

УДК 577.29

РЕНТГЕНОФОТОЭЛЕКТРОННЫЙ АНАЛИЗ АДСОРБЦИИ ФОСФОРТИОАТНЫХ ОЛИГОМЕРОВ ДНК НА ПОВЕРХНОСТИ ЗОЛОТА*

И.Ю. Янов, А.В. Быков, Е.В. Ожимкова, Э.М. Сульман

Тверской государственной технический университет

В работе представлены результаты РФЭС исследований адсорбции фосфотиоатных олигомеров ДНК на поверхности золота. На основе полученных данных предложена модель адсорбции указанных олигомеров. Показано, что разработанная методика позволяет получить близкий к мономолекулярному слой модифицированных олигонуклеотидов ДНК на поверхности золота.

Ключевые слова: рентгенофотоэлектронная спектроскопия, олигомеры ДНК, фосфотиоаты, молекулярная электроника, биосенсоры.

Введение. Способность атомов серы и золота образовывать прочную ковалентную связь широко используется в современной нанотехнологии. В частности, тиолирование применяется в молекулярных электронных устройствах в качестве интерфейса между органическими молекулами и металлическими (золотыми) электродами. Тиолированные олигонуклеотиды ДНК применяются также при создании биочипов.

В настоящее время большая часть исследований в этой области ориентирована на олигонуклеотиды ДНК с одной тиолированной группой на конце, в которых атом серы соединяет поверхность золота с ДНК (как правило с помощью алкантиоловых или меркаптановых спейсеров), т.е. на системы типа золото-сера-углерод (Au-S-C-). В данной работе нами проведен рентгенофотоэлектронный анализ адсорбции фосфотиоатных олигомеров ДНК на поверхности золота (систем типа Au-S-P-).

Фосфотиоаты являются вариантом нормальной ДНК, в котором один из немостиковых атомов кислорода в каждой фосфодиэфирной группе заменен атомом серы (рис. 1). Фосфотиоатная модификация олигонуклеотидов широко используются в антисмысловых исследованиях для блокировки экспрессии нежелательных генов из-за ее стабильности в цитоплазме с высоким содержанием экзонуклеазы и способности проникать через двойной липидный слой клеточных мембран [6].

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант № Р978)

В отличие от одноцепочечных ДНК с одной тиолированной группой на конце, широко применяемых в биочипах, фосфотиоаты способны образовывать многочисленные ковалентные связи с золотой поверхностью, т. е. они располагаются *параллельно* поверхности подложки. Данная возможность представляет интерес для многих практических приложений, таких, как разработка нового поколения полностью электронных биосенсоров и нанофлюидика.

Подготовка образцов. Для обеспечения упорядоченной адсорбции ДНК и получения воспроизводимых результатов необходимо высокое качество золотой подложки.

Золотая подложка была приготовлена с помощью вакуумного испарения золота и его конденсации на предварительно очищенной стандартной 8 дюймовой кремниевой пластине, используемой в микроэлектронике. Для лучшей адгезии золота с подложкой и предотвращения отслаивания золота в течение последующей обработки между кремниевым субстратом и слоем золота был нанесен слой титана в 5 нм. Толщина золотого покрытия составила около 100 нм. Исходная пластина была разрезана на образцы размером 5×3 мм.

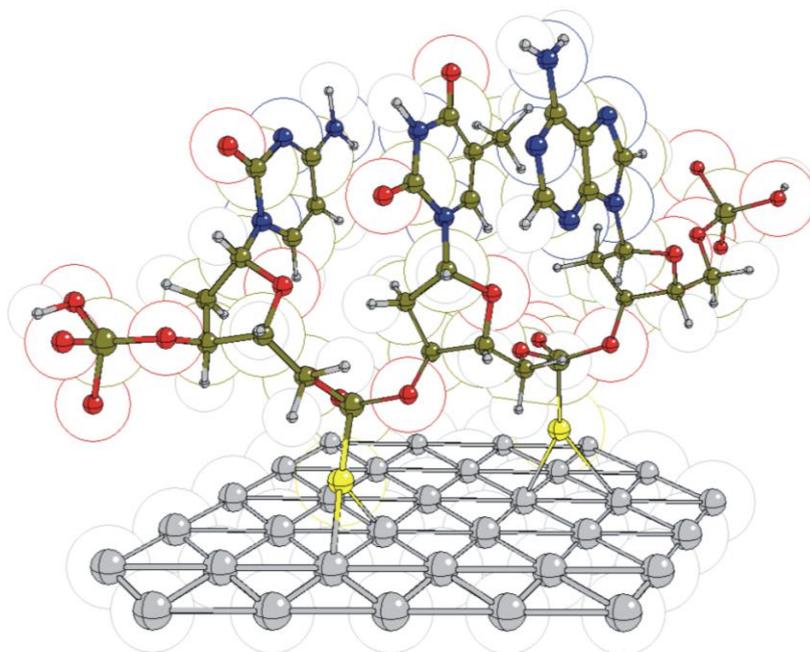


Рис. 1. Модель адсорбции фосфотиоатных олигомеров ДНК на поверхности золота

Золото является химически инертным веществом, но оно мгновенно покрывается слоем углеводов после контакта с

воздухом. Если рентгенофотоэлектронный анализ показывает, что на поверхности содержатся только атомы углерода, золота и кислорода, то такая подложка считается пригодной для нанесения исследуемых образцов. Если же на поверхности присутствуют другие элементы, то необходима дополнительная очистка поверхности золота.

Нами были исследованы различные химические и физические способы очистки. С помощью рентгенофотоэлектронного анализа было установлено, что наилучшие результаты дает применение раствора «Пиранья». Для этого золотой образец помещался на несколько секунд (до начала бурного кипения) в раствор 30% перекиси водорода (H_2O_2) и концентрированной серной кислоты (H_2SO_4) (30:70 по объему). Затем образец несколько раз промывался в деионизированной воде MilliQ. После такой обработки, обзорные РФЭ-спектры не показывали содержание посторонних примесей на образце.

Остальные из исследованных методов не позволили полностью избавиться от загрязнения образцов органическими соединениями. Также было обнаружено, что существенно снизить загрязнение поверхности позволяет вакуумная сушка образцов.

Для анализа использовались следующие образцы:

1. Чистый золотой образец, помещенный на несколько секунд (до начала бурного кипения) в раствор «Пиранья». Затем, образец три раза промывался в деионизированной воде MilliQ и высушивался в вакууме.

2. Золотой образец, подготовленный согласно п.1, с нанесенным раствором модифицированных олигонуклеотидов в деионизированной воде MilliQ (концентрация 9.25 мкг/мл). После инкубации в течение 12 часов образец промывался MilliQ водой и высушивался в вакууме.

Выбор тестовой последовательности олигонуклеотидов. В качестве объекта исследования нами была выбрана одноцепочечная последовательность нуклеотидов, комплементарная специфическому участку промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV). Уникальность CaMV 35S промотора заключается в том, что он используется практически во всех генетически модифицированных сельскохозяйственных культурах выращиваемых или исследуемых в настоящее время [3] CaMV 35S промотор и NOS терминатор содержатся в большинстве коммерчески используемых генетически модифицированных растений). Поэтому, наличие в пробах нуклеотидных последовательностей, характерных для 35S промотора является наиболее универсальным признаком ГМО (за исключением тех растений, которые могут быть поражены природным вирусом мозаики цветной капусты, например, относящийся к семейству крестоцветных рапс).

CaMV 35S промотор был впервые выделен и исследован в начале 1980-х годов Chua Nam-Hai и соавт. из университета Рокфеллера [5]. Чтобы определить наличие в пробах ГМО, созданных с использованием

промотора вируса мозаики цветной капусты необходимо синтезировать одноцепочечные зондовые олигонуклеотиды, комплементарные каким либо специфическим его участкам.

Для обеспечения эффективной и селективной гибридизации с CaMV 35S промотором, нами была выбрана следующая последовательность, состоящая из 26 нуклеотидов и предложенная в работе [4]:

– оригинальная последовательность CaMV 35S в области «минимального промотора», содержащая TATA и TCACC боксы:

CAGTAGGGAATGCAGTCACCTCTATA

– комплементарная ей последовательность зонда:

5'-GTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATAT-3'

Фосфоротиоаты ДНК. Для решения задачи прочного и упорядоченного присоединения ДНК параллельно поверхности золота, мы использовали фосфоротиоатный аналог нашего зонда, комплементарного к выбранной последовательности CaMV 35S промотора.

Синтез тиофосфатных олигонуклеотидов осуществлялся амидофосфитным методом с использованием содержащего серу окислителя на стадии окисления [1]. Метод позволяет синтезировать олигонуклеотиды, содержащие фосфотиоатную связь в любом положении олигонуклеотидной цепи. В результате синтеза получается 2n диастереоизомеров (где n – число фосфотиоатных связей). Данный синтез был проведен по нашему заказу научно-производственной компанией СИНТОЛ [1].

Рентгенофотоэлектронная спектроскопия образцов. Спектры были получены в ИНБТ ТГТУ с помощью спектрометра ЭС 2403 М-Т СКБ АП РАН с анализатором энергий PNOIBOS 100 (производство SPECS, Германия). Для фотоэлектронного возбуждения использовалось характеристическое излучение Mg K α ($h\nu=1253.6$ эВ). Условия съемки:

– энергия анализатора: 7 эВ для спектров высокого разрешения 40 эВ для обзорных спектров;

– мощность рентгеновского источника: 100 Вт;

– вакуум: 10^{-7} Па.

Спектры были записаны с предварительно дегазированных в сверхвысоком вакууме образцов. Спектры высокого разрешения были получены путем накопления и усреднения соответствующих спектров. В качестве референтного пика был использован пик Au 4f_{7/2} (84,00 эВ). При моделировании 2p подуровня серы учитывалось, что расстояние между компонентами 2p_{3/2} и 2p_{1/2} равно 1.3 эВ; соотношение интенсивностей этих компонент 2:1.

Во всех моделях фон определялся по методу Ширли. Сравнение обзорных спектров до и после нанесения олигонуклеотидов однозначно свидетельствует о присутствии олигонуклеотидов ДНК на поверхности

золота. Для того, чтобы детально исследовать характер данного взаимодействия, нами были получены спектры высокого разрешения для отдельных элементов. Наибольший интерес для целей нашего исследования представляют спектры серы, фосфора и азота (рис. 2–4).

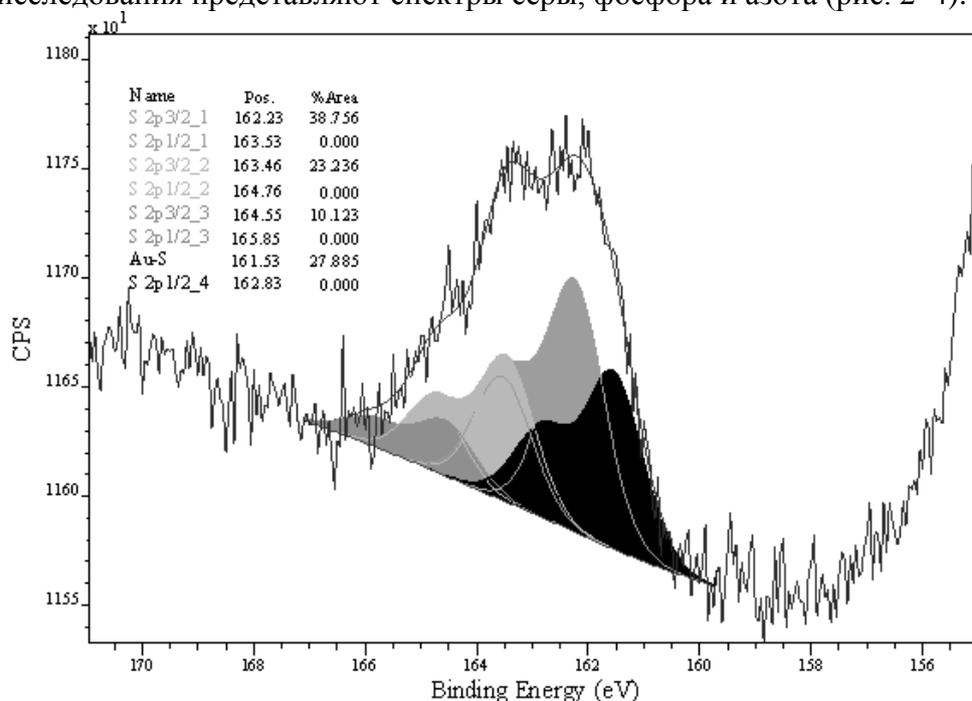


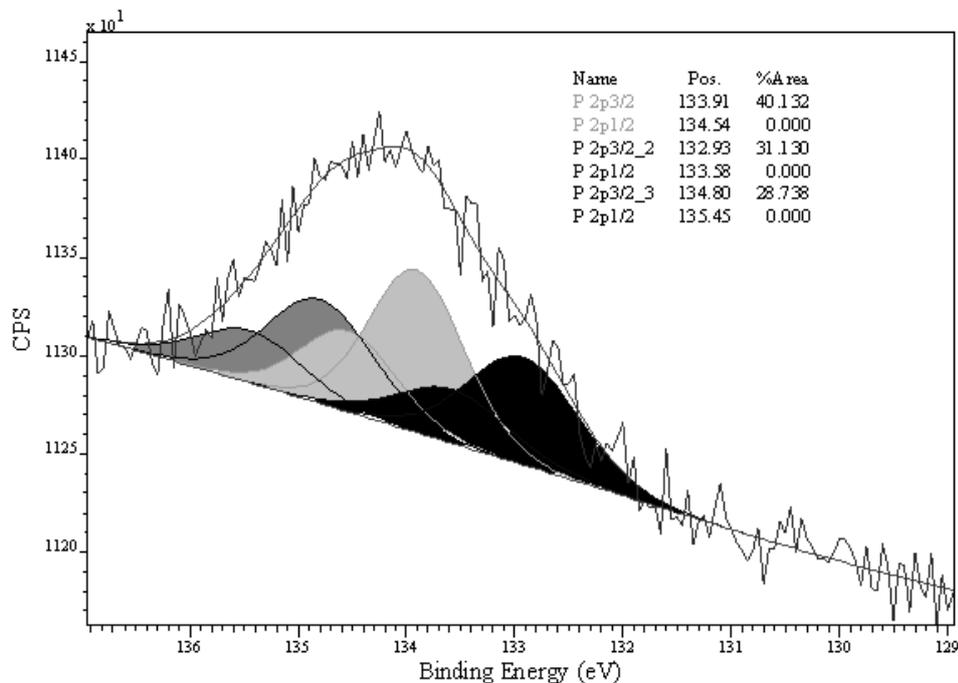
Рис. 2. Спектр высокого разрешения S 2p после нанесения олигонуклеотидов: по оси абсцисс – энергия связи, эВ, по оси ординат – интенсивность сигнала, с

Наиболее релевантная математическая модель (дающая минимальное среднеквадратичное отклонение от экспериментального спектра) для спин-разрешенного дублета подуровня S 2p состоит из четырех компонентов, соответствующих разным химическим состояниям серы. Известно, что для алкантиолов энергия связи S 2p_{3/2} электронов около 162 эВ характерна для связи S-Au, тогда как наличие пиков S 2p_{3/2} между 163–164 эВ свидетельствует о том, что алкантиол не связан с золотой подложкой (и находится на поверхности монослоя связанных алкантиолов) [2].

Учитывая эти данные, можно предположить, что пики 162,23 эВ и 163,46 эВ соответствуют связанным и несвязанным с подложкой тиол-модифицированным нуклеотидам, соответственно. В отличие от алкантиолов, у нас остаются еще две компоненты, дающие значительный вклад в спектры.

Расположенный ниже всех пик 161,53 эВ можно интерпретировать как результат гидролиза связи S-P и образования

поверхностных сульфидов (донирование электронной плотности атомами золота понижает энергию связи S 2p электронов). Известно также, что золото является катализатором окисления органических соединений. Поэтому оставшийся пик (164,55 eV) может соответствовать более окисленному (по сравнению с исходным) состоянию серы тиолированного олигонуклеотида.



Р и с . 3 . Спектр высокого разрешения P 2p после нанесения олигонуклеотидов: по оси абсцисс – энергия связи, эВ, по оси ординат – интенсивность сигнала, с

РФЭ-спектры фосфора, золота и азота свидетельствуют в пользу данного предположения. Компьютерная обработка спектров показывает, что наибольшую статистическую значимость имеют трехкомпонентные модели для фосфора и двухкомпонентная модель для азота (рис. 3, 4).

Наименьшую энергию связи P 2p электронов (132.93 eV) можно ожидать для структур, где лишенные в результате гидролиза атомы серы олигонуклеотиды ковалентно присоединяются к поверхности золота через атомы фосфора. Тогда оставшиеся компоненты будут соответствовать свободным олигонуклеотидам и олигонуклеотидам, ковалентно связанным с золотом через атомы серы.

РФЭ-спектр азота хорошо описывается двухкомпонентной моделью (рис. 4). Можно предположить, что эти достаточно близко расположенные пики соответствуют двум различным состояниям азота

в основаниях ДНК (в аминоклупах и пятичленных циклах). В случае наличия неспецифического взаимодействия азота напрямую с подложкой или ее дефектами, более предпочтительной была бы трех- (и более) компонентная модель.

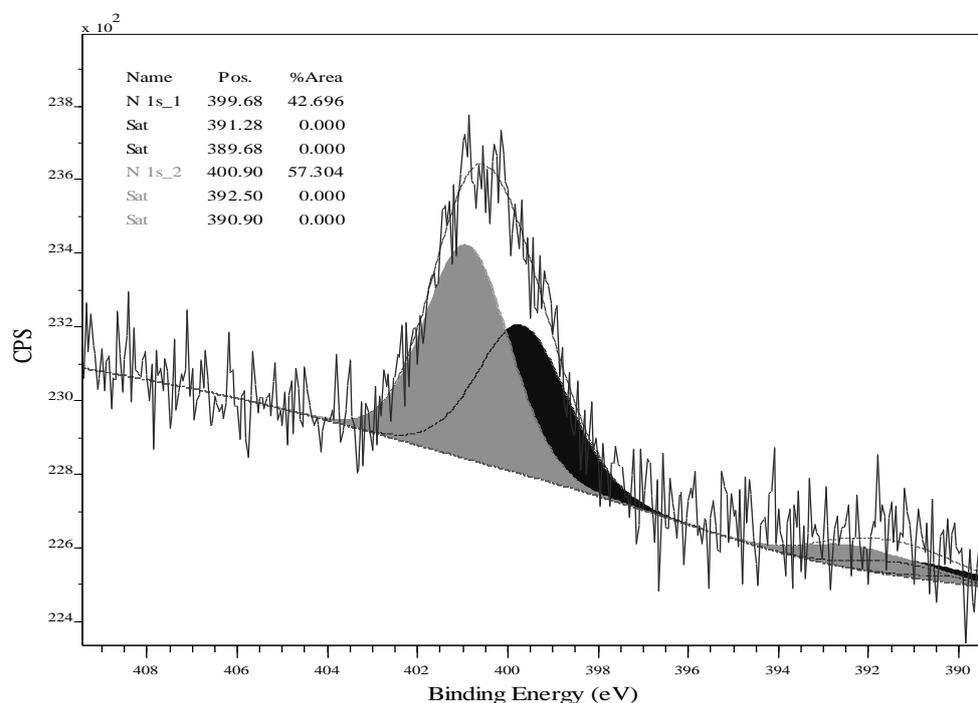


Рис. 4. Спектр высокого разрешения подуровня N 1s и его модель:
по оси абсцисс – энергия связи, эВ,
по оси ординат – интенсивность сигнала, с

Приведенные данные позволяют окончательно сформулировать модель адсорбции фосфототиоатных олигомеров ДНК на поверхности золота. С поверхностью золота ковалентно взаимодействуют:

- неповрежденные фосфототиоатные нуклеотиды;
- лишенные в результате гидролиза S-P связи серы нуклеотиды (присоединяющиеся к поверхности золота через фосфор);
- образовавшиеся в результате гидролиза S-P связи поверхностные сульфиды.

Выводы. 1. Энергия связи S 2p электронов подразделяется на четыре уровня, соответствующих: поверхностным сульфидам (27,88%) – гидролиз S-P связи; олигонуклеотидам, ковалентно связанным с золотом с помощью фосфототиоатных групп (38,75%); олигонуклеотидам со свободным фосфототиоатным группами (23,23%); олигонуклеотидам с различными формами окисленных фосфототиоатных групп (10,12%). Наименьшая энергия связи соответствует поверхностным сульфидам, а наибольшая – окисленным состояниям фосфототиоатных групп олигонуклеотидов.

2. Минимальная энергия связи Р 2р подуровня соответствует структурам, в которых лишённые серы олигонуклеотиды ковалентно присоединяются к поверхности золота (31,13%). Оставшиеся 68,86% (28,73%+40,13%) соответствуют свободным олигонуклеотидам и олигонуклеотидам, ковалентно связанным с золотом через атомы серы.

3. Сравнение процентного содержания соответствующих атомов в спектрах S 2р и Р 2р подуровней позволяет сделать вывод, что 69,88% (38,75%+31,13%) нуклеотидов в рассматриваемых ДНК ковалентно связано с золотой подложкой. Доля образовавшихся поверхностных сульфидов (27,88%) хорошо соответствует количеству ковалентно связанных с золотом нуклеотидов без серы (31,13%, результат гидролиза S-P связи). Поэтому оставшиеся ~ 30% неспецифических связей следует отнести к нуклеотидам с непрореагировавшими с золотом свободными, окисленными и гидролизованными фосфоротиоатными группами.

Таким образом, разработанная нами методика позволяет получить близкий к мономолекулярному (около 70% связей олигонуклеотидов являются прямыми ковалентными связями с золотом) слой модифицированных олигонуклеотидов ДНК на поверхности золота.

Список литературы

1. СИНТОЛ. Модифицированные олигонуклеотиды: [Электрон. ресурс]. 2011. Режим доступа: <http://www.syntol.ru/productf.htm> (дата обращения: 23.06.2011).
2. *Castner D.G., Hinds K., Grainger D.W.* X-ray photoelectron spectroscopy sulfur 2p study of organic thiol and disulfide binding interactions with gold surfaces // *Langmuir*. 1996. Vol. 12. P. 5083–5086.
3. *Chaouachi M., Fortabat M. N., Geldreich A., Yot P., Kerlan C., Kebdani N., Audeon C., Romaniuk M., Bertheau Y.* An accurate real-time PCR test for the detection and quantification of cauliflower Mosaic virus (CaMV): applicable in GMO screening // *European Food Research and Technology*. 2008. Vol. 227, № 3. P. 789–798.
4. *Morisset D., Dobnik D., Hamels S., Zel J., Gruden K.* NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs // *Nucleic Acids Research*. 2008. Vol. 36. P. 1–11.
5. *Odell J.T., Nagy F., Chua N.H.* Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature*. 1985. Vol. 313. P. 810–812.
6. *Shaw J.P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B.* Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum // *Nucleic Acids Research*. 1991. Vol. 19, № 4. P. 747–750.

X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY ANALYSIS OF THE PHOSPHOROTHIOATE DNA OLIGOMERS ADSORPTION ON THE GOLD SURFACE

I.Yu. Yanov, A.V. Bykov, E.V. Ozhimkova, E.M. Sulman

Tver State Technical University

We present here the results of XPS studies of the phosphorothioate DNA oligomers adsorption on the gold surface. Based on the obtained data, the model of adsorption of such oligomers is proposed. It is shown that the developed technique allows to obtain a near monomolecular layer of modified DNA oligonucleotides on the gold surface.

Keywords: *X-ray photoelectron spectroscopy, phosphorothioate DNA oligomers, molecular electronics, biosensors.*

Об авторах:

ЯНОВ Илья Юрьевич—кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: science@science.tver.ru

БЫКОВ Алексей Владимирович—кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: science@science.tver.ru

ОЖИМКОВА Елена Владимировна—кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: science@science.tver.ru

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна—доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой биотехнологии и химии, старший преподаватель кафедры гистологии и эмбриологии, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: science@science.tver.ru