

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В
ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Пенсковой Екатерины Борисовны

Научный руководитель

доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н, доцент _____ Н. Ф. Шуршалова

Зав.кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Одним из значительных событий девяностых годов прошлого века стало создание нового класса флуорофоров, основанных на использовании квантовых точек в форме коллоидных нанокристаллов (КТ). Благодаря своим уникальным характеристикам они сразу привлекли внимание специалистов самых разных областей. Прогнозы развития приложений КТ предрекали их быстрое внедрение в электронику (элементы памяти, оптоэлектронные переключатели, дисплеи), оптику (преобразователи световой энергии, лазеры), биологию и медицину (флуоресцентные метки, пробы, сенсоры, инструменты для диагностики). Принципиальным свойством КТ является возможность получения флуоресценции любого наперед выбранного цвета (длины волны эмиссии) при возбуждении КТ всех цветов единым источником возбуждения [1]. Эти возможности легли в основу разработок систем одновременной детекции сразу множества параметров исследуемого образца. В биологических приложениях это вылилось в развитие мультиплексных методов детекции, предназначенных для многопараметрического анализа состава и/или функциональных свойств биологических объектов.

Квантовые точки (флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы), вдохнувшие в оптическую микроскопию новые силы и позволившие заглянуть за пресловутый дифракционный предел. Уникальные физические свойства квантовых точек делают их идеальным средством для сверхчувствительной многоцветной регистрации биологических объектов, а также для медицинской диагностики.

Достоинством нанокристаллов по сравнению с органическими флуорофорами является их высокая яркость, обусловленная большим значением коэффициента поглощения, уникально высокая фотостабильность и узкий, симметричный пик эмиссии [2].

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось: экспериментально обосновать и оценить

эффективность применения квантовых точек в качестве флуорофоров иммунофлуоресцентного анализа для специфической индикации микроорганизмов на примере возбудителя чумы *Yersinia pestis*.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить оптические характеристики различных видов квантовых точек с оценкой максимумов поглощения и эмиссии.
2. Получить иммуноконъюгаты квантовых точек со специфическими антителами.
3. Оценить эффективность очистки иммуноконъюгатов при проведении иммунофлуоресцентного анализа.
4. Провести люминисцентную микроскопию возбудителя чумы с использованием полученных иммуноконъюгатов.

Материалы и методы. Работа выполнена на базе Лаборатории диагностических технологий Отдела диагностики инфекционных болезней организации ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

В работе в качестве экспериментальной модели использовали готовые фиксированные и обеззараженные препараты взвеси микроорганизмов *Y. pestis* EV НИИЭГ (вакцинный штамм).

В качестве иммунобиологических препаратов применяли иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации (рег. уд. № ФСР 2008/02592-270409), иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные (рег. уд. № ФСР 2007/00881-270409) производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Конъюгирование иммуноглобулинов с квантовыми точками осуществляли по J.A. Kloepfer *et al* карбодиимидным способом с образованием ковалентных связей [3].

Для повышения активности КТ добавляли к ним органические

вещества NHS и EDS.

Спектрофотометрический анализ исследуемых образцов в объеме 100 мкл проводили в пластиковых кюветках Eppendorf UVette (Eppendorf, Германия), оптически прозрачных в диапазоне (220-1600) нм с длиной оптического пути 10 мм с использованием спектрометра высокого разрешения HR4000 (Ocean Optics, США). Регистрацию спектральных характеристик осуществляли в диапазоне 200-1100 нм [4].

Основным методом работы являлся метод флуоресцирующих антител (МФА). Мазки фиксировали в соответствии с п. 2.6.25 СП 1.3.3118-13 [5] погружением в фиксатор с 96% этиловым спиртом на 30 мин. После экспозиции стекла высушивали на воздухе. На высушенные мазки наносили раствор конъюгатов специфических антител и квантовых точек и инкубировали во влажной камере при температуре (37 ± 1) °С в течение (30 ± 5) мин. Отмывку окрашенных препаратов проводили в течение 7-10 мин в двух-трех порциях 0,9% раствора хлорида натрия, а затем ополаскиванием дистиллированной водой [6,7].

Учет результатов при флуоресцентной микроскопии производили по четырехкрестовой системе на основании выявления морфологических особенностей микроорганизмов и локализации возбудителя, а также интенсивности и специфичности (структуры) его свечения

Структура и объем работы. Диплом изложен на 37 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа включает 3 таблицы и 4 рисунка. Список использованных источников включает в себя 34 наименований.

Основное содержание работы

На первом этапе работы проводили изучение оптических характеристик образцов квантовых точек.

Квантовые точки представляют собой наноразмерную структуру, в

которых флуоресцирующие полупроводниковое ядро (CdSe) покрыто полупроводниковой оболочкой с более широкой запрещенной зоной (CdS или ZnS), улучшающей флуоресцентные свойства и химическую стабильность квантовых точек.

Нами были исследованы пять видов квантовых точек с максимумом флуоресценции при длине волны 530 нм - QD530, 570 нм - QD570 (ООО «НТИЦ «Нанотех-Дубна», Россия), 550 нм - QD550, 593 нм - QD593, 640 нм - QD640 (МИП «Вектор-СГУ», Россия). Квантовые точки QD530, QD570 содержали ядро CdSe, оболочку CdS/ZnS, квантовые точки QD550, QD593, QD640 – ядро CdSe, оболочку – ZnS и были стабилизированы полимером. В качестве лиганда квантовые точки QD530, QD570 содержали на поверхности 3-меркаптопропионовую кислоту.

Было установлено, что все квантовые точки поглощают излучение лампы в широком спектральном диапазоне от 350 нм до 625 нм, с положением максимумов спектра поглощения в видимом диапазоне, что обуславливает цвет коллоидных растворов квантовых точек.

Полуширина кривой спектра поглощения квантовых точек (разность между двумя длинами волн, при которых оптическая плотность составляет половину от максимальной - $\Delta\lambda_{1/2}$) составила более 150 нм. В то время как у традиционно используемого флуорофора – флуоресцеина изотиоцианата натрия (ФИТЦ) полуширина кривой спектра поглощения составила 40 нм (Рисунок 2). Таким образом, органические флуорофоры на основе ФИТЦ могут использоваться только в узком диапазоне излучения, что ограничивает их использование при применении различных источников излучения.

При возбуждении квантовых точек излучением длиной волны 400 нм у всех образцов наблюдали флуоресценцию с различным положением максимумов (Рисунок 3) и узким пиком флуоресценции (полуширина спектра составила до 30 нм).

Данные оптические характеристики делают их подходящим объектом для люминесцентной микроскопии в широком диапазоне спектра источника

излучения. Разные виды квантовых точек имеют различную флуоресценцию, что делает их подходящими для многоцветной маркировки и визуализации биологических объектов.

Для изготовления иммуноконъюгатов использовали «Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для РА на стекле (рег. уд. № ФСР 2008/02592-270409), которые представляют собой иммуноглобулиновую фракцию чумной агглютинирующей сыворотки, полученной гипериммунизацией лошадей живой культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Конъюгацию стабилизированных квантовых точек с антителами осуществляли по [J.A. Kloepfer et al.](#) [30].

Полученные иммуноконъюгаты оценивали по уровню флуоресценции и фотостабильности с коммерческими иммуноглобулинами флуоресцирующими чумными, мечеными ФИТЦ.

Количественную оценку уровня флуоресценции полученных препаратов иммуноконъюгатов и коммерческих иммуноглобулинов осуществляли с помощью спектрометра HR4000 (Ocean Optics, США) в диапазоне 200-1100 нм по значению пика флуоресценции.

В результате работы установлено, что получение иммуноконъюгатов на основе квантовых точек в одной концентрации (1 мг/мл) ведет к повышению уровня флуоресценции иммунобиологических препаратов в 1,4-3,6 раз, в то время как, при использовании ФИТЦ – снижение уровня флуоресценции в 1,2 раза (таблица 2).

В свою очередь все пять видов иммуноконъюгатов на основе квантовых точек были в 1,4-2,1 раз ярче иммуноглобулинов чумных флуоресцирующих на основе ФИТЦ. Самый высокий уровень флуоресценции при значении 1500 у.е. проявлялся у иммуноконъюгата на основе образца QD530.

Важной характеристикой, применяемой в микроскопии флуорофоров, является фотостабильность. Фотостабильность – время облучения, при

котором флуорохром теряет 50% яркости. Флуорохром должен иметь высокий квантовый выход (интенсивность флуоресценции) и высокую фотостабильность. Фотостабильность иммуноконъюгатов оценивали по уровню флуоресценции в течение 10 мин УФ облучения препарата и регистрации флуоресценции в режиме реального времени (в режиме мониторинга) на оптоволоконном спектрометре HR4000.

По результатам анализа установлено, что квантовые точки характеризовались высокой фотостабильностью, что позволяло осуществлять просмотр исследуемых образцов в течение 5-10 мин без снижения уровня флуоресценции (Таблица 3). В то же время облучение иммуноглобулинов на основе ФИТЦ в течение 1 мин приводило к снижению флуоресценции в 2 раза, облучение в течение 5-10 мин приводило к снижению уровня флуоресценции практически до нуля.

Таким образом, в результате работы получены иммуноконъюгаты на основе квантовых точек, которые характеризовались высоким уровнем флуоресценции в 2 раза больше флуоресценции иммуноглобулинов чумных флуоресцирующих на основе ФИТЦ и высокой фотостабильностью – в 10 раз по результатам собственных исследований.

Далее в работе проводили очистку иммуноконъюгатов для проведения иммунофлуоресцентного анализа.

При проведении люминисцентной микроскопии с полученными неочищенными иммуноконъюгатами установлен высокий уровень фоновой флуоресценции, обусловленный наличием флуоресцирующих квантовых точек, свободно расположенных в растворе и не взаимодействующих с бактериальными клетками (Рисунок 4). В то же время сами клетки не были окрашены. Аналогичные результаты получены для всех пяти видов квантовых точек.

Поэтому нами было принято решение об очистке полученных иммуноконъюгатов от свободных неконъюгированных квантовых точек с

помощью спин-колонок, применяемых для очистки флуоресцирующих иммуноглобулинов.

В результате сравнительного анализа препаратов иммуноконъюгатов очищенных с использованием спин-колонок и неочищенных было установлено, что очистка приводит к незначительному (в 1,1-1,25 раз) снижению уровня флуоресценции. После проведения очистки КТ, первая из исследуемых проб (QD570) не прошла очистку через гель (в геле остался хорошо заметный красный флуорофор). Возможно, это можно объяснить большим размером частиц. Другие четыре пробы прошли процедуру очистки успешно.

В результате работы установлено, что все пять видов квантовых точек флуоресцируют при использовании светофильтра 65 HE.

Наибольшей яркостью обладали иммуноконъюгаты на основе квантовых точек QD530, QD550 и QD593. Иммуноконъюгаты на основе квантовых точек по яркости флуоресценции превосходили традиционные флуоресцирующие чумные иммуноглобулины, используемые для диагностики возбудителя чумы.

Результаты микроскопии возбудителя чумы с использованием иммуноконъюгатов на основе квантовых точек и традиционных флуоресцирующих иммуноглобулинов представлены в таблице 5.

В результате проведенной работы получены пять видов иммуноконъюгатов на основе квантовых точек, которые превосходят традиционные флуоресцирующие красители по уровню флуоресценции, спектру поглощения, фотостабильности, возможности проведения многоцветной люминесцентной микроскопии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что квантовые точки являются перспективными флуорофорами, которые могут заменить традиционные флуоресцирующие красители, не снижая специфичность иммунобиологических диагностических препаратов.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено,

что все квантовые точки флуоресцируют при использовании одного светофильтра 65 HE (возбуждение 460-490 нм, эмиссия 500-600 нм), что позволяет использовать их для многоцветной люминесцентной микроскопии.

Рабочие растворы иммуноконъюгатов по интенсивности свечения превосходили флуоресцирующие иммуноглобулины на основе ФИТЦ, характеризовались фотостабильностью и возможностью просмотра исследуемых образцов в течение 5-10 мин без снижения флуоресценции. Наибольшей активностью обладали растворы иммуноконъюгатов с исходной концентрацией квантовых точек 25 мг/мл (QD570, QD530).

Конъюгаты на основе квантовых точек и специфических иммуноглобулинов позволяют осуществлять дифференциальную диагностику штаммов микроорганизмов, различающихся по антигенному составу. При этом, специфичность метода обусловлена функциональными биологическими молекулами. Высокий уровень флуоресценции, фотостабильность препаратов и возможность проведения многопараметрического анализа обеспечивается уникальными свойствами наноразмерных квантовых точек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С изобретением люминесцентного микроскопа и возможностью использования антител, меченых флуоресцентным красителем, метод иммунофлуоресцентного анализа, предложенный в 1941 г. Кунсом, широко вошел в практику микробиологических, иммунологических и медико-биологических исследований. Люминесценция характеризует способность вещества испускать излучение при воздействии на него энергии возбуждения. С помощью специальных флуоресцирующих красителей, молекул, частиц (флуорохромов, флуорофоров), не вызывающих сильного окрашивания объектов при обычной световой микроскопии, возникает флуоресценция при возбуждении ультрафиолетовыми лучами. Из синтетических органических флуорохромов наибольшую флуоресценцию дают акридиновый оранжевый, родамин и флуоресцеин-изотиоцианат натрия

(ФИТЦ). В то же время, использование традиционных органических флуорохромов ограничено их недостаточной фотостабильностью и невозможностью одновременной детекции в многопараметрических (многоцветных) системах. Тенденции развития современной микробиологии требуют поиска новых видов флуорохромов для люминесцентной микроскопии.

Успехи в развитии технологии квантовых точек открыли возможности получения нового класса флуорофоров для биологических и медицинских применений. Квантовые точки представляют собой флуоресцирующие нанокристаллы на основе полупроводников размером 2-10 нм. Длина волны флуоресценции квантовых точек строго зависит от их размеров, при этом для возбуждения различных видов нанокристаллов достаточно одного источника излучения. Квантовые точки характеризуются высокой фотостабильностью; яркостью, обусловленной большим значением коэффициента поглощения; узким пиком эмиссии. Такие уникальные свойства делают квантовые точки подходящими флуорофорами для сверхчувствительной, многоцветной детекции биологических объектов и лабораторной диагностики, требующей регистрации многих параметров одновременно.

В результате проведенных исследований установлено, что все квантовые точки флуоресцируют при использовании одного светофильтра 65 HE (возбуждение 460-490 нм, эмиссия 500-600 нм), что позволяет использовать их для многоцветной люминесцентной микроскопии. Рабочие растворы иммуноконъюгатов по интенсивности свечения превосходили флуоресцирующие иммуноглобулины на основе ФИТЦ, характеризовались фотостабильностью и возможностью просмотра исследуемых образцов в течение 5-10 мин без снижения флуоресценции. Наибольшей активностью обладали растворы иммуноконъюгатов с исходной концентрацией квантовых точек 25 мг/мл (QD570, QD530).

Конъюгаты на основе квантовых точек и специфических иммуноглобулинов позволяют осуществлять дифференциальную

диагностику штаммов микроорганизмов, различающихся по антигенному составу. При этом, специфичность метода обусловлена функциональными биологическими молекулами; высокий уровень флуоресценции, фотостабильность препаратов и возможность проведения многопараметрического анализа обеспечивается уникальными свойствами наноразмерных квантовых точек.

Выводы

Список использованных источников

1. Борисенко, С. И. Новости нанотехнологий / С. И. Борисенко // Нано и микросистемная техника. 2007. № 2. С. 7–13.
2. Борисенко, С. И. Новости нанотехнологий / С. И. Борисенко // Нано и микросистемная техника. 2007. №6. С. 1–9.
3. Kloepfer, J.A. Quantum Dots as Strain- and Metabolism-Specific Microbiological Labels / J.A. Kloepfer, R.E. Mielke, M.S. Wong [*et al.*] // Applied and environmental microbiology. – 2003. – V. 69, N 7. - P. 4205-4213.
4. Накамото К., ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений, пер. с англ., М., 1991. С. 13–17.
5. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.3118-13: утв. постановлением Врио Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.11.2013: ввод в действие с 28.11.2013. – 180 с.
6. Гусев, М. В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева и др. // М.: Медицина, 2003. Т. 2. С. 66–90.
7. Фёдорова, С. В. Современные методы микроскопии в биологии / Фёдорова М.З., Надеждин С.В., Чернявских С.Д. и др. // Белгород: БелГУ, 2009. С. 43–102.