

на правах рукописи



Соболев Александр Михайлович

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ
НА ОСНОВЕ СИЛАНИЗИРОВАННЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК:
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Горячева Ирина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Алексенко Светлана Сергеевна,
доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО
«Саратовский государственный аграрный
университет имени Н. И. Вавилова», доцент
кафедры микробиологии, биотехнологии и
химии

Комова Надежда Сергеевна,
кандидат химических наук, ФГУ
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (г. Москва),
научный сотрудник лаборатории
иммунобиохимии

Ведущая организация:

**ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова»**

Защита состоится 23 апреля 2020 года в 14 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.243.07, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 1, Институт химии СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В. А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национально исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского» и на сайте:

<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-07/kandidatskaya-dissertaciya-soboleva-aleksandra>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета Д 212.243.07,

доктор химических наук, доцент

Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

В современной аналитической химии большое внимание уделяется разработке, модификации и применению наноразмерных меток в качестве простого и эффективного инструмента улучшения аналитических характеристик. Использование полупроводниковых квантовых точек (КТ)¹, в качестве люминесцентных меток для биологической визуализации и детектирования является актуальным трендом благодаря уникальным оптическим свойствам данных материалов. В последнее время были разработаны методики высокотемпературного синтеза КТ в неполярных координирующих высококипящих растворителях, характеризующиеся высокими значениями квантового выхода (КВ) люминесценции получаемых КТ, узким распределением по размеру и высокой коллоидной стабильностью. Данные свойства КТ побудили к широкому использованию люминесцентной метки в иммунохимическом анализе.

Иммунохроматографический анализ (ИХА) традиционно занимает почетное место среди иммунохимических методов анализа, которые обеспечивают высокую селективность и быстроту получения результатов. На сегодняшний день ИХА широко используется в медицине и ветеринарии, контроле качества продуктов питания и напитков, фармацевтике и в контроле загрязнения окружающей среды. Применение люминесцентных наночастиц в ИХА обеспечивает снижение предела обнаружения (ПрО) на один-два порядка по сравнению с традиционно используемыми колориметрическими метками, такими как золотые наночастицы (ЗНЧ) и монодисперсный латекс. Однако использование КТ в качестве источника аналитического

¹ АЗ – аналитическая зона, АОТ – бис (2-этилгексил) сульфосукцинат, АТ – антитело, ДОН – дезоксиниваленон, ДРС – динамическое рассеяние света, ЖХ-МС/МС – жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, ЗЕН – зеараленон, ЗНЧ – золотые наночастицы, ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ, ИХА – иммунохроматографический анализ, КВ – квантовый выход, КЗ – контрольная зона, кКТ – коммерческие квантовые точки, КТ – квантовые точки, КТ@SiO₂ – квантовые точки, покрытые оболочкой из оксида кремния, МикроРНК – малые некодирующие молекулы РНК, МС – условный монослой, ПАВ – поверхностно-активные вещества, ПрО – предел обнаружения, СРБ – С-реактивный белок, сульфо-ГСС – N-гидроксисульфосукцинимид натрия соль, ФСБТ – фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0.05% Тритона X-100, ЭДК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид

сигнала предписывает модификацию поверхности гидрофильными лигандами, что зачастую сопровождается снижением интенсивности люминесценции и агрегацией. Оптимизация процессов получения и гидрофилизации КТ для улучшения свойств метки как источника сигнала и разработка быстрых чувствительных методов анализа с использованием данных меток позволят разработать новые чувствительные методы внелабораторного анализа.

Цель диссертационной работы заключается в получении люминесцентных меток на основе КТ различных типов, изучении их свойств и применении для разработки иммунохроматографических систем определения макро- и низкомолекулярных аналитов.

Достижение поставленной цели предусматривает решение следующих **задач**:

1. Изучить влияние оболочек широкозонных проводников (CdS и ZnS) и условий силанизации на люминесцентные свойства КТ на основе CdSe.
2. Разработать иммунохроматографическую тест-систему на основе силанизированных КТ CdSe для определения С-реактивного белка (**СРБ**).
3. Синтезировать и изучить новый тип бескадмиевых люминесцентных меток на основе силанизированных КТ с ядром из InP.
4. Разработать иммунохроматографическую тест-систему на основе силанизированных КТ InP для одновременного определения зеараленона (**ЗЕН**) и дезоксиниваленола (**ДОН**).

Научная новизна работы.

- Изучено влияние оболочек широкозонных полупроводников на сохранение КВ люминесценции КТ на основе CdSe при их покрытии гидрофильной оболочкой оксида кремния.
- Определен состав полупроводниковых оболочек КТ CdSe, позволяющий минимизировать потери КВ люминесценции при покрытии оболочкой из оксида кремния.
- Установлено влияние поверхностно-активного вещества и количества прекурсора оксида кремния на оптические и другие физические свойства силанизированных КТ.

Практическая значимость работы.

Силанизированные КТ CdSe/2CdS/2CdZnS/2ZnS впервые применены в иммунохроматографическом анализе плазмы крови.

Разработан иммунохроматографический тест-метод с использованием силанизированных КТ InP/ZnS для одновременного определения двух микотоксинов.

Показана возможность применения силанизированных КТ в иммунохроматографических тест-системах для определения низкомолекулярных и высокомолекулярных аналитов.

Продемонстрирована возможность количественного определения СРБ в плазме крови человека с использованием силанизированных КТ CdSe/2CdS/2CdZnS/2ZnS иммунохроматографическим методом.

Представлена возможность одновременного определения двух аналитов в смеси иммунохроматографическим методом с использованием силанизированных КТ InP/ZnS разного цвета излучения.

На защиту автора выносит:

1. Оптимизированные методики синтеза и силанизации КТ CdSe ядро/оболочка для получения стабильных в водных средах силанизированных КТ с минимальной потерей КВ люминесценции.
2. Иммунохроматографический тест-метод определения СРБ в плазме крови человека с использованием силанизированных КТ CdSe.
3. Получение силанизированных КТ InP типа ядро/оболочка и их использование в иммунохроматографической тест-системе для одновременного определения двух микотоксинов: ЗЕН и ДОН.

Личный вклад соискателя заключался в постановке задачи, а также выполнении основных теоретических и экспериментальных исследований: выбор и оптимизация методов синтеза, модификации, конъюгации КТ, разработка и апробация двух иммунохимических тест-систем. Проанализированы и обобщены полученные материалы, подготовлены научные статьи. В диссертации обобщены результаты, полученные автором лично и совместно с соавторами публикаций.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 публикаций, включая 7 статей в изданиях (3 публикации в журналах, одна в сборнике и три в материалах конференций), входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus.

Степень достоверности результатов, проведенных исследований подтверждается с помощью современных физико-химических и аналитических методов исследования и соответствия между ними, представлением результатов на конференциях и публикацией основных положений диссертации в профильных изданиях.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на конференциях: 5-й международный симпозиум MYTOX, 2016» (Гент, Бельгия, 2016), Международная конференция «Оптика Лазеров 2016, 2018» (Россия, Санкт-Петербург, 2016, 2018), «Биотехнологии и перспективы развития, 2018» (Россия, Москва, 2018), Saratov Fall Meeting- 2015, 2016, 2018: «International Symposium Optics and Biophotonics» (Россия, Саратов, 2015, 2016, 2018), XXI Менделеевский Съезд (Россия, Санкт-Петербург, 2019).

Структура и объем работы обусловлены поставленной целью и сформулированными задачами исследования, а также требованиями, предъявляемыми к диссертационным работам. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, схемы, диаграммы и графические иллюстрации. Общий объем диссертации составляет 130 страницы, включая 43 рисунка и 16 таблиц.

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках следующих проектов: гранты РФФИ № 17-33-50179, 17-53-49002, 18-29-08033; совместные гранты Германской службы академических обменов (DAAD) и Министерства образования и науки Российской Федерации №18.703.2016/2.2 и 16.12788.2018/12.2; гранты Министерства образования и науки РФ № 4.1063.2017/4.6 и FSRR-2020-0002, грант Российский научный фонд № 14-13-00229, а также при поддержке гранта Правительства Российской Федерации «Дистанционно управляемые наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики» (договор №14.Z50.31.0004 от 4 марта 2014 г.).

Основное содержание работы

Во **Введении** кратко описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы, её научно-практическая значимость, а также определены основные цели и задачи.

В **первой главе** представлен критический анализ литературных данных по ИХА и применяемым в нем меткам. Рассмотрена структура тест-систем, применяемые форматы анализа и варианты используемых меток. Подробно рассмотрены метки на основе полупроводниковых КТ, их структурные особенности и способы модификации поверхности для придания гидрофильных свойств. Рассмотрены методы получения конъюгатов на основе гидрофилизированных КТ с карбоксильными, эпоксидными и аминогруппами на поверхности. Проведен анализ недостатков меток на основе КТ, устранение которых легло в основу данной диссертационной работы.

Во **второй главе** приведены сведения о реагентах, используемых для синтеза КТ, гидрофиллизации, конъюгации и проведении иммуноанализа. Описаны методики синтеза КТ, гидрофиллизации (силанизации) и конъюгации со специфичными антителами, проведения иммуноанализа и расчёта аналитических характеристик тест-методов. Описаны оборудование для проведения измерений и методики расчета КВ, диаметра КТ и аналитических характеристик тест-методов.

Третья, четвертая, пятая и шестая главы (Результаты и обсуждения) посвящены экспериментальным результатам, полученным в рамках диссертационной работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В **третьей главе** рассмотрены формирование оболочки оксида кремния на поверхности КТ на основе ядер CdSe и выбор оптимальной архитектуры КТ. Показано влияние условий проведения силанизации в обратной микроэмульсии на получение стабильных водных коллоидов КТ с минимальной потерей люминесцентных свойств. Для систематического исследования рассматривали серию КТ, синтезированных из одинаковых ядер (CdSe с диаметром 2.8 нм). Поверхность ядра покрывали оболочками CdS и ZnS для повышения квантового выхода люминесценции. Влияние состава на оптические свойства силанизированных КТ состава CdSe/xCdS/yZnS оценивали по изменению толщины оболочки CdS при 2 и 6 условных монослоях (МС), и оболочки ZnS

при 0, 2 и 4.5 МС. Силанизацию проводили методом обратной микроэмульсии. Исследовали воздействие различных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на примере наиболее часто используемых Brij L4, AOT и Igepal. Влияние толщины оболочки оксида кремния на оптические свойства и стабильность осуществляли варьированием количества предшественника оксида кремния - тетраэтоксисилана (ТЭОС) (Рис. 1).

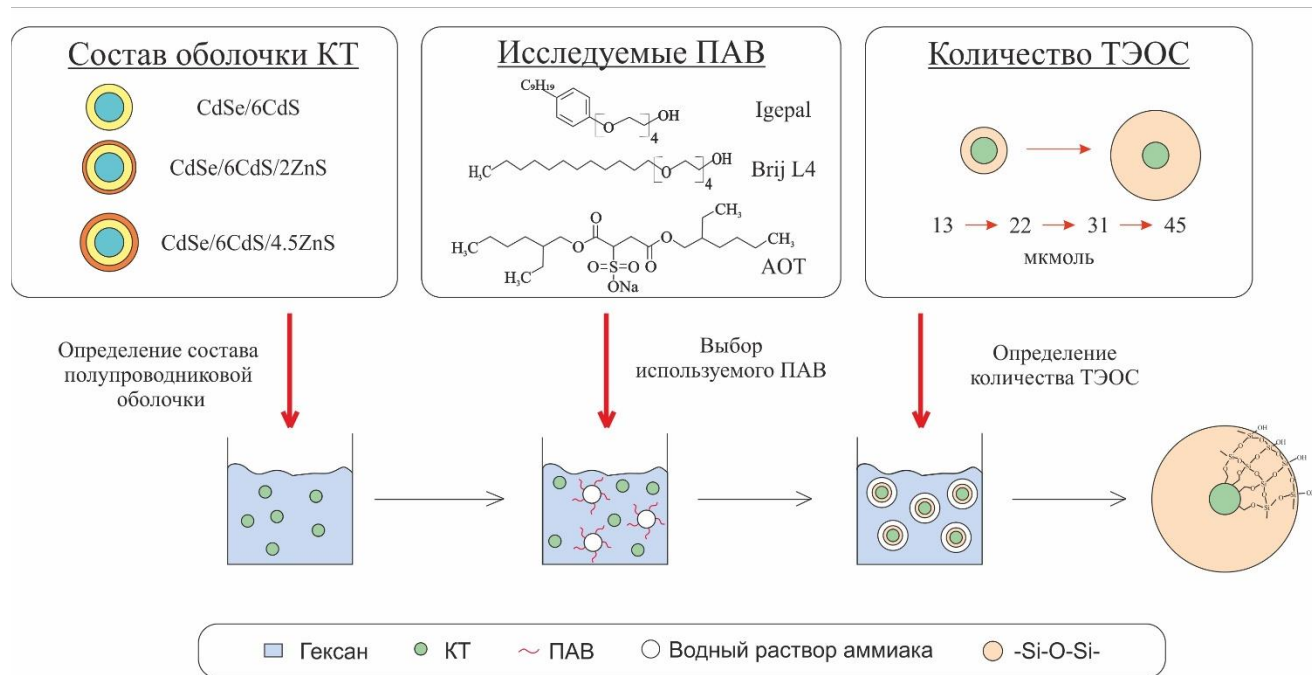


Рисунок 1. Варьируемые параметры при установлении оптимальной архитектуры и условий силанизации КТ

Влияние толщины промежуточной оболочки CdS на фотолюминесцентные свойства силанизированных КТ изучено на примере структуры CdSe/xCdS/4.5ZnS. Для уменьшения влияния оболочки оксида кремния на фотолюминесцентные свойства КТ были нанесены 4.5 МС ZnS в качестве дополнительной пассивирующей оболочки. Исследуемые КТ были покрыты различными оболочками CdS и имели толщину 2 и 6 МС. После нанесения гидрофильной оболочки в образцах КТ, содержащих 2 МС CdS (CdSe/2CdS/4.5ZnS), наблюдали значительное снижение КВ фотолюминесценции, которое характеризовалось 7-кратным уменьшением по сравнению с исходным (с 38% до 5%). При увеличении толщины оболочки CdS до 6 МС (CdSe/6CdS/4.5ZnS) после нанесения оболочки оксида кремния, сохранилось около 70% исходного КВ. Оптические свойства КТ до и после силанизации представлены в таблице 1. Таким образом КТ CdSe с широкой оболочкой CdS (6 МС) после процесса силанизации характеризуется более

высоким КВ (~46%) и в меньшей степени подвержены воздействию оболочки оксида кремния.

Таблица 1. Люминесцентные свойства CdSe/2CdS/4.5ZnS и CdSe/6CdS/4.5ZnS до (исходные КТ) и после силанизации (КТ@SiO₂).

	CdSe/2CdS/4.5ZnS		CdSe/6CdS/4.5ZnS	
	Исходные КТ	КТ @ SiO ₂	Исходные КТ	КТ @ SiO ₂
Длина волны максимума, нм	606	605	602	606
Полуширина пика, нм	46	35	46	36
КВ, %	38	5	64	46
Диаметр*, нм	-	54 ± 23	-	58 ± 4

*Диаметр оценивали методом динамического рассеяния света.

Влияние толщины внешней оболочки ZnS исследовано для структур CdSe/6CdS/yZnS на примере 0, 2 и 4.5 МС. ZnS является широко используемой внешней оболочкой для большинства КТ из-за большой ширины запрещенной зоны и высокой защиты ядра КТ от воздействий внешней среды. В процессе силанизации КТ наблюдается смещение максимума люминесценции и сужение его спектра для всех образцов (Таблица 2). Значения ζ-потенциала КТ@SiO₂ указывают на коллоидную стабильность полученных частиц.

Наименьшее значение исходного КВ (53%) наблюдали у КТ с отсутствием оболочек ZnS. Покрытие оболочкой оксида кремния привело к 3-кратному снижению КВ этих КТ. Нанесение 2 МС ZnS (CdSe/6CdS/2ZnS) привело к улучшению защиты ядра и увеличению значению исходного КВ в исследуемом ряду (73%). После силанизации КТ с 2 МС ZnS продемонстрировали уже только двукратное снижение исходного КВ. Наименьшее снижение КВ после силанизации (в 1.4 раза) достигнуто для КТ с 4.5 МС ZnS со средним исходным КВ (64%). После силанизации такие КТ имели КВ ~46%, что соответствовало наименьшему падению КВ в исследуемом ряду (Таблица 2). Установлено, что архитектура КТ на основе CdSe содержащая 6CdS и 4.5ZnS оболочек является наиболее подходящей для покрытия оболочкой оксида кремния.

Для дальнейшего систематического изучения параметров, влияющих на оптические свойства силанизированных КТ изучен вклад компонентов, использованных в процедуре силанизации. Была рассмотрена взаимосвязь между оптическими свойствами КТ и различными ПАВ, наиболее часто применяемых в силанизации, и количеством добавляемого предшественником силана.

Таблица 2. Люминесцентные свойства CdSe/6CdS, CdSe/6CdS/2ZnS и CdSe/6CdS/4.5ZnS до и после силанизации. ($\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$).

	CdSe/6CdS		CdSe/6CdS/2ZnS		CdSe/6CdS/4.5ZnS	
	Исходные КТ	КТ@SiO ₂	Исходные КТ	КТ@SiO ₂	Исходные КТ	КТ@SiO ₂
Длина волны максимума, нм	615	621	612	609	602	606
Полуширина пика, нм	30	31	43	31	46	36
КВ, %	53	17	73	36	64	46
КВ после 1 недели, %	53	12	—	33	—	43
ζ – потенциал, мВ	—	-31±8	—	-49±8	—	-37±6

Структура ПАВ, используемого в процессе силанизации, оказывает существенное влияние как на оптические свойства, так и стабильность КТ, поскольку отвечает за размер и форму мицелл, в которых происходит рост оболочки оксида кремния. Однако влияние ПАВ на оптические свойства силанизированных КТ мало изучено. Для формирования обратной микроэмульсии были рассмотрены неионогенные (Brij L4 и Igepal) и ионогенный (АОТ) ПАВ. В образцах силанизированных КТ с использованием всех изучаемых ПАВ, наблюдается сужение спектра люминесценции и его незначительное смещение в красную область (Таблица 3).

Таблица 3. Оптические свойства CdSe/6CdS/4.5ZnS после силанизации в присутствии различных поверхностно-активных веществ

	Исходные КТ	КТ@SiO ₂		
		Brij L4	АОТ	Igepal
Длина волны испускания, нм	602	606	610	606
Полуширина пика, нм	46	36	40	34
КВ, %	64	46	47	39
КВ после 1 недели, %	64	43	35	24
Диаметр, нм	-	58 ± 4	76 ± 5	59 ± 5
ζ – потенциал, мВ	-	-31 ± 8	-39 ± 7	-30 ± 6

Значения КВ образцов после силанизации характеризуются близкими значениями, не зависящими от используемого ПАВ. Однако через одну неделю наблюдалось падение КВ на 3, 12 и 15% при использовании Brij L4, АОТ и Igepal, соответственно, предположительно обусловленное равновесными процессами, происходящими в растворе. Образцы КТ CdSe/6CdS/4.5ZnS, полученные с использованием Brij L4,

характеризуются максимальным КВ после 1 недели с момента силанизации. Мы предполагаем, что наименьшее падение КВ обусловлено в первую очередь простотой линейной структурой Brij L4. Ионогенная природа АОТ вносит вклад за счет сульфосукцинат анион в мицеллах, которая может взаимодействовать с катионом аммония, тем самым замедляя процесс конденсации ТЭОС, а также изменять заряд внутри мицелл и нарушать равномерный рост оболочки. Высокое падение КВ при использовании Igepal можно объяснить π - π взаимодействием ароматических колец в структуре ПАВ. Таким образом Brij L4 является подходящим ПАВ для нанесения оболочки оксида кремния.

Влияние количества ТЭОС на процесс силанизации изучали в диапазоне $13 \div 45$ мкмоль ТЭОС на 1 нмоль КТ. Исследование проводили на примере КТ CdSe/6CdS/4.5ZnS, характеризующихся наибольшим значением КВ после силанизации с использованием Brij L4. Наши результаты показывают, что низкое количество ТЭОС (13 мкмоль) приводит к значительному падению КВ (падение примерно в 1.4 раза) по сравнению с 22, 31 и 45 мкмоль, обеспечивающими примерно одинаковый КВ (Таблица 4).

Таблица 4. Влияние количества прекурсора тетраэтоксисилана на оптические свойства CdSe/6CdS/4.5ZnS

	Исходные КТ	КТ@SiO ₂ , количество ТЭОС, мкмоль			
		45	31	22	13
Длина волны испускания, нм	602	606	606	604	606
Полуширина пика, нм	46	36	34	36	35
КВ, %	64	46	43	45	44
КВ после 1 недели, %	64	43	37	44	31
Диаметр, нм	-	58 ± 4	54 ± 4	76 ± 6	61 ± 32
ζ – потенциал, мВ	-	-31 ± 8	-27 ± 5	-22 ± 5	-24 ± 6

Поскольку силанизированные КТ, полученные с использованием 45 мкмоль ТЭОС, характеризовались хорошей стабильностью в сочетании с высоким КВ, данное количество было выбрано как оптимальное. Полученные силанизированные КТ легли в основу разработки ИХА и совместной работы с Национальным институтом исследований

состояния окружающей среды (Бхопал, Индия). По разработанной методике были получены КТ@SiO_2 и разработаны конъюгаты для определения микроРНК.

Четвертая глава посвящена разработке ИХА на основе силанизированных КТ $\text{CdSe}/2\text{CdS}/2\text{CdZnS}/2\text{ZnS}$ (рис. 4), для определения СРБ в плазме крови человека. Разработка тест-систем включала в себя получение СРБ специфичных антител (АТ) конъюгированных с КТ. Для получения конъюгатов КТ-АТ использовали карбодиимид-сукцинимидный метод. Оптимизацию условий получения конъюгатов АТ и КТ проводили путем варьирования соотношений АТ, КТ, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (ЭДК) и N-гидроксисульфосукцинимид натриевой соли (**Сульфо-ГСС**).

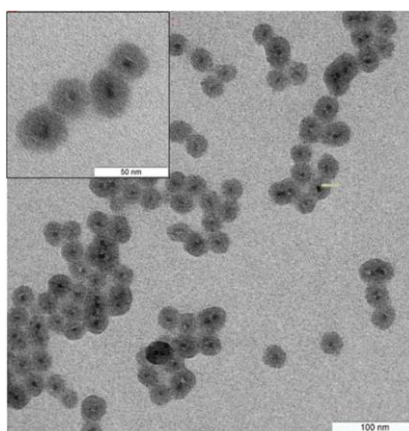
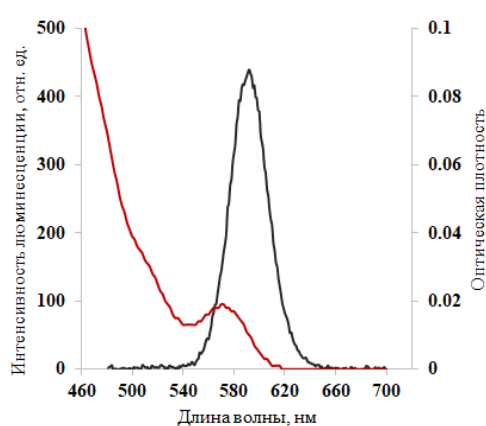


Рисунок 4. Спектры поглощения и испускания ($\lambda_{\text{возб}}=350$ нм) (слева) и ПЭМ изображения силанизированных квантовых точек (справа).

Функциональную характеристику полученных конъюгатов АТ с КТ проводили методом иммуноферментного анализа (**ИФА**) путем сравнения связывания конъюгатов и исходных КТ с антигенами (Рис. 5). Способность полученных конъюгатов КТ–АТ до и после очистки образовывать иммунные комплексы с антигенами подтверждается наличием оптического сигнала ИФА. Неспецифическое взаимодействие свободных КТ с антигеном практически отсутствует, что соответствует слабому уровню сигнала.

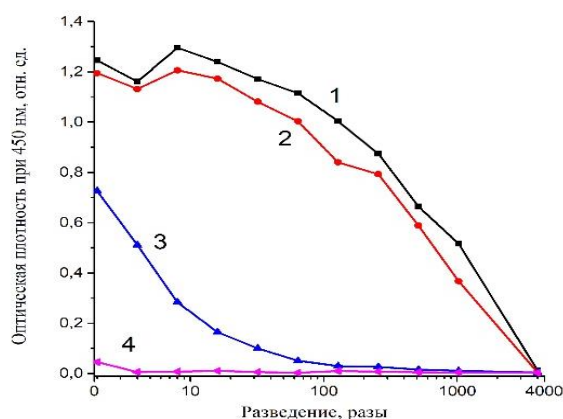


Рисунок 5. Характеристика конъюгатов методом ИФА. Растировка образцов: 1 – конъюгат до центрифугирования; 2 – конъюгат после центрифугирования; 3 – надосадочная жидкость после центрифугирования; 4 – раствор КТ.

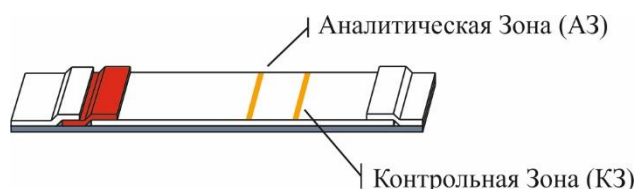


Рисунок 6. Схема иммунохроматографической тест-системы для определения СРБ

Таблица 5. Концентрации антител, КТ и активаторов при конъюгировании

	КТ	АТ	ЭДК	Сульфо-ГСС
Диапазон концентраций, мкМ	0.024–0.3	0.2–1.2	110–780	110–865
Оптимальная концентрация, мкМ	0.17	0.4	240	260

Разрабатываемая тест-система для определения СРБ представлена на рисунке 6. Для определения СРБ использовали «сэндвич»-тип анализа, что позволило распознать высокомолекулярный антиген с высокой чувствительностью и специфичностью.

Апробация тест-систем для определения СРБ была реализована в фосфатно-солевом буфере pH=7.4 с добавлением 0.05% Тритона X-100 (ФСБТ) при различных концентрациях СРБ. Результаты определения СРБ с использованием конъюгата АТ–КТ представлены на рисунке 7. Разработанная система имеет ПрО 1 нг/мл СРБ и динамический диапазон 1 – 300 нг/мл.

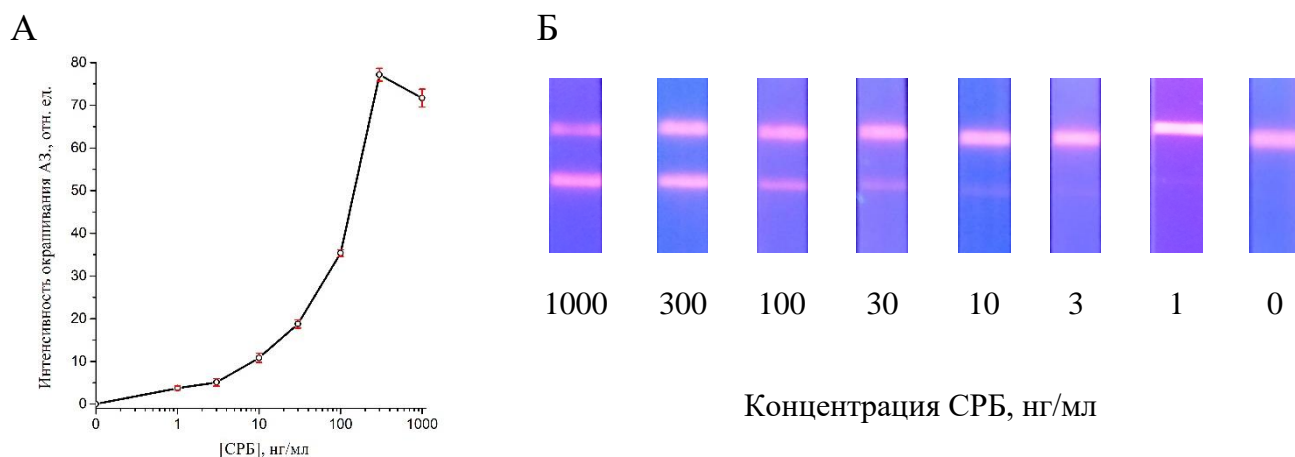


Рисунок 7 Иммунохроматографическое люминесцентное определение СРБ в ФСБТ с использованием силанизированных КТ. А – графическая кривая. Б – иммунохроматографические тест-полоски после проведения анализа.

Для оценки возможностей силанизированных КТ в качестве меток для ИХ тест-систем, было проведено их сравнение с традиционными ЗНЧ и коммерческими КТ (кКТ), произведенными компанией «Invitrogen». Данное сопоставление было проведено с использованием одинаковых иммунореагентов и схемы проведения анализа. ПрО СРБ

для системы с ЗНЧ составляет 10 нг/мл (Рис. 8). Определение СРБ с использованием кКТ в ФСБТ характеризовалось ПрО 10 нг/мл и большими погрешностями (Рис. 9). Таким образом, применение силанизированных КТ позволило снизить ПрО тест-системы в 10 раз. Полученные результаты отражают преимущества данной метки по сравнению с ЗНЧ и кКТ.

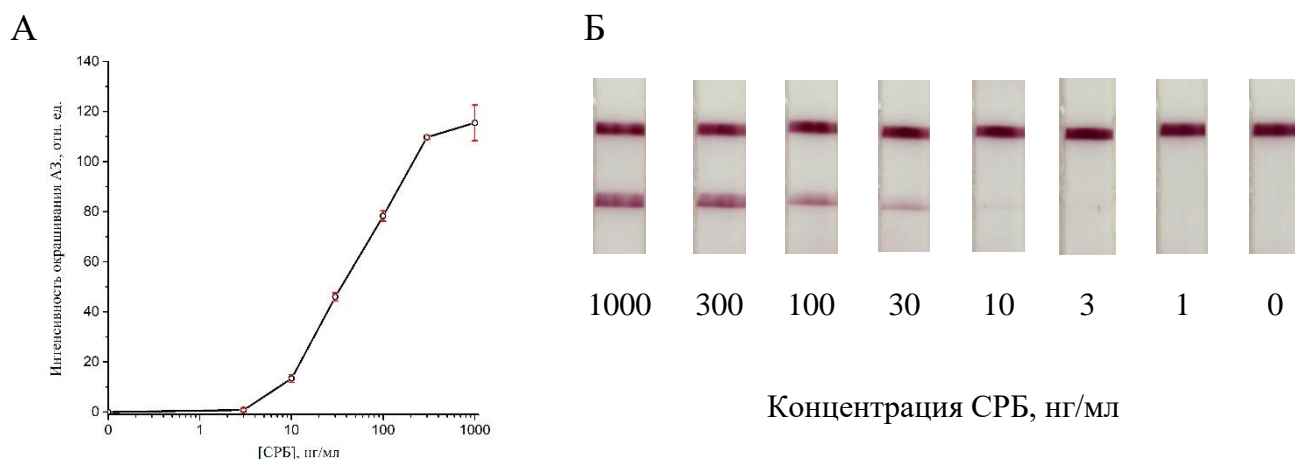


Рисунок 8 Иммунохроматографическое определение СРБ в ФСБТ с использованием ЗНЧ. А – градуировочная кривая. Б – иммунохроматографические тест-полоски после проведения анализа.

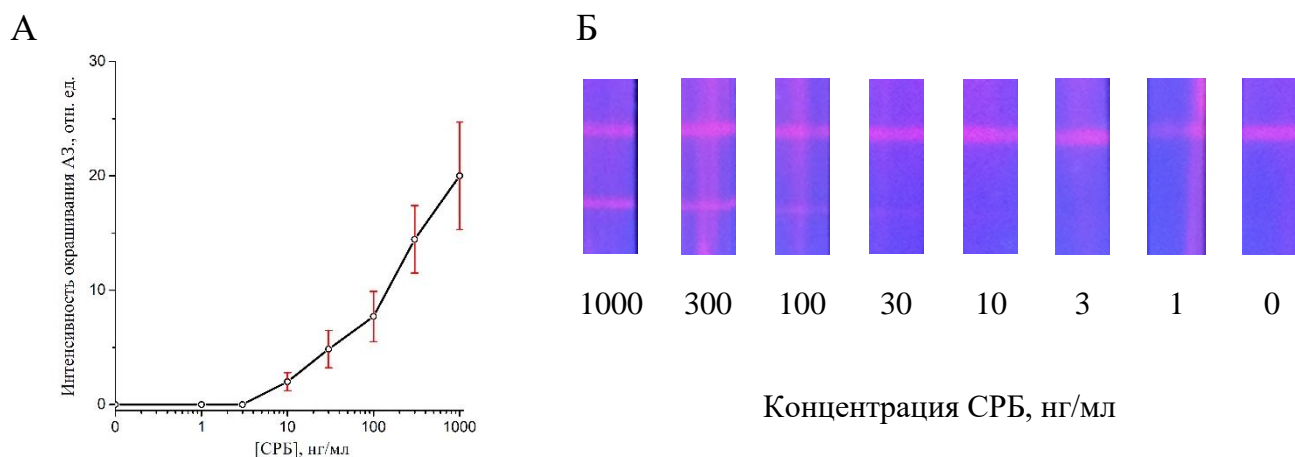


Рисунок 9 Иммунохроматографическое люминесцентное определение СРБ в ФСБТ с использованием кКТ. А – градуировочная кривая. Б – иммунохроматографические тест-полоски после проведения анализа.

Разработанная тест-система определения СРБ с использованием конъюгата АТ–КТ была апробирована на образцах плазмы крови человека, содержащих СРБ. В неразбавленной плазме ПрО тест-системы составил 10 нг/мл. Амплитуда сигнала при 1000 нг/мл снизилась на 25%, что не позволяет правильно количественно определить содержание СРБ (Рис. 10.). Использование неразбавленной плазмы демонстрирует возможность качественной оценки о наличии или отсутствии СРБ в образце, без

количественной оценки из-за влияния матрицы на искажение сигнала. Нейтрализацию матричного эффекта проводили разбавлением плазмы крови в 2, 4 и 10 раз в ФСБТ. При разбавлении плазмы крови ФСБТ в 4 раза матричный эффект пропадает и аналитические параметры тест-системы восстанавливаются.

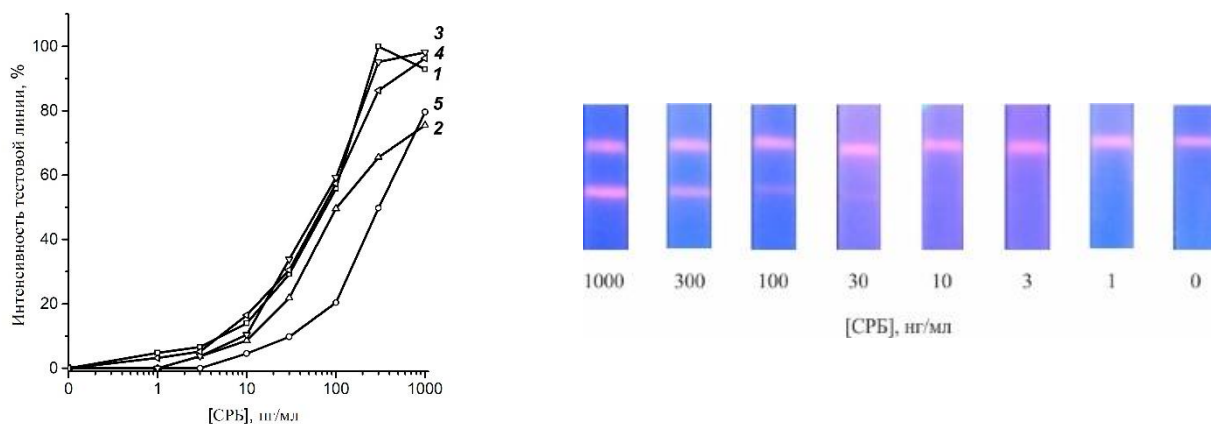


Рисунок. 10. Иммунохроматографическое определение СРБ в ФСБТ (1), и плазме крови человека: неразбавленной (2), разбавленной в 2 раза (3), в 4 раза (4) и 10 раз (5) ФСБТ.

Полученные результаты демонстрируют возможность использования меченых конъюгатов с силанизированными КТ для количественного определения СРБ. Использование силанизированных КТ, позволило получить 10-кратное снижение ПрО тест-системы по сравнению с традиционными маркерами ИХА и кКТ. Продemonстрирована возможность применения ИХ тест-системы на основе силанизированных КТ для плазмы крови после разбавления.

В пятой главе описан синтез и силанизация безкадмиевых КТ InP/ZnS. Логика развития современной науки приветствует отказ от использования веществ и материалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья и окружающей среды.

Для синтеза КТ InP/ZnS оранжевых и желтых КТ использовали 0.45 ммоль InCl_3 и 1.6 ммоль трис(диэтиламино)фосфина. Изменение длины волны излучения КТ было достигнуто путем изменения природы и соотношения галогенид-ионов во время синтеза. Реакционная смесь для получения оранжевых КТ содержала 2.2 ммоль ZnCl_2 (100% Cl), что приводило к синтезу ядер InP диаметром ~ 3.1 нм. Реакционная смесь для желтых КТ содержала 1.3 ммоль ZnCl_2 и 0.7 ммоль ZnBr_2 (28% Br, 72% Cl), обеспечивая размер ядер InP диаметром ~ 2.9 нм

Поскольку нанокристаллы InP не являются люминесцентными, их покрывали более широкозонным полупроводником (ZnS); КТ типа ядро/оболочка состава InP/ZnS были получены с использованием стеарата цинка и стехиометрического раствора триоктилфосфина серы (Рис. 11). Оранжевые КТ InP/ZnS характеризовались пиком эмиссии с максимумом 609 нм и полушириной пика 63 нм, КВ фотолюминесценции составил 40% (в толуоле). Желтые КТ InP/ZnS характеризовались пиком излучения с максимумом 560 нм и полушириной пика 56 нм, КВ составил 60% (в толуоле). Силанизацию КТ проводили методом обратной микроэмульсии с использованием Brij L4. Полученные КТ имели размер около 20 нм и КВ примерно 10 % (Рис. 12).

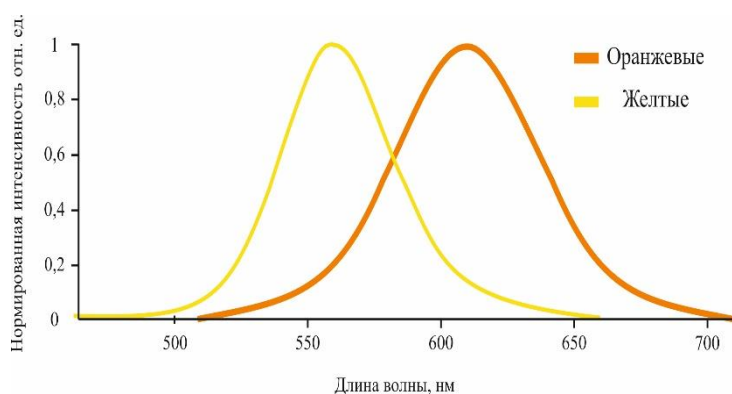


Рисунок. 11. Спектры люминесценции КТ@SiO₂ оранжевого (оранжевая линия) и желтого (желтая линия) цвета излучения.

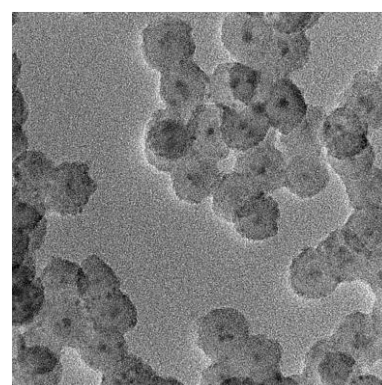


Рисунок 12. ПЭМ изображения КТ InP/ZnS@SiO₂, оранжевого цвета.

В **шестой главе** описано применение силанизированных КТ InP/ZnS оранжевого и желтого цвета излучения для разработки качественного ИХА для определения ДОН и ЗЕН в образцах пшеницы и кукурузы (Рис. 13). Полученные КТ функционализировали антителами специфичными к микотоксинам ДОН и ЗЕН карбодиимидно-сукцинимидный методом.

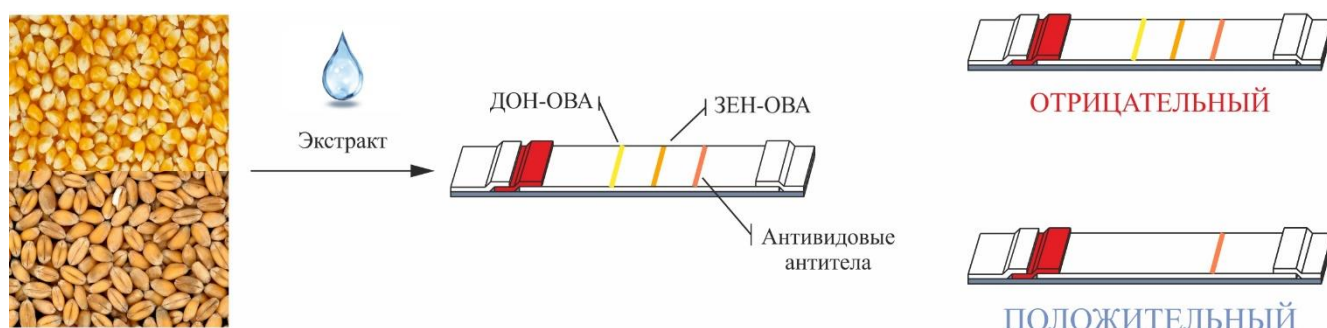


Рисунок 13. Схематическое изображение ИХА для определения ДОН и ЗЕН.

Оранжевые КТ использовали в качестве меток анти-ДОН моноклональных антител, а желтые КТ для анти-ЗЕН. Молярные соотношения КТ: АТ для анти-ДОН

составило 1 к 3, для анти-ЗЕН 1 к 4. Образование конъюгата подтверждали методом горизонтального геля электрофореза по различию в скорости миграции свободных КТ и меченных АТ (Рис. 14).

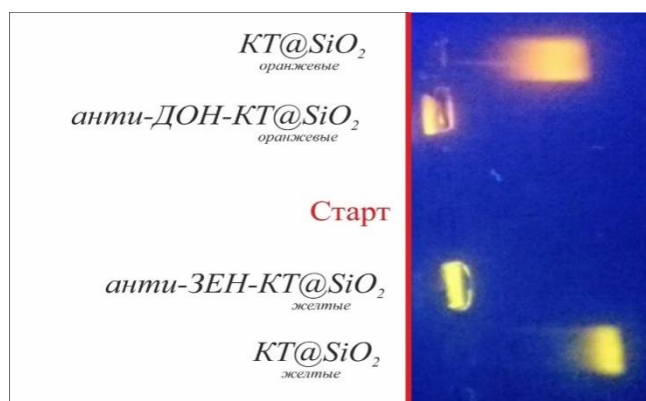


Рисунок 14. УФ изображение агарозного геля после проведения электрофореза, подтверждающая связывание КТ@SiO₂ с анти-ДОН и анти-ЗЕН антителами

Определение микотоксинов проводили конкурентным ИХА: конкурентная реакция проходила между микотоксинами в образце и конъюгатами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране. Отсутствие микотоксина в образце, приводит к образованию интенсивной аналитической зоны. Увеличение концентрации микотоксина в образце приводит к уменьшению интенсивности аналитической зоны, до ее полного исчезновения (Рис. 15).

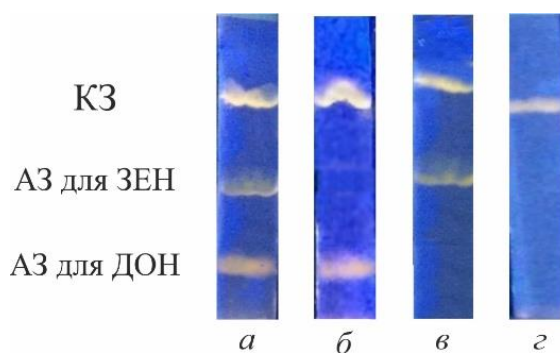


Рисунок 15. ИХА микотоксинов ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$): а – отрицательное для обоих микотоксинов, б – положительное для ЗЕН (концентрация микотоксина выше $50 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$), в – положительное для ДОН (концентрация микотоксина выше $500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$), г – положительный для ДОН, и ЗЕН (концентрации обоих микотоксинов выше предельного уровня, концентрация ЗЕН выше $50 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$, концентрация ДОН выше $500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$). КЗ - контрольная зона; АЗ – аналитическая зона.

Разработана качественная тест-система определения микотоксинов на уровне пороговых концентраций 50 и 500 $\text{мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ для ЗЕН и ДОН, соответственно. Выбор пороговых концентраций микотоксинов был основан на максимально допустимых

концентрациях ЗЕН и ДОН для необработанной пшеницы, кукурузы и хлебных изделий, рекомендованных ЕС.

Определение аналитических характеристик разработанного качественного анализа основано на результатах внутри-лабораторной проверки, выполненной с чистыми пробами пшеницы (30 образцов) и кукурузы (30 образцов), искусственно загрязненными (по 10 каждого типа) смесями микотоксинов в концентрациях меньше, равных и выше соответствующих пороговых концентраций. Чтобы предотвратить ложноотрицательные результаты, обусловленные матричным эффектом, для каждой системы анализировали натуральные и загрязненные образцы (с набором микотоксинов ЗЕН и ДОН в концентрациях выше и ниже установленных пороговых значений). Отсутствие микотоксинов в пробах подтверждено методом ЖХ-МС/МС.

В качестве аналитических характеристик тест-метода определяли долю ложноположительных и отрицательных результатов, чувствительность и специфичность (таблица 5). Рассчитанные параметры соответствовали требованиям, установленным Решением Комиссии 2002/657/ЕС для быстрых методов анализа (уровень ложных результатов <5%), следовательно, разработанную ИХА систему возможно применять в качестве метода определения микотоксинов для зерновых культур.

Таблица 5. Аналитические характеристики производительности многокомпонентного ИХА ($n = 30$). (Пороговая концентрация ДОН $500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$, ЗЕН $50 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$)

Параметры	Пшеница		Кукуруза	
	ЗЕН	ДОН	ЗЕН	ДОН
Ложноположительный результат, %	2.8	4.2	3.1	3.6
Ложноотрицательный результат, %	1.9	2.4	3.3	1.7
Специфичность, %	98	97	96	98
Чувствительность, %	97	95	97	96

Разработанный тест был апробирован с использованием 13 натурально загрязненных образцов зерна (6 образцов пшеницы и 7 кукурузы), которые были проанализированы в трех повторах. Полученные результаты ИХА верифицировали методом ЖХ-МС/МС. Сравнение результатов показало корреляцию между положительными и отрицательными образцами. Разработанная тест-система позволяет

проводить обнаружение ЗЕН и ДОН с PrO $50 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и $500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$, соответственно, в коммерчески важных объектах, таких как пшеница и кукуруза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезированы люминесцентные метки на основе КТ различных типов (CdSe и InP) со структурой ядро/оболочка, изучены закономерности изменения их свойств, получены стабильные КТ с оптимизированными оптическими свойствами, на основе которых разработаны иммунохроматографические системы для определения макромолекулярных и низкомолекулярных объектов.
2. Определена архитектура полупроводниковой оболочки КТ на основе ядер CdSe и методика нанесения оболочки оксида кремния, для получения максимального квантового выхода фотолюминесценции меток. Показана влияние методики на стабильность и оптические свойства получаемых меток. Установлено, что система $\text{CdSe}/6\text{CdS}/4.5\text{ZnS}$, обеспечивает наилучшие характеристики фотолюминесценции после силанизации. Система продемонстрировала наибольший КВ (46%) и коллоидную стабильность при использовании Brij L4, в то время как другие рассматриваемые ПАВ (Igepal и AOT), приводили к агрегации или значительному ухудшению оптических свойств. Показано, что количество ТЭОС несущественно воздействует на фотолюминесценцию КТ, однако значительно влияет на коллоидную стабильность.
3. Синтезированы и охарактеризованы КТ InP/ZnS с эмиссией желтого и оранжевого цвета. Изменение длины волны эмиссии было достигнуто путем изменения процентного соотношения галогенидов в реакционной смеси, позволяющего синтезировать ядра разного размера. Оранжевые КТ (100% ZnCl_2) характеризовались максимумом при 609 нм, полуширина пика 56 нм и КВ 40%. Желтые КТ (72% ZnCl_2 и 28% ZnBr_2) характеризовались максимумом при 560 нм, полуширина пика 56 нм и КВ 60%. Предложена методика силанизации КТ InP/ZnS методом обратной микроэмульсии. Установлено, что наибольшую стабильность силанизированные КТ InP/ZnS проявляют в воде и ФСБ буфере (pH 7.4)
4. Предложены две высокочувствительные иммунохроматографические тест-системы с использованием $\text{КТ}@\text{SiO}_2$ для анализа высокомолекулярных и низкомолекулярных объектов. Показана возможность применение тест-систем для анализа одного или нескольких объектов. Впервые продемонстрировано

- определение макромолекул с использованием KT@SiO_2 на неразбавленной плазме, что указывает на возможность использования системы при работе с биопробами
5. Разработана иммунохроматографическая тест-система для количественного определения СРБ с использованием KT@SiO_2 . Полученная система характеризовалась пределом обнаружения 1 нг/мл, что обеспечивает 10-кратное снижение по сравнению с тест-системами на основе ЗНЧ и коммерческих КТ. Проведена апробация тест-системы KT@SiO_2 на неразбавленной плазме крови человека. Показано, что разбавление плазмы крови в 4 раза нивелирует матричный эффект.
 6. Предложена и апробирована на образцах зерна методика одновременного иммунохроматографического определения дезоксиниваленола и зеараленона с помощью КТ на основе InP/ZnS . Разработанная система позволяет обнаружение ДОН и ЗЕН на уровне допустимых концентраций при $50 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и $500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ в образцах пшеницы и кукурузы. Аналитические характеристики тест-системы позволяют использование данной системы в качестве тест-системы мониторинга микотоксинов (доля ложных результатов не превышает 5%). Результаты валидации методом ЖХ/МС-МС подтвердили, чувствительность тест-системы для обнаружения присутствие целевых микотоксинов.

Список публикаций

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, и библиографические базы данных Web of Science и Scopus:

1. Beloglazova N. V., **Sobolev A. M.**, Tessier M. D., Hens Z., Goryacheva I. Y., De Saeger S. Fluorescently labelled multiplex lateral flow immunoassay based on cadmium-free quantum dots // *Methods*. 2017. Vol. 116. P. 141-148.
2. **Sobolev A. M.**, Byzova N. A., Goryacheva I. Y., Zherdev A. V. Silanized quantum dots as labels in lateral flow test strips for C-reactive protein // *Analytical Letters*. 2019. Vol. 52. №12. P.1874-1887.
3. Shandilya R., **Sobolev A. M.**, Bunkar N., Bhargava A., Goryacheva I. Y., Mishra P. K. Quantum dot nanoconjugates for immuno-detection of circulating cell-free miRNAs // *Talanta*. 2019. Vol. 208 120486.

Статья в сборнике, входящем в библиографические базы данных Web of Science и Scopus:

4. **Sobolev A. M.**, Tsyupka D. V., Drozd D. D., Goryacheva I. Y. Synthesis and silanization of CdSeZnS/ZnS quantum dots with blue and green emission // *SPIE*, Vol. 11067. 2019. № 110671F.

Материалы конференций, входящие в библиографические базы данных Web of Science и Scopus:

5. **Sobolev A. M.**, Pozharov M. V., Beloglazova N. V., Goryacheva, I. Y. Quantum dots as luminescent label for immunoassay // *2016 International Conference Laser Optics (ICLO). IEEE.2016. P. R4-33.*
6. **Sobolev A. M.**, Tsyupka D. V., Goryacheva I. Y. Synthesis, hydrophylization and bioconjugation of core/shell alloyed CdSeZnS/ZnS quantum dots // *2018 International Conference Laser Optics (ICLO). IEEE. 2018. P. 404.*
7. Goryacheva I. Y., Vostrikova A. M., Kokorina A. A., Novikova A. S., **Sobolev A. M.**, Drozd D. D., Goryacheva O. A. Nanoscale luminescent labels of organic and inorganic nature for bioassay // *2018 International Conference Laser Optics (ICLO). IEEE. 2018. P. 536.*

Тезисы докладов конференций:

8. **Соболев А. М.**, Цюпка Д. В., Белоглазова Н. В., Горячева И. Ю. Применение флуоресцентных наночастиц для разработки иммунохроматографических тест-систем. Материалы Международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» Москва, 23-25 мая 2018 г., Т.16. С. 566-567
9. Горячева И.Ю., Новикова А.С., **Соболев А.М.**, Дрозд Д.Д., Пономарева Т.Д. Применение люминесцентных квантовых точек в качестве меток в иммуноанализе. XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Санкт-Петербург., 9-13 сентября 2019. Материалы докладов

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит научный центр нано и биофотоники университета г. Гент (руководитель проф. Зегер Хенс) и Микаэля Д. Тессьер за возможность проведения синтезов, помощи в проведении экспериментов и оптических измерений. Автор благодарит лабораторию иммунобиохимии федерального исследовательского центра «фундаментальные основы биотехнологии» российской академии наук (руководитель отдела, г.н.с., проф. Б.Б. Дзантиев), наставников в.н.с. А.В. Жердева и с.н.с. Н.А. Бызову за научные наставления и возможность проведения экспериментов. Автор благодарит лабораторию анализа пищевых продуктов университета г. Гент (руководитель проф. Сара Де Саегер) и наставника к.х.н., с.н.с. Н.В. Белоглазову за методические советы и проведение экспериментов в лаборатории. Автор благодарит лабораторию физической химии технического университета г. Дрезден (руководитель проф. Н.П. Гапоник) и м.н.с. Горячеву О.А. за помощь в синтезе КТ. Автор благодарит лабораторию биофотоники федерального института исследований и испытаний материалов (руководитель проф. Уте Реш-Генгер) за возможность проведения спектральных и кинетических экспериментов, методическую помощь. Автор благодарит факультет молекулярной биологии национальный институт исследований состояния окружающей среды г. Бхопал, Индия (руководитель проф. Прадьюмна Кумар Мишира) и Ручита Шандиля за проведение экспериментов с микроРНК.