

На правах рукописи

СПЕРАНСКАЯ ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ НА ОСНОВЕ СЕЛЕНИДА КАДМИЯ:
ПОЛУЧЕНИЕ, МОДИФИКАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ
В ИММУНОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

02.00.04 – физическая химия
02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Дмитриенко Александр Олегович

доктор химических наук, доцент
Горячева Ирина Юрьевна

Официальные оппоненты: **Горин Дмитрий Александрович**,
доктор химических наук, доцент,
ФГБОУ ВПО «Саратовский
государственный университет имени
Н.Г.Чернышевского», профессор кафедры
физики полупроводников

Панкин Кирилл Евгеньевич,
кандидат химических наук, ФГБОУ ВПО
«Саратовский государственный аграрный
университет имени Н.И. Вавилова», доцент
кафедры техносферной безопасности и
транспортно-технологических машин

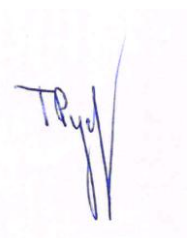
Ведущая организация: **Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
г. Москва**

Защита состоится 25 апреля 2013 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 по химическим наукам при ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 1, Институт химии СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич Саратовского государственного университета имени Н.Г.Чернышевского.

Автореферат разослан «___» марта 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Т.Ю. Русанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (или квантовые точки – КТ) находят широкое применение в самых разных приложениях биоанализа – от иммунохимических тест-методов до визуализации тканей и отслеживания лекарственных веществ в организме. Благодаря уникальным оптическим свойствам – зависимость цвета эмиссии от состава и размера КТ, высокая фотостабильность, широкие спектры поглощения – КТ всё чаще вытесняют используемые ранее органические красители.

В связи с высокой востребованностью КТ публикуется много работ по усовершенствованию методик их синтеза с целью создания нанокристаллов с улучшенными свойствами. В последнее время наметилась тенденция получения КТ из доступных и стабильных реагентов путём использования воспроизводимых методик. Кроме того, важной проблемой остаётся перевод КТ из органических растворителей (в которых получают нанокристаллы) в водные растворы без потери яркости и коллоидной стабильности. На сегодняшний день опубликован ряд работ по применению КТ в качестве меток в твердофазном иммуноанализе и лишь единичные работы посвящены применению КТ в иммунохимических тест-методах.

В данной работе основное внимание уделено получению КТ с различным цветом свечения; улучшению яркости флуоресценции КТ путём оптимизации условий синтеза; переводу КТ из органических растворителей в водные растворы; применению КТ в твердофазном иммунофлуоресцентном анализе и тест-методах.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является получение и модификация квантовых точек структуры ядро/оболочка на основе селенида кадмия и их применение в качестве флуоресцентных меток в иммунохимическом анализе. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

– отработать методики получения квантовых точек структуры ядро-оболочка состава CdSe/ZnS и CdSe/CdS/ZnS с длиной волны максимума флуоресценции в интервале 520-650 нм, что соответствует цвету свечения от зелёного до красного; осуществить выбор оптимальных параметров синтеза для воспроизводимого получения КТ с высокой яркостью флуоресценции;

– разработать методики перевода КТ из органического растворителя в водные растворы двумя способами: методом замены лигандов и путем покрытия амфифильными полимерами; синтезировать амфифильные полимеры для гидрофилизации КТ; установить оптимальные условия для перевода КТ в водные растворы; выбрать наиболее подходящий путь получения гидрофильных КТ для использования в качестве биометок;

– сравнить показатели твердофазного иммунофлуоресцентного анализа (КТ в качестве меток) и иммуноферментного анализа (пероксидаза хрена в качестве метки) на примере количественного определения микотоксина зеараленона;

– разработать неинструментальный колоночный тест-метод с применением флуоресцентных квантовых точек CdSe/ZnS в качестве биометок; оптимизировать методики проведения анализа на примере визуального детектирования микотоксина зеараленона в пшенице.

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс физико-химических методов исследования (люминесценция, УФ-, ИК-, видимая адсорбционная спектроскопия, дифрактометрия, электронная микроскопия) и иммунохимических методов анализа (твердофазный иммунохимический анализ на полистироловых микропланшетах, иммунохимические тест-колонки с сефарозой 4В и полиэтиленовыми фритами в качестве носителей).

Научная новизна состоит в следующем:

– отработаны методики получения квантовых точек структуры ядро-оболочка состава CdSe/ZnS и CdSe/CdS/ZnS с длиной волны максимума флуоресценции от 520 до 650 нм;

– разработан новый подход к увеличению стабильности коллоидных водных растворов КТ, покрытых тиоокислотами, основанный на химическом связывании растворенного кислорода в ходе его реакции с сульфитом натрия;

– синтезированы амфифильные полимеры из недорогих и доступных реагентов; отработана методика перевода КТ из органического растворителя в водные растворы путём покрытия амфифильным полимером;

– проведена сравнительная оценка твердофазного иммуноанализа при использовании в качестве меток КТ и фермента на примере количественного определения микотоксина зеараленона;

– разработан неинструментальный колоночный тест-метод для визуального детектирования зеараленона с применением КТ в качестве меток.

Практическая значимость работы.

В результате проведённых исследований были разработаны методики получения флуоресцентных КТ с цветом свечения от зеленого до красного и тест-системы с применением КТ в качестве биометок для анализа микотоксинов. Разработан новый подход к повышению стабильности водных коллоидных растворов КТ. Синтезированы новые амфифильные полимеры для покрытия КТ. Показано, что полученные КТ могут быть использованы в качестве меток в твердофазном иммуноанализе как в планшетном, так и в тест-вариантах.

На защиту автор выносит:

- Оптимизированную методику получения КТ ядро/оболочка из стабильных и доступных реагентов.
- Новый подход к повышению стабильности водных коллоидных растворов КТ, покрытых меркаптокислотами, на основе химического связывания растворенного кислорода.

- Методику синтеза амфифильного полимера и покрытия им КТ для перевода нанокристаллов из органического растворителя в водные растворы.
- Разработанный иммунохимический тест-метод с применением КТ в качестве флуоресцентных биометок.

Личный вклад соискателя заключается в постановке задач исследования, выборе методов синтеза и модификации КТ, непосредственном проведении экспериментов, обобщении полученных результатов, формулировании выводов.

Публикации. По теме данного исследования опубликовано 12 печатных работ: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 – в сборнике статей, 7 тезисов докладов, из них 4 – на Международных конференциях; получено положительное решение о выдаче патента на изобретение.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2010-2011» (Россия, Москва, 2010, 2011), Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2011» (Россия, Саратов, 2011), 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (Czech Republic, Prague, 2011), XIth International Conference on AgriFood Antibodies (Austria, Vienna, 2012), Всероссийская школа-конференция «Химия биологически активных веществ» молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «ХимБиоАктив-2012» (Россия, Саратов, 2012), Конференция с международным участием по аналитической спектроскопии (Россия, Туапсе, 2012), International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics SFM 2012 (Россия, Саратов, 2012).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения (4 главы), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 147 ссылок. Работа изложена на 118 страницах, содержит 56 рисунков и 14 таблиц.

Финансовая поддержка работы осуществлялась проектами: гранты РФФИ (12-03-91167, 11-03-93963, 12-03-92699), грант ДААД (А/10/73533, 2011), программой У.М.Н.И.К. (№ 01201268968).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены новизна, практическая значимость работы и основные результаты, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе представлен обзор литературы, в котором рассмотрены основные оптические свойства флуоресцентных КТ и требования, которые предъявляются к КТ, используемым в качестве меток в анализе. Приведены основные стадии синтеза КТ и последние разработки в области наращивания оболочек более широкозонных полупроводников для создания ярких и стабильных КТ структуры ядро-оболочка. Рассмотрены основные подходы к гидрофиллизации поверхности КТ с целью перевода их из органического растворителя в водные растворы – метод замены лигандов на поверхности КТ и покрытие КТ амфифильными полимерами – указаны их достоинства и недостатки. Кроме того, кратко рассмотрены последние достижения в области применения КТ в качестве флуоресцентных меток в иммунохимическом анализе.

Глава 2. Экспериментальная часть.

Данная глава содержит описание реагентов, используемых для проведения иммуноанализа, синтеза и модификации КТ. Синтез КТ, а также приготовление прекурсоров проводили в установке, схематически изображённой на рис. 1. Приведены методы, которые применяли для изучения свойств КТ: флуоресценция; УФ-, ИК-, видимая адсорбционная спектроскопия;

дифрактометрия; электронная микроскопия.

Описаны методики, позволяющие оценить размер КТ и их концентрацию в растворах по спектрам поглощения. Относительный квантовый выход (КВ) флуоресценции определяли относительно органических люминофоров с известным КВ: кумарина 2 (КВ 94% при $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм); родамина 6Ж (КВ 95% при $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм).

Для использования полученных гидрофильных КТ в иммуноанализе синтезировали конъюгаты: микотоксина зеараленона (ЗЕА) с овальбумином (ОВА), ЗЕА с пероксидазой хрена (ПХ), КТ с антителами анти-ЗЕА, КТ с ЗЕА-ОВА. В главе приведены методики связывания антител с гелем и пористыми полиэтиленовыми подложками (фритами); приготовления геля с блокированными активными группами; проведения иммунофлуоресцентного анализа в тест-колонках. Для сравнения КТ и фермента в качестве метки проводили твердофазный иммуноанализ на микропланшете. Количественную оценку результатов



Рис. 1 Схема установки для проведения синтеза КТ

выполняли на основе интенсивности флуоресценции (КТ в качестве метки) или оптической плотности (ПХ в качестве метки) с помощью ридера для микропланшетов Tecan Safire. Также в главе описаны методики проведения экспресс-определения ЗЕА с использованием геля и полиэтиленовых подложек в качестве носителей. Методики были использованы для определения ЗЕА в образцах пшеницы.

Глава 3. Синтез и характеристика нанокристаллов селенида кадмия

В данной главе описано два способа получения КТ CdSe: в водном растворе и в органическом растворителе октадецене ($t_{\text{кип}} = 315^{\circ}\text{C}$). Для синтеза КТ CdSe в водном растворе в качестве стабилизатора использовали меркаптопропионовую кислоту, молекулы которой покрывают поверхность образующихся КТ и препятствуют их коагуляции. Однако, полученные растворы КТ нестабильны. Связано это с тем, что тиольные группы, за счёт которых меркаптопропионовая кислота связывается с

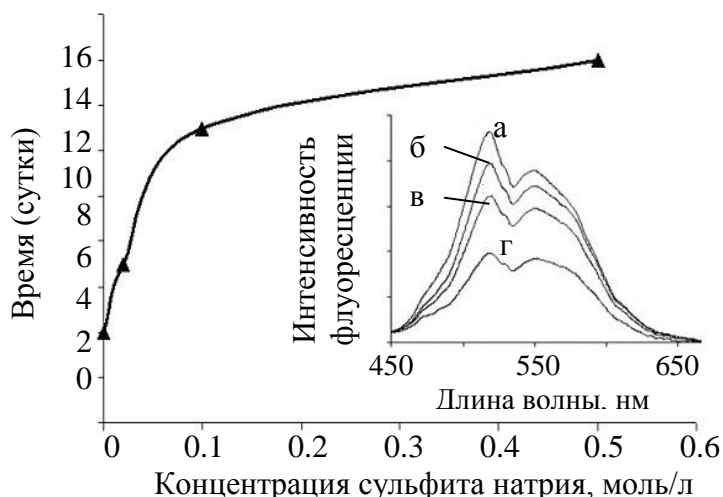


Рис. 2 Влияние концентрации Na_2SO_3 в растворе на стабильность водных растворов КТ во времени и на яркость флуоресценции КТ (вкладка); $C(\text{Na}_2\text{SO}_3)$: (а) 0 М, (б) 0.02 М, (в) 0.1 М, (г) 0.5 М.

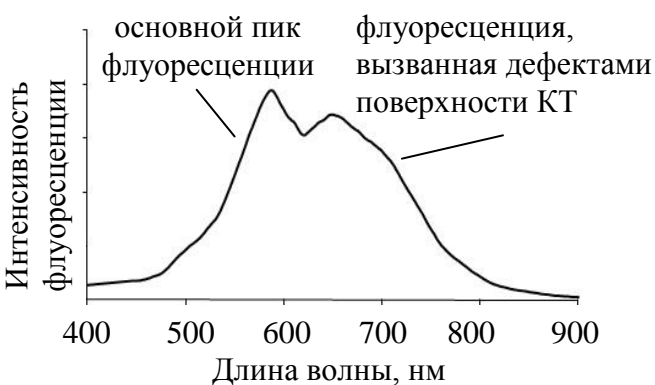


Рис. 3 Спектр флуоресценции растворов КТ CdSe, покрытых МПК, в воде, $\lambda(\text{возб.}) = 400 \text{ нм}$

люминесценции, вызванную дефектами нанокристаллов (рис. 3). КВ полученных КТ не превышал 3%.

значительно увеличить их стабильность во времени (рис. 2). Стабилизация растворов КТ происходит за счёт химического связывания сульфитом натрия растворённого в воде кислорода. КТ, полученные в водных растворах, имеют в спектре флуоресценции наряду с экситонным пиком ($\lambda_{\text{макс}} = 586 \text{ нм}$) широкую интенсивную длинноволновую полосу

В органическом растворителе октадеcene были получены две кристаллические модификации КТ CdSe: гексагональной структуры (типа вюрцит) и кубической (типа сфалерит). В качестве прекурсора кадмия в обоих синтезах использовали олеат кадмия, в качестве прекурсора селена для

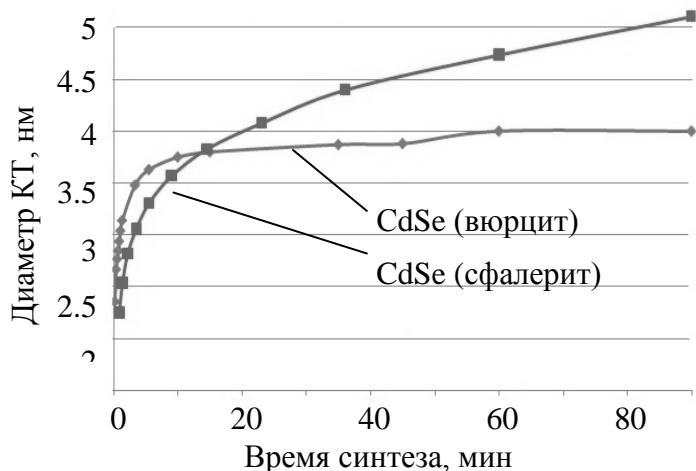


Рис. 4 Изменение диаметра КТ CdSe в процессе синтеза

получения КТ CdSe (вюрцит) применяли триоктилфосфин селенид (TOPSe), для получения КТ CdSe (сфалерит) – раствор селена в октадеcene. Диаметры КТ и концентрацию полученных растворов оценивали по спектрам поглощения. На рис. 4 приведены зависимости, отражающие рост нанокристаллов CdSe в процессе синтеза. В случае

применения TOPSe хорошо сформированные кристаллы образуются уже спустя 10 сек после впрыскивания прекурсора селена. Однако после 10 мин синтеза, смещения в спектре поглощения практически не происходит, что свидетельствует об остановке роста нанокристаллов. Таким образом для получения по этой методике КТ CdSe с диаметром более 4 нм необходимо дополнительное впрыскивание прекурсоров селена и кадмия. В случае использования раствора Se в ОДЕ рост нанокристаллов не останавливается, и возможно получение КТ с диаметром более 5 нм. На основании данных этих зависимостей в последующих синтезах реакцию останавливали в определённый момент для получения КТ CdSe нужного диаметра. Было показано, что для КТ, полученных в октадеcene, также характерна полоса эмиссии в длинноволновой области, связанная с дефектами КТ, однако она малоинтенсивна и по мере роста кристаллов практически исчезает (рис. 5).

Квантовые выходы КТ CdSe и структуры сфалерита, и структуры вюрцита не превышают 1.5%, однако химический выход реакции получения КТ с использованием TOPSe значительно больше, чем с применением раствора селена в октадеcene в качестве прекурсора (~50% и ~15% соответственно).

Хотя КТ CdSe,

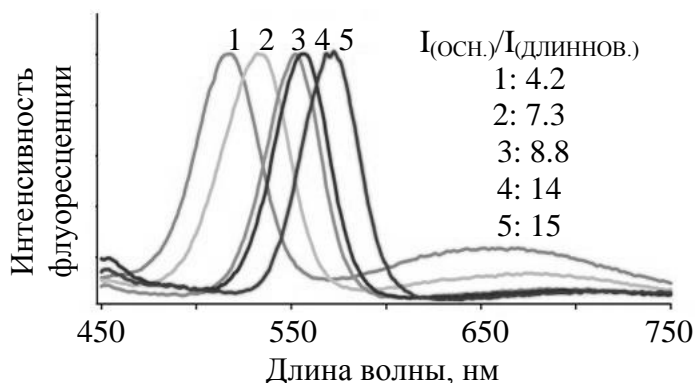


Рис. 5 Спектры флуоресценции растворов КТ CdSe в толуоле d(CdSe): 1) ~2,5нм; 2) ~2,7нм; 3) ~2,9 нм; 4) ~3,0 нм; 5) ~3,5 нм.

полученные в органическом растворителе, имеют ещё меньший КВ флуоресценции по сравнению с КТ CdSe, полученными в водной фазе, следует учитывать, что для гидрофобных КТ разработаны подходы к наращиванию оболочек более широкозонных полупроводников, которые приводят к значительному повышению КВ. Для КТ, полученных в водных растворах, в последние годы появляются отдельные публикации о наращивании оболочек, однако в качестве ядер в таких методах используют теллурид кадмия CdTe, и КВ полученных структур недостаточно высок. Кроме того, синтез КТ CdSe в водных растворах не позволяет получить весь диапазон размеров ядер CdSe, достигаемый при изменении времени синтеза КТ в органических средах. Гидрофобные КТ, приготовленные в октадецене, были выбраны для дальнейшей работы с целью получения флуоресцентных меток.

Глава 4. Наращивание оболочек более широкозонных полупроводников на ядрах CdSe

Для увеличения яркости флуоресценции и стабильности КТ CdSe покрывали оболочками более широкозонных полупроводников. В КТ структуры ядро-оболочка более широкозонный полупроводник пассивирует поверхность флуоресцирующего ядра – уменьшает число так называемых свободных валентностей, которые могут служить ловушками для носителей заряда. Также оболочка пространственно отделяет флуоресцирующее ядро от окружающей среды, таким образом, уменьшается чувствительность оптических свойств к внешним воздействиям. Важно, чтобы экситон не проникал в материал оболочки: чем больше разница в ширине запрещённой зоны материала ядра и оболочки, тем меньше вероятность проникновения элетрона или дырки во внешнюю оболочку. В табл.1 приведены характеристики полупроводников, которые могут быть использованы в качестве материала оболочки для КТ CdSe.

Табл. 1 Характеристики кристаллических структур халькогенидов кадмия-цинка (кубическая кристаллическая решетка)

	ZnSe	CdS	ZnS
Толщина одного монослоя, нм	0.28	0.35	0.31
Постоянная решётки, нм	0.5668	0.6077	0.541
Ширина запрещённой зоны, E_{g0} , эВ	2.69	2.49	3.61

Ядра с $d(\text{CdSe}) < 3$ нм покрывали оболочкой ZnS (ширина его запрещённой зоны максимальна). Для этого при комнатной температуре смешивали прекурсоры цинка (ацетат цинка, растворённый в смеси олеиламина и октадецена), серы (раствор серы в октадецене) и ядра CdSe в октадецене и смесь нагревали до 140 °С и выдерживали при этой температуре. Использовали ядра CdSe с кристаллической структурой сфалерита, поскольку в этих условиях ZnS кристаллизуется в этой структуре. Было оптимизировано время наращивания оболочки ZnS: показано, что яркость флуоресценции возрастает практически сразу после смешивания

прекурсоров ZnS и ядер CdSe и достигает максимума через 2.5 часа. Исследовано влияние исходного количества прекурсоров цинка и серы на оптические свойства КТ CdSe/ZnS. Количество прекурсоров цинка и серы, необходимое для получения оболочки ZnS, рассчитывали, используя параметры кристаллических решёток CdSe и ZnS.

В данной работе варьировали количество прекурсоров цинка и серы для получения КТ CdSe/ZnS с 3; 4.5 и 6 условными монослоями сульфида цинка. Указанное количество монослоёв не является реальным, а служит лишь для расчёта количества прекурсоров. Условный слой отражает такое количество монослоёв сульфида цинка, которое могло образоваться, если бы всё добавленное количество прекурсоров перешло в оболочки. Показано, что при

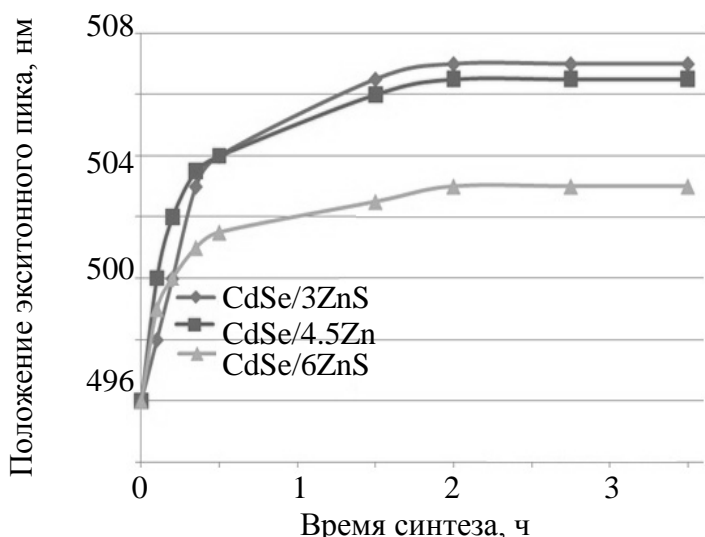


Рис. 6 Изменение положения экситонного пика во время наращивания оболочки ZnS

наращивании оболочки ZnS экситонный пик смещается в красную область спектра в первые 1.5 ч, затем его положение остаётся неизменным (рис. 6). Чем меньше смещение в спектре поглощения после наращивания оболочки, тем в меньшей степени происходит проникновение экситона из флуоресцирующего ядра CdSe в слой ZnS. Важно отметить, что смещение в спектре поглощения

уменьшается при увеличении количества прекурсоров ZnS в исходной смеси. Полученные значения относительного КВ приведены в табл. 2. Необходимо добавить, что при наращивании оболочки сульфида цинка полностью исчезает флуоресценция в длинноволновой части спектра, вызванная дефектами на поверхности флуоресцирующего ядра.

Табл. 2 Квантовые выходы растворов КТ в толуоле

КТ	Квантовый выход
CdSe	1.5%
CdSe/3ZnS	40%
CdSe/4.5Zn	46%
CdSe/6ZnS	60%
после добавления додекантиола	
CdSe/3ZnS	22%
CdSe/4.5Zn	31%
CdSe/6ZnS	48%

Для оценочного суждения о равномерности образующейся оболочки ZnS был сделан тест на устойчивость флуоресценции КТ к наличию тиолов в растворе. Ранее было показано, что тиольные группы сильно снижают интенсивность флуоресценции КТ: если оболочка ZnS неравномерно покрывает КТ CdSe, и создаётся возможность взаимодействия тиольных групп с атомами кадмия флуоресцирующего ядра, то происходит тушение люминесценции. В качестве тиол-

содержащего вещества использовали додекантиол. Из данных табл. 2 по КВ растворов КТ после добавления додекантиола очевидно, что эффективность изоляции ядра возрастает с толщиной оболочки ZnS в изученном интервале. Данные по изменению положения экситонного пика в процессе наращивания оболочки ZnS (рис. 6) позволяют сделать такой же вывод.

Дифрактограммы КТ CdSe и CdSe/ZnS позволили предположить, что в данных условиях синтеза оболочка ZnS

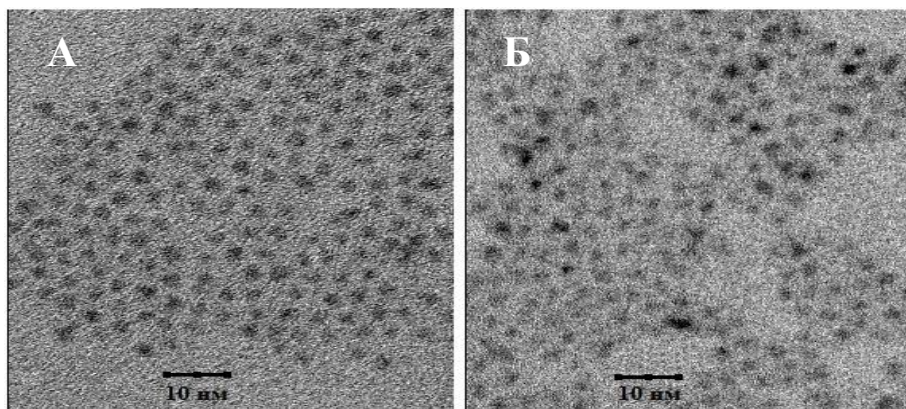


Рис. 7 Данные с просвечивающего электронного микроскопа: КТ CdSe (А), CdSe/6ZnS (Б)

предпочтительно

растёт на гранях (111) и (311) ядер CdSe. Отсутствие на дифрактограммах характерных для структуры вюрцита пиков после наращивания оболочки указывает на сохранение у КТ структуры сфалерита. Показано, что исходные ядра и полученные структуры ядро/оболочка имеют сферическую форму и однородны по размеру (рис. 7). Для дальнейшего применения в качестве меток были выбраны КТ, обладающие наибольшей яркостью – CdSe/6ZnS.

Ранее было показано, что наращивание оболочек ZnS непосредственно на ядрах CdSe с $d(\text{CdSe}) > 3$ нм затруднительно из-за сильных различий в параметрах кристаллической решётки. Для наращивания оболочек на таких ядрах использовали метод послойного наращивания оболочек, который

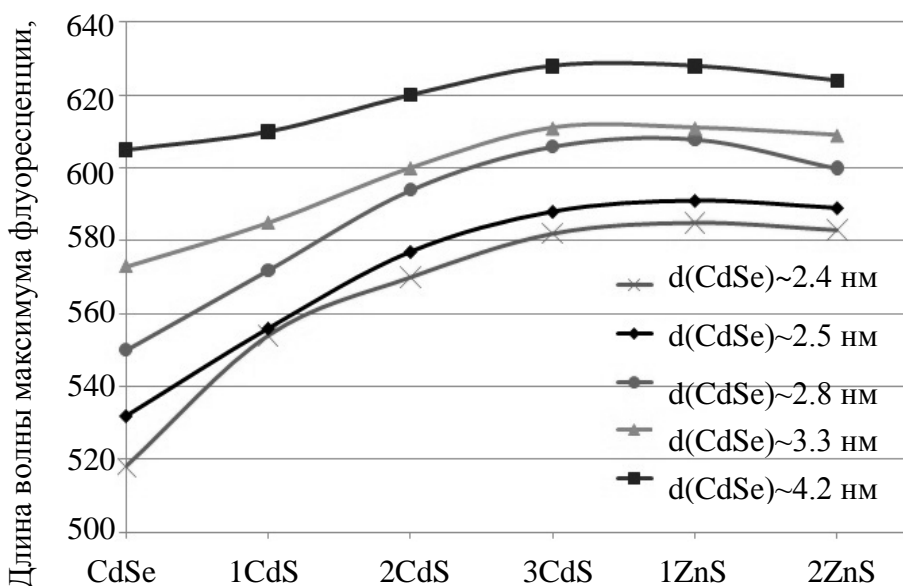


Рис. 8 Изменение длины волны максимума флуоресценции при наращивании оболочек на ядрах CdSe разного диаметра

закключается в попеременном добавлении прекурсоров металла и халькогенида в раствор КТ CdSe при высоких температурах ($200^{\circ}\text{C} - 250^{\circ}\text{C}$).

Чтобы избежать дефектов на стыке двух кристаллических решёток – CdSe и ZnS – между

ними помещали слой сульфида кадмия, который имеет промежуточные между CdSe и ZnS параметры кристаллической решётки и значение ширины запрещённой зоны (табл. 1).

При добавлении прекурсоров сульфида кадмия происходило сильное смещение пиков в спектрах поглощения и эмиссии в длинноволновую область (рис. 8). Связано это с тем, что, несмотря на большее значение ширины запрещённой зоны для сульфида кадмия (табл. 1), разница между краем зоны проводимости для сульфида и селенида кадмия невелика. Поэтому электрон проникает в оболочку сульфида кадмия, что вызывает

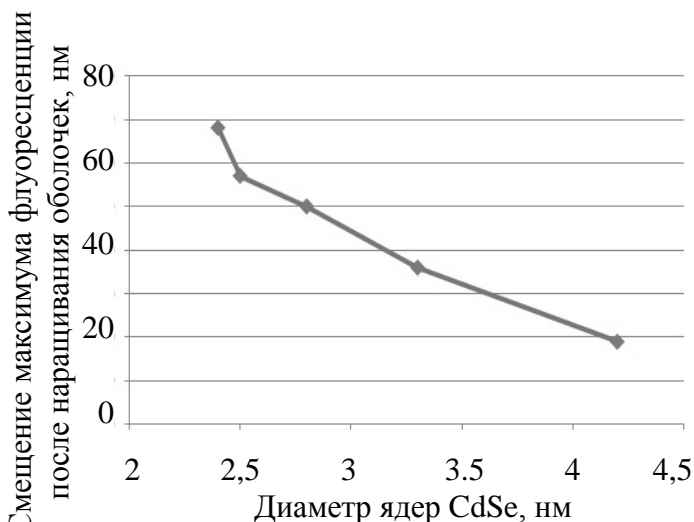


Рис. 9 Смещение максимума флуоресценции в КТ CdSe/CdS/ZnS в зависимости от диаметра исходных ядер CdSe

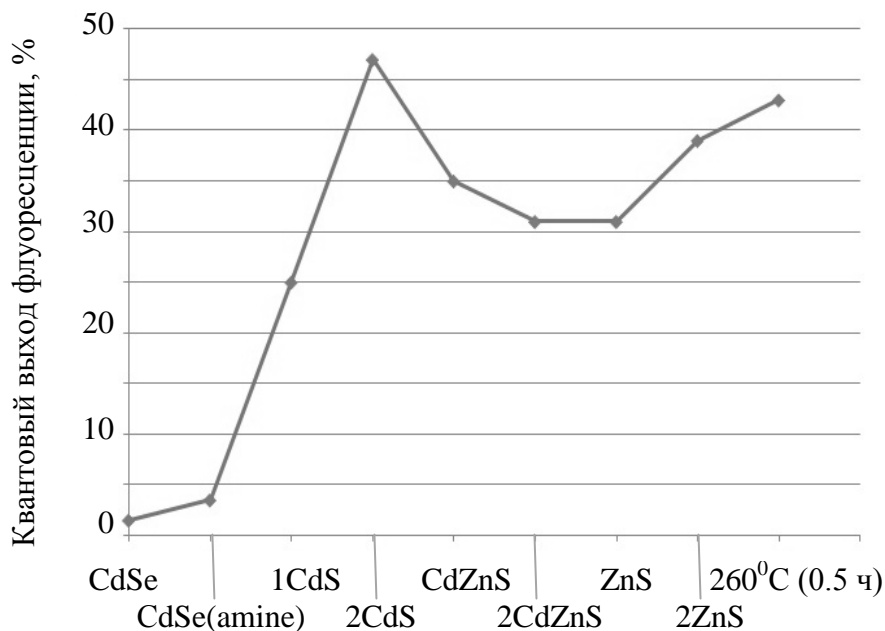


Рис. 10 Изменение квантового выхода флуоресценции в процессе последовательного наращивания оболочек

при наращивании одинакового количества слоёв (рис. 9).

смещение пиков в спектрах. При наращивании первой оболочки сульфида цинка смещения практически не происходит (рис. 8), после наращивания второй оболочки сульфида цинка экситонный пик немного смещается в коротковолновую часть спектра, что вероятно связано с образованием твёрдого раствора CdZnS из-за диффузии атомов цинка в ядро.

Показано, что при получении КТ CdSe/CdS/ZnS методом послойного наращивания оболочек диаметр исходных CdSe значительно влияет на величину смещения экситонного пика и максимума флуоресценции: чем меньше диаметр исходных КТ, тем сильнее будут смещаться спектры при

Было показано, что кристаллическая структура исходных ядер не влияет на яркость полученных КТ CdSe/CdS/ZnS. Вероятно, связано это с тем, что в таких условиях синтеза (температура 220 °С и наличие амина в реакционной смеси) поверхность КТ CdSe подвергается трансформации, таким образом, поверхность и КТ структуры вюрцита, и КТ структуры сфалерита, становятся идентичными перед наращиванием оболочек. Поэтому для синтеза структур CdSe/CdS/ZnS были использованы ядра CdSe структуры вюрцита, которые можно получать с гораздо большим химическим выходом.

Было исследовано изменение КВ флуоресценции в процессе наращивания оболочек (рис.10): КВ флуоресценции сильно возрастает при наращивании оболочек CdS (КВ (CdSe/2CdS)= 47%), однако при нанесении цинк-содержащей оболочки, яркость падает (КВ (CdSe/2CdS/2CdZnS)=31%). После наращивания второй оболочки ZnS и дополнительного нагрева при 260°С яркость флуоресценции несколько увеличивается, и КВ полученных КТ CdSe/2CdS/2CdZnS/2ZnS составляет 43%. Показано, что яркость флуоресценции всех КТ с цинк-содержащей оболочкой меньше, чем яркость КТ, содержащих только CdS-оболочки. Однако для дальнейшей работы по переводу в воду и биоприменению необходимы КТ с оболочкой сульфида цинка для эффективной изоляции экситона внутри флуоресцирующей части CdSe/CdS.

Таким образом, сочетание двух способов наращивания оболочек позволяет создавать оболочки более широкозонных полупроводников на ядрах CdSe любого диаметра для получения КТ структуры ядро-оболочка с флуоресценцией голубого и зелёного цвета свечения (КТ CdSe/ZnS) и от жёлтого до красного (КТ CdSe/CdS/ZnS).

Глава 5. Перевод квантовых точек из органических растворителей в водные растворы

КТ, применяемые как метки в биоанализе, должны образовывать стабильные коллоидные водные растворы. Для успешной конъюгации КТ с биомолекулами на их поверхности необходимы функциональные группы (-COOH или -NH₂). Для перевода КТ, синтезированных в органическом растворителе, были использованы два способа: метод замены лигандов и покрытие амфифильным полимером.

По первому способу исходные гидрофобные лиганды, покрывающие КТ, замещаются на гидрофильные. Данный процесс будет происходить только в том случае, если гидрофильный лиганд имеет большее сродство к поверхности КТ, чем исходный. Ранее было показано, что меркаптогруппа имеет наибольшее сродство к атомам металлов на поверхности КТ, поэтому для перевода КТ по этому методу чаще всего используют гидрофильные лиганды с концевой меркаптогруппой. В данной работе была использована меркаптопропионовая кислота (МПК) в качестве гидрофильного лиганда. Меркаптогруппа МПК связывается с поверхностными атомами цинка, а карбоксильная группа обеспечивает растворимость в воде и возможность

конъюгации с биомолекулами. Для покрытия КТ молекулами МПК гидрофобные КТ, растворённые в толуоле, смешивают с водным раствором, содержащим МПК, и оставляют эмульсию при перемешивании на 1-2 часа. Окрашивание нижнего водного слоя свидетельствует о переходе КТ в него. Были подобраны оптимальные условия процесса для более полной гидрофилизации КТ: мольное соотношение МПК:КТ (3000:1), состав водной фазы (водный раствор, содержащий аммиак и МПК в мольном соотношении 1:1)). Однако, полученные водные коллоидные растворы КТ, покрытых МПК, нестабильны во времени из-за склонности тиольных групп к окислению. Небольшие по размеру молекулы МПК не создают защитного слоя между поверхностью КТ и раствором.

Для увеличения стабильности КТ, покрытых МПК, нанокристаллы покрывали денатурированным бычьим сывороточным альбумином (дБСА). В молекулах дБСА в результате реакции с борогидридом натрия NaBH_4 дисульфидные связи частично восстановлены до тиольных, через которые и происходит связывание молекул белка с атомами цинка на поверхности КТ. Объёмные молекулы дБСА создают хороший изолирующий слой, благодаря чему водные растворы таких КТ стабильны во времени.

В табл. 3 приведены данные по КВ флуоресценции КТ CdSe/ZnS с разной толщиной оболочки ZnS. КТ с более толстой оболочкой ZnS имеют изначально более высокий КВ флуоресценции. Показано, что после перевода в воду КТ CdSe/6ZnS лучше сохраняют яркость по сравнению с КТ CdSe/4.5ZnS. Мы предполагаем, это связано с тем, что КТ CdSe/6ZnS имеют более равномерную изолирующую оболочку сульфида цинка, которая препятствует взаимодействию тиольных групп с флуоресцирующим ядром. Как было отмечено выше, тиольные группы сильно снижают флуоресценцию КТ.

Табл. 3 Относительный квантовый выход КТ до и после перевода в воду с помощью МПК

КТ	растворитель	КВ, %
CdSe/4.5ZnS	толуол	45
	вода	15
CdSe/6ZnS	толуол	60
	вода	36
CdSe/3CdS/2ZnS	толуол	33
	вода	9

Для КТ состава CdSe/CdS/ZnS также характерно сильное падение яркости флуоресценции после перевода в воду с помощью МПК (табл. 3), что свидетельствует о неравномерности оболочки сульфида цинка. Показано, что после перевода в воду ширина пиков не изменяется, дополнительных полос в спектрах флуоресценции не появляется, однако наблюдается небольшое смещение положения пиков флуоресценции (± 5 нм), что может быть объяснено некоторыми изменениями в структуре поверхностного слоя КТ.

КТ CdSe/6ZnS, покрытые МПК и дБСА, устойчивы в водных растворах при рН 6÷13 в течение по меньшей мере 8 месяцев при комнатной температуре. КВ этих КТ достаточно высокий для использования таких нанокристаллов в качестве биометок в иммунохимическом анализе.

Конъюгация с биомолекулами может быть проведена через карбоксильные и аминокруппы дБСА.

По второму способу КТ переводили в водные растворы покрытием амфифильными полимерами. При этом гидрофобные цепи полимеров взаимодействуют с гидрофобными лигандами на поверхности КТ, а гидрофильная часть обеспечивает коллоидную стабильность нанокристаллов в водных растворах.

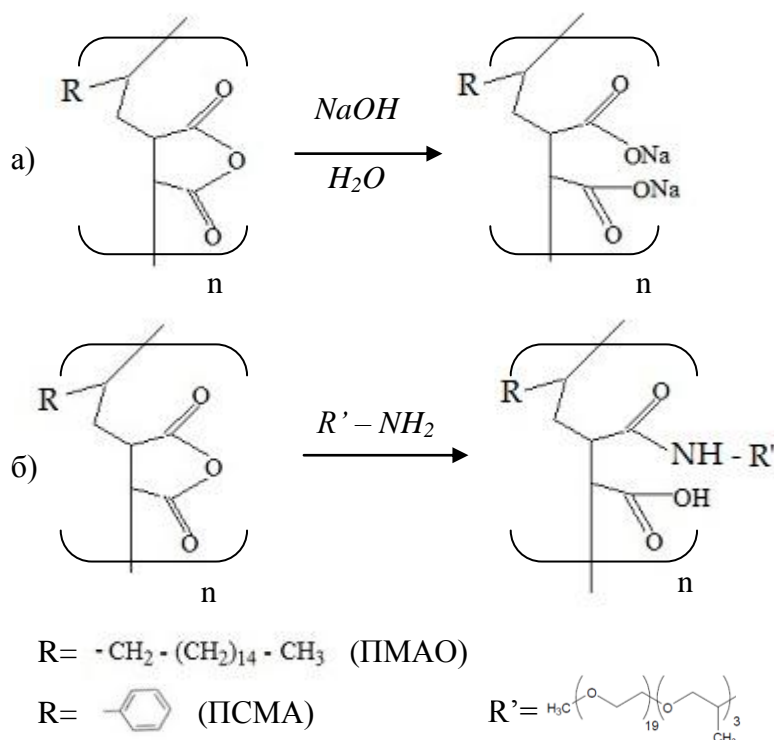


Рис. 11 Схемы реакций: а) щелочной гидролиз полимера; б) взаимодействие полимера с первичным амином.

водорастворимость. Кроме того, ангидридная группа может взаимодействовать с первичными аминами с образованием амидной связи. В качестве амина нами был использован дешёвый и стабильный водорастворимый полимер Джеффамин М1000, состоящий из этиленгликолевых и пропиленгликолевых звеньев. О протекании реакции с Джеффамином судили по ИК-спектрам: в ходе реакции интенсивность колебаний группы С=О малеинового ангидрида (1858 см^{-1} , 1777 см^{-1}) снижается, а интенсивность колебаний, характерных для группы С=О карбоновой кислоты ($1700-1725 \text{ см}^{-1}$), увеличивается. Для проверки растворимости полимера в воде хлороформ удаляли на роторном испарителе, после чего к полученной полимерной плёнке добавляли воду и подвергали ультразвуковой обработке. Было показано, что амфифильный полимер, растворимый в воде, получается при избытке Джеффамин. При этом после завершения реакции (при любых соотношениях) в смеси остаётся непрореагировавший Джеффамин. Наличие непрореагировавшего

Для синтеза амфифильных полимеров использовали поли(малеиновый ангидрид-октадецен) (ПМАО) и поли(стирол-малеиновый ангидрид) (ПСМА), отличающиеся длиной гидрофобной цепи и молекулярной массой (М(ПМАО) 30000-50000 г/моль, М(ПСМА) 1700 г/моль). Амфифильные полимеры синтезировали по схемам (рис. 11): реакционноспособное кольцо малеинового ангидрида раскрывается под действием щёлочи, при этом образующиеся карбоксилат-ионы сообщают полимеру

Джеффамин в реакционной смеси доказывали качественной реакцией на первичные аминогруппы: на подложку из силикагеля помещали каплю реакционной смеси, после испарения хлороформа подложку опрыскивали раствором, содержащим нингидрин и помещали её на плитку, нагретую до 100⁰С на 15 мин. Фиолетовое окрашивание указывало на наличие первичных аминогрупп.

На рис. 12 представлены ИК-спектры исходных компонентов и амфифильного полимера, растворимого в воде. В ИК-спектре полученного полимера отсутствуют пики, характерные для малеинового ангидрида, что свидетельствует о раскрытии всех колец малеинового ангидрида.

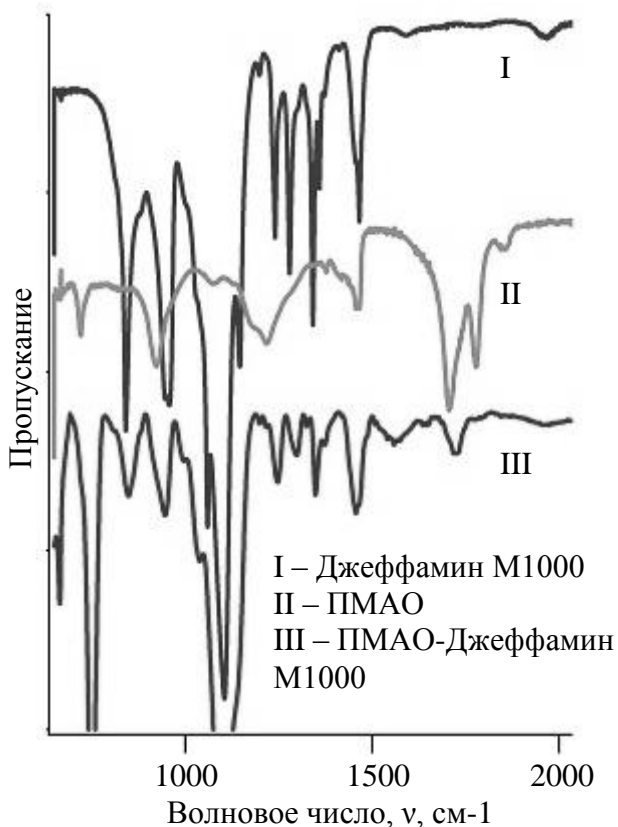


Рис. 12 ИК-спектры исходных реагентов и полученного полимера

Были проведены эксперименты по переводу КТ в водные растворы путём покрытия четырьмя полимерами: ПМАО, ПСМА, ПМАО-Джеффамин, ПСМА-Джеффамин. Для покрытия КТ полимером применяли различные подходы, наиболее воспроизводимым показал себя следующий: КТ структуры ядро-оболочка, растворённые в хлороформе, добавляли к полимеру (ПМАО, ПСМА, ПМАО-Джеффамину или ПСМА-Джеффамину), предварительно растворённому в хлороформе и оставляли на магнитной мешалке на ночь. На следующий день к раствору добавляли водный раствор щелочи (рН 12). Колбу с эмульсией присоединяли к водоструйному насосу: при испарении хлороформа

КТ, покрытые полимером, и избыточный полимер постепенно переходят в водную фазу. Эксперимент показал, что для более полного перехода КТ в водные растворы требуется значительный избыток полимера; найдены оптимальные соотношения реагентов. Показано, что при переходе от КТ CdSe/ZnS (λ (флуор.) ~ 520- 540 нм) к КТ с большим диаметром, например КТ CdSe/CdS/ZnS (λ (флуор.) ~ 610-640), для гидрофилизации требуется ~ в 2 раза большее количество полимера.

Изменение яркости флуоресценции при переводе в воду с помощью полимеров было изучено на примере КТ CdSe/2CdS/2CdZnS/2ZnS (λ (флуор.)=605 нм); относительный КВ этих КТ в толуоле составил 40%. Показано, что водные коллоидные растворы КТ, покрытых ПСМА и ПСМА-Джеффамин, крайне неустойчивы: при попытке разбавления КТ выпадали в

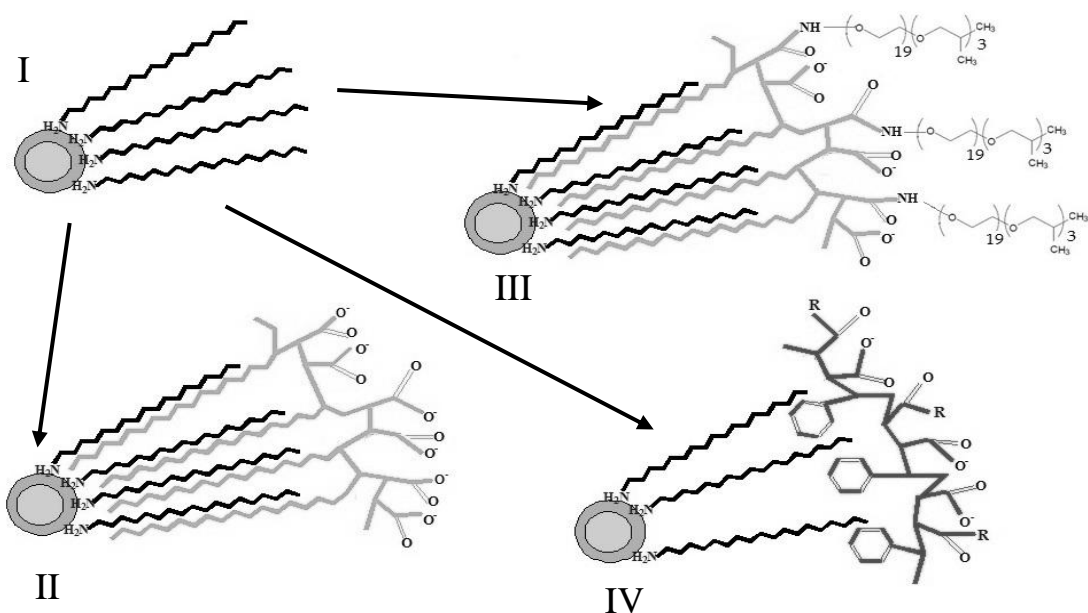


Рис. 13 Схемы покрытия гидрофобных КТ (I) различными полимерами: ПМАО (II), ПМАО-Джеффамином (III), ПСМА (IV, где R = O⁻), ПСМА-Джеффамином M1000 (IV, где R = NH(OC₂H₄)₁₉(OC₃H₆)CH₃).

виде осадка. Также растворы КТ, покрытых ПСМА-Джеффамин, были стабильны только в течение 1-4 дней: чем больше было в растворе избыточного полимера, тем дольше не выпадал осадок КТ. Возможно, такая нестабильность связана со слишком большим различием в длине гидрофобных цепей исходных лигандов на поверхности КТ (C18) и кумольных фрагментов полимера ПСМА, и, как следствие, слабым гидрофобным взаимодействием между цепями (рис. 13).

Водные растворы КТ, покрытых ПМАО, стабильны во времени и устойчивы в щелочных буферных растворах. В кислых средах такие КТ выпадают в осадок. Связано это с тем, что коллоидный раствор КТ в данном случае стабилизирован за счёт электростатического отталкивания между карбоксилат-ионами на поверхности КТ (рис. 13). В кислых средах карбоксильные группы не заряжены, следовательно, и полимер, и покрытые им КТ становятся нерастворимыми в воде и выпадают в осадок. Относительный КВ водных коллоидных растворов КТ, покрытых ПМАО, составил 30%, что значительно выше результатов, полученных при переводе КТ в воду с помощью МПК.

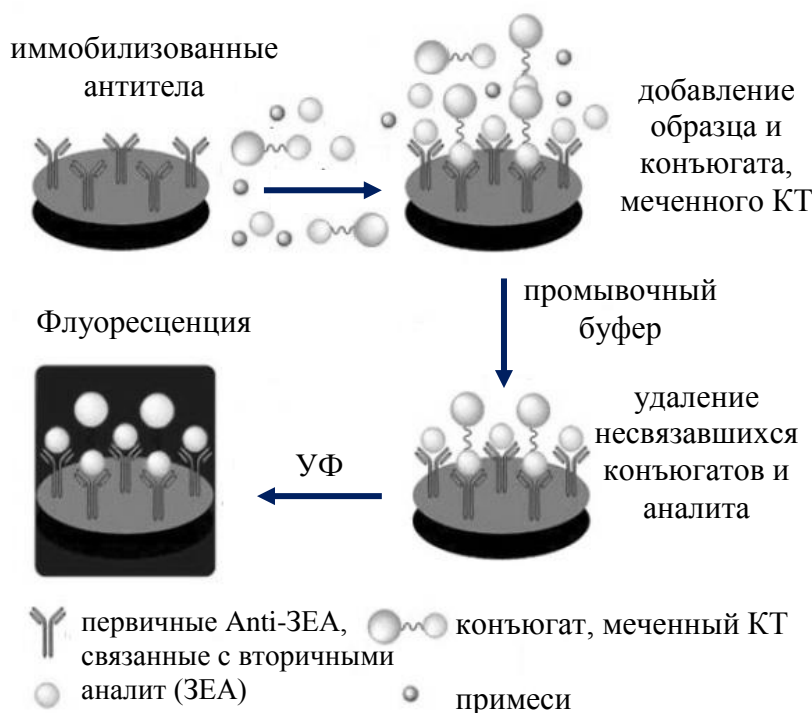
Наилучшие результаты показали КТ, покрытые ПМАО-Джеффамин: яркость флуоресценции при переводе в воду практически не падает (относительный КВ водного раствора составил 37%), что выгодно отличает эти точки от КТ, покрытых только ПМАО. По-видимому, гидрофильные цепи Джеффамина создают дополнительный барьер между поверхностью КТ и окружающей средой. После перевода в воду с помощью полимера смещения пика флуоресценции не происходит, однако появляется малоинтенсивная широкая полоса эмиссии в области 400-500 нм, вызванная наличием полимера. Полученные КТ, покрытые ПМАО-Джеффамин устойчивы в буферных растворах в интервале рН 3.8-13. Таким образом, в

отличие от КТ, покрытых только ПМАО, полученные КТ устойчивы и в кислых средах, поскольку в данном случае стабилизированы не за счёт электростатического, а за счёт стерического отталкивания объёмных полиэтилен и полипропилен–гликолевых фрагментов (рис. 13).

Глава 6. Разработка тест-методов с применением квантовых точек в качестве флуоресцентных меток

В данной главе описано применение КТ в качестве меток в твердофазном иммуноанализе на микропланшетах и в тест-методах на примере определения микотоксина зеараленона (ЗЕА) в образцах пшеницы. В качестве меток использовали КТ CdSe/6ZnS ($\lambda(\text{флуоресц})=530$ нм). Провели сравнение КТ, покрытых МПК-дБСА и полимером ПМАО-Джеффамин. Оба покрытия содержат на поверхности карбоксильные группы, которые были использованы для конъюгирования КТ с антителами и

Показано, что оба синтезированных конъюгата КТ с антителами анти-



ЗЕА показали лишь слабое взаимодействие с вторичными антителами, вероятно, вследствие некоторого изменения структуры антител либо стерических препятствий. Поэтому для проведения анализа КТ конъюгировали с аналитом посредством связывания с конъюгатом ЗЕА с овальбумином (ЗЕА-ОВА). Выбраны оптимальные условия конъюгации КТ с ЗЕА-ОВА: молярное

Рис.14 Схема проведения конкурентного иммуноанализа (метка – КТ)

соотношение ОВА:КТ=5:1, бикарбонатный буфер (pH 8.3), время синтеза – 3 часа.

Сначала было проведено сравнение показателей твердофазного иммуноанализа при использовании в качестве меток КТ и фермента пероксидазы хрена (ПХ) на примере количественного определения ЗЕА. На рис. 14 представлен поэтапно процесс конкурентного иммуноанализа с КТ в качестве меток, который включает в себя меньше стадий, чем традиционный иммуноферментный анализ (ИФА). Аналитический сигнал –

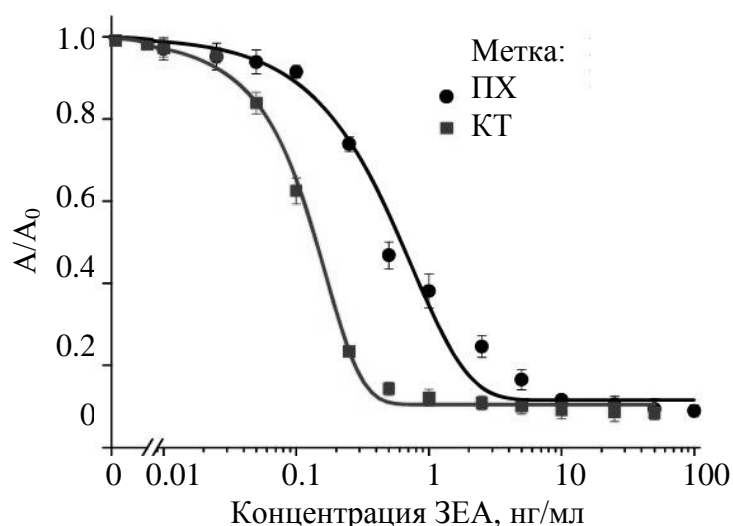


Рис. 15 Градуировочные кривые для определения ЗЕА с применением фермента и КТ в качестве меток. A/A_0 – относительный аналитический сигнал: оптическая плотность ($\lambda=450$ нм) для ПХ и интенсивность флуоресценции ($\lambda=590$ нм) для анализа с применением КТ

флуоресценцию – можно наблюдать сразу после стадии промывки от несвязавшихся компонентов, в то время как ИФА требует добавление субстрата и времени для развития окраски. Таким образом, при использовании в качестве метки КТ требуется меньше операций и времени на проведение определения.

Градуировочные кривые при использовании двух меток приведены на рис. 15. Использование КТ в конкурентном иммуноанализе на микропланшете приводит к значительному увеличению чувствительности метода (табл. 4). Было показано, что ПрО в случае применения КТ, покрытых дБСА и амфифильным полимером, практически совпадают. Однако КТ, переведённые в воду с помощью амфифильного полимера, более устойчивы при их конъюгации с ЗЕА-ОВА, в то время как КТ, покрытые МПК, иногда выпадали в осадок при активации карбоксильных групп. Возможно, связано это с частичным понижением рН раствора, при этом растворы КТ, покрытых белком, теряют стабильность. В дальнейшей работе для создания иммунохимических тест-систем были использованы КТ, покрытые полимером.

Табл. 4 Аналитические показатели определения ЗЕА твердофазным иммуноанализом на микропланшетах с использованием различных меток

	Фермент	КТ, покрытые МПК, дБСА	КТ, покрытые полимером
ПрО, нг/мл	0.08	0.03	0.03
IC 50, нг/мл	0.4	0.10	0.13
Диапазон линейной зависимости, нг/мл	0.15-20	0.05-0.24	0.05-0.22

Тест-определение с применением КТ в качестве меток проводили в колонках с использованием геля на основе цианбромактивированной сефарозы 4В и полиэтиленовых подложек (фритов) в качестве носителей. Учитывая максимально допустимый установленный уровень ЗЕА в необработанном зерне и разбавление при пробоподготовке, чувствительность тест-метода должна быть на уровне 5 нг/мл. Аналитическим сигналом для определения ЗЕА в пробе служила флуоресценция детектирующего слоя,

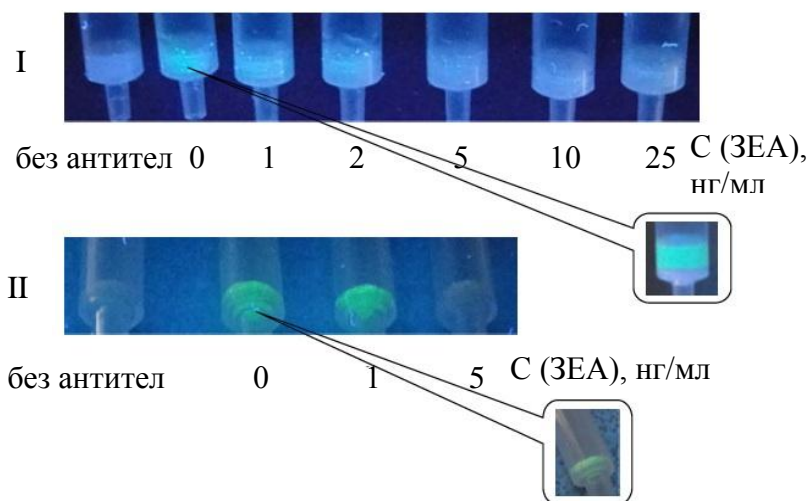


Рис. 16 Определение ЗЕА тест-методами с использованием в качестве носителя геля (I) и полиэтиленового фрита (II)

которую фиксировали визуально под УФ лампой ($\lambda(\text{возб.}) \sim 360\text{--}400$ нм). Для анализа использована последовательность действий, аналогичная приведённой на рис. 14, с некоторым изменением: сначала в колонку вносили образец, затем после стадии промывки, в колонку добавляли конъюгат, меченый КТ. Условия анализа были оптимизированы с

целью получения чёткой разницы в сигнале между положительным (отсутствие флуоресценции) и отрицательным (наличие флуоресценции) результатами при установленном пределе обнаружения (ПрО).

На значение ПрО влияет прежде всего концентрация специфических антител, при увеличении которой ПрО увеличивается, а при снижении, наоборот, уменьшается. Согласно данным табл. 4, для получения нужного ПрО следовало увеличить концентрацию антител, что и было сделано.

Табл. 5 Аналитические характеристики тест-методов

Характеристика	носитель: сефарозный гель	носитель: полиэтиленовый фрит
Процент ложноположительных результатов ($N_{\text{ложноположит}}/N_{-}$)·100%	3	4
Процент ложноотрицательных результатов ($N_{\text{ложноотрицат}}/N_{+}$)·100%	5	5
Специфичность ($N_{\text{отриц}}/N_{-}$)·100%	97	96
Чувствительность ($N_{\text{положит}}/N_{+}$)·100%	95	95

В оптимизированных условиях ПрО тест-метода составил 5 нг/мл в соответствии с максимально допустимым уровнем ЗЕА в пшенице (рис. 16). Надо отметить, что использование полиэтиленовых фритов в качестве носителей позволяет значительно снизить расходы на анализ, поскольку фриты значительно дешевле по сравнению с цианбромактивированной сефарозой.

Для расчёта аналитических показателей тест-методов был проведён анализ 13 сортов пшеницы (табл. 5). Анализ каждого образца проводили тремя независимыми тестами. Для контроля возможного матричного эффекта

и ложноотрицательных результатов в порцию образца вводили добавку ЗЕА. В качестве подтверждающего метода использовали ЖХ-МС/МС. Важно отметить, что для образцов пшеницы, в которые ЗЕА вводили в лабораторных условиях, ложноотрицательные результаты отсутствуют. Рассчитанные параметры (табл. 6) удовлетворяют требованиям комиссии ЕС (Commission Decision 2002/657/EC), предъявляемым к тест-методам: доля ложных результатов не должна превышать 5%.

Табл. 6 Определение ЗЕА в образцах пшеницы тест-методом с визуальной детекцией (*) на разных носителях, твердофазным иммуноанализом на микропланшете и ЖХ-МС/МС

разновидность пшеницы	Тест-методы					
	носитель: гель		носитель: полиэтиленовый фрит		твердофазный иммуноанализ	ЖХ-МС/МС
	0	100	0	100		
С(ЗЕА), мкг/кг						
1	---	+++	---	+++	63	45
2	---	+++	---	+++	5.0	<PrO**
3	---	+++	---	+++	21	<PrO
4	---	+++	---	+++	<PrO	<PrO
5	+++	+++	+++	+++	171	154
6	+-+	+++	+++	+++	118	103
7	---	+++	---	+++	4.2	<PrO
8	---	+++	---	+++	<PrO	<PrO
9	+++	+++	+++	+++	96	108
10	---	+++	---	+++	<PrO	<PrO
11	---	+++	---	+++	11	<PrO
12	---	+++	---	+++	74	67
13	---	+++	---	+++	22	29

*+ Положительный результат, флуоресценция отсутствует (С(ЗЕА)≥100 мкг/кг)

- Отрицательный результат, флуоресценция присутствует (С(ЗЕА)<100 мкг/кг)

**PrO для ЖХ-МС/МС составлял 12 мкг/кг

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы гидрофобные КТ CdSe с гексагональной и кубической кристаллическими решётками. Показано, что яркость флуоресценции и ширина пиков флуоресценции нанокристаллов CdSe обеих кристаллических структур примерно одинаковы, однако химический выход получения КТ заметно различается: составляет не более 15% при получении КТ кубической структуры и около 50% в случае КТ гексагональной структуры. Предложен новый подход к повышению стабильности водных коллоидных растворов КТ, покрытых меркаптокислотами, путём введения в раствор сульфита натрия, который химически связывает растворённый в воде кислород.

2. Оптимизированы методики получения квантовых точек структуры ядро-оболочка CdSe/ZnS и CdSe/CdS/ZnS с длиной волны максимума флуоресценции в интервале 520-650 нм и относительным квантовым

выходом не менее 40%. Установлено, что при наращивании оболочек ZnS на ядрах CdSe увеличение количества прекурсоров сульфида цинка приводит к повышению яркости флуоресценции КТ CdSe/ZnS и к более эффективной изоляции экситона внутри ядра CdSe. Показано, что при получении КТ CdSe/CdS/ZnS диаметр исходных ядер CdSe влияет на величину смещения экситонного пика флуоресценции: чем меньше диаметр исходных КТ, тем сильнее смещаются спектры в длинноволновую область.

3. Разработаны методики перевода КТ из органического растворителя в водные растворы двумя способами: методом замены лигандов и покрытием полимерами. Показано, что яркость флуоресценции гидрофильных КТ, полученных методом замены лигандов, определяется качеством изолирующей оболочки сульфида цинка.

4. Синтезированы амфифильные полимеры для гидрофилизации КТ, установлены оптимальные соотношения между реагентами, при которых образующиеся полимеры водорастворимы. Показано, что КТ, покрытые полиэтиленгликоль-содержащим полимером, сохраняют до 90% яркости флуоресценции, при этом растворы таких КТ стабильны в широком интервале pH (3.8÷13).

5. Реализованы методики конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (пероксидаза хрена в качестве метки) и иммунофлуоресцентного анализа (КТ в качестве метки). Оптимизированы условия проведения анализа с использованием КТ. На примере определения зеараленона показано, что иммунофлуоресцентный анализ позволяет достичь меньший предел обнаружения по сравнению с иммуноферментным анализом (0.03 и 0.08 нг/мл соответственно). Использование КТ в качестве меток также позволяет значительно сократить время анализа.

6. Разработан и оптимизирован колоночный тест-метод с использованием геля на основе сефарозы и пористых полиэтиленовых фритов в качестве носителя для визуального детектирования присутствия зеараленона с контрольным уровнем 5 нг/мл. Тест-метод апробирован для определения зеараленона в пшенице. Полученные аналитические показатели разработанных тест-методов позволяют рекомендовать их для экспресс-определения зеараленона в образцах пшеницы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Е.С. Сперанская, В.В. Гофтман, И.Ю. Горячева. Приготовление водорастворимых квантовых точек CdSe/ZnS с кристаллической структурой сфалерита // Российские нанотехнологии. 2013. Т.8. № 1-2. С. 100-104.

2. N.V. Beloglazova, E.S. Speranskaya, S.De Saeger, S. Abé, I.Yu. Goryacheva. Quantum dot based rapid tests for zearalenone detection // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V.403. P. 3013–3024.

3. Е.С. Сперанская, В.В. Гофтман, А.О. Дмитриенко, В.П. Дмитриенко, Т.А. Акмаева, И.Ю. Горячева. Синтез гидрофобных и гидрофильных

квантовых точек ядро – оболочка // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология, выпуск 4. 2012. Т.12. С. 3-10.

4. Е.С. Сперанская, В.П. Дмитриенко, А.О. Дмитриенко, Д.А. Потапкина, И.Ю. Горячева. Влияние условий синтеза на оптические свойства квантовых точек селенида кадмия // Российские нанотехнологии. 2011. Т.6. С. 126-130.

5. И.Ю. Горячева, Е.С. Сперанская. Способ повышения стабильности водного раствора квантовых точек – наночастиц селенида кадмия, покрытых меркаптокислотами. Заявка на патент 2011123121 Дата приоритета 09.06.2011. Решение на выдачу от 30 октября 2012 года.

6. И.Ю. Горячева, Е.С. Сперанская. Приготовление стабильных водорастворимых квантовых точек, покрытых амфифильным полимером // Материалы конференции с международным участием по аналитической спектроскопии. Туапсе. 23-29 сентября, 2012. С. 320.

7. Е.С. Сперанская, В.В. Гофтман, И.Ю. Горячева, Д. Кнорр. Гидрофилизация полупроводниковых квантовых точек для применения в качестве флуоресцентных меток // «Химия биологически активных веществ»: Межвузовский сборник научных трудов Всероссийской школы-конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2012. С. 289-290.

8. В.В. Гофтман, Е.С. Сперанская, Д.В. Потапкин, О.А. Горячева. Квантовые точки CdSe как флуоресцентные метки в иммунохимических тест-методах анализа природных токсикантов // «Химия биологически активных веществ»: Межвузовский сборник научных трудов Всероссийской школы-конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. г.Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2012. С. 280-282.

9. N.V. Beloglazova, P.S. Shmelin, E.S. Speranskaya, E.P. Grebennikov, I.Yu. Goryacheva, S.De Saeger. Quantum dots and quantum dots loaded liposomes as the labels for immunoassay // XIth International Conference on AgriFood Antibodies. Vienna, Austria. 3d - 5th September, 2012. P. 112.

10. E. Speranskaya, I. Goryacheva, N. Beloglazova. Quantum dots as new label for rapid tests // 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Prague. 1st - 4th October, 2011. P. 264.

11. Е.С. Сперанская, И.Ю. Горячева, В.В. Гофтман. Синтез и применение квантовых точек в биохимических тест-методах // Материалы Всероссийской научной школы-семинара «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2011». Саратов. 25-27 октября, 2011. С.100-101.

12. Е.С. Сперанская, Д.А. Потапкина. Синтез и оптические свойства квантовых точек селенида кадмия // Материалы XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов, молодых учёных «Ломоносов». Москва, 11-15 апреля, 2011.

13. Е.С. Сперанская. Синтез наночастиц селенида кадмия в водных растворах // Материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов, молодых учёных «Ломоносов». Москва, 12-15 апреля, 2010.