

**Применение спектроскопии гигантского
(поверхностно-усиленного) комбинационного
рассеяния (SERS) для био-медицинских
исследований**

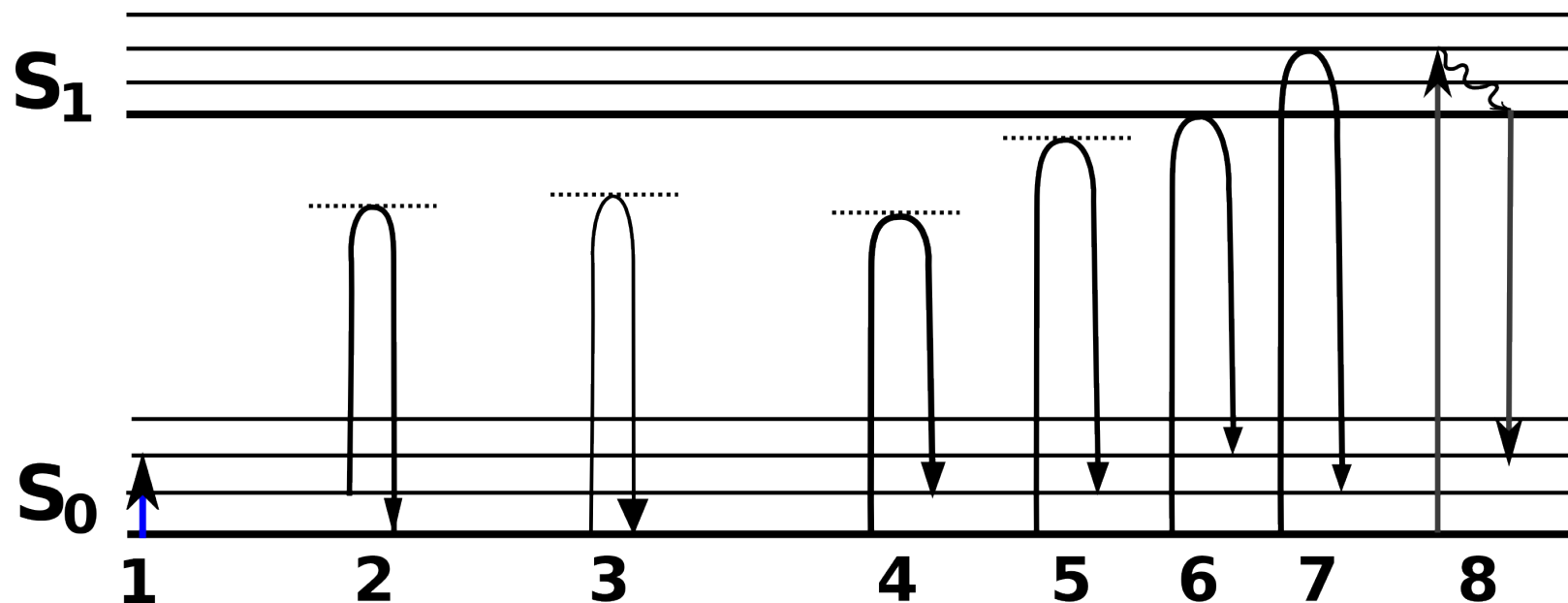
Браже Надежда Александровна
Кафедра биофизики, биологический факультет
МГУ имени М.В. Ломоносова

21 апреля 2010

План лекции

- **Спектроскопия комбинационного рассеяния**
- **Теория и особенности (“подводные камни”) гигантского КР**
- **Подбор условий для получения ГКР от молекул и клеток**
- **Направления спектроскопии ГКР в биологических исследованиях**
- **Наноструктурированные подложки и коллоидные растворы**
- **Перспективы**

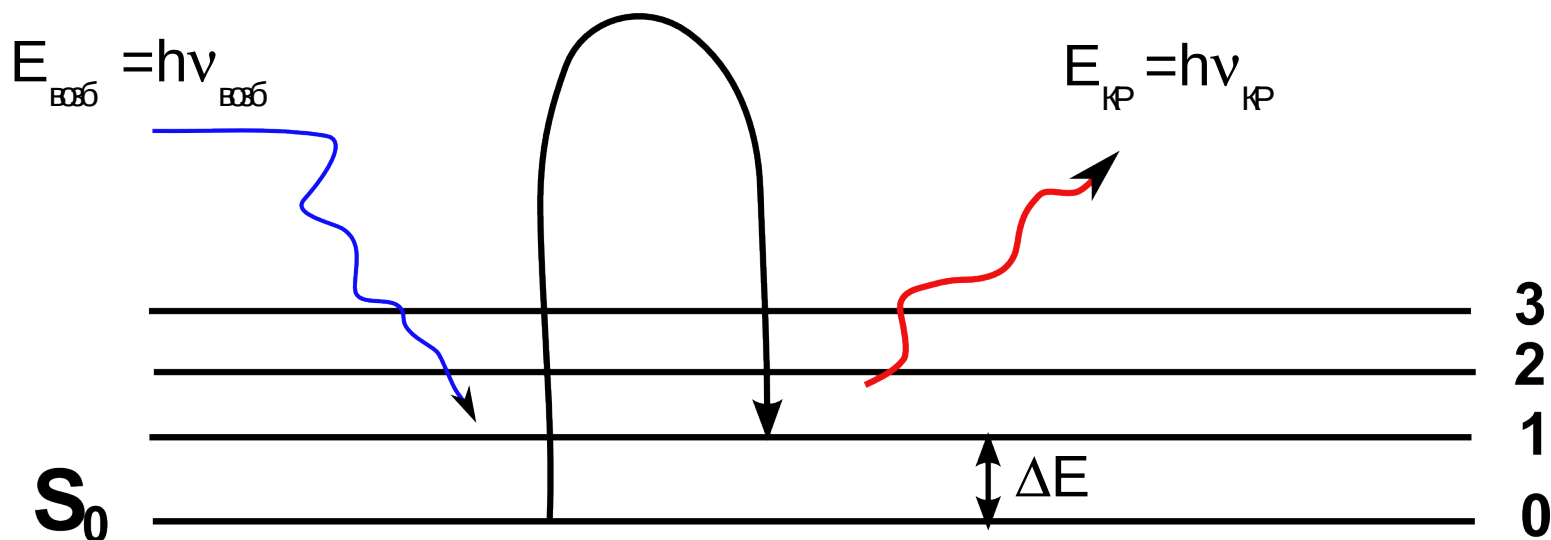
Комбинационное рассеяние света (эффект Рамана) — это рассеяние оптического излучения на молекулах вещества, возникающее вследствие неупругого взаимодействия излучения с молекулами и сопровождающееся изменением частоты излучения



- 1 – ИК поглощение света
- 3 – Релеевское рассеяние света
- 2 – анти-Стоксовское комбинационное рассеяние света
- 4-7 – Стоксовское рассеяние света
- 8 - флуоресценция

О чем говорит КР?

Разница между энергиями возбуждающего кванта и кванта света КР равна энергетическому зазору между колебательными подуровнями. Спектр КР молекулы несет информацию о переходах между колебательными подуровнями, то есть о колебаниях атомов. По спектрам КР можно оценить конформационные перестройки в молекулах.



$$\Delta E = E_{\text{кр}} - E_{\text{воб}} = h(\nu_{\text{воб}} - \nu_{\text{кр}}) = h\left(\frac{c}{\lambda_{\text{воб}}} - \frac{c}{\lambda_{\text{кр}}}\right)$$

$\Delta \nu = \nu_{\text{воб}} - \nu_{\text{кр}}$ **ЧАСТОТНЫЙ СДВИГ = frequency shift or wavenumber**

Гигантское комбинационное рассеяние (SERS)

Эффект ГКР впервые был обнаружен Fleischman и соавт. (1974) на пиридине, адсорбированном на шероховатой Ag проволоке.

ГКР наблюдается для молекул, адсорбированных на поверхности наночастиц (или наноструктурных поверхностях) из Ag, Au, их сплава, реже Cu, Pt.

Теории, объясняющие эффект ГКР:

1. Электро-магнитная (плазмоны на поверхности наноструктур)
2. Химическая (возникает перенос заряда между молекулой, **связанной** с наноструктурой)

Особенности гигантского комбинационного рассеяния с точки зрения электро-магнитной теории

- На поверхности наноструктуры существуют плазмоны. Плазмон – квазичастица, представляющая собой осцилляции поверхностных электронов относительно положительно заряженных ядер металла.

$$E_p = \hbar \sqrt{\frac{ne^2}{m\epsilon_0}} = \hbar \cdot \omega_p,$$

где n – плотность поверхностных электронов, e – элементарный заряд, m – масса электрона, ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость, ω_p – плазмонная частота

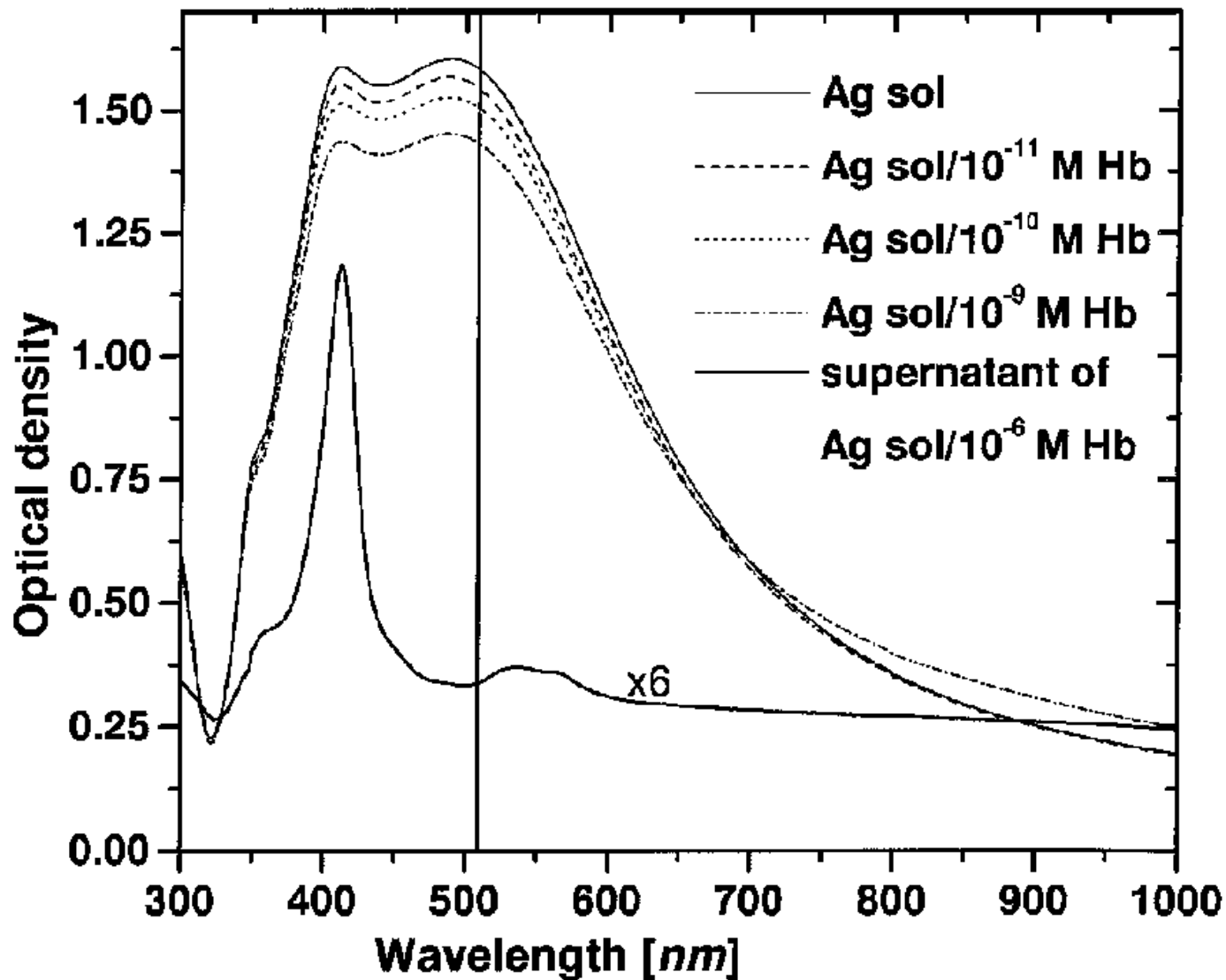
- Когда частота падающего света совпадает с плазмонной частотой, наблюдается поверхностный плазмонный резонанс. Положение максимума в спектрах поглощения/пропускания/отражения коллоидного раствора НЧ или наноструктурированной поверхности соответствует длине волны, на ктр наблюдается ППР.

- ГКР наблюдается, когда длины волн возбуждающего и КР света близки к длине волны, на которой наблюдается плазмонный резонанс;
- Фактор (коэффициент) усиления $E F = |E(\omega_1)|^2 |E(\omega_2)|^2$, где $E(\omega_1)$ – фактор усиления локального ЭМ поля падающего света с частотой ω_1 и $E(\omega_2)$ – фактор усиления Стоксовского КР с частотой ω_2 .

$$K_U = \frac{I_{ГКР}}{I_{КР}} \frac{C_{КР}}{C_{ГКР}}$$

K_U :) - коэффициент усиления, $I_{ГКР}$ и $I_{КР}$ – интенсивности выбранной полосы в спектрах ГКР и КР, $C_{КР}$ и $C_{ГКР}$ – концентрация или количество молекул, ктр дают сигнал КР и ГКР

- Максимальный $EF(K_U)$ достигается при $\lambda_{воб} < \lambda_{ЛПР} < \lambda_{КР}$
- Положение плазмонного резонанса сдвигается при сорбции на наноструктуру молекулы или клетки

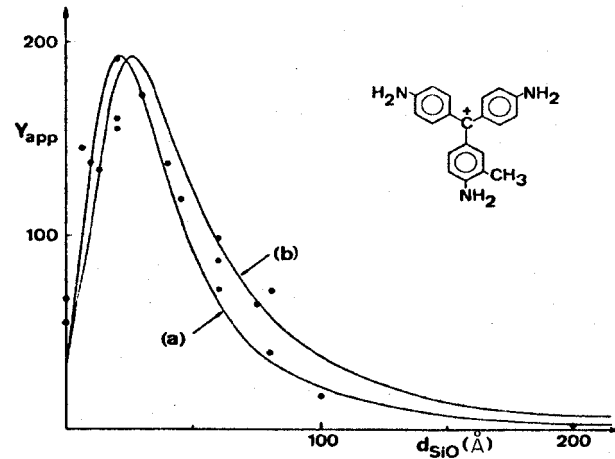


Спектр поглощения коллоидного раствора серебра (сплошная кривая) и спектры поглощения смеси коллоидного раствора серебра с растворами гемоглобина. Максимум в спектре поглощения коллоидного раствора серебра соответствует максимуму плазмонного резонанса.

Дополнительные особенности ГКР

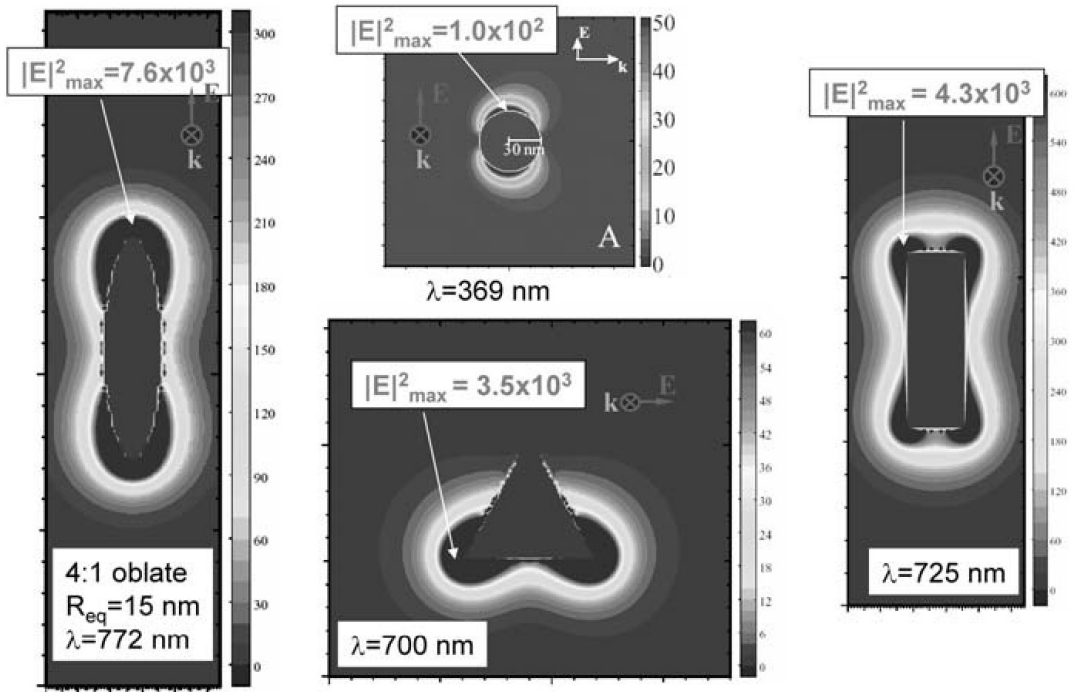
- Зависимость интенсивности ГКР от расстояния от наноструктуры:

Усиление сигнала уменьшается пропорционально $a/(a + r)^{10}$, где a – радиус наноструктуры, r – расстояние от поверхности наноструктуры до молекулы. По другим оценкам усиление сигнала уменьшается пропорционально $1/r^3$



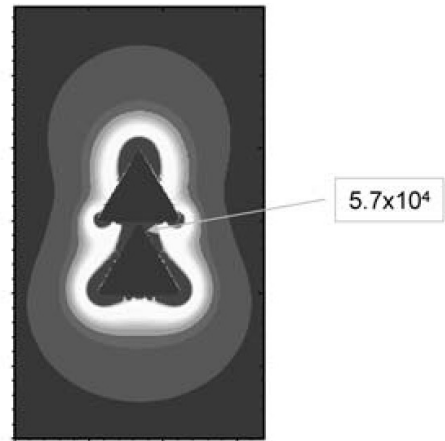
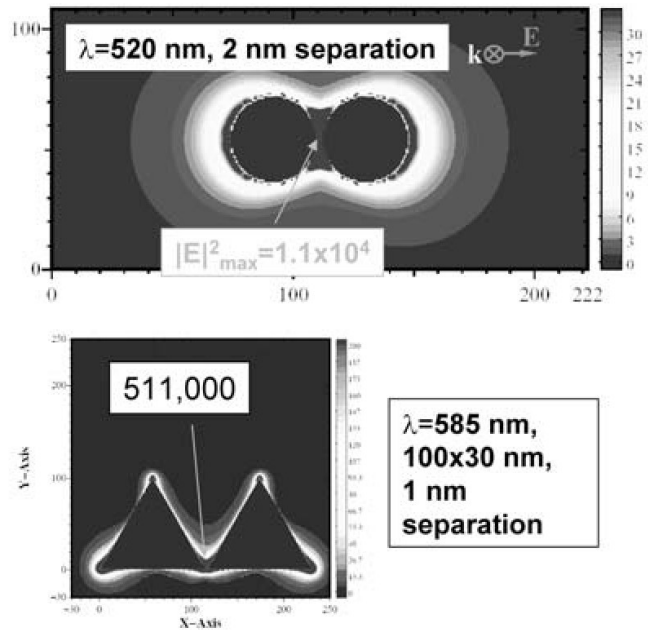
Зависимость усиления сигнала (флуоресценции фуксина) от толщины слоя оксида кремния над наноструктурами серебра (Wokaun et al., 1983)

- Положение плазмонного резонанса, а также EF зависят от металла, размера и формы наноструктуры



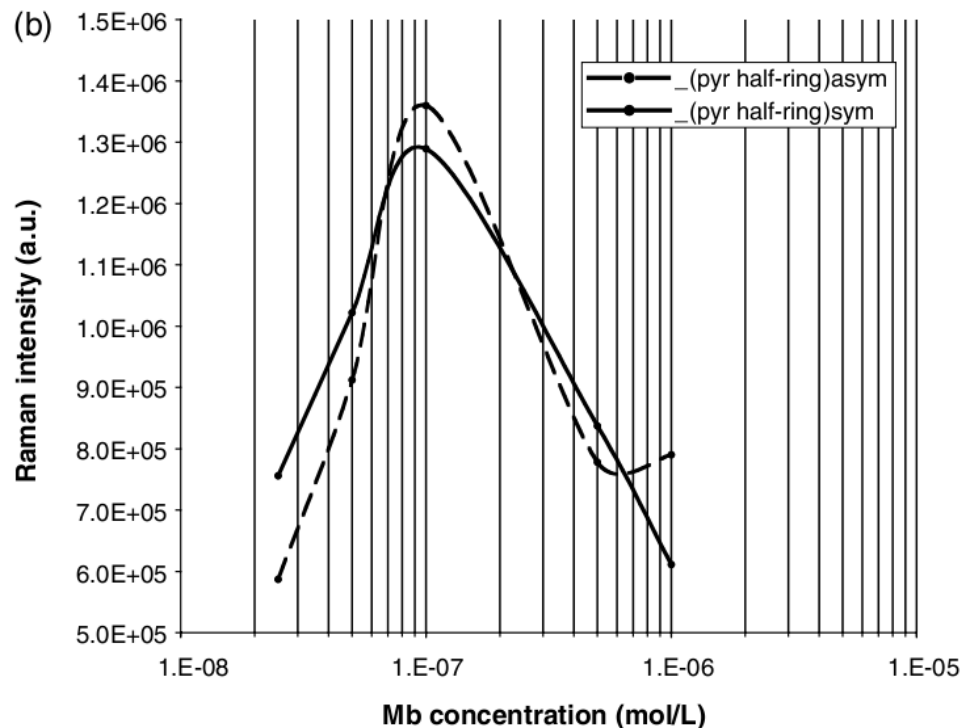
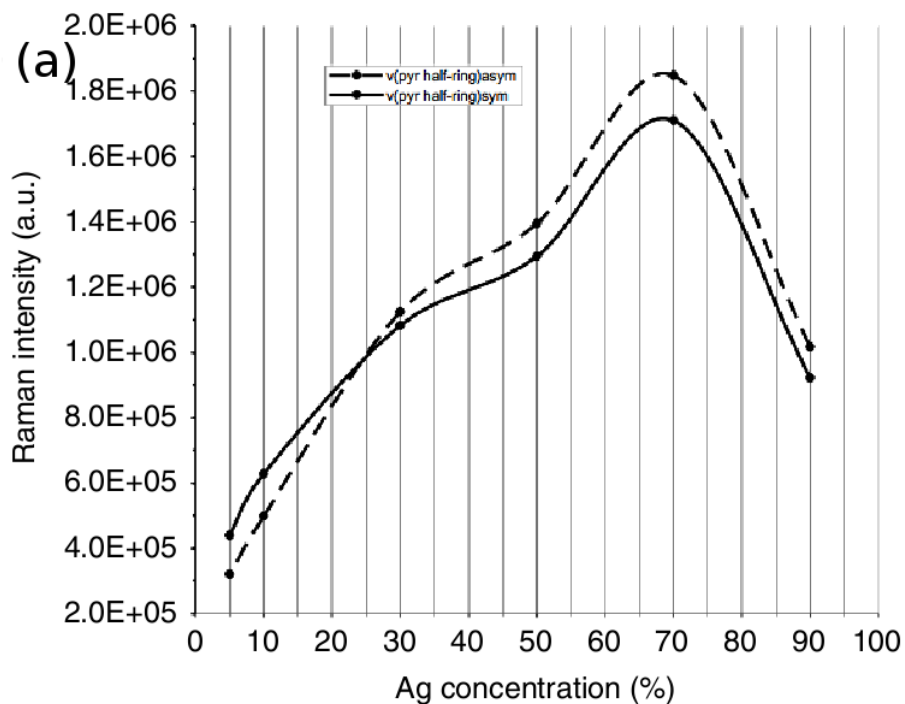
Усиление падающего излучения на НЧ разной формы

В эксперименте всегда следует учитывать возможную агрегацию НЧ и их неоднородность!!!



852 nm, 2 nm separation

Усиление сигнала КР зависит от соотношения числа молекул/наночастиц



Интенсивности гигантского КР миоглобина в зависимости от (а) объемной доли коллоида Ag при концентрации миоглобина 10^{-7} М и (б) от концентрации миоглобина при объемной доле коллоида Ag 70%.

(По Abdali et al., 2007)

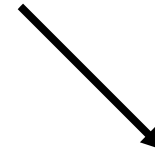
При работе с клетками надо помнить, что коллоидный раствор изменяет состояние клеток и что клетки могут “портить” наночастицы

Усиление КР от исследуемой молекулы может меняться со временем вследствие: агрегации наночастиц, артефактного изменения конформации молекулы, изменения состояния клетки (наноструктуры “портят” клетки), изменения состояния наноструктур (клетки, молекулы или их физиологический раствор “портят” наноструктуры).

Необходимо знать время стабильности сигнала. Оно должно быть как минимум больше характерного времени эксперимента

Направления спектроскопии ГКР в биологии и медицине

Наночастицы и наноструктурированные поверхности (НЧ и НСП)



Специфические сенсоры

К поверхности “пришиты” определенные молекулы, спектр ГКР которых зависит от окружения, или молекулы, избирательно присоединяющие интересующее вещество
Пример: НЧ-“рН-метр”, НСП-”глюкозомер”

Усилители сигнала КР от исследуемых молекул

Обнаружение вещества при субмикромольных концентрациях

Исследование изменения конформации и свойств молекул при низких концентрациях,
В ОПРЕДЕЛЕННЫХ КОМПАРТМЕНТАХ КЛЕТОК!

Модификация поверхности НЧ для стабильности, улучшения сорбции молекул, проникновения в клетку и т.д.

Требования к веществам, модифицирующим поверхность: **отсутствие спектров КР**, нетоксичность

**Общих подходов к использованию наночастиц
или наноструктурных поверхностей в био-
медицинских исследованиях нет!**

**Для каждого конкретного случая (типа клетки,
изолированной макромолекулы), типа
наноструктур надо подбирать свои условия и
свои подходы к анализу данных.**

**Правильная подготовка объекта – половина
успеха**

**Для каждого био-объекта – своя
нанобиотехнология ГКР**

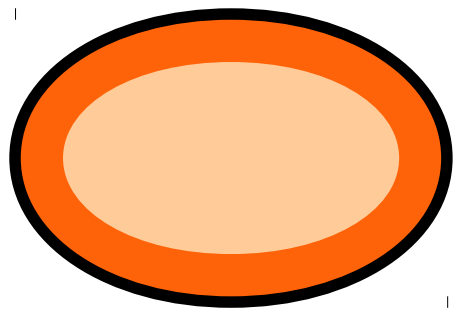
1. Исследование конформации и свойств молекул, в том числе внутри живых клеток (на примере кислород-связывающих свойств гемоглобина, связанного на плазматической мембране эритроцита)

Требования:

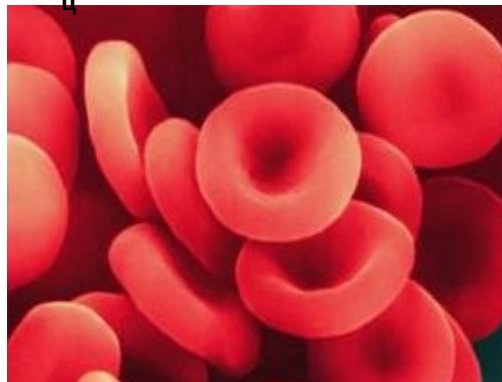
1. Специфичность – усиление сигнала КР от нужных молекул;
2. Высокая повторяемость результатов: стабильность НЧ или НСП (фактора усиления), отсутствие вариабельности гетерогенности НЧ по форме, размерам и т.д. От эксперимента к эксперименту;
3. Нетоксичность;
4. Устойчивость в физиологических растворах

Анализ спектров ГКР:

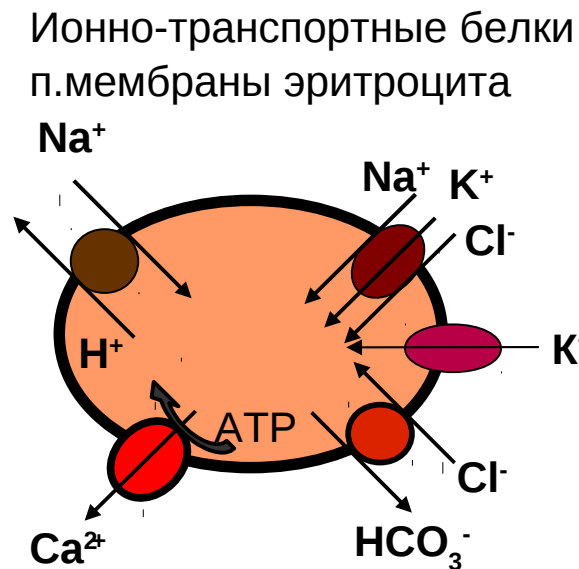
Структура и интенсивность спектра, а также соотношение интенсивностей выбранных полос; фактор усиления



Гемоглобин в эритроците:
 Цитоплазматический Гб_ц и
 мембраносвязанный Гб_м
 $\text{Гб}_{\text{м}} \leq 0.5\% \text{Гб}_{\text{ц}}$



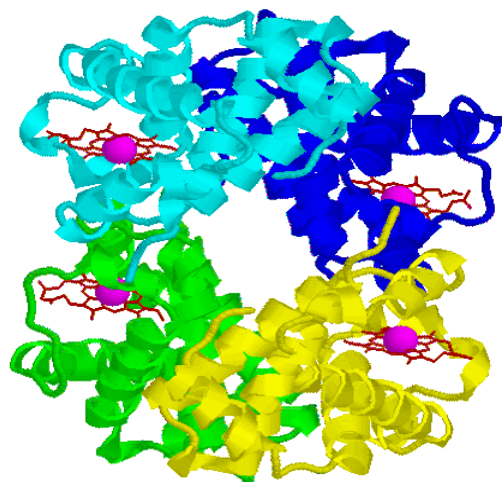
Перераспределение Гб к эритроциту.
 В примембранной области накапливаются “неправильные” формы Гб



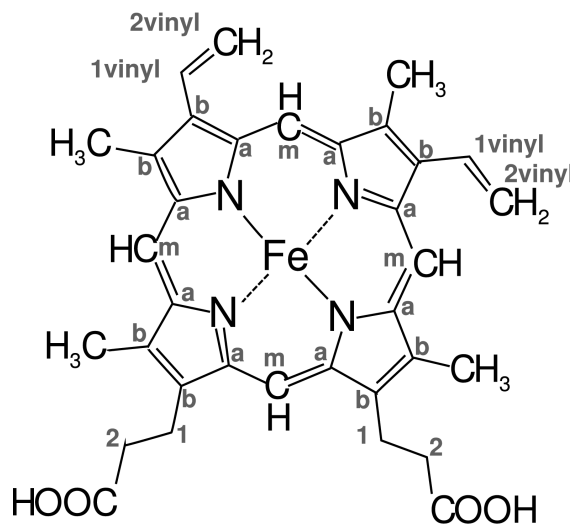
Изменение конформации и O₂-связывающих свойств Гб

Патологии эритроцитов

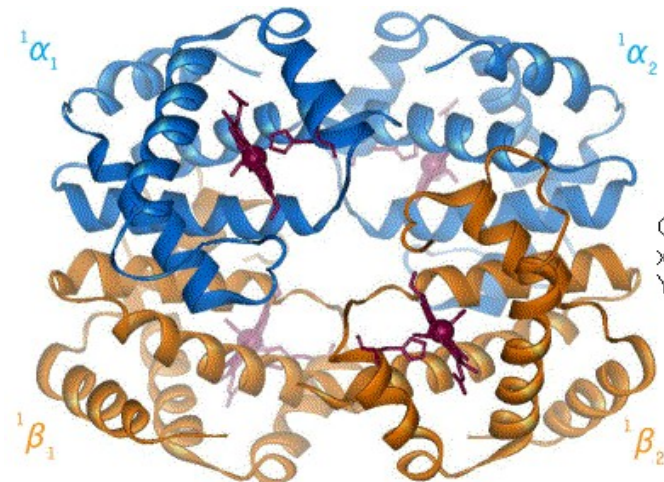
Изменение свойств плазматической мембраны и активности ионно-транспортных систем



Молекула гемоглобина

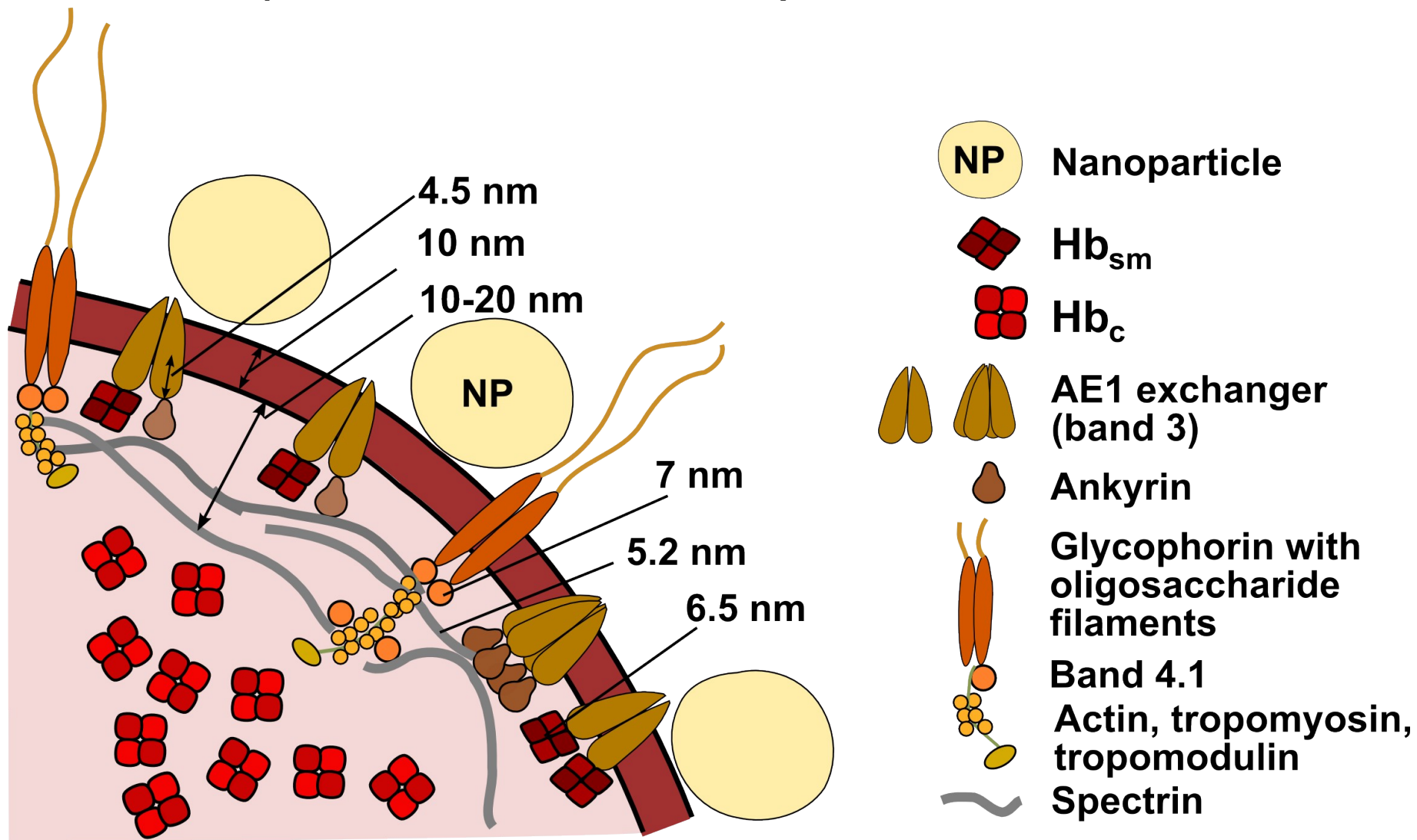


Гемопорфилин



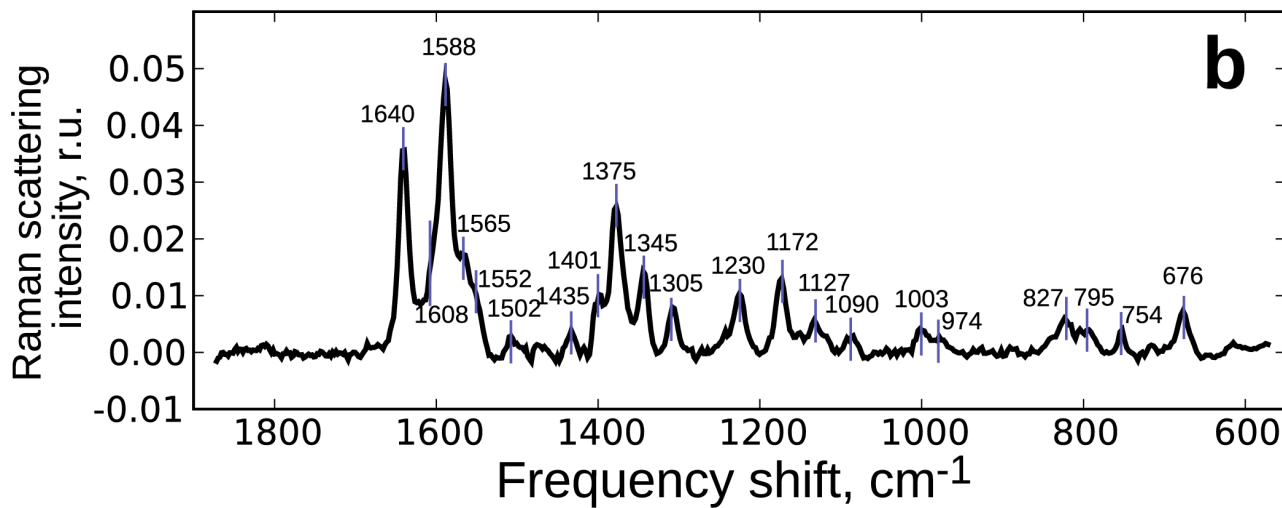
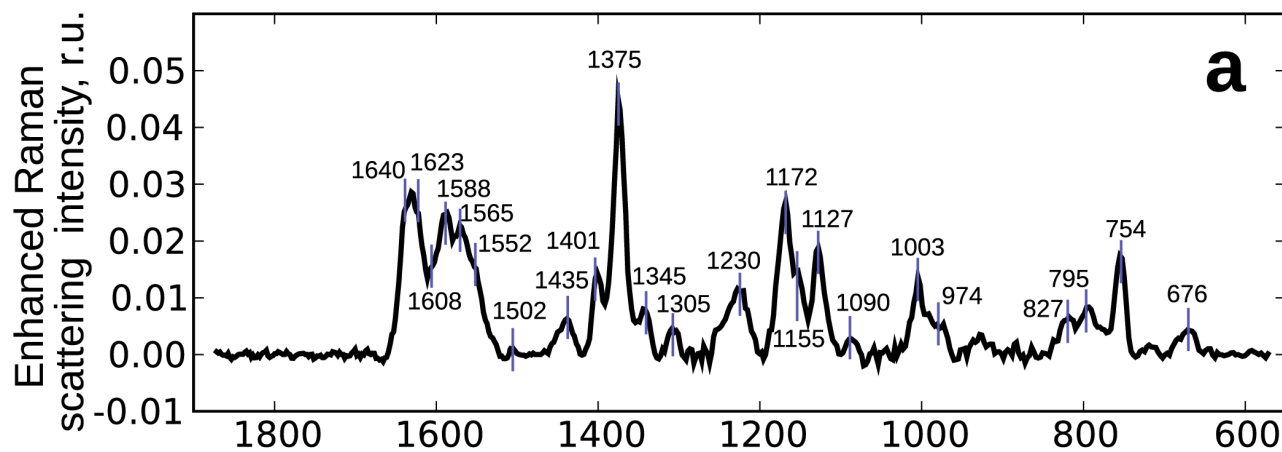
Гемоглобин в действии

Участок эритроцита с плазматической мембраной и трансмембранными белками, адсорбированными наночастицами Ag, подмембранным цитоскелетом и двумя типами гемоглобина: цитоплазматическим и мембраносвязанным



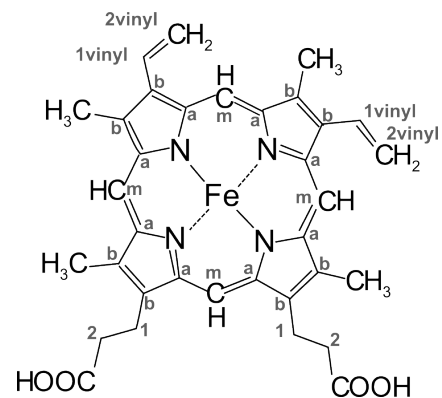
a. Спектр КР эритроцитов при разведении крови в 10^2 раз. Возбуждение – 532 нм

b. Спектр ГКР эритроцитов при разведении крови в 10^4 раз и добавлении раствора коллоидного серебра



Фактор усиления:

Лазер 532 нм: 10^5

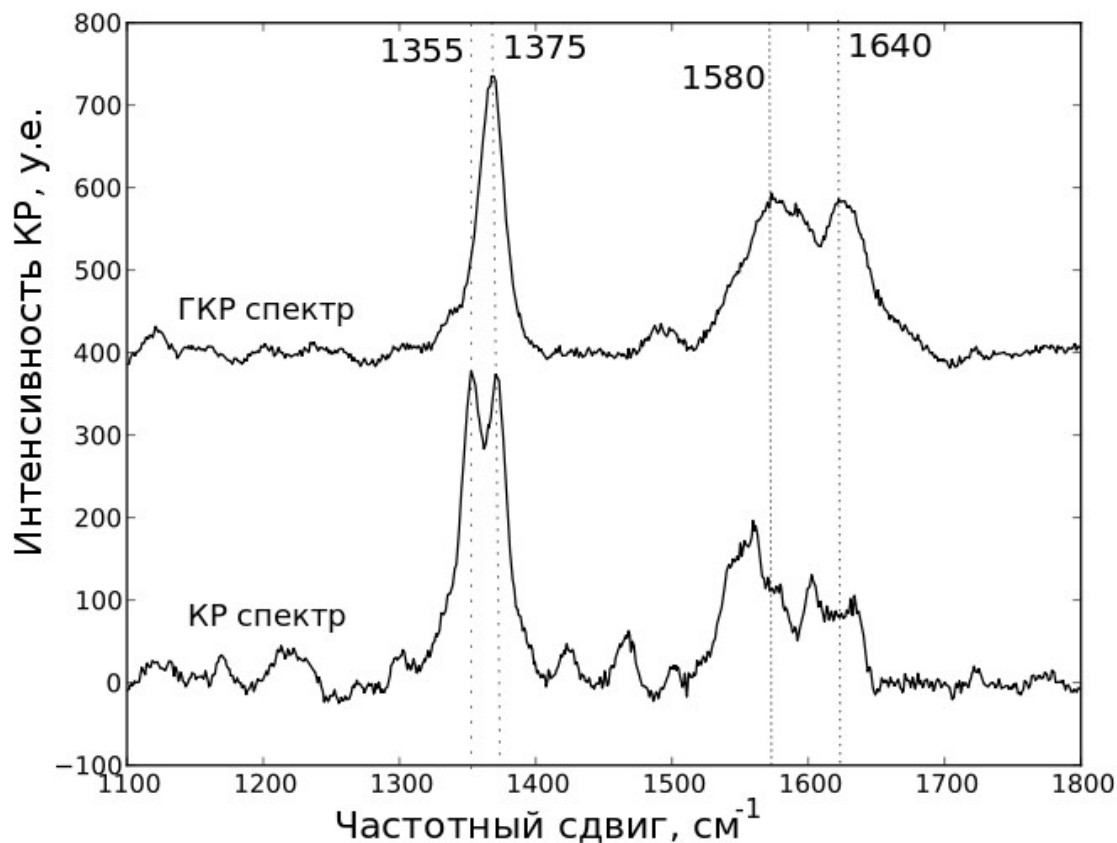


Информация, получаемая из спектров КР эритроцитов: отн. количество Гб- O_2 и Гб- NO , а также способности Гб связывать и выделять O_2 (сродство Гб к O_2)

Особенности спектров ГКР:

Спектр ГКР \neq усиленный спектр КР

1. Относительное усиление в низкочастотной области больше, чем в высокочастотной;
2. Усиление пика в спектре ГКР зависит от ориентации связи по отношению к НЧ, т.е. от того, как молекула/клетка сорбировались на НЧ;
3. При взаимодействии с НЧ изменяется симметрия молекулы и в спектре ГКР появляются асимметричные колебания (для центрально-симметричных молекул)



Спектры КР цельной крови (внизу) и ГКР сильно разведенной крови (вверху) при использовании лазера 473 нм.

Коэффициент усиления 10^7

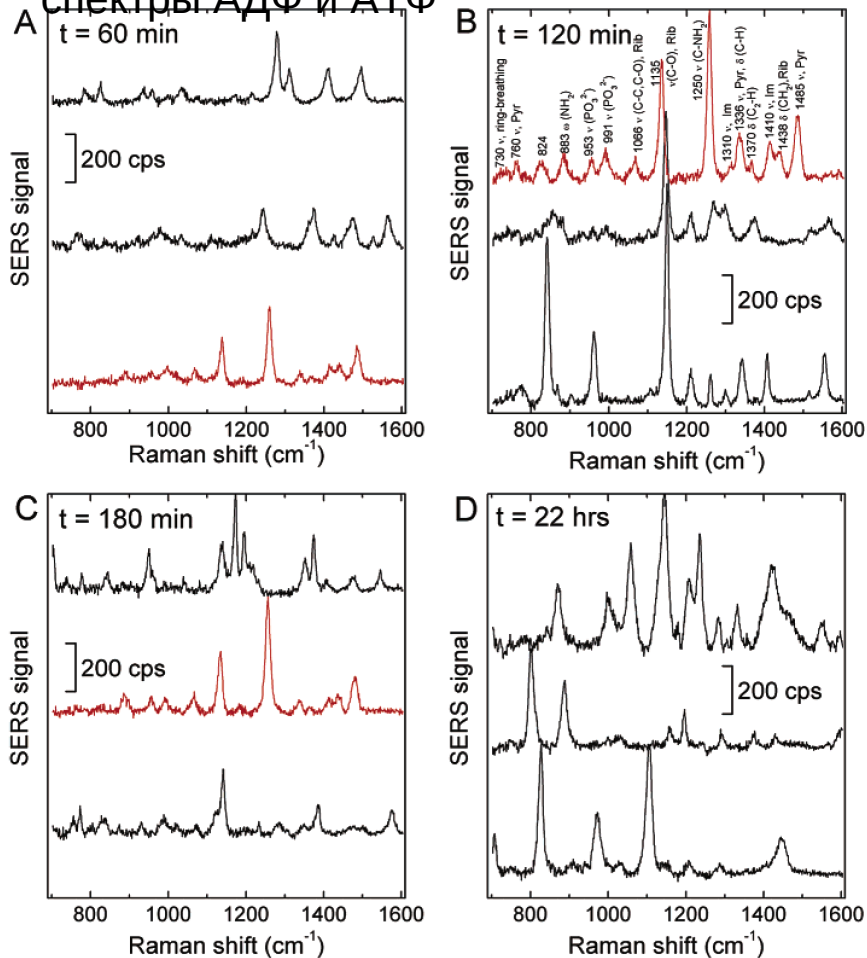
Спектроскопия ГКР может быть использована:

(1) для выявления патологий в эритроцитах на самых ранних стадиях. Состояние эритроцита связано с состоянием кровеносной системы и др. Органов;

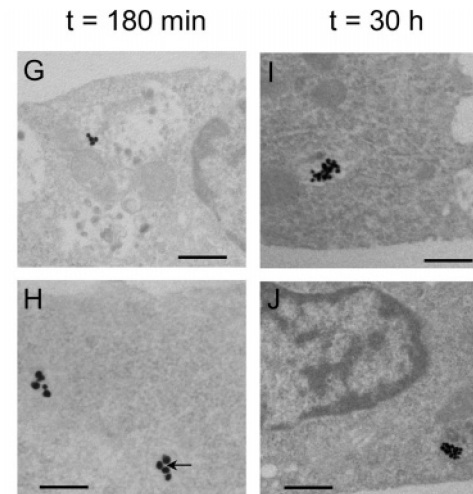
(2) фундаментальных исследований насыщения эритроцитов кислородом, а также способов регуляции конформации и свойств мембраносвязанных белков

Исследование конформации и свойств макромолекул в клетках

Инкубация макрофагов с НЧЗ (30-50 нм) и регистрация спектров ГКР от участков с НЧЗ, возбуждение 735 нм
А,С красные спектры – идентифицированные спектры АДФ и АТФ



ТЭМ микрофотографии макрофагов, эндоцитировавших НЧЗ



Kneipp et al., NanoLetters, 2006

Перспективы: использование СГКР для исследования изменений в клетках, происходящих при различных воздействиях; на разных стадиях развития; при патологиях. Выявление ГКР-биомаркеров для различных процессов

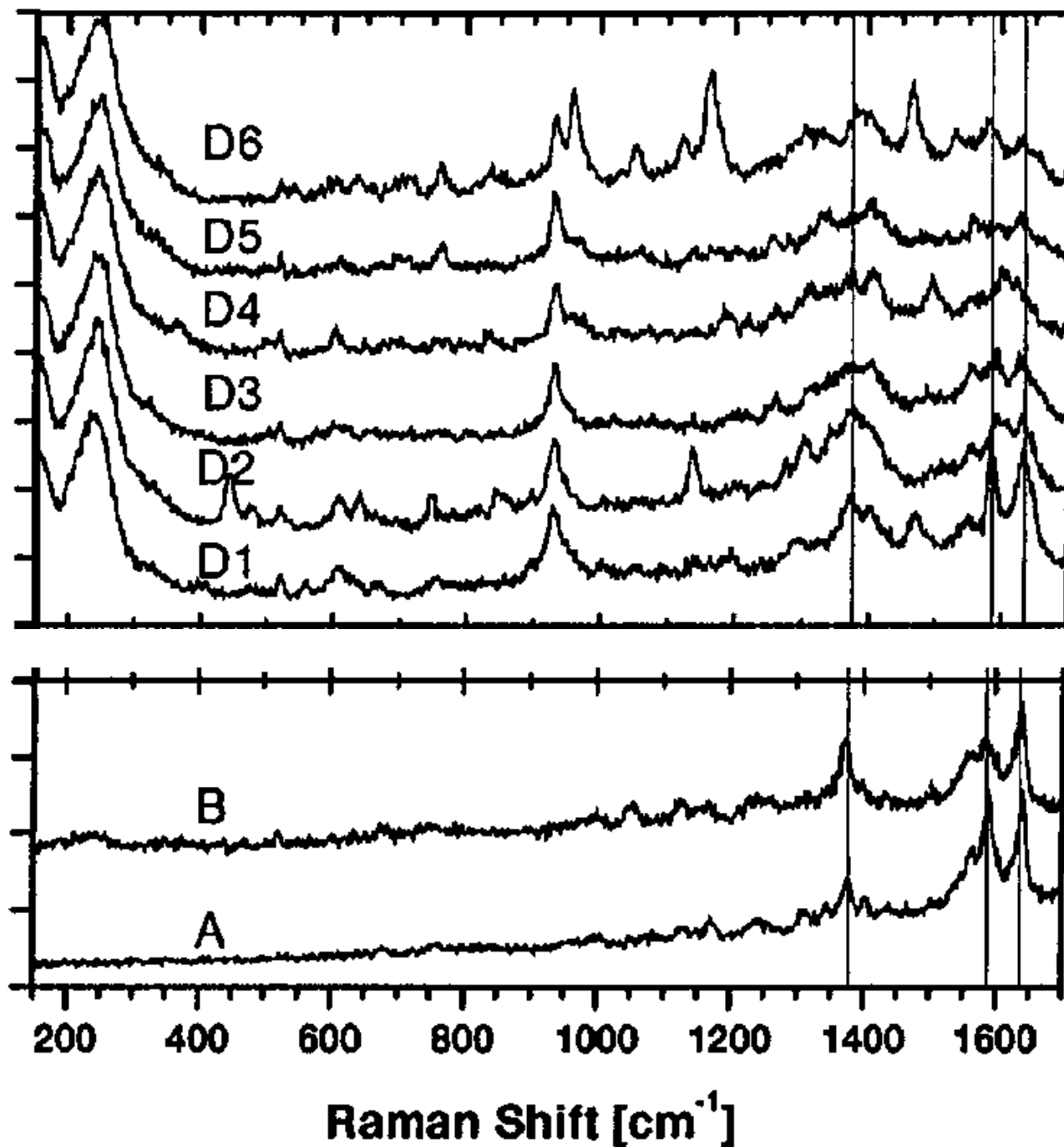
2. Обнаружение вещества при субмикромольных концентрациях

Требования:

1. Специфичность – усиление сигнала КР от нужных молекул;
2. Возможна вариабельности гетерогенности НЧ по форме, размерам и т.д. От эксперимента к эксперименту (т.к. соотношение полос в спектрах ГКР не оценивается);
3. Устойчивость в физиологических растворах
Исследуемый параметр: наличие или отсутствие характерной полосы интересующего вещества

Примеры:

1. Обнаружение спор бактерии *Bacillus subtilis* (*Bacillus anthracis*) (Ag НСП, лазер 750 нм). Обнаружение – 10^3 спор/0,2 мкл раствора. Стабильность Ag НСП – не менее 30 дней (Zhang et al., J.Am.Chem.Soc., 2005)
2. Обнаружение сериновых протеаз в экстраклеточной жидкости (10^{-11} М)
3. Обнаружение цитохрома С, гемоглобина при концентрации 10^{-11} М (Xu et al., Phys.Rev.Lett., 1999)



Спектры ГКР кристаллического Гб (А), концентрированного слоя НЧС/Гб (В) и суспензии НЧС/Гб=3:1 при 10-11 М Гб с выбранной “горячей точки”(D1-D6).

3. Сенсоры

Требования:

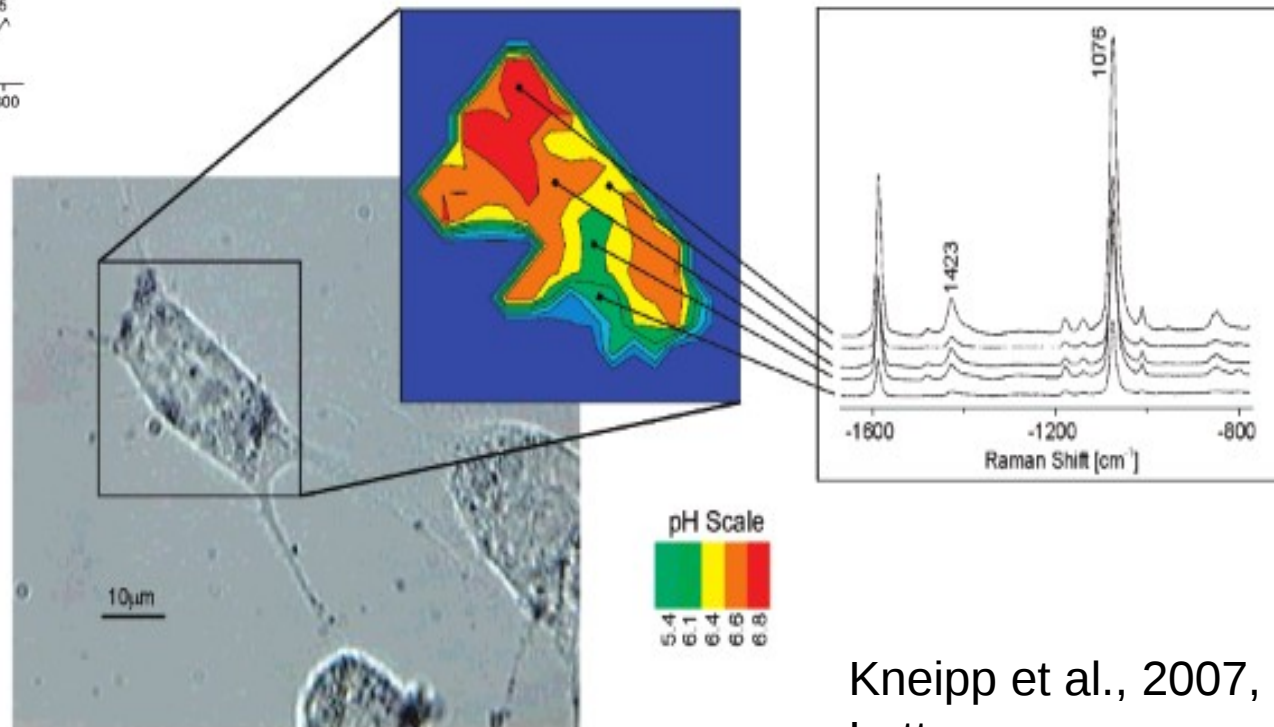
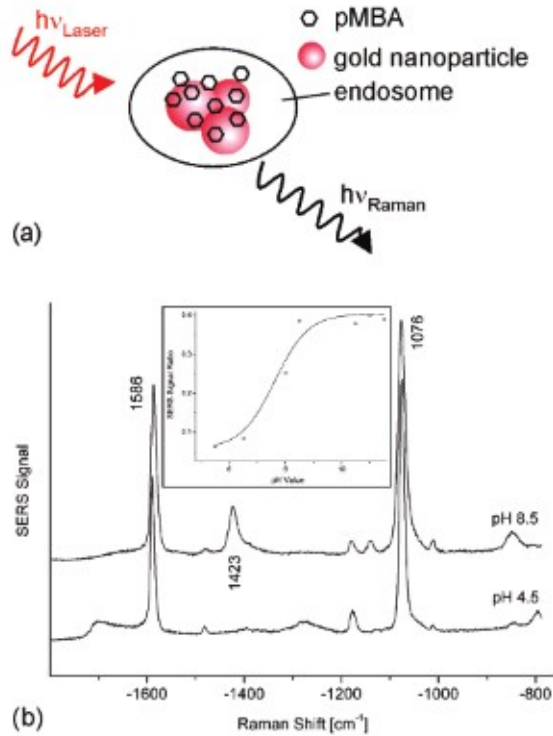
1. Специфичность;
2. Чувствительность к физиологическим концентрациям вещества;
3. Обратимость;
4. Устойчивость;
5. Нетоксичность;
6. Однозначность трактовки спектров ГКР

Оценивание pH в эндочитических везикулах клеток. Золотые НЧ

Наночастицы Au, меченные меркаптобензойной кислотой (МБК), являются меткой на pH внутри эндосом клеток

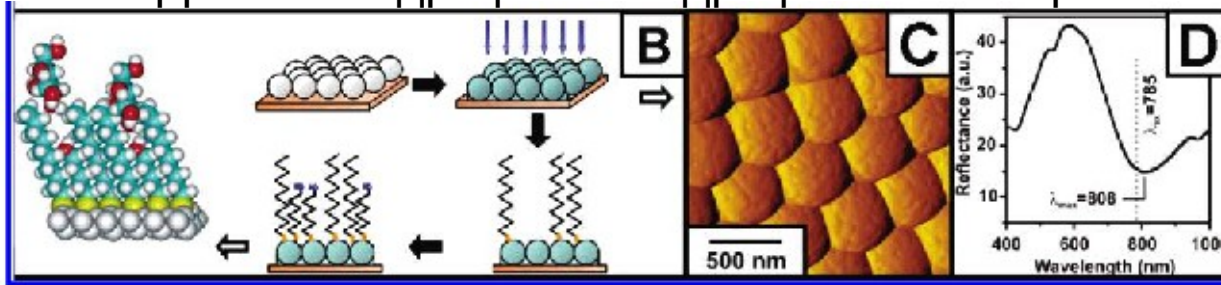
Объект: клетки культуры NIH/3T3 инкубировались в течение 3 ч с НЧ3-МБК. НЧ3-МБК захватываются клетками по механизмы эндоцитоза и накапливаются в эндосомах.

pH оценивали по изменению I_{1423} / I_{1076}

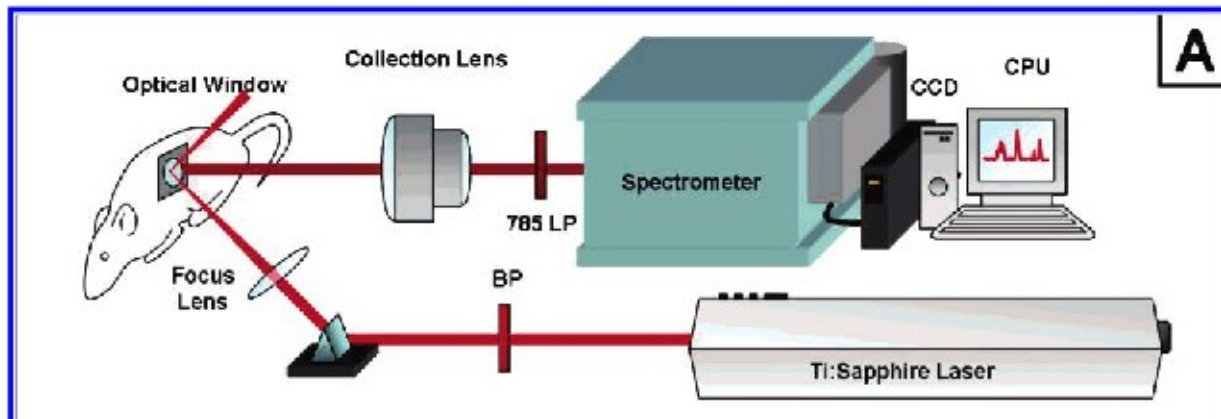


“Глюкозо-метр”

“Сенсор”: Наноструктурированная Ag поверхность, покрытая самособирающимся монослоем декантиолом (ДТ) и меркаптогексанолом (МГ). Смесь ДТ/МГ – гидрофобно/гидрофильное покрытие

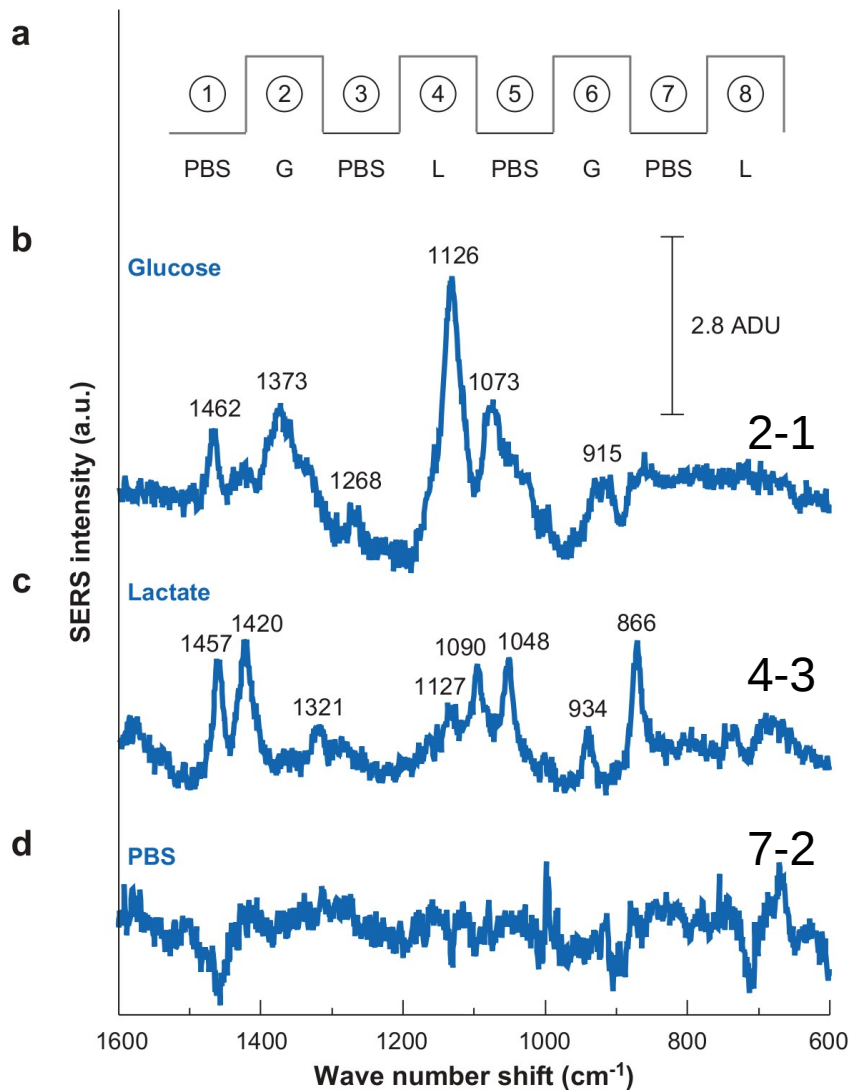


B: схема “функционалирования” подложки. **C:** АСМ-изображение подложки (получение – electron beam deposition); **D:** спектр отражения подложки

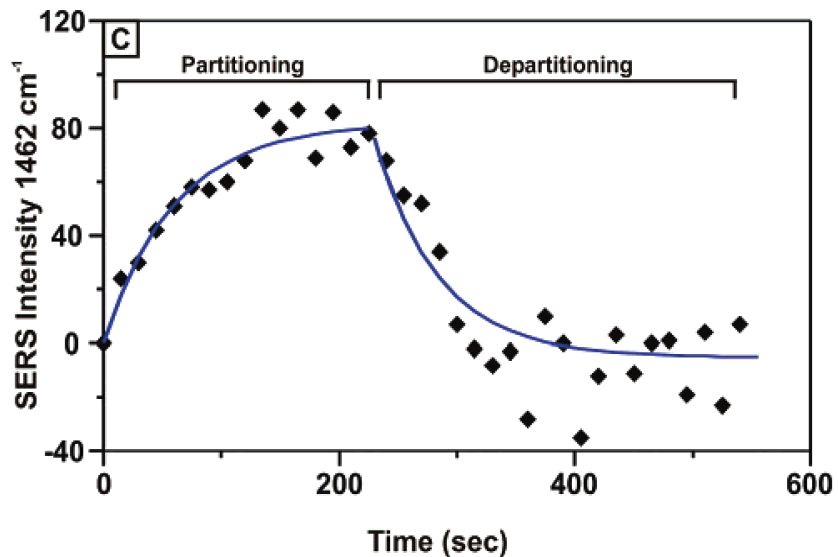


A: in vivo определение количества глюкозы

Разностные спектры ГКР буфера с глюкозой или лактатом и без них



Изменение интенсивности полосы 1462 cm^{-1} при пропускании через сенсор плазмы крови с глюкозой и без



ГКР-глюкозный сенсор обратим

Перспективы и возможные ГКР-биосенсоры

1. ГКР-биосенсор на O_2 , CO и NO: НЧС/НЧЗ или НСП + гемопорфирин или гемоглобин
2. ГКР-биосенсор на мембранный потенциал: НЧС/НЧЗ+бета-каротин

Коллоидные растворы НЧ vs наноструктурированные поверхности

- **Коллоидные растворы НЧ**

1. Простота получения;
2. НЧ эндоцитируются клетками – получение сигнала от внутриклеточных структур;
3. Необходимость оптимизации объема НЧ в среде с молекулами/клетками;
4. Токсическое, гипоосмотическое действие на клетки;
5. Нестабильность коэффициента усиления КР
6. Широкий диапазон объектов

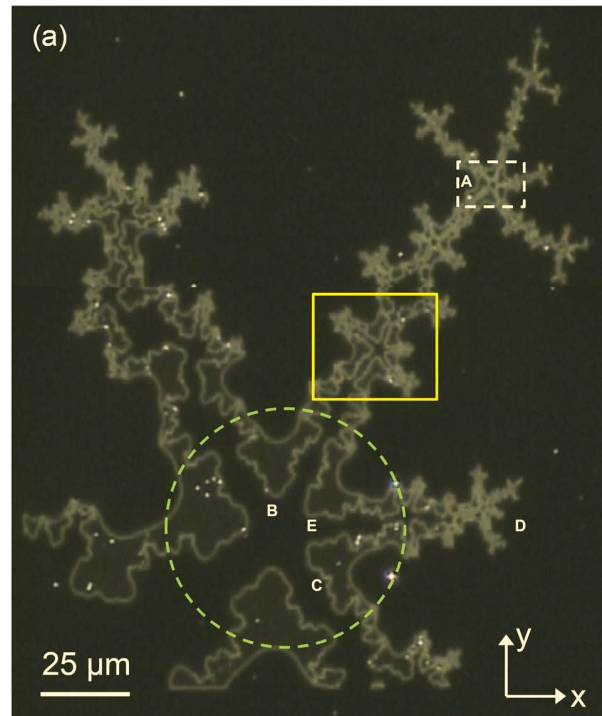
- **Наноструктурированные поверхности**

1. Более сложное получение;
2. В случае клеток сигнал усиливается только от мембраны и примембранных участков;
3. Подбор правильной геометрии;
4. Отсутствие токсического и осмотического действия на клетки;
5. Большая стабильность коэффициента усиления КР
6. Более узкий диапазон объектов

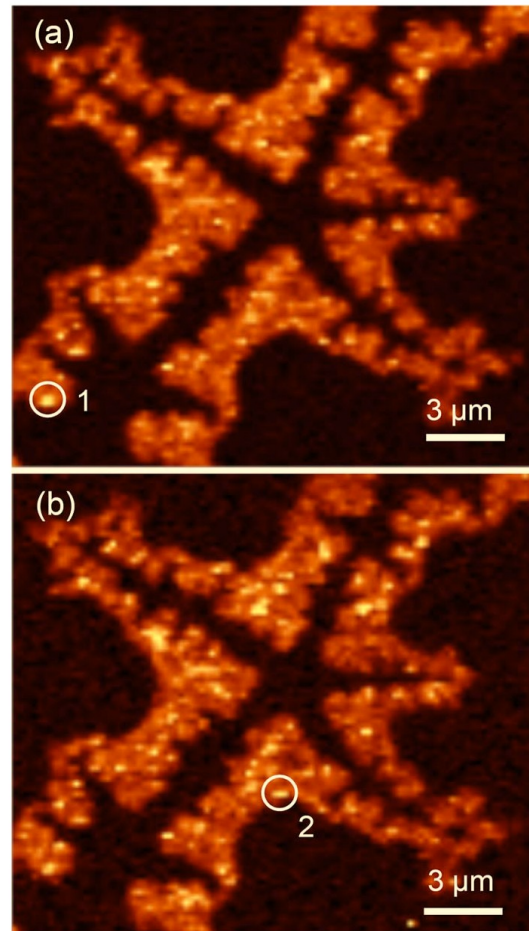
Наноструктурированные подложки

1. Геометрия подложки определяет фактор усиления;
2. Варьируя геометрию, можно получить усиление заданной спектральной области

Beermann et al.,
J.Opt.Soc. Am.B, 2009

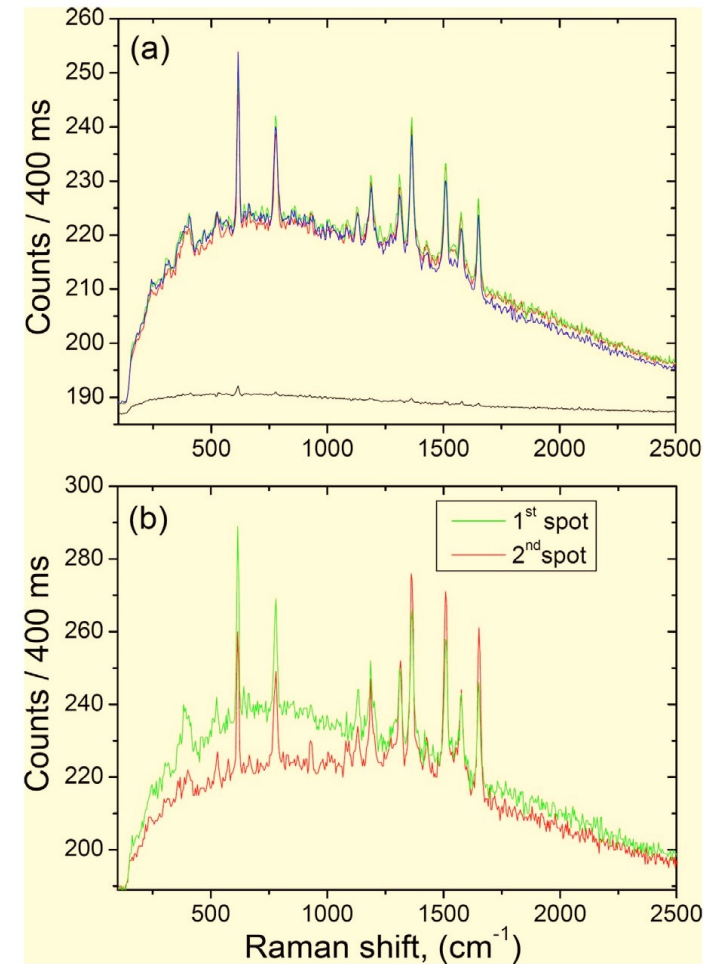


Подложка Au: 50 нм
толщина, НЧЗ с
диаметром 100 нм.
(электроннолучевая
литография)



Raman images ($20 \times 18 \mu\text{m}^2$)

Изображение ГКР
родамина 6G,
нанесенного на подложку
в области “фрактала”



(a) Средние спектры ГКР от Rh6G
в области “фрактала”; (b) Спектры
ГКР Rh6G в точках 1 и 2

Заключение

1. Спектроскопия ГКР позволяет детектировать молекулы в субмикромольной концентрации в растворе;
2. Микро-спектроскопия ГКР позволяет работать с меньшими мощностями лазера;
3. Существует ряд методических особенностей, которые следует учесть при работе со спектроскопией ГКР;
4. Для каждого биологического объекта необходимо подбирать свой ГКР-подход
5. Используя спектроскопию (микроскопию) ГКР можно исследовать молекулы в составе живых клеток с известной локализацией;
6. На основе наночастиц или наноструктурных подложек можно получить сенсоры, чувствительные к ранним патологическим изменениям в клетках.