

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВ-ПОРИНОВ, КАРРАГИНАНОВ, ХИТОЗАНОВ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Набережных Г.А.¹, Сергеев А.А.², Новикова О.Д.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: naber1953@mail.ru

² Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН
ул. Радио, 5, г. Владивосток, 690041, РФ

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0539

Аннотация. Квантовые точки (КТ) представляют собой новое поколение флуорохромов, обладающих значительными преимуществами по сравнению с традиционными органическими красителями. КТ на основе CdS являются перспективными материалами для оптики, оптоэлектроники, биологии и медицины. В данной работе предложен новый эффективный метод получения биоконъюгатов на основе природных биополимеров. Меченные квантовыми точками CdS матрицы были синтезированы *in situ* в водном растворе с использованием OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) и полисахаридов, положительно (хитозан) и отрицательно (каррагинан, липополисахарид) заряженных. Максимум спектров эмиссии для всех полученных образцов составлял 450 нм, что свидетельствует об одинаковом размере КТ, который определяется размером «ячеек» сетчатой матрицы, ограничивающих их размер. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции КТ, синтезированных в растворе липополисахарида, была в два раза выше, чем у остальных образцов. Флуоресценция меченых биоматриц и максимумы спектров их эмиссии (450 нм) сохраняются при интенсивном диализе против буферов, что свидетельствует об устойчивости КТ и возможности практического использования полученных биоконъюгатов. Апробация биосенсора на основе порина показала, что взаимодействие с IgG, специфичными к YpOmpF, приводит к существенному изменению интенсивности люминесценции комплекса КТ-порин. Эти результаты открывают перспективу использования наноструктур на основе поринов, меченных КТ, в качестве биосенсоров для целей иммунодиагностики.

Ключевые слова: порин, хитозан, каррагинан, липополисахарид, сульфид кадмия, квантовые точки, конъюгация, люминесценция.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наметился значительный прогресс в использовании различных наноматериалов для создания биосенсоров. Новый скачок в создании нанопор из природных биополимеров дали исследования биологических мембран. В настоящее время при создании такого рода нанопор внимание исследователей в значительной степени сосредоточено на порообразующих токсинах и белках наружной мембраны бактерий. Эти белки имеют прочную β -баррельную структуру, что делает их удобным объектом для нанотехнологии [1]. Белковые молекулы обладают уникальным свойством передачи материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта своеобразная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем.

Нанокристаллические полупроводниковые материалы, называемые квантовыми точками (КТ), обладают уникальными оптическими и спектроскопическими свойствами: широкое поглощение, узкое и перестраиваемое излучение, сильная люминесценция, устойчивость к фотообесцвечиванию. Квантово-размерные эффекты играют ключевую роль в оптоэлектронных свойствах квантовых точек. Изменяя их размер, можно регулировать длину волны излучения в видимом и ближнем инфракрасном спектре [2]. Ставшие в настоящее время классическими квантовые точки халькогенидов металлов по-прежнему остаются ключевым элементом при создании новых светоизлучающих устройств, солнечных элементов, фотокатализаторов и различного рода оптических сенсоров. Низкомолекулярные и белковые флуорофоры нашли применение в многочисленных биологических приложениях [3,4]. Наиболее часто используется синтез КТ в органических растворителях. Альтернативным способом создания квантовых точек, обеспечивающим достаточное количество реакционных центров на поверхности частицы и препятствующим агрегации частиц, является использование пористых биополимерных матриц. При синтезе неорганических частиц используют различные источники природных материалов, таких как бактерии, белки, полисахариды и аминокислоты [5,6].

Ранее нами [7] были апробированы подходы для формирования новых люминесцентных биоконплексов, состоящих из упорядоченных надмолекулярных структур поринов иерсиний, меченных КТ. Были разработаны два способа получения меченых биоконъюгатов: (1) конъюгирование пориновой матрицы с предварительно полученными стабилизированными КТ и (2) синтез КТ на предварительно сформированной на слое пориновой матрице в поддерживающем липидном бислое (support lipid bilayer, SLB). В данной работе квантовые точки

сульфида кадмия (CdS) были успешно синтезированы в растворе различных пористых матриц, белковых и полисахаридных, и получены их физико-химические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка порина. Изолированный OmpF порин из *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF) получали экстракцией бактериальных клеток ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН) согласно процедурам, описанным в работе [8]. Для очистки порина от сопутствующих белков использовали гель-хроматографию на Sephacryl S-300 HR (Pharmacia, Швеция) в Трис-НСl буфере (0,03 М, pH 7,5) (буфер А), содержащем 0,25 % ДСН. В результате был получен электрофоретически гомогенный образец порина, содержащий белок в нативной тримерной форме.

Выделение хитозана, каррагинана и липополисахарида. Хитозан высокой молекулярной массы (200 кДа) был получен, как описано ранее [9]. S-форму ЛПС выделяли из бактерий *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 6-8 °С, экстракцией клеток 45%-ным водным фенолом по методу Вестфала [10]. Каррагинан (120 кДа) получали горячей водной экстракцией из красных водорослей *Chondrus armatus* (Gigartineae) [11].

Получение стабилизированных КТ. Синтез квантовых точек сульфида кадмия проводили по методу, описанному в работе [7].

Получение КТ сульфида кадмия в растворах порина и полисахаридов. КТ получали при смешивании растворов YpOmpF (1 мг/мл) в буфере А, содержащем 0,25 % ДСН или растворов полисахаридов (1 мг/мл) в буфере А с 70 мкл 4 мМ CdCl₂, смесь выдерживали в течение 12 ч, добавляли 20 мкл 30 мМ Na₂S, еще раз выдерживали в течение 12 ч и затем диализовали против буфера А в течение 24 ч.

Получение пориновой матрицы, меченной КТ, на слюде. Формирование на слюде SLB из липосом, состоящих из дидодецилфосфатидил холина, осуществляли по методу [12]. На слюду с SLB наносили 10 мкл конъюгата КТ-порин (100 мкг/мл) в 0,03 М Трис-НСl буфере pH 5,5, выдерживали в течение 1 ч и отмывали от не связанного белка буфером А (5 раз по 20 мкл).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Морфологию поверхности образцов исследовали с помощью атомно-силового микроскопа NanoDST (PNI, USA). Изображения получали в полуконтактном режиме с использованием сверхострого кантилевера с диаметром острия 1 нм.

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Размеры КТ и их конъюгатов с белком в растворе определяли методом ДРС с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания), оснащенного He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 4 мВт), в кювете 10x10 мм при температуре 20 °С при фиксированном угле рассеяния 173°. Время накопления данных составило 15-30 мин. Расчет Z average (среднего гидродинамического радиуса) и R_H (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их числового распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Метод сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Спектры люминесценции образцов измеряли с помощью спектрофлуориметра FluoroLog 3 (Horiba, Япония). В качестве источника излучения использовали широкополосную ксеноновую лампу со средней мощностью 450 Вт. Спектры люминесценции регистрировали с шагом 1 нм при времени усреднения 0,1 с. Максимум возбуждения люминесценции находился в пределах от 300 до 450 нм (4,15-2,75 эВ) и зависел от размеров полученных квантовых точек в исследуемых образцах. Средние размеры люминесцирующего ядра КТ (без учета стабилизирующей оболочки) определяли методом эффективных масс электрона и дырки [13]. Этот метод основан на определении энергии оптического перехода между известными уровнями размерного квантования электронов и дырок, зависящей от размеров КТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Меченные КТ биоматрицы получали в растворе с использованием YpOmpF, а также полисахаридов, заряженных положительно (хитозан) и отрицательно (каррагинан, липополисахарид). С помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) были определены размеры КТ и их конъюгатов с порином. Частицы комплекса КТ-порин в растворе были полидисперсными, 40% из них составляли частицы со средним гидродинамическим радиусом $R_H = 19,5$ нм, на более крупные частицы с R_H 40,93 и 32,48 нм приходилось соответственно 26,2 и 20,15%.

Для определения морфологии поверхности комплекса КТ-порин, полученного в растворе, использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью микроскопа NanoDST (PNI, USA). Нанесенный на слюду SLB формировал разрозненные массивы с шириной на полувысоте порядка 25 нм и высотой около 3 нм. При добавлении предварительно полученных КТ к SLB наблюдаются сферические структуры, ширина которых на полувысоте составляет около 25 нм, а высота – 20 нм (рис. 1а, б).

Добавление комплекса КТ-порин приводит к формированию на поверхности подложки пленки, покрывающей, в том числе, массивы липидного слоя. Латеральные размеры массивов липидного слоя в присутствии КТ-YpOmpF увеличиваются примерно в два раза: их ширина на полувысоте составляет около 30 нм, а высота – 10 нм (рис. 1в, г).

При изучении оптических свойств полученных биоконъюгатов, синтезированных в растворах как белковой, так и полисахаридных матриц, обнаружено, что максимум испускания КТ лежит в одном и том же спектральном

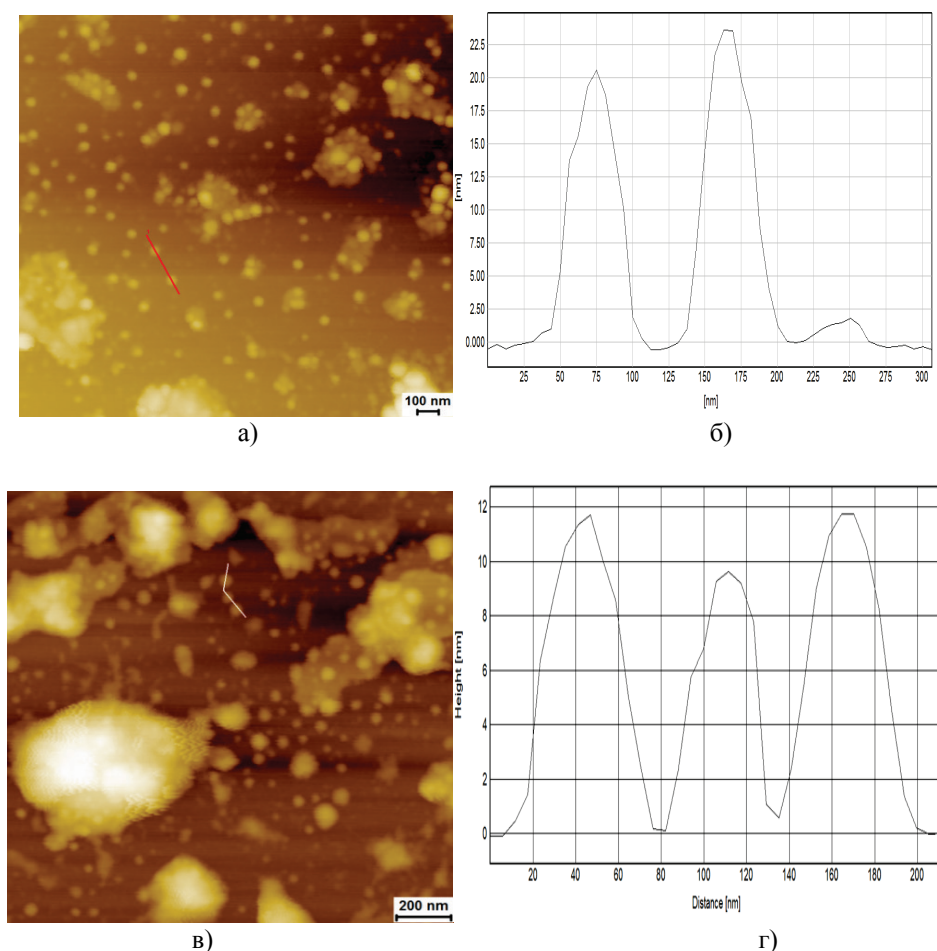


Рисунок 1. АСМ-изображения образцов КТ и КТ-порина в поддерживающем липидном бислое (SLB) на слюде: а) SLB с нанесенными КТ (SLB+КТ); б) профиль единичных структур (а); в) SLB с внесенной пориновой матрицей, меченной КТ (SLB+КТ-YpsOmpF); г) профиль единичных структур (в). Белой пунктирной линией отмечены области измерения профилей единичных структур

диапазоне (455 нм), что указывает на формирование точек одинакового размера, т.е. определяется размером «ячеек» сетчатой матрицы, ограничивающих размер КТ.

При проведении измерений методом флуоресцентной спектроскопии, оказалось, что интенсивность излучения полученных биоконплексов существенно зависит от используемого препарата биополимера. Показано, что при одинаковой концентрации интенсивность люминесценции КТ, синтезированных в растворах ЛПС, была в два раза выше, чем у остальных образцов (рис. 3).

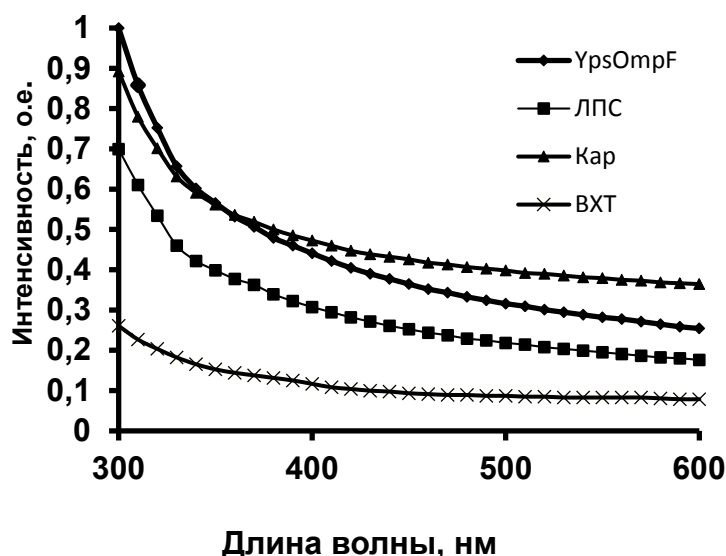


Рисунок 2. Спектры возбуждения флуоресценции конъюгатов, меченных КТ, приготовленных в растворах белковой и полисахаридных матриц

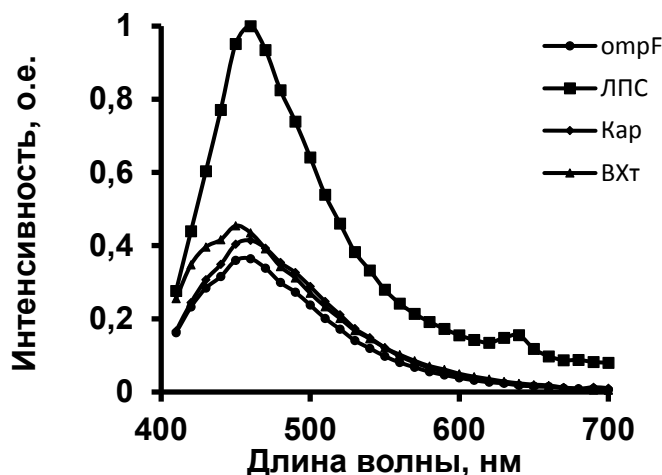


Рисунок 3. Спектры люминесценции конъюгатов с КТ, приготовленных в растворах белковой и полисахаридных матриц.

Достаточно четко выраженный длинноволновый максимум на спектрах возбуждения люминесценции исследуемых комплексов соответствует 1S-1S переходу в КТ, что позволяет использовать его энергию для определения среднего размера КТ по методу эффективных масс [13]. Рассчитанные размеры КТ приведены в таблице.

В используемой нами методике синтеза квантовых точек биополимеры выступают в качестве своеобразного лиганда, компенсирующего избыточную поверхностную энергию синтезированных частиц. Применение лиганда обусловлено необходимостью остановить рост частиц в коллоиде за счет Оствальдского созревания – формирования крупных частиц за счет агрегации мелких – и направлено на получение частиц с узким распределением по размерам. Именно вследствие Оствальдского созревания невозможно получить стабильный раствор низкоразмерных частиц, который в дальнейшем мог бы использоваться в качестве образца сравнения при исследованиях влияния типа биополимера на оптические и сенсорные свойства частиц. В этой связи в качестве образца сравнения нами использовались квантовые точки сульфида кадмия, синтезированные по аналогичной методике с меркаптоянтарной кислотой в качестве лиганда.

Как видно из данных таблицы, размеры КТ CdS, определенные разными методами (ДРС и метода эффективных масс) для КТ-УрОmpF, несколько отличаются друг от друга. По данным ДРС значительная доля частиц этого конъюгата имеет размер 20 нм, что в 10 раз превосходит размер частиц, приведенный в таблице. Кроме того, как было сказано выше, методом ДРС было выявлено также присутствие крупных частиц. Этот факт можно объяснить тем, что данный метод определяет размеры рассеивающих центров, а не самих КТ. Наночастицы CdS в водном растворе расположены в мицеллах, в состав которых входят молекулы стабилизатора и поляризованные молекулы воды. Именно такие образования, состоящие из наночастиц CdS, стабилизирующего слоя и сольватной оболочки из молекул дисперсионной среды, представляют собой рассеивающие центры. Следует также отметить, что различия в размерах квантовых точек, получаемых в матрице УрОmpF, могут быть связаны не только с диаметром пор белка, но и с зарядом его молекулы. Например, наиболее крупные частицы получаются в присутствии каррагинана (имеющего избыточный отрицательный заряд), а одни из самых мелких частиц – в присутствии хитозана (имеющего избыточный положительный заряд).

Апробация биосенсора на основе порина показала, что взаимодействие его с IgG, специфичными к УрОmpF, приводит к существенному увеличению интенсивности люминесценции комплекса КТ-порин (рис. 4). Подобного изменения люминесценции в случае комплекса КТ-BSA не наблюдалось, что наглядно демонстрирует специфичность взаимодействия комплекса КТ-порин с антителами.

Таблица 1. Средний диаметр квантовых точек, рассчитанный по методу эффективных масс электрона и дырки

Лиганды полученных биоконъюгатов, меченных КТ	Энергия перехода, эВ	Средний размер, нм
<i>Меркатоянтарная</i>	4,711	1,996
<i>ОmpF У.psdт</i>	4,21	2,264
<i>ЛПС</i>	4,239	2,246
<i>Каррагенан</i>	4,176	2,288
<i>Хитозан</i>	4,434	2,131

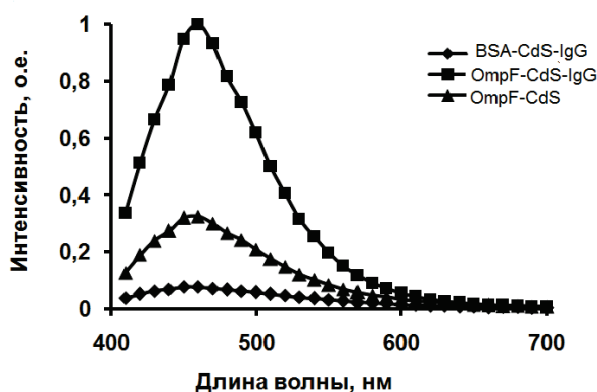


Рисунок 4. Взаимодействие с IgG, специфичными к OmpF порину. Спектры флуоресценции образцов: порина, меченного КТ (OmpF-CdS), порина, меченного КТ с антителами (OmpF-CdS-IgG), бычьего сывороточного альбумина, меченного КТ с антителами (BSA-CdS-IgG)

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан эффективный способ получения биоконъюгатов на основе природных биополимеров. Показано, что состав матрицы существенно влияет на оптические свойства КТ в биоконъюгатах. Показано, что люминесценция КТ в составе полученных комплексов определяется количеством поверхностных дефектов конкретной биоматрицы, что представляет значительный интерес с точки зрения химической сенсорики. Обнаружено, что люминесценция КТ в составе комплекса OmpF-CdS значительно увеличивается в присутствии специфических антител к белку, что открывает перспективы его использования для целей иммунодиагностики.

Список литературы/References:

- Новикова О.Д., Набережных Г.А., Сергеев А.А. Наноструктурные биосенсоры на основе компонентов бактериальных мембран. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 4, с. 668-683. [Novikova O.D., Naberezhnykh G.A., Sergeev A.A. Nanostructural biosensors based on bacterial membrane components. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 668-683, doi: 10.31857/S0006302921040062. (In Russ.)]
- Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, pp. 8706-8715, doi: 10.1021/ja00072a025.
- Rosenthal S.J., McBride J., Pennycook S.J., Feldman L.C. Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals. *Surf. Sci. Rep.*, 2007, vol. 62, pp. 111-157, doi: 10.1016/j.surfrep.2007.02.001.
- Akerman M.E., Chan W., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *PNAS*, 2002, vol. 99, no. 20, pp. 12617-12621, doi: 10.1073/pnas.1524633993.
- Abdellatif A.A.H., Younis M.A., Alsharidah M., Rugaie O., Tawfeek H.M. Biomedical Applications of Quantum Dots: Overview, Challenges, and Clinical Potential. *Int. J. Nanomedicine*, 2022, vol. 17, pp. 1951-1970, doi: 10.2147/IJN.S357980.
- Yang G., Qin D., Zhang L. Controllable synthesis of protein-conjugated lead sulfide nanocubes by using bovine hemoglobin as a capping agent. *J Nanopart. Res.*, 2014, vol. 16, no. 6, pp. 2438-2441, doi: 10.1007/s11051-014-2438-7.
- Dickerson M.B., Sandhage K.H., Naik R.R. Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, no. 11, pp 4935-497, doi: 10.1021/cr8002328.
- Набережных Г.А., Сергеев А.А., Портнягина О.Ю., Чистюлин Д.К., Сидорин Е.В., Новикова О.Д. Биоконъюгирование коллоидных квантовых точек сульфидов кадмия и надмолекулярных структур белка-порина из бактерий рода *Yersinia*. Получение и характеристика. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 4, с. 652-658. [Naberezhnykh G.A., Sergeev A.A., Portnyagina O.Yu., Chistyulin D.K., Sidorin E.V., Novikova O.D. Bioconjugation of colloidal quantum dots of cadmium sulfides and supramolecular structures of porin protein from bacteria of the genus *Yersinia*. Obtaining and characterization. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 652-658. (In Russ.)]
- Новикова О.Д., Вакорина Т.Н., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. Влияние условий культивирования на пространственную структуру и функциональную активность OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2008, т. 73, № 2, с. 173-184. [Novikova O.D., Vakorina T.I., Khomenko V.A., Likhatskaya G.N., Kim N.Yu., Emelyanenko V.I., Kuznetsova S.M., Solov'eva T.F. Influence of cultivation conditions on spatial structure and functional activity of OmpF like porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 173-184, doi: 10.1134/s0006297908020041. (In Russ.)]
- Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N. Interaction of Chitosans and N-acylated Chitosan Derivatives with Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *Biokhimiya*, 2008, vol. 73, no. 4, pp. 530-541, doi: 10.1134/s0006297908040081.
- Galanos O., Luderitz, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, с. 245-249, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

11. Yermak I.M., Kim Y.H., Titlyanov E.A., Isakov V.V., Solov'eva T.F. Chemical structure and gel properties of carrageenan from algae belonging to the Gigartinales and Rhodospirillales, collected from the Russian Pacific coast. *J. Applied Phycology*, 1999, vol. 11, pp. 41-48, doi: 10.1023/A:1008071925884.
12. Naberezhnykh G.A., Khomenko V.A., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Karpenko A.A. The formation of ordered structures of bacterial porins in a lipid bilayer and the analysis of their morphology by atomic force microscopy. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 6, pp. 901-907, doi: 10.1134/S0006302919060097.
13. Разумов В.Ф. Фундаментальные и прикладные аспекты люминесценции коллоидных квантовых точек. *Успехи физических наук*, 2016, т. 186, № 12, с. 1368-1376. [Razumov V.F. Fundamental and applied aspects of luminescence of colloidal quantum dots. *Advances Physical Science*, 2016, vol. 186, no. 2, pp. 1368-1376, doi: 10.3367/UFNr.2016.03.037861. (In Russ.)]

QUANTUM DOTS OF CADMIUM SULFIDE PRODUCED WITH THE USE OF PROTEINS-PORINS, CARRAGEANANS, CHITOSANS AND LIPOPOLOSACCHARIDES

Naberezhnykh G.A.¹, Sergeev A.A.², Novikova O.D.¹

¹Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
100 years of Vladivostok Ave., 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: naber1953@mail.ru

²Institute of Automation and Control Processes Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
Radio str., 5, Vladivostok, 690041, Russia

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2022.0539

Abstract. Quantum dots (QDs) are a new generation of fluorochromes with significant advantages over traditional organic dyes. QDs based on CdS are promising materials for optics, optoelectronics, biology, and medicine. QDs in the form of colloidal solutions are of great scientific and practical interest. CdS quantum dots were synthesized by chemical condensation in an aqueous solution using Yersinia pseudotuberculosis porin proteins, positively (chitosan) and negatively (carrageenan, lipopolysaccharide) charged polysaccharides. The maxima of the emission spectra for all samples were 450 nm, which indicates the same QD size; is determined by the size of the "cells" of the grid matrix, which limit the size of the QD. It was shown that the fluorescence intensity of QDs synthesized in LPS solutions was two times higher than that of other samples. The fluorescence of the samples and the maxima of the emission spectra (450 nm) are preserved during intensive dialysis against buffers, which indicates the stability of QDs and the possibility of using the obtained labeled preparations. Keeping samples at pH 3 leads to a significant decrease in fluorescence, especially for acidic polysaccharides. Anionic oxygen of phosphate, hydroxyl groups of sugar, nitrogen atoms can interact with metal ions, which are precursors (precursors) for CdS nanocrystals. It was found that the interaction with porin-specific IgG leads to a significant change in the luminescence intensity of QD-porin samples. This is of interest from the point of view of chemical sensing and opens the prospect of using QD-labeled porin-based nanostructures as biosensors.

Key words: porin, chitosan, carrageenan, lipopolysaccharide, cadmium sulfide, quantum dots, conjugation, luminescence.