

УДК:54.057

## **СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С АЛЬБУМИНОМ**

Вертина О.Р., Новикова С.А., Андреев Е.В., Гладышев П.П.

*Государственный «Университет «Дубна», Дубна, e-mail:olya.vetlina69@mail.ru*

В данной работе синтез конъюгатов квантовых точек с бычим сывороточным альбумином был проведен с помощью ковалентного связывания аминной и карбоксильной групп с использованием EDC, NHS. Квантовые точки, покрытые бычим сывороточным альбумином, устойчивы в водных растворах. Квантовый выход этих квантовых точек достаточно высокий для использования их в качестве биометок в иммунохимическом анализе. Объемные молекулы альбумина создают хороший изолирующий слой, благодаря чему водные растворы таких квантовых точек стабильны во времени. Применение квантовых точек в биоанализе на сегодняшний день является одной из перспективных областей применения люминесцирующих нанокристаллов. Для синтеза конъюгатов квантовых точек с бычим сывороточным альбумином были использованы CdTe квантовые точки, покрытые тиогликолевой кислотой с концентрацией 27,8402 мкМ, которые имеют максимум люминесценции при 590 нм. На полученном спектре поглощения квантовых точек, на длине волны 550-600 нм имеется плечо, которое соответствует минимуму энергии, необходимой для образования экситонов. Оценивая положение экситонного пика, можно оценить средний размер квантовых точек. Определенный средний размер ядер составил 3,04 нм.

Ключевые слова: квантовые точки, синтез, конъюгация, БСА, альбумин, EDC, NHS, иммуноанализ.

## **SYNTHESIS OF QUANTUM DOTS CONJUGATES WITH ALBUMIN**

Vertlina O.R., Novikova S.A., Andreev E.V. Gladyshev P.P.

*State «University «Dubna», Dubna, e-mail:olya.vetlina69@mail.ru*

In this work, the synthesis of conjugates of quantum dots with bovine serum albumin was carried out using covalent binding of the amine and carboxyl groups using EDC, NHS. Quantum dots coated with bull serum albumin are stable in aqueous solutions. The quantum yield of these quantum dots is high enough to use them as biolabels in immunochemical analysis. Bulk albumin molecules create a good insulating layer, so that aqueous solutions of such quantum dots are stable over time. The use of quantum dots in bioanalysis today is one of the promising areas of application of luminescent nanocrystals. For the synthesis of bovine serum albumin quantum dot conjugates, CdTe quantum dots coated with thioglycolic acid with a concentration of 27.8402  $\mu\text{M}$  were used, which have a maximum luminescence at 590 nm. On the obtained absorption spectrum of quantum dots, at a wavelength of 550-600 nm, there is a shoulder that corresponds to the minimum energy necessary for the formation of excitons. Estimating the position of the exciton peak, one can estimate the average size of quantum dots. A certain average nuclear size was 3.04 nm.

Key words: quantum dots, synthesis, conjugation, BSA, albumin, EDC, NHS, immunoassay.

### **Введение:**

Среди многочисленно появляющихся наноматериалов квантовые точки (КТ) являются наиболее перспективными наночастицами с настраиваемыми оптическими и электронными свойствами в зависимости от их размера и состава. Следовательно, они имеют высокий потенциал во многих областях, таких как солнечные элементы,

протеомика [1, 2], обнаружение металлов [3], использование в биосенсорах [4] и анализ лекарств [5]. Они могут быть сконъюгированы с биомолекулами за счёт ковалентного связывания между группами лигандов, покрывающих КТ, и функциональными группами биомолекул. Применение КТ в биоанализе на сегодняшний день является одной из перспективных областей применения люминесцирующих нанокристаллов. Такие уникальные характеристики КТ, как зависимость цвета эмиссии от размера, высокая фотостабильность, широкие спектры поглощения, делают их идеальными флуорофорами для сверхчувствительной, многоцветной детекции биологических объектов и медицинской диагностики, требующей регистрации нескольких параметров одновременно.

КТ, покрытые бычим сывороточным альбумином (БСА), устойчивы в водных растворах. Квантовый выход этих КТ достаточно высокий для использования их в качестве биометок в иммунохимическом анализе. Объемные молекулы БСА создают хороший изолирующий слой, благодаря чему водные растворы таких КТ стабильны во времени.

**Целью работы** является проведение синтеза конъюгатов КТ с альбумином .

### Квантовые точки

КТ — нанокристаллы с размером в диапазоне 2-10 нанометров, состоящие из  $10^3 - 10^5$  атомов, созданные на основе неорганических полупроводниковых материалов, покрытых монослоем органических молекул, играющих роль стабилизатора (Рис. 1).

КТ представляет собой фрагмент проводника или полупроводника, носители заряда которого, ограничены в пространстве по всем трем направлениям. Квантовыми их назвали потому, что при столь малых размерах в них проявляются квантовые, то есть, дискретные (переход с одного уровня энергии на другой) свойства электронов.

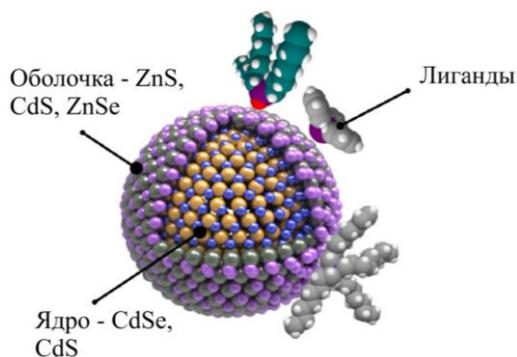


Рисунок 1 — Структура КТ [6]

КТ представляют собой нанокристаллы, синтезированные из элементов II – VI (CdTe, CdS, CdSe, ZnSe, ZnS и др.) и III – V групп (InP и InAs). Малые размеры полупроводниковых нанокристаллов приводят к тому, что образующаяся при облучении электрон-дырочная пара (экситон) перемещается внутри кристалла и испускает фотон: частица флуоресцирует. Цвет флуоресценции зависит от размера наночастиц (Рис. 2).

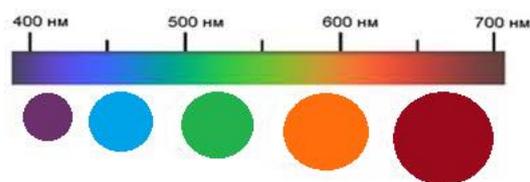


Рисунок 2 — Зависимость цвета флуоресценции от размера КТ [7]

Энергетический спектр КТ принципиально отличается от объемного полупроводника. Энергетический спектр КТ неоднороден, в нем есть отдельные уровни энергии для электрона (отрицательно заряженной частицы) и дырки. Дыркой в полупроводниках называется незаполненная валентная связь, носитель положительного заряда численно равному электрону, она появляется, когда связь между ядром и электроном разрывается.

Рекомбинация пары электрон-дырка приводит к возникновению люминесценции. Несмотря на то, что на многих изображениях КТ представлены в виде сфер, они являются кристаллическими материалами и имеют структуру, соответствующую параметрам кристаллической решётки составляющего их материала [6].

### **Бычий сывороточный альбумин**

БСА — глобулярный белок семейства альбуминов, выполняющий в плазме крови транспортные функции, его молекулярная масса 64 кДа. Первичная структура бычьего альбумина состоит из 582 аминокислотных остатков. Вторичная структура бычьего альбумина в зависимости от рН состоит из 50 – 68 % спиралей, 3 % складчатых слоев и 29 – 47 % участков хаотической укладки. Третичная структура определяется тремя доменами.

Известно, что сывороточный альбумин человека и альбумины у разных видов животных практически гомологичны и отличаются лишь некоторыми аминокислотными остатками. В частности, сывороточный альбумин человека содержит один остаток триптофана Trp 214, а бычий сывороточный альбумин содержит два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214. Уникальная способность молекул сывороточных альбуминов связывать

обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этих белков – транспорт физиологических метаболитов [7].

БСА играет важную роль в плазме крови, определяемой широким разнообразием функций. Альбумины, во-первых, обеспечивают коллоидно-осмотическое давление крови, от которого в значительной степени зависит обмен воды и растворенных в ней веществ между кровью и тканевой жидкостью, во-вторых, регулируют вместе с другими белками плазмы рН крови благодаря наличию буферных свойств, в-третьих, влияют на вязкость крови, в-четвертых, служат переносчиками гормонов, минеральных веществ и лекарственных препаратов [8].

### **Методы конъюгации.**

Для того, чтобы использовать КТ для исследования живых клеток и для других биологических применений, они должны быть конъюгированы с биологическими молекулами, не нарушая биологическую функцию этих молекул.

Существует много методов связывания КТ с биомолекулами: сульфгидрил-аминное связывание [9], биомолекулы могут быть связаны ковалентно с использованием сшивающих агентов [10], синтез с образованием бифункциональной связи лигандов [11, 12] и др.

В данной работе синтез был проведен с помощью ковалентного связывания аминной и карбоксильной групп при помощи 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) — органическое вещество, водорастворимый карбодиимид, как правило в виде гидрохлорида. Он активирует карбоксильные группы, делая возможным связывание их с аминогруппами белка (Рис.3). EDC водорастворим, что позволяет добавлять его прямо в реакционную смесь без использования органических растворителей. БСА, так же, как и антитела, имеет аминогруппы, доступные для сопряжения с карбоксильной группой КТ.

Однако в реакции конъюгации с использованием EDC существует опасность гидролиза – т.е. если целевая аминогруппа не успеет атаковать карбоксильную группу до гидролиза, конъюгация не произойдет (это особенно важно в работе с белками – когда белок находится в небольшой концентрации по отношению к воде). С этой целью в реакционную смесь добавляется N-гидроксиульфосукцинимид (сульфо-NHS), который увеличивает растворимость в воде побочных продуктов реакции [13].

Таким образом, EDC/сульфо-NHS реакция обладает рядом достоинств:

- реагент и побочные продукты водорастворимы
- возможность работы без органических растворителей

- образование стабильной амидной связи [12].

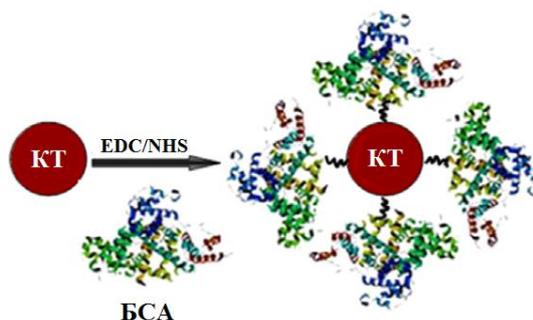


Рисунок 3 — Схематическая иллюстрация синтеза конъюгатов КТ с БСА [14]

## Экспериментальная часть

### Исследование КТ

Для синтеза конъюгатов КТ с БСА были использованы КТ, полученные студентом 4 курса Университета «Дубна» Андреевым Е.В. Синтезированные CdTe-КТ были проанализированы методами спектроскопии.

Ниже представленные спектры поглощения, люминесценции раствора 100 мкл полученных КТ в 3 мл, покрытых TGA и синтезированных в разные дни, демонстрируют влияние продолжительности синтеза (Рис.4) и на смещение максимума экситонного пика.

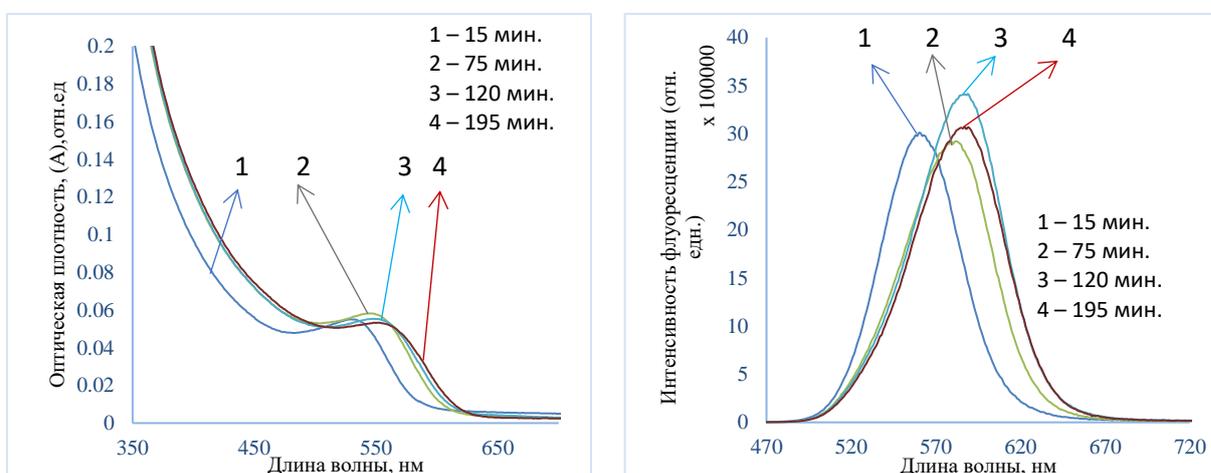


Рисунок 4 — Спектры поглощения и люминесценции КТ в зависимости от продолжительности синтеза

Наблюдаемое смещение экситонного пика в более длинноволновую область свидетельствует об увеличении размера КТ в процессе синтеза.

## Получение конъюгата КТ с БСА

Синтез проводят в 0,01 М PBS с pH= 7,8

С мольным соотношением КТ/БСА равным 10:1

Активируют в пробирке функциональные группы КТ. Для этого к 256,66 мкл КТ с концентрацией 27,8402 мкМ добавляют 144,92 мкл EDC и 14,49 мкл NHS

После смешивания КТ с 0,5 М EDC и 0,1 М NHS их оставляют активироваться на 15 минут. Далее 250 мкл БСА концентрации 0,1 мг/мл добавляют к активированным КТ. Оставляют на 1,5 часа в темноте при постоянном перемешивании.

## Обсуждение результатов

Были сняты спектры поглощений (Рис. 5).

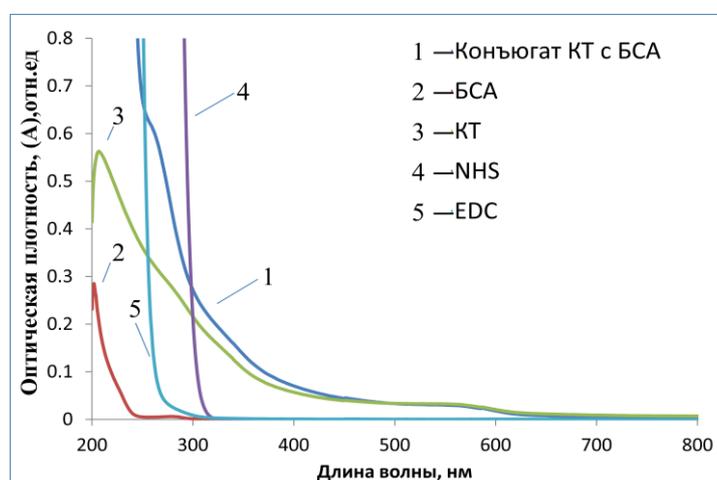


Рисунок 5 — Спектры поглощения: 1 — конъюгат КТ с БСА, 2 — БСА, 3 — КТ, 4 — NHS, 5 — EDC

На спектре поглощения КТ, на длине волны 550-600 нм имеется плечо, которое соответствует минимуму энергии, необходимой для образования экситонов. Оценивая положение экситонного пика, согласно литературным данным [15], можно оценить средний размер КТ. Определенный средний размер ядер составил 3,04 нм.

После проведения конъюгации образцы были переданы для исследования методом капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## Вывод:

Выбран наиболее подходящий метод синтеза конъюгатов КТ с альбумином.

Проведен синтез конъюгатов квантовых точек с альбумином.

Исследованы свойства полученных конъюгатов КТ с альбумином.

## Список использованной литературы

1. Chen Z. Y., Abdelhamid H. N., Wu H. F. Effect of surface capping of quantum dots (CdTe) on proteomics // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2016. – V. 30. – №. 12. – P. 1403-1412.
2. Wu H. F. et al. Quantum dot applications endowing novelty to analytical proteomics // *Proteomics*. – 2012. – V. 12. – №. 19-20. – P. 2949-2961.
3. Abdelhamid H. N., Wu H. F. Synthesis and multifunctional applications of quantum nanobeads for label-free and selective metal chemosensing. *RSC Adv* 5: 50494–50504. – 2015.
4. Abdelhamid H. N., Wu H. F. Probing the interactions of chitosan capped CdS quantum dots with pathogenic bacteria and their biosensing application // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2013. – V. 1. – №. 44. – P. 6094-6106.
5. Олейников В. А., Суханова А. В., Набиев И. Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине // *Российские нанотехнологии*. – 2007. – Т. 2. – №. 1-2. – С. 160-173.
6. Von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods // *Clinical biochemistry*. – 2005. – V. 38. – №. 7. – P. 591-606.
7. Gelamo E. L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – Т. 1594. – №. 1. – С. 84-99.
8. Brewer S. H. et al. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces // *Langmuir*. – 2005. – Т. 21. – №. 20. – С. 9303-9307.
9. Hanaki K., Momo A. et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. V. 302. P. 496–501.
10. S.G. Ding, J.X. Chen, H.Y. Jiang, J. He, W.M. Shi, W.S. Zhao, J.Z. Shen. // *J. Agric. Food Chem*. 2006. V. 54. P. 6139 – 6142.
11. Chan W. C. W., Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection // *Science*. – 1998. – V. 281. – №. 5385. – P. 2016-2018.
12. Chan W. C. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging // *Current opinion in biotechnology*. – 2002. – V. 13. – №. 1. – P. 40-46.
13. Zhang C., Ma H. et al. Quantum dot-labeled trichosanthin // *The Royal Society of Chemistry*. 2000. V. 125. P. 1029–1031.

14. Liu S. et al. Bovine serum albumin coated CuInS<sub>2</sub> quantum dots as a near-infrared fluorescence probe for 2, 4, 6-trinitrophenol detection //Talanta. – 2013. – V. 116. – P. 870-875.
15. Yu W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals //Chemistry of Materials. – 2003. – V. 15. – №. 14. – P. 2854-2860.