Эффект усиления эмиссии флуоресцентных золотых нанокластеров при их взаимодействии с бактериальным липополисахаридом

© Д.С. Чумаков[1], С.С. Евстигнеева[1,2,3], Н.Г. Хлебцов[1,2]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“ (ИБФРМ РАН), Саратов, Россия
[2] Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия
[3] Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

e-mail: laik2012@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2025 г.
В окончательной редакции 23.12.2025 г.
Принята к публикации 27.03.2026 г.

Бактериальные липополисахариды вызывают у человека множество нежелательных реакций со стороны иммунной системы, что делает актуальной разработку селективных и чувствительных методов их определения. В настоящей работе методом флуоресцентной спектроскопии изучено взаимодействие золотых нанокластеров, стабилизированных остатками глутатиона, и бактериального липополисахарида, выделенного из клеток биопленок *Pseudomonas putida.* Показано, что при взаимодействии нанокластеров с надмолекулярными частицами в составе препарата липополисахарида возникает усиление эмиссии при агрегации (AIEE-эффект), что выражается в увеличении интенсивности флуоресценции и небольшом синем сдвиге максимума спектра флуоресценции нанокластеров. Показано, что зависимость увеличения интенсивности флуоресценции нанокластеров от содержания липополисахарида носит линейный характер в широком диапазоне концентраций. Эффект усиления эмиссии нанокластеров при добавлении липополисахарида сохранялся в присутствии различных интерферирующих химических агентов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки сенсорной системы для детекции липополисахаридов в фармацевтических продуктах.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, золотые нанокластеры, усиление эмиссии при агрегации, липополисахариды.

DOI: 10.61011/OS.2026.05.63334.56-25

Введение

Эндотоксины или липополисахариды (ЛПС) представляют собой амфифильные биомолекулы, входящие в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий [1]. При попадании в организм человека даже в малых дозах молекулы ЛПС могут вызывать различные нежелательные реакции со стороны иммунной системы, включая лихорадку, усиление активации комплемента и системы коагуляции крови [2]. Тот факт, что ЛПС являются ключевым фактором в патогенезе абдоминального сепсиса, дополнительно подчеркивает диагностическую значимость данных биомолекул. Особенно важно своевременно детектировать содержание эндотоксинов в фармацевтических продуктах, поскольку современное биотехнологическое производство связано с использованием микробных клеток в качестве продуцентов. Стандартным методом детекции эндотоксинов является LAL-тест, основанный на реакции амебоцитов мечехвостов рода *Limulus* с молекулами ЛПС. Данный метод высокочувствителен, однако занимает много времени (порядка 60 min) и характеризуется высокой стоимостью. Качество реактивов в диагностических LAL-тестах может сильно отличаться между собой из-за сложной процедуры получения амебоцитов [3]. Таким образом, актуальной является разработка альтернативных методов обнаружения ЛПС.

Перспективными представляются флуоресцентные методы детекции ЛПС, так как они сочетают высокую чувствительность обнаружения аналита с хорошо разработанной приборной базой, доступной большинству аналитических лабораторий. При создании флуоресцентных сенсоров для детекции ЛПС некоторые исследователи используют методический прием, связанный с „включением“ флуоресценции флуорофора в присутствии в анализируемой смеси молекул аналита [4]. В ряде работ для повышения специфичности взаимодействия использовали такие узнающие биомолекулы, как аптамеры [5–7] и пептиды [8], которые селективно взаимодействуют с ЛПС.

В рамках альтернативного подхода можно создавать сенсоры для детекции ЛПС на основе эффекта усиления эмиссии при агрегации (AIEE-эффект). В состав данных аналитических систем входят флуоресцентные агенты (AIEE-форы), эмиссия которых усиливается при изменении жесткости внутримолекулярной структуры [9]. Усиление оптического сигнала при непосредственном взаимодействии AIEE-форов и эндотоксинов обусловле-

но тем, что ЛПС в растворах формируют надмолекулярные частицы, что существенно ограничивает внутримолекулярные вращения и колебания в AIEE-форах при связывании с ними [10]. В качестве флуорофоров в таких сенсорных системах чаще всего используют тетрафенилэтилен и его производные [11]. Определенным ограничением органических AIEE-форов является тот факт, что AIEE-эффект проявляется также при добавлении воды, что создает необходимость дифференцирования фонового сигнала от сигнала, вызванного непосредственно добавлением аналита.

Флуоресцентные золотые нанокластеры (AuNCs) также представляют собой AIEE-форы [12]. Данные наноматериалы состоят из атомов золота и стабилизирующих их органических лигандов. К их достоинствам относят простоту синтеза, широкий стоксов сдвиг, высокую биосовместимость и возможность спектральной настройки эмиссии флуоресценции [13]. Перспективным может быть использование AuNCs в качестве флуоресцентных агентов для количественной детекции ЛПС. По сравнению с органическими AIEE-форами многие AuNCs характеризуются гидрофильностью, что упрощает проведение анализа в водных средах. В нашей предыдущей работе с помощью метода молекулярного моделирования мы показали, что золотые нанокластеры, стабилизированные остатками глутатиона (GSH-AuNCs), имеют сродство к полисахаридному компоненту молекулы ЛПС [14].

В настоящей работе мы охарактеризовали AIEE-эффект, возникающий при взаимодействии GSH-AuNCs с модельным ЛПС, выделенным из биопленок бактерий *Pseudomonas putida*. Было изучено влияние некоторых физико-химических факторов на усиление интенсивности флуоресценции AuNCs при их экспозиции с ЛПС. Впервые была показана возможность использования AuNCs для количественной детекции эндотоксина без использования дополнительных узнающих молекул.

Материалы и методы

Для синтеза флуоресцентных AuNCs на основе глутатиона (GSH-AuNCs) применяли метод, описанный в работе Luo и соавторов [15]. Всю стеклянную посуду, в которой осуществляли синтез предварительно промывали царской водкой ($HCl/HNO_3 = 3:1$), далее ополаскивали этанолом и водой. В стеклянном флаконе смешивали 1.5 mL 100 mM-раствора восстановленного глутатиона и 43.5 mL miliQ H_2O и перемешивали. Затем к полученному раствору добавляли 5 mL 20 mM-$HAuCl_4$. Полученную смесь перемешивали в течение 2 min. Далее реакционную смесь инкубировали в термостате в течение 24 h при 70 °C без перемешивания.

Характеризацию GSH-AuNCs осуществляли с помощью различных физико-химических методов. Спектры экстинкции регистрировали с помощью спектрофотометра Specord S600 (Analytic Jena, Германия) в спектральном диапазоне 300–800 nm. Флуоресцентные свойства нанокластеров оценивали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Измерения проводили с шириной щели 10 nm. Электронно-микроскопические измерения выполнялись с помощью просвечивающего микроскопа (ПЭМ) Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Образец наносили на никелевые сеточки с формваровой подложкой и высушивали. Электронно-микроскопическое исследование осуществляли при ускоряющем напряжении 120 kV.

Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas putida* TSh-18 (IBPPM 358) были предоставлены Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http://collection.ibppm.ru). Для получения планктонных культур бактерии выращивали в среде LB [16] при постоянном перемешивании на вибростенде (100–120 rpm, 30 °C) на протяжении 24 h до окончания экспоненциальной фазы роста. Для формирования биопленок на границе раздела „воздух–жидкость“ клетки культивировали в среде LB в стационарных условиях при 30 °C в течение 72 h.

Сформированные биопленки бактерий *P. putida* TSh-18 отделяли от планктонных клеток с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра, суспендировали в фосфатном буфере (pH 7.2) и двукратно обрабатывали ультразвуком (37 kHz, 40 °C) по 30 min. Из полученной суспензии клетки осаждали центрифугированием при 3 000× g в течение 40 min. Экстракцию ЛПС осуществляли из тонко измельченной высушенной ацетоном биомассы клеток биопленок горячей смесью фенол-вода в соответствии с модифицированной методикой Вестфаля без разделения водного и фенольного слоев [17]. Полученный экстракт освобождали от фенола диализом через мембраны с пределом исключения 12–14 kDa против проточной воды в течение 120 h и концентрировали на ротационном испарителе (Laborota 4000; Heidolph, Germany). Белковые примеси осаждали из раствора ЛПС добавлением 40%-трихлоруксусной кислоты до конечных значений pH 2.7 и последующим центрифугированием при 16 000× g (20 min). После удаления остатков кислоты диализом против дистиллированной воды (48 h) экстракт ЛПС лиофилизировали с использованием сушки Benchtop 2K (Virtis, США).

Определение размеров надмолекулярных частиц в препарате ЛПС осуществляли методом динамического светорассеяния с использованием установки Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания). Интенсивность рассеяния света и корреляционную функцию определяли под углом 173° при длине волны гелий-неонового лазера $\lambda = 633$ nm. Измерения проводили в пластиковых четырехсторонних кюветах (SARSTED, Германия) при фиксированной фокусировке лазера в центр кюветы и постоянном диаметре диафрагмы. Измерения проводились при температуре 37 °C. Для измерений лиофилизированные препараты ЛПС растворяли в miliQ H_2O в концентрации 1 mg/mL. Раствор ЛПС выдерживался

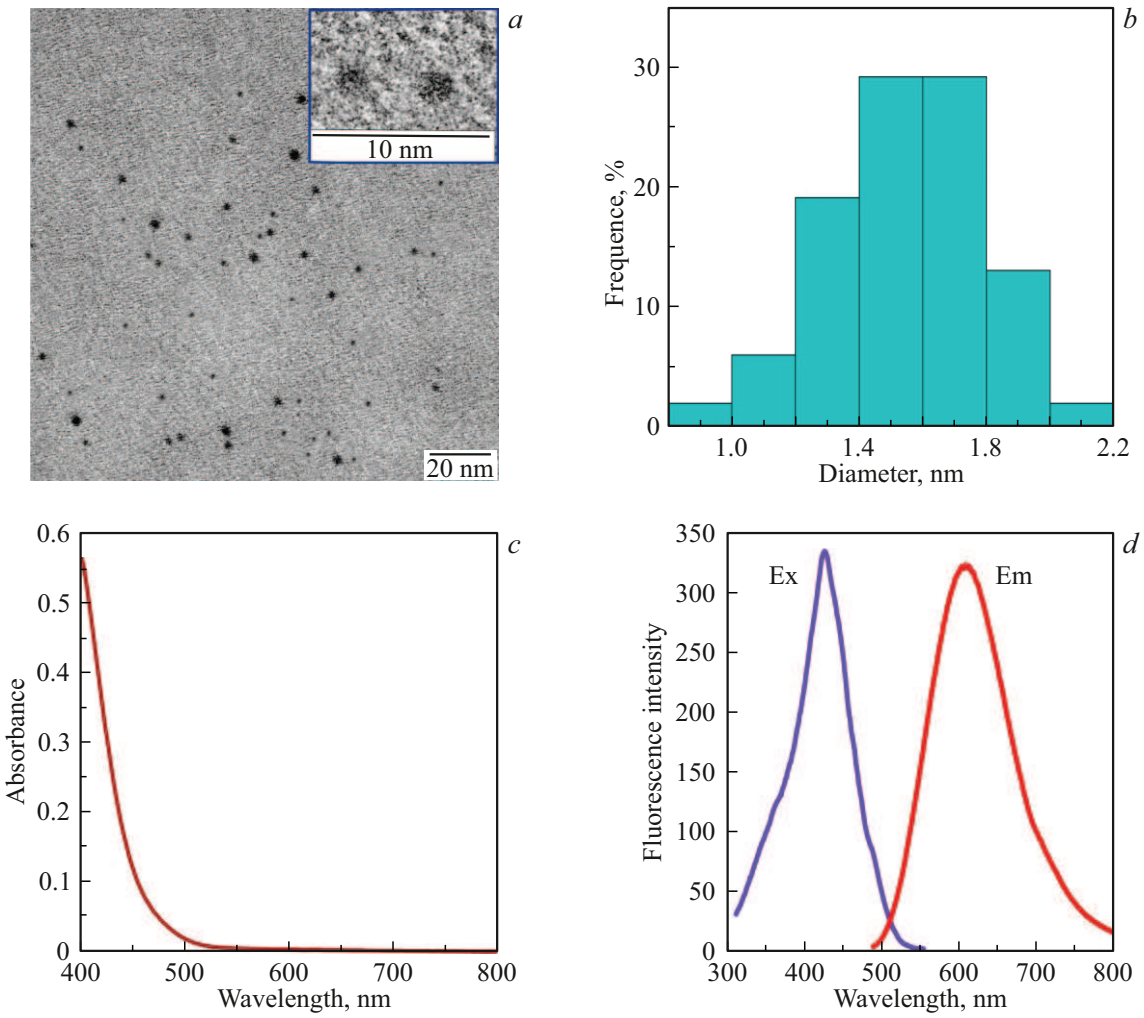

Рис. 1. Характеристика синтезированных GSH-AuNCs: электронно-микроскопическое изображение GSH-AuNCs (*a*); диаграмма числового распределения нанокластеров по размерами (*b*); спектр поглощения GSH-AuNCs (*c*); спектры флуоресценции GSH-AuNCs, синяя линия — спектр возбуждения (Ex), красная линия — спектр излучения (Em) (*d*).

перед каждым измерением в течение 2 min при заданной температуре.

В ходе экспериментов суспензии нанокластеров и ЛПС смешивали в различных пропорциях в пластиковых четырехсторонних кюветах. Полученные суспензии разбавляли до конечного объема 3 mL miliQ H_2O. В экспериментах по изучению влияния pH на выраженность AIEE-эффекта использовали ацетатный буфер (pH 4.5, 20 mM), фосфатный буфер (pH 7.4, 20 mM) и боратный буфер (pH 8.8, 20 mM) в качестве растворителей. После смешивания препараты выдерживали в течение 3 min при комнатной температуре. Спектры флуоресценции полученных суспензий регистрировали при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

Исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием „СИМБИОЗ“ ИБФРМ РАН (ФИЦ СНЦ РАН, Саратов).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена характеристика синтезированных GSH-AuNCs. На спектре поглощения GSH-AuNCs не наблюдается выраженного пика (рис. 1, *c*). Это свидетельствует о том, что все синтезированные нанокластеры имели размер менее 5 nm, а плазмонно-резонансные наночастицы не формировались. Электронно-микроскопическая характеристика подтверждает это. По данным ПЭМ, размер GSH-AuNCs составил 1.5 ± 0.5 nm (рис. 1, *a, b*). Максимум возбуждения флуоресценции GSH-AuNCs составил $\lambda = 410$ nm, а максимум эмиссии — $\lambda = 613$ nm (рис. 1, *d*).

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции GSH-AuNCs, зарегистрированные в присутствии различных концентраций ЛПС. Можно видеть, что с повышением концентрации ЛПС интенсивность флуоресцентного сигнала нанокластеров в спектральном диапазоне 550–650 nm существенно возрастала (рис. 2, *a*). Изме-

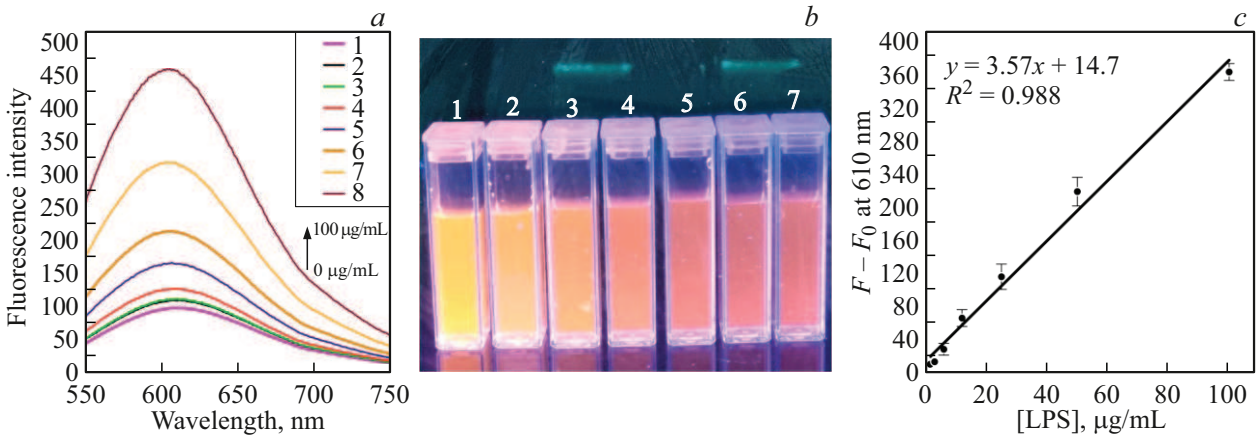

Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции GSH-AuNCs от концентрации ЛПС штамма *P. putida* TSh-18: *1* — 0 μg/mL, *2* — 1.5 μg/mL, *3* — 3 μg/mL, *4* — 6 μg/mL, *5* — 12 μg/mL, *6* — 25 μg/mL, *7* — 50 μg/mL, *8* — 100 μg/mL (*a*). Внешний вид суспензий GSH-AuNCs при экспозиции с различными концентрациями ЛПС: *1* — 100 μg/mL, *2* — 50 μg/mL, *3* — 25 μg/mL, *4* — 12 μg/mL, *5* — 6 μg/mL, *6* — 3 μg/mL, *7* — 0 μg/mL. Фотографии сделаны при освещении УФ-лампой ($\lambda = 365$ nm) (*b*). Зависимость показателя приращения флуоресценции GSH-AuNCs при $\lambda_{em} = 610$ nm от концентрации ЛПС (*c*).

нения интенсивности флуоресценции были легко заметны невооруженным глазом при освещении УФ-лампой ($\lambda = 365$ nm) (рис. 2, *b*). Зависимость показателя усиления эмиссии флуоресценции ($F - F_0$ при $\lambda = 610$ nm) нанокластеров от концентрации ЛПС имела линейный характер в диапазоне 1–100 μg/mL ($R^2 = 0.988$) (рис. 2, *c*). Установленный предел детекции составил 0.7 μg/mL. Следует обратить внимание также на тот факт, что при добавлении в среду ЛПС имело место незначительное, но детектируемое синее смещение положения максимума эмиссии GSH-AuNCs на 3 nm: от $\lambda = 613$ nm до $\lambda = 610$ nm. Возрастание интенсивности флуоресценции, как и смещение максимума эмиссии в сторону коротких длин волн, являются типичными проявлениями AIEE-эффекта у металлических нанокластеров [18].

Формирование надмолекулярных комплексов в водных препаратах ЛПС, выделенных из бактериальных клеток, обусловлено амфифильной природой данных биомакромолекул. Принято считать, что из бактериальных ЛПС преимущественно формируются однослойные мицеллы. Они включают в себя гидрофобную сердцевину из остатков жирных кислот и гидрофильную углеводную оболочку. Динамическое светорассеяние является очень удобным инструментом для характеристики надмолекулярной организации подобных дисперсных систем [19]. С помощью метода динамического светорассеяния в нашем исследовании был определен средний гидродинамический радиус надмолекулярных структур в препарате ЛПС штамма *P. putida* TSh-18 и распределение частиц по размерам (рис. 3). Средний гидродинамический радиус надмолекулярных мицеллярных комплексов в препарате ЛПС составил 62.3 ± 17.4 nm.

В нашей предыдущей работе [14] с помощью метода молекулярного докинга (ламаркианский генетический алгоритм) мы показали, что GSH-AuNCs способны связываться с модельным эндотоксином за счет образования водородных связей между карбоксильной, карбонильной и аминогруппой GSH-AuNCs и гидроксильными группами углеводной оболочки ЛПС. В данном случае проявление AIEE-эффекта, вероятно, обусловлено взаимодействием GSH-AuNCs с надмолекулярными комплексами (мицеллами) в препарате ЛПС, что приводит к ограничению внутримолекулярной подвижности нанокластеров и доминированию в них процессов излучательного перехода над процессами диссипации энергии в виде тепла.

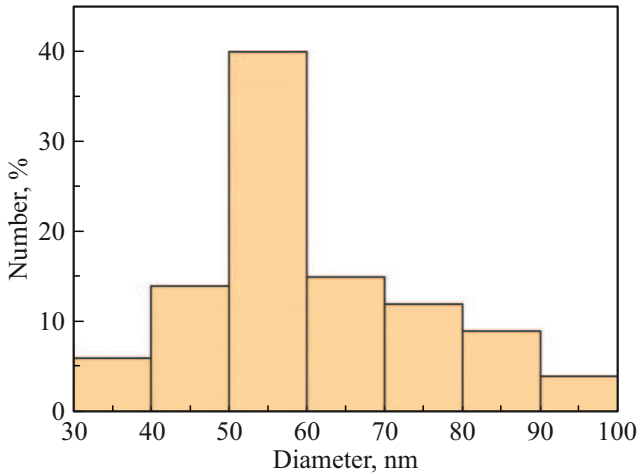

Рис. 3. Диаграмма числового распределения по размерам частиц в водном растворе ЛПС штамма *P. putida* TSh-18.

Была также проведена оценка влияния других биоорганических соединений на усиление интенсивности эмиссии GSH-AuNCs (рис. 4, *a*). В качестве интерферирующих соединений использовали препарат пектина, бычий сывороточный альбумин (BSA), глюкозу и глицин.

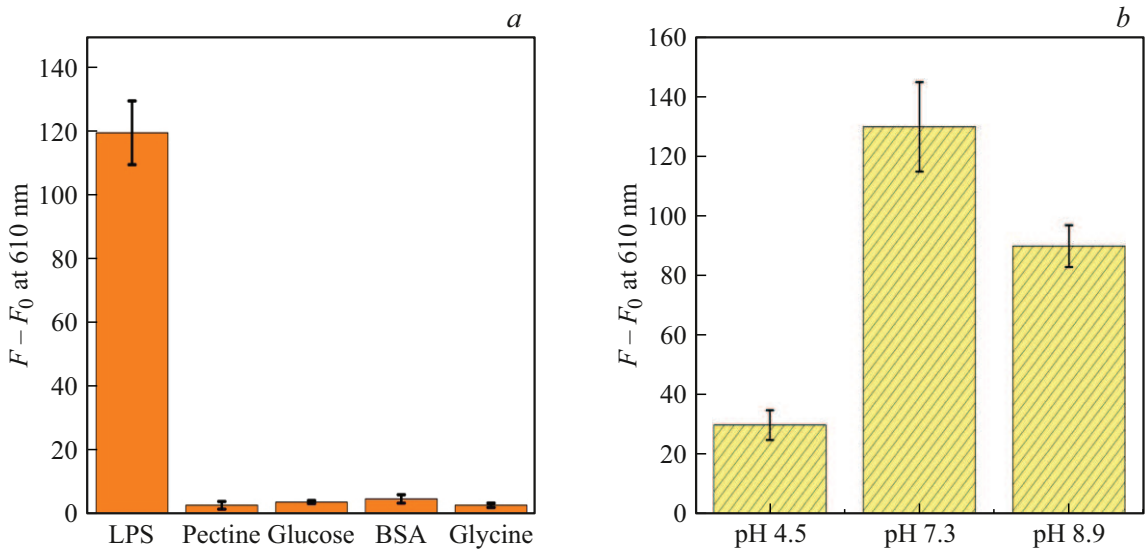

Рис. 4. Влияние различных веществ на усиление эмиссии флуоресценции GSH-AuNCs. Концентрация ЛПС и интерферирующих агентов — 50 μg/mL (*a*). Зависимость показателя приращения флуоресценции GSH-AuNCs от pH среды при экспозиции с 50 μg/mL-ЛПС штамма *P. putida* TSh-18 (*b*).

Только препарат ЛПС *P. putida* TSh-18 оказывал существенное влияние на усиление сигнала флуоресценции. Остальные соединения в исследованной концентрации не влияли на сигнал. Таким образом, можно заключить, что AIEE-эффект, возникающий вследствие взаимодействия нанокластеров и ЛПС, носит селективный характер.

Было показано, что кислотность среды, в которой происходит взаимодействие GSH-AuNCs и препарата ЛПС, оказывает влияние на выраженность AIEE-эффекта (рис. 4, *b*). При нейтральном (pH 7.3) и щелочном (pH 8.9) показателях кислотности усиление интенсивности сигнала флуоресценции нанокластеров практически не отличается. Напротив, при кислой реакции среды (pH 4.5) имеет место 80%-снижение показателя $F - F_0$. Вероятно, это обусловлено тем, что при низких значениях pH меняется характер мицеллообразования ЛПС и образуются надмолекулярные комплексы меньшего размера.

Таким образом, нами была впервые показана возможность детектирования ЛПС на основе AIEE-эффекта AuNCs. Данная аналитическая процедура характеризуется простотой, высокой скоростью исполнения и высокой селективностью. Основным ограничением, ассоциированным с ней, является низкая чувствительность метода. Предел детекции разработанного нами метода составляет 0.7 μg/mL, тогда как описанные в литературе AIEE-сенсоры для детекции ЛПС позволяют детектировать данные биомолекулы с пределом детекции 1–2 ng/mL [10]. Необходимы дальнейшие исследования для повышения чувствительности разработанного методического подхода. Одним из перспективных вариантов является подбор и введение в аналитическую систему ионов тяжелых металлов, тушащих флуоресценцию нанокластеров с последующим восстановлением флуоресцентного сигнала при добавлении ЛПС [20]. Такой подход в перспективе может позволить создать сенсор типа turn off /turn on с более высокой чувствительностью обнаружения эндотоксина.

Заключение

В настоящей работе был впервые зарегистрирован и охарактеризован эффект усиления эмиссии флуоресценции (AIEE-эффект), возникающий при взаимодействии гидрофильных нанокластеров типа GSH-AuNCs и ЛПС штамма *P. putida* TSh-18. Было продемонстрировано, что среди целого ряда биоорганических соединений только ЛПС селективно усиливал эмиссию GSH-AuNCs. Проявление данного эффекта, вероятно, обусловлено уменьшением внутримолекулярной подвижности GSH-AuNCs при связывании с надмолекулярными частицами в препарате ЛПС. Показано, что интенсивность флуоресценции GSH-AuNCs увеличивалась с повышением концентрации ЛПС. Зависимость увеличения интенсивности флуоресценции нанокластеров от содержания ЛПС имела линейный характер в диапазоне концентраций 1–100 μg/mL. Установленный предел детекции ЛПС составил 0.7 μg/mL. Кислотность среды оказывала влияние на выраженность AIEE-эффекта при взаимодействии GSH-AuNCs и ЛПС.

Полученные результаты можно использовать для разработки сенсорной системы для детекции ЛПС в фармацевтических продуктах. Дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на повышении чувствительности разработанного методического подхода.

Финансирование работы

Исследования и публикация выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки РФ для федерального исследовательского центра „Саратовский научный центр РАН“, тема № 124020100134-6.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

[1] F. Di Lorenzo, K.A. Duda, R. Lanzetta, A. Silipo, C. De Castro, A. Molinaro. Chem. Rev., **122**, 20 (2021). DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01321
[2] D.M. Foster, J.A. Kellum. Int. J. Mol. Sci., **24**, 22 (2023). DOI: 10.3390/ijms242216185
[3] K. Ito, K.Y. Inoue, K. Ino, T. Matsue, H. Shiku. Analyst, **144**, 11 (2019). DOI: 10.1039/C9AN00478E
[4] J. Gao, Z. Li, O. Zhang, C. Wu, Y. Zhao. Analyst, **142**, 7 (2017). DOI: 10.1039/c7an00019g
[5] L.X. Wen, J.J. Lv, L. Chen, S.B. Li, X.J. Mou, Y. Xu. Mikrochim. Acta, **186**, 122 (2019). DOI: 10.1007/s00604-018-3218-3
[6] Z. Zhang, J. Yang, W. Pang, G. Yan. RSC Adv.,**7**, 86 (2017). DOI: 10.1039/C7RA10710B
[7] N.K. Radhika, S.S. Gorthi. Anal. Methods, **13**, 2 (2021). DOI: 10.1039/D0AY01906B
[8] S.K. Lim, P. Chen, F.L. Lee, S. Moochhala, B. Liedberg. Anal. Chem., **87**, 18 (2015). DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02270
[9] X. He, L.H. Xiong, Z. Zhao, Z. Wang, L. Luo, J.W.Y. Lam, R.T.K. Kwok, B.Z. Tang. Theranostics, **9**, 11 (2019). DOI: 10.7150/thno.31844
[10] H. Kimoto, Y. Suzuki, Y. Ebisawa, M. Iiyama, T. Hashimoto, T. Hayashita. ACS Omega, **7**, 29 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.2c02935
[11] L. Huang, H. Tao, S. Zhao, K. Yang, Q.Y. Cao, M. Lan. Ind. Eng. Chem. Res., **59**, 17 (2020). DOI: 10.1021/acs.iecr.0c01408
[12] A. Cirri, H. Morales Hernández, C. Kmiotek, C.J. Johnson. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **58**, 39 (2019). DOI: 10.1002/anie.201907586
[13] T.S. Sych, A.M. Polyanichko, A.A. Buglak, A.I. Kononov. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., **298** (2023). DOI: 10.1016/j.saa.2023.122796
[14] S.S. Evstigneeva, D.S. Chumakov, R.S. Tumskiy, B.N. Khlebtsov, N.G. Khlebtsov. Talanta, **264** (2023). DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124773
[15] Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D.T. Leong, J.Y. Lee, J. Xie. J. Am. Chem. Soc., **134**, 40 (2012). DOI: 10.1021/ja306199p
[16] G. Bertani. J. Bacteriol., **62**, 3 (1951). DOI: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951
[17] В.А. Кульшин, А.П. Яковлев, С.Н. Аваева, Б.А. Дмитриев. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, **5** (1987).
[18] T. Li, H. Zhu, Z. Wu. Nanomaterials (Basel), **13**, 3 (2023). DOI: 10.3390/nano13030470
[19] G.L. Burygin, E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, B.N. Khlebtsov, S.Yu. Shchyogolev. Biophysics, **61**, 4 (2016). DOI: 10.1134/S0006350916040059
[20] H.H. Deng, X.Y. Fang., K.Y. Huang, S.B. He, H.P. Peng, X.H. Xia, W. Chen. Anal. Chim. Acta, **1088** (2019). DOI: 10.1016/j.aca.2019.08.047