

Оптический экспресс-мониторинг белка интерналина В патогенной бактерии *Listeria monocytogenes* с использованием ГКР-активных кремниевых нанонитей, декорированных серебром

© К.А. Гончар¹, Е.А. Алексеева¹, О.Д. Гюппенен¹, И.В. Божьев^{1,2}, Е.В. Калинин³,
С.А. Ермолаева³, Л.А. Осминкина^{1,4,¶}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (физический факультет),
119991 Москва, Россия

² Центр квантовых технологий, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (физический факультет),
119991 Москва, Россия

³ „Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи“ Минздрава России,
123098 Москва, Россия

⁴ Институт биологического приборостроения РАН, Московская область,
142290 Пущино, Россия

¶e-mail: osminkina@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 17.08.2022 г.

В окончательной редакции 19.09.2022 г.

Принята к публикации 22.09.2022 г.

Комбинационное рассеяние с поверхностным усилением — гигантское комбинационное рассеяние (ГКР), представляет собой мощный метод вибрационной оптической спектроскопии, который позволяет осуществлять высокочувствительное обнаружение молекул при очень малой концентрации вещества за счет усиления электромагнитных полей, создаваемых возбуждением локализованных поверхностных плазмонов на поверхности наноструктур благородных металлов. В работе разработана методика изготовления композитных наноструктур кремниевых нанонитей, декорированных серебром (AgКНН). Исследована ГКР-активность AgКНН для детектирования белков на примере человеческого сывороточного альбумина. Впервые показана возможность экспресс-диагностики белка InlB патогенных бактерий *Listeria monocytogenes* методом ГКР с использованием полученных наноструктур. В спектрах InlB, адсорбированного на AgКНН с различными концентрациями, наблюдаются четкие пики, соответствующие комбинационному рассеянию на молекулах белковой природы. Из полученных экспериментальных данных рассчитан предел обнаружения InlB, который составляет $4.8 \cdot 10^{-9}$ М. Представленные результаты свидетельствуют о высоком потенциале применений полученных композитных наноструктур для диагностики различных белков методом ГКР.

Ключевые слова: гигантское комбинационное рассеяние, кремниевые нанонити, композитные наноструктуры, альбумин, листерии, интерналин В.

DOI: 10.21883/OS.2022.11.53784.4037-22

Введение

Гигантское комбинационное рассеяние света (ГКР, Surface-enhanced Raman spectroscopy — SERS) является в настоящее время одним из самых быстроразвивающихся методов оптической спектроскопии, который обеспечивает высокочувствительное обнаружение молекул при очень малой концентрации вещества [1]. Благодаря высокой чувствительности и специфичности спектроскопия ГКР находит широкое применение во многих аналитических приложениях, таких как биомедицинская диагностика, детектирование и идентификация следовых количеств веществ, вплоть до регистрации одиночных молекул [1–3]. Метод ГКР заключается в усилении интенсивности сигнала комбинационного рассеяния (КР) молекул, адсорбированных на наноструктурах золота/серебра/меди. После того, как ГКР было впервые обнаружено для молекул пиридина, адсорбированных на шероховатом серебряном электроде в 1974 г. [4],

предложены химические и электромагнитные механизмы, лежащие в его основе. Химический механизм в ГКР вызван переносом заряда между адсорбированными молекулами и наноструктурами и обеспечивает 1000-кратное усиление [5]. Электромагнитный механизм связан с локализованным поверхностным плазмонным резонансом (ЛППР) в наноструктурах благородных металлов, что обеспечивает увеличение интенсивности сигнала обычно на 6–8 порядков [6,7]. Следует отметить, что длина волны света, необходимая для возникновения ЛППР, зависит от материала, размера, формы, показателя преломления окружающей среды и связи между соседними наночастицами [6,7]. При этом особенно сильное усиление КР до 10^9 – 10^{10} раз наблюдается в области „горячих точек“ (от англ. hot spots), где интенсивное электрическое поле создается в наноразмерных зазорах между плазмонными наноструктурами и действует как связанный оптический резонатор [8].

По сравнению с некоторыми другими альтернативными методами детектирования биомолекул ГКР рассматривается как отличный выбор для количественного определения и структурной характеристики в том числе и белков [9,10]. Например, в [11] продемонстрировали детектирование С-реактивного белка с использованием агломератов серебряных наночастиц, а в [12] смогли детектировать бычий сывороточный альбумин с использованием золотых наночастиц.

Для диагностических целей в спектроскопии ГКР широкое применение находят композитные наноструктуры на основе подложек наноструктурированного кремния, среди которых стоит отметить кремниевые нанонити (КНН), покрытые частицами благородных металлов [13]. КНН обычно получают с помощью металл-стимулированного химического травления (МСХТ). Данный метод основан на селективном химическом травлении пластин кристаллического кремния с использованием каталитического металла (Au, Ag, Pt и др.) и позволяет получать плотно упакованные массивы нанонитей кремния с единой кристаллографической ориентацией и различным уровнем легирования [13–16]. Ранее в наших работах методом ГКР с помощью КНН, покрытых наночастицами серебра и золота, была продемонстрирована возможность диагностики псевдомонады, который является специфическим метаболитом синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) в искусственной мокроте при концентрациях до $6.25 \mu\text{M}$, что является нижним пределом клинически значимого диапазона [17], а с помощью КНН, покрытых золотыми частицами, был задетектирован билирубин с пределом обнаружения $1 \mu\text{M}$ [18].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в борьбе с некоторыми инфекционными заболеваниями, существует ряд инфекций, диагностика которых до сих пор затруднена. К числу таких заболеваний следует отнести листериоз, возбудитель которого бактерия *Listeria monocytogenes* широко распространенный контаминант пищевых продуктов, вызывающий генерализованную инфекцию у людей и животных [19]. При попадании в организм листерия способна вызвать менингит, энцефалит, септицемию, эндокардит, абсцессы и гнойные поражения местного характера [19]. Патогенные листерии отличаются от близкородственных непатогенных листерий и других видов бактерий наличием поверхностного белка интерналина В (InlB), отвечающего за индукцию фагоцитоза и необходимого для активной инвазии гепатоцитов [20]. Таким образом, наличие InlB в биологических жидкостях организма (плазме крови, моче) может свидетельствовать о наличии соответствующего заболевания. В практике бактериологов часто используются серологические методы диагностики листерий, которые, однако, часто дают ложные результаты, обладают низкой чувствительностью и специфичностью. Таким образом, разработка надежного экспресс-метода диагностики листериоза является актуальной задачей.

Целью настоящей работы являлось изучение возможности детектирования InlB, белка бактерий *L.*

monocytogenes, методом ГКР с помощью КНН, покрытых наночастицами серебра. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи: разработать методику изготовления композитных наноструктур кремниевых нанонитей, декорированных серебром, исследовать методами электронной микроскопии морфологические особенности полученных композитных наноструктур, исследовать ГКР-активность AgКНН для детектирования белков на примере человеческого сывороточного альбумина; изучить возможность детектирования белка InlB, основываясь на полученных данных, рассчитать предел обнаружения InlB при его диагностике методом ГКР с использованием разработанных композитных наноструктур AgКНН.

Методика эксперимента

Образцы КНН были изготовлены методом МСХТ на пластинах *c*-Si *p*-типа проводимости с удельным сопротивлением $0.8\text{--}1.2 \Omega \cdot \text{cm}$ с кристаллографической ориентацией (100). Подготовка пластин *c*-Si к травлению состояла в их последовательном погружении в ацетон, этанол и 5 М HF по 2 min в каждый. После этого пластины промывались дистиллированной водой и высушивались на воздухе. Далее пластины *c*-Si погружались в раствор 0.02 М AgNO₃ и 5 М HF в соотношении 1:1 на 20 s. На этой стадии происходил процесс нанесения частиц серебра на поверхность пластин. После этого для формирования КНН пластины переносились в раствор 5 М HF и 30% H₂O₂ в соотношении 10:1, в котором происходил процесс химического травления пластины *c*-Si в местах, покрытых серебряными частицами. Время травления составляло 30 s. После этого пластины *c*-Si снова промывались дистиллированной водой и высушивались на воздухе. Для придания ГКР-активных свойств КНН происходило дополнительное покрытие их верхушек частицами серебра путём погружения образцов в раствор 0.02 М AgNO₃ и 5 М HF в соотношении 1:1 на 2 min. Затем образцы промывались дистиллированной водой и высушивались на воздухе. Структурные свойства КНН были исследованы, используя сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Carl Zeiss SUPRA 40 FE-SEM.

Для исследования обнаружения белков методом ГКР с помощью полученных AgКНН использовали сначала человеческий сывороточный альбумин (ЧСА, Sigma Aldrich), а затем рекомбинантный очищенный белок InlB. Рекомбинантный белок InlB был очищен из штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21::pET28b(+):InlBallele9, как описано в [21]. Образцы AgКНН инкубировались 60 min с разведенными в фосфатном буфере pH 7.0 белками ЧСА или InlB в разных концентрациях. Затем образцы высушивались при комнатной температуре на воздухе. Готовые высушенные образцы помещали на предметный столик под луч лазера длиной волны

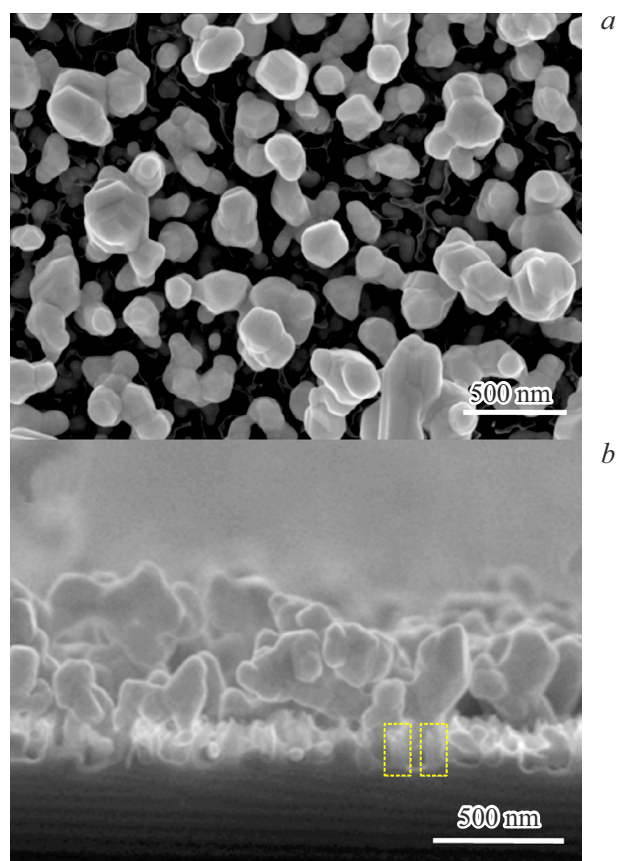


Рис. 1. Микрофотография сканирующей электронной микроскопии AgКНН: вид сверху (*a*), вид сбоку (*b*): желтым штрихом выделены две отдельные КНН.

633 nm и мощностью 1 mW. Спектры снимались на КР-спектрометре Confotec™ MR350 в течение 10 s.

Результаты и обсуждение

Микрофотографии сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) полученных образцов композитных наноструктур кремниевых нанонитей, декорированных наночастицами серебра (AgКНН), представлены на рис. 1 (рис. 1, *a* — вид образца сверху, рис. 1, *b* — вид образца сбоку).

Из рис. 1 видно, что длина КНН составляет 150–200 nm, диаметр и расстояние между нанонитями примерно одинаковы и равны 50 nm (две отдельные КНН для наглядности выделены желтым штрихом на рис. 1, *b*). В качестве катализатора химической реакции при получении КНН методом МСХТ использовались наночастицы серебра, которые видны на микрофотографиях СЭМ у основания КНН. Верхушки КНН также декорированы наночастицами серебра для придания таким композитным подложкам ГКР-активных свойств [17]. Из рис. 1, *b* видно, что толщина слоя AgКНН составляет около 500 nm. Диаметр частиц серебра составляет 200–300 nm.

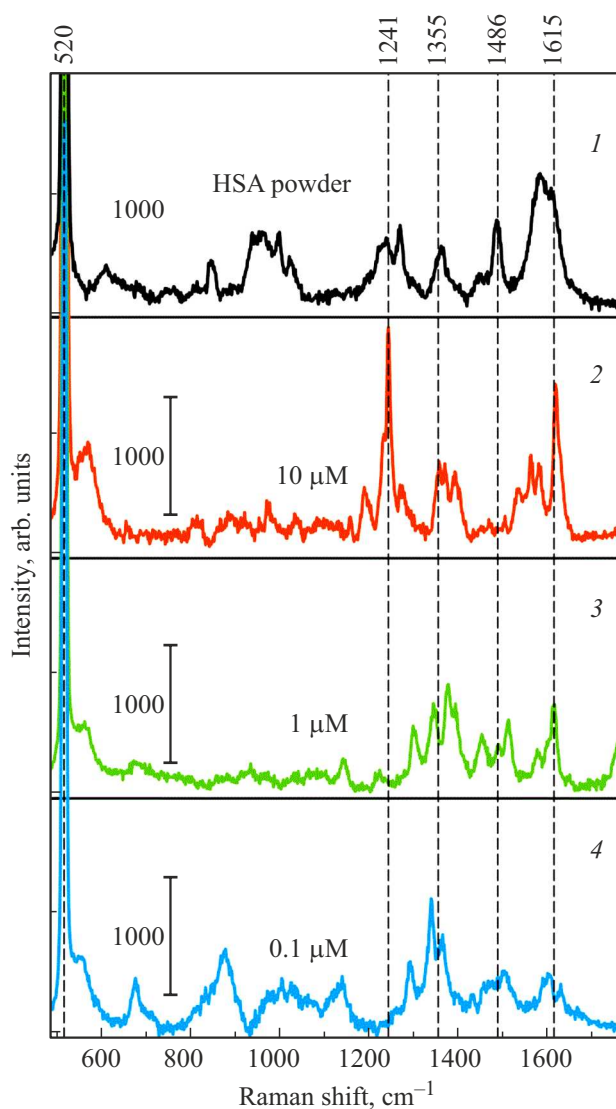


Рис. 2. Спектр КР порошка ЧСА на пластине монокристаллического кремния (*1*); спектры ГКР ЧСА, адсорбированного на AgКНН с различными концентрациями: 10 (*2*), 1 (*3*) и 0.1 μM (*4*).

Исследована возможность использования полученных композитных подложек для обнаружения белков методом ГКР. Для этого были сняты спектры хорошо изученного белка сывороточного альбумина человека (ЧСА). На рис. 2 представлены ГКР-спектры ЧСА, адсорбированного на AgКНН из их растворов в фосфатном буфере pH 7.0 с различными концентрациями: 10, 1 и 0.1 μM . Спектр КР порошка ЧСА на пластине монокристаллического кремния представлен на рис. 2 (*1*).

В представленных на рис. 2 спектрах пик, соответствующий 520 cm^{-1} , является характерным сигналом КР кристаллического кремния [18]. Стоит отметить, что этот пик можно использовать для нормировки при снятии ГКР-спектров адсорбированных на кремниевые подложки молекул. Это несомненно делает удобным

использование композитных материалов на основе кремния в ГКР-диагностике.

В представленных на рис. 2 спектрах КР и ГКР ЧСА можно выделить колебания амидной группы полипептидов, характеристические частоты которых лежат в спектральных областях вблизи 1615 , 1486 и 1240 см^{-1} и соответствуют изменениям длины $\text{C}=\text{O}$ пептидной связи для амида I, изменениям угла CNH для амида II и растяжениям $\text{C}-\text{N}$ - и $\text{N}-\text{H}$ -связей для амида III соответственно [22,23]. Полосы в области частот 1355 см^{-1} можно отнести к деформационным $\text{C}-\text{H}$ -колебаниям [22]. Следует отметить, что смещение частот полос в ГКР-спектрах белков от известных табличных значений [22] является допустимым и обычно вызвано изменениями ориентации исследуемых молекул или обусловлено межмолекулярными взаимодействиями, которые возникают между аминокислотными остатками белков [23].

Спектры ГКР белка InlB, адсорбированного на AgКНН из их растворов в фосфатном буфере pH 7.0 с концентрациями 10 , 1 и $0.1\text{ }\mu\text{M}$, 10 и 1 nM , представлены на рис. 3.

Характерный пик для кристаллического кремния в спектрах на рис. 3 расположен на частоте 520 см^{-1} . Остальные пики в спектрах можно отнести к InlB: пик на частоте 1008 см^{-1} соответствует симметричному растяжению фенильной группы (наиболее характерен для ароматической альфа-аминокислоты фенилаланина, входящей в состав всех известных белков); полосы в области $1110-1260\text{ см}^{-1}$ относят к колебаниям амида III; пики на 1339 и 1439 см^{-1} являются характерным для аминокислот белков, триптофана и гистидина соответственно; пик на частоте 1506 см^{-1} соответствует изгибу $\text{N}-\text{H}$ -связи пептидной основы и, наконец, пик на 1618 см^{-1} соответствует амиду I [22]. Таким образом, в представленных спектрах достаточно ярко выражены пики, характерные для биомолекул белковой природы. Это доказывает возможность эффективного и достаточно точного детектирования белка InlB с использованием разработанных композитных подложек AgКНН методами ГКР.

С точки зрения чувствительности образцов к понижению концентрации, видно достаточно четкое повторение полос в спектрах ГКР, характерных для InlB для всех используемых в эксперименте концентраций. В спектрах наблюдается изменение в соотношениях между высотами некоторых пиков, а также их сдвиг, что можно объяснить некоторыми изменениями ориентации исследуемой молекулы на поверхности образца и межмолекулярными взаимодействиями.

Предел детектирования (от англ. limit of detection, LOD) InlB рассчитывался по изменению интенсивности сигнала от амида I. Для этого построена зависимость интенсивности сигнала пика на 1618 см^{-1} от концентрации белка InlB и проведена аппроксимация изотермой адсорбции Ленгмюра (рис. 4) [24].

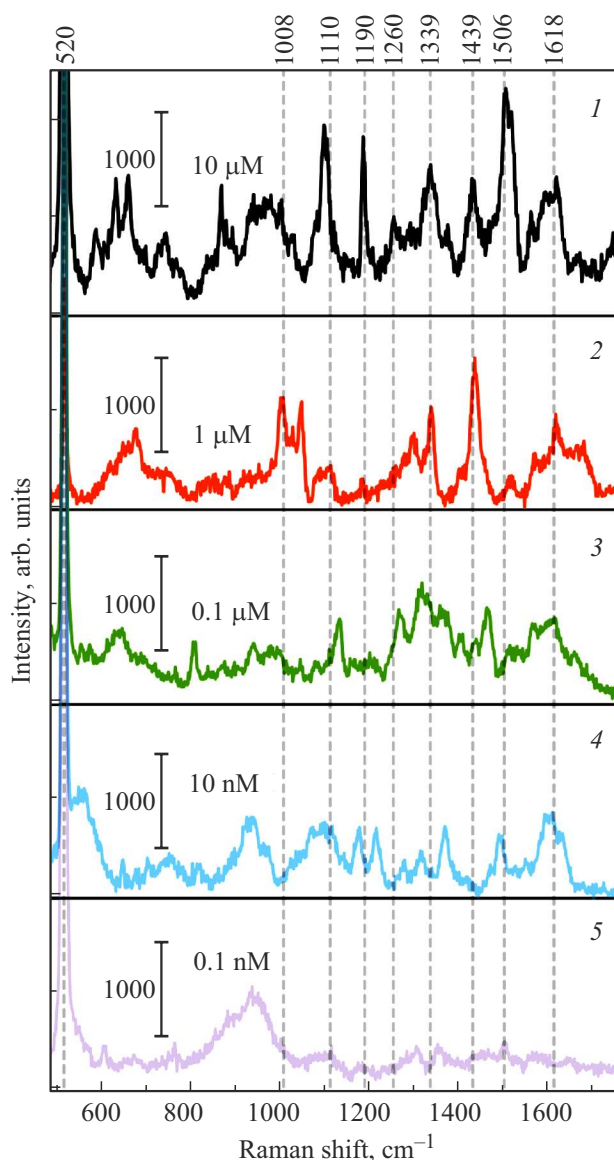


Рис. 3. Спектры ГКР белка InlB адсорбированного на AgКНН с концентрацией 10 (1), 1 (2), $0.1\text{ }\mu\text{M}$ (3) и 10 (4), 1 nM (5).

Взятые из изотермы адсорбции Ленгмюра значения интенсивностей при малых концентрациях аппроксимировались затем методом наименьших квадратов (вставка на рис. 4) для расчета стандартного отклонения ($\sigma = 3.514$) и наклона кривой ($slope = 2.42 \cdot 10^9$). После этого LOD рассчитывался согласно уравнению [25]

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{slope} = \frac{3.3 \cdot 3.514}{2.42 \cdot 10^9} = 4.8 \cdot 10^{-9}\text{ M.}$$

Полученное значение предела детектирования InlB, $LOD = 4.8 \cdot 10^{-9}\text{ M}$, свидетельствует о высоком потенциале применений ГКР-активных наноструктур на основе AgКНН для диагностики белков бактерий *Listeria monocytogenes*.

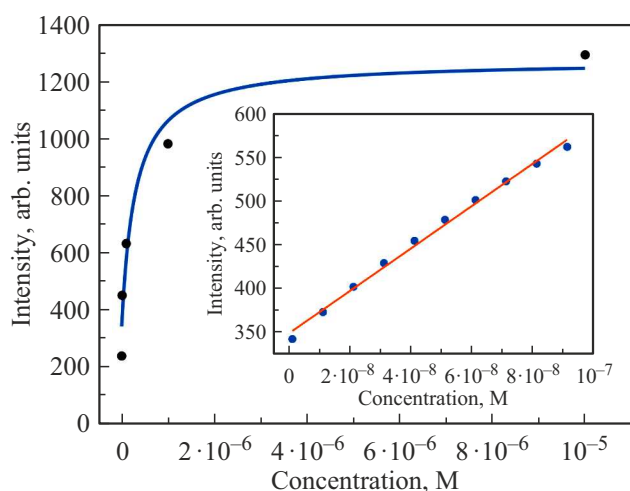


Рис. 4. Зависимость интенсивности пика ГКР амида I на частоте 1618 cm^{-1} от концентрации белка InlB. Синей линией показан результат аппроксимации изотермой адсорбции Ленгмюра. На вставке приведены первые 10 точек, полученных из изотермы Ленгмюра при малых концентрациях белка InlB и результат их аппроксимации (красная линия) методом наименьших квадратов.

Заключение

Разработана методика получения ГКР-активных наноструктур — декорированных серебром кремниевых нанонитей AgКНН. При этом КНН получали простым и доступным методом металл-стимулированного химического травления подложек кристаллического кремния, а декорирование Ag происходило его химическим восстановлением из AgNO_3 в присутствии 5 М HF.

На примере белка альбумина сыворотки крови человека показана возможность применения полученных композитных подложек AgКНН для безметочного определения белков методом ГКР.

Впервые показана возможность экспресс-диагностики белка InlB патогенных бактерий *Listeria monocytogenes* методом ГКР с использованием полученных наноструктур. Показано, что в спектрах ГКР InlB присутствуют полосы, характерные для биомолекул белковой природы. Рассчитанный из экспериментальных спектров предел обнаружения InlB составляет $4.8 \cdot 10^{-9}$ М, что свидетельствует о высокой чувствительности разработанных ГКР-активных наноструктур.

Таким образом показано, что синтезированные композитные наноструктуры AgКНН обладают огромным потенциалом для диагностики различных белков, в частности белка InlB, методом ГКР. Полученные в работе результаты являются перспективными для использования предложенной методики в диагностике бактерий *Listeria monocytogenes* в клинической практике.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-12-00297.

Благодарности

Использовалось оборудование Учебно-методического центра литографии и микроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова. Графики были построены в программе MagicPlotPro. Работа выполнена в рамках программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета „Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина“.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] X.X. Han, R.S. Rodriguez, C.L. Haynes, Y. Ozaki, B. Zhao. *Nature Rev. Methods Primers*, **1** (1), 1 (2021). DOI: 10.1038/s43586-021-00083-6
- [2] M.A. Tahir, N.E. Dina, H. Cheng, V.K. Valev, L. Zhang. *Nanoscale*, **13** (27), 11593 (2021). DOI: 10.1039/D1NR00708D
- [3] О.Е. Еремينا, А.А. Семенова, Е.А. Сергеева, Н.А. Браже, Г.В. Максимов, Т.Н. Шеховцова, Е.А. Гудилин, И.А. Веселова. *Успехи химии*, **87** (8), 741 (2018). DOI: 10.1070/RCR4804
- [4] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan. *Chem. Phys. Lett.*, **26** (2), 163 (1974). DOI: 10.1016/0009-2614(74)85388-1
- [5] J. Chowdhury. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **50**, 240 (2015). DOI: 10.1080/05704928.2014.942815
- [6] B. Sharma, R.R. Frontiera, A.I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne. *Mater. Today*, **15**, 16 (2012). DOI: 10.1016/S1369-7021(12)70017-2
- [7] E. Hutter, J.H. Fendler. *Adv. Mater.*, **16**, 1685 (2004). DOI: 10.1002/adma.200400271
- [8] S.L. Kleinman, R.R. Frontiera, A.I. Henry, J.A. Dieringer, R.P. Van Duyne. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15** (1), 21 (2013). DOI: 10.1039/C2CP42598J
- [9] И.П. Набиев, Р.Г. Ефремов, Г.Д. Чуманов. *УФН*, **154**, 459 (1988). DOI: 10.3367/UFNR.0154.198803D.0459
- [10] N. Feliu, M. Hassan, E. Garcia Rico, D. Cui, W. Parak, R. Alvarez-Puebla. *Langmuir*, **33** (38), 9711 (2017). DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01567
- [11] H. Kim, E. Kim, E. Choi, C.S. Back, B. Song, C.H. Cho, S.W. Jeong. *RSC Advances*, **5** (44), 34720 (2015). DOI: 10.1039/C5RA00040H
- [12] G.P. Szekeres, J. Kneipp. *Frontiers in Chemistry*, **7**, 30 (2019). DOI: 10.3389/fchem.2019.00030
- [13] V.S. Vendamani, S.N. Rao, A.P. Pathak, V.R. Soma. *ACS Appl. Nano Materials*, **5** (4), 4550 (2022). DOI: 10.1021/acsanm.1c04569
- [14] K.A. Gonchar, A.A. Zubairova, A. Schleusener, L.A. Osminkina, V. Sivakov. *Nanoscale Res. Lett.*, **11** (1), 1 (2016). DOI: 10.1186/s11671-016-1568-5

- [15] V. Sivakov, S.J. Christiansen. *J. Nanoelectron. Optoelectron.*, **7** (6), 583 (2012). DOI: 10.1166/JNO.2012.1396
- [16] Z. Huang, N. Geyer, P. Werner, J. de Boor, U. Gösele. *Adv. Mater.*, **23** (2), 285 (2011). DOI: 10.1002/adma.201001784
- [17] O. Žukovskaja, S. Agafilushkina, V. Sivakov, K. Weber, D. Cialla-May, L. Osminkina, J. Popp. *Talanta*, **202**, 171 (2019). DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.047
- [18] A.D. Kartashova, K.A. Gonchar, D.A. Chermoshentsev, E.A. Alekseeva, M.B. Gongalsky, I.V. Bozhev, A.A. Eliseev, S.A. Dyakov, J.V. Samsonova, L.A. Osminkina. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, (2021). DOI: 10.1021/acsbiomaterials.1c00728
- [19] F. Allerberger, M. Wagner. *Clin. Microbiol. Infect.*, **16** (1), 16 (2010). DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x
- [20] Я.М. Чаленко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Калинин, К.А. Собянин, С.А. Ермолаева. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, **35** (2), 53 (2017). DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-53-58
- [21] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **42** (5), 493 (2007). DOI: 10.1080/05704920701551530
- [22] Y. Chalenko, E. Kalinin, V. Marchenkov, E. Sysolyatina, A. Surin, K. Sobyenin, S. Ermolaeva. *Intern. J. Molec. Sci.*, **20** (17), 4138 (2019). DOI: 10.3390/ijms20174138
- [23] Г.Н. Тен, А.Ю. Герасименко, Н.Е. Щербакова, В.И. Баранов. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*, **19** (1), 43 (2019). DOI: 10.18500/1817-3020-2019-19-1-43-57
- [24] E. Massarini, P. Wästerby, L. Landström, C. Lejon, O. Beck, P.O. Andersson. *Sensors and Actuators, B* **207**, 437 (2015). DOI: 10.1016/J.SNB.2014.09.116
- [25] J. Thode. How to determine the LOD using the calibration curve? [Электронный ресурс]. URL: <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/method-validation/calibration-line-procedure>