



## **$\gamma$ -globulin-Au/Ag nanoklaszterek: az ezüst tartalom hatása az optikai sajátságokra és a szenzorikai szelektivitásra**

TDK dolgozat

**Szerző: Torma Bianka<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Kémia alapszak III. évfolyam

**Témavezetők: Janóné Dr. Ungor Ditta Anita<sup>1</sup>, Juhászné Dr. Csapó Edit<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Tudományos munkatárs, Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

<sup>2</sup>Egyetemi adjunktus, Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Lezárva: 2023. január 8.

## Tartalmi összefoglaló

Az elmúlt évtizedekben a nanoszerkezetű anyagok szintézise és vizsgálata az anyagtudományi kutatások egyik legdinamikusabban fejlődő tématerületévé vált. A méretcsökkenés hatására újonnan megjelenő előnyös tulajdonságoknak köszönhetően a mindennapi élet számos területén, *pl.* az orvosi diagnosztikában is nagy sikerrel alkalmazhatóak. Kutatócsoportunk munkatársai a korábbi években eredményesen állítottak elő olyan  $\gamma$ -globulin immunfehérjével stabilizált fluoreszcens arany nanoklasztereket, melyek alkalmasak voltak a triptofán aminosav *ún.* kinurenin metabolikus körfolyamatában található egyik legjelentősebb molekulának, az *L*-kinureninnek a szelektív kimutatására. Ezen molekula koncentrációjának mérése a klaszterek vörös emissziójának kioltásán alapult, ezzel megnyitva az utat egy potenciális optikai bioszenzor fejlesztéséhez [1].

Ehhez a kutatási témához kapcsolódva, tudományos diákköri munkám legfontosabb feladataként tűztük ki célul, hogy a stabilizáló fehérje megtartása mellett, ezüst hozzáadásával Au/Ag ötvözet klasztert állítsunk elő. Munkám során elvégeztük a  $\gamma$ -globulinnal stabilizált, fluoreszcens Au/Ag nanoklaszterek fizikai-kémiai jellemzését. Megvizsgáltuk a klaszterek stabilitását dinamikus fényszórás és  $\zeta$ -potenciál mérésekkel különböző pH-jú közegekben, melyből kiderült, hogy a pH = 7,0–12,0 tartományon a klaszterek kevésbé hajlamosak az aggregációra. Ezzel ellentétben megfigyeltük, hogy pH = 4–5 tartományon szemmel látható aggregáció következett be, ezért töltéstitrálással meghatároztuk a klasztert stabilizáló fehérje izoelektromos pontját a klaszter képződése előtt és után. A mérések rámutattak arra, hogy a klaszter képződést követően a fehérje izoelektromos pontja a savas tartomány felé tolódott  $\sim 1$  pH egységgel. Mindezek mellett tanulmányoztuk a klaszterek NaCl sótűrését 0,0–2,5 M koncentráció tartományon, melynek eredménye rámutatott, hogy a növekvő sókoncentráció enyhén növeli a fluoreszcencia intenzitást a kismértékű aggregációnak köszönhetően. Mindezen vizsgálatok mellett tanulmányoztuk, hogy a megváltozott kémiai összetétel, ezáltal a megváltozott optikai sajátságok milyen hatással bírnak a kinurenin útvonal molekuláival szembeni szelektivitásra.

A fentnevezett szenzorikai méréseket foszfát-pufferben (pH = 7,40; 0,9 w% NaCl) és mesterséges agyvízben (aCSF) is elvégeztük. Mindkét közegben azt tapasztaltuk, hogy a kinurenin útvonal metabolitjai közül az *L*-kinureninből képződő kinurénsav hatására mérhető a legnagyobb mértékű fluoreszcencia kioltás, mely rámutat arra, hogy az arany egy részének ezüstre cserélése révén a szelektivitás hangolható. A klaszterek szelektivitásának felderítése mellett meghatároztuk a kinurénsav legkisebb kimutatható mennyiségét (limit of detection/LOD) és a fluoreszcencia élettartalmát is az egyes közegekben, mely elősegítheti a kioltás természetének alaposabb megértését.

# Tartalomjegyzék

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tartalmi összefoglaló.....</b>                                           | <b>2</b>  |
| <b>Rövidítések jegyzéke.....</b>                                            | <b>4</b>  |
| <b>1. Irodalmi áttekintés.....</b>                                          | <b>5</b>  |
| 1.1. Nanoszerkezetű anyagok jellemzése.....                                 | 5         |
| 1.2. Nemesfém nanorészecskék optikai tulajdonságai.....                     | 5         |
| 1.3. Nemesfém nanorendszerek előállítása.....                               | 6         |
| 1.4. Arany-ezüst nanoklaszterek jellemzése, szenzorikai felhasználásuk..... | 7         |
| 1.5. Kinurenin útvonal.....                                                 | 9         |
| <b>2. Céltűzés.....</b>                                                     | <b>11</b> |
| <b>3. Felhasznált anyagok és szintézismódszerek.....</b>                    | <b>12</b> |
| 3.1. Vegyszerek.....                                                        | 12        |
| 3.2. Immunfehérjével stabilizált arany-ezüst nanoklaszterek szintézise..... | 13        |
| <b>4. Vizsgálati módszerek.....</b>                                         | <b>14</b> |
| 4.1. Fluoreszcencia spektroszkópia.....                                     | 14        |
| 4.2. Dinamikus fényszórás (DLS) és $\zeta$ -potenciál (ZP) mérés.....       | 16        |
| 4.3. Töltéstitrálás.....                                                    | 16        |
| <b>5. Eredmények és kiértékelésük.....</b>                                  | <b>17</b> |
| 5.1. $\gamma$ G-stabilizált arany-ezüst nanoklaszterek jellemzése.....      | 17        |
| 5.1.1. Az ezüst ionok hatása az optikai jellemzőkre.....                    | 17        |
| 5.1.2. Léptékhatás vizsgálata.....                                          | 19        |
| 5.1.3. Stabilitás vizsgálat.....                                            | 20        |
| 5.2. Szenzorikai vizsgálatok.....                                           | 23        |
| <b>6. Összefoglalás.....</b>                                                | <b>28</b> |
| <b>7. Köszönetnyilvánítás.....</b>                                          | <b>29</b> |
| <b>8. Irodalomjegyzék.....</b>                                              | <b>30</b> |

## Rövidítések jegyzéke

**aCSF** (artificial cerebrospinal fluid): mesterséges agy-gerincvelő folyadék

**ATP** (adenosine-5'-triphosphate): adenzin-5'-trifoszfát

**$\beta$ -Lg** ( $\beta$ -lactoglobulin):  $\beta$ -laktoglobulin

**DLS** (dynamic light scattering): dinamikus fényszórás

**$\gamma$ G** (gamma ( $\gamma$ ) globulin immunfehérje

**IgG**: immunglobulin G

**Kyna** (kynurenic acid) kinurénsav

**LCE** (ligand-centered emission): ligandum központú emisszió

**LOD** (limit of detection): kimutatási határ

**LSPR** (localized surface plasmon resonance): lokalizált felületi plazmon rezonancia

**MCE** (metal-centered emission): fém központú emisszió

**MilliQ**: ultratiszta víz

**NAD** (nicotinamide adenine dinucleotide): nikotinamid-adenin-dinukleotid

**NCs** (nanoclusters): nanoklaszterek

**NPs** (nanoparticles): nanorészecskék

**PBS** (phosphate buffered saline): foszfát puffer

**PCD** (particle charge detector): részecske töltés detektor

**TCSPC** (time-correlated single photon counting): idő-korrelált egy-foton számlálás

***L*-Trp** (*L*-tryptophan): *L*-triptofán

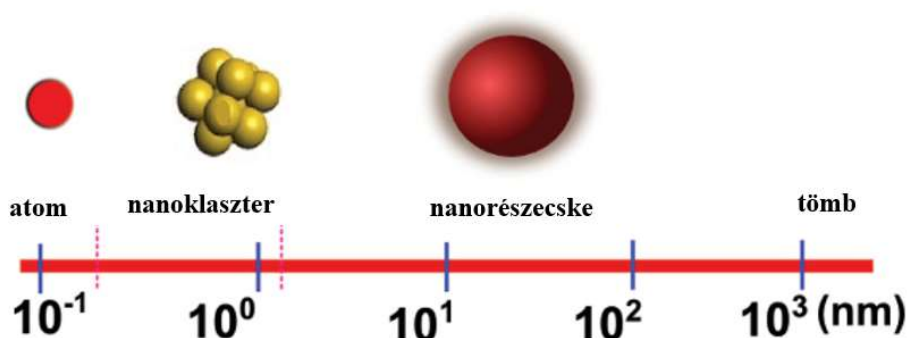
**UV-Vis** (ultraviolet-visibel): ultraibolya-látható

**ZP** (zeta potential): zéta ( $\zeta$ )-potenciál

## 1. Irodalmi áttekintés

### 1.1. Nanoszerkezetű anyagok jellemzése

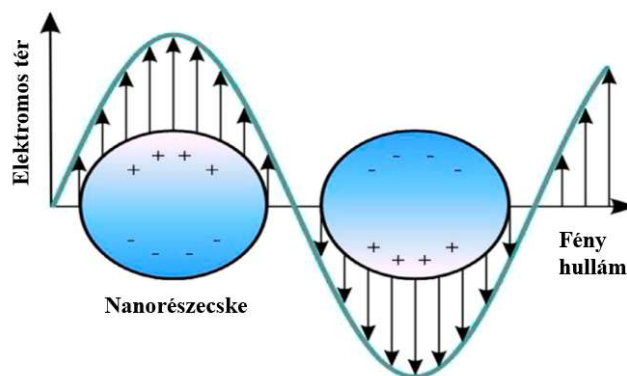
A nanométeres ( $10^{-9}$  m) mérettartományú anyagok vizsgálata közkedvelt kutatási témává vált az elmúlt években. Népszerűsége abban rejlik, hogy a tömbfázishoz képest, a méretcsökkenés hatására az anyagok fizikai-kémiai sajátosságai megváltoznak, emellett pedig új tulajdonságok is megjelennek. A nanorészecskék elnevezés (nanoparticles, NPs) olyan anyagokat foglal magában, melyeknek legalább az egyik dimenziója 100 nm alatti mérettel rendelkezik (**1. ábra**). Általánosságban elmondható, hogy egy klasszikus egyfémes részecskében két fontosabb, fő réteget különíthetünk el: **a központi mag**, ez határozza meg magát a részecskét, és **a felületi réteg**, mely többek között számos kismolekulával, fémionnal, felületaktív anyaggal, valamint polimerrel funkcionálizálható [2].



**1. ábra:** Az egyes anyagtípusok mérettartománya a tömbfázistól az atomig [3].

### 1.2. Nemesfém nanorészecskék optikai tulajdonságai

A nemesfém nanorészecskéket, különösen az arany és ezüst tartalmú rendszereket, számos területen alkalmazzák, köszönhetően egyedi optikai tulajdonságuknak, amely a lokalizált felületi plazmon rezonancia (localized surface plasmon resonance, LSPR). Ennek alapja az, hogy nemesfém nanorészecskék a látható fény fotonjaival intenzív kölcsönhatásba lépnek, így a részecskét alkotó atomokat körülvevő szabad, vezető elektronok oszcillációja következik be. Az oszcilláció rezonánssá válik, ha a rezgés frekvenciája megegyezik a besugárzó fény elektromágneses terének frekvenciájával (**2. ábra**). A plazmon rezonancia spektrumok spektrofotometriával detektálhatók, melyek hasznos információt adnak a nemesfém nanorészecskék összetételéről, méretéről és alakjáról [4]. A gömb alakú arany nanorészecskék karakterisztikus plazmon módusa  $\lambda_{\max} = 500\text{--}550$  nm tartományon, míg az arany/ezüst ötvözet nanorészecskék esetén  $\lambda_{\max} = 390\text{--}550$  nm tartományban azonosítható azok szerkezetétől, méretétől és összetételétől függően [5,6].



2. ábra: A lokalizált felületi plazmon rezonancia jelensége [2].

### 1.3. Nemesfém nanorendszerek előállítása

A fémtartalmú (Au, Ag, Pt, Cu) nanostruktúrált rendszerek fizikai és kémiai sajátosságai nagy mértékben függenek összetételüktől, méretüktől, alakjuktól, illetve az elkészítés és összeállítás módjától is. Ennek következtében a legfontosabb optikai tulajdonságaik könnyen szabályozhatóak a méret és a felületi ligandumok szabályozásával. Nanorészecskék előállítására két fő módszert alkalmaznak az irodalomban. Az egyik az ún. „top-down” módszer, másnéven „fentről lefele építkezés”. Ezt általában valamilyen fizikai eljárással (pl. nanoörlés, maratás) érik el. A másik módszer az ún. „bottom-up” szintézis, vagyis „lentől felfele építkezés”, melyet a nedves-kémiai eljárásokhoz sorolhatunk. Ilyen esetben, ha redukálószerként olyan molekulákat használunk a szintéziseknél, melyek biológiai rendszerekben is jelen vannak (pl. fehérjék), a képződő nanorendszerek fiziológiai körülmények között is nagy stabilitást mutatnak, ezen kívül közvetlenül funkcionálizálhatók a szintézis alatt. Ha a redukálószer adagolása a prekursor fémsóval ekvivalens mennyiségben történik, a keletkező termék gyakorta olyan plazmonikus sajátossággal rendelkező nanorészecske lesz, melynek átlagos mérete 2 nm-nél nagyobb. Ezzel szemben, ha a redukálószer adagolása nagy feleslegben történik, akkor fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező, ún. a nanoklaszterek (nanoclusters, NCs) kialakulása a preferáltabb, melyek primer fémmagja 2 nm-nél kisebb, akár a szub-nanométeres mérettartományba is eshet. Átlagosan néhány atómtól néhány tíz atomig terjed a méretük [7,8] mivel a redukálószer felesleg sztérikus gátolja a részecskék nagyobb (2 nm feletti) méretre történő növekedését.

Ezen kicsiny részecskék fluoreszcens sajátossága egyedi szerkezetükből adódik. Mivel az atomok száma igen kevés a fémmagban, a folytonos vezetési sáv, mely a fémes részecskék egyik szerkezeti jellemzője, nem alakul ki, helyette hibrid pályák képződnek a fémmag és a stabilizáló ligandum donorcsoportjainak részvételével. Ennek eredményeként a kialakuló szub-nanométeres fémmagok

„molekulaszerű” viselkedést mutatnak. A lumineszcens fém nanoklaszterek további jellemzője *pl.* az emisszió és abszorbanancia maximumok közötti nagy Stokes-eltolódást, a jó fotostabilitás és biológiai kompatibilitás [9,10]. Ezen sajátságok mellett a kimagasló kvantum hasznosítás pedig lehetőséget ad optikai szenzorok, biológiai képalkotók, fotoszenzibilátorok és fénykibocsátó eszközök (LED-ek) tervezésére.

#### **1.4. Arany-ezüst nanoklaszterek jellemzése, szenzorikai felhasználásuk**

A fémes nanoklaszterek (NCs) tulajdonságaik és optikai sajátságai széles skálán hangolhatóak a központi fématom(ok) minőségének és mennyiségének változtatásával. Különösen az arany és ezüst tartalmú klasztereket alkalmazzák sikerrel széles körben *pl.* érzékelés, katalízis, biológiai jelölés és biológiai fluoreszcens képalkotás területén. Az arany nanoklaszterek főként a stabilitásuk és biokompatibilitásuk miatt kerültek a figyelem középpontjába, míg az ezüst nanoklaszterek magas elektromos vezetőképességüknek és kiemelkedő fotolumineszcens tulajdonságaiknak köszönhetően lehetnek érdekesek. Emellett nem elhanyagolható az ezüst azon előnyös tulajdonsága sem, hogy sokkal olcsóbb az aragnál [11]. A szakirodalomban számos példát találunk, mely igazolja, hogy már sikeresen állítottak elő fehérjékkel, biológiai kismolekulákkal stabilizált arany, ezüst és arany-ezüst tartalmú nanoklasztereket szenzorikai célokra. Ezen optikai érzékelők fő komponense lehet az előállított fluoreszcens klaszter, mivel a lumineszcens sajátságok (hullámhossz és intenzitás) nagymértékben érzékenyek a kémiai környezetre (*pl.* a pH vagy az ionerősség változása), így ez a sajátosság kiválóan jelzi a detektálni kívánt mintával való kölcsönhatás létrejöttét [12]. A szenzorikai mérések során a „bekapcsolás” (turn-on) és „kikapcsolás” (turn-off) a két leggyakoribb módszer. A kikapcsolás alapú érzékelők működésének lényege, hogy az analit és a klaszter között létrejövő specifikus kölcsönhatás révén kioltódik a nanoklaszter fluoreszcenciája. A bekapcsolás módszer működésének módja a legtöbb esetben pedig az, hogy kezdetben egy inhibitor kötődik a klaszterhez, ennek következtében a minta nem fluoreszkál. A kimutatni kívánt komponens kölcsönhat az inhibitorral, ezáltal szabaddá teszi a klasztert, melynek hatására ismét mérhető a fluoreszcencia intenzitás [7].

A szakirodalomban már számos példát találhatunk ezen klaszter-alapú optikai szenzorok fejlesztésére. X. Han és munkatársai 2019-ben fejlesztettek egy arany nanoklaszter kémiai nyelv szenzor tömböt Alzheimer kór diagnosztizálására [13]. Négy, különböző tiol-tartalmú peptiddel és kismolekulával stabilizált fluoreszcens arany nanoklaszterből állt, melyeket fehérjék kimutatására használtak nanomólos koncentrációkban. Bizonyították, hogy ezzel a szenzor tömbbel a fehérjék megkülönböztethetők egymástól még emberi vizeletben is. Emellett az Alzheimer-kóros betegeket sikeresen azonosították egészséges és ízületi porckopásban szenvedő emberek közül ezen bioszenzort alkalmazva.

Ugyanebben az évben X. Li és H. Zhao munkatársaikkal kifejlesztettek egy ezüst-nanoklaszter molekuláris jeladót adenosin-trifoszfát (ATP) detektálására [14]. Létrehoztak egy jelölésmentes (label-free) fluoreszcens szenzort, amely egy hajtű formájú fémtartalmú adduktum két rövid egyszálú DNS-szálat és T4 DNS ligázt tartalmazva. Működésének alapja, hogy a szenzor ATP hiányában magas fluoreszcencia intenzitást mutat. Azonban, ha ATP-t detektál, a két rövid szálú DNS hibridizálódik, kinyitva ezzel a hajtű alakú szerkezetet, amely fluoreszcencia csökkenést okoz. Optimális körülmények között a fluoreszcencia intenzitás csökkenés teljesen lineáris összefüggést mutat az ATP koncentrációval 0,1-10  $\mu\text{M}$  tartományban. Az ismertetett módszer a hagyományos ATP detektálási módszerekhez képest könnyen használható, olcsó és magas érzékenységű.

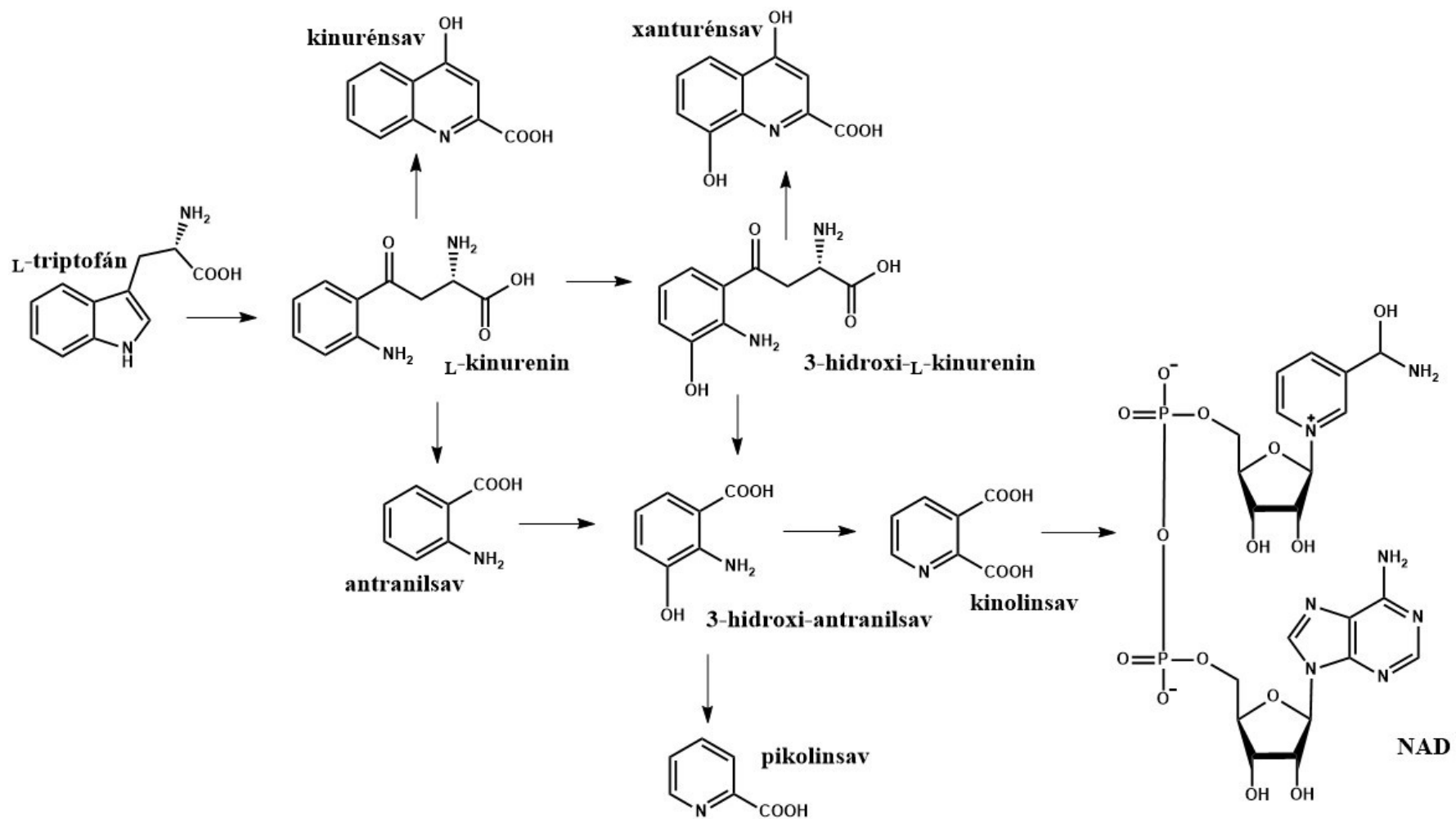
Egy kétfémes klasztert felhasználva ugyancsak 2019-ben B. Han és munkatársai hangolható emissziós sajátságokkal rendelkező arany-ezüst nanoklasztereket állítottak elő *L*-cisztein bekapcsolás („turn-on”) és kikapcsolás („turn-off”) általi detektálására [15]. A redukáló és stabilizáló anyag a  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -Lg) volt. A szenzorikai mérések alapja, hogy az ezüst különböző helyzete a klasztermagban más-más hullámhosszon eredményez fluoreszcencia intenzitás maximumot. Ha a két fém között metallofil kölcsönhatás van jelen, kisebb méretű kétfémes klaszter jön létre, amely a sárga tartományban emittál. Ezzel szemben egy pozitív töltésű ezüst héj létrehozása az arany magon (egy külön lépésben ezüst többlet hozzáadásával) eltolja az emissziót a narancssárga tartományba. Az *L*-cisztein stabilizálja a  $\beta$ -Lg védőhatását, így „bekapcsolja” a sárga emissziót. Ellenben a cisztein és a pozitív töltésű ezüst héj interakciója lerombolja ezt a védőhatást, „kikapcsolva” ezzel a fluoreszcens sajátságot.

Mivel Kutatócsoportunk korábban részletesen tanulmányozta a kinurenin körfolyamatban szerepet játszó neuroaktív vegyületek detektálási lehetőségeit nanoklaszterek alkalmazása révén, így a következő fejezetben ezen molekulák részletesebb bemutatására korlátozódunk.

## 1.5. Kinurenin útvonal

Az *L*-triptofán (*L*-Trp;  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) egyike az emberi szervezet számára szükséges kilenc alapvető aminosavnak. Szerkezetét tekintve az aromás oldalláncú aminosavak közé sorolható az oldalláncban található indol gyűrű miatt. Annak ellenére, hogy ez egy kismértékben előforduló aminosav, fontos szerepet játszik az egészség megőrzésében, például szükséges a fehérjeszintézishez és egyéb neurotranszmitterek kiindulási vegyülete. A kinurenin útvonal (**3. ábra**) során a szervezet a triptofánt különféle neuroaktív metabolitokká alakítja át: többek között *L*-kinurenin, kinurénsav, 3-hidroxy-*L*-kinurein, kinolinsav és nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) keletkezik, melyek jelentős hatással bírnak az idegrendszer megfelelő működésére. Esetenként a **3. ábrán** bemutatott egyes köztitermékek koncentrációjának a normál értékektől való eltérése közvetett kiváltó oka lehet akár daganatos megbetegedéseknek is. Emellett számos neurodegeneratív rendellenesség kialakulását is idővel elindíthatják (pl. Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór) [16].

Ezen molekulák optikai kimutatására 2019-ben tett kísérletet Kutatócsoportunk [1]. Munkatársaink rámutattak arra, hogy a  $\gamma$ -globulin immunfehérjével stabilizált Au nanoklaszterek képesek kölcsönhatásba lépni az *L*-kinurenin molekulával. A kölcsönhatás során a klaszterek elveszítik fluoreszcenciájukat az analit molekulával történő ütközése révén. Meghatározták, hogy az *L*-kinurenin legkisebb kimutatható mennyisége 15 és 22  $\mu$ M foszfát pufferben (pH =7,4) és mesterséges agyvízben (aCSF). Emellett létrehoztak egy ún. „cseppentéses” papírszenzort is, mely alkalmas volt a kérdéses molekula mesterséges agyvízből történő azonnali kimutatására már 5  $\mu$ M koncentrációban is.



3. ábra: A kinurenin útvonal sematikus ábrája a fontosabb metabolitok szerkezeti képletével.

## 2. Célkitűzés

Amint azt az *Irodalmi áttekintésben* is említettük, Kutatócsoportunkban korábban a  $\gamma$ -globulin stabilizált arany nanoklaszter ( $\gamma$ G-Au NCs) szintézismódszerét és szenzorikai felhasználásának kidolgozását sikeresen valósították meg. Ezen kutatómunka folytatásához csatlakozva TDK dolgozatom céljául tűztük ki, hogy a stabilizáló fehérje megtartásával az arany mellett ezüst hozzáadása révén létrejövő új, kétfémes klaszter esetében kiderítsük, hogy tapasztalható-e változás az optikai sajátságokat és a szenzorikai felhasználásokat tekintve. Szerettük volna felderíteni, hogy a kialakuló klaszterekben mekkora arányban találhatók ezüst atomok az arany mellett. Meg kívántuk vizsgálni azt is, hogy a beépülő ezüst pedig hogyan befolyásolja az emisszió helyét, a fluoreszcencia élettartamát és a klaszter kvantumhasznosítását a tiszta arany klaszterek optikai jellemzőihez képest. Dinamikus fényszórás és  $\zeta$ -potenciál mérésekkel terveztük igazolni, hogy az újonnan kialakított ötvözet klaszterek milyen mértékben aggregálódnak a közeg pH-jának függvényében, valamint mennyire képesek tolerálni az ionerősség változását a későbbi biológiai felhasználások érdekében.

Végül szerettünk volna információt nyerni arról, hogy a klaszterek milyen optikai érzékelők fejlesztésére lesznek alkalmasak a jövőben. Mivel a  $\gamma$ G-Au klaszterekkel a triptofán egyik lebontó folyamatában keletkező *L*-kinurenin szelektív kimutatására volt lehetőség, a szenzorikai vizsgálatok célcsoportjának ezen kétfémes rendszer esetén is a kinurenin útvonal metabolitjait választottuk. A szenzorikai mérést kétféle közegben is meg kívántuk vizsgálni, emellett pedig szerettünk volna adatot szolgáltatni arról, hogy mekkora a detektálható molekula vagy molekulák legkisebb kimutatható mennyisége. Fluoreszcencia élettartam mérésekkel a klaszter és az analit molekula közötti kölcsönhatás fizikai-kémiai természetét is felderíteni terveztük.

### 3. Felhasznált anyagok és szintézismódszerek

#### 3.1. Vegyszerek

##### Az arany-ezüst nanoklaszterek előállításához használt anyagok

- hidrogén-tetrakloro-aurát-trihidrát ( $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ; 99,9%, Au 49% min, Alfa Aesar)
- ezüst-nitrát ( $\text{AgNO}_3$ ; >99,9%, Molar)
- gamma globulin szarvasmarha vérből ( $\gamma\text{G}$ ; 99%, Sigma-Aldrich, Serva)
- nátrium-hidroxid mikroszemcsés ( $\text{NaOH}$ ; 99,8%, Molar)
- Sigma – Aldrich cellulóz dialízis csőmembrán (cut-off: 14 kDa)

##### A szenzorikai vizsgálatokhoz használt anyagok

- kinurénsav (Kyna;  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$ ;  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich)
- 3-hidroxi-DL-kinurenin (3-HK;  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ ;  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich)
- L-triptofán (Trp;  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ; 98%, Sigma-Aldrich)
- xanturénsav ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4$ ; 96%, Sigma-Aldrich)
- DL-kinurenin (Kyn;  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ ;  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich)
- antranilsav ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ ;  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)
- 3-hidroxi-antranilsav ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$ ; 97% Sigma-Aldrich)
- kinolinsav ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$ ; 99%, Sigma-Aldrich)
- pikolinsav ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ; 99%, Sigma-Aldrich)
- nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD;  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$ ; 98%, Sigma-Aldrich)

##### Foszfát puffer előállításához használt anyagok

- nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 100%, Molar)
- dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ; 100%, Molar)
- nátrium-klorid ( $\text{NaCl}$ ; 99,6%, Molar)

##### Mesterséges agyvíz előállításához használt anyagok

- nátrium-klorid ( $\text{NaCl}$ ; 99,6%, Molar)
- kálium-klorid ( $\text{KCl}$ ; 100%, VWR Chemicals)
- kálium-dihidrogén-foszfát ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; >99,5%, Reanal)
- nátrium-hidrogén-karbonát ( $\text{NaHCO}_3$ ;  $\geq 95,5\%$ , Sigma-Aldrich)
- D-glükóz-monohidrát ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 99,9%, Molar)
- kalcium-klorid-dihidrát ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 99,98%, Molar)
- magnézium-klorid-hexahidrát ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 99,2%, Molar)

A felhasznált vegyületek analitikai tisztaságúak voltak, így további tisztításra nem volt szükség. Az oldatok elkészítéséhez ultratiszta (Milli-Q, Merck Millipore, Integral3, 18,2 MΩ×cm 25 °C-on) vizet alkalmaztunk.

### **3.2. Immunfehérjével stabilizált arany-ezüst nanoklaszterek szintézise**

A kísérletek során használt klaszterek előállításához 100 cm<sup>3</sup> térfogatú, teflon betétes kupakkal rendelkező mintatartó üvegbe 30 cm<sup>3</sup> MilliQ vizet mértünk, ehhez 0,54 g szilárd γ-globulint adtunk, melyet közepes kevertetés mellett feloldottunk. Ezt követően a térfogat kiegészítése érdekében hozzáadtunk 1,911 cm<sup>3</sup> MilliQ vizet. A következő lépésben történt a fém sók hozzáadása. Elsőnek 1,047 cm<sup>3</sup> 10 mM HAuCl<sub>4</sub> majd 0,102 cm<sup>3</sup> 10 mM AgNO<sub>3</sub> törzsoldatot pipettáztunk a feloldott fehérjéhez kevertetés mellett, ebben a sorrendben. Ezt 15 perc homogenizálás követte. Az idő letelte után 2,4 cm<sup>3</sup> 1 M NaOH-oldatot adtunk a mintához a fémionok redukciójához szükséges bázikus közeg kialakításához, majd szobahőmérsékleten, fénytől elzárva még 24 óráig kevertettük. A szintézist követően a minta tisztítását 14 kDa-os membránnal, 2 dm<sup>3</sup> MilliQ vízben, 2x2 óráig tartó dialízissel végeztük.

*Megfigyelések:* Az arany hatására az addig enyhén fehér és opálos rendszer teljesen átlátszatlanná vált, majd a lúg hozzáadását követően kitisztult. A 24 órás szintézis után a képződött klasztereket tartalmazó vizes diszperzió színe halványsárgára változott.

## 4. Vizsgálati módszerek

### 4.1. Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcencia spektroszkópia a fotolumineszcencia tárgykörébe tartozó vizsgálati módszerek egyike. A fotolumineszcencia során a minta (fluorofór) elektronjai ultraibolya (UV) vagy látható fény (Vis) hatására gerjesztődnek, tehát  $S_0$  alapállapotból egy nagyobb energiájú  $S_1$  elektronpályára jutnak. A fluoreszcencia az a folyamat, amikor a gerjesztett molekulák egy fluoreszcens foton kibocsátása útján térnek vissza alapállapotba (relaxálódnak), spinkvantumszám-változás nélkül ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). A sugárzás energiája arányos az alap és gerjesztett állapot közötti energiakülönbséggel.

A folyamat során kisugárzott fotonok tulajdonságai, mint a hullámhossz, mennyiség (intenzitás) illetve ezek változásai, számunkra szolgáltak fontos információval a mérések folyamán. A változásért felelhet hőmérséklet, nyomás, pH, ionerősség vagy koncentráció változás, esetleg atomok, ionok vagy molekulák kölcsönhatása a mintával. A fotonok intenzitását megváltoztató tényezők lehetnek kioltók (quencher) vagy fokozók (enhancer). Mivel a szakdolgozat témája az előállított klaszterek fluoreszcencia-kioltással történő optikai bioszenzorként való felhasználásán alapul, így a következőkben a kioltás jelenségének részletes bemutatása történik.

A fluoreszcencia-kioltási folyamatok a Stern-Volmer egyenlettel értelmezhetők:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

ahol az  $I_0$  a kioltó nélküli kezdeti,  $I$  pedig a kioltó jelenlétében mért intenzitás.  $K_{SV}$  a Stern-Volmer állandó, illetve  $[Q]$  a kioltó egyensúlyi koncentrációja<sup>1</sup>.

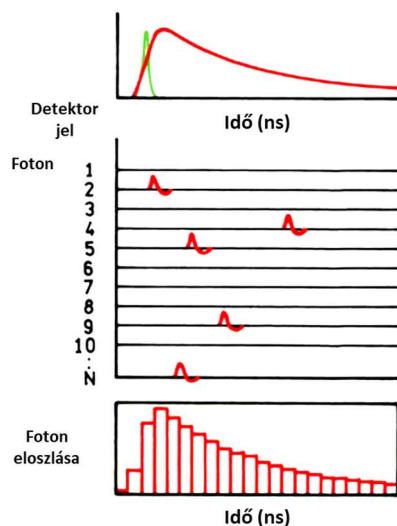
A kioltás természetét tekintve lehet sztatikus, dinamikus vagy ezen két folyamat keveréke is. Sztatikus kioltás esetén a fluorofór és a kioltó között már alapállapotban létrejön egy nem fluoreszkáló (sötét) komplex. Mivel a gerjesztett állapotban töltött idő változatlan – csupán a fluorofórok száma csökken, így sztatikus kioltás során a fluorofór élettartalma a kioltó jelenlétében nem változik.

A másik kioltási folyamat a dinamikus vagy másnéven ütközéses kioltás. Ebben az esetben a kioltó közel kerül a gerjesztett fluorofórhoz, majd ütközés révén a fluorofór elveszíti többletenergiáját. Ilyenkor a fluorofór fluoreszcencia élettartama ( $\tau$ ) megváltozik a kioltó jelenlétében, mivel itt a gerjesztett állapotban töltött idő csökken le az ütközések hatására.

<sup>1</sup> Általánosságban az egyensúlyi koncentrációk meghatározására szolgáló független mérések hiányában a kioltó analitikai koncentrációját szokták alkalmazni  $[Q]$  helyett.

A fluoreszcencia spektrumokat egy Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 típusú spektrofluorométerrel rögzítettük, 2,0 nm-es slit értékkel. A léptékhatás vizsgálatához pedig egy JASCO FP-8500 típusú műszert használtunk, 2,5–2,5 nm-es slit értékekkel és 200 nm/min pásztázási sebességgel. A mérésekhez mindkét esetben 1 cm optikai úthosszú négyoldalú semi-micro kvarc küvettát használtunk, amiben a mintákat 350 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettük és az intenzitás maximumot 630–640 nm körüli hullámhosszon kaptuk.

A minták fluoreszcencia élettartamának mérésére ún. idő-korrelált egy-foton számlálást (TCSPC: time-correlated single photon counting) alkalmaztunk. Működésének elve, hogy egy a gerjesztő impulzusból származó start jellel elindítunk egy idő-amplitúdó konvertert, amelyet leállítunk miután detektáltuk az első fotont (**4. ábra**). Ezt az eljárást kellően sokszor megismételve, egy hisztogramot kapunk, amely kirajzolja a beérkezett fotonok idejét vagyis azok fluoreszcencia lecsengését. Így megkapjuk a két esemény közötti időkülönbséget.



**4. ábra:** A TCSPC mérés technika sematikus alapja [17].

A gerjesztéshez 371 nm-es lézerfényt alkalmaztunk 20 kHz ismétlési frekvenciával. A minták emisszióját 630 nm hullámhosszon vizsgáltuk 8 nm résszélesség és 6,2  $\mu$ s időablak mellett. A fluoreszcencia lecsengési görbék kiértékelését egy háromexponenciális (**2. egyenlet**) egyenlet illesztésével végeztük el:

$$A + B_1 \cdot e^{\frac{-t}{T_1}} + B_2 \cdot e^{\frac{-t}{T_2}} + B_3 \cdot e^{\frac{-t}{T_3}} \quad (2)$$

ahol  $T_1$ ,  $T_2$  és  $T_3$  értékek az egyes fluoreszcencia élettartam komponensek, a  $B_1$ – $B_3$  értékek pedig az egyes komponensek hozzájárulását adják meg a teljes fluoreszcenciához.

## 4.2. Dinamikus fényszórás (DLS) és $\zeta$ -potenciál (ZP) mérés

A dinamikus fényszórás méréssel a részecskék hidrodinamikai átmérője határozható meg vizes közegben. A mintát He-Ne lézerrel világítjuk meg és a szórt fény időbeli változását mérjük. A megfigyelt térrészben a részecskék Brown-mozgásának következtében folyamatosan változik a szórt fény intenzitása. A Brown-mozgás sebessége arányos a részecskék méretével, ugyanis a kisebb részecskék lassabban, míg a nagyobbak gyorsabban mozognak. A mért adatokból egy autokorrelációs függvény létrehozásával, a ZetaSizer program segítségével meghatározhatjuk a részecskék hidrodinamikai átmérőjét ( $d$ ), diffúziós együtthatóját *ill.* a méreteloszlását.

A  $\zeta$ -potenciál méréshez a felületi töltéssel rendelkező részecskéket elektromos erőterbe helyezünk. Ilyenkor elhasad a részecskéket körülvevő ionatmoszféra, ennek következtében potenciálkülönbség jön létre a hasadási sík és az oldat belseje között. Ez a potenciál a zéta potenciál ( $\zeta$ -potenciál, ZP), melynek abszolútértéke a részecskék kinetikai stabilitásával van összefüggésben. A magas abszolútértékű ZP kinetikailag stabil részecskékre utal, míg az alacsony ZP értékű kolloid rendszerek koagulálásra *ill.* flokkulálásra lehetnek hajlamosak. Általánosságban megfelelő kinetikai stabilitásról kb. 15 mV ZP érték felett beszélünk, ha a részecskét valamilyen jóldefiniált biomolekula réteggel (*pl.* fehérje, polimer korona) stabilizáljuk [18].

A DLS és  $\zeta$ -potenciál méréseket egy Malvern NanoZS műszerrel ( $\lambda=633$  nm He-Ne lézer) végeztük,  $25 \pm 0,1$  °C hőmérsékleten. A mért paraméterek értékét minden esetben 5–5 mérés átlagaként számítottuk.

## 4.3. Töltéstitrálás

Az *ún.* részecske töltés detektor (Particle Charge Detector (PCD)), egy elektromosan töltött részecskéket tartalmazó diszperziók mérésére alkalmas technika. A műszer hengeres teflonedényben egy teflon-oszlop által mozgást generál a mintában, amely hatására a részecskék körüli elektromos kettősréteg nyírásából a tefloncső falában elhelyezkedő elektródon potenciálkülönbség mérhető (mV). Ezen eljárást pH-méréssel összekötve lehetőség nyílik a fehérjék, valamint fehérje tartalmú rendszerek izoelektromos pontjának meghatározására.

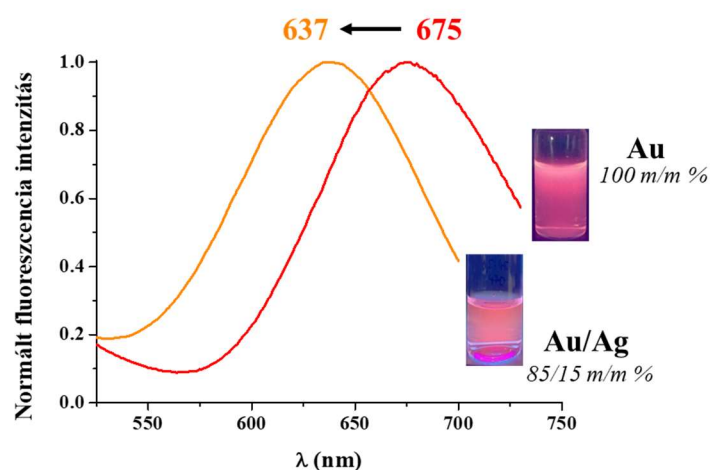
A méréseket egy Mütek PCD 04 töltéstitrátorral végeztük el.  $20 \text{ cm}^3$  kezdeti mintatérfogathoz a pH növelése érdekében NaOH-, illetve pH csökkentéséhez HCl-oldatot adagoltunk és fél pH egységenként mértük a potenciált. A tiszta fehérje és a klaszter titrálásakor is az eredeti recept szerinti mennyiséget hatszorosára hígítottuk, így mindkét esetben  $2,54 \text{ mg/cm}^3$  fehérje koncentrációval dolgoztunk.

## 5. Eredmények és kiértékelésük

### 5.1. $\gamma$ G-stabilizált arany-ezüst nanoklaszterek jellemzése

#### 5.1.1. Az ezüst ionok hatása az optikai jellemzőkre

Munkám első szakaszában a kétfémes Au/Ag ötvözet klaszterek reprodukív szintézisét végeztem el; a Kutatócsoport munkatársai ezen anyag előállítási folyamatát már korábban részben optimalizálták. A szintézisek, tisztítási lépések elsajátítása után összevetettük az új, kétfémes klaszter optikai sajátosságait a tisztán Au-tartalmú  $\gamma$ G-stabilizált klaszterével.



**5. ábra:** A  $\gamma$ G-stabilizált Au és Au/Ag nanoklasztereket tartalmazó vizes diszperziók normált emissziós spektrumai az emissziós maximumok feltüntetésével és a minták UV-lámpa alatti fotói ( $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm).

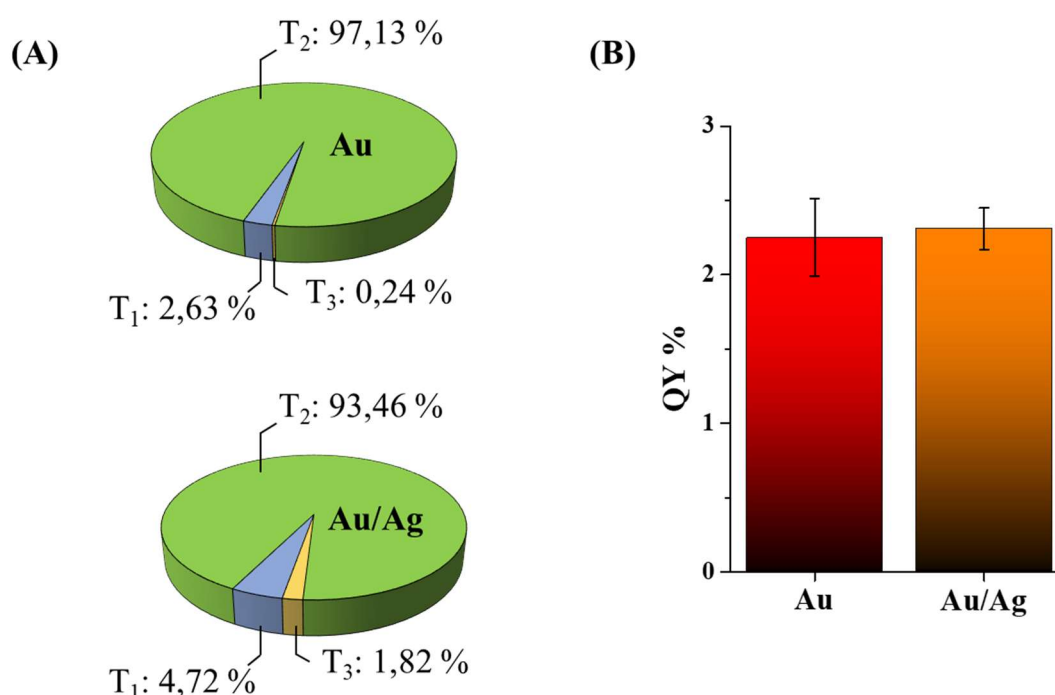
Amint az az **5. ábrán** is látható, mintegy 15 m/m % Ag tartalom hozzáadásának hatására az emissziós sajátosságok a vörös tartományból ( $\lambda_{\text{em}}(\text{Au}) = 675$  nm) a narancs tartományba ( $\lambda_{\text{em}}(\text{Au/Ag}) = 637$  nm) tolódtak. A biológiai rendszerekben történő alkalmazhatóság kritériumai (*pl.* „optikai ablak”:  $\lambda_{\text{em}} > 600$  nm) az ötvözet klaszter kialakítását követően továbbra is érvényesek. Ezen változások alapján méréseket végeztünk a klaszterek fluoreszcencia élettartamának meghatározására is, ahol azt tapasztaltuk, hogy mindkét klaszternél 3-3 exponenciális taggal szükséges illeszteni a lecsengési görbéket. Az illesztések alapján meghatároztunk egy rövid ( $T_3$ ), egy közepes ( $T_1$ ) és egy hosszabb ( $T_2$ ) élettartam komponenset, melyek eltérő mértékben járulnak hozzá a minták teljes fluoreszcenciájához. Jól ismert, hogy a rövid komponensek a klasztermagokra jellemző átmenetek, míg a hosszabb  $T$  értékek a stabilizáló ligandumtól függő sajátosságok.

Az **1. táblázat** alapján látható, hogy a kétfémes klaszter esetén is hasonló tendenciát mutatnak az élettartam komponensek. Mindkét klaszternél azonosítható egy-egy rövid élettartam ( $T_3$ ), amely a

fémagokra jellemző. A  $T_1$ -ként azonosított komponens vélhetően a fémközpontú (*fém*→*ligandum*), míg a  $T_2$  komponens a ligandumközpontú (*ligandum*→*fém*) átmenetekre jellemző.

**1. táblázat:** A lecsengési görbékből meghatározott élettartam komponensek ( $T_1$ – $T_3$ ) az illesztés jóságával ( $\chi^2$ ).

|       | $\gamma$ G-Au klaszter | $\gamma$ G-Au/Ag klaszter |
|-------|------------------------|---------------------------|
| $T_1$ | $62,8 \pm 21,7$ ns     | $99,7 \pm 37,5$ ns        |
| $T_2$ | $845,2 \pm 84,5$ ns    | $1,259 \pm 0,071$ $\mu$ s |
| $T_3$ | $5,9 \pm 0,4$ ns       | $2,7 \pm 0,5$ ns          |
|       | $\chi^2 = 1,01$        | $\chi^2 = 1,08$           |



**6. ábra:** (A) A tiszta Au és a kétfémes Au/Ag klaszterek élettartam komponenseinek százalékos megoszlása. (B) A két klaszter kvantumhasznosítási tényezője (QY %).

Az egyes komponensek hozzájárulásának mértékét a teljes fluoreszcenciához a **6.A ábra** jeleníti meg. Látható, hogy a legnagyobb mértékben a *ligandum*→*fém* átmenetek járulnak hozzá a fluoreszcenciához mindkét klaszter esetén.

A biológiai felhasználásokhoz szükséges optikai ablak megtartása mellett további előnyös tulajdonságként a kvantumhasznosítási tényező (QY %) változatlan értékét azonosíthatjuk. Ezen adat megadja nekünk, hogy a gerjesztő fény hány százaléka hasznosul a minta által fluoreszcens fotonok kibocsátása révén. A mérésekhez egy ún. integráló gömböt alkalmaztunk, amely lehetővé teszi a minták

abszolút kvantumhasznosításának meghatározását. Ezen mérés technika során csupán a mérőberendezés hitelesítése szükséges egy kalibrált fényforrás vagy detektor által; egyéb referencia anyag (pl. fluoreszcens standard festékek: rhodamin B, vagy krezilibolya) alkalmazása nem szükséges. A méréseink (6.B ábra) igazolták tehát, hogy míg az Au klaszterek QY % értéke 2,25 %, addig az ötvözet Au/Ag klaszter a gerjesztő fénynek mintegy 2,31 %-át képes fluoreszcens foton kibocsátásával hasznosítani.

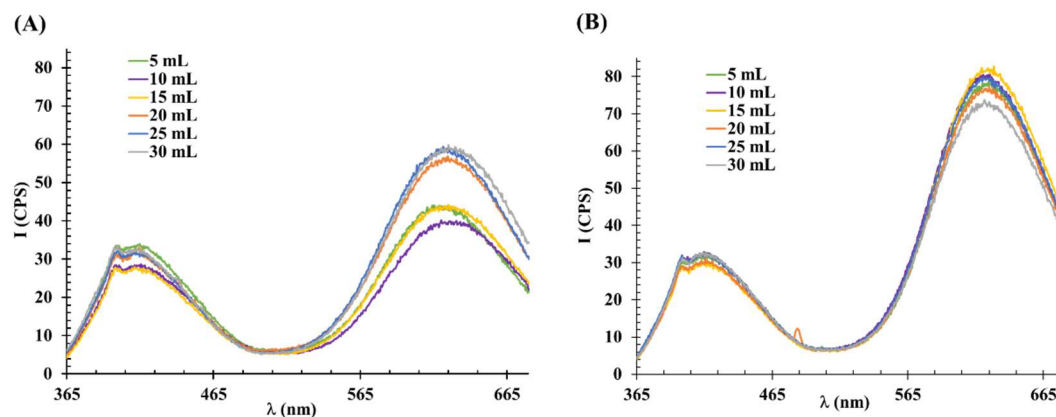
### 5.1.2. Léptékhatás vizsgálata

Következő lépésként megvizsgáltuk a térfogat növelésének hatását a keletkezett klaszterek optikai sajátságaira. Az eredeti recept szerint előállított Au/Ag klaszter diszperzió végső térfogata 5,91 cm<sup>3</sup> volt. Ezt követően megvizsgáltuk, milyen hatással van a képződött klaszter szerkezetére és optikai sajátságaira, ha növeljük a szintéziselegy térfogatát annak érdekében, hogy a további mérésekhez szükséges klasztermennyiséget eredményező szintézisek számát csökkenteni tudjuk a jövőben. A vizsgálatok során a MilliQ víz mennyiségét növeltük 5 cm<sup>3</sup> lépésekben egészen 30 cm<sup>3</sup>-ig a 2. táblázat szerint és a végső térfogathoz megfelelő mértékben arányosítottuk a többi reaktáns mennyiségét is. *A továbbiakban az adott térfogatú klasztert a szintézis első lépéseként bemért víz mennyiségével jelöljük.*

**2. táblázat:** A léptékhatás vizsgálatánál alkalmazott klaszter összetevő arányok.

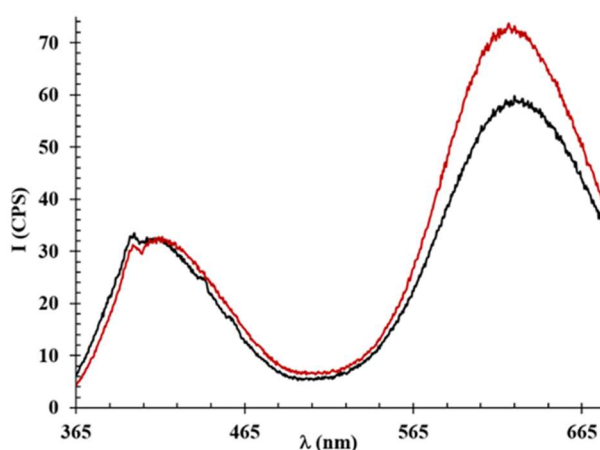
| Anyagok                                      | 1x    | 2x    | 3x    | 4x    | 5x    | 6x    |
|----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| MilliQ (cm <sup>3</sup> )                    | 5     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
| γ-globulin (g)                               | 0,09  | 0,18  | 0,27  | 0,36  | 0,45  | 0,54  |
| + MilliQ (cm <sup>3</sup> )                  | 0,319 | 0,637 | 0,956 | 1,274 | 1,593 | 1,911 |
| HAuCl <sub>4</sub> -oldat (cm <sup>3</sup> ) | 0,175 | 0,349 | 0,524 | 0,698 | 0,873 | 1,047 |
| AgNO <sub>3</sub> -oldat (cm <sup>3</sup> )  | 0,017 | 0,034 | 0,051 | 0,068 | 0,085 | 0,102 |
| NaOH-oldat (cm <sup>3</sup> )                | 0,4   | 0,8   | 1,2   | 1,6   | 2,0   | 2,4   |
| Összes térfogat (cm <sup>3</sup> )           | 5,91  | 11,82 | 17,73 | 23,64 | 29,55 | 35,46 |

A fenti térfogatú mintákat a 24 órás szintézis alatt kevertetéssel és kevertetés nélkül is előállítottuk, majd megmértük a diszperziók fluoreszcencia intenzitás értékeit. Amint az a 7. ábrán feltüntetett spektrumokon látható, a nem kevertetett minta (7.A ábra) esetében a térfogat növekedéssel nőtt a fluoreszcencia intenzitás a tiszta klaszterekben, ugyanakkor a kevert szintézisnél a térfogat változás nem okozott ilyen hatást. Ennek ellenére minden minta esetén nagyobb jelet mértünk (7.B ábra). A keverés a szintézist ezek alapján segítette, közel azonos intenzitás maximumokat kaptunk a homogén reakcióközegnek köszönhetően.



**7. ábra:** A keverés nélküli (A) és a kevertetett (B) szintézis során készült különböző térfogatú, tisztított klaszterek fluoreszcencia spektrumai azonos fémkoncentráció mellett ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ).

A további felhasználásokat szem előtt tartva előnyösebb volt az, hogy nagyobb térfogatot tudtunk egyszerre elkészíteni, így összességében a  $30 \text{ cm}^3$ -es kevertetett mintát alkalmaztunk a további szintézisek alkalmával (8. ábra).

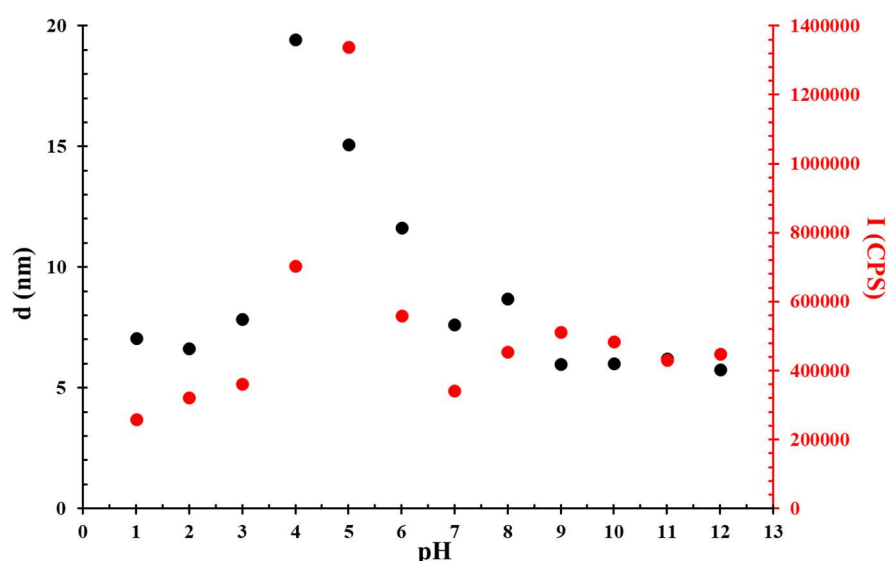


**8. ábra:** A kevertetett (bordó) és a keverés nélküli (fekete)  $30 \text{ cm}^3$ -es klaszterek fluoreszcencia spektrumai ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ).

### 5.1.3. Stabilitás vizsgálat

Az orvosbiológiai felhasználásokat szem előtt tartva tanulmányoztuk a klaszterek stabilitását  $\text{pH} = 1\text{--}12$  tartományon  $0,05 \text{ M}$  sókoncentráció mellett. A mérésekhez spektrofluorimetriát, DLS és ZP méréseket alkalmaztunk (9. ábra). A vizsgálatokhoz  $2 \text{ cm}^3$  össztérfogatú mintákat használtunk, melyből  $1 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ M}$ -os  $\text{NaCl}$ -oldat volt, a másik  $1 \text{ cm}^3$  pedig háromszorosan hígított nanoklasztereket tartalmazó

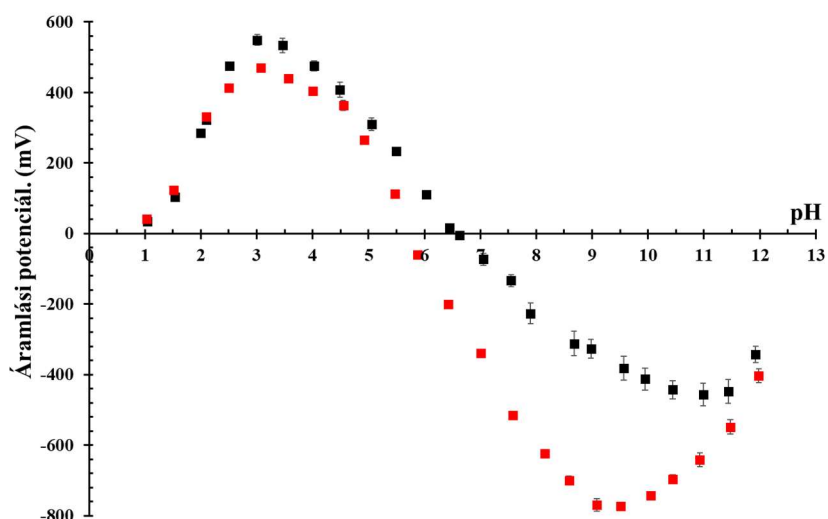
vizes diszperzió. Ez alapján a végső fémkoncentráció 54  $\mu\text{M}$  értéknek adódott az egyes mintákban. Mérés során a pH értékét 0,1 és 1,0 M koncentrációjú NaOH- és HCl-oldatokkal állítottuk be.



**9. ábra:** A nanoklaszterek hidrodinamikai átmérője (**fekete**) és a mért fluoreszcencia intenzitás maximumok (**piros**) a pH függvényében ( $c_{\text{Au}} = 54 \mu\text{M}$ ,  $I = 0,05 \text{ M NaCl}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ )

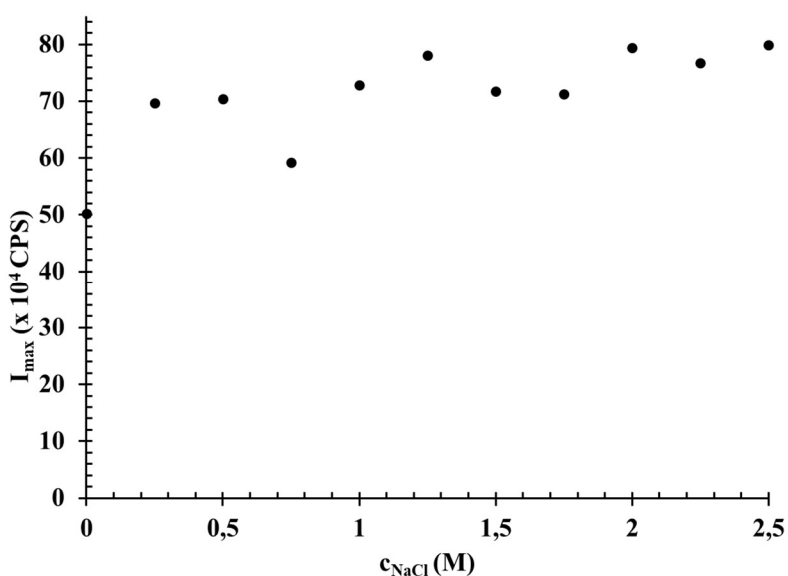
A mérések eredményéből az látható, hogy a szintetizált klaszter a pH 8–12 tartományon viszonylag stabil, mivel a mért  $\zeta$ -potenciál értéke kb. -10–(-20) mV értékekhez közelít. A vizsgálat során a pH = 4–5 tartományon szemmel látható aggregáció következett be. Ezek a rendszerek nagyon gyorsan ülepedtek, így csak az aggregált klaszterek felülúszóját tudtuk megvizsgálni, melyek eredményei láthatóak a **9. ábrán** ezen a pH tartományon. Az aggregáció oka, hogy az alkalmazott stabilizáló fehérjének nagy hányadát alkotó immunoglobulin G (IgG) izoelektromos pontja pH = 4,6–6,5 tartományon található. Az IgG izolabilis fehérje, így izoelektromos pontja körül kicsapódik [19].

Látva ezt a jelenséget töltéstitrálással meghatároztuk külön-külön a tiszta fehérje és a már klasztereket is tartalmazó protein áttöltési pH-értékét is, amely megfeleltethető az izoelektromos pontnak. A **10. ábrán** megfigyelhető, hogy a tiszta fehérje áttöltési pontja a mérések átlagából pH = 6,5 érték körül adódott. A fémmagokat is tartalmazó protein áttöltése viszont eltolódott nagyjából 1 pH értékkel a savas tartomány felé.



**10. ábra:** A tiszta fehérje (fekete) és a fehérje-stabilizált klaszter (piros) áramlási potenciál értékei a pH függvényében  $c_{\text{fehérje}} = 2,54 \text{ mg/cm}^3$

A jövőbeli felhasználásokat szem előtt tartva, tanulmányoztuk a klasszterek NaCl sótűrését is 0–2,5 M sókoncentrációk között. Azt tapasztaltuk, hogy a NaCl mennyiségének növekedésével a fluoreszcencia intenzitás *kb.* 20-30 %-kal megnő (**11. ábra**). A nagy jelentőséggel bíró fiziológiás sókoncentrációnál (0,9 m/m%) nincs más észlelhető változás. Aggregáció egyik esetben sem következett be, melyet a protein korona erős stabilizáló hatásával magyarázhatunk.



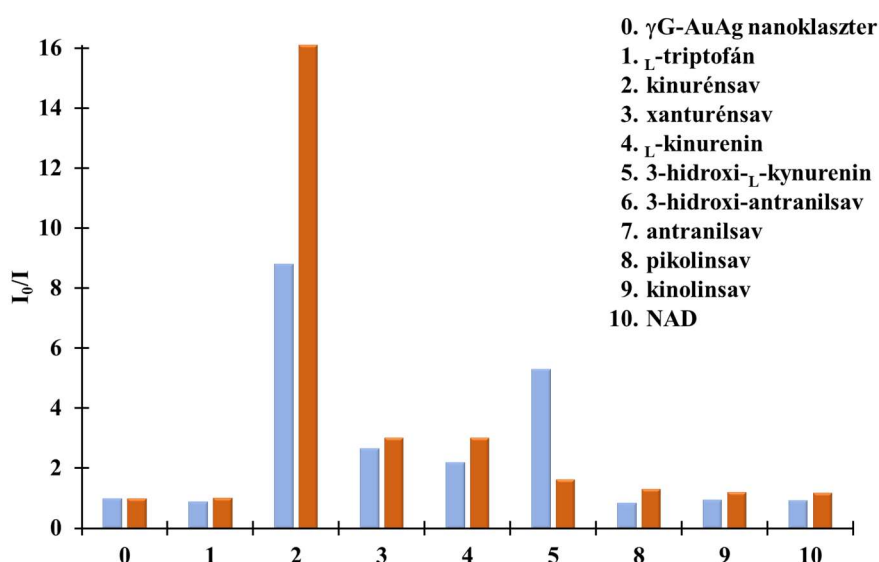
**11. ábra:** Változó NaCl koncentráció mellett mért fluoreszcencia intenzitás ( $\lambda_{\text{em}} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $c_{\text{Au}} = 54 \text{ } \mu\text{M}$ ).

Ezek alapján megállapítható, hogy a klaszterek felhasználhatók olyan magas ionerősségű fiziológias körülmények között is, amelynek pH értéke nagyobb, mint  $\text{pH} = 7,0$ , így a későbbiekben várhatóan biológiai folyadékokban is (*pl.* vér, könny, gerincvelői folyadék) is alkalmazható lesz.

## 5.2. Szenzorikai vizsgálatok

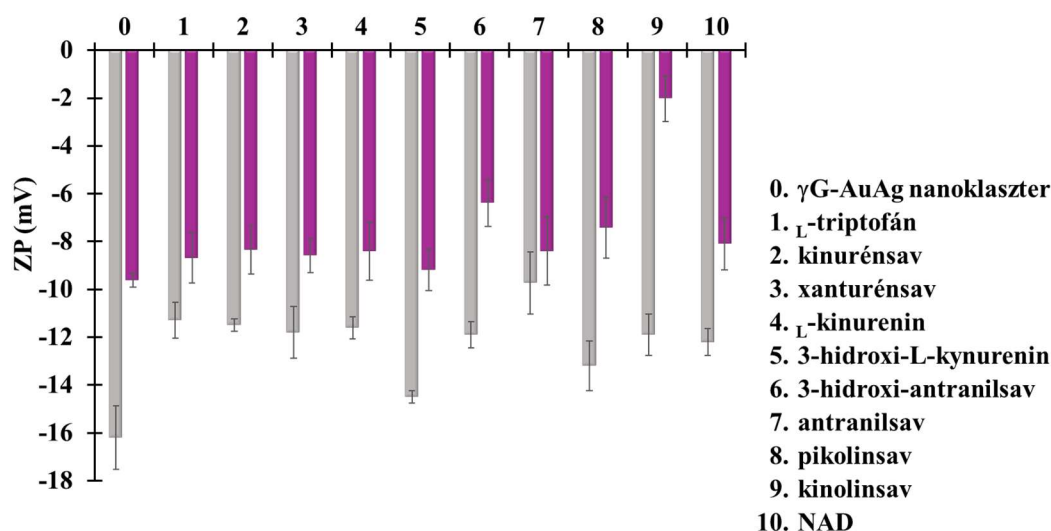
Amint azt az *1.5 fejezetben* is ismertettük, Kutatócsoportunkban korábban már sikeresen állítottak elő  $\gamma$ -globulin felhasználásával tisztán Au-tartalmú klasztert. A klaszter segítségével a triptofán aminosav egyik átalakulási útvonalán, a kinurenin útvonalon képződő első metabolit, az *L*-kinurenin detektálását valósították meg. Ezért kísérleti munkám fő motivációja volt kideríteni, hogy a stabilizáló fehérje megtartásával az arany mellett, ezüsttel történő ötvözés révén létrejövő új, kétfémes klaszter esetében tapasztalható-e eltérés a szenzorikai felhasználásokat tekintve.

Az elvégzett mérések során a  $\gamma\text{G-Au/Ag NCs}$ -t vizsgáltuk a kinurenin útvonal főbb metabolitjainak (*1.5 fejezet*) jelenlétében közegként foszfát puffert (PBS,  $\text{pH} = 7,4$ ; 0,9 w% NaCl) és mesterséges agyvizet (aCSF) használva. A szenzorikai vizsgálatok során azonos térfogatú és koncentrációjú klaszteres diszperzió fluoreszcencia intenzitását mértük a kinurenin útvonal metabolitjainak hozzáadása előtt és után, melyből relatív fluoreszcencia ( $I_0/I$ ) értéket tudtunk meghatározni. A vizsgált minták összes térfogata  $2\text{ cm}^3$  volt, ezek  $1\text{ cm}^3$  klaszterből és  $1\text{ cm}^3$  analit oldat elegyéből álltak, ahol az analit végső koncentrációja  $0,5\text{ mM}$  volt. A végkoncentráció a klaszter esetében az összes fémtartalomra nézve  $0,16\text{ mM}$ . Az fluoreszcencia spektrumok rögzítése során (**12. ábra**) azt tapasztaltuk, hogy aCSF közegben kizárólag az *L*-kinureninből képződő kinurénsav hatására detektálható fluoreszcencia kioltás.



**12. ábra:** A szenzorikai vizsgálatok eredményei PBS (kék) és aCSF (narancssárga) ( $c_{\text{Au}} = 0,16\text{ mM}$ ,  $c_{\text{analit}} = 0,5\text{ mM}$ ).

Ezzel szemben, PBS közeg alkalmazásakor a kinurénsav mellett a 3-hidroxi-*L*-kinurenin is kioltást eredményezett. Mivel a kinurénsav jelenlétében tapasztaltunk nagyobb mértékű kioltást mindkét közegben, így ennek vizsgálatát folytattuk tovább.



**13. ábra:** A klaszter és a hozzáadott kinurenin vegyületek  $\zeta$ -potenciál adatai PBS (lila) és aCSF (szürke) közegben. ( $c_{Au} = 0,16$  mM,  $c_{analit} = 0,5$  mM).

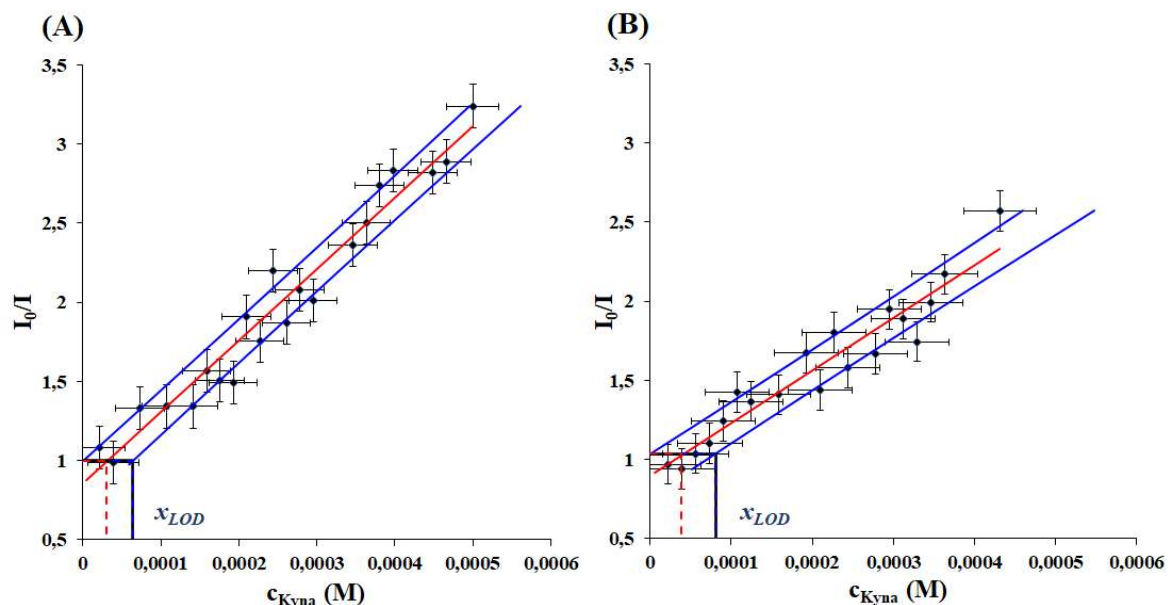
Folytatásként megmértük a kioltási vizsgálatoknál használt minták  $\zeta$ -potenciál értékeit is. Az eredmények a **13. ábrán** láthatóak, amely alapján megállapítottuk, hogy a klaszterek fehérjeburkának áttöltése egyik molekula által sem következik be, így a detektált kioltás nem a töltésváltás miatt következik be.

Következő lépésként meghatároztuk a kinurénsav legkisebb kimutatható mennyiségét (Limit Of Detection; LOD) mivel ennek ismerete elengedhetetlen a bioszenzorként történő felhasználáshoz. Elsődlegesen a kinurénsav koncentrációját 0-tól 4 mM-ig egyenletesen növeltük a vizsgált individuális mintákban és megmértük a fluoreszcencia intenzitásukat. Mindkét közegben a tartomány második felében lépett fel már UV-lámpa alatt is szemmel látható változás (**14. ábra**).



**14. ábra:** A  $\gamma$ G-Au/Ag NCs minták fotói UV-lámpa alatt, változó koncentrációjú (0,0013 mM–4 mM) kinurénsav hatására PBS közegben.

Ezt követően leszűkítettük a koncentráció tartományt 5 -500  $\mu\text{M}$ -ra. A kiértékeléshez a H. P. Loock és P. D. Wentzell által kidolgozott grafikus módszert (**15. ábra**) alkalmaztuk [20].



**15. ábra:** A LOD értékek grafikus illesztése PBS (A) és aCSF (B) közegekben a [20] publikáció szabadon használható Excel táblázata alapján.

A felhasznált szabadon hozzáférhető táblázatkezelő file-ba beillesztve a mérési adatpontokat, a LOD értékek egyszerűen meghatározhatóak. Amint az a **15. ábrán** látható a piros görbe az adatpontok lineáris illesztését jelzi, míg a kék görbék a 99%-os konfidencia intervallumok görbéit mutatják, ahol a jel/zaj arány  $\pm 3s_x$ . Esetünkben az  $x_{\text{LOD}}$  értéke jelöli a kinurénsav legkisebb kimutatható mennyiségét az adott közegekben, amely a mérési adatok alapján PBS-ben  $\sim 64 \mu\text{M}$ , illetve aCSF-ben  $\sim 80 \mu\text{M}$  értéknek adódott.

A kioltás természetének felderítésére megmértük mindkét közegben a **klaszter+kinurénsav** elegyét és a tiszta klasztert tartalmazó minták fluoreszcenciáinak lecsengési görbéit. Ezen vizsgálatok esetén is mind a négy mintánál azt tapasztaltuk, hogy a lecsengési görbék megfelelő illesztéséhez ( $\chi^2 \sim 1$ ) egy háromexponenciális tagból álló függvény alkalmazása volt szükséges. Az illesztések alapján meghatároztunk egy ultra rövid ( $T_3$ ), egy közepes ( $T_1$ ) és egy hosszabb ( $T_2$ ) élettartam komponenst, melyek eltérő mértékben járulnak hozzá a minták teljes fluoreszcenciájához. Az eredményeket a **3. táblázatban** foglaltuk össze. Amint az az **5.1.1 fejezetben** is bemutatásra került, a legrövidebb komponensek ligandumtól függetlenek, csak a klasztert alkotó fématomok közötti átmenetekre jellemzőek, az ennél hosszabb élettartamok pedig mind ligandumtól függő átmenetek sajátosságai. A közepes hosszúságúak alapján *ún. fém*

központú átmenetekre (MCE; Metal-Centered-Emission) következtethetünk, a leghosszabb komponens pedig a ligandum központú átmenetek (LCE; Ligand-Centered-Emission) sajátosságai [21].

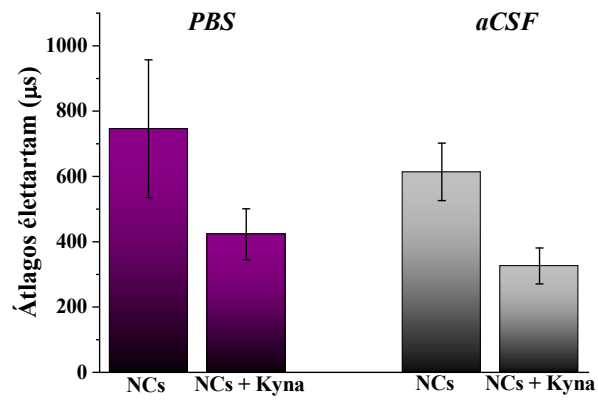
**3. táblázat:** A meghatározott fluoreszcencia élettartam értékek ( $T_1$ – $T_3$ ) a hozzájárulási tényezőkkel (B) és az illesztés jóságával ( $\chi^2$ ).

| PBS                                          |              |                 |                                              |              |                 |
|----------------------------------------------|--------------|-----------------|----------------------------------------------|--------------|-----------------|
| $\gamma$ G-Au/Ag NCs                         |              |                 | $\gamma$ G-Au/Ag NCs + Kyna                  |              |                 |
| $T_1 = 0,479 \pm 0,154 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_1 = 0,34$ | $\chi^2 = 1,02$ | $T_1 = 0,201 \pm 0,052 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_1 = 0,20$ | $\chi^2 = 1,10$ |
| $T_2 = 1,726 \pm 0,144 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_2 = 0,33$ |                 | $T_2 = 1,279 \pm 0,059 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_2 = 0,30$ |                 |
| $T_3 = 0,040 \pm 0,013 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_3 = 0,33$ |                 | $T_3 = 0,006 \pm 0,004 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_3 = 0,50$ |                 |

| aCSF                                         |              |                 |                                              |              |                 |
|----------------------------------------------|--------------|-----------------|----------------------------------------------|--------------|-----------------|
| $\gamma$ G-Au/Ag NCs                         |              |                 | $\gamma$ G-Au/Ag NCs + Kyna                  |              |                 |
| $T_1 = 0,340 \pm 0,071 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_1 = 0,33$ | $\chi^2 = 1,10$ | $T_1 = 0,250 \pm 0,039 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_1 = 0,19$ | $\chi^2 = 1,07$ |
| $T_2 = 1,488 \pm 0,050 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_2 = 0,33$ |                 | $T_2 = 1,377 \pm 0,040 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_2 = 0,20$ |                 |
| $T_3 = 0,023 \pm 0,012 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_3 = 0,34$ |                 | $T_3 = 0,007 \pm 0,002 \text{ } \mu\text{s}$ | $B_3 = 0,61$ |                 |

Amint az a **3. táblázat** adataiból is látszik, a Kyna hozzáadását követően mindhárom élettartam-komponens lecsökken, tehát a klaszter és Kyna közötti kölcsönhatásban egyaránt részt vesz a klaszterek fémmagja és a fémmagokat beburkoló proteinkorona is. A kölcsönhatás az arany-tartalomra nézve fémspecifikusnak tekinthető, hiszen hasonló, de sokkal kisebb mértékű kioltás a tisztán Au-tartalmú klaszternél is megjelent. Ezen ötvözet klaszter esetén viszont kioltást csak a kinurénsav esetén detektáltunk, így megállapítható, hogy az Ag-tartalom sikeresen szűkítette a klaszter szenzorikai szelektivitását. Ahogy az a **16. ábrán** is látható, mindkét közegben a kinurénsav hozzáadását követően *kb.* 45%-kal csökkent a mért átlagos élettartam: PBS-ben 0,75  $\mu\text{s}$ -ról a kinurénsav hozzáadásával 0,42  $\mu\text{s}$ -ra, míg aCSF-ben 0,61  $\mu\text{s}$ -ról 0,33  $\mu\text{s}$ -ra. Ezen mérési adatok alapján tehát elmondható, hogy a kioltás döntően dinamikus lehet, tehát a klaszter a kinurénsavval történő ütközés révén veszíti el a többletenergiát. Korábbi mérésekre és szakirodalmi adatokra alapozva ezen ütközés során feltehetőleg egy gerjesztett elektronok által indukált protoncsere folyamat játszódik le [22] a két komponens között, de ennek igazolására további mérések szükségesek.



**16. ábra:** A klaszterek átlagos fluoreszcencia élettartamai a Kyna hozzáadása előtt és a Kyna hozzáadását követően PBS (lila) és aCSF (szürke) közegekben.

## 6. Összefoglalás

Kutatómunkám során sikeresen kapcsolódtam be a  $\gamma$ -globulin immunfehérjével stabilizált fluoreszcens arany-ezüst kétfémes nanoklaszter potenciális szenzorikai felhasználásainak vizsgálatába. Munkám első szakaszában feltérképeztük, hogy az Au klaszterekhez képest, az ezüst/arany kétfémes klaszterek milyen optikai sajátosságokkal rendelkeznek. Megállapítottuk, hogy mintegy 15 m/m % mennyiségű ezüst jelenléte képes a tiszta arany vörös emisszióját a narancssárga tartományba tolni. A fluoreszcencia lecsengési görbék kiértékelésével rámutattunk arra, hogy mind a tiszta Au, mind az Au/Ag rendszernél 3-3 élettartam komponens azonosítható, melyek közül a leghosszabb, *ligandum*→*fém* átmenetekre jellemző értékek rendelkeznek a legnagyobb hozzájárulási tényezővel. A kétfémes klaszter kvantumhasznosítása pedig az ezüsttartalom ellenére sem csökkent a tiszta aranyhoz képest. A lehetséges nagyobb mennyiség elkészítése céljából tanulmányoztuk milyen hatással van a klaszter optikai tulajdonságaira a térfogat növelése. A biológiai felhasználást szem előtt tartva, tanulmányoztuk a klaszterek stabilitását és sótűrését, melyből megállapítottuk, hogy a klaszterek a pH = 7–12 tartományon nagymértékű stabilitással rendelkeznek. Ellenben pH = 4–5 tartományon szemmel látható aggregáció következett be. Ezt látva töltésitrálással megvizsgáltuk a tiszta fehérje és a klaszter izoelektromos pontját, melyből azt tapasztaltuk, hogy a fémmag jelenléte eltolja a protein izoelektromos pontját nagyjából ~1 pH egységgel a savas tartomány felé. A következőkben megvalósítottuk a szenzorikai vizsgálatokat a kinurenin útvonal metabolitjainak felhasználásával foszfát pufferben és mesterséges agyvízben. A kinurénsav mindkét esetben látható és jól detektálható fluoreszcencia kioltást eredményezett. Bioszenzorként történő felhasználás céljaként elengedhetetlen volt a kinurénsav legkisebb kimutatható mennyiségének (LOD) meghatározása. Ennek érdekében széles koncentráció tartományon adagoltuk a kinurénsavat a klaszterekhez, majd meghatároztuk a kimutatási határt, amely PBS-ben ~64  $\mu\text{M}$ -nak, aCSF-ben ~80  $\mu\text{M}$  értéknek adódott. Ezek után mindkét közegben megmértük a fluoreszcencia élettartamot a kismolekula hozzáadása előtt és után. Látható volt, hogy a kinurénsav hozzáadása után az élettartam mindkét esetben nagyjából 45%-kal lecsökkent. Ezen mérési adatok alapján kiderült, hogy a kioltás döntően dinamikus, tehát a klaszter a kinurénsavval való ütközése során veszíti el többletenergiaját. Kutatómunkám során széleskörű tapasztalatot sikerült nyernem a fluoreszcencia spektroszkópia területén, a klaszterek preparálásában és a stabilitási vizsgálatok precíz kivitelezésében. Az elvégzett kutatómunka alapján remélem, hogy az elért kísérleti adatok a jövőben hozzájárulhatnak egy új, szelektív kinurénsav szenzor kifejlesztéséhez, amely elősegítheti a klinikai diagnosztikai eljárások korszerűbbé tételét.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Tóth Ágota** tanszékvezető egyetemi oktatónak, hogy lehetőséget biztosított az általa vezetett Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszéken TDK dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek **Juhászné Dr. Csapó Edit** egyetemi adjunktusnak és **Janóné Dr. Ungor Ditta Anita** tudományos munkatársnak a sok segítségért és támogatásért, amit kutatómunkám során kaptam.

Köszönöm **Turcsányi Árpád** PhD hallgatónak a  $\gamma$ G-Au/Ag NCs szintézismódszerének kidolgozásához nélkülözhetetlen munkáját.

Szeretném megköszönni **Dr. Varga-Bélteki Rita** és **Kuklis Loretta** tanszéki mérnököknek, illetve **Dr. Varga Norbert** tudományos munkatársnak, hogy munkám során bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Végül köszönöm *családomnak* a támogatást és biztatást, melyet kezdetektől fogva kaptam.

## 8. Irodalomjegyzék

- [1] D. Ungor, K. Horváth, I. Dékány, E. Csapó, *Sensors Actuators B Chem.* 2019, **288**, 728–733
- [2] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, *Arab. J. Chem.* 2019, **11**, 908-931
- [3] P. Yu, X. Wen, Y-R. Toh, X. Ma, J. Tang, *Syst. Charact.*, 2014, **32**, 142-163.
- [4] K. A. Willets, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem* 2007, **58:1**, 267-297
- [5] B. Streszewski, W. Jaworski, K. Paclawski, E. Csapó, I. Dékány, K. Fitzner, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2012, **397**, 63–72.
- [6] E. Csapó, A. Oszkó, E. Varga, Á. Juhász, N. Buzás, L. Kőrösi, A. Majzik, I. Dékány, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2012, **415**, 281–287.
- [7] X. Yuan, Z. Luo, Y. Yu, Q. Yao, J. Xie, *Chem. Asian J.* 2013, **8(5)** 858-871
- [8] L. Shang, S. Dong, G. U. Nienhaus, , *Nano Today*, Volume 6, 2011, **4**, 401-418,
- [9] T-Q. Yang, B. Peng, B-Q. Shan, Y-X. Zong, J-G. Jiang, P. Wu, K. Zhang, *Nanomaterials-Basel*, 2020, **10(2)**, 261
- [10] S. Choi, R.M. Dickson, J. Yu, *Chem. Soc. Rev.* 2012, **41**, 1867–1891
- [11] T. Feng Y. Chen, B. Feng, J. Yan, J. D., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy* 2019, **206**, 97-103
- [12] J. Haus 'Part One: The Optical Sensor Construction in *Optical Sensors: Basics and Applications*', Wiley-VCH, Weinheim, 2010, 5 – 54.
- [13] X. Han, Z. Man, S. Xu, L. Cong, Y. Wang, X. Wang, Y. Du, Q. Zhang, S. Tang, Z. Liu, W. Li. *Colloid Surface B.* 2019, **173**, 478-485
- [14] L. Xiaoshuang, Z. Hao, Z. Ying, L. Lili, W. Xiyue, G. Wenxiu, Z. Bo, L. Dawei, *J Anal. Methods. Chem.* 2019. 1-8.
- [15] B. Han, X. Hu, Q. Yan, J. Jiang, G. He, *Sensor Actuat. B-Chem.* 2019, **284**, 695-703
- [16] J-P. Routy, B. Routy, GM. Graziani, V. Mehraj, *International Journal of Tryptophan Research.* 2016, **9**, 67-77
- [17] J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 104.
- [18] M. Galli, Sz. Sáringer, I. Szilágyi, G. Trefalt, *Colloids and Interfaces.* 2020; **4(2)**, 20.
- [19] A. Elkak, T. Yehya, I. Salloub, and F. Berry, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2012, **3**, 584–590.
- [20] H.-P. Loock and P. D. Wentzell, *Sensors Actuators B Chem.*, 2012, **173**, 157–163.
- [21] TQ. Yang, B. Peng, BQ. Shan, YX. Zong, JG. Jiang, P. Wu, et al. *Nanomaterials* 2020; **10** 1–24.
- [22] SR. Govindaraju, B. Ankireddy, B. Viswanath, J. Kim, K. Yun, *Sci. Rep.* 2017, **7**, 1–12.