

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

А.М. Егоров, главн. науч. сотр. МГУ им. М.В. Ломоносова, академик РАН, д-р биол. наук, alex.m.egorov@gmail.com

В.М. Гукасов, главн. науч. сотр. ФГБНУ НИИ РИНКЦЭ, д-р биол. наук, v_m_gukasov@mail.ru

А.И. Иванин, студент МГУ им. М.В. Ломоносова, ivaninmsuff@gmail.com

М.Ю. Рубцова, ст. науч. сотр. МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, mrubtsova@gmail.com

И.В. Яминский, проф. МГУ, ген. директор ООО «Центр перспективных технологий», д-р физ.-мат. наук, yaminsky@nanoscopy.ru

Золотые наночастицы использовались в биомедицинских приложениях еще три столетия назад, когда люди только научились синтезировать коллоидное золото. Тем не менее, их уникальные электронные свойства до сих пор пользуются большим спросом. Использование золотых наночастиц в биомедицинских приложениях позволяет добиться высокой точности при относительной простоте измеряющих приборов. В статье представлено использование золотых наночастиц на примере исследования конъюгации белков, регистрации отдельных актов гибридизации и других важных процессов, в том числе обнаружения раковых клеток.

Ключевые слова: золотые наночастицы, плазмонно-резонансные частицы, оптические метки для биохимического анализа, ДНК биосенсор, оптическая регистрация наночастиц, режим темного поля, биомедицина.

THE USE OF GOLD NANOPARTICLES IN BIOMEDICAL APPLICATIONS UTILYZING OPTICAL METHODS

A.M. Yegorov, Chief Researcher, Lomonosov Moscow State University, RAS academician, Ph.D. of Biology, alex.m.egorov@gmail.com

V.M. Gukasov, Chief Researcher, SRI FRCEC, Ph.D. of Biology, v_m_gukasov@mail.ru

A.I. Ivanin, Student, Lomonosov Moscow State University, ivaninmsuff@gmail.com

M.Y. Rubtsova, Senior Researcher, Lomonosov Moscow State University, Doctor of Chemistry, mrubtsova@gmail.com

I.V. Yaminskiy, Professor, Lomonosov Moscow State University, Director General, OJSC «Center for Advanced Technologies», Ph.D. of Physics and Mathematics, yaminsky@nanoscopy.ru

The gold nanoparticles had been used in biomedical applications even three centuries ago, when people learned how to synthesize colloidal gold. However, their unique electronic properties are still in high demand. The use of gold nanoparticles in biomedical applications allows to achieve high accuracy with a relatively simple measuring devices. The article presents the use of gold nanoparticles on the example of studying the conjugation of proteins, the registration of individual acts of hybridization and other important processes, including detection of cancer cells.

Keywords: gold nanoparticle plasmon-resonance particles, optical labels for biochemical analysis, DNA biosensor, optical detection of nanoparticles, the dark-field mode, biomedicine.

Введение

Использование наночастиц золота в качестве частиц-меток вызывает большой интерес в науке. Существует несколько основных оптических методов регистрации нанообъектов. В традиционных методах, связанных с флуоресценцией, радиоактивностью или колориметрией, измерения проводятся посредством замеров интенсивности сигнала, вызванного коллективным свечением маркированных молекул. Флуоресцентные метки высоко чувствительны и доступны. Однако такой способ обладает фотохимической нестабильностью, квантовый выход зависит от окружающей среды и для реализации метода необходимы дорогостоящие детекторы. В качестве альтернативы флуоресцентным частицам-меткам были предложены металлические наночастицы, которые в свою очередь обеспечивают высокую стабильность и более простые методы регистрации эффектов связывания [1–4].

Световое рассеяние коллоидных металлических наночастиц обладает свойством плазмонного резонанса. Это свойство заключается в возникновении коллективных колебаний электронов проводимости за счет падающего света. Плазмонные резонансные частицы (ПРЧ) обладают рядом преимуществ: они ультра-яркие, так что свет, рассеянный от отдельных таких частиц можно детектировать с помощью простой оптической системы, например ПЗС камеры; они имеют пик в спектре отражения рассеянного от них света на определенной длине волны, зависящей от размера, формы и материала частиц; серебряные и золотые наночастицы, диаметром от 10 до 150 нм эффективно рассеивают свет в видимом спектре (рис. 1) [5]; при одних и тех же условиях возбуждения светимости, одна ПРЧ диаметром 100 нм эквивалентна 100 000 флуоресцентным молекулам того же размера. Помимо этого, в силу маленького размера, наночастицы преимущественно накапливаются на поверхностях опухолей и легко проникают внутрь клеток. Из-за наличия вышеперечисленных фотофизических свойств, золотые наночастицы широко применяют в биодиагностических анализах и биомедицинских приложениях.

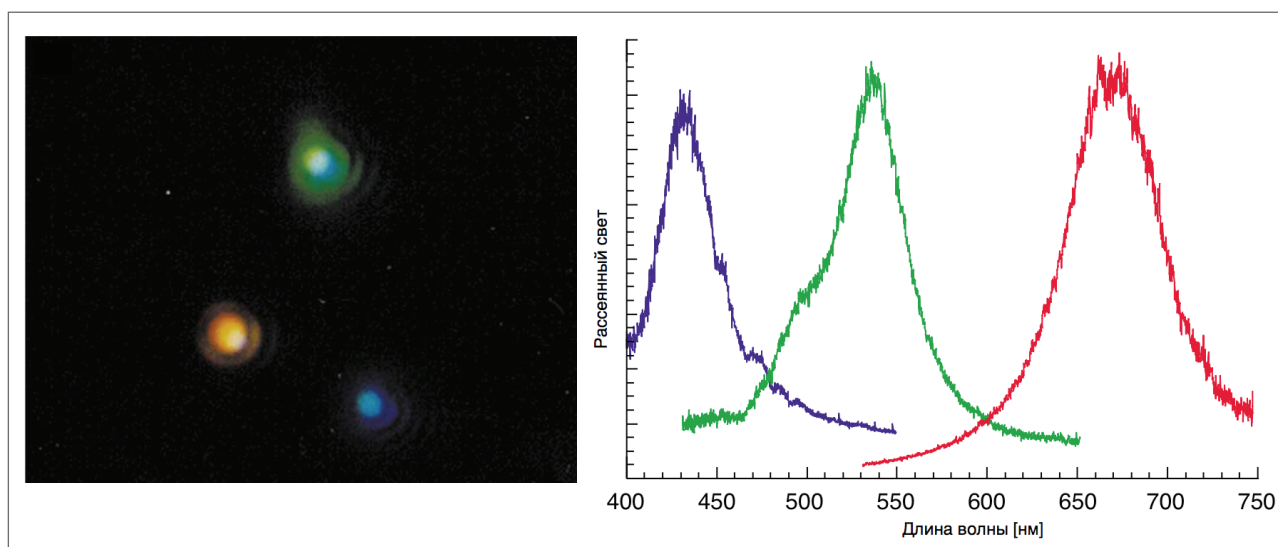


Рис. 1. Оптические свойства плазмонных резонансных наночастиц

a — цветная фотография трех золотых наночастиц разного размера, освещенных белым светом (частицы были выбраны таким способом, чтобы пик плазмонного резонанса соответствовал длинам волн синего, зеленого и красного цвета);

б — спектр рассеянного света от трех наночастиц

Свойство металлических наночастиц: поверхностный плазмонный резонанс

Изменение размеров наночастиц связано с эффектом изменения взаимного положения энергетических уровней. В металле зоны проводимости наполовину заполнены, и плотность уровней энергии так высока, что заметная разница между энергетическими уровнями проявляется только тогда, когда наночастица состоит из нескольких атомов ($N = 100$). Разницу в энергиях между двумя соседними электронными состояниями можно грубо охарактеризовать величиной E_F/N [6–8], где E_F – энергия Ферми, равная примерно 5 эВ в большинстве металлов. Золотая наночастица диаметром 10 нм состоит примерно из 30 000 атомов, тем самым имея энергетическую разность между двумя соседними электронными состояниями 0.169 мэВ. С другой стороны эта простая аппроксимация позволяет определить переходную энергию в 167 мэВ для 30-атомного кластера, что превышает тепловую энергию. Экспериментально было обнаружено, что энергетическая разница между низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) и верхней занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) составляет 1.7 эВ (что соответствует длине волны в 730 нм) для 28-атомного золотого кластера [9].

Поверхностный плазмонный резонанс – это когерентное возбуждение всех свободных электронов в пределах зоны проводимости [10]. Электрическое поле падающего света индуцирует поляризацию свободных электронов, возмущение плотности заряда создает электрическое поле, которое вызывает ток, стремящийся восстановить электронейтральность; из-за инерции носители «проскакивают» положение равновесия, что и приводит к коллективным колебаниям. Для частиц, размер которых составляет несколько нанометров, т. е. много меньше длины волны видимого света, возбуждение поверхностного плазмонного резонанса происходит с помощью видимого света. Для тех же частиц, возбуждение объемного плазмонного резонанса достигается только при очень высоких энергиях (6–9 эВ) [8]. Таким образом очевидно, что поверхность играет очень важную роль для наблюдения поверхностного плазмонного резонанса. В зависимости от поверхности меняются граничные условия для поляризации металла и резонанс смещается в зону оптических частот.

В 1908 г. Густав Ми [12] первый объяснил красный цвет водного раствора золотых наночастиц. Он решил уравнения Максвелла для электромагнитной волны света, взаимодействующей с маленькими сферами, имеющими такую же частотную зависимость диэлектрической проницаемости что и массивный металл. Для наночастиц, размер которых во много раз меньше длины волны падающего света, Ми получил следующую формулу для поперечного сечения возбуждения дипольных колебаний [8]:

$$\sigma_{\text{ext}} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^2 V \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2},$$

где V – объем частицы, ω – частота падающего света, c – скорость света, ε_m и $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ – диэлектрические функции окружающей среды и самого материала соответственно.

Данное уравнение хорошо описывает спектр поглощения металлических наночастиц, показанный на рис. 2. Тем не менее, для более крупных наночастиц, диаметр которых больше 20 нм, дипольная аппроксимация уже не действительна. В этом случае плазмонный резонанс зависит только от размера частицы как функция радиуса частицы. Чем больше рассматриваемая частица, тем больший вклад вносят моды более высокого порядка, так как электромагнитное поле не может однородно поляризовать наночастицу. Пик мод колебаний более высокого порядка соответствует более низким энергиям, тем самым область плазмонного резонанса смещается в красную область видимого спектра. В то же время ширина пика плазмонного резонанса увеличивается вместе с увеличением размера частиц. Данная теория успешно подтверждается экспериментальными данными, представленными на рис. 2.

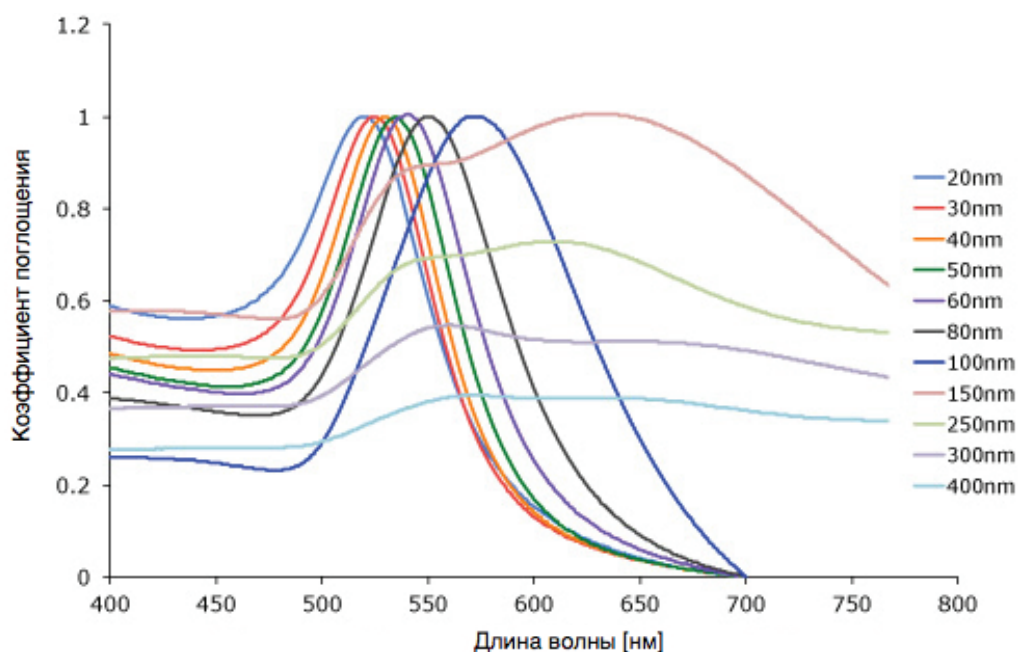


Рис. 2. Спектр поглощения поверхностного плазмона на золотых наночастицах размерами 22, 48 и 99 нм, полученных в водном растворе путем восстановления ионов золота цитратом натрия [11]

Инструменты для оптической регистрации отдельных плазмонных резонансных частиц. Как уже было написано раньше, эффект плазмонного резонанса позволяет наблюдать пик в спектре рассеянного света от металлических наночастиц в видимом спектре, что возможно детектировать с помощью обычной ПЗС-камеры. Для оптической регистрации наночастиц необходимо использование режима темного поля. Режим темного поля осуществляется с помощью оптических систем, представленных на рис. 3 [5].

Основным преимуществом режима темного поля является то, что наночастицы находятся в высоком контрасте и имеют свой собственный цвет, зависящий от размера и форм самих наночастиц. Это позволяет создать технологию мультиплексного анализа. Также, с целью повышения контраста наночастиц используют воду или другие окружающие среды, рассеивающие падающий в объектив свет [13, 14].

Использование металлических наночастиц в биосенсорах. Наличие у металлических наночастиц свойства плазмонного резонанса делает их эффективными инструментами для биосенсоров, чувствительность которых в 60 раз превышает чувствительность флуоресцентных меток, столь широко используемых в современной науке. Золотые и серебряные наночастицы с плазмонным резонансом нашли разнообразные применения в нанобиотехнологии и наномедицине, благодаря возможности настройки спектрального положения и амплитуды плазмонного резонанса за счет изменения природы металла, размера, формы, структуры частиц и их диэлектрического окружения. Последнее означает как локальное окружение, сформированное адсорбированными биомолекулами, так и макроскопические диэлектрические свойства, обусловленные буферной средой или металл/диэлектрической подложкой, на которой могут адсорбироваться молекулы, что влияет на интенсивность и цвет свечения освещаемых наночастиц. Хотя изменения плазмонного резонанса, индуцированные адсорбцией биомолекул, обычно достаточно малы, они с успехом используются для детекции биоспецифического связывания макромолекул и клинической экспресс-диагностики.

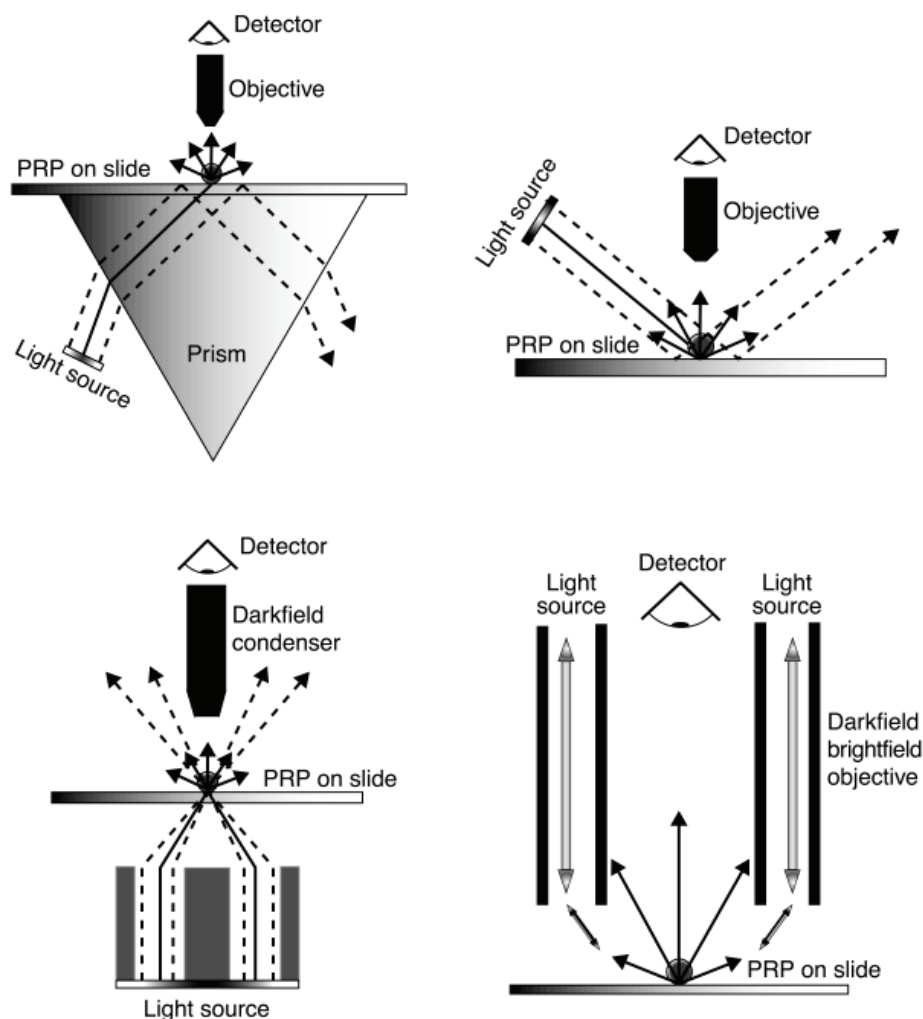


Рис. 3. Примеры оптических схем, удовлетворяющие режиму темного поля [5]

Золотые наночастицы могут быть связаны с различными биофункциональными молекулами посредством простых физических эффектов, таких как гидрофобное взаимодействие или образование электронно-дырочных пар (рис. 4). Сильно гидрофобные молекулы (такие как доксорубин и паклитаксел) могут быть связаны с биомедицинским конъюгатом золотых наночастиц посредством использования амфифильных лигандов.

Исследование конъюгации белков. Для исследования конъюгации белков используют золотые или серебряные наночастицы, покрытые слоем белка [2]. Приготовление таких частиц производится следующим образом. Раствор золотых наночастиц помещается в чистую микроцентрифугу и центрифугируется. Далее добавляется 600 мкл дистиллированной воды и 25 мкл бикарбоната натрия (100 мМ, pH 10), а также козий анти-биотин (GAB 3 мкг). После одного часа инкубации добавляется 100 мкл 5 % БСА. Полученные золотые наночастицы, покрытые белком очищаются и отделяются с помощью центрифугирования, после чего снова добавляется 400 мкл дистиллированной воды, 25 мкл 10-кратного натрий-фосфатного буфера и 100 мкл 5 % БСА. Таким образом получают золотые наночастицы, покрытые белком, с помощью которых можно наблюдать за их конъюгацией с помощью обычной ПЗС камеры, используя микроскоп темного поля.

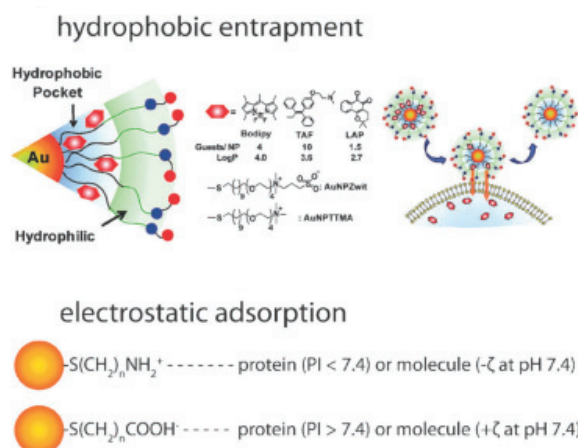


Рис. 4. Схематические иллюстрации методов модификации золотых наночастиц для соединения их с биофункциональными молекулами

Для иммунологического анализа использование золотых наночастиц размером до 15 нм не является эффективным. Поэтому наночастицы увеличивают с помощью серебра. При этом увеличение наночастиц серебром существенно не уменьшает биологическую активность поверхностных белков. Таким образом можно упростить оптическую детекцию эффектов связывания как до, так и после самого специфического связывания.

Регистрация отдельных актов локальной гибридизации. В статье [2] приведен пример использования золотых наночастиц для регистрации отдельных эффектов локальной гибридизации ДНК. Для проведения экспериментов авторы данной статьи использовали хромосомы Дрозофил, полученные путем ПЦР амплификации. Нуклеотиды, модифицированные биотином, были получены также путем ПЦР амплификации или с помощью случайного праймера (High Prime Biotin). После обработки и очищения образца хромосомы Дрозофил, производился процесс инкубации с золотыми наночастицами, покрытыми слоем белка, в течение одного часа. Не связавшиеся наночастицы были вымыты дистиллированной водой. Помеченные плазмонными резонансными наночастицами области хромосом окрашивались с помощью геля нуклеиновой кислоты. Полученный образец изучался с помощью оптического микроскопа в режиме темного поля, в качестве осветительного прибора использовалась ксеноновая лампа мощностью 75 Вт (рис. 5).

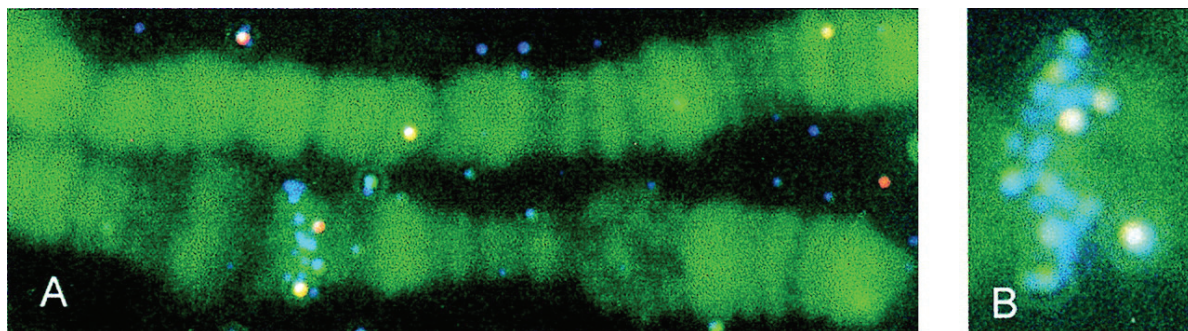


Рис. 5. Фотографии областей хромосомы Дрозофил, меченые коллоидными золотыми наночастицами, иллюстрирующие эффекты локальной гибридизации. Среднее расстояние между золотыми наночастицами ~2 мкм

Цитологический анализ. Для проведения эксперимента, авторы статьи [2] использовали замороженные образцы куриной межреберной мышцы, размером 2×3 мкм, предварительно приготовленные и изученные [9, 10] в электронном микроскопе (рис. 6). После их обработки и очищения, образцы подвергались инкубации с антирианодиновыми рецепторами 34С основных антител в соотношении 1:5 при комнатной температуре, после чего промывались и обрабатывались натрий-фосфатным буфером. Далее, на каждый образец наносился раствор с золотыми наночастицами, размером 5 нм, и затем снова промывался дистиллированной водой.

С целью упрощения оптической регистрации отдельных наночастиц, производилось тщательно контролируемое серебряное увеличение золотых наночастиц.

На рис. 6 и 7 изображены одни и те же участки мышечной ткани курицы. Анализ данных изображений доказывает, что модифицированные золотые наночастицы располагаются вдоль z — линии, присущей пространственному расположению рианодиновых рецепторов на мембране саркоплазматического ретикулума.

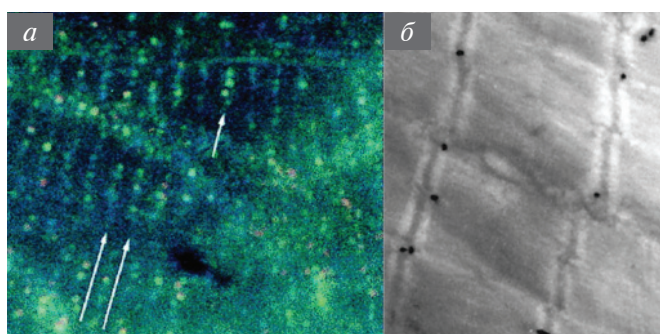


Рис. 6. Фотография участка мышечной ткани курицы

а — рианодиновые рецепторы помечены золотыми наночастицами, увеличенными серебром;
б — изображение получено на просвечивающем электронном микроскопе

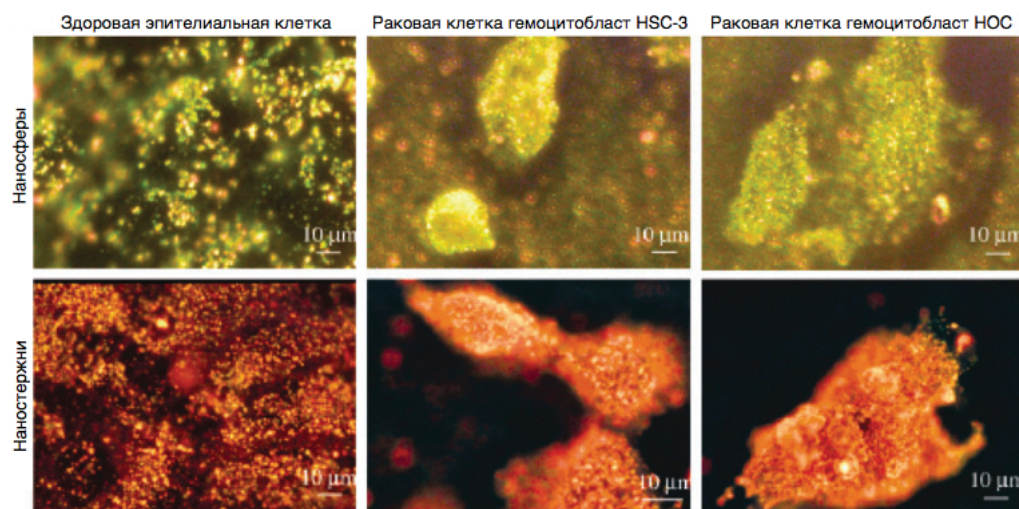


Рис. 7. Диагностика раковых заболеваний. Фотографии здоровой клетки и раковых клеток, полученные с помощью оптической микроскопии в режиме темного поля. В качестве оптических меток использовались золотые наночастицы (наносферы и наностержни)

Обнаружение раковых клеток. В работе [16] проведен следующий эксперимент. Золотые частицы диаметром 12 нм связаны (модифицированы) с антителами рецептора эпидермального фактора роста (anti-EFGR). В свою очередь известно, что мутация данного рецептора, приводящая в гиперэкспрессии или повышению активности, приводит к раковым заболеваниям. В таком случае белок EFGR располагается на поверхности раковой клетки. Золотые наночастицы, модифицированные антителами этого белка, специфически связываются с белком, тем самым оказываясь на поверхности раковой клетки. Регистрация наночастиц (рис. 7) производится с помощью оптического микроскопа и ПЗС-матрицей в режиме темного поля.

Выводы

Приведенные примеры биологических анализов демонстрируют возможность использования металлических наночастиц, модифицированных антителами, в качестве замены стандартных оптических меток. Также демонстрируется «гибкость» использования поверхностных плазмонных наночастиц: для образцов, устойчивых к проникновению крупных наночастиц, возможно использование коллоидных наночастиц. Далее, после осаждения коллоидных частиц на поверхность образца возможно их увеличение (например, серебром), что значительно упрощает их оптическую регистрацию.

Из приведенного обзора следует сделать вывод, что использование золотых наночастиц в различных биомедицинских приложениях очень перспективно и пользуется большим спросом. Использование золотых наночастиц возможно в широком спектре научных исследований, начиная с транспорта медикаментов и заканчивая анализом раковых заболеваний. При этом золотые наночастицы не являются токсичными и не влияют на биологическую активность живых клеток.

Список литературы

1. Hayat M.A., Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications. San Diego, CA: Academic Press, 1989, vol. 1.
2. Schultz S., Smith D.R., Mock J.J., Schultz D.A. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. PNAS. USA, 2000, vol. 97, No 3, p. 996–1001.
3. Schultz S., Mock J.J., Smith D.R., Schultz D.A.: Nanoparticle-based biological assays. Clinical Ligand Assay, 1999, vol. 22, p. 214–216.
4. Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. Science, 1997, vol. 277, p. 1078–1081.
5. Schultz D.A. Plasmon resonant particles for biological detection. Current Opinion in Biotechnology, 2003, vol. 14, p. 13–22.
6. Perenboom J.A., Wyder A.J., Meier P. Phys. Rep., 1981, vol. 78, p. 173.
7. Halperin W.P. ReS. Mod. Phys., 1986, vol. 58, p. 533.
8. Kreibitz U., Vollmer M. Optical Properties of Metal Clusters. Berlin. Springer, 1995.
9. Schaaff T.G., Knight G., Shafigullin M., Borkman R.F., Whetten R.L. J. phys. Chem. B, 1998, vol. 102, p. 10643.
10. Henglein A.J. phys. Chem, 1993, vol. 97, p. 8457.
11. Link S., El-Sayed M.A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. Int. Reviews in Physical Chemistry, 2000. V. 19. № 3. P. 409–453.
12. Mie G. Ann. Phys., 1908, vol. 25, p. 329.
13. Yguerabide J., Yguerabide E.E. Light-scattering submicroscopic particles as highly uorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications – II. Experimental characterization. Analytical Biochemistry, 1998, vol. 262, p. 157–176.

14. Yguerabide J., Yguerabide E.E. Light-scattering submicroscopic particles as highly uorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications – I. Theory. *Analytical Biochemistry*, 1998, vol. 262, p. 137–156.

15. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, p. 2740–2779.

16. Sokolov K., Follen M., Aaron J., Pavlova I., Malpica A., Lotan R. and Richartz-Kortum R. *Cancer Res.*, 2003. vol. 63, p. 1999–2004.

References

1. Hayat M.A. (1989) *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. San Diego, CA: Academic Press, vol. 1.

2. Schultz S., Smith D.R., Mock J.J., Schultz D.A. (2000) Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *PNAS. USA*, vol. 97, no 3, pp. 996–1001.

3. Schultz S., Mock J.J., Smith D.R., Schultz D.A. (1999) Nanoparticle-based biological assays. *Clinical Ligand Assay*, vol. 22, pp. 214–216.

4. Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, vol. 277, pp. 1078–1081.

5. Schultz D.A. (2003) Plasmon resonant particles for biological detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, vol. 14, pp. 13–22.

6. Perenboom J.A., Wyder A.J., Meier P. *Phys. Rep.*, 1981, vol. 78, p. 173.

7. Halperin W.P. *ReS. Mod. Phys.*, 1986, vol. 58, p. 533.

8. Kreibig U., Vollmer M. (1995) *Optical Properties of Metal Clusters*. Berlin. Springer.

9. Schaaff T.G., Knight G., Shafigullin M., Borkman R.F., Whetten R.L. J. (1998) *phys. Chem. B*, vol. 102, p. 10643.

10. Henglein A.J. *phys. Chem*, 1993, vol. 97, p. 8457.

11. Link S., El-Sayed M.A. (2000) Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Reviews in Physical Chemistry*, vol. 19. № 3, pp. 409–453.

12. Mie G. *Ann. Phys.*, 1908, vol. 25, p. 329.

13. Yguerabide J., Yguerabide E.E. (1998) Light-scattering submicroscopic particles as highly uorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications – II. Experimental characterization. *Analytical Biochemistry*, vol. 262, pp. 157–176.

14. Yguerabide J., Yguerabide E.E. (1998) Light-scattering submicroscopic particles as highly uorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications – I. Theory. *Analytical Biochemistry*, vol. 262, pp. 137–156.

15. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, pp. 2740–2779.

16. Sokolov K., Follen M., Aaron J., Pavlova I., Malpica A., Lotan R. and Richartz-Kortum R. (2003) *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 1999–2004.