

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕЛЕКТИВНОГО МАРКИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАТНЫХ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ И РАЗРАБОТКА ПУТЕЙ СИНТЕЗА МОДИФИЦИРОВАННЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК CdTe В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Беликов Н.Е.,¹ Демина О.В.,¹ Лукин А.Ю.,² Петровская Л.Е.,³ Складнев Д.А.,⁴
Варфоломеев С.Д.,¹ Ходонов А.А.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: khodonov@gmail.com

² МИРЕА – Российский технологический университет,
пр-кт Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ;

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ;

⁴ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Ленинский пр-кт, 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ;

Поступила в редакцию: 08.06.2021

Аннотация. В работе рассматривается предложенная авторами процедура обратимого маркирования белков-мишеней с помощью флуоресцентных меток и зондов. В качестве последних было предложено использовать новые флуорофоры на основе квантовых точек (QDs CdTe), содержащие молекулярный адрес (хелатные комплексы Ni^{2+} с нитрилотриуксусной кислотой и ее производными), способные образовывать прочные хелаты с гексагистиридиновым тегом, локализованным в заданном месте полипептидной цепи белка-мишени. В настоящей работе особое внимание посвящено выбору нужного состава и строения молекулы метки и реализации на практике лабораторной технологии синтеза набора исходных квантовых точек QDs CdTe с заданными оптическими параметрами.

Ключевые слова: селективное маркирование белков-мишеней, флуоресцентные метки, квантовые точки, методы получения, нитрилотриуксусная кислота.

При изучении механизмов действия небольших биологически-активных молекул-лигандов (как природного, так и синтетического происхождения) центральное место занимает природа процесса взаимодействия низкомолекулярного лиганда со своим специфичным рецептором-мишенью (ферментом, GPCR, ядерным рецепторами, или определенными сайтами последовательностей нуклеиновых кислот). Неоценимую помощь при определении как места связывания, так и степени его эффективности оказывает ставший на сегодняшний день стандартным прием – введение в молекулу лиганда меток или маркеров различного рода и анализ механизмов процесса связывания, с генерированием определенного физического сигнала, пропорционального количеству связанного меченого лиганда. Развитие и совершенствование существующих аналитических систем с использованием разнообразных меченых субстратов позволяет на сегодняшний день проводить надежное определение содержания метки в системе в диапазонах концентраций 10^{-15} – 10^{-6} моль. Основные типы меток и маркеров, применяемых для проведения биомедицинских исследований, можно разделить на 2 большие группы: радиоактивные (3H -, ^{14}C - и ^{32}P -изотопы) и нерадиоактивные. Из последней группы можно выделить следующие типы меток: стабильные (нерадиоактивные) изотопы (2H -, ^{13}C -, ^{15}N -, ^{19}F и др.); хромогенные, флуоресцентные, спиновые, электроно-плотные и фотохромные [1].

В пост-геномную эру необходимо развивать новые технологии, призванные помочь при анализе белкового состава протеома, идентификации отдельных целевых белков-мишеней и отнесения связи их особенностей структуры с конкретным типом функциональной активности. Особые перспективы подобные системы маркирования имеют при замене пока еще широко применяемых радиоактивных меток на более безопасные флуоресцентные или фотохромные; а также при разработке целого ряда прототипов технических smart-устройств на основе меченых белков в бионанопотонике и сенсорных технологиях; средств визуализации различных бионанообъектов в реальном времени и в многопараметрических (многоцветных) системах; фотоуправляемых средств контроля строения и функции бионанообъектов, фотоуправляемых средств адресной доставки биологически активных соединений и др. [2-4].

Разработанные ранее протоколы маркирования белков-мишеней в живых клетках с помощью флуоресцентных меток и зондов позволяют облегчить процедуры зондирования, визуализации, определения их точной локализации и оценить возможные взаимодействия лиганд-мишень в норме и патологии. Наиболее перспективными среди большого количества известных методов и технологий при изучении процессов взаимодействия белков с друг другом, с фрагментами нуклеиновых кислот, или низкомолекулярными лигандами, как в живых объектах, так и в системах высокоэффективного скрининга (HTS) с выделенными и очищенными образцами препаратов белков, являются методы, основанные на использовании явления флуоресценции, особенно варианты резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

Уже известные протоколы селективного маркирования белков-мишеней включают: либо введение целевых флуорофоров в состав мишени производных модифицированных аминокислот с помощью технологии сайт-специфичного мутагенеза; либо обратимое или необратимое сайт-специфичное взаимодействие определенного

аминокислотного остатка или сайта узнавания аминокислотной последовательности белка-мишени с флуорофором, содержащим молекулярный адрес или реакционноспособную группу с определенным типом специфичности.

Разрабатываемая нами технология маркирования заключается в селективном взаимодействии новых фотоактивных меток на основе флуорофоров, содержащих молекулярный адрес (хелатные комплексы Ni^{2+} с нитрилотриуксусной кислотой и ее производными NTA), с гексагистидиновым тегом (6 His), локализованном в заданном месте полипептидной цепи белка-мишени. Гексагистидиновый тег образует прочные хелатные комплексы с переходными металлами и нитрилотриуксусной кислотой (Ni^{2+} : NTA). NTA – тетрадендантный хелатор, занимающий 4 из 6 сайтов связывания в координационной сфере иона Ni^{2+} , оставшиеся свободные сайты реагируют с имидазольными фрагментами гексагистидинового тега. Анализ данных литературных источников показал, что, подходы, включающие обратимое сайт-специфичное взаимодействие флуорофоров с белками-мишенями за счет образования прочных и обратимых хелатов с комплексами металлов являются одними из наиболее актуальных и перспективных, и поэтому эта технология была нами выбрана для практической реализации в рамках настоящей работы.

Преимущества указанного хелатного варианта связывания над системами, реализующими процесс биоспецифичного распознавания лиганд-рецептор (антитела, пара «биотин-стрептавидин») заключаются в следующем: 1) белки-мишени с гексагистидиновым тегом, меченные по С- или N-концам или внутренним сайтам коммерчески доступны; 2) *in situ* процедура прямого мечения образца хелатным комплексом Ni^{2+} -нитрилотриуксусная кислота (Ni^{2+} : NTA) по типу “mix and read” проста и происходит быстро, без последующих процедур очистки или выделения или дополнительной дериватизации; 3) данный вариант процедуры селективного химического маркирования белков-мишеней низкомолекулярными флуорофорами обратим, и целевой исходный белок-мишень можно достаточно просто регенировать под действием избытка более сильного хелатора (этилендиаминтетрауксусной кислоты) или конкурентных лигандов (имидазол); 4) пространственно заданное положение гексагистидинового тега в мишенях позволяет контролировать иммобилизацию с нужной регио- и стереоселективностью [5-8]. Хелатные комплексы Ni^{2+} – нитрилотриуксусная кислота (Ni^{2+} : NTA) в составе хроматографических сорбентов широко применяются в настоящее время при очистке и выделении рекомбинатных белков с гексагистидиновым тегом. Метод получил широкое применение под названием металло-хелатная аффинная хроматография (ИМАС) и использует (Ni^{2+} : NTA)-агарозные гели и материалы для иммобилизации ((Ni^{2+} : NTA)-содержащих носителей и наночастиц) [6-8].

Среди недостатков указанного хелатного варианта связывания пока остаются полностью нерешенные проблемы неспецифического связывания метки с другими нецелевыми сайтами молекулы белка-мишени; сложность молекул гибридных лигандов флуорофор-NTA- Ni^{2+} , что обуславливает дальнейший поиск более совершенных методов их получения и/или внедрения в практику новых еще неизвестных структур.

В 2021 г. исполняется 16 лет с начала «эры оптогенетики» (нейробиофотоники) – использования генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток человека и животных. Особенности предлагаемой в настоящей работе технологии открывают новое направление для получения фотопереключаемых, фотоактивных компонентов для оптогенетики на основе микробных родопсинов и других фоточувствительных белков с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами [9-11]. В качестве рекомбинатных фотоактивных белков-мишеней будут использованы: мембранный белок – протеородопсин ESRh из бактерии *Exiguobacterium sibiricum* и водорастворимый белок – красный флуоресцентный белок mCherry, содержащие гексагистидиновый тег по С-концу полипептидной цепи белка. Первый объект, ретиналь-содержащий микробный протеородопсин (ESRh), из психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из образцов почвы вечной мерзлоты возрастом 3 млн. лет. Установлено, что ESRh обладает структурой, типичной для семейства ретиналь-содержащих белков, включая наличие семи альфа-спиральных сегментов и молекулы ретиналя в *all-E*-конфигурации ковалентно связанного с остатком K225 посредством протонированной альдиминной связи. Это фоточувствительный мембранный белок, функционирующий, как светуправляемый протонный насос. Уникальными особенностями ESRh являются: 1) наличие нестандартного донора протонов для альдиминной связи основания Шиффа его хромофора с эпсилон-аминофункцией остатка лизина K96 и его расположение в гидрофобной полости близко к поверхности белка, которое может облегчать доступ протонов из цитоплазмы; 2) нарушение альфа-спиральной структуры в средней части спирали F; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85. H57 в молекуле ESRh обладает конфигурацией, существенно отличающейся от положения гомологичного остатка в молекуле ксантородопсина, и связан с поверхностью белка системой водородных связей. В отличие от бактериородопсина, остаток R82 в молекуле ESRh удален от основания Шиффа и не образует водородной связи с акцептором протонов D85, соответственно не оказывая существенного воздействия на его свойства. Установлено наличие ряда специфических особенностей фотоцикла ESRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование M-интермедиата и сдвиг его pK в щелочную область pH [12-13]. Для очистки белка, содержащего С-концевую гексагистидиновую последовательность, будет использован метод металло-аффинной хроматографии на никель-содержащей смоле. Пространственная 3D-структура ESRh с разрешением 2,3Å (PDB код структуры 4huj) была впервые установлена в работах [14-18]. Второй объект-мишень – водорастворимый красный флуоресцентный белок mCherry, который был получен на основе белка DsRed из кораллов рода *Discosoma*. mCherry представляет собой водорастворимый мономерный белок с максимумом флуоресценции 610 нм, быстрым созреванием и высокой фотостабильностью [19].

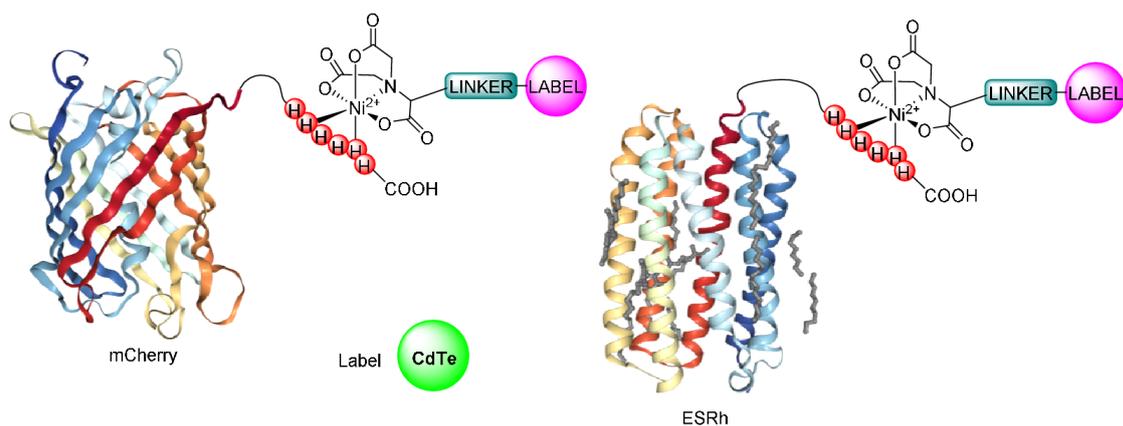


Рисунок 1. Пути модификации целевых белков-мишеней при помощи новых флуорофоров на основе QDs CdTe

Предлагаемые в настоящей работе пути и методы модификации белков-мишеней открывают новое направление для получения новых фотопереключаемых, фотоактивных компонентов для оптогенетики на основе ESRh и других микробных родопсинов.

Необходимо учитывать ряд требований, важных для реализации на практике эффективных флуоресцентных методов и протоколов анализа природы взаимодействия низкомолекулярного лиганда со своим специфичным рецептором-мишенью. Основными из них являются поиск и доступность новых флуорофоров с высокой фотостабильностью, что должно обеспечивать достоверность и надежность данных спектров флуоресценции при количественной оценке эффективности процессов маркирования мишеней и их взаимодействия с различными целевыми лигандами. Это требование очень важно при дизайне молекул новых биологически активных соединений, в том числе и прототипов лекарственных препаратов. Однако, большинство известных флуорофоров на основе органических красителей или флуоресцентных белков (FPs) под действием различных факторов часто испытывают проблемы с гашением флуоресценции и/или фотостабильностью молекул исходных меток.

В качестве флуоресцентных меток нами были выбраны флуорофоры на основе ковалентных конъюгатов квантовых точек QDs. Для успешного решения основной задачи первого этапа настоящего исследования необходимо было создать надежную и воспроизводимую технологию получения исходного набора QDs CdTe с заданными оптическими характеристиками и различными по структуре гидрофильными якорными группами на их поверхности.

Ниже в настоящей публикации представлены полученные нами на начальном этапе работы результаты, описывающие способы получения исходного набора флуоресцентных меток на основе неорганических наноразмерных кристаллов – квантовых точек CdTe.

Дизайн молекул и разработка способов получения флуоресцентных меток на основе неорганических наноразмерных кристаллов – квантовых точек (QDs).

Среди известных на сегодняшний день семейств флуорофоров наиболее перспективными для применения в различных областях являются полупроводниковые нанокристаллы (“квантовые точки”, quantum dots, QDs). Они обладают уникальными оптическими и химическими характеристиками, выгодно отличающими их от органических и от биологических флуорофоров.

Уникальные флуоресцентные свойства QDs имеют целый ряд преимуществ над обычно используемыми в биологии и медицине органическими флуорофорами:

- 1) узкие и симметричные полосы флуоресценции (ширина полосы на полувысоте спектра (FWHM) 20–35 нм);
- 2) возможность создания на основе образцов QDs одного состава, но отличающихся размерами наночастиц, широкой спектральной линейки флуоресцентных зондов и меток от УФ-области до ближнего ИК-диапазона;
- 3) более высокая фотостабильность;
- 4) сравнимые величины квантового выхода и более высокие значения молярного коэффициента экстинкции, что позволило получить системы для визуализации единичных молекул с хорошей чувствительностью и яркостью изображения;
- 5) возможность реализации методов модификации поверхности с помощью дополнительных покрытий или оболочек (ZnS и др.) или способов посадки на нее различных реакционноспособных групп, молекулярных адресов или бионанообъектов, позволяет использовать данные системы в наномедицине при диагностике как в *in vitro*, так и в *in vivo* вариантах, а в перспективе – для лечения пациентов [1-4,20,21].

QDs разных размеров, формы и состава поглощают свет в широком диапазоне оптического спектра от УФ- до ближней ИК-области, тогда как их спектр испускания крайне узок (FWHM составляет 20-25 нм), идеально симметричен, а положение максимума испускания флуоресценции QDs определяется их диаметром. Таким образом, QDs диаметром от 3 нм до 6 нм могут быть возбуждены источником света одной и той же длины волны, испуская при этом флуоресценцию в диапазоне от голубой до ближней ИК области в зависимости от своего размера. Кроме того, QDs являются более фотостабильными (на много порядков), чем лучшие органические

флуорофоры, обеспечивая возможность многократного увеличения как мощности возбуждающего излучения, так и длительного (в течение дней до месяцев) отслеживания поведения метки в реальном времени.

Решение основной задачи настоящего исследования – реализации возможности использования QDs в качестве меток и зондов в биологических системах требует направленного изменения свойств поверхности QDs, ее модификации с формированием на поверхности частиц достаточного количества гидрофильных полярных групп, часть из которых могла бы быть якорными группами для присоединения к ним биологических молекул-мишеней. Возможны 2 основных подхода: (1) использование бифункциональных модификаторов, способных замещать молекулы триоктилфосфиноксида и содержащих терминальные гидрофильные якорные группы, которые после присоединения к QDs оказываются экспонированными в водный раствор, и таким образом, обеспечивают растворимость в воде; (2) внедрение QDs в полимерные матрицы, золь-гели, дендромеры. Хотя поверхностные гидрофобные лиганды (триоктилфосфиноксид и стабилизатор) можно заменить на целевые гидрофильные лиганды путем их обмена в слабополярном растворителе, данный подход не является оптимальным: как правило, такая замена лиганда приводит к существенному снижению квантового выхода флуоресценции и стабильности препаратов QDs.

Выбор состава QDs.

Проанализировав сведения по доступности, стоимости исходных предшественников на отечественном и зарубежных рынках, потенциальной опасности в обращении с указанными реагентами и их стабильности к воздействию различных факторов в процессе синтеза, сравнив данные по двум возможным кандидатам 1) классические гидрофобные препараты QDs CdSe и 2) модифицированные 3-меркаптопропионовой кислотой (МРА) гидрофильные препараты QDs CdTe, мы установили, что синтез CdSe QDs оказался почти в 8 раз более затратным. Таким образом, в настоящей работе мы остановили свой выбор на гидрофильном кандидате (2) – QDs CdTe, модифицированными МРА, для получения которых нами была разработана технология гидротермального синтеза целевых QDs CdTe в водных растворах.

Как, хорошо известно, из литературы для образования прочных ковалентных комплексов QD CdSe или CdTe с органическими лигандами необходимо введение в состав органической молекулы линкера с терминальной меркапто-группой [2,20].

За прошедшие 30 лет после открытия QDs были разработаны несколько вариантов их получения:

- 1) высокотемпературный коллоидный синтез (ВТКС);
- 2) гидротермальный синтез в водных растворах;
- 3) методы замены типа покрытия на поверхности QDs;
- 4) смешанные варианты модификации поверхности и комбинации упомянутых в п.п. 1-3 методов.

Высокотемпературный коллоидный синтез (ВТКС) [2,20,22-25].

Этот способ нашел широкое применение для получения разнообразных гидрофобных QDs состава CdTe, CdSe, InP, InAs, CdSe/ZnS и др. [2,20,22-25]. Метод заключается в том, что холодный раствор селена (Te или других органо-металлических предшественников) в триоктилфосфине (20°C) вводится в горячий ($270\text{-}300^{\circ}\text{C}$) раствор оксида кадмия (или других источников Cd) в смеси триоктилфосфиноксида (ТОФО) и гидрофобного стабилизатора, например, гексадециламина, а рост QDs происходит при контролируемом изменении температуры процесса. Поверхность гидрофобных QDs покрыта фрагментами ТОФО и гидрофобного стабилизатора. Они растворимы только в малополярных органических растворителях (хлороформ, толуол, гептан, гексан). QDs имеют совершенную кристаллическую структуру, малый разброс по размерам ($<5\%$), но квантовый выход флуоресценции оставался относительно низким ($\sim 10\%$). Существенного увеличения квантового выхода (до 70%) удалось добиться формированием дополнительной оболочки ZnS или CdS вокруг основного ядра QDs.

Гидротермальный синтез QDs CdTe в водных растворах.

В литературе известен ряд вариантов проведения процесса синтеза высококачественных препаратов CdTe QDs в водных растворах [26-34]. Их условно можно классифицировать на три группы: 1) генерация предшественника (Te^{2-}) – раствора теллуридоводорода (H_2Te) *in situ* из системы $\text{Al}_2\text{Te}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$, 2) генерация предшественника (Te^{2-}) – раствора NaHTe *in situ* из системы $\text{Te} / \text{NaBH}_4$, 3) генерация предшественника (Te^{2-}) *in situ* из Me_2TeO_3 восстановлением NaBH_4 .

Дополнительные процедуры, призванные улучшить конечные оптические характеристики и стабильность препаратов CdTe QDs, заключаются в рефлюксинге промежуточной реакционной массы в определенном диапазоне температуры и времени [26-29,33,34]. Вместо обычной процедуры прогрева часто используют нагрев при помощи микроволновой технологии или сочетание нагрева с ультразвуковым облучением. Общим недостатком упомянутых выше технологий является высокая стоимость оборудования, но она обеспечивает ускорение процесса по времени и снижение температуры прогрева [30-32] при сохранении высоких оптических характеристик препаратов. Также общим недостатком (1-й и 2-й) групп технологий получения препаратов CdTe QDs является необходимость работы в инертной атмосфере Ag или N_2 для предотвращения окисления предшественника (Te^{2-}).

Для конечной обработки сырого продукта была разработана процедура размер-селективного осаждения с центрифугированием, позволяющая получить набор фракций препаратов наночастиц CdTe QDs с узким интервалом дисперсии распределения их размеров и программировать положение максимумов флуоресценции с более узкой FWHM и величину квантового выхода флуоресценции.

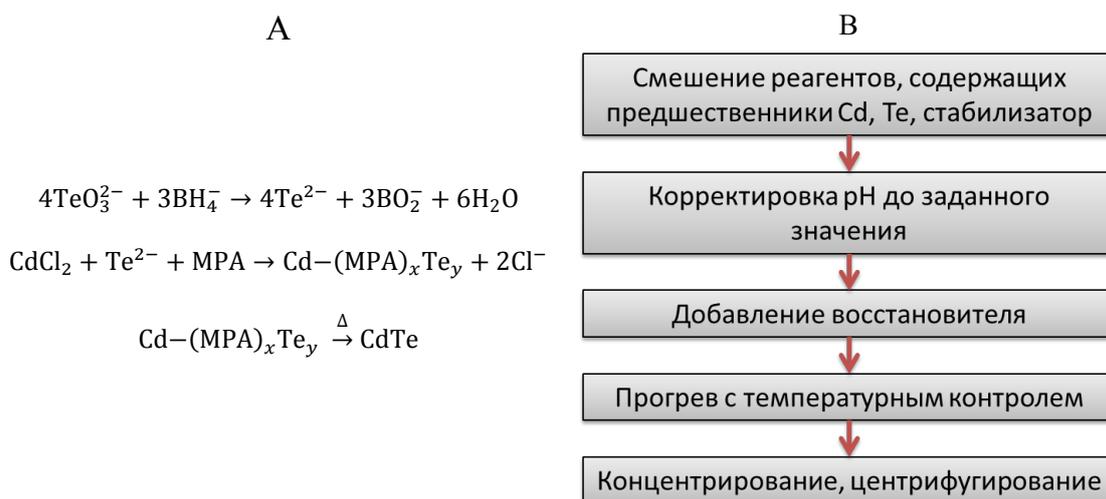


Рисунок 2. А – Основные химические реакции в технологии получения CdTe QDs, стабилизированных 3-меркаптопропионовой кислотой (MPA), В – Основные технологические стадии процесса синтеза CdTe QDs

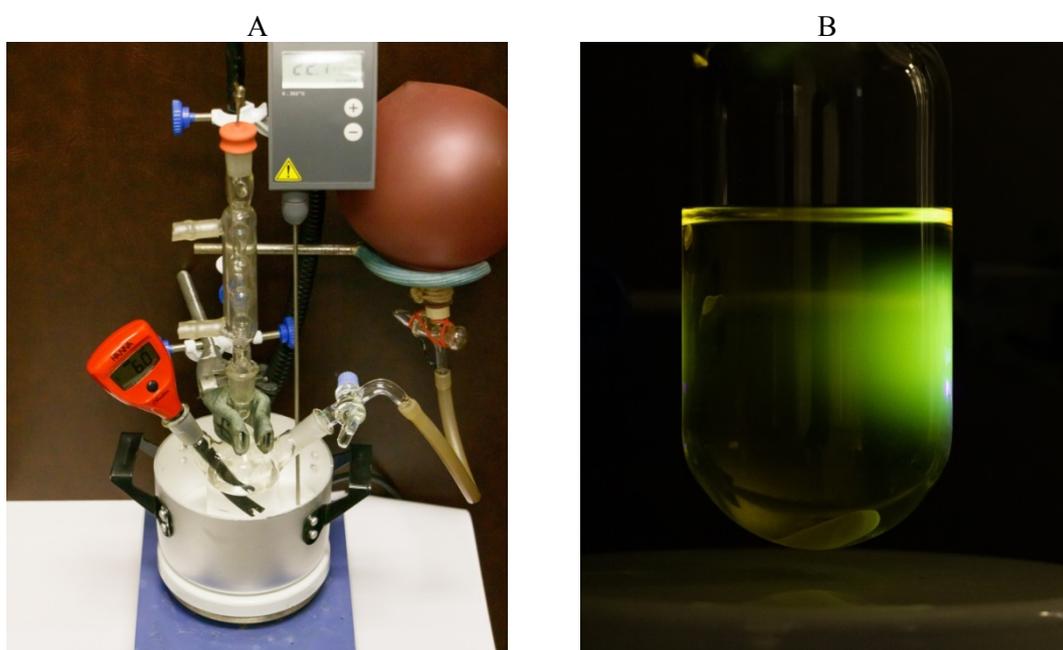


Рисунок 3. А – Общий вид установки для получения препаратов CdTe QDs, стабилизированных 3-меркаптопропионовой кислотой, В – флуоресценция препарата CdTe QDs после рефлюсинга до стадии выделения λ_{max} п 520 нм

Проведя анализ результатов ранних публикаций, мы остановили свой выбор на использовании следующей модифицированной технологии синтеза коллоидной системы CdTe QDs, изображенной на рисунках 2, 3. В качестве исходных предшественников нами были выбраны наиболее доступные соли Cd и Te ($\text{CdCl}_2 \times 2.5 \text{H}_2\text{O}$ и K_2TeO_3). Проведенные пилотные эксперименты позволили подобрать и оптимизировать ряд параметров процесса: порядок смешения реагентов, их соотношение, температуру основной реакции, pH основной реакции (значения диапазона pH от 9 до 12).

Был протестирован ряд различных серу-содержащих лигандов с терминальной полярной карбоксильной группой: 3-меркаптопропионовая, тиогликолевая, 3,3'-дитиодипропионовая кислоты (среди них наиболее оптимальным лигандом оказалась 3-меркаптопропионовая кислота), тип восстановителя (KBH_4 , NaBH_4), температурные параметры и длительность рефлюсинга реакционной массы, растворитель для процедуры размер-селективного осаждения, скорость и длительность центрифугирования.

Средний диаметр частиц D и коэффициент молярной экстинкции ε были определены по эмпирическим формулам, где λ – длина волны максимума полосы поглощения первого экситона [35].

$$D = (9.8127 \times 10^{-7}) \times \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \times \lambda^2 + 1.0064 \times \lambda - 194.84 \text{ (нм)}$$

$$\varepsilon = 10043 \times D^{2.12} \text{ (л·моль}^{-1}\text{·см}^{-1}\text{)}$$

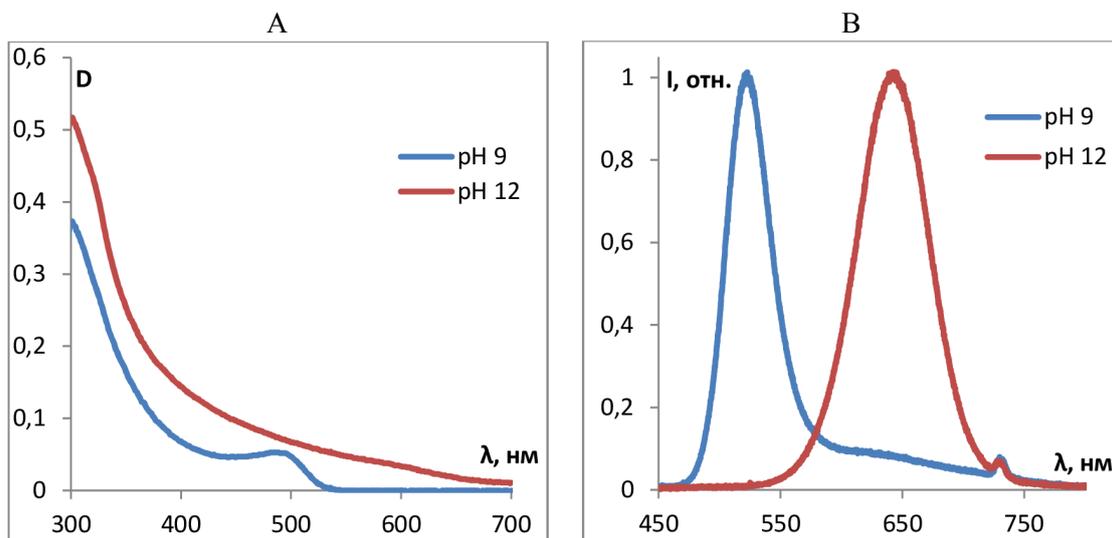


Рисунок 4. Электронные спектры препаратов CdTe QDs (А) и их спектры флуоресценции (В)

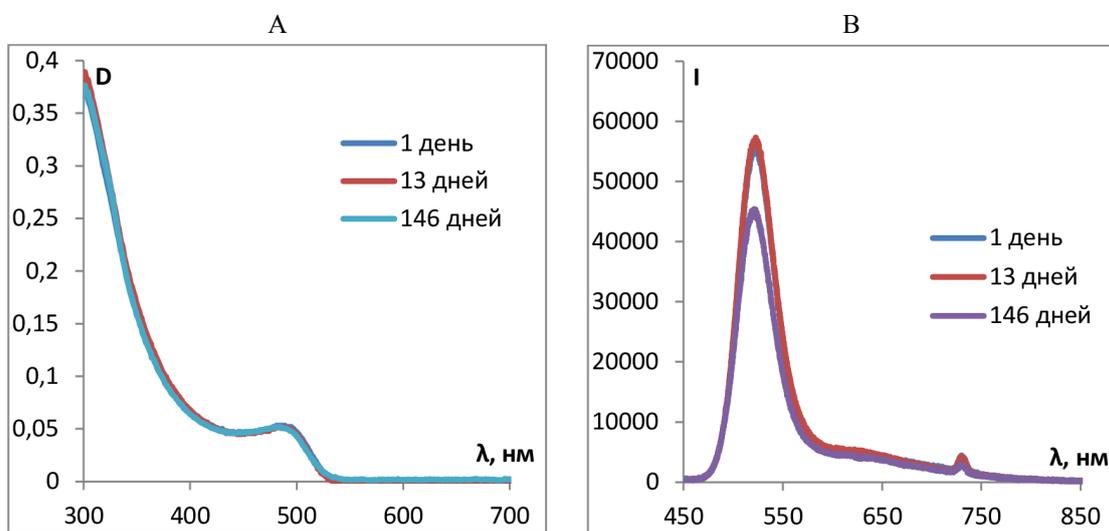


Рисунок 5. Контроль оптических характеристик (А – спектры поглощения, В – спектры флуоресценции) CdTe QDs при различных сроках хранения препаратов при 4°С

Хранение реакционной массы CdTe осуществляли при 4°С в атмосфере аргона. Синтезированные препараты CdTe QDs при хранении при 4°С в растворе или в твердом состоянии практически не изменяли своих спектральных параметров и характеристик в течение длительного времени (рис. 5 и табл. 1).

Таким образом, нами была разработана технология получения линейки препаратов коллоидной системы CdTe QDs с запрограммированными оптическими параметрами флуоресценции от 520 до 642 нм.

В дальнейшем указанные промежуточные CdTe QDs после введения молекулярного адреса – фрагмента NTA по имеющейся якорной карбоксильной функции, будут использоваться для разработки протоколов селективного мечения целевых белков-мишеней.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00139.

Таблица 1. Физико-химические характеристики препаратов CdTe QDs

	pH 9	pH 12
Максимум основного пика в спектре флуоресценции, нм	520	642
Ширина полосы флуоресценции при половине высоты FWHM, нм	45	70
Максимум длины волны поглощения первого экситона, нм	488 (±3)	610 (±10)
Диаметр частиц, нм	1,9 (±0,2)	3,7 (±0,2)
Коэффициент молярной экстинкции, ε (л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)	4,3(±0,9)·10 ⁴	1,6(±0,2)·10 ⁵

Список литературы / References:

1. Демина О.В., Беликов Н.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Новые метки и зонды для решения задач бионанопотоники. *Химическая физика*, 2019, т. 38, № 12, с. 44-47. [Demina O.V., Belikov N.E., Melnikova I.A., Lukin A.Yu., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. New Labels and Probes for the Application in Bionanophotonics. *Russ. J. Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 6, pp. 938-941. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1990793119060162.
2. Звездин К.В., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Демина О.В., Левин П.П., Бричкин С.Б., Спириин М.Г., Разумов В.Ф., Швеиц В.И., Ходонов А.А. Новые гибридные фотохромные материалы с переключаемой флуоресценцией. *Российские нанотехнологии*, 2012, т. 7, № 5-6, с. 112-118. [Zvezdin K.V., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Levin P.P., Brichkin S.B., Spirin M.G., Razumov V.F., Shvets V.I., Khodonov A.A. New Hybrid Photochromic Materials with Switchable Fluorescence. *Nanotechnologies in Russia*, 2012, vol. 7, no. 5-6, pp. 308-317. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1995078012030172.
3. Chambers J.J., Kramer R.H. Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function. *Neuromethods*, Springer, 2011, vol. 55. DOI 10.1007/978-1-61779-031-71.
4. Papazoglou E.S., Parthasarathy A. *Bionanotechnology*. Morgan&Claypool, 2007. DOI: 10.2200/S00051ED1V01Y200610BME007.
5. Wingren C., Borrebaeck C.A. High-throughput proteomics using antibody microarrays. *Expert Rev. Proteomics*, 2004, vol. 1, no. 3, pp. 355-364. DOI: 10.1586/14789450.1.3.355.
6. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, vol. 258, no. 5536, pp. 598-599. DOI: 10.1038/258598a0.
7. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression Purif.*, 1992, vol. 3, no. 4, pp. 263-281. DOI: 10.1016/1046-5928(92)90001-D.
8. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnol.*, 1988, vol. 6, no. 11, pp. 1321-1325. DOI: 10.1038/nbt1188-1321.
9. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1213-1225. DOI: 10.1038/nn.4091.
10. Boyden E.S. Optogenetics and the future of neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1200-1201. DOI: 10.1038/nn.4094.
11. Говорунова Е.Г., Коппель Л.А. Путь к оптогенетике: родопсиновые белки микроорганизмов. *Биохимия*, 2016, т. 81, № 9, с. 1172-1186. [Govorunova E.G., Koppel L.A. The road to optogenetics. Microbial Rhodopsins. *Biokhimiya*, 2016, vol. 81, no. 9, pp. 1172-1186. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S0006297916090029.
12. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Letters*, 2010, vol. 584, no. 19, pp. 4193-4196. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.09.005.
13. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Aspartate-Histidine Interaction in the Retinal Schiff Base Counterion of the Light-Driven Proton Pump of *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 29, pp. 5748-5762. DOI: 10.1021/bi300409m.
14. Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, vol. 110, no. 31, pp. 12631-12636. DOI: 10.1073/pnas.1221629110.
15. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the Carboxyl Rule - Lysine 96 facilitates protonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 29, pp. 21254- 21265. DOI: 10.1074/jbc.M113.465138.
16. Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J.M., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Photocycle of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin Characterized by Low-Temperature Trapping in the IR and Time-Resolved Studies. *J. Phys. Chem. B*, 2013, vol. 117, no. 24, pp. 7235-7253. DOI: 10.1021/jp402430w.
17. Belikov N.E., Demina O.V., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Lukin A.Yu., Shumsky A.N., Chizhov I., Levin P.P., Kirpichnikov M.P., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. The influence of the chromophoric group modification on the optical properties of retinal proteins. *Mendeleev Communications*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 406-408. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.07.022.
18. Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E., Nekrasova O.V., Yakovleva M.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Cherepanov D.A., Kolchugina I.B., Dolgikh D.A., Nadochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. Comparative Femtosecond Spectroscopy of Primary Photoreactions of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin and *Halobacterium salinarum* Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. B*, 2021, vol. 125, no. 4, pp. 995-1008. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c07763.
19. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Gierpmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnol.*, 2004, vol. 22, pp. 1567-1572. DOI: 10.1038/nbt1037.

20. Разумов В.Ф. *Фотоника коллоидных квантовых точек*. Под ред. Ключева М.Б. Иваново: Ивановский гос. ун-т, 2017, 272 с. [Razumov V.F. *Photonics of colloid quantum dots*. Klyuev M.B. Ed. Ivanovo Ivanovo State University, 2017, 272 p. (In Russ.)]
21. 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. [Oleynikov V.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R. Fluorescent semiconductor nanocrystals in biology and medicine. *Nanotechnologies in Russia*, 2007, vol. 2, no. 1-2, pp. 160-173. (In Russ.)]
22. Николенко Д.Ю., Бричкин С.Б., Разумов В.Ф. Неизотермический высокотемпературный коллоидный синтез наночастиц CdSe. *Российские нанотехнологии*, 2009, т. 4, no. 11-12, с. 92-95. [Nikolenko D.Yu., Brichkin S.B., Razumov V.F. Nonisothermal High-Temperature Colloidal Synthesis of Cd Se Nanocrystals. *Nanotechnologies in Russia*, 2009, vol. 4, no. 5-6, pp. 790-794. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1995078009110044.
23. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, no. 19, pp. 8706-8715. DOI: 10.1021/ja00072a025.
24. Peng Z.A., Peng X.G. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, no. 1, pp. 183-184. DOI: 10.1021/ja003633m.
25. Talapin D.V., Rogach A.L., Kornowski A., Haase M., Weller H. Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture. *NanoLett.*, 2001, vol. 1, no. 4, pp. 207-211. DOI: 10.1021/nl0155126.
26. Gaponik N., Talapin D.V., Rogach A.L., Hoppe K., Shevchenko E.V., Kornowski A., Eychmuller A., Weller H. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. *J. Phys. Chem. B*, 2002, vol. 106, no. 29, pp. 7177-7185. DOI: 10.1021/jp025541k.
27. Mandal A., Tamai N. Luminescence enhancement of water soluble CdTe quantum dots by proper surface modification with ethylene diamine. *Chem. Phys. Lett.*, 2011, vol. 507, pp. 248-252. DOI: 10.1016/j.cplett.2011.03.086.
28. Park J.C., Choi S.Y., Yang M.Y., Nan L., Na H., Lee H.N., Chung H.J., Hong C.A., Nam Y.S. Subnanomolar FRET-Based DNA Assay Using Thermally Stable Phosphorothioated DNA-Functionalized Quantum Dots. *ACS Appl. Mater. Interface*, 2019, vol. 11, no. 37, pp. 33525-33534. DOI: 10.1021/acsami.9b07717.
29. Xua N., Piao M., Arkina K., Rena L., Zhanga J., Hao J., Zhenga Y., Shanga Q. Imaging of water soluble CdTe/CdS core-shell quantum dots in inhibiting multidrug resistance of cancer cells. *Talanta*, 2019, vol. 201, pp. 309-316. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.021.
30. Li L., Qian H., Ren J. Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature. *Chem. Comm.*, 2005, vol. 36, no. 4, pp. 528-530. DOI: 10.1039/b412686f.
31. He Y., Sai L.-M., Lu H.-T., Hu M., Lai W.-Y., Fan Q.-L., Wang L.-H., Huang W. Microwave-Assisted Synthesis of Water-Dispersed CdTe Nanocrystals with High Luminescent Efficiency and Narrow Size Distribution. *Chem. Mater.*, 2007, vol. 19, no. 3, pp. 359-365. DOI: 10.1021/cm061863f.
32. Duan J., Song L., Zhan J. One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *NanoRes.*, 2009, vol. 2, no. 1, pp. 61-68. DOI: 10.1007/s12274-009-9004-0.
33. Bao H., Wang E., Dong S. One-Pot Synthesis of CdTe Nanocrystals and Shape Control of Luminescent CdTe-Cystine Nanocomposites. *Small*, 2006, vol. 2, no. 4, pp. 476-480. DOI: 10.1002/smll.200500346.
34. Kinia S., Kulkarnia S.D., Ganigaa V., Nagarakhit T.K., Chidangila S. Dual functionalized, stable and water dispersible CdTe quantum dots: Facile, one-pot aqueous synthesis, optical tuning and energy transfer applications. *Mater. Res. Bulletin*, 2019, vol. 110, pp. 57-66. DOI: 10.1016/j.materresbull.2018.10.013.
35. Yu W.W., Qu L., Guo W., Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.*, 2003, vol. 15, no. 14, pp. 2854-2860. DOI: 10.1021/cm034081k.

STUDY OF THE TECHNOLOGY OF THE RECOMBINATE TARGET PROTEIN SELECTIVE LABELING AND DEVELOPMENT OF THE SYNTHETIC ROUTES FOR THE MODIFIED CdTe QUANTUM DOTS SYNTHESIS IN AQUEOUS SOLUTIONS

Belikov N.E.¹, Demina O.V.¹, Lukin A.Yu.², Petrovskaya L.E.³, Skladnev D.A.⁴, Varfolomeev S.D.¹, Khodonov A.A.¹

¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS
Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: khodonov@gmail.com

²MIREA – Russian Technological University
Vernadsky ave., 78, Moscow, 119454, Russia

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS
Miklukho-Maclay str., 16/10, Moscow, 117997, Russia

⁴Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», RAS
Leninsky ave., 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia

Abstract. This paper considers the proposed procedure for reversible labeling of target proteins using fluorescent labels and probes. New fluorophores based on quantum dots (QDs CdTe) containing a molecular address (chelate complexes of Ni²⁺ with nitrilotriacetic acid and its derivatives) were proposed, capable of forming strong chelates with a hexahistidine tag localized at a given site of the polypeptide chain of the target protein. In this work, special attention is devoted to the selection of the required composition and structure of the label molecule and the practical implementation of the laboratory technology for the synthesis of a set of initial QDs CdTe quantum dots samples with specified optical parameters.

Key words: *selective labeling of target proteins, fluorescent labels, quantum dots, production methods, nitrilotriacetic acid.*