

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Взаимодействие молекул альбумина и γ -глобулина с наночастицами золота в водных растворахВ. В. Гибизова^{1,a}, И. А. Сергеева¹, Г. П. Петрова¹, А. В. Приезжев^{2,b}, Н. Г. Хлебцов³*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,**¹кафедра молекулярной физики; ²кафедра общей физики и волновых процессов.**Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.**³Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.**Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.**E-mail: ^avika2000-05@mail.ru, ^bavp2@mail.ru*

Статья поступила 05.05.2011, подписана в печать 06.06.2011

Методом динамического рассеяния света изучена молекулярная подвижность рассеивающих частиц в водных растворах белков альбумина и γ -глобулина с наночастицами золота. Получены зависимости коэффициентов трансляционной диффузии частиц при различных концентрациях компонентов раствора. Обнаружено, что в широком диапазоне концентраций компонентов раствора взаимодействие наночастиц золота с молекулами альбумина отсутствует, а с молекулами γ -глобулина наночастицы золота образуют комплексы.

Ключевые слова: наночастицы золота, сывороточный альбумин, γ -глобулин, динамическое рассеяние света, фотонно-корреляционная спектроскопия, гидродинамический радиус, коэффициент трансляционной диффузии.

УДК: 532.77.11, 537.635. PACS: 82.37.-j, 87.14.-g, 87.15.-v, 42.62.-b.

Введение

Актуальность данной работы связана с широким использованием наночастиц золота в различных отраслях медицины [1]. Наночастицы золота применяются в биологии и медицине в таких направлениях, как биосенсорика, визуализация и фототермолиз раковых клеток, направленная доставка лекарства в клетку [2]. Например, прикрепленную антителами к раковой клетке золотую наночастицу можно нагреть лазерным излучением до температуры выше 100°C, уничтожив при этом саму клетку. Нагрев также может заставить открыться капсулу с противораковым препаратом, который будет доставлен точно к месту назначения [3].

Интересное применение нашли наночастицы золота в виде «золотой пули» — лекарства, селективно поражающего только злокачественные клетки и оставляющего нетронутыми здоровые клетки организма. Этот метод уже оправдал себя в борьбе с рядом заболеваний, затрагивающих различные компоненты крови [4].

Сывороточный альбумин и γ -глобулин относятся к глобулярным белкам [5, 6]. Общая площадь поверхности молекул альбумина очень велика, поэтому они выполняют различные функции в организме. Они хорошо растворяются в воде и легко диффундируют через стенки сосудов. Гидродинамическое поведение таких молекул хорошо описывается моделью жесткого эллипсоида вращения с соотношением осей примерно 150/50/50 Å.

Биохимические исследования показали, что у сывороточного альбумина большинство ионизируемых атомных групп находится на поверхности белковой глобулы. Эти группы обуславливают значительный заряд белковой макромолекулы, а следовательно, и ее электростатические свойства в растворе. Молекула аль-

бумина содержит порядка сотни пар положительных и отрицательных зарядов. Распределение зарядов по поверхности молекулы можно представить как диполь, имеющий наклон примерно 30° к длинной оси молекулы и расстояние между концевыми зарядами около 150 Å. Таким образом, дипольный момент молекулы человеческого сывороточного альбумина составляет около 500 ед. Дебая, для бычьего сывороточного альбумина (БСА) он составляет ~480 Д, для яичного ~400 Д.

Характерные размеры γ -глобулина составляют 100–200 Å. Он определяет иммунные свойства организма, участвует в транспорте железа; γ -глобулин содержит противобактериальные и противовирусные антитела, многие из которых обладают ферментативной активностью. Как показывают биохимические исследования крови, почти при всех заболеваниях содержание γ -глобулина в плазме крови повышается.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что при наличии ионов тяжелых металлов в водных растворах белков сыворотки крови (альбумина и γ -глобулина) образуются дипольные белковые кластеры [7]. В связи с этим важно понять, как взаимодействуют молекулы альбумина и γ -глобулина с наночастицами золота (50 и 15 нм) в водных растворах.

Рядом авторов [8] были проведены исследования взаимодействия белков — альбумина, фибриногена, γ -глобулина, гистона и инсулина с так называемыми поверхностно-функционализированными (ПФ) золотыми наночастицами с диаметрами от 5 до 100 нм. Было обнаружено, что ПФ наночастицы золота связываются с белками, а степень связывания зависит от размера частиц и исходной структуры белка.

В работе [9] было исследовано взаимодействие БСА с наночастицами золота, полученными методом лазер-

ной абляции в жидкости. Авторы [9] делают вывод о возникновении ассоциатов наночастиц золота с молекулами БСА на основе смещения полосы поверхностного плазмонного резонанса на 5–6 нм. По данным [9] размер ассоциатов превышает размер исследуемых наночастиц золота и БСА примерно в 10 раз, при этом наночастицы золота имели размеры ~ 3 нм, т.е. размеры исследуемых наночастиц и белка альбумина были практически одинаковыми.

В связи с этим большой интерес представляет изучение влияния крупных наночастиц золота, не имеющих специального покрытия, на свойства белков крови — альбумина и γ -глобулина в водных растворах.

1. Метод динамического рассеяния света

В методе динамического рассеяния света [10] изучается спектр флуктуаций интенсивности рассеянного света на частицах, взвешенных в растворе и находящихся в броуновском движении. Броуновское движение может быть описано уравнением диффузии. Корреляционная функция интенсивности рассеянного света $G(\tau)$ имеет вид

$$G(\tau) = \exp(2\tau/T_c), \quad (1)$$

где в соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции (или характерное время релаксации флуктуаций T_c) связано с коэффициентом трансляционной диффузии D_t :

$$1/T_c = D_t q^2, \quad (2)$$

где q — модуль разностного волнового вектора: $q = |q_s - q_i|$, где q_s — волновой вектор рассеянного света, q_i — волновой вектор падающего пучка. В случае сферических не взаимодействующих частиц коэффициент трансляционной диффузии D_t определяется формулой Стокса–Эйнштейна:

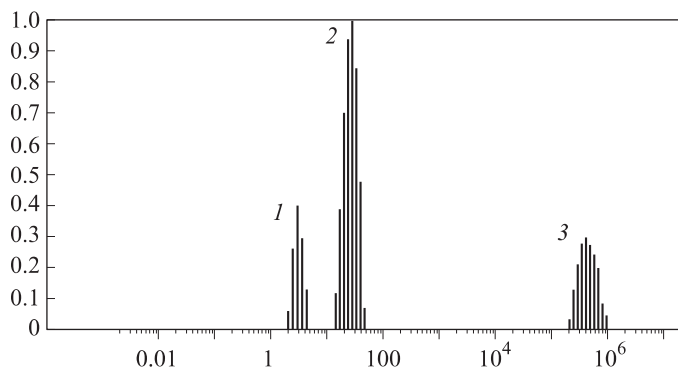
$$D_t = k_B T / (6\pi\eta R), \quad (3)$$

где R — гидродинамический радиус частиц, k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость растворителя. Рассеянный свет принимается фотоприемником. Сигнал с выхода фотоприемника обрабатывается цифровым коррелятором. Из полученной автокорреляционной функции вычисляется средний размер или распределение дисперсных частиц по размерам (рис. 1) [11].

На рис. 1 наблюдается три пика, первый из которых соответствует молекулам альбумина, второй — наночастицам золота, третий определяет постоянную составляющую за счет пыли в растворе, размеры которой на 4 порядка больше размеров исследуемых частиц, а вклад в интенсивность существенно меньше.

2. Экспериментальная установка

Исследования проводились на оптической установке Photocor-FC [12, 13] с диодным лазером (длина волны 647 нм, мощность 25 мВ). Исследовалось рассеяние под углом 90° , сигнал с ФЭУ (Perkin Elmer) анализировался компьютером. В кювете с исследуемым раствором поддерживалась комнатная температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата.



Номер пика	Радиус, нм	Стандартное отклонение
1	3.306	0.645
2	27.47	6.471
3	$3.8 \cdot 10^5$	$1.8 \cdot 10^5$

Рис. 1. Результат компьютерной обработки корреляционной функции. Распределение относительной интенсивности в зависимости от размеров рассеивающих частиц: альбумин — пик 1, наночастицы золота — пик 2; пик 3 — пыль

Обработка сигнала включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций и далее решение обратной задачи — определение коэффициентов диффузии (2) и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц (3). При решении обратной задачи используется метод регуляризации Тихонова [14].

Были проведены калибровочные измерения размеров рассеивающих частиц на эталонных образцах латекса полистерола с размером 120 нм. Погрешность таких измерений составила 1–5%. В серии экспериментов с наночастицами и белками в водных растворах погрешность составила 10–20%. Эта величина погрешности обусловлена главным образом довольно значительным разбросом размеров рассеивающих частиц.

3. Исследуемые материалы и приготовление образцов

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА) и γ -глобулин фирмы Sigma, наночастицы золота (производство ИБФРМ РАН¹), приготовленные по методу Френса, путем восстановления золотохлоридной кислоты цитратом натрия [15]. Радиусы этих частиц, указанные производителем, составляли 7.5 и 25 нм. Электронная микрофотография наночастиц представлена на рис. 2 [16].

В экспериментах с нанозолотом и БСА образцы имели следующие концентрации: альбумин $c = 0.2$ мг/мл (использовалась начальная концентрация альбумина, равная 50 мг/мл, соответствующая концентрации альбумина в крови человека), концентрация наночастиц золота в предоставленных образцах изначально составляла $2 \cdot 10^{12}$ частиц/мл (0.095 мг/мл) для частиц

¹ Образцы наночастиц предоставлены лабораторией нанобиотехнологий ИБФРМ РАН (заведующий — д.ф.-м.н., профессор Н. Г. Хлебцов)

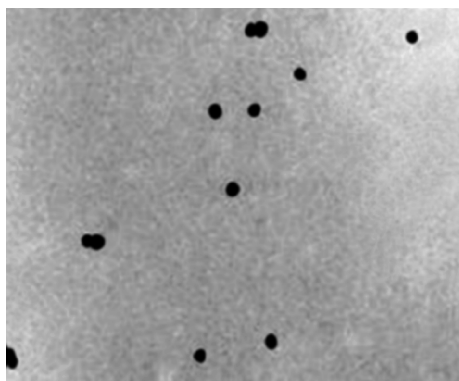


Рис. 2. Электронная микрофотография наночастиц золота со средним диаметром 50 нм. Размер изображения 2.2×1.8 мкм

диаметром 15 нм и $2 \cdot 10^{10}$ частиц/мл (0.0285 мг/мл) для частиц диаметром 50 нм. В процессе эксперимента варьировалась концентрация наночастиц золота и альбумина в водном растворе:

1) концентрация альбумина (БСА) изменялась от 0.2 до 1.0 мг/мл, концентрация частиц золота была постоянной для частиц диаметром 15 нм — $4 \cdot 10^7$ частиц/мл ($1.9 \cdot 10^{-6}$ мг/мл);

2) концентрация альбумина (БСА) постоянна — 25 мг/мл, концентрация частиц золота диаметром 50 нм изменялась от $3.64 \cdot 10^8$ до $18.2 \cdot 10^8$ частиц/мл ($5.2 \cdot 10^{-4}$ – $26 \cdot 10^{-4}$ мг/мл).

В экспериментах с растворами наночастиц золота и γ -глобулина образцы имели следующие концентрации: для γ -глобулина $c = 0.033$ мг/мл, для наночастиц золота концентрация варьировалась от $2 \cdot 10^8$ до $10 \cdot 10^8$ частиц/мл ($(0.28-1.42) \cdot 10^{-3}$ мг/мл).

При приготовлении образцов во всех случаях использовалась дистиллированная вода (ОАО «Новосибхимфарм»), рН 7.0. Измерения проводились при температуре 20°C.

4. Экспериментальные результаты

В качестве первого объекта исследования использовались наночастицы золота, имеющие размер 15 нм. На рис. 3 приведена полученная зависимость коэффициентов трансляционной диффузии рассеивающих частиц при различных концентрациях альбумина. Измерения проводились в нейтральной среде, т.е. при рН 7.0. Из рис. 3 видно, что коэффициенты трансляционной диффузии светорассеивающих частиц не изменяются при увеличении концентрации белка. Для наночастиц золота среднее экспериментальное значение коэффициентов трансляционной диффузии $\langle D_t \rangle_{\text{exp}} \approx (3.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$ см²/с, а рассчитанное по формуле (3) значение диффузии для $R = 7.5$ нм $D_{t\text{theor}} \approx 2.8 \cdot 10^{-7}$ см²/с. Этот результат указывает на то, что между частицами белка и наночастицами взаимодействие отсутствует.

В дальнейших экспериментах исследовались наночастицы золота с размером 50 нм. На рис. 4 также наблюдаются две компоненты, одна из которых соответствует коэффициентам трансляционной диффузии молекул альбумина, а другая — наночастиц золота. В данном случае для наночастиц золота

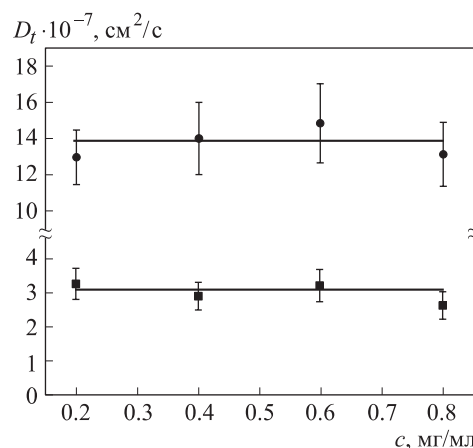


Рис. 3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц от концентрации альбумина в растворах, содержащих наночастицы золота (диаметр 15 нм) при рН 7.0. Верхняя прямая — данные для D_t , соответствующие молекулам альбумина, нижняя — наночастицам золота. Точками обозначены экспериментальные значения коэффициента трансляционной диффузии

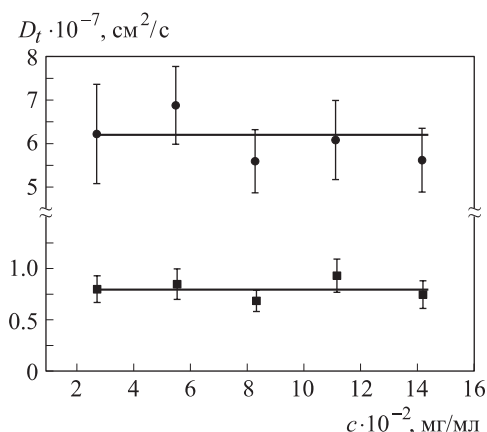


Рис. 4. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц от концентрации наночастиц золота (диаметр 50 нм) в растворах, содержащих альбумин при рН 7.0. Верхняя прямая — данные для D_t , соответствующие молекулам альбумина, нижняя — наночастицам золота. Точками обозначены экспериментальные значения коэффициента трансляционной диффузии

полученный коэффициент трансляционной диффузии $\langle D_t \rangle_{\text{exp}} \approx (7.9 \pm 1.5) \cdot 10^{-8}$ см²/с, а рассчитанный по формуле (3) $D_{t\text{theor}} \approx 8.5 \cdot 10^{-8}$ см²/с. Аналогично предыдущему случаю (рис. 3) агрегация наночастиц золота и молекул БСА не наблюдается.

По нашему мнению, это обстоятельство можно объяснить тем, что молекулы альбумина и наночастицы золота [17] либо несут малый отрицательный заряд, либо нейтральны.

Рассчитанные по формуле Стокса–Эйнштейна (3) значения гидродинамических радиусов совпадают с их теоретическими значениями: для молекул БСА $\langle R_h \rangle_{\text{exp}} \approx 3.5 \pm 0.8$ нм, для наночастиц золота диаметром 15 нм $\langle R_h \rangle_{\text{exp}} \approx 8.1 \pm 1.5$ нм, а диаметром 50 нм — $\langle R_h \rangle_{\text{exp}} \approx 25$ нм.

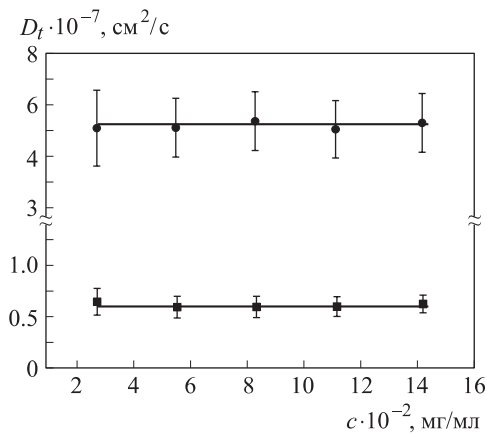


Рис. 5. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц от концентрации наночастиц золота (диаметр 50 нм) в растворах, содержащих γ -глобулин при pH 7.0. Верхняя прямая — данные для D_t , соответствующие молекулам чистого γ -глобулина, нижняя — данные, соответствующие комплексам наночастиц золота с молекулами γ -глобулина. Точками обозначены экспериментальные значения коэффициента трансляционной диффузии

В водных растворах γ -глобулина с наночастицами золота диаметром 50 нм (рис. 5) радиус рассеивающих частиц увеличивается: $\langle R_h \rangle_{\text{exp}} \approx 35$ нм, а полученный коэффициент трансляционной диффузии уменьшается: $\langle D_t \rangle_{\text{exp}} \approx (6.2 \pm 1.0) \cdot 10^{-8}$ см²/с (для сравнения $\langle D_t \rangle_{\text{theor}} \approx 8.5 \cdot 10^{-8}$ см²/с). Взаимодействие наночастиц золота с молекулами γ -глобулина приводит к увеличению размеров рассеивающих частиц и уменьшению их молекулярной подвижности. Вероятно, данный результат может быть связан с тем, что положительно заряженные участки молекул γ -глобулина прикрепляются к поверхности наночастиц золота, имеющих малый отрицательный заряд [17].

Результаты, отраженные на рис. 4 и 5, были получены с помощью модифицированного прибора, в котором использовался фотодетектор с чувствительностью в 5 раз большей, чем у предыдущего прибора.

Заключение

Методом динамического светорассеяния исследовано взаимодействие молекул бычьего сывороточного альбумина с наночастицами золота ($d = 15$ нм и 50 нм) и γ -глобулина с наночастицами золота ($d = 50$ нм).

Обнаружено, что агрегаты альбумина с наночастицами золота в растворе не наблюдаются, т.е. каждый компонент раствора существует независимо друг от друга. На этом основании можно сделать вывод об отсутствии взаимодействия между наночастицами золота и альбумином.

Получено, что для растворов с наночастицами золота (50 нм) и молекулами γ -глобулина радиусы рассеивающих частиц увеличиваются, а коэффициенты трансляционной диффузии уменьшаются, что может свидетельствовать об агрегации молекул γ -глобулина и наночастиц золота.

Полученные результаты могут быть полезны при использовании наночастиц золота в медицинских целях.

Список литературы

1. <http://rough-polished.com/ru/analytics/32271.html>.
2. Хлебцов Н.Г. // Квантовая электроника. 2008. **38**. № 6. С. 504.
3. <http://www.o8ode.ru/article/water/nanotechnology/nanogold.htm>.
4. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Miller C.M. et al. // Nano Letters. 2007. N 12. P. 3808.
5. Нейрат Г., Бейли К. Белки. М., 1958.
6. Ленинджер А.Л. Биохимия. М., 1987.
7. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1998. № 4. С. 71.
8. Lacerda S.H. De Paoli, Park J.J., Meuse C. et al. // ACSNANO. 2009. N 1. P. 365.
9. Красовский В.И., Наговицын И.А., Чудинова Г.К. и др. // Краткие сообщения по физике ФИАН. 2007. **34**, № 11. С. 24.
10. Камминс Г.З., Пайк Э.Р. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М., 2002.
11. <http://www.photocor.ru/dls-theory.htm>.
12. Петрусевич Ю.М., Петрова Г.П. // Биомед. радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 41.
13. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В. и др. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев, 1987.
14. <http://www.photocor.ru/dynals.htm>.
15. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Хлебцов Н.Г. и др. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М., 2008.
16. Ширманова М.В., Загайнова Е.В., Балалаева И.В. и др. // Вестн. Нижегород. ун-та. 2008. № 3. С. 92.
17. Портнов С.А. Создание чувствительных к электромагнитному воздействию нанокompозитных микрокапсул на основе биосовместимых полимеров: Автореф. дисс. ... канд. физ.-мат. наук. Саратов, 2009.

Interaction of albumin and γ -globulin molecules with gold nanoparticles in solutions of water

V. V. Gibizova^{1,a}, I. A. Sergeeva¹, G. P. Petrova¹, A. V. Priezzhev^{2,b}, N. G. Khlebtsov³

¹Department of Molecular Physics; ²Department of General Physics and Wave Processes, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

³Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia.

E-mail: ^avika2000-05@mail.ru, ^baop2@mail.ru.

Molecular mobility of scattering particles in water solutions of albumin and γ -globulin proteins with gold nanoparticles was investigated by dynamic light scattering method. Dependences of translation diffusion coefficients

of particles at various concentrations of solution components were obtained. It is revealed that in a wide range of concentrations of solution components interaction of gold nanoparticles with albumin molecules is absent and γ -globulin molecules with gold nanoparticles form complexes.

Keywords: gold nanoparticles, serum albumin, γ -globulin, dynamic light scattering (DLS), photon correlation spectroscopy, hydrodynamic radius, translation diffusion coefficient.

PACS: 82.37.-j, 87.14.-g, 87.15.-v, 42.62.-b.

Received 5 May 2011.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2011).

Сведения об авторах

1. Гибизова Виктория Валерьевна — студентка; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: vika2000-05@mail.ru.
2. Сергеева Ирина Александровна — канд. физ.-мат. наук, ассистент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: sergeeva@physics.msu.ru.
3. Петрова Галина Петровна — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: petrova@phys.msu.ru.
4. Приезжев Александр Васильевич — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-12-26, e-mail: avp2@mail.ru.
5. Хлебцов Николай Григорьевич — докт. физ.-мат. наук, профессор.