

УДК 544.77.022 + 577.112

МЕТОДЫ АНАЛИЗА НАНОЧАСТИЦ И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР TEM И DLS

ТРУТНЕВ Юрий Анатольевич

инженер

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук
г. Москва, Россия

Исследования белковой короны наночастиц опираются на TEM и DLS. TEM визуализирует корону, искажая нативную структуру. DLS измеряет частицы в растворе, но гидродинамический диаметр неточно отражает тонкий белковый слой. Мета-анализ показывает рост размера частицы на ~50% (15–18 нм). Для точной картины необходим синергетический подход, сочетающий оба метода.

Ключевые слова: наночастицы, белковая корона, просвечивающая электронная микроскопия (TEM), динамическое светорассеяние (DLS), гидродинамический диаметр, характеристизация наноматериалов.

Введение

Современная нанотехнология располагает обширным арсеналом методов для определения размеров наночастиц, каждый из которых основан на уникальных физических принципах. Среди наиболее распространенных — атомно-силовая микроскопия (AFM), позволяющая получать трехмерные изображения поверхности; трекинг-анализ наночастиц (NTA, Nanoparticle Tracking Analysis), который визуализирует и отслеживает броуновское движение отдельных частиц; дифференциальная центрифужная седиментация (DCS, Differential Centrifugal Sedimentation), разделяющая частицы по размеру в градиенте плотности под действием центробежной силы; и, наконец, анализ частиц по подвижности в электрическом поле (SMPS, Scanning Mobility Particle Sizing), классифицирующий частицы по их электрической подвижности.

Несмотря на это многообразие методов, в научной практике, особенно в исследованиях, затрагивающих взаимодействие наночастиц с биологическими молекулами, такими как белки, доминируют два метода: просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ/ТЕМ, Transmission Electron Microscopy) и динамическое светорассеяние (ДСР/DLS, Dynamic Light Scattering). Их популярность обусловлена широкой доступностью и отработанностью методик, однако между данными, получаемыми этими методами, существуют систематические расхождения, что неоднократно отмечалось в литературе [12]. Эти различия проистекают из фундаментально разных принципов измерения, что делает критически важным понимание их преимуществ и ограничений.

Просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ): Визуальный стандарт и его ограничения

Среди методов, предназначенных для характеристики, авторы часто отдают предпочтение ТЕМ-микроскопии, считая ее «золотым стандартом» визуализации. Высокое разрешение метода (порядка долей нанометра) позволяет не только точно измерить размер ядра наночастицы, но и визуализировать его форму, кристалличность и даже в некоторых случаях элементы поверхностной структуры.

Тем не менее использование ТЕМ сопряжено с рядом существенных ограничений и методологических трудностей. Помимо высокой стоимости самого оборудования и необходимости содержания сложной инфраструктуры (например, вакуумных систем), ключевым недостатком ТЕМ является требование к подготовке образца. Анализ проводится в условиях высокого вакуума, что вынуждает исследователей наносить суспензию наночастиц на подложку и полностью высушивать ее [11]. Помимо прочего процесс сушки может сильно видоизменять образец: наночастицы могут агломерироваться, образуя крупные конгломераты, не присутствовавшие в исходном растворе, либо, наоборот, первоначальные непрочные кластеры могут разрушаться. Таким образом, ТЕМ показывает наночастицы не в их нативном, «рабочем» состоянии в растворе, а в статичной, высушенной форме.

Следующим критически важным ограничителем является проблема репрезентативности. ТЕМ-фотография захватывает лишь чрезвычайно малую часть образца (менее 0,1%). Следовательно, статистическая значимость данных, особенно для крупных или редких частиц, оказывается под вопросом, так как малая выборка может неадекватно отражать полный набор частиц в образце [5]. Несмотря на эти ограничения, ТЕМ обладает неоспоримым и уникальным преимуществом: способностью детектировать образование белкового монослоя (короны) на поверхности наночастиц даже в том случае, когда они включены в состав крупных агрегатов [1; 9]. Это позволяет напрямую, визуально подтверждать факт адсорбции белка, что недостижимо для многих других методов.

Динамическое светорассеяние (DLS): Анализ в растворе и скрытые сложности

Метод DLS, со своей стороны, предлагает принципиально иной подход и обладает комплементарным набором достоинств. Его основными практическими преимуществами являются относительно низкая стоимость проведения измерений, простота подготовки образца и высокая скорость анализа. Важнейшим методологическим преимуществом DLS, в сравнении с ТЕМ, является то, что измерения проводятся непосредственно в коллоидном растворе, без стадии высушивания, а это позволяет изучать наночастицы в условиях, близких к физиологическим. Кроме того, метод позволяет получить усредненные данные по всему объему образца, охватывая миллиарды частиц, что обеспечивает высокую статистическую достоверность.

Тем не менее, DLS демонстрирует и значительные недостатки. Метод показывает большую вариабельность результатов, даже для таких стандартных систем, как силикатные частицы [3]. Его точность резко падает в полидисперсных системах, и он плохо определяет размер частиц в растворах с высоким индексом полидисперсности ($PDI > 0,2-0,3$) [10].

Главная же проблема, которую зачастую упускают из виду исследователи, кроется в самой природе измеряемого параметра. DLS определяет не фактический геометрический диаметр частицы, а ее гидродинамический диаметр –

расчетную величину, которая соответствует диаметру сферического объекта, диффундирующего в жидкости с той же скоростью, что и исследуемая частица. Скорость диффузии сильно зависит не только от размера и геометрии самой частицы, но и от параметров среды (вязкости, температуры), а также от состояния поверхности частицы (наличия сольватной оболочки, заряда, адсорбированных молекул). Именно поэтому рентгеноструктурный анализ, определяющий физические размеры кристаллической решетки, зачастую дает иные значения, чем DLS [2].

Этот аспект становится критически важным при изучении взаимодействий «наночастица-белок». Например, гидродинамический диаметр белка лизоцима в чистой воде оказывается меньше, чем в солевых буферах [7], и меньше размера, определенного методом рентгеноструктурного анализа [2]. Данная особенность DLS была отмечена в некоторых работах [4,; 8]. В контексте формирования белковой короны гидродинамический диаметр образующегося комплекса зависит не только от толщины адсорбированного белкового слоя, но и от его жесткости и плотности [4]. В то же время метод исключительно чувствителен к присутствию крупных агрегатов в образцах [6], он, как правило, не способен предоставить прямую информацию о формировании мономолекулярного слоя на поверхности наночастицы, так как этот тонкий слой вносит незначительный вклад в общий гидродинамический диаметр по сравнению с ядром самой наночастицы.

Синергия методов и количественный анализ данных

Учитывая комплементарные, но взаимодополняющие преимущества и недостатки TEM и DLS, их комбинация становится стандартной практикой для получения всесторонней, надежной и воспроизводимой информации о системе «наночастица-белок». Статистически значимые гидродинамические данные от DLS, визуально подтвержденные с помощью TEM, создают полную картину происходящих процессов в образцах.

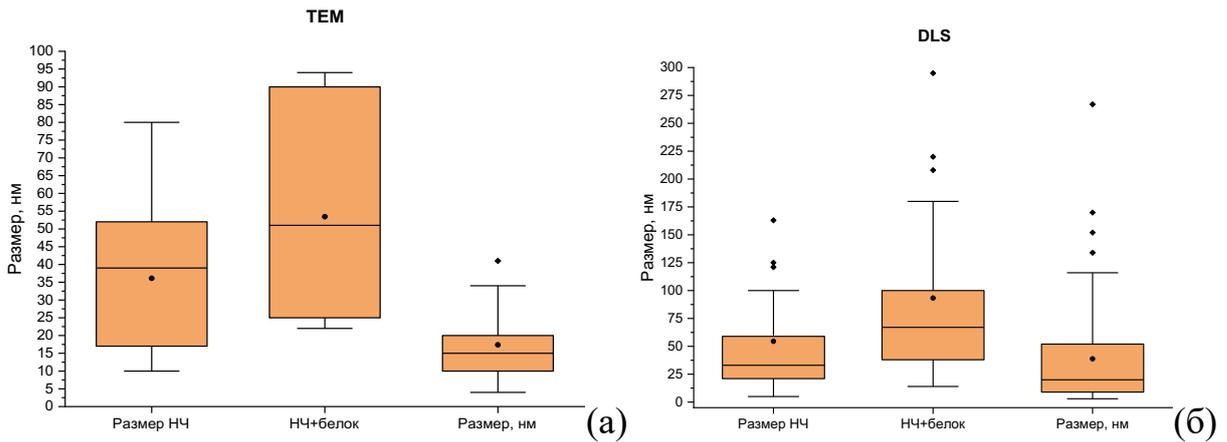


Рисунок 1. Зависимость толщины белковой короны от размера наночастиц. (а) TEM-анализ изменения размеров наночастиц после взаимодействия с белком. (б) DLS-анализ изменения гидродинамического диаметра наночастиц после взаимодействия с белком.

На рисунке 1а и 1б представлен сравнительный анализ, позволяющий разграничить толщину плотной белковой короны (рисунок 1а, данные TEM) и размер крупных агрегатов «наночастица-белок» (рисунок 1б, данные DLS). Согласно нашим расчетам, медианный размер исследованных наночастиц составляет около 33–39 нм. После взаимодействия с белками медианный размер комплекса «наночастица-белок» возрастает до 51–55 нм. Таким образом, можно отметить, что образование белковой короны приводит к увеличению размера частицы в среднем на ~50%. Простые арифметические вычисления позволяют оценить среднюю толщину белковой короны в 15–18 нм.

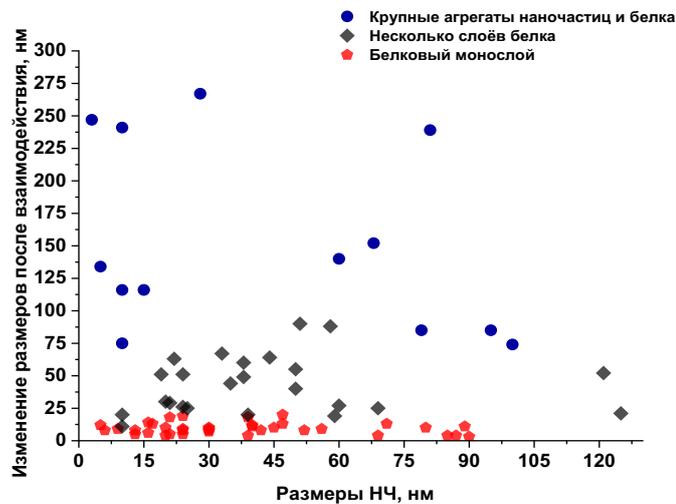


Рисунок 2. Увеличение размера наночастиц после взаимодействия с белковыми молекулами (на оси абсцисс показан размер наночастиц до взаимодействия с белком, а на оси ординат – абсолютное увеличение размера после взаимодействия). Значения размеров

монослоя/мультислоев белка и агрегатов были получены на основе разницы в гидродинамических диаметрах наночастиц, содержащих белок, и свободных от белка наночастиц.

Более детальный анализ, представленный на рисунке 2, показывает несколько ключевых закономерностей:

1. Крупные агрегаты наночастиц с белками в основном формируются на основе малых наночастиц (размером до 30 нм, серые точки).

2. На наночастицах крупнее 100 нм образование плотного белкового монослоя, как правило, не происходит.

3. В 80% случаев белковый монослой формируется на наночастицах размером до 50 нм.

4. В 60% исследований толщина белковой короны не превышает 30% от размера исходной наночастицы.

5. Хотя в 80% случаев белковая корона составляет не более 100% от размера наночастицы, в абсолютных значениях это соответствует увеличению размера приблизительно на 4–40 нм для частиц диаметром 5–50 нм.

Выводы

Ни один метод характеристики наночастиц не является универсальным. Просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ) и динамическое светорассеяние (DLS) предоставляют принципиально разную, но взаимодополняющие результаты. ТЕМ служит «золотым стандартом» для прямого визуального наблюдения ядра частицы и белковой короны, но страдает от низкой репрезентативности и артефактов сушки. DLS, напротив, анализирует частицы в растворе, обеспечивая высокую статистическую достоверность, но измеряет гидродинамический диаметр, зависящий от множества факторов, а не геометрический размер.

Таким образом, для получения полной и достоверной картины в исследованиях нанобиоконъюгатов необходимо комбинировать данные ТЕМ и DLS, критически оценивая ограничения каждого метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абарка-Кабрера Л., Сюй Л., Беренсмайер С., Фрага-Гарсия П. Конкуренция на био-нано интерфейсе: адсорбция белка, полисахарида и жирной кислоты на магнитные наночастицы // *ACS Applied Bio Materials*. – 2022. – Т. 6, № 1. – С. 146-156.
2. Артюмик П., Блейк К., Грейс Д., Отли С., Филлипс Д., Стернберг М. Кристаллографические исследования динамических свойств лизоцима // *Nature*. – 1979. – Т. 280, № 5723. – С. 563-568.
3. Белл Н. С., Минелли К., Томпкинс Дж., Стивенс М. М., Шард А. Г. Новые методы определения размера сублимикронных частиц, применяемые к кремнезему Штобера // *Langmuir*. – 2012. – Т. 28, № 29. – С. 10860-10872.
4. Бхаттачарджи С. Динамическое светорассеяние и дзета-потенциал – что это такое, а что нет? // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Т. 235. – С. 337-351.
5. Ларичев Ю. В. Применение метода динамического светорассеяния для определения размера металлических наночастиц в нанесенных катализаторах // *Chemical Papers*. – 2021. – Т. 75, № 5. – С. 2059-2066.
6. Мурдикудис С., Пальярес Р. М., Тхань Н. Т. К. Методы характеристики наночастиц: сравнение и взаимодополняемость в исследовании свойств наночастиц // *Nanoscale*. – 2018. – Т. 10, № 27. – С. 12871-12934.
7. Павани П., Кумар К., Рани А., Венкатесу П., Ли М.-Дж. Влияние фосфатного буфера натрия на стабильность различных белков: Изучение взаимодействий белок-буфер // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Т. 331. – С. 115753.
8. Саримов Р. М., Биньи В. Н., Матвеева Т. А., Пеньков Н. В., Гудков С. В. Разворачивание и агрегация лизоцима при комбинированном действии дитиотрейтола и гидрохлорида гуанидина: Оптические исследования // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Т. 22, № 5. – С. 2710.
9. Саримов Р. М., Нагаев Е. И., Матвеева Т. А., Биньи В. Н., Бурмистров Д. Е., Серов Д. А., Асташев М. Е., Симакин А. В., Уваров О. В., Хабатова В. В. Исследование агрегации и дезагрегации самособирающихся наноразмерных

кластеров, состоящих из отдельных наночастиц оксида железа, при взаимодействии с молекулами белка HEWL // *Nanomaterials*. – 2022. – Т. 12, № 22. – С. 3960.

10. Соуза Т. Г., Симинелли В. С., Мохаллем Н. Д. С. Сравнение методов ПЭМ и ДСР для характеристики распределения по размерам керамических наночастиц // *Journal of Physics: Conference Series*. – Т. 733. – IOP Publishing, 2016. – С. 012039.

11. Тизро П., Чой К., Ханлоу Н. Пробоподготовка для просвечивающей электронной микроскопии // *Биобанкинг: методы и протоколы*. – 2018. – С. 417-424.

12. Чен Й., Лю Ц., Юй Х., Го Й., Чэн Й., Цянь Х., Се Й., Яо В. Белковая корона, формирующаяся на наночастицах TiO₂, способствует гидролизу коллагена в моделированных желудочно-кишечных жидкостях // *Food Bioscience*. – 2023. – Т. 53. – С. 102786.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF TEM AND DLS METHODS FOR INVESTIGATING THE PROTEIN CORONA ON NANOPARTICLES

TRUTNEV Yurii Anatolyevich

Engineer

Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

Studies of nanoparticle protein coronas rely on TEM and DLS. TEM visualizes the corona, distorting native structure. DLS measures particles in solution, but the hydrodynamic diameter inaccurately reflects a thin protein layer. Meta-analysis shows an average size increase of ~50% (15–18 nm). A synergistic approach combining both methods is essential for an accurate picture.

Keywords: nanoparticles, protein corona, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), hydrodynamic diameter, nanomaterial characterization.