

# Dezvoltarea unui aptasenzor pentru lizozim bazat pe oxid de grafena prin metoda "layer-by-layer"



Alina Vasilescu, Alis Vezeanu, Sorin David

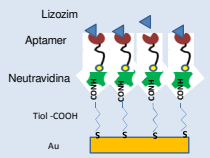
Centrul International de Biodinamica Bucuresti  
str. Intrarea Portocalelor 1B, sector 6, 060101, www.biodyn.ro

**INTRODUCERE.** Numeroase studii din ultimii ani au indicat potentialul grafenei si materialelor derivate din grafena pentru imbunatatirea caracteristicilor analitice ale biosenzorilor cu detectie prin Surface Plasmon Resonance (SPR), datorita avantajelor precum capacitate mare de adsorptie, posibilitati multiple de functionalizare etc [1,2]. Lizozimul din albus de ou este utilizat in anumite procese in industria alimentara, urme din aceasta proteina alergena putandu-se regasi in anumite vinuri sau branzeturi, de unde importanta dezvoltarii de metode analitice sensibile si selective pentru aceasta proteina.

**SCOP.** Lucrarea investigheaza avantajele inlocuirii monostraturilor autoasamblate de tioli cu oxid de grafena sau oxid redus de grafena la modificarea suprafetelor de aur utilizate in realizarea unui biosenzor pentru lizozim.

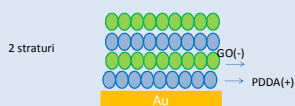
## EXPERIMENTAL.

### Aptasenzorul clasic cu tiol



Schema 1. Etapele urmate la realizarea aptasenzorului de lizozim [3]

### O solutie mai buna bazata pe grafena prin metoda LBL ?



Schema 2. Modificarea electrod aur prin metoda "layer by layer" LBL folosind un electrolit cationic clorura de polidialil dimetilamoniu (PDDA) si oxid de grafena (GO) sau oxid redus de grafena (RGO)

### Solutiile de oxid de grafena si oxid redus de grafena

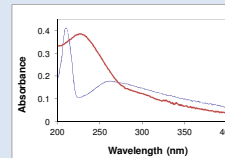


Fig. 1. Spectrul UV al solutiilor de RGO (in 20 mM tampon MES pH 5.5) si GO (in apa) utilizate in experimente

Oxidul de grafena si oxidul redus de grafena nu au fost puse la dispozitie prin amabilitatea Prof. Sabine Szunerits, Universitatea Lille 1, Franta. Oxidul de grafena a fost sintetizat din grafite prin metoda Hummers iar oxidul redus de grafena a fost obtinut din GO prin reducere chimica cu hidrazina [2].

## Studii SPR

### 1. Setup experimental

Pentru masuratorile SPR a fost utilizat un sistem SPR de tip SPREETA, dotat cu o celula in flux din PDMS si conectat la o pompa cu piston si la un computer. Sistemul este controlat de un software dezvoltat la ICB. Masuratorile s-au realizat in tampon MES 20 mM pH 6 cu 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> si 0.05% Tween-20. Aptamerul cu secventa 5'-5-Biosg\_TTT TTT TTT TTT TTT TTT GOA GCT AAG CAG GCG GCT CAC AAA ACC ATT CGC ATG CCG C-3' a fost achizitionat de la IDT DNA, neutravidina de la Pierce, toti ceilalti reactivi de la Sigma.

### 2. Acoperirea suprafetei de Au cu PDDA/GO

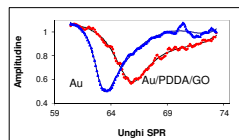


Fig. 2. Modificarea curbei SPR in urma acoperirii interfeței de Au cu PDDA/GO (2 straturi)

### 3. Functionalizarea senzoriului cu aptamerul pentru lizozim

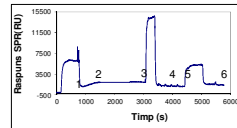


Fig. 3. Etape de realizare a aptasenzorului: activare cu EDC/NHS (1); imobilizare Neutravidina (2); blocare cu etanolamina (3); regenerare (4); imobilizare aptamer biotinitat (5); regenerare (6)

### 4. Calibrare cu lizozim in solutii tampon

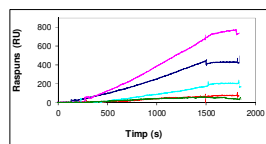


Fig. 4. Semnalul SPR pentru diverse concentratii de lizozim: 0.7; 2.1; 7; 21 si 42 nM. Solutiile de proteina au fost circulat prin celula in flux 10 min, urmate de 5 min solutie tampon, la 100 µL/min

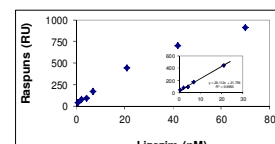


Fig. 5. Curba de calibrare pentru lizozim-DRU masurata la sfarsitul fiecarui test, in functie de concentratia de lizozim

### 5. Comparatie cu senzorul clasic

Parametru	Tiol	PDDA/RGO
Stabilitate in MES pH 6, 20 mM	> 3 zile	> 3 zile
Stabilitate in TRIS pH 7.4, 20 mM	> 3 zile	> 3 zile
Neutravidina imobilizata (RU)	2329 ±110	1342 ±236
Aptamer imobilizat (RU)	487 ±52	351 ±101
Domeniu liniar si limita de detectie	DL: 3.4-70 nM; LD: 2.4 nM	DL: 2-21 nM; LD: 0.7 nM

Caracteristicile analitice ale aptasenzorului SPR bazat pe oxid de grafena redus sunt similare cu cele ale senzoriului bazat pe tiol si permit atingerea unei limite de cuantificare de 2 nM.

#### Perspective:

- optimizarea aptasenzorului SPR bazat pe oxid de grafena redus si aplicarea la analiza de probe reale;
  - utilizarea GO in loc de RGO si imobilizarea directa a aptamerului prin aminocuplare.
- Studii electrochimice in acest sens sunt in curs.

**CONCLUZII:** Timpul redus si usurinta modificarii suprafetei de Au cu GO si RGO prin tehnica LBL recomanda aceste nanomateriale ca alternative la straturile autoasamblate de tioli. Prin optimizarea stratului de grafena, performantele analitice ale aptasenzorului de lizozim pot fi imbunatatite in continuare

**MULTUMIRI:** Autorii multumesc prof. Sabine Szunerits, Interdisciplinary Research Institute, Universitatea Lille 1, Franta, pentru oxidul de grafena si oxidul redus de grafena utilizate in aceasta lucrare. Aceasta lucrare a fost realizata cu sprijinul financiar acordat A. Vasilescu prin grantul de Reintegrare Internationala Marie Curie FP7-PEOPLE-RG-277126

## Studii electrochimice

### 1. Setup experimental

Pentru masuratorile electrochimice au fost utilizate:  
• un potenciostat/galvanostat VSP (Bio-Logic S.A, France), dotat cu software EC-Lab  
• un sistem conventional de 3 electrozi



Fig. 6. Sistemul de 3 electrozi utilizat in determinatile electrochimice WE: gold wire, surface: 0.378 cm<sup>2</sup> REF: Ag/AgCl CE: Pt

### 2. Acoperirea electrozilor cu PDDA/GO

Firele de Au au fost modificate cu oxid de grafena (GO) prin metoda "LBL" prin imersare succesiva in solutiile de PDDA si GO (cate 30 min uitein fiecare solutie, 2 straturi).

### 3. Functionalizarea electrozilor cu aptamer de lizozim

Imobilizarea aptamerului s-a realizat prin aminocuplare. Aptamerul avand grupare 5' terminala amino a fost imobilizat covalent de gruparile carboxil din GO. Secventa aptamerului biotinitat este



### 4. Caracterizarea aptasenzorului

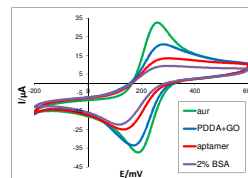


Fig. 7. Voltamograme ciclice in 1mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]- in 0.1 M KCl pentru diversele etape de realizare a senzoriului: domeniu de potential -0.2 la +0.6 V, viteza de scanean 100mV/s

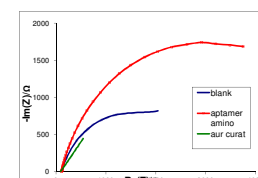


Fig. 8. Spectroscopie de impedanta electrochimica (EIS) in 1 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] in 0.1 M KCl; E<sub>normal</sub> 0.23 V, domeniu frecventa 9.5 KHz - 1 Hz, amplitudine 10 mV

### 5. Specificitatea semnalului electrochimic

Blocarea adsorptiei nespecifice cu BSA

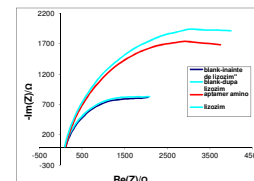


Fig. 9. EIS in 1 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] in 0.1 M KCl; E<sub>formal</sub> 0.23 V, domeniu frecventa 9.5 KHz - 1 Hz, amplitudine 10 mV TEST: 10 µg/mL lizozim in 20 mM TRIS pH 7.4 cu 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 % Tween 20)

## REFERINTE BIBLIOGRAFICE

- Szunerits S, Maalouli N, Wijaya E, Vilcot J-P, Boukherroub R, *Anal Bioanal Chem*, 2013, **405**, 1435-1443
- Subramanian P, Lesniewski A, Kaminska I, Vlandas A, Vasilescu A, Niedziolka-Jonsson J, Pichonat E, Happy H, Boukherroub R, Szunerits S, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **50**, 239-243
- Mihai I, Vezeanu A, Polonschii C, Albu C, Radu G-L, Vasilescu A, Label-free detection of lysozyme in wines using an aptamer-based biosensor and SPR detection, *Sens. Act.B Chemical*, 2015, **206**, 198-204