

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

ЕПАНЧИНЦЕВА АННА ВАЛЕРЬЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И СФЕРИЧЕСКИХ
НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА В СОСТАВЕ НЕКОВАЛЕНТНЫХ АССОЦИАТОВ**

02.00.10 биоорганическая химия

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:
кандидат химических наук
Пышная Инна Алексеевна**

Новосибирск-2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	7
2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЗОЛОТОЙ ПОВЕРХНОСТИ С РАЗЛИЧНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	11
2.1. Типы золотой поверхности.....	11
2.1.1. Наночастицы золота: способы синтеза	11
2.1.2. Особенности поверхности золотых электродов	13
2.1.3. Нанокластеры золота.....	14
2.2. Ковалентная связь золота с другими химическими элементами	14
2.2.1. Ковалентная связь золота с серой	14
2.2.1.1. Лиганды, присоединяемые к золоту через тиольную группу и ее аналоги	14
2.2.1.1.1. Присоединение НК через тиольную и фосфотиоатную группу	15
2.2.1.1.2. Присоединение полиэтиленгликоля	15
2.2.1.1.3. Другие молекулы, присоединяемые к золоту через тиольную связь	16
2.2.1.2. Дальнейшая модификация тиольных лигандов.....	17
2.2.1.3. Устойчивость тиольной связи	18
2.2.2. Ковалентная связь золота с селеном и теллуром	19
2.2.3. Ковалентная связь золота с углеродом.....	19
2.2.3.1. Соли производных катиона диазония.....	19
2.2.3.2. Ароматические изоцианиды	20
2.2.3.3. Ароматические и алифатические алкины и алканы.....	21
2.3. Взаимодействие золота с различными группами лигандов	21
2.3.1. Взаимодействие золота с ионами.....	22
2.3.2. Взаимодействие золота с низкомолекулярными соединениями	22
2.3.3. Взаимодействие золота с высокомолекулярными органическими соединениями	26
2.4. Взаимодействие НЧЗ и соединений пептидной природы	27
2.4.1. Взаимодействие золота с аминокислотами.....	27
2.4.2. Взаимодействие золота с белками сыворотки крови	28
2.4.2.1. Взаимодействие золота с альбуминами	29
2.4.2.2. Взаимодействие НЧЗ с убиквитином, миоглобином, гемоглобином и другими белками	32
2.4.2.3. Стрептавидин, авидин, антитела.....	34
2.4.3. Методы и подходы к поиску пептидных последовательностей, взаимодействующих с НЧЗ	34

2.4.4. Методы детекции адсорбции белков на НЧЗ, основанные на измерении флуоресценции аминокислот	36
2.5. Взаимодействие НЧЗ с нуклеиновыми кислотами	38
2.5.1. Взаимодействие золота с азотистыми основаниями, нуклеозидами, нуклеотидами..	39
2.5.2. Взаимодействие НК, несущих фосфотиоатную модификацию, с НЧЗ.....	40
2.5.3. Нековалентное взаимодействие немодифицированных НК с НЧЗ	42
2.5.3.1. Фундаментальные исследования	42
2.5.3.1.1. Блочные олигонуклеотиды: polyA-тракт	42
2.5.3.1.2. Трехблочные олигонуклеотиды	45
2.5.3.2. Закономерности взаимодействия НЧЗ и НК, полученные в прикладных исследованиях	48
2.5.4. Нековалентное взаимодействие НК, несущих тиольную группу, с НЧЗ.....	49
2.5.5. Механизм нековалентного взаимодействия НК с НЧЗ.....	52
2.5.5.1. Теория ДЛФО	52
2.5.5.2. Влияние соли и растворителя.....	54
2.5.5.3. Роль гидрофобных взаимодействий	55
2.5.5.4. Изотерма адсорбции Лэнгмюра	56
2.5.5.5. Конформация НК при взаимодействии с поверхностью золота.....	57
2.5.5.6.Адсорбция одно- и двуцепочечных НК	58
2.5.5.7. Адсорбция длинных и коротких НК.....	59
2.5.5.8. Атомы, отвечающие за связывание азотистых оснований с поверхностью золота.	59
2.6.1. Селекция ДНК, РНК и пептидов, специфичных к различным материалам	61
2.6.2. Аналитическое применение нековалентных ассоциатов НЧЗ и НК	64
2.6.2.1. Детекция мишеней в растворе.....	65
2.6.2.1.1. Детекция ДНК/РНК-мишеней	65
2.6.2.1.2. Детекция мишеней ненуклеотидной природы	66
2.6.2.2. Детекция однонуклеотидных замен в НК	68
2.6.2.3. Детекция метилированных участков ДНК.....	69
2.6.3. Каталитические свойства ассоциатов НЧЗ с НК	69
2.6.4. Проникновение в клетки и ткани.....	70
3.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	72
3.1. Реагенты	72
3.2. Синтетические олигонуклеотиды	73
3.3. Оборудование	75
3.4. Методы	76

3.4.1. Осаждение ДНК 2 % LiClO ₄ в ацетоне.....	76
3.4.2. Осаждение ДНК этанолом.....	76
3.4.3. Выделение и характеристика олигонуклеотидов.....	76
3.4.4. Определение концентрации ДНК и НЧЗ по оптической плотности.....	76
3.4.5. Электрофорез в полиакриламидном геле.....	77
3.4.6. Электрофорез в агарозном геле.....	77
3.4.7. Полимеразная цепная реакция.....	78
3.4.8. Введение радиоактивного фосфата на 5'-конец НК.....	78
3.4.9. Синтез НЧЗ.....	78
3.4.10. Методы расчетов.....	78
3.4.11. Статистические методы.....	78
3.5. SELEX.....	78
3.5.1. Схема раунда SELEX.....	78
3.5.2. Получение одноцепочечной библиотеки.....	79
3.5.3. Стабилизация НЧЗ с помощью polyA перед селекцией.....	80
3.5.4. Селекция с промежуточной амплификацией.....	80
3.5.5. Селекция с применением агарозного электрофореза (EMSA-SELEX).....	80
3.5.6. Контрселекция к наночастицам серебра.....	80
3.6. Получение ассоциатов НЧЗ с НК и анализ их устойчивости.....	81
3.6.1. Получение ассоциатов НЧЗ с НК в концентрированных условиях.....	81
3.6.2. Получение ассоциатов НЧЗ с НК в разбавленных условиях.....	81
3.6.3. Получение ассоциатов НЧЗ с НК в средних условиях.....	81
3.6.4. Устойчивость ассоциатов НЧЗ-НК в солевых и буферных условиях.....	81
3.6.5. Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-НК с HS-PEG-COOH, BSA, HSA, глутатионом.....	82
3.6.6. Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-НК с линейным PEI.....	82
3.6.7. Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-siPHK с липидной оболочкой.....	82
3.6.8. Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с TGA и MUA.....	82
3.6.9. Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с желатином.....	82
3.6.10. Приготовление «цитозоля».....	83
3.6.11. Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с FBS и «цитозолем».....	83
3.6.12. Десорбция олигонуклеотидов с поверхности НЧЗ.....	83
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	84
4.6. Анализ связывания НК с НЧЗ с помощью электрофореза в агарозном геле.....	84
4.6.1. Разработка методики анализа подвижности ассоциатов.....	85

4.6.2. Выбор буферного раствора и содержания агарозы в геле.....	86
4.6.3. Оценка сродства НК с НЧЗ.....	87
4.6.4. Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами	95
4.2. Расчетные оценки нековалентного связывания НК с НЧЗ.....	100
4.2.1. Оценка равновесного состояния системы.....	100
4.2.2. Расчет констант связывания модельных НК с НЧЗ	101
4.2.3. Плотность покрытия НК на НЧЗ.....	105
4.2.4. Режимы связывания НЧЗ и НК	105
4.2.5. Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами	106
4.3. Селекция <i>in vitro</i> олигонуклеотидов, высокоаффинных к НЧЗ.....	111
4.3.1. Условия селекции	111
4.3.2. Электрофоретический анализ путей селекции	112
4.3.3. Секвенирование отобранных в результате селекции библиотек.....	115
4.3.3.1. Анализа нуклеотидного состава библиотек.....	115
4.3.3.2. Частоты встречаемости гексануклеотидов и их комплементов.....	116
4.3.3.3. Анализ вариативности встречаемости k-нуклеотидов по позициям при селекции. Картирование случайного участка библиотеки.....	116
4.3.3.4. Шпильчатые структуры в библиотеках и их влияние на селекцию	118
4.3.4. Последовательности возможных аптамеров и значения констант диссоциации.....	119
4.3.5. Исследование кинетики связывания аптамерных и контрольных олигонуклеотидов с НЧЗ.....	121
4.4. Применение нековалентного связывания с НЧЗ для доставки siРНК в клетки	126
4.4.1. Дуплексы НК, использованные в работе	128
4.4.2. Подбор условий для нековалентного связывания дуплексов НК с НЧЗ.....	128
4.4.3. Различия в связывании одно- и двуцепочечных НК с НЧЗ.....	133
4.4.4. Масштабирование сборки ассоциатов НЧЗ и дцНК и исследование их стабильности при хранении.....	137
4.4.5. Исследование устойчивости НК в составе нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК к деградации в растворах FBS и «цитозоля»	140
4.4.5.1. Схемы исследования нуклеазной устойчивости НК в составе ассоциатов с НЧЗ.....	140
4.4.5.2. Сравнение факторов в растворе FBS и «цитозоле», влияющих на ассоциаты НК и НЧЗ	142
4.4.5.3. Исследование деградации и десорбции немодифицированных НК и их ассоциатов с НЧЗ	144
4.4.5.3.1. Деградация немодифицированных оцНК	144

4.4.5.3.2. Десорбция полноразмерных немодифицированных оцНК	144
4.4.5.3.3. Дegrаdация многослойных ассоциатов НЧЗ с немодифицированными НК	146
4.4.5.3.4. Нуклеазная устойчивость дцРНК	147
4.4.5.3.5. Дegrаdация и десорбция полноразмерных оцНК с ФГ-группами	147
4.4.5.3.6. Дegrаdация и десорбция дцРНК с ФГ-группами	147
4.4.6. Создание многослойных конструкций на основе НЧЗ для доставки дцРНК в клетки	148
4.5. Заключение.....	152
5. ВЫВОДЫ	154
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	156
7. СПИСОК ТЕРМИНОВ	160
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161

1. ВВЕДЕНИЕ

Создание эффективных транспортеров терапевтических молекул, в частности, терапевтических нуклеиновых кислот (НК), является одной из наиболее актуальных проблем современной фундаментальной медицины [1]. Не менее важной задачей является разработка сенсоров для выявления широкого круга мишеней (нуклеиновых кислот, токсинов, лекарственных препаратов, наркотиков и др.) с низким пределом чувствительности. Как правило, системы диагностики мишеней нуклеотидной природы работают за счет взаимодействия аптамер-мишень или комплементарных НК/НК взаимодействий [2].

Наночастицы золота (НЧЗ) – уникальный материал в качестве носителя НК для создания сенсоров и систем внутриклеточной доставки НК благодаря своим физико-химическим свойствам: спектральным характеристикам, нетоксичности, устойчивости при хранении, простому способу синтеза и последующей модификации [3]. Широко распространено присоединение НК за счёт образования ковалентной связи Au-S. Ковалентные ассоциаты НЧЗ и НК стали повсеместно изучаться после пионерских работ Чада Миркина с соавторами [4] благодаря потенциальной возможности гибридизации олигонуклеотидов, присоединенных к НЧЗ, с комплементарными олигонуклеотидами. Однако НК, в том числе присоединенные ковалентно, способны взаимодействовать с поверхностью золота нековалентно за счет образования электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных связей, причем взаимодействие зависит от длины и нуклеотидной последовательности молекулы, одно- и двуцепочечного состояния, структурированности молекулы, также свой вклад вносят как совокупный заряд фосфатных групп, так и индивидуальные свойства азотистых оснований (гидрофобность, наличие и заряд экзоциклических аминогрупп) [5].

Методы исследования природы взаимодействия НК с поверхностью золота разнообразны: спектроскопические, колориметрические, электрохимические [6]. Наблюдаемые закономерности зависят от типа золотого субстрата (пленки, электроды, наночастицы различного размера и формы) и адсорбируемых молекул, условий инкубации, присутствия вспомогательных реагентов, метода исследования. Из огромного массива публикаций о связывании НК с поверхностью золота можно выделить несколько основных идей о механизме их взаимодействия, однако единой доказанной и согласованной модели связывания среди них нет. Эта несогласованность выводов разных исследователей – следствие сложности учета комплексного влияния множественных факторов на связывание НК с поверхностью золота. Важно отметить, что нековалентные взаимодействия НЧЗ и НК в низкосолевых условиях на данный момент практически не описаны в литературе.

Целью работы было систематическое исследование закономерностей нековалентного взаимодействия сферических наночастиц золота (НЧЗ) диаметром $12,7 \pm 2$ нм с нуклеиновыми кислотами в условиях, максимально исключающих влияние сторонних факторов, и анализ стабильности нековалентных ассоциатов НЧЗ и нуклеиновых кислот в различных средах.

Задачи, которые решали в рамках работы, включали в себя:

- (1) разработку подхода к анализу нековалентного взаимодействия НЧЗ с одноцепочечными олигонуклеотидами по электрофоретической подвижности и коллоидной стабильности НЧЗ;
- (2) количественный анализ связывания НЧЗ с олигонуклеотидами для сравнения аффинности к НЧЗ олигонуклеотидов, отличающих по длине и нуклеотидному составу, а также для оценки стабильности полученных ассоциатов в различных средах;
- (3) исследование влияния последовательности и структуры олигонуклеотидов на их взаимодействие с НЧЗ;
- (4) получение ассоциатов НЧЗ и дуплексов НК с наиболее плотным олигонуклеотидным покрытием;
- (5) изучение стабильности ассоциатов НЧЗ-НК в условиях, имитирующих клеточный цитозоль и исследование потенциала ассоциатов на основе НЧЗ для доставки терапевтических НК в живые клетки на примере подавления флуоресценции белка GFP под действием siРНК.

Научная новизна представленной работы заключается в исследовании сложного комплекса нековалентных взаимодействий стабилизированной цитрат-ионами поверхности НЧЗ и олигонуклеотидов в условиях, максимально исключающих влияние растворителя, компонентов буферных растворов, соединений-стабилизаторов НЧЗ, с использованием одновременно нескольких методов количественной оценки эффективности нековалентного взаимодействия НЧЗ и НК. Впервые в данной работе проведен анализ высокопроизводительного секвенирования пула ДНК-последовательностей, отобранных в процессе селекции *in vitro* к НЧЗ. Впервые в данной работе был применен модифицированный метод электрофореза в агарозном геле, позволяющий быстро оценить скорость связывания НЧЗ с НК и прочность образующихся ассоциатов.

Теоретическая значимость работы состоит в глубоком фундаментальном анализе влияния многих параметров на связывание НК с НЧЗ, выявлении благоприятных условий образования нековалентных ассоциатов, а также установлении влияния первичной и

вторичной структуры олигонуклеотидов¹ на эффективность их взаимодействия с НЧЗ. В работе описана предполагаемая модель механизма адсорбции олигонуклеотидов на поверхность НЧЗ. Понимание деталей этого механизма позволит конструировать НК, способные наиболее прочно связываться с поверхностью НЧЗ, что важно для создания разнообразных сенсоров и средств доставки на их основе.

Практическая значимость исследования: предложен удобный быстрый способ получения нековалентных ассоциатов наночастиц золота (НЧЗ) и нуклеиновых кислот, как одноцепочечных, так и двуцепочечных, при необходимости декорированных дополнительными слоями белков, полиэтиленгликоля, липидов. В работе предложен способ быстрой оценки сродства олигонуклеотидов к НЧЗ путем проведения электрофоретического разделения в агарозном геле.

Методология и методы исследования

Основные результаты работы получены методами измерения свечения по Черенкову и интенсивности флуоресценции, методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, SELEX), динамического светорассеяния и гель-электрофореза как в вертикальном, так и в горизонтальном варианте.

Положения, выносимые на защиту

1. Быстрая и прочная адсорбция одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов на поверхности свежеприготовленных цитратным методом сферических наночастиц золота без добавления веществ-стабилизаторов и изменения pH и ионной силы раствора достигается после их инкубации при 56 °C в течение 30 минут.
2. Электрофоретический анализ ассоциатов НЧЗ с олигонуклеотидами позволяет получить быструю оценку относительного сродства олигонуклеотидов одной длины к НЧЗ.
3. В изученных условиях связывания одинаковые по длине олигоаденилаты и олиготимидилаты обладают повышенной аффинностью к НЧЗ, а олигоцитидилаты – пониженной.
4. Олигонуклеотидное покрытие устойчиво к вытеснению высокомолекулярными тиол-содержащими соединениями и стабильно при хранении в течение 7 месяцев.
5. Неструктурированные G,T,A-богатые последовательности обладают высокой аффинностью к НЧЗ, а любой тип взаимодействия азотистых оснований между собой отрицательно влияет на эффективность адсорбции олигонуклеотидов на НЧЗ в низкосолевых условиях.

¹ Здесь и далее под олигонуклеотидами подразумеваются олигодезоксирибонуклеотиды.

6. Введение двух фосфорилгуанидиновых остатков вблизи 3'-конца одной из цепей РНК-дуплекса или одноцепочечной ДНК либо создание многослойной конструкции на основе наночастиц золота и липидной оболочки являются эффективными способами защиты НК, адсорбированных на наночастицах золота, от действия нуклеаз.

7. Предложен способ эффективного покрытия наночастиц золота дуплексами олигонуклеотидов вплоть до 160 дуплексов на одну НЧЗ диаметром $12,7 \pm 2$ нм.

Апробация и публикация результатов

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Результаты, представленные в работе, достоверны и апробированы на научных конференциях всероссийского и международного уровня: Всероссийской конференции по наноматериалам НАНО-2016, International Symposium of Materials on Regenerative Medicine ISOMRM 2017, международном семинаре "Targeting RNA World" 2018, 3rd International Symposium on Nanoparticles-Nanomaterials and Applications ISN² A 2018, симпозиуме «Терапевтические нуклеиновые кислоты» в рамках мультikonференции «Биотехнология – медицине будущего» 2019.

Личный вклад автора

Синтез и характеристика НЧЗ, за исключением ПЭМ, а также очистка всех олигонуклеотидов после введения ³²P и очистка олигорибонуклеотидов после автоматического синтеза проведены лично автором. Условия сборки ассоциатов, содержащих липидную оболочку, оптимизированы совместно с к.х.н. И.С.Довыденко. Оптимизация условий сборки многослойных ассоциатов, содержащих слой полиэтиленimina, проведена совместно с В.В.Шашковой. Сборка и характеристика (за исключением ПЭМ) всех типов ассоциатов НЧЗ и НК, в том числе многослойных, проведена лично автором. Все эксперименты по оценке степени сродства олигонуклеотидов к НЧЗ и прочности олигонуклеотидного слоя к вытеснению, нуклеазной деградации и при длительном хранении выполнены лично автором. Оценка значений констант диссоциации, констант Лэнгмюра и времени полусвязывания проведены совместно с к.х.н. П.Е.Воробьевым. Стратегия экспериментов по селекции разработана под руководством д.х.н. Д.В.Пышного. Селекция *in vitro* проведена лично автором. Анализ вторичных структур олигонуклеотидов проведен совместно с к.ф.-м.н. А.А.Ломзовым.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 194 страницах, содержит 63 рисунка и 22 таблицы. Библиография включает 410 литературных источников.

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЗОЛОТОЙ ПОВЕРХНОСТИ С РАЗЛИЧНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Наночастицы золота – уникальный материал для создания разнообразных сенсоров и систем внутриклеточной доставки благодаря своим физико-химическим свойствам. Функционализация НЧЗ позволяет повысить устойчивость частиц к агрегации, их биосовместимость, изменить реакционную способность или физические свойства. Функциональные группы вводят на поверхность золота на этапе синтеза нанокластеров (НКЗ) или наночастиц золота либо проводят модификацию предварительно сформированных НЧЗ или металлической поверхности. Данный обзор посвящен преимущественно сферическим наночастицам золота, обладающим диаметром 10-20 нм, также описаны некоторые варианты функционализации плоской поверхности золота в форме золотых пленок и электродов. В обзоре рассмотрены все основные варианты ковалентной модификации золотой поверхности, а также вопросы ковалентного и нековалентного взаимодействия белков и нуклеиновых кислот с НЧЗ. Особое внимание уделено обсуждению возможных механизмов нековалентного взаимодействия НЧЗ с НК и описанию применения нековалентных ассоциатов НЧЗ и НК.

2.1. Типы золотой поверхности

2.1.1. Наночастицы золота: способы синтеза

Исследователи во всем мире работают со множеством разновидностей наночастиц золота: сферическими, кубическими, звездообразными, наностержнями и другими [7]. На свойства наночастиц влияет не только их форма, но и размер [8]. НЧЗ можно синтезировать химически при восстановлении HAuCl_4 или физическими методами, например, методом лазерной абляции [9, 10]. Химический синтез позволяет получить НЧЗ заданного размера с минимальными отклонениями, а метод лазерной абляции дает частицы с широким распределением по размеру, однако не покрытых никаким стабилизирующим агентом, что бывает необходимо при исследовании взаимодействия «голой» золотой поверхности с разными веществами [11, 12]. Поверхность НЧЗ после химического синтеза обычно сольватирована ионами электролитов, такими как цитрат натрия, бромид гексадецилтриметиламмония (СТАВ), полистиролсульфонат натрия (PSS), полиэтилендиаллилдиметиламин гидрохлорид (PDDAC) [13] и др. Такое покрытие поверхности НЧЗ влияет на их способность взаимодействовать с различными биомолекулами. Так, обработка НЧЗ фенилборной кислотой делала возможным связывание с гидроксильными группами полисахаридов бактерий, а НЧЗ, модифицированные

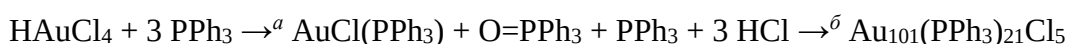
сиаловыми кислотами, могли взаимодействовать с молекулами гемагглютина на поверхности вирусов [14].

Коммерчески доступен широкий ассортимент НЧЗ, модифицированных на этапе синтеза полиэтиленгликолем (PEG), декстраном, сывороточным альбумином быка (BSA), SiO₂ и содержащих в результате на поверхности amino-, карбоксильные, гидроксильные группы [15] (таблица 1).

Таблица 1. Реагенты, используемые в синтезе НЧЗ и размер получаемых НЧЗ.

реагент	диаметр НЧЗ, нм	ссылки
PPH ₃	1,5	[16]
алкиламины	2,5 – 7,0	[17]
Трис (трис(гидроксиметил)аминометан)	59	[18]
PDMAЕМА+PEG	29	[19]
PDMAЕМА+PEG+EG	34	[19]
дендримеры	2 - 4	[20, 21]
BSA	24 - 39	[22, 23]
серрапептаза	20 - 200	[24]
аскорбиновая кислота	5 - 30	[25]
глюкоза	24	[18]
NaBH ₄	30-40	[26]
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	13	[27]

НЧЗ диаметром 1,5 нм, стабилизированные трифенилфосфином, получали при одностадийном синтезе с использованием борогидрида натрия в качестве восстановителя [16] по схеме:



a – толуол, вода, бромид тетраоктиламмония, 5 мин при 25 °С, *б* – 10 эквивалентов борогидрида натрия.

Нанокристаллы золота диаметром 2,5-7,0 нм, стабилизированные первичными аминами, синтезировали по одной из двух схем [17]:

Схема 1.

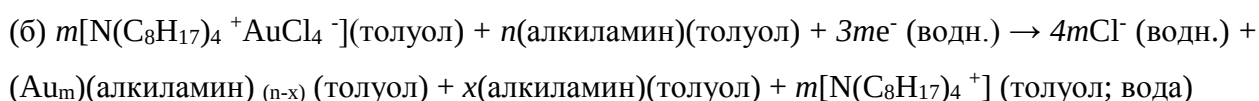
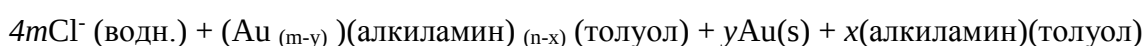


Схема 2.



Использование белка, например, BSA [22, 23], серрапептазы [24] или глутатиона и аминокислот (гистидина, цистеина) [28] как восстановителя при синтезе позволяло получить стабилизированные НЧЗ. В качестве восстановителя при синтезе НЧЗ также использовали аскорбиновую кислоту [25], глюкозу и Трис (гидроксиметиламинометан) [18].

НЧЗ в процессе синтеза встраивали в структуру РАМAM-дендримера (полиамидоамин), содержавшего PEG- α -токоферилсукцинат (α -TOS), PEG-аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту, остаток флуоресцеина. Такие частицы можно использовать в антираковой терапии благодаря свойствам входящего в их состав α -TOS, причем было показано, что α -TOS в этой форме проявлял более высокую терапевтическую активность по сравнению со свободным α -TOS [20]. Также лиганды, например, флуоресцеин и фолиевая кислота, вводили в дендример, уже содержащий НЧЗ [21].

Описана одностадийная схема синтеза НЧЗ, стабилизированных PEG, с применением полидиметиламиноэтилметакрилата (PDMAEMA) в смеси с PEG. При использовании PDMAEMA в смеси с PEG и этиленгликолем получали НЧЗ, несущие и PEG-, и карбоксильные группы. Такие НЧЗ проявляли специфичность в связывании белков: связывали положительно заряженный химотрипсин и не связывали BSA [19].

Широко используются на практике НЧЗ, полученные методом цитратного и методом боргидридного восстановления HAuCl_4 . Механизм образования цитратных НЧЗ исследовали методами малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и спектроскопии блискоуглового рентгеновского поглощения (XANES). Предположили, что этот механизм состоял из четырех стадий: 1. быстрое начальное образование маленьких ядер, 2. объединение ядер в частицы большего размера, 3. медленный рост при непрерывном восстановлении и 4. последующее быстрое восстановление, завершающееся с истощением всего предшественника [27].

У свежеприготовленных цитратных НЧЗ доля окисленных атомов золота Au(I) на поверхности составляла 14 % и при адсорбции тиолов оставалась неизменной независимо от плотности покрытия поверхности тиолами [29].

2.1.2. Особенности поверхности золотых электродов

В электрохимических методах применяются золотые электроды [30, 31], в спектроскопических – субстраты из разных материалов, например, титановые или кремниевые [32, 33], покрытые слоем золота [34] толщиной в десятки нм [32].

Отличие поверхности электродов и пленок от НЧЗ заключается в том, что плотность покрытия одним и тем же лигандом на электродах ниже, чем на НЧЗ из-за меньшей плотности поверхностных дефектов [34]. Также на плоской поверхности отталкивание

между соседними адсорбированными молекулами больше, чем на сферической. С другой стороны, плоская поверхность существенно стабильнее коллоидных растворов наночастиц.

2.1.3. Нанокластеры золота

Структура нанокластеров золота включает в себя ядро и оболочку. Ядро состоит только из атомов золота, а оболочка состоит из молекул или ионов лигандов и может содержать атомы золота, образующие фрагменты вида $-\text{Au}-\text{X}-\text{Au}-$. И ядро, и оболочка состоят из определенного количества атомов. Состав кластеров золота, содержащих тиольные [35], селенольные, галогенные и фосфиновые [36] лиганды, можно описать общей формулой $[\text{L}_s\text{Au}_n\text{X}_m]^q$, где кластер Au_n с зарядом q ($q=0, \pm 1, \pm 2$) стабилизирован электроноакцепторными лигандами X ($\text{X} = \text{SR}$, галоген) и слабо связанными лигандами L (PR_3) [37].

Описаны методы получения нанокластеров золота с трифенилфосфином и его производными, например, dppp (1,3-бис(дифенилфосфино)пропан) [38, 39, 40, 41]. Их обычно получали при восстановлении солей $(\text{Au}(\text{PPh}_3)\text{Cl})$, $(\text{PhPy}_2\text{P})\text{AuCl}$ $(\text{Au}_2(\text{dppm})(\text{NO}_3)_2)$ (dppm - 1,1-бис(дифенилфосфино)метан), $\text{Au}_4(\text{PPh}_3)\text{Cl}_4$, $[\text{Au}_6(\text{dppp})_4](\text{NO}_3)_2$.

2.2. Ковалентная связь золота с другими химическими элементами

2.2.1. Ковалентная связь золота с серой

Золото может образовывать ковалентные связи с атомами серы, селена, теллура, углерода в составе различных лигандов, при этом самым распространенным способом введения функциональной группы является создание связи $\text{Au}-\text{S}$. В качестве якорной группы для химической модификации после синтеза наиболее часто используется тиогруппа $-\text{SH}$ [42, 43, 44, 45], ее вариант в виде тригексилтиольной группы [46], либо дисульфиды [47, 48, 49, 50], либо как вариант дисульфида – производные дитиана [49, 51, 52, 53] благодаря образованию прочной ковалентной связи между серой и золотом [54] с высокой плотностью покрытия [55].

2.2.1.1. Лиганды, присоединяемые к золоту через тиольную группу и ее аналоги

Посредством образования связи $\text{Au}-\text{S}$ к HCl присоединяли самые разные молекулы. Например, олигонуклеотиды, причем как за 5'- [56, 57], так и за 3'-конец [58, 59, 60], пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) [61], флуоресцентные остатки - пирен [62, 63], лиссамин (производное родамина) [64], ароматические и алифатические углеводороды - тиофенол, п-терпенилмеркаптан, п-бифенилмеркаптан, октадецилмеркаптан [65], 11-меркаптоундекановую кислоту [66], мочевины [67], диацилдиаминопиридин [63], меркаптобензимидазол [68], нитрилотрикарбоновую кислоту для комплексообразования с ионами Ni^{2+} [69] или Co^{2+} [70], металлоорганические соединения – ферроцен [71], полимеры – ПАММ [72], белки - протеин А, взаимодействующий с Fc-фрагментами

иммуноглобулинов G [73, 74], GB3 [75], олигосахариды [76], маннозу [77] и глюкозу [78] для взаимодействия с конканавалином, хитозан, модифицированный взаимодействием с гидрохлоридом иминотиолана [79] и др. Остановимся подробнее на взаимодействии НЧЗ с некоторыми лигандами.

2.2.1.1.1. Присоединение НК через тиольную и фосфотиоатную группу

Связывание НК, содержащих тиольную группу или ее аналоги, с НЧЗ осуществляли в основном с использованием одного из двух методов. Первый – традиционный так называемый salt-aging метод: длительная (16-72 ч) инкубация НЧЗ в присутствии значительного (100-1000-кратного) избытка НК с постепенным увеличением концентрации соли в растворе, чаще всего NaCl, до 100-300 мМ [80, 81]. Второй метод, предложенный Лиу с соавторами [82], заключался в краткой – в течение нескольких минут – инкубации НЧЗ с НК при pH 3,0 с последующим доведением pH до 7,0 и позволял получить столь же высокую плотность покрытия, как и в первом методе [83] (рис. 1).

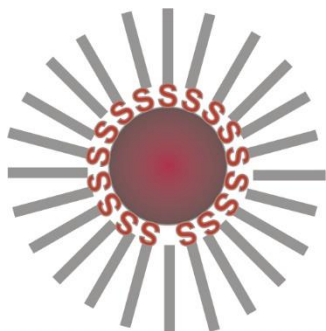


Рисунок 1. Схематичное изображение НЧЗ с высокой плотностью присоединенных ковалентно молекул НК.

Описан вариант присоединения НК к поверхности золота через фосфотиоатную группу модифицированной НК [84, 85, 86, 87, 88]. В этом случае атом серы, как и в тиольной группе, участвовал во взаимодействии с золотом.

2.2.1.1.2. Присоединение полиэтиленгликоля

Очень популярный лиганд для присоединения к НЧЗ через тиольную группу – это полиэтиленгликоль (PEG). Для образования ковалентной связи PEG и НЧЗ используют тиолсодержащий PEG, например, моногидроксид(меркаптоундец-11-ил)тетраэтиленгликоль $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_4-\text{OH}$ [89] или HS-PEG-NH_2 ($M_r=2204$) [90]. НЧЗ, связанные с таким лигандом, становились очень устойчивыми к агрегации даже в условиях низких значений pH и высокой ионной силы раствора. PEG мог связываться с НЧЗ и нековалентно, причем высокомолекулярный PEG также стабилизировал НЧЗ в экстремальных условиях, как и при ковалентном связывании [91]. Также PEG, содержащий тиольную группу, в комбинации с Tween 20 использовали для присоединения тиольных НК к наностержням

золота, поскольку они покрыты СТАВ (бромид гексадецилтриметиламмония) в качестве стабилизирующего агента, плохо вытесняемого с их поверхности [92].

Полиэтиленгликоль с одной тиольной группой при связывании с НЧЗ (образование связи качественно определяли методом LSPR (локализованного поверхностного плазмонного резонанса)) образовывал грибообразную структуру, которая не препятствовала присоединению таких малых молекул, как аденин и меркаптобензимидазол, но не позволяла адсорбироваться BSA, вероятно, из-за стерических затруднений. Данные по адсорбции аденина, меркаптобензимидазола и BSA получали из спектров оптического поглощения и интенсивности флуоресценции флуоресцеина [93].

2.2.1.1.3. Другие молекулы, присоединяемые к золоту через тиольную связь

Меркаптобензимидазол в зависимости от pH взаимодействовал с НЧЗ в форме тиолат-иона (pH 7,9 и 12,5) или тиона (pH 1,4) По данным SERS (поверхностно усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния) получали количественные характеристики связывания (таблица 2).

Таблица 2. Характеристики связывания меркаптобензимидазола с НЧЗ.

характеристика	значение pH		
	1,4	7,9	12,5
константа диссоциации $K_D \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$2,14 \pm 0,57$	$4,44 \pm 1,29$	$10,12 \pm 2,48$
свободная энергия Гиббса $-\Delta G$, кДж/моль	$36,11 \pm 0,66$	$37,92 \pm 0,72$	$39,96 \pm 0,61$

Адаптировано из [94].

Тион располагается перпендикулярно поверхности НЧЗ и связывается моновалентно, а тиолат располагается под наклоном, так что и атом серы, и протонированный азот взаимодействуют с золотом [94].

На примере тиофенола показано, что механизм образования связи Au-S зависел от pH раствора: при низком значении pH первоначально имела место физическая сорбция тиола упорядоченным образом с последующим удалением протона и образованием ковалентной связи Au-S, при этом энергия активации очень мала. При высоком значении pH лиганд в форме тиолат-аниона напрямую образовывал ковалентную связь с золотом в случайных сайтах поверхности, этот процесс характеризовался заметной энергией активации (32,7 кДж/моль) [95].

При добавлении к НЧЗ растворов алкандитиолов они немедленно слипались, хотя концентрация лиганда (3 мкМ) была в несколько раз меньше той, что требуется для создания монослоя на поверхности частиц (10 мкМ). В зависимости от длины углеводородной цепи могло происходить взаимодействие как одной SH-группы с одной НЧЗ и образование дисульфидной связи с SH-группой другой молекулы, так и двух SH-

групп с двумя или одной и той же НЧЗ: бо́льшая часть этандитиола и только половина 1,4-бутандитиола и 1,6-гександитиола образовала дисульфидную связь [96]. Связывание двух тиольных групп с разными НЧЗ тем вероятнее, чем длиннее углеводородная цепь, что показано на примере алкандитиолов с длиной цепи 3, 4, 5, 6, 9, 11 атомов С и НЧЗ диаметром 80 нм [97].

Для создания на поверхности плоского золотого субстрата самоорганизованных слоев, содержащих карбоксильные группы, использовали 0,5 мМ спиртовой раствор меркаптоундекановой кислоты (MUA) или 50 мкМ меркаптоянтарной кислоты [34], 0,5 мМ 11-амино-1-ундекантиола гидрохлорид – для введения аминогрупп, 0,5 мМ 11-меркаптоундеканол и 1-нонантиол – для введения гидроксильных и метильных групп соответственно [98].

2.2.1.2. Дальнейшая модификация тиольных лигандов

Одна из схем дальнейшего модифицирования золотой поверхности – это взаимодействие аминогруппы одной молекулы с карбоксильной группой другой молекулы, активированной в присутствии EDC ((1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид) и NHS (N-гидроксисукцинимид) по реакции [7, 58, 99, 100], приведенной на рисунке 2 А.

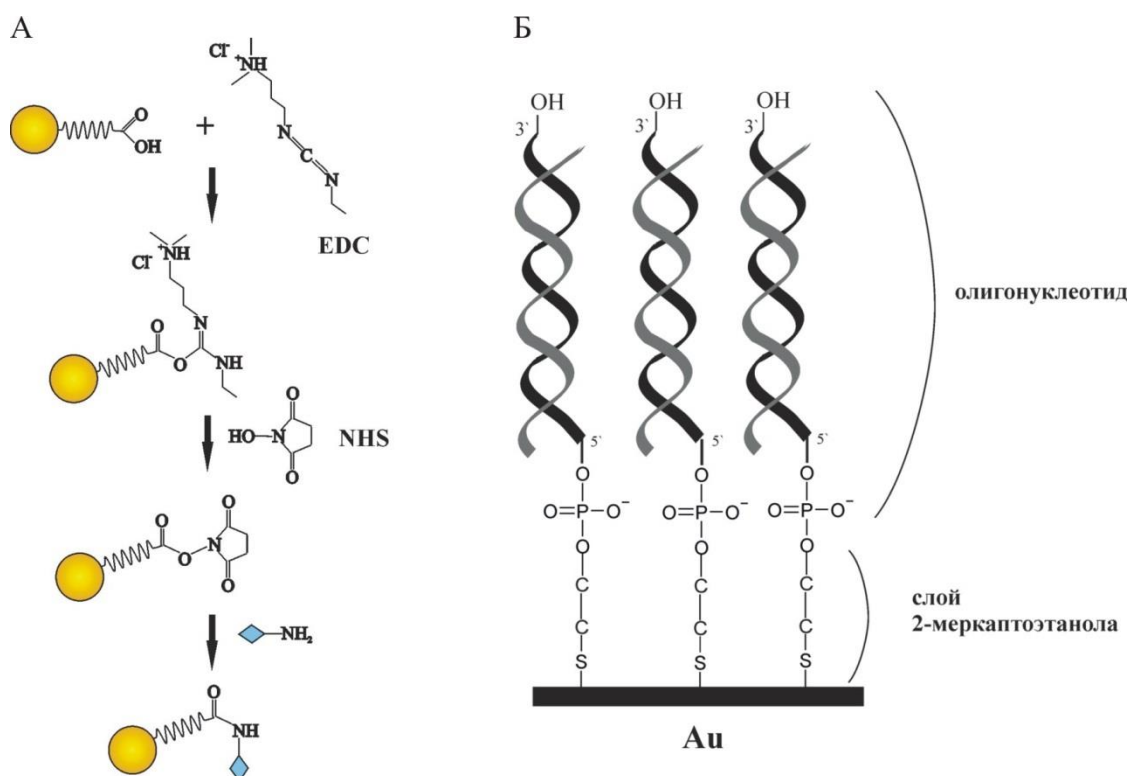


Рисунок 2. Функционализация НЧЗ при участии EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид) и NHS (N-гидроксисукцинимид): А - реакционная схема, Б - пример конструкции с дцДНК.

Описан способ присоединения одной из цепей дцДНК к поверхности золотого электрода, предварительно выдержанного в растворе 2-меркаптоэтанола с образованием самоорганизующегося монослоя в присутствии EDC [101] (рис. 2 Б). В другой работе к золотому электроду, обработанному $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ с образованием связи $\text{Au}-\text{S}$, присоединяли НК, содержащую карбоксильную группу на 5'-конце [87].

Модифицируя лиганды по такой схеме, в их состав вводили различные функциональные группы: фоточувствительный пептид KRAzR [102, 103], дитиольную группу в НК [104, 105], цистеинсодержащий циклический пептид присоединяли к PEG [106], биотин к PAMAM [72], конканавалин А к глюкозе и маннозе [78], фотопорфирин к цистеину [107], BSA и HSA (сывороточный альбумин человека) к MUA [66].

Второй путь последующей модификации НЧЗ – это CuAAC-клик химия – катализируемое Cu (I) азид-алкин циклоприсоединение [108], используемое для присоединения, например, люциферазы к алкину [109], фотопереключаемого ингибитора α -химотрипсина [110, 111], слоя оксида графита [112] (рис. 3 А).

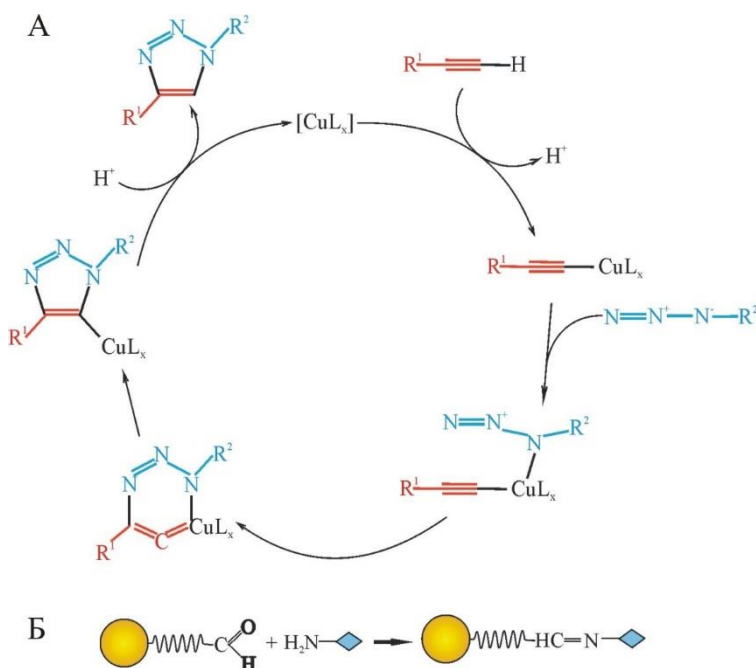


Рисунок 3. Варианты последующей модификации функционализированных НЧЗ. А - схема катализируемого Cu (I) азид-алкин циклоприсоединения, Б - схема взаимодействия альдегидной и аминогрупп (адаптировано из [33]).

Третья схема модификации реализуется, если присоединяемый через тиогруппу лиганд содержит на другом конце альдегидную группу, тогда он может взаимодействовать с аминогруппой другого лиганда по реакции, приведенной на рисунке 3 Б [33].

2.2.1.3. Устойчивость тиольной связи

Достоинства использования лигандов с тиогруппой для связывания с НЧЗ очевидны, однако есть и недостатки: связь $\text{Au}-\text{S}$ подвержена окислению при контакте с воздухом и в

водном растворе [91], а также диссоциирует при высоких значениях pH, высокой температуре, высоком содержании соли в растворе, при этом лишь малая часть ДНК деградирует в этих условиях [113]. Различные тиолы могут участвовать в реакции лигандного обмена, замещая друг друга на поверхности золота [114].

2.2.2. Ковалентная связь золота с селеном и теллуром

Ковалентную связь с поверхностью золота образуют селен- и теллурсодержащие молекулы. Такие лиганды представляют собой диселениды и дителлуриды; при расщеплении связи Se-Se или Te-Te можно присоединить к поверхности золота ароматические и алифатические углеводороды. Взаимодействие золота с лигандом осуществляется либо путем погружения золотой поверхности/электрода в раствор лиганда [32, 115], либо при добавлении лиганда в реакционную смесь при синтезе нанокластеров золота [116, 117].

Нанокластеры золота, содержащие селенольные лиганды, характеризуются более прочной, чем связь Au-S, связью Au-Se: при инкубации в толуоле при 60 °C в течение 2 дней нанокластеров $[\text{Au}_{25}(\text{SC}_8\text{H}_{17})_{18}]$ и $[\text{Au}_{25}(\text{SeC}_8\text{H}_{17})_{18}]$ наблюдали существенное уменьшение интенсивности оптического поглощения на характерных длинах волн в первом случае и никаких существенных изменений – во втором. Однако при увеличении прочности связи Au-Se по сравнению со связью Au-S происходило ослабление связи Se-C по сравнению со связью S-C [117]. Связь Se-C сильнее подвержена расщеплению при окислении под действием воздуха и ультрафиолета, чем связь S-C, с образованием SeO_2 and SeO_3^{2-} [118].

При сравнении прочности связывания с поверхностью золота бензолтиолата и бензолселенолата показано, что дифенилдиселенид вытеснял бензолтиолат с поверхности золота, но не наоборот. Адсорбция дифенилдиселенида оказалась более выгодна, чем дифенилдисульфида – разница в теплоте адсорбции составила ~0,7 ккал/моль [118].

2.2.3. Ковалентная связь золота с углеродом

Взаимодействие НЧЗ или поверхности золотых электродов с солями производных катиона диазония, ароматическими изоцианидами, производными алкинов и алканов приводила к образованию ковалентной связи Au-C, что подтверждалось методами ИК-спектроскопии (инфракрасной спектроскопии).

2.2.3.1. Соли производных катиона диазония

По данным ИК-спектров, а также по сдвигу максимума в спектре поглощения НЧЗ подтверждали образование ковалентной связи Au-C при смешивании раствора НЧЗ диаметром 40 нм с раствором тетрафторбората 4-нитробензолдиазония [119] (рис. 4).

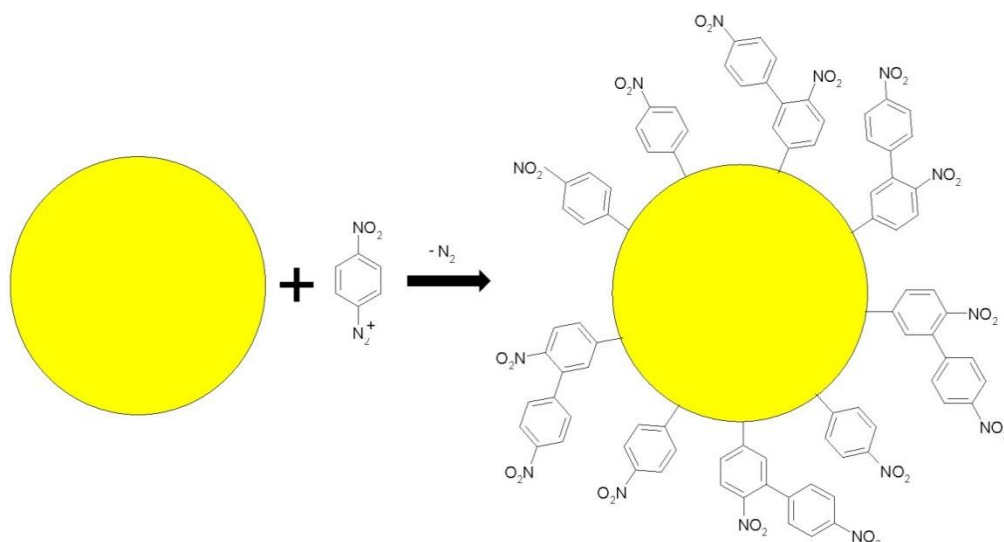


Рисунок 4. Взаимодействие НЧЗ и катиона 4-нитробензолдiazония. Адаптировано из [119].

Другой вариант модификации золотой поверхности – это «печать» на золотых пленках штампами из полидиметилсилоксана, предварительно выдержанных в растворе тетрафторбората 4-нитробензолдiazония или 4-карбоксибензолдiazония [120].

Ароматические углеводороды присоединяли к поверхности золота (золотого электрода) при электрохимическом осаждении солей производных diaзония из раствора [121, 122]. При исследовании методами ИК-, XPS-спектроскопии (рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии), сканирующей силовой микроскопии, эллипсометрии свойств пленок 4-нитробензола и 4-нитробензолтиола, образованных на поверхности золота электрохимически из соответствующей соли diaзония и при спонтанной адсорбции из раствора соответствующего тиола, показано, что при определенных условиях соли diaзония дали более стабильные органическое покрытие, чем тиолы. Тиольное покрытие было более устойчиво к ультразвуковому воздействию, а пленка из солей diaзония – к замещению октадекантиолом, который в одних и тех же условиях вытеснял 100 % 4-нитробензолтиола и 75 % 4-нитробензола [123].

При восстановлении тетрахлоаурата катионом 4-децилбензолдiazония получали стабилизированные связью Au-C НЧЗ диаметром $8,1 \pm 0,8$ нм [124].

2.2.3.2. Ароматические изоцианиды

Образование связи Au-C происходило самопроизвольно при добавлении в раствор НЧЗ ароматических соединений, содержащих одну [125] или две [126] изоцианидные группы. При взаимодействии фенилизотиоцианида, бензилизотиоцианида и 2,6-диметилфенилизотиоцианида методами ИК-спектроскопии подтверждали образование связи Au-C [127].

После добавления в раствор НЧЗ соединения, несущие две изоцианидные группы (1,4-фенилендиизоцианид [128], 4,4'-бифенилдиизоцианид [129]), в низкой концентрации

связывали по две НЧЗ, а в высокой образовывали связь с золотом только за счет одной изоцианидной группы. 1,4-фенилендиизоцианид при добавлении в раствор НЧЗ разного диаметра (6, 14, 23, 40, 57 и 97 нм), вероятно, многократно сшивал их между собой, приводя к аслипанию [128]. Слипание тем интенсивнее, чем больше размер НЧЗ.

2.2.3.3. Ароматические и алифатические алкины и алканы

Алифатические алкины и ароматические производные ацетилена (ацетилен, 1-бутин, 2-бутин, 1-пентин, 2-пентин, фенилацетилен) присоединяли к поверхности золотого электрода электрохимически [130].

Для ковалентного связывания терминальных алкинов (рис. 5) с поверхностью золотого электрода использовали растворы их триметилсилильных производных, образование связи Au-C подтверждали ИК-спектрами, СТМ (сканирующей трансмиссионной микроскопией) и АСМ (атомной силовой микроскопией) [131].

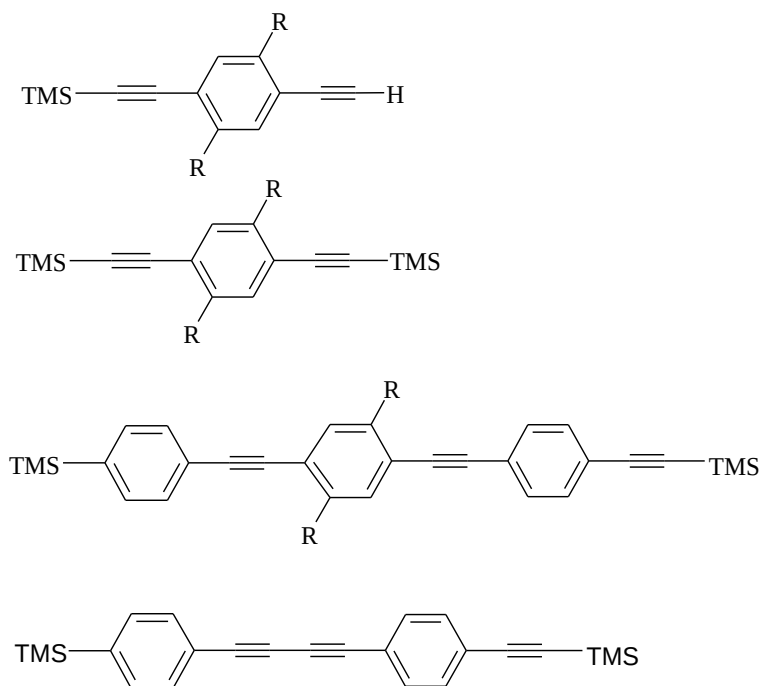


Рисунок 5. Структурные формулы терминальных алкинов. Адаптировано из [131].

Триметилстаннильные производные алканов ($C_4 - C_{12}$) [132] и бензола [133] при взаимодействии с плоской золотой поверхностью также образовывали связь Au-C.

Ароматические углеводороды, несущие две терминальные алкиновые группы, в отличие от своих аналогов, содержащих две изоцианидные группы, связывались с НЧЗ через одну из двух функциональных групп [134].

2.3. Взаимодействие золота с различными группами лигандов

Помимо рассмотренных типов ковалентной связи между золотом и адсорбируемыми молекулами могут образовываться нековалентные связи: электростатические,

гидрофобные, ван-дер-ваальсовы в зависимости от строения молекулы и условий взаимодействия. Остановимся подробнее на примерах этих взаимодействий.

2.3.1. Взаимодействие золота с ионами

НЧЗ начинали агрегировать при ионной силе раствора более 24 мМ, при этом среди галогенид-ионов наблюдали разное по силе сродство к поверхности золота, которое увеличивалось в следующем ряду: $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$, для ионов Cl^- , Br^- , I^- могла иметь место хемосорбция на поверхность золота с возрастанием ковалентного характера связи в ряду Cl^- , Br^- , I^- [135].

Взаимодействие НЧЗ с разными катионами изучали в процессе длительной инкубации с тиольной НК с постепенным добавлением соли. При одинаковом заряде катионы большего радиуса характеризуются меньшей плотностью и легче дегидратируются, чем катионы меньшего радиуса, поэтому катион Cs^+ легче и прочнее адсорбировался на поверхности НЧЗ, чем Li^+ . В итоге плотность покрытия молекулами ДНК была выше для катионов малого радиуса, например, для Li^+ она составляла 130 и 105 мол./НЧЗ (молекул на одну НЧЗ) при ионной силе 300 и 100 мМ, а с Cs^+ 80 и 70 мол./НЧЗ соответственно. Другими словами, Li^+ взаимодействовал сильнее с ДНК, а Cs^+ взаимодействовал сильнее с НЧЗ [136].

2.3.2. Взаимодействие золота с низкомолекулярными соединениями

Взаимодействие NH_3 и HF с поверхностью золота исследовали методом термической программируемой десорбции. Полученные данные свидетельствовали о том, что это слабое, нековалентное взаимодействие, на которое влияло образование водородных связей между адсорбированными молекулами [137]. В другой работе сообщали об обратимой адсорбции CO , а также NH_3 на золотых пленках [138]. При исследовании кинетики адсорбции аммиака на поверхность золота оценивали дифференциальную теплоту его адсорбции, она составила 2-35 ккал/моль [139].

Ряд соединений взаимодействовал с НЧЗ через аминогруппу: меламина [140], аминопроизводное тимина [141], 1-метиламинопирен [142], СТАВ [13] (рис. 6).

Малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый и метиловый зеленый взаимодействовали с поверхностью НЧЗ за счет положительно заряженного атома азота (рис. 6). Взаимодействие характеризовалось следующими значениями свободной энергии адсорбции и площади адсорбции: $-12,5 \pm 0,1$, $-10,0 \pm 0,3$ и $-11,1 \pm 0,1$ ккал/моль, 219 ± 11 Å², 67 ± 9 Å² и 113 ± 5 Å² для малахитового, бриллиантового и метилового зеленого соответственно (рис. 6). Различные молекулярные структуры, особенно вблизи атома азота, создавали разный электростатический потенциал всего сайта адсорбции [143].

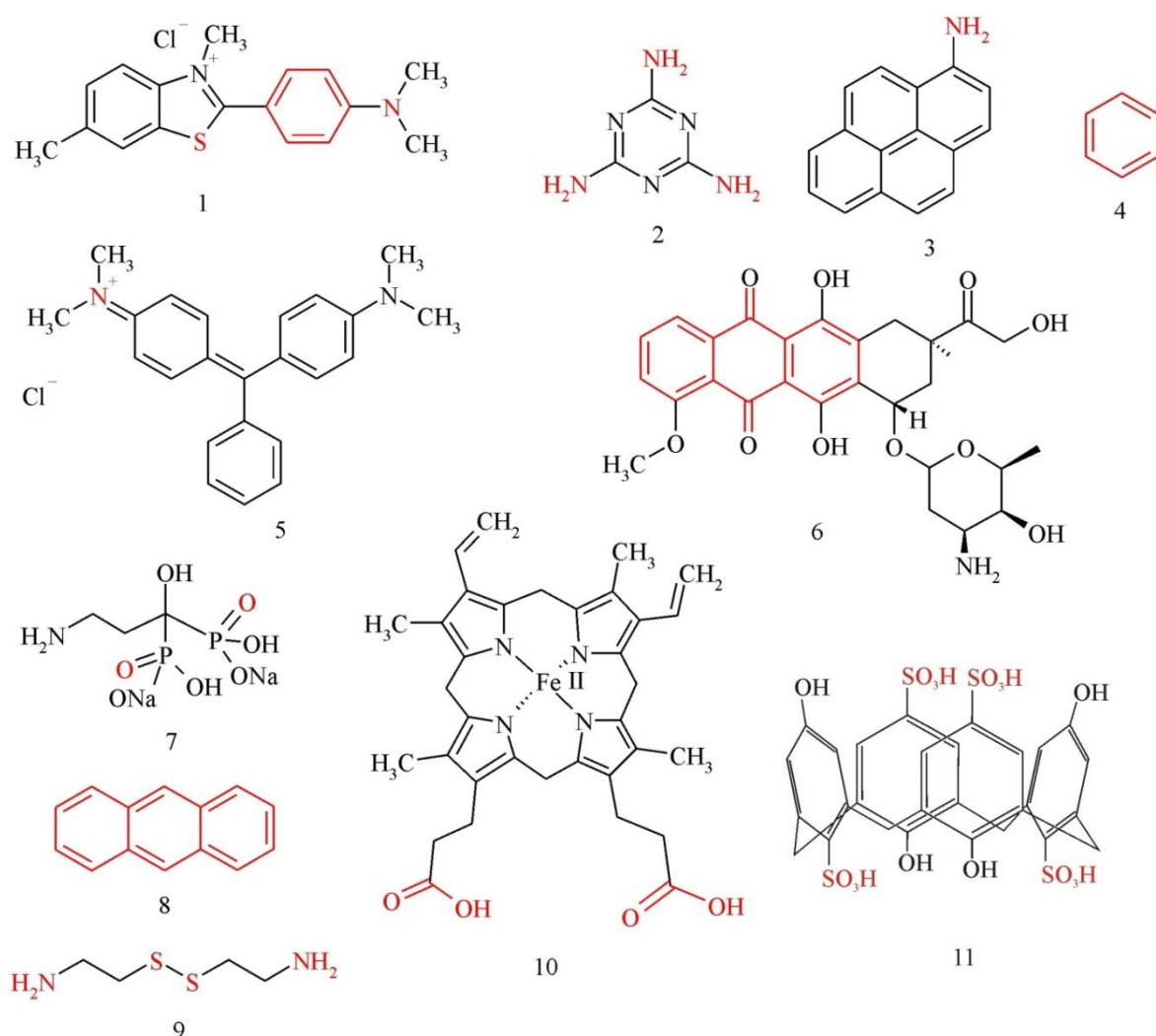


Рисунок 6. Низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с золотом: 1 – тиофлавин Т, 2 – меламина, 3 – 1-аминопирен, 4 – бензол, 5 – малахитовый зеленый, 6 – доксорубин, 7 – памидронат натрия, 8 – антрацен, 9 – цистамин, 10 – гем b, 11 – каликс[4]арен, красным выделены атомы и группировки, участвующие в связывании с золотом.

На примере стекла, покрытого НЧЗ диаметром 30-100 и 200-400 нм, методами ИК-спектроскопии показано, что в зависимости от условий при взаимодействии с лигандом, несущим тиогруппу и/или аминогруппу, могла образоваться или связь Au-S, или связь Au-N. Молекулы цистамина образовали более прочную связь Au-S при 4 °С, а менее прочную Au-N – при 25 °С (рис. 6). Выяснили, что при связывании с молекулами цистеина и цистина происходило образование связи S-S, а с поверхностью золота лиганды образовали связь Au-N, причем наиболее эффективно при pH 9,0 [144]. Таким образом, возможно регулировать тип связи путем изменения температуры или pH среды.

По данным ПЭМ (просвечивающей электронной микроскопии), FTIR- (инфракрасной Фурье-спектроскопии), электронных спектров поглощения, XPS-спектроскопии) было обнаружено, что молекулы бензола и антрацена способны связываться с поверхностью НЧЗ, предположительно, посредством катион-π-

взаимодействий между ароматическими молекулами и ионами Au^+ , поверхностно связанными с HfZ . Ароматические соединения, например, бензол и антрацен, взаимодействовали с поверхностью HfZ посредством своей π -системы. Уменьшение электронной плотности π -системы при введении в молекулу, например, карбоксильной группы существенно ослабляло связывание с золотом, как это было показано для бензойной кислоты. Также установили наличие Cl^- в образовавшейся бензольной пленке, что указывало на присутствие AuCl на поверхности HfZ [145].

В другой работе [146] с использованием SERS-спектров показали, что молекула тиофлавина Т могла осуществлять связь с HfZ как посредством бензольного кольца, так и атома серы триазольного кольца и N,N-диметиламиногруппы (рис. 6).

Для установления группировок, отвечающих за связывание доксорубина с поверхностью HfZ , исследовали методом XPS-спектроскопии взаимодействие золота с соединениями, содержащими одну из структурных частей его молекулы: антраценом, D-глюкозой, мочевиной, 7-дезоксидоксорубин агликоном и доксорубицином, модифицированным декановой кислотой (рис. 7). Было установлено, что доксорубин взаимодействует с окисленными атомами золота Au^+ на поверхности HfZ посредством π -системы антраценового кольца молекулы [147].

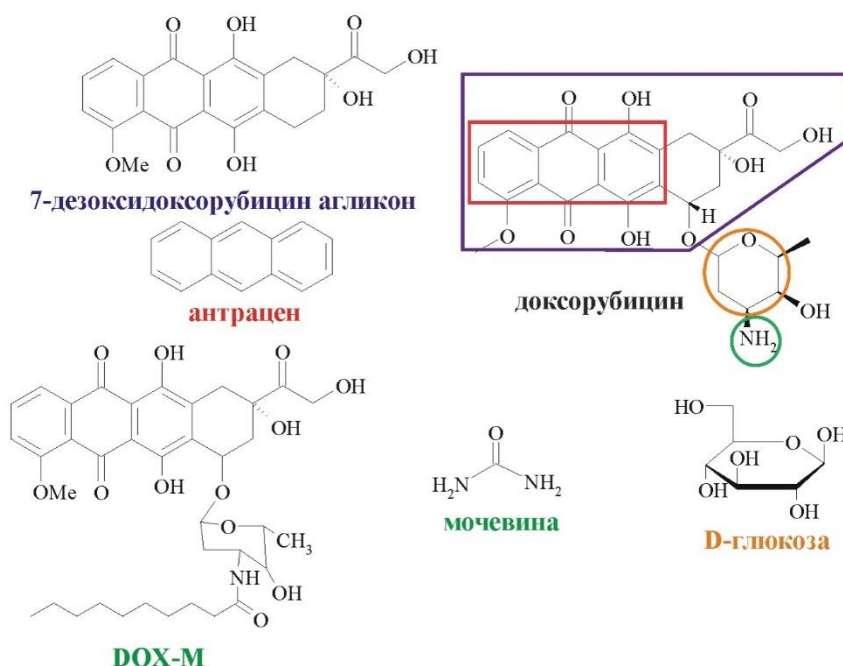


Рисунок 7. Доксорубин и его структурные аналоги. DOX-M – доксорубин, модифицированный декановой кислотой. Адаптировано из [147].

В связывании с золотой поверхностью могут участвовать карбоксильные и иные анионные группы адсорбированных молекул и ионов, например, ионов цитрата. Особенности их взаимодействия с поверхностью HfZ исследовали методом XPS-спектроскопии с последующим моделированием. В процессе синтеза HfZ ионы цитрата на

их поверхности подвергались двухстадийному окислению до ацетоацетата по следующей схеме (рис. 8):

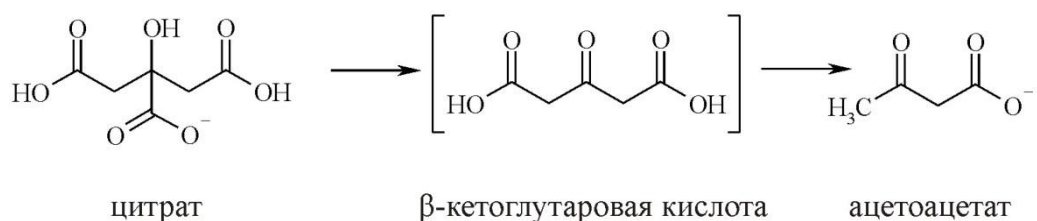


Рисунок 8. Окисление цитрата до ацетоацетата.

Ацетоацетат десорбировался с поверхности НЧЗ. По результатам моделирования расстояние между CH_2 -группами соседних ионов цитрата находилось в пределах контактного расстояния ван-дер-ваальсовых взаимодействий (0,50 - 0,58 нм). Энергия связи Au-S составляла около 40 ккал/моль, а Au- OSO_3H – около 2 ккал/моль, но энергия водородных связей карбоксильных групп двух соседних молекул цитрата достигала уже около 7 ккал/моль, в результате энергетический барьер для лигандного обмена цитрата на тиол был значителен.

Хотя на полностью заполненной молекулами цитрата поверхности золота были вакантные места для адсорбции тиолов, а на площади, которую занимали две молекулы цитрата, могли адсорбироваться четыре молекулы тиола, однако при взаимодействии золота с тиолами происходила их соадсорбция с молекулами цитрата [29].

Методами ИК- и XPS-спектроскопии установлено, как взаимодействовали ионы цитрата между собой. При идеальной организации образовывался бислой, состоявший из тримеров цитрата, в котором два иона были адсорбированы на поверхности золота, а третий был связан с ними водородными связями. В неидеальном бислое неадсорбированный ион образовывал водородные связи лишь с одним адсорбированным ионом. Толщина цитратного бислоя составляла 0,8 – 1,0 нм [97].

По данным FTIR- и спектроскопии комбинационного рассеяния молекула гема b образовывала связь с НЧЗ посредством карбоксильных групп [148] (рис. 6). Взаимодействие лигандов с цитратными НЧЗ, например, с модифицированными каликсаренами, могло осуществляться через сульфогруппы SO_3H^- [149]. Молекула памидроната натрия (применяемого в терапии костных заболеваний, например, остеопороза), содержащая аминогруппу, гидроксигруппу и две фосфатные группы, взаимодействовала с цитратными НЧЗ посредством карбонильного кислорода [150] (рис. 6).

2.3.3. Взаимодействие золота с высокомолекулярными органическими соединениями

Поверхность НЧЗ чаще всего покрыта слоем стабилизирующего электролита, заряженного отрицательно или положительно. Помимо широко распространенного цитрата натрия это могут быть анионные полимеры, к примеру, PSS (полистиролсульфонат) [13]. Для стабилизации используются и катионные полимеры, в частности, содержащими катион тетраалкиламмония, например, PDDAC (полиэтилендиаллилдиметиламин гидрохлорид) [13, 151], и другие амины с разной степенью замещения (полиэтиленимин, полиаллиламин гидрохлорид, полидиаллиламмоний хлорид) [152]. Также при синтезе НЧЗ в реакционную смесь могут добавлять катионные полимеры [153] (рис. 9).

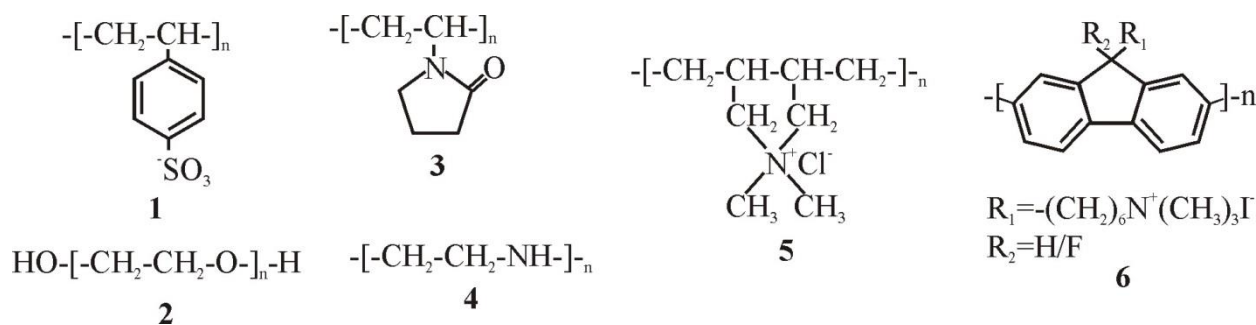


Рисунок 9. Структурные формулы полимеров: 1 – полистиролсульфонат, 2 – полиэтиленгликоль, 3 – поливинилпирролидон, 4 – полидиаллилдиметиламин хлорид, 6 – производное полифлуорена.

Полидопамин взаимодействует со многими металлическими поверхностями - Au, Ag, Pt и Pd, образование связей подтверждалось XPS-спектрами [154].

Рассмотрим подробнее взаимодействие PEG с золотом. PEG – незаряженный полимер, по данным моделирования молекула PEG располагалась плоско на поверхности золотого электрода и взаимодействовала с ним через атомы O [155]. Использование PEG с разной длиной цепи ($n=4000-20000$) позволило эффективно предотвращать сорбцию лигандов, например, доксорубина, на стенках полистирольных планшет и при этом не влияло на адсорбцию на НЧЗ [156]. Однако присутствие PEG затрудняло адсорбцию НК, меченных FAM (фосфитамида флуоресцеина), на НЧЗ, причем тем сильнее, чем длиннее полимер: 5 % PEG 20000 полностью ее ингибировал [157]. По другим данным НЧЗ с присоединенными тиольными НК слипались в присутствии PEG [158]. Тиольные лиганды, например, меркаптогексанол, меркаптопропионовая кислота, меркаптоянтарная кислота и глутатион, препятствовали сорбции PEG на НЧЗ [159].

НЧЗ после взаимодействия с раствором поливинилметакрилата (PMMA) или поливинилацетата (PVAc) в ацетоне высушивали без агрегации и в случае PMMA ресуспендировали без агрегации в DMF (диметилформамиде), DMSO (диметилсульфоксиде), метаноле, ацетоне, 1,2-пропандиоле, глицерине [160].

2.4. Взаимодействие НЧЗ и соединений пептидной природы

Нельзя обойти вниманием такую важную группу взаимодействующих с НЧЗ биомолекул, как пептиды и белки. При взаимодействии белков с НЧЗ имеет место химическая либо физическая адсорбция. На адсорбцию белков на НЧЗ помимо прочих факторов оказывают влияние форма белковой молекулы, аминокислотный состав, расположение гидрофобных и гидрофильных участков. Свой вклад в связывание вносят водородные связи, ван-дер-ваальсовы, гидрофобные, электростатические взаимодействия, стерическое отталкивание боковых групп [13]. Обзор литературных данных о взаимодействии белков и НЧЗ представлен в данной главе.

2.4.1. Взаимодействие золота с аминокислотами

В литературе можно найти работы о взаимодействии золота с индивидуальными аминокислотами: цистеином, цистином, метионином, триптофаном. Молекула цистеина содержит тиольную группу $-SH$ и при взаимодействии с золотом образует связь $Au-S$ [107, 161]. Используя синтетический пептид, содержащий концевой остаток цистеина, как линкер, к НЧЗ присоединяли протеин G для дальнейшего связывания с определенными антителами [162].

При pH 7,4 87,84 % молекул цистеина находились в цвиттерионной форме, 2,54 % были положительно заряжены и 9,62 % незаряжены [163]. Адсорбированные молекулы в цвиттерионной форме взаимодействовали между собой, вызывая слипание НЧЗ [164]. Цистин (димер цистеина) сохранял свою дисульфидную связь целостной, т.к., согласно SERS-спектрам, она была достаточно удалена от поверхности золота, и взаимодействие с золотом осуществлялось посредством amino- и карбоксильных групп [165].

Метионин, еще одна содержащая серу аминокислота, взаимодействовала с поверхностью золота посредством аминогруппы и карбоксильной группы, причем аминогруппа была расположена так, что связь C-N была параллельна поверхности золотого кристалла, а карбоксильная группа почти перпендикулярна ей (рис. 10) [166].



Рисунок 10. Предполагаемая ориентация молекулы метионина относительно поверхности НЧЗ. Атомы С голубого цвета, S – желтого, Н – белого, О- красного, N - синего. Адаптировано из [166].

При адсорбции триптофана на двух типах НЧЗ - восстановленных цитратом (диаметром 40-50 нм) или борогидридом натрия (30-40 нм) - получали совершенно разные спектры SERS, согласно которым индольное кольцо располагалось более или менее перпендикулярно поверхности в случае цитратных НЧЗ и параллельно поверхности в случае борогидридных НЧЗ [26].

Взаимодействие НЧЗ с аминокислотами зависело от pH раствора, например, взаимодействие аспарагиновой кислоты усиливалось при pH 7,0 в отличие от лизина, который хорошо связывался при pH 11,0, т.е., непротонированная аминогруппа обеспечивала эффективное взаимодействие аминокислоты с НЧЗ [167].

2.4.2. Взаимодействие золота с белками сыворотки крови

При попадании в организм человека НЧЗ окружаются множеством биомолекул: белков, липидов, полисахаридов, НК. Различные белки, содержащиеся в биологических жидкостях, специфически или неспецифически связываются с НЧЗ, образуя на их поверхности прочное покрытие – «белковую корону» [168]. Характеристика этого связывания зависит от множества факторов, включающих форму, размер частиц, стабилизирующий наночастицы агент, условия инкубации и др.

У ассоциатов, полученных при взаимодействии НЧЗ с белками сыворотки крови (быка или человека), определяли их гидродинамический радиус и ζ -потенциал методом динамического светорассеяния [169, 170]. Состав связавшихся белков определяли методом масс-спектрометрии после обработки ассоциатов трипсином [171, 172] для определения различий в составе сыворотки у здоровых и больных раком людей или влияния на него лазерного теплового воздействия. Из результатов измерения гидродинамического радиуса НЧЗ до и после образования «короны» рассчитали значения микроскопических констант диссоциации K^D и коэффициента Хилла n комплекса НЧЗ-белок для НЧЗ диаметром 40 нм [173] согласно уравнению (1):

$$d_z([белок]) = d_z(0) \cdot (1 + c[P]^n / ([P]^n + K^D))^{1/3}, \quad (1)$$

где $d_z([белок])$ и $d_z(0)$ – гидродинамический диаметр НЧЗ с белком и без него, P – концентрация свободного белка. Рассчитанные значения были близки к тем, что получили при измерении интенсивности флуоресценции [8], и были равны, в частности, для стабилизированных цитратом натрия НЧЗ и BSA 226 ± 120 нМ, трансферрина – 55 ± 15 нМ. Значение коэффициента Хилла составило больше 1 для НЧЗ, модифицированных цистеином и тиогликолевой кислотой при меньших значениях K^D , что указывает на кооперативный характер связывания белков с этими частицами.

2.4.2.1. Взаимодействие золота с альбуминами

Альбумин - один из основных белков плазмы крови, множество работ посвящено исследованию взаимодействия НЧЗ с BSA и HSA как с модельными белками, при этом его молекулу представляют как треугольную призму со стороной основания 8,4 нм и высотой 3,15 нм [174, 168]. Молекула BSA состоит из 607 аминокислотных остатков и богата серой: содержит один остаток цистеина, 17 остатков цистина и пять остатков метионина. Помимо серосодержащих аминокислот в состав молекулы входят 60 остатков лизина [175, 176] и два остатка триптофана, способные взаимодействовать с золотой поверхностью. Для ковалентного связывания с НЧЗ имеет значение возможность образования связи Au-S. Между BSA и золотыми наностержнями, стабилизированными СТАВ, методом XANES-спектроскопии обнаружено уменьшение количества S-S-связей в белке и возникновение Au-S-связей [175]. НЧЗ диаметром 1,5 нм, покрытые глутатионом (трипептидом, содержащим цистеин), использовали для защиты суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (SPION) от адсорбции сывороточных белков [177].

Механизм образования НКЗ с использованием в синтезе BSA включал в себя формирование комплекса белок – ионы Au^{3+} , за которым следовало восстановление Au^{3+} до Au^0 остатками тирозина при повышенном pH. Однако роль аминокислотных остатков не до конца определена. Предположительно ионы AuCl_4^- первоначально взаимодействовали с остатками лизина и аргинина. Хотя связь Au-S намного сильнее, взаимодействие с тиогруппой цистеина и дисульфидными мостиками затруднено, т.к. они пространственно недоступны при pH 5-7. При повышенном pH становилось возможным их взаимодействие с ионами золота, и образовывались стабильные мотивы –S-Au-S- [22].

НЧЗ, полученные методом цитратного восстановления HAuCl_4 , электростатически стабилизированы ионами цитрата натрия: их отрицательно заряженный слой на поверхности золота вызывает отталкивание соседних частиц. Молекулы BSA самопроизвольно прилипали к НЧЗ, стабилизированным цитратом натрия. Описано две гипотезы взаимодействия молекул BSA и покрытых цитратом натрия НЧЗ: гипотеза электростатического связывания и гипотеза вытеснения. Согласно первой гипотезе, за сильное связывание BSA и НЧЗ ответственно притяжение между положительно заряженными (при нейтральных и основных значениях pH) поверхностными аминокислотными остатками BSA и отрицательно заряженным цитратом, т.е., прямое взаимодействие BSA с самой поверхностью золота очень слабое. Согласно второй гипотезе цитрат замещался при адсорбции BSA функциональными группами аминокислот: аминогруппой лизина [178, 179], имидазольным кольцом гистидина [176] и тиогруппой цистеина. Структурные изменения адсорбируемого белка могли понизить свободную

энергию системы, а они часто являлись результатом денатурации белка при вытеснении цитрата. Соответственно, из гипотезы вытеснения возможны два следствия: 1) вытеснение осуществлялось нативным белком или 2) вытеснение происходило при денатурации белка на поверхности НЧЗ. В последнем случае молекула белка меняла конформацию так, что специфические функциональные группы аминокислот становились доступны для связывания с поверхностью НЧЗ. По данным LSPR и DLS (динамического светорассеяния) молекула BSA занимала 25 нм^2 поверхности НЧЗ, это могло означать, что во взаимодействии с поверхностью участвовало не более 26 аминокислот [180].

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния установлено, что при адсорбции молекул HSA на НЧЗ диаметром 40 и 70 нм в первую очередь возникали электростатические и гидрофобные взаимодействия, а при инкубации продолжительностью 8 – 9 ч образовалась связь S-Au, в ее формировании могли быть задействованы как дисульфидные связи остатков цистина, так и тиогруппа остатка цистеина [181]. В другом исследовании выявлен следующий порядок силы неспецифических взаимодействий BSA и НЧЗ [176]: гидрофобные > COO^- > NH_3^+ > OH > этиленгликоль.

Параметры связывания BSA с НЧЗ зависели от их размера, формы, стабилизирующего агента, условий связывания, выбранного метода исследования, в итоге разные исследователи получали разные результаты (таблица 3), которые обобщены в работе [182].

Таблица 3. Значения константы ассоциации для BSA и НЧЗ.

стабилизатор	форма	линейные размеры или диаметр, нм	растворитель	метод	K_a, M^{-1}
цитрат	сфера	18 ± 2	вода	флуоресценция	$2,34 \cdot 10^{11}$
СТАВ	стержень	$(70 \pm 10) \cdot (30 \pm 5)$	вода	флуоресценция	$5,0 \cdot 10^4$
глутатион	сфера	40 ± 5	PBS ³	флуоресценция	$3,16 \cdot 10^{11}$
цитрат	сфера	20 ± 4	вода	CD ⁶	$7,14 \cdot 10^8$
цитрат	сфера	10	вода	QCM ⁷	$1,0 \cdot 10^6$
цитрат	сфера	15	PBS	флуоресценция	$3,0 \cdot 10^9$
цитрат	сфера	51	HEPES ⁴	SCS ⁸	$4,0 \cdot 10^3$
РАА ¹	стержень	$54,0 \cdot 15,9$	MOPS ⁵	ACE ⁹	$7,93 \cdot 10^4$
mPEG-SH ²	стержень	$54,0 \cdot 15,9$	MOPS	ACE	$1,53 \cdot 10^4$

¹ РАА – полиакриловая кислота, ² mPEG-SH – тиолированный метоксиполи(этиленгликоль), ³ PBS – фосфатно-солевой буферный раствор, ⁴ HEPES -

4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан сульфокислота, ⁵ MOPS - 3-(N-морфолино)пропансульфокислота, ⁶ CD – круговой дихроизм, ⁷ QCM - пьезокварцевое микровзвешивание, ⁸ SCS – рассеивающая корреляционная спектроскопия, ⁹ ACE – аффинный капиллярный электрофорез.

Адаптировано из [182].

Применение QCM в комбинации с измерением ζ -потенциала (дзета-потенциала) позволило изучить параметры связывания BSA и НЧЗ без введения метки в белок. Изменение частоты резонатора, свидетельствовавшее об образовании слоя адсорбата (BSA) на поверхности золота, преобразовано в значение поверхностного покрытия золота молекулами белка. Зависимость покрытия от концентрации белка аппроксимировано уравнением изотермы Лэнгмюра. Измерения проведены для прямого и последовательного осаждения белка на покрытую и непокрытую цитратом поверхность золота. Полученные значения покрытия и константы Лэнгмюра приведены в таблице 4.

Таблица 4. Параметры связывания BSA и НЧЗ.

метод осаждения	прямое	последовательное	
покрытие цитратом	+	+	-
покрытие поверхности, 10^{12} мол./см ²	$3,7 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,8$
константа Лэнгмюра, мкМ ⁻¹	$1,0 \pm 0,3$	$0,05 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,005$

Адаптировано из [183].

Указано, что приведенные значения константы Лэнгмюра служили лишь качественной оценкой силы связывания. Разница в значениях для разных методов осаждения связана с тем, что при прямом осаждении все количество белка добавлялось разом, и электростатическое взаимодействие сильнее, т.к. отрицательный заряд покрытых цитратом НЧЗ был максимален, а при последовательном осаждении заряд поверхности постепенно уменьшался при добавлении того же количества белка порциями. Результаты подтвердили, что для покрытых цитратом НЧЗ основным являлся электростатический механизм взаимодействия с белком. Более высокое покрытие белком поверхности «голых» НЧЗ говорило о том, что связывание сопровождалось денатурацией белка. При связывании BSA с поверхностью золота изменялось количество атомов О (данные XPS), содержавшегося в молекулах воды, т.е., при адсорбции происходила дегидратация белка [183].

На основании измерений гидродинамического радиуса конъюгатов НЧЗ диаметром 51 нм и BSA рассчитаны значения константы связывания $K_D = 256 \pm 50$ мкМ и коэффициента Хилла $n = 0,4 \pm 0,1$, значение которого указывало на антикооперативный характер связывания [184].

2.4.2.2. Взаимодействие НЧЗ с убиквитином, миоглобином, гемоглобином и другими белками

Методами ЯМР, динамического светорассеяния и двумерного ядерного магнитного резонанса (CSP-анализа) исследовано взаимодействие убиквитина с НЧЗ диаметром 10-30 нм при pH 7,7, причем отмечено изменение химических сдвигов в ЯМР-спектре. С поверхностью НЧЗ связывалось несколько аминокислотных остатков: Gln2, Ile3, Leu15, Val17 и Glu18. Свободные молекулы белка участвовали в быстром обмене со связанными молекулами. Такой метод пригоден для исследования взаимодействия с НЧЗ и других белков массой до 50-60 кДа [185].

В миоглобине лошади содержится два остатка тирозина, два остатка триптофана, 6 остатков фенилаланина. Согласно спектральным данным (SERS и комбинационного рассеяния) вклад во взаимодействие с золотом вносили тирозин, а также лизин, карбоксильные группы аспартата и глутамата и/или соадсорбированного цитрата натрия. При взаимодействии НЧЗ (30 нм) с миоглобином в низкой концентрации он вел себя как соль, взаимодействуя лишь электростатически и вызывая слипание НЧЗ, а при высокой концентрации, превосходящей необходимую для полного покрытия, адсорбция белка преобладала над слипанием (или происходила быстрее), и каждая НЧЗ оказывалась покрытой слоем молекул миоглобина и изолированной от других. Авторы ссылались на другие работы, где наблюдались подобные изменения в спектрах SERS при взаимодействии НЧЗ с BSA при изменении концентрации белка. Порог концентрации миоглобина для таких изменений составил 10^{-7} М [186].

Гемоглобин адсорбировался на цитратных НЧЗ (15 нм), возможно, за счет входящих в его состав остатков цистеина [187].

Неясно, за счет каких аминокислот взаимодействовал с золотом цитохром c, но по спектрам оптического поглощения установлено, что на одной НЧЗ 15 нм адсорбировалось 700 молекул белка, образовав покрытие из трех слоев [148].

GB3 – небольшой белок, состоящий из 56 аминокислотных остатков. Дикий тип белка не содержит цистеина, а мутант K19C содержит. По данным ЯМР они связывались с НЧЗ практически в одинаковом количестве, вероятно, за счет остатков лизина 4, 19, 28 и 50 [188]. Однако, поскольку меркаптобензимидазол (МБИ) вытеснял два варианта белка с разной эффективностью, очевидно, что наличие цистеина в мутантном белке влияло на его связывание с НЧЗ [75].

При адсорбции флуоресцентно меченных белков на поверхность НЧЗ получены разные значения покрытия для случаев адсорбции одного белка и для последовательной и

одновременной адсорбции двух белков (малатдегидрогеназы и цитратсинтазы), что подтверждало влияние уже адсорбированного слоя молекул на последующий [189].

НКЗ можно получить путем тетрафторборатного восстановления Au^{3+} с использованием в синтезе обогащенного гистидином белка HRE с последовательностью Ala-His-His-Ala-His-His-Ala-Ala-Asp. Так получают НКЗ с определенными оптическими свойствами. Для установления того, какие из остатков гистидина задействованы в образовании кластера, проведено связывание со специфичным реагентом – комплексным соединением никеля с нитрилтриуксусной кислотой, имевшем два сайта для координации гистидина. Установлено, что остатки гистидина в белке HRE делились на две группы, His 2 и His 5, His 3 и His 6, одна из которых была доступна для комплексообразования, а другая нет, так как взаимодействовала с золотом. [28].

В работе, посвященной исследованию взаимодействия НЧЗ диаметром 95 нм с различными биомолекулами [190], при измерении размера частиц и ζ -потенциала методом динамического светорассеяния выявлено несколько разных режимов связывания белков с НЧЗ: для BSA и IgM (иммуноглобулинов класса М) – электростатические взаимодействия с ионами цитрата натрия, а для IgG (иммуноглобулина класса G) – вытеснение цитрата. Также установлено, что BSA и IgG кролика образовывали стабильный монослой на поверхности НЧЗ, а IgG и IgM человека после взаимодействия с НЧЗ вызывали образование кластеров.

Для ряда радиоактивно меченных белков были рассчитаны константы связывания с НЧЗ диаметром 15 ± 2 нм на основе графиков изотермы Лэнгмюра с линеаризацией в координатах Скэтчарда [191]. В таблице 5 приведены параметры связывания белков с НЧЗ.

Таблица 5. Параметры связывания различных белков с НЧЗ.

белок	молекулярная масса, кDa	мол/НЧЗ	K_D , нМ	площадь/мол., нм ²
инсулин свиньи	5,88	200	321,1	3,6
миоглобин кашалота	17,00	87	200,4	7,6
пероксидаза хрена	40,00	61	79,0	11,8
белок А золотистого стафилококка	41,00	60	343,9	10,9
BSA	68,00	39	160,3	17,5
галактозилированный BSA	75,00	15	39,1	47,1
лактоферрин человека	80,00	35	13,6	20,3
трансферрин крысы	90,00	31	9,5	23,3
каталаза печени быка	250,000	18	11,5	36,5

белок	молекулярная масса, кDa	мол/НЧЗ	K _D , нМ	площадь/мол., нм ²
липопротеины низкой плотности человека	350,000	9	4,7	73,8
ферритин человека	450,000	8	4,0	81,8
полимерный IgA ¹ человека	500,000	4	3,9	182,5

¹Ig A – иммуноглобулин класса A

Адаптировано из [191].

Отметим, что при увеличении молекулярной массы белка значение K_D уменьшалось, что может говорить о повышении аффинности белков. Если сравнить данные по связыванию BSA с НЧЗ 51 нм [184] и 13 нм, то разница в значении K_D составила три порядка. Таким образом, количественные характеристики связывания зависят от вида НЧЗ и способа измерения данных.

2.4.2.3. Стрептавидин, авидин, антитела

Свойства многих белков прочно адсорбироваться на поверхность НЧЗ [192, 187] использовали для приготовления устойчивых конъюгатов, например, со стрептавидином [193] или авидином [194], некоторые из них коммерчески доступны [71, 195]. На поверхность НЧЗ адсорбировали антитела для колориметрической детекции различных патогенов [196], к примеру, к афлатоксину В1 [197] или к *Salmonella Typhimurium*; этот способ детекции связан с агрегацией НЧЗ, покрытых антителами, вокруг патогена-мишени [14]. При детекции антигена также могло происходить образование сэндвич-структур антитело-антиген-антитело, где антитело связано с НЧЗ, а детекция антигена (IgG человека) сопряжена с изменением гидродинамического радиуса НЧЗ [198]. Антитела инкубировали с НЧЗ в течение 1 часа при комнатной температуре при соотношении антитела:НЧЗ 9:8 [199]. Получены и конъюгаты НЧЗ одновременно с антителами и тиольными НК [200].

2.4.3. Методы и подходы к поиску пептидных последовательностей, взаимодействующих с НЧЗ

В литературе представлены работы по комбинаторному анализу аминокислотной последовательности пептидов с целью выявления наиболее подходящего для прочного связывания или стабилизации НЧЗ варианта.

Исследование влияния состава и длины пептида на стабильность НЧЗ проводили на примере 58 пентапептидов, сконструированных с учетом следующих вариативных параметров: длина, якорная аминокислота (позиция 1), гидрофобное ядро (позиции 2 и 3), карбоксильный конец (позиции 4 и 5). Каждый пептид инкубировали с НЧЗ (12,3 нм), а затем проверяли стабильность в солевых условиях. В результате была выбрана

последовательность Cys-Ala-Leu-Asn-Asn, в которой якорем служил остаток цистеина, взаимодействовавший с НЧЗ и за счет SH-, и за счет NH₂-группы. Остатки аланина и лейцина вносили вклад в самоассоциацию пептида, а остатки аспарагина участвовали во взаимодействии с НЧЗ благодаря амидной группе в боковой цепи и С-концевой карбоксильной группе [201].

Методом XPS-спектроскопии было проанализировано взаимодействие пентапептидов вида Gly-Gly-X-Gly-Gly и X₅ и декапептидов вида X₁₀ с покрытым золотом субстратом. Общая тенденция заключалась в том, что для гидрофобных боковых цепей взаимодействие с золотом оказалось предпочтительнее взаимодействия с растворителем. Для гидрофобных остатков плотность покрытия была выше у компактных Ala, Thr, Val, чем у объемных Lys, His, Trp, Tyr, для полярных и заряженных остатков наоборот: плотность была выше у объемных Arg, Glu, Gln, чем у более компактных Ser, Asn, Asp [202].

В более поздней работе [203] были объединены результаты нескольких исследований. Методом QCM были определены кинетические и термодинамические параметры связывания с поверхностью золота 12 пептидов, выбранных по их эффективности связывания с золотом, палладием (Pd4), серебром (AgBP1, AgBP2) и кварцем (QBP1) (таблица 6). Для всех этих пептидов, даже специфичных не к золоту, получены высокие значения свободной энергии адсорбции, сравнимые со значениями энергии адсорбции тиолов, однако эти взаимодействия представляли собой вклад нескольких более слабых нековалентных связей, чем отдельная связь Au-S у тиола. Таким образом, достижение аффинности к выбранной мишени в процессе селекции не гарантирует высокой специфичности к ней. Также оценили значения свободной энергии Гиббса для покрытия поверхности золотого электрода каждым пептидом в максимальной концентрации (15 мкМ).

Таблица 6. Термодинамические параметры связывания нескольких белков с золотом.

пептид	последовательность	ΔG , кДж/моль
AuBP1	Trp -Ala-Gly- Ala -Lys- Arg -Leu-Val-Leu- Arg-Arg -Glu	-37,6±0,9
GBP1	Met-His -Gly-Lys-Thr- Gln -Ala-Thr-Ser-Gly-Thr-Ile-Gln-Ser	-37,6±1,0
B1	Leu-Lys-Ala- His -Leu-Pro-Pro-Ser- Arg -Leu-Pro-Ser	-36,6±1,2
AuBP2	Trp -Ala-Leu- Arg-Arg -Ser-Ile-Arg-Arg-Gln-Ser- Tyr	-36,4±0,3
Midas2	Thr- Gly -Thr-Ser-Val-Leu-Ile-Ala-Thr-Pro- Tyr -Val	-35,7±1,2
AgBP2	Glu-Gln-Leu- Gly -Val- Arg -Lys-Glu-Leu- Arg-Gly -Val	-35,3±1,2
Z2	Arg- Met -Arg- Met -Lys- Met -Lys	-35,0±0,6

пептид	последовательность	ΔG , кДж/моль
QBP1	Pro-Pro-Pro- Trp -Leu-Pro- Tyr-Met -Pro-Pro- Trp -Ser	-35,0±1,1
A3	Ala- Tyr -Ser-Ser- Gly-Ala -Pro-Pro- Met -Pro-Pro- Phe	-31,8±0,3
AgBP1	Thr-Gly-Ile- Phe -Lys- Ser -Ala- Arg -Ala- Met-Arg -Asn	-31,6±0,2
Z1	Lys- His -Lys-His- Trp -His- Trp	-31,3±0,1
Pd4	Thr-Ser-Asn-Ala-Val- His -Pro-Thr-Leu-Arg- His -Leu	-30,3±0,2

Жирным шрифтом обозначены аминокислотные остатки, контактирующие с поверхностью золота согласно результатам моделирования.

Адаптировано из [203].

Анализ приведенных данных показал, что чаще всего в последовательностях этих пептидов встречались остатки Arg и Ser, а также Lys, His, Met, Thr, Leu, Ala, Pro, а среди остатков, контактировавших с поверхностью золота согласно результатам моделирования – остатки Arg, Met и Trp, т.е. и заряженные, и незаряженные, и полярные, и гидрофобные аминокислотные остатки в составе пептидов взаимодействовали с золотом.

2.4.4. Методы детекции адсорбции белков на НЧЗ, основанные на измерении флуоресценции аминокислот

Для детекции биомолекул часто используются флуоресцентные метки. Это сопряжено с дополнительными этапами подготовки проб и повышением стоимости анализа. В качестве примера безметочной детекции адсорбции белков на НЧЗ можно упомянуть методику измерения собственной флуоресценции триптофана в составе белков ($\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 340-360$ нм). Данную методику применяли в исследовании связывания с НЧЗ диаметром 24 нм ряда белков – BSA, HSA, Ig G, STI (ингибитор соевого трипсина Кунитца), протеина G [204, 205, 174, 168]. Измерение остаточной интенсивности флуоресценции проводили в супернатанте после отделения НЧЗ с присоединенным белком, что позволило получить данные линейной зависимости интенсивности сигнала от концентрации белка. Из полученных данных были рассчитаны константы связывания белков с НЧЗ по методу Скэтчарда согласно уравнению (2):

$$RL/[L] = (N - RL)/K_D, \quad (2)$$

где [L] – концентрация свободного белка, RL – количество молекул белка, связанных с одной НЧЗ, K_D – равновесная константа диссоциации комплекса, N- число сайтов связывания на одной НЧЗ. Полученные кривые имели вид гиперболы как в случае комбинации двух графиков с разной линейной зависимостью (рис. 11), поэтому авторы сделали вывод, что при увеличении концентрации белка константа связывания увеличилась, т.е., наблюдалась отрицательная кооперативность связывания.

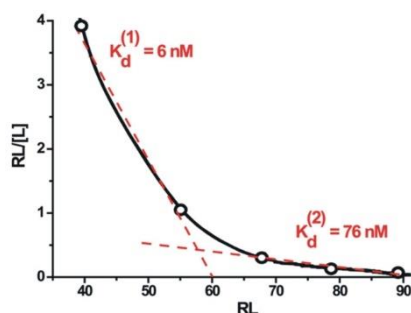


Рисунок 11. Кривая связывания BSA с НЧЗ в координатах Скэтчарда. $K_d(1)$ определена при концентрации BSA ниже точки насыщения, $K_d(2)$ определена при концентрации BSA, близкой к точке насыщения. [L] – концентрация свободного BSA, RL - число молекул BSA, связанных с одной НЧЗ. Адаптировано из [205].

Рассчитанные значения константы связывания для Ig G, BSA, протеина G, STI были равны 4, 6, 10, 15 нМ на начальном участке зависимости и 25, 76, 175, 100 нМ на участке насыщения соответственно. Показана зависимость покрытия НЧЗ молекулами белка от молекулярной массы белка: 52, 90, 500, 550 мол/НЧЗ для Ig G, BSA, протеина G, STI с молекулярной массой 150, 66, 26 и 20 кДа соответственно.

Таким же способом – по тушению собственной флуоресценции триптофана, тирозина и фенилаланина – рассчитаны константы связывания K_D белков, преимущественно циркулирующих в крови, таких как альбумин, фибриноген, гамма-глобулин, гистоны и инсулин, на НЧЗ разных размеров – от 5 до 100 нм согласно уравнению Хилла (3) [8]:

$$Q/Q_{\max} = [NP]^n / (K_D^n + [NP]^n), \quad (3)$$

где Q – тушение интенсивности флуоресценции, n- коэффициент Хилла, [NP] – концентрация НЧЗ. Значения констант связывания составили порядка $1 \cdot 10^{-5}$ М для НЧЗ диаметром 5 нм, $1 \cdot 10^{-6}$ М для 10 и 20 нм, $1 \cdot 10^{-7}$ М для 30 и 60 нм, $1 \cdot 10^{-8}$ М для 80 нм. Значение коэффициента Хилла для всех белков и всех размеров частиц меньше единицы: $1 > n > 0,61$, кроме инсулина, для которого значение n было равно 1,61, 2,11, 3,64 для НЧЗ диаметром 60, 80, 100 нм соответственно [205]. Таким образом, белки проявили большее сродство к НЧЗ большего диаметра.

Еще один метод – измерение флуоресценции тирозина после переноса энергии с триптофана – использовали для изучения связывания HSA с золотом [206]. Определили сайт связывания молекулы BSA с золотом путем измерения флуоресцентного сигнала триптофана [207]. Данные Раман-спектроскопии подтвердили близость пиррольного кольца триптофана 212 к поверхности золота [206]. По тушению флуоресценции Trp212 заключили, что связывание молекулы BSA с НЧЗ (3-4 нм) происходило в сайте I в гидрофобном кармане субдомена IIА, где находился Trp 212 (рис. 12). Этот вывод

подтвердился контрольными экспериментами по связыванию варфарина, которое, как было показано ранее, происходило именно в этом сайте [207].

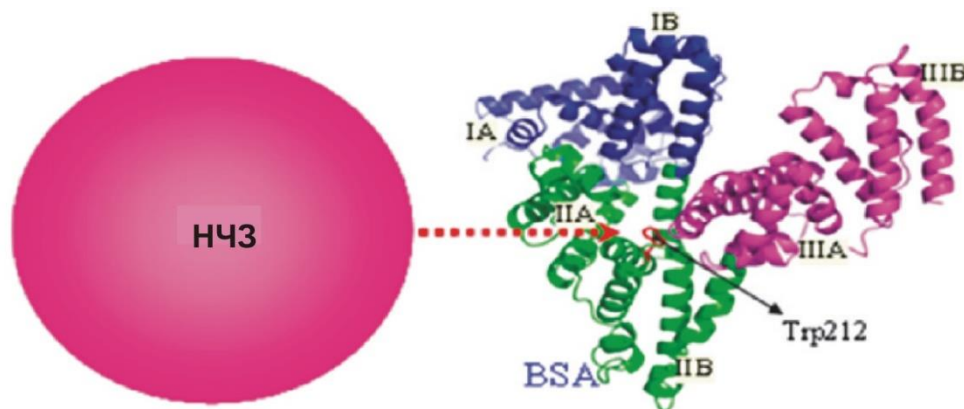


Рисунок 12. Схема взаимодействия НЧЗ с субдоменом IIА молекулы BSA. Адаптировано из [207].

Белковые молекулы отличаются большим разнообразием по размеру, пространственной структуре и набору функциональных групп, поэтому их связывание с НЧЗ происходит по разным механизмам и характеризуется разными типами взаимодействия и влиянием на стабильность коллоида НЧЗ. Это направление исследований остается актуальным, т.к. вопрос о типах взаимодействия белков с поверхностью золота, а также о вовлеченных в него аминокислотных остатках остается открытым.

2.5. Взаимодействие НЧЗ с нуклеиновыми кислотами

Огромное значение в современных химико-биологических исследованиях имеют ассоциаты НЧЗ и НК. Молекулы НК могут взаимодействовать с поверхностью золота нековалентно посредством фосфатных групп и азотистых оснований. Механизмы нековалентного взаимодействия НК с поверхностью НЧЗ требуют детального изучения для выявления закономерностей их связывания в зависимости от условий: нуклеотидного состава НК, длины НК, температуры и pH среды, типа соли и ее концентрации и др. Эти закономерности изучаются при взаимодействии золотой поверхности с азотистыми основаниями, дезоксинуклеотидами, олигонуклеотидами, плазмидами разнообразными физико-химическими методами (таблица 7).

Таблица 7. Сродство азотистых оснований и их производных к золоту.

субстрат	лиганд	метод	сродство	ссылка
золотые пленки	азотистые основания	$\Delta H_{\text{десорбции}}$	G>A>C>T	208
золотые пленки	дезоксирибонуклеозиды	$\Delta H_{\text{десорбции}}$	G>C>A>T	208
НЧЗ 13 нм	дезоксирибонуклеозиды	колориметрия	G, C>A>T	209
кластеры Au ₃	азотистые основания	MD	G>A>C>T	210
золотые пленки	N ₂₅	SERS, плотность покрытия	A>C>T	211

субстрат	лиганд	метод	сродство	ссылка
НЧЗ 6,5 нм	азотистые основания	$\Delta H_{\text{взаимодействия}}$	$C > G > A(>T)$	167
НЧЗ 13 нм	N_{20}	колориметрия	$A, T > G, C$	212
золотые пленки	N_5	FTIR, XPS	$A > C \geq G > T$	213
НЧЗ	$T_{10}NNTNN$	интенсивность флуоресценции	$A > C > G > T$	43

При анализе этих закономерностей складывается противоречивая картина: предпочтение в связывании с поверхностью золота можно отдать как гуанину и его производным, так и аденину и его производным, реже цитозину и тимину. Данная глава посвящена подробному анализу этих закономерностей.

2.5.1. Взаимодействие золота с азотистыми основаниями, нуклеозидами, нуклеотидами

При измерении температуры десорбции азотистых оснований с поверхности золотых пленок в вакууме было обнаружено, что температура десорбции и значения энергии десорбции уменьшались в следующем ряду: $G > A = C > T$, однако для дезоксирибонуклеозидов значения энергии десорбции практически равны (таблица 8). Авторы сделали вывод, что пиримидины, в особенности тимин, взаимодействовали с поверхностью золота слабее, чем пурины, энергия связывания составила около 110 кДж/моль, что близко к значениям энергии ковалентной связи тиольной группы с НЧЗ (120 – 160 кДж/моль) [208].

Таблица 8. $\Delta H_{\text{десорбции}}$ азотистых оснований и дезоксирибонуклеотидов с поверхности золота.

азотистые основания	$\Delta H_{\text{десорбции}}$, кДж/моль,	2`дезоксирибонуклеозиды	$\Delta H_{\text{десорбции}}$, кДж/моль,
тимин	110 ± 2	тимидин	109 ± 3
цитозин	130 ± 5	цитидин	114 ± 2
аденин	129 ± 4	аденозин	112 ± 4
гуанин	144 ± 2	гуанозин	120 ± 2

Группа Миркина использовала колориметрический метод для определения степени сродства к НЧЗ дезоксинуклеозидов, т.к. при инкубации НЧЗ с незаряженными молекулами наблюдалось слипание НЧЗ, сопровождавшееся изменением цвета коллоида с красного на синий. Сродство дезоксинуклеозидов к НЧЗ уменьшалось в ряду: $G, C > A > T$ [209], причем при инкубации с dT не происходило слипания частиц, на основании чего был сделан вывод о неспособности dT сорбироваться на поверхности НЧЗ.

Следует отметить, что для исследования взаимодействий НК с поверхностью золота широко применяется метод молекулярной динамики и компьютерное моделирование [214].

Так, методом молекулярной динамики моделировали взаимодействие азотистых оснований с поверхностью золота и рассчитали энергию связывания, причем расчеты хорошо коррелировали с литературными данными [208]. Энергия связывания уменьшалась в ряду $G > A > C > T$. При моделировании связывания двух одинаковых оснований был показан выигрыш в энергии связывания пар GG и TT по сравнению со связыванием единичных молекул, что указывает на кооперативный характер связывания G и T [210].

Моделирование взаимодействий азотистых оснований и кластеров Au₃ [215] позволило оценить энергию связывания золота и каждого «якорного сайта» азотистого основания, а также суммарную энергию связывания каждого азотистого основания, которая уменьшается в ряду $G > A > C > T$, что согласуется с другими литературными данными [208].

Кимура-Суда с соавторами исследовали взаимодействие гомоолигонуклеотидов длиной 5 нт. с золотыми пленками, используя FTIR- и XPS-спектроскопию. В результате была получена такая зависимость сродства гомоолигонуклеотидов к золоту: $A > C \geq G > T$ [213].

Отметим, что независимо от типа золотого субстрата и метода анализа, практически все исследователи заключали, что пуриновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды взаимодействовали с золотом прочно, а тимин и его производные - слабо.

2.5.2. Взаимодействие НК, несущих фосфотиоатную модификацию, с НЧЗ

НК, несущие фосфотиоатную модификацию (PS-НК), вызывают у исследователей особый интерес благодаря их устойчивости к действию нуклеаз и окислению. Их применяют в различных биосенсорах, для взаимодействия с белками, для исследования ферментативных механизмов [88].

PS-НК присоединяли к НЧЗ после взаимодействия с BIDBE (N,N'-бис(α-йодацетил)-2,2'-дитиобис(этиламин)) посредством PS-группы (рис. 13) [216].

В ряде работ PS-НК использовали как замену тиольным НК для присоединения к поверхности золота [84, 85, 86, 87], серебра [217], нанокристаллам CdTe [218]. Присоединяемая НК содержала на 5'-конце 6 или 10 тиминов, каждый с фосфотиоатной модификацией, которая, как и тиольная группа; служила «якорем» на поверхности НЧЗ. Описан способ приготовления кластеров присоединения за счет гибридизации фосфотиоатных НК в составе ассоциатов с серебряными НЧ и тиольных Нк в составе ассоциатов с НЧЗ. Длина тиольной НК составила 100 нт., PS-НК – 59, 62, 65 нт. с 3, 6 или 9 PS- модификациями [217].

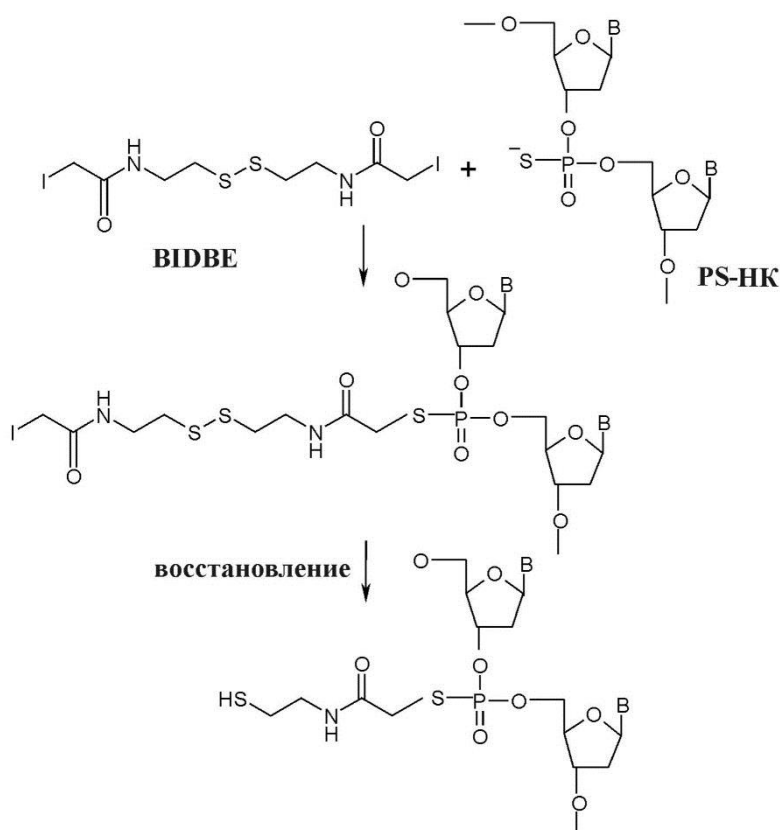


Рисунок 13. Взаимодействие BIDBE и фосфотиоатной группы НК. Адаптировано из [211].

Свойство PS-НК связываться с поверхностью золота исследовали в своей работе Лиу с соавторами [88]. Они сконструировали несколько НК длиной 21 нт., содержащих с 5'-конца 9 остатков А и затем 12-звенную гетеропоследовательность для гибридизации с комплементарной НК. Одна из НК содержала 8 модифицированных фосфатов в polyA-тракте, вторая несла тиольную группу на 5'-конце (SH-НК), а третья НК представляла собой немодифицированную НК (PO-НК) (рис. 14).

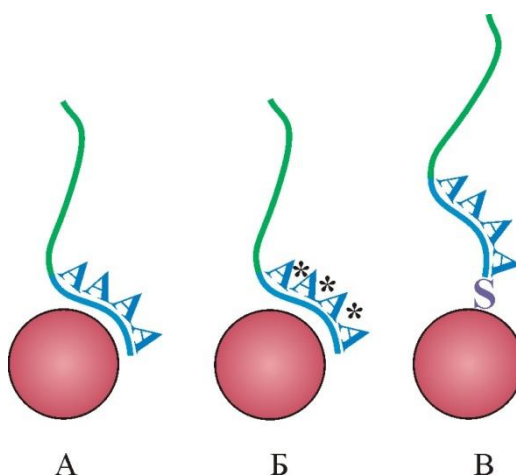


Рисунок 14. Связывание PO-НК (А), PS-НК (Б), SH-НК (В) с НЧЗ. Адаптировано из [88].

Все НК содержали остаток флуоресцеина на 3'-конце. Адсорбцию НК на НЧЗ проводили при низком pH. По интенсивности флуоресценции была рассчитана плотность посадки разных 21-звенных НК, которая составила приблизительно 80, 60 и 50 мол./НЧЗ

для тиольной, фосфотиоатной и немодифицированной НК соответственно. Исследование кинетики вытеснения НК с поверхности НЧЗ глутатионом показало относительную прочность связывания этих НК с НЧЗ: SH-НК > PS-НК > PO-НК. Также было проведено исследование набора НК с одной и той же гетеропоследовательностью, но с разной длиной polyA-тракта с модифицированными фосфатами – 2, 5, 9, 13 и 17 нт. Измерение плотности посадки этих НК на поверхность НЧЗ показало, что именно polyA-тракт с модифицированными фосфатами адсорбировался на частицах, выиграв конкуренцию в адсорбции у немодифицированных нуклеотидов в составе НК. При измерении соотношения оптической плотности на длине волны 520 и 650 нм у ассоциатов НЧЗ и НК, содержащих T₉PS- либо A₉PS-тракт после инкубации в солевых условиях были получены примерно одинаковые значения, свидетельствовавшие о равнозначной устойчивости таких ассоциатов, несмотря на разный состав PS-тракта. Использование PS-модификации, по мнению авторов, позволило точно адсорбировать на НЧЗ нужные участки НК независимо от их последовательности, т.к. взаимодействие PS-группы с золотом сильнее, чем нековалентное взаимодействие азотистых оснований. Тем самым значительно облегчалась задача последующей гибридизации с комплементарной НК. Немаловажно и то, что стоимость PS-модификации НК существенно ниже стоимости тиольной модификации [219]. Таким образом, для решения ряда задач выбор PS-НК предпочтительнее по сравнению с тиольными НК.

2.5.3. Нековалентное взаимодействие немодифицированных НК с НЧЗ

Работы, связанные с нековалентным связыванием НК с НЧЗ, можно (условно) разделить на две группы: фундаментальные исследования закономерностей такого связывания и исследования, направленные на разработку ассоциатов НЧЗ-НК для различных применений. Различие между этими группами работ в целом заключается в разных условиях связывания НЧЗ и НК: в исследовательских работах чаще всего использовали метод низкого pH и salt-aging метод, а в прикладных обычно проводили короткую инкубацию без изменения pH. Для изучения нековалентного связывания с НЧЗ в последовательности НК нередко выделяли определенные блоки в последовательности НК, присваивая им разные функции.

2.5.3.1. Фундаментальные исследования

2.5.3.1.1. Блочные олигонуклеотиды: polyA-тракт

Олигонуклеотиды, содержащие polyA-тракт, широко используются для нековалентной адсорбции на НЧЗ поверхности золота [220, 221, 222, 223, 224, 225]. Группа Фан Ли исследовала взаимодействие НЧЗ диаметром 13 нм с НК, содержащими polyA-блок различной длины (5, 10, 15, 20, 30 н.) и не содержащими его, а с использованием в

качестве сравнения НК, несших тиольную группу. Инкубацию НЧЗ с НК проводили при нейтральном pH в течение 16 ч с дальнейшим добавлением NaCl. Показано, что НЧЗ, инкубированные с НК, не содержащими тиольную группу или polyA-блок, были одинаково устойчивы в солевых условиях до 0,3 М NaCl, в то время как НЧЗ, инкубированные с НК, не содержащими polyA-блок, начинали слипаться и менять цвет уже при содержании NaCl больше 20 мМ. Исследование устойчивости ассоциатов с polyA-содержащими НК к вытеснению НК, несущими polyT-блок показало, что лишь несколько молекул polyA-содержавших НК десорбировались из-за комплементарных взаимодействий. Исследователи пришли к выводу, что именно polyA-тракт целиком адсорбировался на поверхности НЧЗ, обладая бóльшим сродством к НЧЗ, чем олигонуклеотиды другого состава, причем на поверхности НЧЗ диаметром 13 нм могло адсорбироваться до четырехсот остатков аденина [226].

Фан Ли с соавторами использовали НЧЗ диаметром 15 нм для получения ассоциатов с НК, содержащими CpG-мотив и A₅- или A₁₅-тракт. Благодаря НЧЗ такие ассоциаты могли проникать в клетки, что необходимо для исследования терапевтических перспектив CpG-содержащих НК. Было показано, что тиольная НК адсорбировалась в количестве 74, A₅-CpG - 50, A₁₅-CpG – 24 мол./НЧЗ [227].

Основываясь на более выгодной адсорбции polyA-блока в составе НК на поверхности НЧЗ и зависимости числа адсорбированных молекул НК от длины polyA-блока [226], Хао Пей с соавторами разработали способ получения НЧЗ, на которой адсорбирована только одна молекула НК [228]. Ее свободный 3'-конец содержал определенную последовательность, комплементарную другой НК, адсорбированной на поверхности другой НЧЗ. Таким образом, при взаимодействии двух типов НЧЗ происходило контролируемое образование именно димеров НЧЗ. НЧЗ были предварительно обработаны бис(п-сульфонатофенил)фенилфосфином дикалия дигидратом (BSPP) для повышения устойчивости в солевых условиях инкубации с НК; он легко замещался polyA-содержащей НК. Затем НЧЗ инкубировали в концентрации 100 нМ с 500 нМ НК при комнатной температуре в течение 15 мин при низком pH. Меняя длину polyA-блока, авторы обнаружили, что при длине 80 нт. с выходом 90 % образовался димер НЧЗ, т.е., на каждой НЧЗ была адсорбирована одна молекула НК. Используя НЧЗ диаметром 5 и 10 нм и НК с polyA-блоком разной длины, авторы получили димеры, тримеры, тетрамеры НЧЗ с выходом 63, 56 и 23 % соответственно. Образование этих структур подтверждено микроскопическими изображениями и анализом электрофоретической подвижности (рис. 15).

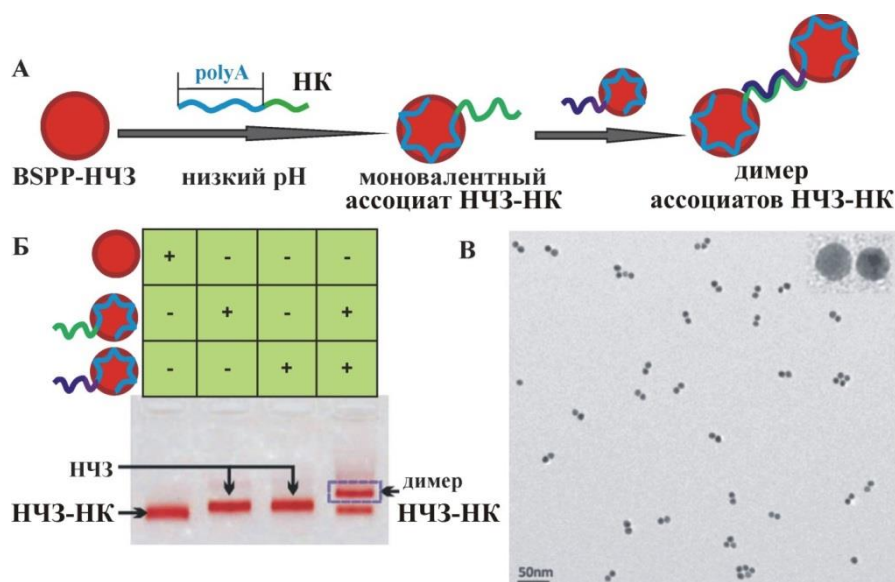


Рисунок 15 Контролируемое получение димеров H43. А - схема взаимодействия НК и H43 и образования димера H43, Б - гель-электрофорез двух типов ассоциатов H43 и НК, В - ПЭМ-изображения димеров H43. Адаптировано из [228].

Другой группой исследователей был сконструирован композит из золотого электрода, на поверхность которого были ковалентно присоединены H43 и НК для электрохимической детекции гербицида диквата. НК были комплементарны друг другу и содержали на 5'-конце блок ААА, образуя дуплекс с 5'-ААА-нависаниями [229].

Группа Лиу выявила зависимость эффективности связывания НК с H43 от их последовательности при связывании FAM-меченных НК длиной 15 нт. с H43 в соотношении 200:1. Показано, что С- и А-богатые НК адсорбировались на H43 в большем количестве, чем Т-богатые: 60 – 130 и 30 мол./H43 соответственно; НК смешанного состава адсорбировались в количестве 93 мол./H43. Авторы объясняли эти различия тем, что аденин и цитозин эффективно протонировались при pH 3,0 в отличие от тимина, чем уменьшали электростатическое отталкивание от H43. Однако не означало ли меньшее покрытие Т-богатыми НК, что они имели большее сродство к H43 и адсорбировались большим числом оснований, чем А- и С-богатые НК? Основываясь на работе Фан Ли с соавторами [226], авторы сделали вывод, что A₁₅ адсорбировалась на поверхности H43 тремя концевыми основаниями. Чтобы проверить, не являлась ли адсорбция polyT просто более медленным процессом, чем адсорбция НК другого состава, исследовали кинетику связывания этих НК с H43. Было обнаружено, что процесс связывания выходил на плато через две минуты для всех НК, включая polyT [230].

Стабильность ассоциатов H43 с НК изучена на примере кинетики десорбции НК при pH 7,6: за 1 ч лишь 2 % T₁₅ десорбировалось с поверхности H43, десорбция A₁₅ и C₁₅ составила менее 1 %. Добавление NaCl усиливало десорбцию 12-звенных НК, однако она

не достигала и 2 % за 1 ч. В то же время в 50 мМ HEPES за четыре дня десорбировалось 50 % ДНК. Ассоциаты проявили термическую стабильность при нагревании от 10 до 95 °C (pH 7,6).

Метод низкого pH, предложенный Лиу с соавторами [230], был использован для связывания НК, содержащих блок polyA длиной 10, 20 или 30 нт. и смешанную последовательность из 15 нт. и меченных остатком карбоксифлуоресцеина по 5'-концу, с НЧЗ диаметром 13 нм. Была исследована зависимость скорости десорбции НК от длины polyA-блока, температуры и концентрации NaCl. Оказалось, что степень десорбции увеличивалась при уменьшении длины polyA-блока (и длины НК в целом), и при повышении температуры концентрация NaCl не оказывала особого влияния на степень десорбции. Следует отметить, что в работе приведены не данные о количестве связавшихся молекул НК на частицу, а лишь доля десорбированной НК, определенная по интенсивности флуоресценции НК в растворе после вытеснения β-меркаптоэтанолом, что затрудняет интерпретацию результатов [231].

2.5.3.1.2. *Трехблочные олигонуклеотиды*

Помимо НК с polyA-трактом для исследования связывания с золотом применяются НК, последовательность которых состоит из трех блоков. Остановимся подробнее на разных структурах таких трехблочных НК.

Группа Лиу исследовала связывание НК с НЧЗ при различном pH [230]. Оказалось, что при нейтральном pH только 20 молекул НК длиной 12 нт. связывались с каждой НЧЗ при инкубации в течение ночи, тогда как при pH 3,0 процесс занимал несколько минут, а покрытие составило до 130 мол./НЧЗ. Связывание НЧЗ с НК проводили в двух вариантах: (1) связывание с гомопоследовательностями, содержащими остаток флуоресцеина, в этом случае измеряли интенсивность флуоресценции супернатанта, (2) связывание с НК вида $X(Y)_{13}X$, где X – A, G, C, T, Y – A, C, T во всех возможных комбинациях, всего 12 последовательностей (рис. 16), детекцию во втором случае осуществляли с помощью SYBR Green I. Связывание проводили при соотношении НК:НЧЗ равном 400:1. Из полученных данных были рассчитаны значения константы Лэнгмюра для pH 3,0 и pH 7,0, которые были равны 0,64 и 1,6 мкМ⁻¹ соответственно. Это означает, что адсорбция НК на НЧЗ при pH 7,0 была выгоднее, чем при pH 3,0, что противоречит расчетам по количеству связавшихся молекул НК на частицу при разных pH. Авторы заключили, что модель изотермы адсорбции Лэнгмюра неприменима для описания связывания НК с НЧЗ при низких значениях pH.

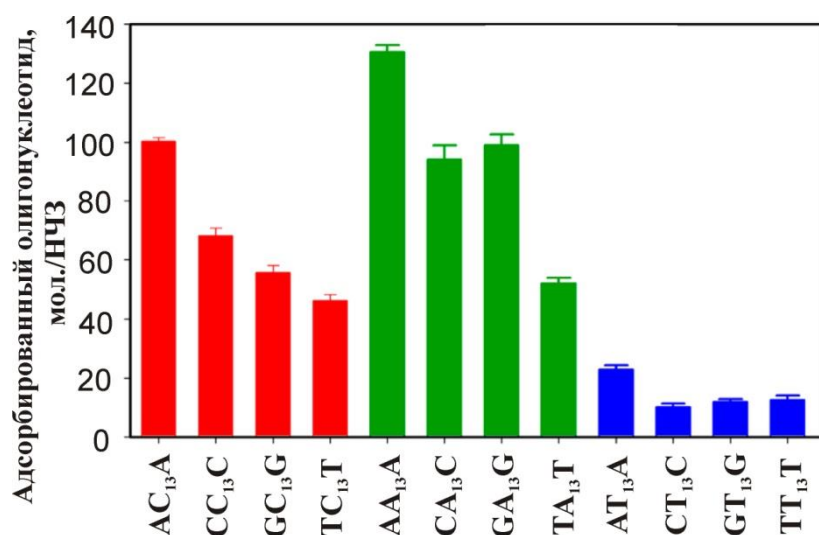


Рисунок 16. Покрывание НЧЗ молекулами НК в зависимости от их нуклеотидной последовательности. Адаптировано из [230].

Авторы сравнили заполнение НЧЗ молекулами НК при pH 3,0 и pH 7,0 при длительном связывании от 1 до 72 ч на примере НК с polyA-трактом длиной 9 нт. [232] и получили интересный результат: связывание при pH 3,0 занимало всего несколько минут и достигало 90 мол./НЧЗ, после увеличения pH до 7,0 и продолжительности инкубации до 72 ч емкость упала до 50 мол./НЧЗ. В то же время связывание при pH 7,0 с постепенным увеличением концентрации NaCl до 100 mM происходило намного медленнее, но через 72 ч достигало того же значения, что и для pH 3,0 - 50 мол./НЧЗ (рис. 17).

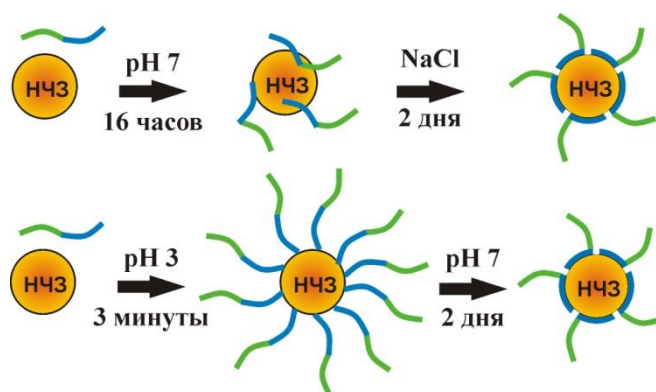


Рисунок 17. Модель связывания НК с НЧЗ при pH 7,0 и pH 3,0. Адаптировано из [232].

Лиу с соавторами была предложена колориметрическая детекция ДНК-мишени: ДНК-мишень связывала две НЧЗ, на которых были адсорбированы НК, комплементарные двум половинам мишени. По разнице в температуре плавления полностью комплементарного дуплекса и дуплекса с точечной мутацией можно детектировать мутацию в ДНК-мишени. Для того, чтобы такая детекция была возможна, необходимо обеспечить единообразное связывание НК с НЧЗ в одном направлении, иначе гибридизация с комплементарным олигонуклеотидом будет затруднена или невозможна. Для этой цели была сконструирована четырехблочная НК (рис. 18), содержащая на 5'-конце polyA/C-

тракт для адсорбции, затем polyT-спейсер, 12-звенную последовательность для гибридизации с комплементарной НК и polyT/G-кэп на 3'-конце [232].

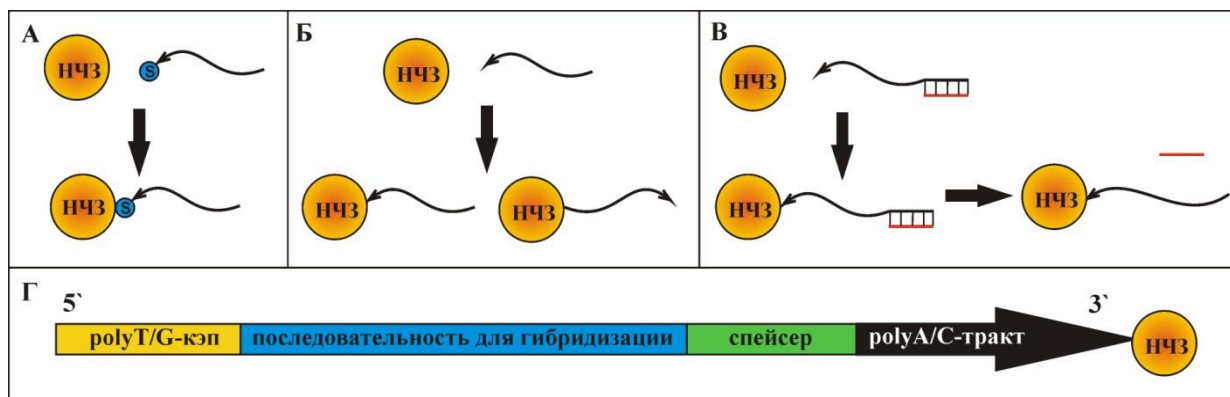


Рисунок 18. Схема взаимодействия НЧЗ с НК: А - тиольной НК), Б - немодифицированной НК и В – НК в структуре дуплекса с другой НК. Г - структура предложенной НК. Адаптировано из [232].

Функция polyT/G-кэпа и polyT-спейсера заключалась в том, чтобы предотвратить взаимодействие центральной, гибридизационной последовательности с НЧЗ и сделать более предпочтительной адсорбцию polyA-тракта. Однако стоит отметить, что эта модель сконструирована в предположении, что адсорбция для Т наименьшая, а для А наибольшая из всех азотистых оснований. Для предотвращения образования шпильки за счет взаимодействия polyT-кэпа с polyA-трактом уменьшали длину кэпа до трех оснований либо заменяли polyT-кэп на polyG-кэп. PolyA-тракт длиной менее 7 оснований не влиял на заполнение поверхности НЧЗ молекулами НК, а при увеличении длины polyA-тракта от 7 до 20 оснований степень заполнения поверхности НЧЗ олигонуклеотидами зависела от длины polyA-тракта, как было показано в работе Фан Ли с соавторами [226].

Трехблочные НК с polyA-трактом для связывания с НЧЗ, polyT-трактом для обеспечения перпендикулярной конформации и гибридизационным блоком были использованы в целой серии работ [233, 234, 235, 236]. В этих работах были определены оптимальные длины каждого блока и их функции на основе измерения плотности покрытия поверхности с помощью SERS и XPS-спектроскопии. Показано, что при высокой ионной силе (1 М NaCl или CaCl₂) достаточными для прочного связывания и эффективной гибридизации оказались следующие длины блоков: A₁₅, T₅ и N₁₅.

Один из вариантов блочных НК использовали для детекции тромбина. Две НК имели последовательность TBAh₂₀A₂₀, где TBA – это последовательности двух аптамеров к разным частям молекулы тромбина, h₂₀ – последовательность для гибридизации этих НК между собой, A₂₀ – последовательность для адсорбции на НЧЗ. Адсорбцию НК проводили salt-aging методом (500 мМ NaCl) и определяли плотность покрытия с помощью красителя для одноцепочечной ДНК OliGreen, которая составила 30 мол./НЧЗ. Константа диссоциации такого дуплекса составила примерно 1,5·10⁻¹¹ М, что оказалось меньше

значений константы диссоциации свободных аптамеров: $K_D(\text{TBA}_{15}) \approx 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $K_D(\text{TBA}_{29}) \approx 5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ [237].

2.5.3.2. Закономерности взаимодействия НЧЗ и НК, полученные в прикладных исследованиях

Для разработки методов детекции биополимеров с помощью ассоциатов НЧЗ с НК используют простые алгоритмы получения ассоциатов, не требующие критических значений pH и длительной инкубации.

В одной работе [238] описан метод выявления мутаций в плазмиде, который основан на полной или частичной комплементарности ее с короткой НК и связанной с этим степенью деградации плазмиды при нагревании. При нагревании до 95°C в течение 3 мин плазмиды pUC19, предварительно инкубированной с НЧЗ, группа Полака наблюдала деградацию плазмиды, деградация плазмиды отсутствовала при нагревании без НЧЗ. При добавлении короткой 22-звенной комплементарной НК к плазмиде происходит лишь частичная деградация плазмиды при нагревании, а в случае частичной комплементарности между короткой НК и участком плазмиды степень деградации становилась другой (рис. 19).

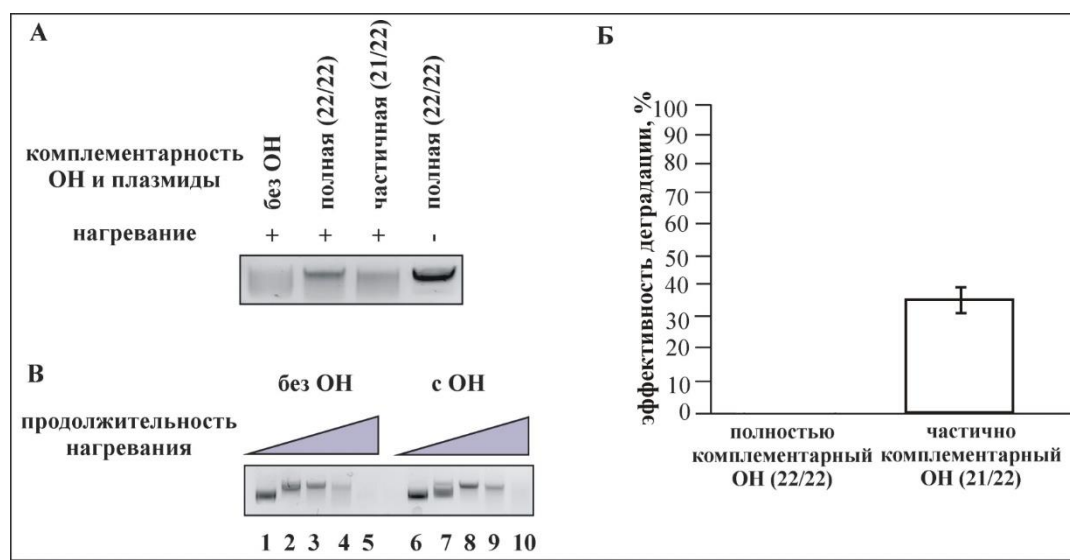


Рисунок 19. Метод выявления мутаций с помощью ассоциатов НК с НЧЗ на примере плазмиды pUc19. А – анализ деградации плазмиды pUc19 в отсутствие и в присутствии полностью или частично комплементарной НК в составе НЧЗ под действием нагревания; Б – эффективность деградации плазмиды pUc19 в присутствии полностью и частично комплементарной НК; В – анализ зависимости кинетики деградации плазмиды pUc19 в отсутствие и в присутствии полностью или частично комплементарной НК в составе НЧЗ от нагревания. Анализ проводили методом электрофореза в агарозном геле. Адаптировано из [238].

Группой исследователей предложен «многомерный» способ детекции 11 белков с помощью ассоциатов НЧЗ и A_{15} , T_{15} , C_{15} , меченных флуоресцеином. Суть метода заключалась в конкурентном связывании белка в зависимости от его свойств с НЧЗ либо с молекулой НК и последующем тушении флуоресценции и/или слипанием НЧЗ.

Гемоглобин, лизоцим, папаин, миоглобин и трансферрин вызывали слипание НЧЗ, а BSA, HSA, яичный белый альбумин, трипсин, пепсин и пероксидаза хрена обладали большим сродством к НЧЗ и защищали их от агрегации в солевых условиях. Фиксировали изменение интенсивности флуоресценции и отношение оптического поглощения на длинах волн 620 и 520 нм, поскольку комбинация этих двух показателей была уникальна для каждого белка и одного из трех ассоциатов НЧЗ-НК. Примечательно, что в данной работе использованы гомопоследовательности, состоящие из А, Т и С в отличие от ряда других исследований [239].

В работе, связанной с детекцией метилирования в ДНК исследовали сродство 20-звенных гомо-НК к НЧЗ (13 нм) по степени агрегации НЧЗ в солевых условиях (4 мМ Трис-ацетат, 10 мМ NaClO₄) после инкубации с этими НК. Выяснили, что А- и Т-богатые НК лучше защищали НЧЗ от солевой агрегации, чем С- и G-богатые НК [212], что может указывать на более высокое сродство А и Т к НЧЗ по сравнению с G.

2.5.4. Нековалентное взаимодействие НК, несущих тиольную группу, с НЧЗ

Присоединение НК к поверхности золота посредством тиольной группы очень широко используется для синтеза ковалентных ассоциатов с высокой плотностью покрытия поверхности НЧЗ молекулами НК для связывания в четко заданной ориентации, обеспечивающей последующую эффективную гибридизацию НК с комплементарной НК, для получения прочной ковалентной связи между НК и золотом. Однако химически присоединенные НК могут дополнительно взаимодействовать с поверхностью золота нековалентно, как и немодифицированные НК, и этим взаимодействиям посвящено большое количество исследований.

Группой Миркина с коллегами были сконструированы НК, содержащие А₂₀- или Т₂₀-спейсер между тиольной группой и 12-звенной последовательностью, меченной флуоресцеином. При обработке НЧЗ меркаптоэтанолом происходило вытеснение тиольных групп, что позволяло по изменению интенсивности флуоресценции рассчитать плотность покрытия НК НЧЗ. Плотность покрытия составила 35 ± 1 и 24 ± 1 пмоль/см² для НК с Т₂₀ и А₂₀-спейсером соответственно, что еще раз подтвердило, что сродство остатков аденина к поверхности золота выше, чем остатков тимина [240]. Меньшее сродство тимина привело к меньшему числу адсорбированных тиминовых оснований в составе одной молекулы и, следовательно, к большему числу присоединенных к НЧЗ молекул.

Группа Миркина использовала НЧЗ, модифицированные тиольными гомо-НК длиной 15-20 нт., для выявления зависимости между нуклеотидной последовательностью и агрегацией НЧЗ в солевых условиях. Для этого определяли критическое для слипания НЧЗ значение ионной силы раствора, используя в качестве электролита MgCl₂. Полученные

данные свидетельствовали о том, что олигоТ стабилизировали частицы от слипания существенно лучше, чем олигоА и олигоС. Это явление авторы объясняли тем, что к НЧЗ присоединялось больше молекул олигоТ, чем олигоА и олигоС из-за меньшего сродства Т к поверхности золота, чем у А и С [209].

В работе, посвященной исследованию связывания тиольных НК с НЧЗ разных размеров (от 15 до 250 нм), группа Миркина исследовала плотность покрытия НЧЗ молекулами НК в зависимости от состава спейсера между тиольной группой и распознаваемой последовательностью [241]. Было использовано три варианта спейсера: А₁₀, Т₁₀ и PEG (3[(CH₂CH₂O)₆-амидофосфит]). Связывание проводили при постепенном повышении концентрации NaCl до 1 М. Было показано, что емкость максимальна для PEG-спейсера (250 мол./НЧЗ), а для А₁₀ и Т₁₀ составляет 70 и 80 мол./НЧЗ соответственно. Эти различия объясняли тем, что, во-первых, сахаро-фосфатные остовы НК-спейсеров электростатически отталкивались друг от друга, во-вторых, аденин и тимин проявляли сродство к поверхности золота, в итоге и А₁₀, и Т₁₀ нековалентно адсорбировались на частицах, препятствуя дальнейшему связыванию НК с НЧЗ [208].

Для изучения взаимодействия азотистых оснований с поверхностью золота АСМ-зонд, покрытый слоем золота, модифицировали с помощью двух наборов НК: SH-(CH₂)₆-5'-X₂₀-3', где X - Т, С, G или А и SH-(CH₂)₆-5'-Т₂₄X₂-3', где X - А, С или G. Длина НК была выбрана так, чтобы предотвратить нековалентное взаимодействие самого зонда с поверхностью золота. Для спейсера выбрали олигоТ-последовательность благодаря тому, что молекулы тимина не взаимодействовали между собой, и такой спейсер оставался линейным. Из данных по взаимодействию с золотом X₂₀-НК авторы заключили, что тимин слабее всех остальных азотистых оснований нековалентно взаимодействовал с золотом. В то же время данные, полученные для аденина, могли означать, что аденин взаимодействовал с поверхностью золота по нескольким механизмам или что несколько адениновых звеньев взаимодействовали с поверхностью золота [242].

Исследуя ковалентно присоединенную к поверхности золота НК Т₂₅ методами XPS- и FTIR-спектроскопии, Кимура-Суда с соавторами получили покрытие $1 - 6 \cdot 10^{13}$ мол./см², причем для покрытия $1 \cdot 10^{13}$ мол./см² получены данные о том, что 8 из 25 азотистых оснований каждого НК были нековалентно сорбированы на поверхности золота [243]. Следует отметить, что покрытие НЧЗ молекулами BSA, который также образовывал ковалентные связи с НЧЗ за счет тиольных групп остатков цистеина, достигало $3,3 \cdot 10^{12}$ мол./см² [176].

Путем измерения гидродинамического радиуса НЧЗ, связанных с оц-НК длиной 46 нт., методом динамического светорассеяния было показано, что связавшиеся тиольные НК

располагались параллельно поверхности частицы, обвиваясь вокруг НЧЗ. С увеличением ионной силы раствора для подавления неспецифических взаимодействий НК с НЧЗ наблюдали увеличение гидродинамического радиуса, свидетельствовавшее о более удаленном от НЧЗ расположении НК (рис. 20). Те же измерения для дц-НК длиной 146 п.нт. позволили сделать вывод, что дц-НК также стабилизировали НЧЗ, однако дальнейшее концентрирование ассоциатов приводило к слипанию НЧЗ. Стоит отметить, что в данной работе проводят лишь измерения гидродинамического радиуса и не измеряют покрытие НЧЗ молекулами [244].

При изучении взаимодействия тиольных НК T_5 и T_{25} и немодифицированной НК T_5 с поликристаллическим золотом методами XPS,- NEXAFS- (тонкая структура блискоуглового рентгеновского поглощения) и FTIR-спектроскопии Кимура-Суда с соавторами получили данные, свидетельствовавшие о том, что T_5 адсорбировался на поверхности золота таким образом, что его азотистые основания были распростерты на поверхности [245] (аналогично схеме, рис. 20 А).

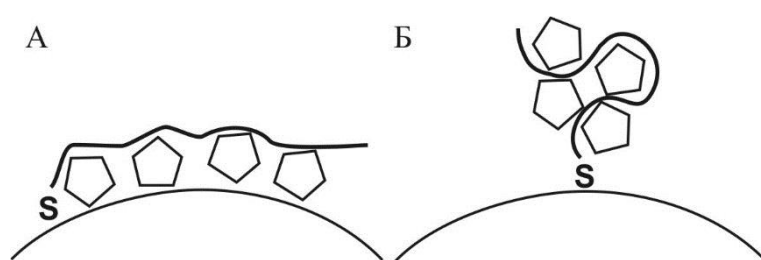


Рисунок 20. Схематичное изображение ассоциатов НЧЗ с тиольными НК. А – плоское расположение адсорбированных НК, Б- вытянутое расположение адсорбированных НК. Адаптировано из [244].

Браун с соавторами исследовали нековалентные взаимодействия с поверхностью НЧЗ олигонуклеотидов, присоединенных к ней через тиольную группу [43]. НК длиной 15 нт. были сконструированы так, что на 5'-конце, в середине или на 3'-конце содержался блок вида NNTNN, где N – это C, G, A, а остальные 10 азотистых оснований в составе – это Т (рис. 21). Для изучения неспецифических взаимодействий ковалентно присоединенных к НЧЗ НК ковалентные ассоциаты обрабатывали 1 мкМ МСН (меркаптогексанол) в течение 2 мин, затем инкубировали с флуоресцентно меченными комплементарными НК и определяли степень гибридизации по измерению флуоресцентного сигнала после жесткой обработки МСН ($c(\text{МСН}) = 1 \text{ mM}$, 16 ч). Мягкая обработка МСН снимала неспецифические взаимодействия НК с НЧЗ, но не разрушала ковалентные связи в отличие от жесткой обработки [246]. Таким образом, сравнивая данные по гибридизации ковалентных ассоциатов, предварительно обработанных МСН в мягких условиях, с данными по гибридизации ковалентных ассоциатов без такой обработки, авторы делали вывод о

наличии нековалентных взаимодействий и их зависимости от нуклеотидного состава. Зависимость покрытия НЧЗ молекулами НК [молекул/см²] от концентрации свободной НК аппроксимировали уравнением адсорбции Лэнгмюра и, анализируя его параметры, сделали следующий вывод о сродстве азотистых оснований в составе НК к золоту: $A > C > G > T$.

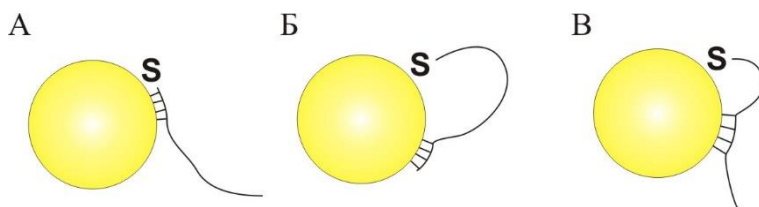


Рисунок 21. Нековалентная адсорбция тиольных НК на НЧЗ. А – Связывающий блок расположен на 5'-конце молекулы, Б – в середине молекулы, В – на 3'-конце молекулы. Адаптировано из [43].

Привлекает внимание тот факт, что тимин изначально считался авторами обладающим наименьшим сродством к поверхности золота и потому был выбран в качестве неактивного компонента НК. Если же считать сродство всех азотистых оснований неизвестным, то задействованный в данной работе набор НК не является представительным для оценки способности разных азотистых оснований связываться с НЧЗ, т.к. эти НК состояли из 11 Т и лишь четырех А, С или Г. Свои выводы о низком сродстве тимина к поверхности НЧЗ группа Браун сделала на основании литературных данных, однако в одной из этих работ способность к связыванию с НЧЗ оценивали по электрофоретической подвижности НКЗ (10 нм), покрытых трифенилфосфинсульфонатом и инкубированных с тиольными НК [247], а в другой изучали связывание НЧЗ с нуклеозидами, т.е., незаряженными молекулами и по слипанию НЧЗ и связанному с этим изменению цвета сделали вывод, что Т связывался хуже всех остальных азотистых оснований [209].

2.5.5. Механизм нековалентного взаимодействия НК с НЧЗ

2.5.5.1. Теория ДЛФО

Взаимодействие НЧЗ с заряженными молекулами, в частности, с НК, можно описывать в рамках теории ДЛФО (теория Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека) [248, 249, 250, 251]. Это теория устойчивости коллоидных систем к агрегации, в которой рассматривается совместное действие энергии притяжения и энергии отталкивания между частицами (рис. 22). Взаимодействие обусловлено ван-дер-ваальсовыми и электростатическими силами. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия подчиняются уравнению (4):

$$\omega(r) = -A/\pi^2 \rho_1 \rho_2 r^6, \quad (4)$$

где ρ_1 и ρ_2 - число атомов в единице объема взаимодействующих тел (частиц), а A – так называемая константа Гамакера. Поскольку эффективная константа Гамакера всегда положительна, ван-дер-ваальсовы силы между подобными частицами вызывают

притяжение. Электростатические силы приводят к отталкиванию подобных частиц за счет расклинивающего давления. При перекрывании двойных электронных слоев (ДЭС) сближающихся частиц концентрация вещества сольватных оболочек (ионов) между частицами становится выше равновесной, и возникает поток ионов, создающий расклинивающее давление. Комбинация двух этих сил создает энергетический барьер. Высота энергетического барьера определяет, будет ли коллоид стабилен (при более высоком энергетическом барьере) или же произойдет слипание (при более низком энергетическом барьере). Такие факторы, как константа Гамакера, поверхностный потенциал и концентрация электролита, влияют на высоту энергетического барьера и могут использоваться для контроля стабильности коллоида. Чем выше потенциал на поверхности частиц, тем больше отталкивание между частицами. Чем ниже концентрация инертного электролита, тем больше расстояние между частицами (т.е., больше длина Дебая-Хюккеля), на котором отталкивание становится существенным. Оба эти фактора увеличивают высоту энергетического барьера. И наоборот, чем больше константа Гамакера или выше концентрация электролита, тем сильнее притяжение между частицами и ниже энергетический барьер [252, 253].

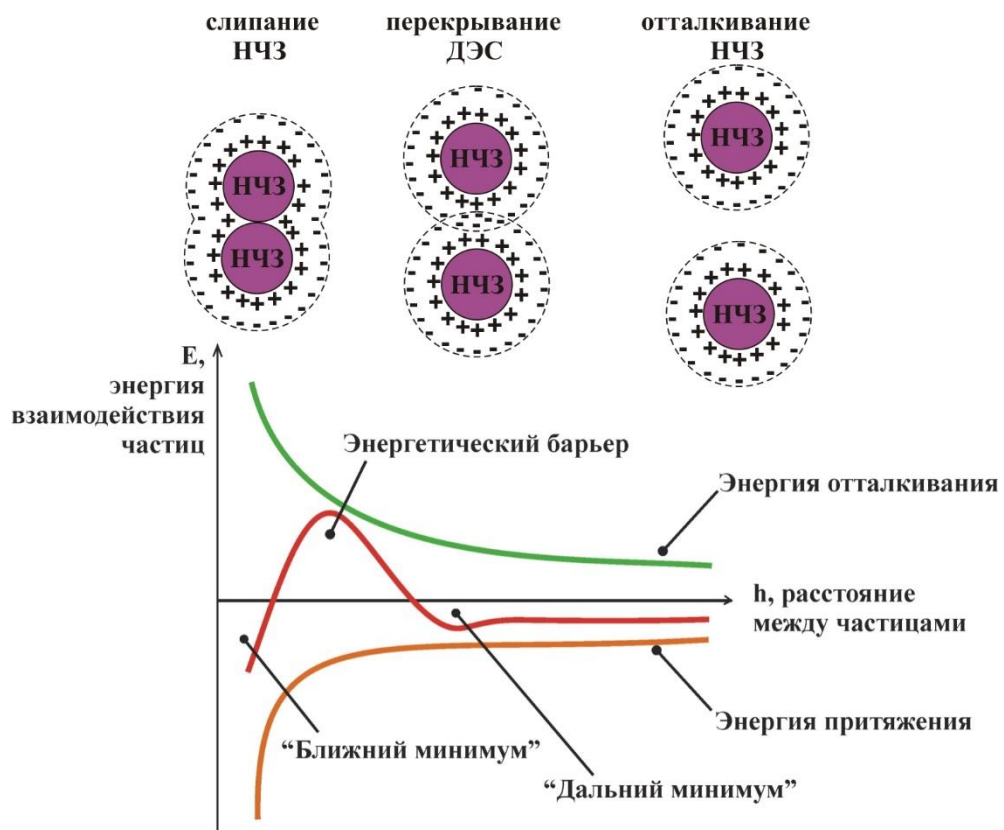


Рисунок 22. Силы притяжения и отталкивания между коллоидными частицами в зависимости от расстояния между ними.

Теория ДЛФО не может описать случаи, когда частицы сближаются меньше, чем на 1 нм, т.к. она не учитывает другие типы взаимодействий: гидрофобные, стерические, сольватные взаимодействия.

2.5.5.2. Влияние соли и растворителя

Группа Лиу исследовала адсорбцию НК длиной 12, 24 и 44 нт. на НЧЗ в зависимости от типа и концентрации соли, pH раствора, концентрации этанола [254]. Поскольку ДНК и стабилизированные цитратом натрия НЧЗ заряжены отрицательно, то очевидно, что на адсорбцию НК влияет сила электростатического отталкивания, которая зависит от типа соли в растворе. В растворе, содержащем 1 нМ НК, меченной флуоресцеином, и 1 нМ НЧЗ, адсорбция НК в отсутствие соли протекала медленно, скорость адсорбции НК увеличивалась при $c(\text{NaCl}) = 30$ мМ, а при $c(\text{NaCl}) = 60$ мМ она занимает 1 мин. Добавление соли ускоряло адсорбцию НК независимо от длины НК и увеличивало итоговую емкость НЧЗ (15 мол./НЧЗ для НК длиной 12 нт.) (рис. 23 А). Приведена оценка длины Дебая, уменьшившейся с 4,7 до 1 нм при увеличении концентрации NaCl с 0 до 90 мМ (рис. 23 Б), что позволило авторам сделать вывод о том, что силы отталкивания между НЧЗ начинают действовать на расстоянии 1-2 нм.

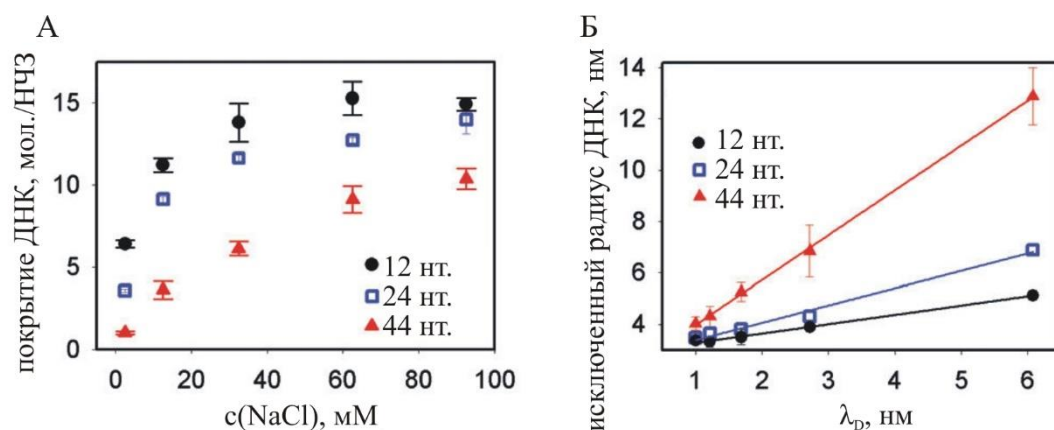


Рисунок 23. Адсорбция ДНК длиной 12, 24 и 44 нт. на НЧЗ. А - покрытие поверхности НЧЗ молекулами ДНК в зависимости от концентрации NaCl, Б – линейная зависимость между исключенным радиусом ДНК и длиной Дебая. Адаптировано из [254].

Также показано, что постепенное добавление к смеси НК и НЧЗ NaCl порциями по 30, 60 и 60 мМ с интервалом в 1 ч не изменяло цвет НЧЗ, а единовременное добавление 150 мМ NaCl приводило к слипанию НЧЗ; тушение флуоресценции, свидетельствовавшее об адсорбции НК на поверхности НЧЗ, наблюдалось лишь в присутствии NaCl. Авторы использовали этанол как менее полярный растворитель, чем вода; увеличивая его концентрацию в образцах до 80 %, они получили максимально возможное в данных условиях покрытие НК длиной 12 нт. при 27-кратном избытке НК над НЧЗ (22 мол./НЧЗ).

2.5.5.3. Роль гидрофобных взаимодействий

Нельсон и Ротберг подвергли сомнению применимость теории ДЛФО к адсорбции НК на НЧЗ, т.к. она не учитывает влияние на адсорбцию нуклеотидной последовательности, типа соли, различий в связывании одно- и двуцепочечной НК. Они предполагали, что основную роль в связывании НК и НЧЗ играют гидрофобные взаимодействия и рассматривали взаимодействия НК-растворитель и золото-растворитель. Используя данные по интенсивности флуоресценции $Su5$, авторы исследовали кинетику адсорбции согласно уравнению Аррениуса, а также определили коэффициент Джонса-Дола для разных электролитов. Аденин сольватировался четырьмя молекулами воды: по одной на атомы N3 и N7 и аминогруппу, четвертая делилась между аминогруппой и атомом N1. Цитозин также связывал четыре молекулы воды: по одной на карбонильный атом O и аминогруппу, еще две делились между атомом N3 и карбонильной группой. Тимин связывал три молекулы воды: по две на каждый из карбонильных атомов O, а третья делилась между атомом C4 и атомом N3. Также до четырех молекул воды связывалось с фосфатными группами нуклеотида. Чтобы уменьшить площадь контакта с растворителем, оц-ДНК претерпевала небольшие конформационные изменения, увеличившие ее спиральную скрученность, которые возможны в случае дегидратации азотистых оснований. Исходя из числа связанных с азотистыми основаниями молекул воды, можно сказать, что аденин с меньшей вероятностью терял воду, чем тимин, следовательно, А-богатый участок ДНК с большей вероятностью оставался в нескрученном состоянии, чем Т-богатый, и охотнее адсорбировался на поверхности НЧЗ [255].

При анализе значений $\log P$ (коэффициента распределения между фазами) для азотистых оснований группа Лиу сделала вывод о том, что все азотистые основания гидрофильны, причем цитозин более, а аденин менее гидрофилен (данные о значениях $\log P$ взяты из онлайн базы данных LOGKOW, таблица 9). Таким образом, было сделано заключение, что роль гидрофобных взаимодействий в нековалентном связывании НЧЗ с НК невелика [256]:

Таблица 9. Значения коэффициента распределения между фазами для азотистых оснований и дезоксирибонуклеозидов.

азотистые основания	$\log P$	2' дезоксирибонуклеозиды	$\log P$
тимин	$-0,6 \pm 0,04$	тимидин	$-1,1 \pm 0,2$
цитозин	$-1,73 \pm 0,39$	цитидин	$-2,3 \pm 0,2$
аденин	$-0,14 \pm 0,03$	аденозин	$-1,1 \pm 0,1$
гуанин	$0,94 \pm 0,04$	гуанозин	$-1,9 \pm 0,1$

Группа Лиу подтвердила свое предположение, показав, что гидрофобные взаимодействия НЧЗ с НК уменьшились в солевых условиях [254], а покрытие НЧЗ молекулами НК возросло. Основываясь на всех проведенных экспериментах, авторы предложили модель адсорбции НК с НЧЗ, основанную как на специфических химических взаимодействиях азотистых оснований с поверхностью золота, в частности, атомов N3 и N7 аденина и гуанина, так и на электростатических. Каждая молекула ДНК характеризовалась своим гидродинамическим радиусом и электростатически исключенным по отношению к другим молекулам ДНК объемом. При сближении исключенных объемов дальнейшая адсорбция НК была невыгодна. Так как исключенный объем для длинных НК больше, их способность к связыванию уменьшалась. При повышении концентрации соли связывание могло увеличиться из-за экранирования отрицательных зарядов и компактизации НК, но этот же процесс делал адсорбцию НК менее прочной и облегчал десорбцию (рис. 24).

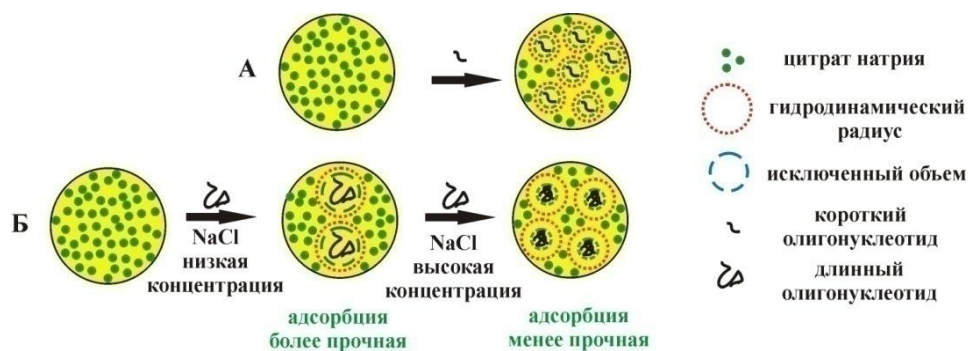


Рисунок 24. Схематическое изображение адсорбции коротких (А) и длинных (Б) ДНК на поверхности НЧЗ за счет вытеснения цитрата натрия. Б – улучшение связывания ДНК при повышении концентрации NaCl. Адаптировано из [254].

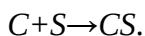
Однако можно сделать и другой вывод о значении гидрофобных взаимодействий: при повышении ионной силы раствора на поверхности НЧЗ адсорбировалось больше молекул НК в стремлении уменьшить площадь контакта азотистых оснований с ионами в растворе и экранируя их фосфатными группами остова.

2.5.5.4. Изотерма адсорбции Лэнгмюра

Для описания адсорбции молекул ДНК на различных поверхностях, в том числе золотых, широко применяют модель изотермы мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра [230, 232, 254, 43]. Эта модель предполагает соблюдение четырех условий в рассматриваемой системе: все сайты адсорбции на поверхности эквивалентны, адсорбированные молекулы не взаимодействуют между собой, все случаи адсорбции происходят по одному механизму, адсорбированные молекулы образуют исключительно монослой. Если система удовлетворяет этим допущениям, то взаимодействие НЧЗ и НК можно описать уравнением изотермы Лэнгмюра (5):

$$q = \frac{Qb[S]}{1+b[S]}, \quad (5)$$

где q – равновесное покрытие частицы адсорбируемыми молекулами [мол./част.], Q – максимально достижимое покрытие, $[S]$ – равновесная концентрация адсорбируемого вещества, b – константа Лэнгмюра, т.е., константа равновесия процесса адсорбции:



В большинстве работ, описывающих количественную оценку связывания НК с НЧЗ, рассчитано значение именно константы Лэнгмюра [230, 254, 43]. Однако в исследовании, посвященном связыванию белков плазмы (альбумина, фибриногена, гамма-глобулина, гистонов и инсулина) на НЧЗ разных размеров – от 5 до 100 нм – степень связывания белков с НЧЗ характеризуют константой связывания, обратной константе Лэнгмюра и имеющей размерность [моль/л]. Константы связывания рассчитаны по интенсивности флуоресценции, они имели значения порядка $1 \cdot 10^{-5}$ М для НЧЗ диаметром 5 нм, $1 \cdot 10^{-6}$ М для НЧЗ диаметром 10 и 20 нм, $1 \cdot 10^{-7}$ М для НЧЗ диаметром 30 и 60 нм, $1 \cdot 10^{-8}$ М для НЧЗ диаметром 80 нм [8].

2.5.5.5. Конформация НК при взаимодействии с поверхностью золота

Целый ряд исследований посвящен определению конформации НК, связанной с НЧЗ. В работе [257] было проведено изучение того, как структура дц-НК влияет на ее связывание с НЧЗ. В работе исследована структура ДНК на примере обычного двуспирального дуплекса (типа $\parallel$), искаженного дуплекса (типа ∇), содержащего в середине мотив A_6/T_6 , и перекрученного дуплекса на основе самокомплементарной НК (типа ∇) при связывании с НЧЗ диаметром 5 и 14 нм. На основании SERS-спектроскопии по степени слипания НЧЗ в присутствии KCl было сделано заключение, что лучше всего связывается с НЧЗ самокомплементарная НК типа ∇ .

Исследование кинетики связывания НК с последовательностью A_{25} , C_{25} , T_{25} с поверхностью покрытых слоем золота призм с помощью спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса выявило следующую тенденцию к связыванию: $T < C < A$. При изучении длительной кинетики связывания (до 12 ч) плотность покрытия НЧЗ T_{25} уравнивалась с C_{25} , но оставалась меньше, чем у A_{25} . Суммарное покрытие после часовой инкубации НК с поверхностью золота уменьшалось в ряду $A > C > T$. С другой стороны, при измерении кинетики связывания таких же НК, но содержащих тиольную группу, получили противоположные данные: покрытие возрастало в ряду $A < C < T$. Нековалентные взаимодействия азотистых оснований с НЧЗ в составе тиольной НК меняли конформацию молекулы, увеличивая площадь ее контакта с поверхностью золота, возникающее электростатическое отталкивание молекул НК между собой уменьшало количество

ковалентных связанных с золотом молекул НК. Авторы предположили, что нековалентные взаимодействия Т с золотом были слабее и образовывались медленнее, чем у А и С, и потому не мешали ковалентному взаимодействию тиольной группы с НЧЗ, приводя к более высокому покрытию поверхности за короткое время. Правда, это предположение не объясняет уменьшения покрытия немодифицированных НК в ряду А>С>Т. Возможно, что Т сильнее взаимодействовал с поверхностью золота, чем А и С, адсорбируясь большим количеством азотистых оснований и приведя к конечному меньшему покрытию поверхности [211].

В некоторых работах для определения конформации НК на поверхности НЧЗ использовали метод измерения электрофоретической подвижности. Для этого НКЗ (нанокристаллы золота) диаметром 10 нм обрабатывали трифенилфосфинсульфонатом $(C_6H_5)_3PC_6H_4SO_3Na$, после чего НКЗ приобретали отрицательный заряд и электрофоретическую подвижность. Далее НКЗ связывали с тысячекратным избытком тиол-содержащих НК длиной от 8 до 135 нт. и анализировали гель-электрофорезом в 2 % агарозе. По изменению электрофоретической подвижности ассоциатов рассчитали их размер с использованием калибровочной кривой зависимости электрофоретической подвижности НКЗ, обработанных трифенилфосфинсульфонатом от их размера. Из полученных данных по размеру ассоциатов были сделаны выводы о конформации НК, связанных с НКЗ. НК длиной до 30 нт. находились в вытянутом состоянии, перпендикулярном поверхности золота, при увеличении длины НК ее первые 30 нуклеотидов по-прежнему находились в вытянутом состоянии, а остальная цепь скручивалась случайным образом, самые же длинные НК из представленных обвивались вокруг НКЗ [247].

Лиу с соавторами предположили следующую модель связывания тиольных и немодифицированных НК с НЧЗ [230]: тиольные НК занимали вытянутое, перпендикулярное к поверхности частицы положение, немодифицированные НК при pH 7,0 адсорбировались всеми азотистыми основаниями, «обвивая» частицу, а при pH 3,0 в связывании участвовали лишь несколько терминальных азотистых оснований, обеспечив тем самым большую «плотность» молекул НК на поверхности частицы. Однако авторы не отрицали, что реальная картина адсорбции, вероятно, была сложнее, т.е., часть молекул задействовала в связывании только концевые азотистые основания, а другая часть молекул адсорбировалась целиком.

2.5.5.6. Адсорбция одно- и двуцепочечных НК

Ли и Ротберг проводили сравнение электростатических свойств одно- и двуцепочечной ДНК, исходя из предположения, что гибкая структура одноцепочечной ДНК позволила

молекуле принять такую конформацию, что сахаро-фосфатный остов был удален от поверхности НЧЗ (13 нм), а азотистые основания, наоборот, были расположены достаточно близко к поверхности золота для ван-дер-ваальсовых взаимодействий с ней. Двойная спираль двуцепочечной ДНК не позволила ей принять выгодную для связывания с НЧЗ конформацию. В итоге адсорбция двуцепочечных НК на НЧЗ если и происходила, то требовала намного больше времени, чем адсорбция одноцепочечных НК [249]. Также двуцепочечная ДНК имела удвоенную плотность отрицательного заряда, что усиливало ее отталкивание от цитратных НЧЗ [258].

2.5.5.7. Адсорбция длинных и коротких НК

Исследование связывания НЧЗ с НК разной длины (10, 24 и 50 нт.), меченных родамином, методом измерения зависимости интенсивности флуоресценции показало [259], что короткие НК адсорбировались на поверхности частиц быстрее, чем длинные. В другой работе связывание НЧЗ с НК исследовали при повышающихся температурах путем измерения спектров оптического поглощения. Было обнаружено, что скорость адсорбции возрастала с увеличением температуры. Исходя из ранее описанной модели взаимодействия НЧЗ и НК [249], авторы сделали предположение, что изменение конформации НК, необходимое для ван-дер-ваальсовых взаимодействий, происходило путем структурных флуктуаций, которые усиливались при повышении температуры и становились менее затрудненными с уменьшением длины НК.

Длинные НК лучше защищают НЧЗ от слипания, как это было показано на примере НК длиной 12 и 70 нт. при добавлении 120 мМ NaCl. С использованием модели изотермы адсорбции Лэнгмюра, Лиу с соавторами измерили константы Лэнгмюра для НК длиной 12 и 44 нт., получив значения $0,022 \pm 0,004 \text{ нМ}^{-1}$ и $0,033 \pm 0,004 \text{ нМ}^{-1}$ соответственно. Десорбция НК с НЧЗ также зависела от длины НК: 2,5 и 5 % НК длиной 144 и 12 нт. соответственно высвобождались за 2 ч; добавление NaCl ускоряло десорбцию пропорционально концентрации соли [254].

2.5.5.8. Атомы, отвечающие за связывание азотистых оснований с поверхностью золота

Методами циклической вольтамперометрии и электрохимически контролируемой СТМ было установлено, как ориентированы азотистые основания на поверхности золота при разных значениях pH [260]. Так, аденин был расположен перпендикулярно поверхности при pH 4,5, и параллельно плоскости золота при pH 2,5. Гуанин был расположен перпендикулярно при pH 6,5, а при более низких значениях его расположение было беспорядочно. Для тимина предпочтительным являлось параллельное расположение в плоскости относительно поверхности золота. Таким образом, ориентация параллельно

плоскости поверхности золота являлась доминирующей для пиримидиновых оснований, а перпендикулярная – для пуриновых.

Методом SERS-спектроскопии было установлено, посредством каких атомов нуклеозиды связываются с НЧЗ (рис. 25 А). dA образует связь через атом N(7) имидазольного кольца, а также аминогруппу атома C(6). dC связывается с НЧЗ через атом N(3) пиримидинового кольца с частичным вкладом атома О карбонильной группы C(2)=O. Координация dG с НЧЗ вовлекает и атом N(1), и атом О карбонильной группы C(6)=O. Наконец, dT связывается с НЧЗ посредством атома О карбонильной группы C(4)=O. Также устанавливают, что dA, dT, dG ориентированы перпендикулярно к поверхности НЧЗ, однако для dC данные о расположении относительно поверхности золота неоднозначны [261].

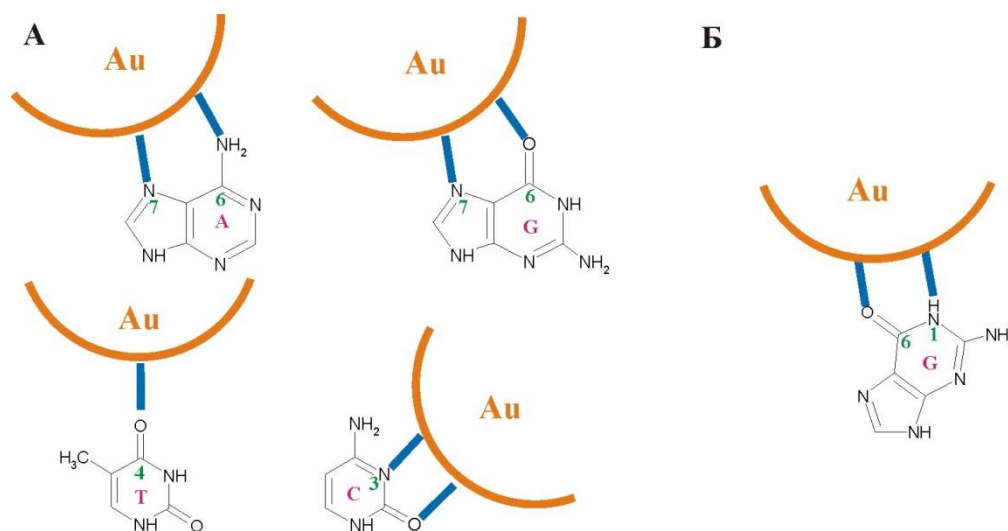


Рисунок 25. Предполагаемые схемы взаимодействий азотистых оснований в составе 2'-дезоксинуклеозидов с НЧЗ. Адаптировано из [256] (А) и [261] (Б).

При изучении термодинамических аспектов связывания НЧЗ диаметром 6,5 нм с азотистыми основаниями [167] при соотношении 1:5 были получены величины ΔH взаимодействия, согласно которым азотистые основания образовали следующий ряд аффинности к НЧЗ: $C > G > A > T$. Для тимина калориметрические данные получены не были, но авторы предположили, что он слабее всего связывался с НЧЗ, опираясь на идею, что аденин, цитозин и гуанин взаимодействовали с поверхностью золота через аминогруппу, а у тимина она отсутствовала, хотя эта идея не согласовалась с вышеописанной моделью связывания [256, 261].

Несколько исследовательских групп предложили одинаковую схему взаимодействия конкретных атомов в азотистых основаниях с поверхностью золота, за исключением гуанина, для которого было предложено два типа взаимодействия. Группа Перголезе предположила, что G и dG находились в наклонной ориентации по отношению

к поверхности золота и взаимодействовали с ней через атом О карбонильной группы и атом N(7) [262] (рис. 25 А) [256]. Джанг предложил другой тип взаимодействия, где G взаимодействовал с НЧЗ через атом N7 и карбонильный атом (C(6)=O) (рис. 25 Б) [261].

При моделировании взаимодействия плоской поверхности золота с азотистыми основаниями методом молекулярной динамики Алави с соавторами сделали вывод, что азотистые основания располагались параллельно поверхности золота [263].

Таким образом, на основании многочисленных исследований о связывании ДНК с поверхностью золота можно выделить несколько основных трендов в трактовании механизма их взаимодействия, однако единой доказанной и согласованной модели связывания среди них нет, а значит, это научное направление открыто для новых исследований.

2.6. Практическое использование нековалентных ассоциатов золотых субстратов с пептидами и олигонуклеотидами

В настоящее время взаимодействию нуклеиновых кислот и пептидов с разнообразными по химическому составу, форме, физическим свойствам поверхностями посвящено большое количество исследовательских работ. Это обусловлено обширной сферой применения гибридов, сочетающих свойства биомолекул и неорганических материалов в уникальных комбинациях.

2.6.1. Селекция ДНК, РНК и пептидов, специфичных к различным материалам

Широкий спектр исследований связан с изучением закономерностей и механизмов взаимодействия азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов с различными материалами: плоскими поверхностями, наночастицами, нанотрубками и т.д. [264, 265, 266, 267, 268 269, 270]. Ряд исследовательских групп перешел от изучения принципов взаимодействия модельных лигандов с поверхностями к селекции лигандов, способных к высокоспецифичному связыванию с целевой поверхностью методом SELEX (систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением) или с применением технологии фагового дисплея. Опубликованы результаты селекции пептидных аптамеров к наночастицам диоксида титана [271], оксида железа [272], бориды никеля [273], к поверхности диоксида титана [274], оксида цинка [275], титана [276], алмазоподобного углерода [27 5], лигнина [278], алюминия [279], к кристаллам арсенида галлия [280], к углеродным наноконусам [281]. Работы, связанные с получением ДНК и РНК-аптамеров, делятся на две группы: в первой селекцию проводили в растворе предшественника наночастиц [282, 283, 284], например, хлорида кобальта и хлорида железа (II) при получении наночастиц Co/FeO [283] или $[Pd_2(DBA)_3]$ (DBA – дибензиден ацетон)

при синтезе наночастиц палладия [284], во второй – в присутствии уже сформированных частиц [285].

Селекцию аптамеров к наночастицам ZnO по методу SEL-Seq (однораундовое обогащение лигандов с глубоким секвенированием) проводили за один раунд, затем анализировали последовательности выбранных семейств с высокой и низкой аффинностью методом массового параллельного секвенирования с использованием системы Applied Biosystems SOLiD (AB SOLiD). Консенсусная последовательность для высокоспецифичного семейства - это T₃₀. Аффинность выбранных семейств олигонуклеотидов сравнивали, оценивая количество связанных с мишенью олигонуклеотидов по интенсивности флуоресцентного сигнала (Alexa-флуорофор) на единицу площади наночастиц. Высокоаффинное семейство проявило десятикратное увеличение связывания по сравнению с исходной библиотекой и стократное улучшение по сравнению с низкоаффинным семейством [286].

В исследовании селекции аптамеров к частицам Sephadex G-100 по методу SELEX проводили 11 раундов связывания РНК-библиотеки с мишенью и получили две группы высокоспецифичных аптамеров, с разными консенсусными последовательностями в каждой: CCUAAUCGA(**AUGA) в первой группе и GAGUAAUUUACG во второй; все аптамеры обладали сравнимой аффинностью к мишени [285].

Ряд работ посвящен отбору пептидов с высоким сродством к золоту путем обогащения клеточной культуры, вырабатывавшей химерный белок, при инкубации с золотом (пудра с размером частиц ~1,5 мкм [287] или пластинка золота 5x5 мм толщиной 25 нм [288]).

В одном из исследований в результате селекции были получены две группы пептидов. В первой группе пептиды связывались существенно лучше с золотом, предварительно обработанным в течение ночи 48 % HF, а во второй - одинаково с обработанной и необработанной поверхностью золота. Было сделано предположение, что пептиды из первой группы связывались с самой поверхностью золота, а из второй группы – с загрязнениями на поверхности золота, которые частично удалялись при обработке HF. В первой группе в аминокислотной последовательности пептидов не было обнаружено сходства, но все пептиды были богаты серином и треонином, т.е., аминокислотами, содержащими гидроксигруппу, а во второй группе пептидов был найден общий мотив: (Arg/Lys)-Ile-Asp-*-Asn. Один из клонов первой группы содержал многократно повторяющийся мотив Met-His-Gly-Lys-Thr-Gln-Ala-Thr-Ser-Gly-Thr-Ile-Q-Gln-Ser [287]. Пептид с такой последовательностью был использован в дальнейшем как золотосвязывающий белок [289].

В следующей работе те же авторы провели селекцию пептидов к золотой пудре. В работе были получены две популяции клеток, нарабатывавших полипептиды с повторяющейся последовательностью, кодируемой рандомной вставкой в плазмиду. Эти пептиды содержали в своем составе постоянную последовательность: в одной популяции это была Lys-Thr-Gln-Ala-Thr-Ser, а в другой – Ser-Lys-Thr-Ser. Первая последовательность представляла собой часть связывающего с золотом пептида, а вторая – это два наиболее встречающихся дипептида среди всех связывающих с золотом пептидов из вышеописанного исследования [287]. Среди пептидов были выбраны те, что ускоряли образование коллоидного раствора золота при синтезе. В последовательностях выбранных пептидов содержались мотивы Gly-Ala-Ser-Leu и Ser-Glu-Lys-Leu [289].

В другом исследовании после пяти раундов селекции к золотой фольге пептиды из произвольно выбранных клонов разделили на три группы по силе сродства к золоту, которое оценивали методом флюоресцентной микроскопии, подсчитывая количество клеток, связавшихся с золотом. Аминокислотный состав пептидов анализировали с учетом сродства к золоту, результаты представлены на гистограмме (рис. 26) [288]. Можно заметить, что в группе сильносвязывающихся пептидов было повышено содержание Trp, Cys, Tyr, Arg (как в сильно-, так и в слабосвязывающихся пептидах), Met, Ile и понижено содержание Asn, Gln, Glu, Lys, Pro, Phe, Thr.

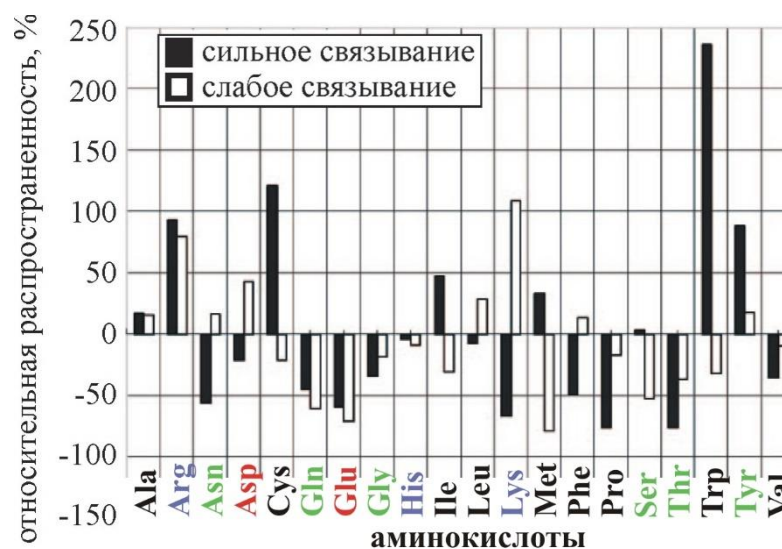


Рисунок 26. Относительное распределение аминокислот в сильно- и слабосвязывающихся с золотом пептидах. Основные аминокислоты обозначены сиреневым, кислотные – красным, доноры/акцепторы для водородных связей – зеленым, неполярные – черным. Адаптировано из [288].

Есть работы, в которых проводили селекцию лигандов, специфичных к нано- и микрочастицам золота, из библиотеки антител [290, 291]. В высокоспецифичных к золотой пудре антителах содержалось повышенное количество остатков аргинина по сравнению с исходной библиотекой: 24 % и 6 % соответственно [291].

Среди существующих исследований аптамеров к различным золотым поверхностям нет данных о б отборе ДНК- или РНК-аптамеров к наночастицам золота, что открывает исследователям возможность поиска в этом направлении.

2.6.2. Аналитическое применение нековалентных ассоциатов НЧЗ и НК

Такие свойства НЧЗ, как максимум оптического поглощения в видимой области спектра и их высокий коэффициент экстинкции ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [209], делают их привлекательным объектом для множества исследований с использованием колориметрического метода детекции, т.е. основанных на изменении цвета коллоидного раствора НЧЗ с красного на синий при их слипании и влиянии на этот процесс присутствия мишени.

Использование флуоресцентных меток расширило возможности детекции, но усложнило процесс подготовки образцов. Наиболее часто в качестве флуорофора выбирали флуоресцеин [231, 292, 230, 254], также в исследованиях использовали родамин [293, 294], Су5, акридин [295]. Описаны варианты безметочной детекции ДНК-мишени в растворе, например, при добавлении в образец раствора флуоресцеина [296] или родамина В [293, 294], а также применение хемилюминесценции системы люминол – H_2O_2 [297].

Известно свойство НЧЗ тушить флуоресценцию молекул флуорофоров, находящихся в непосредственной близости к НЧЗ. Это явление может быть описано следующим образом. Плазмоны - это квазичастицы, возникающие в проводниках за счет колебаний электронов проводимости относительно кристаллической решетки. Плазмонный резонанс (в случае наноразмерных металлических структур – локализованный плазмонный резонанс) – это возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной. В целом, взаимодействие поверхностного плазмона наночастицы с молекулой флуорофора может приводить к усилению или к тушению флуоресценции. Взаимодействие происходит в две стадии: на первой усиленное резонансом поле на поверхности частицы приводит к увеличенной флуоресценции молекулы флуорофора, расположенной вблизи наночастицы. На второй стадии флуоресцентное излучение испускается в окружающую среду, но если расстояние между молекулой флуорофора и наночастицей достаточно мало, то бóльшая часть испускаемой энергии рассеивается металлической поверхностью [294]. Эффективность тушения флуоресценции зависит от расстояния d между НЧЗ и молекулой флуорофора и пропорционально d^{-4} , в то время как для молекулярных тушителей эта зависимость пропорциональна d^{-6} [256].

Способность НЧЗ выступать в роли тушителя флуоресценции часто используется в комбинации с колориметрическим методом [298]. Часть методик основана на применении

химически немодифицированных НЧЗ [299]. Можно выделить пять направлений применения ассоциатов НЧЗ и НК: распознавание разнообразных мишеней благодаря специфическим взаимодействиям, детекция однонуклеотидных замен (SNP), детекция метилированных участков ДНК, использование каталитических свойств ассоциатов НЧЗ с НК, проникновение в клетки. Конкретные частные случаи и вариации общепринятых методик рассмотрим подробнее в соответствующих разделах.

2.6.2.1. Детекция мишеней в растворе

Различные прикладные методики позволяют определять наличие в растворе НК, пептидов, низкомолекулярных соединений, ионов.

2.6.2.1.1. Детекция ДНК/РНК-мишеней

Детекция ДНК/РНК-мишеней основана на разном сродстве одноцепочечной и двуцепочечной НК к золоту. ДНК/РНК-мишень, присутствующая в растворе, образует комплементарный дуплекс с НК, изначально адсорбированной на НЧЗ, что вызывает ее диссоциацию с поверхности частицы и последующее слипание НЧЗ в солевых условиях [300, 301, 302, 298]. Например, так определяли наличие в растворе РНК вируса гепатита С [303], РНК нерегулярного белка гепатомы (HURP) у больных раком мочевого пузыря [304], присутствие бактерии *Acinetobacter* [305], модельной НК, состоявшей из четырех теломерных повторов TTAGGG [301] и другие мишени [306, 294, 230, 307]. Можно сочетать эту методику с процессом поверхностного плазмонного усиленного переноса энергии (SPEET) между флуоресцентными ассоциатами нанокластеров серебра с НК и НЧЗ [298].

Зрелую миРНК (микроРНК) детектировали в растворе посредством образования сэндвич-структуры электрохимическим методом. Поверхность золотого электрода модифицировали через тиольную группу НК со шпильчатой структурой. При добавлении миРНК-мишени шпилька раскрывалась, и к ее 5'-концу гибридизовалась комплементарная репортерная ДНК, нековалентно присоединенная к НЧЗ и являвшаяся ДНКзимом в последующем окислении 4-хлоро-1-нафтола пероксидом водорода с осаждением нерастворимого продукта на электроде [308].

Длинные НК адсорбировались медленнее, чем короткие, и за короткое время инкубации (2 мин) с последующим добавлением соли (до 100 мМ NaCl) можно было увидеть это различие по слипанию частиц, инкубированных с длинными НК. Так детектировали разрушение ДНК под действием S1-нуклеазы и окислительных реагентов, например, реагента Фэнтонна ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$), разрезавшего ДНК на случайные короткие фрагменты вплоть до азотистых оснований [309].

В нескольких работах описан колориметрический метод детекции присутствия мишени в растворе для случая, когда мишень – АТФ, а адсорбированная на НЧЗ НК –

аптамер к АТФ. Одна из схем детекции предполагала сначала образование частично комплементарного дуплекса аптамерной НК с другой НК в солевых условиях (90 мМ NaCl), затем последовательное добавление анализируемого раствора и НЧЗ. Если в анализируемом растворе присутствовала АТФ, то дуплекс денатурировал, аптамер связывался с мишенью, а комплементарная НК адсорбировалась на НЧЗ и защищала их от слипания. Такой способ позволил детектировать присутствие АТФ спектроскопически от 0,75 мкМ, при этом концентрации аптамера и НЧЗ составила 7,5 мкМ и 2 нМ соответственно [300].

2.6.2.1.2. Детекция мишеней ненуклеотидной природы

НЧЗ с адсорбированными на поверхности ДНК-аптамерами используют для детекции в растворе низкомолекулярных соединений: бисфенола А [310], тромбина [237], кокаина [299, 311, 312], канамицина [302], тобрамицина [313], теофиллина [314], стрептомицина [292], эстрадиола, ократоксина А [315] и других. Предел обнаружения для разных мишеней составляет от микромолярного до наномолярного уровня. Возможно применение одновременно двух методов детекции, например, определение стрептомицина колориметрически и по тушению флуоресценции [292]. Для этого к стрептомициновому аптамеру добавляли комплементарную НК и инкубировали для образования дуплекса, затем инкубировали дуплекс с анализируемым раствором, содержащим 0 – 4000 нМ стрептомицина, после добавляли НЧЗ и спустя 30 мин либо добавляли 100 мМ NaCl и через 5 мин фиксировали изменение цвета, либо измеряли интенсивность флуоресценции. Если мишени в растворе не было, то НЧЗ слипались в солевых условиях либо не происходило тушения флуоресценции.

НК могут образовывать триплексы в присутствии определенных соединений (triplex binders), к которым относятся, например, оксазин и крезил фиолетовый. Триплекс-образующая НК связывается с дуплексом в его большой бороздке сиквенс-специфично через образование водородных связей между азотистыми основаниями. Детекция этих веществ основана на слипании НЧЗ в солевых условиях при образовании триплекса, если же триплекс не образовывался, то комплементарные НК образовывали дуплекс, а триплекс-образующая НК адсорбировалась на НЧЗ и защищала их от слипания [316].

Хотя подавляющее число работ по детекции мишеней основано на слипании НЧЗ при высоком содержании солей, описан и другой механизм, когда изменение цвета было связано с разной морфологией НЧЗ при их дальнейшем росте в присутствии гидроксиламина и HAuCl_4 . Если на частицах было адсорбировано много молекул оц-аптамера, что происходило в отсутствие мишени, то образовывались частицы с разветвленной структурой, и раствор имел синий цвет. Если же на частицах при наличии

А

красный раствор

NaCl

H43

Т-богатая НК

Hg^{2+}

H43

NaCl

синий раствор

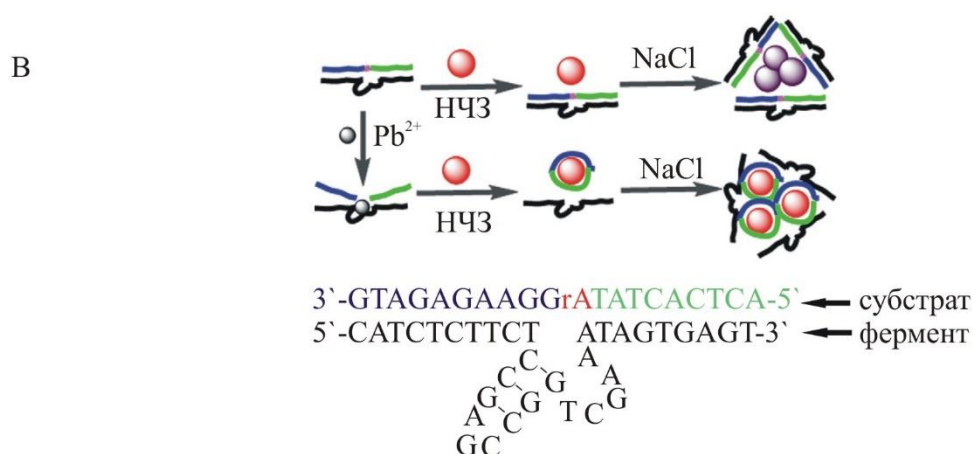
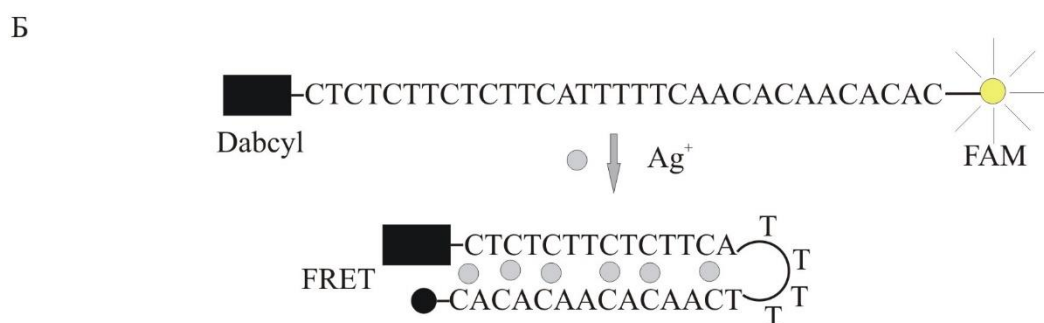


Рисунок 27. Детекция ионов в растворе с использованием ассоциатов НЧЗ-НК: А – ионов ртути Hg^{2+} (адаптировано из [315]), Б – ионов серебра Ag^+ (адаптировано из [319]), В – ионов свинца Pb^{2+} (адаптировано из [320]).

С-богатую НК (200 нМ) инкубировали в буфере MORS, содержащем Ag^+ , в течение 5 мин, затем к раствору добавляли НЧЗ (3,9 нМ), инкубировали при комнатной температуре 5 мин и добавляли 90 мМ NaNO_3 , через 2 мин центрифугировали, отделяя агрегировавшие НЧЗ (3 мин, 3000 об./мин, смешивали с раствором флуоресцеина (42 нМ) и через 5 мин измеряли интенсивность флуоресценции. Суть детекции заключалась в том, что ионы Ag^+ образовывали прочные связи с цитозином в составе НК (рис. 27 Б) [323], и молекулы НК не взаимодействовали с добавленными НЧЗ и не защищали их от слипания. У агрегированных НЧЗ свойство тушить флуоресценцию слабее, чем у диспергированных, следовательно, наблюдали более высокий сигнал интенсивности флуоресценции, чем в отсутствие ионов Ag^+ . Предел чувствительности от 6 нМ.

Тот же метод детекции ионов Ag^+ [296] нашел применение при использовании родамина В в качестве флуорофора, который добавляли одновременно с NaNO_3 , но без отделения агрегировавших НЧЗ и с инкубацией по 10 мин на каждом шаге [293].

Ионы Pb^{2+} определяли в растворе, используя дцДНК-зим, одна цепь которого содержала в середине рибоА и расщеплялась на два одноцепочечных фрагмента второй ферментной цепью в присутствии Pb^{2+} . Одноцепочечные НК, в свою очередь, сорбировались на НЧЗ, и агрегации частиц при добавлении NaCl не происходило (предел чувствительности от 10 пМ) [324] (рис. 27 В). Саморасщепляющийся в присутствии ионов Cu^{2+} ДНК-зим использовали для их детекции по схожему с вышеописанным методу (предел чувствительности от 0,29 мкМ) [325]. По тому же принципу организована детекция катиона UO_2^{2+} [326]. Наличие ионов Cu^{2+} в растворе определяли благодаря образованию комплекса со специфичным к меди 3-меркапто-D-валином, вызывавшим слипание НЧЗ в их отсутствие (предел чувствительности – 1 мкМ) [327].

2.6.2.2. Детекция однонуклеотидных замен в НК

Принципиальная возможность детекции SNP колориметрическим методом по степени защиты НЧЗ адсорбированными НК от слипания в солевых условиях была показана Ли и Ротбергом: образование дуплексов коротких НК, меченных родамином, с длинными ДНК-мишенями позволило различать мишени с одним нуклеотидным несоответствием [250, 249]. Ли и Ротберг также продемонстрировали, что тем же способом можно определять наличие мутации в РНК-мишенях [251]. Практическое определение однонуклеотидных замен преимущественно по соотношению оптической плотности на 520 и 620-650 нм описано в ряде работ [328, 329, 330, 331, 238].

Вариация методики для детекции однонуклеотидных замен в ДНК заключалась в использовании белка, связывавшего одноцепочечную ДНК в случае неполностью

комплементарного дуплекса и защищавшего в таком виде НЧЗ от слипания, а в свободном виде - в случае полностью комплементарного дуплекса - вызывавшего их слипание [332].

2.6.2.3. Детекция метилированных участков ДНК

Детекция метилированных участков ДНК (рис. 27) основана на превращении неметилированного цитозина в урацил при бисульфитной обработке и устойчивости к ней метилированного цитозина. [333]. Далее проводили амплификацию ДНК с помощью симметричной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [212] с наработкой С/Г-богатых ампликонов из метилированных участков и А/Т-богатых из неметилированных участков или с помощью асимметричной ПЦР [334, 335] с наработкой G-богатых ампликонов из метилированных участков и А-богатых из неметилированных. Неметилированные участки ДНК в большем количестве сорбировались на поверхности золота, чем метилированные участки (рис. 28).

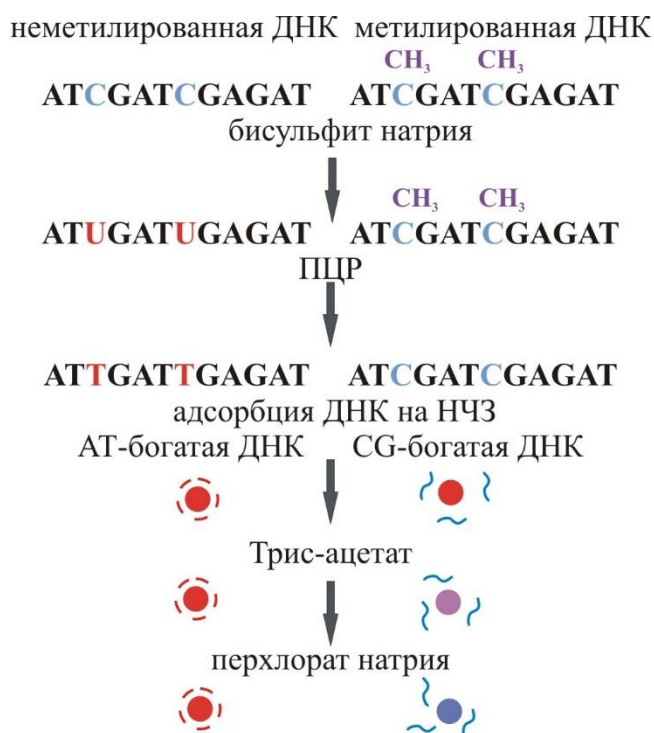


Рисунок 28. Детекция метилированных участков ДНК. Адаптировано из [207].

Детекцию осуществляли либо по SPR-спектрам (спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса), отражавшим степень агрегации НЧЗ, либо электрохимически [336, 337].

2.6.3. Каталитические свойства ассоциатов НЧЗ с НК

При окислении 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода свободные НЧЗ и ассоциированные с НК проявляли пероксидазную активность, причем эта активность была в 2,5 раза выше у ассоциатов НЧЗ-НК, чем у НЧЗ. Каталитическую активность

оценивали по спектрам оптического поглощения, т.к. продукт окисления окрашен в синий цвет [338, 339].

НЧЗ после агрегации в 500 мМ NaCl усиливали хемилюминесцентный сигнал при взаимодействии люминола с пероксидом водорода. В присутствии мишени в растворе образовавшийся с комплементом дуплекс не препятствовал слипанию НЧЗ и последующему усилению хемилюминесцентного сигнала, в отсутствие мишени комплементарная НК защищала НЧЗ от слипания, и усиления сигнала не происходило [297].

Ассоциаты НЧЗ-НК проявляли каталитическую активность в процессе окисления D-глюкозы кислородом, причем структурированные НК уменьшали эту активность, а неструктурированные НК повышали ее. Структурирование НК происходило при понижении pH [340]. Предположительно неструктурированные НК оставляли достаточно доступной поверхности НЧЗ для контакта с молекулой глюкозы, а структурированные нет, поэтому каталитическая активность НЧЗ изменялась. Продукт окисления глюкозы – D-глюконовая кислота - являлась субстратом для пероксидазы хрена, которая, в свою очередь, вызывала окисление ABTS²⁻ (2,2' -азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)) до ABTS, окрашенного в зеленый цвет. Таким образом, по спектрам оптического поглощения можно контролировать каталитическую активность ассоциатов НЧЗ-НК. Недостатком метода являлось то, что D-глюконовая кислота являлась каталитическим ингибитором, она адсорбировалась на НЧЗ и уменьшала их активность [341].

2.6.4. Проникновение в клетки и ткани

Применение НЧЗ для создания ассоциатов с биомолекулами позволило отслеживать биомолекулы в различных компартментах клеток методами оптической и просвечивающей электронной микроскопии [176]. Проникновение НЧЗ в клетки зависит от формы и размера наночастиц, их заряда и функциональных групп на поверхности, продолжительности взаимодействия и количества НЧЗ. Суммируя данные, можно сказать, что НЧЗ малого размера (2,4 нм) проникают в клеточное ядро, среднего (5,5 и 8,2 нм) - в цитоплазму, большого (от 16 нм) проникают через клеточную мембрану, но с низкой эффективностью [13].

В экспериментах с двустворчатыми моллюсками было показано, что НЧЗ накапливались преимущественно в лизосомальной системе клеток пищеварительной железы. Ионы Au³⁺ (предшественники НЧЗ) накапливались в жабрах и по результатам тестов на выживаемость обладали высокой токсичностью [342].

Также ассоциаты НЧЗ с НК использовали для системного воздействия на организм. Так, при внутрибрюшинном введении ассоциатов НЧЗ с трехблочными

противотромбиновыми аптамерами крысам с последующим тестом продолжительности кровотечения (rat tail bleeding) наблюдали значительное увеличение времени кровотечения по сравнению с гепарином: 29,8 мин против 8,5 мин соответственно при введении 100 мкл каждого из препаратов с концентрацией от 0 до 750 нМ [237].

Заключение

Природу взаимодействия молекул различного состава, в частности, нуклеиновых кислот с поверхностью золота исследовали разнообразными методами (спектроскопическими, колориметрическими, электрохимическими), и разные группы исследователей делали разные заключения о преобладающем типе взаимодействия. Понять, насколько велика разница в этих результатах, можно при сравнении значений количественных характеристик связывания, в частности, константы Лэнгмюра: диапазон ее значений, например, для связывания BSA составил несколько порядков [182]. Подобные противоречия встречались при изучении литературы о зависимости сродства к золоту от нуклеотидного состава лигандов: в одной группе работ получены данные о преимущественной адсорбции аденина в составе ДНК, во второй очень обширной группе работ использованы эти результаты, а в третьей, самой малочисленной, приведены доказательства равного сродства к золоту и тимина, и аденина. Эта несогласованность выводов - следствие совместного влияния многих факторов на связывание лигандов с поверхностью золота. Систематизация экспериментальных данных, упорядочивание знаний о закономерностях взаимодействия лигандов различной природы с золотом и их зависимости от всей совокупности условий связывания – обширная задача для будущих исследований.

Стоит отметить, что нековалентные взаимодействия НЧЗ и НК в низкосолевых условиях на данный момент практически не описаны в литературе. Целью нашей экспериментальной работы было исследование закономерностей нековалентного связывания НЧЗ и олигонуклеотидов в условиях, максимально исключающих влияние сторонних факторов.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Реагенты

В работе были использованы следующие вещества и растворители: золотохлористоводородная кислота тригидрат $\text{HAuClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Аурат, Россия), цитрат натрия дигидрат $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Fluka, Бельгия), BSA, MUA, TGA (80 % раствор), желатин А, желатин В, хлорид магния гексагидрат (Sigma–Aldrich, США), HSA, полиаденилат натрия (Reanal, Венгрия), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), N,N-метилен(бис)акриламид, бромфеноловый синий, ксиленцианол FF, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), додецилсульфат натрия (Amresco, США), глицин, глицерин, бис(сульфанил)бутан-2,3-диол (DTT) (Serva, Германия), HS-PEG-COOH (PEG), (3,2 кДа, 4,9 кДа, Iris Biotech, Германия), глутатион, мочевиная, акриламид, ацетонитрил (о.с.ч.), этидиум бромид (AppliChem, Германия), γ [^{32}P]-АТФ, T4-полинуклеотидкиназа, Taq-полимераза, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (Биосан, Россия), Stains All, перхлорат лития, персульфат аммония (Acros, США), PEI (полиэтиленимин), PEG (Alfa Aesar, США), борная кислота, формамид, хлорид натрия (Panreac, Испания), ацетон (о.с.ч.) (Реахим, Россия), этанол (ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», Россия), фосфат натрия двузамещенный додекагидрат (АльфаХимПлюс, Россия), фосфат натрия однозамещенный дигидрат (Реатэкс, Россия), стрептавидин-агароза (Solulink, США), яичный фосфатидилхолин, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) (Avanti Polar Lipids, США), HSA-Cy5 (любезно предоставлен д.х.н. Т.С. Годовиковой), политимидилат натрия (любезно предоставлен д.б.н. С.Н. Ходыревой), Hepx и DMEM (любезно предоставлены д.б.н. Е.И. Рябчиковой), FBS (сыворотка телят, любезно предоставлена к.б.н. О.В. Марковым), наночастицы серебра (НЧС) (любезно предоставлены к.б.н. И.Д. Ивановым), конъюгат стеариновой кислоты и пептида [Str-(RL)4G-NH2] (любезно предоставлен к.х.н. Е.К.Апарциным), 2-[[4-додециламино-6-олеиламино-1,3,5-триазин-2ил]-(2-гидроксиэтил)амино]этанол (DOME2) (любезно предоставлен к.х.н. И.С.Довыденко).

Растворители были очищены Т.Ю.Бушуевой (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН).

Бактериальный «цитозоль» был приготовлен А.С. Долодоевым (ГМИ ИХБФМ СО РАН).

Все растворы готовились с использованием воды, очищенной с помощью системы Simplicity 185 (Millipore, США).

В работе использованы буферные растворы TBE (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ ЭДТА, pH 8,3), Трис-Gly (25 мМ Трис, 250 мМ Gly, pH 8,3), AP (20 мМ Трис-HCl, 0,2 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl, pH 7,5), PB (23 мМ NaH_2PO_4 , 77 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4), PBS (2,3 мМ

NaH₂PO₄, 7,7 мМ Na₂HPO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4), Трис-ацетатный (1 мМ ЭДТА, 40 мМ Трис, 20мМ CH₃COOH, pH 8,5), цитратный (25 мМ Na₃C₆H₅O₇, pH 6,7).

3.2. Синтетические олигонуклеотиды

В работе использовали следующие олигодезоксирибонуклеотиды и олигорибонуклеотиды (таблица 10):

Таблица 10. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

шифр	последовательность (5`-3`) ¹
T6	TTTTTT
T26	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
T26FAM	FAM TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
T40	TT
A26	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
C26	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
G26	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
N26	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NC	CAACACAACCAACACAACCAACACAA
GC	GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC
GT	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
AC	ACACACACACACACACACACACACAC
AT	ATATATATATATATATATATATATATAT
TGT	TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
ATG	ATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
R.20	FAM C*A*C*T*C*G*C*A*A*G*C*A*C*C*T*A*T*C*A*G
R.19	FAM C*A*C*T*C*G*C*A*A*G*C*A*C*C*T*A*T*C*AG
R.18	FAM C*A*C*T*C*G*C*A*A*G*C*A*C*C*T*A*T*CAG
R.17	FAM *C*A*C*T*C*G*C*A*A*G*C*A*C*C*T*ATCAG
R.15	FAM *C*A*C*T*C*G*C*A*A*G*C*A*C*C*CTATCAG
R	FAM CACTCGCAAGCACCTATCAG
G.2	GGTGCGCTCCTGGACGTA*G*C
L0	CCTGGATCCTTCTTCCCACTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CGCGCGAGGTA GAATTCGAA
Pr1	CCTGGATCCTTCTTCCCACT
Pr2	TTCGAATTCTACCTCGCGCG
Pr2b	биотин TTCGAATTCTACCTCGCGCG
L6-1	CAGCGGAGTAGTGATATCATGGAGTG
L6-2	ATGTAGTGTTTCGATGTGTTGCTGTGT
L6-3	TACAGATGAGGTGTTTCGATTTGTATA

шифр	последовательность (5'-3') ¹
L6-5	GCGCGCGGGATGCTTCTAGATCAGTT
L6-a2, L6-a1	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC
itGCA	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCACTCACG
tACT	CGTGAGACTGTGCAGCTTTTGCTGCACA
L7-1	GCACGATGTAGTGATGTGATGTATCG
L7-5	AGGCAGGGCATCGCGCGTGAAAGGAA
L7-6	ATTAACGCGCGTAAGGGCCCTAGTGG
L7-1-0	GGCACAGAGGTTGAATGTTGTGTTGT
L5-1	CGTATCTGATAGGTATTGTGAGATCG
L2-1	TATCGCGAGCGGAGTAATCTAGTGAG
6-1	TGAGAT
6-2	TGAGAT^TGAGAT
6-3	TGAGAT^TGAGAT^TGAGAT
6-4	TGAGAT^TGAGAT^TGAGAT^TGAGAT
asGFP	rCrArArGrCrUrGArCrCrCrUrGrArArGrUrUrCTT
sGFP	rGrArArCrUrUrCrArGrGrGrUrCrArGrCrUrUrGTT
sGFPCy5.5	Cy5.5 rCrArArGrCrUrGrArCrCrCrUrGrArArGrUrUrCTT
4	rGrGrUrGrArArGrUrUrCrArUrCrGrGrCrGrUrGTT
5	rCrArCrGrCrCrGrArUrGrArArCrUrUrCrArCrCTT
4.1	rGrGrUrGrArArGrUrUrCrArUrCrGrGrCrGrUrGT*T
4.2	rGrGrUrGrArArGrUrUrCrArUrCrGrGrCrGrUrGT*T*T
5.1	rCrArCrGrCrCrGrArUrGrArArCrUrUrCrArCrCT*T
5.2	rCrArCrGrCrCrGrArUrGrArArCrUrUrCrArCrCT*T*T

¹ - г обозначает рибонуклеотид, в остальных случаях указаны дезоксирибонуклеотиды,

* обозначает фосфорилгуанидиновую группу (1,3-диметил-2-имидазолидиниминофосфорильную группу) (рис. 29),

^ обозначает гексаэтиленгликолевый фосфатный линкер между нуклеотидными звеньями.

Олигодезоксирибонуклеотиды, нативные и модифицированные, были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом Т.Ю.Бушуевой и М.С.Купрюшкиным (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН), олигорибонуклеотиды 4, 5, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2 - М.И.Мещаниновой (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН), олигорибонуклеотиды sGFP, asGFP – И.С.Довыденко (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН) на автоматических синтезаторах ASM-800. Введение остатка Cy5.5 на 5'-конец олигорибонуклеотида sGFP проведено И.С.Довыденко.

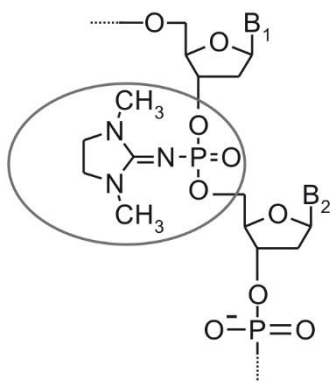


Рисунок 29. Фосфорилгуанидиновая группа (ФГ-группа) олигодезоксирибонуклеотида.

3.3.Оборудование

ПЦР в растворе проводили в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Растворы олигонуклеотидов концентрировали в концентраторе Centrivar (Labconco, США) или в ротационном испарителе Rotavapor R-200 (Buchi, Швейцария). Коллоид НЧЗ концентрировали в центрифуге (Eppendorf, Германия). Суспензию бактерий E.coli концентрировали в центрифуге Beckman-Coulter Avanti J-30I (Beckman-Coulter, США). Элюцию ДНК из геля проводили в термомиксере Comfort (Eppendorf, Германия). НЧЗ с НК и другими биомолекулами инкубировали в термостате Biosan (Россия). Обращеннофазовую ВЭЖХ (высокоэффективную жидкостную хроматографию) осуществляли на хроматографе Agilent (Agilent, США) с использованием колонки Zorbax SB-C18 (диаметр 4,6 мм, длина 250 мм, диаметр частиц сорбента 5мкм). Электрофорез проводили с применением источников питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия) и PowerPac HC (Biorad, США). Оптическую плотность водных растворов олигонуклеотидов измеряли при температуре 20 – 25 °С с использованием спектрофотометра NanoDrop (GEC, США). Оптическую плотность коллоидного раствора НЧЗ измеряли при температуре 20 – 25 °С с использованием спектрофотометра UV-2100 (Shimadzu, Япония). Гидродинамический диаметр НЧЗ определяли с помощью Zetasizer (Malvern, США). Активность γ [^{32}P]-меченных олигонуклеотидов измеряли с использованием счетчика сцинтилляции Tri-Carb 2800TR (Perkin-Elmer, США). Интенсивность флуоресценции олигонуклеотидов и других биомолекул в гелях и планшетах детектировали с помощью флуориметра Clariostar (BMG Labtech). Фоточувствительный экран (K-screen, Kodak) после экспонирования с гелем, содержащим γ [^{32}P]-меченные НК, сканировали с использованием сканера Molecular Imager Pharos FX Plus (BioRad, США). Гели, содержащие олигонуклеотиды, визуализировали в трансиллюминаторе TCP-20.LC (Vilber Lourmat, Франция) на длине волны 365 нм. Ультразвуковую обработку растворов проводили в УЗ-ванне Elmasonic S10H (Elma,

Германия). Ультразвуковую обработку суспензии бактерий *E.coli* проводили с помощью Bandelin Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Германия).

3.4. Методы

3.4.1. Осаждение ДНК 2 % LiClO_4 в ацетоне

К раствору ДНК объемом 20 - 100 мкл прибавляли 1 мл 2 % LiClO_4 в ацетоне, встряхивали, центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин, отбирали супернатант, затем промывали осадок 1 мл ацетона, вновь встряхивали и центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин, отбирали супернатант и высушивали осадок на воздухе или в термостате СН-100 (Биосан, Россия).

3.4.2. Осаждение ДНК этанолом

К водному раствору ДНК объемом около 200 мкл добавляли 100 мкл 1 М NaOAc и 900 мкл этанола, встряхивали, оставляли при - 20 °С на ночь. Затем центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин, отбирали супернатант, промывали 900 мкл 80 % этанола, центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин, отбирали супернатант и высушивали осадки.

3.4.3. Выделение и характеристика олигонуклеотидов

Растворы олигодезоксирибонуклеотидов концентрировали, затем олигонуклеотиды, содержащие диметокситритильную защитную группу, после удаления полимерного носителя и прочих защитных групп выделяли с помощью обращеннофазовой ВЭЖХ в 0,02 М растворе триэтиламмония ацетата в градиенте ацетонитрила 0-50 %. Полученные элюаты концентрировали при 40 °С примерно до 100 мкл. Затем осаждали ДНК 2 % LiClO_4 в ацетоне. Для удаления 5'-диметокситритильной защитной группы добавляли к каждому осадку по 20 мкл бидистиллированной воды и по 80 мкл ледяной уксусной кислоты, осадки растворяли. Через 5 мин после добавления уксусной кислоты вновь проводили осаждение 2 % LiClO_4 в ацетоне, после промывания ацетоном подсушивали осадки в течение 5 мин при 38 °С, прибавляли к каждому по 10 мкл Трис- HCl (рН 8,8) и осаждали 2 % LiClO_4 в ацетоне. Далее элюат концентрировали и осаждали 2 % LiClO_4 в ацетоне. Все олигорибонуклеотиды выделяли электрофоретически. Все олигонуклеотиды были охарактеризованы спектрофотометрически и электрофоретически.

3.4.4. Определение концентрации ДНК и НЧЗ по оптической плотности

Концентрации синтезированных олигонуклеотидов, ПЦР-продуктов и НЧЗ определяли спектрофотометрически в водных растворах при температуре 20 – 25 °С. При этом использовали для НЧЗ значение коэффициентов молярного поглощения $\epsilon_{520}(\text{НЧЗ}) = 8,78 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Для олигонуклеотидов расчет коэффициентов молярного поглощения выполнили по методу [343].

3.4.5. Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение образцов НК проводили в денатурирующем 10-20 % ПААГ (полиакриламидном геле) в присутствии 8М мочевины при соотношении акриламид:бисакриламид – 29:1 в буферном растворе TBE при напряженности электрического поля 20 В/см и температуре 30 – 40 °С или в 15 % водном ПААГ в буферном растворе TBE (трис-боратный буферный раствор) при напряженности электрического поля 5 В/см и температуре 25 °С. После проведения аналитического электрофореза олигонуклеотидов гель окрашивали раствором 0,07 % Stains All в 50 % водном растворе формамида. После проведения препаративного электрофореза для выделения олигонуклеотидов из геля после визуализации в УФ-свете вырезали участок геля, содержащий целевой продукт, и элюировали его дважды 1 мл H₂O mQ, в течение 30 мин при 60 °С, третью элюцию проводили в течение 16 ч при 25 °С. Элюцию олигорибонуклеотидов проводили при 25 °С. Все элюаты объединяли, упаривали и осаждали.

3.4.6. Электрофорез в агарозном геле

Пробы, содержащие НЧЗ, олигонуклеотиды или другие биомолекулы и 5 % глицерина, подвергали электрофоретическому разделению в геле, содержащем 0,8 % агарозы, в буферном растворе Трис-глицин при напряженности электрического поля 5 В/см в течение 30 мин. В некоторых случаях перед нанесением на гель пробы инкубировали в воде при 95 °С в течение 2 мин с последующим охлаждением во льду в течение 2 мин. После проведения электрофореза изображения гелей фиксировали с помощью фотокамеры. Гели, содержавшие флуоресцентно меченные НК, сканировали с использованием флуориметра Clariostar. Гели, содержащие γ^[32P]-меченные НК, высушивали, экспонировали в течение 1-16 ч с фоточувствительным экраном K-screen, который затем сканировали на сканере Molecular Imager Pharos FX Plus, данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Quantity One.

Для выделения олигонуклеотидов, связанных с НЧЗ, после электрофореза в агарозном геле использовали набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) по инструкции производителя. Из геля вырезали участок геля, содержащий целевой продукт, взвешивали его, добавляли трехкратное количество (для упрощения ρ=1 г/мл) буферного раствора QG, растворяли в течение 10 мин при температуре 50 °С, встряхивая каждые 2-3 мин. После растворения агарозы добавляли один объем изопропанола. Раствор наносили на QIAquick спин-колонку и центрифугировали в течение 1 мин для связывания НК, затем промывали 0,75 мл буферного раствора PE и центрифугировали в течение 1 мин. Для элюции НК

добавляли 30-50 мкл 10 мМ Трис-НCl (рН 8,5) и центрифугировали в течение 1 мин. Выделенную ДНК осаждали этанолом.

3.4.7. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ каждого dNTP, $2 \cdot 10^{-6}$ М каждого из соответствующих праймеров, 50 мМ TrisHCl, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 е.а. (единиц активности) TaqPol, 1 мкл раствора ДНК-матрицы в амплификаторе Eppendorf Mastercycler в течение 23 циклов 94 °С 7 с., 61,7 °С 13 с., 72 °С 33 с. с предварительной денатурацией при 95 °С 52 с и заключительной элонгацией при 72 °С 2 мин. ДНК выделяли из реакционной смеси с помощью электрофореза в 10 % ПААГ.

3.4.8. Введение радиоактивного фосфата на 5'-конец НК

Радиоактивный фосфат вводили на 5'-конец олигонуклеотида (100 нмоль) с использованием 10 е.а. полинуклеотидкиназы фага Т4 и 0,1 mCi [$\gamma^{32}\text{P}$]АТФ в 10 мкл раствора, содержавшего 50 мМ Трис-НCl рН 7,6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, в течение 2 ч при 37 °С. Реакционную смесь подвергали флеш-хроматографии с использованием сорбента Waters C18 125 Å 55–105 мкм.

3.4.9. Синтез НЧЗ

Для синтеза НЧЗ по методике [344] 5 мл 38,8 мМ раствора Na₃C₆H₅O₇ добавляли при перемешивании в кипящий раствор H₂AuCl₄·3H₂O (45 мл, 1 мМ). Через 20 мин интенсивного перемешивания смесь охлаждали до комнатной температуры, выдерживали в течение 24 ч, фильтровали через фильтр с размером пор 200 мкм. Полученную суспензию НЧЗ хранили при 4°С.

3.4.10. Методы расчетов

Значения константы диссоциации (с использованием модели односайтового связывания), константы Лэнгмюра и времени полунасыщения рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данные корректировали вычитанием сигнала образцов, не содержавших НЧЗ и НК.

3.4.11. Статистические методы

Все эксперименты проводили в трех и более повторах. Для статистической обработки данных использовали t-критерий Стьюдента. 95 % доверительный интервал рассчитывали с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

3.5. SELEX

3.5.1. Схема раунда SELEX

Типичный раунд селекции проводили по следующей схеме (рис. 30). Синтетическую ДНК-библиотеку длиной 66 нт., содержащую 26-звенный центральный рандомизированный фрагмент и два краевых 20-звенных фрагмента для амплификации

библиотеки методом ПЦР, инкубировали с НЧЗ в течение часа при 25 °С и встряхивании 1400 об./мин. Для первого раунда использовали 4320 пмоль библиотеки L0 и 54,4 пмоль НЧЗ, для последующих раундов – 100 и 10 пмоль соответственно. Таким образом, в первом раунде селекции молярное соотношение ДНК к НЧЗ составило 79:1, в последующих – 10:1. После инкубации проводили цикл из 6 промывок 0,1-кратным буферным раствором AP (буферным раствором щелочной фосфатазы), отделяя несвязавшиеся олигонуклеотиды. Связанные с мишенью олигонуклеотиды отделяли четырехкратной инкубацией с 500 мкл NH_3 водн при 60 °С и встряхивании 1400 об./мин в течение 7 мин. Супернатант, содержащий целевые олигонуклеотиды, отделяли от НЧЗ центрифугированием (30 мин при 13200 об./мин), ДНК осаждали в виде натриевой соли в этаноле. Осадки растворяли в воде. Проводили амплификацию библиотеки с биотинилированным обратным праймером и немодифицированным прямым праймером.

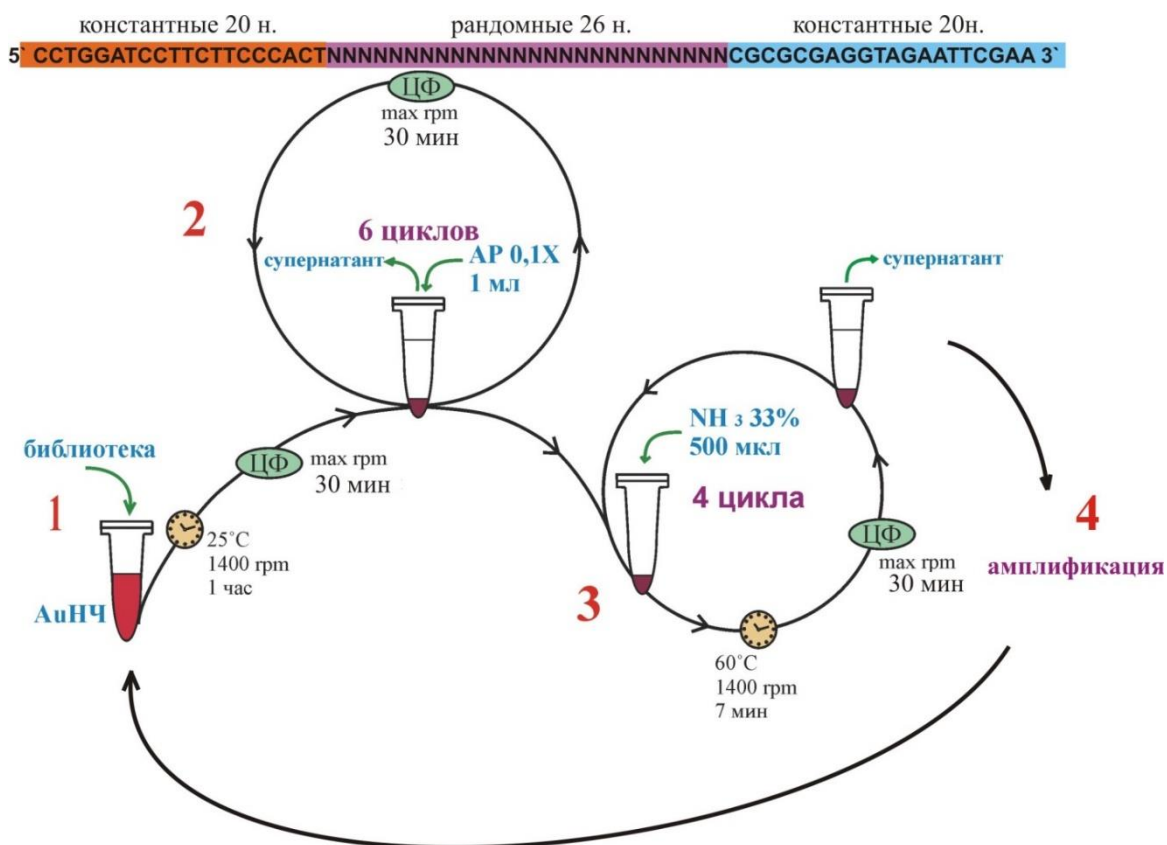


Рисунок 30. Схема стандартного раунда селекции: (1) – инкубация НЧЗ с ДНК-библиотекой, (2) – отделение НЧЗ от несвязавшейся фракции библиотеки, (3) – десорбция связавшейся фракции библиотеки с поверхности НЧЗ, (4) – амплификация обогащенной библиотеки.

3.5.2. Получение одноцепочечной библиотеки

Проводили ПЦР с биотинилированным обратным праймером и немодифицированным прямым праймером, добавляя по 1 мкл $5 \cdot 10^{-8}$ М библиотеки в каждую пробу (если предварительно не проводили амплификацию после раунда с немодифицированными праймерами, то концентрация матрицы была неизвестна), затем

реакционные смеси упаривали до общего объема ~ 900 мкл, добавляли 150 мкл стрептавидин-агарозы Solulink, инкубировали 2 ч при 37 °C и встряхивании 1400 об./мин, центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 мин, убирали супернатант, добавляли к осадку 100 мкл 0,1 М NaOH, инкубировали 1 ч при 37° C и встряхивании 1400 об./мин, центрифугировали в течение 5 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, повторяли элюцию ДНК раствором NaOH. Элюаты (две порции) объединяли и осаждали этанолом.

3.5.3. Стабилизация НЧЗ с помощью polyA перед селекцией

10 пмоль НЧЗ в 25 мкл водного раствора и 1,2 мг polyA инкубировали в течение 1 ч при 25 °C и встряхивании 1400 об./мин, затем промывали дважды 200 мкл 0,1-кратного буферного раствора AP. Сконцентрированные НЧЗ отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 13200 об./мин.

3.5.4. Селекция с промежуточной амплификацией

После инкубации и цикла отмывок, выполненных по стандартной схеме, проводили ПЦР с добавлением НЧЗ со связанными с ними олигонуклеотидами (по 0,025 пмоль НЧЗ на одну реакцию) в течение 25 циклов. Сконцентрированные НЧЗ отделяли от реакционной смеси центрифугированием в течение 30 мин при 13200 об./мин, затем проводили обработку НЧЗ водным раствором аммиака для получения связанных с НЧЗ олигонуклеотидов.

3.5.5. Селекция с применением агарозного электрофореза (EMSA-SELEX)

Библиотеку инкубировали с НЧЗ при молярном соотношении НК:НЧЗ= 20:1 или 100:1 и финальной концентрации НЧЗ $4,35 \cdot 10^{-9}$ М или $1 \cdot 10^{-7}$ М в течение 30 мин при 25 °C и встряхивании 1400 об./мин. Пробы с меньшей концентрацией НЧЗ после инкубации центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, отделяя супернатант. К пробам объемом 5 мкл добавляли глицерин (до 5 %), наносили на 0,8 % агарозный гель и проводили электрофорез в буферном растворе Трис-Gly при напряженности электрического поля 5 В/см в течение 30 мин. После окончания электрофореза вырезали кусочки геля с самыми подвижными НЧЗ и выделяли ДНК из агарозного геля с применением набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) по инструкции производителя.

3.5.6. Контрселекция к наночастицам серебра

4 мл $4,6 \cdot 10^{-10}$ М НЧС (наночастиц серебра) (диаметр 40 нм) в трех пробирках смешивали с 0,536 мкл $6,4 \cdot 10^{-5}$ М ДНК в каждой (молярное соотношение НК:НЧЗ=56:1), связывание проводили по схеме первого раунда с той разницей, что супернатант после первой отмывки упаривали до 200 мкл и осаждали НК, не связавшиеся с НЧС, этанолом. НК, связавшиеся с НЧС, отделяли по стандартной схеме.

3.6 Получение ассоциатов НЧЗ с НК и анализ их устойчивости

3.6.1 Получение ассоциатов НЧЗ с НК в концентрированных условиях

НЧЗ концентрировали центрифугированием в течение 30 мин при 13200 об./мин в 50 – 100 раз. Пробы объемом 5 мкл, содержавшие $1 \cdot 10^{-7}$ М НЧЗ (0,5 пмоль) и различное количество олигонуклеотида (от $4 \cdot 10^{-7}$ М до $4 \cdot 10^{-5}$ М), инкубировали в течение 2 мин - 16 ч при температуре 25 - 95 °С. При использовании $\gamma[^{32}\text{P}]$ -меченых НК пробы содержали от $5 \cdot 10^{-9}$ М до $5 \cdot 10^{-8}$ М $\gamma[^{32}\text{P}]$ -меченых НК при общем содержании НК в указанных выше пределах. После инкубации проводили отмывку избытка несвязавшегося олигонуклеотида: добавляли 1 мл 3,88 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, встряхивали, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, оставляя осадок объемом 5-10 мкл. Супернатант при необходимости упаривали до 100 мкл (40 °С, SpeedVac), осаждали 2 % LiClO_4 в ацетоне.

3.6.2 Получение ассоциатов НЧЗ с НК в разбавленных условиях

Пробы объемом 1400 мкл, содержавшие от $5 \cdot 10^{-11}$ М до $3 \cdot 10^{-8}$ М НЧЗ и от $5 \cdot 10^{-11}$ М до $2 \cdot 10^{-10}$ М олигонуклеотида, инкубировали 30 мин при температуре 56 °С. После инкубации проводили отмывку избытка несвязавшегося олигонуклеотида: добавляли 1 мл 3,88 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, встряхивали, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, оставляя осадок объемом 5-10 мкл. Супернатант упаривали до 100 мкл (40 °С, SpeedVac), осаждали 2 % LiClO_4 в ацетоне.

3.6.3 Получение ассоциатов НЧЗ с НК в средних условиях

Пробы объемом 139 мкл, содержащие $3,6 \cdot 10^{-9}$ М НЧЗ и $7,2 \cdot 10^{-7}$ М олигонуклеотида, инкубировали 30 мин при температуре 56 °С. После инкубации проводили отмывку избытка несвязавшегося олигонуклеотида: добавляли 1 мл 3,88 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, встряхивали, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, оставляя осадок объемом 5-10 мкл. Супернатант при необходимости упаривали до 100 мкл (40 °С, SpeedVac), осаждали 2 % LiClO_4 в ацетоне.

3.6.4 Устойчивость ассоциатов НЧЗ-НК в солевых и буферных условиях

НЧЗ ($1,4 \cdot 10^{-7}$ М для ТВЕ и ПЦР-буфера, $3,4 \cdot 10^{-9}$ М для АР, PBS, 0,3 М NaCl, $8,5 \cdot 10^{-8}$ М для NaCl) инкубировали с НК ($1,4 \cdot 10^{-6}$ М для ТВЕ и ПЦР-буфера, от $5 \cdot 10^{-9}$ М до $5 \cdot 10^{-7}$ М для АР, PBS, 0,3 М NaCl, $1,25 \cdot 10^{-6}$ М для NaCl) или polyA ($5,5 \cdot 10^{-4}$ М для NaCl) в лунках иммунологического планшета в течение 1 ч при 25°С, затем добавляли равный объем раствора NaCl до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ - 2,5 М, АР 0,1 - 1X, PBS 0,1 - 1X, ТВЕ 0,25X или ПЦР-буфер 0,5X, инкубировали 30 мин при 25 °С.

3.6.5 Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-НК с HS-PEG-COOH, BSA, HSA, глутатионом

Инкубацию ассоциатов НЧЗ-НК с HS-PEG-COOH 3,2 и 4,9 кДа (PEG), BSA, HSA, глутатионом проводили при 25 °С и встряхивании 1400 об./мин в течение 30 мин - 22 ч в водном растворе с концентрацией HS-PEG-COOH, HSA, глутатиона равной $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ М и $1 \cdot 10^{-6}$ М BSA, затем пробы центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, проводили отмывку, супернатанты при необходимости упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

3.6.6 Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-НК с линейным PEI

К пробе ассоциатов НЧЗ-НК объемом около 5 мкл добавляли 10 мкл 1 мМ NaCl, затем 10 мкл 0,2 % PEI, инкубировали в течение 30 мин при 25 °С и встряхивании 1400 об./мин. Затем проводили отмывку дважды по 100 мкл 4 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, супернатанты при необходимости упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

3.6.7 Получение многослойных ассоциатов НЧЗ-siPHK с липидной оболочкой

Приготовили раствор объемом 1 мл, содержащий 45 мкМ фосфатидилхолина, 45 мкМ DOPE и 10 мкМ DOME2 в хлороформе в круглодонной колбе объемом 10 мл. Получили липидную пленку путем испарения хлороформа под вакуумом при 25 °. В колбу с пленкой добавили 923 мкл водного раствора, содержавшего ассоциаты НЧЗ-siPHK в концентрации $2,7 \cdot 10^{-9}$ М и 25 мМ NaH_2PO_4 , и провели ультразвуковую обработку в течение 15 мин при 20 °С. Затем добавили в колбу 77 мкл 1М Na_2HPO_4 , перемешали смесь, добавили 3 мкл 1 мМ конъюгата стеариновой кислоты и пептида [Str-(RL)4G-NH₂] и провели ультразвуковую обработку в течение 5 мин при 20 °С.

3.6.8 Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с TGA и MUA

Инкубацию ассоциатов НЧЗ-НК с тиогликолевой (TGA) и меркаптоундекановой (MUA) кислотами проводили при 25 и 56 °С соответственно и встряхивании 1400 об./мин в течение 30 мин - 22 ч в $2,5 \cdot 10^{-5}$ М растворе TGA или $1 \cdot 10^{-4}$ М растворе MUA, затем пробы центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, проводили отмывку, супернатанты при необходимости упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

3.6.9 Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с желатином

К пробам ассоциатов НЧЗ-НК добавляли 95 мкл 4 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, переносили в другую пробирку с 300 мкл раствора желатина А или В с концентрацией 3-10 % в среде Hepx, инкубировали в течение 30 мин – 22 ч при 37 °С и встряхивании 1400 об./мин, центрифугировали в течение 40-60 мин при 13200 об./мин (60 мин для 10 % раствора желатина), супернатанты убирали, упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

3.6.10 Приготовление «цитозоля»

Для приготовления «цитозоля» использовали суспензию бактерий *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922) с титром 10^9 КОЕ/мл. Сначала суспензию концентрировали в 10 раз в центрифуге Beckman-Coulter Avanti J-30I в течение 5-7 минут при ускорении 5000 g. Клетки отмывали от избытка питательной среды физиологическим раствором и центрифугировали в тех же условиях. Повторяли два раза. Осадки ресуспендировали и отфасовывали по пробиркам объемом 50 мл по 5-10 мл в каждую. После этого пробирки с клеточной суспензией инкубировали при температуре -20°C в течение 12-24 ч, затем пробирки размораживали и центрифугировали в течение 5 минут при 4000 об./мин. Супернатанты убирали, к осадкам добавляли по 5-10 мл дистиллированной воды и ресуспендировали, после чего инкубировали полученные суспензии при температуре 37°C в течение 1,5-2 часов. После инкубации образцы суспензии обрабатывали ультразвуком с помощью Bandelin Sonopuls HD 3100 при 90 % мощности в течение 15 мин в режиме пульсации 3 сек через 3 сек. Во время обработки пробирки помещали в смесь льда и NaCl. Суспензии центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об./мин, после чего убирали супернатант, а осадок ресуспендировали. Суспензию с помощью шприца пропускали через фильтр Millipore Millex-HV с диаметром пор 0,45 мкм и отфасовывали по 0,5 мл в предварительно взвешенные пробирки объемом 2 мл. Образцы лиофилизировали в течение 24 часов. Определяли массу полученных образцов. Сухие образцы хранили при температуре -20°C . Перед работой готовили водный раствор с концентрацией 4 мг/мл.

3.6.11 Инкубация ассоциатов НЧЗ-НК с FBS и «цитозолем»

К пробам ассоциатов НЧЗ-НК объемом около 5 мкл добавляли 25 мкл «цитозоля», разбавленного водой до концентрации 4 мг/мл (по белку), или FBS с концентрацией 10 % в среде DMEM, инкубировали при 37°C и встряхивании 600 об./мин в течение 0 – 22 ч, затем пробы центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант и промывали осадки 75 мкл H_2O mQ, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, супернатанты упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

3.6.12 Десорбция олигонуклеотидов с поверхности НЧЗ

Ассоциаты НЧЗ-НК инкубировали в течение 30 мин при 56°C и встряхивании 1400 об./мин в 50 мМ растворе DTT, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, убирали супернатант, промывали 50 мкл H_2O mQ, центрифугировали в течение 30 мин при 13200 об./мин, супернатанты упаривали и осаждали в виде литиевой соли в ацетоне.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.6 Анализ связывания НК с НЧЗ с помощью электрофореза в агарозном геле

В литературе описаны различные варианты электрофоретического разделения НЧЗ и их ассоциатов с НК в агарозном геле, отличающиеся буферными условиями, концентрацией агарозы в геле, напряженностью электрического поля, продолжительностью анализа. Гель-электрофорез НЧЗ и ассоциатов на их основе использовали преимущественно для подтверждения образования ассоциатов [345], оценки их размеров [346] и разделения НЧЗ и ассоциатов разного размера и состава [347], причем чаще всего анализировали только сканированные изображения гелей, хотя применялся и способ окраски гелей раствором флуоресцеина для визуализации малых количеств НЧЗ по тушению флуоресценции [348]. Например, для анализа ассоциатов НЧЗ (14 нм), модифицированных через тиольную группу азидом для дальнейшей модификации по схеме катализируемого Cu(I) азидалкинциклоприсоединения, проводили электрофорез (ЭФ) в 1,5 % агарозе в TBE при 100 В в течение 60 мин [349]. Разделение димеров, тримеров и тетрамеров НЧЗ, стабилизированных BSPP и модифицированных тиольными НК, проводили в 1,5 % [350] или 3 % агарозе в 0,5-кратном TBE в течение 90 мин при 5 В/см [351], таким же образом разделяли НЧЗ с фиксированным числом присоединенных тиольных НК (1-5 мол./НЧЗ) [352]. Кроме обычной агарозы для разделения НЧЗ применяли и агарозу MetaPhor с дважды улучшенной разрешающей способностью [346]. Помимо широко используемого TBE для агарозного ЭФ НЧЗ использовались и другие буферные растворы, например, 10 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) [351] или 10 мМ HEPES (рН 7,6) [254].

Задачей первого этапа работы было применение электрофоретического анализа зависимости нековалентного связывания НЧЗ с НК от ряда факторов, включающих в себя как варьирование условий связывания, так и длины и последовательности олигонуклеотидов. Решение этой задачи включало в себя следующие шаги:

- подбор условий проведения электрофореза с ассоциатами НЧЗ и НК и способа анализа его результатов;
- анализ зависимости связывания НЧЗ с НК от длины, заряда и нуклеотидной последовательности НК, а также от температуры и продолжительности инкубации при получении ассоциатов;
- анализ устойчивости полученных ассоциатов при последующей инкубации с другими соединениями, содержащими или не содержащими тиольную группу.

В данной главе рассмотрены возможности, которые открывает эта методика, и проанализированы данные, полученные с ее помощью на первом этапе работы с модельными олигонуклеотидами.

4.6.1 Разработка методики анализа подвижности ассоциатов

Принципиально результаты электрофоретического анализа ассоциатов НЧЗ-НК можно анализировать по одной из двух компонент ассоциатов: НК или НЧЗ. Гель-электрофорез является самым простым методом визуального анализа, поскольку НЧЗ в геле имеют красный цвет и не требуют дополнительного окрашивания. Применение 5'-[^{32}P]-меченных НК позволило нам провести количественную оценку связывания различных НК с НЧЗ благодаря высокой чувствительности такого метода. Данному способу анализа связывания посвящена глава 4.2.

На рисунке 31 представлен анализ НЧЗ и их ассоциатов с 66-звенной ДНК L0 в агарозном геле.

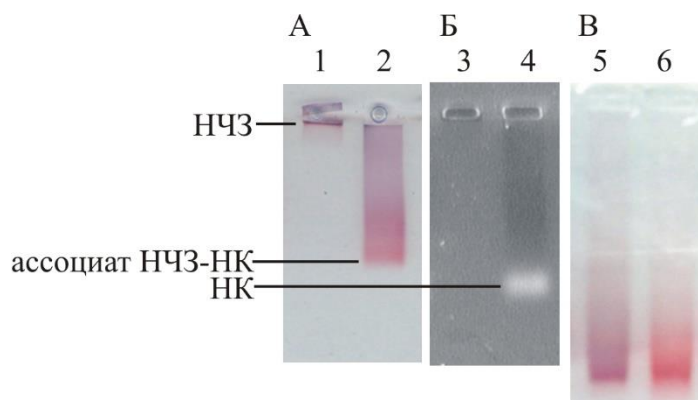


Рисунок 31. Сканированное изображение гелей после электрофоретического анализа НЧЗ-L0: А – в буферном растворе Трис-глицин, Б – после окрашивания геля этидиум бромидом с последующей визуализацией в УФ-свете (365 нм), В - в буферном растворе Трис-глицин-SDS. Дорожки 1, 3, 5 – НЧЗ, 2, 4, 6 – ассоциаты НЧЗ-L0. Концентрация НЧЗ равна $1 \cdot 10^{-7}$ М.

Визуально после проведения ЭФ оценивали следующие параметры:

- коллоидную стабильность НЧЗ и ассоциатов по их цвету (синий цвет свидетельствует о слипании НЧЗ, а красный – о стабилизации НЧЗ),
- разные аспекты электрофоретической подвижности НЧЗ (достижение максимальной подвижности НЧЗ, долю наиболее подвижных НЧЗ и др.).

НЧЗ практически не обладали электрофоретической подвижностью (дорожки 1, 3, рис. 31 А, Б), коллоидная стабильность НЧЗ в буферном растворе нарушена, что видно по их сине-красному цвету. Ассоциаты НЧЗ с НК приобретали подвижность благодаря адсорбции отрицательно заряженных НК (дорожки 2, 4 рис. 31 А, Б). Свободные молекулы НК в геле имели бóльшую подвижность по сравнению с ассоциатами НЧЗ-НК (дорожка 4, рис. 31 Б).

4.6.2 Выбор буферного раствора и содержания агарозы в геле

Путем анализа подвижности НЧЗ в геле проводили сравнение широкого спектра факторов, влияющих на степень связывания разных НК с НЧЗ, а именно зависимость связывания от температуры и продолжительности предварительной инкубации, концентрации, заряда, нуклеотидной последовательности НК, а также устойчивость ассоциатов НК с НЧЗ при связывании с другими биомолекулами. На основе анализа электрофоретической подвижности НЧЗ в геле проводили качественную оценку сродства НК к НЧЗ. Для этого готовили агарозный гель с содержанием агарозы 0,8 – 3 % с использованием буферных растворов, приведенных в таблице 11.

Таблица 11. Состав буферных растворов, использованных для проведения электрофореза в агарозном геле.

Буферный раствор	состав	pH
0,5X TBE	45 mM Трис, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM ЭДТА	pH 8,3
Трис-Gly	25 mM Трис, 250 mM Gly	pH 8,3
Трис-ацетатный	1 mM ЭДТА, 40 mM Трис, 20mM CH_3COOH	pH 8,5
цитратный	25 mM $Na_3C_6H_5O_7$	pH 6,7

Концентрация агарозы 0,8 % была выбрана как обеспечивающая размер пор, не затрудняющий миграцию НЧЗ. Выбор буферного раствора был обусловлен стабильностью в нем НЧЗ. Для определения оптимальных условий анализа подвергали электрофоретическому разделению ассоциаты НЧЗ с 26-звенным олигонуклеотидом Т26 в вышеперечисленных условиях. Стабильность ассоциатов НЧЗ-Т26 при электрофорезе подтверждали спектрами оптического поглощения растворов ассоциатов буферном растворе Трис-Gly, в которых не наблюдалось изменений относительно контроля - 4 mM цитрата натрия (рис. 32).

Широко применяемый состав буферного раствора Трис-Gly предполагает наличие SDS (додецилсульфата натрия). Однако SDS взаимодействует с НЧЗ и влияет на их подвижность в геле (рис. 31 В), поэтому этот компонент был исключен из состава. Как было установлено, для проведения ЭФ в агарозном геле толщиной 4 мм с дорожками шириной 5,5 мм проба должна иметь объем 5-10 мкл и содержать 0,5 пмоль НЧЗ, в таком случае количество частиц было достаточно для их визуализации и в то же время не наблюдалось чрезмерной интенсивности окрашивания продуктов для используемой толщины геля. Таким образом, в электрофоретических пробах концентрация НЧЗ была равна $1 \cdot 10^{-7} M$.

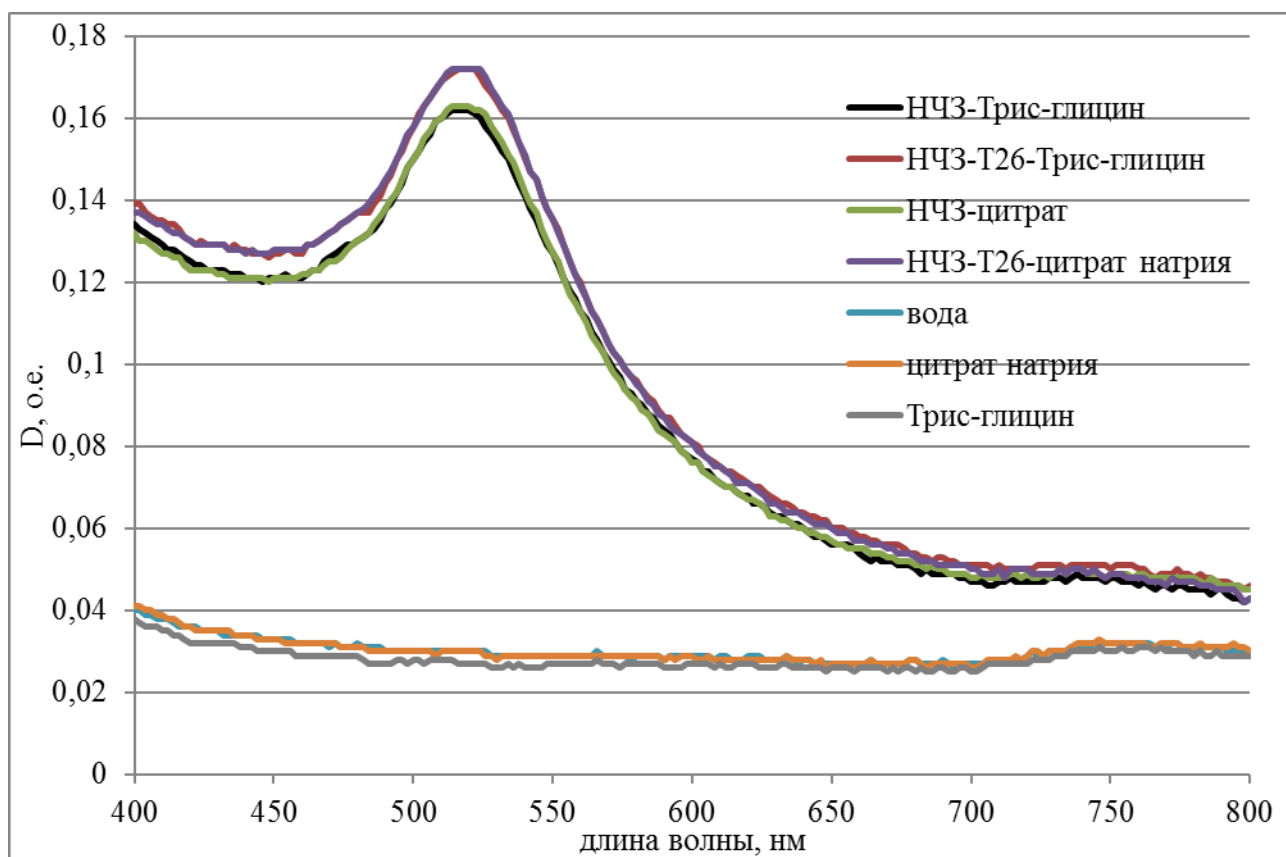


Рисунок 32. Спектры оптического поглощения НЧЗ и их ассоциатов с олигонуклеотидом Т26 в 4 мМ растворе цитрата натрия и в буферном растворе Трис-глицин.

Как видно из представленных данных, ассоциаты НЧЗ-Т26 оставались стабильны после инкубации в буферном растворе Трис-Gly в течение 30 мин при 25 °С: максимум поглощения наблюдался при длине волны 520 нм, в то же время отсутствовал пик поглощения в диапазоне 650-700 нм, характерный для слипшихся НЧЗ.

4.6.3 Оценка сродства НК с НЧЗ

Для оценки сродства НК к НЧЗ проводили связывание НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) с Т26 в диапазоне концентраций $4 \cdot 10^{-7}$ - $4 \cdot 10^{-5}$ М в водном растворе в течение 30 мин при 56 °С. НЧЗ сами по себе не обладают заметной электрофоретической подвижностью. Связывание со всё возрастающими количествами отрицательно заряженных НК приводило к увеличению подвижности НЧЗ в геле. На рис. 33 приведен электрофоретический анализ концентрационной зависимости связывания НЧЗ с НК (рис. 33 А), изображение, обработанное для расчета (рис. 33 Б) и кривая концентрационной зависимости (рис. 33 В). Как видно из представленных данных, при самой низкой концентрации Т26 (0,4 мкМ) наблюдалось слипание НЧЗ в агарозном геле (рис. 33 А). Этот факт необязательно указывает, что ни одна молекула НК не связалась с НЧЗ, скорее говорит о том, что количество связанной НК было недостаточно для предотвращения слипания НЧЗ. Постепенное увеличение концентрации Т26 до 1 и 2 мкМ сначала приводило к повышению

стабильности НЧЗ (рис. 33 А), а затем к увеличению их подвижности в геле (дорожки 4-10 мкМ, рис. 33 А). Более медленные и диффузные полосы, возможно, соответствовали частицам, несущим меньший отрицательный заряд и меньшее количество адсорбированных молекул НК. Предположительно самые подвижные полосы содержали НЧЗ с наибольшим числом адсорбированных молекул НК (дорожки 6-10 мкМ, рис. 33 А).

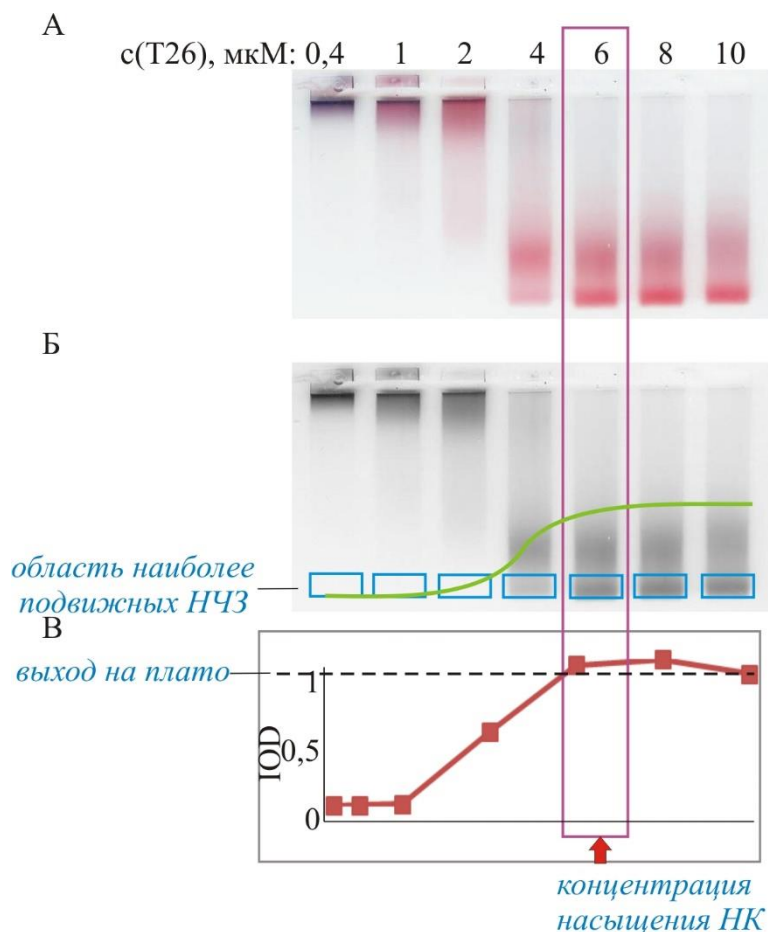


Рисунок 33. Анализ агарозного геля после проведения электрофореза. А – сканированное изображение геля, содержащего ассоциаты НЧЗ-Т26, Б – обработка черно-белого изображения с выделением в каждой дорожке областей одинаковой площади, содержащих наиболее подвижные НЧЗ, и получением числового эквивалента интенсивности окрашивания выделенных областей, В – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с Т26, красной стрелкой обозначена концентрации Т26, при которой достигается плато насыщения (концентрация насыщения). IOD – интегральная оптическая плотность.

Интенсивность окрашивания участков геля, соответствующих положению полосы с НЧЗ максимальной подвижности, существенно возрастала с ростом концентрации Т26 и затем достигала плато (рис. 33 Б, В). Интенсивность окрашивания этих областей оценивали с помощью программного обеспечения Quantity One (Biorad) (рис. 33 Б) и строили график зависимости эффективности связывания НЧЗ с Т26 (рис. 33 В). Полученный график имел характерную сигмовидную форму. Далее определяли концентрацию насыщения НК, при которой увеличение адсорбции олигонуклеотидов заканчивалось, и связывание Т26

выходило на плато. Таким образом, на примере T26 была продемонстрирована картина концентрационной зависимости адсорбции, типичная для других НК.

Зависимость связывания НЧЗ с НК от температуры и продолжительности инкубации

Известно, что в процесс адсорбции НК на НЧЗ вовлечены гидрофобные взаимодействия [255], которые усиливаются с ростом температуры [354]. Было проведено изучение зависимости степени адсорбции T26 на НЧЗ от температуры инкубации. Для этого НЧЗ инкубировали с T26 ($4-6 \cdot 10^{-7}$ М) в водном растворе при температуре 25, 40, 56, 70, 95 °С. Далее анализировали ассоциаты электрофорезом в агарозном геле (рис. 34 А).

Видно, что при увеличении температуры инкубации происходило образование полос, обладавших бóльшей подвижностью в геле (сравните дорожки 25, 40 и 56 °С, рис. 34 А).

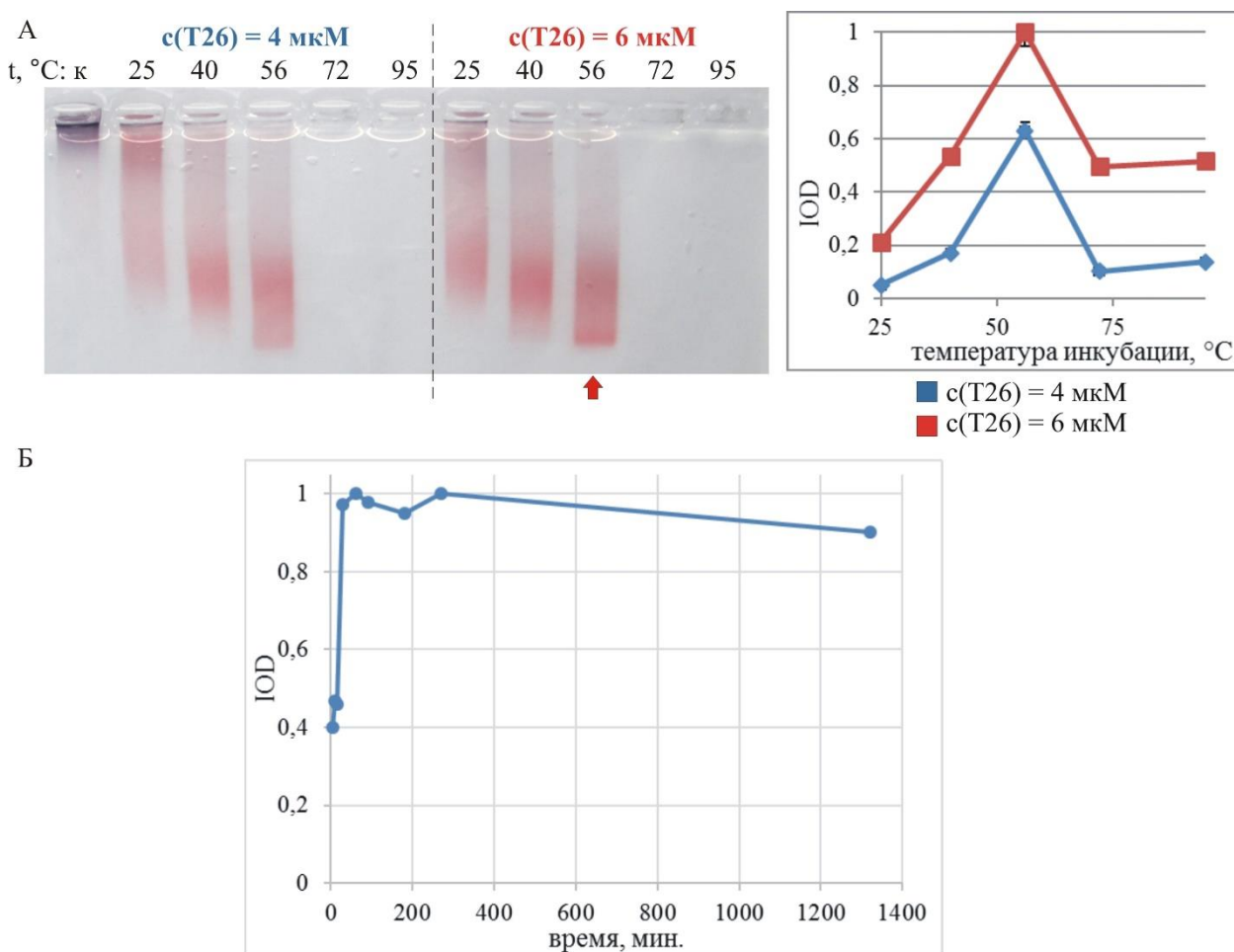


Рисунок 34. Исследование влияния температуры инкубации на эффективность адсорбции T26 на НЧЗ. А - анализ подвижности ассоциатов НЧЗ-T26 электрофорезом в 0,8 % агарозном геле, Б – зависимость эффективности адсорбции НК на НЧЗ от продолжительности инкубации. Красной стрелкой обозначена концентрация насыщения НК. IOD- интегральная оптическая плотность.

Также с ростом температуры интенсивность полос быстрых НЧЗ возрастала, и одновременно уменьшалась интенсивность полос медленно движущихся НЧЗ. Таким

образом, связывание НЧЗ с НК усиливалось при повышении температуры инкубации, однако при слишком высоких температурах НЧЗ (70 и 95 °С) происходило слипание НЧЗ. Для $t=56$ °С получили самые быстродвижущиеся ассоциаты, поэтому далее использовали эту температуру инкубации как оптимальную. Далее было проведено исследование влияния продолжительности инкубации НЧЗ с НК при температуре 56 °С на эффективность образования ассоциатов. Для этого НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) инкубировали с НК ($1 \cdot 10^{-5}$ М) в водном растворе при температуре 56 °С в течение 5 мин- 22 ч. Как видно из представленных данных, при увеличении времени инкубации до 30 мин степень адсорбции достигала плато (90 %), при более длительной инкубации увеличения связывания не происходило (рис. 34 Б).

Далее во всех экспериментах по связыванию НЧЗ и одноцепочечных НК инкубацию реакционной смеси проводили в течение 30 мин при 56 °С, если не указано иначе.

Зависимость связывания от концентрации, длины, заряда одноцепочечных НК

Для выяснения влияния длины НК на эффективность связывания с НЧЗ инкубировали НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) с несколькими группами НК. Первая группа НК – олиготимидилаты длиной 6, 26, 40, 300 нт. (рис. 35 А, Б, Г, Д, Е, Ж, И), вторая группа – НК 6-1, 6-2 и 6-4 длиной 6, 12, 24 нт. соответственно, содержащие повторяющийся мотив TGAGAT и гексаэтиленгликолевый фосфатный линкер между мотивами (рис. 35 А, В, К, Л, М, Н). Линкер был введен в структуру НК для повышения гибкости молекулы.

В каждой группе НК более длинные олигонуклеотиды имели более низкую концентрацию насыщения по сравнению с более короткими НК, что объясняется увеличением числа фосфатных групп в образце с ростом длины НК в одних и тех же молярных концентрациях и соответствующим увеличением отрицательного заряда на НЧЗ. Ассоциаты с короткими НК длиной 6 нт. Т6 (рис. 35 Г) и 6-1 (рис. 35 К) не достигали максимальной подвижности, что, вероятно, свидетельствовало о том, что суммарного отрицательного заряда на них было недостаточно.

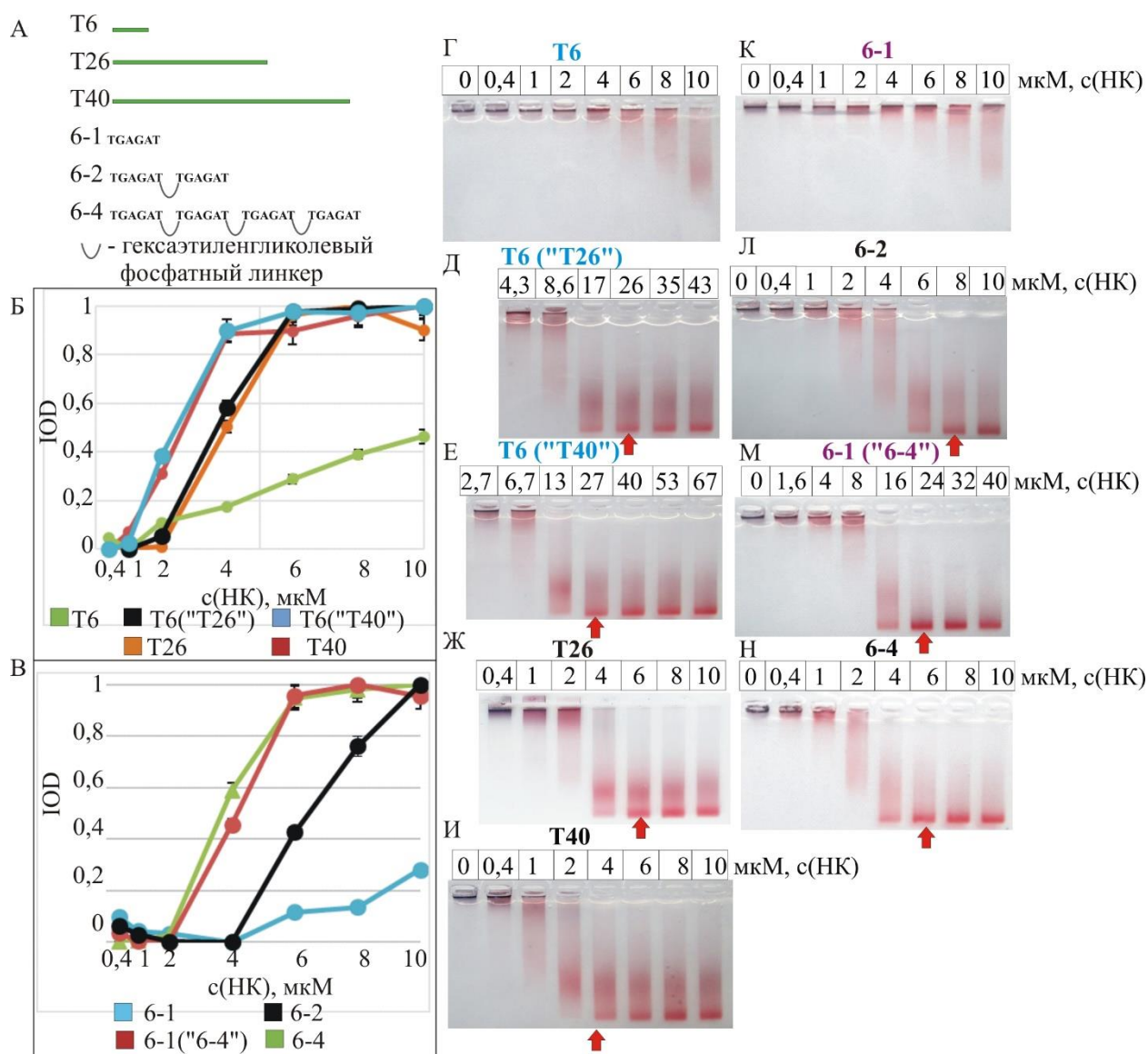


Рисунок 35. Зависимость эффективности адсорбции НК от их длины и последовательности. А - длина и последовательность НК, Б – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с олиготимидилатами, В - концентрационная зависимость связывания НЧЗ с олигонуклеотидами, содержащими мотив TGAGAT, Г – анализ электрофорезом в 0,8 % агарозном геле связывания НЧЗ с олиготимидилатом Т6, Д – с Т6 в концентрациях, имитирующих Т26, Е – с Т6 в концентрациях, имитирующих Т40, Ж – с Т26, И – с Т40, К – с олигонуклеотидом 6-1, Л – с 6-2, М – с 6-1 в концентрациях, имитирующих 6-4, Н – с 6-4. Красными стрелками обозначены концентрации насыщения НК. IOD – интегральная оптическая плотность.

Далее провели сравнение подвижности ассоциатов НЧЗ с НК из двух групп, рассмотренных выше, чтобы оценить влияние числа заряженных групп в составе НК на их связывание с НЧЗ и электрофоретическую подвижность НЧЗ. Для этого увеличили концентрации коротких НК Т6 и 6-1 так, чтобы каждый образец содержал столько же нуклеотидных звеньев, сколько содержит образец НЧЗ с более длинной НК: Т26 или Т40 для Т6 и 6-4 для 6-1. Т.е., четыре молекулы 6-1 «заменяют» одну молекулу 6-4 по числу нуклеотидных звеньев, 4,3 молекулы Т6 «заменяют» одну молекулу Т26, 6,7 молекул Т6 «заменяют» одну молекулу Т40. Другими словами, каждая длинная НК была симитирована

соответствующей короткой НК такого же нуклеотидного состава. Концентрации коротких олигонуклеотидов были пересчитаны в соответствующие концентрации длинных олигонуклеотидов. Наблюдался практически идентичный профиль подвижности ассоциатов в каждом случае (сравните изображения Д и Ж, Е и И, М и Н, рис. 35). Таким образом, очевидно, что при одинаковой нуклеотидной последовательности решающее влияние на подвижность ассоциатов в геле оказывал суммарный отрицательный заряд НК. Заметим, что данное заключение справедливо в условиях быстрого связывания НЧЗ и НК при 56 °С, в которых не выявлено различие в скоростях адсорбции НК разной длины.

Было замечено, что подвижность ассоциатов, содержавших НК разной длины, имела некий единый верхний предел в геле, связанный с насыщением поверхности НЧЗ молекулами НК. Одинаковый предел подвижности для НК разной длины, очевидно, был связан с размером пор используемого 0,8 % геля. Разницу в подвижности ассоциатов НЧЗ с НК разной длины наблюдали в гелях, содержащих 1,5 – 3 % агарозы [228, 352, 355].

Для подтверждения роли количества фосфатных групп в молекулах НК в ЭФ-подвижности их ассоциатов с НЧЗ исследовали ассоциаты НЧЗ с набором НК на основе гетеропоследовательности 5`-CACTCGCAAGCACCCSTATCAG-3` длиной 21 нт. Эти олигонуклеотиды содержали разное количество незаряженных ФГ-групп (0, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20) и разное число отрицательно заряженных фосфатных групп (21, 10, 6, 4, 3, 2 и 1 соответственно). Олигонуклеотиды с ФГ-группами R, R.15, R.17, R.18, R.19, R.20 ($0,4 - 10 \cdot 10^{-6}$ М) инкубировали с НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в водном растворе при 56 °С в течение 30 мин и анализировали электрофорезом в 0,8 % агарозном геле (рис. 36).

Видно, что снижение числа отрицательно заряженных групп не только увеличило пороговую концентрацию НК, но и уменьшило максимально достижимую электрофоретическую подвижность НЧЗ R_f , принятую равной 1 для полностью заряженного олигонуклеотида R, до значений R_f от 0,67 до 0,77 для олигонуклеотидов, несущих 15-18 ФГ-групп (рис. 36). Последнее, возможно, связано с тем, что молекулы НК адсорбированы на поверхности НЧЗ своим заряженным концом, а незаряженные концы молекул образуют объемную оболочку вокруг НЧЗ, увеличивая ее диаметр и затрудняя миграцию в геле.

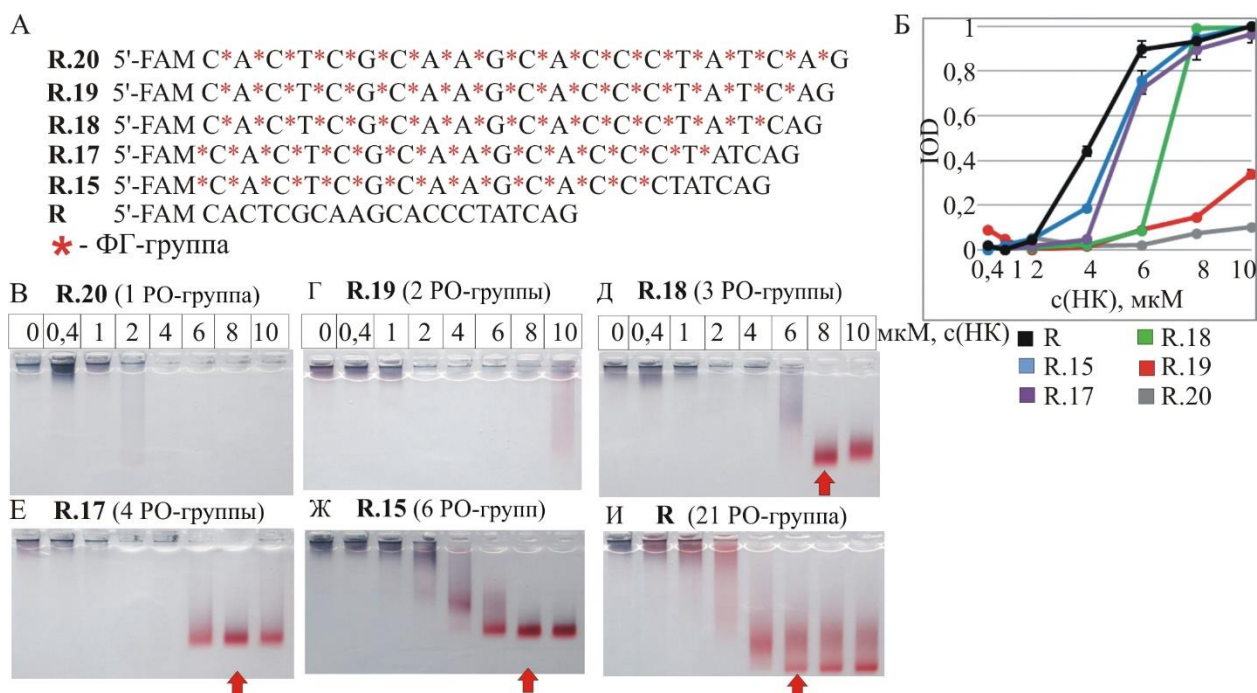


Рисунок 36. Исследование, демонстрирующее влияние числа заряженных групп в олигонуклеотидах на электрофоретическую подвижность их ассоциатов с НЧЗ. А - олигонуклеотиды, использованные в работе, Б - концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК, В - анализ электрофорезом в 0,8 %агарозном геле ассоциатов НЧЗ с олигонуклеотидом R.20, содержащим 1 заряженную фосфатную группу (РО-группу), Г – с R.19, содержащим 2 РО-группы, Д – с R.18, содержащим 3 РО-группы, Е – с R.17, содержащим 4 РО-группы, Ж – с R.15, содержащим 6 РО-групп, И – с R, содержащим 21 РО-группу. Красными стрелками обозначены концентрации насыщения НК. IOD – интегральная оптическая плотность.

Отметим, что наименее заряженные НК R.20 и R.19, несущие одну или две фосфатные группы соответственно, практически не изменили электрофоретическую подвижность НЧЗ в геле, при этом вызвали слипание НЧЗ (синий цвет) (рис. 36 В, Г).

Далее представлялось интересным оценить влияние последовательности НК при одинаковой длине. Для этого исследовали концентрационные профили для олигонуклеотидов одинаковой длины (26 нт.), но с разной гомопоследовательностью: олигоС, олигоА, олигоТ и олигоG (рис. 37). Олигонуклеотиды G26, C26, T26 и A26 ($0,4 - 10 \cdot 10^{-6}$ М) инкубировали с НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в водном растворе при 56 °С в течение 30 мин. Видно, что T26 и A26 имели меньшую концентрацию насыщения (6 мкМ), чем C26 (8 мкМ) и, что ожидаемо, чем G26 (рис. 37). G26, очевидно, в условиях эксперимента образовывал вторичные структуры, и его ассоциаты не детектировались в геле. Ассоциаты НЧЗ-G26 не достигали максимальной подвижности, поэтому концентрация насыщения не была определена.

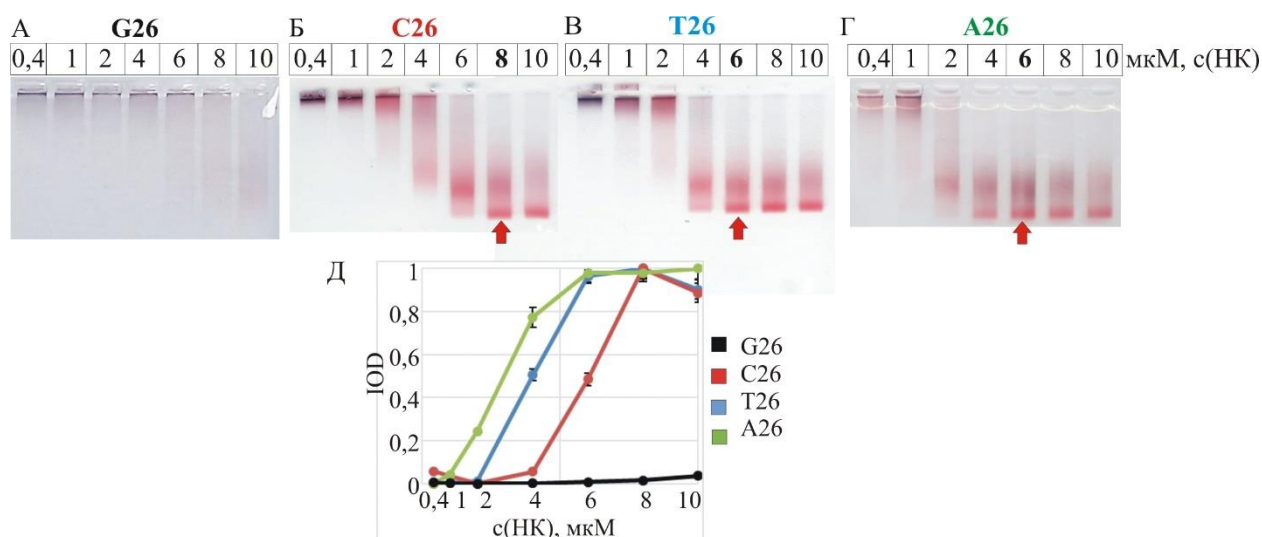


Рисунок 37. Влияние последовательности НК разной гомопоследовательности (26 нт.) на электрофоретическую подвижность ассоциатов НЧЗ и НК. А – анализ подвижности ассоциатов НЧЗ-G26, Б - НЧЗ-C26, В – НЧЗ-T26, Г – НЧЗ-A26, Д – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК. Красными стрелками обозначены концентрации насыщения НК. IOD – интегральная оптическая плотность.

Эти наблюдения указывали на более высокую аффинность Т и А к НЧЗ по сравнению с С, однако сделать вывод о сродстве G26 к НЧЗ из представленных данных нельзя. Полученный результат идет вразрез с литературными данными, согласно которым сродство аденина и цитозина однозначно выше сродства тимина как для азотистых оснований, так и для нуклеозидов и нуклеотидов [209, 208, 215, 213].

Далее провели изучение электрофоретической подвижности ассоциатов НЧЗ с НК длиной 26 нт. смешанного состава: AC, AT, GC, GT, TGT, ATG и NC (5' СААСАСААССААСАСААССААСАСАА). Для этого НК ($0,4 - 10 \cdot 10^{-6}$ М) инкубировали с НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в водном растворе при 56°C в течение 30 мин и анализировали электрофорезом в 0,8 % агарозном геле (рис. 38). Самая низкая для 26-меров концентрация насыщения наблюдалась в случае аденин-содержащих олигонуклеотидов AC и AT (рис. 38 А, Г) и была равна 4 μM , что было меньше концентрации насыщения соответствующих гомопоследовательностей (A26, T26 и C26). Бóльшую концентрацию насыщения (6 μM), чем у AC и AT, имели олигонуклеотиды, составленные из повторяющихся мотивов TGT или ATG (рис. 38 Б, Д). Последовательность NC (рис. 38 В), состоявшая из 15 высокоаффинных А и 11 низкоаффинных С, и G-богатый олигонуклеотид GT (рис. 38 Е) имели самую высокую концентрацию насыщения из всех аденин- и тиминсодержащих последовательностей, равную 8 μM . Для G-богатого и, вероятно, сильноструктурированного олигонуклеотида GC (рис. 38 Ж) концентрация насыщения не была определена.

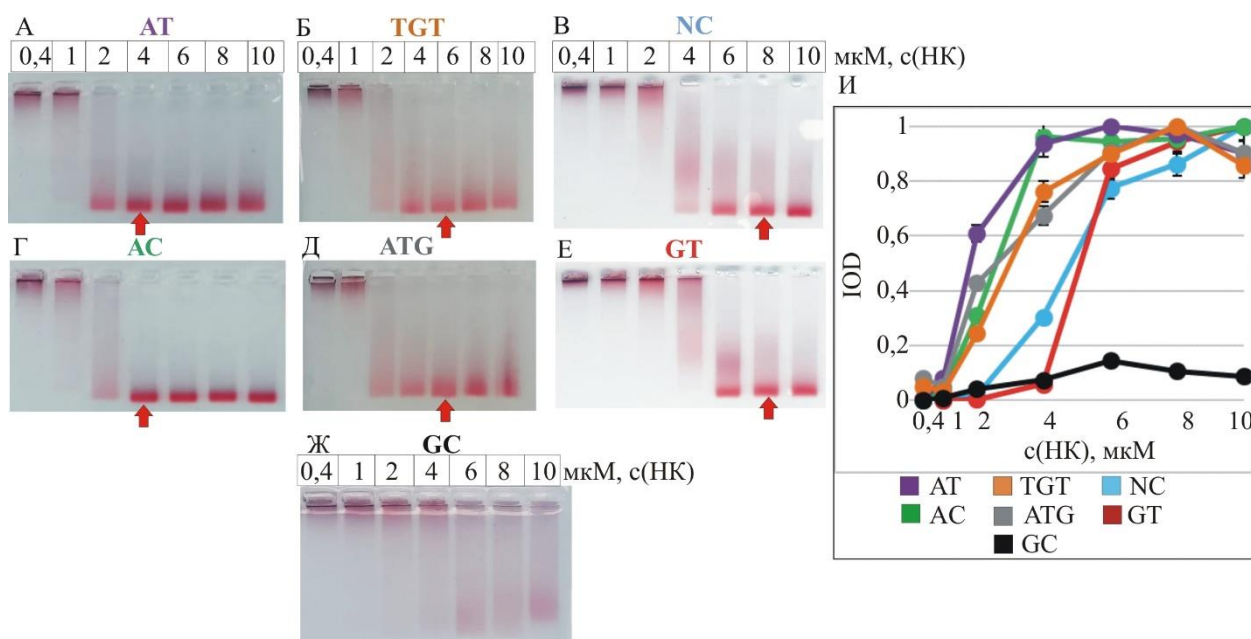


Рисунок 38. Влияние гетеропоследовательности НК (26 нт.) на электрофоретическую подвижность ассоциатов с НЧЗ. А – анализ подвижности ассоциатов НЧЗ-АТ, Б - НЧЗ-TGT, В – НЧЗ-NC, Г – НЧЗ-AC, Д – НЧЗ-ATG, Е - НЧЗ-GT, Ж – НЧЗ-GC, И – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК. Красными стрелками обозначены концентрации насыщения НК. IOD – интегральная оптическая плотность.

Видимо, содержание высокоаффинных нуклеотидов А и Т или низкоаффинного С не является решающим фактором для сродства НК к НЧЗ. Свой вклад в аффинность, вероятно, вносит также конкретная последовательность нуклеотидов и определяемая ею вторичная структура молекулы.

4.6.4 Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами

В первую очередь, было исследовано, насколько устойчиво нековалентное нуклеотидное покрытие НЧЗ к 4 мМ раствору цитрата натрия (рис. 39).

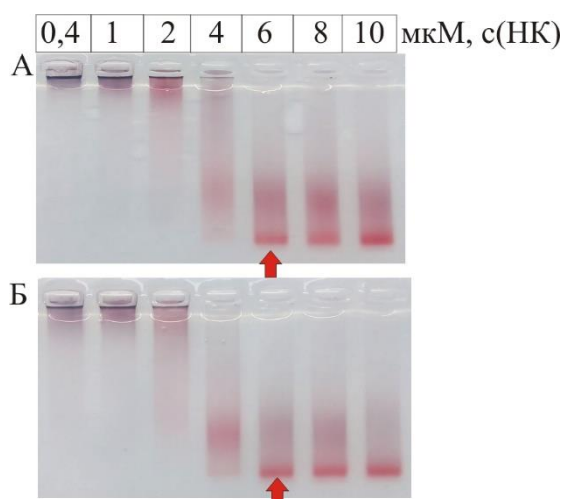


Рисунок 39. Исследование устойчивости ассоциатов НЧЗ-T26 к 0.4 мМ раствору цитрата натрия. Анализ ассоциатов в 0,8 % агарозном геле: А – до обработки раствором цитрата натрия, Б – после обработки раствором цитрата натрия. Красными стрелками обозначены концентрации насыщения НК.

Для этого Т26 ($0,4 - 10 \cdot 10^{-6}$ М) инкубировали с НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в водном растворе при 56° С в течение 30 мин. Далее проводили обработку ассоциатов 4 мМ раствором цитрата натрия (добавляли 1 мл раствора, встряхивали, после центрифугирования в течение 30 мин при 13200 об./мин отделяли супернатант) и анализировали электрофорезом в 0,8 % агарозном геле. Видно, что пороговая концентрация для ассоциатов НЧЗ-Т26 до и после обработки одинакова, что говорит о стабильности нековалентного покрытия НЧЗ молекулами НК.

Далее была проведена серия экспериментов по последовательной инкубации НЧЗ сначала с НК, затем с тиолсодержащими соединениями (рис. 40), поскольку ряд соединений с тиольной группой широко используют для десорбции молекул НК с поверхности НЧЗ, присоединенных как ковалентно, так и нековалентно [43, 227]. Для упрощения анализа электрофоретической подвижности инкубацию НЧЗ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) с Т26 и Т40 проводили при 100-кратном молярном избытке НК ($1 \cdot 10^{-5}$ М), поскольку в этих условиях после электрофореза в агарозном геле наблюдалась узкая гомогенная полоса НЧЗ максимальной подвижности для ассоциатов Т26 и Т40 с НЧЗ.

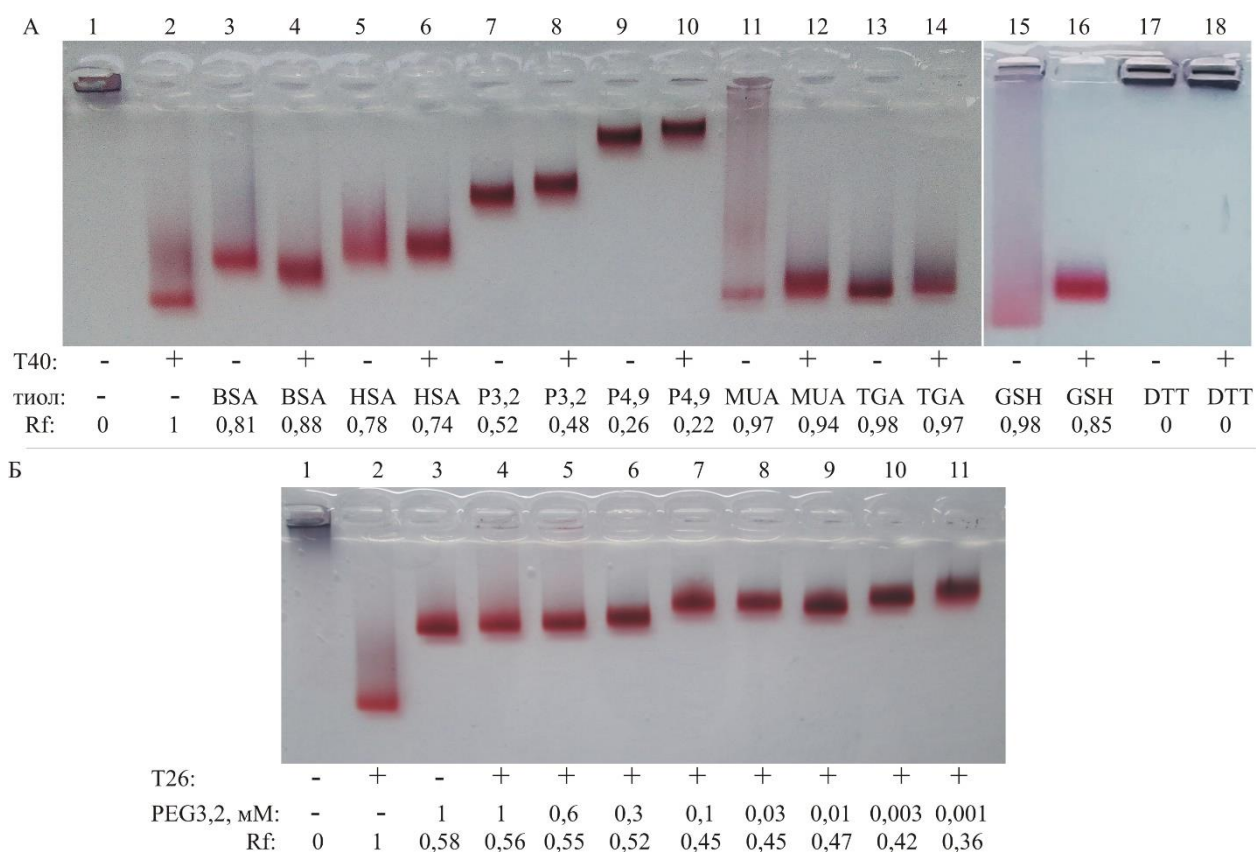


Рисунок 40. Влияние тиол-содержащих соединений на электрофоретическую подвижность ассоциатов НЧЗ с НК. А – ассоциаты НЧЗ с олигонуклеотидом Т40 и/или с одним из тиольных соединений (P3,2 – HS-PEG-COOH 3,2 кДа, P4,9 – HS-PEG-COOH 4,9 кДа), Б - ассоциаты НЧЗ с олигонуклеотидом Т26 и/или HS-PEG-COOH 3,2 кДа. Rf – относительная подвижность ассоциатов НЧЗ в геле.

Поскольку другие биомолекулы кроме НК способны адсорбироваться на НЧЗ и таким образом влиять на стабильность ассоциатов НЧЗ-НК, было проведено исследование влияния следующих веществ: сывороточных альбуминов BSA и HSA, глутатиона (GSH) (содержат остатки цистеина, цистина), HS-PEG-COOH, DTT, тиогликолевая (TGA) и меркаптоундекановая (MUA) кислоты (высоко- и низкомолекулярные соединения, содержащие SH-группу, стабилизаторы НЧЗ) (рис. 40 А). Далее эти вещества, содержащие тиольную SH-группу, собирательно обозначены как тиолы. Была рассчитана относительная подвижность (R_f) ассоциатов в геле с использованием в качестве единицы подвижности самых быстрых ассоциатов – НЧЗ-НК. После инкубации со всеми исследованными соединениями наблюдалось уменьшение электрофоретической подвижности НЧЗ по сравнению с подвижностью ассоциатов НЧЗ-T40 (сравните дорожки 3-18 и дорожку 2, рис. 40 А). Электрофоретическая подвижность НЧЗ после инкубации с каждым из тиолсодержащих соединений была чуть больше по сравнению с НЧЗ после последовательной инкубации с олигонуклеотидом и с соответствующим тиолом (сравните дорожки 3 и 4, 5 и 6, 7 и 8, 9 и 10, 11 и 12, 13 и 14, 15 и 16, рис. 40 А), за исключением BSA (сравните дорожки 3 и 4, рис. 40 А). Коллоидная стабильность сохранялась в большинстве случаев, однако в растворах MUA, TGA и DTT происходило частичное слипание НЧЗ с изменением цвета с красного на пурпурный или на красно-синий (дорожки 11, 13, 14, 17, 18, рис. 40 А).

Уменьшение подвижности НЧЗ свидетельствует об увеличении размера ассоциатов и может происходить по двум причинам: (1) вытеснение нековалентно сорбированных НК с поверхности НЧЗ тиолсодержащими соединениями или (2) адсорбция тиолсодержащих молекул с высокой молекулярной массой вторым слоем с частичным вытеснением сорбированных молекул НК (вследствие стерических затруднений), возможно, с вовлечением нековалентных (электростатических, гидрофобных и др.) взаимодействий с сорбированными молекулами НК (метод «слой-за-слоем» [356]).

Ассоциаты НЧЗ-T26-PEG, полученные при раститровке HS-PEG-COOH (3,2 kDa) от 0,001 мМ до 1 мМ, обладали существенно меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходные ассоциаты НЧЗ-T26, значение R_f составило от 0,58 до 0,36 (сравните дорожки 4-11 и дорожку 2, рис. 40 Б). Подвижность уменьшалась на 35 % при уменьшении концентрации PEG на три порядка. Наблюдаемый эффект замедления образцов в геле можно объяснить увеличением размера ассоциатов при адсорбции молекул PEG. Некоторые исследователи полагают, что молекулы полиэтиленгликоля с одним тиольным «якорем» образуют объемные грибообразные структуры при ковалентной адсорбции на поверхности НЧЗ и неполностью вытесняют низкомолекулярные соединения, сорбированные нековалентно [93]. Незначительный рост подвижности с увеличением

концентрации PEG, вероятно, объясняется увеличением количества адсорбированных молекул и, соответственно, увеличением отрицательного заряда на частицах. Поскольку в молекуле HS-PEG-COOH содержится всего одна отрицательно заряженная группа, то заряд и подвижность наночастиц увеличивались постепенно.

Поскольку понятно, что тиол-содержащие соединения уменьшают электрофоретическую подвижность ассоциатов НЧЗ-НК, далее было исследовано влияние инкубации НЧЗ-НК в желатине на подвижность и стабильность ассоциатов НЧЗ-НК. Желатин - это смесь высокомолекулярных белков, входящих в состав коллагена, которую получают путем кипячения шкуры, костей, сухожилий свиней (тип А) и коров (тип В), причем тип А получают из тканей, обработанных кислотой, а тип В – известью. Его используют, в частности, при синтезе НЧЗ как восстановитель и стабилизатор [357]. Эти белки могут образовывать ковалентные связи с НЧЗ за счет остатков цистеина. После инкубации НЧЗ и их ассоциатов с НК в растворах желатина электрофоретическая подвижность значительно падает (сравните дорожки 6-9 и дорожку 4, рис. 41). Заметим, что в случае желатина типа А заряд ассоциатов меняется с отрицательного на положительный (дорожки 6, 7, рис. 41). Все образцы НЧЗ остаются стабильными.

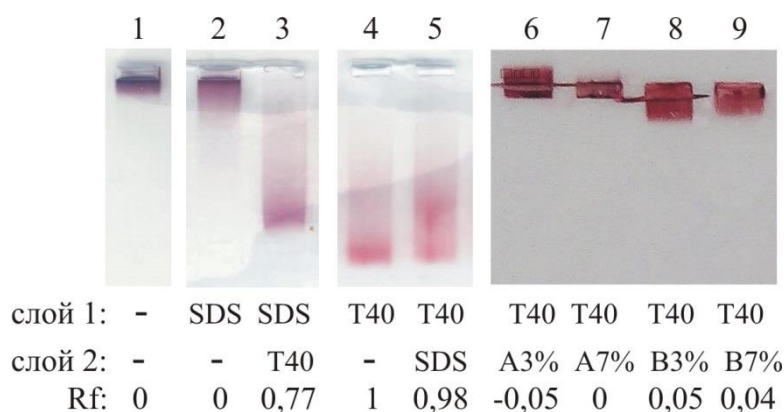


Рисунок 41. Электрофоретическая подвижность ассоциатов НЧЗ с олигонуклеотидом Т40 и/или с одним из следующих реагентов: 3,5 mM SDS, 3 или 7 % раствор желатина типа А, 3 или 7 % раствор желатина типа В.

Для сравнения связывания НК с НЧЗ в конкуренции с соединениями, содержащими тиогруппу, использовали SDS как соединение без тиогруппы, способное только к нековалентной адсорбции на поверхности НЧЗ. Молекулы SDS при адсорбции на поверхности НЧЗ приводили к частичному слипанию НЧЗ (появление пурпурного цвета в дорожке 2, рис. 41). Последующая адсорбция НК вызвала резкое увеличение подвижности ассоциатов, по-прежнему частично слипшихся, до $R_f = 0,77$. Это, по всей видимости, свидетельствовало о частичном вытеснении молекул SDS с поверхности НЧЗ молекулами НК (дорожка 3, рис. 41). Последовательная адсорбция в обратном порядке приводила к образованию дисперсных ассоциатов с разной подвижностью, в том числе с максимальной

(последняя представлена в дорожке 5, рис. 41). Это явление можно объяснить соадсорбцией молекул SDS (возможно, вторым слоем, «слой-за-слоем») без вытеснения уже сорбированных молекул НК, приводящей к увеличению размера НЧЗ и, следовательно, к замедлению в геле.

На основании визуального и количественного анализа результатов электрофореза ассоциатов НЧЗ с НК и другими биомолекулами в агарозном геле были сделаны следующие выводы:

1. оптимальные условия получения нековалентных ассоциатов НЧЗ с оцНК – это 30-минутная инкубация при 56 °С;
2. в описанных условиях получения ассоциатов и проведения ЭФ максимальная подвижность ассоциатов НЧЗ-НК не зависит от длины и состава НК;
3. в силу малого размера ассоциатов НЧЗ с НК именно суммарный заряд, приобретаемый НЧЗ в составе ассоциата, определяет их подвижность в геле;
4. можно симитировать кривую насыщения НЧЗ длинным НК, используя более короткие НК в количестве, пропорциональном соответствующему изменению длины по сравнению с более длинными НК при одинаковой нуклеотидной последовательности;
5. в изучаемых условиях наибольшей аффинностью к НЧЗ среди азотистых оснований обладают тимин и аденин, наименьшей – цитозин;
6. была получена концентрационная зависимость НК к НЧЗ путем анализа ассоциатов НЧЗ-НК в 0,8 % агарозном геле;
7. нуклеотидный слой на поверхности НЧЗ, полученный при нековалентной адсорбции НК, устойчив к воздействию других нековалентно связывающихся с НЧЗ соединений;
8. при последовательной инкубации НЧЗ с НК и тиолсодержащими соединениями НЧЗ приобретают подвижность, характерную для соответствующих ассоциатов с тиолсодержащими веществами без НК.

Вопрос о степени вытеснения НК с поверхности НЧЗ под действием тиолсодержащих молекул и вопрос о степени сродства различных НК к НЧЗ не может быть решен только путем анализа электрофоретической подвижности получаемых ассоциатов. Для расчета степеней связывания НК в различных условиях инкубации необходимо перейти к количественным методам анализа. Результаты количественного анализа связывания НЧЗ с НК представлены в следующей главе.

4.2 Расчетные оценки нековалентного связывания НК с НЧЗ

Вторая часть работы была направлена на количественный анализ связывания НЧЗ с радиоактивно меченными олигонуклеотидами для сравнения аффинности к НЧЗ олигонуклеотидов, отличающих по длине и нуклеотидному составу, а также для оценки прочности получаемого нековалентного олигонуклеотидного покрытия в условиях связывания НЧЗ с другими биомолекулами. Работа состояла из следующих этапов:

- анализ кривых связывания и оценка значений констант диссоциации при образовании ассоциатов НЧЗ-НК;
- анализ кривых насыщения, оценка предельных значений покрытия НЧЗ молекулами НК, оценка значений констант Лэнгмюра;
- оценка степени вытеснения адсорбированных молекул НК при последующей адсорбции разнообразных биомолекул;
- изучение возможности высвобождения ДНК из ассоциатов НЧЗ-ДНК в условиях, имитирующих внутриклеточное пространство или кровяное русло.

4.2.1. Оценка равновесного состояния системы

В первую очередь, была изучена кинетика связывания НЧЗ с олигонуклеотидами Т26 и Т40 при 56 °С. Связывание провели при концентрации НЧЗ, равной 0,1 мкМ. Данные, приведенные на рисунке 42 А, позволяют утверждать, что после 30 мин инкубации при 56 °С смесь НЧЗ и НК находится в равновесии. Далее исследовали насыщение НЧЗ молекулами Т26 после инкубации в разных условиях: 30 мин при 56 °С и 22 ч при 25 °С. Как видно из рисунка 42 Б, и в первых, и во вторых условиях достигается одинаковый уровень покрытия поверхности НЧЗ молекулами НК.

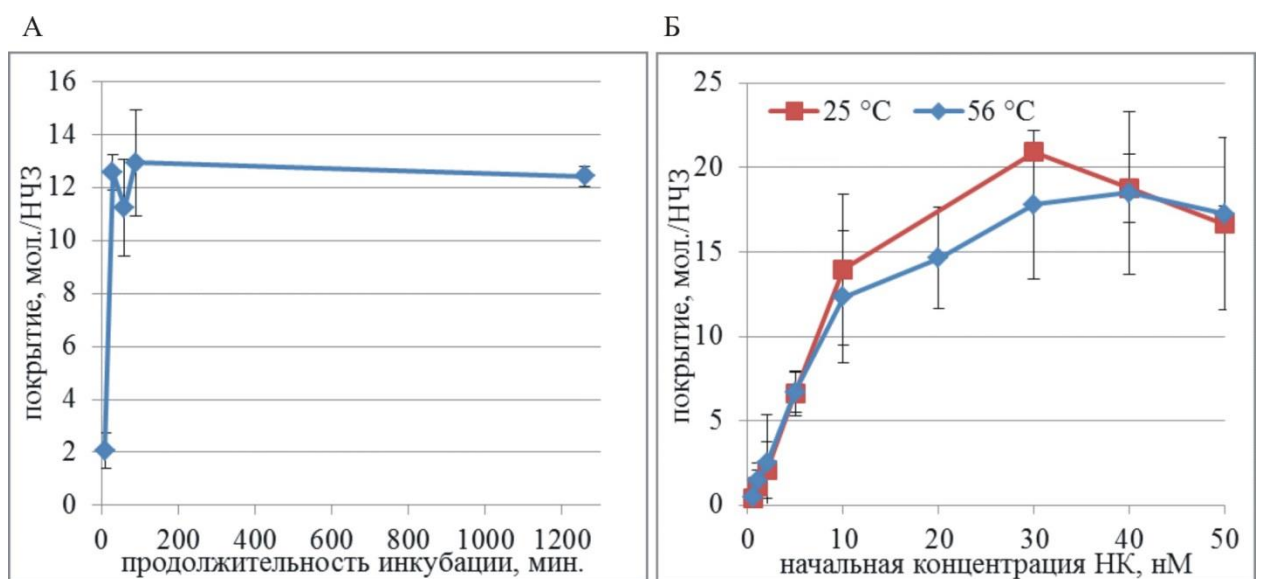


Рисунок 42. Оценка равновесного состояния системы НЧЗ-НК: А – кинетика связывания НЧЗ с Т40, Б - кривые насыщения после инкубации НЧЗ с Т26 30 мин при 25°С (красный) и 22 ч при 56 °С (синий).

4.2.2. Расчет констант связывания модельных НК с НЧЗ

Из результатов электрофоретического анализа концентрации насыщения олигонуклеотидов при связывании с НЧЗ, представленных в главе 4.1, следует, что целый ряд 26-звенных олигонуклеотидов разной последовательности характеризовался одинаковой концентрацией насыщения, равной 6 мкМ. Единственным исключением был олигоцитидилат С26, концентрация насыщения которого составила 8 мкМ. Также наблюдали высокие концентрации насыщения для коротких НК (Т6) и низкие для длинных НК (Т40). Однако оставался вопрос, есть ли достоверная связь между концентрацией насыщения и аффинностью олигонуклеотидов к НЧЗ. Связывание НЧЗ и НК проводили в диапазоне высоких концентраций ($c(\text{НЧЗ}) = 0,1$ мкМ, $c(\text{НК}) = 0,4 - 10$ мкМ) и анализировали электрофорезом, далее для ответа на этот вопрос были определены равновесные константы диссоциации для ряда олигонуклеотидов при фиксированной низкой концентрации олигонуклеотида и возрастающих концентраций НЧЗ ($c(\text{НК}) = 0,05 - 2$ нМ, $c(\text{НЧЗ}) = 0,05 - 20$ нМ, т.е. концентрация НК была на два порядка меньше, чем для электрофоретического анализа). НЧЗ и НК инкубировали в водном растворе при 56 °С в течение 30 мин. Такие условия эксперимента были выбраны для того, чтобы только одна молекула олигонуклеотида могла взаимодействовать с одной НЧЗ и можно было избежать взаимодействия молекул НК на поверхности НЧЗ между собой. Эта методика аналогична той, которая применяется для исследования взаимодействий между НК и белками [358], когда НК в низкой концентрации титруется белком с возрастающей концентрацией для определения термодинамической константы диссоциации комплекса. Было сделано предположение, что значения K_D , полученные таким способом согласно уравнению (6), обеспечивают наиболее корректное сравнение степени сродства различных НК к НЧЗ:

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_D + X}, \quad (6)$$

где X – начальная концентрация радиоактивно меченного олигонуклеотида, Y – доля олигонуклеотида в связанном состоянии, $B_{\max}$ – максимальная доля связанного олигонуклеотида, K_D – термодинамическая константа диссоциации.

Значения K_D хорошо коррелировали со значениями концентрации насыщения, за исключением Т6, для которого значение K_D составило $0,10 \pm 0,04$ нМ, что противоречит высокой пороговой концентрации (26 мкМ) (таблица 12). Это несоответствие объясняется необходимостью для НЧЗ приобрести отрицательный заряд не меньше некоего значения, чтобы достичь максимальной электрофоретической подвижности, поэтому концентрация насыщения коротких НК в несколько раз выше, чем у длинных, однако неизвестно, связано ли различие в концентрациях насыщения с различием в сродстве НК разной длины.

Несмотря на это ограничение, значение концентрации насыщения может быть использовано для грубого, но быстрого сравнения сродства разных НК одинаковой длины.

Таблица 12. Равновесные константы диссоциации (K_D) и концентрации насыщения для ассоциатов НЧЗ-НК.

НК	K_D , нМ	Концентрация насыщения, мкМ
T6	$0,10 \pm 0,04$	>10
T26	$1,8 \pm 0,3$	6
A26	6 ± 1	6
C26	18 ± 3	8
N26	2 ± 1	6
T40	$0,17 \pm 0,03$	4

Низкие значения K_D наблюдались для T6 и T40, а для T26 значение K_D было выше (таблица 12). Уменьшение K_D для более длинных НК может быть следствием более низкой скорости диссоциации НК из-за большего числа контактов с поверхностью наночастицы [254]. В такой трактовке низкое значение K_D , полученное для T6, представляется необъяснимым. Однако его можно объяснить, анализируя значения ζ -потенциала и гидродинамического диаметра, полученные методом DLS (рис. 43 А). На примере T6, T26, T40 и политимидилата было показано возрастание гидродинамического диаметра с увеличением длины НК с 6 до 300 нт.

Различие в гидродинамическом диаметре между НЧЗ-T6 и НЧЗ-T40 составило 8 нм, и можно предположить, что эти олигонуклеотиды взаимодействуют с НЧЗ по-разному (рис. 43 Б). Возможно, некоторая часть молекулы T26 напрямую не контактирует с поверхностью НЧЗ, образуя нависание или петлю (петли) рядом с поверхностью НЧЗ. Незначительное различие гидродинамического диаметра между НЧЗ-T26 и НЧЗ-T40 (2 нм) может означать, что у T26 и T40 размеры петель/нависаний близки. Следовательно, часть молекулы T40, напрямую контактирующая с поверхностью НЧЗ, должна быть больше, чем у T26, отсюда следует и меньшее значение K_D для T40. Политимидилат может формировать очень большие петли/нависания, приводящие к самому большому гидродинамическому диаметру среди изученных ассоциатов ДНК с НЧЗ, равному 48 нм. Существование больших нависаний или петель может быть подтверждено электрофоретическим анализом, представленным на рисунке 43 В. Полосы, содержащие ассоциаты НЧЗ-полиТ, характеризуются замедленной подвижностью в геле по сравнению со всеми другими рассмотренными ассоциатами НЧЗ-НК из-за большой длины полиТ (300-500 нт.) и очень диффузные, возможно, из-за гетерогенности этих ассоциатов.

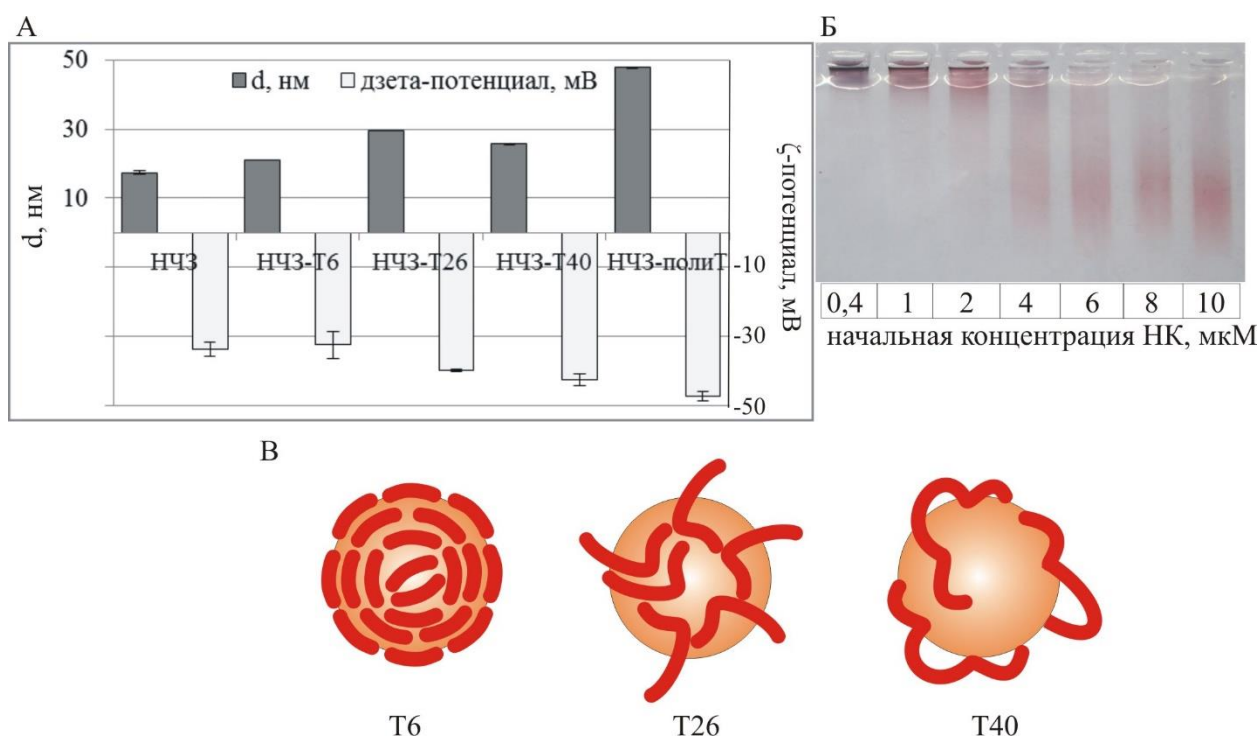


Рисунок 43. Размерные характеристики ассоциатов НЧЗс олигоТ: А - гидродинамический диаметр и ζ -потенциал ассоциатов НЧЗ-НК, Б –предполагаемая модель адсорбции олигонуклеотидов разной длины, предложенная П.Е. Воробьевым, В –анализ подвижности ассоциатов НЧЗ-полиТ электрофорезом в 0,8 % агарозном геле. (концентрация полиТ указана в пересчете на Т26).

НЧЗ-Т6 обладали ζ -потенциалом, близким с исходными НЧЗ, покрытыми цитратом натрия, следовательно, при замещении цитрата олигонуклеотидом отрицательный заряд НЧЗ практически не менялся. Более длинные НК значительно увеличивали отрицательный ζ -потенциал НЧЗ. В то же время значения ζ -потенциала НЧЗ-Т40 и НЧЗ-Т26 были очень близки, то есть при адсорбции Т40 и Т26 вытеснялось практически одинаковое количество цитрата. Дополнительный отрицательный заряд, вероятно, был связан с частью молекулы олигонуклеотида, образовавшей нависание/петлю и не взаимодействовавшей с поверхностью НЧЗ (рис. 43 Б). Эта нависающая часть молекулы могла негативно влиять на аффинность всей молекулы из-за отталкивания от близко расположенных ионов цитрата или других молекул олигонуклеотида. Таким образом, короткие олигонуклеотиды, неспособные образовать нависания, могут быть более аффинными, чем длинные, если число прямых контактов с поверхностью НЧЗ отличалось незначительно. Для сравнения аффинности различных нуклеотидных последовательностей выбрали 26-меры А26, Т26 и С26 (не оценивали аффинность G26 из-за его высокой структурированности) (рис. 44 А, Б). Видно, что в этих условиях связывания нет большого различия в аффинности между 26-мерами (А26 и Т26), за исключением С26, который проявил меньшую аффинность к НЧЗ (рис. 44 А).

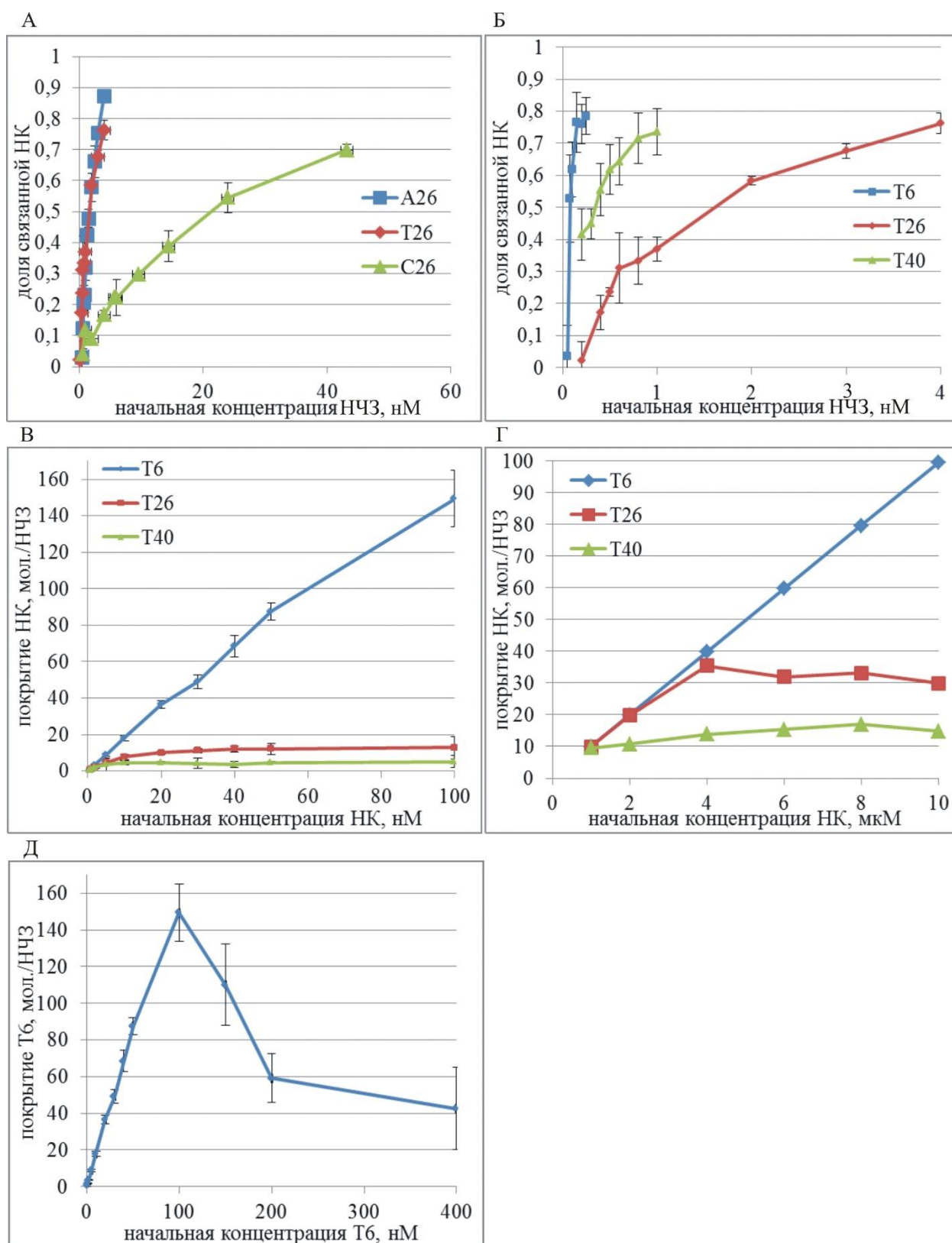


Рисунок 44. Адсорбция олигонуклеотидов на НЧЗ. А, Б - доля связанной ДНК при ее титровании наночастицами золота, $c(\text{НК}) = 0,05$ нМ. В - плотность покрытия ДНК при $c(\text{НЧЗ}) = 0,5$ нМ, молекул на одну НЧЗ, Г - плотность покрытия ДНК при $c(\text{НЧЗ}) = 0,1$ мкМ, молекул на одну НЧЗ, Д - конкурентное ингибирование связывания меченного фосфатом Т6 с НЧЗ немеченным Т6 при $c(\text{НЧЗ}) = 0,1$ мкМ.

Интересно, что значение K_D для N26, рандомизованной смеси последовательностей, полученной с помощью автоматического синтеза, очень близко к самому низкому значению

K_D для 26-меров, что указывает на то, что некоторые гетеропоследовательности могут быть более аффинны, чем «лидер» T26 (таблица 12).

4.2.3. Плотность покрытия НК на НЧЗ

Для оценки связывающей способности НК с НЧЗ также анализировали изотермы адсорбции Лэнгмюра на примере T26 и T40. НЧЗ ($5 \cdot 10^{-10}$ М) инкубировали с НК ($5 \cdot 10^{-10}$ - $5 \cdot 10^{-8}$ М) в водном растворе при 56 °С в течение 30 мин. Значение константы Лэнгмюра K составило: $0,042 \pm 0,003$ нМ⁻¹ для T26 и $0,28 \pm 0,03$ нМ⁻¹ для T40 (рис. 44 В). Эти данные коррелируют с литературными данными [254] и полученными нами значениями K_D (таблица 13), т. е. для более аффинных НК получили более высокие значения K и более низкие значения K_D . Из данных кривых насыщения были рассчитаны предельно достижимые значения поверхностной плотности НК на НЧЗ (таблица 13).

Таблица 13. Плотность покрытия НЧЗ олигонуклеотидами в составе ассоциатов.

НК	покрытие, мол./НЧЗ	$c(\text{НЧЗ}), \text{М}$
T6	$87,6 \pm 4,8$	$5 \cdot 10^{-10}$
T26	$12,3 \pm 1,7$	$5 \cdot 10^{-10}$
T40	$5,1 \pm 0,4$	$5 \cdot 10^{-10}$
T6	99,4	$1 \cdot 10^{-7}$
T26	$31,7 \pm 1,7$	$1 \cdot 10^{-7}$
T40	$15,0 \pm 0,8$	$1 \cdot 10^{-7}$

Значения константы Лэнгмюра также оценили для разных условий связывания НЧЗ с T26: в течение 30 мин при 56 °С и в течение 24 ч при 56 °С. Полученные значения были практически одинаковы между собой, что дополнительно подтверждает установление термодинамического равновесия в системе после получасовой инкубации при 56 °С.

4.2.4. Режимы связывания НЧЗ и НК

При определении поверхностной плотности НК на НЧЗ в диапазоне высоких концентраций было сделано интересное наблюдение. Рисунок 44 Г демонстрирует существенное увеличение покрытия НЧЗ для всех НК по сравнению со связыванием в диапазоне низких концентраций (рис. 44 В). Поверхностная плотность увеличилась на 100 % для T26 и T40 и на 20 % для T6. Предположительно такое резкое изменение в условиях связывания (два порядка в концентрациях основных компонентов) могло влиять на режим связывания. В диапазоне низких концентраций олигонуклеотиды, вероятно, взаимодействовали с НЧЗ более длинными участками. Сдвиг к высоким концентрациям мог уменьшить эти участки до некоего минимума, менее чем 6 нт. Было показано, что только три нуклеотида были вовлечены в связывание олигоаденилатов с НЧЗ при высоких

концентрациях [230], а при низких концентрациях участок полиА длиной 60-80 нт. оборачивался вокруг НЧЗ [228]. Это обстоятельство однозначно влияет на аффинность олигонуклеотидов к НЧЗ. Константы Лэнгмюра, полученные при высоких концентрациях НЧЗ и НК, были равны 0,46 и 0,60 мкМ⁻¹ для Т26 и Т40 соответственно. Существенное различие между значениями К, полученными при разных концентрациях НЧЗ, показывает, что в этом концентрационном диапазоне модель Лэнгмюра, возможно, неприменима из-за заметного взаимодействия олигонуклеотидов на поверхности НЧЗ. Другие модели были бы более приемлемы, но для решения этой задачи требуется больше данных.

Кривая адсорбции Т6 не аппроксимировалась уравнением изотермы Лэнгмюра, вероятно, из-за большого различия в аффинности меченного и немеченого гексануклеотидов. Немеченый Т6 содержал только пять межнуклеотидных отрицательных зарядов на фосфатных группах, поэтому добавление двух дополнительных отрицательных зарядов на терминальном фосфате могло сильно снизить его силу связывания из-за электростатического отталкивания. Следовательно, при фиксированной концентрации [³²P]-меченного Т6 возрастающая концентрация немеченого Т6 могла ингибировать адсорбцию меченного Т6 в большой степени. Это может быть причиной значительного уменьшения связывания при высоких концентрациях Т6. Тем не менее, при высоких концентрациях Т6 наблюдали большое количество связанного Т6 (до 200 мол./НЧЗ) до начала ингибирования связывания (рис. 44 Д).

4.2.5. Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами

Устойчивость ассоциатов НЧЗ-НК к действию NaCl и к вытеснению белками, высоко- и низкомолекулярными тиолами исследовали в диапазоне как высоких, так и низких концентраций НЧЗ и НК, применяя электрофоретический анализ и измерение интенсивности Черенковского свечения.

Ассоциаты НЧЗ-ДНК были устойчивее в растворах с высокой ионной силой, чем цитратные НЧЗ, немедленно слипавшиеся после добавления 5 мМ NaCl (рис. 45 А). Ассоциаты НЧЗ-олигоТ сохраняли свой цвет даже в 100 мМ NaCl, что указывает на отсутствие слипания НЧЗ. Более высокие концентрации NaCl вели к быстрому слипанию НЧЗ, хотя ассоциаты НЧЗ-Т6 короткое время сохраняли свою стабильность в 200 мМ NaCl, что, вероятно, было результатом более высокой аффинности Т6 и более плотного покрытия НК на НЧЗ в случае Т6.

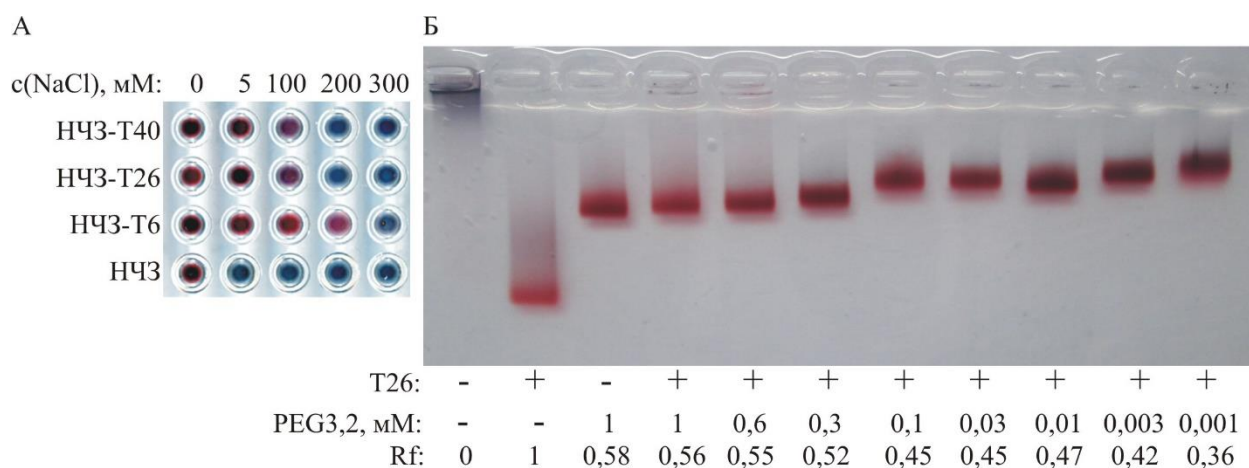


Рисунок 45. Устойчивость ассоциатов НЧЗ-олигоТ: А - сканированное изображение планшета после солевого теста НЧЗ и их ассоциатов с олигонуклеотидами Т6, Т26, Т40 в присутствии NaCl в концентрации 0, 5, 100, 200, 300 mM, Б - ассоциаты НЧЗ с олигонуклеотидом Т26 и/или HS-PEG-COOH 3,2 кДа (обозначен как PEG3,2); Rf – относительная подвижность ассоциатов НЧЗ в геле.

Известно, что различные тиол-содержащие соединения препятствуют нековалентному связыванию других молекул с поверхностью НЧЗ. В наших экспериментах большая часть адсорбированной ДНК вытеснялась с поверхности НЧЗ 25 мкМ раствором TGA. Наблюдалась связь между долей вытесненной ДНК и значениями K_D ассоциатов НЧЗ-ДНК. Т6, обладавший наименьшим значением K_D , не вытеснялся полностью с поверхности НЧЗ в этих условиях, Т26 с наибольшим значением K_D полностью десорбировался за 1 ч, Т40 с промежуточным значением K_D вытеснялся медленнее, чем Т26 (таблица 14). Схожая низкомолекулярная тиокислота MUA, реагент для стабилизации НЧЗ [359], также очень эффективно вытесняла НК с поверхности НЧЗ. Т26 полностью вытеснялся с поверхности НЧЗ за 30 мин инкубации в 0,1 mM MUA при 56 °С. Скорость вытеснения Т40 под действием MUA и TGA была ниже (таблица 14).

HS-PEG-COOH частично вытеснял ДНК с поверхности НЧЗ. Изменение электрофоретической подвижности ассоциатов после короткой инкубации (1,5 ч) с HS-PEG-COOH 3,2 или 4,9 кДа ясно указывало на наличие взаимодействия между НЧЗ и HS-PEG-COOH (рис. 45 Б). Гидродинамический диаметр покрытых HS-PEG-COOH ассоциатов составил 62 ± 6 нм, и этого было достаточно, чтобы уменьшить подвижность НЧЗ в 0,8 % агарозном геле. HS-PEG-COOH в концентрации 0,001 – 0,1 mM вытеснял 10 ± 2 % адсорбированного Т26 и 17 ± 2 % Т40 с НЧЗ. Существенное вытеснение (до 40 %) достигалось после 16 ч инкубации с 1 mM HS-PEG-COOH (таблица 14). Тот факт, что адсорбция HS-PEG-COOH изменяла подвижность ассоциатов даже при небольшой доле вытеснения НК, подтверждает грибообразное связывание HS-PEG-COOH с НЧЗ [93], когда части его молекулы образуют вторичную оболочку вокруг олигонуклеотидного слоя. Частичное вытеснение нековалентно связанных НК ковалентно связывающимися тиолами

может объясняться неоднородностью поверхности НЧЗ, которая состоит из граней (111) и (100) в соотношении 66:34 [360]. Разные соединения реагируют по-разному с разными гранями НЧЗ [34]. Была показана соадсорбция тиолов с другими соединениями для грани (111) [29]. Дополнительный эксперимент по вытеснению Т40 из состава двухслойных ассоциатов НЧЗ-Т40-BSA под действием TGA показал, что слой альбумина защищает олигонуклеотидный слой от полного вытеснения: лишь 33 % адсорбированного Т40 было вытеснено с поверхности НЧЗ за 16 ч инкубации (таблица 14).

Таблица 14. Вытеснение олигонуклеотидного покрытия из состава ассоциатов с НЧЗ после инкубации в течение 16 ч при 25 ° С в растворах тиол-содержащих соединений.

ассоциат	вытесняющий агент	% вытесненной НК
НЧЗ-Т26	HS-PEG-COOH	10 ± 2
НЧЗ-Т40	HS-PEG-COOH	17 ± 2
НЧЗ-Т6	HSA, BSA	10 ± 3
НЧЗ-Т26	HSA, BSA	20 ± 5
НЧЗ-Т40	HSA, BSA	40 ± 2
НЧЗ-Т26	Глутатион	21 ± 5
НЧЗ-Т40	Глутатион	14 ± 4
НЧЗ-Т6	TGA	75 ± 5
НЧЗ-Т26	TGA	94 ± 4
НЧЗ-Т40	TGA	95 ± 3
НЧЗ-Т40-BSA	TGA	33 ± 4
НЧЗ-Т26	MUA	95 ± 5
НЧЗ-Т40	MUA	70 ± 9
НЧЗ-Т26	DTT	98 ± 1
НЧЗ-Т40	DTT	99 ± 2

Еще одной задачей было имитирование условий внутри клетки или кровяного русла для оценки возможности высвобождения ДНК в соответствующих условиях, адсорбированной на НЧЗ. Для этого выбрали одни из самых распространенных низко- и высокомолекулярных тиол-содержащих внутриклеточных белков – глутатион и сывороточные альбумины (HSA и BSA) [361]. Ассоциаты НЧЗ-Т40 инкубировали в присутствии глутатиона (1 мМ) или сывороточных альбуминов (с(HSA)=1 мМ, с(BSA)=1 мкМ) при 25 ° С в течение 30 мин - 22 ч. Было обнаружено, что раствор глутатиона вытеснял лишь 18 % адсорбированного Т26 за 30 мин инкубации и 25 % за 16 ч, при этом вытеснял не более 14 % Т40 и за 30 мин, и за 16 ч инкубации (таблица 14).

Далее провели изучение связывания флуоресцентно меченного HSA с НЧЗ и ассоциатами НЧЗ-ДНК. Оценка предельных значений связывания показала, что больше всего молекул HSA адсорбировалось на НЧЗ в отсутствие НК – 22,7 молекул на одну НЧЗ, 10,5 молекул связывалось с ассоциатами НЧЗ-T26 и только 3,0 молекулы - с ассоциатами НЧЗ-T6. При этом не наблюдали различий в связывании после 1 и 16 ч инкубации с HSA. Эти результаты подтверждают предположение, что T6 покрывает поверхность НЧЗ более плотно, чем T26. Процесс связывания HSA или BSA с частицами сопровождается вытеснением части адсорбированного олигонуклеотида. Меньшая доля (10 % от адсорбированного) вытесняется в случае T6, несколько больше (20 %) – в случае T26. В более позднем эксперименте не выявили различия между HSA и BSA, которые вытесняли одинаковую долю связанных олигонуклеотидов. T40 вытеснялся альбуминами более эффективно, чем другие олигонуклеотиды (до 40 %), возможно, из-за более высокого стерических затруднений между нависаниями олигонуклеотида и молекулами белка. Анализ степени вытеснения T6 и T26 после длительного периода инкубации ассоциатов с BSA показал, что только 11,7 % адсорбированного T6 и 20 % T26 вытеснялось после инкубации с BSA в течение 11 дней.

Для моделирования внутриклеточного пространства использовали растворы желатина типа А и Б различной концентрации (3 и 6 %) вследствие их вязкости. После проведения инкубации ассоциатов НЧЗ с НК (НЧЗ-T40) в растворах желатина было продемонстрировано, что желатин практически не влияет на олигонуклеотидный слой, вытесняя максимум 2,5 % олигонуклеотидного покрытия за сутки.

Используя полученные данные об устойчивости олигонуклеотидного слоя к вытеснению тиолсодержащими соединениями, отработали методику получения многослойных ассоциатов НЧЗ, содержащих олигонуклеотиды, альбумины, полиэтиленгликоль и полиэтиленмин вплоть до пяти слоев (рис. 46 А). Сохранение олигонуклеотидного покрытия качественно подтверждали с использованием радиоактивно меченных олигонуклеотидов (рис. 46 Б). Все этапы сборки контролировали с использованием ПЭМ (рис. 46 В).

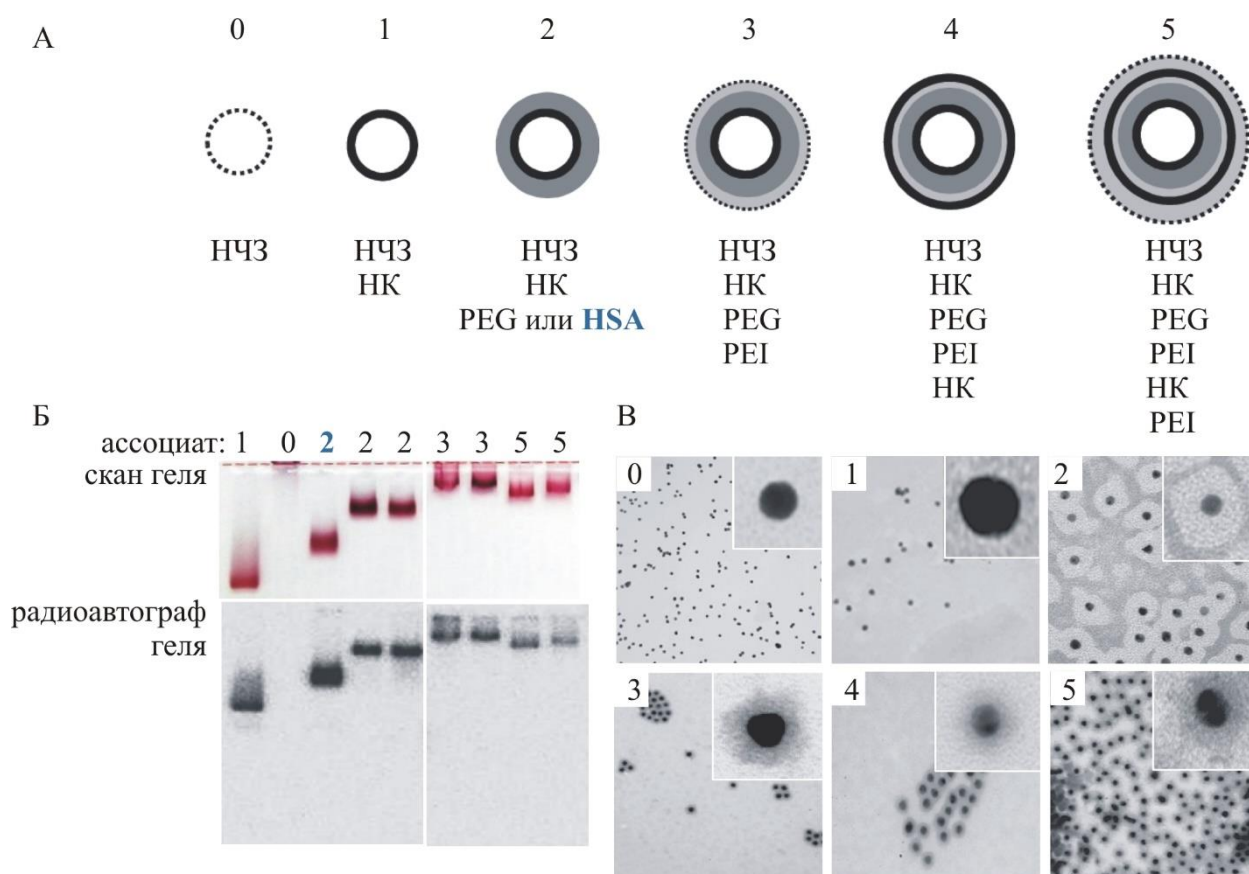


Рисунок 46. Многослойные ассоциаты НЧЗ и НК с HSA, HS-PEG-COOH (обозначен как PEG), PEI. А – схема сборки многослойных ассоциатов, Б – анализ подвижности многослойных ассоциатов электрофорезом в 0,8 % агарозном геле, В – контроль образования слоев ассоциатов с помощью ПЭМ.

По результатам исследования связывания радиоактивно меченных олигонуклеотидов с НЧЗ можно сделать следующие заключения:

- инкубация смеси свежеприготовленных НЧЗ с НК в течение 30 мин при 56 °С без какого-ли изменения состава коллоида НЧЗ приводит к равновесию процесса нековалентного связывания НЧЗ и НК;
- предложенный метод адсорбции НК обеспечивает высокую стабильность олигонуклеотидного покрытия на НЧЗ и контролируемую загрузку НК на поверхность НЧЗ в зависимости от длины и последовательности НК;
- олигоА и олигоТ обладают схожей аффинностью к НЧЗ в низкосолевых условиях связывания, в то время как олигоС проявляет значительно меньшую аффинность;
- концентрация НЧЗ и НК при инкубации влияет на режим их связывания: более высокие концентрации НЧЗ и НК увеличивают загрузку НЧЗ, но уменьшают аффинность НК;
- в условиях, имитирующих внутриклеточную среду или кровяное русло, часть загруженной на поверхность НК вытесняется с поверхности НЧЗ.

4.3 Селекция *in vitro* олигонуклеотидов, высокоаффинных к НЧЗ

Цель третьего этапа работы - получение наиболее аффинных к НЧЗ ДНК-последовательностей методом селекции *in vitro*. Данное исследование позволит ответить на вопросы: 1) существуют ли гетеропоследовательности, обладающие более высокой аффинностью к поверхности золота, чем олиго Т и олигоА; 2) последовательность или вторичная структура в большей степени отвечает за высокую аффинность олигонуклеотидов к НЧЗ?

Для этого были выполнены следующие эксперименты:

- была проведена селекция синтетической ДНК-библиотеки L0 с 26-звенной рандомной областью, фланкированной двумя 20-звенными праймерными участками для последующей амплификации, к НЧЗ;
- на каждом этапе селекции был проведен анализ связывания обогащенных библиотек с НЧЗ методом электрофореза в агарозном геле с получением концентрационных профилей связывания;
- исходный пул и несколько обогащенных пулов были подвергнуты высокопроизводительному секвенированию и анализу²;
- результаты анализа секвенирования были верифицированы путем оценки констант связывания и исследования кинетики связывания для ряда олигонуклеотидов.

4.3.1. Условия селекции

Как было показано в предыдущих главах, оптимальными условиями для связывания НЧЗ и НК является инкубация в течение 30 мин при 56 °С. Инкубацию НЧЗ с библиотекой во всех раундах селекции осуществляли при 25 °С. Матрицей для селекции служила 66-звенная синтетическая ДНК-библиотека, содержащая 26-звенный центральный рандомизованный фрагмент и два 20-звенных фланкирующих фрагмента, служащих для последующей амплификации библиотеки методом ПЦР. Связывание НЧЗ с ДНК в процессе селекции намеренно проводили при неоптимальных условиях, которые не обеспечивают максимальное связывание молекул ДНК с поверхностью золота, чтобы создать конкуренцию, необходимую для эффективного отбора высокоаффинных последовательностей. Также для ужесточения селекции применили следующие приемы: стабилизацию НЧЗ с помощью полиА перед раундом селекции, селекцию с промежуточной амплификацией, селекцию с выделением ассоциатов НЧЗ и наиболее аффинных олигонуклеотидов методом гель-электрофореза (вариация EMSA-SELEX), контрселекцию к наночастицам серебра (НЧС). При этом стабилизацию НЧЗ с помощью полиА проводили

² Анализ результатов NGS-секвенирования выполнен А.А. Ломзовым, П.Е. Воробьевым, Д.В. Пышным, М.Р. Кабиловым

на ранних этапах селекции (во втором и третьем раунде), электрофоретическое разделение применили на третьем и четвертом раундах, промежуточную амплификацию и контрселекцию к НЧЗ провели на последнем, четвертом раунде селекции (рис. 47). В качестве удобного экспресс-метода анализа эффективности селекции проводили электрофоретическое разделение в агарозе ассоциатов НЧЗ с библиотеками, полученными на разных этапах отбора.

4.3.2. Электрофоретический анализ путей селекции

Рассмотрим ветку селекции, проведенной по стандартной схеме (L0-N1^S-L2^S-L4^S-N3^S) (рис. 47, серая стрелка).

Молярное соотношение НК:НЧЗ в первом раунде было равно 79:1, что способствовало жесткой конкуренции среди НК из исходного пула при связывании. После амплификации выделили 600 пмоль библиотеки. С учетом продолжительности ПЦР (23 цикла) и средней эффективности амплификации (70 %) можно оценить количество библиотеки, выделенной с НЧЗ после раунда, как равное 0,12 пмоль, что составило 0,03 % от исходного количества библиотеки, равного 4320 пмоль.

Во всех последующих раундах селекции, проводившихся по стандартной схеме, а также с использованием polyA, молярное соотношение НК:НЧЗ составляло 10:1. Смягчение этого параметра отбора было целесообразно, так как значительное число неспецифических последовательностей (99,997%) отсеяли в первом раунде.

Электрофоретический анализ связывания позволил сделать следующий вывод: существенное улучшение связывания произошло после первого и второго раундов (сравните L0 и N1^S, рис. 47), а также заметно улучшение после третьего раунда (сравните N1^S с L2^S и L1^A, рис. 46), однако четвертый раунд не изменил способность к связыванию (сравните L2^S и L4^S, рис. 47). Следовательно, для последующей селекции требовалось изменение условий. Предварительная обработка НЧЗ polyA при последующей инкубации с библиотекой уменьшила число свободных сайтов связывания на поверхности НЧЗ и создала дополнительную конкуренцию не только с другими олигонуклеотидами, но и с молекулами polyA. Электрофоретический анализ показал, что введение этой стадии в схему селекции было результативнее в третьем раунде, чем во втором (сравните L3^A и N4^S), т.е., путь стандарт→ стандарт→polyA (L0- N1^S-L2^S-L3^A (желтая стрелка, рис. 47) был предпочтительнее, чем стандарт→polyA→ стандарт (L0-N1^S-L1^A-N4^S, оранжевая стрелка, рис. 47). Предварительный анализ показал, что присутствие polyA не повлияло на последующую амплификацию библиотеки с помощью ПЦР (первичные данные не приведены).

Цель промежуточной ПЦР с ассоциатами НЧЗ-НК – ужесточение селекции за счет конкурентного связывания НК не только с НЧЗ, но и с праймерами и комплементарной цепью в температурном цикле ПЦР. Последующий электрофоретический анализ не выявил усиления связывания ($N3^S$ и $L7^{PCR}$, рис. 47), следовательно, ассоциаты не диссоциировали в условиях ПЦР и дополнительного обогащения не происходило.

Раунд селекции к НЧС с библиотекой $L4^S$ провели в качестве отрицательного контроля селекции с получением двух фракций НК: связывающихся и с НЧС, и с НЧЗ (Au+Ag) и связывающихся только с НЧЗ (Au-Ag). Как и ожидалось, связывание с НЧЗ фракции Au+Ag было хуже, чем фракции Au-Ag. Электрофоретический анализ для пула Au-Ag существенно не отличался от исходного (первичные данные не приведены). Можно предположить, что существует различие в селективности последовательностей ДНК при связывании с НЧЗ и НЧС, что может быть предметом дальнейшего исследования.

При анализе вида «кривых насыщения», полученных электрофоретическим разделением ассоциатов НЧЗ-НК, был сделан вывод, что при достижении пороговой концентрации НК к наиболее подвижным НЧЗ присоединены самые аффинные НК. Две библиотеки $L1^A$ и $L3^A$, обладающие сходной аффинностью к НЧЗ, но полученные после разного количества раундов селекции (два и три раунда соответственно), использовали как стартовые точки для раунда селекции с электрофоретическим разделением образцов.

Для $L1^A$ провели два варианта инкубации с НЧЗ: при $c(\text{НЧЗ}) = 4,35 \cdot 10^{-9}$ М и $1 \cdot 10^{-7}$ М и молярном соотношении НК:НЧЗ=20:1. Первый вариант привел к получению библиотеки $N2^E$ (сиреневая стрелка, рис. 46, а второй – $N5^E$ (голубая стрелка, рис. 47), причем для $N2^E$ наблюдалось ухудшение связывания, а для $N5^E$ – улучшение (рис. 47). Повтор шага селекции по первому варианту с получением библиотеки $L5^E$ из $N2^E$ не изменил аффинность. Таким образом, связывание в этой ветке селекции менялось следующим образом: $N5^E > L1^A > N2^E = L5^E$.

Для библиотеки $L3^A$ провели инкубацию с концентрированными НЧЗ с усилением конкуренции путем повышения молярного соотношения НК:НЧЗ до 100:1 (темно-синяя стрелка, рис. 47). Электрофоретический анализ показал существенное улучшение связывания полученной библиотеки $L6^E$ по сравнению как с исходной библиотекой $L3^A$, так и с полученной в параллельной ветке селекции библиотекой $N5^E$ (сравните пути, отмеченные сиреневой и темно-синей стрелкой, рис. 47). Отметим, что повтор шага селекции с библиотекой $L6^E$ ухудшил связывание.

Можно сделать вывод, что наиболее эффективными условиями селекции является инкубация НЧЗ в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М со стократным молярным избытком библиотеки с электрофоретическим разделением связавшейся и несвязавшейся фракций библиотек.

4.3.3. Секвенирование отобранных в результате селекции библиотек

Библиотеки L0, L4^S, L7^{PCR}, L3^A, L6^E, L1^A, L5^E, L2^S, выбранные по результатам гелевого электрофореза, подвергли высокопроизводительному секвенированию MiSeq (Illumina). Наиболее интересные пулы L0, L3, L4, L6, L7 были секвенированы с покрытием более $3 \cdot 10^5$ последовательностей, давших не менее чем $1 \cdot 10^5$ финальных уникальных последовательностей N26. Пулы L1, L2, L5 отсекали в тестовом режиме с низким покрытием. Полученные данные существенно не отличались от данных для других пулов. Также для сравнения был сгенерирован полностью случайный пул N, содержащий $1,5 \cdot 10^5$ уникальных 26-звенных последовательностей. Секвенирование было выполнено в ЦКП Геномика. Анализ результатов секвенирования, изложенный в пунктах 4.3.3.1-4.3.3.4, был проведен М.Р. Кабиловым, П.Е. Воробьевым, А.А. Ломзовым и Д.В. Пышным.

4.3.3.1. Анализа нуклеотидного состава библиотек

Было обнаружено, что исходная ДНК-библиотека и обогащенные пулы после короткой четырехраундовой селекции не содержали ни одного явного лидера-олигонуклеотида и состояли только из уникальных последовательностей, где присутствовало очень незначительное количество повторов по две-три копии. Отсутствие уникальных последовательностей привело к необходимости анализа большого числа коротких ДНК-мотивов. Эти мотивы обозначены как k-нуклеотиды (последовательности, состоящие из k нуклеотидов). Для выявления различия между сравниваемыми библиотеками применили принципиальный компонентный анализ (PCA) и анализ частот встречаемости k-нуклеотидов в библиотеках. Процент встречаемости каждого k-нуклеотида в исходной библиотеке L0 вычитали из соответствующего значения для обогащенных пулов L1-L7. Результат представлен как D^k_x , где k=1 – 6, длина k-нуклеотида в нуклеотидах, x – порядковый номер обогащенного пула.

По совокупности результатов двух методов анализа на уровне мононуклеотидов самыми очевидными тенденциями являлось обеднение dC и обогащение T. На уровне динуклеотидов происходило существенное обеднение G,C-богатых динуклеотидов (CC, CG и GC) и накопление A,T, G-богатых мотивов преимущественно в составе гетеродинуклеотидов PuPu (пиримидин-пурин) и PuPy (пурин-пиримидин) и в меньшей степени в составе динуклеотидов PuPu и PyPy во всех пулах, имевших лучшее сродство к НЧЗ, чем исходная библиотека. Динуклеотиды СТ и АС не подвергались отбору.

Разумно предположить, что существует большое число более длинных k-нуклеотидов, которые накапливались в процессе отбора благодаря сродству к НЧЗ. Для этого сравнили частоты встречаемости D^6_x для каждого гексануклеотида как процент от его содержания в исходной библиотеке L0. Большинство гексануклеотидов подвергалось

селекции, положительной или отрицательной. Наблюдалось явное накопление или обеднение наблюдалось для 829 и 872 гексануклеотидов соответственно из общего количества гексануклеотидов (4096). Абсолютный лидер по накоплению, например, для L6 - гексануклеотид ATGTTG, а по обеднению – CGCGCG. Наблюдалась выраженная кластеризация гексануклеотидов по типам более коротких последовательностей. Например, накапливались почти все гексануклеотиды, содержавшие мотивы ATG, TGT, GTA на 5'- или 3'-конце. Присутствие мотивов GCG и CGC на 5'- или 3'-конце, наоборот, уменьшало аффинность содержащих их гексануклеотидов к НЧЗ.

4.3.3.2. Частоты встречаемости гексануклеотидов и их комплементов

Данные по встречаемости гексануклеотидных последовательностей и их полных комплементов показали анти-корреляцию между содержанием конкретного гексануклеотида в пуле и соответствующим значением для комплементарного гексануклеотида. Исходная библиотека значительно отличалась от теоретической рандомной библиотеки из-за отклонений от случайности на уровне химического синтеза, ферментативного перехода к двуцепочечной форме и приготовления образцов для секвенирования. В результате селекции обогащенные пулы (например, L6) были еще более отдалены от случайности, чем исходная библиотека. Выявленная асимметрия встречаемости взаимно комплементарных последовательностей свидетельствовала о том, что исходная библиотека должна была состоять из одноцепочечных или слабо структурированных фрагментов, которые потенциально более аффинны к НЧЗ. Процесс селекции увеличил эту асимметрию. Эти данные подтвердили предположение, что слабо структурированные олигонуклеотиды более аффинны к НЧЗ, чем дцДНК или структурированная оцДНК более высокого порядка.

4.3.3.3. Анализ вариативности встречаемости k-нуклеотидов по позициям при селекции. Картирование рандомного участка библиотеки

В исходной библиотеке встречаемость каждого нуклеотида не зависела от его позиции в центральном участке. В обогащенных пулах наблюдали перераспределение нуклеотидов по 26-звенному участку. Это перераспределение было сходно для всех обогащенных пулов. Содержание G, C и A плавно уменьшалось по направлению к 3'-концу, в то время как содержание T увеличивалось в том же направлении. Важно отметить, что степень перераспределения нуклеотидов возрастала в процессе селекции.

Динуклеотиды были сгруппированы по сходному обеднению либо накоплению на различных позициях. Использование программного пакета AutoSOME позволило найти три кластера динуклеотидов (рис. 48 А). Первый кластер содержал динуклеотиды с

положительным изменением встречаемости в 5'-участке (позиции 1-10), второй – динуклеотиды с отрицательным изменением встречаемости почти во всех позициях (6-24) и третий – в 3'-участке (17-24). В 5'-участке накапливались AG, GA, AC и CA, остальные динуклеотиды почти не участвовали в отборе, за исключением TT, который уверенно обеднялся. С другой стороны, в 3'-участке накапливались динуклеотиды AT, TA, GT, TG и TT; CT и TC накапливались в меньшей степени. Динуклеотиды GC, CG и GG обеднялись по всему 26-звенному фрагменту, при этом динуклеотиды GC и CG обеднялись в еще большей степени в 3'-участке.

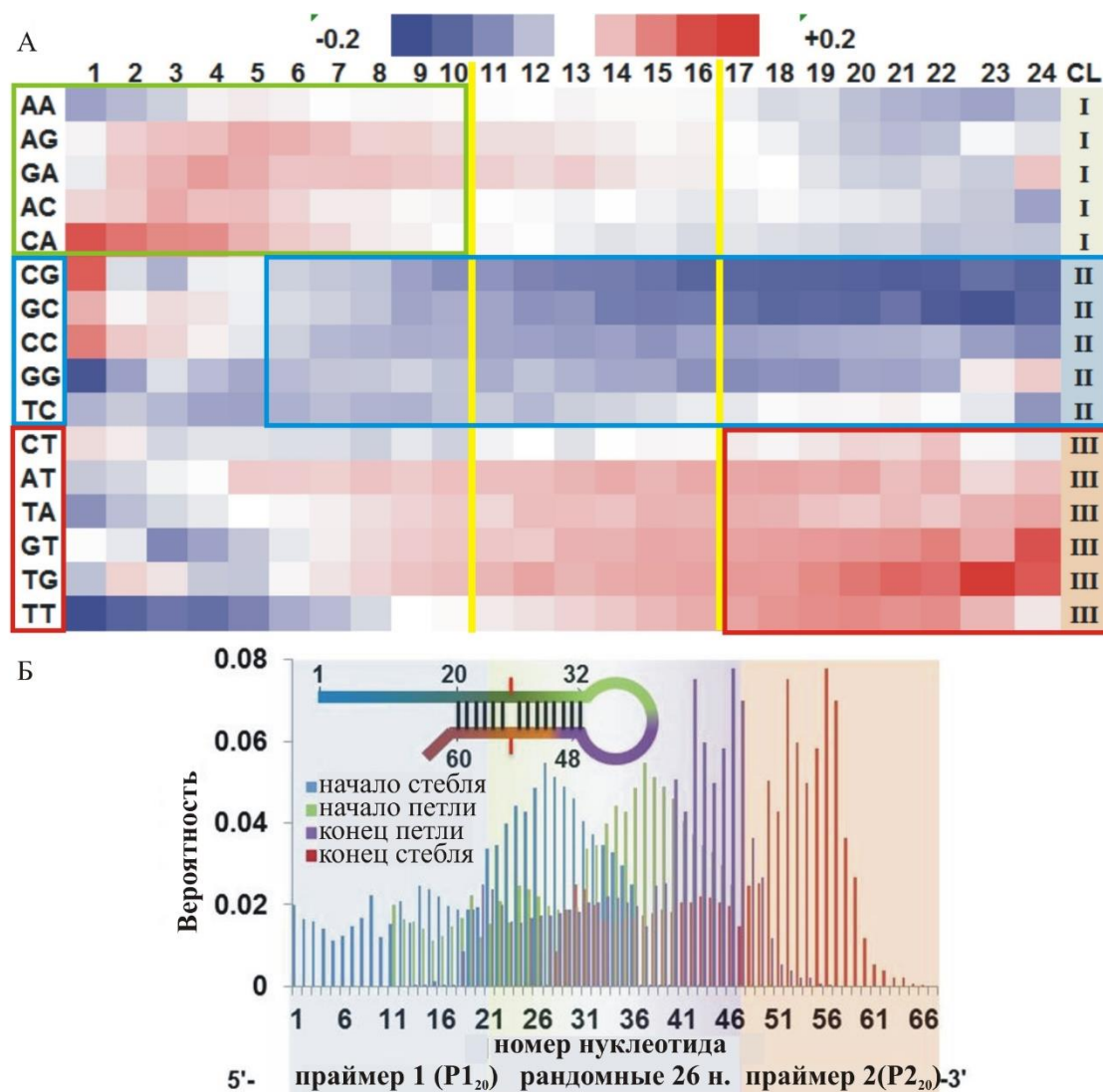


Рисунок 48. Частоты встречаемости динуклеотидов внутри 26-звенного фрагмента и их влияние на образование вторичных структур. А - отличие в частоте встречаемости всех динуклеотидов на позициях 1-24 центрального 26-звенного фрагмента пула L6 от исходного L0 после кластеризации. Границы участков обозначены желтыми линиями. Кластеры динуклеотидов I, II, III выделены рамками зеленого, синего и красного цвета соответственно. Б - Распределение вероятности для начала стебля, начала петли и конца стебля на позиции в полной 66-звенной последовательности для пула L6. В верхней части рисунка приведена усредненная шпильчатая структура.

Таким образом, наблюдали выраженную тенденцию к обогащению граничных участков случайного 26-звенного фрагмента некоторыми конкретными блоками относительно других мотивов. В то же время центральный участок 26-звенного фрагмента демонстрировал наибольшее накопление большинства динуклеотидов в процессе селекции.

В 5'- и 3'-участках наблюдали накопление последовательностей, содержащих комплементарные мотивы наподобие 5'-AC/GT-3', 5'-CA/TG-3' и, в меньшей степени, 5'-AG/CT-3' и 5'-GA/TC-3'. Центральный участок существенно обеднялся по С, сохранив значительное разнообразие последовательностей, состоящих из А, G и Т. Эти тенденции могут указывать на существование меж- или внутримолекулярных структур в ДНК-последовательности. Если принять во внимание низкую ионную силу и низкие концентрации всех компонентов, то более предпочтительными окажутся внутримолекулярные шпильчатые структуры.

4.3.3.4. Шпильчатые структуры в библиотеках и их влияние на селекцию

Чтобы проверить это утверждение, было проанализировано три ДНК-пула (исходная библиотека L0, обогащенная библиотека L6 и теоретический случайный пул N) на присутствие шпильчатых структур с использованием программного пакета Mirinho, который позволяет анализировать последовательности на присутствие идеальных и неидеальных шпилек. Константные участки библиотеки сравнимы по длине с центральным фрагментом и также могли принимать участие во внутримолекулярных взаимодействиях. Были рассчитаны шпильчатые структуры с длиной стебля до 30 п.о. и одноцепочечной петли длиной от трех до 20 нт. внутри 66-звенных последовательностей. Наиболее стабильные вторичные структуры были образованы с участием 3'-константного участка благодаря высокому содержанию нуклеотидов G, C в 3'-константном участке. Однако позиции 61-66 очень редко вовлекались в образование таких структур, поскольку этот участок является А,Т-богатым и не способен образовывать стабильные шпильчатые структуры. Удивительно, что во всех пулах 5'-константный участок (соответствующий Pr1) оставался по большей части одноцепочечным, т.е. не принимал участия в каких-либо внутримолекулярных взаимодействиях внутри компонентов библиотеки и не влиял на отбор случайного участка (рис. 48 Б).

Анализ структур стебля выявил, что они содержат мисматчи, внеспиральные нуклеотиды и петли. В среднем в исходной библиотеке, обогащенном пуле L6 или N содержалось около 5,5 неспаренных нуклеотидов в 20-звенном стеблевом фрагменте. В процессе селекции пулы обогащались стеблями уменьшенной стабильности, что подтверждалось рассчитанными значениями свободных энергий.

Далее была проанализирована встречаемость всех динуклеотидов в петлевых или стеблевых участках. Скорость отбора в стеблевом участке очень низкая, тем не менее, наиболее значительное накопление наблюдалось для GA, CT, AT и TA, в то время как CC и GG обеднялись.

В петлевом участке наблюдался заметный отбор. Динуклеотиды AT, TA, GA, AG, GT и TG накапливались, динуклеотиды CG, GC и CC исключались при отборе. Динуклеотиды GG, CT, TC, CA, TT, AC и AA не подвергались отбору. Большинство выраженных потерь – это потеря C, которая компенсировалась накоплением T и A. Эти закономерности подтверждают выводы, сделанные при анализе распределения к-нуклеотидов в центральном 26-звенном фрагменте без учета вторичной структуры. В частности, такие же тринуклеотиды накапливались в обогащенных библиотеках с высокой аффинностью к НЧЗ: ATG, AGT, TGA в стеблевом и петлевом участках и TGT, TTG и GGT в петлевом участке, в то время как G,C-богатые тринуклеотиды в обоих участках терялись.

4.3.4. Последовательности возможных аптамеров и значения констант диссоциации

Чтобы подтвердить сделанные выше предположения, синтезировали несколько 26-звенных олигонуклеотидов с различной нуклеотидной последовательностью. Их предполагаемую аффинность оценивали на основании отбираемости входящих в состав гексануклеотидных мотивов. Процент встречаемости каждого гексануклеотида с учетом позиции в рандомном фрагменте в исходной библиотеке L0 вычитали из соответствующего значения для обогащенных пулов. Результат был представлен как D^6_x , где 6 - длина гексануклеотида, x – порядковый номер обогащенного пула. Рассчитали конечную сумму ΣD^6_x для каждого 26-звенного олигонуклеотида. Все 26-звенные олигонуклеотиды в отсекаемых пулах оценили по этой сумме. Было сделано предположение, что лидеры этих рейтингов будут обладать высокой аффинностью к НЧЗ. Одна лидирующая последовательность была взята из пула L2 (L2-1, таблица 15) и одна из пула L5 (L5-1).

Были определены значения K_D для комплекса НЧЗ-ДНК в условиях высокого избытка (до 432:1) наночастиц относительно ДНК, в которых только одна молекула ДНК может связаться с одной НЧЗ. Значения K_D для обеих аптамерных последовательностей очень низкие, что указывает на их высокую аффинность к НЧЗ. Они существенно ниже, чем значения K_D для гомопоследовательностей T26 и A26.

Также использовали данные D^6_6 по позициям, чтобы сконструировать лидирующую последовательность для библиотеки L6. Эта последовательность (L6-1) была построена на перекрывании гексануклеотидов с лучшими близкими значениями D^6_6 . Необходимо отметить, что эта последовательность отсутствовала в секвенированных библиотеках.

Значение K_D олигонуклеотида L6-1 оказалось очень близко к значениям K_D для L2-1 и L5-1 (таблица 15).

Таблица 15. Сконструированные последовательности для проверки результатов анализа селектированных библиотек и константы диссоциации при связывании с НЧЗ.

шифр	последовательность	K_D , нМ	вторичная структура
L5-1	CGTATCTGATAGGTATTGTGAGATCG	$1,0 \pm 0,1$	есть
L2-1	TATCGCGAGCGGAGTAATCTAGTGAG	$0,9 \pm 0,1$	есть
L6-1	CAGCGGAGTAGTGATATCATGGAGTG	$1,0 \pm 0,2$	нет
L6-a2	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC нижняя полоса	$1,9 \pm 0,1$	нет
L6-a1	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC верхняя полоса	5 ± 2	есть
6-1	TGAGAT	$0,14 \pm 0,02$	нет
6-4	TGAGAT^TGAGAT^TGAGAT^TGAGAT	$0,41 \pm 0,09$	нет

Используя перекрытия гексануклеотидов, сконструировали последовательность из наиболее неотбираемых гексануклеотидов – L6-а. При электрофоретическом анализе этого олигонуклеотида после введения радиоактивной метки наблюдали две отдельные полосы (рис. 49). Верхняя полоса может быть соотнесена с внутримолекулярным квадруплексом. Нижняя полоса соответствует одноцепочечному состоянию этого олигонуклеотида и обладает другой аффинностью к НЧЗ. По результатам были рассчитаны K_D для обеих фракций, верхней L6-a1 и нижней L6-a2 (таблица 15).

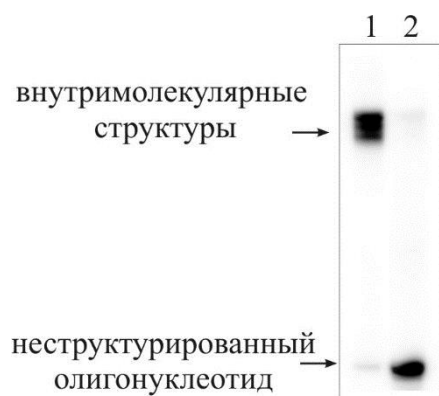


Рисунок 49. Сканированное изображение геля после электрофоретического анализа разделенных радиоактивно меченных форм L6-a1 (дорожка 1) и L6-a2 (дорожка 2).

Оказалось, что значение K_D для одного из лидирующих гексануклеотидных мотивов TGAGAT (6-1) очень близко к значению, ранее полученному для T6 ($0,10 \pm 0,04$ нМ). С использованием этого гексануклеотидного мотива и гибкого линкера на основе фосфодиэфира гексаэтиленгликоля был синтезирован олигонуклеотид с высочайшей

аффинностью к НЧЗ среди всех 26-звенных олигонуклеотидов, исследованных в работе, его значение K_D равно $0,41 \pm 0,09$ нМ.

4.3.5. Исследование кинетики связывания аптамерных и контрольных олигонуклеотидов с НЧЗ

Для проверки выводов о более выгодном связывании НЧЗ со слабоструктурированными и неструктурированными олигонуклеотидами по сравнению с двуцепочечными и сильно структурированными олигонуклеотидами была изучена кинетика связывания с НЧЗ набора олигонуклеотидов длиной 26 нт., обладающих различной вторичной структурой, методом агарозного электрофореза. НЧЗ инкубировали с 200-кратным молярным избытком каждого олигонуклеотида, поскольку было необходимо создать условия насыщения НЧЗ молекулами НК. Инкубация НЧЗ с НК при 56 °С в условиях насыщения обеспечивала установление равновесия уже после 30 мин инкубации и способствовала быстрому максимальному связыванию. Однако выявить отличия в кинетике связывания в условиях быстрого связывания оказалось затруднительно. Поэтому инкубацию намеренно проводили при температуре 25 °С, неоптимальной для связывания, и сравнивали скорости связывания НЧЗ со всеми исследуемыми олигонуклеотидами с использованием агарозного гель-электрофореза, предполагая, что скорость накопления фракции НЧЗ с наибольшей подвижностью зависит от скорости их связывания с олигонуклеотидами. Далее рассчитали интенсивность наиболее подвижной полосы и определяли время полунасыщения ($\tau_{1/2}$) как количественный параметр кинетики связывания. Значения $\tau_{1/2}$ и суммарного рейтинга (ΣD^6_6) представлены в таблице 16.

Таблица 16. Суммарный рейтинг при селекции (ΣD^6_6) и время полунасыщения ($\tau_{1/2}$) для олигонуклеотидов при связывании с НЧЗ.

НК	последовательность	$\tau_{1/2}$, ч	ΣD^6_6
L6-1	CAGCGGAGTAGTGATATCATGGAGTG	$3,3 \pm 0,1$	5,36
L6-2	ATGTAGTGTTCGATGTGTTGCTGTGT	$0,98 \pm 0,16$	10,92
L6-3	TACAGATGAGGTGTTTCGATTTGTATA	$0,91 \pm 0,12$	7,44
L6-5	GCGCGCGGGATGCTTCTAGATCAGTT	$2,6 \pm 0,1$	-1,21
L6-a2	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC нижняя полоса	$4,9 \pm 0,6$	-0,11
L6-a1	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC верхняя полоса	$8,6 \pm 1,5$	-0,11
itGCA	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCACTCAGG	$1,9 \pm 0,3$	-0,22
tACT	CGTGAGACTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	$1,1 \pm 0,2$	3,88
L7-1	GCACGATGTAGTGATGTGATGTATCG	$1,9 \pm 0,2$	12,03
L7-5	AGGCAGGGCATCGCGCGTGAAAGGAA	$3,1 \pm 0,4$	-5,93

НК	последовательность	$\tau_{1/2}$, ч	ΣD_6^6
L7-6	ATTAACGCGCGTAAGGGCCCTAGTGG	$4,8 \pm 0,3$	-5,70
L7-1-0	GGCACAGAGGTTGAATGTTGTGTTGT	$1,7 \pm 0,3$	9,66
L5-1	CGTATCTGATAGGTATTGTGAGATCG	$2,2 \pm 0,2$	7,05
TGT	TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG	$1,1 \pm 0,2$	11,98
ATG	ATGATGATGATGATGATGATGATGAT	$1,7 \pm 0,2$	15,65
A26	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	$1,6 \pm 0,2$	-13,09
T26	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	$4,8 \pm 0,3$	-8,23
C26	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	$4,6 \pm 0,3$	-9,45
L2-1	TATCGCGAGCGGAGTAATCTAGTGAG	$3,7 \pm 0,4$	-1,78

Для большинства олигонуклеотидов была выявлена корреляция между значениями $\tau_{1/2}$ и суммарного рейтинга (рис. 50 А) и между значениями суммарного рейтинга и суммарного изменения гидрофобной поверхности при прерывании внутримолекулярных стэкинг-взаимодействий (рис. 50 Б), за исключением А26 и L6-а.

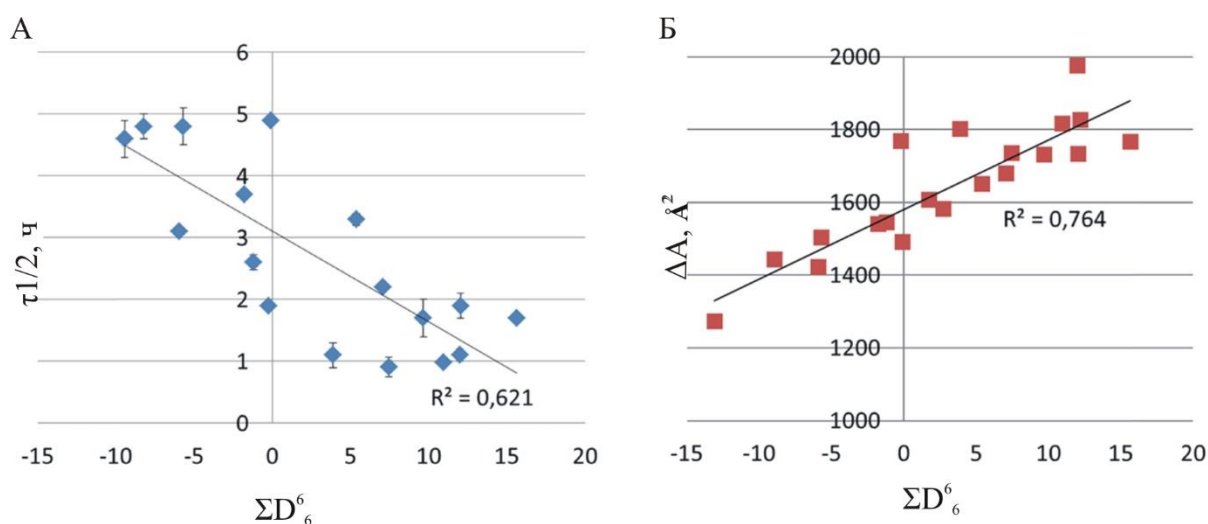


Рисунок 50. Линейная зависимость (А) между суммарным рейтингом ΣD_6^6 и временем полунасыщения $\tau_{1/2}$, (Б) между суммарным рейтингом ΣD_6^6 и суммарным изменением гидрофобной поверхности при прерывании внутримолекулярных стэкинг-взаимодействий ΔA .

А26 хорошо связывался с НЧЗ, имел низкие значения K_D и $\tau_{1/2}$, но терялся при селекции. Это может быть связано с высокой гидрофобностью олигоА, приводившей к его повышенной сорбции на стенках пробирок и последующей потере. Для L6-а было получено два набора данных: одноцепочечное состояние (инкубация в течение 2 мин при 95° и медленное охлаждение до 25°C) и образование внутримолекулярных структур (рис. 51 А, Б, В). Верхняя полоса, по всей вероятности, характеризовала внутримолекулярный квадруплекс, и ей соответствовали довольно высокие значениями K_D и $\tau_{1/2}$.

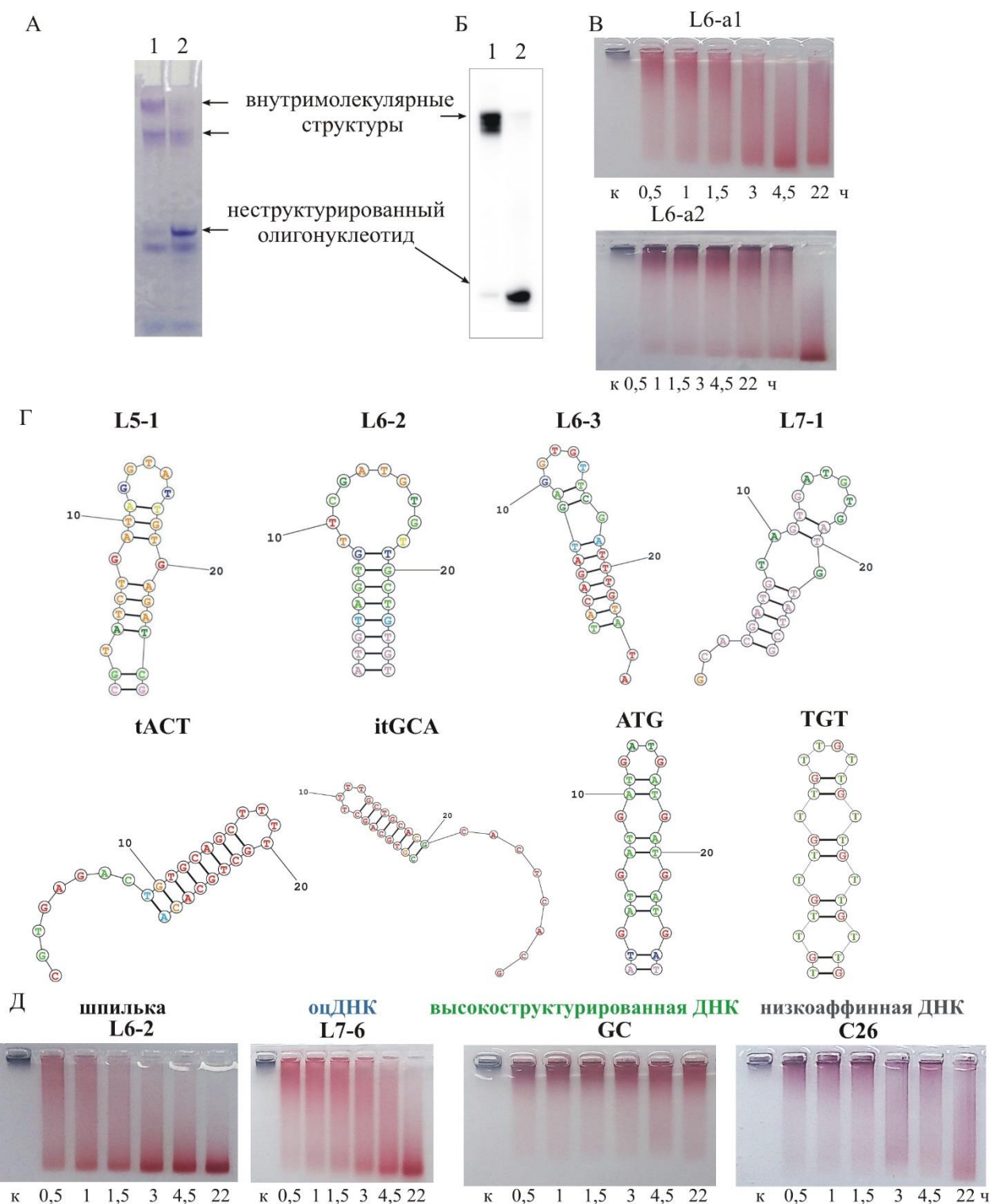


Рисунок 51. Кинетика связывания олигонуклеотидов с НЧЗ. А – сканированное изображение геля после электрофоретического анализа структурированной формы L6-a1 (дорожка 1) и неструктурированной формы L6-a2 (дорожка 2) (гель окрашен Stains All), Б – сканированное изображение геля после электрофоретического анализа разделенных радиоактивно меченных форм L6-a1 (дорожка 1) и L6-a2 (дорожка 2), В – сканированные изображения гелей после электрофоретического анализа кинетики связывания НЧЗ с L6-a1 (вверху) и L6-a2 (внизу), Г - предполагаемые структуры олигонуклеотидов, полученные с использованием базы данных RNAstructure, Д - сканированные изображения гелей, демонстрирующие типы кинетических профилей связывания НЧЗ с олигонуклеотидами различной вторичной структуры.

Большой общий отрицательный заряд этой структуры влиял и на термодинамику, и на кинетику связывания с НЧЗ. Одноцепочечный L6-а, соответствующий нижней полосе, связывался с НЧЗ хоть и медленно, но прочно (высокое $\tau_{1/2}$ и низкое K_D). Далее мы проанализировали вторичную структуру всех олигонуклеотидов, используя платформу RNAstructure. Наиболее вероятные структуры приведены на рисунке 51 Г. Они хорошо согласовались с предложенной моделью структуры аффинного олигонуклеотида: большинство хорошо отбираемых структур содержали слабые стебли и G, T, A-богатые петли.

Анализ кинетики связывания этих олигонуклеотидов с НЧЗ показал, что самую высокую скорость адсорбции продемонстрировали аптамеры, образующие шпилькоподобные структуры (L5-1, L6-2, L6-3, L7-1), и два олигонуклеотида, сконструированных из наиболее накапливающихся тринуклеотидных мотивов ATG и TGT (рис. 51 Д, L6-2). Для подтверждения влияния такого типа структуры на скорость адсорбции дополнительно была проанализирована кинетика адсорбции на НЧЗ двух олигонуклеотидов tACT и itGCA длиной 28 нк., сконструированных таким образом, чтобы образовывать шпильку со стеблем длиной 8 п.о. с одноцепочечным нависанием длиной 8 нт. с 5'- либо с 3'-конца соответственно. Для этих олигонуклеотидов получили время полунасыщения, близкое к значениям для слабоструктурированных аптамеров.

При изучении кинетики связывания с НЧЗ неструктурированных олигонуклеотидов (L6-1, L6-5, L7-5 и L7-6) (рис. 51 Д, L7-6) было обнаружено, что скорость связывания такого типа олигонуклеотидов существенно ниже, чем у шпилькоподобных олигонуклеотидов.

В качестве контроля была оценена скорость адсорбции на НЧЗ двух олигонуклеотидов той же длины, не обладающих вторичной структурой: T26 и C26. Она оказалась близка к скорости адсорбции неструктурированных аптамеров и снижена по сравнению со шпилькоподобными олигонуклеотидами. Остановимся на кинетике связывания C26 (рис. 51 Б, C26). Скорость его адсорбции оказалась так же низка, как и у неструктурированных олигонуклеотидов (рис. 51 Д, L7-6), однако профиль насыщения заметно отличался. Для C26 характерно наличие широкого диапазона разноразряженных ассоциатов при практически полном отсутствии максимально заряженных ассоциатов в точках 0,5 – 4,5 ч и невысокая интенсивность максимально подвижных наночастиц после 22 ч инкубации. Насыщения НЧЗ этим олигонуклеотидом в течение 22 ч не наблюдалось, и $\tau_{1/2}$ не была определена. Среди неструктурированных последовательностей C26 оказалась наименее аффинна. В данных условиях возможно образование i-мотивов [362, 363], которые могут повлиять на равновесную концентрацию C26.

Согласно литературным данным, структурированные ДНК должны иметь наименьшую аффинность к НЧЗ. Среди структурированных 26-звенных олигонуклеотидов наименее аффинным должен был быть GC. Исследование кинетики адсорбции наиболее структурированных модельных олигонуклеотидов GC и AT показало, что скорость их адсорбции оказалась самой медленной среди всех олигонуклеотидов: ассоциаты не достигали насыщения даже после 22 ч инкубации, к тому же во всех точках наблюдался широкий диапазон разнозаряженных ассоциатов (в случае GC), что можно объяснить как действительно медленной адсорбцией, так и слипанием НЧЗ в большие скопления из-за того, что межмолекулярные структуры НК могли адсорбироваться на нескольких НЧЗ (рис. 51 Д, GC).

Данные, полученные для всех протестированных олигонуклеотидов, подтверждают, что нестабильные шпильчатые структуры имеют преимущество при связывании с НЧЗ за счет изменения конформации и выгодного ориентирования азотистых оснований на поверхности НЧЗ.

Таким образом, можно сделать следующие заключения:

- стабильная вторичная структура олигонуклеотида препятствует взаимодействию азотистых оснований с поверхностью НЧЗ;
- большой пул разнообразных ДНК-последовательностей, не обладающих стабильной вторичной структурой, обладает высокой аффинностью к НЧЗ;
- предположительно главный молекулярный механизм связывания азотистых оснований с золотом – это их расположение параллельно металлической поверхности, поэтому любой тип взаимодействия оснований между собой отрицательно повлияет на адсорбцию ДНК на золоте;
- возможный механизм взаимодействия шпильчатых олигонуклеотидов с НЧЗ состоит из взаимодействия НЧЗ с азотистыми основаниями в шпильчатой петле, разрушения одиночных стэкинг-взаимодействий между ними благодаря образованию стебля шпильки и возникновения многоточечного взаимодействия других азотистых оснований с НЧЗ;
- неструктурированные G,T,A-богатые последовательности олигонуклеотиды с перемежающимися последовательностями Pu-Py могут обладать высокой аффинностью к НЧЗ.

4.4 Применение нековалентного связывания с НЧЗ для доставки siРНК в клетки

Создание эффективных транспортеров терапевтических молекул является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Одним из приложений генной терапии является «выключение» экспрессии целевых генов посредством малых интерферирующих РНК (siРНК) [364]. Активно разрабатывают способ доставки siРНК в составе ассоциатов со сферическими НЧЗ с ковалентным присоединением сенс-цепи к НЧЗ через тиольную группу [365, 366, 367, 368]. Эти ассоциаты характеризовались высокой плотностью покрытия, однако нет экспериментальных данных, подтверждавших, что десорбция siРНК из них происходила в виде дуплекса, а не одной антисенс-цепи. Между тем, механизм работы siRNA требует, чтобы она была в двуцепочечном состоянии [369]. Не менее важно обеспечить защиту НК от деградации внутриклеточными нуклеазами.

Серьезной проблемой является и необходимость использования значительного количества siРНК и наноконструкций на их основе для изучения биологического эффекта на клеточных культурах и тем более на животных моделях [369]. Также важным является масштабирование синтеза для получения наноконструкций рутинным методом «в одной пробирке» и стабильность готовых наноконструкций при хранении без изменения их ключевых свойств [370].

Для повышения устойчивости молекул siРНК к деградации ведутся работы по их химической модификации и поиску в них сайтов, чувствительных к нуклеазам [371, 372]. Модификации в двуцепочечной части siРНК или модификации на одноцепочечном 3'-конце антисенс-цепи могут снижать эффективность siРНК [373], тогда как модификации концов смысловой цепи не влияют на биологическую активность siРНК [374, 375]. Для защиты от деградации в состав siРНК многие исследователи вводят 2'-фторо-, 2'-дезокси-, 2'-О-метильные звенья и остов, содержащий фосфотиоатные группы или L-рибозу [367, 371, 372, 376]. Олигонуклеотиды в составе ряда препаратов для антисенс-терапии содержат многочисленные 2'-О-метильные, 2'-О-(2-метоксиэтильные), 2'-дезокси- группы, метилированные по С5-атому цитозин и урацил, а также фосфотиоатный или морфолиновый остов [377, 378, 379, 380].

На данный момент не разработаны экспериментальные системы, адекватно воспроизводящие условия внутри клетки и в кровяном русле, которые позволили бы полноценно тестировать методы защиты siРНК. Исследователи используют смеси на основе: агар-агара (имеет повышенную вязкость) [381]; глутатиона (обладает восстановительным потенциалом); смеси с рН, характерным для разных внутриклеточных компартментов [366]; а также сложные смеси, получаемые при лизисе бактерий, обладающие рядом активностей [382, 383, 384]; моделирующие биodeградирующую

активность смеси различных нуклеаз (ДНКазы I [385, 386, 387], ДНКазы II [366] или турбо-ДНКазы [386]), и различные сыворотки (теленка, мыши) [367, 388, 387].

Проблема оптимизации условий синтеза химических соединений и наночастиц при увеличении реакционного объема (то есть при масштабировании синтеза) [389, 390] актуальна не только при крупнотоннажном производстве, но и на этапе научно-исследовательских работ. В литературе не опубликовано данных о влиянии увеличения реакционного объема при сборке ассоциатов НЧЗ и НК на их свойства. Вопрос о сохранности при хранении готовых препаратов, содержащих siРНК, также крайне важен, поскольку стабильность готовых ассоциатов напрямую не зависит от стабильности каждого из исходных компонентов. Например, липидные наночастицы и их ассоциаты с siРНК проявляли высокую устойчивость при хранении в течение 18 месяцев без изменения размера, коллоидной стабильности и степени адсорбции siРНК [391]. В то же время стабильность наночастиц, наностержней золота и ассоциатов на их основе с пептидами, другими биологически активными веществами или стабилизаторами была существенно ниже и составляла от одной недели до одного месяца [392, 393, 394, 395], поскольку коллоидные растворы НЧЗ гарантированно сохраняют стабильность лишь в течение трех месяцев при 4 °С [396]. Коллоидную стабильность коммерчески доступных НЧЗ (GYS-LyoFTM (Ocean NanoTech LLC.) и Nanogold® (Nanoprobes Inc.)) обеспечивают путем добавления веществ-стабилизаторов [393, 397] или криопротектантов при лиофилизации [397], однако эти вещества могут менять свойства наночастиц, что влияет на условия сборки ассоциатов.

Заключительная часть работы была посвящена изучению поведения ассоциатов НЧЗ-НК в условиях, имитирующих клеточный цитозоль, и при трансфекции в живые клетки и включала в себя несколько этапов:

- оптимизацию условий адсорбции дуплексов НК на поверхность НЧЗ для получения возможно более плотного олигонуклеотидного покрытия, эффективного для внутриклеточной доставки;
- изучение возможности увеличения объема получаемых в одной пробирке ассоциатов и определение срока хранения готовых ассоциатов без ухудшения их ключевых физико-химических свойств (плотность покрытия НК-слоя на НЧЗ, коллоидная стабильность);
- исследование сохранности молекул НК в составе ассоциатов с наночастицами золота (НЧЗ), содержащих один или несколько структурированных слоев;
- изучение кинетики высвобождения НК с поверхности НЧЗ в растворах, моделирующих внутриклеточных цитозоль;

- выяснение потенциала использования ассоциатов на основе НЧЗ для доставки терапевтических НК в живые клетки на примере подавления флуоресценции белка GFP (зеленого флуоресцентного белка) под действием siРНК.

4.4.1 Дуплексы НК, использованные в работе

Для оптимизации условий адсорбции двуцепочечных НК на НЧЗ использовали ДНК-дуплекс T26-FAM/A26 и РНК-дуплекс siGFP. Также использовали siGFP для демонстрации его биологического эффекта в составе многослойных конструкций на основе НЧЗ. Для изучения высвобождения НК с поверхности НЧЗ в растворе, имитирующем клеточный цитозоль, использовали РНК-дуплексы 4/5, состоящие как из нативных цепей, так и несущих одну (4.1, 5.1) или две ФГ-группы (4.2, 5.2).

4.4.2 Подбор условий для нековалентного связывания дуплексов НК с НЧЗ

Поскольку одно- и двуцепочечные НК адсорбируются на НЧЗ по-разному, была проведена оптимизация условий связывания дуплексов РНК и ДНК с НЧЗ, чтобы достичь наибольшей плотности покрытия поверхности НЧЗ молекулами НК и при этом получить стабильные монодисперсные коллоидные растворы. Для этого было необходимо определить оптимальные температуру, время, концентрационные и солевые условия инкубации дцНК с НЧЗ.

На основании данных, представленных в главах 4.1 и 4.2 для одноцепочечных НК, был использован 200-кратный молярный избыток дуплекса НК по отношению к НЧЗ для достижения максимально возможной плотности покрытия. Есть данные, что процесс адсорбции НК на поверхность НЧЗ энергетически более выгоден, чем процесс образования дуплекса НК [208, 210, 398], что определяет отличие условий сборки ассоциатов НЧЗ и дцНК от условий сборки ассоциатов с оцНК. К раствору НЧЗ добавляли заранее сформированные дуплексы, реакционную смесь выдерживали при температуре 25 °С, поскольку температура инкубации должна быть заметно меньше температуры плавления дуплексов, которая составляла 44 °С при 4 mM NaCl (по расчетным данным Vector NTI, Invitrogen).

Условием формирования дуплексов НК является присутствие не менее 10 mM NaCl [369]. Добавление соли вместе с siРНК к коллоидному раствору НЧЗ повышает степень их нековалентного связывания, что применяют в salt-aging-методе нековалентной адсорбции оцНК на поверхности НЧЗ [226]. С другой стороны, повышение концентрации NaCl негативно сказывается на стабильности коллоидного раствора цитратных НЧЗ [399]. С учетом этого было исследовано влияние времени инкубации, солевых условий и различных концентраций НЧЗ и дцНК (образцы I, II и III) на образование ассоциатов. В случае образца II использовали исходный раствор НЧЗ («сразу после синтеза»), для образца I проводили

концентрирование исходного раствора НЧЗ, а для III – его разбавление. При этом сохраняли молярное соотношение дцНК : НЧЗ = 200 : 1 и инкубацию при комнатной температуре (таблица 17).

Таблица 17. Концентрация компонентов для сборки ассоциатов.

Образец	НЧЗ, М	дцНК, М	с(дцНК)/с(НЧЗ)
I	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-5}$	200
II	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$7,2 \cdot 10^{-7}$	200
III	$5 \cdot 10^{-10}$	10^{-7}	200

На первом этапе определяли оптимальные значения продолжительности инкубации и концентраций компонентов. Время инкубации составило 3, 5 и 22 ч для всех образцов. Процесс формирования ассоциатов анализировали методом агарозного геле-электрофореза, который демонстрирует как эффективность связывания дцРНК с НЧЗ, так и гомогенность коллоидного раствора (рис. 52). Повышение концентрации исходных компонентов (рис. 52, образцы I, дорожки 4-6) приводило к быстрому и эффективному формированию ассоциатов. При увеличении времени инкубации до 22 ч (рис. 52, дорожка 6) в образце I присутствовал материал синего цвета с пониженной электрофоретической подвижностью, что свидетельствует о возможном слипании ассоциатов (область выделена белой рамкой).

Инкубации в течение 22 часов оказалось недостаточно для обеспечения максимальной подвижности большинства наночастиц в образцах III: они содержали весь диапазон отрицательно заряженных наночастиц. С другой стороны, образцы III содержали существенно меньше окрашенных в синий цвет наночастиц, чем образцы I. (рис. 52, дорожки 1-3).

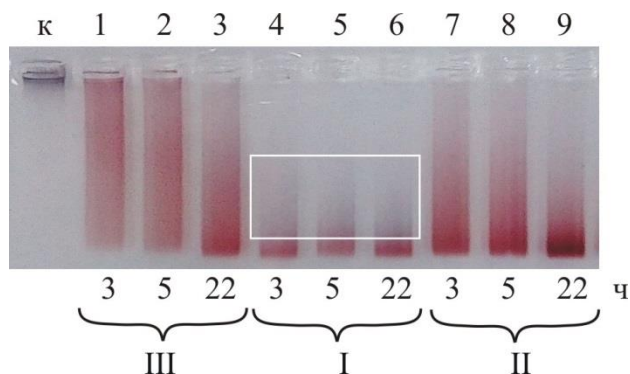


Рисунок 52. Сканированное изображение геля после электрофоретического анализа ассоциатов НЧЗ и дцНК, полученный при варьировании концентрации дцНК и НЧЗ, и времени инкубации компонентов. К – контроль подвижности (НЧЗ). I, II и III – образцы ассоциатов при разной концентрации исходных компонентов. Область геля, содержащая слипшиеся НЧЗ, выделена белой рамкой.

Изучение образца II (рис. 52, дорожки 7-9), при получении которого использовали раствор НЧЗ «сразу после синтеза», выявило отличия как от разбавленного образца III, так

и от концентрированного образца I. С одной стороны, доля НЧЗ с максимальной электрофоретической подвижностью после 22 ч инкубации увеличилась (рис. 52, дорожки 9 и 3), с другой стороны, признаки слипания НЧЗ отсутствовали (рис. 52, дорожки 9 и 6).

Оценка поверхностной плотности ассоциатов НЧЗ-T26FAM/A26 показала, что наиболее эффективную адсорбцию дцНК наблюдали в образцах II, содержащих НЧЗ «после синтеза» без разбавления или концентрирования (таблица 18).

Таблица 18. Поверхностная плотность олигонуклеотидного слоя (дупл./НЧЗ) в составе ассоциатов НЧЗ-T26FAM/A26, полученных в разных концентрационных условиях.

образец	время инкубации, ч		
	3	5	22
I	$9,6 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,2$
III	$20,5 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,2$	$30,2 \pm 0,3$
II (0,3 мМ NaCl)	$23,6 \pm 0,4$	$28,1 \pm 0,7$	$32,9 \pm 0,5$
II (10 мМ NaCl)	$29,8 \pm 0,6$	$35,0 \pm 1,1$	$39,6 \pm 0,7$

Далее было исследовано влияние увеличения концентрации NaCl в образцах на плотность покрытия. Предварительные данные, полученные для оцДНК T40, показали значительное увеличение поверхностной плотности при добавлении NaCl в смесь НЧЗ и T40: с 5 до 37 мол./НЧЗ. Увеличение концентрации NaCl с 0,3 до 10 мМ при получении ассоциатов НЧЗ-T26FAM/A26 также привело к ожидаемому росту поверхностной плотности дуплексов с 32,9 до 39,6 мол./НЧЗ (таблица 18).

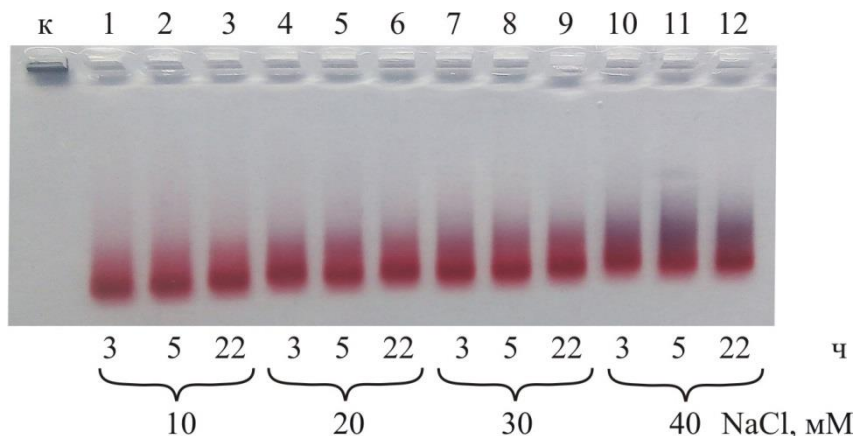
Затем провели сравнение свойств ассоциатов НЧЗ с ДНК-дуплексом и ассоциатов с РНК-дуплексом, полученных в одинаковых условиях сборки. Сравнение проводили для трех типов образцов, а в образцах ассоциатов II дополнительно варьировали содержание NaCl от 10 до 40 мМ.

Было выявлено различие в покрытии между ассоциатами с разными типами НК. Различие в поверхностной плотности между образцами I и образцами II и III в случае ассоциатов НЧЗ-дцGFPCy5.5 выражено значительно сильнее и достигает порядка по сравнению с двумя-тремя разами для ассоциатов НЧЗ-дцДНК. Для образцов I - III плотность дцРНК на поверхности НЧЗ возрастала с увеличением продолжительности инкубации с $11,8 \pm 3,7$ дцРНК/НЧЗ (таблица 18, образец I, 3 ч инкубации) до $107,7 \pm 2,1$ молекул дцРНК/НЧЗ (таблица 19, образец II, 22 ч инкубации). Различие поверхностной плотности между исследованными ассоциатами НЧЗ-дцДНК и НЧЗ-дцРНК может быть связано с наличием или отсутствием одноцепочечных нависаний в этих дуплексах, а также с различием углеводного фрагмента в ДНК и РНК, последовательности и длины дуплекса.

Таблица 19. Поверхностная плотность дцРНК в составе ассоциатов с НЧЗ, дуплексов/НЧЗ.

Образец	Продолжительность инкубации, ч		
	3	5	22
I	$11,8 \pm 3,7$	$31,6 \pm 7,7$	$41,3 \pm 5,1$
III	$13,7 \pm 5,3$	$73,7 \pm 4,3$	$90,6 \pm 6,1$
II	$59,4 \pm 6,0$	$76,0 \pm 5,0$	$107,7 \pm 2,1$
II 10 мМ	$107,4 \pm 2,6$	$107,0 \pm 3,0$	$119,5 \pm 2,9$
II 20 мМ	$123,8 \pm 0,4$	$130,3 \pm 3,0$	$132,5 \pm 2,0$
II 30 мМ	$130,8 \pm 1,1$	$130,2 \pm 1,2$	$134,0 \pm 2,9$
II 40 мМ	$150,5 \pm 0,9$	$148,8 \pm 3,7$	$161,6 \pm 4,9$

Для повышения поверхностной плотности дуплексов НК в составе ассоциатов с НЧЗ определили необходимое количество NaCl в образцах. Электрофоретический анализ показал, что увеличение концентрации NaCl с 10 до 40 мМ привело к последовательному нарастанию слипания ассоциатов, заметному уже через 3 ч инкубации и регистрируемому по увеличению доли синего материала в дорожках (рис. 53, дорожки 1-12). Однако следует отметить, что одновременно с ростом агломерации при повышении концентрации соли наблюдался значительный рост поверхностной плотности дцGFPCy5.5 вплоть до 161 дуплекса/НЧЗ (таблица 18), что согласуется с литературными данными [226].

**Рисунок 53.** Сканированное изображение геля после электрофоретического анализа ассоциатов НЧЗ-дцGFPCy5.5 при концентрации NaCl от 10 мМ до 40 мМ в образцах II.

Одновременно с ростом концентрации соли наблюдалось плавное уменьшение электрофоретической подвижности ассоциатов (рис. 53), различие в которой достигало 12 % при переходе от образцов, содержащих 10 мМ NaCl, к образцам, содержащим 40 мМ NaCl. Данные DLS подтверждают скачкообразное увеличение гидродинамического диаметра ассоциатов при увеличении содержания соли (таблица 20). Примечательно, что одинаковые по содержанию соли образцы уменьшались в диаметре на 2-4 нм при увеличении продолжительности инкубации с 3 до 22 ч, при этом основной прирост

поверхностной плотности дуплексов (90-98 %) наблюдался уже после первых 3 ч инкубации. В то же время гидродинамический диаметр ассоциатов НЧЗ-T26FAM/A26, характеризующихся существенно меньшей поверхностной плотностью и более медленной адсорбцией (74 % прироста поверхностной плотности за первые 3 ч инкубации) после инкубации от 3 до 22 ч в присутствии 10 мМ NaCl незначительно возрастал с $38,8 \pm 2,3$ до $41,4 \pm 3,1$ нм (таблица 20).

Можно сделать предположение, что за первые 3 ч большая часть дуплексов РНК быстро сорбировалась на поверхности НЧЗ, а при дальнейшей инкубации дуплексы принимали более выгодную конформацию и образовали больше контактов с поверхностью НЧЗ, олигонуклеотидный слой становился плотнее, а диаметр ассоциатов уменьшался. Дуплексы же ДНК сорбировались медленнее, и увеличение диаметра ассоциатов отражало прирост поверхностной плотности.

Таблица 20. Гидродинамический диаметр ассоциатов НЧЗ-НК.

Образец	Продолжительность инкубации, ч		
	3	5	22
НЧЗ-T26FAM/A26	$38,8 \pm 2,3$	$40,7 \pm 2,1$	$41,4 \pm 3,1$
НЧЗ-дцGFPCy5.5 10 мМ NaCl	$45,0 \pm 2,6$	$43,9 \pm 1,1$	$38,2 \pm 1,8$
НЧЗ-дцGFPCy5.5 20 мМ NaCl	$60,9 \pm 2,1$	$65,7 \pm 1,2$	$58,6 \pm 1,6$
НЧЗ-дцGFPCy5.5 30 мМ NaCl	$69,7 \pm 1,1$	$67,3 \pm 1,3$	$63,4 \pm 0,8$
НЧЗ-дцGFPCy5.5 40 мМ NaCl	$83,9 \pm 2,7$	$88,9 \pm 4,2$	$77,2 \pm 2,0$

Образцы ассоциатов I, II и III в разных условиях инкубации были охарактеризованы методом ПЭМ, на рисунке 54 приведены иллюстрации высокодисперсной суспензии ассоциатов II и III (А, Б) и слипание ассоциатов I (В). ПЭМ выполнена в ГМИ ИХБФМ под руководством

д.б.н.

Е.И.

Рябчиковой.

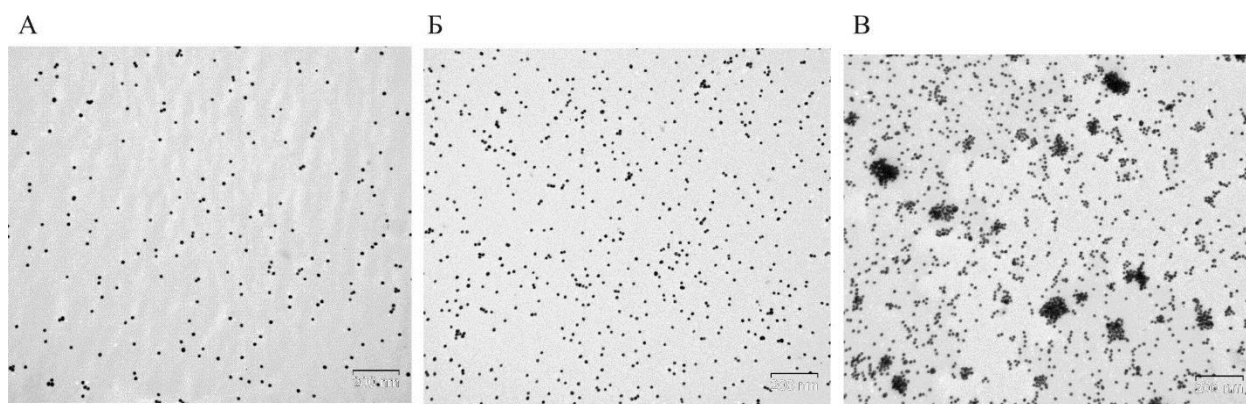


Рисунок 54. ПЭМ ассоциатов после 22 ч инкубации: А – Высокодисперсная суспензия ассоциатов в образце III, Б – высокодисперсная суспензия ассоциатов в образце II, В - слипание ассоциатов в образце I.

Морфология агломератов не различалась в разных образцах, а их размеры составляли 100-500 нм. Сравнение образцов I, II и III, содержащих разную концентрацию

NaCl, показало изменения содержания агрегатов, соответствующие данным электрофоретического анализа.

Полученные результаты показывают важность каждого параметра при сборке нековалентных ассоциатов дцНК-НЧЗ. Исследователю предстоит сделать выбор между желаемой поверхностной плотностью НК и общей коллоидной стабильностью системы. На основании полученных данных в дальнейшем сборку ассоциатов НЧЗ и дцНК проводили, добавляя предварительно приготовленный раствор НК-дуплекса в 200-кратном молярном избытке к коллоиду НЧЗ с концентрацией 3,6 нМ («сразу после синтеза») с дальнейшей инкубацией в присутствии 10 мМ NaCl в течение 22 ч при 25 °С.

4.4.3 Различия в связывании одно- и двухцепочечных НК с НЧЗ

Образование РНК-дуплексов подтверждали методом гель-электрофореза в нативных условиях. Для образования дуплексов РНК инкубировали при 95 °С в течение 3 мин и охлаждали до 25 °С. В работе использовали три типа дуплексов с фосфорилгуанидиновыми НК: 4.2/5.2, 4.2/5.1 и 4.2/5 (индекс .1 обозначает одну ФГ-группу, .2 - две ФГ-группы). На рисунке 55 представлен анализ РНК-дуплексов и их ассоциатов с НЧЗ. Как видно из представленных данных, наличие одной или двух ФГ-групп на 3'-конце оцРНК не влияет на формирование дуплекса РНК (рис. 55 А). Образование ассоциатов НЧЗ именно с дуплексами НК, а не с отдельными цепями подтверждали несколькими косвенными методами. Во-первых, проводили электрофоретический анализ ассоциатов в 4 % геле на основе MetaPhor® агарозы (рис. 55 Б).

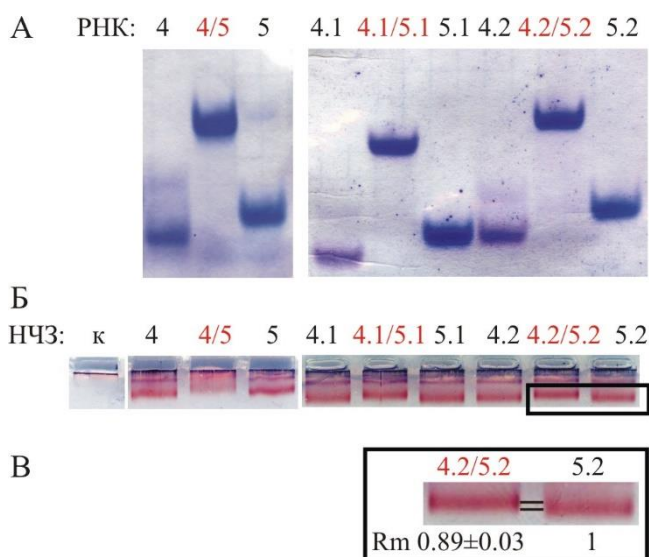


Рисунок 55. Сканированные изображения гелей после электрофоретического анализа дуплексов РНК (А) и их ассоциатов с НЧЗ (Б). В - разная электрофоретическая подвижность R_m ассоциатов НЧЗ с оцРНК и дцРНК. Электрофоретическая подвижность НЧЗ-оцРНК принята за 1.

Нековалентная адсорбция дуплексов всех дцРНК (как нативных, так и содержащих модифицированную цепь) на поверхности НЧЗ приводила к образованию наноконструкций, обладавших меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с подвижностью ассоциатов НЧЗ с отдельными цепями этих же дуплексов. Таким образом, если принять за базовую линию подвижность, например, НЧЗ-5.2, то относительная подвижность НЧЗ-4.2/5.2 составит $0,89 \pm 0,03$ (рис. 55 В).

Во-вторых, был определен гидродинамический диаметр и ζ -потенциал ассоциатов НЧЗ с оцНК и с дцНК (таблица 21). Ассоциаты НЧЗ с дцНК имели достоверно больший диаметр, чем ассоциаты НЧЗ с оцНК, что может указывать на разный режим связывания.

Таблица 21. DLS-характеристика ассоциатов НЧЗ с оцНК и дцНК.

ассоциат	D, нм	ζ -потенциал, мВ
НЧЗ	$17,4 \pm 0,4$	$-33,6 \pm 2,0$
НЧЗ-T26	$29,5 \pm 0,1$	$-39,8 \pm 0,5$
НЧЗ-T26FAM/A26	$41,4 \pm 3,1$	$-38,9 \pm 2,7$
НЧЗ-дцРНК	$38,2 \pm 1,8$	$-40,1 \pm 0,6$

В-третьих, было исследовано связывание НЧЗ с оцНК и с дцНК в нескольких вариантах. Связывание НЧЗ и дцНК проводили при 25 °С в течение суток. Связывание НЧЗ с оцНК проводили в четырех вариантах: при 25 °С в течение суток, при 56 °С в течение 30 мин, в присутствии 10 мМ NaCl или без NaCl. На рис. 56 представлены кинетические кривые связывания НЧЗ с оцНК и с дцНК для двух дуплексов (T26FAM/A26 и siGFPCy5.5) и для двух олигонуклеотидов, входящих в их состав (T26FAM и sРНКCy5.5).

Рассмотрим кинетику связывания олигодезоксинуклеотида T26FAM на НЧЗ в присутствии и отсутствии NaCl. Как видно из рисунка 56 А, добавление соли при инкубации T26FAM с НЧЗ существенно, практически в два раза, повысило покрытие T26FAM на НЧЗ. Также видно, что основная часть олигонуклеотида (80 %) сорбировалась уже за первые полчаса реакции. Кривые насыщения для T26FAM фиксировали как при 25 °С, так и при 56 °С с добавлением NaCl и в его отсутствие (рис. 56 В). Инкубация в течение суток при 25 °С оказалась по эффективности насыщения эквивалентна получасовой инкубации при 56 °С, что служит подтверждением наступления равновесия в системе. Видно, что добавление NaCl в обоих режимах инкубации приводило к повышению покрытия.

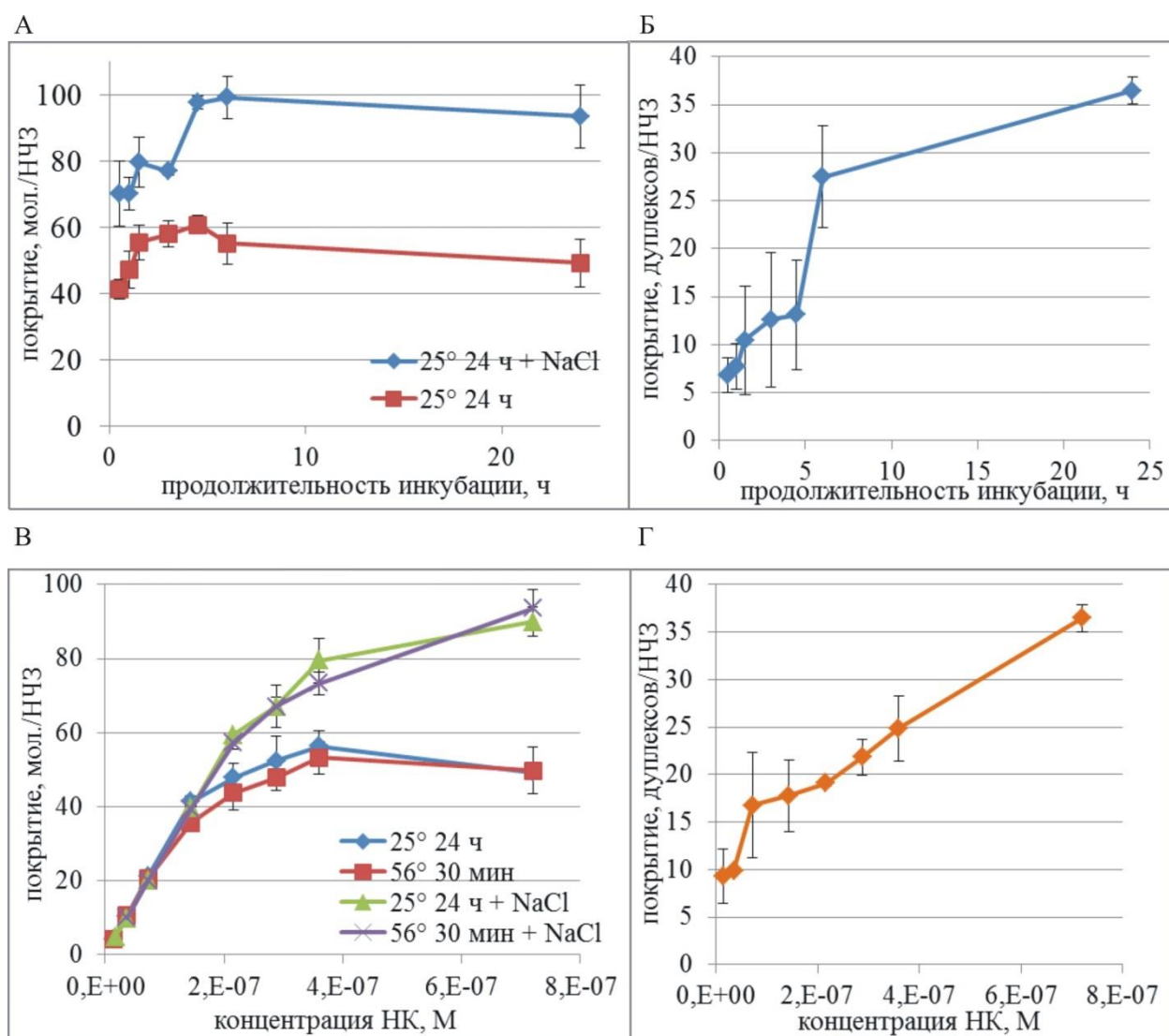


Рисунок 56. Кинетические кривые (А, Б) и кривые насыщения (В, Г) при связывании НЧЗ с Т26FAM (А, В) и с Т26FAM/А26 (Б, Г).

При переходе от инкубации НЧЗ с оцНК к инкубации с соответствующим дуплексом наблюдали значительное падение поверхностной плотности, что согласуется с теоретическими представлениями о большем электростатическом отталкивании дуплексов и НЧЗ по сравнению с одноцепочечными олигонуклеотидами (рис. 56 Г). Также скорость связывания дуплексов была гораздо медленнее, чем в случае одноцепочечного олигонуклеотида: время полунасыщения составило $0,30 \pm 0,09$ ч для Т26FAM и $4,3 \pm 1,1$ ч для Т26FAM/А26. Разная скорость адсорбции подтверждает разный характер связывания НЧЗ с одно- и двуцепочечными НК. (рис. 56 Б). Поверхностная плотность не достигала и 40 дуплексов на частицу, что более чем в два раза меньше плотности для Т26FAM. Оценили значения константы Лэнгмюра, составившие $3,2 \pm 0,7$ мкМ⁻¹ и 8 ± 4 мкМ⁻¹ для оцДНК и дцДНК соответственно. К возможным причинам различной адсорбции одно- и двуцепочечных нуклеиновых кислот на НЧЗ можно отнести и увеличенную плотность

отрицательного заряда у дуплекса, и его сниженную гибкость, не позволяющую занять выгодную конформацию.

Как и в случае с T26FAM, в случае sGFP-Cy5.5 наблюдали высокую скорость связывания и повышение покрытия при добавлении NaCl до полутора раз (рис. 57 А). В отличие от адсорбции T26FAM не наблюдали различия в поверхностной плотности при разных условиях инкубации вплоть до 100-кратного избытка олигонуклеотида (рис. 57 В). Разный характер адсорбции T26FAM и sGFP-Cy5.5 можно объяснить разной природой этих олигонуклеотидов (углеводнофосфатный остов, длина, последовательность).

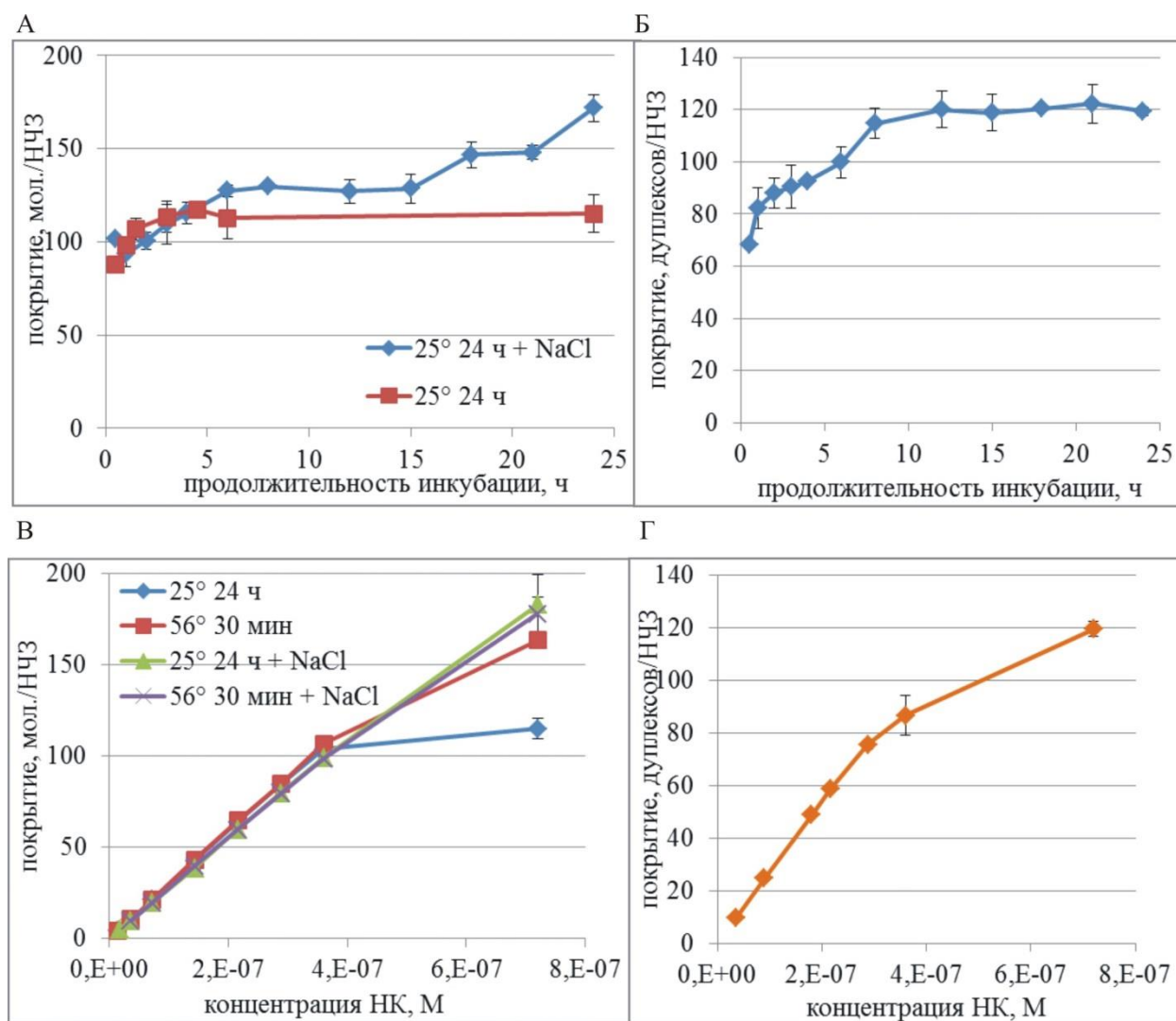


Рисунок 57. Кинетические кривые (А, Б) и кривые насыщения (В, Г) при связывания НЧЗ с sGFP-Cy5.5 (А, В) и с siGFP-Cy5.5 (Б, Г).

Адсорбция siGFP-Cy5.5 давала покрытие значительно меньшей поверхностной плотности, чем адсорбция sGFP-Cy5.5. Как и для T26FAM, наблюдали уменьшение плотности покрытия в полтора раза (рис. 57 Г). Значения константы Лэнгмюра составили $0,19 \pm 0,03 \text{ мкМ}^{-1}$ и $1,64 \pm 0,24 \text{ мкМ}^{-1}$ для оцРНК и дцРНК соответственно. Скорость адсорбции siGFP-Cy5.5 так же была ниже, чем в случае sGFP-Cy5.5, хотя это отличие не так

выражено, как для T26FAM и T26FAM/A26 (рис. 57 Б): время полунасыщения составило $0,26 \pm 0,03$ ч для оцРНК и $0,50 \pm 0,11$ ч для дцРНК.

4.4.4 Масштабирование сборки ассоциатов НЧЗ и дцНК и исследование их стабильности при хранении

Для изучения влияния увеличения объема реакционной смеси при сборке ассоциатов и времени хранения готового образца при 4 °С на свойства нековалентных ассоциатов НЧЗ и РНК было приготовлено два вида образцов. Первый вид образцов – это ассоциаты, полученные в условиях, описанных выше (однократные образцы). Второй тип образцов – это ассоциаты, полученные в объеме, увеличенном в 10 раз и содержащем в 10 раз больше НЧЗ и РНК (десятикратные образцы). Готовые ассоциаты хранили в течение 0 - 28 суток.

Анализ полученных нековалентных ассоциатов методом электрофореза в агарозном геле показал, что однократные образцы ассоциатов содержали меньше слипшихся частиц по сравнению с десятикратными образцами. Хранение в течение 8 суток практически не повлияло на качество всех приготовленных образцов (рис. 58).

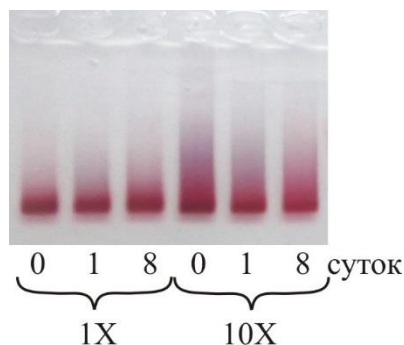


Рисунок 58. Анализ ассоциатов НЧЗ-siGFP при хранении. Агарозный гель-электрофорез нековалентных ассоциатов НЧЗ с siGFP, полученных при масштабировании синтеза и варьировании срока хранения готовых ассоциатов.

Для расчета плотности покрытия поверхности НЧЗ дуплексами НК использовали данные интенсивности флуоресценции. Полученные значения поверхностной плотности приведены в таблице 22. Нековалентное покрытие поверхности НЧЗ дуплексами дцНК было стабильно в течение всего периода хранения ассоциатов. Образцы, приготовленные в однократном и в десятикратном реакционном объеме, отличались значением поверхностной плотности не более чем на 16 %. Увеличение реакционного объема в 10 раз при получении нековалентных ассоциатов практически не оказало влияния на плотность покрытия поверхности НЧЗ дуплексами НК.

Таблица 22. Поверхностная плотность олигонуклеотидного слоя в составе нековалентных ассоциатов НЧЗ с siGFP или с T26FAM/A26 после разного периода хранения, дуплексов/НЧЗ.

хранение, суток	покрытие, дуплексов/НЧЗ	
	10х-пробы НЧЗ-siGFPCy5.5	10х-пробы НЧЗ-T26FAM/A26
0	$102,5 \pm 3,5$	$35,3 \pm 0,9$
1	$101,3 \pm 0,1$	$39,1 \pm 2,6$
8	$101,8 \pm 1,1$	$40,0 \pm 3,1$
14	$101,3 \pm 0,1$	-
21	$100,8 \pm 0,5$	-
28	$101,8 \pm 0,5$	-

Полученное НК-покрытие оказалось устойчиво к хранению в течение 28 суток.

Остановимся на размерных характеристиках одно- и десятикратных образцов с разным периодом хранения, полученных методом DLS (рис. 59). Для корректной интерпретации полученных методом DLS значений гидродинамического радиуса и индекса полидисперсности изучаемых наночастиц следует учитывать, что они не являются непосредственно измеряемыми величинами, а рассчитываются прибором-анализатором автоматически из корреляционной функции на основе измеренных данных интенсивности светорассеяния. Индекс полидисперсности (PdI) отражает степень гомогенности образцов. Как правило, образцы, характеризующиеся значением PdI от 0 до 0,3, считают гомогенными, в то время как значение PdI выше 0,3 свидетельствует о высокой гетерогенности образцов вследствие образования агрегатов [400]. Исследование образцов нековалентных ассоциатов методом динамического светорассеяния показало, что ассоциаты, приготовленные в однократном и десятикратно увеличенном реакционном объеме, имели практически одинаковый гидродинамический диаметр ($33,4 \pm 1,1$ и $37,5 \pm 1,7$ соответственно) (рис. 59 А), а ζ -потенциал всех ассоциатов составлял около - 40 мВ. Индекс полидисперсности (PdI) колебался от $0,266 \pm 0,025$ до $0,304 \pm 0,010$ для однократных и десятикратных образцов соответственно. Хранение в течение 8 суток не повлияло на размер ассоциатов и значение PdI: оно составило $0,296 \pm 0,005$ для однократных образцов и $0,300 \pm 0,005$ для десятикратных образцов ассоциатов (рис. 59 Б). Дальнейшее хранение десятикратных образцов выявило увеличение диаметра ассоциатов до $43,0 \pm 2,2$ нм после 21 суток хранения, а также увеличение индекса полидисперсности до $0,407 \pm 0,041$ по истечении 28 суток хранения, в то время как при хранении вплоть до 21 суток значение PdI не превышало $0,326 \pm 0,006$ (рис. 59 В, Г).

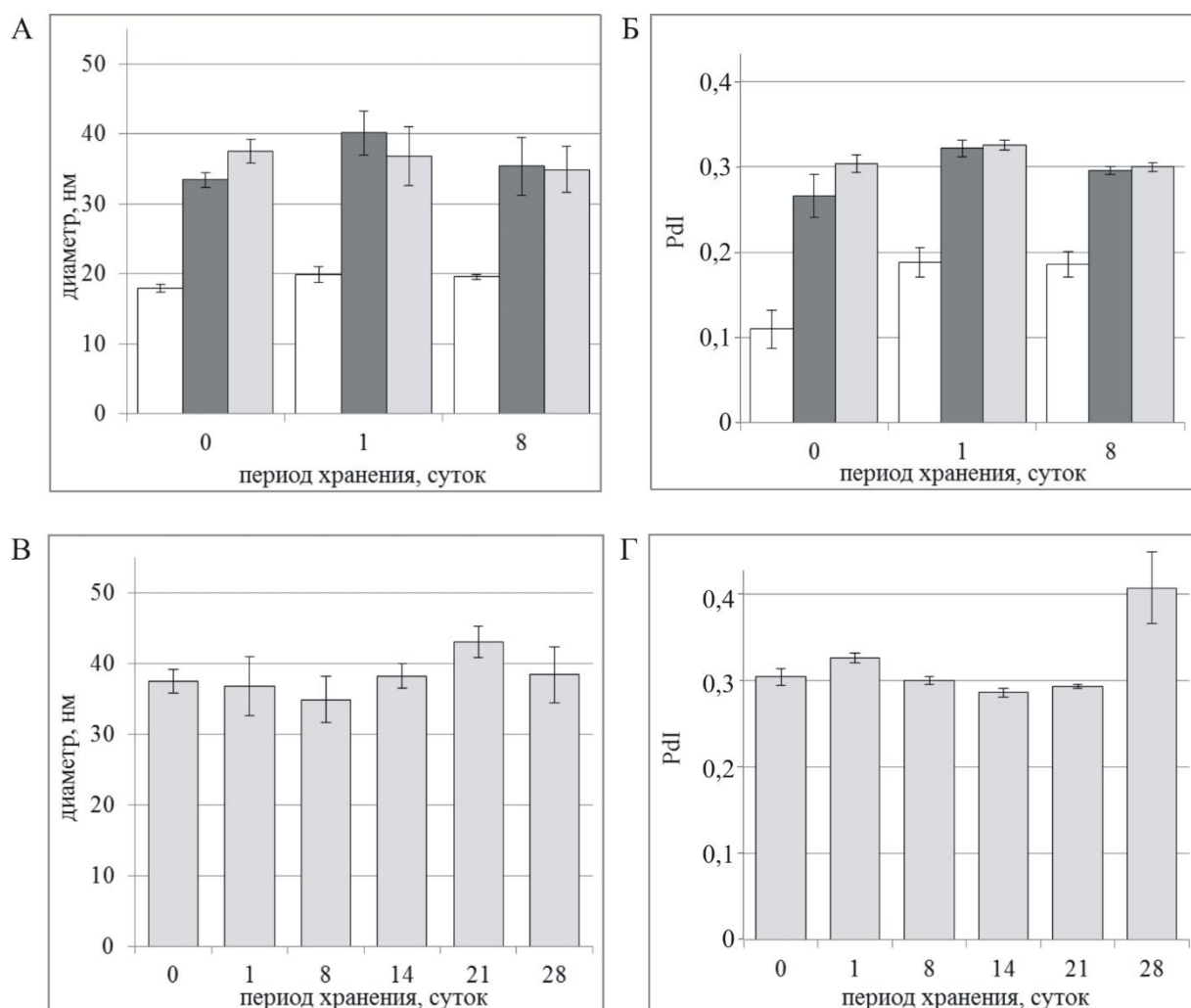


Рисунок 59. Гидродинамический диаметр (А, В) и индекс полидисперсности Pdl (Б, Г) наночастиц золота (белые столбцы) и их ассоциатов с дуплексами РНК, приготовленных в однократном (темно-серые столбцы) и десятикратном (светло-серые столбцы) объеме, на разных сроках хранения.

Исследование ассоциатов РНК с НЧЗ после их хранения в течение 7 месяцев методом DLS показало, что после 7 месяцев хранения размер ассоциатов не превышал $40,3 \pm 3,7$ нм, а индекс полидисперсности Pdl составлял $0,449 \pm 0,006$. Оптический спектр длительно хранившихся ассоциатов не отличался от спектра свежеприготовленных ассоциатов (рис. 60 А).

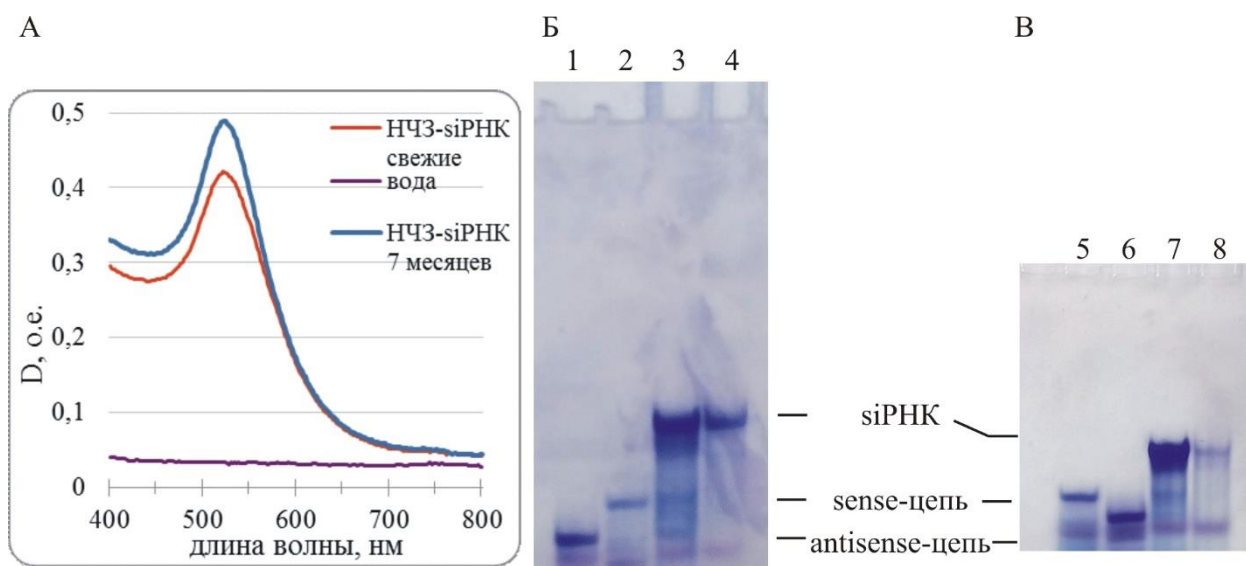


Рисунок 60. Анализ ассоциатов НЧЗ-siGFP при хранении. А - спектры оптического поглощения ассоциатов НЧЗ-siGFP, свежеприготовленных и после 7 мес. хранения. Б, В - сканированные изображения гелей после электрофоретического анализа РНК, десорбированной с поверхности НЧЗ после 3 недель (Б, дорожка 4) и после 7 месяцев хранения ассоциатов (В, дорожка 8). Контроли подвижности: дорожки 1, 5 – sense-цепь РНК, дорожки 2, 6 – antisense-цепь РНК, дорожки 3, 7 – siРНК. 15 % нативный полиакриламидный гель.

Исследование нуклеотидного материала, десорбированного с поверхности ассоциатов, методом гель-электрофореза выявило сохранение полноразмерных цепей РНК в эквимольных количествах, что видно по факту образования дуплекса полной длины (рис. 60 Б, В).

4.4.5 *Исследование устойчивости НК в составе нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК к деградации в растворах FBS и «цитозоля»*

4.4.5.1 *Схемы исследования нуклеазной устойчивости НК в составе ассоциатов с НЧЗ*

Целью данного этапа исследования был анализ устойчивости НК к деградации в биологических жидкостях и определение степени десорбции полноразмерных НК с поверхности НЧЗ. В некоторых исследованиях описаны способы изучения деградации и десорбции НК из состава ассоциатов с НЧЗ с помощью измерений интенсивности сигнала флуоресценции флуорофора в составе НК [386, 366, 385]. Для анализа устойчивости НК в биологических жидкостях был использован электрофоретический анализ [387, 372, 401], а степень деградации НК оценивали по накоплению сигнала радиоактивного распада [^{32}P] в составе НК [385, 372].

Ассоциаты инкубировали от 1 до 22 ч в «цитозоле» или растворе FBS, затем НЧЗ отделяли центрифугированием от супернатанта, разделяя каждый образец на две части (рис. 61). НЧЗ с адсорбированными НК обрабатывали раствором DTT для десорбции НК (эффективность десорбции $98,4 \pm 0,7$ %). Все образцы НК подвергали

электрофоретическому разделению в 15 % ПААГ и затем проводили расчет степени десорбции полноразмерных молекул НК и степени деградации НК.

Нуклеотидный материал анализировали после инкубации в биологических жидкостях (рис. 61): (А) полноразмерные НК, которые были адсорбированы на поверхности НЧЗ; (Б) полноразмерные НК, десорбированные в раствор; (В) молекулы НК разной степени деградации, которые были адсорбированы на поверхности НЧЗ; (Г) молекулы НК разной степени деградации, десорбированные в раствор.

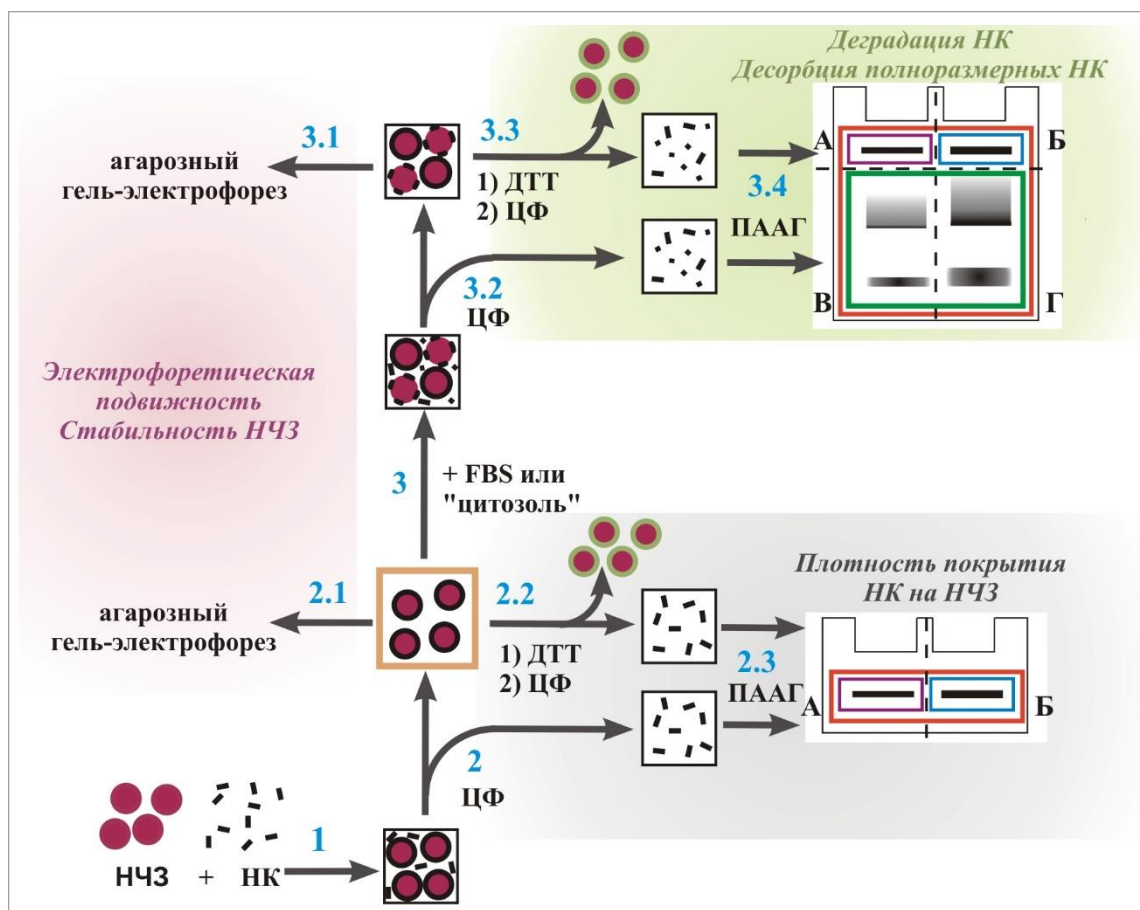


Рисунок 61. Схема сборки и исследования ассоциатов НЧЗ-НК: 1 – образование НЧЗ-НК, 2 – разделение реакционной смеси центрифугированием на золь (ассоциаты) и супернатант (несвязавшиеся НК), 2.1 – агарозный гель-электрофорез ассоциатов, 2.2 – инкубация ассоциатов с ДТТ с последующим центрифугированием для высвобождения сорбированных НК с поверхности НЧЗ, 2.3 – электрофоретический анализ в ПААГ супернатантов, полученных на этапах 2 и 2.2, 3 – инкубация ассоциатов в «цитозоле» или 10 % FBS, 3.1 – электрофоретический анализ результатов инкубации в «цитозоле» или FBS в агарозном геле, 3.2 – разделение реакционной смеси на золь (ассоциаты НЧЗ с полноразмерными и/или деградировавшими НК) и супернатант (свободные полноразмерные и/или деградировавшие НК), 3.3 – инкубация золь (из 3.2) с ДТТ с последующим центрифугированием для высвобождения сорбированных НК с поверхности НЧЗ, 3.4 – электрофоретический анализ в ПААГ супернатантов, полученных на этапах 3.2 и 3.3. Курсивом на схеме указана анализируемая характеристика.

За 100 % принимали количество молекул НК, сорбированных на поверхности НЧЗ непосредственно перед инкубацией в деградирующей системе (плотность покрытия) (рис.

61, красная рамка). Стоит отметить, что учет состояний (В) и (Г) может быть использован для расчета общей степени деградации (рис. 61, зеленая рамка); а (Б) и (Г) – общей степени десорбции.

Мы сосредоточились на анализе общей степени деградации НК и степени десорбции только полноразмерных НК, т.к. их содержание важно для оценки биологической активности. В ряде исследований [387, 386, 366, 385] сообщали об изучении деградации и десорбции НК, однако изучали лишь отдельные аспекты. Так, в работе [387] были изучены НК, адсорбированные на поверхность НЧЗ (что соответствует состояниям А и В, рис. 61), без рассмотрения общей степени десорбции, а в [386, 366, 385] рассматривали только десорбированные НК (что соответствует состояниям Б и Г, рис. 61), без учета НК на частицах и анализа степени деградации.

4.4.5.2 Сравнение факторов в растворе FBS и «цитозоле», влияющих на ассоциаты НК и НЧЗ

Цитозоль заполняет пространство между органоидами в эукариотических клетках. В работе использовали бактериальный «цитозоль», полученный из *E.coli* без их лизиса [402, 383]. Для приготовления «цитозоля» суспензию бактерий *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922) с титром 10^9 КОЕ/мл подвергли серии отмывок от избытка питательной среды физиологическим раствором. После этого пробирки с клеточной суспензией инкубировали при температуре -20°C в течение 12-24 ч, затем образцы суспензии размораживали и обрабатывали ультразвуком с помощью Bandelin Sonopuls HD 3100 при 90 % мощности в течение 15 мин для разрушения клеточных стенок. Эффективность обработки контролировали с помощью ПЭМ. Полученную суспензию пропускали через фильтр Millipore Millex-HV с диаметром пор 0,45 мкм. Определяли массу лиофилизированных образцов. Перед работой готовили водный раствор с концентрацией 4 мг/мл.

При исследовании с помощью ПЭМ полученного «цитозоля» было выявлено безмембранное вещество, состоящее из мелких сгустков аморфного материала (рис. 62 А, справа). Анализ вещества с помощью MALDI-TOF показал, что «цитозоль» содержал комплексы (рис. 62 Б), которые могут быть белковыми и белково-нуклеиновыми комплексами [403, 404].

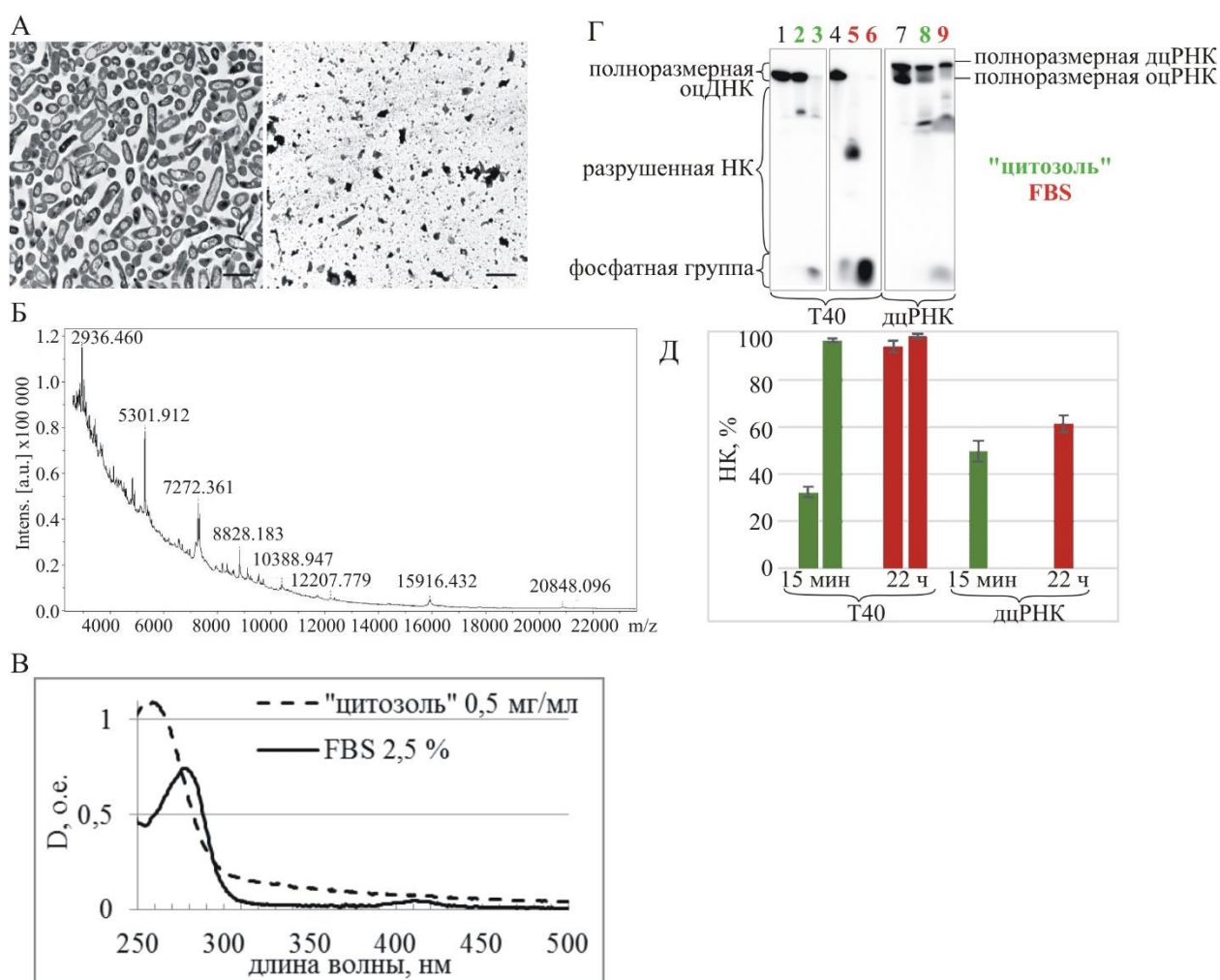


Рисунок 62. Характеризация деградирующих растворов FBS и «цитозоля», задействованных в работе. А – изображения ПЭМ исходного препарата *E.coli* после удаления культуральной среды (слева) и итогового «цитозоля» (справа). Б – спектр MALDI-TOF «цитозоля». В – спектры оптического поглощения раствора «цитозоля» 0,5 мг/мл (пунктирная линия) и 2,5 % FBS (сплошная линия). Г – электрофоретический анализ деградации НК под действием FBS (дорожки 1, 4 – Т40, 2, 3 – деградация Т40 в «цитозоле» за 15 мин и 22 ч, 5, 6 – деградация Т40 в 10 % FBS за 15 мин и 22 ч, 7 – РНК-дуплекс 4.2/5.2, 8 – деградация 4.2/5.2 в «цитозоле» за 15 мин, 9 – деградация 4.2/5.2 в 10 % FBS за 15 мин, Д – уровень деградации Т40 и дцРНК в «цитозоле» и FBS за 15 мин и 22 ч.

Растворы FBS концентрации 2,5 и 10 % получали путем разбавления исходной FBS средой DMEM. После инкубации ассоциатов в среде DMEM в течение трех суток выяснили, что именно среда DMEM способствует десорбции НК с поверхности НЧЗ (от 12 ± 4 % за 22 ч до 72 ± 6 % за 72 ч), при этом вызывает деградацию 19 ± 1 % НК. Раствор FBS и «цитозоль» содержали сравнимое количество белка (2,9 мг/мл и 4 мг/мл соответственно, рассчитанное по УФ-спектрам (рис. 62 В) [405] и обладали фосфатазной и нуклеазной активностями (рис. 62 Г, Д).

4.4.5.3 Исследование деградации и десорбции немодифицированных НК и их ассоциатов с НЧЗ

Далее исследовали деградацию всех двуцепочечных РНК и одноцепочечных ДНК, в том числе в составе ассоциатов с НЧЗ, а также десорбцию полноразмерных НК с поверхности НЧЗ после инкубации в цитозоле.

4.4.5.3.1 Деградация немодифицированных оцНК

На примере нативной Т40 было показано, что не менее 94 % немодифицированной оцДНК деградировало уже за 2-3 ч инкубации в растворе FBS и «цитозоле» (первичные данные не приведены).

Ассоциаты НЧЗ-Т26 и НЧЗ-Т40 инкубировали с «цитозолем» и раствором FBS (рис. 63 А - В). Оказалось, что деградация НК разной длины происходила по-разному. Так, за первые 1,5 ч инкубации в FBS уровень деградации Т40 в составе ассоциатов составил $35,4 \pm 10,7$ % а для Т26 в составе ассоциатов – $70,5 \pm 9,1$ %. В «цитозоле» за 1,5 ч деградировало $81,0 \pm 6,6$ % Т40 и $69,7 \pm 11,1$ % Т26. После инкубации в течение 22 ч во всех образцах уровень деградации НК достигал 74,0 – 85,0 %. Таким образом, НК в составе ассоциатов с НЧЗ устойчивее к деградации на 12 - 25 %, чем свободные НК, что согласуется с литературными данными [386].

4.4.5.3.2 Десорбция полноразмерных немодифицированных оцНК

Десорбция оцДНК разной длины также различалась (рис. 63 А - В). Доля десорбированных полноразмерных молекул Т40 в растворе FBS (рис. 63 Б) понижалась с $47,4 \pm 14,5$ % (1,5 ч) до $3,4 \pm 1,1$ % (22 ч). В то же время доля Т40 в «цитозоле» (рис. 63 А) росла с $2,8 \pm 2,0$ % до $13,3 \pm 2,6$ %. Доля полноразмерных Т26 в «цитозоле» (рис. 63 В), наоборот, уменьшалась с $22,3 \pm 8,7$ % (1,5 ч) до $10,0 \pm 8,3$ % (22 ч).

Полученные данные позволяют предположить, что содержание полноразмерных молекул НК в растворе в течение всего времени инкубации менялось в результате двух процессов: деградации активными компонентами растворов и высвобождения полноразмерных молекул с поверхности НЧЗ. Если деградация полноразмерных молекул происходила быстрее, чем их высвобождение с поверхности, то содержание в растворе полноразмерных НК понижалось (рис. 63 Б, В). И наоборот, если высвобождение полноразмерных молекул в раствор компенсировало их убыль вследствие деградации, то содержание полноразмерных НК в растворе росло (рис. 63 А).

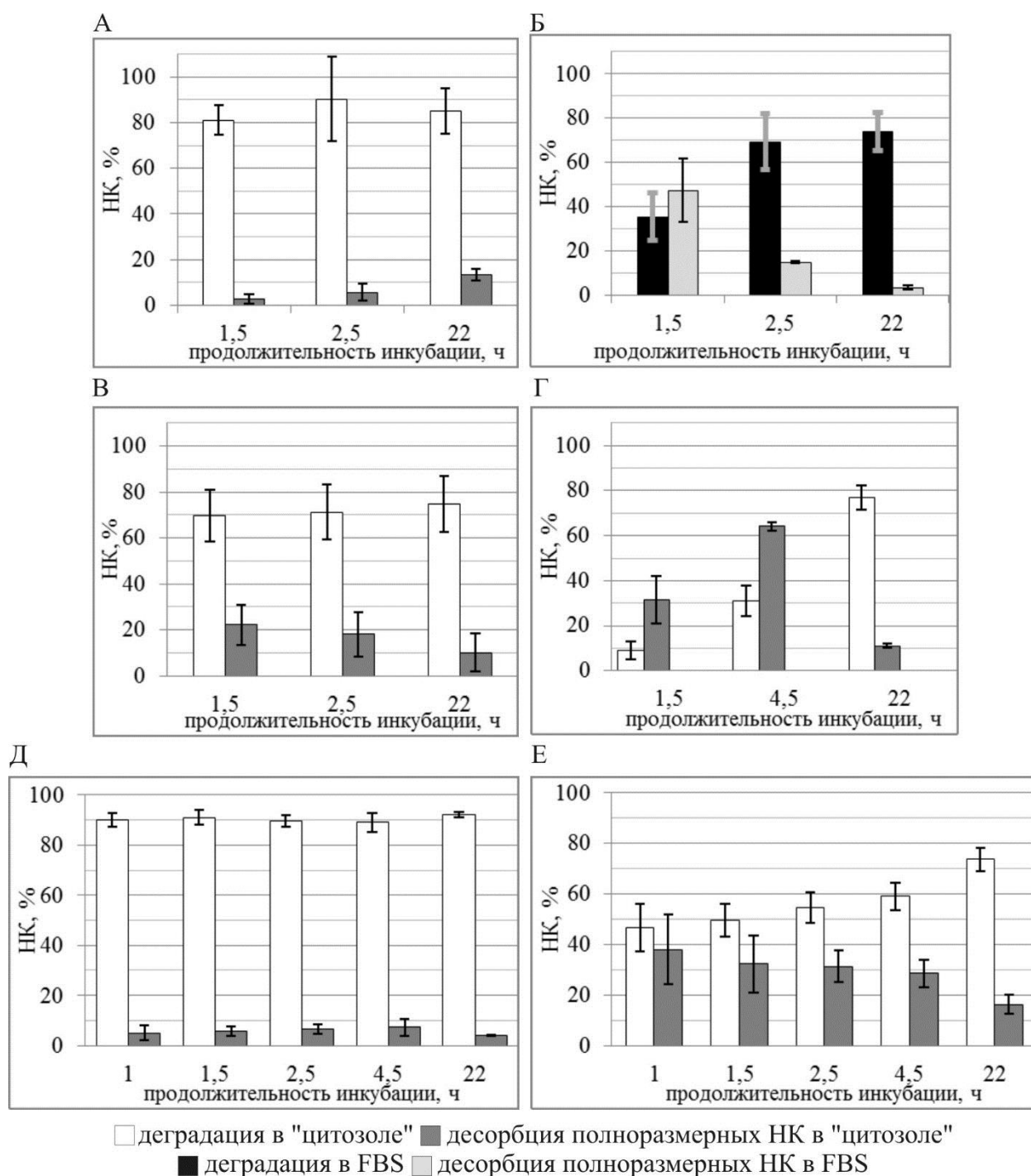


Рисунок 63. Дегградация НК в составе ассоциатов с НЧЗ после инкубации в 10 % FBS или в «цитозоле»: А - T40 в «цитозоле», Б - T40 в 10 % FBS, В - T26 в «цитозоле», Г – G.2 в «цитозоле», Д - дцРНК 4/5 в «цитозоле», Е - дцРНК4.2/5.x в «цитозоле».

Можно сделать вывод, что в составе нековалентных ассоциатов T26 более устойчива при длительной инкубации в деградирующих системах, чем T40, что согласуется с полученными ранее данными для ковалентных ассоциатов [387]. Таким образом, устойчивость НК в биологических жидкостях зависит от многих факторов, включая разный характер связывания и разную плотность покрытия НК разной длины.

4.4.5.3.3 Дегградация многослойных ассоциатов НЧЗ с немодифицированными НК

Первым шагом к повышению защиты НК от дегградации внутриклеточными нуклеазами было включение в состав ассоциатов еще одного слоя высокомолекулярного соединения: HS-PEG-COOH (PEG) или HSA. Ассоциаты НЧЗ-НК с PEG или HSA получали после инкубации ассоциатов НЧЗ-НК в 1 мкМ растворе PEG или HSA в течение 30 мин при 25 °С и встряхивании 1000 об./мин с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 13200./мин и удалением супернатанта. Общий уровень дегградации в растворе FBS двухслойных ассоциатов типа НЧЗ-T40-PEG/HSA после инкубации в течение ночи достигал $72,4 \pm 3,3$ %, что практически равно дегградации однослойных ассоциатов НЧЗ-T40 ($74,0 \pm 8,6$ %). Десорбция полноразмерных НК из двухслойных ассоциатов была больше, чем из однослойных ($17,6 \pm 4,2$ % и $3,4 \pm 1,1$ % соответственно) (первичные данные не приведены).

Более заметный эффект защиты от дегградации компонентами биологических жидкостей наблюдался для ассоциатов НЧЗ-T26-PEG: уровень дегградации после 1,5 часов инкубации в FBS составил $51,5 \pm 1,8$ % против $70,5 \pm 9,1$ %. Уровень десорбции этих ассоциатов в тех же условиях практически одинаков (10,8 – 11,5 %) (первичные данные не приведены).

Также изучили дегградацию многослойных ассоциатов в «цитозоле». Ассоциаты НЧЗ-T26-PEG/HSA за 1,5 часа инкубации дегградировали сильнее, чем ассоциаты НЧЗ-T26 ($79,4 \pm 6,2$ и $69,7 \pm 11,1$ %), но после 22 часов инкубации степень дегградации была одинакова. Степень десорбции за 22 ч инкубации для двухслойных ассоциатов НЧЗ-T26-PEG/HSA снизилась по сравнению с однослойными ассоциатами с $10,0 \pm 8,3$ % до $3,4 \pm 0,9$ % (первичные данные не приведены).

Было проведено исследование влияния третьего слоя из линейного полиэтиленimina (PEI) на защиту НК. Для получения трехслойных ассоциатов ассоциаты НЧЗ-НК-PEG или НЧЗ-НК-HSA инкубировали в растворе, содержащем 1 мМ NaCl и 0,2 % PEI, в течение 30 мин при 25 °С и встряхивании 1000 об./мин с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 13200./мин и удалением супернатанта. Дегградация T26 в составе трехслойных ассоциатов НЧЗ-T26-PEG/HSA-PEI достигала 66 - 70 % после 1,5 часов инкубации в дегградирующих растворах, что сравнимо с уровнем дегградации T26 в составе однослойных ассоциатов ($69,7 \pm 11,1$ %), а десорбция составила 11 - 13 %, что сравнимо с десорбцией T26 из однослойных ассоциатов в FBS, но существенно меньше, чем в «цитозоле» (первичные данные не приведены).

4.4.5.3.4 *Нуклеазная устойчивость дцРНК*

Как и ожидалось, нативные дцРНК в составе ассоциатов с НЧЗ неустойчивы к действию нуклеазных агентов (рис. 63 Д). Уже за первый час инкубации с «цитозолем» разрушалось $90,1 \pm 2,7$ % РНК, а по истечении 22 ч инкубации доля деградировавшей РНК превышала 92 %. Одно из решений проблемы стабильности НК – использование химически модифицированных НК. В литературе описано введение разнообразных заместителей по 2'-положению рибозы (фторо-, О-метил, дезокси-), азотистым основаниям и по сахарофосфатному остову молекул НК [372 371, 367, 376, 378, 379, 380]. Нами было использовано два типа химической модификации 3'-концов молекул siРНК для их защиты от деградации нуклеазами: введение двух тимидиндезоксирибонуклеотидных звеньев на 3'-концы всех РНК [406] и ФГ-групп в состав нависающих 3'-концов siRNA [407].

4.4.5.3.5 *Деградация и десорбция полноразмерных оцНК с ФГ-группами*

Исследование устойчивости модифицированных НК в деградирующих системах начали с оцДНК, а именно с G.2, в которой две ФГ-группы располагались вблизи 3'-конца олигонуклеотида. Модифицированный таким образом олигонуклеотид G.2 практически целиком сохранился за 1 ч инкубации с «цитозолем», а после 1,5 ч инкубации степень его деградации составила $4,4 \pm 0,4$ %. Т.е., введение в состав ДНК двух ФГ-групп привело к значительному повышению ее устойчивости к деградации в «цитозоле»: после 1,5 ч. инкубации уровень деградации модифицированных ДНК был меньше в 20 раз, чем немодифицированных ДНК (первичные данные не приведены).

G.2 в составе ассоциата с НЧЗ демонстрировал высокую устойчивость к деградации: через 4,5 ч инкубации с «цитозолем» деградировало только $30,9 \pm 6,8$ % G.2, (рис. 63 Г). Следует отметить, что модифицированные и нативные ДНК в составе ассоциатов после 22 ч инкубации с «цитозолем» деградировали в сходной степени ($76,0 \pm 5,5$ % и $74,0 - 85,0$ % соответственно). Анализ начального периода (до 2,5 ч) инкубации показал, что в составе нековалентных ассоциатов модифицированные ДНК более устойчивы (G.2 деградировала за 1,5 ч в 7,7 – 9,0 раз меньше, чем T26 и T40, за 2,5 ч – в 2,6 – 2,8 раза меньше). Другая особенность модифицированной ДНК заключалась в том, что скорость высвобождения ее полноразмерных молекул превышала скорость ее деградации (рис. 63 Г): доля полноразмерной G.2 в растворе возрастала с $31,5 \pm 10,6$ % после 1,5 ч до $64,1 \pm 2,0$ % после 4,5 ч инкубации.

4.4.5.3.6 *Деградация и десорбция дцРНК с ФГ-группами*

Исследование сохранности модифицированных siРНК в бактериальном «цитозоле» показало, что степень десорбции и деградации в «цитозоле» трех видов модифицированных дцРНК (4.2/5, 4.2/5.1, 4.2/5.2) была практически одинакова, поэтому в дальнейшем для

упрощения все дуплексы модифицированных РНК были обозначены как 4.2/5х. Как и в случае с модельными ДНК, введение ФГ-групп в состав дцРНК повысило их устойчивость к деградации в 1,5 – 1,9 раз по сравнению с немодифицированными дцРНК (первичные данные не приведены).

В составе нековалентных ассоциатов с НЧЗ (рис. 63 Е) около половины 4.2/5х деградировало за 1,5 ч ($46,6 \pm 9,4$ %), однако далее разрушение происходило гораздо медленнее: за 4,5 ч уровень деградации РНК составил $59,1 \pm 5,5$ %. Общий уровень деградации 4.2/5х в составе ассоциатов после 22 ч инкубации достигал $73,7 \pm 4,5$ %, что существенно меньше, чем деградация нативного дуплекса 4/5 в составе ассоциатов ($92,2 \pm 1,1$ %) и сравнимо с деградацией модельных ДНК в составе ассоциатов (74,0 – 85,0 %). Аналогичная динамика наблюдалась в случае ассоциата НЧЗ с ДНК, содержащей ФГ-группы (G.2).

Отметим, что при инкубации в биологических жидкостях с поверхности НЧЗ десорбировались обе цепи РНК (рис. 62 Г, дорожки 7-9). Доля полноразмерных дуплексов 4.2/5х в растворе оставалась достаточно высокой на протяжении всего времени инкубации: она менялась от $38,0 \pm 13,8$ % после 1 ч инкубации до $28,6 \pm 5,3$ % спустя 4,5 ч инкубации. Отсюда был сделан вывод, что скорость деградации полноразмерных модифицированных дцРНК практически компенсировалась скоростью их высвобождения с поверхности НЧЗ.

Далее было изучено влияние дополнительных слоев на сохранение дуплексов модифицированных siРНК в «цитозоле». Ассоциаты с одним (PEG) и двумя (PEG-PEI) дополнительными слоями сильнее деградировали после 1 ч инкубации, чем однослойные ($73,4 \pm 3,7$ и $63,8 \pm 4,1$ против $46,6 \pm 9,4$ % соответственно), однако после 22 ч инкубации уровень деградации однослойных и двухслойных ассоциатов был очень близок: $73,7 \pm 4,5$ % и $75,6 \pm 6,1$ % соответственно.

Доля свободных дуплексов составила $13,0 \pm 1,6$ % для двухслойных и $21,1 \pm 6,1$ % для трехслойных ассоциатов после часовой инкубации. После 22 ч инкубации в «цитозоле» из двухслойных ассоциатов десорбировалось $12,9 \pm 1,2$ % дуплексов.

Таким образом, в течение 4 ч, требующихся обычно для трансфекции [408], ассоциаты НЧЗ с дцРНК, содержащими две ФГ-группы на дуплекс, продемонстрировали высокую устойчивость к деградации по сравнению с ассоциатами НЧЗ с немодифицированными дцРНК и высокую способность к высвобождению полноразмерных дуплексов.

4.4.6 Создание многослойных конструкций на основе НЧЗ для доставки дцРНК в клетки

Второй подход для защиты терапевтических НК от разрушения во внутриклеточной среде, представленный в работе, заключался в защите ассоциатов НК и НЧЗ липидной

оболочкой с добавлением конъюгата стеарата и аргинин-содержащего пептида, синтезированного Е.К. Апарциным (ЛХРНК ИХБФМ) (рис. 63А). В состав липидной оболочки входил DOPE, который должен повышать эффективность выхода наночастиц из эндосом за счет своей способности к слиянию с клеточными мембранами [409]. Допирование наноконструкций амфифильным белком должно было повысить эффективность трансфекции [410]. Синтез липидов, подбор состава и условий формирования липосом, а также работа с клеточными культурами были проведены И.С. Довыденко (ЛСБ ИХБФМ).

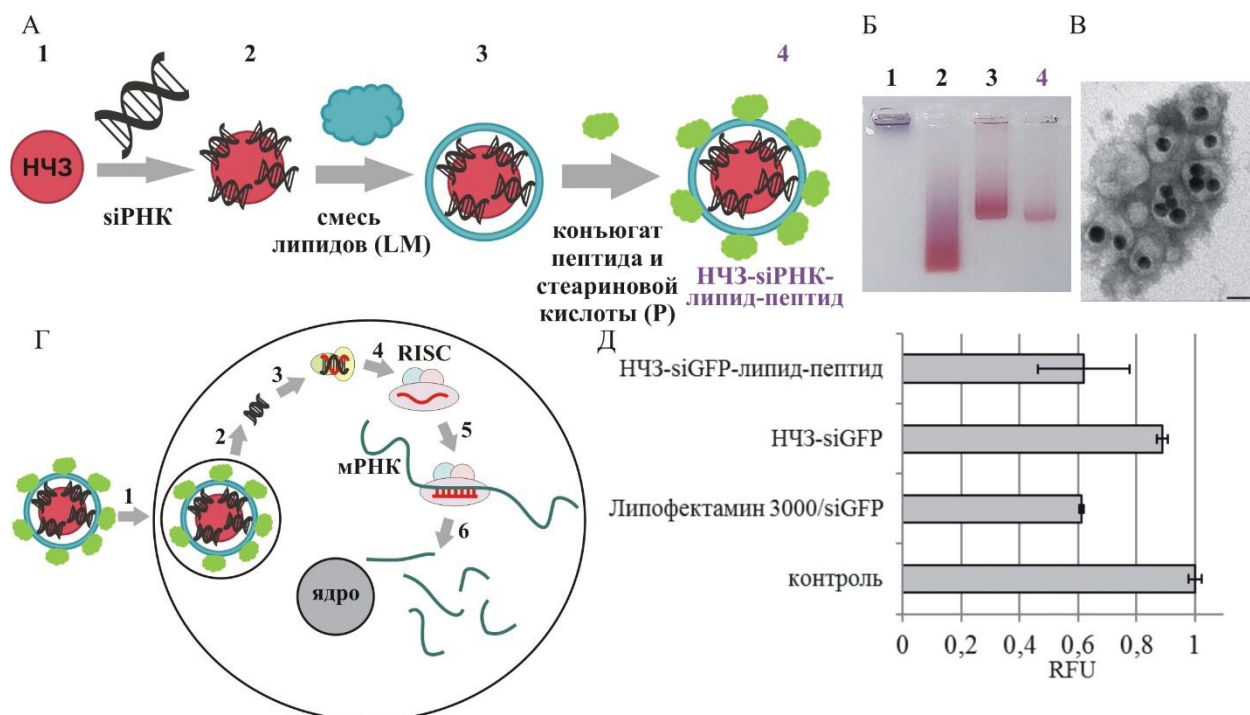


Рисунок 63. Биологическая активность многослойных ассоциатов H43-siGFP-липид-пептид: А – схема сборки многослойных ассоциатов H43-siGFP-липид-пептид, Б – электрофоретический анализ ассоциатов (1 – H43, 2 – H43-siGFP, 3 – H43-siGFP-липид, 4 – H43-siGFP-липид-пептид), В – анализ ассоциатов - H43-siGFP-липид-пептид с помощью ПЭМ, Г – схематическое изображение механизма биологического действия siRNA (1 – проникновение ассоциатов H43-siGFP-липид-пептид в клетку, 2 – высвобождение siRNA в цитоплазму, 3 – образование RISC-загрузочного комплекса, 4 – диссоциация siRNA в составе белкового комплекса RISC, 5 – распознавание целевой мРНК, 6- расщепление целевой мРНК), Д – подавление синтеза белка GFP siRNA, доставленной в составе H43-siGFP-липид-пептид и с помощью Липофектамина 3000, в клетках HEK-Phoenix; гистограмма построена с использованием нормализованных средних значений флуоресценции клеток ($RFU = RFU \text{ образца} / RFU \text{ контроля}$) после трансфекции; в каждой выборке насчитывалось более 10000 событий, средние значения получены по трем независимым экспериментам.

Многослойные ассоциаты формировали, подвергая раствор ассоциатов H43-НК в колбе с предформированной липидной пленкой действию ультразвука в течение 15 мин при 25 °С. Допирование ассоциатов пептидными конъюгатами осуществлялось под действием ультразвука в течение 5 мин при 25 °С. Сформированные многослойные ассоциаты имели

гидродинамический диаметр $127,1 \pm 13,4$ нм и ζ -потенциал $-21,5 \pm 6,6$ мВ. Сохранность олигонуклеотидного слоя внутри липосомы оценивали по интенсивности флуоресценции содержащей флуорофор sense-цепи. Доля вытесненного олигонуклеотидного покрытия составила $36,7 \pm 4,0$ %, при этом было показано, что эта потеря НК равна доле вытесненной НК с поверхности НЧЗ под действием ультразвука той же продолжительности, что требуется при создании липидной оболочки вокруг НЧЗ-НК ($37,0 \pm 1,1$ %). Изменение электрофоретической подвижности ассоциатов на основе НЧЗ на всех этапах сборки свидетельствует о количественном получении многослойной конструкции увеличенного диаметра (рис. 63 Б), что было подтверждено с помощью ПЭМ (рис. 63 В).

Эффективность подавления синтеза белка GFP в клетках HEK-Phoenix ассоциатами НЧЗ-siGFP-липид-пептид (рис. 63 Г) исследовали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Концентрация siРНК при трансфекции составила 12,5 нМ как в составе многослойных ассоциатов с НЧЗ, так и в образце с Липофектамином 3000. Трансфекция ассоциатами НЧЗ-siGFP привела к снижению флуоресценции на 11,2 % (рис. 63 Д), показав неспособность исходных ассоциатов к эффективной доставке в клетки. При трансфекции клеток ассоциатами НЧЗ-siGFP-липид-пептид наблюдали снижение флуоресцентного сигнала до 38 % (рис. 63 Д). Такой же эффект (39 %) наблюдался при аналогичной трансфекции siGFP в присутствии Липофектамина 3000. Существенное снижение уровня флуоресценции свидетельствует об эффективной доставке многослойной конструкции в клетки HEK Phoenix, высвобождении siРНК из состава ассоциатов и ингибировании синтеза GFP.

Из результатов четвертого этапа работы можно сделать следующие заключения:

- процесс получения ассоциатов НЧЗ с дцНК значительно отличается от получения ассоциатов НЧЗ-оцНК и требует больше времени, однако полученное покрытие также достаточно устойчиво к вытеснению другими соединениями при создании многослойных ассоциатов и может обеспечивать высокую плотность загрузки поверхности НЧЗ молекулами НК;
- можно увеличить реакционный объем при получении ассоциатов в 10 раз, а также хранить готовые ассоциаты до 7 месяцев без изменений в олигонуклеотидном покрытии;
- для защиты НК, нековалентно сорбированных на поверхности НЧЗ, от разрушения реагентами с нуклеазной активностью можно успешно применять как химическую модификацию фосфатных групп НК, так и создание дополнительных защитных слоев ассоциата;

- всего двух ФГ-групп фосфатной группы в составе одной из цепей РНК-дуплекса или в составе оцДНК достаточно, чтобы обеспечить высвобождение в раствор 29 и 64 % загруженной полноразмерной НК соответственно;
- многослойная конструкция на основе ассоциата НЧЗ-siРНК и липидной оболочки обеспечивает эффективное подавление гена GFP в клетках и демонстрирует потенциальную возможность использования ассоциатов НЧЗ-НК для внутриклеточной доставки терапевтических НК.

4.5 Заключение

В представленной работе предложен простой и удобный способ получения нековалентных ассоциатов на основе сферических наночастиц золота (НЧЗ) и тиол-несодержащих нуклеиновых кислот (НК). Способ заключается в инкубации НЧЗ и НК в течении 30 минут при 56 °С в случае одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов и 24 ч при 25 °С для дуплексов олигорибонуклеотидов. При это НЧЗ представляют собой коллоидный раствор, используемый непосредственно после их синтеза («сразу после синтеза»), т.е. без изменения его состава. В этих условиях способ обеспечивает прочное нековалентное покрытие поверхности НЧЗ НК разного типа (одноцепочечными и двуцепочечными ДНК и РНК, в том числе содержащими незаряженные модифицированные фосфатные группы). В рамках указанного подхода показана возможность создания многослойных конструкций, содержащих последующие слои белковых молекул, полиэтиленгликоля или липидов, служащие защитой нуклеотидного материала от действия нуклеаз. Показано, что нековалентное олигонуклеотидное покрытие устойчиво к вытеснению высокомолекулярными соединениями, содержащими тиольную группу -SH и способными к образованию ковалентной связи Au-S (альбумины, полиэтиленгликоль с тиольной группой). В то же время низкомолекулярные тиол-содержащие соединения (глутатион, ДТТ, тиогликолевая кислота и т.д.) эффективно вытесняют молекулы НК, нековалентно сорбированные на поверхности НЧЗ.

В работе представлена оригинальная методика безметочной (label-free) оценки аффинности олигонуклеотидов к НЧЗ путем электрофоретического анализа ассоциатов НЧЗ и НК в агарозном геле без применения интеркаляторов и средств визуализации. Проведен фундаментальный анализ адсорбции олигонуклеотидов на поверхности НЧЗ в зависимости от многих факторов (продолжительности и температуры инкубации, длины, заряда и нуклеотидной последовательности НК). Представлена количественная оценка аффинности ряда олигонуклеотидов к НЧЗ. Показано, что ряд олигонуклеотидов обладает высокой аффинностью к НЧЗ, характеризующейся наномольными значениями равновесной константы диссоциации.

Впервые в данной работе проведен анализ высокопроизводительного секвенирования пула ДНК-последовательностей, отобранных в процессе селекции *in vitro* к НЧЗ. Показано влияние последовательности олигонуклеотидов на их сродство к НЧЗ: в результате селекции *in vitro* обогащаются G,T,A-богатые последовательности ДНК, обедняются C-богатые последовательности ДНК. Установлено, что высокоструктурированные олигонуклеотиды обладают пониженным сродством к НЧЗ, а

неструктурированные и шпилечные олигонуклеотиды проявляют повышенное сродство к НЧЗ. Предложен механизм взаимодействия шпилечных олигонуклеотидов с поверхностью НЧЗ.

Представлена оценка влияния масштабирования реакционного объема при получении ассоциатов НЧЗ и дуплексов НК на эффективность адсорбции НК на поверхность НЧЗ. Показана стабильность ассоциатов НЧЗ и НК при хранении в течение длительного срока (до 7 месяцев) без существенного изменения физико-химических свойств ассоциатов НЧЗ и НК. Проведена оценка стабильности ассоциатов НЧЗ и дуплексов НК в растворе, имитирующем сыворотку крови, и возможности пролонгированного выделения полноразмерных дуплексов НК с поверхности НЧЗ в раствор. Показана потенциальная возможность использования ассоциатов НЧЗ-НК для внутриклеточной доставки терапевтических НК на примере многослойной конструкции на основе ассоциатов НЧЗ-siРНК и липидной оболочки, обеспечившей эффективное подавление гена GFP в клетках. Полученные результаты позволяют заключить, что разработанные многослойные конструкции могут быть использованы для эффективной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в эукариотические клетки и являются многообещающими инструментами терапии на уровне мРНК.

5 ВЫВОДЫ

1. Разработан способ создания нековалентных ассоциатов наночастиц золота (НЧЗ) и олигонуклеотидов (НК), заключающийся в инкубации тиол-несодержащих НК и сферических цитрат-стабилизированных НЧЗ без изменения состава коллоидного раствора последних. Способ обеспечивает:

- возможность оценки сродства НК к НЧЗ методом электрофоретического разделения в агарозном геле при титровании НЧЗ олигонуклеотидом;
- высокую стабильность олигонуклеотидного покрытия и его контролируемую загрузку на поверхность НЧЗ в зависимости от длины, последовательности НК (до 150 молекул одноцепочечного гексануклеотида или 160 дуплексов длиной 21 пар оснований на одну НЧЗ);
- возможность декорирования нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК белками или полиэтиленгликолем для применения в биологических средах.

2. Изучено влияние последовательности и структуры одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов на взаимодействие с наночастицами золота. Установлено, что:

- аффинность гомоолигонуклеотидов равной длины (26-меров) изменяется в ряду $T > A > C$ (равновесные константы диссоциации K_D составили $1,8 \pm 0,3$, 6 ± 1 , и 18 ± 3 нМ соответственно);
- реализация внутримолекулярного стэкинг-взаимодействия и комплементационные взаимодействия между азотистыми основаниями НК негативно сказываются на сродстве НК к НЧЗ;
- G,T,A-богатые олигонуклеотиды, не имеющие стабильной вторичной структуры, проявляют повышенную аффинность к НЧЗ.

3. Предложен механизм взаимодействия олигонуклеотидов с НЧЗ, предполагающий первоначальное связывание конформационно подвижных азотистых оснований в структуре олигомера с последующей реорганизацией цепи последнего для обеспечения множественных контактов, преимущественно гидрофобных, между НК и поверхностью НЧЗ.

4. Показана возможность масштабирования реакционного объема при получении ассоциатов НЧЗ-НК и их коллоидная стабильность во время длительного хранения (до 7 мес.) без существенных изменений олигонуклеотидного покрытия.

5. Исследован потенциал нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК для внутриклеточной доставки терапевтических НК:

- показана пролонгированная десорбция полноразмерных олигорибонуклеотидов из ассоциатов НЧЗ-НК при выдерживании НЧЗ-НК в биологических средах;
- продемонстрирована стабильность НК, содержащих на 3'-конце два фосфорилгуанидиновых остатка, к действию нуклеаз, входящих в состав сыворотки FBS и бактериального цитозоля;
- показано эффективное подавление гена GFP с помощью многослойной конструкции НЧЗ-siРНК-липид.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ABTS - 2,2' -азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)
- ACE – аффинный капиллярный электрофорез
- AP - буферный раствор щелочной фосфатазы
- α -TOS - полиэтиленгликоль- α -токоферилсукцинат
- BIDBE - (N,N`-бис( $\alpha$ -йодацетил)-2,2`-дитиобис(этиламин))
- BSA – сывороточный альбумин быка
- BSPP - бис(п-сульфонатофенил)фенилфосфин дикалия дигидрат
- CSP - двумерный ядерный магнитный резонанс
- CTAB – бромид гексадецилтриметиламмония
- CuAAC - катализируемое Cu (I) азид-алкин циклоприсоединение
- DLS - динамическое светорассеяние
- DMF – диметилформамид
- DMSO – диметилсульфоксид
- dpptm - 1,1-бис(дифенилфосфино)метан
- dprrp - 1,3-бис(дифенилфосфино)пропан
- DTT - бис(сульфанил)бутан-2,3-диол
- EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
- EG – этиленгликоль
- EMSA – анализ сдвига электрофоретической подвижности
- FAM – фосфитамида флуоресцеина
- FBS – сыворотка телят
- FTIR – инфракрасная Фурье-спектроскопия
- GFP - зеленый флуоресцентный белок
- GSH - глутатион
- HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота
- HRE - белок с последовательностью Ala-His-His-Ala-His-His-Ala-Ala-Asp
- HSA– сывороточный альбумин человека
- HURP - нерегулярный белок гепатомы
- IgG – иммуноглобулин класса G
- IgM - иммуноглобулин класса M
- IOD – интегральная оптическая плотность
- K_D – константа диссоциации
- KRAzR – фоточувствительный пептид с последовательностью Lys-Arg-азобензол-Arg
- logP - коэффициент распределения между фазами

LSPR – локализованный поверхностный плазмонный резонанс
 MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с использованием времяпролетного масс-спектрометра
 MCH – меркаптогексанол
 MOPS - 3-(N-морфолино)пропансульфокислота
 mPEG-SH – тиолированный метоксиполи(этиленгликоль)
 MUA – меркаптоундекановая кислота
 NEXAFS - тонкая структура близкоуглового рентгеновского поглощения
 PAA – полиакриловая кислота
 PAMAM – поли(амидоамин)
 PBS-фосфатно-солевой буферный раствор
 PCA - принципиальный компонентный анализ
 PDDAC - полиэтилендиаллилдиметиламин гидрохлорид
 PDMAEMA – поли(диметиламиноэтил метакрилат)
 PEG - полиэтиленгликоль
 PEI - полиэтиленимин
 PMMA – поливинилметакрилат
 PNA - пептидные нуклеиновые кислоты
 polyA – полиаденилат
 polyG - полигуанидилат
 polyT – политимидилат
 PSS – полистиролсульфонат
 Pu - пурин
 PVAc – поливинилацетат
 Py - пиримидин
 QCM - пьезокварцевое микровзвешивание
 RFU- относительные единицы флуоресценции
 SAXS - малоугловое рентгеновское рассеяние
 SCS – рассеивающая корреляционная спектроскопия
 SDS - додецилсульфат натрия
 SELEX – систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением
 SEL-Seq - однораундовое обогащение лигандов с глубоким секвенированием
 SERS – поверхностно усиленная спектроскопия комбинационного рассеяния
 SNP - однонуклеотидная замена
 SPEET – поверхностный плазмонный усиленный перенос энергии

SPION - суперпарамагнитные наночастицы оксида железа
 SPR - спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса)
 STI - ингибитор соевого трипсина Кунитца
 TBE – трис-боратный буферный раствор
 TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
 TGA – тиогликолевая кислота
 XANES – блискоугловая спектроскопия рентгеновского поглощения
 XPS - рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

АТФ – аденозинтрифосфат
 АСМ – атомная силовая микроскопия
 ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 дц – двуцепочечная
 ДЭС - двойной электронный слой
 е.а. - единиц активности
 ИК – инфракрасный
 КОЕ – колониеобразующая единица
 миРНК - микроРНК
 мол. – молекула
 нт. – нуклеотид
 НК – нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты)
 НКЗ - нанокристаллы золота
 НЧ – наночастицы
 НЧЗ - наночастицы золота
 НЧС – наночастицы серебра
 об./мин- оборотов в минуту
 оц - одноцепочечная
 ПААГ - полиакриламидный гель
 п.нт. – пар нуклеотидов
 ПЦР - полимеразная цепная реакция
 ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия
 РНК - рибонуклеиновая кислота
 СТМ – сканирующая трансмиссионная микроскопия
 теория ДЛФО - теория Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан

УЗ – ультразвуковой

УФ – ультрафиолетовый

ФГ-группа - (1,3-диметил-2-имидазолидиниминофосфорильная группа

част. – частица

ЭФ – электрофорез, электрофоретический

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ζ-потенциал - дзета-потенциал

k-нуклеотиды - последовательности, состоящие из k нуклеотидов

РО-НК – нуклеиновая кислота с немодифицированными фосфатными группами

PS-НК – нуклеиновая кислота с фосфотиоатной модификацией

SH-НК – нуклеиновая кислота с тиольной группой

siРНК - малые интерферирующие РНК

7 СПИСОК ТЕРМИНОВ

Ассоциаты наночастиц и нуклеиновых кислот: межмолекулярные образования на основе нековалентных взаимодействий наночастиц и нуклеиновых кислот.

Ковалентные ассоциаты: межмолекулярные образования на основе ковалентных связей наночастиц и нуклеиновых кислот.

Поверхностная плотность нуклеиновых кислот: количество адсорбированных молекул (или дуплексов) нуклеиновых кислот на одну наночастицу золота.

Слипание НЧЗ: в широком смысле и агрегация, и агломерация наночастиц.

8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Busatto S., Pham A., Suh A., Shapiro S., Wolfram J. Organotropic drug delivery: Synthetic nanoparticles and extracellular vesicles // *Biomed. Microdevices*. - 2019. V. 21. - P. 46.
2. Elahi N., Kamali M., Baghersad M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles : A review // *Talanta*. - 2018. - V. 184. - P. 537–556.
3. Li-na M. A., Dian-jun L. I. U., Zhen-xin W. Synthesis and Applications of Gold Nanoparticle Probes // *Chinese J. Anal. Chem.* - 2010. - V. 38. - P. 1–7.
4. Letsinger R. L., Mirkin C. A., Elghanian R., Mucic R. C., Storhoff J. J. Chemistry of Oligonucleotide-Gold Nanoparticle Conjugates // *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. - 1999. - V. 144–146. - P. 359–362.
5. Oh J., Park D. H., Joo J. H., Lee J. Recent advances in chemical functionalization of nanoparticles with biomolecules for analytical applications // *Anal Bioanal Chem.* - 2015. - V. 407. - P. 8627–8645.
6. Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine // *Chem. Rev.* - 2015. - V. 115. - P. 10410–10488.
7. Tokonami S., Yamamoto Y., Shiigi H., Nagaoka T. Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review // *Anal. Chim. Acta*. - 2012. - V. 716. - P. 76–91.
8. Lacerda S. H. De P., Park J. J., Meuse C., Pristinski D., Becker M. L., Karim A., Douglas J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins // *ACS Nano*. - 2010. - V. 4. - P. 365–379.
9. Rehbock C., Merk V., Gamrad L., Streubel R., Barcikowski S. Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2013. - V. 15. - P. 3057–3067.
10. Krishnakanth K. N., Chandu B., Bharathi M. S. S., Kumar Raavi S. S., Rao S. V. Ultrafast excited state dynamics and femtosecond nonlinear optical properties of laser fabricated Au and Ag50Au50 nanoparticles // *Opt. Mater. (Amst)*. - 2019. - V. 95. - P. 109239.
11. Mizutaru T., Sakuraba T., Nakayama T., Marzun G., Wagener P., Rehbock C., Barcikowski S., Murakami K., Fujita J., Ishii N., Yamamoto Y. Cysteine-containing oligopeptide β -sheets as redispersants for agglomerated metal nanoparticles // *J. Mater. Chem. A*. - 2015. - V. 3. - P. 17612–17619.
12. Merk V., Rehbock C., Becker F., Hagemann U., Nienhaus H., Barcikowski S. In situ non-DLVO stabilization of surfactant-free, plasmonic gold nanoparticles: effect of Hofmeister's anions // *Langmuir*. - 2014. - V. 30. - P. 4213–4222.
13. Wang P., Wang X., Wang L., Hou X., Liu W., Chen C. Interaction of gold nanoparticles with

proteins and cells // *Sci. Technol. Adv. Mater.* - 2015. - V. 16. - P. 34610.

14. Verma M. S., Rogowski J. L., Jones L., Gu F. X. Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles // *Biotechnol. Adv.* - 2015. - V. 33. - P. 666–680.

15. Sapsford K. E., Algar W. R., Lorenzo B., Gimmill K. B., Casey B. J., Oh E., Stewart M. H., Medintz I. L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules developing chemistries that facilitate nanotechnology // *Chem. Rev.* - 2013. - V. 113. - P. 1904–2074.

16. Weare W. W., Reed S. M., Warner M. G., Hutchison J. E. Improved synthesis of small (dCORE $\approx$ 15 nm) phosphine-stabilized gold nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2000. - V. 122. - P. 12890–12891.

17. Leff D. V., Brandt L., Heath J. R. Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines // *Langmuir*. - 1996. - V. 12. - P. 4723–4730.

18. Chen F., Wang Y., Ma J., Yang G. A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by Tris (hydroxymethyl) aminomethane // *Nanoscale Res. Lett.* - 2014. - V. 9. - P. 220.

19. Park G., Seo D., Chung I. S., Song H. Poly(ethylene glycol)- and carboxylate-functionalized gold nanoparticles using polymer linkages: Single-step synthesis, high stability, and plasmonic detection of proteins // *Langmuir*. - 2013. - V. 29. - P. 13518–13526.

20. Zhu J., Fu F., Xiong Z., Shen M., Shi X. Dendrimer-entrapped gold nanoparticles modified with RGD peptide and alpha-tocopheryl succinate enable targeted theranostics of cancer cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2015. - V. 133. - P. 36–42.

21. Baker J. R., Shi X., Wang S., Meshinchi S., Antwerp M. E. Van, Bi X., Lee I., Baker J. R. Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targeting and imaging // *Small*. - 2007. - V. 3. - P. 1245–1252.

22. Xu Y., Palchoudhury S., Qin Y., MacHer T., Bao Y. Make conjugation simple: a facile approach to integrated nanostructures // *Langmuir*. - 2012/ - V. 28. - P. 8767–8772.

23. Mocan L., Matea C., Pop T., Iancu C. Photothermal treatment of liver cancer with albumin-conjugated gold nanoparticles initiates Golgi Apparatus – ER dysfunction and caspase-3 apoptotic pathway activation by selective targeting of Gp60 receptor // *Int J Nanomedicine*. - 2015. - V. 10. - P. 5435–5445.

24. Ravindra P. Protein-mediated synthesis of gold nanoparticles // *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* - 2009. - V. 163. - P. 93–98.

25. Zheng Y., Ma Y., Zeng J., Zhong X., Jin M., Li Z., Xia Y. Seed-Mediated Synthesis of Single-Crystal Gold Nanospheres with Controlled Diameters // *Chem. Asian J.* - 2013. - V. 8. - P. 792 – 799 2013.

26. Hussain S., Pang Y. Surface geometry of tryptophan adsorbed on gold colloidal nanoparticles

// J. Mol. Struct. - 2015. - V. 1096. - P. 121–128.

27. Polte J., Ahner T. T., Delissen F., Sokolov S., Emmerling F., Thünemann A. F., Kraehnert R. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation // J. Am. Chem. Soc. - 2010. - V. 132. - P. 1296–1301.

28. Slocik J. M., Wright D. W. Biomimetic mineralisation of noble metal nanocluster // Biomacromolecules. - 2003. - V. 4. - P. 1135–1141.

29. Park J. W., Shumaker-Parry J. S. Strong resistance of citrate anions on metal nanoparticles to desorption under thiol functionalization // ACS Nano. - 2015. - V. 9. - P. 1665–1682.

30. Islam M. A., Atia M. A., Macka M., Paull B., Mahbub P. Electrochemical characterisation of nanoparticulate zirconium dioxide-on-gold electrode for electrochemical detection in flow-based analytical systems // Electrochim. Acta. - 2019. - V. 318. - P. 61–68.

31. Khashayar P., Amoabediny G., Larijani B., Hosseini M., Verplancke R., Schaubroeck D., Keersmaecker M. D., Adriaens A., Vanfleteren J. Characterization of gold nanoparticle layer deposited on gold electrode by various techniques for improved sensing abilities // Biointerface Res Appl Chem. – 2016. – V. 6. – P. 1380-1390.

32. Sato Y., Mizutani F. Formation and characterization of aromatic selenol and thiol monolayers on gold: In-situ IR studies and electrochemical measurements // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2004. - V. 6. - P. 1328–1331.

33. Zin M. T., Yip H. L., Wong N. Y., Ma H., Jen A. K. Y. Arrays of covalently bonded single gold nanoparticles on thiolated molecular assemblies // Langmuir. - 2006. - V. 22. - P. 6346–6351.

34. Azca J. C., Addato F., Rubert A., Moreno S. K., Ben G., Zelaya E., Salvarezza R. C., Fonticelli M. H. Surface chemistry of thiomalic acid adsorption on planar gold and gold nanoparticles // Langmuir. - 2014. - V. 30. - P. 1820–1826.

35. Woehrle G. H., Hutchison J. E. Thiol-functionalized undecagold clusters by ligand exchange: Synthesis, mechanism, and properties // Inorg. Chem. - 2005. - V. 44. - P. 6149–6158.

36. Mingos D. M. P. Bonding in molecular clusters and their relationship to bulk metals // Chem. Soc. Rev. - 1986. - V. 15. - P. 31–61.

37. Пичугина Д.А., Кузьменко Н.Е., Шестаков А. Ф. Индивидуальные кластеры золота, стабилизированные лигандами: строение, синтез и применение // Успехи химии. - 2015. - V. 84. - P. 1114–1144.

38. Velden J. W. A. van der, Vollenbroek F. A., Bour J. J., Beurskens P. T., Smits J. M. M., Bosman W. P.. Gold clusters containing bidentate phosphine ligands Preparation and X-Ray structure investigation of $[\text{Au}_5(\text{dppm})_3(\text{dppm})](\text{NO}_3)_2$ and $[\text{Au}_{13}(\text{dppmH})_6](\text{NO}_3)_n$ // Recueil,

- J. R. Netherlands Chem. Soc. - 1981. - V. 100. - P. 148–152.
39. Shichibu Y., Zhang M., Kamei Y., Konishi K. [Au 7] 3+ : a missing link in the four-electron gold cluster family // J. Am. Chem. Soc. - 2014. - V. 136. - P. 12892–12895.
40. Gutrath B. S., Oppel I. M., Presly O., Beljakov I., Meded V., Wenzel W., Simon U. [Au 14 (PPh 3) 8 (NO 3) 4]: an example of a new class of Au(NO 3)-ligated superatom complexes // Angew. Chemie - Int. Ed. - 2013. - V. 52. - P. 3529–3532.
41. Kamei Y., Shichibu Y., Konishi K. Generation of small gold clusters with unique geometries through cluster-to-cluster transformations: Octanuclear clusters with edge-sharing gold tetrahedron motifs // Angew. Chemie - Int. Ed. - 2011. - V. 50. - P. 7442–7445.
42. Yang Y., Zhong S., Wang K., Huang J. Gold nanoparticle based fluorescent oligonucleotide probes for imaging and therapy in living systems // Analyst. - 2019. - V. 144. - P. 1052–1072.
43. Brown K. A., Park S., Hamad-Schifferli K. Nucleotide-surface interactions in DNA-modified Au-nanoparticle conjugates: sequence effects on reactivity and hybridization // J. Phys. Chem. C. - 2008. - V. 112. - P. 7517–7521.
44. Shenhar R., Rotello V. M. Nanoparticles: scaffolds and building blocks // Acc. Chem. Res. - 2003. - V. 36. - P. 549–561.
45. Liu S. F., Li J. R., Jiang L. Surface modification of platinum quartz crystal microbalance by controlled electroless deposition of gold nanoparticles and its enhancing effect on the HS-DNA immobilization // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. - 2005. - V. 257–258. - P. 57–62.
46. Li, Z. Jin, R. Mirkin C, A. Letsinger R L. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates // Nucleic Acids Res. - 2002. - V. 30. - P. 1558–1562.
47. Pallares R. M., Choo P., Cole L. E., Mirkin C. A., Lee A., Odom T. W. Manipulating immune activation of macrophages by tuning the oligonucleotide composition of gold nanoparticles // Bioconjug. Chem. - 2019. - V. 30. - P. 2032–2037.
48. Porter, L. A., Ji D., Westcott S. L., Graupe M., Czernuszewicz R. S., Halas N. J., Lee T. R. Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides // Langmuir. - 1998. - V. 14. - P. 7378–7386.
49. Letsinger R. L., Elghanian R., Viswanadham G., Mirkin C. A. Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates // Bioconjug. Chem. - 2000. - V. 11. - P. 289–291.
50. Kon K., Kuwahara T., Shimomura M. Detection of a complementary couple of single-stranded DNAs by use of a quartz crystal device for determination of bacteria // J. Biosci. Bioeng. - 2011. - V. 111. - P. 242–245.
51. Reynolds R. A., Mirkin C. A., Letsinger R. L. Homogeneous, nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides // J. Am. Chem. Soc. - 2000. - P. 3795–3796.

52. Willey T. M., Vance A. L., Bostedt C., Van Buuren T., Meulenberg R. W., Terminello L. J., Fadley C. S. Surface structure and chemical switching of thioctic acid adsorbed on au(111) as observed using near-edge x-ray absorption fine structure // *Langmuir*. - 2004. - V. 20. - P. 4939–4944.
53. Lee J., Lytton-jean A. K. R., Hurst S. J., Mirkin C. A. Silver nanoparticle-oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties // *Nano Lett.* - 2007. - V. 7. - P. 2112–2115.
54. Dubois L. H. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces // *Annu. Rev. Phys. Chem.* - 1992. - V. 43. - P. 437–463.
55. Ansar S. M., Perera G. S., Jiang D., Holler R. A., Zhang D. Organothiols self-assembled onto gold: Evidence for deprotonation of the sulfur-bound hydrogen and charge transfer from thiolate // *J. Phys. Chem. C*. - 2013. - V. 117. - P. 8793–8798.
56. Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I. Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalyzed precipitation of an insoluble product onto electrodes // *Chem. - A Eur. J.* - 2003. - V. 9. - P. 1137–1145.
57. Niemeyer C. M., Ceyhan B. DNA-directed functionalization of colloidal gold with proteins // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2001. - V. 40. - P. 3685.
58. Fazio A. F. De, Haines J., Courtier A., Muskens O. L., Kanaras A. G. Optical response of gold and upconversion nanoparticles assembled via DNA interaction. In *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XIV* // *Proc. SPIE*. - 2019. - V. 10892.
59. Patolsky F., Ranjit K. T., Lichtenstein A., Willner I. Dendritic amplification of DNA analysis by oligonucleotide- functionalized Au-nanoparticles // *Chem. Commun.* - 2000. - V. 1. - P. 1025–1026.
60. Liu T., Tang J., Jiang L. The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2004. - V. 313. - P. 3–7.
61. Liu J., Tian S., Tiefenauer L., Nielsen P. E., Knoll W. Simultaneously amplified electrochemical and surface plasmon optical detection of DNA hybridization based on ferrocene-streptavidin conjugates // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77. - P. 2756–2761.
62. Uznanski P., Kurjata J., Bryszewska E. Modification of gold nanoparticle surfaces with pyrenedisulfide in ligand-protected exchange reactions // *Mater. Sci. Pol.* - 2009. - V. 27. - P. 659–670.
63. Boal A. K., Rotello V. M. Fabrication and self-optimization of multivalent receptors on nanoparticle scaffolds // *J. Am Chem Soc.* - 2000. - V. 122. - P. 734–735.
64. Dulkeith E., Morteani A. C., Niedereichholz T., Klar T. A., Feldmann J., Levi S. A., van Veggel F. C. J. M., Reinhoudt D. N., Möller M., Gittins D. I. Fluorescence quenching of dye

molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects // *Phys. Rev. Lett.* - 2002.- V. 89. - P. 12–15.

65. Sabatani E., Cohen-Boulakia J., Bruening M., Rubinstein I. Thioaromatic monolayers on gold: a new family of self-assembling monolayers // *Langmuir*. - 1993. - V. 9. - P. 2974–2981.

66. Fujiwara K., Watarai H., Itoh H., Nakahama E., Ogawa N. Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2006. - V. 386. - P. 639–644.

67. Cheuquepán W., Pérez J. M., Orts J. M., Rodes A. Spectroelectrochemical and DFT study of thiourea adsorption on gold electrodes in acid media // *J. Phys. Chem. C*. - 2014. - V. 118. - P. 19070–19084.

68. Zhang D., Ansar S. M. Ratiometric surface enhanced Raman quantification of ligand adsorption onto a gold nanoparticle // *Anal. Chem.* - 2010. - V. 82. - P. 5910–5914.

69. Kitai T., Watanabe Y., Toyoshima Y. Y., Kobayashi T., Murayama T., Sakaue H., Suzuki H., Takahagi T. Simple method of synthesizing nickel-nitrilotriacetic acid gold nanoparticles with a narrow size distribution for protein labeling // *Jpn. J. Appl. Phys.* - 2011. - V. 50. - P. 095002.

70. Abad J. M., Mertens S. F. L., Pita M., Fernández V. M., Schiffrin D. J. Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005.- V. 127. - P. 5689–5694.

71. Li J., Hu J., Zhou F., Yan W., Wang J., Baca A. J., Pang D.-W. Amplified voltammetric detection of DNA hybridization via oxidation of ferrocene caps on gold nanoparticle/streptavidin conjugates // *Anal. Chem.* - 2003. - V. 75. - P. 3941–3945.

72. Oh E., Hong M. Y., Lee D., Nam S. H., Yoon H. C., Kim H. S. Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 127. - P. 3270–3271.

73. Hermanson G. T. Preparation of colloidal-gold-labeled proteins. In Hermanson G. T. ed. *Bioconjugate techniques* // Academic Press. - 1996. - P. 593–604.

74. Chu X., Zhao Z. L., Shen G. L., Yu R. Q. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex // *Sensors Actuators, B Chem.* - 2006. - V. 114. - P. 696–704.

75. Wang A., Vangala K., Vo T., Zhang D., Fitzkee N. C. A three-step model for protein-gold nanoparticle adsorption // *J. Phys. Chem. C*. - 2014. - V. 118. - P. 8134–8142.

76. Penade S. A model system mimicking glycosphingolipid interactions by surface plasmon resonance // *Water*. - 2002. - V. 114. - P. 1624–1627.

77. Tsai C. S., Yu T. Bin, Chen C. T. Gold nanoparticle-based competitive colorimetric assay for detection of protein-protein interactions // *Chem. Commun.* - 2005. - P. 4273–4275.

78. Willner I., Rubin S., Cohen Y. Photoregulated binding of spiropyran-modified concanavalin A to monosaccharide-functionalized self-assembled monolayers on gold electrodes // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. - V. 115. - P. 4937–4938.
79. Nandanan E., Jana N. R., Ying J. Y. Functionalization of gold nanospheres and nanorods by chitosan oligosaccharide derivatives // *Adv. Mater.* - 2008. - V. 20. - P. 2068–2073.
80. Storhoff J. J., Elghanian R., Mucic R. C., Mirkin C. A., Letsinger R. L. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes // *J. Am. Chem. Soc.* - 1998. - V. 120. - P. 1959–1964.
81. Sharma J., Chhabra R., Yan H., Liu Y. A facile in situ generation of dithiocarbamate ligands for stable gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates // *Chem. Commun.* - 2008. - P. 2140–2142.
82. Zhang X., Liu J., Servos M. R., Gouriye T., Göeken K., Gill R. Toward fast and quantitative modification of large gold nanoparticles by thiolated DNA: Scaling of nanoscale forces, kinetics, and the need for thiol reduction // *J. Phys. Chem. C.* - 2013. - V. 117. - P. 15677–15684.
83. Zhang X., Servos M. R., Liu J. Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 7266–7269.
84. Willner I., Amit B., Bardea A., Dagan A., Ben-Dov I. Amplified microgravimetric quartz-crystal-microbalance analyses of oligonucleotide complexes: a route to a Tay–Sachs biosensor device // *Chem. Commun.* - 1998. - V. 382. - P. 839–840.
85. Patolsky F., Katz E., Bardea A., Willner I. Enzyme-linked amplified electrochemical sensing of oligonucleotide-DNA interactions by means of the precipitation of an insoluble product and using impedance spectroscopy // *Langmuir.* - 1999. - V. 15. - P. 3703–3706.
86. Bardea A., Patolsky F., Dagan A., Willner I. Sensing and amplification of oligonucleotide-DNA interactions by means of impedance spectroscopy: A route to a Tay-Sachs sensor // *Chem. Commun.* - 1999. - P. 21–22.
87. Bardea A., Dagan A., Willner I. Amplified electronic transduction of oligonucleotide interactions: novel routes for Tay-Sachs biosensors // *Anal. Chim. Acta.* - 1999. - V. 385. - P. 33–43.
88. Zhou W., Wang F., Ding J., Liu J. Tandem phosphorothioate modifications for DNA adsorption strength and polarity control on gold nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2014. - V. 6. - P. 14795–14800.
89. Kanaras A. G., Kamounah F. S., Schaumburg K., Kiely C. J., Brust M. Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters // *Chem. Commun.* - 2002. - V. 20. - P. 2294–2295.

90. Xu C., Xie J., Ho D., Wang C., Kohler N., Walsh E. G., Morgan J. R., Chin Y. E., Sun S. Au-Fe₃O₄ dumbbell nanoparticles as dual-functional // *Angew. Chemie - Int. Ed.* - 2008. - V. 47. - P. 173–176.
91. Su S., Zuo X., Pan D., Pei H., Wang L., Fan C., Huang W. Design and applications of gold nanoparticle conjugates by exploiting biomolecule-gold nanoparticle interactions // *Nanoscale.* - 2013.- V. 5. - P. 2589–2599.
92. Li J., Zhu B., Zhu Z., Zhang Y., Yao X., Tu S., Liu R., Jia S., Yang C. J. Simple and rapid functionalization of gold nanorods with oligonucleotides using an mPEG-SH/Tween 20-assisted approach // *Langmuir.* - 2015. - V. 31. - P. 7869–7876.
93. Siriwardana K., Gadogbe M., Ansar S. M., Vasquez E. S., Collier W. E., Zou S., Walters K. B., Zhang D. Ligand adsorption and exchange on pegylated gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. C.* - 2014. - V. 118. - P. 11111–11119.
94. Ansar S. M., Haputhanthri R., Edmonds B., Liu D., Yu L., Sygula A., Zhang D. Determination of the binding affinity, packing, and conformation of thiolate and thione ligands on gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. C.* - 2011. - V. 115. - P. 653–660.
95. Tripathi A., Emmons E. D., Christesen S. D., Fountain A. W., Guicheteau J. A. Kinetics and reaction mechanisms of thiophenol adsorption on gold studied by surface-enhanced raman spectroscopy // *J. Phys. Chem. C.* - 2013. - V. 117. - P. 22834–22842.
96. Gadogbe M., Zhou Y., Alahakoon S. H., Perera G. S., Zou S., Pittman C. U., Zhang D. Structures and conformations of alkanedithiols on gold and silver nanoparticles in water // *J. Phys. Chem. C.* - 2015. - V. 119. - P. 18414–18421.
97. Park J. W., Shumaker-Parry J. S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2014. - V. 136. - P. 1907–1921.
98. Maroni P., Montes Ruiz-Cabello F. J., Cardoso C., Tiraferri A. Adsorbed mass of polymers on self-assembled monolayers: Effect of surface chemistry and polymer charge // *Langmuir.* - 2015. - V. 31. - P. 6045–6054.
99. Li G., Li X., Wan J., Zhang S. Dendrimers-based DNA biosensors for highly sensitive electrochemical detection of DNA hybridization using reporter probe DNA modified with Au nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* - 2009. - V. 24. - P. 3281–3287.
100. DeLong R. K., Reynolds C. M., Malcolm Y., Schaeffer A., Severs T., Wanekaya A. Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules // *Nanotechnol. Sci. Appl.* - 2010. - V. 3. - P. 53–63.
101. Cho S., Seong N., Pak J. J. Development of a cheap and portable sensing system for

- electrochemical genotyping. In *Sensors IEEE // Sensors IEEE*. - 2003. - P. 233–236.
102. Tokel O., Inci F., Demirci U. Advances in plasmonic technologies for point of care applications // *Chem. Rev.* - 2014. - V. 114. - P. 5728–5752.
103. Hayashi G., Hagihara M., Nakatani K. RNA aptamers that reversibly bind photoresponsive azobenzene-containing peptides // *Chem. - A Eur. J.* - 2009. - V. 15. - P. 424–432.
104. Dougan J. A., Karlsson C., Smith W. E., Graham D. Enhanced oligonucleotide-nanoparticle conjugate stability using thioctic acid modified oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - V. 35. - P. 3668–3675.
105. Sharma J., Chhabra R., Andersen C. S., Gothelf K. V., Yan H., Liu Y. Toward reliable gold nanoparticle patterning on self-assembled DNA nanoscaffold // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - P. 1–17.
106. Kim Y. H., Jeon J., Hong S. H., Rhim W. K., Lee Y. S., Youn H., Chung J. K., Lee M. C., Lee D. S., Kang K. W., Nam J. M. Tumor targeting and imaging using cyclic RGD-PEGylated gold nanoparticle probes with directly conjugated iodine-125 // *Small*. - 2011. - V. 7. - P. 2052–2060.
107. Ashjari M., Dehfuly S., Fatehi D., Shabani R., Koruji M. Efficient functionalization of gold nanoparticles using cysteine conjugated protoporphyrin IX for singlet oxygen production in vitro // *RSC Adv.* - 2015. - V. 5. - P. 104621–104628.
108. Mugaka B. P., Hu Y., Ma Y., Ding Y. Surface modification of gold nanoparticles for targeted drug delivery. In Pathak Y. V., ed. *Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery* // Springer International Publishing. - 2019. - P. 391–403.
109. Kim Y. P., Daniel W. L., Xia Z., Xie H., Mirkin C. A., Rao J. Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates // *Chem. Commun.* - 2010. - V. 46. - P. 76–78.
110. Pearson D., Downard A. J., Muscroft-Taylor A., Abell A. D. Reversible photoregulation of binding of α -chymotrypsin to a gold surface // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - P. 14862–14863.
111. Szymański W., Beierle J. M., Kistemaker H. A. V., Velema W. A., Feringa B. L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches // *Chem. Rev.* - 2013. - V. 113. - P. 6114–6178.
112. Heuer-Jungemann A., Kiessling L., Stratakis E., Kymakis E., El-Sagheer A. H., Brown T., Kanaras A. G. Programming the assembly of gold nanoparticles on graphene oxide sheets using DNA // *J. Mater. Chem. C*. - 2015. - V. 3. - P. 9379–9384.
113. Bhatt N., Huang P. J. J., Dave N., Liu J. Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents // *Langmuir*. - 2011. - V. 27. - P.

6132–6137.

114. Larson-Smith K., Pozzo D. C. Competitive adsorption of thiolated poly(ethylene glycol) and alkane-thiols on gold nanoparticles and its effect on cluster formation // *Langmuir*. - 2012. - V. 28. - P. 13157–13165.

115. Weidner T., Shaporenko A., Müller J., Höltig M., Terfort A., Zharnikov M. Self-assembled monolayers of aromatic tellurides on (111)-oriented gold and silver substrates // *J. Phys. Chem. C*. - 2007. - V. 111. - P. 11627–11635.

116. Yee C. K., Ulman A., Ruiz J. D., Parikh A., White H., Rafailovich M. Alkyl Selenide- and Alkyl Thiolate-Functionalized Gold Nanoparticles: Chain Packing and Bond Nature // *Langmuir*. - 2003. - V. 19. - P. 9450–9458.

117. Kurashige W., Yamaguchi M., Nobusada K., Negishi Y. Ligand-induced stability of gold nanoclusters: Thiolate versus selenolate // *J. Phys. Chem. Lett.* - 2012. - V. 3. - P. 2649–2652.

118. Huang F. K., Horton R. C., Myles D. C., Garrell R. L. Selenolates as Alternatives to Thiolates for Self-Assembled Monolayers: A SERS Study // *Langmuir*. - 2002. - V. 14. - P. 4802–4808.

119. Laurentius L., McDermott M. T., Stoyanov S. R., Gusarov S., Kovalenko A., Du R., Lopinski G. P. Diazonium-derived aryl films on gold nanoparticles: Evidence for a carbon-gold covalent bond // *ACS Nano*. - 2011. - V. 5. - P. 4219–4227.

120. Downard A. J., Lehr J., Garrett D. J., Flavel B. S., Paulik M., Brooksby P. A., Williamson B. E. Single- and two-component patterning of carbon, metal and silicon substrates by microcontact printing with aryldiazonium salt inks // *Adv. Mater.* - 2010. - V. 82. - P. 7027–7034.

121. Laforgue A., Addou T., Bélanger D. Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryldiazonium cations // *Langmuir*. - 2005. - V. 21. - P. 6855–6865.

122. Paulik M. G., Brooksby P. A., Abell A. D., Downard A. J. Grafting aryl diazonium cations to polycrystalline gold: Insights into film structure using gold oxide reduction, redox probe electrochemistry, and contact angle behavior // *J. Phys. Chem. C*. - 2007. - V. 111. - P. 7808–7815.

123. Shewchuk D. M., McDermott M. T. Comparison of diazonium salt derived and thiol derived nitrobenzene layers on gold // *Langmuir*. - 2009. - V. 25. - P. 4556–4563.

124. Mirkhalaf F., Paprotny J., Schiffrin D. J. Synthesis of metal nanoparticles stabilized by metal-carbon bonds // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - V. 128. - P. 7400–7401.

125. Sohn Y., White J. M. Solely σ -Atop Site Bonding of Phenyl Isocyanide on Au(111)? Comparison with on Cu(111) // *J. Phys. Chem. C*. - 2008. - P. 5006–5013.

126. Lee S. Y., Jang S. H., Cho M. H., Kim Y. M., Cho K. C., Ryu P. D., Gong M. S., Joo S. W. In situ single cell monitoring by isocyanide-functionalized Ag and Au nanoprobe-based Raman spectroscopy // *J. Microbiol. Biotechnol.* - 2009. - V. 19. - P. 904–910.
127. Sang-Woo Joo, Wan-Joong Kim, Wan Soo Yun, Sungu Hwang and I. S. C. Binding of Aromatic Isocyanides on Gold Nanoparticle Surfaces Investigated by Surface-Enhanced Raman Scattering // *Appl. Spectrosc.* - 2004. - V. 58. - P. 218–223.
128. Lee C. R., Kim S. Il, Yoon C. J., Gong M. S., Choi B. K., Kim K., Joo S. W. Size-dependent adsorption of 1,4-phenylenediisocyanide onto gold nanoparticle surfaces // *J. Colloid Interface Sci.* - 2004. - V. 271. - P. 41–46.
129. Joo S. W., Kim W. J., Yoon W. S., Choi I. S. Adsorption of 4,4'-biphenyl diisocyanide on gold nanoparticle surfaces investigated by surface-enhanced Raman scattering // *J. Raman Spectrosc.* - 2003. - V. 34. - P. 271–275.
130. Feilchenfeld H., Weaver M. J. Binding of alkynes to silver, gold, and underpotential-deposited silver electrodes as deduced by surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem.* - 1989. - V. 93. - P. 4276–4282.
131. Wenjing Hong, Hui Li, Shi-Xia Liu, Yongchun Fu, Jianfeng Li, Veerabhadrarao Kaliginedi, Silvio Decurtins and T. W. Trimethylsilyl-terminated oligo(phenylene ethynylene)s: an approach to single-molecule junctions with covalent Au-C sigma-bonds // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 19425–19431.
132. Cheng Z. L., Skouta R., Vazquez H., Widawsky J. R., Schneebeli S., Chen W., Hybertsen M. S., Breslow R., Venkataraman L. In situ formation of highly conducting covalent Au-C contacts for single-molecule junctions // *Nat. Nanotechnol.* - 2011. - V. 6. - P. 353–357.
133. Chen W., Schneebeli S. T., Breslow R., Widawsky J. R., Vázquez H., Venkataraman L., Hybertsen M. S. Highly conducting π -conjugated molecular junctions covalently bonded to gold electrodes // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - V. 133. - P. 17160–17163.
134. Lim J. K., Joo S. W., Shin K. S. Concentration dependent Raman study of 1,4-diethynylbenzene on gold nanoparticle surfaces // *Vib. Spectrosc.* - 2007. - V. 43. - P. 330–334.
135. Zhang Z., Li H., Zhang F., Wu Y., Guo Z., Zhou L., Li J. Investigation of halide-induced aggregation of Au nanoparticles into spongelike gold // *Langmuir* - 2014. - V. 30. - P. 2648–2659.
136. Liu B., Kelly E. Y., Liu J. Cation-size-dependent DNA adsorption kinetics and packing density on gold nanoparticles: An opposite trend // *Langmuir* - 2014. - V. 30. - P. 13228–13234.
137. Kay B. D., Lykke K. R., Creighton J. R., Ward S. J. The influence of adsorbate-absorbate hydrogen bonding in molecular chemisorption: NH₃, HF, and H₂O on Au(111) // *J. Chem. Phys.*

- 1989. - V. 91. - P. 5120–5121.

138. Brearley, N.A., Surplice W. The adsorption of carbon monoxide, ammonia, and wet air on gold // *Surface Science* - 1975. - V. 52. - P. 62–74.

139. Richton R. E., Farrow L. A. Adsorption kinetics of ammonia on an inhomogeneous gold surface // *J. Phys. Chem.* - 1981. - V. 85. - P. 3577–3581.

140. Liu G., Yang X., Li T., Yu H., Du X., She Y., Wang J., Wang S., Jin F., Jin M., Shao H., Zheng L., Zhang Y., Zhou P. Spectrophotometric and visual detection of the herbicide atrazine by exploiting hydrogen bond-induced aggregation of melamine-modified gold nanoparticles // *Microchim. Acta.* - 2015. - V. 182. - P. 1983–1989.

141. Du J., Wang Z., Peng X., Fan J. In situ colorimetric recognition of melamine based on thymine derivative-functionalized gold nanoparticle // *Ind. Eng. Chem. Res.* - 2015. - V. 54. - P. 12011–12016.

142. Zhang J., Riabinina D., Chaker M., Ma D. Effect of surface oxidation on the interaction of 1-methylaminopyrene with gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2012. - V. 28. - P. 2858–2865.

143. Karam T. E., Haber L. H. Molecular adsorption and resonance coupling at the colloidal gold nanoparticle interface // *J. Phys. Chem. C.* - 2014. - V. 118. - P. 642–649.

144. Aina V., Marchis T., Laurenti E., Diana E., Lusvardi G., Malavasi G., Menabue L., Cerrato G., Morterra C. Functionalization of sol gel bioactive glasses carrying Au nanoparticles: Selective Au affinity for amino and thiol ligand groups // *Langmuir.* - 2010. - V. 26. - P. 18600–18605.

145. Kumar A., Mandal S., Mathew S. P., Selvakannan P. R., Mandale A. B., Chaudhari R. V., Sastry M. Benzene- and anthracene-mediated assembly of gold nanoparticles at the liquid-liquid interface // *Langmuir.* - 2002. - V. 18. - P. 6478–6483.

146. Maiti N., Chadha R., Das A., Kapoor S. Adsorption and sub-nanomolar sensing of thioflavin T on colloidal gold nanoparticles, silver nanoparticles and silver-coated films studied using surface-enhanced Raman scattering // *Spectrochim. Acta.* - 2015. - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. - V. 149. - P. 949–956.

147. Curry D., Cameron A., MacDonald B., Nganou C., Scheller H., Marsh J., Beale S., Lu M., Shan Z., Kaliaperumal R., Xu H., Servos M., Bennett C., MacQuarrie S., Oakes K. D., Mkandawire M., Zhang X. Adsorption of doxorubicin on citrate-capped gold nanoparticles: Insights into engineering potent chemotherapeutic delivery systems // *Nanoscale.* - 2015. - V. 7. - P. 19611–19619.

148. Tom R. T., Pradeep T. Interaction of azide ion with hemin and cytochrome c immobilized on Au and Ag nanoparticles // *Langmuir.* - 2005. - V. 21. - P. 11896–11902.

149. Maity D., Bhatt M., Paul P. Calix[4]arene functionalized gold nanoparticles for colorimetric

and bare-eye detection of iodide in aqueous media and periodate aided enhancement in sensitivity // *Microchim. Acta.* - 2015. - V. 182. - P. 377–384.

150. Hormozi-Nezhad M. R., Abbasi-Moayed S. A visual colorimetric probe for naked-eye detection of pamidronate disodium in human plasma based on aggregation of citrate capped gold nanoparticles // *Plasmonics.* - 2015. - V. 10. - P. 971–978.

151. Fan C., Wang S., Hong J. W., Bazan G. C., Plaxco K. W., Heeger A. J. Beyond superquenching: Hyper-efficient energy transfer from conjugated polymers to gold nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2003. - V. 100. - P. 6297–6301.

152. Wurster E. C., Liebl R., Michaelis S., Robelek R., Wastl D. S., Giessibl F. J., Goepferich A., Breunig M. Oligolayer-coated nanoparticles: impact of surface topography at the nanobio interface // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2015. - V. 7. - P. 7891–7900.

153. Mayer A. B. R., Mark J. E. Colloidal gold nanoparticles protected by cationic polyelectrolytes // *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* - 1997. - V. 34. - P. 2151–2164.

154. Lee H., Dellatore S. M., Miller W. M., Messersmith P. B. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings // *Science.* - 2007. - V. 318. - P. 426–430.

155. Méndez A., Moron L. E., Ortiz-Frade L., Meas Y., Ortega-Borges R., Trejo G. Thermodynamic studies of PEG (Mw 20,000) adsorption onto a polycrystalline gold electrode // *J. Electrochem. Soc.* - 2011. - V. 158. - P. F45–F51.

156. Curry D., Scheller H., Lu M., Mkandawire M., Servos M. R., Cui S., Zhang X., Oakes K. D. Prevention of doxorubicin sorptive losses in drug delivery studies using polyethylene glycol // *RSC Adv.* - 2015. - V. 5. - P. 25693–25698.

157. Zhang X., Huang P. J. J. J., Servos M. R., Liu J. Effects of polyethylene glycol on DNA adsorption and hybridization on gold nanoparticles and graphene oxide // *Langmuir.* - 2012.- V. 28. - P. 14330–14337.

158. Shin J., Zhang X., Liu J. DNA-functionalized gold nanoparticles in macromolecularly crowded polymer solutions // *J. Phys. Chem. B.* - 2012.- V. 116. - P. 13396–13402.

159. Lang N. J., Liu B., Zhang X., Liu J. Dissecting colloidal stabilization factors in crowded polymer solutions by forming self-assembled monolayers on gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2013.- V. 29. - P. 6018–6024.

160. Alkilany A. M., Caravana A. C., Hamaly M. A., Lerner K. T., Thompson L. B. Phase transfer of citrate stabilized gold nanoparticles using nonspecifically adsorbed polymers // *J. Colloid Interface Sci.* - 2016. - V. 461. - P. 39–44.

161. Türkekul K., Üzer A., Can Z., Erçağ E., Apak R. Colorimetric Sensing of the Insensitive Energetic Material 3-Nitro-1,2,4-triazol-5-one (NTO) Using l-Cysteine Stabilized Gold Nanoparticles and Copper(II) // *Anal. Lett.* - 2019. - P. 1–13.

162. Lee I. H., Lee J. M., Jung Y. Controlled Protein Embedment onto Au/Ag Core–Shell Nanoparticles for Immuno-Labeling of Nanosilver Surface // ACS Appl. Mater. Interfaces. - 2014. - V. 6. - P. 7659–7664.
163. Lin P., Ding L., Lin C., Gu F. Non-fouling property of zwitterionic cysteine surface // . Langmuir. - 2014. - V. 30. - P. 1–4.
164. Acres R. G., Feyer V., Tsud N., Carlino E., Prince K. C. Mechanisms of aggregation of cysteine functionalized gold nanoparticles // J. Phys. Chem. C. - 2014. - V. 118. - P. 10481–10487.
165. López-Tobar E., Hernández B., Ghomi M., Sanchez-Cortes S. Stability of the disulfide bond in cystine adsorbed on silver and gold nanoparticles as evidenced by SERS data // J. Phys. Chem. C. - 2013. - V. 117. - P. 1531–1537.
166. Humblot V., Tielens F., Luque N. B., Hampartsoumian H., Méthivier C., Pradier C. M. Characterization of two-dimensional chiral self-assemblies l - and d -methionine on Au(111) // . Langmuir. - 2014.- V. 30. - P. 203–212.
167. Gourishankar A., Shukla S., Ganesh K. N., Sastry M. Isothermal titration calorimetry studies on the binding of DNA bases and PNA base monomers to gold nanoparticles // J. Am. Chem. Soc. - 2004. - V. 126. - P. 13186–13187.
168. Huang R., Carney R. P., Ikuma K., Stellacci F., Lau B. L. T. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: Different protein configurations // ACS Nano. - 2014. - V. 8. - P. 5402–5412.
169. Dobrovolskaia M. A., Patri A. K., Zheng J., Clogston J. D., Ayub N., Aggarwal P., Neun B. W., Hall J. B., McNeil S. E. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. - 2009. - V. 5. - P. 106–117.
170. Murthy A. K., Schramm R., Nie G. D., Gourisankar S., Truskett T. M., Johnston K. P., Sokolov K. V., Stover R. J., Hardin W. G. Charged gold nanoparticles with essentially zero serum protein adsorption in undiluted fetal bovine serum // J. Am. Chem. Soc. - 2013. - V. 135. - P. 7799–7802.
171. Zheng T., Pierre-pierre N., Yan X., Huo Q., Almodovar A. J. O., Valerio F., Rivera-ramirez I., Griffith E., Decker D. D., Chen S., Zhu N. Gold nanoparticle-enabled blood test for early stage cancer detection and risk assessment // ACS Appl. Mater. Interfaces. - 2015. - V. 7. - P. 6819–6827.
172. Mahmoudi M., Lohse S. E., Murphy C. J., Fathizadeh A., Montazeri A., Suslick K. S. Variation of protein corona composition of gold nanoparticles following plasmonic heating // Nano Lett. - 2014. - V. 14. - P. 6–12.

173. Cui M., Liu R., Deng Z., Ge G., Liu Y., Xie L. Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications // *Nano Res.* - 2014. - V. 7. - P. 345–352.
174. Selva sharma A., Ilanchelian M. Comprehensive multispectroscopic analysis on the interaction and corona formation of human serum albumin with gold/silver alloy nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* - 2015. - V. 119. - P. 9461–9476.
175. Wang L., Li J., Pan J., Jiang X., Ji Y., Li Y., Qu Y., Zhao Y., Wu X., Chen C. Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotron radiation-based techniques: Understanding the reduced damage in cell membranes // *J. Am. Chem. Soc.* - 2013. - V. 135. - P. 17359–17368.
176. Brewer S. H., Glomm W. R., Johnson M. C., Knag M. K., Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces // *Langmuir.* - 2005. - V. 21. - P. 9303–9307.
177. Vinluan R. D., Liu J., Zhou C., Yu M., Yang S., Kumar A., Sun S., Dean A., Sun X., Zheng J. Glutathione-coated luminescent gold nanoparticles: A surface ligand for minimizing serum protein adsorption // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2014. - V. 6. - P. 11829–11833.
178. Keating C. D., Kovaleski K. K., Natan M. J. Heightened electromagnetic fields between metal nanoparticles: surface enhanced Raman scattering from metal–cytochrome c -metal sandwiches // *J. Phys. Chem. B.* - 1998. - V. 102. - P. 9414–9425.
179. Chaudhary A., Gupta A., Khan S., Nandi C. K. Morphological effect of gold nanoparticles on the adsorption of bovine serum albumin // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2014. - V. 16. - P. 20471–20482.
180. Vangala K., Ameer F., Salomon G., Le V., Lewis E., Yu L., Liu D., Zhang D. Studying protein and gold nanoparticle interaction using organothiols as molecular probes // *J. Phys. Chem. C.* - 2012. - V. 116. - P. 3645–3652.
181. Fu C., Yang H., Wang M., Xiong H., Yu S. Serum albumin adsorbed on Au nanoparticles: Structural changes over time induced by S-Au interaction // *Chem. Commun.* - 2015. - V. 51. - P. 3634–3636.
182. Boulos S. P., Davis T. A., Yang J. A., Lohse S. E., Alkilany A. M., Holland L. A., Murphy C. J. Nanoparticle-protein interactions: A thermodynamic and kinetic study of the adsorption of bovine serum albumin to gold nanoparticle surfaces // *Langmuir.* - 2013. - V. 29. - P. 14984–14996.
183. Beilis E., Belgorodsky B., Fadeev L., Cohen H., Richter S. Surface-induced conformational changes in doped bovine serum albumin self-assembled monolayers // *J. Am. Chem. Soc.* - 2014. - V. 136. - P. 6151–6154.
184. Dominguez-Medina S., McDonough S., Swanglap P., Landes C. F., Link S. In situ measurement of bovine serum albumin interaction with gold nanospheres // *Langmuir.* - 2012. -

V. 28. - P. 9131–9139.

185. Calzolari L., Franchini F., Gilliland D., Rossi F. Protein-nanoparticle interaction: identification of the ubiquitin-gold nanoparticle interaction site // *Nano Lett.* - 2010. - V. 10. - P. 3101–3105.

186. Sevilla P., Sanchez-Cortes S., Garcia-Ramos J. V., Feis A. Concentration-controlled formation of myoglobin/gold nanosphere aggregates // *J. Phys. Chem. B.* - 2014. - V. 118. - P. 5082–5092.

187. Tom R. T., Samal A. K., Sreeprasad T. S., Pradeep T. Hemoprotein bioconjugates of gold and silver nanoparticles and gold nanorods: Structure-function correlations // *Langmuir.* - 2007. - V. 23. - P. 1320–1325.

188. Siriwardana K., Wang A., Vangala K., Fitzkee N., Zhang D. Probing the effects of cysteine residues on protein adsorption onto gold nanoparticles using wild-type and mutated GB3 proteins // *Langmuir.* - 2013. - V. 29. - P. 10990–10996.

189. Keighron J. D., Keating C. D. Enzyme:Nanoparticle bioconjugates with two sequential enzymes: Stoichiometry and activity of malate dehydrogenase and citrate synthase on Au nanoparticles // *Langmuir.* - 2010. - V. 26. - P. 18992–19000.

190. Zhang S., Moustafa Y., Huo Q. Different interaction modes of biomolecules with citrate-capped gold nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2014. - V. 6. - P. 21184–21192.

191. C. De Roe, P. J. Courtoy P. B. A model of protein-colloidal gold interactions // *Journal Histochem. Cytochem.* - 1987. - V. 35. - P. 1191–1198.

192. Oh E., Lee D., Kim Y. P., Cha S. Y., Oh D. B., Kang H. A., Kim J., Kim H. S. Nanoparticle-based energy transfer for rapid and simple detection of protein glycosylation // *Angew. Chemie - Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - P. 7959–7963.

193. Shen Z. Q., Wang J. F., Qiu Z. G., Jin M., Wang X. W., Chen Z. L., Li J. W., Cao F. H. QCM immunosensor detection of Escherichia coli O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold // *Biosens. Bioelectron.* - 2011. - V. 26. - P. 3376–3381.

194. Li T., Liu D., Wang Z. Microarray-based Raman spectroscopic assay for kinase inhibition by gold nanoparticle probes // *Biosens. Bioelectron.* - 2009. - V. 24. - P. 3335–3339.

195. Shaiu W., Larson D. D., Vesenska J., Henderson E. Atomic force microscopy of oriented linear DNA molecules labeled with 5nm gold spheres // *Nucleic Acids Res.* - 1993. - V. 21. - P. 99–103.

196. Shenton W., Davis S. A., Mann S. Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition // *Adv. Mater.* - 1999. - V. 11. - P. 449–452.

197. Wang X., Niessner R., Knopp D. Controlled growth of immunogold for amplified optical

- detection of aflatoxin B1 // *Analyst*. - 2015. - V. 140. - P. 1453–1458.
198. Kashid S. B., Tak R. D., Raut R. W. Antibody tagged gold nanoparticles as scattering probes for the pico molar detection of the proteins in blood serum using nanoparticle tracking analyzer // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2015. - V. 133. - P. 208–213.
199. Du B., Li Z., Cheng Y. Homogeneous immunoassay based on aggregation of antibody-functionalized gold nanoparticles coupled with light scattering detection // *Talanta*. - 2008. - V. 75. - P. 959–964.
200. Qiao F. Y., Liu J., Li F. R., Kong X. L., Zhang H. L., Zhou H. X. Antibody and DNA dual-labeled gold nanoparticles: Stability and reactivity // *Appl. Surf. Sci.* - 2008. - V. 254. - P. 2941–2946.
201. Lévy R., Thanh N. T. K., Christopher Doty R., Hussain I., Nichols R. J., Schiffrin D. J., Brust M., Fernig D. G. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. - V. 126. - P. 10076–10084.
202. Fears K. P., Clark T. D., Petrovykh D. Y. Residue-dependent adsorption of model oligopeptides on gold // *J. Am. Chem. Soc.* - 2013. - V. 135. - P. 15040–15052.
203. Tang Z., Palafox-Hernandez J. P., Law W. C., Hughes Z. E., Swihart M. T., Prasad P. N., Knecht M. R., Walsh T. R. Biomolecular recognition principles for bionanocombinatorics: An integrated approach to elucidate enthalpic and entropic factors // *ACS Nano*. - 2013. - V. 7. - P. 9632–9646.
204. Sotnikov D. V., Berlina A. N., Ivanov V. S., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2019. - V. 173. - P. 557–563.
205. Sotnikov D. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle protein conjugates // *Int. J. Mol. Sci.* - 2015. - V. 16. - P. 907–923.
206. Alatorre-Meda M., Casals E., Puentes V. F., Taboada P., Mosquera V., Goy-López S., Juárez J., Alatorre-Meda M., Casals E., Puentes V. F., Taboada P., Mosquera V. Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: the role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition // *Langmuir*. - 2012. - V. 28. - P. 9113–9126.
207. Chakraborty S., Singh S. P., Chakrabarti P., Joshi P., Shanker V. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin // *Langmuir*. - 2011. - V. 27. - P. 7722–7731.
208. Demers L. M., Zhang H., Jang N.-H., Mirkin C. A., Östblom M., Liedberg B. Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold // *J. Am.*

Chem. Soc. - 2002. - V. 124. - P. 11248–11249.

209. Storhoff J. J., Elghanian R., Chad A. Mirkin A., Letsinger R. L. Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles // *Langmuir*. - 2002. - V. 18. - P. 6666–6670.

210. Rapino S., Zerbetto F. Modeling the stability and the motion of DNA nucleobases on the gold surface // *Langmuir*. - 2005. - V. 21. - P. 2512–2518.

211. Wolf L. K., Gao Y., Georgiadis R. M. Sequence-dependent DNA immobilization: specific versus nonspecific contributions // *Langmuir*. - 2007. - V. 20. - P. 3357–3361.

212. Lin Y. Z., Chang P. L. Colorimetric determination of DNA methylation based on the strength of the hydrophobic interactions between DNA and gold nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. - 2013. - V. 5. - P. 12045–12051.

213. Kimura-Suda H., Petrovykh D. Y., Michael J. Tarlov A., Whitman L. J. Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - P. 9014–9015.

214. Toomjeen P., Phanchai W., Choodet C., Chompoosor A., Thanan R., Sakonsinsiri C., Puangmali T. Designing an aptasensor based on cysteamine-capped AuNPs for 8-oxo-dG detection: a molecular dynamics approach and experimental validation // *J. Phys. Chem. B*. - 2019. - V. 123. - P. 1129–1138.

215. Kryachko E. S., Remade F. Complexes of DNA bases and Watson-Crick base pairs with small neutral gold clusters // *J. Phys. Chem. B*. - 2005. - V. 109. - P. 22746–22757.

216. Lee J. H., Wernette D. P., Yigit M. V., Liu J., Wang Z., Lu Y. Site-specific control of distances between gold nanoparticles using phosphorothioate anchors on DNA and a short bifunctional molecular fastener // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2007. - V. 46. - P. 9006–9010.

217. Pal S., Sharma J., Yan H., Liu Y. Stable silver nanoparticle-DNA conjugates for directed self-assembly of core-satellite silver-gold nanoclusters // *Chem. Commun.* - 2009. - P. 6059–6061.

218. Ma N., Sargent E. H., Kelley S. O. One-step DNA-programmed growth of luminescent and biofunctionalized nanocrystals // *Nat. Nanotechnol.* - 2009. - V. 4. - P. 121–125.

219. Huang P. J. J., Wang F., Liu J. Cleavable molecular beacon for Hg²⁺ detection based on phosphorothioate RNA modifications // *Anal. Chem.* - 2015. - V. 87. - P. 6890–6895.

220. Huang J. Y., Lin H. T., Chen T. H., Chen C. A., Chang H. T., Chen C. F. Signal amplified gold nanoparticles for cancer diagnosis on paper-based analytical devices // *ACS Sensors*. - 2018. - V. 3. - P. 174–182.

221. Fan T., Du Y., Yao Y., Wu J., Meng S., Luo J., Zhang X., Yang D., Wang C., Qian Y., Gao F. Rolling circle amplification triggered poly adenine-gold nanoparticles production for label-free electrochemical detection of thrombin // *Sensors Actuators B Chem.* - 2018. - V. 266. - P. 9–

18.

222. Xie Y., Huang Y., Tang D., Cui H., Cao H. A competitive colorimetric chloramphenicol assay based on the non-cross-linking deaggregation of gold nanoparticles coated with a polyadenine-modified aptamer // *Microchim. Acta.* - 2018. - V. 185. - P. 534.
223. Yin J., Wang J., Yang X., Wu T., Wang H., Zhou X. Poly(adenine)-mediated DNA-functionalized gold nanoparticles for sensitive detection of mercury ions in aqueous media // *RSC Adv.* - 2019. - V. 9. - P. 18728–18733.
224. Carnerero J. M., Jimenez-Ruiz A., Castillo P. M., Prado-Gotor R. Covalent and non-covalent DNA–gold-nanoparticle interactions: new avenues of research // *ChemPhysChem.* - 2017. - V. 18. - P. 17–33.
225. Chen L., Chao J., Qu X., Zhang H., Zhu D., Su S., Aldalbahi A., Wang L., Pei H. Probing cellular molecules with polyA-based engineered Aptamer nanobeacon // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2017. - V. 9. - P. 8014–8020.
226. Chen N., Wan Y., Liu H., Su Y., Fan C., Wei M., Li F., Huang Q., Pei H. Designed diblock oligonucleotide for the synthesis of spatially isolated and highly hybridizable functionalization of DNA–gold nanoparticle nanoconjugates // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 11876–11879.
227. Chen N., Wei M., Sun Y., Li F., Pei H., Li X., Su S., He Y., Wang L., Shi J., Fan C., Huang Q. Self-assembly of poly-adenine-tailed CpG oligonucleotide-gold nanoparticle nanoconjugates with immunostimulatory activity // *Small.* - 2014. - V. 10. - P. 368–375.
228. Yao G., Pei H., Li J., Zhao Y., Zhu D., Zhang Y., Lin Y., Huang Q., Fan C. Clicking DNA to gold nanoparticles: poly-adenine-mediated formation of monovalent DNA-gold nanoparticle conjugates with nearly quantitative yield // *NPG Asia Mater.* - 2015. - V. 7. - P. e159.
229. Niu L. M., Liu Y., Lian K. Q., Ma L., Kang W. J. Characterization of a sensitive biosensor based on an unmodified DNA and gold nanoparticle composite and its application in diquat determination // *Arab. J. Chem.* - 2015. - V. 11. - P. 655–661.
230. Zhang X., Liu B., Dave N., Servos M. R., Liu J. Instantaneous attachment of an ultrahigh density of nonthiolated DNA to gold nanoparticles and its applications // *Langmuir.* - 2012. - V. 28. - P. 17053–17060.
231. Lu W., Wang L., Li J., Zhao Y., Zhou Z., Shi J., Zuo X., Pan D. Quantitative investigation of the poly-adenine DNA dissociation from the surface of gold nanoparticles // *Sci. Rep.* - 2015. - V. 5. - P. 1–9.
232. Zhang X., Liu B., Servos M. R., Liu J. Polarity control for nonthiolated DNA adsorption onto gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2013. - V. 29. - P. 6091–6098.
233. Sohreiner S. M., Shudy D. F., Hatoh A. L., Opdahl A., Whitman L. J., Petrovykh D. Y.

- Controlled and efficient hybridization achieved with DNA probes immobilized solely through preferential DNA-substrate interactions // *Anal. Chem.* - 2010. - V. 82. - P. 2803–2810.
234. Opdahl A., Petrovykh D. Y., Kimura-Suda H., Tarlov M. J., Whitman L. J. Independent control of grafting density and conformation of single-stranded DNA brushes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2007. - V. 104. - P. 9–14.
235. Schreiner S. M., Hatch A. L., Shudy D. F., Howard D. R., Howell C., Zhao J., Koelsch P., Zharnikov M., Petrovykh D. Y., Opdahl A. Impact of DNA-surface interactions on the stability of DNA hybrids // *Anal. Chem.* - 2011. - V. 83. - P. 4288–4295.
236. Howell C., Hamoudi H., Zharnikov M. Thymine/adenine diblock-oligonucleotide monolayers and hybrid brushes on gold: A spectroscopic study // *Biointerphases.* - 2013. - V. 8. - P. 1–12.
237. Huang S. S., Wei S. C., Chang H. T., Lin H. J., Huang C. C. Gold nanoparticles modified with self-assembled hybrid monolayer of triblock aptamers as a photoreversible anticoagulant // *J. Control. Release.* - 2016. - V. 221. - P. 9–17.
238. Polak P., Zalevsky Z., Shefi O. Gold nanoparticles-based biosensing of single nucleotide DNA mutations // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2013. - V. 59. - P. 134–137.
239. Sun W., Lu Y., Mao J., Chang N., Yang J., Liu Y. Multidimensional sensor for pattern recognition of proteins based on DNA-gold nanoparticles conjugates // *Anal. Chem.* - 2015. - V. 87. - P. 3354–3359.
240. Demers L. M., Mirkin C. A., Mucic R. C., Reynolds R. A., Letsinger R. L., Elghanian R., Viswanadham G. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles // *Anal. Chem.* - 2000. - V. 72. - P. 5535–5541.
241. Sarah J. Hurst, Abigail K. R. Lytton-Jean and C. A. M. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes // *Anal. Chem.* - 2006. - V. 78. - P. 8313–8318.
242. Bano F., Sluysmans D., Wislez A., Duwez A. S. Unraveling the complexity of the interactions of DNA nucleotides with gold by single molecule force spectroscopy // *Nanoscale.* - 2015. - V. 7. - P. 19528–19533.
243. Petrovykh D. Y., Kimura-Suda H., Whitman L. J., Tarlov M. J. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - P. 5219–5226.
244. Cárdenas M., Barauskas J., Schullén K., Brennan J. L., Brust M., Nylander T. Thiol-specific and nonspecific interactions between DNA and gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2006. - V. 22. - P. 3294–3299.
245. Petrovykh D. Y., Whitman L. J., Opdahl A., Kimura-Suda H., Tarlov M. J. Nucleobase

orientation and ordering in films of single-stranded DNA on gold // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - V. 128. - P. 2–3.

246. Park S., Brown K. A., Hamad-Schifferli K. Changes in oligonucleotide conformation on nanoparticle surfaces by modification with mercaptohexanol // *Nano Lett.* - 2004. - V. 4. - P. 1925–1929.

247. Parak W. J., Pellegrino T., Micheel C. M., Gerion D., Williams S. C., Alivisatos A. P. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis /. *Nano Lett.* - 2003. - V. 3. - P. 33–36.

248. Evdokimov S. I., Evdokimov V. S. Synthesis of a stable magnetite (magnetic fluid) colloid solution. In *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* // *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* - 2017. - V. 164. - P. 012013.

249. Li H., Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2004. - V. 101. - P. 14036–14039.

250. Li H., Rothberg L. J. DNA sequence detection using selective fluorescence quenching of tagged oligonucleotide probes by gold nanoparticles // *Anal. Chem.* - 2004. - V. 76. - P. 5414–5417.

251. Li H., Rothberg L. Detection of specific sequences in RNA using differential adsorption of single-stranded oligonucleotides on gold nanoparticles // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77. - P. 6229–6233.

252. Zhou J., Ralston J., Sedev R., Beattie D. A. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability // *J. Colloid Interface Sci.* - 2009. - V. 331. - P. 251–262.

253. Зименкова Л.П., Наумов В.А. Методическое руководство по изучению дисциплины «Физическая и коллоидная химия» [Электронный ресурс] // Московский государственный университет печати. - 2013. URL: <http://hi-edu.ru/e-books/xbook948/01/eabout.htm> (дата обращения 19.12.2019).

254. Zhang X., Servos M. R., Liu J. Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2012. - V. 28. - P. 3896–3902.

255. Nelson E. M., Rothberg L. J. Kinetics and mechanism of single-stranded DNA adsorption onto citrate-stabilized gold nanoparticles in colloidal solution // *Langmuir.* - 2011. - V. 27. - P. 1770–1777.

256. Liu J. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: Surface science and applications // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2012. - V. 14. - P. 10485–10496.

257. Gearheart L. A., Ploehn H. J., Murphy C. J. Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: A surface-enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA // *J.*

Phys. Chem. B. - 2001. - V. 105. - P. 12609–12615.

258. Li H., Huang J., Lv J., An H., Zhang X., Zhang Z., Fan C., Hu J. Nanoparticle PCR: nanogold-assisted PCR with enhanced specificity // *Angew. Chemie - Int. Ed.* - 2005. - V. 44. - P. 5100–5103.

259. Li H., Rothberg L. J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. - V. 126. - P. 10958–10961.

260. Salvatore P., Nazmutdinov R. R., Ulstrup J., Zhang J. DNA bases assembled on the Au(110)/electrolyte interface: A combined experimental and theoretical study // *J. Phys. Chem. B.* - 2015. - V. 119. - P. 3123–3134.

261. Jang N. H. The coordination chemistry of DNA nucleosides on gold nanoparticles as a probe by SERS // *Bull. Korean Chem. Soc.* - 2002. - V. 23. - P. 1790–1800.

262. Pergolese B., Bonifacio A., Bigotto A. SERS studies of the adsorption of guanine derivatives on gold colloidal nanoparticles // *J. Mol. Struct.* - 2005. - V. 7. - P. 3610–3613.

263. Maleki A., Alavi S., Najafi B. Molecular dynamics simulation study of adsorption and patterning of DNA bases on the Au(111) surface // *J. Phys. Chem. C.* - 2011. - V. 115. - P. 22484–22494.

264. Gao Z., Sawada T., Zhi C., Bando Y., Golberg D., Serizawa T. Nucleotide-assisted decoration of boron nitride nanotubes with semiconductor quantum dots endows valuable visible-light emission in aqueous solution // *Soft Matter.* - 2011. - V. 7. - P. 8753–8756.

265. Zhi C., Bando Y., Wang W., Tang C., Kuwahara H., Golberg D. DNA-mediated assembly of boron nitride nanotubes // *Chem. - An Asian J.* - 2007. - V. 2. - P. 1581–1585.

266. Lu M., Shan Z., Andrea K., Macdonald B., Beale S., Curry D. E., Wang L., Wang S., Oakes K. D., Bennett C., Wu W., Zhang X. Chemisorption mechanism of DNA on Mg/Fe layered double hydroxide nanoparticles: insights into engineering effective siRNA delivery systems // *Langmuir.* - 2016. - V. 32. - P. 2659–2667.

267. Pershina A. G., Sazonov A. E., Ogorodova L. M. Investigation of the interaction between DNA and cobalt ferrite nanoparticles by FTIR spectroscopy // *Russ. J. Bioorganic Chem.* - 2009. - V. 35. - P. 607–613.

268. Pershina A. G., Sazonov A. E., Novikov D. V., Knyazev A. S., Izaak T. I., Itin V. I., Naiden E. P., Magaeva A. A., Terechova O. G. Study of DNA interaction with cobalt ferrite nanoparticles // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2011. - V. 11. - P. 2673–2677.

269. Pershina A. G., Ogorodova L. M., Magaeva A. A., Itin V. I., Naiden E. P., Izaak T. I., Shchegoleva N. N., Sazonov A. E. Sequence-selective binding of oligonucleotides to superparamagnetic cobalt ferrite nanoparticles: A new way to fabricate functional

- nanoconjugates // RSC Adv. - 2015. - V. 5. - P. 26115–26124.
270. Zhang X., Wang F., Liu B., Kelly E. Y., Servos M. R., Liu J. Adsorption of DNA oligonucleotides by titanium dioxide nanoparticles // *Langmuir*. - 2014. - V. 30. - P. 839–845.
271. Seo M.H., Lee J.H., Kim M.S., Chae H.K., Myung H.J. Selection and characterization of peptides specifically binding to TiO₂ nanoparticles // *J. Microbiol. Biotechnol.* - 2006. - V. 16. - P. 303–307.
272. Barch M., Okada S., Bartelle B. B., Jasanoff A. Screen-based analysis of magnetic nanoparticle libraries formed using peptidic iron oxide ligands // *J. Am. Chem. Soc.* - 2014. - V. 136. - P. 12516–12519.
273. Ploss M., Facey S. J., Bruhn C., Zemel L., Hofmann K., Stark R. W., Albert B., Hauer B. Selection of peptides binding to metallic borides by screening M13 phage display libraries // *BMC Biotechnol.* - 2014. - V. 14. - P. 12.
274. Gronewold T. M. A., Baumgartner A., Weckmann A., Knekties J., Egler C. Selection process generating peptide aptamers and analysis of their binding to the TiO₂ surface of a surface acoustic wave sensor // *Acta Biomater.* - 2009. - V. 5. - P. 794–800.
275. Rothenstein D., Claasen B., Omiecienski B., Lammel P., Bill J. Isolation of ZnO-binding 12-mer peptides and determination of their binding epitopes by NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 12547–12556.
276. Liu Y., Mao J., Zhou B., Wei W., Gong S. Peptide aptamers against titanium-based implants identified through phage display // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2010. - V. 21. - P. 1103–1107.
277. Gabryelczyk B., Szilvay G. R., Salomäki M., Laaksonen P., Linder M. B. Selection and characterization of peptides binding to diamond-like carbon // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2013. - V. 110. - P. 66–73.
278. Yamaguchi A., Isozaki K., Nakamura M., Takaya H., Watanabe T. Discovery of 12-mer peptides that bind to wood lignin // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6. - P. 1–11.
279. Adams B. L., Sarkes D. A., Finch A. S., Hurley M. M., Stratis-Cullum D. Biodiscovery of aluminum binding peptides // *Smart Biomed. Physiol. Sens. Technol. X*. - 2013. - V. 8719. - P. 871909.
280. Artzy-Schnirman A., Abu-Shah E., Dishon M., Soifer H., Sivan Y., Reiter Y., Benhar I., Sivan U. On the limited recognition of inorganic surfaces by short peptides compared with antibodies // *J. Pept. Sci.* - 2014. - V. 20. - P. 446–450.
281. Kase D., Kulp J. L., Yudasaka M., Evans J. S., Iijima S., Shiba K. Affinity selection of peptide phage libraries against single-wall carbon nanohorns identifies a peptide aptamer with conformational variability // *Langmuir*. - 2004. - V. 20. - P. 8939–8941.

282. Rouge J. L., Ackerson C. J., Feldheim D. L., Eaton B. E. Cooperativity between two selected RNA Pdases in the synthesis of Pd nanoparticles // *J. Mater. Chem.* - 2010. - V. 20. - P. 8394–8398.
283. Carter C. J., Dolska M., Owczarek A., Ackerson C. J., Eaton B. E., Feldheim D. L. In vitro selection of RNA sequences capable of mediating the formation of iron oxide nanoparticles // *J. Mater. Chem.* - 2009. - V. 19. - P. 8320–8326.
284. Gugliotti L. A., Feldheim D. L., Eaton B. E. RNA-mediated metal-metal bond formation in the synthesis of hexagonal palladium nanoparticles // *Science.* - 2004. - V. 304. - P. 850–852.
285. Srisawat C., Goldstein I. J., Engelke D. R., Rna S. Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - P. 2–6.
286. Bawazer L. A., Newman A. M., Gu Q., Ibish A., Arcila M., Cooper J. B., Meldrum F. C., Morse D. E. Efficient selection of biomineralizing DNA aptamers using deep sequencing and population clustering // *ACS Nano.* - 2014. - V. 8. - P. 387–395.
287. Brown S. Metal-recognition by repeating polypeptides // *Nat. Biotechnol.* - 1997. - V. 15. - P. 269–272.
288. Hnilova M., Oren E. E., Seker U. O. S., Wilson B. R., Collino S., Evans J. S., Tamerler C., Sarikaya M. Effect of molecular conformations on the adsorption behavior of gold-binding peptides // *Langmuir.* - 2008. - V. 24. - P. 12440–12445.
289. Brown S., Sarikaya M., Johnson E. A genetic analysis of crystal growth // *J. Mol. Biol.* - 2000. - V. 299. - P. 725–735.
290. Watanabe H., Nakanishi T., Umetsu M., Kumagai I. Human anti-gold antibodies: biofunctionalization of gold nanoparticles and surfaces with anti-gold antibodies // *J. Biol. Chem.* - 2008. - V. 283. - P. 36031–36038.
291. Jain P., Soshee A., Narayanan S. S., Sharma J., Girard C., Dujardin E., Nizak C. Selection of arginine-rich anti-gold antibodies engineered for plasmonic colloid self-assembly // *J. Phys. Chem. C.* - 2014. - V. 118. - P. 14502–14510.
292. Emrani A. S., Danesh N. M., Lavaee P., Ramezani M., Abnous K., Taghdisi S. M. Colorimetric and fluorescence quenching aptasensors for detection of streptomycin in blood serum and milk based on double-stranded DNA and gold nanoparticles // *Food Chem.* - 2016. - V. 190. - P. 115–121.
293. Zhan S., Xu H., Zhan X., Wu Y., Wang L., Lv J., Zhou P. Determination of silver(I) ion based on the aggregation of gold nanoparticles caused by silver-specific DNA, and its effect on the fluorescence of Rhodamine B // *Microchim. Acta.* - 2015. - V. 182. - P. 1411–1419.
294. Pylaev T. E., Volkova E. K., Kochubey V. I., Bogatyrev V. A., Khlebtsov N. G. DNA

- detection assay based on fluorescence quenching of rhodamine B by gold nanoparticles: The optical mechanisms // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* - 2013. - V. 131. - P. 34–42.
295. Xu Q., Liu J., He Z., Yang S. Superquenching acridinium ester chemiluminescence by gold nanoparticles for DNA detection // *Chem. Commun.* - 2010. - V. 46. - P. 8800–8802.
296. Pu W., Zhao Z., Wu L., Liu Y., Zhao H. Label-free detection of Ag⁺ based on gold nanoparticles and Ag⁺-specific DNA // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2014. - V. 15. - P. 5524–5529.
297. Qi Y., Li B., Zhang Z. Label-free and homogeneous DNA hybridization detection using gold nanoparticles-based chemiluminescence system // *Biosens. Bioelectron.* - 2009. - V. 24. - P. 3581–3586.
298. Ma J. L., Yin B. C., Le H. N., Ye B. C. Label-Free Detection of Sequence-Specific DNA Based on Fluorescent Silver Nanoclusters-Assisted Surface Plasmon-Enhanced Energy Transfer // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2015. - V. 7. - P. 12856–12863.
299. Xia F., Zuo X., Yang R., Xiao Y., Kang D., Vallee-Belisle A., Gong X., Yuen J. D., Hsu B. B. Y., Heeger A. J., Plaxco K. W. Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2010. - V. 107. - P. 10837–10841.
300. Wang J., Lu J., Su S., Gao J., Huang Q., Wang L., Huang W., Zuo X. Binding-induced collapse of DNA nano-assembly for naked-eye detection of ATP with plasmonic gold nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* - 2015. - V. 65. - P. 171–175.
301. Qi Y., Li L., Li B. Label-free detection of specific DNA sequence-telomere using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probes // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2009. - V. 74. - P. 127–131.
302. Song K. M., Cho M., Jo H., Min K., Jeon S. H., Kim T., Han M. S., Ku J. K., Ban C. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer // *Anal. Biochem.* - 2011. - V. 415. - P. 175–181.
303. Shawky S. M., Bald D., Azzazy H. M. E. Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles // *Clin. Biochem.* - 2010. - V. 43. - P. 1163–1168.
304. Eissa S., Shawky S. M., Matboli M., Mohamed S., Azzazy H. M. E. Direct detection of unamplified hepatoma upregulated protein RNA in urine using gold nanoparticles for bladder cancer diagnosis // *Clin. Biochem.* - 2014. - V. 47. - P. 104–110.
305. Khalil M. A. F., Azzazy H. M. E., Attia A. S., Hashem A. G. M. A sensitive colorimetric assay for identification of *Acinetobacter baumannii* using unmodified gold nanoparticles // *J. Appl. Microbiol.* - 2014. - V. 117. - P. 465–471.
306. Han M. S., Lytton-Jean A. K. R., Oh B. K., Heo J., Mirkin C. A. Colorimetric screening of

- DNA-binding molecules with gold nanoparticle probes // *Angew. Chemie - Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - P. 1807–1810.
307. Elghanian R., Storhoff J. J., Mucic R. C., Letsinger R. L., Mirkin C. A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles // *Science*. - 1997. - V. 277. - P. 1078–1081.
308. Wan J., Liu X., Zhang Y., Gao Q., Qi H., Zhang C. Sensitive impedimetric detection of microRNAs using a hairpin probe based on DNAzyme-functionalized gold nanoparticle tag-initiated deposition of an insulating film on gold electrode // *Sensors Actuators, B. - Chem.* 2015. - V. 213. - P. 409–416.
309. Shen Q., Nie Z., Guo M., Zhong C. J., Lin B., Li W., Yao S. Simple and rapid colorimetric sensing of enzymatic cleavage and oxidative damage of single-stranded DNA with unmodified gold nanoparticles as indicator // *Chem. Commun.* - 2009. - P. 929–931.
310. Lee E. H., Lee S. K., Kim M. J., Lee S. W. Simple and rapid detection of bisphenol A using a gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor // *Food Chem.* - 2019. - V. 287. - P. 205–213.
311. Cho H., Baker B. R., Wachsmann-Hogiu S., Pagba C. V., Laurence T. A., Lane S. M., Lee L. P., Tok J. B. H. Aptamer-based SERRS sensor for thrombin detection // *Nano Lett.* - 2008. - V. 8. - P. 4386–4390.
312. Mirau P. A., Smith J. E., Chávez J. L., Hagen J. A., Kelley-Loughnane N., Naik R. Structured DNA aptamer interactions with gold nanoparticles // *Langmuir*. - 2018. - V. 34. - P. 2139–2146.
313. Han X., Zhang Y., Nie J., Zhao S., Tian Y., Zhou N. Gold nanoparticle based photometric determination of tobramycin by using new specific DNA aptamers // *Microchimica Acta*. - 2018. - V. 185. - P. 2568–2576.
314. Ma X., Guo Z., Mao Z., Tang Y., Miao P. Colorimetric theophylline aggregation assay using an RNA aptamer and non-crosslinking gold nanoparticles // *Microchim. Acta*. - 2018. - V. 185. - P. 33.
315. Soh J. H., Lin Y., Rana S., Ying J. Y., Stevens M. M. Colorimetric detection of small molecules in complex matrixes via target-mediated growth of aptamer-functionalized gold nanoparticles // *Anal. Chem.* - 2015. - V. 87. - P. 7644–7652.
316. Chen C., Song G., Yang X., Ren J., Qu X. A gold nanoparticle-based strategy for label-free and colorimetric screening of DNA triplex binders // *Biochimie*. - 2010. - V. 92. - P. 1416–1421.
317. Naderi M., Hosseini M., Ganjali M. R. Naked-eye detection of potassium ions in a novel gold nanoparticle aggregation-based aptasensor // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2018. - V. 195. - P. 75–83.
318. Priyadarshini E., Pradhan N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric

- detection of toxic metal ions: A review // *Sensors Actuators, B Chem.* - 2017. - V. 238. - P. 888–902.
319. Li L., Li B., Qi Y., Jin Y. Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2009. - V. 393. - P. 2051–2057.
320. Wang H., Wang Y., Jin J., Yang R. Gold nanoparticle-based colorimetric and ‘turn-on’ fluorescent probe for mercury(II) ions in aqueous solution // *Anal. Chem.* - 2008. - V. 80. - P. 9021–9028.
321. Darbha G. K., Ray A., Ray P. C. Gold nanoparticle-based miniaturized nanomaterial surface energy transfer probe for rapid and ultrasensitive detection of mercury in soil, water, and fish // *ACS Nano.* - 2007. - V. 1. - P. 208–214.
322. Huang C., Chang H. Selective gold-nanoparticle-based ‘turn-on’ fluorescent sensors for detection of mercury(II) in aqueous solution // *Anal. Chem.* - 2006. - V. 78. - P. 8332–8338.
323. Ono A., Cao S., Togashi H., Tashiro M., Fujimoto T., MacHinami T., Oda S., Miyake Y., Okamoto I., Tanaka Y. Specific interactions between silver(i) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes // *Chem. Commun.* - 2008. - P. 4825–4827.
324. Miao X. M., Ling L. S., Shuai X. T. Detection of Pb 2+ at attomole levels by using dynamic light scattering and unmodified gold nanoparticles // *Anal. Biochem.* - 2012. - V. 421. - P. 582–586.
325. Wang Y., Yang F., Yang X. Label-free colorimetric biosensing of copper(II) ions with unimolecular self-cleaving deoxyribozymes and unmodified gold nanoparticle probes // *Nanotechnology.* - 2010. - V. 21. - P. 205502.
326. Jung Heon L., Zidong W., Juewen L., Yi L. Highly sensitive and selective colorimetric sensors for uranyl (UO₂ 2+): development and comparison of labeled and label-free DNAzyme-gold nanoparticle systems // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - P. 14217–14226.
327. Hormozi-Nezhad M. R., Abbasi-Moayed S. A sensitive and selective colorimetric method for detection of copper ions based on anti-aggregation of unmodified gold nanoparticles // *Talanta.* - 2014. - V. 129. - P. 227–232.
328. Xing S., Xu X., Fu P., Xu M., Gao T., Zhang X., Zhao C. Colorimetric detection of single base-pair mismatches based on the interactions of PNA and PNA/DNA complexes with unmodified gold nanoparticles // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2019. - V. 181. - P. 333–340.
329. Li H. R. L. Rapid DNA sequence identification based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. In 2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show // *NSTI Nanotech 2005 Technical Proceedings.* - 2005. - V. 1. - P. 470–471.

330. Ray P. C. Diagnostics of single base-mismatch DNA hybridization on gold nanoparticles by using the hyper-Rayleigh scattering technique // *Angew. Chemie - Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - P. 1151–1154.
331. Cho K., Lee Y., Lee C. H., Lee K., Kim Y., Choi H., Ryu P. D., Lee S. Y., Joo S. W. Selective aggregation mechanism of unmodified gold nanoparticles in detection of single nucleotide polymorphism // *J. Phys. Chem. C.* - 2008. - V. 112. - P. 8629–8633.
332. Tan Y. N., Lee K. H., Su X. Study of single-stranded DNA binding protein-nucleic acids interactions using unmodified gold nanoparticles and its application for detection of single nucleotide Polymorphisms Yen // *Anal. Chem.* - 2011. - V. 83. - P. 4251–4257.
333. Nazmul Islam M., Yadav S., Hakimul Haque M., Munaz A., Islam F., Al Hossain M. S., Gopalan V., Lam A. K., Nguyen N. T., Shiddiky M. J. A. Optical biosensing strategies for DNA methylation analysis // *Biosens. Bioelectron.* - 2017. - V. 92. - P. 668–678.
334. Huang B., Ji L., Liang B., Cao Q., Tu T., Ye X. A simple and low-cost screen printed electrode for hepatocellular carcinoma methylation detection // *Analyst.* - 2019. - V. 144. - P. 3282–3288.
335. Shiddiky M. J. A., Sina A. A. I., Carrascosa L. G., Palanisamy R., Rauf S., Trau M. Methylsorb: a simple method for quantifying DNA methylation using DNA-gold affinity interactions // *Anal. Chem.* - 2014. - V. 86. - P. 10179–10185.
336. Sina A. A. I., Howell S., Carrascosa L. G., Rauf S., Shiddiky M. J. A., Trau M. EMethylsorb: Electrochemical quantification of DNA methylation at CpG resolution using DNA-gold affinity interactions // *Chem. Commun.* - 2014. - V. 50. - P. 13153–13156.
337. Koo K. M., Sina A. A. I., Carrascosa L. G., Shiddiky M. J. A., Trau M. Emethylsorb: rapid quantification of DNA methylation in cancer cells on screen-printed gold electrodes // *Analyst.* - 2014. - V. 139. - P. 6178–6184.
338. Das R., Dhiman A., Kapil A., Bansal V., Sharma T. K. Aptamer-mediated colorimetric and electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* utilizing peroxidase-mimic activity of gold NanoZyme // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2019. - V. 411. - P. 1229–1238.
339. Hizir M. S., Top M., Balcioglu M., Rana M., Robertson N. M., Shen F., Sheng J., Yigit M. V. Multiplexed activity of perAuxidase: DNA-capped AuNPs act as adjustable peroxidase // *Anal. Chem.* - 2016. - V. 88. - P. 600–605.
340. Zhan P., Wang J., Wang Z. G., Ding B. Engineering the pH-responsive catalytic behavior of AuNPs by DNA // *Small.* - 2014. - V. 10. - P. 399–406.
341. Zhou P., Jia S., Pan D., Wang L., Gao J., Lu J., Shi J., Tang Z., Liu H. Reversible regulation of catalytic activity of gold nanoparticles with DNA nanomachines // *Sci. Rep.* - 2015. - V. 5. - P. 1–7.

342. Garcia-Negrete C. A., Blasco J., Volland M., Rojas T. C., Hampel M., Lapresta-Fernandez A., Jimenez De Haro M. C., Soto M., Fernandez A. Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations // *Environ. Pollut.* - 2013. - V. 174. - P. 134–141.
343. Fasman G. D. Handbook of biochemistry and Molecular Biology // *Nucleic Acids.* - 1975. - V. 1. - P. 589.
344. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions // *Nat. Phys. Sci.* - 1973. - V. 241. -P. 20–22.
345. Niidome T., Nakashima K., Takahashi H., Niidome Y. Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells // *Chem. Commun.* - 2004. - P. 1978.
346. Sandström P., Åkerman B. Electrophoretic properties of DNA-modified colloidal gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2004. - V. 20. - P. 4182–4186.
347. Xu X., Caswell K. K., Tucker E., Kabisatpathy S., Brodhacker K. L., Scrivens W. A. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* - 2007. - V. 1167. - P. 35–41.
348. Hasenoehrl C., Alexander C. M., Azzarelli N. N., Dabrowiak J. C. Enhanced detection of gold nanoparticles in agarose gel electrophoresis // *Electrophoresis.* - 2012. - V. 33. - P. 1251–1254.
349. Brennan J. L., Tshikhudo T. R., Brust M., Hatzakis N. S., Nolte R. J. M., Rowan A. E., Dirvianskyte N., Razumas V., Patkar S., Vind J., Svendsen A. Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles // *Bioconjug. Chem.* - 2006. - V. 17. - P. 1373–1375.
350. Yao H., Yi C., Tzang C. H., Zhu J., Yang M. DNA-directed self-assembly of gold nanoparticles into binary and ternary nanostructures // *Nanotechnology.* - 2007. - V. 18. P. 015102.
351. Shelley A. Claridge, Sarah L. Goh, Jean M. J. Frechet, Shara C. Williams, Christine M. Micheel and A. P. A. Directed assembly of discrete gold nanoparticle groupings using branched DNA scaffolds // *Chem. Mater.* - 2005. - P. 1628–1635.
352. Zanchet D., Micheel C. M., Parak W. J., Gerion D., Alivisatos A. P. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates // *Nano Lett.* - 2001. - V. 1. - P. 32–35.
353. Sandström P., Boncheva M., Åkerman B. Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles // *Langmuir.* - 2003. - V. 19. - P. 7537–7543.
354. Schellman J. A. Temperature, stability, and the hydrophobic interaction // *Biophys. J.* - 1997. - V. 73. - P. 2960–2964.

355. Eidelshstein G., Fattal M., Avishai G., Kempinski B., Giannini C., Kotlyar A. Preparation, characterization and manipulation of conjugates between gold nanoparticles and DNA // *Nanomaterials*. - 2016. - V. 6. - P. 167.
356. Elbakry A., Zaky A., Liebl R., Rachel R. Layer-by-layer assembled gold nanoparticles for siRNA delivery // *Nano Lett.* - 2009. - V. 9. - P. 2059–2064.
357. Zhang J. J., Gu M. M., Zheng T. T., Zhu J. J. Synthesis of gelatin-stabilized gold nanoparticles and assembly of carboxylic single-walled carbon nanotubes/Au composites for cytosensing and drug uptake // *Anal. Chem.* - 2009. - V. 81. - P. 6641–6648.
358. Ryder S. P., Recht M. I., Williamson J. R. *Quantitative analysis of protein–RNA interactions by gel mobility shift*. (Humana Press, 2008).
359. Laaksonen T., Ahonen P., Johans C., Kontturi K. Stability and electrostatics of mercaptoundecanoic acid-capped gold nanoparticles with varying counterion size // *ChemPhysChem*. - 2006. - V. 7. - P. 2143–2149.
360. Barnard A. S. Direct comparison of kinetic and thermodynamic influences on gold nanomorphology // *Acc. Chem. Res.* - 2012. - V. 45. - P. 1688–1697.
361. Turell L., Radi R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. - V. 65. - P. 244–253.
362. Lacroix L., Mergny J. L., Leroy J. L., Hélène C. Inability of RNA to form the i-motif: Implications for triplex formation // *Biochemistry*. - 1996. - V. 35. - P. 8715–8722.
363. Assi H. A., Garavís M., González C., Damha M. J. I-motif DNA: structural features and significance to cell biology // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - V. 46. - P. 8038–8056.
364. Kesharwani P., Gajbhiye V., Jain N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA // *Biomaterials*. - 2012. - V. 33. - P. 7138–7150.
365. Briley W. E., Bondy M. H., Randeria P. S., Dupper T. J., Mirkin C. A. Quantification and real-time tracking of RNA in live cells using Sticky-flares // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2015. - V. 112. - P. 9591–9595.
366. Wu X. A., Choi C. H. J., Zhang C., Hao L., Mirkin C. A. Intracellular fate of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates // *J. Am. Chem. Soc.* - 2014. - V. 136. - P. 7726–7733.
367. Barnaby S. N., Perelman G. A., Kohlstedt K. L., Chinen A. B., Schatz G. C., Mirkin C. A. Design considerations for RNA spherical nucleic acids (SNAs) // *Bioconjug. Chem.* - 2016. - V. 27. - P. 2124–2131.
368. Chinen A. B., Ferrer J. R., Merkel T. J., Mirkin C. A. Relationships between poly(ethylene glycol) modifications on RNA-spherical nucleic acid conjugates and cellular uptake and circulation time // *Bioconjug. Chem.* - 2016. - V. 27. - P. 2715–2721.
369. Nakashima Y., Abe N., Ito Y., Abe H. Nanostructured RNAs for RNA Interference. In

- Siould M., ed. RNA Interference. Challenges and Therapeutic Opportunities // Springer, New York. - 2015. - P. 17-37.
370. Campuzano S., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M. Electrochemical genosensing of circulating biomarkers // *Sensors (Switzerland)* - 2017. - V. 17. - P. 1–20.
371. Barnaby S. N., Lee A., Mirkin C. A. Probing the inherent stability of siRNA immobilized on nanoparticle constructs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2014. - V. 111. - P. 9739–9744.
372. Volkov A. A., Kruglova N. S., Meschaninova M. I., Venyaminova A. G., Zenkova M. A., Vlassov V. V., Chernolovskaya E. L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // *Oligonucleotides*. - 2009. - V. 19. - P. 191–202.
373. Deleavey G. F., Damha M. J. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing // *Chem. Biol.* - 2012. - V. 19. - P. 937–954.
374. Ya-Lin Chiu, Akbar Ali, Chia-ying Chu H. C., Rana and T. M. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells // *Chem. Biol.* - 2004. - V. 11. - P. 1165–1175.
375. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference // *Nat. Biotechnol.* - 2004.- V. 22. - P. 326–330.
376. Song W., Kim K.-R., Park M., Eun Lee K., Ahn D.-R. Backbone-modified oligonucleotides for tuning the cellular uptake behaviour of spherical nucleic acids // *Biomater. Sci.* - 2017. - V. 5. - P. 412–416.
377. Hua Y., Sahashi K., Hung G., Rigo F., Passini M. A., Bennett C. F., Krainer A. R. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model // *Genes Dev.* - 2010. - V. 24. - P. 1634–1644.
378. Raal F. J., Santos R. D., Blom D. J., Marais A. D., Charng M. J., Cromwell W. C., Lachmann R. H., Gaudet D., Tan J. L., Chasan-Taber S., Tribble D. L., Flaim J. A. D., Crooke S. T. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet*. - 2010. - V. 375. - P. 998–1006.
379. Miner P., Wedel M., Bane B., Bradley J. An enema formulation of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule-1, in the treatment of chronic, unremitting pouchitis // *Aliment. Pharmacol. Ther.* - 2004. - V. 19. - P. 281–286.
380. Mendell R. J., Rodino-Klapac L., Sahenk Z., Roush K., Bird L., Lowes L., Alfano L., a Gomez M.A., Lewis S., Kota J., Malik V., Shontz K., M Walker C., Flanigan K., Kean R. J., Allen H., Shilling C., Melia R. K., Sazani P. Saoud J. B., Kaye E. M., the Eteplirsen Study Group. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy // *Ann. Neurol.* - 2013. - V. 74. - P. 637–647.

381. Lai P., Letchman E., Mashouf S., Pignol J.-P., Reilly R. Depot system for controlled release of gold nanoparticles with precise intratumoral placement by permanent brachytherapy seed implantation (PSI) techniques // *Int. J. Pharm.* - 2016. - V. 515. - P. 729–739.
382. Stewart J. M., Driedzic W. R., Berkelaar J. A. Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system // *Biochem. J.* - 1991. - V. 275. - P. 569–573.
383. Wang Y., Li C., Pielak G. J. Effects of proteins on protein diffusion // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - V. 132. - P. 9392–9397.
384. Smith A. E., Sarkar M., Young G. B., Pielak G. J. Amide proton exchange of a dynamic loop in cell extracts // *Protein Sci.* - 2013. - V. 22. - P. 1313–1319.
385. Cutler I. J., Zhang K., Zheng D., Auyeung E., Prigodich A. E., Mirkin C. A. Polyvalent nucleic acid nanostructures // *J. Am. Chem. Soc.* 2011.- V. 133. - P. 9254–9257.
386. Seferos D. S., Prigodich A. E., Giljohann D. A., Patel P. C., Mirkin C. A. Polyvalent DNA nanoparticle conjugates stabilize nucleic acids // *Nano Lett.* - 2009. - V. 9. - P. 308–311.
387. Zagorovsky K., Chou L., C W Chan W. Controlling DNA-nanoparticle serum interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2016. - V. 113. - P. 13600–13605.
388. Giljohann D. A., Seferos D., Prigodich A. E., Patel P. C., Mirkin C. A. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - V. 131. - P. 2072–2073.
389. Леонтьева А.И., Брянкин К. В. Общая химическая технология: учебник // Тамбов: Издательство ТГТУ. - 2004. - С. 5-74.
390. Feng J., Guo X., Ramlawi N., Pfeiffer T. V., Geutjens R., Basak S., Nirschl H., Biskos G., Zandbergen H. W., Schmidt-Ott A. Green manufacturing of metallic nanoparticles: A facile and universal approach to scaling up // *J. Mater. Chem. A.* - 2016. - V. 4. - P. 11222–11227.
391. Suzuki Y., Hyodo K., Tanaka Y., Ishihara H. SiRNA-lipid nanoparticles with long-term storage stability facilitate potent gene-silencing in vivo // *J. Control. Release.* - 2015. - V. 220. - P. 44–50.
392. Balasubramanian S. K., Yang L., Yung L. Y. L., Ong C. N., Ong W. Y., Yu L. E. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles // *Biomaterials.* - 2010. - V. 31. - P. 9023–9030.
393. Huang H.-C., Barua S., Kay D. B., Rege K. Simultaneous enhancement of photothermal stability and gene delivery efficacy of gold nanorods using polyelectrolytes // *ACS Nano.* - 2009. - V. 3. - P. 2941–2952.
394. Zhou B., Xiong Z., Wang P., Peng C., Shen M., Mignani S., Majoral J. P., Shi X. Targeted tumor dual mode CT/MR imaging using multifunctional polyethylenimine-entrapped gold nanoparticles loaded with gadolinium // *Drug Deliv.* - 2018. - V. 25. - P. 178–186.

395. Li J., Chen Y., Kawazoe N., Chen G. Ligand density-dependent influence of arginine–glycine–aspartate functionalized gold nanoparticles on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Nano Res.* - 2018. - V. 11. - P. 1247–1261.
396. Hayat M. A., ed. *Colloidal gold: principles, methods, and applications* // Elsevier Science. - 2012. - P. 484.
397. Alkilany A. M., Abulateefeh S. R., Mills K. K., Bani Yaseen A. I., Hamaly M. A., Alkhatib H. S., Aiedeh K. M., Stone J. W. Colloidal stability of citrate and mercaptoacetic acid capped gold nanoparticles upon lyophilization: effect of capping ligand attachment and type of cryoprotectants // *Langmuir.* - 2014. - V. 30. - P. 13799–13808.
398. *Водородная связь.* (Наука, 1981).
399. Guo Y., Zhang Y., Shao H., Wang Z., Wang X., Jiang X. Label-free colorimetric detection of cadmium ions in rice samples using gold nanoparticles // *Anal. Chem.* - 2014. - V. 86. - P. 8530–8534.
400. Zhang L., Kosaraju S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants // *Eur. Polym. J.* - 2007. - V. 43. - P. 2956–2966.
401. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - V. 33. - P. 439–447.
402. Sarkar M., Smith A. E., Pielak G. J. Impact of reconstituted cytosol on protein stability // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2013. - V. 110. - P. 19342–19347.
403. Chong, B.E., Wall, D.B., Flynn S. J. Rapid profiling of E coli proteins up to 500 kDa from whole cell lysates using MALDI-TOF-MS // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* - 1997. - V. 11., - P. 1900– 1908.
404. Starostin K. V., Demidov E. A., Bryanskaya A. V., Efimov V. M., Rozanov A. S., Peltek S. E. Identification of bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach // *Sci. Rep.* - 2015. - V. 5. - P. 1–9.
405. Extinction coefficients. In *TECH TIP #6 [Электронный ресурс]* // Thermo Fisher Scientific Inc. All. - 2013. - P. 6.4. URL: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2FAApplication-Notes%2FTR0006-Extinction-coefficients.pdf&title=VGVjaCBUaXA6IEV4dGluY3Rpb24gY29lZmZpY2llbnRzIGFuZCBlc3RpbWF0aW9uIG9mIHByb3RlaW4gY29uY2VudHJhdGlvbiBieSBhYnNvcmlJhbmNlIGF0IDI4MG5t> (дата обращения 19.12.2019).
406. Ozcan G., Ozpolat B., Coleman R. L., Sood A. K., Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2015. - V. 87. - P.

108–119.

407. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V, Stetsenko D. A., Medicine F. Phosphoryl guanidines : a new type of nucleic acid analogues // *Acta Naturae*. - 2014. - V. 6. - P. 116–118.

408. Lichen Yin , Nan Zheng and J. C. Highly Efficient SiRNA Delivery Mediated by Cationic Helical Polypeptides and Polypeptide-Based Nanosystems. In Shum K., Rossi J., eds. *SiRNA Delivery Methods* // Springer. - 2016. - V. 1364. - P. 37–48.

409. Du Z., Munye M. M., Tagalakakis A. D., Manunta M. D. I., Hart S. L. The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations // *Sci. Rep.* - 2014. - V. 4. - P. 4–9.

410. Marks J. R., Placone J., Hristova K., Wimley W. C. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - V. 133. - P. 8995–9004.