

УДК 544.777

## **ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ И ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СВЯЗЫВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ С БЕЛКАМИ<sup>1</sup>**

Морозов М.В., Бондарь О.В.\*, Булатов Э.Р.\*,  
Абдуллин Т.И.\*, Гильмутдинов А.Х.

*Казанский государственный университет, физический факультет  
\*биолого-почвенный факультет,  
г. Казань, Россия, Кремлевская, 18, e-mail: misha617@mail.ru*

### **Аннотация**

Оптимизированы методы получения комплексов золотых наночастиц с протеином А, авидином, бычим сывороточным альбумином и их характеристики с использованием атомно-силовой микроскопии и оптической спектроскопии. Полученные комплексы можно использовать в качестве меток в биологических методах анализа и биосенсорах.

### **Введение**

Создание биосенсоров для медицинской диагностики является одной из наиболее динамично развивающихся областей современной науки и технологии. Значительный прогресс в этой области связан с использованием наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки, наночастицы металлов и их соединений, отличающихся необычными структурными и физико-химическими свойствами [1].

Среди них золотые наночастицы, обладающие выраженными оптическими и электрохимическими свойствами, широко используют в качестве меток для чувствительного детектирования биомолекул с помощью соответствующих биосенсоров. Подобные метки получают, связывая наночастицы с белками, например, с антителами, протеином А, авидином, которые специфично взаимодействуют со своим лигандом. От качества комплексов золотых наночастиц с биоспецифичными белками и воспроизводимости их свойств во многом зависит эффективность создаваемых на их основе биосенсоров. Это обуславливает необходимость информативных и доступных методов, позволяющих оценивать размер и свойства синтезируемых наночастиц, равно как и контролировать их связывание с белками. Для решения этой

задачи в настоящем исследовании предложено использовать атомно-силовую микроскопию и оптическую спектроскопию.

## 1. Экспериментальная часть

В работе использовали авидин, протеин А, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich). Коллоидные наночастицы золота определенного размера синтезировали по методу Френса, восстанавливая золотохлористоводородную кислоту (Sigma-Aldrich) цитратом натрия [2].

Атомно-силовые изображения наночастиц получали с помощью зондовой нанолаборатории ИНТЕГРА Прима (NT-MDT, Россия), сканер 50 мкм с емкостными датчиками. Использовали стандартные кремниевые кантилеверы NSGO3 и NSG20 с радиусом кривизны 10 нм. Измерения производили в полуконтактном режиме на воздухе. Спектры поглощения наночастиц измеряли на двухлучевом спектрофотометре Lambda 35 (PerkinElmer, США).

## 2. Результаты

Синтезированы три препарата различающихся по диаметру золотых наночастиц. Известно, что золотые наночастицы интенсивно поглощают и рассеивают свет в видимой области благодаря явлению плазмонного резонанса [2]. Это свойство можно использовать для определения среднего диаметра наночастиц, так как с увеличением размера наночастицы максимум ее поглощения смещается в длинноволновую область [3]. Размер наночастиц, оцененный по положению максимума их поглощения, составил 13, 35 и 78 нм (рис. 1).

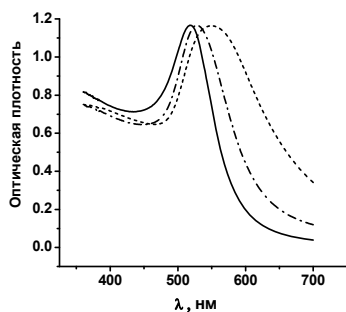


Рис. 1. Спектры поглощения золотых наночастиц диаметром 13 нм (—), 35 нм (---) и 78 нм (— · —).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет исследовать геометрию нанообъектов на ровных поверхностях. При определении размеров наночастиц с помощью АСМ следует учитывать, что на результаты влияют особенности взаимодействия наночастиц с поверхностью подложки и выбор рабочих параметров сканирования [4].

Для наночастиц с наименьшим размером удалось

добиться однородного нанесения слоя отдельных наночастиц на поверхность слюды, для которой были оптимизированы параметры сканирования. В качестве примера на рис.2 приведено АСМ-изображение золотых наночастиц на слюде, на котором видны как индивидуальные сферообразные наночастицы высотой 14 нм, так и их агрегаты.

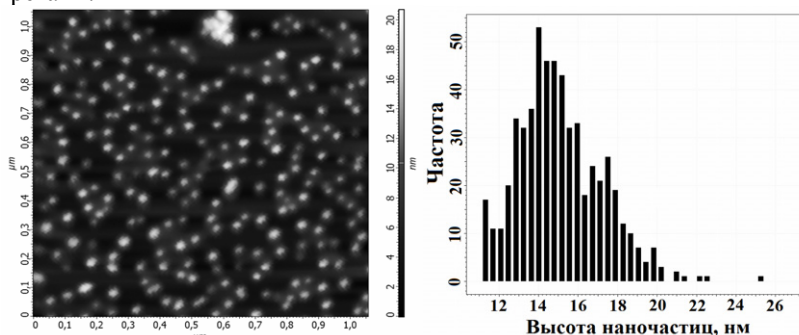


Рис. 2. АСМ-изображение золотых наночастиц (14 нм) на слюде и гистограмма их распределения по размерам.

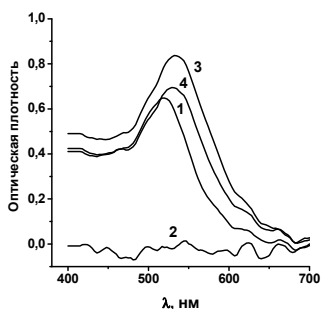


Рис. 3. Изменение спектров поглощения золотых наночастиц в присутствии авидина и NaCl. 1 - исходные наночастицы (14 нм), 2 - наночастицы после добавления NaCl, 3 - наночастицы после стабилизации авидином, 4 - стабилизированные наночастицы после добавления NaCl.

стабилизации белком при солевой агрегации. Так, стабилизация золотых наночастиц белком сопровождается некоторым сдвигом

Стандартное отклонение от среднего значения высоты составило 1,5 нм и можно говорить, что результаты, полученные с помощью АСМ, соответствуют размерам наночастиц, оцененным по оптическим спектрам поглощения.

Получены комплексы золотых наночастиц с авидином, протеином А, бычим сывороточным альбумином (БСА) путем добавления минимальной концентрации белка, стабилизирующей золь от солевой агрегации. На рис. 3 показаны спектры поглощения наночастиц до и после их стабилизации белком при солевой агрегации. Так, стабилизация золотых наночастиц белком сопровождается некоторым сдвигом

максимума поглощения в длинноволновую область, а также предотвращает солевую агрегацию наночастиц, регистрируемую по исчезновению спектра поглощения. На рис. 4 показано АСМ-изображение золотых наночастиц (14 нм) с комплексом БСА на слюде и их распределение по размерам. Размер комплексов составил 21 нм, стандартное отклонение 3 нм.

Результаты исследования комплексов методами оптической спектроскопии и АСМ подтверждают наличие связывания золотых наночастиц с белками. В результате связывания золотые наночастицы покрываются белковой оболочкой толщиной несколько нм, что приводит к их стабилизации в золе.

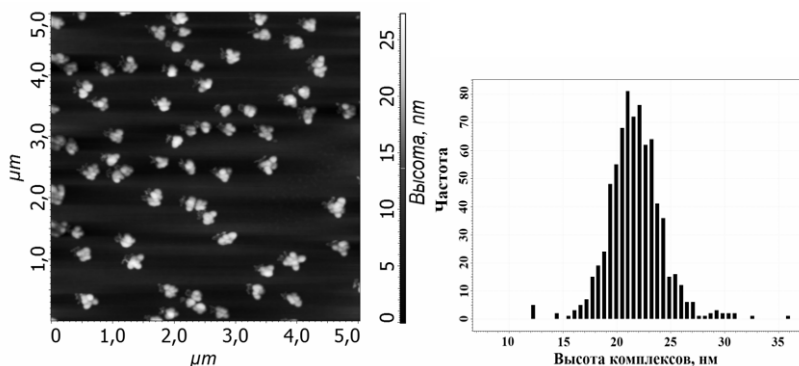


Рис. 4. АСМ-изображение золотых наночастиц (14 нм) с комплексом БСА на слюде и гистограмма их распределения по размерам.

## Литература

1. Rosi N.L., Mirkin C.A. // *Chem. Rev.* – 2005. – V. 105. – P. 1547-1562.
2. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. // *Colloids and Surfaces.* – 2007. – V. 58. – P. 3-7.
3. Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Краснов Я.М., Плотников В.К., Хлебцов Н. Г. // *Коллоидный журнал.*–2002.–Т.64, № 6.–С. 745-755.
4. Вакштейн М.С., Аратов Н.В., Зосимов В.В. // *Молекулярные технологии.* – 2007. – Т. 1. – С. 1-14.

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке молодежных грантов Академии наук Татарстана (проекты № 02-2/2008 (Г) и № 14-3/2008(Г))