

Un nou nanomaterial pentru studiul interacțiunilor proteinelor

Alina Vasilescu*, Iuliana Mihai*, Alis Vezeanu*, Veronica Andrei*,
Georgian Nedelcu*, Sabine Szunerits**, Rabah Boukheroub**

*Centrul International de Biodinamica, Bucuresti

**Interdisciplinary Research Institute, Universitatea Lille 1, Franta



Scop: evaluarea nanofirelor de diamant ca si material de electrod pentru studiul interactiunilor proteinelor

Materiale:

Nanofire de diamant produse la IRI, Universitatea din Lille din electrozi de diamant policristalin prin «Reactive Ion Etching» cu plasma de oxigen*

Electrozi planari de diamant, donati de IRI, Lille

Electrozi de carbune vitros, Metrohm

Aplicatii:

-determinarea tirozinei si triptofanului

-determinarea lizozimei si urmarirea agregarii sale la pH acid

*Szunerits, S., Coffinier, Y., Galopin, E., Brenner, J., Boukherroub, R.,»
preparation of boron-doped diamnond nanowires and their application for
sensitive electrochemical detection of tryptophan», Electrochem. Comm, 12
(2010), 438-441

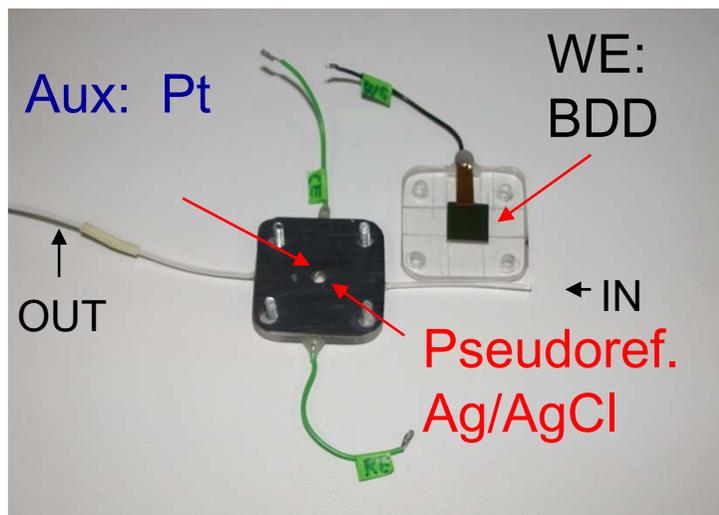


Material si metode

Celule folosite la determinarile electrochimice

Aparatura: VSP potentiostat/galvanostat: Bio-Logic S.A, France, EC-Lab software

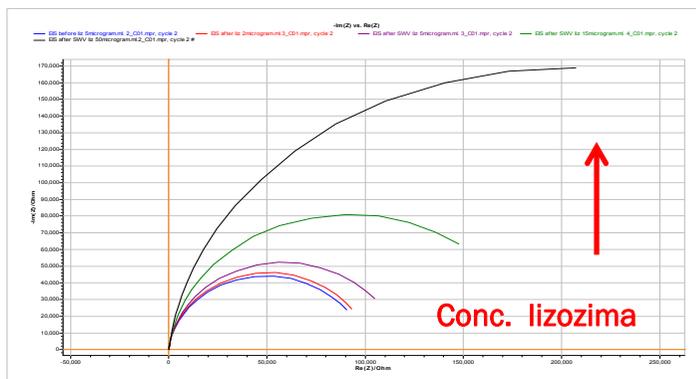
Celula in flux ($v=120 \mu\text{L}$)



Sistem clasic de 3 electrozi:
WE:GC, AUX:Pt, REF:
Ag/AgCl, KCl (3M)

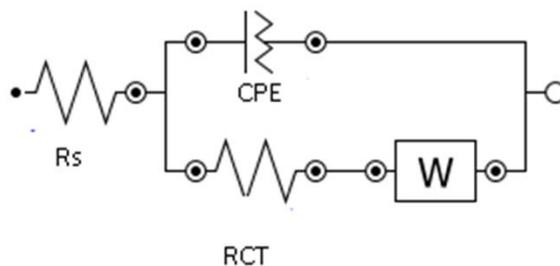


Conditii experimentale: EIS



Conditii experimentale (EIS): 1 mM feri/ferocianura in PBS pH 7.4, Eoc, E amplit=10 mV, Domeniul de frecvente: 9.5 kHz-0.1Hz

Circuit echivalent Randles



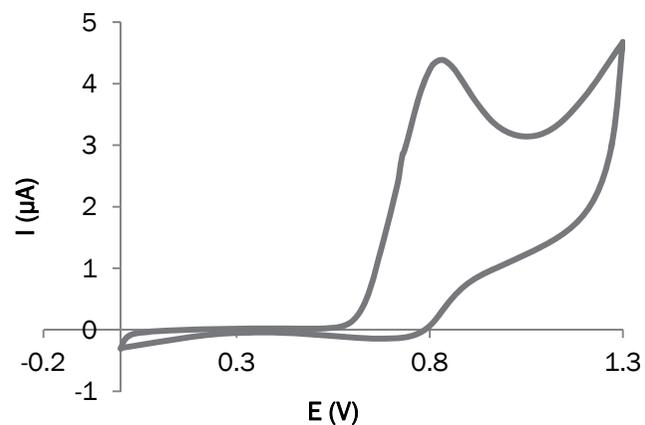
Fitarea datelor folosind Zview

Comparatie nanofire versus electrod planar de BDD

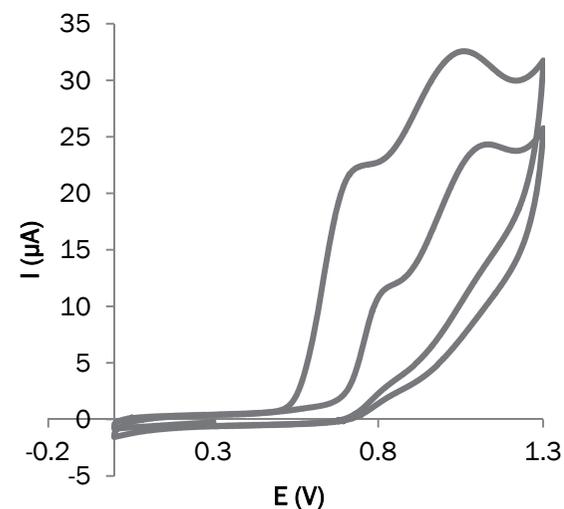
1. Determinarea tirozinei si triptofanului

Conditii experimentale: voltametrie ciclica in tampon BR
pH 2, 50 mV/s

Electrod planar de BDD



Nanofire de BDD

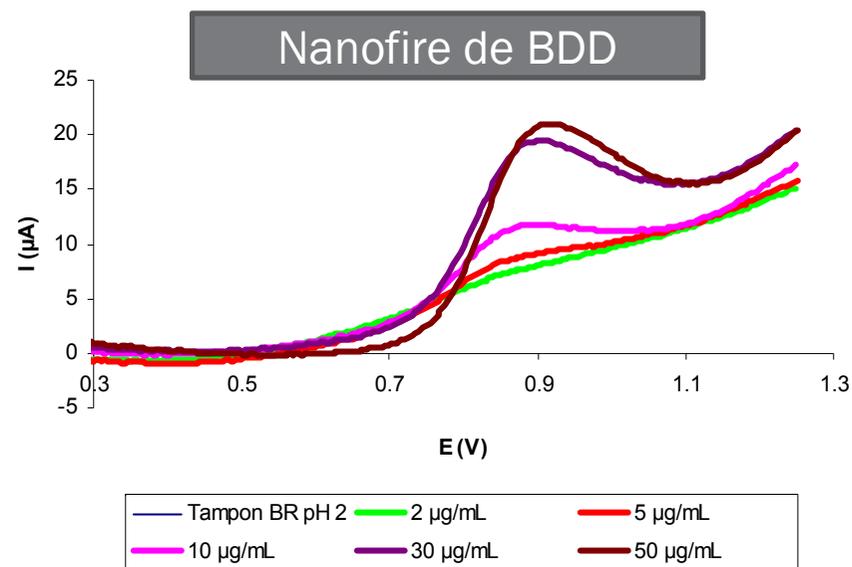
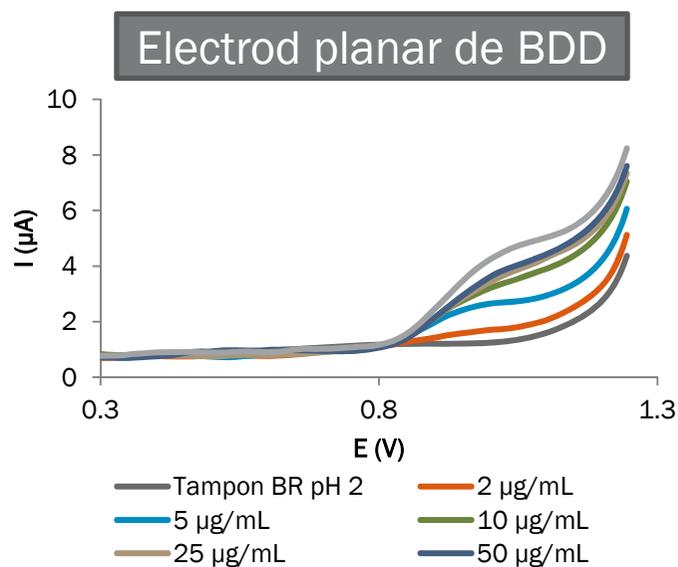


Comparatie nanofire versus electrod planar de BDD

2. Determinarea lizozimei prin oxidare electrochimica directa

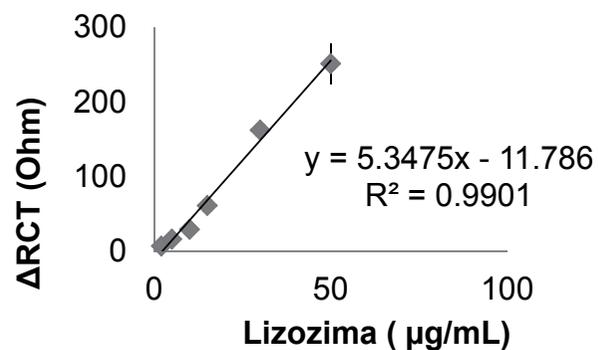
Metoda folosita: Voltametrie cu Unda Patrata (AdSV)

Conditii experimentale: 5 min la -0.25V vs. REF, baleiaj de la -0.25 la $+1.5\text{ V}$ vs. REF la $F= 200\text{ Hz}$, $E_H= 25\text{ mV}$, $E\text{ step}=5\text{mV}$

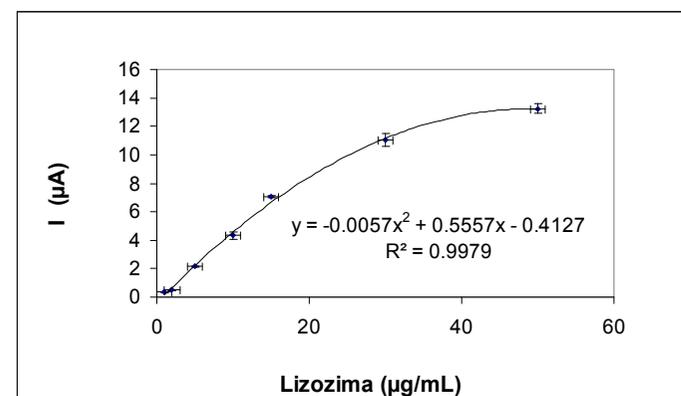


Performante analitice la detectia lizozimei cu nanofire de BDD

EIS



SWV



Performante analitice identice prin SWV si EIS:

Domeniu liniar: 2-20 µg/mL

Limita de detectie: 1 µg/mL



Comparatie electrod planar versus nanofire de BDD

Concluzii

Nanofirele permit cresterea sensibilitatii la determinarea triptofanului si separarea contributiilor individuale ale tirozinei si triptofanului la pH

Sensibilitatea la detectia lizozimei este mai mare daca se folosesc nanofire de diamant (proces limitat de adsorptie)

Electrodul planar prezinta avantajul unei suprafete mai rezistente la adsorbtiia proteinelor comparativ cu nanofirele



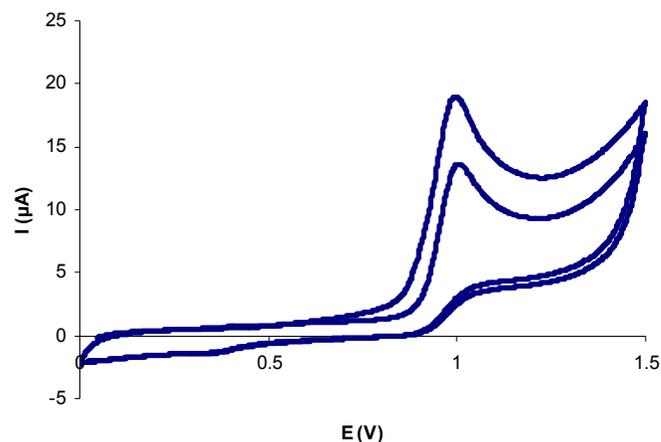
Comparatie nanofire de BDD versus carbune vitros

Aplicatii:

1. Determinarea tirozinei si triptofanului in mediu acid
2. Detectia lizozimei si studiul agregarii sale

1. Determinarea tirozinei si triptofanului in mediu acid

(SWV, tp. BR pH 2, F=200 Hz, Eh=25 mV, E step=5 mV)



Semnalele electrochimice ale tirozinei si triptofanului pe electrodul GC se suprapun in domeniul de pH 2-7

Comparatie nanofire de BDD versus carbune vitros

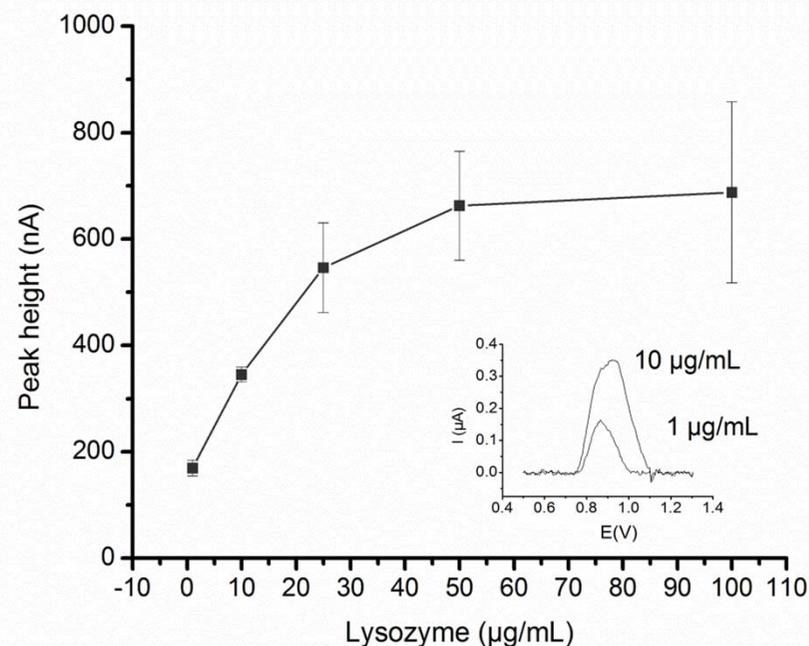
2. Detectia lizozimei si studiul agregarii sale folosind GC*

Conditii: acumulare la -0.1V for 5 min, baleiaj pana la 1.5 V cu EH= 25 mV, F=250 Hz, Estep= 5mV. Tampon acetat 0.2 M + 0.1 M NaCl pH 5
WE: GC, CE: Pt, REF: Ag/AgCl, KCL (3M)

Domeniu liniar: 1-30 $\mu\text{g/mL}$

Limita de detectie: 0.5 $\mu\text{g/mL}$

*Vasilescu, A, Mihai, I, Gaspar, S, Tache A si Silescu, S-L, Analyst, 2013, DOI: 10.1039/C3AN00229B



Comparatie nanofire de BDD versus carbune vitros

2. Studiul agregarii lizozimei*

Protocol: 10 mg/mL lizozima in 0.02 N HCl pH 2 cu 5 mg/mL NaCl, incubata la 60° C pentru cateva zile, pana la formarea de fibrile

Agregarea lizozimei a fost studiată prin câteva metode: MALDI-TOF, SEC, SWV, AFM, fluorescența tioflavinei T, SPR, SDS-PAGE

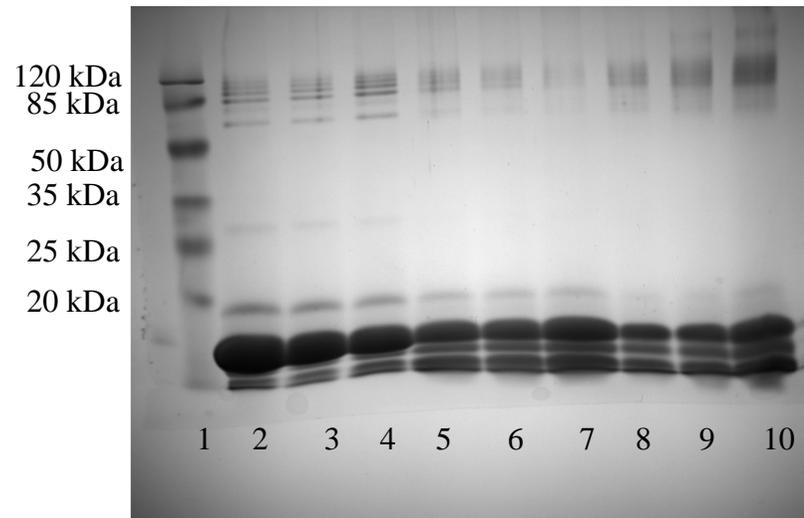
Agregatele solubile (oligomerii) se formează în decursul primelor 24 h, fibrilele se formează după 48 h

*Vasilescu A, Mihai I., Gaspar, S., Tache, A., Litescu, S.C, “Development Of A Label-Free Aptasensor For Monitoring The Self-Association Of Lysozyme”, Analyst, 2013, DOI: 10.1039/C3AN00229B



Studiul agregarii lizozimei

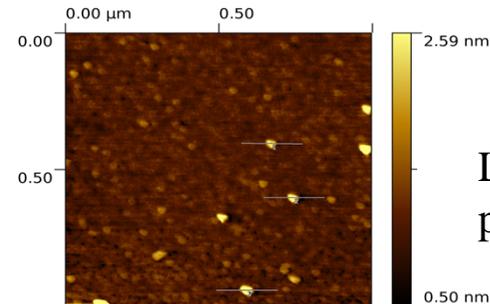
SDS-PAGE (gel de 10% polyacrylamida)



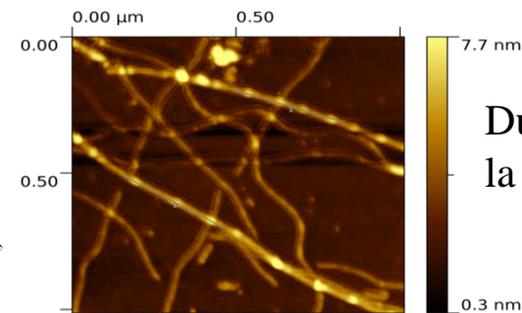
SDS-PAGE, lizozima, 10 mg/mL, pH 2, 60 C: MW Markeri (1); 2h, 3 mg/mL NaCl (2); 2h, 5 mg/mL NaCl (3); 4h, 5 mg/mL NaCl (4); 18h, 5 mg/mL NaCl (5); 20h, 5 mg/mL NaCl (6); 24h, 5 mg/mL NaCl (7); 28h, 5 mg/mL (8); 41h, 3 mg/mL (9); 41 h, 5 mg/mL NaCl (10).

Intermittent contact mode AFM

-proteina diluata la 50 $\mu\text{g/mL}$ adsorbita pe mica, scala : 200 nm



Lizozima proaspata

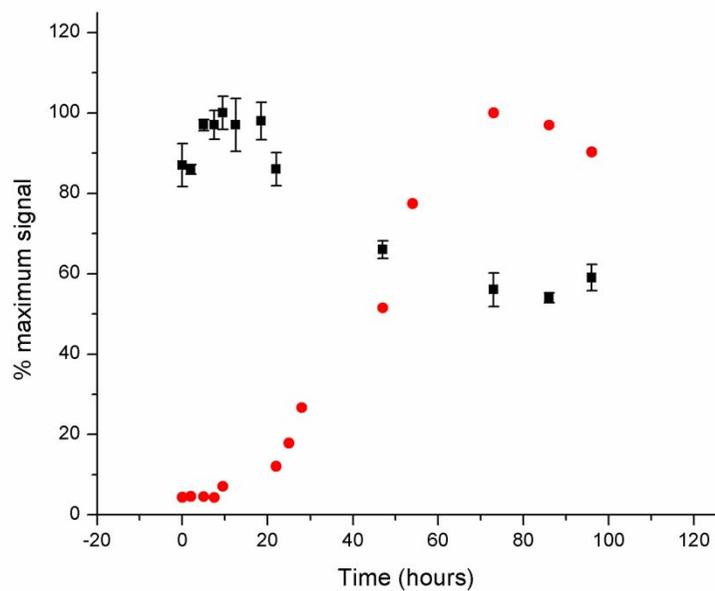


Dupa 3 zile la 60°C

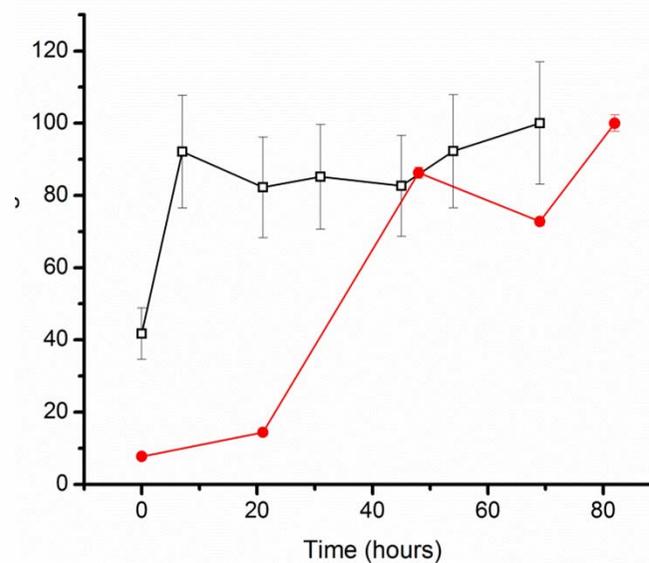
Comparatie nanofire de BDD versus carbune vitros

Studiul agregarii lizozimei prin SWV

Nanofire de diamant



Electrod de carbune vitros



CONCLUZII

Nanofirele de diamant permit diferentierea semnalelor electrochimice datorate tirozinei și triptofanului la pH 2 și combinate cu metode chemometrice ar putea fi folosite la determinarea selectivă a celor 2 aminoacizi

Nanofirele de diamant și carbunele vitros sunt materiale adecvate pentru detectia sensibilă a lizozimei, conducând la performanțe analitice similare. Adsorbția redusă a lizozimei pe electrodul planar de BDD este cauza probabilă a sensibilității sale reduse.

Nanofirele de diamant și carbunele vitros permit urmărirea agregării lizozimei. Performanțe similare au fost obținute cu BDD NWs prin EIS și SWV .



MULTUMIRI

Acest studiu a fost posibil cu sprijinul financiar al ANCS, CNDI – UEFISCDI pentru proiectele PN-II-RU-TE-2011-3-0302 si PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-1809. si al grantului Marie Curie IRG FP7-PEOPLE-2010-RG – 277126

Dorim sa multumim drd Elena Popa, Institutul de Biologie Bucuresti pentru determinarile prin SDS-PAGE si Dr. Szilveszter Gaspar, Centrul International de Biodinamica pentru analizele prin AFM

