

## Observación de cambios en la resonancia de *nanoshells* de oro tras proceso de bioconjugación

### Uso de NanoDrop-One espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis

**Autores:** Kejian Li<sup>1</sup>, Megan N. Dang<sup>1</sup>, Alexis B. Duffy<sup>1</sup> and Emily S. Day<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>University of Delaware, Dept. of Biomedical Engineering, Newark, DE, USA

<sup>2</sup>University of Delaware, Department of Materials Science and Engineering, Newark, DE, USA

<sup>3</sup>Helen F. Graham Cancer Center and Research Institute, Newark, DE, USA

#### Resumen

Las terapias basadas en el RNA de interferencia (RNAi) han resultado ser una herramienta muy poderosa para mejorar el estudio y tratamiento de enfermedades cuyas bases genéticas son conocidas. Sin embargo, la susceptibilidad a degradación por nucleasas, la baja captación celular o la rápida eliminación de la circulación son desafíos que impiden el éxito de la aplicación preclínica y clínica de las terapias con RNAi<sup>1</sup>.

Para superar estas limitaciones, pequeños RNA de interferencia (siRNAs) o microRNA (miRNA) pueden conjugarse con nanopartículas (NPs) como las *nanoshells* (NS) para mejorar su estabilidad, captación celular y tiempo de circulación sanguínea, resultando en un aumento de su eficacia<sup>2,3,4</sup>.

#### Introducción

Antes de usar conjugados RNA-NP con aplicaciones terapéuticas, es esencial confirmar que la conjugación del RNA con la NP se ha llevado a cabo de forma exitosa.

Un método habitual para confirmar la carga de la molécula en NP de oro se basa en evaluar el espectro de resonancia de plasmón superficial (RPS) de las NPs antes y después de la funcionalización; una exitosa unión del RNA causará un ligero desplazamiento del pico SPR hacia longitudes de onda mayores correspondientes al color rojo.

Tradicionalmente, los espectrofotómetros UV-Vis son usados para analizar las propiedades ópticas de NPs de oro. Por ejemplo, el pico de absorbancia puede ser utilizado para determinar la concentración de NPs mediante la ley de Beer y para evaluar los cambios debidos a cualquier modificación en la superficie. Sin embargo, los espectrofotómetros UV-Vis tradicionales basados en cubetas tienen un rango lineal delimitado debido al uso de cubetas estándar de longitud de onda fija (10mm), y a menudo requieren volúmenes de muestra relativamente grandes (0,5–3 mL) siendo esto un hándicap en la conservación de muestras tan valiosas como NPs recubiertas con costosas moléculas de RNA. Además, la necesidad de diluir las muestras para ajustarlas al rango operativo del instrumento aumenta el tiempo de análisis e incrementa la probabilidad de obtener mediciones poco precisas.

Por todo ello, sería ideal poseer técnicas alternativas de medición que requieran menos volumen y permitan el análisis de muestras concentradas sin diluir.

Un trabajo reciente ha mostrado que el NanoDrop™ One espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis de Thermo Scientific™ puede ser utilizado para medir con precisión NPs muy concentradas sin diluir, gracias a su sistema de tensión superficial y a su técnica de longitud de onda autorregulable<sup>5,6</sup>.

Por ejemplo, NS de 150 nm de diámetro pueden cuantificarse en concentraciones de hasta 100 pM con alta reproducibilidad<sup>5</sup>. En esta nota de aplicación se ha llevado a cabo el uso de NanoDrop One para observar los cambios en la RPS de NS después de su conjugación con dúplex de siRNA modificados con tiol y metoxi-poli(etilenglicol)-tiol (mPEG-SH, un agente pasivante). Los resultados indicaron que el equipo de NanoDrop One puede servir como alternativa de microvolumen a los espectrofotómetros tradicionales basados en cubetas para confirmar cuantitativamente la carga de RNA y PEG en NPs de oro mediante la resonancia de plasmón superficial.



NanoDrop-One

## Procedimiento experimental

Las NS fueron sintetizadas siguiendo protocolos publicados mediante el método Oldenburg<sup>7</sup>. En primer lugar, siguiendo el método de Duff<sup>8</sup> se sintetizó una suspensión de oro coloidal de 3-5nm de diámetro a partir de tetracloroaurato (III) de hidrógeno hidrato (HAuCl<sub>4</sub>), cloruro de tetrakis(hidroximetil)fosfonio (VWR) e hidróxido sódico 1N (Fisher Scientific). El oro coloidal se combinó con esferas de sílice de 120 nm de diámetro funcionalizadas con 3-aminopropiltrióxido (Nanocomposix) y cloruro de sodio 1M (NaCl) y se sacudieron durante 3-4 días a temperatura ambiente para crear "semillas" de NP. Posteriormente las semillas se purificaron dos veces mediante centrifugación a 3000 rpm durante 30 min cada una y se suspendieron en agua Milli-Q® (Sigma) a una densidad óptica de 530 nm (OD530nm) de 0,1 como se establece usando un espectrofotómetro UV-Vis basado en cubetas. Las semillas diluidas fueron mezcladas con adicional HAuCl<sub>4</sub> diluido en cloruro potásico seguido del agregado de un pequeño volumen de formaldehído al 37% (VWR). La solución fue vigorosamente agitada para formar *nanoshells* de oro completas y posteriormente se purificaron dos veces mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos cada una. Adicionalmente, las NS fueron tratadas con 0,1 % de pirocarbonato de dietilo (DEPC) (Sigma) durante 3 días, balanceándolas a 37° C para liberar las NS libres de RNasa. Todos los materiales descritos fueron adquiridos o tratados con DEC para dejarlos libres de RNasa antes de su uso. Los oligonucleótidos de siRNA se adquirieron en forma de hebras individuales a través de IDT DNA (secuencias disponibles en la **Tabla 1**). Las hebras sentido tioladas fueron mezcladas con hebras antisentido no tioladas complementarias en cantidades equimolares, se hirvieron a 95° C durante 5 min en un termociclador y a continuación, se enfriaron lentamente a 37° C durante 1 hora para facilitar la formación de dúplex de siRNA. Las NS libres de RNasa se diluyeron hasta una OD800nm = 1,5 en agua Milli-Q® (medido en un espectrofotómetro de cubeta). A continuación, se añadió un 10% de Tween-20 y NaCl 5M a una concentración final de 0,2% y 12mM respectivamente y las NS fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron dúplex de siRNA a una concentración final de 200 nM y la solución se sonico y balanceó a 4° C durante 3 horas. Después se añadió NaCl a una concentración final de 400 mM antes de dejarse agitando durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se diluyó en agua Milli-Q® 5 kDa de mPEG-SH a 1 mM y se añadió a las NS a una concentración final de 10 µM. Después de balancearlas durante 4 horas a 4° C, la solución de NS fue purificada tres veces mediante centrifugación a 500 g durante 5 minutos, se resuspendió en tampón fosfato salino 1X (PBS) libre de RNasa con 100X menos volumen de NS inicial y se almacenó a 4° C hasta su uso.

Para la espectrofotometría convencional, NS sin tratar y siRNA-NS (diluidas 100 veces en agua) fueron colocadas en cubetas desechables de 1 cm de camino óptico y se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis de referencia desde 1.100 nm a 400 nm. La concentración de NS fue calculada a partir de la ley de Beer usando el pico de extinción (DO ~ 800 nm) según lo determinado por el espectrofotómetro y el coeficiente de extinción teórico de las NS con núcleos de sílice de 120 nm de diámetro y 15 nm de espesor de concha de oro. Esto reveló que las NS sin recubrir y siRNA-NS tenían una concentración de 6,9 pM y 150 pM respectivamente.

Para preparar las muestras utilizadas en la medición con el NanoDrop-One, las NS sin tratar fueron concentradas mediante centrifugación a 500 g durante 15 min, seguido de eliminación de sobrenadante y dilución en agua a 100 pM. Las siRNA-NS fueron directamente diluidas en agua a 100 pM. Ambas soluciones se midieron en el espectrofotómetro NanoDrop-One en el rango de 850 nm a 190 nm mediante pipeteo de alícuotas de 2 µl directamente en el pedestal. Entre mediciones se limpió el pedestal usando una toallita de laboratorio libre de pelusas. En el software se activó la opción de longitud de onda automática.

**Tabla 1.** Secuencias de siRNA sentido y antisentido utilizadas en este trabajo, anotadas de 5' a 3'. iSpPC es una molécula espaciadora fotoeliminable de 10 átomos, 3ThioMC3-D es una modificación de tiol que facilita la unión a NS de oro.

Name	Sequence
siRNA sense	GCU GAU AUU GAC GGG CAG UAU / iSpPC//iSpPC//3ThioMC3-D/
siRNA antisense	AUA CUG CCC GUC AAU AUC AGC

## Resultados

Los espectros de absorción de NS de 150 nm, antes (sin recubrir) y después (siRNA-NS) de la conjugación con siRNA tiolado y mPEG-SH a concentraciones de 100 pM se muestran en la **Figura 1**. Los espectros revelan que las NS sin recubrir y las siRNA-NS tienen un pico de resonancia de plasmón a ~795 nm y ~804 nm respectivamente, lo cual es consistente con los espectros obtenidos usando el espectrofotómetro de referencia. El ligero desplazamiento del pico hacia longitudes de onda correspondientes al rojo tras la funcionalización, manteniendo la forma general y la intensidad del espectro, proporciona una confirmación de la correcta conjugación de siRNA y mPEG-SH. Esto fue corroborado por mediciones de dispersión de luz dinámica y de potencial zeta, así como por la cuantificación de la carga de siRNA a través del ensayo de OliGreen<sup>2,4,9</sup>.

Destacar que los espectros producidos por el espectrofotómetro NanoDrop-One fueron altamente precisos y reproducibles. En la medición se utilizó una muestra muy pequeña de muestra (2µl) y no se requirieron diluciones para la medición de muestras muy concentradas (100 pM).

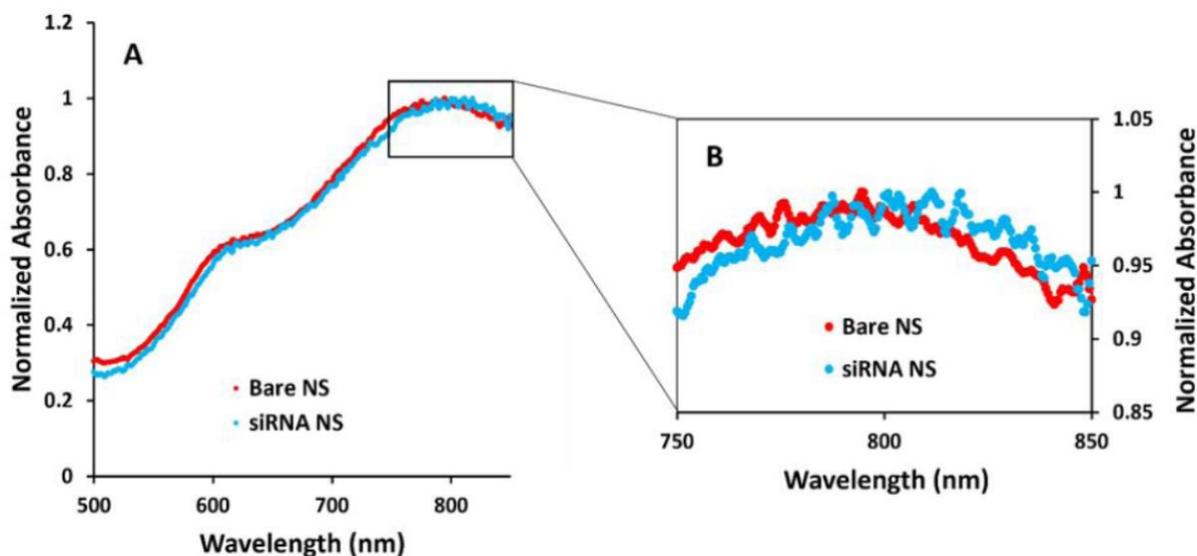


Figura 1. (A) Espectro UV-Vis de NS sin tratar y siRNA-NS a concentraciones de 100 pM, medidas con el espectrofotómetro NanoDrop One. n=3. (B) Zoom del pico del espectro UV-Vis para NS sin recubrir y siRNA-NS (750 nm a 850 nm).

## Conclusiones

Este trabajo demuestra que el espectrofotómetro NanoDrop-One puede ser utilizado como método sencillo y fiable para evaluar la modificación de la superficie de NS. NanoDrop-One produce resultados de alta fiabilidad gracias a su tecnología Acclaro™ que identifica contaminantes comunes u otras anomalías que pueden afectar la precisión de la medición. Además, los espectrofotómetros NanoDrop permiten a los usuarios cuantificar muestras muy concentradas con 1 – 2 µl sin necesidad de diluir y produce datos espectrales completos en segundos en comparación con un espectrofotómetro tradicional de cubetas. Estas ventajas ahorran valioso tiempo y dinero y ayudan a determinar la calidad y cantidad de las muestras antes de su uso en posteriores aplicaciones. La facilidad de uso y la posibilidad de usar volúmenes de muestra tan pequeños hace que el espectrofotómetro NanoDrop-One sea un instrumento ideal y valioso para caracterizar las propiedades de NPs con modificaciones en su superficie.

## Referencias

1. Wang, T.; Shigdar, S.; Shamaileh, H. A.; Gantier, M. P.; Yin, W.; Xiang, D.; Wang, L.; Zhou, S. F.; Hou, Y.; Wang, P.; et al. **Challenges and Opportunities for siRNA-Based Cancer Treatment.** *Cancer Lett.* 2017, 387, 77–83.
2. Riley, R. S.; Dang, M. N.; Billingsley, M. M.; Abraham, B.; Gundlach, L.; Day, E. S. **Evaluating the Mechanisms of Light-Triggered siRNA Release from Nanoshells for Temporal Control Over Gene Regulation.** *Nano Lett.* 2018, 18, 3565–3570.
3. Artiga, Á.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; Mitchell, S. G.; De La Fuente, J. M. **Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery.** *J. Mater. Chem. B* 2019, 7, 876–896.
4. Dang, M. N.; Gomez Casas, C.; Day, E. S. **Photoresponsive miR-34a/Nanoshell Conjugates Enable Light-Triggered Gene Regulation to Impair the Function of Triple-Negative Breast Cancer Cells.** *Nano Lett.* 2021, 21(1), 68–76.
5. Li, K.; Kapadia, C. H.; Dang, M. N.; Day, E. S. **Quantification of gold nanoshells using the NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.** <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FMSD%2FApplcation-Notes%2Fquantification-goldnanoshells-nanodrop-one-uv-vis-spectrophotometer-an53464.pdf>
6. Kapadia, C. H.; Melamed, J. R.; Day, E. S. **Quantification of gold nanoparticles using the NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.** <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN53100-quantificationgold-nanoparticle.pdf>
7. Oldenburg, S. J.; Averitt, R. D.; Westcott, S. L.; Halas, N. J. **Nanoengineering of optical resonances.** *Chem. Phys. Lett.* 1998, 288 (2–4), 243–247.
8. Duff, D. G.; Baiker, A.; Edwards, P. P. **A new hydrosol of gold clusters. 1. formation and particle size variation.** *Langmuir.* 1993, 9, 2301–2309.
9. Melamed, J. R.; Riley, R. S.; Valcourt, D. M.; Billingsley, M. M.; Kreuzberger, N. L.; Day, E. S. **Chapter 1: Quantification of siRNA duplexes Bound to Gold Nanoparticle Surfaces. In Biomedical Nanotechnology.** Humana Press: New York, NY, USA, 2017.