

ГКР МЕТКИ НА ОСНОВЕ СИЛИКАТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ С АДСОРБИРОВАННЫМИ ЗОЛОТЫМИ НАНОЗВЕЗДАМИ

**© 2024 г. О. А. Иноземцева^{1,2,*}, Е. С. Прихожденко¹, А. М. Карташова¹,
Ю. А. Тюнина^{1,2}, А. М. Захаревич¹, А. М. Буров², Б. Н. Хлебцов²**

¹ *Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012, Саратов,
ул. Астраханская, 83, Россия*

² *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии
наук – обособленной структурное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский
научный центр РАН», 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13, Россия*

**e-mail: Inozemtsevaoo@mail.ru*

Поступила в редакцию 20.06.2024 г.

После доработки 20.08.2024 г.

Принята к публикации 20.08.2024 г.

Большой интерес в качестве платформы для биоанализа представляют метки гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) благодаря сочетанию сильного оптического сигнала, фотостабильности и узких спектральных линий. Несмотря на значительный прогресс в области синтеза новых типов ГКР-меток на основе золотых наночастиц, получение микрочастиц, имеющих интенсивность комбинационного рассеяния достаточную для детекции единичной метки с использованием обычного микроскопа комбинационного рассеяния (КР), является нетривиальной задачей. В данной работе были синтезированы и охарактеризованы гибридные коллоидные наноконпозиты на основе микрочастиц диоксида кремния и золотых нанозвезд (НЗВ) состава $\text{SiO}_2/\text{НЗВ}/\text{SiO}_2$. Золотые нанозвезды двух типов, одни с плазмонным резонансом в области 700 нм и другие с двумя максимумами 650 и 900 нм, были предварительно синтезированы и адсорбированы на поверхности монодисперсных коллоидных частиц диоксида кремния диаметром 1.5 мкм. В качестве молекул с высоким сечением комбинационного рассеяния использовали три вида ароматических тиолов: 4-нитробензентиол, нафталентиол и 1,4-бензедитиол. Продемонстрирована возможность измерения ГКР сигнала от единичной микрочастицы с вариацией интенсивности не более 20%, а также возможность мультиплексного определения различных микрочастиц на одном КР изображении. Проведена комплексная оценка стабильности, в том числе фотостабильности, измеряемого ГКР сигнала во времени при изменении физико-химических параметров микроокружения.

Ключевые слова: ГКР метки, нанозвезды, силикатные микрочастицы, плазмонный резонанс

SERS TAGS BASED ON SILICA MICROSPHERES WITH ADSORBED GOLD NANOSTARS

© 2024 O. A. Inozemtseva, E. S. Prikhozhenko, A. M. Kartashova,
Yu. A. Tyunina, A. M. Zakharevich, A. M. Burov, B. N. Khlebtsov

SERS tags are of great interest as bioanalysis platforms due to their combination of strong optical signal, photostability, and narrow spectral lines. Despite significant progress in the synthesis of new types of SERS tags based on gold nanoparticles, obtaining microparticles with a Raman scattering intensity sufficient for detection of a single tag using a conventional Raman microscope is not a trivial task. In this paper, hybrid colloidal nanocomposites based on silica microparticles and gold nanostars (AuNSTs) with the composition $\text{SiO}_2/\text{AuNSTs}/\text{SiO}_2$ were synthesized and characterized. Two types of gold nanostars, one with a plasmon resonance at 700 nm and the other with two maxima at 650 and 900 nm, were pre-synthesized and adsorbed on the surface of monodisperse colloidal silica particles with a diameter of 1.5 μm . Three types of thiolated aromatic molecules were used as Raman reporters: 4-nitrothiophenol, naphthalenethiol, and 1,4-benzenedithiol. The possibility of measuring the SERS signal from a single microparticle with an intensity variation of no more than 20% has been demonstrated, as well as the possibility of multiplex determination of various microparticles in one Raman image. A comprehensive assessment of the stability, including photostability, of the measured SERS signal over time was carried out when the physicochemical parameters of the microenvironment changed.

Keywords: SERS tags, nanostars, silica particles, plasmon resonance

ВВЕДЕНИЕ

Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) [1], в основе которого лежит сильное локальное усиление поля вблизи металлических наноструктур, является достойным конкурентом традиционным аналитическим методам благодаря узким спектральным линиям и высокой чувствительности вплоть до обнаружения единичных молекул [2–4]. Тематика гигантского комбинационного рассеяния была подробно рассмотрена в ряде обзоров [5–8]. С практической точки зрения следует различать два основных направления использования комбинационного рассеяния (КР). В первом случае используют ГКР субстраты, металлические наноструктурированные поверхности, для усиления интенсивности спектральных линий исследуемого вещества. Во втором случае используют новый вид нанозондов, названных ГКР-метками, которые объединяют металлические наночастицы и специфические органические молекулы с высоким сечением комбинационного рассеяния – репортеры комбинационного рассеяния. Такие ГКР-активные нанозонды генерируют сильные характерные сигналы комбинационного рассеяния и могут быть использованы для косвенного определения молекул-мишеней с помощью лазерной ГКР-микроскопии, по аналогии с флуоресцентной микроскопией с использованием органических красителей [9] и квантовых точек [10].

Разработку ГКР-меток можно считать значительным шагом вперед в спектроскопическом анализе биологических образцов, поскольку эти метки обладают четырьмя основными преимуществами по сравнению с другими оптическими зондами. Во-первых, ГКР-метки могут обеспечить достаточно высокую чувствительность для анализа следовых количеств анализируемого вещества [3, 11]. Во-вторых, ГКР-метки на основе металлических наночастиц с иммобилизованными молекулами репортерами пригодны для мультиплексного анализа благодаря наличию колебательных спектральных полос комбинационного рассеяния с узкой шириной линий [12, 13]. В-третьих,

чрезвычайно короткое время жизни комбинационного рассеяния света предотвращает фотообесцвечивание, передачу энергии или тушение репортеров в возбужденном состоянии [14, 15], что обеспечивает высокую фотостабильность. И, в-четвертых, оптимальный контраст может быть достигнут за счет использования излучения ближнего инфракрасного диапазона для минимизации автофлуоресценции клеток и тканей, что позволяет использовать ГКР-метки для неинвазивной визуализации живых объектов. Указанные преимущества, а также возможность использования одного источника возбуждения для нескольких меток, выдвигают подобные структуры в качестве яркой альтернативы органическим флуорофорам и другим маркерам для биовизуализации [16].

Среди разработанных к настоящему времени ГКР-меток можно выделить три основных типа. Первый – это плазмонные частицы, имеющие на своей поверхности молекулы с высоким сечением комбинационного рассеяния. В простейшем случае могут использоваться золотые наносферы с тиолированными ароматическими молекулами и красителями [17–19]. Недавний прогресс в области коллоидной химии предоставил исследователям широкий арсенал возможностей по варьированию структуры металлических наночастиц и настройке плазмонного резонанса. Благодаря этому были разработаны различные виды ГКР-меток на основе металлических наноболочек, включая золотые наноболочки на основе диоксида кремния [20, 21], полых золотых наноболочек [22, 23] и наноклеток [24, 25], и многие другие [26–28]. Среди всего многообразия используемых наночастиц особо следует отметить золотые нанозвезды. Помимо сравнительно простой технологии получения таких частиц и возможности настройки плазмонного резонанса в широком диапазоне длин волн от 600 нм до 2 мкм, малые радиусы кривизны на лучах этих наночастиц приводят к формированию областей чрезвычайно сильного усиления электромагнитного поля, что называется «эффектом острого наконечника» [29–31].

Второй тип ГКР-меток включает различные агрегаты, микроагрегаты и частицы «ядро-спутник». Благодаря сверхсильному усилению поля в зазорах агрегаты металлических наночастиц дает большее усиление ГКР по сравнению с изолированными наночастицами [32–35].

По сравнению с традиционными агрегированными системами наночастиц, системы «ядро–спутник» обладают лучшей воспроизводимостью благодаря обеспечению высокого сродства к взаимодействию между «ядром» и «спутниками» [36]. Для синтеза этих систем преимущественно используют неорганические темплаты в качестве основных наноструктур [37], в то время как более мелкие неорганические наночастицы, такие как золото, серебро или полупроводниковые наночастицы, используются в качестве «спутников» [38–40].

Третий тип – метки с усилением поля в зазоре (gap-enhanced Raman tags), в которых репортерные молекулы защищены от нежелательных внешних воздействий и агрегации частиц, демонстрируют превосходные ГКР характеристики благодаря сильно усиленным электромагнитным полям в зазорах между металлическими структурами «ядра» и «оболочки» [41–43]. Для улучшения биосовместимости меток и снижения их неспецифического связывания и агрегации были разработаны процедуры нанесения защитного покрытия, которое в дальнейшем может быть функционализировано таргетными молекулами [15, 44].

Несмотря на значительный прогресс в области синтеза новых типов ГКР-меток на основе золотых наночастиц получение микроагрегатов, имеющих интенсивность комбинационного рассеяния, достаточную для детектирования единичной метки с использованием обычного микроскопа комбинационного рассеяния, является нетривиальной задачей. Для реализации одночастичного комбинационного рассеяния перспективным представляется сборка нескольких (от десятков до сотен) ГКР-меток на

поверхности или внутри темплатных микроструктур. В качестве такой матрицы для сборки мы предлагаем использовать монодисперсные микрочастицы диоксида кремния, которые являются одним из наиболее распространенных и широко используемых синтетических материалов, применяемых в катализе, зондировании, визуализации и адресной доставке лекарственных средств благодаря своей биоинертности, химической стабильности, возможности получения частиц в широком диапазоне размеров, а также биофункционализации их поверхности [45, 46].

В данной работе золотые нанозвезды двух типов, одни с плазмонным резонансом в области 700 нм и другие с двумя максимумами 650 и 900 нм, были предварительно синтезированы и адсорбированы на поверхность монодисперсных силикатных частиц диаметром 1.5 мкм. Нанозвезды ГКР-активировали с использованием трех видов молекул с высоким сечением КР: 4-нитробензентиол (НБТ), нафталентиол (НТ) и 1,4-бензедитиол (БДТ), затем вторично покрывали силикатной оболочкой с образованием структуры $\text{SiO}_2/\text{НЗВ}/\text{SiO}_2$. Разработанные нами гибридные композиты позволяют расширить возможности использования золотых нанозвезд в качестве ГКР-меток, благодаря возможности измерения ГКР сигнала от единичной микрочастицы с возможностью мультиплексного определения различных микрочастиц на одном микроскопическом изображении. Используемые в работе силикатные микрочастицы являются интересной альтернативой другим ГКР-меткам благодаря своей стабильности и легкой химической функционализации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали следующие реагенты: аммиак (30% водный раствор), 4-нитробензентиол, нафталентиол, 1,4-бензедитиол, цитрат натрия, поливинилпирролидон (ПВП, $M_w = 10$ кДа и $M_w = 40$ кДа), L-аскорбиновая кислота (АК, > 99.9), соляная кислота

(HCl, 37 масс. % в воде), тетраэтоксисиликат (ТЭОС, 98%), аминопропилтриметоксисилан (АПТМС, 98%) были получены из Sigma-Aldrich; тригидрат тетрахлораурата водорода ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, ЗХВК) и нитрат серебра (AgNO_3 , > 99%) были приобретены у Alfa Aesar. В работе использовались 96% этиловый спирт (Кировский БиоХим завод) и деионизованная вода, очищенная с помощью системы Milli-Q Integral 5.

Получение золотых нанозвезд

В данной работе мы использовали два вида нанозвезд, отличающихся по размеру, форме лучей и положению плазмонного резонанса.

Первый тип нанозвезд (НЗВ1) был синтезирован по двухэтапному протоколу с использованием золотых зародышевых частиц [47, 48] с небольшими изменениями. На первом этапе с использованием метода Френса [49] были синтезированы золотые наносферы со средним диаметром 15 нм, которые использовались в качестве затравок для синтеза золотых нанозвезд. Для этого в колбе Эрленмейера вскипятили 238 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке. Добавили 2.5 мл 1% раствора HAuCl_4 и 7.75 мл 1% раствора цитрата натрия. Раствор перемешивали в течение 15 минут, при этом цвет раствора изменился с бесцветного на красный. Затем к коллоиду при перемешивании добавили 250 мг ПВП (40 кДа). Золотые наносферы, покрытые ПВП, центрифугировали при 20000 g в течение часа. Полученный осадок ресуспензировали в этаноле. Концентрация наночастиц составила около $6 \cdot 10^{12}$ мл^{-1} , что соответствует оптической плотности 4, измеренной в кювете с длиной оптического пути 1 см. На втором этапе 10 г ПВП (40 кДа) растворяли в 100 мл диметилформамида. После этого к раствору добавляли 1 мл золотых наносфер ($6 \cdot 10^{12}$ мл^{-1}) и 0.4 мл 8% раствора HAuCl_4 . Реакцию роста нанозвезд проводили в течение суток. Затем золотые нанозвезды очищали от избытка

продуктов реакции центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспензировали в 20 мл этанола.

Для получения второго вида нанозвезд (НЗВ2) использовали цитратные золотые зародышевые наносферы, полученные аналогично вышеприведенному протоколу, но без стабилизации поливинилпирролидоном. На втором этапе для синтеза нанозвезд к 4.5 мл 15 нм зародышевых частиц с концентрацией $1.6 \cdot 10^{12}$ мл⁻¹ добавляли последовательно 46.25 мл воды, 3.75 мл 10 мМ HAuCl_4 и 150 мкл 1М HCl . Далее при перемешивании (700 об/мин) добавили 750 мкл 4 мМ нитрата серебра и 750 мкл аскорбиновой кислоты (АК; 100 мМ). Раствор перемешивали в течение 30 секунд, при этом его цвет быстро изменился со светло-красного на сине-зеленый. Затем к коллоиду при перемешивании добавили 5 мл 1% раствора ПВП (10 кДа) в этаноле и перемешивали еще 10 минут. Затем золотые нанозвезды очищали от продуктов реакции центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспензировали в 20 мл этанола.

Получение композитных микрочастиц

Для синтеза изодисперсных микрочастиц диоксида кремния использовали методику многостадийного перероста, детально описанную в нашей работе [50]. Число циклов доращивания подбирали таким образом, чтобы размер силикатных частиц был около 1.5 мкм.

Для адсорбции золотых нанозвезд (как НЗВ1, так и НЗВ2) поверхность микрочастиц диоксида кремния была функционализирована аминогруппами путем допирования аминопропилтриметоксисиланом. К коллоиду 1.5 мкм силикатных частиц в этаноле добавляли соответствующий силан в количестве 1% от объема реакционной смеси. Суспензию частиц инкубировали 1 час при комнатной температуре при перемешивании. Полученные аминированные частицы центрифугировали при

5000 об/мин 1 минуту и повторно ресуспензировали в этаноле с помощью ультразвуковой обработки.

Далее, 1 мл коллоида функционализированных силикатных частиц добавляли к 4 мл концентрированного коллоида золотых нанозвезд. Полученную смесь инкубировали в течение суток при перемешивании 500 об/мин. Затем добавляли 10 мкл 2мМ спиртового раствора ароматического тиола и инкубировали 30 минут при перемешивании 500 об/мин. Для дополнительной стабилизации добавляли поливинилпирролидон в этаноле (10 кДа, 1%) в количестве 10% от объема. Инкубировали дополнительно 30 минут при перемешивании 500 об/мин. Далее частицы центрифугировали при 5000 об/мин 1 минуту и ресуспензировали в 1 мл этанола. Для каждого вида золотых нанозвезд было получено три вида ГКР-меток, содержащих различные репортерные молекулы: 4-нитробензентиол, нафталентиол и 1,4-бензедитиол. Полученные ГКР-метки на основе силикатных микросфер с ГКР-активированными золотыми нанозвездами на поверхности использовали для дальнейшей характеристики и формирования вторичной силикатной оболочки.

Формирование вторичной силикатной оболочки

Для формирования вторичной силикатной оболочки использовали полученные выше ГКР метки без какой-либо модификации. На 1 мл исходной суспензии ГКР-меток добавляли 1 мл этанола, 50 мкл аммиака и 10 мкл ТЭОСа. Затем аналогичную аликвоту ТЭОСа добавили еще дважды с интервалом 1 час. Реакционную смесь оставили на ночь при перемешивании. Полученные композитные ГКР-метки структуры $\text{SiO}_2/\text{H3B}/\text{SiO}_2$ с толщиной вторичной силикатной оболочки 32 ± 5 нм центрифугировали (5000 об/мин 1 минуту), затем диспергировали в этаноле. Эту процедуру повторяли трижды. Далее композиты характеризовали с помощью ПЭМ и ГКР-спектроскопии и микроскопии.

Характеризация образцов

Спектры экстинкции были записаны с помощью спектрофотометра Specord S300 (Analytik Jena, Германия). Измерения проводили в диапазоне длин волн 320–1100 нм с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 2 и 10 мм. Изображения методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования исследовательским оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологий "Симбиоз" (ИБФРМ РАН, Саратов). Сканирующие электронно-микроскопические изображения получали с использованием микроскопа Mira-II LMU (Tescan, Чехия) в Центре коллективного пользования (СГУ, Саратов). Для анализа образцы нано- и микрочастиц наносили на кремневую подложку, ускоряющее напряжение при исследовании было 30 кВ.

Концентрацию силикатных микрочастиц определяли гравиметрически, путем взвешивания сухого остатка после лиофилизации коллоида на аналитических весах. Общий вес частиц в 1 мл коллоида вместе с данными ПЭМ позволяют однозначно определять числовую концентрацию частиц по формуле:

$$N = \frac{3m}{4\pi\rho R^3} \quad (1)$$

где m – масса кремнезема, выраженная в мг, ρ – плотность кремнезема, выраженная в мг/см³, R – радиус частиц, выраженный в сантиметрах.

Измерение размера и электрокинетического потенциала золотых наночастиц и силикатных частиц проводили с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern).

Измерение ГКР спектров от единичных меток

Для измерений ГКР спектров от единичных частиц 1 мкл образца (или смеси образцов) наносили на поверхность кварцевого стекла. Измерения гигантского

комбинационного рассеяния (ГКР) света проводили с помощью конфокального КР-микроскопа Renishaw inVia (Renishaw, Великобритания), оснащенного лазером 785 нм. Лазерное излучение было сфокусировано на образце с помощью объектива 50x/0.5 N.A. Регистрацию единичных спектров проводили при мощности лазера 25 мкВт (0.1%) и времени накопления сигнала 5 с. Для оценки степени деградации образцов под воздействием лазерного излучения проводили регистрацию 60 спектров с частицы, при этом мощность лазера и время накопления сигнала были аналогичны регистрации единичных спектров. Также проводилось картирование высохшей капли смеси образцов: 40x40 точек (1600 отдельных спектров), шаг сканирования 1 мкм, мощность лазера и время накопления сигнала аналогичны регистрации единичных спектров.

Для регистрации спектров использовали ПО КР-микроскопа Renishaw WiRE (Renishaw, Великобритания). Дальнейшую обработку и анализ данных ГКР-спектроскопии проводили на языке Python 3 в среде Jupyter Notebook. Данные были загружены с помощью `renishawWiRE.WDFReader`. Удаление полиномиального фона проводили полиномом 5 степени с помощью функции `polyfit` библиотеки NumPy. Проводили нормировку единичных спектров образцов, их усреднение и приведение к диапазону 0–1. Для получения карты распределения меток (БДТ, НБТ и НТ) использовали умножение матриц по следующему уравнению:

$$A=Y \cdot X^{-1} \quad (2)$$

Y – матрица спектров – результатов картирования, размерность 1600x1011 (1600 спектров, 1011 интенсивностей)

X^{-1} – инвертированная (с помощью `linalg.pinv` библиотеки NumPy) матрица нормализованных усредненных по 5 измерениям спектров с образцов БДТ, НБТ и НТ, размерность 1011x3,

A – матрица коэффициентов, размерность 1600x3.

Далее определяли пороговые значения коэффициентов для каждого вещества по Оцу (`filters.threshold_otsu` библиотеки `skimage`): коэффициент компонента для спектров ниже порога становился нулевым. Для получения RGB изображения матрицу коэффициентов после фильтрации по Оцу приводили к диапазону 0–1.

Исследования коллоидной и фотостабильности

Исследование проводили для двух коллоидов $\text{SiO}_2/\text{HЗВ2}$ и $\text{SiO}_2/\text{HЗВ2}/\text{SiO}_2$. В качестве репортерной молекулы был выбран нитробензентиол. Для оценки стабильности комбинационного рассеяния в зависимости от физико-химических параметров внешней среды 100 мкл коллоида микрочастиц добавляли в растворы соляной кислоты ($\text{pH} = 2$), гидроксида натрия ($\text{pH} = 10$) и культуральной среды DMEM. Спектры комбинационного рассеяния от суспензии частиц записывали через каждые 30 минут в течение 4 часов. Для измерения спектров комбинационного рассеяния использовали установку PeakSeeker Pro (Ocean optics, США). Измерения проводили в 1 см четырехсторонних кварцевых кюветах при возбуждении длиной волны 785 нм. Мощность лазерного излучения равнялась 30 мВт, время накопления сигнала 10 секунд. Для уменьшения эффекта внутреннего фильтра лазерный луч был сфокусирован вблизи стенки кюветы. В качестве параметра, характеризующего стабильность образца, использовали интенсивность комбинационного рассеяния со сдвигом 1335 см^{-1} , соответствующим вибрации нитрогруппы.

Коллоидную стабильность силикатных частиц характеризовали путем измерения электрокинетического потенциала в воде и буферных смесях с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern). Регистрацию pH осуществляли на pH-метре pH-150МИ с точностью измерения $\text{pH} \pm 0.05$ единиц pH. Для приготовления буферных растворов использовали универсальную буферную смесь (фосфорная, уксусная и борная кислоты, 0.04 M). Для получения буферного раствора заданной величины pH к 100 мл

указанной смеси добавляли аликвоту 0.2 н NaOH согласно справочным данным [51].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методы получения золотых нанозвезд делятся на два принципиально различных подхода: с использованием зародышевых частиц [29, 52] и беззародышевые протоколы синтеза [53, 54]. В данной работе мы применили две вариации зародышевых протоколов. В обоих случаях в качестве центров роста нанозвезд использовали 15 нм квазисферические золотые частицы. В первом случае (образец НЗВ1) восстановителем золота являлся диметилформамид, а анизотропные условия роста создавались путем адсорбции поливинилпирролидона на кристаллических гранях частицы в процессе роста. Во втором случае (образец НЗВ2) восстановление золота на поверхности зародышей осуществлялось аскорбиновой кислотой, а для создания анизотропных условий роста использовался хлорид серебра, получаемый непосредственно в коллоиде путем реакции нитрата серебра с соляной кислотой. Следует отметить принципиально разную скорость реакции синтеза нанозвезд для двух описанных выше подходов. В первом случае для полного восстановления золота необходимо как минимум 12 часов, а во втором реакция длится около 30 секунд. Для обоих протоколов, варьируя концентрацию золотых зародышей и количество золото-содержащего прекурсора, можно регулировать размер звезд и число «лучей» [29, 55].

Синтезированные наночастицы были охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии. Для золотых нанозвезд принято говорить не о среднем размере как таковом, а о группе геометрических параметров, таких как средний размер ядра, длина и число лучей.

Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения золотых нанозвезд, полученных восстановлением ЗХВК на поверхности 15 нм «зародышей» диметилформамидом (а) и аскорбиновой кислотой (б). Размерная шкала равна 200 нм. Панель (в) показывает спектры экстинкции синтезированных наночастиц. Спектр 1 – для нанозвезд на панели (а), спектр 2 – для нанозвезд на панели (б).

Так, из данных просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1а) видно, что для образца НЗВ1 средний размер ядра составил 100 нм, длина лучей 20–30 нм и количество лучей от 1 до 4. Микрофотография ПЭМ, приведенная на рис. 1б, соответствует нанозвездам, полученным восстановлением золота аскорбиновой кислотой (НЗВ2). Видно, что средний размер ядра таких частиц составлял 42 нм, длина лучей 15–20 нм и число лучей от 3 до 10. Следует также отметить, что для НЗВ2 лучи были существенно более острыми чем для НЗВ1. Данные размерных параметров нанозвезд, полученные из микрофотографий ПЭМ, хорошо согласуются с величинами, определенными методом динамического светорассеяния (измеренными в этаноле), которые составили 82.4 ± 38.8 нм для образца НЗВ1 и 68.8 ± 26.2 нм – для НЗВ2.

Другим существенным различием в образцах является различие в условных размерах частиц приблизительно в 2.5 раза. Это объясняется тем, что для синтеза НЗВ2 использовали концентрации золотых зародышевых наносфер, которые составили 4.5 мл золотых зародышей (с концентрацией $1.6 \cdot 10^{12}$ мл⁻¹), а для НЗВ1 – 1 мл золотых наносфер (то есть $6 \cdot 10^{12}$ мл⁻¹). При этом количество восстановленной ЗХВК также существенно отличалось: для НЗВ2 добавляли 3.75 мл 10 мМ HAuCl_4 , а для НЗВ1 – 0.4 мл 240 мМ HAuCl_4 . Исходя из указанных соотношений, разница в объемах частиц должна составлять 11.5 раз, что соответствует разнице в размерах около 2.3 раз.

Обсудим далее оптические свойства полученных частиц. На рис. 1в показаны спектры экстинкции золотых коллоидов. В согласии с данными наших предыдущих

исследований [56] в спектре существуют два максимума, первый – отвечает за колебания электронов в шероховатом ядре нанозвезды, второй – за плазмонные волны в тонких лучах (в особенности в лучах, расположенных напротив друг друга). Для НЗВ1 в спектре экстинкции (1) первый максимум локализован около 650 нм, а второй – около 900 нм. Для образца НЗВ2, за счет наличия острых и тонких лучей, длинноволновый резонанс смещен в область за пределами детекции спектрометра и виден только как подъем в «красной» части спектра. Коротковолновый резонанс шероховатого ядра находится в спектральном диапазоне около 700 нм (2). В целом, можно ожидать, что измеренные оптические свойства для обоих видов наночастиц позволят получать усиленное электромагнитное поле вблизи лучей при возбуждении лазерным излучением ближнего инфракрасного диапазона.

В качестве матрицы для сборки золотых нанозвезд в ГКР активные микроструктуры использовали изодисперсные частицы диоксида кремния. На рис. 2а показаны сканирующие электронно-микроскопические изображения таких частиц.

Рис. 2. Сканирующее электронно-микроскопическое изображение силикатных микрочастиц (а). Масштабная шкала 10 мкм. На вставке показано увеличенное изображение отдельных частиц. Масштабная шкала 1 мкм. Гистограмма распределения силикатных частиц по размерам (б).

На вставке показано увеличенное изображение, демонстрирующее идеальную сферическую форму частицы. На рис. 2б приведена гистограмма распределения силикатных микрочастиц по размерам. Средний диаметр составил 1493 нм, а среднеквадратичное отклонение 21 нм. Для последующей адсорбции золотых нанозвезд силикатные микрочастицы были функционализированы аминопропилтриметоксисиланом

для введения аминогрупп, обладающих положительным зарядом. Исходные силикатные микрочастицы в воде имели электрокинетический потенциал -31.4 ± 5.3 мВ. После процедуры аминирования величина электрокинетического потенциала составила $+14.5 \pm 5.7$ мВ.

В работе [57] были проведены систематические исследования влияния концентрации аminosилана и содержания воды на плотность аминогрупп, привитых на поверхность силикатных частиц в смеси этанол-вода. Показано, что контроль гидролиза и конденсации аminosилана позволяет регулировать плотность аминогрупп на поверхности кремнезема, смещая величину изоэлектрической точки в широком диапазоне pH (2.9–9.2) [57]. Измерения электрокинетического потенциала наших образцов при различных pH показали значение изоэлектрической точки силикатных микрочастиц, функционализированных аминопропилтриметоксисиланом, равное 4.8. Для исходных силикатных частиц изоэлектрическая точка находилась в области значения pH 2.4, что соответствует литературным данным [58–60].

В отличие от обычно используемых ГКР меток, основанных на отдельных сферических наночастицах золота или серебра, [12, 15, 61] в данной работе золотые нанозвезды двух видов, стабилизированные поливинилпирролидоном, были собраны посредством электростатических взаимодействий на поверхности положительно заряженных аминированных силикатных микросфер. Для достижения относительно интенсивных сигналов комбинационного рассеяния света использовали молекулы с высоким сечением комбинационного рассеяния света, такие как различные ароматические тиолы (нафталентиол, бензедитиол, нитробензентиол), которые благодаря сродству тиольной группы к золоту и относительной прочности связи Au-S, могут связываться с поверхностью золотых нанозвезд.

На вставках на рис. 3 представлены изображения сканирующей электронной микроскопии микросфер диоксида кремния с адсорбированными на поверхности ГКР-активированными золотыми нанозвездами двух видов. При этом нанозвезды независимо от их вида и размерных характеристик равномерно распределены по поверхности силикатной частицы, без формирования агрегатов.

Рис. 3. Электронно-микроскопические изображения двух типов композитных ГКР-меток с большими ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$) и малыми ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$) звездами на поверхности силикатных микросфер (а). Масштабная шкала 1 мкм. Спектры экстинкции композитных ГКР-меток (б). Спектр 1 – для образца ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$), спектр 2 – для образца ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$).

Важно отметить, что микрочастицы диоксида кремния после адсорбции золотых нанозвезд также сохранили коллоидную стабильность, не агрегированы, на СЭМ изображении (рис. 3) микросферы отстоят отдельно друг от друга.

Интересно определить число наночастиц золота на поверхности силикатных частиц и сопоставить расчётные данные с изображениями СЭМ. Учитывая, что масса единичной микросферы диоксида кремния с диаметром 1.5 мкм равна $3 \cdot 10^{-9}$ мг, а в 1 мл суспензии содержится 6 мг частиц, то мы получаем число частиц в одном миллилитре $2 \cdot 10^9$ штук.

Так, для больших нанозвезд (НЗВ1), согласно экспериментальным данным, из 1 мл золотых зародышей с концентрацией $6 \cdot 10^{12}$ частиц/мл было получено 20 мл коллоида нанозвезд. Для адсорбции на силикатные микросферы взяли одну пятую часть, т. е. $1.2 \cdot 10^{12}$ частиц. Таким образом на одну силикатную частицу приходится максимум 600 таких нанозвезд.

Для НЗВ2 брали 4.5 мл золотых зародышей с концентрацией $1.6 \cdot 10^{12}$ частиц, в результате получали 20 мл коллоида нанозвезд, где находилось $7.2 \cdot 10^{12}$ частиц. Для адсорбции на силикатные микросферы также брали одну пятую часть, т. е. $1.44 \cdot 10^{12}$ звезд. В этом случае для образца малых золотых звезд (НЗВ2) максимальное число частиц равно 720 шт на одну силикатную микросферу.

Спектры экстинкции для НЗВ1 и НЗВ2, приведенные на рис. 3б, демонстрируют, что положения пиков поверхностного плазмонного резонанса для звезд, адсорбированных на силикатных микросферах, не отличаются от таковых для исходных коллоидов нанозвезд. Таким образом, покрывая поверхность темплатной микрочастицы, золотые нанозвезды оптически не взаимодействуют друг с другом, и их оптические характеристики остаются без изменений. В целом, это дает нам право ожидать, что полученные композитные структуры способны проявить себя в качестве эффективных ГКР меток при возбуждении лазерным излучением ближнего ИК диапазона.

Полученные композитные микросферы диоксида кремния, повторно капсулировали в оболочку из диоксида кремния для защиты молекул с высоким сечением комбинационного рассеяния. Сканирующая электронная микроскопия образцов показала, что частицы сохраняют монодисперсность и коллоидную стабильность на всех этапах получения композитного образца (рис. 4).

Рис. 4. Электронно-микроскопические изображения двух типов композитных ГКР-меток: с большими ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$) (а, б) и малыми ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$) звездами (в, г) на поверхности силикатных микросфер. Масштабные шкалы 20 мкм (а, в) и 1 мкм (б, г).

В результате ГКР метки защищены, а толщина вторичной силикатной оболочки составляет 32 ± 5 нм независимо от вида нанозвезд на поверхности силикатной частицы.

Для демонстрации возможности детектирования единичных микрочастиц с использованием микроскопа комбинационного рассеяния полученные ГКР метки наносили на поверхность кварцевого стекла. Локализация отдельных микрочастиц определялась с использованием светового микроскопа, оснащенного 50х объективом. Далее микроскоп переключали в режим накопления сигнала комбинационного рассеяния и для каждого образца записывали спектр ГКР от пяти отдельных микрочастиц. На рис. 5а в верхнем ряду показан спектр ГКР, полученный от пяти частиц с 1.5 мкм силикатным ядром и адсорбированными на его поверхности НЗВ1, функционализированными 1,4-бензедитиолом в качестве молекулы с высоким сечением комбинационного рассеяния.

Рис. 5. ГКР спектры от пяти единичных микрочастиц $\text{SiO}_2@NЗВ1$ (сверху), $\text{SiO}_2@NЗВ2$ (посередине) и $\text{SiO}_2@NЗВ1@SiO_2$ (а). В качестве репортерной молекулы использовали бензедитиол. Микроскопическое изображение единичных микрочастиц $\text{SiO}_2@NЗВ1$ (б). Цифрами отмечены частицы, от которых получали спектр ГКР. Суммированные данные относительной интенсивности ГКР от единичных микрочастиц для двух видов нанозвезд ($NЗВ1$ и $NЗВ2$) с и без силикатной оболочки, для трех видов ароматических тиолов (1,4-бензедитиол (БДТ), нитробензентиол (НБТ) и нафталентиол (НТ)) представлены на панели (в).

Локализация этих микрочастиц отмечена цифрами на микроскопическом изображении (рис. 5б). Видно, что для данного образца линии гигантского комбинационного рассеяния соответствуют бензедитиолу [62] и представлены в исследуемом спектральном диапазоне вибрацией C-S связи при 730 см^{-1} , двойным пиком определяемым колебаниями (C6-C1-C2)+(C3-C4-C5) при 1007 см^{-1} и вибрацией бензольного кольца при 1058 см^{-1} , вибрацией C-H связи совместно с колебаниями (C2-

C3)+(C5-C6) при 1177 см^{-1} и наиболее выраженным пиком, определяемым растяжением бензольного кольца, при 1560 см^{-1} . В дальнейшем для простоты при обсуждении мы будем называть величину наиболее выраженного пика ГКР от меток «интенсивностью ГКР». Следует отметить, что для бензедитиола наиболее выраженный неперекрывающийся с другими ароматическими тиолами пик проявляется при 1560 см^{-1} , для нафталентиола при 1379 см^{-1} , а для нитробензентиола – это пик, связанный с вибрацией нитрогруппы, при 1335 см^{-1} . На средней панели на рис. 5а показаны аналогичные спектры ГКР, измеренные для микрочастиц с адсорбированными нанозвездами меньшего размера НЗВ2. Видно, что спектральные характеристики не меняются, однако интенсивность ГКР для данных меток была приблизительно в 5 раз ниже. Это демонстрирует, что использование крупных нанозвезд является более эффективной стратегией по сравнению с более мелкими, вероятно, за счет большего усиления локального поля вблизи поверхности при облучении лазером с длиной волны 785 нм. На нижней панели рис. 5а показаны спектры ГКР после покрытия образца $\text{SiO}_2@\text{НЗВ2}$ силикатной оболочкой. Видно, что для этого образца формирование на поверхности защитной силикатной оболочки не влияет на уровень ГКР сигнала от отдельных частиц. Суммированные данные по интенсивности ГКР для меток с различными адсорбированными нанозвездами до и после силикатного покрытия и для трех видов репортерных молекул показаны на рис. 5в. По результатам полученных данных можно сделать ряд выводов. Во-первых, следует отметить существенно большую интенсивность ГКР для образцов с НЗВ1 по сравнению с образцами с НЗВ2 для всех выбранных ароматических тиолов. Например, для образца $\text{SiO}_2@\text{НЗВ1}$ с адсорбированным нитробензентиолом интенсивность ГКР до покрытия силикатной оболочкой была около 13000 отсчетов, а для $\text{SiO}_2@\text{НЗВ2}$ около 5000 отсчетов. Во-вторых, покрытие силикатной оболочкой не оказывает влияние на ГКР интенсивность от меток на

основе НЗВ2 и приводит к уменьшению интенсивности ГКР от меток на основе НЗВ1 приблизительно в 2.5 раза. В-третьих, для всех типов исследуемых микрочастиц вариации интенсивности ГКР при измерении с одинаковыми условиями фокусировки и времени накопления сигнала не превышали 20%. Наконец, следует отметить, что измеряемые уровни сигнала ГКР от отдельных частиц на порядки превосходили уровни шума, что позволяет говорить о безусловной детектируемости отдельных ГКР меток методом спектроскопии комбинационного рассеяния.

Далее мы решили проверить возможность одновременного детектирования различных ГКР меток, имеющих одинаковую структуру, но отличающихся видом используемой репортерной молекулы. Для данного исследования смесь ГКР меток вида $\text{SiO}_2@\text{НЗВ1}@\text{SiO}_2$ была нанесена на поверхность кварцевого стекла и на выбранном участке, содержащем группу агрегированных и неагрегированных микрочастиц, проведено ГКР картирование. На рис. 6а показано декодированное по основной линии бензедитиола изображение интенсивности ГКР в исследуемой области. На рис. 6б показано аналогичное изображение для нитробензентиола, рис. 6в – нафталентиола.

Рис. 6. ГКР картирование области с нанесенной смесью микрочастиц, кодированных различными ароматическими тиолами. Изображение декодировано по интенсивности характерной линии бензедитиола при 1563 см^{-1} (а), нафталентиола – при 1385 см^{-1} (б), нитробензентиола – при 1335 см^{-1} (в). Панель (г) показывает оптическое микроскопическое изображение сканируемой области. Панель (д) показывает типичные ГКР спектры исследуемых микрочастиц и вариации интенсивности (среднее значение и стандартное отклонение) линий комбинационного рассеяния.

Для сопоставления точек высокой интенсивности с положением микрочастиц на рис. 6г показано оптическое изображение указанной области. Несмотря на то, что на обычном микроскопическом изображении все частицы выглядят одинаково, КР-картирование позволяет однозначно отличить ГКР метки, «кодированные» различными ароматическими тиолами. Типичные спектры ГКР из наиболее интенсивных точек КР-карты показаны на рис. 6д. Видно четкое различие спектральных линий для каждой репортерной молекулы. Дополнительно, микронный размер меток, соответствующий шагу сканирования, позволяет различать число частиц в агрегате. В случае картирования больших по размеру образцов, например интраоперационной ГКР биовизуализации опухолей [63–65], когда пятно фокусировки значительно превышает размер микрочастиц, их число можно оценить, сопоставляя абсолютные значения интенсивности ГКР. Проведенное исследование позволяет предположить, что разработанные ГКР метки могут использоваться для мультиплексного мечения различных образцов или для мультиплексного ГКР-иммуноанализа [6, 66].

Стабильность ГКР сигнала является ключевым параметром, определяющим эффективность использования таких меток для многих приложений. Несмотря на то, что комбинационное рассеяние гораздо в меньшей степени подвержено фотообесцвечиванию по сравнению с флуоресценцией, возможный разогрев металлических наночастиц под действием резонансного лазерного облучения может приводить к фотохимическим реакциям репортерных молекул и падению интенсивности ГКР. Другим возможным механизмом фотообесцвечивания ГКР меток является плавление металлических наночастиц, в результате которого происходит полное исчезновение сигнала ГКР. В данной работе мы исследовали эффекты фотообесцвечивания разработанных ГКР-активных микрочастиц при облучении сфокусированным лазерным излучением в течение 300 секунд. Данное время значительно превышает типичные времена накопления сигнала

в точке для всех видов ГКР исследований. На рис. 7 показаны данные изменения интенсивности ГКР для образцов с адсорбированными НЗВ1 (а) и НЗВ2 (б), покрытых и непокрытых вторичной стабилизирующей силикатной оболочкой. В качестве репортерной молекулы использовали нитробензентиол.

Рис. 7. Изменение интенсивности комбинационного рассеяния от образцов с адсорбированными НЗВ1 (а) и НЗВ2 (б) для микрочастиц, покрытых (штриховая кривая) и непокрытых (сплошная кривая) силикатной оболочкой, при облучении лазером в течение 300 секунд. В качестве репортерной молекулы использовали нитробензентиол. Исследовали значение интенсивности линии, соответствующей вибрации нитрогруппы.

Видно, что для обоих видов образцов в случае непокрытых частиц падение интенсивности ГКР за 300 секунд составляет около 50%. Покрытие ГКР меток силикатной оболочкой существенно повышает фотостабильность, и после облучения ГКР метки сохраняют 85% своей яркости. Мы предполагаем, что основным стабилизирующим механизмом здесь является препятствие проникновению кислорода к поверхности нанозвезд и уменьшение фотоокисления.

Помимо фотостабильности, другим немаловажным фактором является коллоидная и химическая стабильность меток в агрессивных средах. Для исследования такой стабильности мы инкубировали ГКР метки $\text{SiO}_2@NЗВ1$ и $\text{SiO}_2@NЗВ1@\text{SiO}_2$ в средах с $\text{pH} = 2$, $\text{pH} = 10$ и в культуральной клеточной среде DMEM. В качестве репортерной молекулы снова использовали нитробензентиол. ГКР спектры от меток измеряли в коллоиде каждые 30 минут в течение 4 часов. Такой вид исследования позволил комплексно оценить коллоидную и химическую стабильность по изменению интенсивности сигнала ГКР. На Рисунке 8 представлены суммированные данные.

Рис. 8. Изменение относительной интенсивности комбинационного рассеяния от образцов с адсорбированными НЗВ1 для микрочастиц непокрытых (а) и покрытых (б) силикатной оболочкой при инкубации в среде с рН = 2 (кружки), рН = 10 (квадраты) и культуральной клеточной среде DMEM (треугольники). В качестве репортерной молекулы использовали нитробензентиол. Исследовали значение интенсивности линии, соответствующей вибрации нитрогруппы.

Видно, что для ГКР меток без силикатной оболочки интенсивность комбинационного рассеяния падает до 73% от исходной величины при инкубации в щелочной и культуральной средах и до 30% при инкубации в кислой среде с рН = 2. Важно отметить, что микрочастицы не агрегируют при таких значениях рН благодаря перемешиванию. Из-за высокой массы композитные частицы оседают на дно пробирки за 1 час. Однако они могут быть легко ресуспендированы перемешиванием. В случае вторичной силикатной оболочки ультразвуковая обработка позволяет полностью ресуспендировать коллоид после оседания и месяца хранения. Покрытие ГКР меток вторичной силикатной оболочкой позволяет увеличить коллоидную и химическую стабильность, а уровень сигнала после инкубации составляет 85–90% и не зависит от вида среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были получены композитные структуры состава $\text{SiO}_2/\text{НЗВ}/\text{SiO}_2$, на основе силикатных микросфер, содержащих адсорбированный слой ГКР активированных золотых нанозвезд. Такие частицы показали себя отличными ГКР-метками для получения интенсивных сигналов комбинационного рассеяния от молекул с высоким сечением КР

(4-нитробензентиол, нафталентиол и 1,4-бензедитиол), сохранившими собственные сигналы после покрытия вторичной оболочкой диоксида кремния. Частицы сохраняют монодисперсность и коллоидную стабильность на всех этапах получения композитного образца. Частицы, вторично покрытые диоксидом кремния, достаточно стабильны в кислой (pH = 2) и щелочной среде (pH = 10), а также в клеточном субстрате. Эту процедуру можно использовать для включения различных органических КР-соединений в ГКР метки для получения большого числа сигналов, а благодаря возможности измерения ГКР сигнала от единичной микрочастицы, можно реализовать мультиплексное определение различных микрочастиц на одном микроскопическом изображении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 23-24-00062).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schlücker S.* Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2014. V. 53. № 19. P. 4756–4795.
<https://doi.org/10.1002/anie.201205748>
2. *Nie S., Emory S.R.* Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering // *Science* 1997. V. 275. № 5303. P. 1102–1106.
<https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102>
3. *Michaels A.M., Nirmal M., Brus L.E.* Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. № 43. P. 9932–9939.
<https://doi.org/10.1021/ja992128q>
4. *Jiang., Bosnick K., Maillard M. et al.* Single molecule Raman spectroscopy at the junctions of large Ag nanocrystals // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V. 107. № 37. P. 9964–9972.
<https://doi.org/10.1021/jp034632u>
5. *Wang Y., Yan B., Chen L.* SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. № 3. P. 1391–1428.
<https://doi.org/10.1021/cr300120g>
6. *Wang Z., Zong S., Wu L. et al.* SERS-activated platforms for immunoassay: probes, encoding methods, and applications // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 12. P. 7910–7963.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00027>
7. *Laing S., Jamieson L.E., Faulds K. et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy for *in vivo* biosensing // *Nat. Rev. Chem.* 2017. V. 1. № 8. P. 0060.
<https://doi.org/10.1038/s41570-017-0060>
8. *Smith B.R., Gambhir S.S.* Nanomaterials for *in vivo* imaging // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 3. P. 901–986.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00073>

9. Wang R., Yu C., Yu F. *et al.* Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2010. V. 29. № 9. P. 1004–1013.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.005>

10. Wang Y., Chen L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine // *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 2011. V. 7. № 4. P. 385–402.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.12.006>

11. Kneipp K., Wang Y., Kneipp H. *et al.* Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS) // *Phys. Rev. Lett.* 1997. V. 78. № 9. P. 1667–1670.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>

12. Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection // *Science.* 2002. V. 297. № 5586. P. 1536–1540.

<https://doi.org/10.1126/science.297.5586.1536>

13. Yuan H., Fales A.M., Khoury C.G. *et al.* Spectral characterization and intracellular detection of surface-enhanced Raman scattering (SERS)-encoded plasmonic gold nanostars // *J. Raman. Spectrosc.* 2013. V. 44. № 2. P. 234–239.

<https://doi.org/10.1002/jrs.4172>

14. Wang Y., Seebald J.L., Szeto D.P. *et al.* Biocompatibility and biodistribution of surface-enhanced Raman scattering nanoprobe in zebrafish embryos: *in vivo* and multiplex imaging // *ACS Nano.* 2010. V. 4. № 7. P. 4039–4053

<https://doi.org/10.1021/nn100351h>

15. Doering W.E., Nie S. Spectroscopic tags using dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 22. P. 6171–6176.

<https://doi.org/10.1021/ac034672u>

16. Qian X., Peng X.-H., Ansari D.O. *et al.* *In vivo* tumor targeting and spectroscopic

detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 1. P. 83–90.

<https://doi.org/10.1038/nbt1377>

17. *Cheng Y., Samia A.C., Meyers J.D. et al.* Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 32. P. 10643–10647.

<https://doi.org/10.1021/ja801631c>

18. *Ghosh P., Han G., De M. et al.* Gold nanoparticles in delivery applications // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1307–1315.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>

19. *Grubisha D.S., Lipert R.J., Park H.-Y. et al.* Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 21. P. 5936–5943.

<https://doi.org/10.1021/ac034356f>

20. *Wang H., Kundu J., Halas N.J.* Plasmonic nanoshell arrays combine surface-enhanced vibrational spectroscopies on a single substrate // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2007. V. 46. № 47. P. 9040–9044.

<https://doi.org/10.1002/anie.200702072>

21. *Lal S., Grady N.K., Kundu J. et al.* Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. № 5. P. 898.

<https://doi.org/10.1039/b705969h>

22. *Schwartzberg A.M., Oshiro T.Y., Zhang J.Z. et al.* Improving nanoprobe using surface-enhanced Raman scattering from 30-nm hollow gold particles // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 13. P. 4732–4736.

<https://doi.org/10.1021/ac060220g>

23. *Ochsenkühn M.A., Jess P.R.T., Stoquert H. et al.* Nanoshells for surface-enhanced Raman spectroscopy in eukaryotic cells: cellular response and sensor development // *ACS Nano*. 2009. V. 3. № 11. P. 3613–3621.
<https://doi.org/10.1021/nn900681c>
24. *Rycenga M., Wang Z., Gordon E. et al.* Probing the photothermal effect of gold-based nanocages with surface-enhanced Raman scattering (SERS) // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 52. P. 9924–9927.
<https://doi.org/10.1002/anie.200904382>
25. *Fang J., Lebedkin S., Yang S. et al.* A new route for the synthesis of polyhedral gold mesocages and shape effect in single-particle surface-enhanced Raman spectroscopy // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. № 18. P. 5157.
<https://doi.org/10.1039/c1cc10328h>
26. *Boca S.C., Astilean S.* Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags // *Nanotech.* 2010. V. 21. № 23. P. 235601.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/23/235601>
27. *Jiang L., Qian J., Cai F. et al.* Raman reporter-coated gold nanorods and their applications in multimodal optical imaging of cancer cells // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. № 9. P. 2793–2800.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-4894-6>
28. *Su P.-J., Wu M.-H., Wang H.-M. et al.* Circulating tumour cells as an independent prognostic factor in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma undergoing chemoradiotherapy // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 31423.
<https://doi.org/10.1038/srep31423>
29. *Senthil Kumar P., Pastoriza-Santos I., Rodríguez-González B. et al.* High-yield synthesis

and optical response of gold nanostars // *Nanotech.* 2008. V. 19. № 1. P. 015606.

<https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/01/015606>

30. *Barbosa S., Agrawal A., Rodríguez-Lorenzo L. et al.* Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars // *Langmuir.* 2010. V. 26. № 18. P. 14943–14950.

<https://doi.org/10.1021/la102559e>

31. *Guerrero-Martínez A., Barbosa S., Pastoriza-Santos I. et al.* Nanostars shine bright for you // *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 2011. V. 16. № 2. P. 118–127.

<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.12.007>

32. *Fang J., Huang Y., Li X. et al.* Aggregation and surface-enhanced Raman activity study of dye-coated mixed silver–gold colloids // *J. Raman. Spectrosc.* 2004. V. 35. № 11. P. 914–920.

<https://doi.org/10.1002/jrs.1225>

33. *Wei G., Zhou H., Liu Z. et al.* A simple method for the preparation of ultrahigh sensitivity surface enhanced Raman scattering (SERS) active substrate // *Appl. Surf. Sci.* 2005. V. 240. № 1–4. P. 260–267.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.06.116>

34. *Su X., Zhang J., Sun L. et al.* Composite organic–inorganic nanoparticles (coins) with chemically encoded optical signatures // *Nano. Lett.* 2005. V. 5. № 1. P. 49–54.

<https://doi.org/10.1021/nl0484088>

35. *Zhang G., Qu G., Chen Y. et al.* Controlling carbon encapsulation of gold nano-aggregates as highly sensitive and spectrally stable SERS tags for live cell imaging // *J. Mater. Chem. B.* 2013. V. 1. № 35. P. 4364.

<https://doi.org/10.1039/c3tb20801j>

36. *Gandra N., Abbas A., Tian L. et al.* Plasmonic planet–satellite analogues: hierarchical self-assembly of gold nanostructures // *Nano. Lett.* 2012. V. 12. № 5. P. 2645–2651.

<https://doi.org/10.1021/nl3012038>

37. *Rossner C., Fery A.* Planet-satellite nanostructures from inorganic nanoparticles: from synthesis to emerging application // *MRS Commun.* 2020. V. 10. № 1. P. 112–122.
<https://doi.org/10.1557/mrc.2019.163>
38. *Wu L.-A., Li W.-E., Lin D.-Z. et al.* Three-dimensional sers substrates formed with plasmonic core-satellite nanostructures // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 13066.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13577-9>
39. *Meng D., Ma W., Wu X. et al.* DNA-driven two-layer core–satellite gold nanostructures for ultrasensitive microRNA detection in living cells // *Small.* 2020. V. 16. № 23.
<https://doi.org/10.1002/sml.202000003>
40. *San Juan A.M.T., Chavva S.R., Tu D. et al.* Synthesis of SERS-active core–satellite nanoparticles using heterobifunctional PEG linkers // *Nanoscale. Adv.* 2022. V. 4. № 1. P. 258–267.
<https://doi.org/10.1039/D1NA00676B>
41. *Khlebtsov N.G., Lin L., Khlebtsov B.N. et al.* Gap-enhanced Raman tags: fabrication, optical properties, and theranostic applications // *Theranostics.* 2020. V. 10. № 5. P. 2067–2094.
<https://doi.org/10.7150/thno.39968>
42. *Li Z.-Y., Xia Y.* Metal nanoparticles with gain toward single-molecule detection by surface-enhanced Raman scattering // *Nano. Lett.* 2010. V. 10. № 1. P. 243–249.
<https://doi.org/10.1021/nl903409x>
43. *Hu C., Shen J., Yan J. et al.* Highly narrow nanogap-containing Au@Au core–shell SERS nanoparticles: size-dependent Raman enhancement and applications in cancer cell imaging // *Nanoscale.* 2016. V. 8. № 4. P. 2090–2096.
<https://doi.org/10.1039/C5NR06919J>
44. *Mulvaney S.P., Musick M.D., Keating C.D. et al.* Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: a new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman

scattering // *Langmuir*. 2003. V. 19. № 11. P. 4784–4790.

<https://doi.org/10.1021/la026706j>

45. *Sanles-Sobrido M., Exner W., Rodríguez-Lorenzo L. et al.* Design of SERS-encoded, submicron, hollow particles through confined growth of encapsulated metal nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 7. P. 2699–2705.

<https://doi.org/10.1021/ja8088444>

46. *Hwang D.W., Ko H.Y., Kim S. et al.* Development of a quadruple imaging modality by using nanoparticles // *Chem. – A Eur. J.* 2009. V. 15. № 37. P. 9387–9393.

<https://doi.org/10.1002/chem.200900344>

47. *Khlebtsov B.N., Burov A.M., Zarkov S. V. et al.* Surface-enhanced Raman scattering from Au nanorods, nanotriangles, and nanostars with tuned plasmon resonances // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2023. V. 25. № 45. P. 30903–30913.

<https://doi.org/10.1039/D3CP04541B>

48. *Pazos-Perez N., Guerrini L., Alvarez-Puebla R.A.* Plasmon tunability of gold nanostars at the tip apexes // *ACS Omega*. 2018. V. 3. № 12. P. 17173–18179.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02686>

49. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.

<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>

50. *Khlebtsov B.N., Burov A.M.* Synthesis of monodisperse silica particles by controlled regrowth // *Colloid Journal*. 2023. V. 85. № 3. P. 376–389.

<https://doi.org/10.31857/S0023291223600293>

51. *Лурье Ю.Ю.* Справочник по аналитической химии. Москва: Химия. 1989.

52. *Zou X., Ying E., Dong S.* Seed-mediated synthesis of branched gold nanoparticles with the assistance of citrate and their surface-enhanced Raman scattering properties // *Nanotech.*

2006. V. 17. № 18. P. 4758–4764.

<https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/18/038>

53. *Hao E., Bailey R.C., Schatz G.C. et al.* Synthesis and optical properties of “branched” gold nanocrystals // *Nano. Lett.* 2004. V. 4. № 2. P. 327–330.

<https://doi.org/10.1021/nl0351542>

54. *Bakr O.M., Wunsch B.H., Stellacci F.* High-yield synthesis of multi-branched urchin-like gold nanoparticles // *Chem. Mater.* 2006. V. 18. № 14. P. 3297–3301.

<https://doi.org/10.1021/cm060681i>

55. *Xie J., Zhang Q., Lee J.Y. et al.* The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for *in vivo* applications // *ACS Nano.* 2008. V. 2. № 12. P. 2473–2480.

<https://doi.org/10.1021/nm800442q>

56. *Khlebtsov N.G., Zarkov S. V., Khanadeev V.A. et al.* A novel concept of two-component dielectric function for gold nanostars: theoretical modelling and experimental verification // *Nanoscale.* 2020. V. 12. № 38. P. 19963–19981.

<https://doi.org/10.1039/D0NR02531C>

57. *Liu C., Han Y., Wang Z. et al.* Preparation of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified silica particles with tunable isoelectric point // *Langmuir.* 2024. V. 40. № 24. P. 12565–12572.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c01027>

58. *Айлер Р.К.* Коллоидная химия кремнезема и силикатов. Москва: Госстройиздат. 1959.

59. *Сидорова М.П., Кибирова Н.А., Дмитриева И.Б.* Адсорбция неионогенных поверхностно-активных веществ на кварце // *Коллоидный Журнал.* 1979. Т. 41. С. 277–282.

60. *Сидорова М.П., Дмитриева И.Б., Голуб Т.П.* Комплексное исследование электроповерхностных свойств кварца в растворах 1: 1 электролитов // *Коллоидный*

Журнал. 1979. Т. 41. С. 488–493.

61. *Nam J.-M., Thaxton C.S., Mirkin C.A.* Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins // *Science*. 2003. V. 301. № 5641. P. 1884–1886.

<https://doi.org/10.1126/science.1088755>

62. *Shao Y., Li C., Feng Y. et al.* Surface-enhanced Raman scattering and density functional theory study of 1,4-benzenedithiol and its silver complexes // *Spectrochim. Acta Part. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. V. 116. P. 214–219.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.037>

63. *Liu H., Gao X., Xu C. et al.* SERS tags for biomedical detection and bioimaging // *Theranostics*. 2022. V. 12. № 4. P. 1870–1903.

<https://doi.org/10.7150/thno.66859>

64. *Wojtynek N.E., Mohs A.M.* Image-guided tumor surgery: The emerging role of nanotechnology // *WIREs Nanomed. Nanobiotech.* 2020. V. 12. № 4.

<https://doi.org/10.1002/wnan.1624>

65. *Lane L.A.* Biomedical SERS: spectroscopic detection and imaging *in vivo*. 2022; P. 451–522.

https://doi.org/10.1142/9789811235252_0012

66. *Laing S., Gracie K., Faulds K.* Multiplex *in vitro* detection using SERS // *Chem. Soc. Rev.* 2016. V. 45. № 7. P. 1901–1918.

<https://doi.org/10.1039/C5CS00644A>

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения золотых нанозвезд, полученных восстановлением ЗХВК на поверхности 15-нм «зародышей» диметилформамидом (а) и аскорбиновой кислотой (б). Размерная шкала равна 200 нм. Панель (в) показывает спектры экстинкции синтезированных наночастиц. Спектр 1 – для нанозвезд на панели (а), спектр 2 – для нанозвезд на панели (б).

Рис. 2. Сканирующее электронно-микроскопическое изображение силикатных микрочастиц (а). Масштабная шкала 10 мкм. На вставке показано увеличенное изображение отдельных частиц. Масштабная шкала 1 мкм. Гистограмма распределения силикатных частиц по размерам (б).

Рис. 3. Электронно-микроскопические изображения двух типов композитных ГКР-меток с большими ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$) и малыми ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$) звездами на поверхности силикатных микросфер (а). Масштабная шкала 1 мкм. Спектры экстинкции композитных ГКР-меток (б). Спектр 1 – для образца ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$), спектр 2 – для образца ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$).

Рис. 4. Электронно-микроскопические изображения двух типов композитных ГКР-меток: с большими ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ1}$) (а, б) и малыми ($\text{SiO}_2/\text{НЗВ2}$) звездами (в, г) на поверхности силикатных микросфер. Масштабные шкалы 20 мкм (а, в) и 1 мкм (б, г).

Рис. 5. ГКР спектры от пяти единичных микрочастиц $\text{SiO}_2@\text{НЗВ1}$ (сверху), $\text{SiO}_2@\text{НЗВ2}$ (посередине) и $\text{SiO}_2@\text{НЗВ1}@\text{SiO}_2$ (а). В качестве репортерной молекулы использовали бензедитиол. Микроскопическое изображение единичных микрочастиц $\text{SiO}_2@\text{НЗВ1}$ (б). Цифрами отмечены частицы, от которых получали спектр ГКР. Суммированные данные относительной интенсивности ГКР от единичных микрочастиц для двух видов нанозвезд (НЗВ1 и НЗВ2) с и без силикатной оболочки, для трех видов ароматических тиолов (1,4-бензедитиол (БДТ), нитробензентиол (НБТ) и нафталентиол (НТ)) представлены на панели (в).

Рис. 6. ГКР картирование области с нанесенной смесью микрочастиц, кодированных различными ароматическими тиолами. Изображение декодировано по интенсивности характерной линии бензедитиола при 1563 см^{-1} (а), нафталентиола – при 1385 см^{-1} (б), нитробензентиола – при 1335 см^{-1} (в). Панель (г) показывает оптическое микроскопическое изображение сканируемой области. Панель (д) показывает типичные ГКР спектры исследуемых микрочастиц и вариации интенсивности (среднее значение и стандартное отклонение) линий комбинационного рассеяния.

Рис. 7. Изменение интенсивности комбинационного рассеяния от образцов с адсорбированными НЗВ1 (а) и НЗВ2 (б) для микрочастиц, покрытых (штриховая кривая) и непокрытых (сплошная кривая) силикатной оболочкой, при облучении лазером в течение 300 секунд. В качестве репортерной молекулы использовали нитробензентиол. Исследовали значение интенсивности линии, соответствующей вибрации нитрогруппы.

Рис. 8. Изменение относительной интенсивности комбинационного рассеяния от образцов с адсорбированными НЗВ1 для микрочастиц непокрытых (а) и покрытых (б) силикатной оболочкой при инкубации в среде с $\text{pH} = 2$ (кружки), $\text{pH} = 10$ (квадраты) и культуральной клеточной среде DMEM (треугольники). В качестве репортерной молекулы использовали нитробензентиол. Исследовали значение интенсивности линии, соответствующей вибрации нитрогруппы.

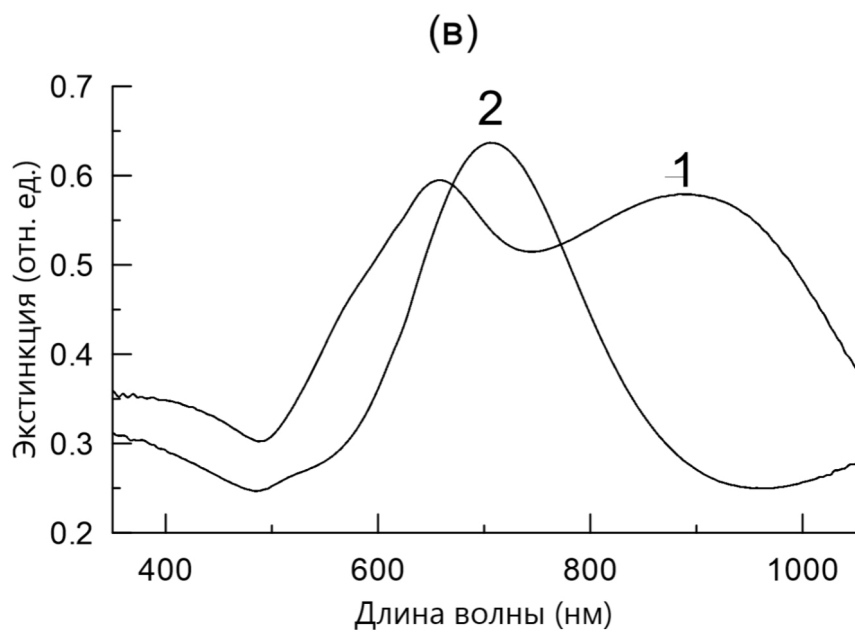
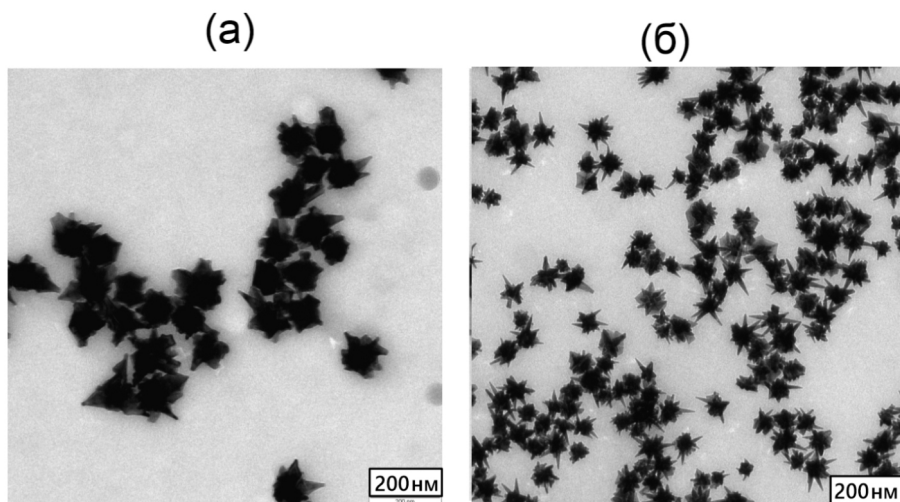


Рисунок 1. Иноземцева О.А.

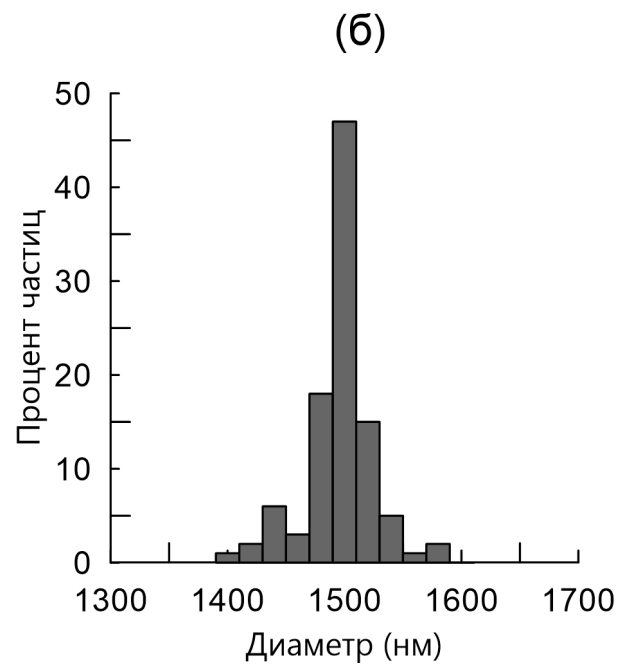
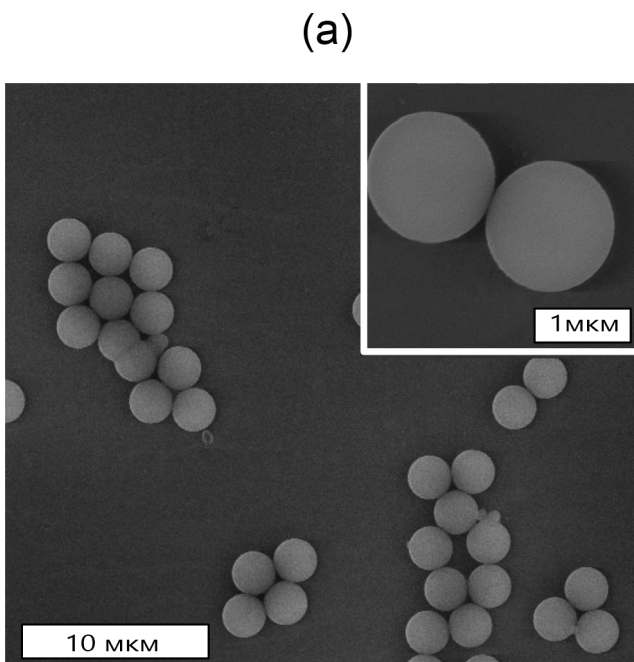
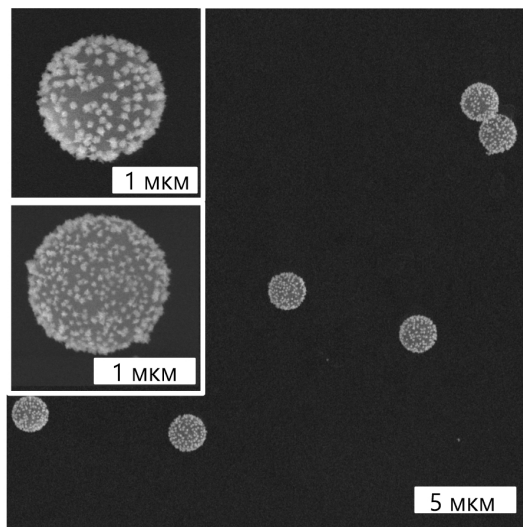


Рисунок 2. Иноземцева О.А.

(a)



(б)

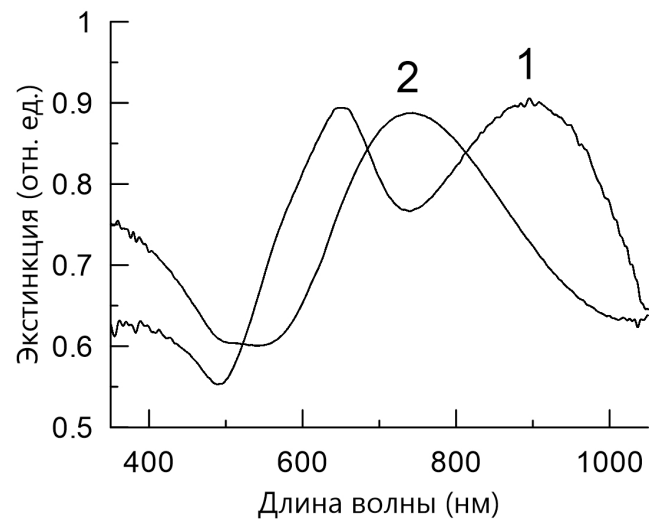


Рисунок 3. Иноземцева О.А.

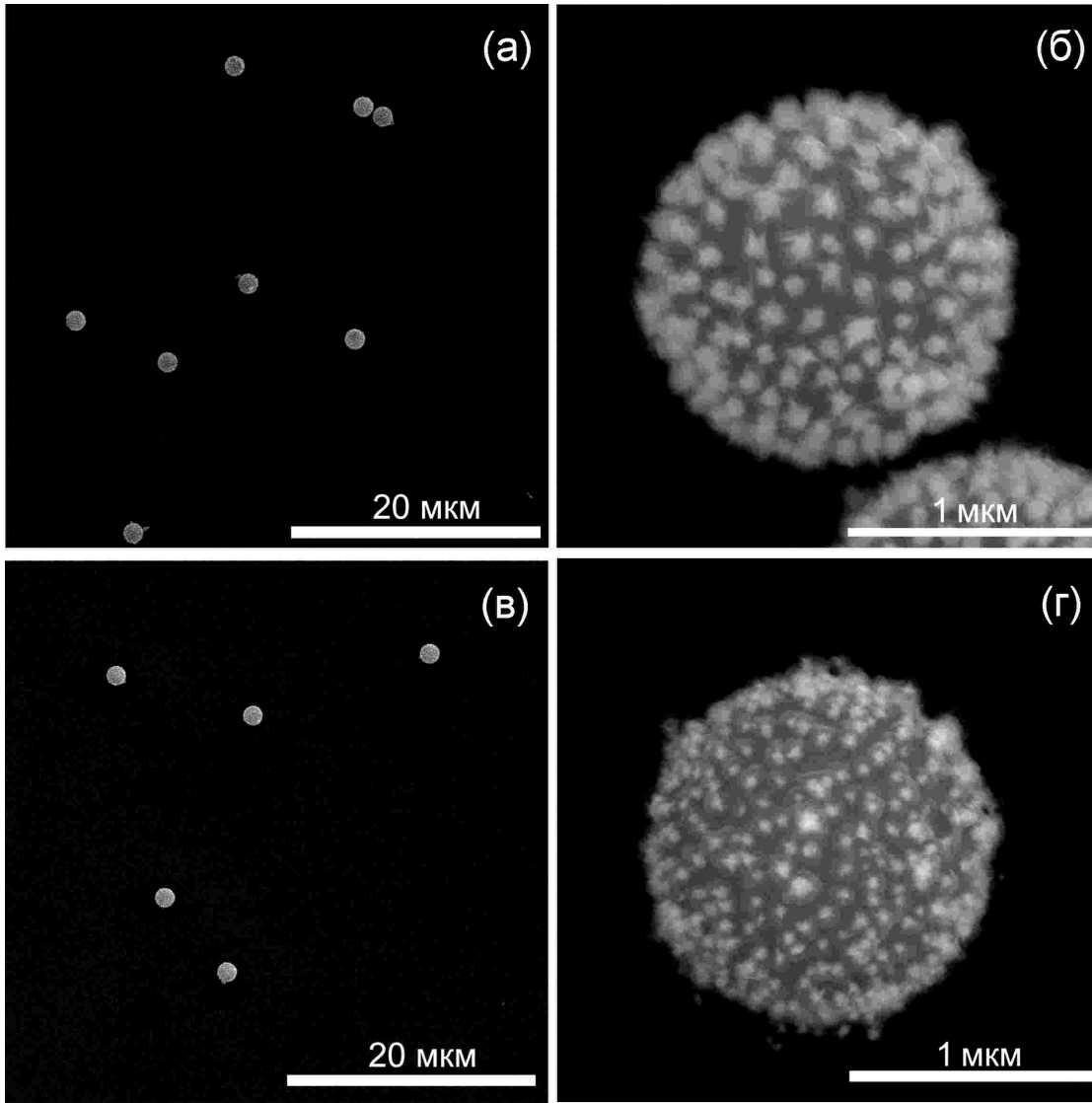


Рисунок 4. Иноземцева О.А.

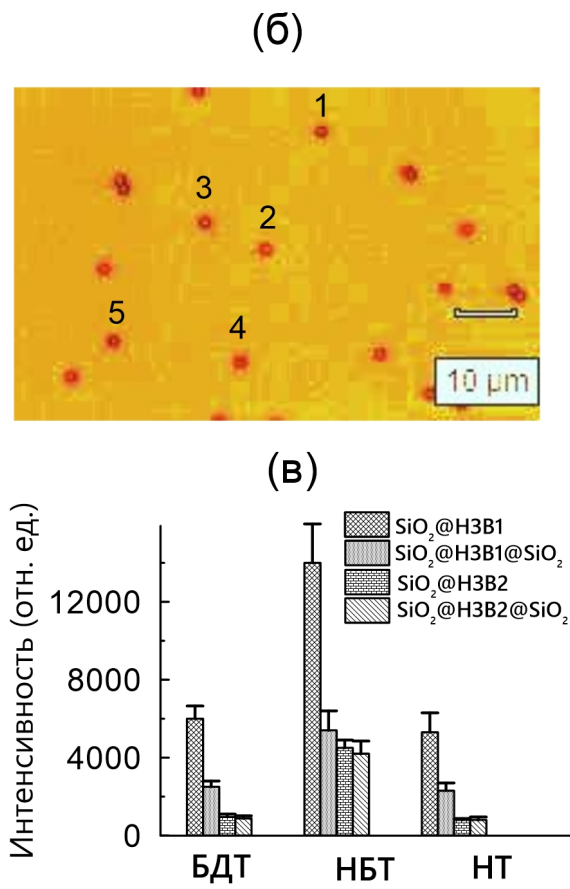
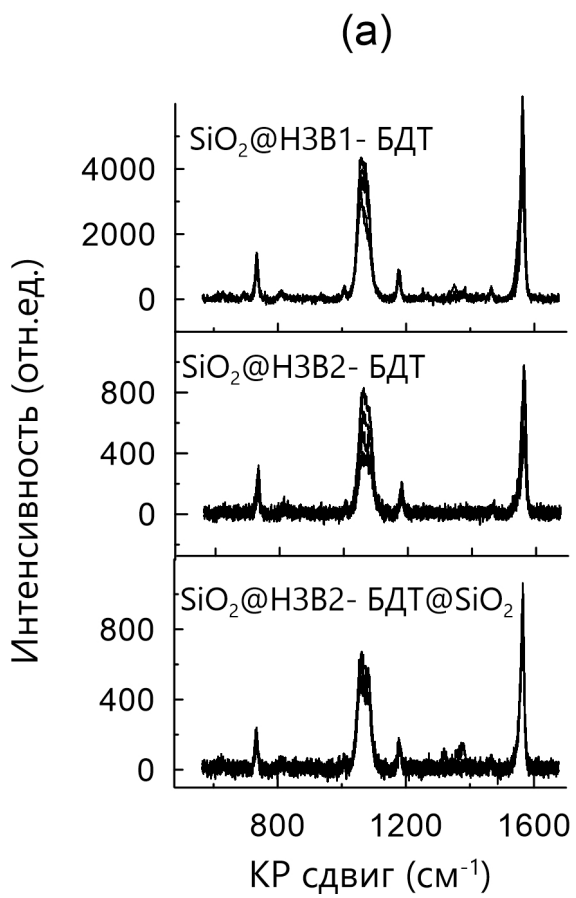


Рисунок 5. Иноземцева О.А.

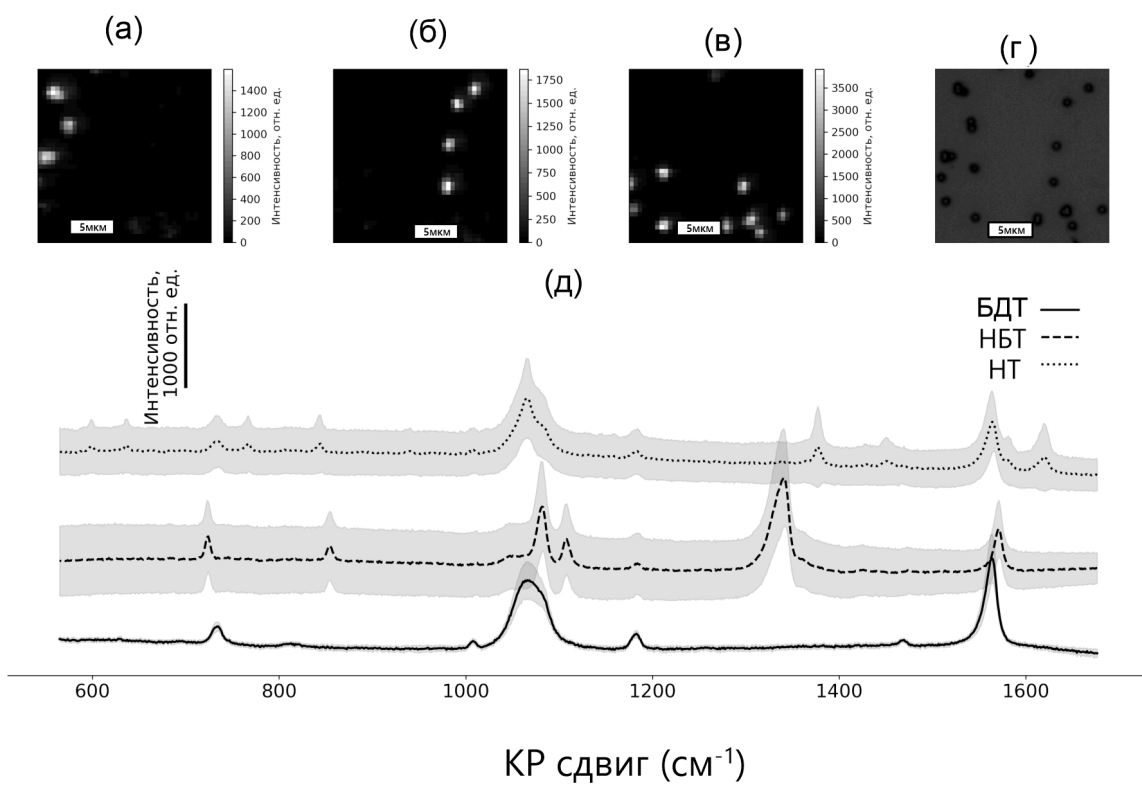


Рисунок 6. Иноземцева О.А

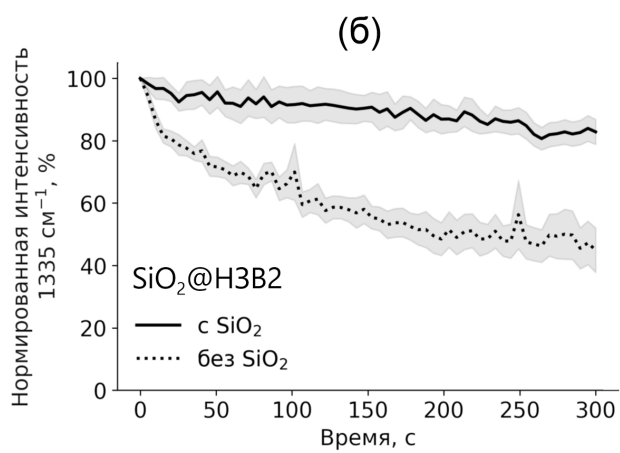
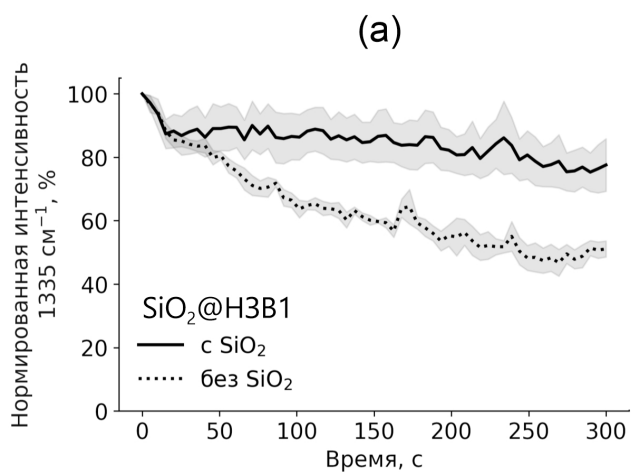


Рисунок 7. Иноземцева О.А.

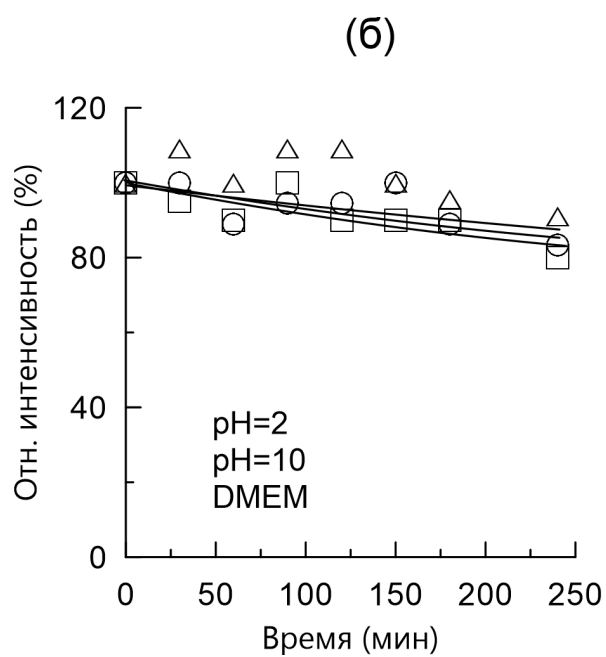
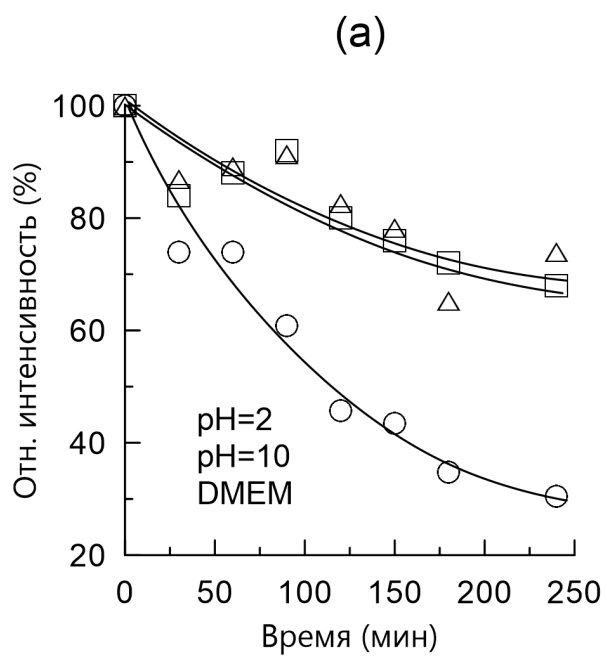


Рисунок 8. Иноземцева О.А.