

Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

Алексей Валерьевич Феофанов

Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

***Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул***

ИБХ РАН

Лекция № 7

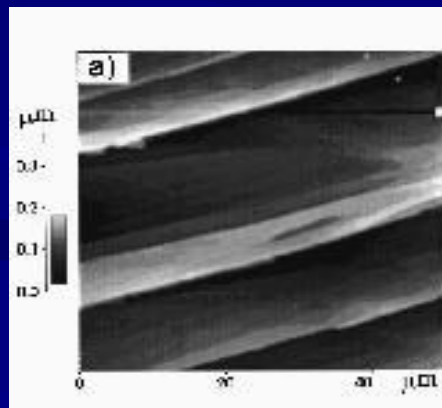
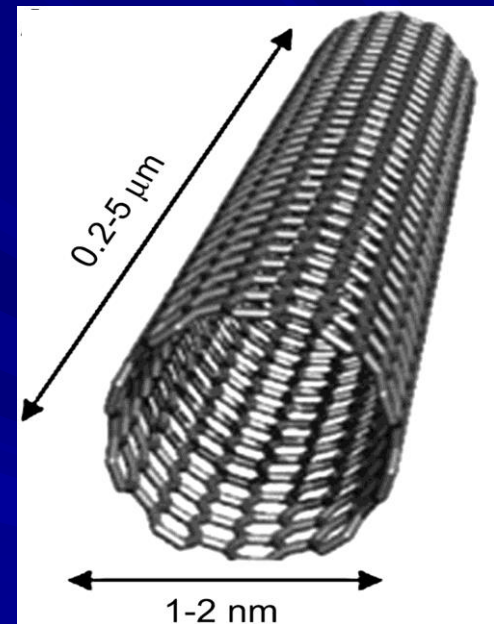
Наноматериалы –

это материалы с характерными размерами
менее 100 нм



↑
1 нм
↓

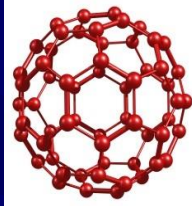
наночастицы
нановолокна
нанопленки



ВИДЫ наноматериалов

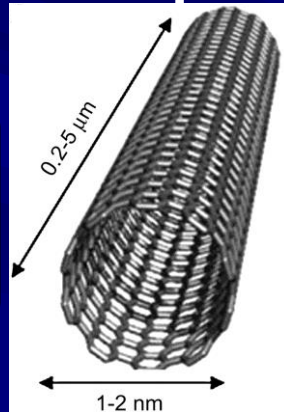
на основании форм-фактора

наночастицы

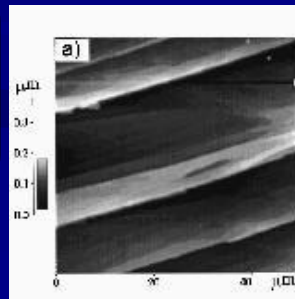


1 нм

нанотрубки,
нановолокна



нанопленки,
нанопокрyтия



на основании химического состава

металлические
*Au, Ag, Pt, Pd,
Ru, Ni, Cu*

оксиды металлов и
неметаллов
*SiO₂, Al₂O₃, TiO₂, SnO₂,
ZnO, MoO₃, V₂O₅, PbO,
Fe₂O₃, NiO*

полупроводниковые
*CdS, CdSe, PbS,
PbTe, GaN, GaAs,
InN*

углеродные
C₆₀, C₇₀
нанотрубки

органические
полимеры
дендримеры

наноглины
*{[Si_nAl_m]Mg_jO₁₀(OH)₂
x Na_k K_k или Ca_k}*

Годовое производство некоторых видов наночастиц

| | |
|--|-----------------|
| Различные фуллерены | > 500 т/год |
| Одностенные и многостенные углеродные нанотрубки | > 100 т/год |
| Наночастицы серебра | > 500 т/год |
| Наночастицы кремния и диоксида кремния | > 100 000 т/год |
| Диоксид титана | > 5 000 т/год |
| Оксид церия | > 10 000 т/год |
| Оксид цинка | > 20 т/год |

Число наночастиц размером 20 нм в 1 миллиграмме примерно такое же, как число клеток в организме взрослого человека.

Виды потребительской продукции, в состав которой входят наночастицы

- лакокрасочные материалы**
- очистка воды**
- солнечные батареи**
- фармацевтика**
- косметика**
- текстиль**
- пищевые продукты**

Количество видов потребительской продукции, в состав которой входят наночастицы

Количество
наименований товаров

| | |
|---------------------|-------|
| наночастицы серебра | > 240 |
| фуллерены | > 70 |
| диоксид титана | > 40 |
| нанокремний | > 30 |
| цинксодержащие | > 30 |
| нанозолото | > 16 |

Возможное накопление наночастиц в живых организмах вызывает опасение из-за не изученных эффектов, которые эти наночастицы могут вызывать

Причины накопления наночастиц в биообъектах:

активное развитие наноиндустрии;

загрязнение наноматериалами окружающей среды;

использования наночастиц в продуктах бытового назначения;

разработка лекарств и наносистем доставки лекарств к молекулярным и клеточным мишеням.

Что насстораживает в свойствах наночастиц с точки зрения биобезопасности:

повышенная проницаемость клеток, тканей, т.н. биологических барьеров для наноразмерных частиц;

возможное изменение или усиление отдельных свойств материалов в форме наночастиц по сравнению с микрочастицами и макроматериалами.

В частности, резкое увеличение площади поверхности материалов в наноразмерной форме;
увеличение числа дефектов кристаллической структуры на поверхности наночастиц;
увеличение адсорбционной емкости материалов в наноразмерной форме.

Нужны методы, позволяющие обнаруживать, идентифицировать, выявлять локализацию и распределение наночастиц в биообъектах

составная часть системы биомониторинга и системы оценки рисков и контроля безопасности наноматериалов для человека, животных и растений;

полезный инструмент, помогающий в разработке наносистем доставки лекарств.

Методы изучения наночастиц

Форма и размер наночастиц: методы сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), просвечивающей и растровой электронной микроскопии (ПЭМ, РЭМ);

Распределение наночастиц по размерам: СЗМ, ПЭМ, РЭМ, методы фракционирования в поперечном поле сил, гидродинамическая и эксклюзионная хроматография, ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние, масс-спектрометрия единичных частиц;

Химический состав наночастиц: ЯМР, фотоэлектронная спектроскопия, рентгеноструктурный анализ, электронная Оже-спектроскопия, атомно-абсорбционный анализ, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, аналитическая электронная микроскопия, включая энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДС) и спектроскопию характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ).

Методы изучения наночастиц

Установление структуры наночастиц: ПЭМ, РЭМ, СЗМ, малоугловое нейтронное рассеяние и рентгеноструктурный анализ.

Измерение поверхностного заряда: капиллярный электрофорез, методы определения зета-потенциала (электрокинетического потенциала).

Величина удельной поверхности наночастиц: BET-метод (метод Брунауэра-Эммета-Теллера),

Удельный объем пор на поверхности наночастиц: метод Баррета-Джойнера-Халенды (Barrett-Joyner-Halenda method, BJH).

**Ситуация с выбором методов анализа
значительно усложняется, если необходимо
установить присутствие и локализацию
экзогенных наночастиц в биологических
образцах**

Метод: просвечивающая электронная микроскопия

Объект: наночастицы золота (35 нм) в сыворотке крови

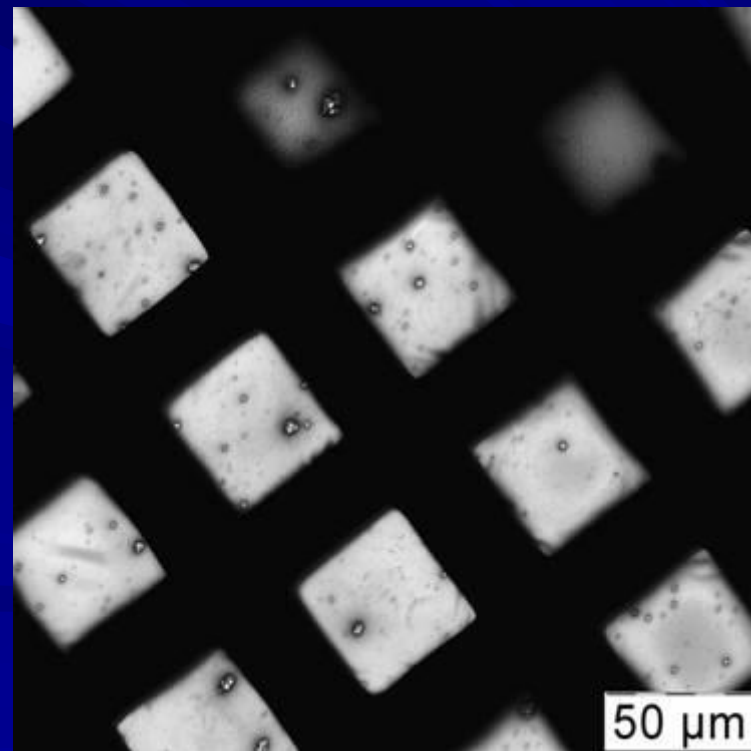
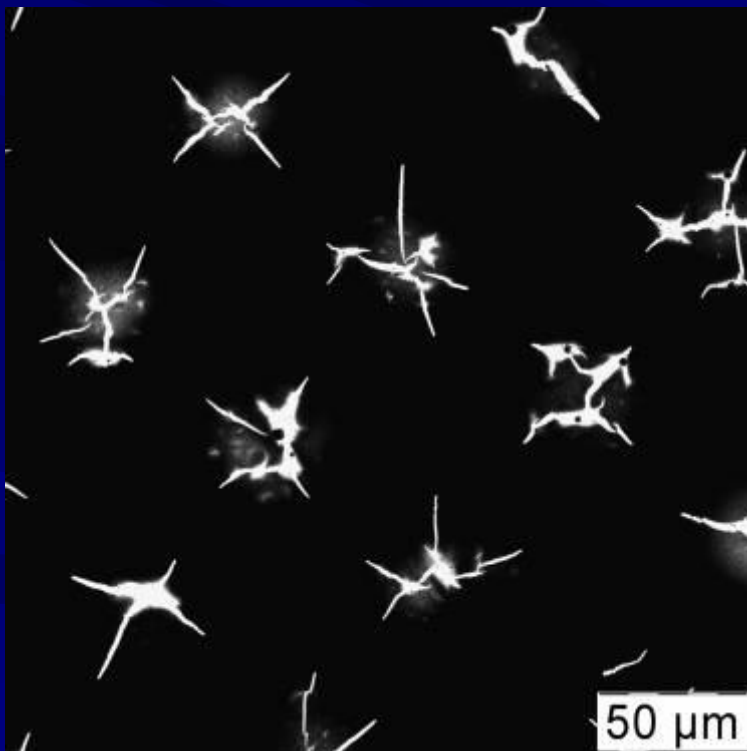
Проблема:

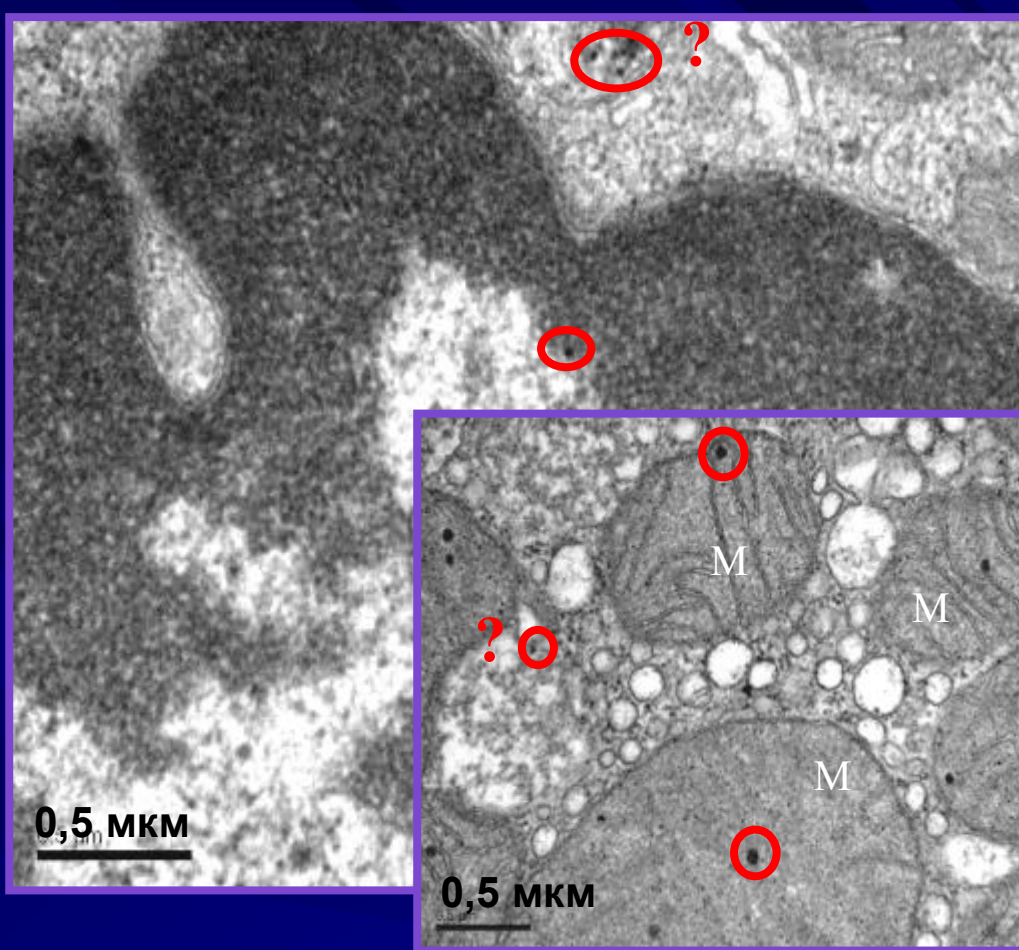
сыворотка при высыхании образует электронно-плотный слой большой толщины, полностью маскирующий наночастицы

Решение:

— пробоподготовка включает обработку образца различными ферментами;

— оптимизирована техника нанесения образца.

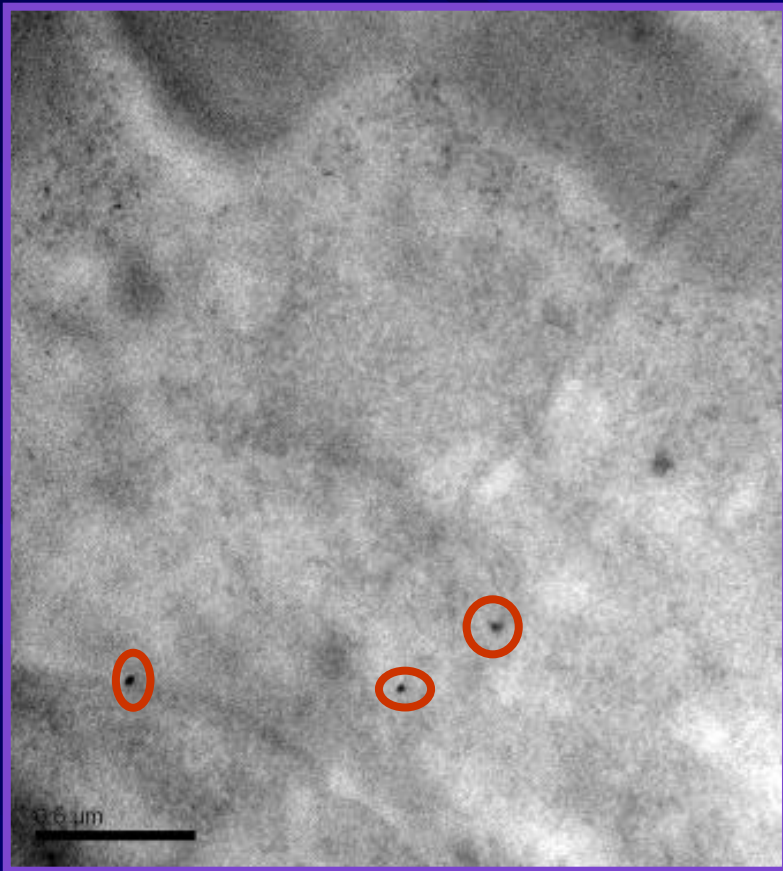




**наночастицы золота
(12 нм) в срезах ткани
лимфатического узла и
эпителия почки мыши**

Проблема

соли тяжелых металлов маскируют наночастицы, интенсивно окрашивая определенные внутриклеточные структуры и включения, например, соли кальция (в митохондриях- М)



**наночастицы золота (12 нм)
в срезе ткани эпителия почки**

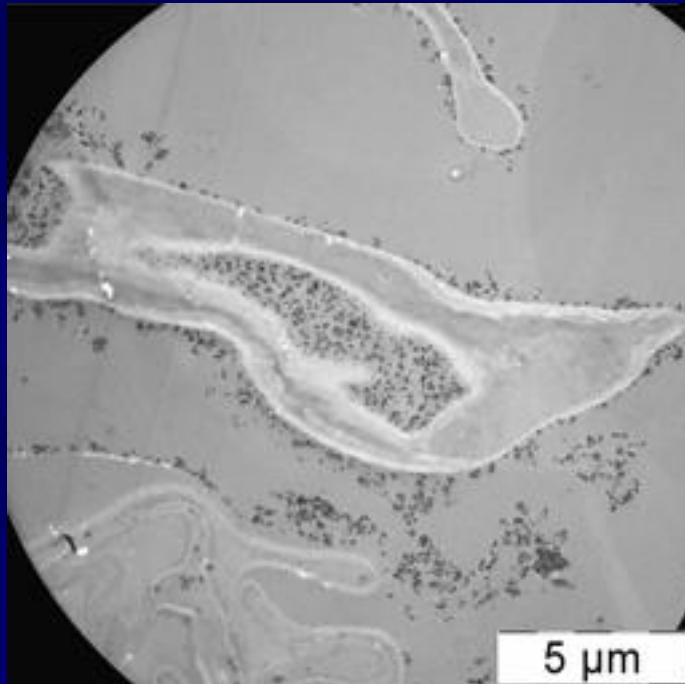
**для улучшения надежности и
достоверность выявления
наночастиц в срезах тканей и
клетках методом ПЭМ**

**исключить контрастирование с
применением**

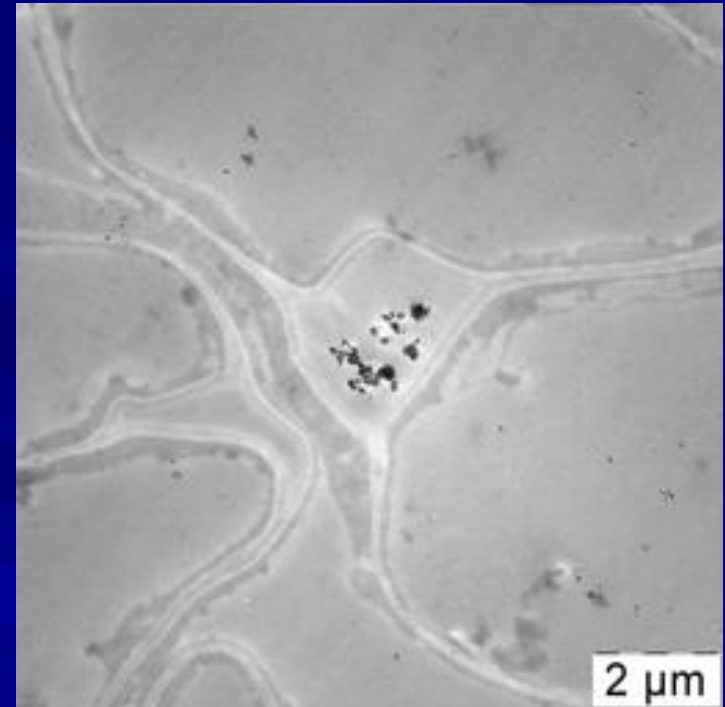
- OsO₄**
- уранила ацетата**
- цитрата свинца**

**Вместо фиксации и заливки
образца в эпоксидные блоки
можно использовать криостатные
ультратонкие срезы**

**Детекция наночастиц оксида алюминия (<35 нм) в проростках
риса. ПЭМ неконтрастированных срезов**



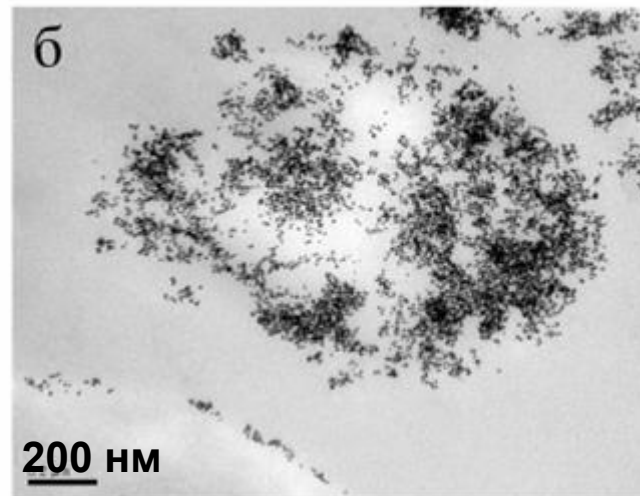
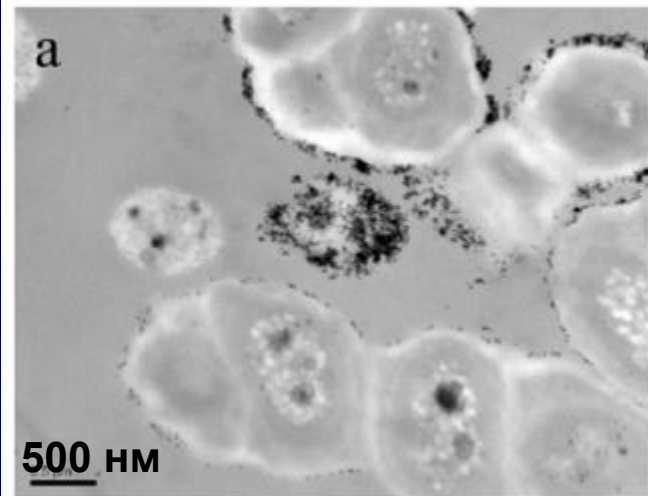
Корень



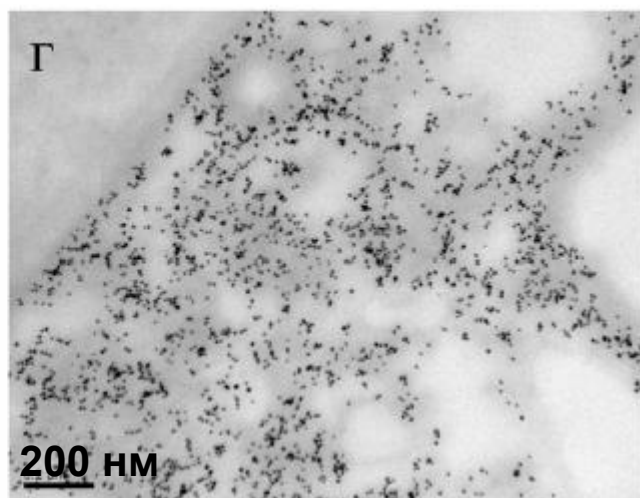
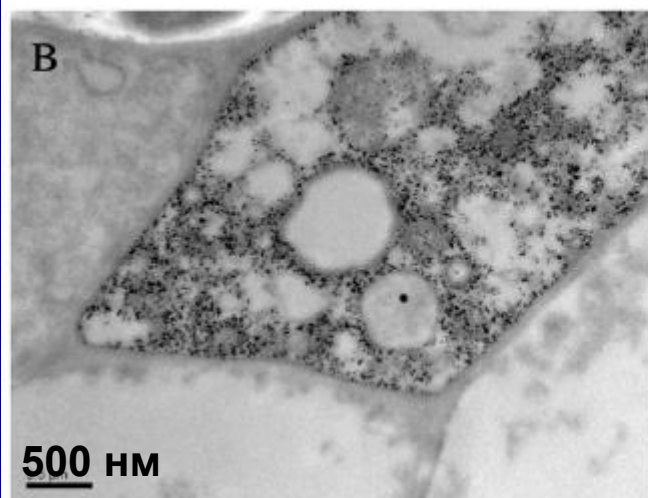
Лист

Детекция наночастиц золота (7 нм) в различных органах и тканях проростков риса. ПЭМ неконтрастированных срезов

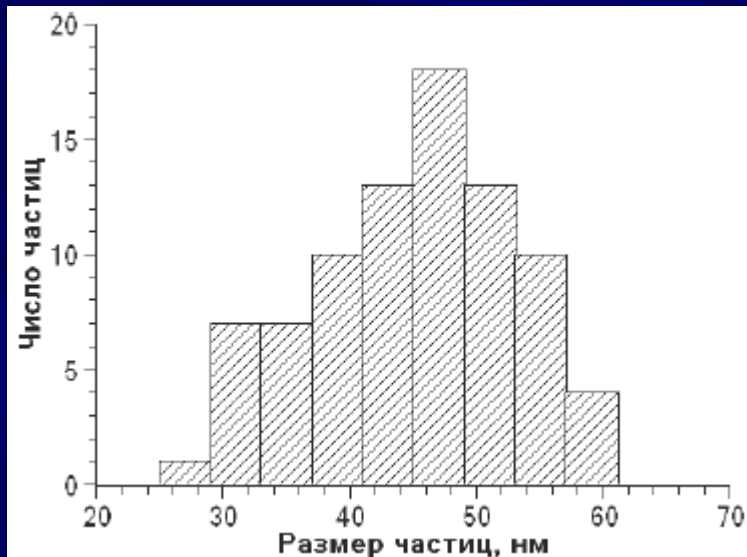
Клетки паренхимы колеоптиля



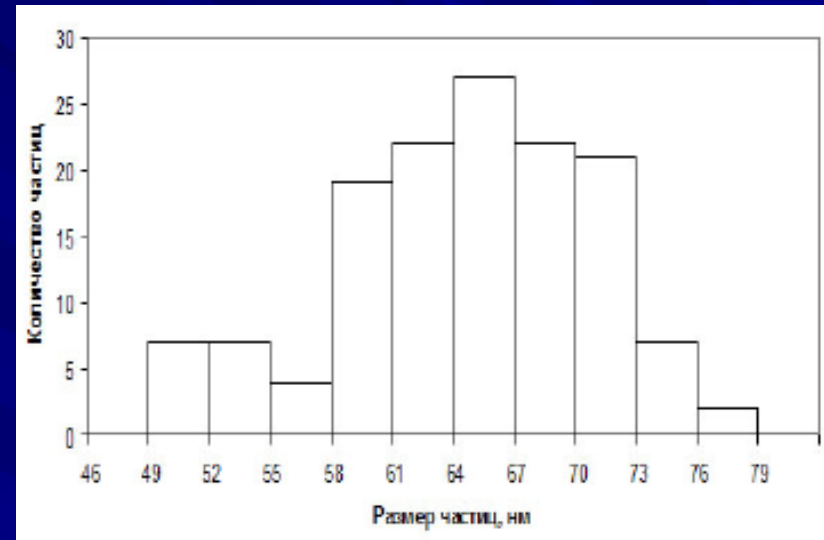
Обкладочные клетки в зоне перехода корня в стебель



Анализ распределения наночастиц золота по размерам с использованием ПЭМ

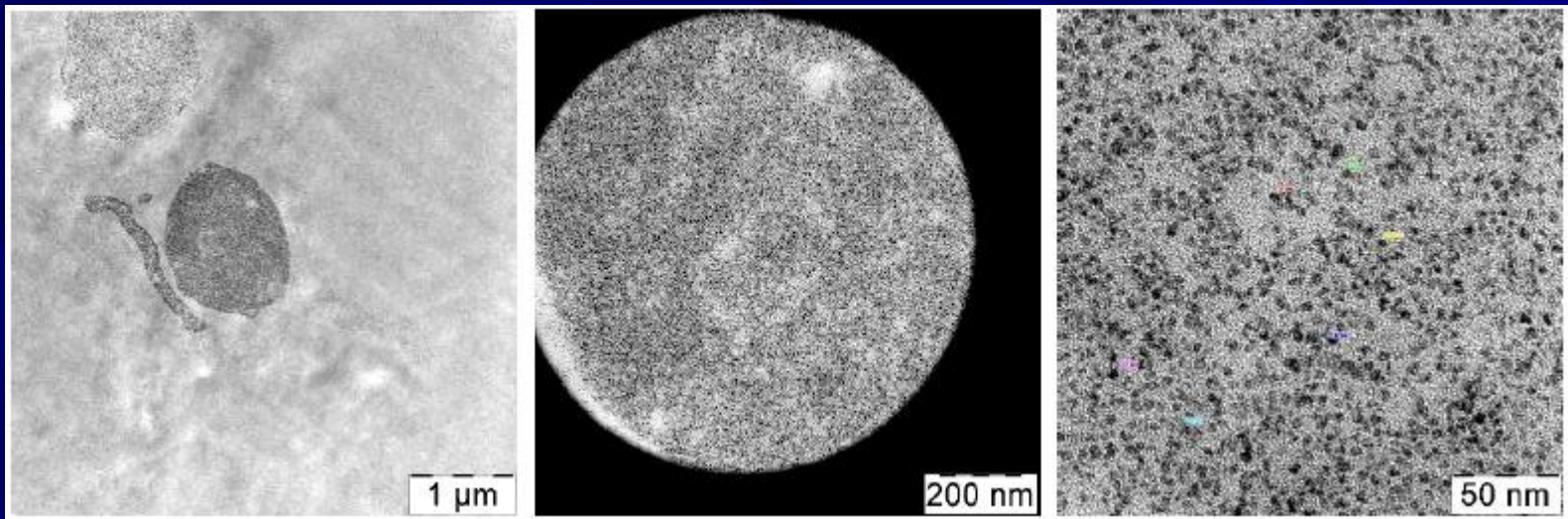


Исходный коллоид
Средний размер 45 ± 8 нм



Наночастицы в сыворотке крови
Средний размер 64 ± 15 нм

ПЭМ обладает высочайшим разрешением – лучше 1 нм, что дает возможность охарактеризовать размеры и форму наночастиц в биологических образцах



**Ультратонкий срез селезенки мыши.
Анализ выявляет присутствие скоплений электронно-
плотных наночастиц размером - 4-5 нм**

Распознавание наночастиц по характерному размеру и форме затруднено, если наночастицы способны агрегировать или частично растворяться в биологических средах

Сложности обнаружения и распознавания наночастиц возрастают по мере уменьшения их размера и плотности распределения в анализируемых биопробах

Необходимы:

- оптимизация пробоподготовки, улучшающая надежность и достоверность анализа
- вспомогательные методики, обеспечивающие идентификацию наночастиц

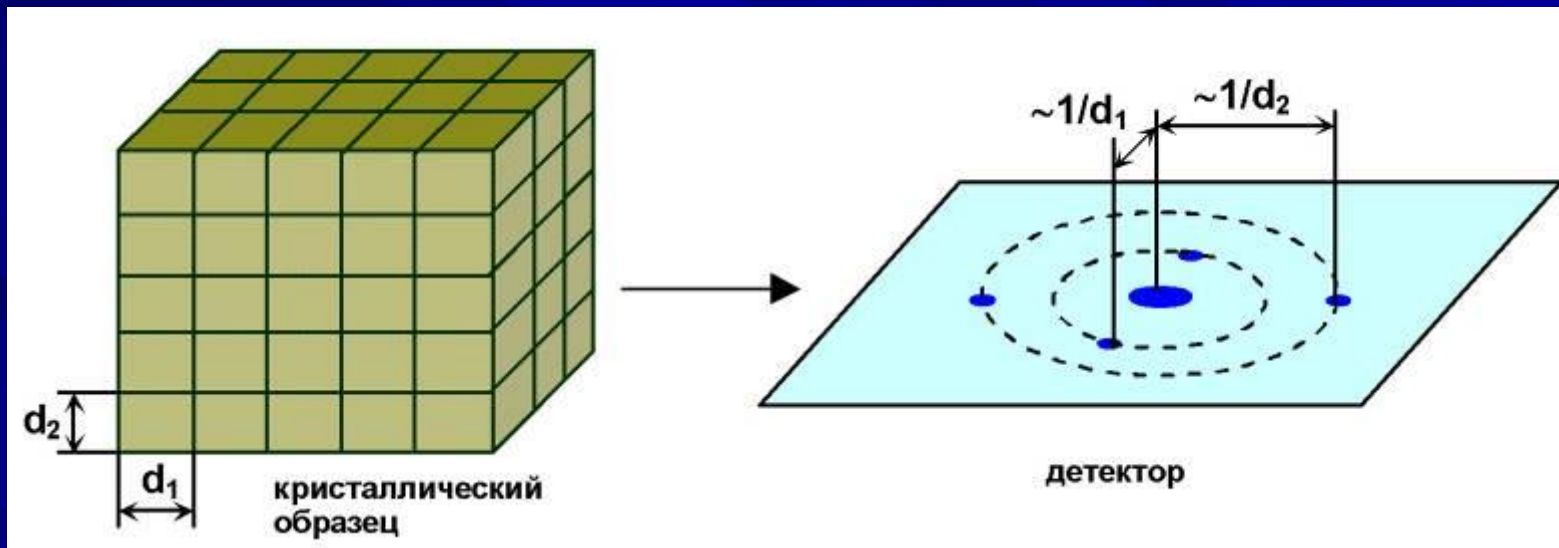
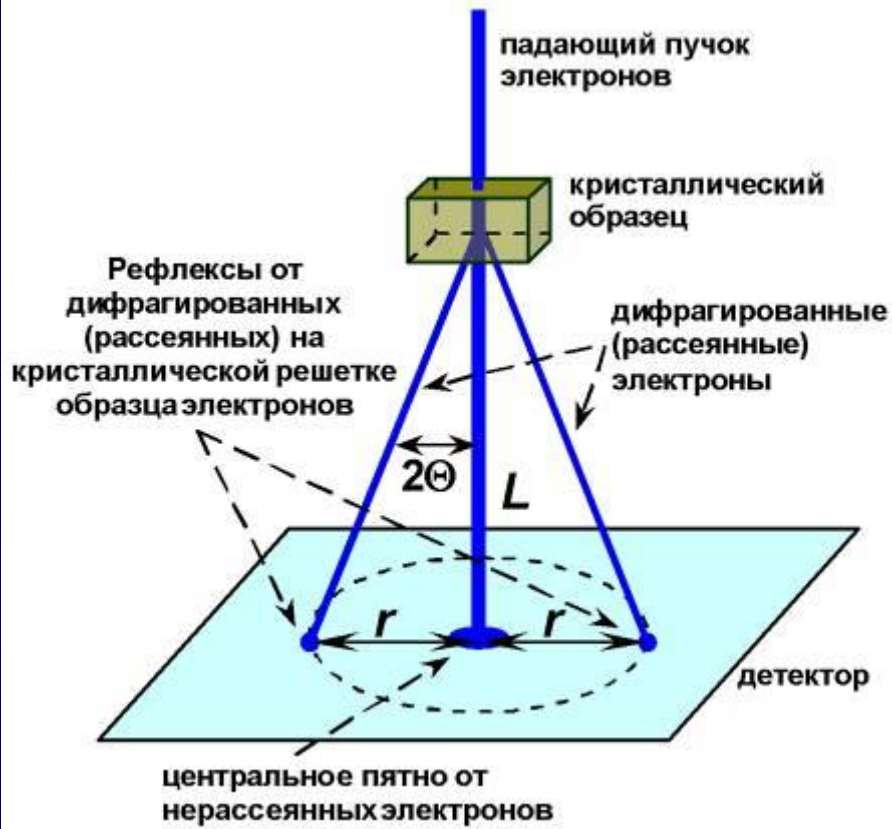
Принцип метода дифракции электронов

закон Вульфа—Брэгга:

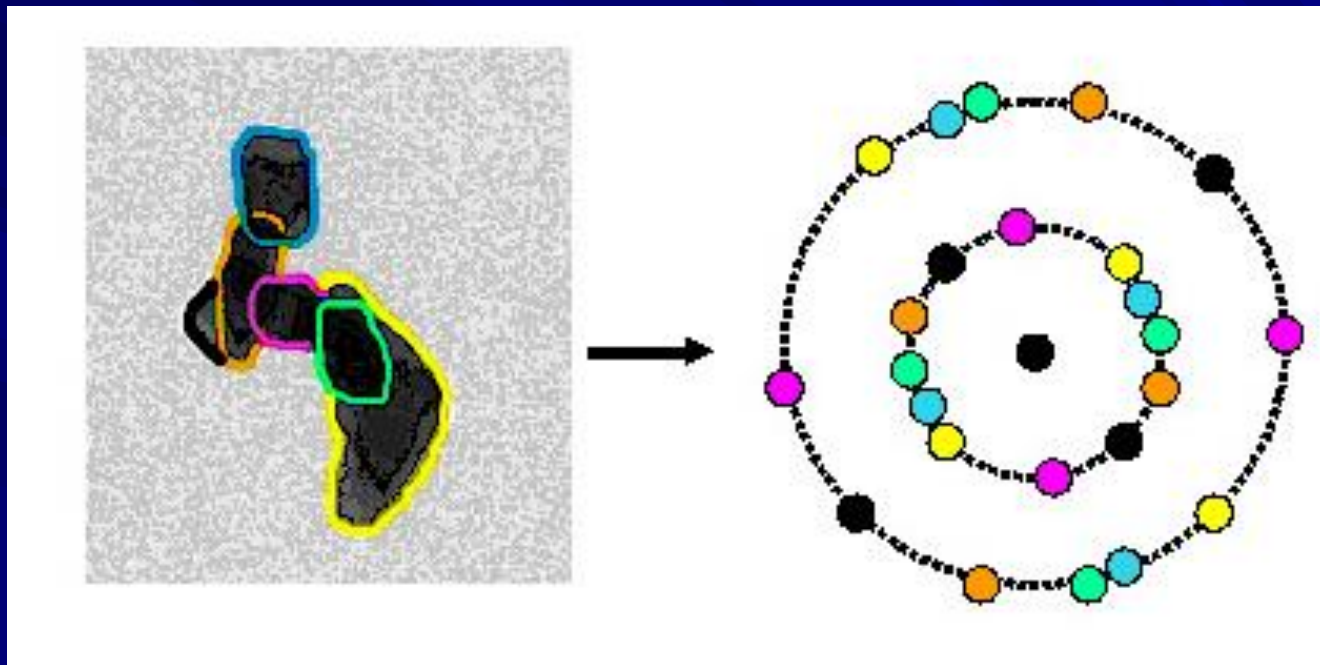
$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

$$d = L\lambda / r,$$

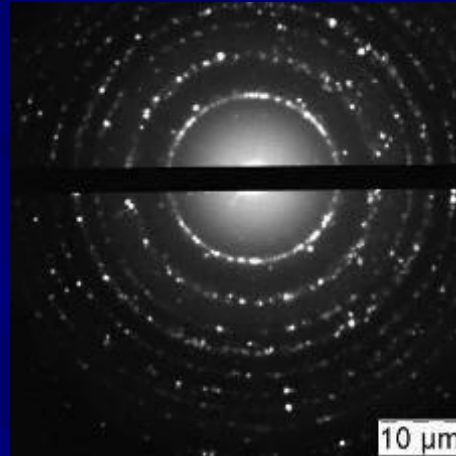
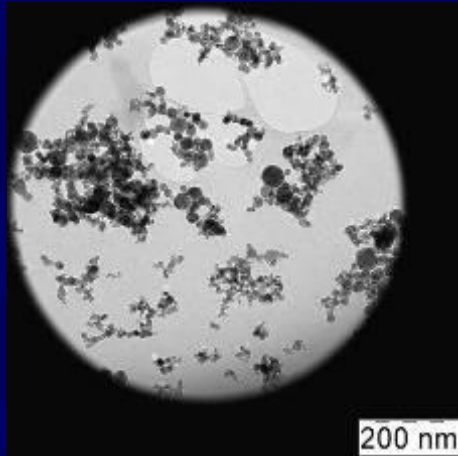
L — расстояние от образца до детектора.



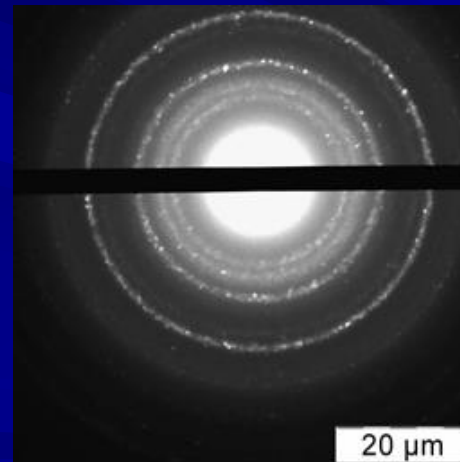
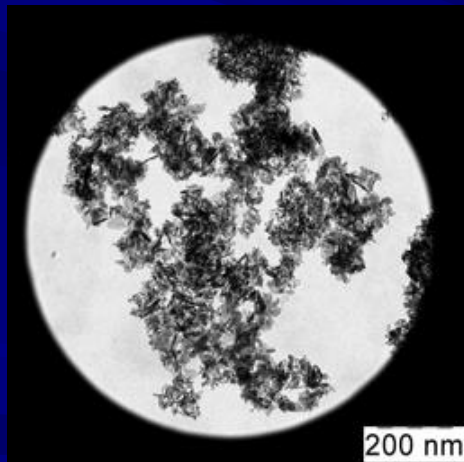
Картина дифракции электронов от нескольких нанокристаллов одинакового состава



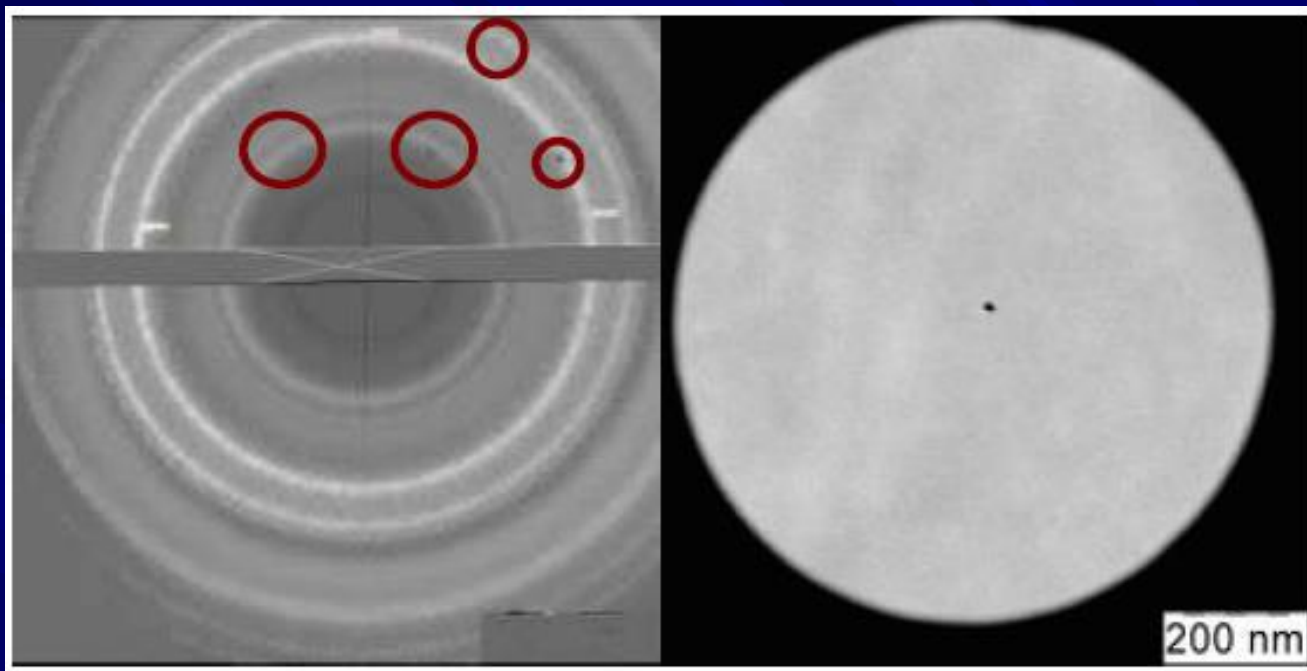
ПЭМ и метод дифракции электронов



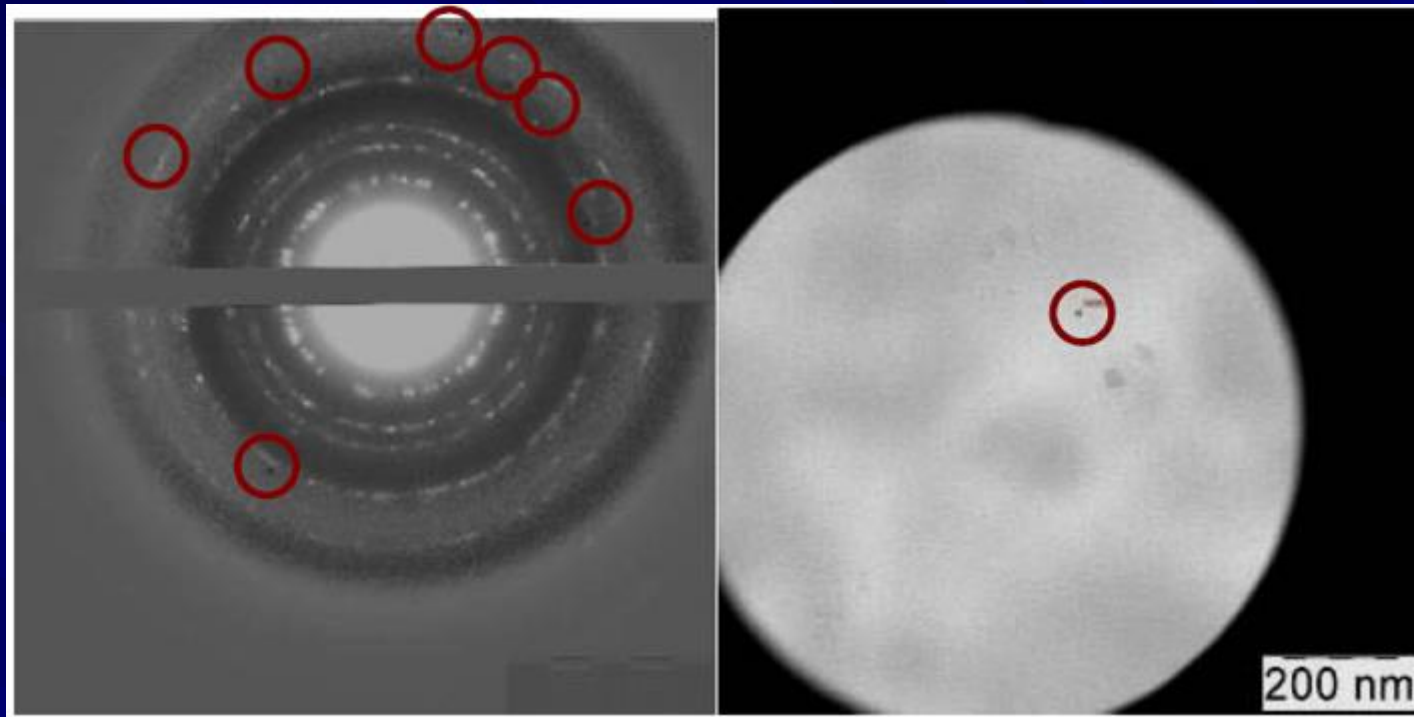
Наночастицы оксида титана



Наночастицы оксида алюминия

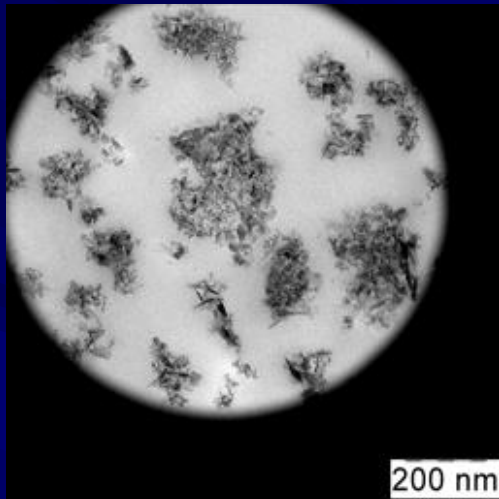


Наложение электронограммы наночастицы золота (35 нм) в клетке лимфатического узла на электронограмму стандарта - золотой пленки . Четыре из пяти рефлексов наночастицы ложатся на «кольца» стандарта.

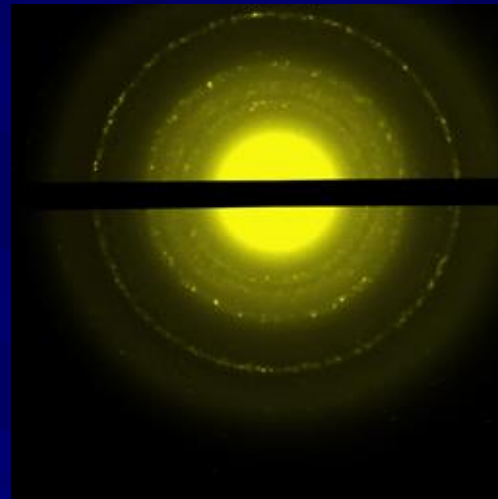


Наложение электронограммы наночастицы диоксида титана (25 нм) в клетке A431 на электронограмму стандарта – порошка наночастиц диоксида титана. Большинство рефлексов наночастицы ложатся на «кольца» стандарта.

**ПЭМ в комбинации с методом дифракции электронов.
Выявление и идентификация наночастиц оксида алюминия в
проростках риса**



**ПЭМ клеток корня
риса**

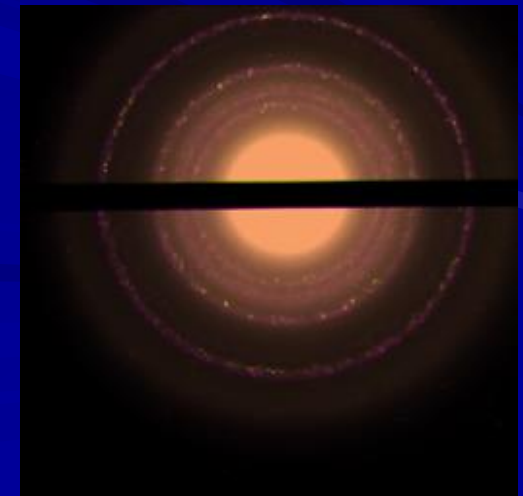


**ДЭ на наночастицах в
исследуемом образце**

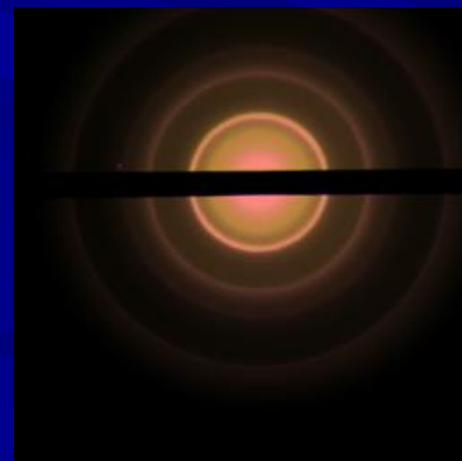
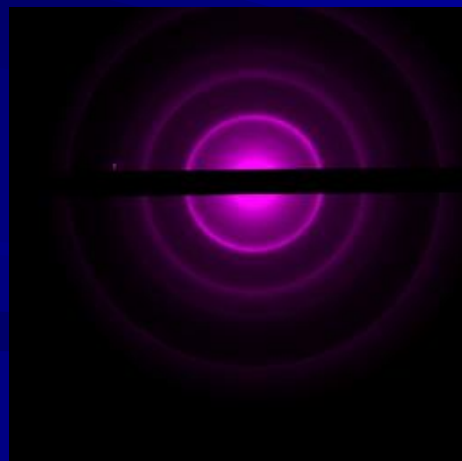
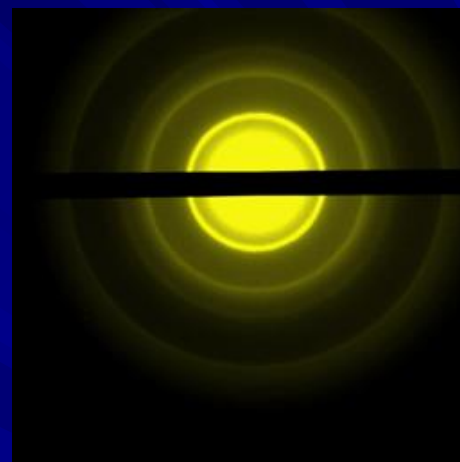
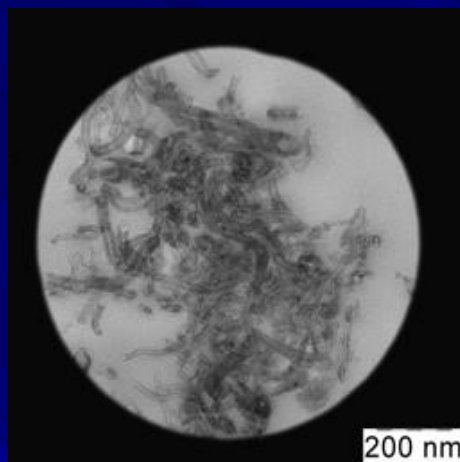
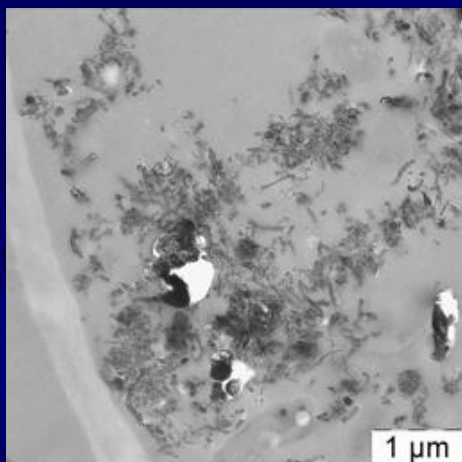


**Электроннограмма
исходного порошка
наночастиц**

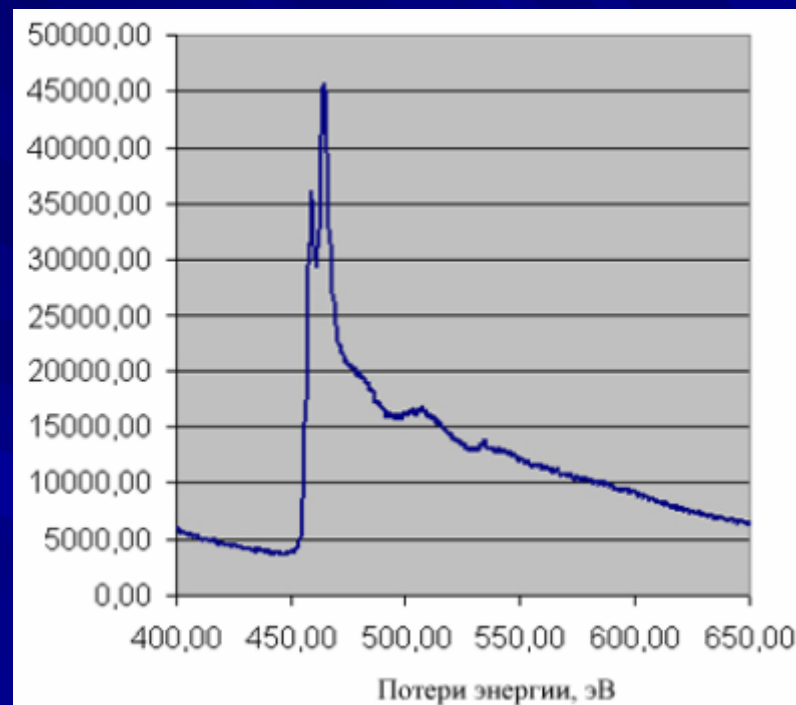
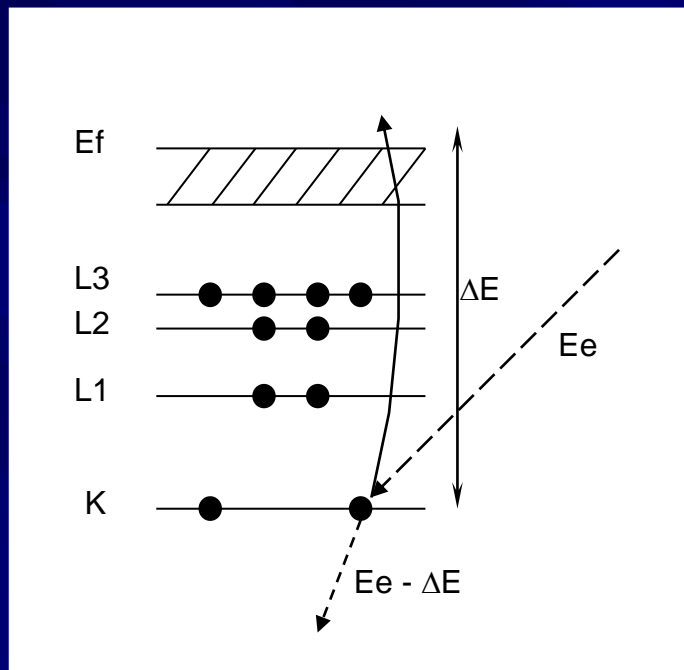
**Наложение двух
электроннограмм**



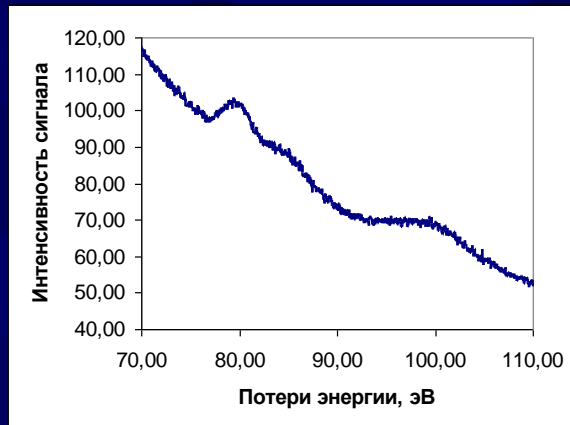
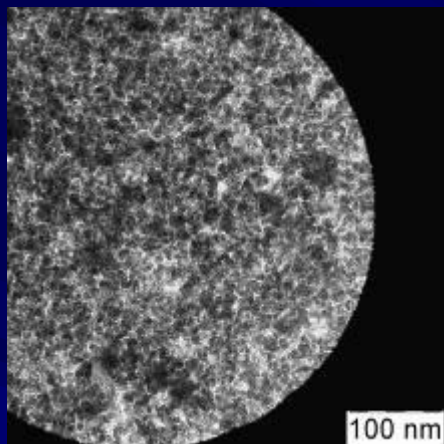
Выявление и идентификация многостенных углеродных нанотрубок в листе проростка эспарцета



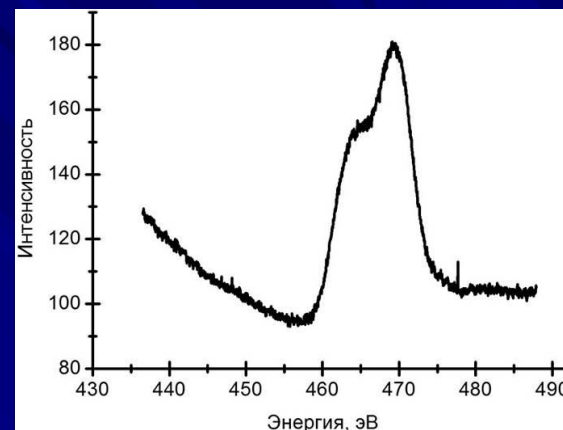
Принцип спектроскопии характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ) electron energy loss spectroscopy (EELS)



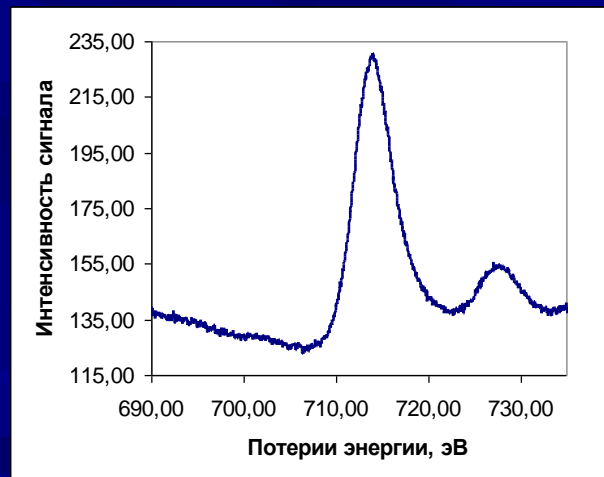
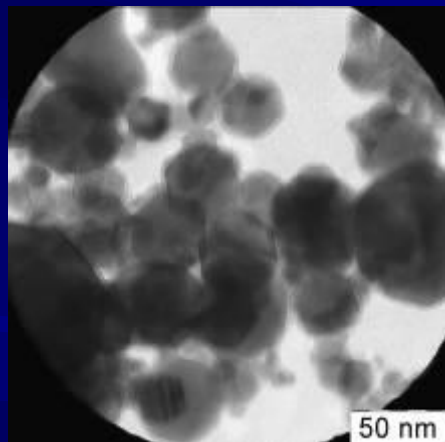
ПЭМ и измерение спектров ХПЭЭ в заданных областях



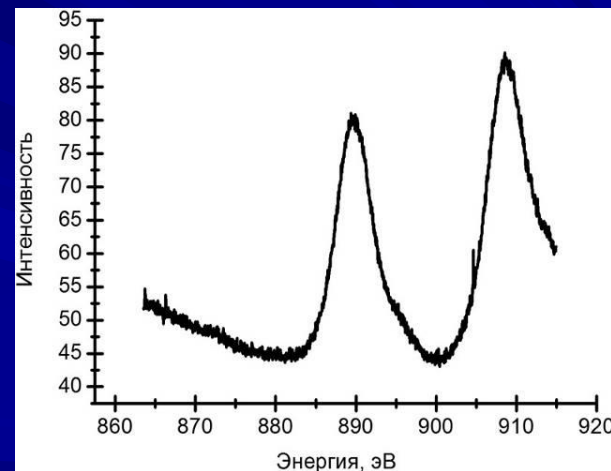
СХПЭЭ наночастиц суспензии Al_2O_3



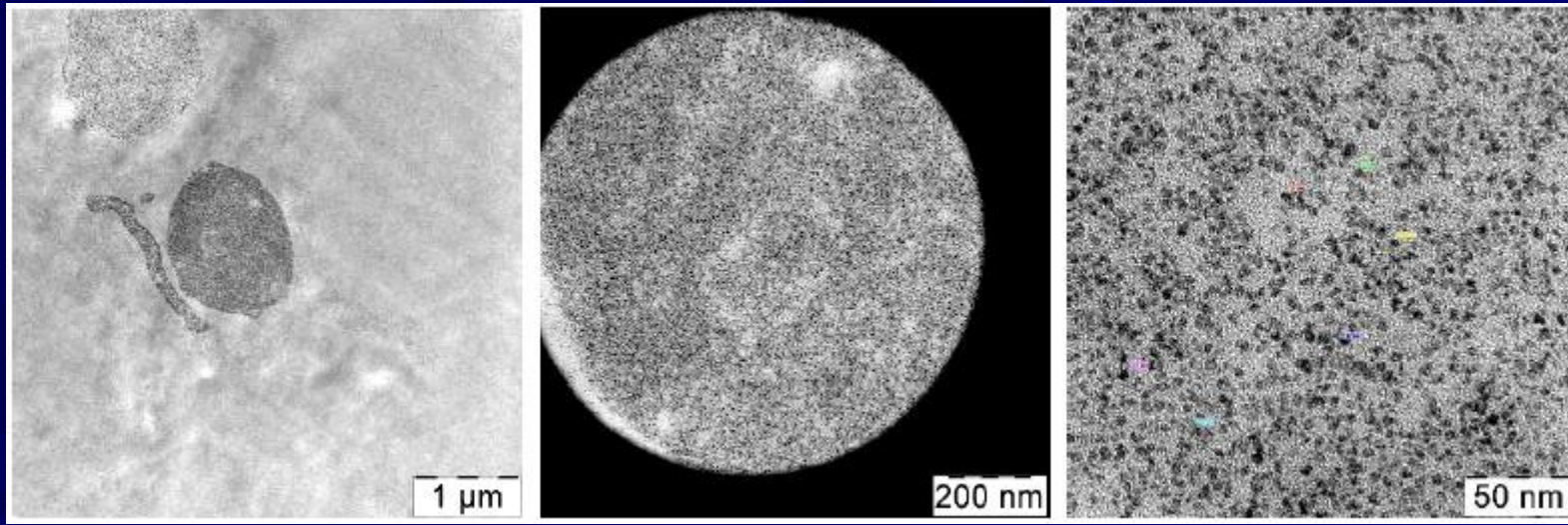
СХПЭЭ наночастиц TiO_2



СХПЭЭ наночастиц порошка Fe_2O_3

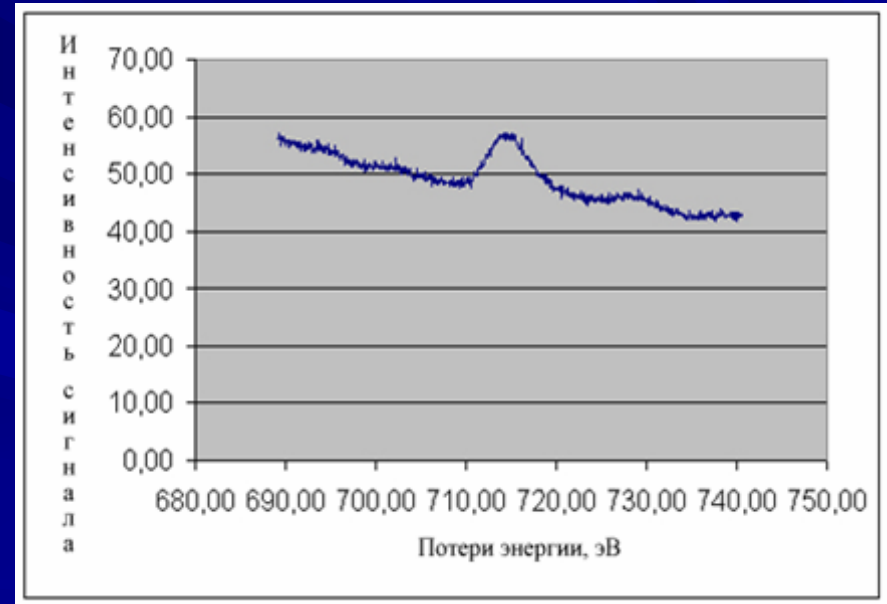


СХПЭЭ наночастиц CeO_2



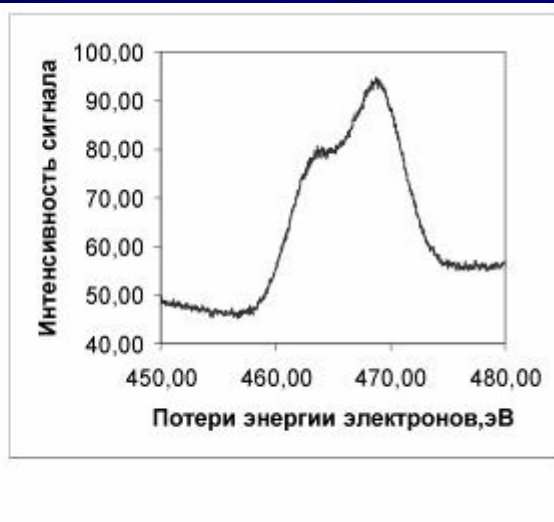
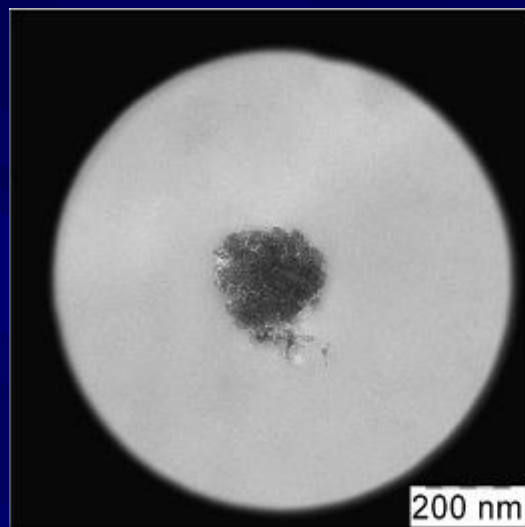
**Ультратонкий срез селезенки
мыши. Оптимизированная
процедура пробоподготовки:
без контрастирования. Размер
наночастиц - 4-5 нм.**

**Анализ спектров ХПЭЭ показывает,
что в состав наночастиц входит
железо**

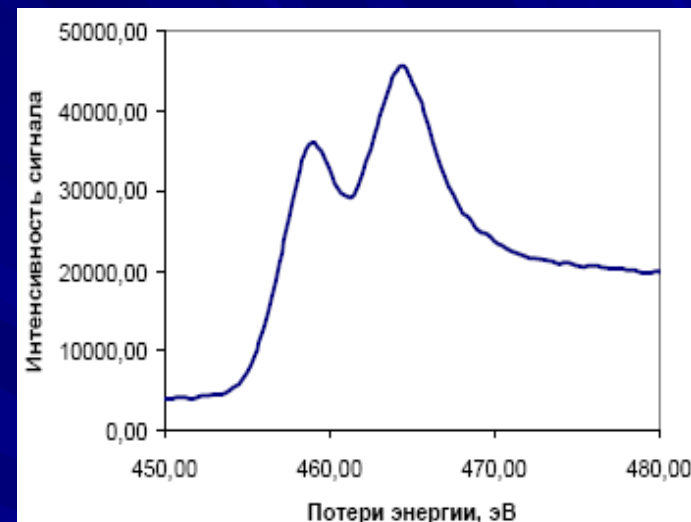


**Наблюдаемые наночастицы – результат деградации
гемоглобина и запасания железа в форме ферритина.**

Агрегаты наночастиц диоксида титана в клетках эукариот

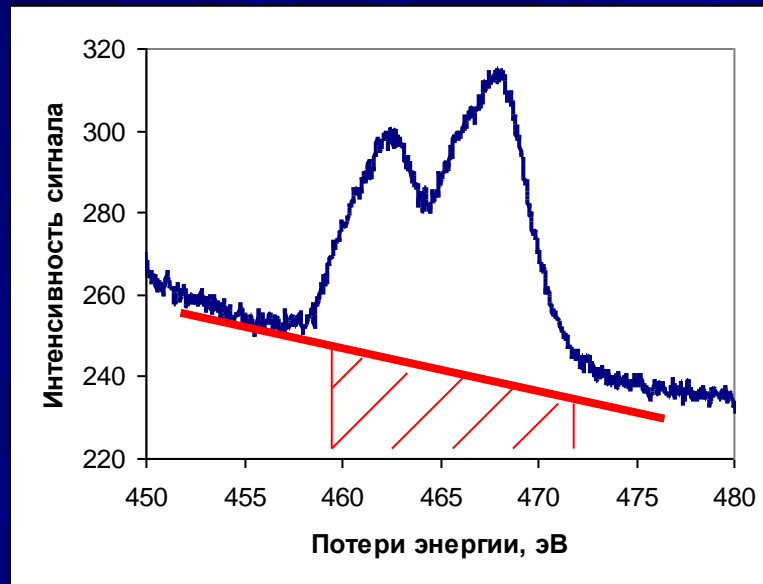
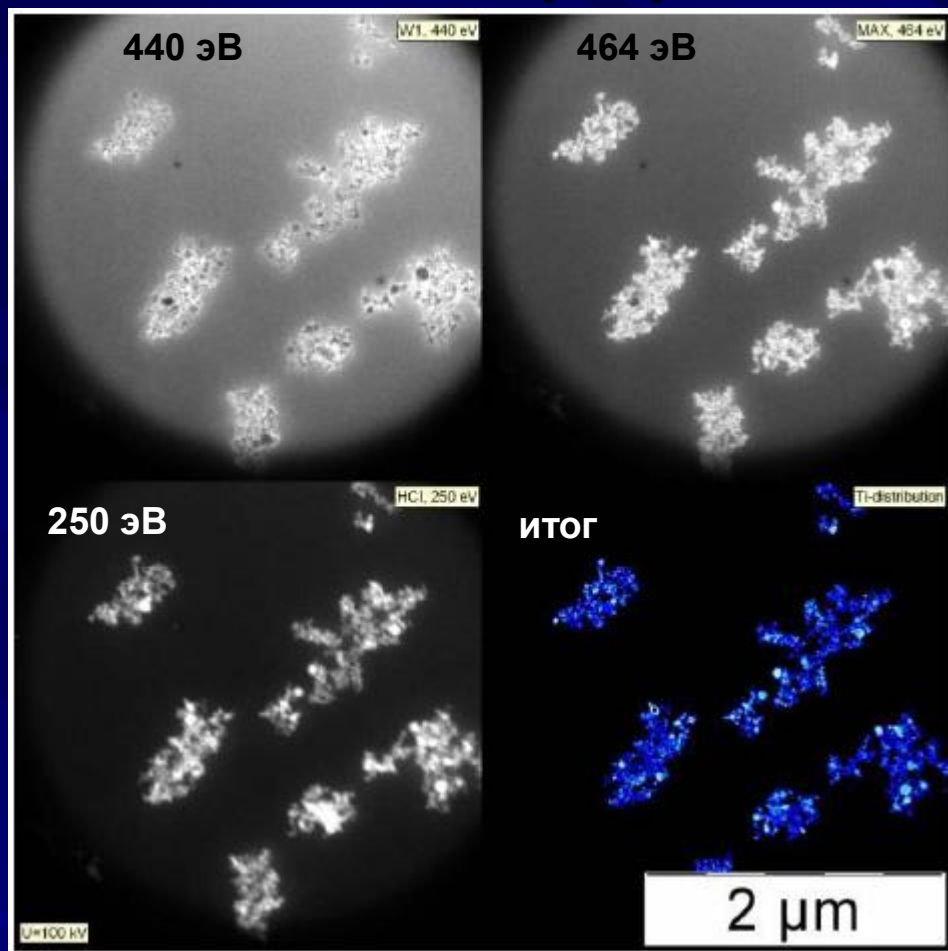


спектр ХПЭЭ снятый с области, ограниченной диафрагмой



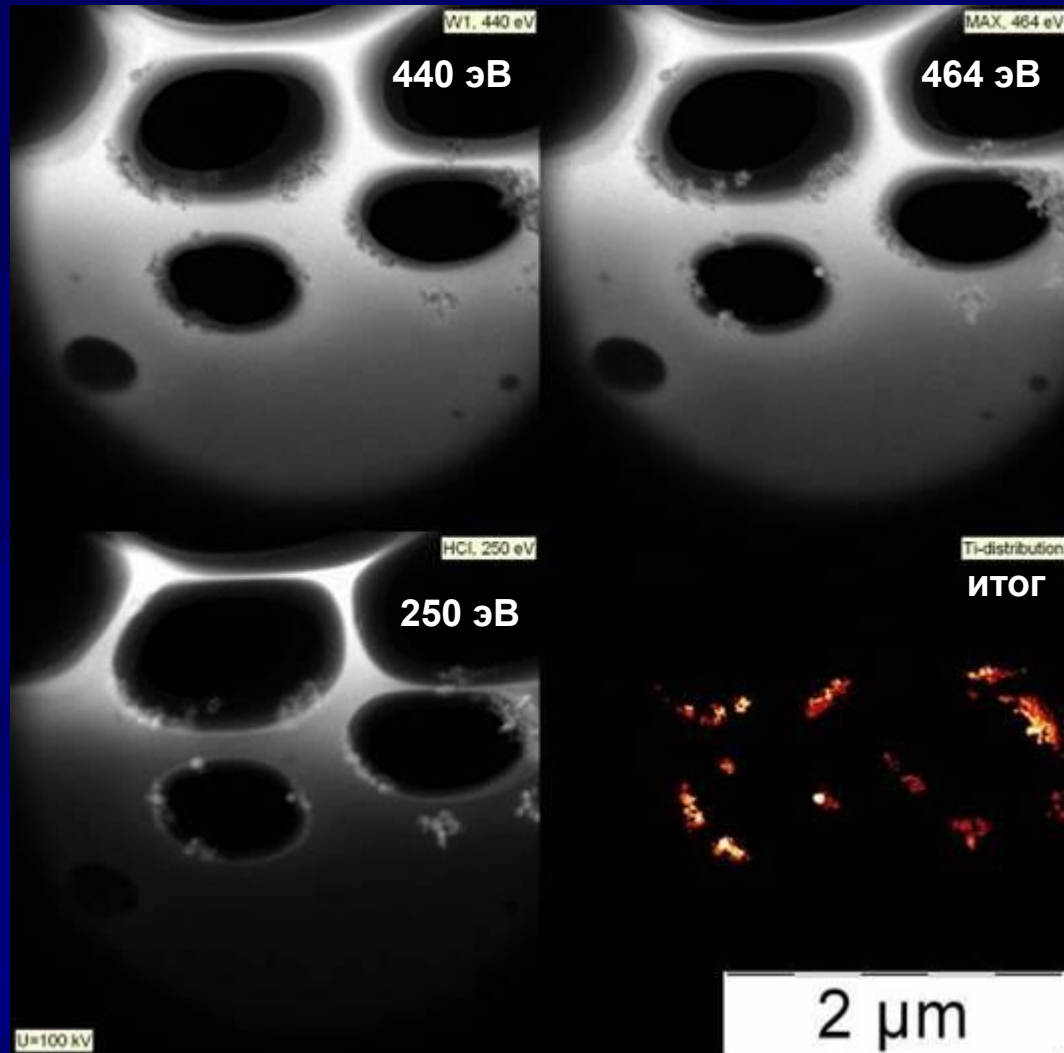
Спектр ХПЭЭ титана из атласа спектров

Элементное картирование на основе метода СХПЭЭ



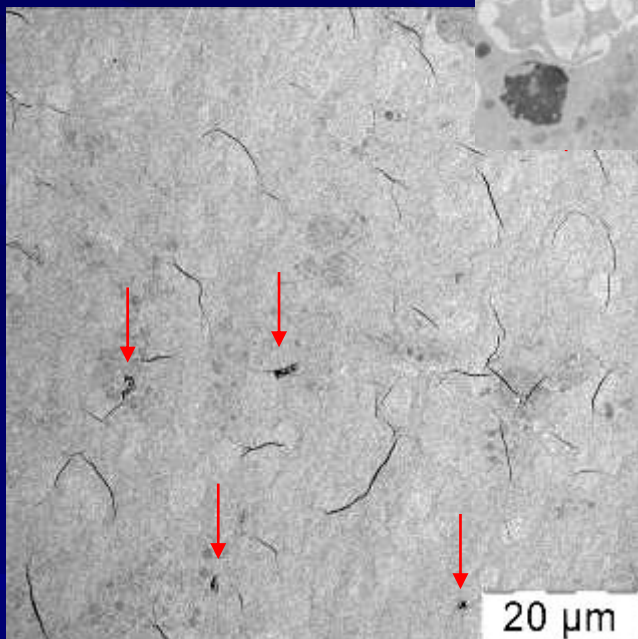
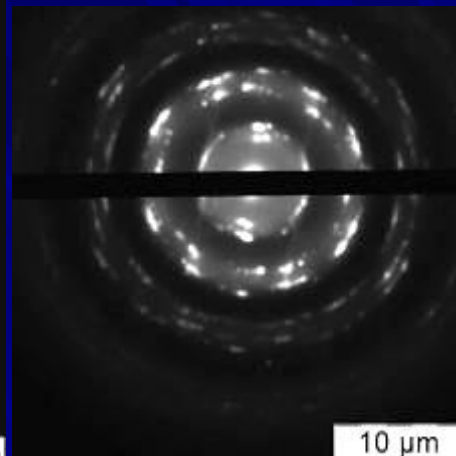
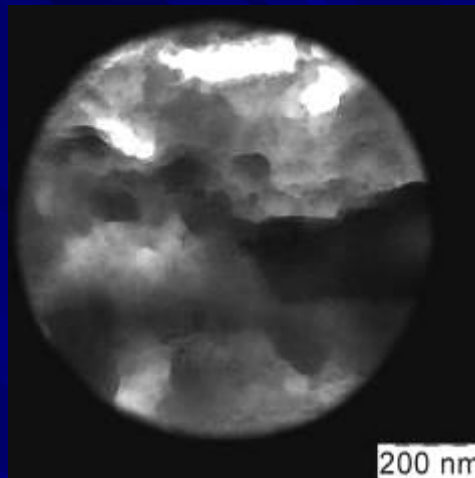
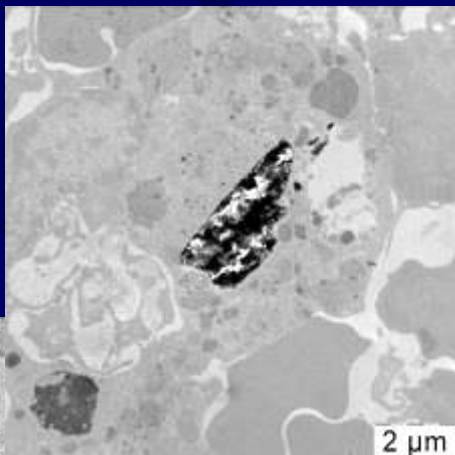
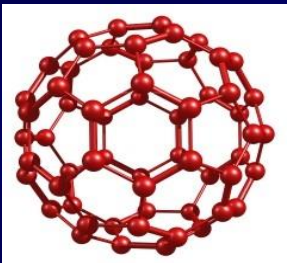
Агрегаты наночастиц TiO_2 в плазме крови

Элементное картирование на основе метода СХПЭЭ

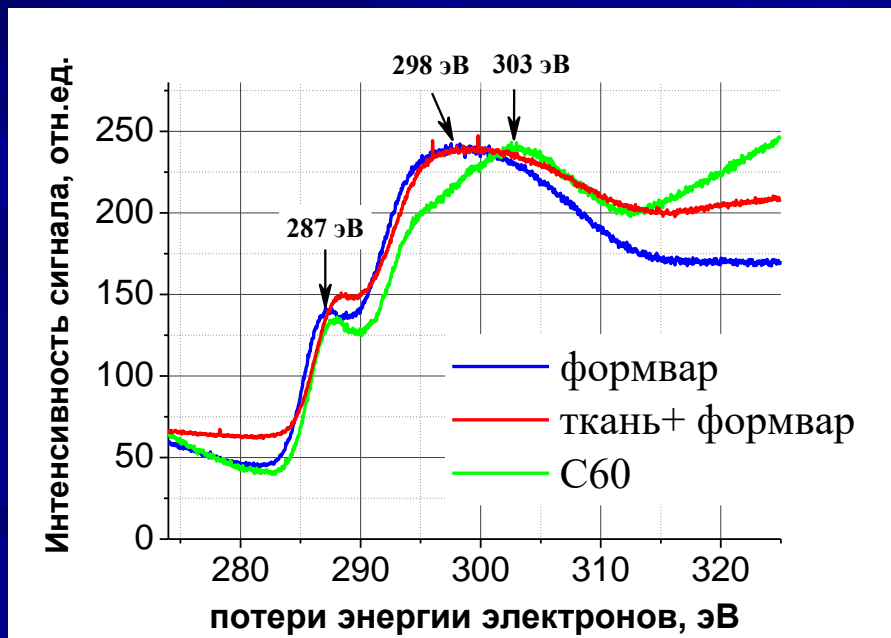


Агрегаты наночастиц TiO₂ в плазме крови

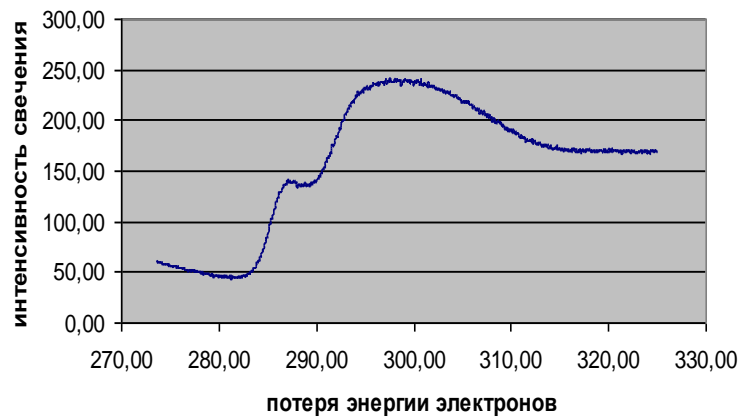
Выявление и идентификация агрегатов фуллерена



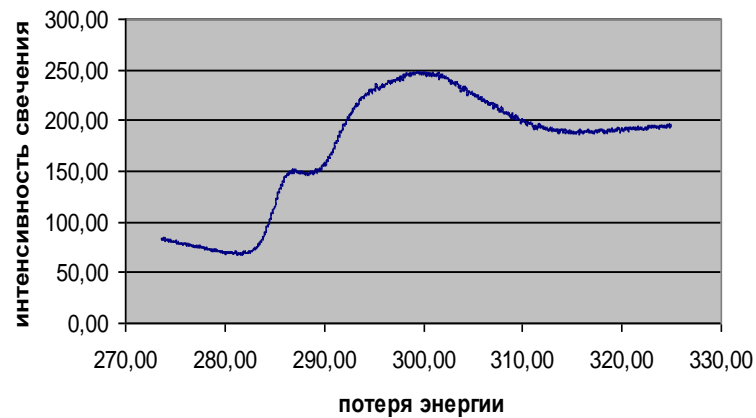
**Агрегаты фуллерена
в селезёнке.
Контрастирование
тетраокисью осмия**



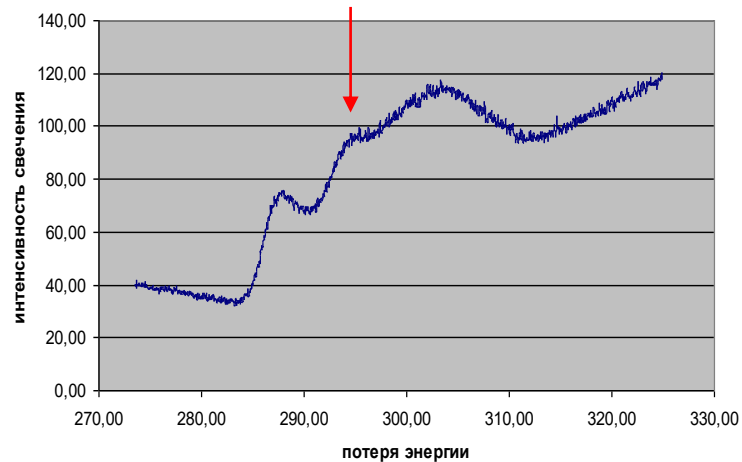
Углерод в формваровой подложке



Углерод в биологическом образце



Сухой порошок фуллеренов



Методом СХПЭЭ лучше всего регистрируются элементы, характеристические пики которых расположены в диапазоне от 30 до 1000 эВ

С ростом порядкового номера элемента увеличивается диапазон энергии, в котором должен работать энергетический фильтр (область измерения энергии неупругого рассеяния)

Метод СХПЭЭ не применим для:

P, S, Cl, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Sr, Y, Zr, Nb, Mo,
Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In