

ИЗМЕРЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОВЕРХНОСТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Сафенкова И. В., Емельянова Г. К., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2), e-mail: saf-iri@yandex.ru

Предложен подход для анализа степени поверхностной модификации наночастиц на основе атомно-силовой микроскопии (АСМ). Работа проведена на примере немодифицированных наночастиц коллоидного золота (НКЗ) и НКЗ, покрытых белковой оболочкой (конъюгат НКЗ и иммуноглобулинов класса G). Предлагаемый анализ степени поверхностной модификации НКЗ заключается в регистрации силовых кривых, которые отражают зависимости отклонения балки АСМ-зонда при взаимодействии с поверхностью от перемещения кантилевера в вертикальном направлении. В качестве параметров, характеризующих степень модификации, предложены модуль упругости и сила взаимодействия зонда с модифицированной или немодифицированной поверхностью наночастицы. Получены достоверные отличия между немодифицированными и модифицированными НКЗ методом АСМ в режиме спектроскопии.

Ключевые слова: наночастицы, поверхностная модификация, атомно-силовая микроскопия, силовая спектроскопия.

MEASURING THE DEGREE OF SURFACE MODIFICATION OF COLLOIDAL GOLD NANOPARTICLES USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Safenkova I. V., Emelyanova G. K., Zherdev A. V., Dzantiev B. B.

A. N. Bach Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia (Leninsky prospect 33, 119071 Moscow), e-mail: saf-iri@yandex.ru

An approach for measuring the degree of surface modification of nanoparticles based on atomic force microscopy (AFM) is developed. The work was carried out for unmodified colloidal gold nanoparticles (GNP) and GNP coated by protein shell (GNP - immunoglobulin G conjugate). The proposed measurement of the degree of GNP surface modification is based on the registration of force curves, which reflect dependence of a tip deflection versus vertical movements of the cantilever. Elastic modulus and force of the interaction with surface of modified or unmodified nanoparticles are proposed as parameters characterizing the degree of nanoparticles modification. The application of AFM mode spectroscopy demonstrated significant differences between the unmodified and modified GNP.

Key words: nanoparticles, surface modification, atomic force microscopy, force spectroscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы коллоидного золота с плазмонным резонансом нашли разнообразные применения в нанобиотехнологии и наномедицине благодаря возможности варьировать спектральное положение и амплитуду плазмонного резонанса за счет изменения размера, формы, структуры частиц. Результаты ряда исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют об особенностях биологического действия наноматериалов, отличающих их от традиционных соединений [7, 9]. Это открывает широкие возможности использования наноматериалов в медицине, фармакологии, производстве продуктов питания, при решении экологических и сельскохозяйственных задач. Однако высокая биологическая активность техногенных наночастиц несет в себе потенциальные риски токсических эффектов для

работников нанотехнологических предприятий, потребителей продукции наноиндустрии, контактирующих с нанотехнологическими производствами и их отходами [2, 4].

Наночастицы поступают в организм, как правило, в виде агрегатов/ассоциатов и(или) с поверхностью, модифицированной в результате взаимодействия с биологическим окружением. Поверхностная модификация многих наночастиц белками (адсорбционное формирование «белковой короны») и другими полимерами биологического матрикса *in vitro* и *in vivo* показана во многих работах [1, 3, 5]. Наличие «белковой короны» может в значительной степени влиять на биосовместимость и биораспределение техногенных наночастиц [1], в том числе на их распознавание клетками иммунной системы.

Измерение степени поверхностной модификации наночастиц представляет существенную проблему. Целью настоящей работы являлась разработка подхода на основе атомно-силовой микроскопии (АСМ) для анализа поверхностной модификации наночастиц коллоидного золота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При определении поверхностных свойств наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов аликвоту раствора наночастиц, синтезированных по методике [6], или их конъюгатов (5–10 мкл), синтезированных согласно [8], наносили на поверхность подложки (свежесколотая слюда), инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, удаляли избыток жидкости фильтровальной бумагой и высушивали при комнатной температуре в эксикаторе с хлористым кальцием.

Сканирование образцов проводили в контактном режиме с использованием кантилеверов fpC10S («Нанотюннинг», Россия), радиус кривизны ≤ 10 нм, с жесткостью < 0.2 Н/м. Образцы последовательно сканировали на участках площади 35×35 мкм², 10×10 мкм², 5×5 мкм² и 1×1 мкм². Далее переключали микроскоп в режим спектроскопии и снимали силовые кривые с выбранных объектов в координатах силы (F, Н – ось ординат) и расстояния зонд-поверхность (z, м – ось абсцисс). Силовую кривую для каждого объекта получали в пяти повторах.

Измерения проводились с использованием атомно-силового микроскопа «SmartSPM» («Аист-НТ», Россия). Первоначальное изображение подвергали математической обработке в программе «Gwiddion» (Czech Metrology Institute, Чехия) для устранения искажений: нелинейность сканирования, температурный дрейф и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получаемые методом АСМ изображения немодифицированных наночастиц и наночастиц, покрытых белковыми молекулами или подвергшихся иному преобразованию, невозможно достоверно отличить при использовании только режима сканирования. На рис.

1, А, Б представлены изображения наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с иммуноглобулинами класса G соответственно. Как видим, морфологические особенности не являются признаком, существенным для определения степени модификации исходных наночастиц.

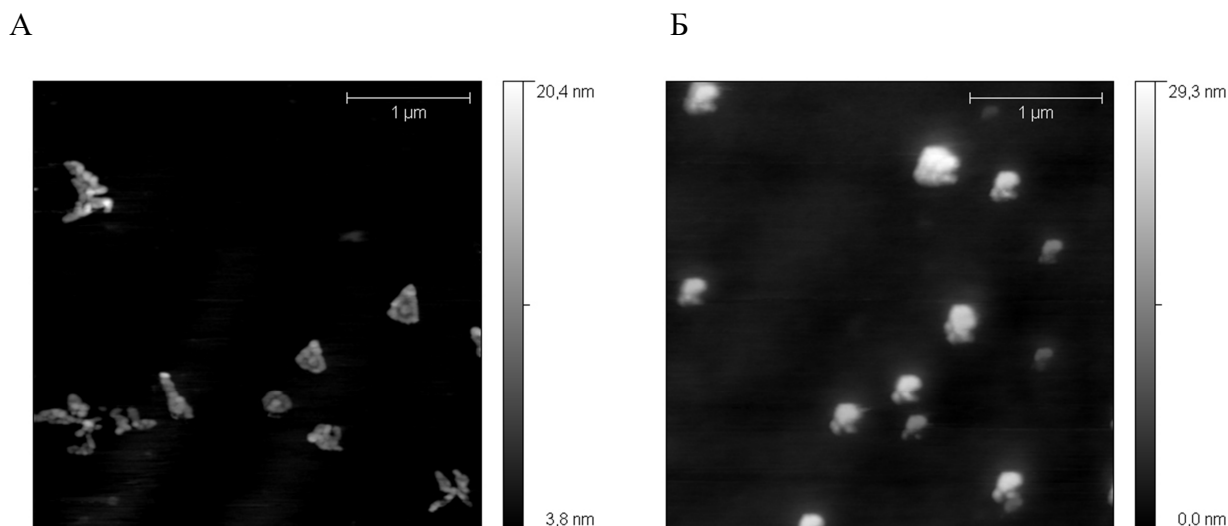


Рис. 1. Изображения наночастиц коллоидного золота (А) и конъюгатов наночастиц коллоидного золота с иммуноглобулинами класса G (Б), полученные методом атомно-силовой микроскопии

Предлагаемый анализ степени поверхностной модификации наночастиц коллоидного золота проводится по измерению параметра жесткости (модуля упругости, модуля Юнга) и сил взаимодействия зонда с модифицированной или немодифицированной поверхностью наночастицы. Атомно-силовая спектроскопия позволяет проводить измерение модуля упругости, основанное на определении степени деформации поверхности при ее взаимодействии с вершиной зонда атомно-силового микроскопа. Метод заключается в регистрации силовых кривых, которые отражают отклонение гибкой балки АСМ-зонда при взаимодействии с поверхностью в зависимости от расстояния между ними. Для расчета абсолютного значения модуля Юнга по силовым кривым в методике используется модель Герца, в которой рассматривается взаимодействие жесткой полусферы (АСМ-зонд) и бесконечной плоскости (поверхность наночастицы или модифицированной наночастицы).

Для получения достоверных отличий между немодифицированными и модифицированными наночастицами коллоидного золота рассмотрим более подробно измерения в режиме атомно-силовой спектроскопии, при которых кантилевер движется в вертикальном направлении. Согласно закону Гука ($F = kd$, где F соответствует силе отрыва, k

– константе жесткости кантилевера, d – отклонению кантилевера) сила отрыва прямо пропорциональна отклонению кантилевера.

При измерении модуля упругости наночастиц по силовой кривой определяют реальное расстояние между зондом и образцом (δ) по закону Гука:

$$F = kd = k(z - \delta) \quad (1),$$

где F – сила взаимодействия кантилевера и образца, k – жесткость кантилевера, d – отклонение кантилевера, z – перемещение пьезосканера по вертикали, δ – деформация образца в приближении недеформированного зонда (реальное расстояние между иглой и образцом).

Модуль упругости определяли по модели Герца, используя следующую формулу:

$$F = \frac{4E}{3 \cdot (1 - \nu^2)} \cdot \delta^{1,5} \sqrt{R} \quad (2),$$

где E – модуль упругости, ν – коэффициент Пуассона, R – радиус иглы.

Таким образом

$$F = A\delta^{1,5} \quad (3),$$

где A – коэффициент пропорциональности.

Построив график зависимости логарифма силы от логарифма отклонения, получали прямую вида $Y = kX + B$, где $k \approx 1,5$, $B = \ln A$. По формуле (2) находили значения локального модуля упругости.

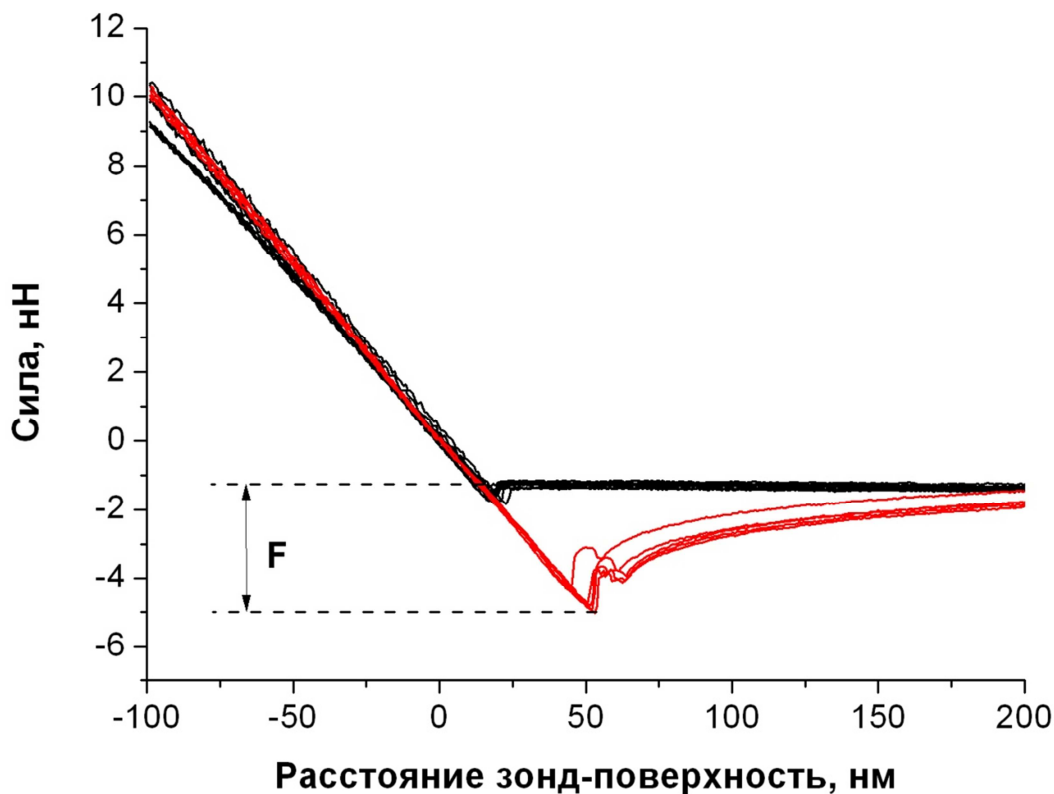


Рис. 2. Зависимость силы по координате Z от расстояния зонд-поверхность при подводе кантилевера к поверхности слюды и немодифицированных наночастиц коллоидного золота (черные кривые), конъюгатов наночастиц коллоидного золота с иммуноглобулинами класса G (красные кривые)

Силы взаимодействия оценивают, исходя из силовых кривых — зависимостей отклонения иглы от перемещения кантилевера в вертикальном направлении (рис. 2). Благодаря программным методам обработки сигнала силовая кривая может быть преобразована в зависимость силы отрыва от перемещения в вертикальном направлении. Следует отметить появление значимого локального минимума на силовой кривой модифицированных наночастиц коллоидного золота. Для измерения сил взаимодействия проводят построение вертикальной проекции по оси ординат (см. величину F на рис. 2), соответствующей отрезку от локального минимума на силовой кривой отвода до горизонтального отрезка на кривой подвода. Эта вертикальная проекция отражает значение сил взаимодействия зонда с модифицированной поверхностью наночастицы. Степень поверхностной модификации наночастиц определяется как отношение силы взаимодействия зонда с немодифицированной поверхностью наночастицы к силе взаимодействия зонда с

модифицированной поверхностью или отношение модуля упругости немодифицированных наночастиц к модулю упругости модифицированных наночастиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокое пространственное разрешение АСМ в совокупности с простотой подготовки образцов и возможностью работы в жидкой среде позволяют применять разработанный подход для изучения поверхностных свойств разнообразных модифицированных и немодифицированных наночастиц. Полученные результаты позволяют заключить, что измерение степени поверхностной модификации наночастиц методом АСМ в режиме спектроскопии представляется перспективным направлением и эффективным средством регистрации уникальных характеристик комплексов наночастиц с биоорганическими молекулами.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.1065 от 24 мая 2011 г.).

Список литературы

1. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2009. – Vol. 61, № 6. – P. 428-437.
2. Bostrom A. and Lofstedt R. E. Nanotechnology Risk Communication Past and Prologue // Risk Analysis. – 2010. – Vol. 30, № 11. – P. 1645-1662.
3. Casals E., Pfaller T., Duschl A. et al. Time evolution of the nanoparticle protein corona // ACS Nano. – 2010. – Vol. 4, № 7. – P. 3623-3632.
4. Conti J. A., Killpack K., Gerritzen G. et al. Health and safety practices in the nanomaterials workplace: results from an international survey // Environ. Sci. Technol. – 2008. – Vol. 42, № 9. – P. 3155-3162.
5. Dobrovolskaia M. A., Patri A. K., Zheng J. et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // Nanomedicine. – 2009. – Vol. 5, № 2. – P. 106-117.
6. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nat. Phys. Sci. – 1973. – Vol. 241. – P. 20–22.

7. Hasselov M., Readman J. W., Ranville J. F. et al. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles // *Ecotoxicology*. – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 344-361.
8. Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity // *J. Immunol. Methods*. – 2010. – Vol. 357, № 1–2. – P. 17–25.
9. Tiede K., Boxall A. B., Tear S. P. et al. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment // *Food Addit. Contam. Part A*. – 2008. Vol. 25, № 7. – P. 795-821.

Рецензенты:

Ярополов Александр Иванович, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, г. Москва.

Еремин Сергей Александрович, д.х.н., профессор, заведующий группой иммунохимических методов анализа кафедры энзимологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва.