

PREPARATION OF BIOTIN-GLUTATHIONE COATED QUANTUM DOTS

Janů L.¹, Ryvolová M.¹, Chomoucká J.², Drbohlavová J.², Hubálek J.², Adam V.¹, Kizek R.¹

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

² Department of Microelectronics, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Údolní 53, 602 00 Brno, Czech Republic

E-mail: libor.janu@seznam.cz

ABSTRACT

One of the fastest moving branches of nanotechnology is the use of quantum dots (QDs). QD's unique optical properties make them an excellent in vivo and in vitro fluorescent labels in a variety of biological investigations. Traditional molecular dyes are generally large, have broad absorption and emission profiles, low photobleaching thresholds and short lifetime. Therefore, use of traditional labels in long term experiments can be limited. In contrast to this, QDs with the dimensions in the range of 2–10 nm have a broad absorption with narrow photoluminescence spectra, high resistance to photobleaching and high resistance to photo- and chemical degradation. Originally, QDs were synthesized by organometallic way and coated with trioctylphosphine oxide TOPO to make them biocompatible. But due to hydrophobic properties of TOPO, these QDs can not be directly applied in bioapplications. The most common method for synthesizing water-soluble QDs is by aqueous synthesis route. QDs can be then coated with thiol containing molecules, such as mercaptopropionic acid, dihydrolipoic acid or glutathione.

In this study, we synthesized water soluble CdTe QDs coated with N-terminal biotin-glutathione. This type of coating represents a unique combination of water soluble, biocompatible QDs with biotin, which serves as specific linker able to react with avidin or streptavidin. Biotin-glutathione-QDs were prepared by one pot synthesis using sodium tellurite and cadmium chloride.

Key words: quantum dots, glutathione, biotin.

Acknowledgement: The work has been supported by IGA FA MENDELU 13/2011.

ÚVOD

V posledních letech nachází nanotechnologie široké uplatnění nejen v technických oborech, ale také oborech přírodních. V bioanalýze se při značení sledovaných látek s úspěchem využívají malé polovodičové částice nazvané kvantové tečky. Kvantové tečky (quantum dots, QD) jsou částice velmi malých rozměrů (2-10 nm), vyrobené nejčastěji z CdSe nebo CdTe. Vykazují vynikající fluorescenční vlastnosti. V porovnání s klasickými organickými fluorescenčními značkami jsou kvantové tečky neporovnatelně menší velikosti, mají silnější fluorescenci a delší životnost (1,5).

Vzhledem ke svému složení jsou kvantové tečky sami o sobě pro živý organismus toxické (3). Takto neupravené jsou také velmi náchylné k interakcím mezi povrchem kvantové tečky a rozpouštědlem, čímž značně klesá jejich luminiscenční schopnost, a to až na 10 – 15 % původní hodnoty (9). Další nevýhodou je jejich relativně nízká rozpustnost ve vodných roztocích. Z tohoto důvodu bylo v počátcích vývoje nejdůležitějším úkolem modifikovat povrch kvantových teček tak, aby byly netoxické, zachovaly si luminiscenční schopnosti a byly dobře rozpustné ve vodných roztocích (1, 3, 9). Výše uvedené vlastnosti jsou nutným předpokladem k jejich využití ve výzkumu živých organismů. Proto byla vyvinuta celá řada postupů, které by měly vést k odstranění toxických vlastností a lepší rozpustnosti kvantových teček. Tyto postupy zahrnovaly především povrchové úpravy. K pokrytí kvantových teček byly použity takové sloučeniny jako TOPO, mercaptoacetic acid (MAA), dihydrolipoic acid DHLA a další (1, 5, 6, 8). Účelem tohoto kroku je nejen zlepšení výše uvedených vlastností, ale také opatřit kvantové tečky funkční skupinou, na kterou by bylo možné specificky navázat další biomolekuly. Nejčastější funkční skupinou je v tomto směru aminoskupina nebo karboxylová skupina. Na takto upravené tečky lze vhodně navázat např. peptidy, proteiny nebo protilátky (2,4). Zajímavou aplikací je konstrukce biosensorů, kde se využívá komplexu kvantová tečka – peptid a interakce akceptoru a donoru fluorescence (9). Nejmodernější výzkumy se zabývají konjugací kvantové tečky na různé deriváty DNA jako např. psDNA či PNA (7,10).

Využití kvantových teček může být poměrně široké a rozmanité. Každá metoda má své výhody i nevýhody. Pro všechny aplikace však souhrnně platí, že základním předpokladem pro jejich úspěšné použití je syntéza vysoce fluorescenčních a stabilních kvantových teček.

MATERIÁL A METODIKA

Resiny pro přípravu syntetických peptidů byly zakoupeny od firmy Applied Biosystems (Česká republika), aminokyseliny pro syntézu na pevné fázi byly zakoupeny od firmy Merck (Česká republika). Rozpouštědla pro syntézu peptidů byla zakoupena od firmy Biossolve (Holandsko)

a Sigma Aldrich (Česká republika). Chemikálie potřebné na přípravu kvantových teček byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Česká republika).

K syntéze peptidů na pevné fázi byl použit automatický syntetizátor peptidů Pioneer Peptide Synthesizer od firmy PerSeptive Biosystems (USA). Analýza čistoty peptidů byla provedena na HPLC od firmy Shimadzu (Česká republika). K analýze byly použity následující mobilní fáze: A = 0,1% TFA, B = 80% acetonitril, 20% voda a 0,08% TFA. Gradient byl od 2%B do 100% B, 15 minut. Analýzy MS byly provedeny na přístroji Ultraflex III instrument (Bruker Daltonik, Germany). 0,6 μ l vzorku bylo smícháno s 2,4 μ l roztoku matrix (nasycený roztok alfa-kyano-4-hydroxykořicové kyseliny směsi voda/acetonitril 1:1, v/v). Elektroforéza byla provedena na přístroji CE (Beckman Coulter, PACE 5500).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Syntéza biotinylovaného glutathionu

Pro povrchovou úpravu kvantových teček byl zvolen biotinylovaný tripeptid glutathion (GSH). Peptid byl připraven pomocí syntézy na pevné fázi, klasickým postupným napojování aminokyselin od C-konce peptidu po jeho N-konec.

Úvodní krok syntézy byl proveden s resinem Fmoc-Gly-PEG-PS. Tento resin celkově zjednodušuje syntézu a značně redukuje riziko vedlejších reakcí, které by se jinak vyskytovaly při esterifikaci aminokyseliny při jejím navazování na resin. Resin PEG-PS je navíc svoji strukturou vhodný pro syntézu na průtočném systému jakým je Pioneer peptide synthesizer. Další tvorba peptidových vazeb cystein-glycin a gama glutamová kyselina–cystein probíhala následovně: Fmoc skupina byla odstraněna 20% roztokem piperidinu v dimethylformamide (DMF) po dobu 10 minut. Aktivace přichází aminokyseliny probíhala pomocí 0,05 M roztoku N,N-diisopropylethylamin (DIPEA) v DMF; 0,15 g O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-fosfát (HBTU) a 0,03 g Hydroxybenzotriazol (HOBt). Molární poměr aminokyseliny (AK) a aktivátorů byl:

AK : HBTU : HOBt : DIPEA = 1 : 1 : 0,5 : 2.

Reakční doba byla 30 minut. Byl použit čtyřnásobný molární přebytek aminokyselin vzhledem k navážce resinu. Měřtko reakce bylo 0,2 mmol. Na N-konci glutathionu je kyselina glutamová připojena na předchozí cystein přes karboxylovou skupinu postranního řetězce. Z tohoto důvodu byl použit speciální monomer Fmoc-Glu-OtBu, který umožňuje tvorbu peptidové vazby na gama karboxylové skupině výše uvedené aminokyseliny.

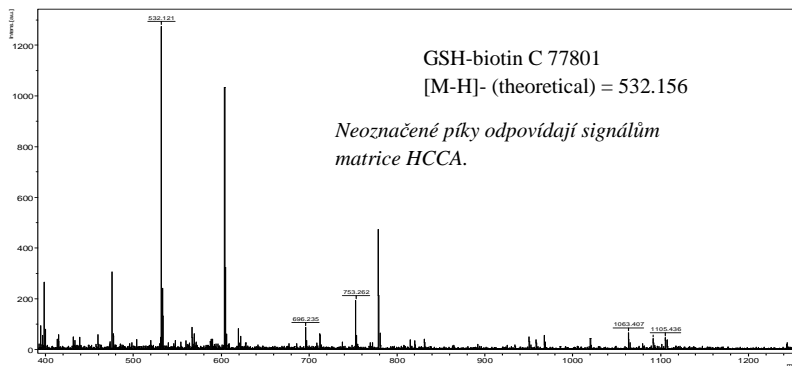
Biotinylace peptidu byla provedena manuálně na N-konci sekvence. Navážka byla 0,19 mg. Biotin byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu za současného mírného zahřívání roztoku pod tekoucí vodou až do úplného rozpuštění biotinu. Aktivátory a roztoky byly nadávkovány obvyklým způsobem. Roztok biotinu byl do reakce přidán manuálně. Reakce probíhala za standardních podmínek (biotin: HBTU : HOBt : DIPEA = 1 : 1 : 0,5 : 2) a času (30 minut).

Závěrečná úprava peptidu zahrnovala štěpení sekvence od resinu, štěpení chránících skupin OtBu a Trt z gama glutamové kyseliny a cysteinu, precipitaci peptidu z roztoku a jeho lyofilizaci. Především štěpení a precipitace byly v případě GSH velmi riskantní, neboť peptid obsahuje cystein, který je velmi náchylný k oxidaci. Sekvence je navíc poměrně krátká. Při předchozím pokusu syntézy samotného glutathionu se nepodařilo peptid vysrážet, takže výtěžek byl prakticky nulový. Obecně platí riziko, že právě velmi krátké peptidy bývá obtížné vysrážet z roztoku TFA a lyofilizovat.

Štěpení biotin–glutathionu proběhlo v koncentrované TFA. K potlačení vedlejších reakcí během štěpení byly zvoleny následující přísady: voda (HPLC grade), fenol, triisopropyl silan a 3,6-dioxo-1,8-oktandithiol (89:2:5:2:2). Tyto chemikálie mají za úkol eliminovat uvolněné reaktivní zbytky chránících skupin, které mohou být velmi reaktivní a modifikovat vedlejší řetězce aminokyselin a tím způsobovat tvorbu nežádoucích vedlejších produktů. Doba štěpení byla vzhledem k přítomnosti cysteinu 2 hodiny. Poté byl roztok TFA dekantován petroleterem a vysrážen dietyléterem. Ve srovnání se syntézou samotného glutathionu, vysrážení biotin–glutathionu z roztoku TFA proběhlo poměrně dobře, pravděpodobně díky přítomnosti biotinu, který zvýšil molekulovou hmotnost celého peptidu.

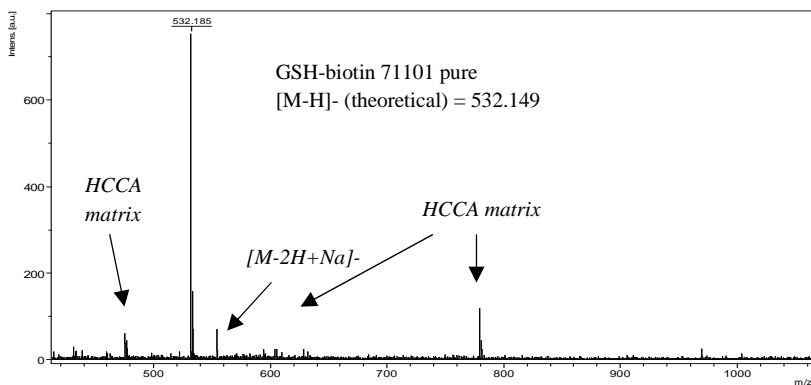
Identifikace peptidu a vedlejších produktů byla provedena na MALDI-TOF MS. Kvantifikace byla provedena na HPLC. Obě analýzy byly vzhledem k délce peptidu poměrně obtížné. Výsledek MALDI-TOF MS je na obrázku 1.

Obr.1: MALDI TOF-MS surového biotinylovaného peptidu glutathionu. Neoznačené píky odpovídají signálům matrice HCCA. Pík s relativní molekulovou hmotností 1063,407 g/mol odpovídá S-S dimeru.



Při většině MS analýz byl signál hlavního produktu potlačen v porovnání se signálem matrice a objevil se také minoritní pík disulfidického můstku. Byla proto odebrána čistá frakce biotin-GSH a podrobena analýze. Viz obrázek 2.

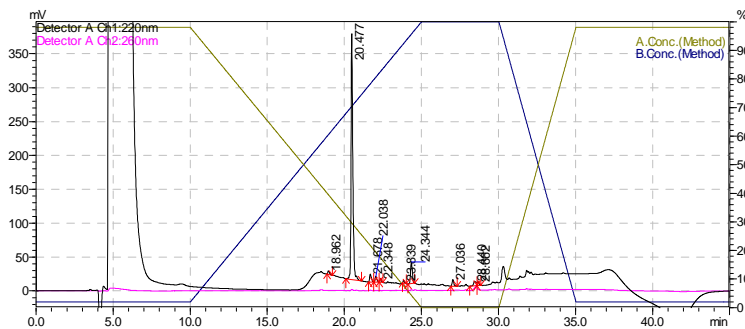
Obr.2: MALDI TOF-MS čisté frakce biotin-glutathionu.



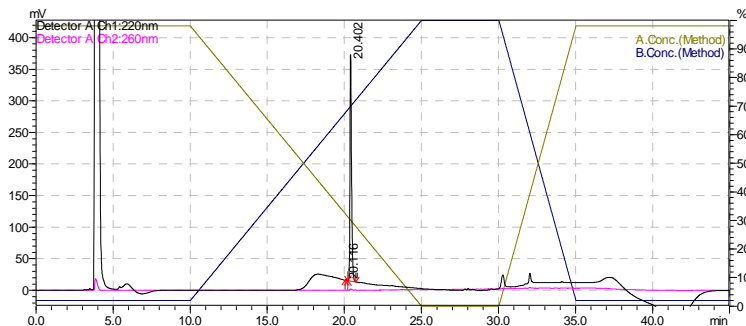
K rozpuštění vzorků pro analýzu a purifikaci byl použit DMF nebo kyselina mravenčí a následně naředění 0,1% roztokem TFA.

Z HPLC chromatogramu byla zjištěna výsledná čistota surového produktu více jak 80 %. Přečištěním se dosáhlo čistoty více jak 98 %. Viz obrázky 3 a 4.

Obr.3: HPLC chromatogram surového peptidu. V retenčním čase 4-8 minut je pík DMF.



Obr.4: HPLC chromatogram čistého peptidu. V retenčním čase 4 minuty je pík DMF, v čase 30 a 32 minut je nečistota z mobilní fáze, která není přítomna v původním peptidu.

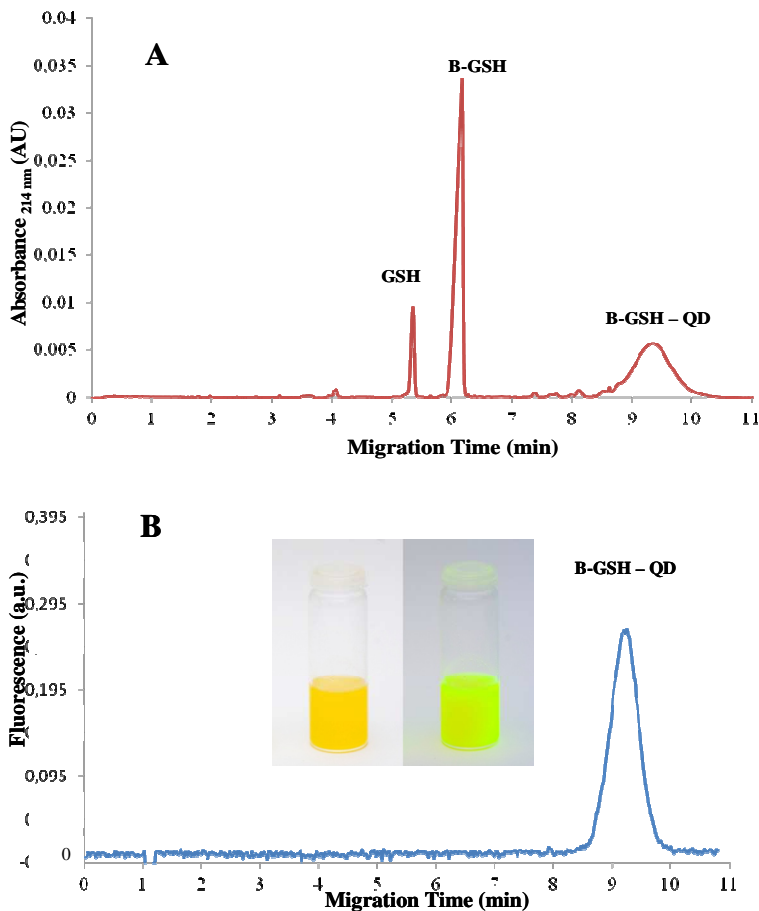


Příprava kvantových teček v prostředí vody a modifikace peptidem

Kvantové tečky byly připraveny reakcí ve vodném prostředí. Výhodou této metody je, že se provádí současně s modifikací povrchu kvantových teček. Struktura glutathionu umožňuje nekovalentní specifickou vazbu peptidu na povrch kvantových teček přes SH skupinu cysteinu. Kvantové tečky jsou tímto způsobem vybavené funkčními skupinami COOH a NH₂. Taktó upravená kvantová tečka je dobře rozpustná ve vodě a netoxická.

Syntézy probíhaly za následujících podmínek: 330 μ l roztoku CdCl₂ (0,04 mol/L) bylo zředěno 2,5 ml vody. Za stálého míchání bylo následně přidáno: 8 mg citrátu sodného, 330 μ l Na₂TeO₃ (0,01 mol/L), 15 mg biotin-GSH a 3,3 mg NaBH₄. Reakce probíhala při teplotě 95 $^{\circ}$ C po dobu 2,5 hodiny. Výsledkem byl žlutý koloidní roztok kvantových teček pokrytých modifikovaným peptidem. Komplex biotin-GSH-kvantová tečka byl analyzován na CE (Beckman Coulter, PACE 5500) při vlnové délce 214 nm, LIF (Ar⁺, λ_{ex} -488 nm/ λ_{em} -530 nm). Výsledný elektroferogram je na obrázku 5. Roztok modifikovaných QD pod běžným světlem (vlevo) a pod UV lampou (vpravo).

Obr.5: A) Elektroferogram biotin-GSH-QD. B) LIV detekce biotin-GSH-QD pod běžným světlem (vlevo) a UV zářením (vpravo).



ZÁVĚR

Byla provedena syntéza modifikovaného peptidu biotin-glutathion a jeho navázání na povrch kvantových teček. Současně byla provedena podrobná analýza samotného peptidu a komplexu peptid-kvantová tečka. Bylo zjištěno, že výsledná reakční směs obsahuje jak komplex kvantová tečka-peptid, tak také samotný peptid a samotné kvantové tečky. Do určité míry dochází také k agregaci kvantových teček, což může být způsobeno povrchovými defekty v důsledku syntézy. Vzhledem k těmto skutečnostem by při dalších pokusech bylo vhodné optimalizovat podmínky

syntézy a modifikace kvantových teček z důvodu eliminace agregace. K získání čisté frakce bude zapotřebí zavést metodiku purifikace komplexu peptid-kvantová tečka.

LITERATURA

1. Junling, D, et al.: One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties, *Nano Res* (2009) 2: 61-68.
2. Jing Z. et al.: Fluorescent quantum dot-labeled aptamer bioprobes specifically targeting mouse liver cancer cells. *Talanta* 81 (2010) 505–509.
3. Weibin, Z., et al.: Single-Pot biofabrication of Zinc Sulfide Immuno-Quantum Dots. *J.AM. CHEM.SOC.* 2010, 132, 4731 – 4738.
4. Aaron, R., C., et al.: Capping of CdSe–ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins. *NATURE PROTOCOLS, VOL.1, NO.3, 2006*, p. 1258-1256.
5. Monika B., et al.: Highly Fluorescent Streptavidin-Coated CdSe Nanoparticles: Preparation in Water, Characterization, and Micropatterning. *Langmuir* 2004, 20, 3828-3831.
6. Chuang, Ch., et al.: Quantum-dot-based immunofluorescent imaging of HER2 and ER provides new insights into breast cancer heterogeneity. *Nanotechnology* 21 (2010) 095101 (6pp).
7. Ravindra, P., S., et al.: Application of peptide nucleic acid towards development of nanobiosensor arrays. *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 153–161.
8. Wei, J., J., et al.: Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions. *Chem. Commun.*, 2005, 883–885 | 883.
9. Min Z., et al.: Current trends in Peptide Science - Quantum Dots and Peptides: A Bright Future Together. *PeptideScience Volume 8 / Number 3, 2006*, p. 325 – 338.
10. Kersten, S., R., et al.: Selective Covalent Conjugation of Phosphorothioate DNA Oligonucleotides with Streptavidin. *Molecules* 2011, 16, 6916-6926.