



ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

УДК 535.36+541.182.535.36

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ПОГЛОЩЕНИЯ И ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ СИСТЕМ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ + ДНК

Б. Н. Хлебцов, Т. Е. Пылаев, В. А. Ханадеев, Н. Г. Хлебцов

Хлебцов Борис Николаевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), khlebtsov_b@ibppm.ru

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, ученый секретарь, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), pylaev_t@ibppm.ru

Ханадеев Виталий Андреевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), khanadeev_v@ibppm.ru

Хлебцов Николай Григорьевич, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов); профессор кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khlebtsov@ibppm.ru

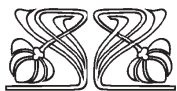
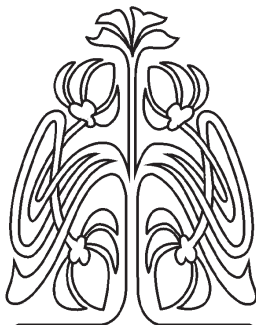
Метод динамического рассеяния света (ДРС) является широко используемым лабораторным тестом для оценки дисперсного состава зольей, однако он не свободен от ряда недостатков. Для быстрой приближенной оценки среднего размера и концентрации золотых наночастиц (ЗНЧ) в диапазоне 15–100 нм разумные значения дает спектроскопия поглощения с использованием аналитической и графической зависимостей, приведенных в работе. Для частиц с диаметром 3–15 нм в работе приведен калибровочный график для определения размера, основанный на измерении отношения пиков поглощения в максимуме и при 450 нм. Обсуждаются сравнительные достоинства и недостатки различных методов и отмечается, что метод ДРС является на сегодняшний день единственным методом для невозмущающей и чувствительной диагностики сравнительно медленных агрегационных процессов с характерными временами порядка минут. В качестве примера рассмотрено применение ДРС для оценки концентрации олигонуклеотидов (коротких фрагментов одноцепочечной ДНК (оцДНК)). Метод основан на регистрации среднего размера агрегатов, формирующихся при гибридизации оцДНК в системе, содержащей конъюгаты ЗНЧ с оцДНК зондами и комплементарные им оцДНК-мишени.

Ключевые слова: золотые наночастицы, распределение частиц по размерам, динамическое рассеяние света, электронная микроскопия, спектроскопия поглощения, олигонуклеотиды, агрегация наночастиц.

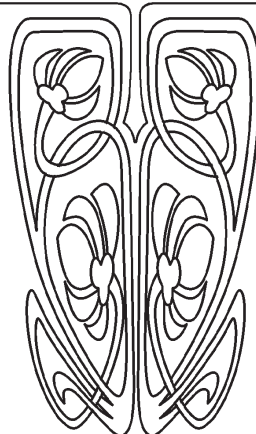
DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149

Введение

В современной лабораторной практике метод ДРС оказался востребованным как сравнительно простой невозмущающий и оперативный метод определения дисперсного состава коллоидов



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





и суспензий. Возможности достаточно простого определения распределения по размерам частиц и анализа агрегационных процессов стимулировали развитие многочисленных приложений ДРС, отраженных в монографии [1] и статьях (см., например, ссылки в [2–7]), в том числе в многочисленных биологических приложениях [8–19].

Наш опыт применения одной из разработок – прибора Zetasizer Nano ZS [20], показал, что некритическое использование метода ДРС без контроля с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) может иногда приводить к артефактам [21].

В предыдущей статье [22] мы дали краткий обзор предшествующих результатов по применению метода ДРС для двух типов наноразмерных систем:

1) непоглощающие рассеивающие диэлектрические наночастицы диоксида кремния (силикатные наночастицы) с диаметром от десятков до сотен нанометров [23, 24];

2) ЗНЧ с доминирующим поглощением (диаметр менее 15 нм) и сильным рассеянием света (диаметр более 30 нм) [21].

В данной работе в дополнение к методу ДРС мы кратко обсуждаем также использование обычной спектроскопии поглощения для оценки среднего размера золотых наночастиц в широком диапазоне от 3 до 100 нм (более детальное обсуждение можно найти в работах [25–28]). В разделе 2 анализируются достоинства и недостатки методов ТЭМ, ДРС и спектроскопии поглощения в оценке размеров ЗНЧ. В качестве экспериментального примера рассматривается количественное определение коротких фрагментов одноцепочечной ДНК (оцДНК-мишеней) [29], основанное на регистрации среднего размера агрегатов, формирующихся при гибридизации оцДНК в системе, содержащей конъюгаты ЗНЧ с оцДНК зондами и комплементарные оцДНК-мишени.

1. Определение среднего размера ЗНЧ по спектрам экстинкции

В предыдущей статье [22] мы кратко обсудили проблемы, возникающие при определении размеров золотых и силикатных наночастиц методом ДРС. В тех случаях, когда нет возможности для доступного и оперативного применения ТЭМ или ДРС и нужна быстрая оценка хотя бы среднего размера частиц коллоидного золота, а не полного распределения по размерам, можно,

как нам кажется, воспользоваться обычной спектроскопией поглощения, если спектрофотометр имеет монохроматор с разрешением порядка 0.5 нм. Недостатки этого подхода будут обсуждены ниже.

Принцип определения среднего из спектров экстинкции основан на хорошо известном смещении плазмонного резонанса наночастиц КЗ в красную область с увеличением их размера [8]. При этом аккуратное воспроизведение спектров экстинкции реальных образцов требует учета эффектов полидисперсности по размерам и форме частиц, а также зависимости оптических констант от размера частиц, как это было впервые показано строгим методом Т-матриц в [25] и недавно с использованием дипольного приближения [30]. Учитывая, что вопрос о применении теории Ми для калибровки среднего размера по положению плазмонного резонанса был недавно детально обсужден в работах [25–27], мы ограничимся здесь сжатым изложением.

На рис. 1, а приведены экспериментальные данные из пяти работ вместе с аналитической аппроксимацией (рис. 1, б), предложенной в [28] на основе измерений, обсужденных в [25]:

$$d = \begin{cases} 3 + 7.5 \times 10^{-5} X^4, & X < 23 \\ \left[\sqrt{X - 17} - 1 \right] / 0.06, & X \geq 23 \end{cases}, \quad X(\text{nm}) = \lambda_{\text{max}} - 500. \quad (1)$$

В отличие от работы [25] приведенный здесь набор экспериментальных данных включает только те источники, в которых решались метрологические задачи сопоставления положения плазмонного резонанса со средним ТЭМ размером. В дополнение мы приводим также недавние данные группы W. Chan [31], где ТЭМ измерения в широком диапазоне размеров коллоидных частиц, полученных в однотипной технологии, сопоставлены со спектроскопией поглощения. Более полный набор экспериментальных данных, включающий пары $(\lambda_{\text{max}}, d_{\text{ТЕМ}})$ из ряда прикладных работ, приведен в нашем обзоре [9].

Для оценки средних ошибок спектрального метода мы использовали пять наборов экспериментальных данных, показанных на рис. 1, а, и сгруппировали их по ТЭМ диаметрам частиц в диапазонах от 5 до 30 нм (шаг 5 нм) и от 30 до 100 нм (шаг 10 нм). По каждой группе были рассчитаны среднеквадратические стандартные отклонения, показанные на рис. 1, б вертикальными линиями. Как видно из кривой 2, приведенной на рис. 1, б, имеется заметный разброс

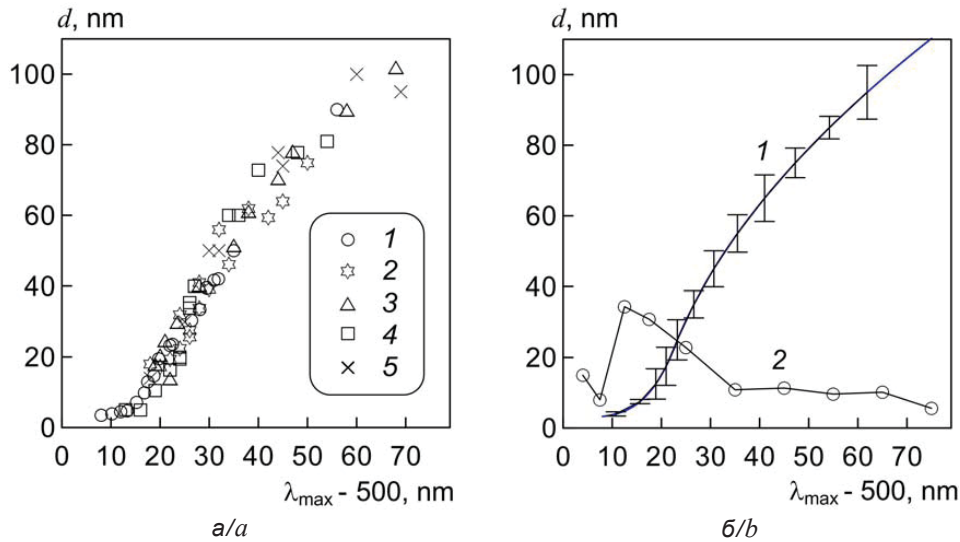


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения среднего размера наночастиц КЗ по положению плазмонного резонанса экстинкции. Точками 1–4 на панели (а) показаны экспериментальные данные из работ, указанных в [28], точками 5 – в обзоре [9]. На панели (б) приведена аналитическая аппроксимация (кривая 1) по формуле (1) и среднеквадратические отклонения экспериментальных данных ($\pm\sigma$), рассчитанные, как описано в тексте, по экспериментальным точкам (а). Кривая 2 показывает относительные ошибки (σ/d_{av})

Fig. 1. Calibration curve for determination of the average size of CG nanoparticles by a position of the plasmonic extinction resonance. The points 1–4 in panel (a) show the experimental data taken from papers indicated in Ref. [28] and review [32] (5). In the panel (b) the analytical approximation (curve 1) as calculated by Eq. (1) is shown together with standard root-mean deviations of the experimental data ($\pm\sigma$), that were calculated as described in the text by using experimental points in the panel (a). Curve 2 shows the normalized errors (σ/d_{av})

данных экспериментов и среднеквадратическая ошибка может достигать 35% по отношению к данным ТЭМ, но в среднем уровень отклонения данных ТЭМ от калибровки порядка 10–20%, т.е. примерно такой же, как и в методе ДРС. Таким образом, приведенные на рис. 1, б экспериментальные результаты, полученные независимо в пяти опубликованных измерениях разных групп, показывают возможность применения простой калибровки 1 для быстрой оценки среднего размера с использованием обычных спектрофотометров, доступных для любой лаборатории. Однако следует иметь в виду, что в ряде случаев опубликованные данные по парам (λ_{max} , d_{TEM}) отклоняются от калибровки 1 на рис. 1, б существенно больше.

Как видно из рис. 1, для диаметров менее 10 нм измерения положения максимума экстинкции становятся бесполезными, потому что сдвиг плазмонного резонанса определяется ограничением длины пробега электронов в малых частицах (размерный эффект для диэлектрической функции), а чувствительность калибровки становится очень

слабой. Для диапазона размеров 1–10 нм можно использовать два подхода [28]. Первый заключается в измерении отношения A_{max}/A_{min} [32], где минимальное значение обычно измеряется около 450 нм [27, 28]. Для примера на рис. 2 приведена калибровка, позволяющая определить средний эквиобъемный диаметр малых полидисперсных наночастиц КЗ по отношению экстинкций A_{max}/A_{450} , измеренных на длине волны резонанса и 450 нм. Отметим, что с увеличением размера от 2 до 15 нм положение теоретического резонанса с учетом размерного изменения оптических констант изменяется от 508 до 516 нм. Влияние формы частиц на зависимости такого типа обсуждалось в [28]. Экспериментальные примеры использования этого метода приведены в работе [27].

Размерный эффект оптических констант золотых наночастиц приводит также к уширению слабого плазмонного резонанса, которое можно измерить и сопоставить с теоретической калибровкой. Этот подход анализировался в работе [33].

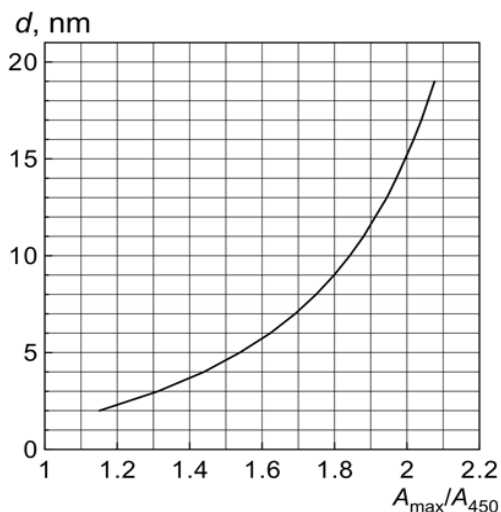


Рис. 2. Калибровочная зависимость для определения среднего размера наночастиц КЗ по отношению значений экстинкции A_{\max}/A_{450} . Расчет по теории Ми для нормального распределения полидисперсных золотых частиц с нормированным стандартным отклонением $\sigma/d_{av} = 30\%$

Fig. 2. Calibration curve for determination of the average size of CG nanoparticles from the extinction ratio A_{\max}/A_{450} . Calculations were carried out by Mie theory using a normal size distribution for polydisperse gold nanoparticles with normalized standard deviation $\sigma/d_{av} = 30\%$

2. Сравнение методов ТЭМ, ДРС и спектроскопии поглощения в оценке средних размеров ЗНЧ

Приведенные выше результаты требуют обсуждения, чтобы у читателей не создалось ложного впечатления о принципиальных недостатках метода ДРС вообще, безотносительно к проблемам других методов. Во избежание недоразумений подчеркнем, что все дальнейшее обсуждение относится в основном только к коллоидным золотым частицам, получаемым стандартными методами восстановления HAuCl_4 .

Вряд ли стоит напоминать, что ТЭМ и ДРС по своим принципам дают разную, хотя и сопоставимую информацию о дисперсном составе коллоида. ТЭМ изображения являются случайными выборками препарированного образца на сеточке, поэтому всегда имеются две проблемы. Первая – это изменения в образце, происходящие в процессе препарирования. Вторая – это обеспечение неискажающей статистики выборок изображений. К счастью, для золотых наночастиц проблема первого типа отсутствует, если нас интересует *только распределение по размерам индивидуальных частиц* безотносительно к их возможной *агрегации* в коллоиде. Само собой

разумеется, что образец должен быть подготовлен к ТЭМ анализу по общепринятым протоколам (отмыт, ресуспендирован и т.п.), чтобы не возникало никаких артефактов препарирования при сушке образца на ТЭМ сетке (продолжение роста, слипание частиц, искажение их формы и размера и т.д.). Вторая проблема решается обычными средствами статистики и тщательным просмотром всех участков сетки (что может быть достаточно трудоемким процессом). Наш опыт и данные других публикаций показывают, что обычно обсчет 1000 частиц с одного участка сетки статистически не отличается от обсчета по другому случайно выбранному участку. При обеспечении перечисленных условий метод ТЭМ дает прекрасно воспроизводимые результаты и на сегодняшний день является «золотым стандартом», принятым во всех без исключения лабораториях мира (судя по нашей базе данных, включающей более 4000 источников с 1995 по 2016 г.). Здесь уместно подчеркнуть, что для биологических частиц метод ТЭМ сразу теряет свое основное преимущество из-за хорошо известных проблем препарирования. Кроме того, трудоемкость ТЭМ и проблемы его корректного применения сильно возрастают в случае *кинетических* исследований.

Бесспорным преимуществом метода ДРС, как и большинства других оптических методов, является возможность исследования дисперсного состава *in situ* с усреднением данных по большому ансамблю частиц, попадающих в зондируемый объем. Скажем, для типичного объема когерентности в методе ДРС порядка 10^{-3} см^3 число анализируемых частиц в типичном золотом коллоиде с оптической плотностью 1 в кювете толщиной 1 см на резонансной длине волны около 520 нм будет порядка $10^8 - 10^9$. Такой ансамбль невозможно исследовать методом ТЭМ. Во-вторых, метод ДРС можно применять и для *медленных* кинетических процессов с характерными временами меньше времени накопления автокорреляционной функций фототока (5–30 мин). Для биологических частиц невозмущающий характер ДРС может быть решающим фактором. Кроме того, по сравнению с большинством других оптических методов, метод ДРС определяет функцию распределения по размерам без априорной информации об оптических свойствах частиц (см., впрочем, ниже). Альтернативой могут рассматриваться только варианты метода «пролетной индикатрисы» [34] или спектральной прозрачности [35].



Как было показано в [22], для частиц КЗ-16 метод ДРС в распределении интенсивностей рассеяния дает две сильно различающиеся моды, одна из которых близка по размерам к ТЭМ размерам частиц КЗ, а вторая имеет максимум в области 200 нм. Вопрос об интерпретации этой фракции нетривиален и связан с принципиальной особенностью всех методов светорассеяния, включая ДРС. Если размер частиц мал и соответствует условиям рэлеевского рассеяния, то интенсивность пропорциональна квадрату модуля поляризуемости, т.е. квадрату объема частицы. Ясно, что рассеиватели большого объема всегда имеют непропорционально доминирующий оптический вес и могут исказить информацию от интересующих нас наночастиц даже при ничтожной числовой доле. Это видно уже из пересчета распределения интенсивностей в распределения объемов и числа частиц. Только по данным ДРС ничего нельзя сказать о природе этих 200-нм частиц. Они могут быть просто частицами «пыли», крупными «нецелевыми» частицами золота или случайными агрегатами золотых наночастиц. Однако можно показать (данные здесь не представлены), что при одних и тех же условиях цитратного синтеза постепенный переход от среднего размера 15 нм к размерам 20, 25, 30 нм сопровождается заметным уменьшением второго максимума в распределении интенсивностей и переходу к полностью одномодовому распределению. Это является сильным аргументом в пользу предположения о том, что речь идет просто о паразитной информации в случае слабо рассеивающих частиц КЗ-16, которая

перестает влиять, как только рассеяние самих частиц КЗ начинает возрастать.

К сожалению, начиная с размера частиц КЗ порядка 40–50 нм, в ДРС измерениях начинает проявляться второй эффект – паразитная мода в области малых размеров, обусловленная вращательным движением несферических частиц. Подчеркнем еще раз, что этот эффект обусловлен именно формой и не наблюдается, скажем, для наносфер диоксида кремния в очень широком диапазоне размеров [23] и для золотых нанобочечек, выращенных на этих ядрах [36].

Мы показали ранее [21], что паразитное влияние вращательного движения можно исключить переходом к малым углам рассеяния или соответствующей настройкой коррелятора. Более того, измеряя *угловую зависимость* автокорреляционной функции, можно сделать некоторые выводы о форме частиц, но только качественного характера (см., например, сравнение данных ДРС и ТЭМ по форме частиц в [37, 38]). К сожалению, большинство коммерческих приборов (включая Zetasizer Nano ZS) не имеют этой полезной опции.

Второй вопрос, который следует обсудить, это адекватность среднего размера и дисперсии ДРС-распределения по размерам результатам ТЭМ анализа. Согласно данным таблицы, имеется определенное согласие между средними диаметрами КЗ-16, однако данные ДРС могут быть внутренне противоречивы: измерения при разных углах могут дать разные размеры даже после отсечки моды вращательного движения (таблица). Отметим также, что данные ТЭМ и ДРС для КЗ-60 различаются существенно.

Средние диаметры и полуширины распределений образцов КЗ-16 и КЗ-60 по данным ТЭМ и ДРС

The average diameters and FWHM of the size-distributions of samples CG-16 and CG-60 according to TEM and dynamic light scattering (DLS) data

Образец Sample	$d_N(\sigma\%), \text{ nm}$	$d_N(\sigma\%), \text{ nm}$		$d_V(\sigma\%), \text{ nm}$	
	ТЭМ TEM	ДРС DLS, 13°	ДРС DLS, 173°	ДРС DLS, 13°	ДРС DLS, 173°
CG-16	15.8 (8.9%)	–	13.2 (23%)	–	16.4 (33%)
CG-60	59.4 (8.9%)	66.2 (16.3%)	32 (25%)	69 (19%)	42 (33%)

Выше мы отмечали, что метод ДРС иногда считают единственным, который дает распределение по размерам частиц *in situ*. Однако вопрос об адекватности этого распределения числовому распределению частиц по размерам в коллоиде часто опускается. Единственной

прямой информацией метода ДРС является распределение интенсивностей рассеяния по коэффициентам броуновской диффузии [1]. Пересчет этого распределения, скажем, в распределение агрегатов наносфер по *гидродинамическим* размерам, – задача практически не решаемая, поэтому



разработчики оборудования ДРС часто переключают эти серьезные проблемы на конечного пользователя, предоставляя в его распоряжение файл с автокорреляционной функцией или распределением по интенсивностям рассеяния. Если исследуемый объект можно как-то описать моделями Стокса-Эйнштейна (пересчет коэффициента диффузии в гидродинамический размер для одной идеальной сферы в бесконечной покоящейся жидкости) и Ми (пересчет интенсивности в число частиц данного размера), то тогда и только тогда решение обратной задачи будет корректным для модели изотропных однородных невзаимодействующих однократно рассеивающих сфер. Ясно, что эта модель может быть далека от реального объекта (см. [22, рис. 3]). Даже для сферических частиц показатели степени в пересчетных формулах от интенсивности рассеяния к размеру частиц зависят от свойств материала, ширины распределения и т.д. (см. обсуждение этого вопроса в [39]). Не следует также забывать, что даже в простых случаях (сферы с полимерным покрытием) метод ДРС дает информацию о гидродинамическом размере всего комплекса, а не о геометрическом размере самой частицы.

Как мы видели выше, дисперсия ДРС размеров обычно всегда завышена по сравнению с данными ТЭМ. В нашем случае – примерно в 2–4 раза. Поучительно сравнить наши дисперсии для коллоидов КЗ-16 и КЗ-60 с тщательными ТЭМ измерениями наночастиц, полученных по оригинальным протоколам синтеза в [26] и [27] (рис. 3).

Хорошо видно, что для частиц КЗ-16 наш результат весьма близок к [27], а для КЗ-60 наша дисперсия (8.9%) примерно в 2.5 раза больше средней величины [27] для этого диапазона размеров, но меньше значения 14% для частиц КЗ-60, исследованных в [26]. Таким образом, дисперсия размеров наших образцов типична для частиц КЗ. Сопоставляя рис. 3 с данными таблицы и учитывая другие опубликованные данные [8, 25], мы приходим к следующему принципиальному выводу: дисперсия распределения наночастиц КЗ по размерам, получаемая методом ДРС, неадекватна дисперсии числового ТЭМ распределения по размерам и обычно завышена. Это завышение обусловлено несколькими факторами. Во-первых, метод ДРС учитывает оптические вклады от неболь-

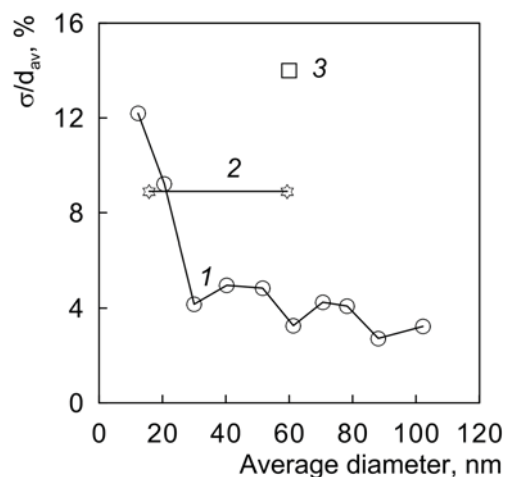


Рис. 3. Относительная полуширина ТЭМ распределения числа частиц по размерам для коллоидов со средними диаметрами 12.3, 20.6, 30, 40.3, 51.6, 61.3, 70.6, 78.3, 88.1 и 102.2 нм: 1 – адаптировано по данным [27], 2 – для коллоидов КЗ-16 и КЗ-60, 3 – данные [26] для КЗ-60

Fig. 3. Normalized width of TEM particle size distribution for colloids with the average diameters 12.3, 20.6, 30, 40.3, 51.6, 61.3, 70.6, 78.3, 88.1, and 102.2 nm: 1 – adapted from data of Ref. [27], 2 – for colloids CG-16 and CG-60, 3 – data of Ref. [26] for CG-60

шой доли крупных частиц, которые обычно не представляют интереса и игнорируются в ТЭМ анализе. Во-вторых, сама по себе процедура обращения интегрального уравнения Фредгольма первого рода в методе ДРС вносит неизбежное уширение, не имеющее отношение к коллоиду [1]. Наконец, в реальном коллоиде *in situ* могут формироваться и разрушаться агрегаты, которые будут отражаться в корреляциях фототока, но обычно игнорируются в ТЭМ анализе. Отметим, что уширение распределения в методе ДРС уже неоднократно описывалось в литературе даже для простейших латексных систем [40].

Оценка среднего размера по сдвигу плазмонного резонанса также имеет свои достоинства и недостатки. Прежде всего, речь вовсе не идет о функции распределения по размерам. Более того, даже при определении среднего размера, как показывает наш почти 20-летний экспериментальный опыт [8], надежные результаты получаются только в рамках однотипного, протестированного протокола синтеза при обязательном исключении агрегации. Наличие лиганда типа IgG или тиолированных молекул полиэтиленгликоля на поверхности частиц обычно приводит к не-



большому сдвигу порядка 3 нм для экстинкции и 4-5 нм для рассеяния [11]. Конечно, в этом случае и метод плазмонного сдвига, и метод ДРС нельзя применять для характеристики самих нефункционализированных частиц. Например, экспериментально было показано [11], что для частиц типа КЗ-16 адсорбция молекул IgG увеличивает гидродинамический диаметр с 18 до примерно 28 нм, а в случае желатина – с 18 до 40 нм. Но в данном контексте это не недостаток, а, наоборот, – важное достоинство метода ДРС, позволяющего оценить толщину биополимерной оболочки конъюгата, как это было сделано в [11].

Что касается неконтролируемой небольшой агрегации, то метод плазмонного сдвига обладает наибольшей устойчивостью к этому эффекту, по сравнению с ДРС или методом дифференциального рассеяния [41]. В частности, это было показано экспериментально и теоретически в [42] для модельных смесей золотых коллоидов и в [41] для случая агрегации, инициированной биоспецифическими взаимодействиями конъюгатов наночастиц с молекулами-мишенями. Физическая причина этой устойчивости достаточно проста. В приближении слабого взаимодействия поглощение малых частиц определяется мнимой частью их поляризуемости и пропорционально объему. Объединение частиц не изменяет суммарного поглощения до тех пор, пока оптическое взаимодействие не начнет влиять на сечение

поглощения частиц в кластере. Оценки кластерного усиления поглощения в зависимости от межчастичных расстояний и типа кластера даны в работе [43].

3. Определение ДНК последовательностей методом ДРС

Как часто бывает, недостаток метода может в определенных обстоятельствах оказаться несомненным достоинством. Например, высокая чувствительность ДРС распределения к образованию даже небольшой доли сильно рассеивающих агрегатов обеспечивает несомненные конкурентные преимущества ДРС перед другими оптическими методами в исследовании биоспецифической агрегации, где метод ТЭМ практически бесполезен. В частности, в цитированных выше работах [12–19] именно эта особенность ДРС была успешно использована в анализе сборки биоконъюгатов золотых наночастиц. В нашей работе [29] метод ДРС был применен в качестве чувствительного теста для количественного определения коротких одноцепочечных ДНК (оцДНК). Метод основан на регистрации оптических эффектов, сопровождающих агрегацию положительно заряженных частиц КЗ, индуцированную реакцией гибридизации оцДНК-зондов и оцДНК-мишеней (рис. 4). Применимость метода ДРС сравнивается с традиционно используемой в аналогичных гибридационных тестах спектроскопией поглощения.

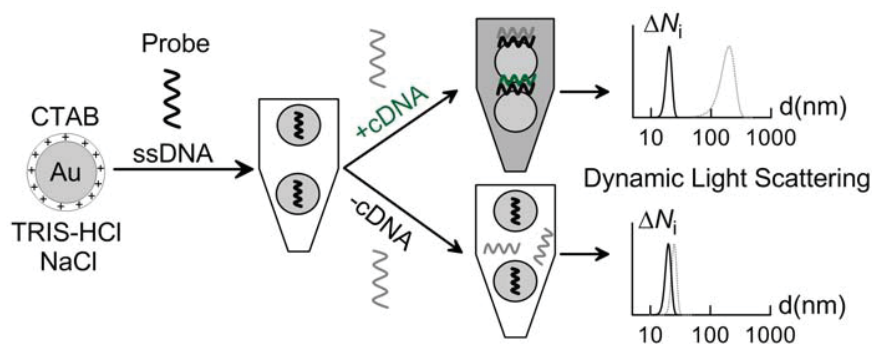


Рис. 4. Схематическое представление колориметрического и ДРС методов для детектирования оцДНК с использованием ЦТАБ-покрытых положительно заряженных золотых наносфер [29]

Fig. 4. Schematic representation of colorimetric and DLS methods to detect ssDNA using CTAB-coated positive charged gold nanospheres [29]

Положительно заряженные сферические 16, 25, и 30 нм наночастицы КЗ (КЗ-16, КЗ-25, КЗ-30) были получены простой функционализацией молекулами цетилтриметиламмонийбромида

(ЦТАБ) [29] отрицательно заряженных частиц, синтезированных по методу Фрэнса. Использование ЗНЧ крупнее 30 нм из-за их низкой стабильности в гибридационных условиях приводит к



плохой воспроизводимости колориметрического теста наряду с отмеченным в [22, рис. 3] заметным отклонением формы цитратных золотых частиц от сферической. Все эксперименты в работе [29] были проведены на двух моделях: маркерной последовательности на определение ВИЧ-1 (модель 1) и маркерной последовательности на определение *Bacillus anthracis* (модель 2).

На рис. 5 показана зависимость концентрации оцДНК-мишени от относительного изменения значения экстинкции, измеренного на длине волны 550 нм, $\Delta A_{550} / A_{550} = (A_{550}^{target} - A_{550}^{probe}) / A_{550}^{target}$, выбранной нами для отображения меры агрегации из соответствующих спектров (рис. 5, б). Заметим, что функционализация молеку-

лами ЦТАБ сопровождалась небольшим 5-нм красным сдвигом максимума экстинкции. Для концентраций кДНК (сДНА) ниже, чем 10 пМ, максимальную экстинкцию и относительные изменения $\Delta A_{550} / A_{550}$ было трудно отличить от случайных изменений экстинкции контрольных образцов с зондовой оцДНК. Согласно калибровке на рис. 5, б нижний концентрационный предел детектирования может быть определен как 100 пМ. Верхний концентрационный предел детектирования кДНК, который составлял около 15 нМ, приводил к сильному изменению цвета суспензии и сильной, зависящей от времени агрегации сразу после добавления кДНК мишени (данные не приведены).

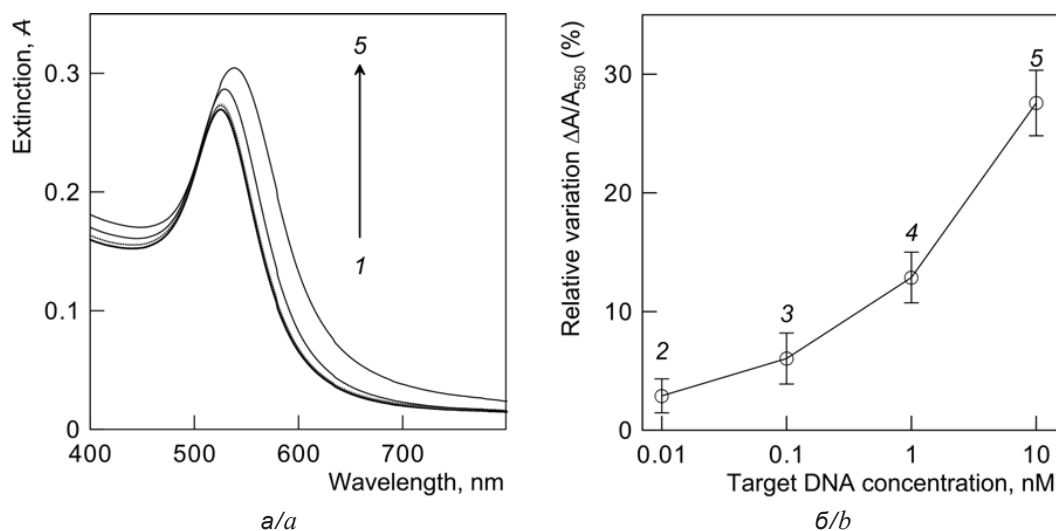


Рис. 5. Спектры экстинкции ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-16 в смеси с гибридизационным буфером и зондовой оцДНК P_1 после добавления оцДНК мишени HIV-1 U5 (T_1) с концентрациями 0 (1), 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4) и 10 нМ (5) (а) и относительные изменения экстинкции $\Delta A_{550} / A_{550}$, определенные из спектров 2–5 (б). Вертикальные бары показывают стандартные отклонения от среднего ($n = 4$) [29]

Fig. 5. Extinction spectra of CTAB-coated nanoparticles CG-16 after mixing with hybridization buffer and probe ssDNA P_1 followed by addition of target ssDNA HIV-1 U5 (T_1) at concentrations 0 (1), 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4), and 10 nM (5) (a). Relative changes in extinction $\Delta A_{550} / A_{550}$ as determined from spectra 2–5 (b). The bars show standard errors of the mean ($n = 4$) [29]

Как уже было отмечено, экстинкция малых агрегатов ЗНЧ в основном определяется поглощением отдельной частицы, а не их индивидуальным рассеянием или рассеянием агрегата в целом. Именно поэтому спектры экстинкции показывают слабую чувствительность детектирования при концентрации оцДНК 0.1–1 нМ. С другой стороны, хорошо известно [1], что в распределении интенсивности рассеяния по размерам доминируют частицы большого размера, поскольку для диэлектрических частиц их вклад

в рассеяние пропорционален квадрату объема, т.е. шестой степени размера. Следовательно, мы можем ожидать повышенной чувствительности детектирования для систем, показанных на рис. 5.

Распределения интенсивности рассеяния по размеру частиц на рис. 6 (вставка) показывают очевидное уширение и сдвиг распределений в область больших размеров уже при 10–100 пМ кДНК. Для исключения влияния рассеяния от загрязняющих частиц и корректного определе-

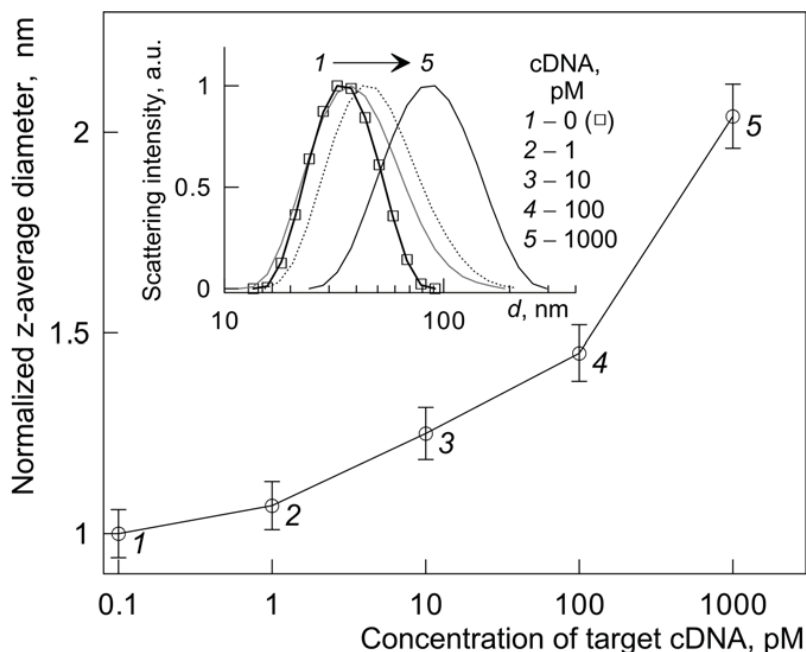


Рис. 6. Концентрационная зависимость среднего диаметра по ДРС, нормализованная к таковым для ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-16 в смеси гибридационного буфера и зондовой оцДНК. В качестве погрешности измерений отображены стандартные отклонения от средней величины ($n=5$). На вставке показаны распределения интенсивность–размер ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-25 в смеси гибридационного буфера и зондовой оцДНК после добавления оцДНК мишени с концентрациями 0 (1), 1 (2), 10 (3), 100 (4) и 1000 пМ (5) [29]

Fig. 6. Concentration dependence of the average DLS diameter normalized to that for CTAB-coated CG-16 nanoparticles mixed with hybridization buffer and probe ssDNA. The bars show standard errors of the mean ($n = 5$). The inset presents the intensity-size distributions for CTAB-coated nanoparticles CG-25 after mixing with hybridization buffer and probe ssDNA P_1 followed by addition of target ssDNA at concentrations 0 (1), 1 (2), 10 (3), 100 (4), and 1000 pM (5) [29]

ния степени агрегации ЗНЧ мы использовали z-средние диаметры частиц в системе, содержащей оцДНК-мишени, нормированные на z-средние диаметры частиц системы с зондовой оцДНК, $d_z(T_i)/d_z(P_i)$ ($i=1,2$). Кроме того, чтобы максимально снизить нежелательные эффекты от посторонних случайных рассеивателей, мы не использовали встроенную программу прибора, а непосредственно рассчитывали z-средний размер $d_z = \sum d_i I_i / \sum I_i$, используя только первый главный пик распределения интенсивности. Как показано на рис. 6, нормализованное стандартное отклонение составляет около 0.06 и основанный на ДРС нижний предел обнаружения составляет около 10 пМ оцДНК, что существенно меньше предела чувствительности спектроскопии экстинкции, полученного ранее в работах [44, 45].

Следует, однако, отметить, что имеется отличие более чем на два-три порядка в пределах

чувствительности детекции оцДНК, согласно нашим данным и данным работы [44] (10–100 пМ), с одной стороны, и по данным работы [46] (0.1 пМ), с другой. Специальный анализ данных [46] показывает [29], что рекордная чувствительность 0.1 пМ не согласуется с представлениями о возможных механизмах агрегации частиц в системах, содержащих столь низкие концентрации мишеней кДНК.

Отметим, что метод ДРС может быть использован также для определения точечных мутаций. В частности, было показано [29], что нормализованные z-средние ДРС размеры агрегатов закономерно уменьшаются для образцов, содержащих мишени с однобуквенными (single-based mismatch, SBM) и трехбуквенными мисмэтчами (three-based mismatch, TBM), в сравнении с размерами агрегатов образцов, содержащих полностью комплементарные мишени.



Заключение

Ширина ДРС распределений числа или объемов частиц по размерам в обоих случаях слабого и сильного рассеяния всегда завышена по сравнению с ТЭМ гистограммами. В тех случаях, когда нужна быстрая качественная оценка среднего размера в диапазоне 15–100 нм, разумные значения дает обычная спектроскопия поглощения. Для этой цели можно использовать уравнение (1) или график, приведенный на рис. 1. Для частиц меньшего размера имеет смысл использовать метод отношения экстинкций вместе с калибровкой, приведенной на рис. 2.

Важным достоинством метода ДРС является его высокая чувствительность к агрегации частиц, что позволяет рекомендовать его в качестве более надежного теста, по сравнению со спектроскопией поглощения, для детектирования биоспецифических взаимодействий с применением наночастиц КЗ. В частности, измерение z-среднего размера можно использовать для чувствительного ДРС детектирования ДНК последовательностей. Для исследованных в работе модельных оцДНК предел чувствительности ДРС метода составляет менее 10 пМ. Кроме того, метод ДРС позволяет детектировать точечные мутации в коротких оцДНК [29].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-02-00054, 16-52-45026, 17-02-00075). Исследования В. А. Ханадеева поддержаны грантом Президента РФ для поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (проект № МК-2617.2017.2).

Список литературы

1. Berne B. J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Mineola, N.Y. : Dover Publ., 2000. 384 p.
2. Roebben G., Ramirez-Garcia S., Hackley V. A., Roesslein M., Klaessig F., Kestens V., Lynch I., Garner C. M., Rawle A., Elder A., Colvin V. L., Kreyling W., Krug H. F., Lewicka, Z. A., McNeil S., Nel A., Patri A., Wick P., Wiesner M., Xia T., Oberdörster G., Dawson K. A. Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment // *J. Nanopart. Res.* 2011. Vol. 13. P. 2675–2687.
3. Speed D., Westerhoff P., Sierra-Alvarez R., Draper R., Pantano P., Aravamudhan S., Chen K. L., Hristovski K., Herckes P., Bi X., Yang Y., Zeng C., Otero-Gonzalez L., Mikoryak C., Wilson B. A., Kosaraju K., Tarannum M., Crawford S., Yi P., Liu X., Babu S. V., Moinpour M., Ranville J., Montano M., Corredor C., Posner J., Shadman F. Physical, chemical, and *in vitro* toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry : Towards environmental health and safety assessments // *Environ. Sci. : Nano.* 2015. Vol. 2. P. 227–244.
4. Gambinossi F., Mylon S. E., Ferri J. K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles // *Adv. Colloid Interfac.* 2015. Vol. 222. P. 332–349.
5. Zhu X., Li J., He H., Huang M., Zhang X., Wang S. Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol. 74. P. 113–133.
6. Zheng T., Bott S., Huo Q. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation // *ACS Appl. Mater. Inter.* 2016. Vol. 8. P. 21585–21594.
7. Siddiqi K. S., Husen A. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system // *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2017. Vol. 40. P. 10–23.
8. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы : Синтез, свойства, биомедицинское применение. М. : Наука, 2008. 319 с.
9. Khlebtsov N. G., Dykman L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2010. Vol. 111. P. 1–35.
10. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications : Recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41. P. 2256–2282.
11. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Englebienne P. A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates : application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method // *Colloid J.* 2003. Vol. 65. P. 622–635.
12. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies // *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81. P. 9425–9432.
13. Kalluri J. R., Arbneshi T., Khan S. A., Neely A., Candice P., Varisli B. Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay : Selective detection of arsenic in groundwater // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. Vol. 48. P. 9668–9671.
14. Bell N. C., Minelli C., Shard A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement // *Anal. Methods.* 2013. Vol. 5. P. 4591–4601.
15. Alex S. A., Chakraborty D., Chandrasekaran N., Mukherjee A. A comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6. P. 52683–52694.
16. Sutariya P. G., Pandya A., Lodha A., Menon S. K. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity,



- using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles // *Talanta*. 2016. Vol. 147. P. 590–597.
17. Liu X., Huo Q. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering // *J. Immunol. Methods*. 2009. Vol. 349. P. 38–44.
 18. Miao X., Zou S., Zhang H., Ling L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering // *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2014. Vol. 191. P. 396–400.
 19. Witten K. G., Bretschneider J. C., Eckert T., Richtering W., Simon U. Assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles studied by UV/Vis-spectroscopy and dynamic light scattering // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008. Vol. 10. P. 1870–1875.
 20. Dynamic Light Scattering (DLS), Malvern, UK. URL: <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx> (дата обращения: 4.01.17).
 21. Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method // *Colloid J.* 2011. Vol. 73. P. 118–127.
 22. Хлебцов Б. Н., Ханадеев В. А., Пылаев Т. Е., Хлебцов Н. Г. Метод динамического рассеяния света в исследованиях силикатных и золотых наночастиц // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 71–84. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84.
 23. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // *Langmuir*. 2008. Vol. 24. P. 8964–8970.
 24. Khanadeev V. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores : experiment and simulations // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2017. Vol. 187. P. 1–9.
 25. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Melnikov A. G. Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180. P. 436–445.
 26. Haiss W., Thanh N. T. K., Aveyard J., Fernig D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra // *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. P. 4215–4221.
 27. Njoki P. N., Lim I.-I. S., Mott D., Park H.-Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C.-J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111. P. 14664–14669.
 28. Khlebtsov N. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 6620–6625.
 29. Pylaev T., Khanadeev V., Khlebtsov B., Dykman L., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanorods and nanospheres : A comparative study // *Nanotechnology*. 2011. Vol. 22. P. 285501 (11 p).
 30. Amendola V., Meneghetti M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy // *J. Phys. Chem. C*. 2009. Vol. 113. P. 4277–4285.
 31. Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6. P. 662–668.
 32. Scaffardi L. B., Tocho J. O. Size dependence of refractive index of gold nanoparticles // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17. P. 1309.
 33. Sancho-Parramon J. Surface plasmon resonance broadening of metallic particles in the quasi-static approximation : a numerical study of size confinement and interparticle interaction effects // *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20. P. 235706.
 34. Maltsev V. P., Chernyshev A. V., Semyanov K. A., Soini E. Absolute real-time measurement of particle size distribution with the flying light-scattering indicatrix method // *Appl. Opt.* 1996. Vol. 35. P. 3275.
 35. Shifrin K. S., Tonna G. Inverse problems related to light scattering in the atmosphere and ocean // *Advances in Geophysics*. N.Y. : Academic Press, 1993. Vol. 34. P. 175–252.
 36. Khlebtsov B. N., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Spectra of resonance light scattering of gold nanoshells : effects of polydispersity and limited electron free path // *Opt. Spectrosc.* 2007. Vol. 102. P. 233–241.
 37. Van der Zande B. M. I., Dhont Jan K. G., Bohmer Marcel R., Philippe A. P. Colloidal dispersions of gold rods characterized by dynamic light scattering and electrophoresis // *Langmuir*. 2000. Vol. 16. P. 459–464.
 38. Rodríguez-Fernández J., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L. M., Lang P. R. Dynamic light scattering of short Au rods with low aspect ratios // *J. Phys. Chem. C*. 2007. Vol. 111. P. 5020–5025.
 39. Khlebtsov N. G. On the dependence of the light scattering intensity on the averaged size of polydisperse particles : comments on the paper by M. S. Dyuzheva *et al.* (*Colloid J.* 2002, vol. 64, no. 1, p. 39) // *Colloid J.* 2003. Vol. 65, № 5. P. 652–655.
 40. Klyubin V. V., Bungov V. N. A comparison of results obtained by solution of the inverse problem of correlation spectroscopy with the use of the CONTIN and KLUB packages // *Colloid J.* 1998. Vol. 60. P. 313–318.
 41. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Krasnov Ya. M. Differential light scattering spectroscopy : a new approach to studies of colloidal gold nanosensors // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2004. Vol. 89. P. 133–142.
 42. Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Measurement of mean size and evaluation of polydispersity of gold nanoparticles from spectra of optical absorption and scattering // *Opt. Spectrosc.* 2004. Vol. 96. P. 128–135.
 43. Khlebtsov B. N., Zharov V. P., Melnikov A. G., Tuchin V. V., Khlebtsov N. G. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17. P. 5167–5179.
 44. He W., Huang C. Z., Li Y. F., Xie J. P., Yang R. G., Zhou P. F., Wang J. One-step label-free optical genosens-



- ing system for sequence-specific DNA related to the human immunodeficiency virus based on the measurements of light scattering signals of gold nanorods // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 8424–8430.
45. *Darbha G. K., Ra U. S., Singh A. K., Ray P. C.* Gold nanorod based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA using hyper Rayleigh scattering spectroscopy // *Chem. Eur. J.* 2008. Vol. 14. P. 3896–3903.
46. *Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C.* Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation // *Anal. Chim. Acta.* 2010. Vol. 673. P. 179–184.

Образец для цитирования:

Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Хлебцов Н. Г. Применение спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света в исследованиях систем золотых наночастиц + ДНК // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика.* 2017. Т. 17, вып. 3. С. 136–149. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149.

Application of Dynamic Light Scattering and Absorption Spectroscopy to Studies of Systems with Colloidal Gold Nanoparticles + DNA

**B. N. Khlebtsov, T. E. Pylaev,
V. A. Khanadeev, N. G. Khlebtsov**

Boris N. Khlebtsov, ORCID 0000-0003-3996-5750, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khlebtsov_b@ibppm.ru

Timofey E. Pylaev, ORCID 0000-0002-2701-3333, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, pylaev_t@ibppm.ru

Vitaly A. Khanadeev, ORCID 0000-0003-3404-5402, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khanadeev_v@ibppm.ru

Nikolai G. Khlebtsov, ORCID 0000-0002-2055-7784, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khlebtsov@ibppm.ru

Background and Objectives: The dynamic light scattering (DLS) method is widely used to evaluate the particle size distributions. However, DLS is not free of serious drawbacks. For a fast approximate estimation of the average size of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) within the range of 15–100 nm reasonable results can be obtained with using the absorption spectroscopy. We discuss the advantages and drawbacks of DLS, transmission electron microscope (TEM), and absorption spectroscopy in gold nanoparticle sizing. In addition, we consider the application DLS and absorption spectroscopy to detection of ssDNA oligonucleotides and mismatches in their sequences with using AuNPs. The method principle is as follows: the addition of probe and target ssDNA to CTAB-coated AuNPs results in particle aggregation, whereas no aggregation occurs after addition of probe and nontarget DNA sequences. **Materials and Methods:** 16-nm and 60-nm AuNPs with negative charges were synthesized by the Frens method. Positively charged AuNPs were obtained by functionalization of with CTAB. As ssDNA models, we used 21-mer oligonucleotides from the human immunodeficiency virus HIV-1 and a 23-mer ssDNAs from the *Bacillus anthracis* genes. A Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) was used for DLS measurements. A Libra-120 transmission electron microscope (Carl Zeiss,

Jena, Germany) and a Specord BS 250 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) were used for TEM and spectroscopic measurements at the Simbioz Center for the Collective Use of Research Equipment in the Field of Physical-Chemical Biology and Nanobiotechnology at the IBPPM RAS. **Results:** For a fast estimation of the average size of AuNPs in the range of 15–100 nm, the absorption spectroscopy gives reasonable sizes derived from presented calibrations. For AuNPs with diameters in the range of 3–15 nm, the sizing calibration curve is based on the measurement of the ratio between the absorption intensities at the plasmon resonance wavelength and at 450 nm. We also have demonstrated the application of absorption spectroscopy and DLS methods to estimation of ssDNA concentration.

Conclusion: The advantages and drawbacks of three methods (TEM, DLS, and absorption spectroscopy) in nanoparticle sizing have been discussed with a special attention to AuNPs. For spherical particles, the z-average DLS size of AuNPs is in a reasonable agreement with TEM data, whereas the size distribution obtained with DLS is typically much broader than that derived from TEM histograms. DLS is shown to be the only method suitable for nonperturbative and sensitive diagnostics of relatively slow aggregation processes with characteristic times about 1 min. The detection limits of absorption spectroscopy and DLS for ssDNA detection are 100 and 10 pM, respectively.

Key words: silica nanoparticles, gold nanoparticles, particle size distribution, dynamic light scattering, electron microscopy, absorption spectroscopy, oligonucleotides, nanoparticle aggregation.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 16-02-00054, 16-52-45026, and 17-02-00075). The work by Vitaly A. Khanadeev was also supported by a grant from the President of Russian Federation (project no. MK-2617.2017.2).

References

- Berne B. J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics.* Minerva, New York, Dover Publ., 2000. 384 p.
- Roebben G., Ramirez-Garcia S., Hackley V. A., Roesslein M., Klaessig F., Kestens V., Lynch I., Garner C. M., Rawle A., Elder A., Colvin V. L., Kreyling W., Krug H. F., Lewicka, Z. A., McNeil S., Nel A., Patri A., Wick P., Wiesner M., Xia T., Oberdörster G., Dawson K. A. Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment. *J. Nanopart. Res.*, 2011, vol. 13, pp. 2675–2687.



3. Speed D., Westerhoff P., Sierra-Alvarez R., Draper R., Pantano P., Aravamudhan S., Chen K. L., Hristovski K., Herckes P., Bi X., Yang Y., Zeng C., Otero-Gonzalez L., Mikoryak C., Wilson B. A., Kosaraju K., Tarannum M., Crawford S., Yi P., Liu X., Babu S. V., Moinpour M., Ranville J., Montano M., Corredor C., Posner J., Shadman F. Physical, chemical, and *in vitro* toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry: Towards environmental health and safety assessments. *Environ. Sci.: Nano*, 2015, vol. 2, pp. 227–244.
4. Gambinossi F., Mylon S. E., Ferri J. K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles. *Adv. Colloid. Interfac.*, 2015, vol. 222, pp. 332–349.
5. Zhu X., Li J., He H., Huang M., Zhang X., Wang S. Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, vol. 74, pp. 113–133.
6. Zheng T., Bott S., Huo Q. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2016, vol. 8, pp. 21585–21594.
7. Siddiqi K. S., Husen A. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2017, vol. 40, pp. 10–23.
8. Dykman L. A., Bogatyrev V. A., Shchyogolev S. Yu., Khlebtsov N. G. *Zolotyie nanochastitsy: Sintez, svoystva, biomeditsinskoe primeneniye* [Gold Nanoparticles. Synthesis, Properties, and Biomedical Applications]. Moscow, Nauka Publ., 2008. 319 p. (in Russian).
9. Khlebtsov N. G., Dykman L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2010, vol. 111, pp. 1–35.
10. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, pp. 2256–2282.
11. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Englebienne P. A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates: application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method. *Colloid J.*, 2003, vol. 65, pp. 622–635.
12. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal. Chem.*, 2009, vol. 81, pp. 9425–9432.
13. Kalluri J. R., Arbneshi T., Khan S. A., Neely A., Candice P., Varisli B. Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay: Selective detection of arsenic in groundwater. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, vol. 48, pp. 9668–9671.
14. Bell N. C., Minelli C., Shard A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement. *Anal. Methods*, 2013, vol. 5, pp. 4591–4601.
15. Alex S. A., Chakraborty D., Chandrasekaran N., Mukherjee A. A. comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization. *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, pp. 52683–52694.
16. Sutariya P. G., Pandya A., Lodha A., Menon S. K. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity, using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, 2016, vol. 147, pp. 590–597.
17. Liu X., Huo Q. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering. *J. Immunol. Methods*, 2009, vol. 349, pp. 38–44.
18. Miao X., Zou S., Zhang H., Ling L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2014, vol. 191, pp. 396–400.
19. Witten K. G., Bretschneider J. C., Eckert T., Richtering W., Simon U. Assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles studied by UV/Vis-spectroscopy and dynamic light scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, vol. 10, pp. 1870–1875.
20. *Dynamic Light Scattering (DLS)*, Malvern, UK. Available at: <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx> (accessed 04 January 2017).
21. Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J.*, 2011, vol. 73, pp. 118–127.
22. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Pylaev T. E., Khlebtsov N. G. Dynamic Light Scattering Method in Studies of Silica and Gold Nanoparticles. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 71–84 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84.
23. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra. *Langmuir*, 2008, vol. 24, pp. 8964–8970.
24. Khanadeev V. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores: experiment and simulations. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2017, vol. 187, pp. 1–9.
25. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Melnikov A. G. Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates. *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, vol. 180, pp. 436–445.
26. Haiss W., Thanh N. T. K., Aveyard J., Fernig D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79, pp. 4215–4221.
27. Njoki P. N., Lim I.-I. S., Mott D., Park H.-Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C.-J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, pp. 14664–14669.
28. Khlebtsov N. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, pp. 6620–6625.



29. Pylaev T., Khanadeev V., Khlebtsov B., Dykman L., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanorods and nanospheres: A comparative study. *Nanotechnology*, 2011, vol. 22, p. 285501 (11 pp).
30. Amendola V., Meneghetti M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2009, vol. 113, pp. 4277–4285.
31. Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.*, 2006, vol. 6, pp. 662–668.
32. Scaffardi L. B., Tocho J. O. Size dependence of refractive index of gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 2006, vol. 17, p. 1309–1315.
33. Sancho-Parramon J. Surface plasmon resonance broadening of metallic particles in the quasi-static approximation: a numerical study of size confinement and interparticle interaction effects. *Nanotechnology*, 2009, vol. 20, p. 235706 (7 pp).
34. Maltsev V. P., Chernyshev A. V., Semyanov K. A., Soini E. Absolute real-time measurement of particle size distribution with the flying light-scattering indicatrix method. *Appl. Opt.*, 1996, vol. 35, pp. 3275–3280.
35. Shifrin K. S., Tonna G. Inverse problems related to light scattering in the atmosphere and ocean. *Advances in Geophysics*. New York, Academic Press, 1993, vol. 34, pp. 175–252.
36. Khlebtsov B. N., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Spectra of resonance light scattering of gold nanoshells: effects of polydispersity and limited electron free path. *Opt. Spectrosc.*, 2007, vol. 102, pp. 233–241.
37. Van der Zande B. M. I., Dhont Jan K. G., Bohmer Marcel R., Philipse A. P. Colloidal dispersions of gold rods characterized by dynamic light scattering and electrophoresis. *Langmuir*, 2000, vol. 16, pp. 459–464.
38. Rodríguez-Fernández J., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L. M., Lang P. R. Dynamic light scattering of short Au rods with low aspect ratios. *J. Phys. Chem. C*, 2007, vol. 111, pp. 5020–5025.
39. Khlebtsov N. G. On the dependence of the light scattering intensity on the averaged size of polydisperse particles: comments on the paper by M. S. Dyuzheva *et al.* (*Colloid J.*, 2002, vol. 64, no. 1, p. 39). *Colloid J.*, 2003, vol. 65, no. 5, pp. 652–655.
40. Klyubin V. V., Bungov V. N. A comparison of results obtained by solution of the inverse problem of correlation spectroscopy with the use of the CONTIN and KLUB packages. *Colloid J.*, 1998, vol. 60, pp. 313–318.
41. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Krasnov Ya. M. Differential light scattering spectroscopy: a new approach to studies of colloidal gold nanosensors. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2004, vol. 89, pp. 133–142.
42. Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Measurement of mean size and evaluation of polydispersity of gold nanoparticles from spectra of optical absorption and scattering. *Opt. Spectrosc.*, 2004, vol. 96, pp. 128–135.
43. Khlebtsov B. N., Zharov V. P., Melnikov A. G., Tuchin V. V., Khlebtsov N. G. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology*, 2006, vol. 17, pp. 5167–5179.
44. He W., Huang C. Z., Li Y. F., Xie J. P., Yang R. G., Zhou P. F., Wang J. One-step label-free optical genosensing system for sequence-specific DNA related to the human immunodeficiency virus based on the measurements of light scattering signals of gold nanorods. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, pp. 8424–8430.
45. Darbha G. K., Ra U. S., Singh A. K., Ray P. C. Gold nanorod based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA using hyper Rayleigh scattering spectroscopy. *Chem. Eur. J.*, 2008, vol. 14, pp. 3896–3903.
46. Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C. Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation. *Anal. Chim. Acta*, 2010, vol. 673, pp. 179–184.

Cite this article as:

Khlebtsov B. N., Pylaev T. E., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Application of Dynamic Light Scattering and Absorption Spectroscopy to Studies of Systems with Colloidal Gold Nanoparticles + DNA. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 136–149 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149.
