

КОН'ЮГАТИ БІОСИНТЕЗОВАНИХ КВАНТОВИХ ТОЧОК Ag_2S З МОНОКЛОНАЛЬНИМИ АНТИТІЛАМИ ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ МІКРОТРУБОЧОК

М. БОРОВА ¹, О. КАПУШ ², В. ДЖАГАН ², А. НАУМЕНКО ³, Я. БЛЮМ ¹, А. ЄМЕЦЬ ^{1 *}

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Байди-Вишневецького, 2а, Київ, 04123, Україна

² Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, просп. Науки, 41, Київ, 03028, Україна

³ Київський національний університет ім. Т. Шевченка, просп. Глушкова 4, Київ, 03680, Україна

E-mail: marie0589@gmail.com, Kapush@nas.gov.ua, volodymyrdzhagan@gmail.com, anaumenko2015@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net, yemets.alla@nas.gov.ua

* Автор для кореспонденції – Ємець А., e-mail: yemets.alla@nas.gov.ua

*Представлено результати поверхневої функціоналізації за допомогою бичачого сироваткового альбуміну напівпровідникових наночастинок (квантових точок) Ag_2S , отриманих методом «зеленого» синтезу. Виявлено, що внаслідок функціоналізації максимум люмінесценції квантових точок Ag_2S зсувається до короткохвильового діапазону (піки у межах 270–350 нм). У результаті вивчення морфології та розмірів функціоналізованих квантових точок Ag_2S встановлено, що для них є характерною однорідна поверхня без структурних дефектів та сферична форма. Діаметр функціоналізованих квантових точок становив приблизно 20 нм, тоді як діаметр квантових точок без функціоналізації – до 10 нм. Отримано кон'югати функціоналізованих квантових точок Ag_2S з моноклональними антитілами (на прикладі антитіл TU-01 проти α -субодиниці тубуліну – основного білка мікротрубочок). У результаті спектрофотометричного аналізу виявлено, що спектр люмінесценції отриманих біокон'югатів Ag_2S – TU-01 мав декілька максимумів залежно від збудження. Максимуми відповідали діапазону довжин хвиль 410–470 нм. Продемонстровано, що отримані кон'югати Ag_2S – TU-01 здатні візуалізувати мікротрубочки, зокрема в клітинах *Nicotiana tabacum*. Отже, нами вперше створено біокон'югати з моноклональними антитілами за використання квантових точок Ag_2S , отриманих методом «зеленого синтезу», який суттєво знижує токсичність таких наночастинок, що дає можливість розглядати їх як ефективні люмінісцентні зонди в клітинно-біологічних дослідженнях.*

Ключові слова: Ag_2S , квантові точки, функціоналізація, моноклональні антитіла, біокон'югація, спектрофотометрія, мікротрубочки.

Вступ. В сучасних клітинно-біологічних і біомедичних дослідженнях, а також у діагностиці та при лікуванні ряду захворювань все частіше

використовують низькорозмірні наноструктури – напівпровідникові квантові точки, які попередньо функціоналізують за допомогою специфічних лігандів, отримуючи кон'югати з високою спорідненістю до структурних компонентів клітини (Karakoti et al., 2015; Badilli et al., 2020; Borovaya et al., 2021; Abdellatif et al., 2022; Devi et al., 2022; Yemets et al., 2022; Ali et al., 2023; Huang et al., 2023; Le and Kim, 2023; Mondal et al., 2024; Das et al., 2024). Інтерес саме до таких наноматеріалів зумовлений їх унікальними флуоресцентними властивостями у порівнянні із широкоживаними органічними барвниками та флуорохромами, оскільки вони характеризуються пролонгованим свіченням, фотостабільністю, що дозволяє створювати ефективні біомаркери, біосенсори або засоби адресної доставки протипухлинних речовин до клітин-мішеней (Badilli et al., 2020; Vus et al., 2021; Abdellatif et al., 2022; Devi et al., 2022; Mondal et al., 2024). Функціоналізація поверхні квантових точок є необхідною передумовою для їх подальшого застосування у різноманітних дослідженнях, зокрема пов'язаних з біовізуалізацією клітинних структур чи біомолекул. Квантові точки функціоналізують з метою надання їм водорозчинності, створення на їх поверхні функціональних груп для біокон'югації, біосумісності та запобігання агрегації або коагуляції цих наноматеріалів (Abdellatif et al., 2022; Yemets et al., 2022). Варіюючи хімічну структуру і розподіл функціональних груп можна ефективно управляти процесом функціоналізації, маючи на меті отримання складних наноструктур різної будови з унікальними властивостями. Існують певні підходи до модифікації поверхні квантових точок, які базуються на гідрофобних взаємодіях амфі-

фільних молекул з квантовими точками та на взаємодіях полярних груп органічного покриття з поверхнею квантової точки (Karakoti et al., 2015; Yemets et al., 2022; Ahmad et al., 2022).

Після того, як здійснюється функціоналізація квантових точок за допомогою відповідних молекул, слід ретельно оцінити біоактивність цих наноструктур на предмет наявності будь-яких змін, які можуть впливати на їх властивості, а, саме, розмір квантових точок, структуру їх поверхні, заряд, взаємодію з внутрішньоклітинним біомолекулами чи структурами у випадку їх використання *in vivo* чи *in vitro*. Головною метою функціоналізації квантових точок є покриття їх поверхні певним типом молекул, яке забезпечує хімічну функціональність для потрібного застосування. У всіх випадках функціоналізація наночастинок призводить до суттєвих змін властивостей їхньої поверхні.

Кон'югація з мультифункціональними лігандами забезпечує селективність та чутливість квантових точок як флуоресцентних зондів. Часто як функціоналізуючий агент використовують бичачий сироватковий альбумін (БСА). На сьогодні розроблено навіть методи синтезу напівпровідникових квантових точок з використанням БСА для створення захисного та стабілізуючого покриття на їх поверхні (Chen et al., 2014; Yan et al., 2018; Ye et al., 2019; Estrada-Rojas et al., 2025). За рахунок зв'язування білкових молекул з поверхнею наночастинок досягається стабілізація нанорозмірної квантової точки. З іншого боку, амінокислотні залишки, що входять до структури БСА, можуть формувати на поверхні квантових точок центри зв'язування з молекулами білкової природи, що є передумовою для створення біокон'югатів для подальших біологічних застосувань (Chen et al., 2014; Yan et al., 2018; Sahoo et al., 2019; Ye et al., 2019; Estrada-Rojas et al., 2025).

Для функціоналізації наночастинок також використовують антитіла. На відміну від поліклональних антитіл, які можуть відрізнятися своєю специфічністю, афінністю та фізико-хімічними властивостями, моноклональні антитіла містять єдиний продукт, спрямований до чітко визначеної антигенної детермінанти, і для якого характерними є однакові фізико-

хімічні характеристики і спорідненість до антигену (Dammes and Peer, 2020; Kothari et al., 2024). Моноклональні антитіла є виключно зручним та широко вживаним сьогодні діагностичним інструментом (Cordell, 2022; Kothari et al., 2024). За їх допомогою визначають маркери клітинних популяцій, проводять лікування різних захворювань, зокрема рак, аутоімунні розлади, інфекційні хвороби, тощо (Juan, 2020; Lu et al., 2020; Dammes & Peer, 2020; Kothari et al., 2024; Mekala et al., 2024). Крім того, моноклональні антитіла широко застосовують у детекції внутрішньоклітинних структур в різних типах клітин, зокрема залучених до проліферативних клітинних процесів (Yemets et al., 2000, 2008; Blume et al., 2010; Dráber and Dráberová, 2021; Hausrat et al., 2021; Chen et al., 2024).

Новим напрямком застосування імунофлуоресцентної мікроскопії є поєднання (кон'югація) цільових первинних моноклональних антитіл з люмінесцентною міткою, при цьому у ролі останньої можуть бути використані люмінесцентні наночастинок — квантові точки. Приклади використання таких комплексів «квантові точки-антитіла», а також аналіз хімічних взаємодій, що виникають між наночастиною та антитілом при різних підходах біокон'югації наведено нами в огляді (Yemets et al., 2022). Однак залишається актуальним питання зниження токсичності певних типів квантових точок, ефективності кон'югації антитіл з їх поверхнею, а також забезпечення стабільності таких утворених комплексів. Одним із ефективних рішень зі зниження токсичності може бути розробка і використання дружнього до природи «зеленого» синтезу квантових точок з використанням біологічних матриць, а також використання іонів нетоксичних металів, зокрема срібла, для їх синтезу (Vogova et al., 2021). У більшості робіт, відомих на сьогоднішній день, функціоналізували переважно Cd- та/або Zn-вмісні квантові точки, отримані за допомогою методів хімічного синтезу (за рахунок відновлення цитрату, хімічного осадження, високотемпературного синтезу, тощо) (Mazumder et al., 2009; Yemets et al., 2022). Також більшість досліджень по застосуванню квантових точок як люмінес-

центних маркерів проводили на різних клітинах тварин або людини (Liu et al., 2008; Yemets et al., 2022; Le and Kim, 2023).

Отже, зважаючи на перспективність застосування люмінесцентних наночастинок, метою роботи було розробити підходи функціоналізації поверхні Ag -вмісних квантових точок, синтезованих за допомогою методу «зеленого» синтезу, та отримати їх біокон'югати зі специфічними первинними моноклональними антитілами для біовізуалізації внутрішньоклітинних структур.

Матеріали і методи. Функціоналізація наночастинок Ag_2S . В роботі застосовували квантові точки Ag_2S , отримані шляхом «зеленого» синтезу з використанням міцелію гриба *Pleurotus ostreatus* (Vorova et al., 2020). Оскільки функціоналізація покращує біосумісність квантових точок при їх контакті з внутрішнім середовищем клітин, свіжесинтезовані наночастинок Ag_2S функціоналізували з метою утворення навколо їхньої поверхні безпечного реакційноздатного органічного покриття. Для функціоналізації використовували бичачий сироватковий альбумін, БСА («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 10 мг/мл. Отримання зразків оцінювали за допомогою оптичної спектрофотометрії. Для порівняння досліджували також спектри фотолюмінесценції вихідних (нефункціоналізованих) наночастинок Ag_2S .

Біокон'югація Ag_2S з моноклональними антитілами. Кон'югацію квантових точок Ag_2S з моноклональними антитілами проводили згідно до методу (Zhang et al., 2020) з певними модифікаціями. Для цього спочатку окремо готували розчини 1-етил-3(3-диметламінопропіл) карбодііміду (EDC) («Sigma-Aldrich», США) та *N*-гідроксисукциніміду (Sulfo-NHS) («Sigma-Aldrich», США) безпосередньо перед проведенням дослідження, оскільки ці розчини є нестабільними. До наночастинок Ag_2S додавали 1 мл EDC (10 мг/л) і 1 мл Sulfo-NHS (10 мг/л) та інкубували при постійному перемішуванні на шейкері (300 об/хв) впродовж 30 хв при 28 °C. Потім додавали 250 мкл мишачих первинних моноклональних антитіл TU-01 проти α -тубуліну («Thermo Fischer Scientific», США), які розводили в буфері PBS (8 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,44 г/л Na_2HPO_4 , 0,24 г/л KH_2PO_4 , pH 7,4) та інкубували впродовж 1 год при 28 °C. Після

цього до суміші додавали 500 мкл 5%-ного розчину БСА та інкубувати впродовж 10 хв. Отриманий зразок центрифугувати при 2000 об/хв впродовж 10 хв і для подальших досліджень відбирали супернатант. Перед кожним експериментом готувати свіжий розчин біокон'югатів, оскільки вони не зберігаються тривалий час.

Спектрофотометрична характеристика кон'югатів квантових точок Ag_2S з антитілами. Спектри поглинання аналізували спектрофотометрично на спектрофотометрі SPECORD 210 («Analytik Jena AG», Німеччина) з використанням програмного забезпечення WinASPECT 2.3.1.0 (Analytik Jena AG 1998-2000). Як контроль використовували бідистильовану воду. Для спектральних вимірювань також використовували прилад Shimadzu UV-1800 (Японія).

Спектри люмінесценції вимірювали на серійному спектрофлюориметрі Cary Eclipse (Varian Inc., Agilent Tech.). Максимальна роздільна здатність приладу Cary Eclipse — 1,5 нм, що визначається апаратною функцією та найменшою шириною щілини. Обрана спектральна ширина щілини для вимірів становила 5 нм. Стандартні кварцові кювети розміром $1 \times 1 \times 3$ см³ використовували при проведенні оптичного аналізу.

Електронна мікроскопія. Характеризацію квантових точок Ag_2S , функціоналізованих БСА, здійснювали за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) з використанням мікроскопу JEM-2100F («JEOL», Японія). Прискорююча напруга приладу складала 200 кВ. Попередньо здійснювали ультразвукове перемішування зразків, після чого краплини досліджуваних розчинів наносили на мідну сітку з вуглецевим покриттям.

Зразки біокон'югатів квантових точок з антитілами досліджували за допомогою скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) на приладі JSM-7001F («JEOL», Японія). Плівки зразку товщиною 50–100 нм на кремнієвих підкладках отримували за допомогою методу spin-coating шляхом послідовного нанесення 3–5 шарів.

Лазерна конфокальна мікроскопія. Отримані кон'югати (квантові точки Ag_2S —моноклональні антитіла TU-01) використовували для візуалізації мікротрубочок в живих клітинах тютюну *Nicotiana tabacum*. Для цього корені

проростків *N. tabacum* інкубували впродовж 12–24 год в розчині з кон'югатами Ag₂S–TU-01, далі досліджували клітини за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина). Для отримання зображення використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм, об'єктиви Plan Achromat 40x/1.4 DIC, флуоресцентний сигнал фіксували при довжині хвилі 410–470 нм. Індивідуальну конфігурацію визначали шляхом зміни параметрів швидкості сканування, точкової діафрагми і детектора променів. За допомогою програмного забезпечення версії 4SP2 LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина) візуалізовано мікротрубочкові структури на основі серії оптичних зрізів (Z-стеків) з інтервалом 0,2–0,7 мкм.

Результати та їх обговорення. Процес біокон'югації передбачає зв'язування певних сполук з наночастинками шляхом хімічних або біологічних взаємодій, що робить їх ідеальними зразками для біологічних або біомедичних застосувань. У результаті такої кон'югації відбувається поєднання корисних властивостей як цільових молекул (білок/антитіло), так і властивостей безпосередньо наночастинок (квантових точок) як міток для імунофлуоресценції.

Хімія поверхні наночастинок є важливим аспектом їх синтезу, оскільки ця властивість може бути використана для контролю їх розміру та самоорганізації під час формування (Sanita et al., 2020; Ahmad et al., 2022). Відомо дві стратегії прикріплення функціональних груп до поверхонь наночастинок. Перший метод – це пряма функціоналізація, де ліганд є двофункціональною органічною сполукою. У цьому випадку одну з функціонально реактивних груп використовують для прикріплення до поверхні наночастинки (комплексоутворювач), а друга група містить необхідну активну функціональність (група модифікацій поверхні наночастинок) (Ahmad et al., 2022). Для прямої функціоналізації зазвичай застосовують тіоли, фосфіноксид, фосфонати, карбоксилатні групи у випадку халькогенідів, оксидних наночастинок та наночастинок благородних металів.

Другий метод – це постфункціоналізація, яка є загалом переважаючим методом, оскільки ця стратегія є більш універсальною, і характер функціоналізуючих груп дозволяє контролю-

вати розміри наночастинок та стан дисперсії частинок у розчиннику, що використовується для їх синтезу. Постфункціоналізація частинок вимагає наявності молекули, яку слід прищепити на поверхню, її структуру можна описати як «наночастинка – агент – функціональна група». Для постфункціоналізації зазвичай використовують силаноподібні сполуки (Ahmad et al., 2022).

Для функціоналізації квантових точок Ag₂S, отриманих за допомогою методу «зеленого» синтезу, нами було використано БСА (Ye et al., 2019). Спектри оптичного поглинання контрольних (вихідних) та функціоналізованих за допомогою БСА квантових точок Ag₂S представлено на рис. 1, а. Згідно літературних даних, напівпровідникові нанокристали характеризуються зсувом краю оптичного поглинання у короткохвильову область спектру. Такий «блакитний» зсув обумовлений квантово-розмірним ефектом (Ikeri et al., 2019). Спектр поглинання функціоналізованих квантових точок дещо відрізнявся від спектру вихідних квантових точок Ag₂S. Крива 2 (рис. 1, а) демонструє появу піку в короткохвильовому діапазоні (280 нм), відсутнього у спектрі вихідних наночастинок. Появу такого максимуму пов'язують з наявністю у зразку саме БСА (Zhang et al., 2013). Крім того, було визначено спектри фотолюмінесценції квантових точок Ag₂S, функціоналізованих БСА. Спектри отримували збудженням у діапазоні довжин хвиль 400–527 нм.

Було виявлено, що внаслідок функціоналізації максимум люмінесценції зсувається до короткохвильового діапазону (піки у межах 270–350 нм) (рис. 1, б, крива 1). У порівнянні зі спектром люмінесценції вихідних наночастинок Ag₂S (рис. 1, б, крива 2), де максимумами відповідають діапазону довжин хвиль 440–450 нм. Відмінності, які спостерігали в спектрах люмінесценції контрольних і функціоналізованих наночастинок Ag₂S, можуть бути викликані значним послабленням смуги наночастинок в області 440–450 нм. Причиною такого послаблення цієї смуги може бути процес перерозподілу заряду між наночастинкою та БСА. Отже, результати спектрофотометричних вимірювань дозволяють припустити, що поверхня наночастинок Ag₂S набуває модифікацій за рахунок покриття, утвореного саме БСА. Проте,

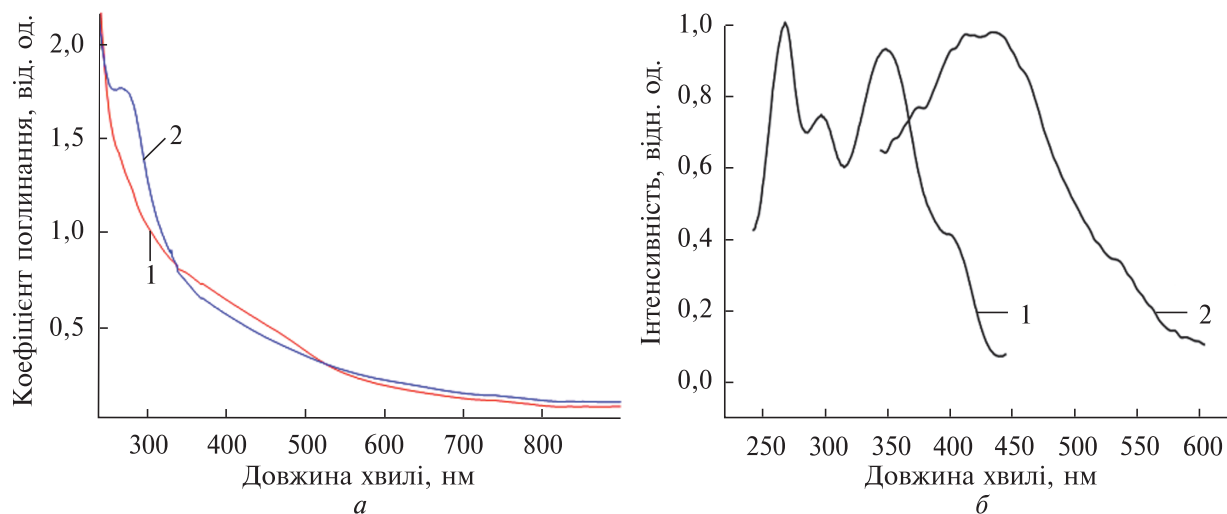


Рис. 1. *a* – спектри оптичного поглинання контрольних (вихідних) (1) та функціоналізованих БСА квантових точок Ag_2S (2), *б* – спектри люмінесценції функціоналізованих БСА (1) та контрольних квантових точок Ag_2S (2)

детальне вивчення структури та особливостей такої модифікованої поверхні наночастинок є важливим завданням, яке потребує подальших досліджень.

Отримані нами результати оптичного аналізу узгоджуються з результатами досліджень (Fu et al., 2017), згідно яких спостерігався «блакитний зсув» з максимумом при 270 нм у спектрі поглинання Ag_2S , покритих HSA (сироватковим альбуміном людини). Стосовно змін у спектрі люмінесценції автори відзначають залежність концентрації наночастинок від інтенсивності флуоресценції альбуміну, а саме зниження інтенсивності флуоресценції білка при підвищенні концентрації наночастинок. Однак, у той же час, з підвищенням концентрації Ag_2S максимум випромінювання HSA залишався незмінним і відповідав 360 нм (Fu et al., 2017).

Крім того, нами було досліджено морфологію та розміри функціоналізованих квантових точок Ag_2S . Встановлено, що для них є характерною однорідна поверхня без структурних дефектів та сферична морфологія, при цьому, діаметри окремих наночастинок переважно були і 20 нм (рис. 2, *a*), у той час як діаметр квантових точок без функціоналізації – до 10 нм (рис. 2, *б*). Отримані нами результати співставні з результатами подібних досліджень по вивченню фізико-хімічних властивостей поверх-

ні функціоналізованих Ag-вмісних квантових точок. Зокрема, авторами роботи (Wu et al., 2014) отримано кон'юговані з БСА наноконізати $\text{CdS}/\text{Ag}_2\text{S}$ з підвищеною протипухлинною активністю. Для таких сульфідних наночастинок були характерними виражений короткохвильовий максимум у спектрі поглинання (204 нм), сферична морфологія, а їх діаметр у середньому становив 7 нм. Отже, було підтверджено роль БСА як структурного компоненту під час синтезу квантових точок, а також обгрунтовано його вплив при оцінці цитотоксичних властивостей утворених нанокон'югатів на пухлинні клітини (Wu et al., 2014). Таким чином, функціоналізація наночастинок забезпечує унікальний зв'язок між наноматеріалами та їх клітинно-біологічним та біомедичним застосуванням і стає незамінною для розробки іновативних діагностичних або флуоресцентних засобів.

Останнім часом безперервно розширюються можливості застосування біокон'югатів квантових точок в імуногістохімічних та цитологічних дослідженнях. Як правило, з цією метою використовують кон'югати квантових точок з високоспецифічними моноклональними антитілами або стрептавідином у поєднанні з біотинильованими антитілами. Деякі автори стверджують, що використання саме квантових точок дозволяє досягти вищої чутливості

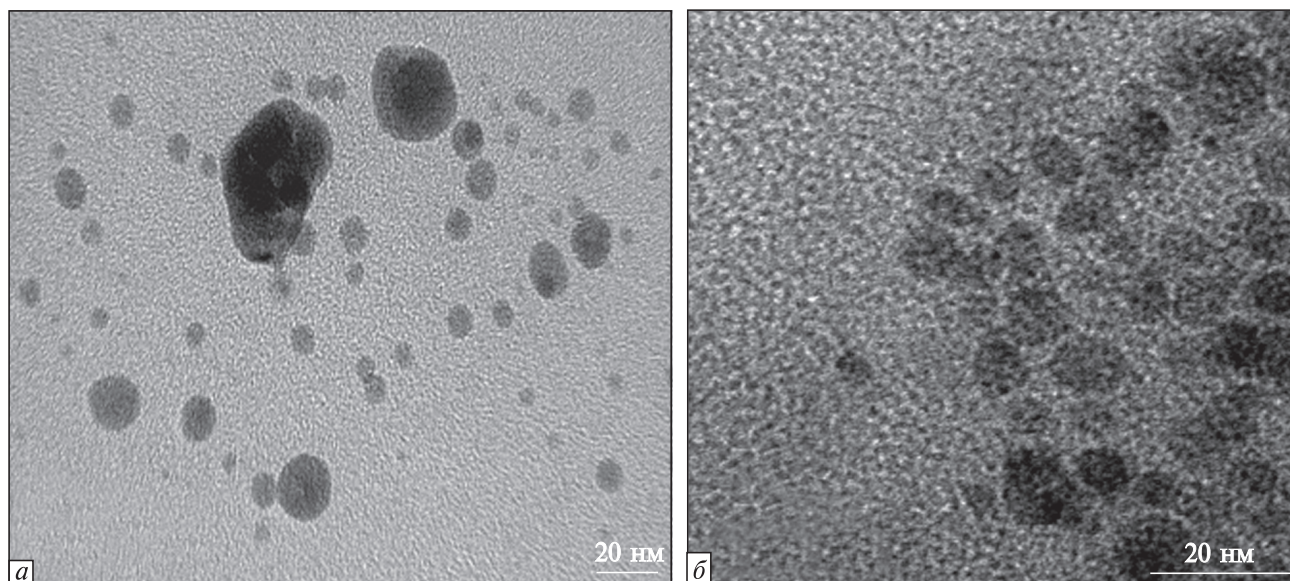


Рис. 2. Електронна мікрофотографія функціоналізованих БСА (а) та контрольних квантових точок Ag_2S (б)

у порівнянні зі стандартними методами імунозабарвлення (Mason et al., 2005; Eggenberger et al., 2007).

Специфічність очищених імуноглобулінів створює передумови для покращення якості імунофлуоресцентної мікроскопії. Наприклад, молекули антитіл, кон'юговані з флуоресцентною міткою, утворюють комплекс з антигеном, за допомогою якого можна кількісно визначити або візуалізувати певні білки та структури в різних типах клітин. Для збереження специфічності кон'югатів антитіл слід використовувати лише очищені імуноглобуліни. Такі очищені препарати виділяють з антисироватки за допомогою афінної хроматографії з використанням відповідного іммобілізованого агента. Таким чином, ці препарати містять лише ту популяцію молекул антитіл, яким притаманна необхідна антигенна специфічність (Mason et al., 2005).

За результатами проведеного спектрофотометричного аналізу отриманих біокон'югатів встановлено (рис. 3), що спектр люмінесценції синтезованих кон'югатів антитіл TU-01 з квантовими точками Ag_2S (рис. 3, б) містить смугу в області 400–470 нм, при цьому положення максимуму залежить від довжини хвилі збудження. Даний спектр підтверджує люмінесцентні властивості синтезованих біокон'югатів наночастинок сульфиду срібла з антитілами, він має кілька максимумів залежно від довжи-

ни хвилі збуджуючого випромінювання. Максимуми переважно відповідають діапазону довжин хвиль 410–470 нм. При цьому люмінесценція зумовлена наявністю в досліджуваному зразку люмінесцентної квантової точки. Слід зауважити, що у спектрі спостерігається виражений «блакитний» зсув, притаманний саме біологічно синтезованам квантовим точкам Ag_2S на противагу хімічно синтезованам квантовим точкам аналогічного складу, для яких характерна люмінесценція переважно в інфрачервоному діапазоні (900–1700 нм). Відомо, що характер спектрів поглинання та люмінесценції наночастинок залежить від хімічного складу, їх розмірів та особливостей поверхні (Borova et al., 2021). На оптичні характеристики також впливає взаємодія поверхні частинки з оточенням і взаємодія окремих наночастинок між собою. Нами було досліджено також і спектр поглинання отриманих кон'югатів Ag_2S з моноклональним антитілами TU-01. У спектрах поглинання отриманих біокон'югатів з Ag_2S спостерігався зсув смуги поглинання в короткохвильову область спектру, що обумовлено квантово-розмірним ефектом. Зокрема, максимуми поглинання були у межах 400–410 нм (рис. 3, а). Отримані спектри поглинання та люмінесценції демонструють лише ймовірні зміни стану поверхні наночастинок Ag_2S , що є відображенням процесу функціоналізації.

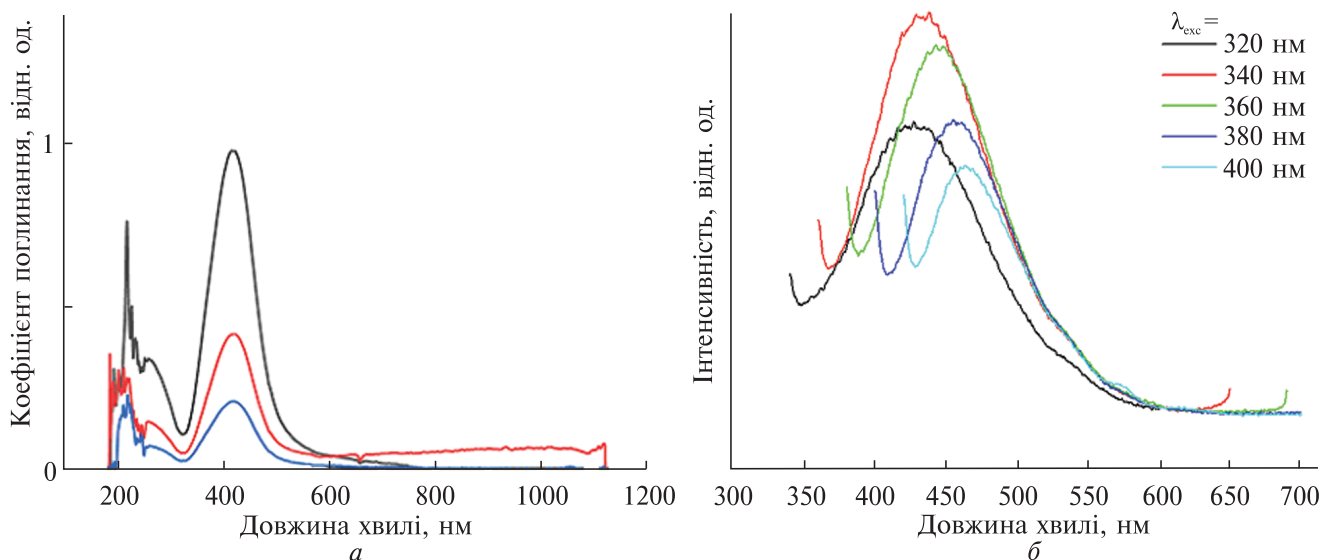


Рис. 3. а – спектр поглинання кон'югатів Ag_2S з антитілами; б – спектр люмінесценції кон'югатів квантова точка Ag_2S -антитіло TU-01

Також нами було досліджено морфологію отриманих біокон'югатів Ag_2S - TU-01 за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Цей метод дозволяє проводити дослідження поверхневої структури об'єкта шляхом аналізу відбитого «електронного зображення». Для отриманих нами біокон'югатів є характерною видовжена форма та розміри у межах 70–100 нм (рис. 4).

Існує декілька типів кон'югації квантових точок з антитілами (Yemets et al., 2022), зокрема нековалентна кон'югація (адсорбція шляхом електростатичних взаємодій в ізоелектричній точці антитіла) та прямий ковалентний зв'язок або з використанням молекули-адаптера (переважно стрептавідин і біотин). Зокрема, електростатичний нековалентний підхід застосовують для кон'югування квантових точок з антитілами за допомогою зв'язуючих білків (Mason et al., 2005). Одним з найбільш поширених, хоча і дорогих, методів кон'югації квантових точок з антитілами є їх кон'югація на основі афінності зі стрептавідином (авідином) і біотином. Створення таких біокон'югатів квантових точок з антитілами розглядається як альтернативний підхід до використання вторинних антитіл з люмінесцентними мітками, які є досить дорогими та мають короткі періоди яскравого свічення. Таким чином, створені на основі квантових то-

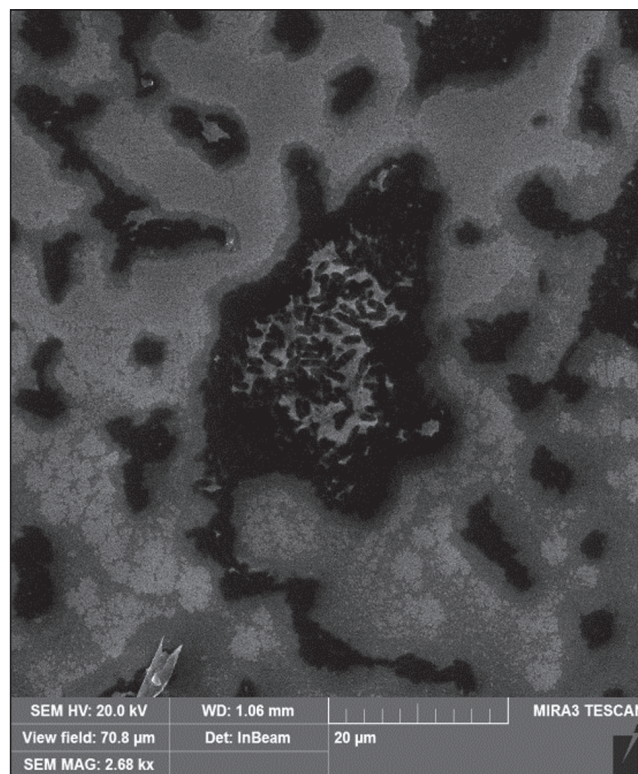


Рис. 4. Електронно-мікроскопічне зображення отриманих кон'югатів квантова точка Ag_2S -антитіло TU-01

чок люмінесцентні зонди є ключовими інструментами для досліджень з використанням флуоресцентної мікроскопії. Переважна більшість

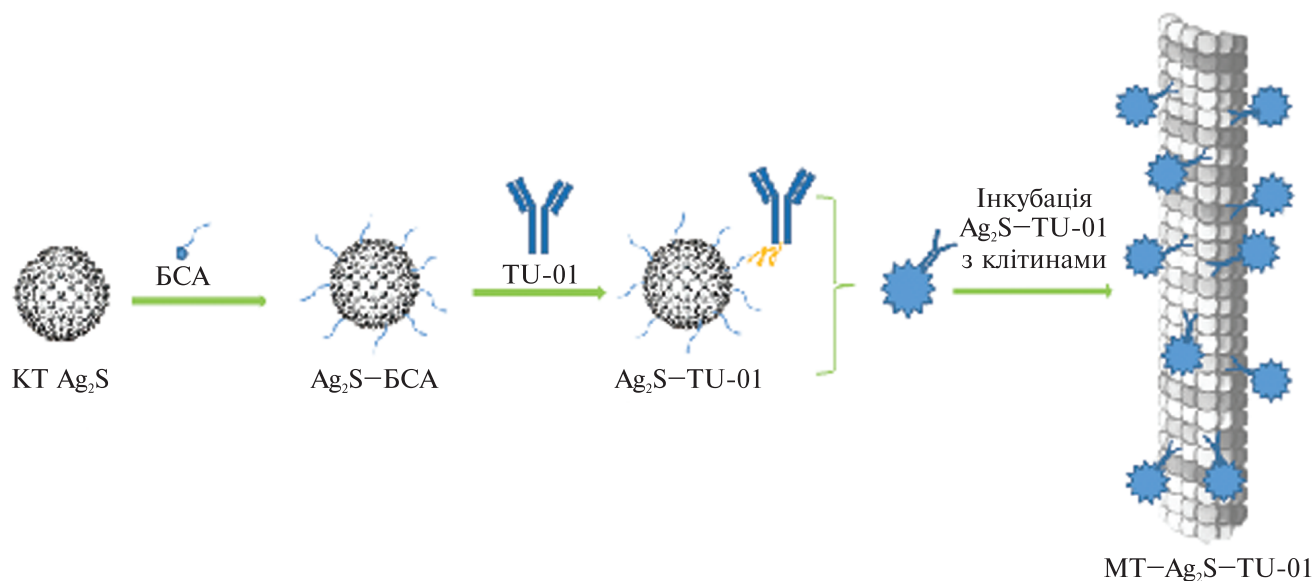


Рис. 5. Схематичне зображення отримання за допомогою БСА функціоналізованих квантових точок (КТ) Ag_2S , а також їх кон'югатів з моноклональним антитілами TU-01 проти α -тубуліну (Ag_2S -TU-01) для візуалізації мікротрубочок (MT)

досліджень, пов'язаних з використанням квантових точок для біовізуалізації, проводилась на тваринних клітинах або різних типах ракових клітин як модельних об'єктах (Sahoo et al., 2019; Khaledian et al., 2022; Yemets et al., 2022), тоді як на рослинних клітинах існує лише одна така робота (Eggenberger et al., 2007). Нами вперше створено біокон'югати з моноклональними антитілами з використанням квантових точок Ag_2S , отриманих за допомогою «зеленого синтезу», який суттєво знижує токсичність таких наночастинок, що дає можливість розглядати їх як люмінесцентні зонди в клітинно-біологічних дослідженнях, що не викликають побічних ефектів. В якості антитіл було обрано моноклональні антитіла TU-01 проти α -тубуліну, які зазвичай використовують в імуофлюоресцентній мікроскопії для вивчення різноманітних процесів, пов'язаних із функціонуванням мікротрубочок в тваринних (Dráber et al., 1986; 1989; Dráberová et al., 2000; Bryaskova et al., 2023) і рослинних клітинах (Yemets et al., 2000; 2008). Загальну схему отримання нами кон'югатів Ag_2S -TU-01 наведено на рис. 5.

У результаті інкубування коренів проростків *N. tabacum* з кон'югатами Ag_2S -TU-01 було візуалізовано мікротрубочки в епідермальних клітинах зони елонгації (рис. 6, б) та диферен-

ціації (рис. 6, в). Отже, отримані біокон'югати Ag_2S -TU-01 можна використовувати в клітинно-біологічних дослідженнях, пов'язаних з вивченням цих цитоскелетних структур, принаймні у рослинних об'єктах, як нами продемонстровано в даному дослідженні (рис. 6).

Таким чином, розробка і вдосконалення стратегії кон'югації квантових точок з антитілами відкриває можливості для застосування нових методів як для флуоресцентної мікроскопії, так і біоіміджингу з метою медичної діагностики. Вивчення клітинних механізмів з використанням кон'югатів «квантова точка-антитіло» може суттєво покращити наше розуміння функціонування різних типів клітин і субклітинних структур, а також забезпечити більш швидку і точну діагностику різних захворювань (Juan et al., 2020). Нами показана можливість використання біокон'югатів Ag_2S -антитіло як альтернативи традиційним органічним барвникам для внутрішньоклітинної детекції окремих структур.

Основними параметрами, які впливають на проникнення наночастинок у клітину та їх внутрішньоклітинний розподіл є їх форма, поверхневий заряд і розмір. Квантові точки є найбільш придатними для досліджень флуоресценції внутрішньоклітинних детермінантів, оскільки вони

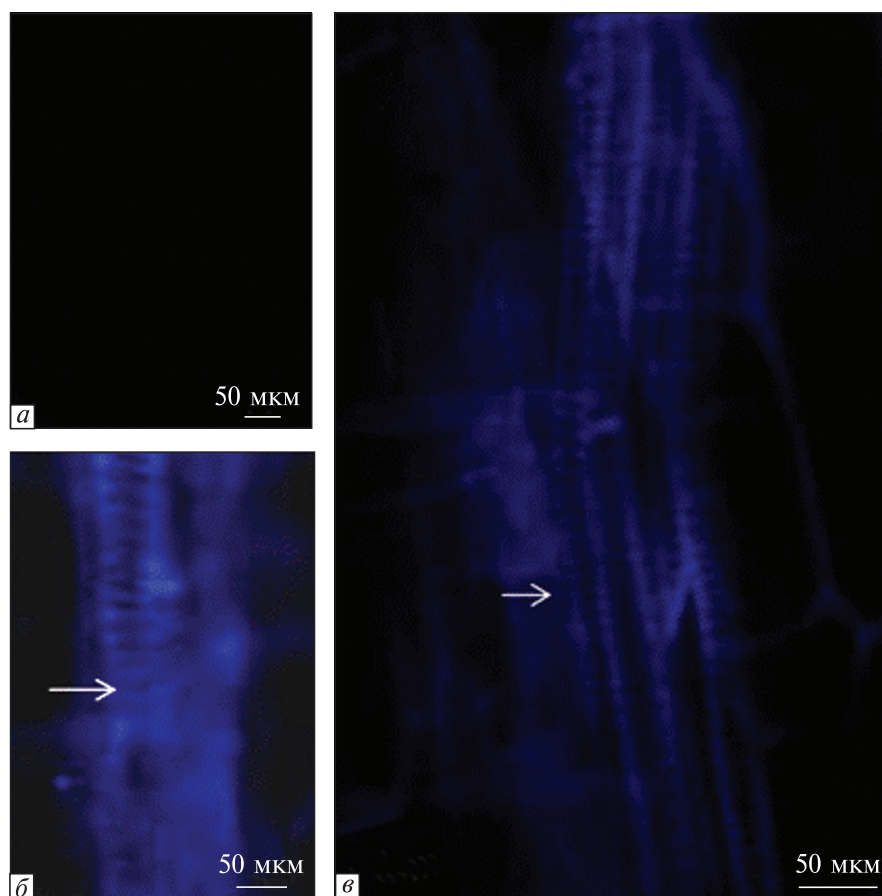


Рис. 6. Внутрішньоклітинна візуалізація мікротрубочок в клітинах кореня *N. tabacum* після інкубації з біокон'югатами Ag_2S -TU-01. *a* – контроль (корінь без обробки); *б, в* – експеримент. Стрілками позначено мікротрубочкові структури

мають виняткові оптичні та електронні властивості, пов'язані з ефектом квантового обмеження. Такі нанокристали вважаються ідеальними інструментами для флуоресцентного зображення біологічних об'єктів, оскільки, окрім високої та пролонгованої яскравості, їх використання не потребує досить дорогих вторинних антитіл і не передбачає застосування комерційних хімічно синтезованих квантових точок, оскільки, у нашому дослідженні використано підходи «зеленого» синтезу. Це принципово новий підхід, який поєднує в собі переваги «зеленого» синтезу безпечних (без вираженої побічної дії) срібло-вмісних наночастинок, а їх доведені люмінесцентні властивості можуть дозволити отримувати яскраві та стабільні мітки для візуалізації біомолекул і різноманітних структур в живих клітинах. От-

же, отримані результати закладають підґрунтя для подальших можливих застосувань біосинтезованих квантових точок, та створення на їх основі нових кон'югатів для різноманітних імунофлуоресцентних досліджень.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані із використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу було виконано в рамках гранту Національної академії наук України для молодих вчених дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки

«Створення біокон'югатів екологічно безпечних квантових точок Ag_2S як нових інструментів для внутрішньоклітинної візуалізації» (0120U100930, 2020–2021) для МБ і КО.

CONJUGATES OF BIOFABRICATED Ag_2S QUANTUM DOTS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES FOR MICROTUBULE VISUALIZATION

M. Borova, O. Kapush, V. Dzhanagan,
A. Naumenko, Ya. Blume, A. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
2a Baidy-Vyshnevetskoho Str., 04123, Kyiv, Ukraine
V.E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics,
National Academy of Sciences of Ukraine, 41 Nauky
Ave., 03028, Kyiv, Ukraine
Taras Shevchenko National University of Kyiv, 4
Glushkova Ave., 03680, Kyiv, Ukraine

E-mail: marie0589@gmail.com,
Kapush@nas.gov.ua, volodymyrdzhanagan@gmail.com,
anaumenko2015@gmail.com,
cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net,
yemets.alla@nas.gov.ua

The data of surface functionalization using bovine serum albumin of Ag_2S semiconductor nanoparticles (quantum dots) obtained by the «green» synthesis method are presented. It was found that as a result of functionalization, the luminescence maximum of Ag_2S quantum dots shifts to the short-wavelength range (peaks within 270–350 nm). The study of the morphology and size of the functionalized Ag_2S quantum dots revealed a uniform surface without structural defects and a spherical morphology. The diameter of the functionalized quantum dots was approximately 20 nm, while the diameter of the non-functionalized ones was up to 10 nm. Conjugates of the functionalized Ag_2S quantum dots with monoclonal antibodies were obtained (in particular, the TU-01 antibodies against the α -tubulin – the main protein of microtubules). Spectrophotometric analysis showed that the luminescence spectrum of the obtained Ag_2S –TU-01 bioconjugates had several maxima depending on the excitation. The maxima corresponded to the wavelength range of 410–470 nm. It was demonstrated that the obtained Ag_2S –TU-01 conjugates can be used for visualization and study of microtubule organization, particularly in plant cells. Thus, for the first time, we have created bioconjugates with monoclonal antibodies using Ag_2S quantum dots obtained via a «green» synthesis method, which significantly reduces the toxicity of such nanoparticles, allowing them to be considered effective luminescent probes in cell biological studies.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abdellatif, A.A.H., Youni, M.A., Alsharidah, M., Al Rurgaie, O., and Tawfeek, H.M., Biomedical applications of quantum dots: overview, challenges, and clinical potential, *Int. J. Nanomedicine*, 2022, vol. 17, pp. 1951–1970. <https://doi.org/10.2147/IJN.S357980>
- Ahmad, F., Salem-Bekhit, M.M., Khan, F., Alshehri, S., Khan, A., et al., Unique properties of surface-functionalized nanoparticles for bio-application: functionalization mechanisms and importance in application, *MDPI Nanomaterials*, 2022, vol. 12, pp. 1333. <https://doi.org/10.3390/nano12081333>
- Ali, M.K., Javaid, S., Afzal, H., Zafar, I., Fayyaz, K., Ain, Q.U., Rather, M.A., Hossain, M.J., Rashid, S., Khan, K.A., and Sharma, R., Exploring the multifunctional roles of quantum dots for unlocking the future of biology and medicine, *Environm. Res.*, 2023, vol. 232, pp. 116290. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116290>
- Badilli, U., Mollarasouli, F., Bakirhan, N.K., Ozkan, Y., and Ozkan, S.A., Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery, *TrAC Trends Analyt. Chem.*, 2020, vol. 131, pp. 116013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116013>
- Blume, Y., Yemets, A., Sheremet, Y., Nyporko, A., Sulimenko, V., Sulimenko, T., and Draber, P., Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on a *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells, *BMC Plant Biol.*, 2010, vol. 10, pp. 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-29>
- Borovaya, M., Horiunova, I., Plokhovska, S., Pushkarova, N., Blume, Y., and Yemets, A., Synthesis, properties and bioimaging applications of silver-based quantum dots, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, pp. 12202. <https://doi.org/10.3390/ijms222212202>
- Borovaya, M., Naumenko, A., Horiunova, I., Plokhovska, S., Blume Y., and Yemets A., «Green» synthesis of Ag_2S nanoparticles, study of their properties and bioimaging applications, *Appl. Nanosci.*, 2020, vol. 10, no. 12, pp. 4931–4940. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01365-3>
- Bryaskova, R., Georgiev, N., Philipova, N., Bakov, V., Anichina, K., Argirova, M., Apostolova, S., Georgieva, I., and Tzoneva, R. Novel fluorescent benzimidazolehydrazone-loaded micellar carriers for controlled release: impact on cell toxicity, nuclear and microtubule alterations in breast cancer cells, *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, pp. 1753. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061753>
- Chen, X., Ding, L., and Liu P., Synthesis of protein-assisted aqueous Ag_2S quantum dots in the bovine

- serum albumin solution, *Surface Interface Analysis*, 2014, vol. 46, no. 5, pp. 301–306. <https://doi.org/10.1002/sia.5417>
- Chen, Y.-L., Chen, Y.-C., and Suzuki, A., Immuno CellCycle-ID – a high-precision immunofluorescence-based method for cell cycle identification, *J. Cell Sci.*, 2024, vol. 137, no. 22, pp. jcs263414. <https://doi.org/10.1242/jcs.263414>
- Cordell, J., Developing monoclonal antibodies for immunohistochemistry, *Cells*, 2022, vol. 11, no. 2, pp. 243. <https://doi.org/10.3390/cells11020243>
- Dammes, N., and Peer, D., Monoclonal antibody-based molecular imaging strategies and theranostic opportunities, *Theranostics*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 938–955. <https://doi.org/10.7150/thno.37443>
- Das, S., Mondal, S., and Ghosh, D., Carbon quantum dots in bioimaging and biomedicines, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2024, vol. 11, pp. 1333752. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1333752>
- Devi, S., Kumar, M., Tiwari, A., Tiwari, V., Kaushik, D., Verma, R., Bhatt, S., Sahoo, B.M., Bhattacharya, T., Alshehri, S., Ghoneim, M.M., Babalghith, A.O., and Batiha, G.E., Quantum dots: an emerging approach for cancer therapy, *Front. Mater.*, 2022, vol. 8, pp. 798440. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.798440>
- Dráber, P., and Dráberová, E., Dysregulation of microtubule nucleating proteins in cancer cells, *Cancers*, 2021, vol. 13, no. 22, pp. 5638. <https://doi.org/10.3390/cancers13225638>
- Dráber, P., Dráberová, E., Linhartová, I., and Viklický, V., Differences in the exposure of C- and N-terminal tubulin domains in cytoplasmic microtubules detected with domain-specific monoclonal antibodies, *J. Cell Sci.*, 1989, vol. 92, no. 3, pp. 519–528. <https://doi.org/10.1242/jcs.92.3.519>
- Dráber, P., Dráberová, E., Zicconi, D., Sellitto, C., Viklický, V., and Cappuccinelli, P., Heterogeneity of microtubules recognized by monoclonal antibodies to alpha-tubulin, *Eur. J. Cell Biol.*, 1986, vol. 41, no. 1, pp. 82–88
- Dráberová, E., Viklický, V., and Dráber, P., Short communication exposure of luminal microtubule sites after mild fixation, *Eur. J. Cell Biol.*, 2000, vol. 79, no. 12, pp. 982–985. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00129>
- Eggenberger, K., Merkulov, A., Darbandi, M., Nann, T., and Nick, P., Direct immunofluorescence of plant microtubules based on semiconductor nanocrystals, *Bioconjugate Chem.*, 2007, vol. 18, pp. 1879–1886. <https://doi.org/10.1021/bc700188d>
- Estrada-Rojas, P., Hernández-Paz, J.F., Rodríguez-González, C.A., Mendoza-Duarte, M.E., Martel-Estrada, S.A., Valencia-Gymez, L.E., Camacho-Montes, H., and Olivas-Armendáriz, I., One-pot synthesis and characterization of a BSA-Cu₂S/CuS quantum dots drug delivery system based on biuret's reaction, *Mater. Res. Express*, 2025, vol. 12, no. 1, pp. 015406. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ada5b0>
- Fu, Y., Guan, E., Liang, J., Ren, G., and Chen, L., Probing the effect of Ag₂S quantum dots on human serum albumin using spectral techniques, *J. Nanomaterials*, 2017, vol. 2017, pp. 7209489. <https://doi.org/10.1155/2017/7209489>
- Hausrat, T.J., Radwitz, J., Lombino, F.L., Breiden, P., and Kneussel, M., Alpha- and beta-tubulin isoforms are differentially expressed during brain development, *Dev. Neurobiol.*, 2021, vol. 81, no. 3, pp. 333–350. <https://doi.org/10.1002/dneu.22745>
- Huang, Y., Lu, G., and Zhou, L., A mini review on selenium quantum dots: synthesis and biomedical applications, *Front. Bioengin. Biotechnol.*, 2023, vol. 11, pp. 1332993. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1332993>
- Ikeri, H.I., Onyia, A.I., and Vwawware, O.J., The dependence of confinement energy on the size of quantum dots, *Int. J. Sci. Res. Phys. Appl. Sci.*, 2019, vol. 7, no. 2, pp. 27–30. <https://doi.org/10.26438/ijrsras/v7i2.2730>
- Juan, A., Cimas, F.J., Bravo, I., Pandiella, A., Ocaca, A., and Alonso-Moreno, C., An overview of antibody conjugated polymeric nanoparticles for breast cancer therapy, *Pharmaceutics*, 2020, vol. 12, no. 9, pp. 802. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090802>
- Karakoti, A., Shukla, R., Shanker, R., and Singh S., Surface functionalization of quantum dots for biological applications, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 2015, vol. 215, pp. 28–45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.004>
- Khaledian, S., Abdoli, M., Fatahian, R., and Zahabi, S., Quantum dots in cancer cell imaging, In: *Quantum Dots – Recent Advances, New Perspectives and Contemporary Applications*, Ed. by Thirumalai J., IntechOpen; 2023, 264 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.10210>
- Kothari, M., Wanjari, A., Acharya, S., Karwa, V., Chavhan, R., Kumar, S., Kadu, A., and Patil, R.A., Comprehensive review of monoclonal antibodies in modern medicine: tracing the evolution of a revolutionary therapeutic approach, *Cureus*, 2024, vol. 16, no. 6, pp. e61983. <https://doi.org/10.7759/cureus.61983>
- Le, N., and Kim, K., Current advances in the biomedical applications of quantum dots: promises and challenges, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 16, pp. 12682. <https://doi.org/10.3390/ijms241612682>
- Liu, W., Howarth, M., Greytak, A.B., Zheng, Y., Nocera, D.G., Ting, A.Y., Bawendi, M.G., Compact biocompatible quantum dots functionalized for cel-

- lular imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, vol. 130, no. 4, pp. 1274–1284. <https://doi.org/10.1021/ja076069p>
- Lu, R.M., Hwang, Y.C., Liu, I.J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., and Wu, H.-C., Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *J. Biomed. Sci.*, 2020, vol. 27, pp. 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
- Mason, J.N., Tomlinson, I.D., Rosenthal, S.J., and Blakely, R.D., Labeling cell-surface proteins via antibody quantum dot streptavidin conjugates, *Methods Mol. Biol.*, 2005, vol. 303, pp. 35–50. <https://doi.org/10.1385/1-59259-901-X:035>
- Mazumder, S., Dey, R., Mitra, M.K., Mukherjee, S., and Das G.C., Review: biofunctionalized quantum dots in biology and medicine, *J. Nanomaterials*, 2009, vol. 2009, pp. 815734. <https://doi.org/10.1155/2009/815734>
- Mekala, J.R., Nalluri, H.P., Reddy, P.N., Sainath, S.B.J., Kumar, N.S.S., Kiran, G.V.S.D.S., Dhiman, R., Chamarthy, S., Rao, K.R., Manyam, R.R., and Dirisal, V.R., Emerging trends and therapeutic applications of monoclonal antibodies, *Gene*, 2024, vol. 925, pp. 148607. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148607>
- Mondal, J., Lamba, R., Yukta, Y., Yadav, R., Kumar, R., Pani, B., and Singh, B., Advancements in semiconductor quantum dots: expanding frontiers in optoelectronics, analytical sensing, biomedicine, and catalysis, *J. Mater. Chem. C*, 2024, vol. 12, pp. 10330–10389. <https://doi.org/10.1039/D4TC01396D>
- Sahoo, S.L., Liu, C.-H., Kumari, M., Wu, W.-C., and Wang, C.-C., Biocompatible quantum dot-antibody conjugate for cell imaging, targeting and fluorometric immunoassay: crosslinking, characterization and applications, *RSC Adv.*, 2019, vol. 9, pp. 32791–32803. <https://doi.org/10.1039/C9RA07352C>
- Sanita, G., Carrese, B., and Lamberti, A., Nanoparticle surface functionalization: how to improve biocompatibility and cellular internalization, *Front. Mol. Biosci.*, 2020, vol. 7, pp. 587012. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>
- Vus, K., Tarabara, U., Danylenko, I., Pirko, Ya., Krupodorova, T., Yemets, A., Blume, Ya., Turchenko V., Klymchuk D., Smertenko P., Zhytniakivska O., Trusova V., Petrushenko S., Bogatyrenko S., and Gorbienko G., Silver nanoparticles as inhibitors of insulin amyloid formation: A fluorescence study, *J. Mol. Liq.*, 2021, vol. 342, pp. 117508. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117508>
- Wu, S.S., Zhang, J.Z., Yu, X.H., Ying, C., and Wang, H.J., BSA-conjugated CdS/Ag₂S quantum dots: synthesis and preliminary antineoplastic assessment, *RSC Adv.*, 2014, vol. 4, pp. 63502–63507. <https://doi.org/10.1039/C4RA09526J>
- Yan, R., Yu, B.Q., Yin, M.M., Zhou, Z.Q., Xiang, X., Han, X.L., Liu, Y., and Jiang, F.L., The interactions of CdTe quantum dots with serum albumin and subsequent cytotoxicity: the influence of homologous ligands, *Toxicol. Res.*, 2018, vol. 7, no. 2, pp. 147–155. <https://doi.org/10.1039/c7tx00301c>
- Ye, Q., Guo, L., Wu, D., Yang, B., Tao, Y., Deng, L., and Kong, Y., Covalent functionalization of bovine serum albumin with graphene quantum dots for stereospecific molecular recognition, *Analyt. Chem.*, 2019, vol. 91, no. 18, pp. 11864–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02605>
- Yemets, A., Plokhovska, S., Pushkarova, N., and Blume, Ya., Quantum dot-antibody conjugates for immunofluorescence studies of biomolecules and subcellular structures, *J. Fluorescence*, 2022, vol. 32, no. 5, pp. 1713–1723. <https://doi.org/10.1007/s10895-022-02968-5>
- Yemets, A., Stelmakh, O., and Blume, Y.B., Effects of the herbicide isopropyl-*N*-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action, *Cell Biol. Int.*, 2008, vol. 32, no. 6, pp. 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.012>
- Yemets, A.I., Blume, Ya.B., Kundelchuk, O.P., Smertenko, A.P., Solodushko, V.A., Rudas, V.A., and Gleba, Yu.Yu., Transfer of amiprophosmethyl-resistance from *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization, *Theor. Appl. Genet.*, 2000, vol. 100, no. 6, pp. 847–857. <https://doi.org/10.1007/s001220051361>
- Zhang, J., Chen, L. Zeng, B. Kang, Q., and Dai, L., Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV-vis spectroscopy, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, vol. 105, pp. 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.11.06>
- Zhang, L., Mazouzi, Y., Salmain, M., Liedberg, B., and Boujday, S., Antibody-gold nanoparticle bioconjugates for biosensors: synthesis, characterization and selected application, *Biosens. Bioelectron.*, 2020, vol. 165, pp. 112370. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>

Надійшла в редакцію 15.02.2025

Після доопрацювання 20.03.2025

Прийнята до друку 18.07.2025