

Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии

Л.А.Дыкман, В.А.Богатырев

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13, факс (8452)97–0383*

Представлены данные о синтезе, функционализации и использовании в биологических исследованиях наночастиц золота. Особое внимание уделено применению коллоидного золота в твердофазных методах анализа, иммуноанализе и для изучения биологически активных веществ методами колебательной спектроскопии. Отдельный раздел посвящен применению наночастиц золота в качестве носителей антигенов при иммунизации.
Библиография — 406 ссылок.

Оглавление

I. Введение	199
II. Методы получения коллоидного золота	201
III. Функционализация наночастиц золота	203
IV. Коллоидное золото в твердофазных методах анализа	204
V. Использование коллоидного золота для количественного определения белков	205
VI. Применение наночастиц золота в исследованиях биологически активных веществ методами колебательной спектроскопии	206
VII. Наночастицы золота — носители антигенов	206

I. Введение

Золото — один из первых открытых человеком металлов, и история его изучения насчитывает несколько тысяч лет. Первые сведения о коллоидном золоте (КЗ) можно найти в трактатах китайских, арабских и индийских ученых, которые уже в V–IV веках до нашей эры получали КЗ и использовали его, в частности, в лечебных целях. В средние века в Европе алхимики активно изучали и применяли КЗ. Возможно, что удивительные цветовые превращения, которые сопровождали конденсацию атомов золота, полученных восстановлением из растворов солей, приводили алхимиков к мысли о превращении элементов, причем КЗ считали панацеей.¹ Так, Парацельс писал о терапевтических свойствах «quinta essentia aurig», полученной им восстановлением хлорида золота спиртовыми растительными экстрактами. Врач французского короля Людовика XIII алхимик Давид де Плани-Кампи в

1583 г. рекомендовал ему использовать для продления жизни «эликсир долголетия» — коллоидный раствор золота в воде. Первая из дошедших до нас книг, посвященных КЗ, была опубликована в 1618 г. философом и доктором медицины Франциском Антониом.² В ней содержались сведения о получении КЗ и его медицинском применении, включая практические советы. С середины XVII века КЗ начали использовать для производства красных («рубиновых») стекол, росписи фарфора (Кассиев пурпур), окраски шелка.

Началом научных исследований КЗ следует считать середину XIX века, когда вышла статья Майкла Фарадея,³ посвященная методам синтеза и свойствам КЗ. В этой статье Фарадей впервые описал агрегацию КЗ в присутствии электролитов, защитный эффект желатина и других высокомолекулярных соединений, свойства тонких пленок КЗ. Приготовленные им растворы коллоидного золота до сих пор хранятся в Лондонском королевском институте.

В конце XIX–начале XX века Рихард Зигмонди (Жигмонди)^{4,5} опубликовал ряд фундаментальных работ, посвященных изучению свойств КЗ. Им были впервые описаны способы синтеза КЗ с различными размерами частиц при использовании в качестве восстановителей пероксида водорода, формальдегида, белого фосфора, а также приведены важнейшие физико-химические (в том числе оптические) свойства золей золота. Коллоидное золото было использовано им в качестве основного экспериментального объекта при создании (совместно с Г.Ф.В.Зидентопфом) ультрамикроскопа. В 1925 г. Зигмонди была присуждена Нобелевская премия по химии «за установление гетерогенной природы коллоидных растворов и за разработанные в этой связи методы, имеющие фундаментальное значение в современной коллоидной химии».

Л.А.Дыкман. Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физической химии клеточных структур ИБФРМ РАН. Телефон: (8452)97–0403, e-mail: dykman@ibppm.sgu.ru
Область научных интересов: иммунология, иммунохимия, коллоидная химия и оптика золотых золей.
В.А.Богатырев. Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биосенсоров на основе наноразмерных структур того же института. Телефон: (8452)97–0403, e-mail: bog@ibppm.sgu.ru
Область научных интересов: коллоидная химия, биофизика, иммунохимия, нанотехнология, микроскопия.

Дата поступления 17 октября 2006 г.

К классическим работам по получению, анализу механизмов формирования КЗ и исследованию его седиментационных свойств (с помощью изобретенной им ультрацентрифуги) относятся работы еще одного Нобелевского лауреата — Теодора Сведберга.⁶ Он изучил кинетику восстановления галогенидов золота и сформулировал основные представления о механизме формирования (химической конденсации) коллоидных частиц золота.

В последующем вышел целый ряд работ^{7–11}, посвященных различным методикам синтеза золей золота, основанным как на дезинтеграции металлического золота электрической дугой, так и (в основном) на синтезе коллоидных частиц из галогенидов золота с использованием химических восстановителей или облучения.

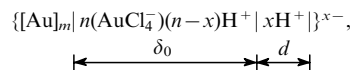
В настоящее время КЗ используется учеными как превосходный объект для изучения оптических свойств частиц металлов^{12–15} и фрактальных кластеров,¹⁶ механизмов агрегации и стабилизации коллоидов;^{17–21} оно применяется в аналитической химии,^{22,23} в геомикробиологии и геобиохимии,²⁴ в фотографии.²⁵ Коллоидное золото в отличие от кристаллического золота обладает выраженной каталитической активностью.²⁶ Имобилизованное на поверхности электродов КЗ используется для изучения каталитических процессов и электронного транспорта в биомакромолекулах.²⁷

Известны примеры применения КЗ в медицине, в частности в цветных реакциях на белки, содержащиеся в спинномозговой жидкости и сыворотке крови.^{28,29} Предложенные для этих целей методы основаны на свойстве белков служить (в зависимости от их физико-химических свойств) либо флокулянтами, либо стабилизаторами частиц коллоидного золота. Разработаны способы лечения ревматоидного артрита с использованием растворов КЗ.³⁰ Коллоидные растворы изотопа золота ¹⁹⁸Au (период полураспада 65 ч) успешно применяются в терапевтических целях в онкологической практике.³¹ Нерадиоактивное КЗ активно используют для диагностики и лечения раковых заболеваний.^{32–35}

Частицы золота применяют для изучения транспорта веществ в клетку путем эндоцитоза,³⁶ для доставки генетического материала в клеточное ядро методом биолиственной трансфекции,³⁷ а также для адресной доставки лекарственных веществ.³⁸

Однако наиболее широкое применение в медицине КЗ нашло в качестве иммунохимических маркеров. Идеальный маркер должен быть легко различим в электронном микроскопе, иметь заданный размер, форму и структуру, быть стабильным к процессам агрегации, прочно связываться с биомолекулами и при этом не снижать их активность. Всем этим требованиям удовлетворяет КЗ. Впервые конъюгат КЗ с иммуноглобулинами был применен в качестве иммунохимического маркера в 1971 г.,³⁹ а после появления в 1973 г. работы Френса,⁴⁰ посвященной методам синтеза КЗ с определенным, заранее заданным размером частиц, началось активнейшее использование биоспецифических маркеров на основе КЗ в различных областях биологии. Обширную информацию по важнейшим аспектам получения и использования иммунохимических маркеров на основе КЗ в биологии и медицине можно найти в книгах^{41–43} и обзорах^{44–47}.

Коллоидная частица золота состоит из кристаллического ядра $[Au]_m$, на поверхности которого адсорбированы ионы $AuCl_4^-$, определяющие отрицательный заряд коллоидной частицы золота. Ионы $AuCl_4^-$ составляют внутренний слой двойного ионного (электрического) слоя и определяют величину потенциала адсорбции. Ионы H^+ находятся в интермицеллярном растворе (одна часть располагается в адсорбционной области, а другая — в диффузной области двойного электрического слоя). Условно мицеллу золота можно представить следующим образом:



где $[Au]_m$ — ядро мицеллы (m — число атомов золота, которое может меняться от нескольких сотен до миллионов), n — количество адсорбированных ионов $AuCl_4^-$ ($n \ll m$), δ_0 — толщина адсорбционного слоя, d — толщина диффузной части двойного электрического слоя.⁴⁸

Высокая электронная плотность, способность рассеивать и излучать вторичные электроны, характерное поглощение и рассеяние в видимой области спектра электромагнитных излучений, интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяют легко обнаруживать частицы золота с помощью различных физико-химических методов (микроскопии,[†] фотометрии, проточной цитометрии и др.). Возможность получения золей золота с различными размерами частиц и их узким распределением обеспечивает высокое разрешение этих методов, а кроме того, позволяет вводить метку одновременно по двум и более антигенам (или иным лигандам). Размеры частиц КЗ после проведения соответствующей иммунохимической реакции можно увеличить с помощью реакции усиления солями серебра⁴⁹ или золота (автометаллография),⁵⁰ что существенно раздвигает границы применимости описанных методов.

В последние 10–15 лет расширилась область применения наночастиц металлов (в частности, золота) в качестве эффективных оптических преобразователей результатов биоспецифических взаимодействий (например, антитело–антиген, адсорбированный на частицах КЗ) в детектируемый оптический сигнал в устройствах, называемых биочипами и биосенсорами.⁵¹ В основе работы таких устройств лежат уникальные оптические свойства КЗ, в частности, явление поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance (SPR), см. ниже).⁵² Для регистрации изменений физико-химических параметров биочипов и биосенсоров, происходящих в процессе биоспецифической реакции, используют визуальные наблюдения, а также методы светорассеяния, колебательной спектроскопии и др.

В настоящее время опубликовано большое число работ, описывающих биоспецифические взаимодействия биомолекул, адсорбированных на наночастицах золота, в системах, где наночастицы представлены в виде упорядоченных самосборных структур (тонких пленок)⁵³ или входят в состав полимерных матриц.⁵⁴ Подобные структуры активно используются для детектирования биомолекул и микроорганизмов, для создания ДНК-чипов и т.д. В таких системах благодаря усилению возбуждающего локального поля в сформировавшемся из наночастиц золота агрегате происходит резкое усиление оптического сигнала от маркера.

Среди наноразмерных структур, фундаментальные исследования которых сейчас активно развиваются, особый интерес вызывают кластеры. Последние занимают промежуточное положение между отдельными атомами и твердыми телами и проявляют свойства, отличные от свойств тех и других. В частности, их физические характеристики существенно зависят от вида и числа входящих в них атомов, причем ослабление этой зависимости с ростом числа атомов свидетельствует о переходе материала из кластерного состояния в объемное (квантово-размерные эффекты). Среди кластеров простых веществ особое место занимают кластеры металлов (типичный пример — наночастицы золота). Пристальное внимание к ним объясняется особенностями их электронной структуры, а также относительной простотой получения.

[†] Кроме традиционной трансмиссионной электронной микроскопии широко применяют сканирующую электронную микроскопию, световую и различные варианты зондовой микроскопии.

Началом современного этапа развития физики кластеров металлов можно считать экспериментальное открытие у них в 1993 г. оболочечной электронной структуры, которая во многом напоминает оболочечную структуру атомов.^{55, 56} Практически одновременно с экспериментальным открытием электронных оболочек у многоатомных кластеров существование таких оболочек было подтверждено и теоретически.

В основу теоретического подхода было положено свойство валентных электронов металла покидать свои атомы (делокализовываться) и образовывать зону проводимости. Оказалось, что именно эти обобществленные электроны определяют энергетическую структуру кластера и его необычные «коллективные» свойства.⁵⁷ В частности, делокализованные электроны в металлическом кластере влияют на характер поведения кластера в процессах взаимодействия с внешними полями. Так, в результате исследований взаимодействий кластеров металлов с электромагнитными полями, которые интенсивно проводятся в последние годы, было обнаружено, что в спектрах поглощения электромагнитной энергии наблюдаются гигантские максимумы — резонансы. Эти резонансы связаны с возбуждением коллективных колебаний электронной системы, аналогичных плазменным колебаниям электронного газа в плазме и макроскопических металлических телах. Такие колебания называются плазмонными, а резонанс — поверхностным плазмонным резонансом. Амплитуда и частотный диапазон плазмонного резонанса в кластерах отличаются от таковых в макроскопических кристаллах.

Если частицы формируют агрегаты, соответствующий плазмонный пик смещается в сторону длинных волн или уширяется в результате диполь-дипольного взаимодействия индуцированных светом дипольных моментов частиц в агрегате.⁵⁸ Таким образом, оптические возбуждения в агрегатах, построенных из наночастиц металла, имеют коллективную природу. В результате локальные оптические поля, действующие на металлическую частицу во фрактальном агрегате, могут значительно превышать среднее поле, что приводит к гигантским нелинейным эффектам.⁵⁹

Принципиально важно, что оптический отклик от наночастиц или их агрегатов (особенно упорядоченных) существенно зависит от размера и формы частиц, межчастичного расстояния, а также от их локального диэлектрического окружения.⁶⁰ Это дает возможность настраивать оптические параметры сенсоров.

Получение и практическое применение биосенсоров на основе наночастиц металлов рассмотрены в обзорах^{51, 61–68}. При создании биосенсорных устройств в настоящее время используют новые уникальные технологии, в частности монослойную самосборку металлических частиц,⁶⁹ нанолитографию,⁷⁰ вакуумное испарение⁷¹ и др. Биосенсоры на основе наночастиц золота применяют в иммуноанализе,⁷² для определения нуклеотидных последовательностей.^{73, 74} Недавно были получены^{75, 76} рекордные показатели чувствительности (в септомолярном диапазоне) подобных сенсоров и показана возможность регистрации спектров резонансного рассеяния от отдельных частиц. Это открывает путь к регистрации межмолекулярных взаимодействий на уровне индивидуальных молекул.⁷⁷

Уникальные оптические свойства наночастиц серебра и золота, обусловленные локализованным поверхностным плазмонным резонансом, в настоящее время широко используются в одноэлектронных транзисторах,⁷⁸ в оптической микроскопии ближнего поля,⁷⁹ в усиленном поверхностно-комбинационном рассеянии⁸⁰ (в том числе и на уровне отдельных молекул⁸¹), в SPR-микроскопии, SPR-спектроскопии⁸² и др. Оптические свойства металлических наночастиц и их конъюгатов с биомакромолекулами рассмотрены в обзорах^{83–88}.

В настоящем обзоре представлены данные о различных методах синтеза и функционализации наночастиц золота и их использовании в биологических исследованиях. Особое внимание уделено применению частиц коллоидного золота в твердофазных методах анализа, в иммуноанализе и при исследовании биомолекул методами колебательной спектроскопии (мы практически не будем касаться вопросов использования наночастиц золота в электронно-микроскопических методах анализа). Отдельный раздел посвящен использованию наночастиц золота в качестве носителей антигенов при иммунизации.

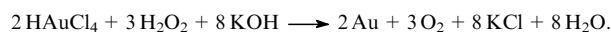
II. Методы получения коллоидного золота

Методы синтеза КЗ (и других коллоидов металлов) можно условно разделить на две большие группы — на дисперсионные (диспергирование металлов) и конденсационные методы (восстановление соответствующих солей металлов).

Дисперсионные методы приготовления КЗ основаны на разрушении кристаллической решетки металлического золота под действием электрического тока высокого напряжения. Если в жидкости между двумя золотыми электродами под действием электрического тока образуется электрическая дуга, то при ее «горении» происходит перенос вещества между электродами, сопровождающийся образованием КЗ. На выход и форму частиц золота, образующихся под действием электрического тока, помимо напряжения между электродами и силы тока влияет также наличие в растворе электролитов. При использовании постоянного тока образуются неоднородные по величине частицы золота. Добавление даже очень малых количеств щелочей или хлоридов и применение для распыления переменного тока высокой частоты существенно улучшают качество гидрозолей золота.

Конденсационные методы более распространены, чем дисперсионные. Наиболее часто КЗ получают восстановлением галогенидов золота (например, HAuCl_4) с использованием химических восстановителей и/или облучения (γ - и УФ-облучения, импульсного или лазерного радиолиза).^{47, 89} В качестве химических восстановителей используют различные органические и неорганические соединения.²³ В пионерских работах Фарадея и Зигмонди^{3, 4} восстановителями служили, в частности, формальдегид, этанол и белый фосфор. Эти вещества и в настоящее время с успехом используются для получения золей со средним диаметром частиц 5–12 нм.^{90, 91} Помимо этих восстановителей для синтеза золей золота применяют цитрат натрия⁹² (для получения КЗ со средним диаметром частиц 20 нм), аскорбиновую кислоту⁹³ (12 нм), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА)⁸ (20 нм), цитрат натрия вместе с таннином (~5 нм),^{94, 95} а также боргидрид натрия,⁹⁶ боргидрид вместе с цитратом натрия⁹⁷ или ЭДТА⁹⁸ и цианоборгидрид⁹⁹ (для получения частиц диаметром ~5 нм). С целью получения ультрадисперсных золей (диаметр частиц 2–3 нм) используют тиоцианат натрия или калия.¹⁰⁰ Другие восстановители, такие как щавелевая и винная кислоты, монооксид углерода, хлорид олова, гидразин, пероксид водорода, сахара, фенолы, ароматические альдегиды, эфирные масла и многие другие вещества (вплоть до водного экстракта голландских сигар),⁹⁰ активно применявшиеся для синтеза КЗ в начале XX века, в настоящее время уже не используются.

Зигмонди и Сведберг^{5, 6} изучили кинетику процесса восстановления растворов галогенидов золота и сформулировали основные представления о механизме формирования частиц золота на примере восстановления HAuCl_4 пероксидом водорода



В результате данной реакции образуется только один электродит, следовательно, за ее ходом можно наблюдать кондуктометрически.

Согласно Зигмонди и Сведбергу, вначале восстанавливается $\sim 30\%$ HAuCl_4 (при этом образуется высокопересыщенный раствор золота, концентрация атомарного металла в котором на 6 порядков превышает таковую в насыщенном растворе), после чего процесс резко замедляется. На медленной стадии происходит конденсация золота с образованием очень мелких частиц (зародышей новой фазы). Последние объединяются в крупные, но нестабильные агрегаты (коагуляция с последующей пептизацией), при этом раствор золя приобретает синюю окраску. Частицы, входящие в агрегаты, постепенно укрупняются и становятся центрами дальнейшего быстрого восстановления HAuCl_4 . При достижении зародышами определенного критического размера образуется устойчивый золь, имеющий красную окраску.

Учитывая конденсационный механизм формирования коллоидной фазы, можно выделить ряд параметров, определяющих степень дисперсности суспензий золота. Очевидно, что скорость образования зародышей новой фазы зависит от концентрации реагирующих веществ и химической природы восстановителя. При низкой скорости возникновения зародышей и достаточно высокой скорости конденсации частиц (низкая степень пересыщения раствора HAuCl_4) образуется малое количество сравнительно крупных частиц. При высокой скорости возникновения зародышей и сравнительно малой скорости конденсации частиц (высокая степень пересыщения раствора HAuCl_4) увеличивается вероятность образования частиц малого размера. Увеличение концентрации восстановителя лимитируется агрегативной устойчивостью коллоидного золота — достаточно высокая устойчивость достижима лишь в средах с низкой ионной силой.

При самопроизвольном образовании зародышей чем больше образуется зародышевых центров, тем более тонкодисперсными будут золи. При этом в большинстве случаев образование зародышей и их рост происходят одновременно (т.е. восстановленный металл расходуется сразу на оба процесса). Замедление скорости образования зародышей приводит к более грубодисперсному гидрозолу, а замедление скорости роста частиц — к тонкодисперсному. Исследования многочисленных золей золота, полученных с помощью химического восстановления, показали, что большинство из них имеют ограниченную стабильность и широкое распределение частиц по размерам.¹⁰¹ Только метод Френса,⁴⁰ в котором для восстановления HAuCl_4 используется цитрат натрия, позволяет получать сравнительно монодисперсные частицы диаметром 10–60 нм.

Чтобы получить золь с узким распределением частиц Au по размерам, Зигмонди предложил вносить в раствор HAuCl_4 заранее синтезированные зародыши Au, на которых будет происходить конденсация. При этом восстанавливающими агентами могут служить цитрат натрия или гидроксил-амин.^{102–104} Изодисперсные и изоморфные золи образуются только при условии предотвращения образования новых зародышей. Как правило, это достигается проведением процесса в две стадии. Сначала формируются зародыши новой фазы, а затем в золе создается слабое пересыщение, при котором новые зародыши уже не образуются, а идет только рост уже образовавшихся.¹⁰⁵

Другой способ получения монодисперсных золей золота предложен в работе¹⁰⁶. Суть его заключается в восстановлении концентрированного раствора HAuCl_4 ($0.5 \text{ моль} \cdot \text{мл}^{-1}$) изоаскорбиновой кислотой в присутствии защитного коллоида — гуммиарабика. В этих условиях наряду с конденсацией происходит агрегация, в результате чего образуются практически монодисперсные сферические частицы золота

диаметром от 80 нм до 5 мкм (в зависимости от кислотности среды и концентрации восстановителя).

Для получения наночастиц золота используют также микроэмульсионный двухфазный метод. На первой стадии металлосодержащие реагенты переводят из водной фазы в органическую. После добавления в эту систему раствора ПАВ происходит образование микроэмульсии — дисперсии двух несмешивающихся жидкостей. При этом реакция восстановления протекает в дисперсной фазе, размер капель которой не превышает 100 нм. В результате образуются практически монодисперсные золи.¹⁰⁷ Позже был разработан однофазный метод без использования водных растворов.¹⁰⁸

Часто при микроэмульсионных методах синтеза КЗ в раствор добавляют алкантиолы, которые образуют на поверхности золота плотные самоорганизованные монослои. Таким путем были получены самосборные двух- и трехмерные ансамбли из наночастиц золота.^{109–111} Некоторые лиганды, такие как алкантиолы, амины, силаны, фосфины и галогениды, способны участвовать в расщепительном (digestive ripening) созревании (digestive ripening) — процессе, в котором коллоидная суспензия при кипячении в растворителе с поверхностно-активными лигандами превращается из полидисперсной системы в монодисперсную.¹¹²

В последнее время для синтеза монодисперсных КЗ стали использовать синтетические полимеры — полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленмин, поливинилпирролидон, поливинилацетат, полиамидоамин (дендример), полидитиафульвен, хитозан и др.^{113–117} Частицы, сформированные в присутствии этих полимеров, отличаются большой однородностью размеров и формы.^{118,119} При этом в качестве восстановителей можно использовать боргидрид натрия,^{120,121} спирты и простые эфиры,¹²² гидразин,¹²³ дифениламиносульфонат натрия,¹²⁴ а также УЗ-излучение.¹²⁵ В работе¹²⁶ восстановителем служил тирозин в составе полифункционального пептида. Выбирая тот или иной восстановитель и принимая во внимание особенности кинетики формирования коллоидной фазы, можно получать КЗ с заданным размером частиц.^{127–130} В работе¹³¹ описан метод синтеза маркера на лектины с использованием ПЭГ, модифицированного сахарами и тиогруппами.

Физические (основанные на использовании УЗ-, УФ-, ИК-или ионизирующего излучения, а также лазерного фотолито)^{8,9,132–138} и электрохимические¹³⁹ методы восстановления гораздо менее популярны, чем химические. К достоинствам этих методов следует отнести отсутствие в образующихся золях (собственно на поверхности металлических частиц) примесных остатков химических соединений.¹⁴⁰

В электронно-микроскопических биологических исследованиях в качестве метки применяют кластеры золота, состоящие из 11–67 атомов (undecagold, «NanogoldTM»), диаметром 0.82–1.4 нм. Их получают восстановлением триарилфосфинового комплекса золота боргидридом натрия^{11,141,142} или восстановлением HAuCl_4 в метаноле действием глутатиона.^{143,144}

Новым направлением в нанобиотехнологии стало использование для синтеза КЗ микроорганизмов, клеток растений и животных.^{145–148}

В последнее время в связи с применением КЗ в биосенсорных устройствах сильно возрос спрос на частицы КЗ, равномерно распределенные в полимерных матрицах, и на частицы, состоящие из металлического ядра и диэлектрической оболочки,^{149–151} а также на частицы несферической формы (сфероиды, стержни, пепочки)^{*} и на оболочечные и планарные структуры.^{152–162} Последние получают восста-

* Известно, что форма частиц радикально влияет на их оптические свойства.

новлением солей золота в обратных мицеллах,¹⁶³ фотохимическим методом,¹⁶⁴ а также с использованием пористых алюминиевых или кварцевых шаблонов и углеродных нанотрубок.^{165, 166} Эти методы применялись и для синтеза композитных структур, например золото-железных (обладающих магнитными свойствами),¹⁶⁷ золото-серебряных^{168, 169} и других биметаллических наночастиц.⁴⁷

III. Функционализация наночастиц золота

Гидрозоль золота — типичный лиофобный коллоид, частицы которого несут на поверхности большой отрицательный заряд (поверхностный потенциал ~ 50 мВ),¹⁷⁰ поэтому он устойчив лишь при низкой ионной силе раствора. У лиофобных систем дисперсионная среда и дисперсная фаза существенно различаются по химическому составу и строению на границе раздела, что проявляется в нескомпенсированности поверхностных сил на межфазной границе. Такие системы термодинамически неустойчивы и требуют специальной стабилизации.^{17, 170, 171}

Устойчивость золя можно повысить, покрыв частицы полимерным слоем (конъюгация с полимером).^{18–21, 172} Такой способ стабилизации был предложен еще Фарадеем, изучавшим защитные свойства желатина.³ Добавка даже незначительного количества полимера (особенно полиэлектролитов) к лиофобным коллоидам способна существенно повысить их агрегативную устойчивость.

Образование на поверхности частиц адсорбированного полимерного слоя уменьшает межфазное натяжение благодаря усилению взаимодействия дисперсной фазы с дисперсионной средой. При этом значительно увеличивается энтропийная составляющая системы (за счет участия молекул и ионов поверхностного слоя в тепловом движении вместе с частицами дисперсной фазы), в результате чего агрегативная устойчивость системы повышается. Адсорбционный слой способствует образованию сольватного слоя. В итоге поверхность частиц лиофилизуется, и лиофобный золь становится гораздо менее чувствительным к коагуляции электролитами (благодаря электростатическим и гидрофобным взаимодействиям, а также структурно-механическому фактору устойчивости).

Эффективность стабилизации зависит от растворимости защитного полимера в дисперсионной среде, способности лиофобных частиц адсорбировать его на своей поверхности и от степени заполнения поверхности полимером.

Для защитного действия помимо молекулярной массы полимера важен заряд его функциональных групп. Полимеры, содержащие одновременно и кислотные, и основные группы (например, аналоги протеина), или слабоосновные поликатионные макромолекулы с рН-зависимым защитным действием являются наиболее эффективными стабилизаторами гидрозолей золота.^{19, 20, 173}

Способность полимеров (в том числе биоспецифических макромолекул) стабилизировать лиофобные коллоиды лежит в основе получения стабильных биоконъюгатов — комплексов КЗ с иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, гормонами, липопротеидами и т.д.¹⁷⁴

Среди способов «посадки» биоспецифических зондов на КЗ выделяют адсорбционный и хемосорбционный. Каждый из них имеет свои особенности. Согласно общепринятому мнению, стабилизация КЗ узнающими биомолекулами (функционализация) происходит путем пассивной адсорбции полимера на поверхности частицы за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий.^{43, 90} Сильный отрицательный заряд поверхности частиц золота обеспечивает их прочное адсорбционное взаимодействие с высокомолекулярными соединениями. В работе¹⁷⁵ сообщается также о кулоновском взаимодействии NH_2 -групп лизина, входящего в

состав адсорбированного на поверхности наночастиц золота белка, с цитрат-ионами.

В последнее время появились сообщения о важной роли SH-групп молекул цистеина в осуществлении процессов связывания белков с поверхностью частиц золота.¹⁷⁶

К преимуществам физической адсорбции относят минимальное воздействие частиц золота на структуру макромолекулы (зонда). Электростатическое (а не ковалентное) взаимодействие метки и зонда позволяет в наибольшей степени сохранить нативность зонда, а следовательно, активность и специфичность его взаимодействия с молекулой-мишенью. Однако при использовании этого способа получения биоконъюгатов всегда следует учитывать возможность десорбции узнающих молекул с поверхности наночастиц золота и их связывание с молекулами-мишенями. Основной особенностью адсорбции полимеров является то, что они обычно адсорбируются в количествах, намного превосходящих необходимые для образования мономолекулярного слоя. При адсорбции полимеров из разбавленных растворов на изотермах адсорбции не наблюдается перегибов, которые свидетельствовали бы о формировании дискретного монослоя, как это наблюдается для низкомолекулярных ПАВ. Это обусловлено образованием относительно большого числа контактов макромолекул с поверхностью. Одновременный разрыв этих контактов является статистически маловероятным,²⁰ поэтому адсорбция индивидуальных макромолекул в большинстве случаев носит необратимый характер.

Известно, что между атомами серы и золота образуется донорно-акцепторная связь,^{22, 177} поэтому для более прочной посадки биомолекул на частицы золота было предложено использовать алкантиольные линкеры $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{R}$ ($\text{R} = \text{COOH}, \text{OH}, \text{SO}_3\text{H}; n = 11–22$) (хемосорбционный способ).¹⁷⁸ При взаимодействии таких линкеров с золотом образуются тиолаты $[\text{Au}^0]_m \cdot \text{Au}^+ \text{S}^-(\text{CH}_2)_n\text{R}$,⁶⁹ организованные в монослой на поверхности частицы.

В 1996 г. Миркин и соавт.⁷³ предложили проводить тиолирование олигонуклеотидов по 5'-концу перед их посадкой на частицы золота размером 15 нм. В результате ими были получены очень стабильные (устойчивые к высоким и низким температурам) конъюгаты, которые они использовали для колориметрического определения ДНК в растворе. Для создания биоконъюгатов с частицами золота размерами 30 и 100 нм они предложили применять в качестве линкеров циклические дисульфиды¹⁷⁹ и трис(ω -меркаптогексилные) производные¹⁸⁰ соответственно. В работах^{168, 181} для получения конъюгатов с наночастицами золота (наносферами и наностержнями) использовали тиолированные белки — иммуноглобулины и авидин. Кроме алкантиолов в качестве линкеров применяют лиганды, содержащие фосфино-, amino- и карбоксильные группы.⁴⁷ Преимущества хемосорбции наиболее ярко проявляются в случае линейных молекул (например, ДНК), при адсорбции которых образуются структуры со строгой пространственной ориентацией закрепленных молекул.

Однако до сих пор самым популярным способом получения золотых маркеров для иммунохимических исследований остается нековалентная (адсорбционная) конъюгация, в наибольшей степени сохраняющая нативную структуру биомacroмолекул и, как следствие, их функциональные качества.

IV. Коллоидное золото в твердофазных методах анализа

На ранних этапах развития иммуноанализа предпочтение отдавалось жидкофазным методикам, однако в последнее время стали все чаще использовать твердофазные методики, поскольку они позволяют существенно упростить проведение эксперимента и уменьшить фоновый сигнал. Впервые

твердофазная методика была применена для радиоиммунного анализа белков.¹⁸²

Дело в том, что для осуществления жидкофазного анализа необходимо иметь раствор антигена (АГ), однако не все АГ растворимы в воде.⁸ Существует большое количество АГ, которые можно перевести в растворимое состояние, только вводя в раствор АГ диссоциирующие добавки, такие как додецилсульфат натрия, мочевины, гуанидинхлорид и др. Перечисленные диссоциирующие добавки препятствуют образованию иммунных комплексов.¹⁸³ Избежать подобных затруднений удастся, иммобилизовав АГ на твердых носителях. Наибольшее распространение среди твердофазных методов анализа получили микротитровальные планшеты и нитроцеллюлозные (НЦ) фильтры.¹⁸⁴

В качестве меток в мембранных тестах широко применяют радиоактивные изотопы (¹²⁵I, ¹⁴C, ³H) и ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу и др.),^{185–187} а в последнее время — КЗ. В 1984 г. вышло сразу несколько работ,^{188–191} в которых в качестве метки для твердофазного иммуноанализа было предложено использовать КЗ. Применение конъюгатов КЗ в методах твердофазного анализа обусловлено интенсивной красной окраской золотосодержащего маркера. По появлению окраски в процессе реакции можно визуальным образом судить о ее результате.^{192–194}

В работах^{195, 196} для неспецифического выявления белков на НЦ-фильтрах было предложено использовать «золотой краситель» (AuRoDye).[¶] В дальнейшем данный метод был развит и модифицирован.^{197–199} Метод неспецифического окрашивания белков золотым красителем достаточно прост, удобен и обладает высокой чувствительностью.²⁰⁰ Интенсивность окрашивания пропорциональна логарифму концентрации белка и его молекулярной массе.²⁰¹ В работе²⁰² предложен метод элюции связанного с КЗ белка и фотометрического определения концентрации белка по измерению светопоглощения образовавшегося комплекса при 540 нм. Золотой краситель использовали также для непосредственной окраски белков в геле,²⁰³ для выявления на блоте нуклеиновых кислот,²⁰⁴ для определения белков с помощью электронной микроскопии^{205, 206} и для колориметрического определения белков в растворе.²⁰⁷

При проведении анализа мембрану с нанесенным антигеном инкубируют в растворе соответствующих антител (АТ) (или других биоспецифических зондов), меченных КЗ. В качестве зондов при проведении «золотого» дот- или блот-анализа используют иммуноглобулины (Ig),^{189, 191, 208, 209} Fab- и scFv-фрагменты антител,^{123, 210} протеин А,^{188, 190} лектины,^{211, 212} ферменты,²⁰⁴ стрептавидин или антибиотинные АТ (при исследовании биотинилированных образцов)^{213, 214} и др. Для выявления различных АГ на мембране можно использовать одновременно несколько меток (например, КЗ и пероксидазу^{215, 216} или щелочную фосфатазу²¹⁷). Конъюгаты КЗ применяют также в тканевом блоте,²¹⁸ когда на НЦ-фильтры наносят отпечаток ткани и с помощью меченых зондов выявляют расположение искомым компонентов, и в линейном блоте.²¹⁹

Коллоидное золото в мембранных тестах применяли для диагностики паразитарных,^{220–223} вирусных^{224–227} и грибковых^{228, 229} заболеваний, туберкулеза,²³⁰ мелиоидоза,²³¹ сифилиса,²³² бруцеллеза,²³³ шигеллеза,²³⁴ для определения ранних сроков беременности²³⁵ и групп крови,²³⁶ для идентификации растительных АГ,^{237, 238} а также для дот-блот-гибридизации.²³⁹

§ К нерастворимым в воде АГ относится, например, широкий класс корпускулярных АГ, таких как целая бактериальная клетка.

¶ Золотой краситель представляет собой золь золота, частично стабилизированный полимерами типа ПЭГ 20М, Твин-20 и др.

Предпринимались попытки (на наш взгляд, не вполне убедительные) проводить окрашивание образцов препаратами КЗ в лунках микротитровальных планшетов^{240–244} или на поверхности покровного стекла,²⁴⁵ а также применять в твердофазном иммуноанализе вместо КЗ коллоидное серебро²⁴⁶ или угольные частицы.²⁴⁷ Более перспективным кажется употребление КЗ для анализа больших массивов АГ в микроматрицах (иммуночипах).²⁴⁸ Последний метод позволяет определять анализируемое вещество в концентрации 60–70 нг·л⁻¹. При этом, используя только микролитровые количества анализата и детектирующего иммунозолотого маркера, можно анализировать одновременно до 384 проб.

В зависимости от того, в каком виде антиген иммобилизован на мембране, различают иммунодот- и иммуноблот-методы анализа. С помощью первого анализируют нефракционированные образцы, а с помощью второго — предварительно фракционированные образцы. Иммунодот-анализ является одним из наиболее простых методов анализа АГ, иммобилизованных на мембранах, и в некоторых случаях позволяет оценить их количественное содержание. Чаще всего с помощью иммунодот-анализа исследуют растворимые АГ,²⁴⁹ однако известны работы, в которых в качестве исследуемого материала в технике дот-анализа с ферментной меткой или методе «colony blot» использовали целые бактериальные клетки.^{250–253} Впервые методика дот-анализа целых бактериальных клеток с визуализацией продуктов реакции биоспецифическими маркерами — конъюгатами КЗ (cell-gold immunoblotting) — была использована в работах^{254, 255} для серотипирования почвенных азотфиксирующих микроорганизмов. В дальнейшем этот метод был применен для диагностики кишечных инфекций.²⁵⁶

Существует зависимость чувствительности метки от размера частиц золота (с увеличением диаметра частиц (> 40 нм) возрастает коэффициент светоослабления).²⁵⁷ Не случайно большинство фирм-производителей золотых маркеров рекомендуют использовать в блот-анализе конъюгаты зонда с частицами КЗ диаметром 20–30 нм. В работах^{258, 259} при проведении дот-анализа для увеличения чувствительности использовали конъюгаты узнающих молекул с наночастицами золота в виде наностержней и наноболочек.

В 1990-х годах рядом зарубежных фирм был организован выпуск иммунохимических тест-систем для бесприборной диагностики. Благодаря высокой специфичности и чувствительности иммуноанализа эти тесты нашли широкое применение в определении наркотических соединений и токсинов, в ранней диагностике беременности, в скрининге особо опасных инфекций и урогенитальных заболеваний.^{260–267} В последнее время разрабатываются методы ДНК-гибридизации²⁶⁸ и диагностики туберкулеза.²⁶⁹ Наиболее интенсивно разрабатываемым и широко внедряемым в практику форматом экспрессных иммунотестов является иммунохроматография.

Иммунохроматографический анализ основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная диффузия), которое сопровождается образованием на разных участках мембраны специфических иммунных комплексов, визуализируемых как окрашенные полосы.²⁷⁰ В качестве меток в данных системах используют ферменты, окрашенные латексы, но чаще всего КЗ.^{271, 272}

Исследования таких тест-систем показали их высокую стабильность, воспроизводимость результатов и корреляцию с альтернативными методами. Денситометрическая характеристика степени неоднородности детектируемых полос дает величины в диапазоне 5–8%, что позволяет осуществлять вполне достоверную визуальную диагностику результатов анализа. Эти тесты крайне просты и удобны в применении. Однако технология изготовления компонентов таких тест-систем (в отличие от дот-блот-тестов) достаточно

сложна и является собственностью фирм-производителей, что ограничивает применение этих методов в обычной лабораторной практике.

V. Использование коллоидного золота для количественного определения белков

Метод дот-блот анализа с применением конъюгатов КЗ находит все более широкое признание и распространение благодаря высокой чувствительности и простоте исполнения. Однако этот метод имеет ряд ограничений, среди которых в первую очередь необходимо отметить трудности строгой количественной интерпретации результатов, сложность работы с низкомолекулярными лигандами и значительные затруднения, возникающие при выявлении компонентов сложных биологических систем (гомогенатов, экссудатов и др.).

В 1980 г. Лойверинг с соавт.²⁷³ предложил новый метод иммуноанализа, названный им иммуноанализом на частицах золя (sol particle immunoassay, SPIA). В этом методе используются два важных свойства золей золота: 1) типичный ярко-красный цвет золя, который практически не меняется при адсорбции на частицах золота высокомолекулярных соединений, и 2) изменение цвета золя при агрегации частиц золота, что регистрируется по изменению поглощения в видимой области спектра. Это изменение поглощения четко детектируется спектрофотометрически или визуально.

Метод SPIA довольно прост в исполнении. Растворы золотосодержащего маркера и исследуемого образца смешивают в реакционном сосуде и в течение инкубационного периода (0.5–2 ч) контролируют спектрофотометрические характеристики суспензии либо визуально оценивают ее цвет. Если в результате протекания на поверхности КЗ биоспецифической реакции происходит дестабилизация золя, приводящая к агрегации частиц золота (при использовании поликлональных АТ этот процесс называется агглютинацией), то в спектре поглощения суспензии наблюдаются существенные изменения, связанные с заметным изменением ее цвета (с красного на голубой или серый). Для количественного определения антигенов можно применять спектрофотометры и колориметры.

Авторы работ^{274–277} модифицировали и оптимизировали данный метод для выявления в моче беременных хорионического гонадотропина (они использовали частицы золота более крупных размеров и моноклональные антитела к различным участкам антигенов). На основе их разработок фирмой «Chefaro» (Нидерланды) был выпущен набор DiscretestTM для внебольничной ранней диагностики беременности. Фирмой «ПЛИВА-Лахема» (Чехия) выпускаются наборы для иммуноколориметрического определения ревматоидного фактора и стрептолизина.

В дальнейшем этот метод был применен для иммуноанализа антигенов шистозом,²⁷⁸ рубелл,²⁷⁹ для определения констант аффинности различных изоформ мышечных моноклональных IgG,²⁸⁰ а также для количественного определения иммуноглобулинов^{281, 282} и цистатина С (эндогенного маркера фильтрационной способности почечных гломерул).²⁸³

В 2002 г. вышла работа²⁸⁴, в которой авторы, «переоткрыв» данный метод, использовали его для количественного определения антител к протеину А с помощью конъюгата протеина А с КЗ. В последнее время для повышения чувствительности анализа стали применять новые способы регистрации отклика системы (например, системы антиген–антитело, меченное КЗ) на взаимодействие, такие

как фототермальная спектроскопия,²⁸⁵ лазерная двулучевая абсорбционная спектроскопия,²⁸⁶ гиперрэлееское рассеяние.²⁸⁷ В работе²⁸⁸ был предложен метод совместного использования агглютинации латексных и золотых частиц (гетерогенный SPIA).

Все варианты метода SPIA оказались весьма простыми в исполнении и при этом продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность. Однако исследователи столкнулись с тем фактом, что не всегда взаимодействие типа антиген–антитело на частицах золя приводит к дестабилизации системы (к агрегации частиц). В ряде случаев, несмотря на заведомую комплементарность пары, изменений цвета раствора и, соответственно, спектров поглощения не происходило или они были незначительными.

После серии предварительных экспериментов в работе²⁸⁹ было выдвинуто предположение, что в этих случаях происходит образование второго белкового слоя на золотых частицах без потери агрегативной устойчивости золя. При этом изменения спектров, обусловленные адсорбцией второго биополимера и, соответственно, изменением структуры биополимерного слоя на поверхности металлических частиц, сравнительно малы. Однако и такие незначительные изменения спектров поглощения возможно регистрировать и использовать для количественного анализа в биологических приложениях, что было продемонстрировано авторами работ^{290, 291}.

Еще один вариант использования описываемого метода был предложен Миркиным с соавт.⁷³ Он основан на колориметрическом определении полинуклеотидов за счет их взаимодействия с комплементарными олигонуклеотидами, иммобилизованными на наночастицах золота. Этот процесс сопровождается формированием упорядоченной трехмерной структуры наночастиц золота, что приводит к изменению спектра поглощения раствора и детектируется визуально⁷³ или фотометрически.²⁹²

Образование упорядоченных трехмерных структур при взаимодействии IgG-функционализированных наночастиц золота с антигенами наблюдали авторы работ^{176, 293}, а с использованием аптамеров — авторы статьи²⁹⁴. В работах^{295, 296} показана возможность получения биологически программируемых ансамблей наночастиц золота с применением системы авидин–биотин. В работе¹⁴⁶ аналогичный подход был использован для определения лектинов. В статье²⁹⁷ описана Ca^{2+} -зависимая агрегация покрытых углеводами наночастиц золота.

Несмотря на то что метод SPIA весьма прост в реализации, за более чем 20-летнюю историю его развития количество публикаций, посвященных реальному практическому применению данного метода, оказалось довольно скромным. Только в последнее время появились работы, указывающие на возможность его использования в качестве высокопроизводительного клинического теста. Причина слабого внедрения метода SPIA связана, на наш взгляд, с недостаточным пониманием физико-химических и оптических механизмов трансформации сигналов, возникающих при биоспецифическом связывании молекул-мишеней с КЗ-конъюгатами, в показатели ослабления или рассеяния света суспензиями.

Предложен новый вариант метода SPIA с использованием микротитровальных планшетов и ИФА-ридера с применением в качестве специфического выявляющего агента на белки конъюгата трипсина (протеолитического фермента) с КЗ.²⁹⁸ Представляется, что такой метод анализа весьма перспективен для быстрого, чувствительного и количественного определения белков.

VI. Применение наночастиц золота в исследованиях биологически активных веществ методами колебательной спектроскопии

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света является весьма эффективным инструментом исследования строения молекул, поскольку набор частот внутримолекулярных колебаний однозначно связан со структурой молекул, а также межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями.^{299, 300} Однако относительно малая интенсивность сигнала КР делает его регистрацию достаточно сложной задачей, требующей применения современных лазерных источников света и систем подсчета фотонов. В 1974 г. Флейшман³⁰¹ предложил увеличить эффективное число молекул, участвующих в рассеянии излучения от адсорбированного монослоя, увеличив реальную площадь поверхности при сохранении «видимой» площади, освещаемой излучением накачки. Для этого он с помощью анодного травления сделал поверхность серебра шероховатой и снял спектры адсорбированного на этой поверхности вещества. Интенсивность комбинационного рассеяния возросла в 10^6 – 10^7 раз, в то время как площадь разрыхленной травлением поверхности серебряного электрода увеличилась только на порядок.³⁰¹ Позднее было показано, что за наблюдаемым усилением КР стоит новый нелинейный эффект, который был назван гигантским комбинационным рассеянием (ГКР).[†]

Гигантское комбинационное рассеяние обладает рядом особенностей, отличающих его от обычного КР. Во-первых, сечения ГКР для колебательных мод адсорбированных молекул могут увеличиваться в 10^{10} и более раз по сравнению с аналогичными величинами для неадсорбированных молекул. Во-вторых, величина усиления рассеяния изменяется в зависимости от частоты возбуждения и степени шероховатости подложки по специфичному для ГКР закону. В-третьих, спектры ГКР многих адсорбированных молекул сильно отличаются от соответствующих спектров КР молекул в свободном состоянии. Это проявляется в избирательном усилении определенных колебаний, а также в появлении новых полос в спектре ГКР.

Обширную информацию о применении усиленных поверхностью ИК-Фурье- и ГКР-спектроскопии в биологических исследованиях можно найти в обзорах^{303–306}. Методы колебательной спектроскопии используют для изучения как отдельных биологических молекул, так и целых клеток и тканей.^{307–311}

В большинстве перечисленных работ для усиления колебаний биологических молекул применяли их адсорбцию на металлических электродах или тонких пленках. Однако в последние годы наиболее широкое распространение получили методы, в которых для усиления сигнала использовали коллоидные металлы (в основном золото и серебро).^{312–316} В этих методах усиление сигнала вызывают гигантские нелинейные локальные поля, образующиеся в металлических кластерах.^{317, 318} Разработаны варианты иммуноанализа с использованием АТ или АГ, адсорбированных на наночастицах золота, с привлечением методов колебательной спектроскопии.^{319–323}

В работе³²⁴ впервые была продемонстрирована возможность применения ИК-Фурье-спектроскопии для чув-

ствительного определения взаимодействия белковых молекул с поверхностью частиц золота, а также для достоверной и простой регистрации биоспецифических реакций. Описанный метод (названный авторами спектроиммунохимическим) может послужить основой для разработки тест-систем, детектирующих биоспецифические взаимодействия типа антиген–антитело, фермент–субстрат, лектин–полисахарид и т.п. Обнаруженные изменения спектров биомолекул, находящихся на частицах золота, являются доказательством того, что эти биомолекулы действительно адсорбированы. Предложенный метод наряду с другими (например, ГКР) может быть использован для контроля качества золотых конъюгатов.

VII. Наночастицы золота — носители антигенов

Остановимся коротко на двух взаимосвязанных проблемах современной иммунологии, привлекающих внимание большого числа исследователей. Это получение антител на неиммуногенные низкомолекулярные вещества (гаптены) и создание нового поколения вакцин на основе естественных (микробных) или синтетических пептидов.^{325–328}

Известно, что биосинтез АТ в организме индуцируют вещества, обладающие достаточно развитой структурой (иммуногенностью). К их числу принадлежат белки и полисахариды.³²⁹ Значительная же часть биологически активных веществ (нейромедиаторы, гормоны, витамины, антибиотики и т.д.) имеет относительно небольшую молекулярную массу. Низкомолекулярные АГ относятся к категории так называемых слабых АГ, т.е. против них выраженный иммунный ответ (биосинтез соответствующих АТ) не развивается.

Интерес исследователей к получению АТ против гаптен связан с рядом причин. Во-первых, АТ к отдельным участкам биомакромолекул могут служить высокоэффективным инструментом в исследовании их топографии и структуры. Во-вторых, получение АТ к таким низкомолекулярным соединениям, как антибиотики, гормоны и некоторые лекарственные препараты, позволило бы контролировать их содержание в крови больных, в мясных и молочных продуктах, в культуральных средах. Лекарственный мониторинг широко используется во всех развитых странах, что дает возможность существенно повысить эффективность лечения и предотвратить появление побочных осложнений. При наличии различных способов обнаружения подобных веществ наиболее доступными и высокочувствительными остаются методы иммунохимического анализа, которые подразумевают получение АТ к этим низкомолекулярным соединениям. Очень перспективным представляется использование АТ к низкомолекулярным соединениям в иммунотерапевтической практике.^{325, 330} В-третьих, синтетические пептиды пытаются использовать для конструирования искусственных (ацеллюлярных) вакцин, содержащих только про-активные АГ и инертный носитель.

Поскольку гаптены обладают слабой иммуногенностью, важной задачей при получении к ним АТ является подбор оптимального носителя (системы доставки), обеспечивающего высокий иммунный ответ, и, вместе с тем, получение достаточно чистых препаратов АТ. Традиционно эта задача решается с помощью химического присоединения гаптена к белковой матрице — шлепперу (от немецкого *schleppen* — тащить, буксировать) — с применением адъювантов и напряженных схем иммунизации животных полученным конъюгатом.^{325, 331} В качестве шлепперов обычно используют бычий сывороточный альбумин, овальбумин, тиреоглобулин, гемоцианин, дифтерийный или столбнячный анатоксины (для синтетических пептидов) и др. Однако при этом образуются АТ как против гаптена, так и против иммунодетерминант-

† При адсорбции молекул исследуемого вещества на поверхности металла наблюдается также изменение люминесценции, поглощения, ряда нелинейных эффектов и возникает наведенная оптическая активность.³⁰²

ных участков носителя. Причем далеко не всегда при использовании таких носителей развивается выраженный иммунный ответ на слабые АГ. Кроме того, последующая очистка и скрининг получаемых АТ трудоемки и дороги, а их титр и аффинность зачастую оказываются низкими.

Большинство применяемых сегодня адъювантов на основе масляных эмульсий и суспензий неорганических веществ, как правило, склонны к расслоению фаз, их иммуногенные свойства изменяются со временем, многие из таких адъювантов вызывают локальные и системные токсические явления.^{332, 333} Казалось бы, наиболее перспективным решением проблемы получения АТ против гаптенных является использование фагового дисплея АТ,³³⁴ однако эта методика в настоящее время практически неприменима в вакцинологии.

В последние годы ведутся работы по созданию так называемых комплексных АГ, т.е. искусственных макромолекулярных комплексов, в состав которых входят как необходимые антигенные детерминанты, так и носители и/или адъюванты. В качестве носителей были предложены, в частности, синтетические полиэлектролиты (поли-L-лизин, полиакриловая кислота, поливинилпиридин, полистиролсульфонат, фикоил и др.).³³⁵ Так, с использованием поликатионита «полиоксидоний» была разработана противогриппозная вакцина «Гриппол». Указанные полимерные соединения получают методом радикальной полимеризации соответствующих мономеров.³³⁶ Простота химического синтеза полиэлектролитов, возможность получения полимерных цепочек в широком диапазоне молекулярных масс (т.е. различной длины), растворимость в воде и другие свойства (способность к конформационным превращениям, образование комплексов с белками и др.) открыли возможности для их использования в иммунологических исследованиях.³³⁷ Такие носители-адъюванты способны депонировать АГ в местах введения, усиливать презентацию АГ иммунокомпетентным клеткам и индуцировать продукцию необходимых цитокинов. Однако невысокая иммуногенность таких комплексов, обусловленная малой эпитопной плотностью, побуждает исследователей к поиску новых нетоксичных и эффективных носителей, обладающих к тому же адъювантными свойствами.

Особо перспективными в этом отношении, на наш взгляд, представляются корпускулярные носители нанометровых размеров: полимерные наночастицы (например, полиметилметакрилатные),³³⁸ липосомы, протеосомы и микрокапсулы,^{339–341} фуллерены,^{342, 343} углеродные нанотрубки³⁴⁴ и др. При их использовании меняются формы проявления иммуногенности заданного вещества в иммунной системе организма-хозяина. Антиген, адсорбированный или инкапсулированный наночастицами, может использоваться в качестве адъюванта для оптимизации иммунного ответа организма при вакцинации. Так, например, анализ динамики иммунного ответа показал, что титр АТ в ответ на АГ, введенный с фуллеренами, был равен титру АТ в ответ на АГ, введенный с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), и примерно на порядок превышал титр АТ в ответ на АГ, введенный без адъюванта.

В 1986 г. в пионерской работе японских исследователей³⁴⁵ появились сведения об успешном получении АТ к глутаминовой кислоте с использованием в качестве носителя частиц КЗ. (Необходимо отметить, что коллоидные металлы использовались для стимуляции иммунного ответа на гаптены и полноценные антигены еще в 20-х годах прошлого века Зильбером и др.^{346–348}). После этого вышло несколько работ, авторы которых применили и развили этот метод для получения АТ к следующим гаптенам и полноценным АГ: аминокислотам,^{349, 350} фактору активации тромбоцитов,^{351, 352} хинолиновой кислоте,³⁵³ биотину,³⁵⁴ иммунофиллину,³⁵⁵ лизофосфатидной кислоте,³⁵⁶ эндостатину,³⁵⁷ пепти-

дам капсида вируса гепатита С,³⁵⁸ поверхностным АГ иерсиний³⁵⁹ и бруцелл.³⁶⁰ Во всех перечисленных работах гаптен непосредственно конъюгировали с частицами КЗ, смешивали с ПАФ и иммунизировали животных. В результате получали антисыворотки с высоким титром, которые не требовали дальнейшей очистки от балластных АТ.

В 1993 г. вышла работа австралийских ученых,³⁶¹ которые предложили присоединять гаптены к белку-носителю перед конъюгированием с КЗ. Это предложение впоследствии использовалось при получении АТ к ряду синтетических^{362–365} и природных³⁶⁶ пептидов, к аминокислотам,^{367, 368} цитруллину,³⁶⁹ фенил-β-D-тиоглюкурониду.³⁷⁰ В качестве адъювантов в этих работах использовали ПАФ или N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин.³⁶³ Антитела, полученные предложенным способом, обладали высокой специфичностью к исследованным АГ и более высоким титром (по выражению авторов работы³⁶¹, «чрезвычайно высоким») — от 1:250 000 до 1:1 000 000 — по сравнению с АТ, полученными рутинным способом (конъюгацией со шлеппером).

В 1996 г. была опубликована статья³⁷¹ сотрудников Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, в которой они впервые показали возможность использования частиц КЗ в составе антивирусной вакцины как носителей белкового АГ капсида вируса клещевого энцефалита. По данным авторов, несмотря на то что в состав вакцины не входили адъюванты, предложенная ими вакцина обладала более высокими протективными свойствами по сравнению с коммерческими аналогами. В 2003 г. вышла статья³⁷², в которой был предложен новый способ получения АТ против Аβ-пептида — молекулярного маркера болезни Альцгеймера. Ковалентно пришив предварительно тиолированные олигомеры к поверхности золотых частиц, авторы создали молекулярную имитацию фибриллярной формы Аβ-пептидов. Антитела, полученные на синтезированный таким способом АГ, обладали очень высокой специфичностью и аффинностью как к растворимой, так и к фибриллярной форме Аβ-пептидов.

Появилось также значительное число работ, посвященных использованию частиц КЗ для создания ДНК-вакцин. Принцип ДНК-иммунизации заключается в следующем: в организм вводятся генные конструкции, кодирующие белки, к которым необходимо получить АТ. В случае эффективной экспрессии генов эти белки служат АГ для развития иммунного ответа.^{373, 374} В первых работах иммунизацию проводили с помощью подкожной или внутримышечной инъекции «голой» ДНК. Однако практически сразу с этой целью начали применять биолистическую трансфекцию с использованием наночастиц, которая оказалась очень эффективной, по всей видимости, вследствие множественности мест взаимодействия трансгена с тканями. Инъекционный материал стали вводить подкожно, кожно-резорптивно, интраназально.^{377, 378}

Особой популярностью среди наночастиц — носителей ДНК — пользуются частицы КЗ.^{379–385} Причем если раньше золото использовалось только как носитель, то сейчас показано, что оно усиливает иммунный ответ *in vivo*.³⁸⁶ Однако ни в одной из доступных нам работ мы не нашли сведений о механизмах подобного действия частиц золота.

Метод генной иммунизации, часто называемой ДНК-иммунизацией, разработанный в опытах на животных, показал высокую эффективность, особенно в отношении вирусных инфекций — клещевого энцефалита, ВИЧ-инфекции, гепатита В и некоторых других. ДНК-Иммунизация имеет ряд преимуществ по сравнению с обычной вакцинацией. Один рекомбинантный вектор может направлять синтез нескольких АГ одновременно, что уменьшает число отдельных иммунизаций. При этом снимаются проблемы, связан-

ные с трудностями проникновения белка в организм, а кроме того, значительно снижается риск побочных эффектов, которые зависят от токсичности вводимых при обычной вакцинации балластных белков или вирулентности используемых бактерий и вирусов. Можно ожидать, что в ближайшие годы именно ДНК-иммунизация окажется в числе наиболее эффективных методов генной терапии.^{37, 375, 376}

В работах^{387, 388} описано получение АГ к полноценным АГ и гаптенам различной природы с использованием в качестве носителя частиц КЗ. Показано, что КЗ в качестве носителя АГ активирует фагоцитарную активность макрофагов и влияет на функционирование лимфоцитов, что, возможно, и определяет его иммуномодулирующий эффект. Наиболее интересным аспектом проявления гаптенами иммуногенных свойств при их иммобилизации на коллоидном золоте является то, что частицы КЗ выступают одновременно и в роли адьюванта, и в роли носителя, т.е. каким-то образом представляют гаптен Т-клеткам. Было обнаружено влияние наночастиц золота, конъюгированных с АГ, на активацию Т-клеток (увеличение пролиферации в 10 раз по сравнению с таковой при добавлении нативного АГ). Этот факт показывает принципиальную возможность целенаправленного активирования Т-клеток (например, антигенами микобактерий туберкулеза, ВИЧ и др.) с последующей активацией макрофагов и уничтожением возбудителя, что, безусловно, весьма перспективно для создания вакцин нового поколения.

Чем же обусловлены адьювантные свойства КЗ? В настоящее время у нас нет точного ответа на этот вопрос, но тем не менее, мы позволим себе привести некоторые замечания по этому поводу.

На наш взгляд, безусловно справедливы выводы о предпочтительном макрофагальном ответе на корпускулярные АГ в отличие от растворимых.³⁶¹ Этот факт подтверждают и авторы работ^{381, 383, 386}, изучавшие механизм действия ДНК-вакцин и применявшие частицы золота для транспортировки генетического материала в клетку. В этих работах показана роль клеток Купфера и Лангерганса в формировании иммунного ответа. Более того, именно частицы КЗ использовались авторами работ^{389, 390} при изучении эндоцитоза макрофагами. (Включенные в лизосомы фагоцитов золотые частицы даже получили собственное название — ауросомы.) В статье³⁹¹ обсуждается влияние дендритных клеток на формирование иммунного ответа на введение АГ, конъюгированного с наночастицами золота. Кроме того, авторы отмечают, что при использовании наночастиц в медицинской практике необходимо следить за отсутствием на их поверхности липополисахаридов.

Однако эти данные не отвечают на вопрос о дальнейших механизмах презентации антигенов Т-хелперам. Поскольку, по современным представлениям,^{329, 392} презентации антигенов Т-клеткам предшествует процессинг (расщепление белка на пептидные фрагменты), а затем образование соединения с молекулами главного комплекса гистосовместимости, которые и осуществляют транспорт фрагмента АГ на поверхность антигенпрезентирующей клетки, то остается неясным — каким образом этот процесс может происходить с гаптенем? Не дает ответа на этот вопрос и предположение о существовании мультивалентного АГ, т.е. АГ, образующегося вследствие высокой локальной концентрации одновалентных АГ на поверхности золотой частицы.

Вместе с тем давно известно влияние солей золота на иммунную систему.^{393–397} На свойстве золота изменять неспецифические иммунные реакции организма основаны способы лечения ряда аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита. Так, в работах^{30, 398} сообщается об успешной терапии ревматоидного артрита коллоидным раствором золота. По данным работы³⁹⁹

эффект КЗ в этом случае заключается в ингибировании моноцит-индуцированной пролиферации лимфоцитов. В работе⁴⁰⁰ обсуждается превращение Au(0) в Au(I) в клетках иммунной системы под воздействием некоторых аминокислот.

Противоречивые результаты получены в работах^{401–403}, посвященных изучению чувствительности организма млекопитающих к введению металлического золота. В частности, в работах^{401, 402} отмечается, что инъекционное введение лабораторным животным КЗ может приводить к воспалительным реакциям, накоплению золота в ретикулярных клетках лимфоидной ткани, активации клеточного и гуморального иммунитета. В то же время в статье⁴⁰³, авторы которой изучали воздействие наночастиц золота на клетки иммунной системы, сделан вывод о том, что частицы КЗ являются нецитотоксичным, неиммуногенным и биосовместимым материалом для потенциального использования в различных областях наноиммунологии, наномедицины и нанобиотехнологии.

В последнее время появился ряд работ (см., например,^{32, 404–406}), в которых рассматриваются вопросы использования наночастиц золота для адресной доставки лекарств. В связи с этим хотелось бы отметить, что, на наш взгляд, к этой проблеме необходимо подходить весьма осторожно, учитывая возможность выработки в организме животного и человека антител на вводимое лекарственное вещество, адсорбированное на частицах КЗ.

В заключение отметим, что, возможно, настало время говорить не только о биохимии, но и о биофизике иммунного ответа, так как именно уникальные биофизические свойства частиц металлов, в частности поверхностный заряд и электростатическое поле частицы, определенным образом влияющие на заряд, ориентацию и поляризацию сорбированных на частицах молекул АГ, оказывают существенное влияние на процесс иммунного ответа.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (проекты №№ 04-04-48224 и 05-02-16776) за финансовую поддержку.

Литература

1. Ж.Саду. *Алхимики и золото*. София, Киев, 1995
2. F.Antonii. *Panacea Aurea-Auro Potabile*. Bibliopolio Frobeniano, Hamburg, 1618
3. M.Faraday. *Philos. Trans. R. Soc. London*, **147**, 145 (1857)
4. R.Zsigmondy. *Ann. Chim.*, **301**, 29 (1898)
5. Р.Жигмонди. *Коллоидная химия*. Изд-во НКСнаба УССР, Харьков; Киев, 1933
6. Т.Сведберг. *Образование коллоидов*. Науч. хим.-техн. изд-во, Ленинград, 1927
7. L.De Brouckere, J.Casimir. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **57**, 517 (1948)
8. A.Fabrikanos, S.Athanassiou, K.H.Lieser. *Z. Naturforsch.*, **B, 18**, 612 (1963)
9. C.L.Beignt, G.Müller. *Experimentia*, **36**, 472 (1980)
10. J.Turkevich. *Gold Bull.*, **18**, 86 (1985)
11. J.F.Hainfeld. *Science*, **236**, 450 (1987)
12. G.Mie. *Ann. Phys.*, **25**, 377 (1908)
13. J.Turkevich, G.Garton, P.C.Stevenson. *J. Colloid Sci., Suppl. 1*, **9**, 26 (1954)
14. К.Борен, Д.Хафмен. *Поглощение и рассеяние света малыми частицами*. Мир, Москва, 1986
15. U.Kreibig, M.Vollmer. *Optical Properties of Metal Clusters*. (Springer Series in Materials Science). Springer-Verlag, Heidelberg, 1995
16. M.Y.Lin, H.M.Lindsay, D.A.Weitz, R.C.Ball, R.Klein, P.Meakin. *Phys. Rev. A*, **41**, 2005 (1990)
17. Г.Р.Кройт. *Наука о коллоидах*. Изд-во иностр. лит., Москва, 1955
18. W.Heller, T.L.Pugh. *J. Polym. Sci.*, **47**, 203 (1960)

19. H.Thiele, K.Hoppe, G.Moll. *Kolloid-Z. Z. Polym.*, **185**, 45 (1962)
20. А.А.Баран. *Полимерсодержащие дисперсные системы*. Наукова думка, Киев, 1986
21. M.K.Chow, C.F.Zukoski. *J. Colloid Interface Sci.*, **165**, 97 (1994)
22. Р.Паддефет. *Химия золота*. Мир, Москва, 1982
23. А.И.Бусев, В.М.Иванов. *Аналитическая химия золота*. Наука, Москва, 1973
24. С.А.Маракушев. *Геомикробиология и биохимия золота*. Наука, Москва, 1991
25. M.J.Ware. *J. Photogr. Sci.*, **42**, 157 (1994)
26. G.C.Bond, C.Louis, D.T.Thompson. *Catalysis by Gold*. Imperial College Press, London, 2006
27. S.Q.Liu, D.Leech, H.X.Ju. *Anal. Lett.*, **36**, 1 (2003)
28. F.Green. *The Colloidal Gold Reaction of the Cerebrospinal Fluid*. Medizin Fritz-Dieter Söhn, Berlin, 1925
29. N.F.Maclagan. *Br. J. Exp. Pathol.*, **25**, 15 (1944)
30. G.E.Abraham, P.B.Himmel. *J. Nutr. Med.*, **7**, 295 (1997)
31. E.E.Rogoff, R.Romano, E.W.Hahn. *Radiology*, **114**, 225 (1975)
32. G.F.Paciotti, L.Myer, D.Weinreich, D.Goia, N.Pavel, R.E.McLaughlin, L.Tamarkin. *Drug Deliv.*, **11**, 169 (2004)
33. C.M.Pitsillides, E.K.Joe, X.Wei, R.R.Anderson, C.P.Lin. *Biophys. J.*, **84**, 4023 (2003)
34. I.H.El-Sayed, X.H.Huang, M.A.El-Sayed. *Nano Lett.*, **5**, 829 (2005)
35. C.Loo, A.Lin, L.Hirsch, M.-H.Lee, J.Barton, N.Halas, J.West, R.Drezek. *Technol. Cancer Res. Treat.*, **3**, 33 (2004)
36. E.J.Andreu, L.A.de Llano, I.Moreno, E.Knecht. *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 1199 (1998)
37. А.В.Зеленин. *Вестн. РАН*, **71**, 387 (2001)
38. G.A.Hughes. *Nanomedicine*, **1**, 22 (2005)
39. W.Faulk, G.Taylor. *Immunochemistry*, **8**, 1081 (1971)
40. G.Frens. *Nature Phys. Sci.*, **241**, 20 (1973)
41. *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. (Ed. M.A.Hayat). Academic Press, San Diego, 1989
42. *Techniques in Immunocytochemistry*. (Eds G.R.Bullock, P.Petrusz). Academic Press, London, 1982
43. J.De Mey, M.Moeremans. In *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*. (Ed. J.K.Koehler). Springer-Verlag, Berlin, 1986. P. 229
44. М.Д.Рехтер, А.А.Миронов. *Успехи соврем. биологии*, **109**, 467 (1990)
45. Л.А.Дыкман, В.А.Богатырев. *Биохимия*, **62**, 411 (1997)
46. W.R.Glomm. *J. Dispers. Sci. Technol.*, **26**, 389 (2005)
47. M.C.Daniel, D.Astruc. *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004)
48. H.B.Weiser. *Inorganic Colloid Chemistry*. Wiley, New York, 1933
49. G.Danscher. *Histochemistry*, **71**, 81 (1981)
50. Z.F.Ma, S.-F.Sui. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 2176 (2002)
51. Th.Schalkhammer. *Monatsh. Chem. (Chem. Monthly)*, **129**, 1067 (1998)
52. M.Malmqvist. *Nature (London)*, **361**, 186 (1993)
53. M.D.Musick, C.D.Keating, L.A.Lyon, S.L.Botsko, D.J.Peña, W.D.Holliway, T.M.McEvoy, J.N.Richardson, M.J.Natan. *Chem. Mater.*, **12**, 2869 (2000)
54. A.N.Shipway, E.Katz, I.Willner. *ChemPhysChem*, **1**, 18 (2000)
55. W.A.De Heer. *Rev. Mod. Phys.*, **65**, 611 (1993)
56. M.Brack. *Rev. Mod. Phys.*, **65**, 677 (1993)
57. G.Schmid, L.F.Chi. *Adv. Mater.*, **10**, 515 (1998)
58. В.М.Шалаев, М.И.Штокман. *Журн. эксперим. теорет. физики*, **92**, 509 (1987)
59. А.В.Бутенко, П.А.Чубаков, Ю.Е.Данилова, С.В.Карпов, А.К.Попов, С.Г.Ратян, В.П.Сафонов, В.В.Слабко, В.М.Шалаев, М.И.Штокман. *Z. Phys. D*, **17**, 283 (1990)
60. A.C.Templeton, J.J.Pietron, R.W.Murray, P.Mulvaney. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 564 (2000)
61. S.G.Penn, L.He, M.J.Natan. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 609 (2003)
62. P.Schuk. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 541 (1997)
63. W.M.Mullett, E.P.C.Lai, J.M.Yeung. *Methods*, **22**, 77 (2000)
64. C.M.Niemeyer. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 4128 (2001)
65. D.A.Schultz. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 13 (2003)
66. W.J.Parak, D.Gerion, T.Pellegrino, D.Zanchet, C.Micheel, S.C.Williams, R.Boudreau, M.A.Le Gros, C.A.Larabell, A.P.Alivisatos. *Nanotechnology*, **14**, R15 (2003)
67. J.C.Riboh, A.J.Haes, A.D.McFarland, C.R.Yonzon, R.P.Van Duyne. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 1772 (2003)
68. A.Moore, F.Goettmann. *New J. Chem.*, **30**, 1121 (2006)
69. A.Ulman. *Chem. Rev.*, **96**, 1533 (1996)
70. C.L.Haynes, R.P.Van Duyne. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5599 (2001)
71. L.A.Lyon, M.D.Musick, M.J.Natan. *Anal. Chem.*, **70**, 5177 (1998)
72. M.Adamczyk, J.A.Moore, Z.Yu. *Methods*, **20**, 319 (2000)
73. C.A.Mirkin, R.L.Letsinger, R.C.Mucic, J.J.Storhoff. *Nature (London)*, **382**, 607 (1996)
74. P.Bao, A.G.Frutos, Ch.Greef, J.Lahiri, U.Muller, T.C.Peterson, L.Warden, X.Y.Xie. *Anal. Chem.*, **74**, 1792 (2002)
75. G.Raschke, S.Kowarik, T.Franzl, C.Sönnichsen, T.A.Klar, J.Feldmann, A.Nichtl, K.Kürzinger. *Nano Lett.*, **3**, 935 (2003)
76. A.D.McFarland, R.P.Van Duyne. *Nano Lett.*, **3**, 1057 (2003)
77. A.Csáki, G.Maubach, D.Born, J.Reichert, W.Fritzsche. *Single Mol.*, **3**, 275 (2002)
78. D.L.Feldheim, C.D.Keating. *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 1 (1998)
79. S.I.Bozhevolnyi. In *Optics of Nanostructured Materials. (Wiley Series in Lasers and Applications)*. (Eds V.A.Markel, Th.F.George). Wiley-Interscience, New York, 2000. P. 73
80. K.Kneipp, H.Kneipp, I.Itzkan, R.R.Dasari, M.S.Feld. *J. Phys.: Condens. Matter*, **14**, R597 (2002)
81. W.E.Doering, S.M.Nie. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 311 (2002)
82. B.Rothenhäusler, W.Knoll. *Nature (London)*, **332**, 615 (1988)
83. J.Belloni. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1**, 184 (1996)
84. J.Yguerabide, E.E.Yguerabide. *Anal. Biochem.*, **262**, 137 (1998)
85. В.И.Ролдугин. *Успехи химии*, **69**, 899 (2000)
86. G.C.Schatz. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **573**, 73 (2001)
87. N.G.Khlebtsov, A.G.Melnikov, L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev. In *Photopolarimetry in Remote Sensing*. (Eds G.Videen, Y.Yatskiv, M.Mishchenko). Kluwer Academic, Dordrecht, 2004. P. 265
88. E.Katz, I.Willner. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 6042 (2004)
89. T.Teranishi. In *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. (Ed. A.Hubbard). Marcel Dekker, New York, 2002. P. 3314
90. J.Roth. In *Techniques in Immunocytochemistry*. (Eds G.R.Bullock, P.Petrusz). Academic Press, London, 1983. P. 217
91. D.A.Handley. In *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*. (Ed. M.A.Hayat). Academic Press, San Diego, 1989. P. 13
92. J.Turkevich, P.C.Stevenson, J.Hillier. *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, 55 (1951)
93. E.C.Stathis, A.Fabricanos. *Chem. Ind. (London)*, **27**, 860 (1958)
94. H.Mühlpfordt. *Experientia*, **38**, 1127 (1982)
95. J.W.Slot, H.J.Geuze. *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 87 (1985)
96. J.Tschopp, E.R.Podack, H.J.Muller-Eberhard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7474 (1982)
97. G.B.Birrel, K.K.Hedberg. *J. Electron Microsc. Tech.*, **5**, 219 (1987)
98. N.G.Khlebtsov, V.A.Bogatyrev, L.A.Dykman, A.G.Melnikov. *J. Colloid Interface Sci.*, **180**, 436 (1996)
99. R.G.DiScipio. *Anal. Biochem.*, **236**, 168 (1996)
100. W.Baschong, J.M.Lucocq, J.Roth. *Histochemistry*, **83**, 409 (1985)
101. J.M.Thomas. *Pure Appl. Chem.*, **60**, 1517 (1988)
102. K.R.Brown, M.J.Natan. *Langmuir*, **14**, 726 (1998)
103. K.R.Brown, D.G.Walter, M.J.Natan. *Chem. Mater.*, **12**, 306 (2000)
104. N.R.Jana, L.Gearheart, C.J.Murphy. *Langmuir*, **17**, 6782 (2001)
105. J.P.Wilcoxon, P.P.Provencio. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6402 (2004)
106. D.V.Goia, E.Matijević. *Colloids Surf., A*, **146**, 139 (1999)
107. H.Hirai, H.Aizawa. *J. Colloid Interface Sci.*, **161**, 471 (1993)
108. M.Green, P.O'Brien. *Chem. Commun.*, 183 (2000)
109. M.Giersig, P.Mulvaney. *Langmuir*, **9**, 3408 (1993)
110. M.Brust, D.Walker, D.Bethell, D.J.Schiffrin, R.Whyman. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 801 (1994)
111. M.Brust, C.J.Kiely. *Colloids Surf., A*, **202**, 175 (2002)
112. S.Stoeva, K.J.Klabunde, C.M.Sorensen, I.Dragieva. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2305 (2002)
113. Y.Zhou, H.Itoh, T.Uemura, K.Naka, Y.Chujo. *Chem. Commun.*, 613 (2001)
114. S.Sato, K.Toda, S.Oniki. *J. Colloid Interface Sci.*, **218**, 504 (1999)
115. Y.Tan, X.Dai, Y.Li, D.Zhu. *J. Mater. Chem.*, **13**, 1069 (2003)
116. K.Esumi, N.Takei, T.Yoshimura. *Colloids Surf., B*, **32**, 117 (2003)
117. A.Pal. *J. Nanoparticle Res.*, **6**, 27 (2004)

118. T.Sugimoto. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **28**, 65 (1987)
119. L.Longenberger, G.Mills. *J. Phys. Chem.*, **99**, 475 (1995)
120. T.Teranishi, M.Miyake. *Hyomen (Japan)*, **35**, 439 (1997)
121. S.Nuss, H.Böttcher, H.Wurm, M.L.Hallensleben. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 4016 (2001)
122. H.Hirai, Y.Nakao, N.Toshima. *J. Macromol. Sci. Chem., A*, **13**, 727 (1979)
123. J.P.Spatz, S.Mössmer, M.Möller. *Chem. – Eur. J.*, **12**, 1552 (1996)
124. Q.Liu, H.Liu, Q.Zhou, Y.Liang, G.Yin, Z.Xu. *J. Mater. Sci.*, **41**, 3657 (2006)
125. K.Esumi, A.Susuki, N.Aihara, K.Usui, K.Torigoe. *Langmuir*, **14**, 3157 (1998)
126. J.M.Slocik, M.O.Stone, R.R.Naik. *Small*, **1**, 1048 (2005)
127. Л.А.Дыкман, А.А.Ляхов, В.А.Богатырев, С.Ю.Щеголев. *Коллоидный журн.*, **60**, 757 (1998)
128. S.T.Wang, J.C.Yan, L.Chen. *Mater. Lett.*, **59**, 1383 (2005)
129. A.V.Singh, B.M.Bandgar, M.Kasture, B.L.V.Prasad, M.Sastry. *J. Mater. Chem.*, **15**, 5115 (2005)
130. C.E.Hoppe, M.Lazzari, I.Pardiñas-Blanco, M.A.López-Quintela. *Langmuir*, **22**, 7027 (2006)
131. H.Otsuka, Y.Akiyama, Y.Nagasaki, K.Kataoka. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8226 (2001)
132. S.A.Yeung, R.Hobson, S.Biggs, F.Grieser. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 378 (1993)
133. W.Chen, W.Cai, L.Zhang, G.Wang, L.Zhang. *J. Colloid Interface Sci.*, **238**, 291 (2001)
134. M.Mandal, S.Kundu, S.K.Ghosh, T.Pal. *Bull. Mater. Sci.*, **25**, 509 (2002)
135. Y.Niidome, A.Hori, T.Sato, S.Yamada. *Chem. Lett.*, 310 (2000)
136. E.Gachard, H.Remita, J.Khatouri, B.Keita, L.Nadjo, J.Belloni. *New J. Chem.*, **22**, 1257 (1998)
137. F.Mafuné, J.-Y.Kohno, Y.Takeda, T.Kondow, H.Sawabe. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5114 (2001)
138. K.Mallick, M.J.Witcomb, M.S.Scurrrell. *Appl. Phys. A*, **80**, 395 (2005)
139. H.Ma, B.Yin, S.Wang, Y.Jiao, W.Pan, S.Huang, S.Chen, F.Meng. *ChemPhysChem*, **5**, 68 (2004)
140. Б.Г.Ершов. *Рос. хим. журн.*, **45** (3), 20 (2001)
141. P.A.Bartlett, B.Bauer, S.J.Singer. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5085 (1978)
142. J.F.Hainfeld, R.D.Powell. *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 471 (2000)
143. T.G.Schaaff, R.L.Whetten. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 2630 (2000)
144. C.J.Ackerson, P.D.Jadzinsky, G.J.Jensen, R.D.Kornberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2635 (2006)
145. J.L.Gardea-Torresdey, J.G.Parsons, E.Gomez, J.Peralta-Videa. *Nano Lett.*, **2**, 397 (2002)
146. C.S.Shankar, A.Ahmad, R.Pasricha, M.Sastry. *J. Mater. Chem.*, **13**, 1822 (2003)
147. M.Gericke, A.Pinches. *Gold Bull.*, **39**, 22 (2006)
148. A.Anshup, J.S.Venkataraman, C.Subramaniam, R.R.Kumar, S.Priya, T.R.S.Kumar, R.V.Omkumar, A.John, T.Pradeep. *Langmuir*, **21**, 11562 (2005)
149. M.S.Kunz, K.R.Shull, A.J.Kellok. *J. Colloid Interface Sci.*, **156**, 240 (1993)
150. M.K.Corbierre, N.S.Cameron, M.Sutton, S.G.J.Mochrie, L.B.Lurio, A.Rühm, R.B.Lennox. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10411 (2001)
151. S.T.Selvan, J.P.Spatz, H.-A.Klock, M.Möller. *Adv. Mater.*, **10**, 132 (1998)
152. N.R.Jana, L.Gearheart, S.O.Obare, C.J.Murphy. *Langmuir*, **18**, 922 (2002)
153. N.R.Jana, L.Gearheart, C.J.Murphy. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 4065 (2001)
154. B.Nikoobakht, M.A.El-Sayed. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3372 (2003)
155. J.J.Mock, S.J.Oldenburg, D.R.Smith, D.A.Schultz, S.Schultz. *Nano Lett.*, **2**, 465 (2002)
156. T.Pham, J.B.Jackson, N.J.Halas, T.R.Lee. *Langmuir*, **18**, 4915 (2002)
157. T.Ung, L.M.Liz-Marzán, P.Mulvaney. *Colloids Surf., A*, **202**, 119 (2002)
158. Y.Sun, Y.Xia. *Science*, **298**, 2176 (2002)
159. H.Liao, C.L.Nehl, J.H.Hafner. *Nanomedicine*, **1**, 201 (2006)
160. N.G.Khlebtsov, A.G.Melnikov, V.A.Bogatyrev, L.A.Dykman, A.V.Alekseeva, L.A.Trachuk, B.N.Khlebtsov. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 13578 (2005)
161. А.В.Алексеева, В.А.Богатырев, Б.Н.Хлебцов, А.Г.Мельников, Л.А.Дыкман, Н.Г.Хлебцов. *Коллоидный журн.*, **68**, 725 (2006)
162. Н.Г.Хлебцов, В.А.Богатырев, Л.А.Дыкман, Б.Н.Хлебцов. *Нанотехника*, **4**, 1 (2006)
163. F.Chen, G.-Q.Xu, T.S.A.Hor. *Mater. Lett.*, **4325**, 1 (2003)
164. F.Kim, J.H.Song, P.Yang. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14316 (2002)
165. B.M.I.van der Zande, M.R.Böhmer, L.G.J.Fokink, C.Schönenberger. *Langmuir*, **16**, 451 (2000)
166. S.L.Pan, M.Chen, H.L.Li. *Colloids Surf., A*, **180**, 55 (2001)
167. T.Kinoshita, S.Seino, K.Okitsu, T.Nakayama, T.Nakagawa, T.A.Yamamoto. *J. Alloys Compd.*, **359**, 46 (2003)
168. I.D.Walton, S.M.Norton, A.Balasingham, L.He, D.F.Oviso, D.Gupta, P.A.Raju, M.J.Natan, R.G.Freeman. *Anal. Chem.*, **74**, 2240 (2002)
169. M.P.Mallin, C.J.Murphy. *Nano Lett.*, **2**, 1235 (2002)
170. Ю.Г.Фролов. *Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсионные системы*. Химия, Москва, 1989
171. Е.Д.Шукин, А.В.Перцов, Е.А.Амелина. *Коллоидная химия*. Изд-во МГУ, Москва, 1982
172. E.D.Goddard, B.Vincent. *Polymer Adsorption and Dispersion Stability. (ACS Symp. Ser.)*. American Chemical Society, Washington, DC, 1984
173. A.B.R.Mayer, J.E.Mark. *Pure Appl. Chem.*, **11**, 2151 (1997)
174. G.T.Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, CA, 1996
175. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. (Ed. M.Donbrow). CRC Press, Boca Raton, FL, 1992
176. W.Shenton, S.A.Davis, S.Mann. *Adv. Mater.*, **11**, 449 (1999)
177. L.H.Dubois, R.G.Nuzzo. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 437 (1992)
178. C.R.Lowe. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 428 (2000)
179. R.L.Letsinger, R.Elghanian, G.Viswanadham, C.A.Mirkin. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 289 (2000)
180. Z.Li, R.S.Jin, C.A.Mirkin, R.L.Letsinger. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1558 (2002)
181. S.S.Ghosh, P.M.Kao, A.W.McCue, H.L.Chappelle. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 71 (1990)
182. K.J.Catt, G.W.Tregear. *Science*, **158**, 1570 (1967)
183. А.Т.Михайлов, В.Н.Симирский. *Методы иммунохимического анализа в биологии развития*. Наука, Москва, 1991
184. R.Hawkes, E.Niday, J.Gordon. *Anal. Biochem.*, **119**, 142 (1982)
185. W.F.Glass, R.C.Briggs, L.S.Hnilica. *Science*, **211**, 70 (1981)
186. M.L.Bell, E.Engvall. *Anal. Biochem.*, **123**, 329 (1982)
187. R.Jahn, W.Schiebler, P.Greengard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1684 (1984)
188. D.Brada, J.Roth. *Anal. Biochem.*, **142**, 79 (1984)
189. M.Moeremans, G.Daneels, A.van Dijk, G.Langanger, J.De Mey. *J. Immunol. Methods*, **74**, 353 (1984)
190. B.Surek, E.Latzko. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 284 (1984)
191. Y.-H.Hsu. *Anal. Biochem.*, **142**, 221 (1984)
192. M.Moeremans, G.Daneels, M.De Raeymaeker, J.De Mey. In *Handbook of Immunoblotting of Proteins*. (Eds O.J.Bjerrum, N.H.H.Heegaard). CRC Press, Orlando, 1988. P. 137
193. R.Rohringer. In *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*. (Ed. M.A.Hayat). Academic Press, San Diego, CA, 1989. P. 396
194. S.J.Fowler. *Methods Mol. Biol.*, **32**, 239 (1994)
195. M.Moeremans, G.Daneels, J.De Mey. *Anal. Biochem.*, **145**, 315 (1985)
196. G.Daneels, M.Moeremans, M.De Raeymaeker, J.De Mey. *J. Immunol. Methods*, **89**, 89 (1986)
197. D.Egger, K.Bienz. *Anal. Biochem.*, **166**, 413 (1987)
198. A.H.V.Schapira, G.Keir. *Anal. Biochem.*, **169**, 167 (1988)
199. K.Jamaguchi, H.Asakawa. *Anal. Biochem.*, **172**, 104 (1988)
200. D.Egger, K.Bienz. *Mol. Biotechnol.*, **1**, 289 (1994)
201. K.W.Li, W.P.Geraerts, R.van Elk, J.Joosse. *Anal. Biochem.*, **182**, 44 (1989)

202. S.Cheley, H.Bayley. *BioTechniques*, **10**, 730 (1991)
203. P.Casero, G.B.Del Campo, P.G.Righetti. *Electrophoresis*, **6**, 367, (1985)
204. E.Saman. *Gene Anal. Tech.*, **3**, 1 (1986)
205. G.L.Jones, J.A.Bailey, R.J.O'Connell. *Mycol. Res.*, **99**, 567 (1995)
206. B.H.Juurink, R.M.Devon. *Experientia*, **47**, 75 (1991)
207. C.M.Stoschek. *Anal. Biochem.*, **160**, 301 (1987)
208. D.Poulain, A.Ayadi, J.Fruit. *Ann. Biol. Clin.*, **45**, 565 (1987)
209. S.R.Kimball, S.L.Rannels, M.B.Elenski, L.S.Jefferson. *J. Immunol. Methods*, **106**, 217 (1988)
210. В.А.Великов, О.С.Ермошина, И.В.Волохина, М.И.Чумаков. *Мол. генетика, микробиол. вирусол.*, (1), 21 (2006)
211. J.Seitz. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**, 442 (1987)
212. W.P.Li, C.Zuber, J.Roth. *Histochemistry*, **100**, 347 (1993)
213. A.Nespolo, G.Bianchi, A.Salmaggi, M.Lazzaroni, D.Cerrato, L.M.Tajoli. *Electrophoresis*, **10**, 34 (1989)
214. S.Tomlinson, A.Luga, E.Huguenel, N.Dattagupta. *Anal. Biochem.*, **171**, 217 (1988)
215. P.G.Righetti, P.Casero, G.B.Del Campo. *Clin. Chim. Acta*, **157**, 167 (1986)
216. M.L.Poor, P.F.Santa, G.S.Sittampalam. *Anal. Biochem.*, **175**, 191 (1988)
217. W.Steffen, R.W.Linck. *Electrophoresis*, **10**, 714 (1989)
218. K.M.Makkouk, A.Comeau. *Eur. J. Plant Pathol.*, **100**, 71 (1994)
219. D.Raoult, G.A.Dasch. *J. Immunol. Methods*, **125**, 57 (1989)
220. B.Petchclai, S.Hiranras, U.Potha. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**, 672 (1991)
221. J.M.Scott, W.G.Shreffler, H.W.Ghalib, A.el Asad, M.Siddig, R.Badaro, S.G.Reed. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**, 272 (1991)
222. Y.S.Liu, W.P.Du, Z.X.Wu. *Int. J. Parasitol.*, **26**, 127 (1996)
223. Y.S.Liu, W.P.Du, Y.M.Wu, Y.G.Chen, K.Y.Zheng, J.M.Shi, X.Z.Hu, G.Y.Li, C.F.You, Z.X.Wu. *J. Trop. Med. Hyg.*, **98**, 151 (1995)
224. F.Chu, Q.Ji, R.-M.Yan. *Chin. J. Integr. Trad. Western Med.*, **21**, 504 (2001)
225. V.S.Dar, S.Ghosh, S.Broor. *J. Virol. Methods*, **47**, 51 (1994)
226. D.Fernandez, I.Valle, R.Llamos, M.Guerra, L.Sorell, J.Gavilondo. *J. Virol. Methods*, **48**, 315 (1994)
227. J.L.Yee, M.B.Jennings, J.R.Carlson, N.W.Lerche. *Lab. Anim. Sci.*, **41**, 119 (1991)
228. A.C.Reboli. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 518 (1993)
229. D.Poulain, D.W.R.Mackenzie, J.van Cutsem. *Mycoses*, **34**, 221 (1991)
230. L.Vera-Cabrera, A.Rendon, M.Diaz-Rodriguez, V.Handzel, A.Laszlo. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 686 (1999)
231. M.Kunakorn, B.Petchclai, K.Khupulsup, P.Naigowit. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2065 (1991)
232. Q.Huang, X.Lan, T.Tong, X.Wu, M.Chen, X.Feng, R.Liu, Y.Tang, Z.Zhu. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2011 (1996)
233. Т.Ю.Загоскина, Е.Ю.Марков, А.И.Калиновский, Е.П.Голубинский. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол.*, (6), 64 (1998)
234. В.А.Лазарчик, Л.П.Титов, Т.Н.Воробьева, Т.С.Ермакова, О.Н.Врублевская, Н.В.Власик. *Изв. НАН Белорус. Сер. мед. наук*, (3), 44 (2005)
235. Z.Xu. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei)*, **72**, 216 (1992)
236. S.Matsuzawa, H.Kimura, Y.Itoh, H.Wang, T.Nakagawa. *J. Forensic Sci.*, **38**, 448 (1993)
237. M.V.Sumaroka, L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev, N.V.Evseeva, I.S.Zaitseva, S.Yu.Shchyogolev, A.D.Volodarsky. *J. Immunoassay*, **21**, 401 (2000)
238. Л.А.Дыкман, В.А.Богатырев, И.С.Зайцева, М.К.Соколова, В.В.Иванов, О.И.Соколов. *Биофизика*, **47**, 632 (2002)
239. A.F.Cremers, N.Jansen in de Wal, J.Wiegant, R.W.Dirks, P.Weisbeek, M.van der Ploeg, J.E.Landegent. *Histochemistry*, **86**, 609 (1987)
240. A.G.Walker, K.I.Dawe. *J. Immunol. Methods*, **104**, 281 (1987)
241. E.B.Smithwick, L.G.Young. *J. Androl.*, **11**, 246 (1990)
242. T.Hatakeyama, K.Murakami, Y.Miyamoto, N.Yamasaki. *Anal. Biochem.*, **237**, 188 (1996)
243. S.Vazquez, G.Lemos, M.Pupo, O.Ganzon, D.Palenzuela, A.Indart, M.G.Guzman. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 1074 (2003)
244. R.Kaur, M.Raje. *J. Immunol. Methods*, **279**, 33 (2003)
245. L.Duan, Y.Wang, S.S.Li, Z.Wan, J.Zhai. *BMC Infect. Dis.*, **5**, 53 (2005)
246. А.Г.Полтавченко, Д.А.Полтавченко, Т.Ю.Загоскина. *Сибирь – Восток*, (3), 10 (2002)
247. Т.Ю.Загоскина, А.Г.Полтавченко, А.А.Докорина. *Сибирь – Восток*, (8), 8 (2002)
248. A.Han, M.Dufva, E.Belleville, C.B.V.Christensen. *Lab Chip*, **3**, 329 (2003)
249. Н.Ф.Стародуб, В.П.Артюх, В.И.Назаренко, Л.И.Коломиец. *Укр. биохим. журн.*, **59**, 108 (1987)
250. J.McCarvil, A.J.McKenna, C.Grief, C.S.Hoy, D.Sesardic, M.C.J.Maiden, I.M.Feavers. *Mol. Microbiol.*, **10**, 203 (1993)
251. R.Liang, D.W.Emerich. *Anal. Biochem.*, **164**, 488 (1987)
252. M.Achacha, K.R.Mittal. *Vet. Rec.*, **139**, 539 (1996)
253. A.Fenoll, I.Jado, D.Vicioso, J.Casal. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 764 (1997)
254. В.А.Богатырев, Л.А.Дыкман, Л.Ю.Матора, Б.И.Шварцбург. *Микробиология*, **60**, 524 (1991)
255. V.A.Bogatyrev, L.A.Dykman, L.Yu.Matora, B.I.Schwartzburg. *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**, 115 (1992)
256. L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **27**, 135 (2000)
257. M.A.Jeppesen, R.B.Barlow. *J. Opt. Soc. Am.*, **52**, 99 (1962)
258. A.V.Alekseeva, V.A.Bogatyrev, L.A.Dykman, B.N.Khlebtsov, L.A.Trachuk, A.G.Melnikov, N.G.Khlebtsov. *Appl. Opt.*, **44**, 6285 (2005)
259. B.N.Khlebtsov, L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev, V.Zharov, N.G.Khlebtsov. *Nanoscale Res. Lett.*, **2**, 6 (2007)
260. A.H.Peruski, L.F.Peruski. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 506 (2003)
261. G.W.Long, T.O'Brien. *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 214 (1999)
262. C.B.Bird, R.L.Miller, B.M.Miller. *J. AOAC Int.*, **82**, 625 (1999)
263. S.J.Wu, H.Paxton, B.Hanson, C.G.Kung, T.B.Chen, C.Rossi, D.W.Vaughn, G.S.Murphy, C.G.Hayes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 106 (2000)
264. Escalante A.Hermies, Huamanchay C.Obed, Davelois A.Kelly. *Rev. Perú. Med. Exp.*, **18**, 57 (2001)
265. K.H.Engler, A.Efstratiou, D.Norn, R.S.Kozlov, I.Selga, T.G.Glushkevich, M.Tam, V.G.Melnikov, I.K.Mazurova, V.E.Kim, G.Y.Tseneva, L.P.Titov, R.C.George. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 80 (2002)
266. R.H.Shyu, H.F.Shyu, H.W.Liu, S.S.Tang. *Toxicon*, **40**, 255 (2002)
267. S.Chanteau, L.Rahalison, L.Ralafiarisoa, J.Foulon, M.Ratsitorahina, L.Ratsifasoamanana, E.Carniel, F.Nato. *Lancet*, **361**, 211 (2003)
268. K.Glynnou, P.C.Ioannou, T.K.Christopoulos, V.Syriopoulou. *Anal. Chem.*, **75**, 4155 (2003)
269. M.P.Grobush, D.Schormann, S.Schwenke, D.Teichmann, E.Klein. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3443 (1998)
270. Б.Б.Дзантиев, А.В.Жердев, В.О.Попов, Ю.Ю.Венгеров, Т.А.Старовойтова, Р.Т.Тогузов. *Клин. лаб. диагн.*, (8), 25 (2002)
271. J.-H.Cho, S.-H.Paek. *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 725 (2001)
272. S.Wang, C.Zhang, J.Wang, Y.Zhang. *Anal. Chim. Acta*, **546**, 161 (2005)
273. J.H.W.Leuversing, P.J.H.M.Thal, M.van der Waart, A.H.W.M.Schuurs. *J. Immunoassay*, **1**, 77 (1980)
274. J.H.W.Leuversing, P.J.H.M.Thal, M.van der Waart, A.H.W.M.Schuurs. *J. Immunol. Methods*, **45**, 183 (1981)
275. J.H.W.Leuversing, B.C.Coverde, P.J.H.M.Thal, A.H.W.M.Schuurs. *J. Immunol. Methods*, **60**, 9 (1983)
276. J.H.W.Leuversing, P.J.H.M.Thal, A.H.W.M.Schuurs. *J. Immunol. Methods*, **62**, 175 (1983)
277. T.J.C.Gribnau, J.H.W.Leuversing, H.van Hell. *J. Chromatogr.*, **176**, 175 (1986)
278. A.M.Deelder, M.H.Dozy. *Acta Leiden.*, **48**, 17 (1982)
279. F.Wielaard, A.Denissen, L.van der Veen, I.Rutjes. *J. Virol. Methods*, **17**, 149 (1987)

280. R.Van Erp, T.J.C.Gribnau, A.P.van Sommeren, H.P.Bloemers. *J. Immunoassay*, **12**, 425 (1991)
281. R.Zeisler, S.F.Stone, R.P.Viscidi, E.H.Cerny. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **167**, 445 (1993)
282. V.K.Gasparyan. *J. Clin. Lab. Anal.*, **19**, 124 (2005)
283. M.Tanaka, K.Matsuo, M.Enomoto, K.Mizuno. *Clin. Biochem.*, **37**, 27 (2004)
284. N.T.K.Thanh, Z.Rosenzweig. *Anal. Chem.*, **74**, 1624 (2002)
285. H.Sakashita, A.Tomita, Y.Umeda, H.Narukawa, H.Kishioka, T.Kitamori, T.Sawada. *Anal. Chem.*, **67**, 1278 (1995)
286. N.T.K.Thanh, J.H.Rees, Z.Rosenzweig. *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 1174 (2002)
287. C.X.Zhang, Y.Zhang, X.Wang, Z.M.Tang, Z.H.Lu. *Anal. Biochem.*, **320**, 136 (2003)
288. M.J.Benecky, D.R.Post, S.M.Schmitt, M.S.Kochar. *Clin. Chem.*, **43**, 1764 (1997)
289. L.A.Dykman, Ya.M.Krasnov, V.A.Bogatyrev, N.G.Khlebtsov. *Proc. SPIE*, **4241**, 37 (2001)
290. P.Englebienne. *Analyst*, **123**, 1599 (1998)
291. P.Englebienne, A.van Hoonacker, M.Verhas, N.G.Khlebtsov. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **6**, 777 (2003)
292. J.J.Storhoff, R.Elghanian, R.C.Mucic, C.A.Mirkin, R.L.Letsinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998)
293. S.Mann, S.A.Davis, S.R.Hall, M.Li, K.H.Rhodes, W.Shenton, S.Vaucher, B.Zhang. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3753 (2000)
294. J.Liu, Y.Lu. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 90 (2006)
295. S.Connolly, D.Fitzmaurice. *Adv. Mater.*, **11**, 1202 (1999)
296. S.Mann, W.Shenton, M.Li, S.Connolly, D.Fitzmaurice. *Adv. Mater.*, **12**, 147 (2000)
297. A.J.Reynolds, A.H.Haines, D.A.Russell. *Langmuir*, **22**, 1156 (2006)
298. L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev, B.N.Khlebtsov, N.G.Khlebtsov. *Anal. Biochem.*, **341**, 16 (2005)
299. Г.С.Ландсберг. *Оптика*. Наука, Москва, 1976
300. S.E.M.Colaiaanni, J.Aubard, S.H.Hansen, O.F.Nielsen. *Vib. Spectrosc.*, **9**, 111 (1995)
301. M.Fleischman, P.J.Hendra, A.J.McQuillan. *Chem. Phys. Lett.*, **26**, 163 (1974)
302. О.А.Акипетров. *Сорос. образ. журн.*, **7**, 109 (2001)
303. A.Campion, P.Kambhampati. *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 241 (1998)
304. K.Kneipp, H.Kneipp, I.Itzkan, R.R.Dasari, M.S.Feld. *Chem. Phys.*, **247**, 155 (1999)
305. D.I.Kreimer, T.H.Nufert. *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **1**, 4 (1999)
306. F.Maroun, F.Ozanam, J.-N.Chazalviel, W.TheiB. *Vib. Spectrosc.*, **19**, 193 (1999)
307. D.Naumann, D.Helm, H.Labischinski. *Nature (London)*, **351**, 81 (1991)
308. D.Naumann, S.Keller, D.Helm, Ch.Schultz, B.Schrader. *J. Mol. Struct.*, **347**, 399 (1995)
309. H.H.Mantsch, D.Chapman. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Wiley, New York, 1996
310. K.Brandenburg, U.Seydel. *Chem. Phys. Lipids*, **96**, 23 (1998)
311. M.Osawa. *Top. Appl. Phys.*, **81**, 163 (2001)
312. K.Kneipp, Y.Wang, R.R.Dasari, M.S.Feld, B.D.Gilbert, J.Janni, J.I.Steinfield. *Spectrochim. Acta, Part A*, **51**, 2171 (1995)
313. S.R.Emory, S.Nie. *Anal. Chem.*, **69**, 2631 (1997)
314. T.Vo-Dinh. *TrAC — Trends Anal. Chem.*, **17**, 557 (1998)
315. X.Dou, Y.M.Jung, H.Yamamoto, S.Doi, Y.Ozaki. *Appl. Spectrosc.*, **53**, 133 (1999)
316. J.A.Seelenbinder, C.W.Brown, P.Pivarnik, A.G.Rand. *Anal. Chem.*, **71**, 1963 (1999)
317. K.Kneipp, H.Kneipp, R.Manoharan, E.B.Hanlon, I.Itzkan, R.R.Dasari, M.S.Feld. *Appl. Spectrosc.*, **52**, 1493 (1998)
318. R.F.Aroca, D.J.Ross, C.Domingo. *Appl. Spectrosc.*, **58**, 324A (2004)
319. C.W.Brown, Y.Li, J.A.Seelenbinder, P.Pivarnik, A.G.Rand, S.V.Letcher, O.J.Gregory, M.J.Platek. *Anal. Chem.*, **70**, 2991 (1998)
320. D.S.Grubisha, R.J.Lipert, H.Y.Park, J.Driskell, M.D.Porter. *Anal. Chem.*, **75**, 5936 (2003)
321. X.Dou, Y.Yamaguchi, H.Yamamoto, S.Doi, Y.Ozaki. *J. Raman Spectrosc.*, **29**, 739 (1998)
322. J.Ni, R.J.Lipert, G.B.Dawson, M.D.Porter. *Anal. Chem.*, **71**, 4903 (1999)
323. S.Xu, X.Ji, W.Xu, X.Li, L.Wang, Y.Bai, B.Zhao, Y.Ozaki. *Analyst*, **129**, 63 (2004)
324. A.A.Kamnev, L.A.Dykman, P.A.Tarantilis, M.G.Polissiou. *Biosci. Rep.*, **22**, 541 (2002)
325. И.Е.Ковалев, О.Ю.Полевая. *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям*. Наука, Москва, 1985
326. В.Т.Иванов, О.М.Вольпина, Т.М.Андропова. *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И.Менделеева*, **33**, 523 (1988)
327. R.Arnon, R.J.Horwitz. *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 449 (1992)
328. T.Ben-Yedidia, R.Arnon. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 442 (1997)
329. А.Ройт, Дж.Бростофф, Д.Мейл. *Иммунология*. Мир, Москва, 2000
330. W.J.Harris, C.Cunniugham. *Antibody Therapeutics*. Springer-Verlag, Berlin, 1995
331. М.-P.Marco, S.Gee, B.D.Hammonck. *TrAC — Trends Anal. Chem.*, **14**, 415 (1995)
332. В.А.Сергеев. *Вирусные вакцины*. Урожай, Киев, 1993
333. J.F.Stills. *ILAR J.*, **46**, 280 (2005)
334. J.McCafferty, A.D.Griffiths, G.Winter, D.J.Chiswell. *Nature (London)*, **348**, 552 (1990)
335. Р.В.Петров, Р.М.Хайтов. *Иммунология*, (1), 4 (1998)
336. Р.В.Петров, В.А.Кабанов, Р.М.Хайтов. *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И.Менделеева*, **33**, 502 (1988)
337. В.А.Дьяконова, С.В.Дамбаева, Н.М.Голубева, В.В.Бураков, Г.В.Шаронов, Е.Э.Комогорова, Б.В.Пинегин. *Физиология и патология иммунной системы*, **8**, 100 (2004)
338. J.Kreuter. *Pharm. Biotechnol.*, **6**, 463 (1995)
339. G.Gregoriadis. *Immunol. Today*, **11**, 89 (1990)
340. M.Fukasawa. *FEBS Lett.*, **441**, 353 (1998)
341. W.Morris. *Vaccine*, **12**, 5 (1994)
342. О.В.Масалова, А.В.Шепелев, С.Н.Атанадзе, З.Н.Парнес, В.С.Романова, О.М.Вольпина, Ю.А.Семилетов, А.А.Куш. *Докл. АН*, **369**, 411 (1999)
343. С.М.Андреев, А.А.Бабахин, А.О.Петрухина, В.С.Романова, З.Н.Парнес, Р.В.Петров. *Докл. АН*, **370**, 261 (2000)
344. D.Pantarotto, C.D.Partidos, J.Hoebeke, F.Brown, E.Kramer, J.-P.Briand, S.Muller, M.Prato, A.Bianco. *Chem. Biol.*, **10**, 961 (2003)
345. S.Shiosaka, H.Kiyama, A.Wanaka, M.Tohyama. *Brain Res.*, **382**, 399 (1986)
346. Л.А.Зильбер, В.В.Фризе. *Журн. эксперим. биол.*, **11**, 128 (1929)
347. J.Zozaya, J.Clark. *J. Exp. Med.*, **57**, 21 (1933)
348. Л.А.Зильбер. *Основы иммунологии*. Медгиз, Москва, 1958
349. О.Р.Ottersen, J.Storm-Mathisen. *Trends Neurosci.*, **10**, 250 (1987)
350. A.Wanaka, Y.Shiotani, H.Kiyama, T.Matsuyama, T.Kamada, S.Shiosaka, M.Tohyama. *Exp. Brain Res.*, **65**, 691 (1987)
351. A.Tomii, F.Masugi. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **44**, 75 (1991)
352. N.Tatsumi, Y.Terano, K.Hashimoto, M.Hiyoshi, S.Matsuura. *Osaka City Med. J.*, **39**, 167 (1993)
353. J.R.Moffett, M.G.Espey, M.A.A.Namoodiri. *Cell Tissue Res.*, **278**, 461 (1994)
354. L.A.Dykman, L.Yu.Matora, V.A.Bogatyrev. *J. Microbiol. Methods*, **24**, 247 (1996)
355. L.D.Walensky, P.Gascard, M.E.Fields, S.Blackshaw, J.G.Conboy, N.Mohandas, S.H.Snyder. *J. Cell Biol.*, **141**, 143 (1998)
356. J.Chen, F.Zou, N.Wang, S.Xie, X.Zhang. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1691 (2000)
357. A.L.Feldman, L.Tamarkin, G.F.Paciotti, B.W.Simpson, W.M.Linehan, J.C.Yang, W.E.Fogler, E.M.Turner, H.R.Alexander, S.K.Libutti. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 4628 (2000)
358. Л.В.Оленина, Е.Ф.Колесанова, Ю.В.Гервазиев, И.С.Зайцева, Т.Е.Кураева, Б.Н.Соболев, А.И.Арчаков. *Мед. иммунол.*, **3**, 231 (2001)
359. С.А.Староверов, Д.Н.Ермилов, А.А.Щербаков, С.В.Семенов, С.Ю.Щеголев, Л.А.Дыкман. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол.*, (3), 54 (2003)
360. Т.Ю.Загоскина. Дис. д-ра мед. наук. ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2003

361. D.V.Pow, D.K.Crook. *J. Neurosci. Methods*, **48**, 51 (1993)
362. A.Baude, Z.Nusser, E.Molnár, R.A.J.McIlhinney, P.Somogyi. *Neuroscience*, **69**, 1031 (1995)
363. L.Pickard, J.Noël, J.M.Henley, G.L.Collingridge, E.Molnar. *J. Neurosci.*, **20**, 7922 (2000)
364. S.Holmseth, Y.Dehnes, L.P.Bjørnsen, J.-L.Boulland, D.N.Furness, D.Bergles, N.C.Danbolt. *Neuroscience*, **136**, 649 (2005)
365. D.P.Harris, H.-M.Vordermeier, A.Arya, K.Bogdan, C.Moreno, J.Ivanyi. *Immunology*, **88**, 348 (1996)
366. M.K.-H.Schäfer, H.Varoqui, N.Defamie, E.Weihe, J.D.Erickson. *J. Biol. Chem.*, **277**, 50734 (2002)
367. M.J.Schell, M.E.Molliver, S.H.Snyder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3948 (1995)
368. M.J.Schell, O.B.Cooper, S.H.Snyder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2013 (1997)
369. M.J.L.Eliasson, S.Blackshaw, M.J.Schell, S.H.Snyder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3396 (1997)
370. N.Staimer, S.J.Gee, B.D.Hammock. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 273 (2001)
371. В.А.Деменев, М.А.Щинова, Л.И.Иванов, Р.Н.Воробьева, Н.И.Здановская, Н.В.Небайкина. *Вопросы вирусологии*, **41**, 107 (1996)
372. R.Kayed, E.Head, J.L.Thompson, T.M.McIntire, S.C.Milton, C.W.Cotman, C.G.Glabbe. *Science*, **300**, 486 (2003)
373. D.W.Kowalczyk, H.C.J.Ertl. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 751 (1999)
374. U.A.Hasan, A.M.Abai, D.R.Harper, B.W.Wren, W.J.W.Morrow. *J. Immunol. Methods*, **229**, 1 (1999)
375. M.A.Liu, M.R.Hillerman, R.Kurth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **772**, 1 (1995)
376. S.Gurunathan, D.M.Klinman, R.A.Seder. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 927 (2000)
377. Z.Cui, R.J.Mumper. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **5**, 11 (2003)
378. L.Zhang, G.Widera, D.Rabussay. *Bioelectrochemistry*, **63**, 369 (2004)
379. M.J.Roy, M.S.Wu, L.J.Barr, J.T.Fuller, L.G.Tussey, S.Speller, J.Culp, J.K.Burkholder, W.F.Swain, R.M.Dixon, G.Widera, R.Vessey, A.King, G.Ogg, A.Gallimore, J.R.Haynes, D.Heydenburg Fuller. *Vaccine*, **19**, 764 (2000)
380. C.M.Leutenegger, F.S.Boretti, C.N.Mislin, J.N.Flynn, M.Schroff, A.Habel, C.Junghans, S.A.Koenig-Merediz, B.Sigrist, A.Aubert, N.C.Pedersen, B.Wittig, H.Lutz. *J. Virol.*, **74**, 10447 (2000)
381. D.Chen, L.G.Payne. *Cell Res.*, **12**, 97 (2002)
382. D.Chen, C.Zuleger, Q.Chu, Y.F.Maa, J.Osorio, L.G.Payne. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **18**, 715 (2002)
383. H.J.Dean, D.Fuller, J.E.Osorio. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **26**, 373 (2003)
384. M.Thomas, A.M.Klibanov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9138 (2003)
385. A.K.Salem, C.F.Hung, T.W.Kim, T.C.Wu, P.C.Searson, K.W.Leong. *Nanotechnology*, **16**, 484 (2005)
386. Z.Zhao, T.Wakita, K.Yasui. *J. Virol.*, **77**, 4248 (2003)
387. Л.А.Дыкман, М.В.Сумарока, С.А.Староверов, И.С.Зайцева, В.А.Богатырев. *Изв. АН. Сер. биол.*, **31**, 86 (2004)
388. L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev, S.A.Staroverov, D.V.Pristensky, S.Yu.Shchyogolev, N.G.Khlebtsov. *Proc. SPIE*, **6164**, 38 (2006)
389. S.M.Moghimi, I.S.Muir, L.Illum, S.S.Davis, V.Kolbbaehofen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**, 157 (1993)
390. H.S.Kruth, J.Chang, I.Ifrim, W.Y.Zhang. *Eur. J. Cell Biol.*, **78**, 91 (1999)
391. H.Vallhov, J.Qin, S.M.Johansson, N.Ahlborg, M.A.Muhammed, A.Scheynius, S.Gabrielsson. *Nano Lett.*, **6**, 1682 (2006)
392. *Белки иммунной системы*. (Под ред. В.Т.Иванова). ИБХ РАН, Москва, 1997
393. R.H.Persellin, E.V.Hess, M.Ziff. *Arthritis Rheum.*, **10**, 99 (1967)
394. J.W.Measel. *Infect. Immun.*, **11**, 350 (1975)
395. M.Harth. *J. Rheumatol. Suppl.*, **5**, 7 (1979)
396. A.J.Lewis, J.Cottney, D.D.White, P.K.Fox, A.McNeillie, J.Dunlop, W.E.Smith, D.H.Brown. *Agents Actions*, **10**, 63 (1980)
397. S.Bajaj, I.Ahmad, M.Fatima, S.Raisuddin, S.B.Vohora. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **21**, 151 (1999)
398. J.Stejskal, V.D.M.Stejskal. *Neuroendocrinol. Lett.*, **20**, 351 (1999)
399. G.Graham. *Agents Actions Suppl.*, **44**, 209 (1993)
400. B.Merchant. *Biologicals*, **26**, 49 (1998)
401. R.Eisler. *Biol. Trace Elem. Res.*, **100**, 1 (2004)
402. R.Eisler. *Biogeochemical, Health, and Ecotoxicological Perspectives on Gold and Gold Mining*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2004
403. R.Shukla, V.Bansal, M.Chaudhary, A.Basu, R.R.Bhonde, M.Sastry. *Langmuir*, **21**, 10644 (2005)
404. Z.P.Xu, Q.H.Zeng, G.Q.Lu, A.B.Yu. *Chem. Eng. Sci.*, **61**, 1027 (2006)
405. H.Gu, P.L.Ho, E.Tong, L.Wang, B.Xu. *Nano Lett.*, **3**, 1261 (2003)
406. H.M.Joshi, D.R.Bhumkar, K.Joshi, V.Pokharkar, M.Sastry. *Langmuir*, **22**, 300 (2006)

GOLD NANOPARTICLES: PREPARATION, FUNCTIONALISATION, APPLICATIONS IN BIOCHEMISTRY AND IMMUNOCHEMISTRY

L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13, Prosp. Entuziastov, 410049 Saratov, Russian Federation, Fax +7(8452)97-0383*

The review traces the history and state-of-art applications of gold nanoparticles to biomedical studies. Special attention is given to the applications of colloidal gold in analytical solid-phase techniques, sol particle immunoassay and for studies of biologically active compounds by vibrational spectroscopy. The use of colloidal gold nanoparticles as antigen carriers for the production of antibodies is also discussed. Bibliography — 406 references.

Received 17th October 2006