

1
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

On-line версия журнала на сайте

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Bubo scandiacus (Linnaeus, 1758)

Полярная или белая сова

Жданов С.И.



2020

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР

УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2020

УДК 57.088.1

П.В. Храмцов¹, М.Д. Кропанева², М.Б. Раев²

НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

¹ Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Цель. Разработка наночастиц для флуоресцентного анализа с временным разрешением на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) и п-толуилпировиноградной кислоты (ТПК)

Материалы и методы. Флуоресцентные наночастицы синтезировали методом репреципитации, добавляя спиртовой раствор ТПК к раствору БСА при перемешивании в присутствии катионов европия. Полученные наночастицы функционализировали стрептавидином при помощи глутарового альдегида. Функциональную активность наночастиц тестировали при помощи твердофазного флуоресцентного анализа с временным разрешением ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 620$ нм, время задержки – 100 мс).

Результаты. Средний размер наночастиц составил около 220-230 нм. Функционализированные стрептавидином наночастицы стабильны в нейтральном фосфатном буфере. Применение флуоресцентных наночастиц позволяет осуществлять детекцию биотинилированного БСА в концентрации 1 мкг/мл.

Заключение.

Был разработан подход к синтезу флуоресцентных наночастиц, содержащие в своем составе ТПК, БСА и катионы европия. Синтезированные наночастицы обладают способностью к длительной флуоресценции с узким пиком эмиссии (максимум 620 нм), характерным для хелатов европия. Используемая в работе технология функционализации наночастиц позволяет создавать флуоресцентные конъюгаты с другими распознающими молекулами, в частности моноклональными антителами.

Ключевые слова: флуоресценция, европий, наночастицы.

P.V. Khramtsov¹, M.D. Kropaneva², M.B. Rayev²

NANOPARTICLES FOR FLUORESCENT ASSAY WITH TIME RESOLUTION

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Goal. Development of nanoparticles for time-resolved fluorescence analysis based on bovine serum albumin (BSA) and p-toluy pyruvic acid (TPC)

Materials and methods. Fluorescent nanoparticles were synthesized by nanoprecipitation by adding an alcohol solution of TPC to the BSA solution during mixing in the presence of europium cations. The resulting nanoparticles were functionalized with streptavidin using glutaraldehyde. The functional activity of nano-particles was tested using solid-phase fluorescence analysis with a time resolution ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm, delay time-100 ms).

Results. The average size of the nanoparticles was about 220-230 nm. Streptavidin-synthesized nanoparticles are stable in a neutral phosphate buffer. The use of fluorescent nanoparticles allows the detection of biotinylated BSA at a concentration of 1 microgram / ml.

Conclusion. An approach to the synthesis of fluorescent nanoparticles containing TPC, BSA and europium cations was developed. The synthesized nanoparticles are capable of long-term fluorescence with a narrow emission peak of 620 nm, which is typical for europium che-

lates. The nanoparticle functionalization technology used in this work allows us to create fluorescent conjugates with other recognizing molecules, in particular monoclonal antibodies.

Keywords: fluorescence, europium, nanoparticles.

Введение

Флуоресценция является физическим феноменом, который нашел применение в различных областях биомедицины. Флуоресцентные белки используются для оценки экспрессии генов; антитела, меченные органическими флуорофорами, являются основой технологии проточной цитометрии, а также широко применяются в медицинской визуализации как *in vitro*, так и *in vivo*. Весьма перспективно использование флуоресцентных меток и в клинической лабораторной диагностике при постановке анализов на онкомаркеры, аллергены, аутоантитела и др. [1].

Способностью к флуоресценции обладают многие молекулы, характерные для живых организмов, а именно ароматические аминокислоты, нуклеотиды, пигменты [2]. Аутофлуоресценция клеток и тканей живых организмов является одним из источников ошибок при проведении исследований с использованием флуоресцентных меток. Для преодоления этого препятствия используют различные подходы, например, синтезируют молекулы, испускающие излучение в ближнем ИК-диапазоне, где аутофлуоресценция тканей минимальна [3]. Существуют флуорофоры, способные к так называемой апконверсии, когда длина волны эмиссии меньше, чем длина волны возбуждения, что нехарактерно для флуоресцирующих молекул живых организмов и традиционных органических флуорофоров [4]. Кроме того, некоторые вещества обладают свойством к очень длительной флуоресценции, которая длится сотни микросекунд, в то время как продолжительность аутофлуоресценции не превышает нескольких микросекунд [5].

Способностью к длительной флуоресценции обладают редкоземельные металлы (лантаниды): европий, тербий, самарий, диспрозий и др. Коэффициент молярной экстинкции катионов этих металлов чрезвычайно мал, вследствие чего сами по себе они не способны к яркой флуоресценции. Для того, чтобы эффективно использовать их в качестве флуорофоров необходимы так называемые молекулы-антенны, которые эффективно поглощают излучение определенной длины волны и передают его катионам лантанидов [6]. Зача-

стую, в качестве молекул-антенн выступают вещества, которые способны, с одной стороны, выступать в качестве антенн, а с другой – прочно связывать (хелатировать) катионы лантанидов. В клинической лабораторной диагностике большую перспективу имеет применение наночастиц, содержащих в своем составе многочисленные комплексы «антенна-катион лантанида (La^{3+})». Эти наночастицы могут быть использованы для разработки систем лабораторной диагностики и медицинской визуализации. Как правило, синтез таких наночастиц требует химической модификации молекул-антенн, благодаря чему они могут прикрепляться к поверхности наночастиц или взаимодействовать с молекулами, образующими их матрикс (например, оксидами кремния) [7-9].

В настоящей работе приставлен простой метод синтеза наночастиц, содержащих флуоресцирующие комплексы молекул-антенн и катионов европия. Основой метода является так называемая реприципитация: образование наночастиц при добавлении вещества в плохой растворитель (воду) [9, 10]. Стабилизатором наночастиц в водном растворе служит бычий сывороточный альбумин. В качестве молекулы-антенны и хелатора впервые была использована п-толуилпировиноградная кислота.

Материалы и методы

Реактивы: бычий сывороточный альбумин (БСА) «VWR» (США), стрептавидин «Prospec Bio» (Израиль), глутаральдегид (50%), хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, гидроксид натрия, глицерин, твин-20, азид натрия «ITW Reagents» (США), казеин, хлорид европия шестиводный, N-гидроксисукцинимидный эфир аминокaproилбиотина «Sigma Aldrich» (США), п-толуилпировиноградная кислота (ТПК), синтезированная на кафедре органической химии Пермского государственного национального исследовательского университета в любезно предоставленная сотрудником кафедры Екатериной Степановой (рис. 1).

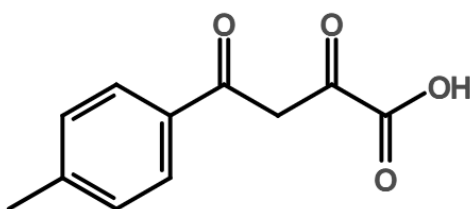


Рис. 1. Структура п-толуидилпировиноградной кислоты.

Приборы: планшетный флуориметр Synergy H1 «BioTek Instruments» (США), спектрофотометр Shimadzu UV-VIS UVmini 1240 (Япония), ультразвуковой дезинтегратор VCX 130 «Sonics & Materials» (США), анализатор частиц Malvern ZetaSizer NanoZS (Великобритания), промыватель планшетов Stat Fax 2600 «Awareness Technology» (США).

Буферные растворы: 0,15М раствор NaCl, забуференный 0,015М Na-фосфатами, содержащий 0,1% NaN₃ pH 7,25 (ФБ), ФБ +0,1%Tween 20 (ФБТ), ФБТ+2% казеин+1% БСА (ФБТК). Все растворы, использованные в работе приготовлены на деионизированной воде.

Синтез наночастиц БСА/ТПК/Eu³⁺

Количественные соотношения ТПК и Eu³⁺ были взяты из статьи [11]. К 90 мл воды последовательно добавляли 10 мл водного раствора EuCl₃ (3,6 мг), 1 мл водного раствора БСА (75 мг) и 10 мл раствора ТПК (6 мг) в 96%-ном этаноле. Растворы добавляли быстро, при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке (1000 об/мин), размер магнитного якоря совпадал по длине с диаметром стакана, в котором производили смешивание. После 16 часов перемешивания при комнатной температуре смесь центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 4 мл воды, после чего смесь обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин (60% усиления, диаметр зонда – 3 мм). Синтезированные наночастицы хранили при +4 °С.

Конъюгирование наночастиц БСА/ТПК/Eu³⁺ со стрептавидином (Стр)

К 2 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида (pH 7,3) в ФБ добавляли 2 мл суспензии наночастиц БСА/ТПК/Eu³⁺ при интенсивном перемешивании. Смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин при перемешивании на роторном смесителе (5 об/мин). При помощи центрифугирования при 20000 g в течение 30 мин (3 цикла) наночастицы осаждали и отмывали ФБ от избытка альдегида. Наночастицы ресуспендировали в 2 мл ФБ, после чего к 1 мл суспензии наночастиц добавляли 50 мкл Стр (10 мг/мл) в ФБ. Смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин при перемешивании на роторном смесителе (5 об/мин), затем добавляли 10 мкл 0,6 М раствора глицина в воде и инкубировали смесь еще полчаса. Наночастицы отмывали от избытка Стр так же, как и от глутаральдегида. БСА/ТПК/Eu³⁺/Стр ресуспендировали в 0,5 мл ФБ при помощи ультразвука. В качестве стабилизатора

добавляли БСА до 1%.

Прямая детекция биотинилированного БСА при помощи планшетного флуоресцентного анализа

В ячейки 96-луночных планшетов из черного полистирола добавляли по 100 мкл биотинилированного БСА (биБСА) в концентрациях от 100 мкг/мл до 1 нг/мл. Для разведения биБСА использовали 0,05 М карбонатный буфер, pH 9,6. В часть лунок добавляли БСА в концентрации 100 мкг/мл в том же буфере. Планшеты инкубировали 2 часа в термостате при +37°C. Лунки планшетов промывали трехкратно 300 мкл ФБТ, затем в них добавляли 200 мкл ФБТК и инкубировали в термостатируемом шейкере при +37°C (100 об/мин), после чего планшеты промывали ФБТ, а в лунки добавляли БСА/ТПК/ Eu^{3+} /Стр, разведенный в ФБТК 1:5, 1:10 и 1:100. После часа инкубации в шейкере при 37°C (100 об/мин) планшеты промывали ФБТ, в лунки добавляли по 100 мкл воды. Интенсивность флуоресценции регистрировали, используя следующие настройки прибора: $\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 620$ нм, время задержки считывания – 100 мс, усиление – 200 у.е.

Определение размеров наночастиц

В пластиковых кюветах разводили наночастицы в ФБ 1:350, измерения проводили на анализаторе частиц Malvern ZetaSizer NanoZS (Великобритания) в трех повторностях. Результаты выражали как значение наибольшего пика интенсивности светорассеяния.

Результаты и обсуждение

Репреципитация является простым способом синтеза наночастиц. Ранее L.Y. Mironov et al. [11] синтезировали наночастицы, состоящие из комплексов катионов европия с бета-дикетонами. В качестве стабилизатора наночастиц они использовали детергент тритон X-100. Мы синтезировали флуоресцентные наночастицы по схожей методике, однако стабилизатором служил БСА. Это связано с тем, что данный белок имеет гидрофобные участки, при помощи которых он может адсорбироваться на поверхности гидрофобных агрегатов, а также несет несколько десятков доступных для конъюгирования аминокислот. Эти аминокислоты и были использованы нами для пришивки стрептавидина, который играл роль модельной распознающей молекулы.

Синтезированные наночастицы имели размеры порядка 220-230 нм, индекс полидисперсности составил 0,26 (рис. 2). Стоит отметить, что в отсутствие БСА происходило формирование крупных, видимых глазу агрега-

тов, которые невозможно было разбить при помощи ультразвуковой обработки.

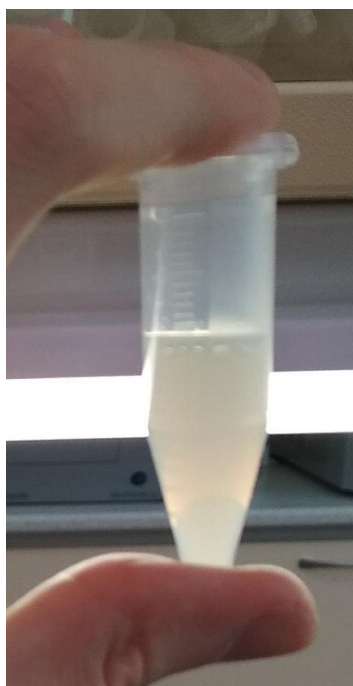


Рис. 2. Суспензия наночастиц БСА/ТПК/ Eu^{3+} .

Наночастицы БСА/ТПК/ Eu^{3+} сохраняли свои свойства при хранении в течение месяца. Ширина спектра флуоресценции составляла от 610 до 630 нм, пик эмиссии составил 620 нм (при длине волны возбуждения 350 нм), что характерно для катионов европия (рис. 3).

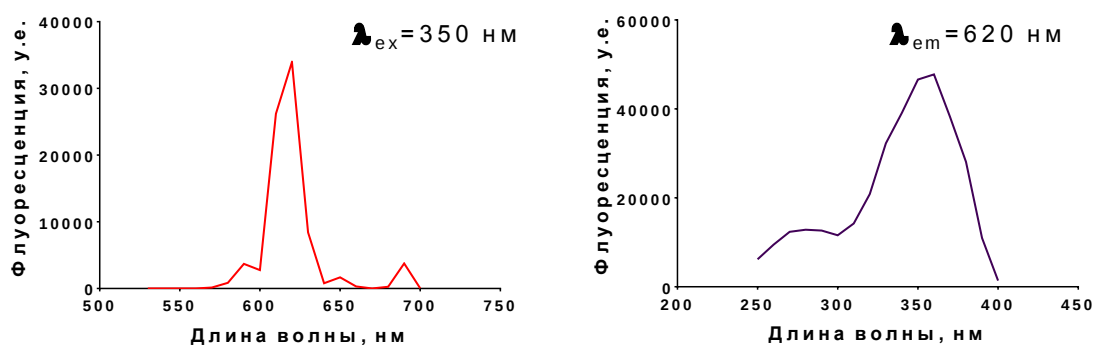


Рис. 3. Спектры эмиссии (слева) и возбуждения (справа) наночастиц БСА/ТПК/ Eu^{3+} .

Наночастицы БСА/ТПК/ Eu^{3+} были функционализированы стрептавидином с использованием глutarальдегида в качестве сшивающего агента. Синтезированные таким образом БСА/ТПК/ Eu^{3+} /Стр были использованы в качестве диагностического реагента в твердофазном флуоресцентном анализе. На по-

верхность лунок иммунологических планшетов сорбировали биБСА, далее осуществляли его прямую детекцию. Была выявлена прямая зависимость между концентрацией биБСА и интенсивностью флуоресценции (рис. 4).

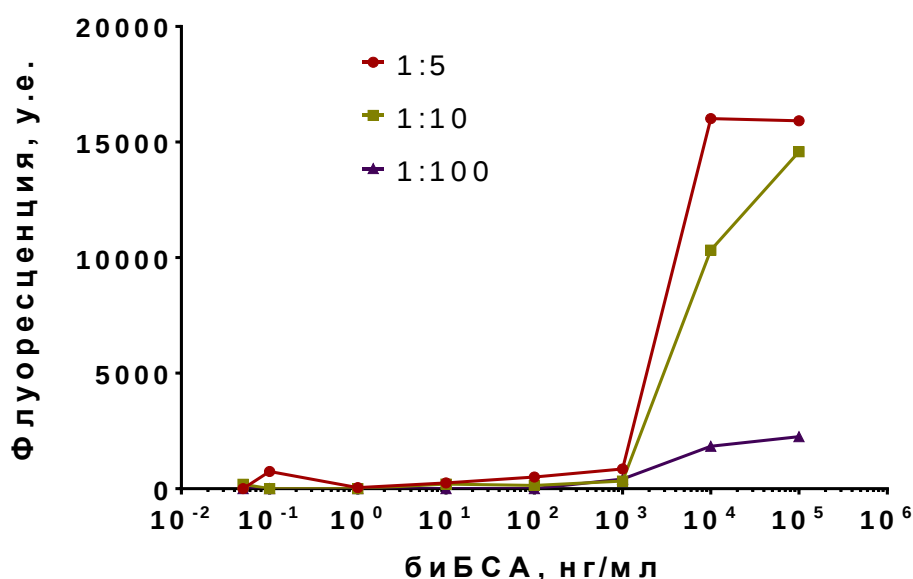


Рис. 4. Зависимость флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 620$ нм, время задержки – 100 мс) от концентрации биБСА в твердофазном флуоресцентном анализе с использованием БСА/ТПК/ Eu^{3+} /Стр в трех различных разведениях.

Заключение

Нами разработан метод синтеза флуоресцентных наночастиц, содержащих в своем составе ТПК, БСА и катионы европия. Синтезированные наночастицы обладают способностью к длительной флуоресценции с узким пиком эмиссии (максимум 620 нм), характерным для хелатов европия. Используемая в работе технология функционализации наночастиц позволяет создавать флуоресцентные конъюгаты с другими распознающими молекулами, в частности моноклональными антителами.

(Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Калининградской области в рамках научного проекта № 19-415-393005)

ЛИТЕРАТУРА

1. Fang X., Zheng Y., Duan Y., Liu Y., Zhong W. Recent Advances in Design of Fluorescence-based Assays for High-throughput Screening. *Analytical Chemistry*. 2019. 91(1): 482-504.
2. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*. 2005. 11: 227-256.
3. Zhao J., Zhong D., Zhou S. NIR-I-to-NIR-II fluorescent nanomaterials for biomedical imaging and cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018. 6(3): 349-365.

4. Chatterjee D., Rufaihah A., Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*. 2008. 29(7): 937-943.
5. Cardoso Dos Santos M., Goetz J., Bartenlian H., Wong K.-L., Charbonnière L.J., Hildebrandt N. Autofluorescence-Free Live-Cell Imaging Using Terbium Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*. 2018. 29(4): 1327-1334.
6. Hagan A.K., Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. 400(9): 2847-2864.
7. Zhang K.Y., Yu Q., Wei H., Liu S., Zhao Q., Huang W. Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chemical Reviews*. 2018. 118(4): 1770-1839.
8. Dou X.-R., Wu Z.-Z., Hu Z.-Y., Zhu X.-T., Xu R., Xie L., Xie H.-P. Preparation of immuno-probes based on europium-chelate-adsorbed silica nanoparticles and magnetic nanoparticles and their application in detection of hepatitis B surface antigen. *Analytical Methods*. 2012. 4(11): 3810-3815.
9. Härmä, H., Keränen, A.-M., Lövgren, T. Synthesis and characterization of europium(III) nanoparticles for time-resolved fluoroimmunoassay of prostate-specific antigen. *Nanotechnology*. 2007. 18(7): 075604.
10. Baba K., Pudavar H. E., Roy I., Ohulchanskyy T. Y., Chen Y., Pandey R. K., Prasad P. N. New method for delivering a hydrophobic drug for photodynamic therapy using pure nanocrystal form of the drug. *Molecular pharmaceuticals*. 2007. 4(2): 289-297.
11. Mironov L.Y., Parfenov P.S., Shurukhina A.V., Lebedev Y.I., Metlenko A.A. Delayed Fluorescence of Dyes Sensitized by Eu³⁺ Chelate Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017. 121(36): 19958-19965.

Получена 26 марта 2020 г.

(Контактная информация:

Храмцов Павел Викторович – к.б.н., н.с. базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий, Балтийский федеральный университет имени И.Канта; адрес: г. Калининград, ул. А. Невского, д. 14; тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: khramtsov Pavel@yandex.ru;

Кропанева Мария Дмитриевна – аспирант лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: kropanevamasha@gmail.com;

Раев Михаил Борисович – д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: mraev@iegm.ru)

Образец ссылки на статью:

Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б. Наночастицы для флуоресцентного анализа с временным разрешением. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2020. 1. 8с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2020-1/Articles/PVH-2020-1.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2020-11002