

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК CdSe/ZnS С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ

В. А. Решетов, В. П. Зорин

Белорусский государственный университет, физический факультет, кафедра биофизики, ул. Бобруйская 5, 220050 Минск, Беларусь, vadim.reshetov@gmail.com

Исследования люминесцентных полупроводниковых нанокристаллов, или квантовых точек (КТ), получили широкое распространение за последние два десятилетия. Стремительный рост активности в разработке новых наноматериалов обусловлен потенциально широкими областями применения наноструктур. Благодаря отличительным оптическим свойствам нанокристаллов, таким как узкий симметричный спектр испускания, высокий квантовый выход, большие времена жизни флуоресценции, высокая фотостабильность, зависимость оптических спектров от размера структур [1], перспективно использование КТ в биологических приложениях в качестве биосенсоров, меток для визуализации клеточных и тканевых структур [2-4], средств направленной доставки лекарственных соединений [3]. Для успешного применения КТ в биоприложениях необходимо детальное изучение взаимодействия КТ с биологическими структурами, в том числе белками крови.

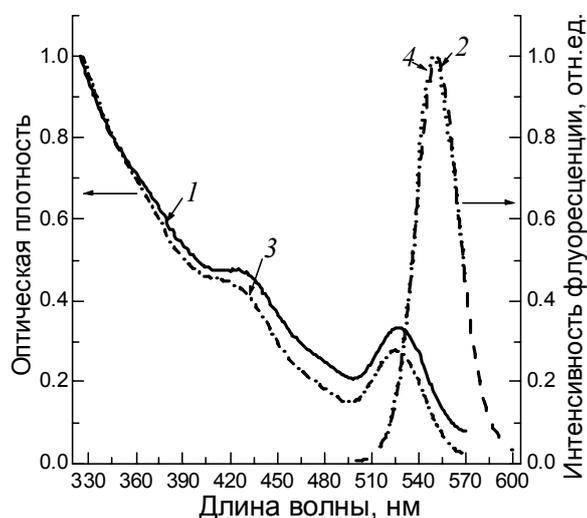
Целью данной работы являлось исследование поведения водорастворимых КТ в водных средах и изучение процессов взаимодействия КТ с белками сыворотки крови. Эти вопросы имеют значение для понимания механизмов транспорта и распределения КТ в биосистемах, для разработки методов визуализации различных тканевых структур и функциональных процессов в организме.

В работе использовались КТ CdSe/ZnS типа ядро/оболочка, поверхность которых была модифицирована для придания гидрофильных свойств полиэтиленгликолем, глутатионом или меркаптопропионовой кислотой и тиоглицерином. Исследовались КТ с диаметром ядра CdSe ~2.6 нм (КТП, КТГ, КТМТ) и ~6.2 нм (КТГ6, КТМТ6).

Нормированные спектры поглощения и флуоресценции КТ с диаметром ядра 2.6 нм, модифицированных глутатионом (КТГ), показаны на рис. 1. Данные КТ характеризуются широким спектром поглощения (рис. 1, 1) с максимумами на длине волны 437 нм и 527 нм и наличием интенсивной флуоресценции. КТГ обладают узким (полуширина 28 нм) симметричным спектром флуоресценции с максимумом на длине волны 551 нм (рис. 1, 2).

Аналогичные исследования спектральных характеристик были проведены и для КТ с модификацией поверхности другими системами (КТП, КТМТ), а также с диаметром ядра 6.2 нм (КТГ6, КТМТ6). Согласно полученным результатам, спектры КТ с различной мо-

дификацией поверхности очень близки между собой. Спектральные характеристики КТ с диаметром ядра 6.2 нм значительно отличаются от таковых для КТ с ядром 2.6 нм. Первый экситонный максимум в спектре поглощения смещен до 630 нм, максимум флуоресценции приходится на длину волны 661 нм.



1 – спектр поглощения в буфере Трис-НСl, 2 – спектр флуоресценции в буфере Трис-НСl, 3 – спектр поглощения в растворе БСА, 4 – спектр флуоресценции в растворе БСА

Рис. 1. Спектры флуоресценции и поглощения КТГ

сительного квантового выхода флуоресценции в процессе инкубирования в водных растворах сильно уменьшается (в 2-4 раза за 1 час инкубирования).

Значительный интерес представляет исследование стабильности флуоресцентных свойств КТ в растворах с различным содержанием белка. На рис. 2 приведена кинетика изменения интенсивности флуоресценции КТГ при инкубировании в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА).

В отсутствие белка интенсивность флуоресценции КТГ значительно падает через 2 часа инкубирования в буферном растворе. Длительное время нахождения КТ в буферном растворе приводит к тому, что нанокристаллы агрегируют и выпадают в осадок. Добавление БСА приводит к существенному увеличению устойчивости флуоресцентных свойств КТ. Это выражается не только в снижении амплитуды, но и в замедлении скорости изменения интенсивности флуоресценции КТ. При больших концентрациях белка нанокристаллы сохраняют интенсивную флуоресценцию при временах инкубирования более 30 суток.

Введение белка в водные растворы КТ практически не влияет на спектры поглощения (рис. 1, 3) и флуоресценции (рис. 1, 4) по сравнению с аналогичными характеристиками КТ в буферном растворе. Для спектров флуоресценции характерен гипсохромный сдвиг на 1 нм, что, по-видимому, связано с изменением характеристик микроокружения КТ вследствие связывания с белком.

Для использования КТ в практических целях в биологических системах важным аспектом является стабильность их флуоресцентных свойств. Результаты наших исследований флуоресценции водорастворимых КТ показывают, что величина их относительного квантового выхода флуоресценции в процессе инкубирования в водных растворах сильно уменьшается (в 2-4 раза за 1 час инкубирования).

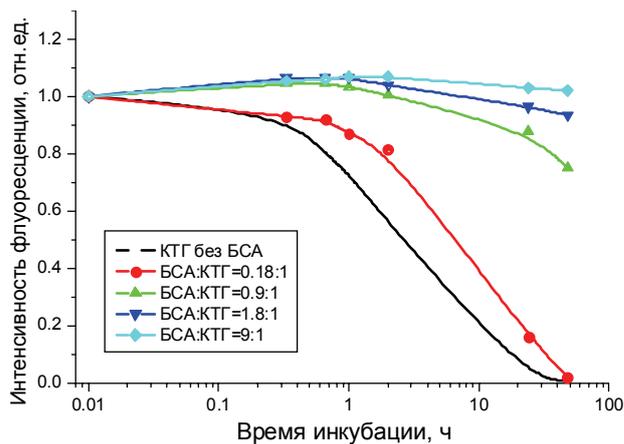


Рис. 2. Устойчивость флуоресцентных свойств КТГ в растворах БСА

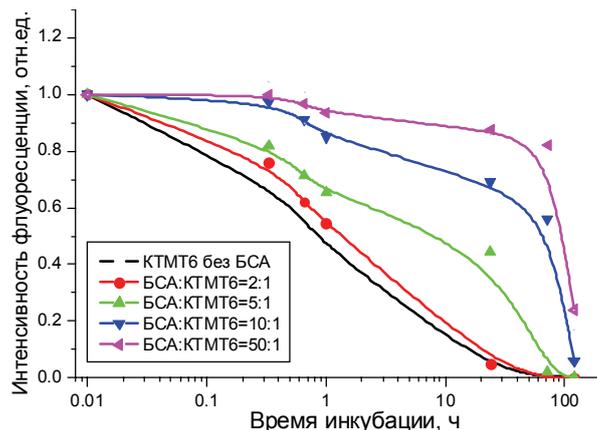


Рис. 3. Устойчивость флуоресцентных свойств КТМТ6 в растворах БСА

Аналогичные результаты были получены и для КТМТ6 (рис. 3). При низких соотношениях БСА:КТМТ6 стабилизирующий эффект белка выражен значительно меньше, чем для КТМТ. Так, при соотношениях БСА:КТМТ6 менее 2:1 не наблюдается изменения устойчивости по сравнению с КТМТ6 в водных растворах без белка.

Из общих соображений можно предположить, что при взаимодействии молекулы БСА обволакивают КТ, приводя к образованию дополнительного слоя, защищающего нанокристаллы от взаимодействия с компонентами и примесями буферных растворов. Это значительно снижает скорость падения интенсивности флуоресценции, а также препятствует агрегации КТ в течение длительного времени. Для КТ с диаметром ядра 2.6 нм устойчивость флуоресцентных свойств значительно возрастает по сравнению с КТ в водных растворах уже при соотношениях БСА:КТ больше 1:1. В случае КТ с диаметром ядра 6.2 нм подобный эффект наблюдается при соотношениях БСА:КТ, больших 10:1. Эти различия, очевидно, обусловлены отличиями площадей поверхности нанокристаллов – для покрытия КТ большего диаметра белковой оболочкой требуется значительно большее число молекул белка.

При исследовании процессов связывания КТ с белками сыворотки нанокристаллы помещали в раствор сыворотки и инкубировали в течение 1 часа, затем полученный образец пропускали через хроматографическую колонку 1.2x45 см, заполненную гелем Sephacryl 400-NR. Пропускание водорастворимых КТ через колонку показывает, что в свободном виде нанокристаллы не выходят из колонки, что, по всей видимости, связано с образованием устойчивых связей КТ с полимерным гелем. Существенно иное поведение демонстрируют нанокристаллы, проинкубированные с белками сыворотки крови: КТ вы-

ходят из колонки в виде одного широкого пика. Измерения содержания КТ в полученных хроматографических фракциях по поглощению и флуоресценции КТ позволяет сделать вывод, что большая часть КТ (более 70%) выходит из колонки. Наши данные свидетельствуют, что КТ взаимодействуют в основном с сывороточным альбумином. Поэтому основное внимание было сосредоточено на взаимодействии КТ с сывороточным альбумином.

При исследовании процессов связывания КТ с БСА нанокристаллы предварительно инкубировали с белком при различных соотношениях БСА:КТ, а затем пропускали через колонку. Чистый БСА без КТ выходит из колонки в виде полосы с объемом исключения 15-17 мл. Количество вышедших из колонки КТ зависит от концентрации БСА в образце. Анализ профилей элюции КТ и БСА показывает, что нанокристаллы выходят из колонки с объемом элюции 10-13 мл, причем БСА распределен между двумя фракциями: 10-13 мл и 15-18 мл, что, очевидно, соответствует фракциям белка, связавшегося с КТ, и мономерному белку, не связанному с КТ (рис. 4). При уменьшении соотношения БСА:КТ наблюдается увеличение веса фракции альбумина, выходящего с КТ, одновременно с уменьшением относительного количества белка, проходящего через колонку независимо от КТ.

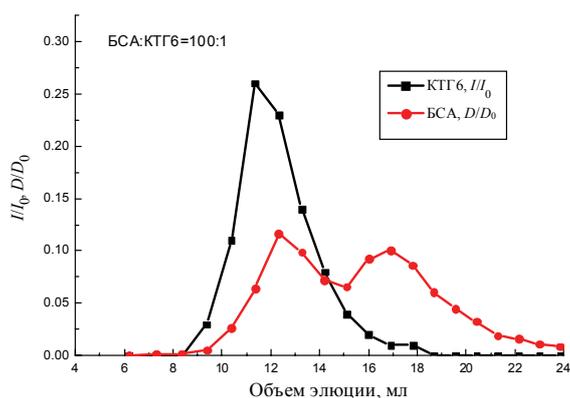


Рис. 4. Профили элюции КТГ6 и БСА

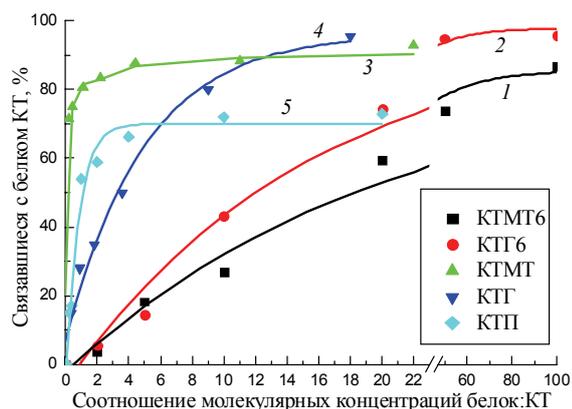


Рис. 5. Стехиометрия связывания КТ с БСА: 1 – КТМТ6, 2 – КТГ6, 3 – КТМТ, 4 – КТГ, 5 – КТП

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что КТ образуют комплексы с БСА, проходящие через колонку. Экранировка поверхности нанокристаллов сорбированными молекулами белка предотвращает связывание с полимерным гелем и обеспечивает возможность элюции КТ через колонку. Комплексообразование сопряжено с появлением более крупных структур по сравнению с нативными белками, о чем свидетельствует смещение полос БСА в гель-хроматограммах в сторону меньших объемов исключения. Размер комплексов зависит от соотношения БСА:КТ в исследуемом образце, так как при изменении соотношения наблюдается небольшое смещение пика выхода на-

нокристаллов и белка из колонки.

Процесс комплексообразования белка и КТ характеризуется насыщением при высоких концентрациях белка. На основании анализа зависимости выхода КТ из колонки от концентрации белка можно охарактеризовать стехиометрию комплексообразования КТ и БСА. Так, для КТ с размером ядра 2.6 нм (рис. 5, 3-5) насыщение комплексообразования происходит при соотношении молекул белка и КТ около 5:1. Для КТ с диаметром ядра 6.2 нм (рис. 5, 1-2) насыщение связывания наблюдается при значительно больших концентрациях белка (24:1 для КТГ6 и 40:1 в случае КТМТ6), что, очевидно, является следствием большей площади поверхности данных наноструктур. При достижении насыщения значительно возрастает фракция белка, несвязанного с КТ и выходящего в мономерной форме. Образованные БСА и КТ комплексы достаточно устойчивы и характеризуются временем диссоциации БСА с поверхности КТ большим, чем время проведения разделения.

Наблюдаются отличия в связывании белка и КТ с различной модификацией поверхности. Отличия могут быть связаны с изменением сродства КТ к белку и заполнением поверхности нанокристаллов. Для КТМТ характерно быстрое насыщение даже при невысоких концентрациях белка (соотношение БСА:КТ ~1:1). Более объемная оболочка из полимерных молекул у КТП, вероятно, обуславливает необходимость присутствия в образце большего количества молекул белка для достижения насыщения (рис. 5).

Полученные результаты показывают, что КТ могут связывать большое число молекул белка, причем стехиометрия комплексообразования зависит от размеров нанокристалла и от свойств поверхности КТ. Образование на поверхности КТ белковой оболочки существенно изменяет их поведение в водных растворах и в составе биологических систем, что должно учитываться при характеристике процессов распределения КТ в биосистемах.

Литература

1. Sahoo S.K., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Clinical Nanomedicine* 20-31 (2007).
2. Baker J. R. et al. *Pharm. Res.* **19**, 1310–1316 (2002).
3. Wickline S. A. et al. *Magn. Reson. Med.* **51**, 480–486 (2004).
4. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Matoussi H. *Nat. Mater.* **4**, 435–446 (2005).