

УДК 577 (087.1 + 112.4)

КЛАСТЕРИ З ДЕКІЛЬКОХ АТОМІВ СРІБЛА У ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СЕНСОРНИХ ТЕХНОЛОГІЯХ

О. П. ДЕМЧЕНКО, М. І. КАНЮК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: alexdem@ukr.net; kanyukni@ukr.net

Кластери з декількох атомів срібла мають унікальні оптичні властивості, що дозволяє розглядати їх як ефективну заміну органічним барвникам у різних флуоресцентних сенсорних технологіях. Описано їхні властивості і приклади застосування, техніку створення і стабілізації за допомогою різних високомолекулярних та низькомолекулярних матриць. Зокрема, дуже простими є методи одержання кластерів із використанням хімічних відновників, а також відновлення під дією світла.

Продемонстровано застосування кластерів срібла для мічення ДНК та створення ДНК-сенсорів на основі їх гібридизації з наступним детектуванням флуоресценції кластерів. Надзвичайно швидко розвиваються інші перспективні напрями, зокрема детектування іонів та мічення живих клітин, як у плані фундаментальних досліджень, так і з огляду на широкі можливості практичного застосування.

Ключові слова: флуоресценція, кластери атомів срібла, сенсорні технології.

У біосенсорних та сенсорних технологіях триває пошук методів з якомога ширшим колом застосування і з найвищою абсолютною чутливістю. Йде невпинне вдосконалення методу, який найбільшою мірою відповідає цим вимогам, — методу флуоресценції. В минулі часи його розвиток та впровадження були пов'язані з органічними барвниками. Чималий набір цих барвників з різними спектроскопічними параметрами і практично невичерпними можливостями ковалентної модифікації та функціоналізації в біологічних системах забезпечили широке застосування їх у молекулярних та клінічних дослідженнях. Проте виявились і їхні суттєві недоліки, передусім низька фотохімічна стійкість, тобто здатність до вицвітання (фотодеградації). Існують принципові обмеження й щодо їхньої яскравості, часу випромінювання тощо.

В останній час дослідники звернули увагу на унікальні спектроскопічні властивості кластерів срібла, що складаються з декількох атомів — Ag_n , де $n = 2 - 8$ [1, 2]. Маючи оптичні характеристики, подібні до органічних барвників, вони перевершують їх за величиною молярного поглинання та фотостабільністю [3]. Водночас кластери значно менші за розміром порівняно з напівпровід-

никовими наноматеріалами (квантовими точками), які токсичні на рівні клітини та організму. Відсутність цих недоліків у поєднанні зі значними перевагами в оптичних властивостях (таблиця) робить кластери срібла гідними уваги в різноманітних сферах застосування. Цікаві та обнадійливі результати одержано на рівні одиничних молекул для розвитку молекулярно-оптичних і електронних пристроїв майбутнього [4]. Багатообіцяльним є їх використання в молекулярних сенсорах та біосенсорах [5–7], а також у біології клітини [8, 9]. Обговоренню цих питань присвячено цей огляд.

Властивості кластерів срібла

Кластери з кількох (2–8) атомів срібла мають унікальні властивості. Це структури розміром менше 0,5 нм. Їхні властивості принципово відрізняються від добре вивчених більших за розміром наночастинок срібла. Для останніх є характерним плазмонне поглинання та розсіювання [10]. Локалізовані плаزمони — це одночасні коливання електронів, що виникають унаслідок просторового обмеження їх руху в наночастинках (деяких) металів. Оскільки їхній розмір значно менший, ніж довжина хвилі

Порівняльні властивості кластерів срібла, органічних барвників та квантових точок

Властивості	Кластери срібла	Органічні барвники	Квантові точки
Розмір (нм)	~0,5	0,5–2	10–20
Молярна екстинкція ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	~ 10^5	10^3 – 10^5	~ 10^7
Час життя флуоресценції (нс)	0,5–5	3–5	10–20
Стоксів зсув (нм)	До 100	10–60	~15
Чутливість спектрів до оточення	Помірна	Різна, часом значна	Відсутня
Фотостабільність	Стабільні	Вицвітають	Стабільні
Токсичність	Відсутня	Різна	Потенційно значна

світла, то виникають коливання густини електронів з частотою світла. Спектри екстинкції містять значну компоненту розсіювання, а також пік плазмонного резонансного поглинання при 380–410 нм. Такі частинки практично не випромінюють світла. Їхні властивості зазнають істотних змін зі зменшенням розміру до кількох атомів (рис. 1).

Змінюються спектральні характеристики кластерів, передусім зникає їх плазмонне поглинання, оскільки колективних коливань електронів уже не існує. Водночас виникають нові смуги поглинання у видимій та ближній ультрафіолетовій (УФ) області завдяки збільшенню відстані між енергетичними рівнями. Кластери срібла стають потужними випромінювачами флуоресценції, і це випромінювання нагадує флуоресценцію органічних молекул. Такі зміни відбуваються тому, що в кластерах атомів металу електрони вже не делокалізовані

й для них характерні дискретні електронні стани і електронні переходи між цими станами. Ці електронні переходи відповідають енергії поглинання та випромінювання світла у видимій області спектра саме так, як і в органічних барвників. Характерною мірою розміру тут є Фермі-довжина хвилі електрона (довжина де Бройля електрона з енергією Фермі). Для срібла вона становить ~0,5 нм. Фізика цих процесів активно вивчають. Одна з моделей, запропонованих для Ag_n , полягає в тому, що поглинання фотона переводить електрон з рівня d до порожнього рівня sp , вищого за енергію від рівня Фермі. Після втрати енергії через релаксації (механізм яких досі невідомий) рекомбінація електрона та «дірки» призводить до випромінювання світла. Для електронних переходів характерна значна сила осцилятора (що визначає ефективність поглинання світла) і високий квантовий вихід випромінювання.

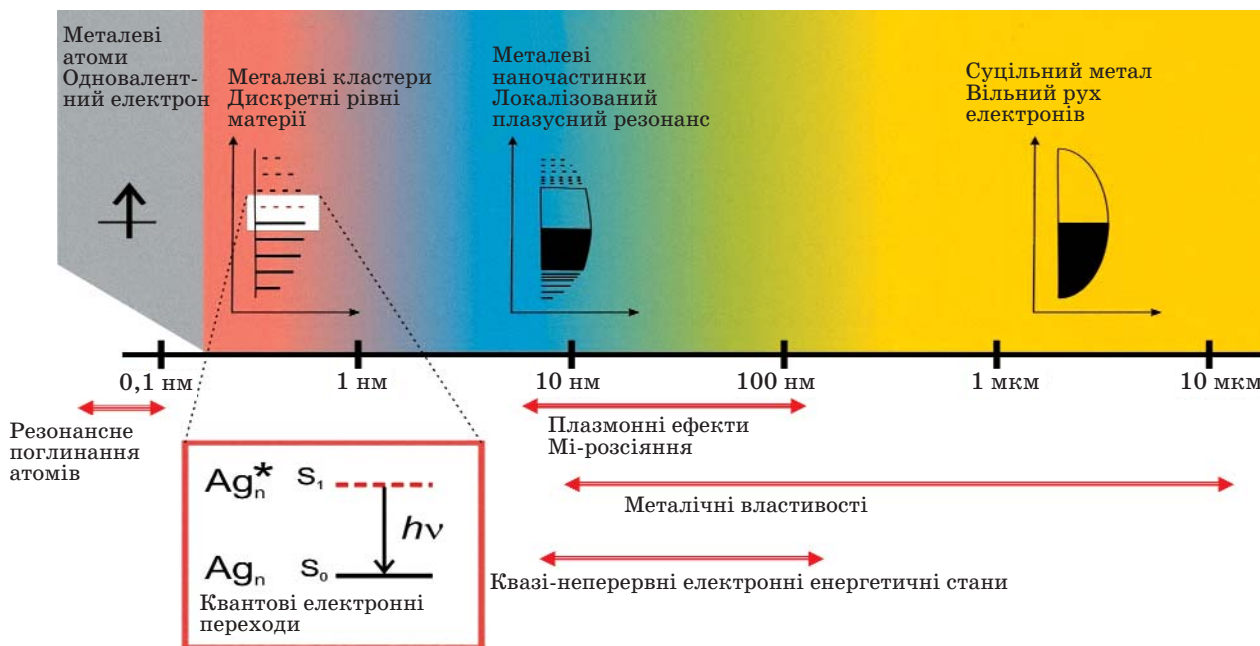


Рис. 1. Властивості матеріалів срібла залежно від їхнього розміру.

Зменшення розміру від наночастинок до кластерів з кількох атомів призводить до радикальних змін фізичних властивостей

Дослідження оптичних властивостей кластерів срібла мають довгу історію як в плані наукових досліджень, так і розроблення та вдосконалення матеріалів для фотографії [11]. Дослідження в криогенних матрицях благородних газів (аргон, криптон) показали, що навіть двох атомів достатньо для спостереження «молекулярного типу» випромінювання з часом життя в кілька наносекунд [12]. Так, для кластерів Ag_2 характерні смуги поглинання при 384 нм і емісії — 479 нм. Для кластерів Ag_3 в спектрах збудження спостерігаються відносно вузькі максимуми за 321, 386 та 492 нм, а в спектрах випромінювання — дві основні смуги за 374 та 622 нм, що відсутні в спектрах димерів. Що стосується кластерів з більшим числом атомів, то їхні властивості вивчено менше, і не існує єдиної думки дослідників щодо класифікації їхніх спектрів [13]. Проте простежується загальна тенденція зсуву спектрів поглинання і випромінювання до великих довжин хвилі зі збільшенням числа атомів Ag .

Створення та стабілізація кластерів

Наведені вище дані слід віднести до передісторії технологічних та, зокрема, біотехнологічних застосувань. Справжня історія розпочалася тоді, коли було показано можливість створення та стабілізації Ag_n -кластерів за кімнатних температур у водних розчинах дендритних полімерів [14] і молекул ДНК [15–17], які правили за матриці, тобто це молекули, які стабілізують кластери і запобігають росту їх до наночастинок.

Одержувати кластери срібла дуже просто. Увесь процес складається з одного етапу й не потребує значних витрат часу чи коштів. Тут існує декілька методів з використаням розчинних солей срібла, зокрема $Ag^+NO_3^-$. Дослідник має широкий набір механізмів відновлення іонів до атомів, зокрема застосування хімічних відновлювачів [17], фотовідновлення [18, 19], радіолітичне [20] і навіть ультразвукове [21] відновлення. Відновлення під дією світла відбувається за допомогою утворених у розчиннику фотоелектронів і дозволяє контролювати процес у просторі й часі, що дає значні переваги в біотехнологічних застосуваннях.

Таким чином, складність в одержанні кластерів полягає в застосуванні спеціальних матриць, які обмежують розміри кластерів срібла (Ag_{2-8}), утримують, стабілізують, а потім не дають їм можливості рости далі до наночастинок. Тому без матриць не-

можливо створити стабільні кластери. Такими матрицями можуть слугувати полімерні молекули, що містять багаті на електрони атоми сірки, азоту й кисню. Саме під час взаємодії з ними відбувається стабілізація кластерів. На додаток до використаних вперше поліамідоамінових (ПАМАМ) дендримерів [14] і однитчастих сегментів ДНК (ssДНК) [15–17] було запропоновано застосовувати інші полімери, наприклад поліакрилову [22] та поліметакрилову [23] кислоти.

Низькомолекулярні речовини також можна використовувати як матриці. Зокрема, це показано для барвника тіофлавіну Т [24], похідних тіолів [5, 25, 26] та амінів [19]. Для різних біотехнологій є дуже цікавим застосування пептидів [27, 28] і протеїнів [29].

Механізм взаємодії кластерів з матрицею

Багато авторів стверджують, що за наявності певного типу стабілізаторів та матриць утворюються кластери лише певного типу. Зокрема, зі збільшенням часу опромінення спостерігається збільшення інтенсивності поглинання та флуоресценції в певних смугах, але не поява нових смуг (рис. 2). Ці спостереження дуже зручні та надійні, оскільки ані вихідні іони срібла, ані наночастинок більшого розміру не флуоресціюють. Усі матеріали, які мають здатність стабілізувати кластери, містять атоми сірки, азоту та кисню, що відомі як атоми, багаті на електрони і здатні бути їхніми донорами в комплексах з перенесенням заряду [30]. Такі центри утворення кластерів є в дендримерах [14], пептидах [28], протеїнах [29] та нуклеїнових кислотах [3, 31].

Варто відзначити, що кластери утворюються під час взаємодії з основами ДНК, а не із сахаридно-фосфатним остовом, як можна було б очікувати у разі первинної електростатичної взаємодії з іонами срібла. Важливо, що саме одноланцюгові сегменти ДНК є найкращими центрами утворення кластерів, і простежуються дуже різні спектроскопічні ефекти при зв'язуванні з різними основами [15], зокрема значна різниця в кольорі флуоресценції (рис. 3). Такі незвичайні властивості привернули увагу теоретиків [32]. Вони можуть бути корисними і в практичному плані, адже це уможливило ідентифікування одонуклеотидних мутацій [33].

Цікаво, що спостерігається відносно потужна флуоресценція кластерів, утворених у водних розчинах, тобто в умовах, коли має відбуватися її гасіння за відомим механізмом

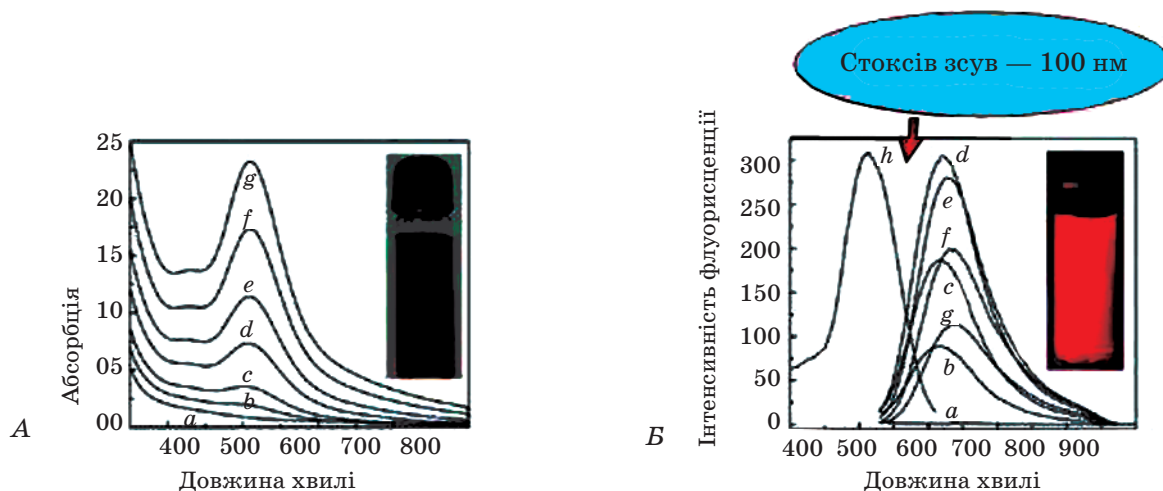


Рис. 2. Спектри поглинання (А) та флуоресценції (Б) водного розчину ПМАА (поліметакрилова кислота) і AgNO_3 за різного часу опромінювання довжиною хвилі 365 нм (у хв): а — 0; б — 5; с — 10; д — 20; е — 40; ф — 60; г — 90. Крива *h* у Б — спектр збудження, що відповідає флуоресценції при 620 нм [23]

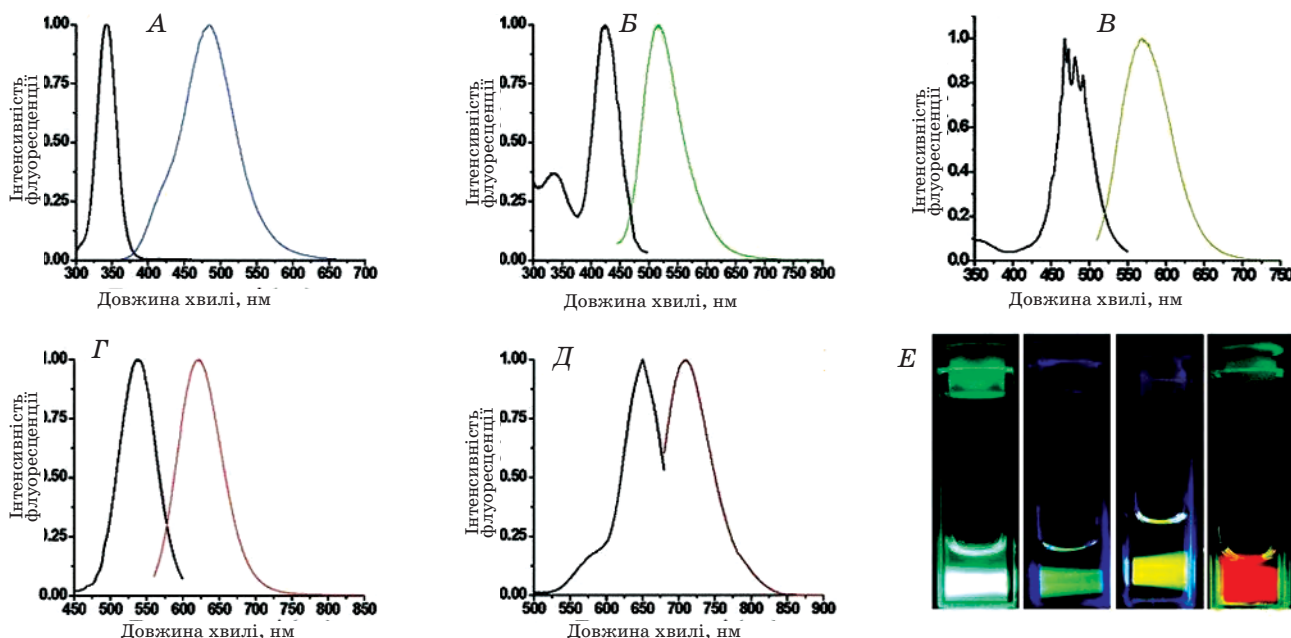


Рис. 3. Спектри поглинання і флуоресценції для різних послідовностей ssДНК, що включають кластери срібла:

А — кластери із синім випромінюванням, створені на 5'-СССТТТААСССС-3'; В — кластери із зеленим випромінюванням, створені на 5'-СССТСТТААСССС-3'; Г — кластери з жовтим випромінюванням, створені на 5'-СССТТААТСССС-3'; Д — кластери з червоним випромінюванням, створені на 5'-ССТССТТССТСС-3'; Е — кластери з ближнім ІЧ-випромінюванням, створені на 5'-СССТААТСССС-3'; Е — фото випромінювальних розчинів, що відповідають А-Г [15]

перенесення електрона на розчинник. Це свідчить про екранування кластерів від водного оточення. Іони срібла є відомими гасіями флуоресценції, але наявність їх у процесі фотовідновлення не впливає на флуоресценцію вже утворених кластерів. Відносно слабка залежність спектрів кластерів, утворених на полімерних носіях від розчинника (див. нижче), є ще одним свідченням цього. Та-

ким чином, взаємодія кластера з матрицею має бути основним чинником, що визначає спектроскопічні властивості.

Найхарактернішою з цих властивостей є значний Стоксів зсув (зсув між спектрами поглинання і випромінювання), що досягає $2500\text{--}2700\text{ см}^{-1}$, тобто порядку 100 нм (рис. 2). Природа цього зсуву наразі невідома. Проте є підстави вважати, що її природа пов'язана

із взаємодією кластерів зі своїм оточенням, а саме з утворенням комплексів з перенесенням заряду в основному стані. Сусідні атоми сірки, азоту чи кисню можуть переносити частково електронний заряд на кластери, які є його акцепторами, а утворення таких комплексів припиняє подальший ріст кластерів до наночастинок.

Матриці з олігонуклеотидів. Структурні та спектральні відмінності

Найбільш вивченими є кластери, створені на основі ssДНК. Дослідники, які використовують олігонуклеотиди як матриці для кластерів, помітили суттєву різницю в спектрах поглинання та флуоресценції залежно від гетероциклічних основ нуклеотидів, що видно з порівняння 12-членних олігонуклеотидних матриць [15]. Для послідовностей, які складаються з основ А, С та G, спостерігаються значні спектральні відмінності від основи Т, що можна пояснити в термінах різної стабільності комплексів з перенесенням заряду. Як вважають, вона корелює зі спектроскопічними властивостями, і для основи Т ці комплекси значно слабші. У цьому разі флуоресценція спостерігається в синій ділянці спектру, а в інших — значно зміщена в ділянку великих довжин хвиль. Підбором коротких послідовностей ssДНК можна варіювати колір флуоресценції в широких межах (рис. 3). За відсутності прямих даних про розмір кластерів ще не з'ясовано, чи ця різниця може бути спричинена не тільки різною взаємодією з атомами оточення, а ще й відмінностями в розмірі та структурі кластерів.

Непрямим свідченням того, що розмір

кластера відіграє дуже важливу роль у спектроскопічних властивостях, є дослідження з ДНК-шпильками (рис. 4), які є штучними олігомерними молекулами. Вони складаються в структуру, в якій утворюється дволанцюговий сегмент — «хвіст» та одноланцюгова «голівка». У даному випадку було синтезовано набір молекул типу 5'-ТАТССГТ-С_n-АССГГАТА-3', де 7 пар основ утворювали «хвіст», а послідовність з 3 до 12 цитозинів (-С_n-) — «голівки» різного розміру [34]. Інкубація в розчині з AgNO₃ в присутності відновника NaBH₄ призводила до утворення кластерів, іммобілізованих на «голівках». Як видно з рис. 4, в усіх випадках за винятком С₃ одночасно спостерігаються два типи кластерів з відмінними властивостями, а порівняння шпильок з різною довжиною «голівок» дало змогу ідентифікувати кластери чотирьох типів.

Така специфіка зв'язування Ag_n-кластерів із ssДНК і залежність спектрів флуоресценції від виду та послідовності її основ стимулювала розробку нових та модифікацію існуючих аналітичних методів. Так, сенсорна послідовність ДНК із включенням олігоцитозинової петлі може гібридизуватися з ланцюгом ДНК, який розпізнається (рис. 5), а сформований дуплекс слугуватиме матрицею для утворення кластера срібла [33]. Флуоресценція цього кластера може давати інформацію, що дозволяє селективно ідентифікувати типову одонуклеотидну мутацію, зокрема серпоподібно-клітинну анемію (рис. 6). Це свідчить про можливість широкого застосування даного явища в методах, які базуються на гібридизації ДНК.

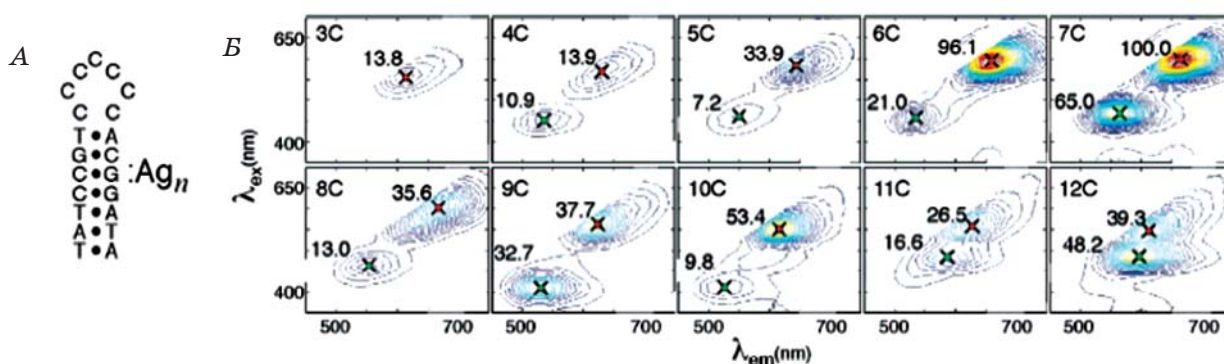


Рис. 4. Властивості кластерів, іммобілізованих на «голівках» ДНК-шпильок:

А — структура ДНК-шпильок типу 5'-ТАТССГТ-С_n-АССГГАТА-3' з різною величиною шпильок (-С_n-) з 3 < n < 12. Кластери срібла утворюються на одноланцюгових «голівках»; Б — двовимірні діаграми спектрів поглинання і флуоресценції для різних послідовностей ssДНК «голівок» різного розміру (С₃-С₁₂). «Зелені» і «червоні» максимуми позначено «Х» і зазначено їхню інтенсивність у відносних одиницях. Сірі смуги вказують на умови поглинання і випромінювання, де сигнал флуоресценції маскується світлорозсіянням [34]

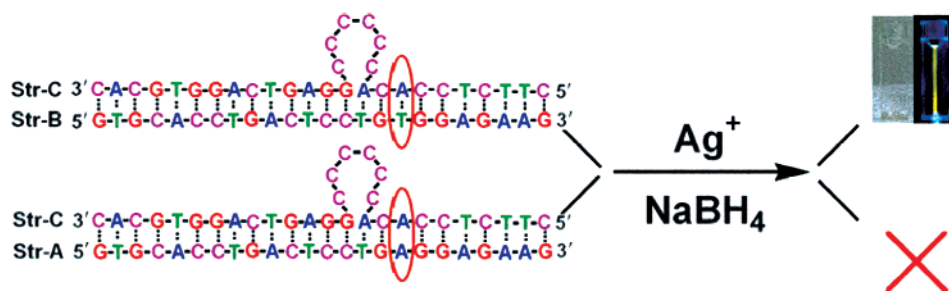


Рис. 5. Використання сенсорної ДНК з петлею оліго-С для гібридизації з аналізованою ДНК з метою пошуку мутантних форм.

Прикладом слугує мутація, що призводить до серпоподібно-клітинної анемії. Str-A — сегмент β-ланцюга гемоглобіну, Str B — його мутантної форми, а Str-C — сенсорний ДНК-сегмент, що гібридується з обома формами. Далі відбувається створення кластерів срібла на петлі оліго-С. У разі гібридизації з нормальною формою спостерігається інтенсивна флуоресценція, а з патологічною — ні [33]

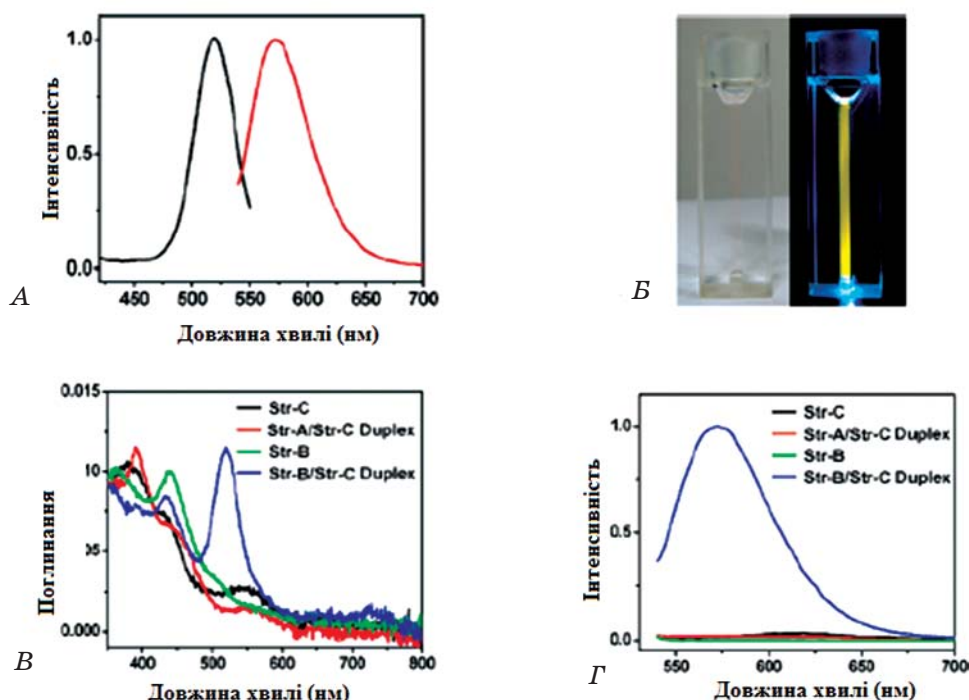


Рис. 6. Спектри збудження та флуоресценції кластерів срібла, утворених на гібридизованій структурі Str-B/Str-C (А). Фото цих флуоресцентних об'єктів (Б) і спектри поглинання (В) і флуоресценції (Г) за збудження 520 нм кластерів, синтезованих на Str-C (чорний), дуплексі Str-A/Str-C (червоний), Str-B (зелений) та дуплексі Str-B/Str-C (синій) [33]

Полімерні та дендримерні носії

Найбільш активний пошук носіїв для формування кластерів останнім часом здійснюється серед водорозчинних штучних полімерних молекул. Першими було описано флуоресцентні кластери, сформовані на ПАМAM-дендримерах (полімерах, де розгалужені гілки однакового розміру виходять з єдиного центра) з ОН-кінцевими групами. Для них характерний дуже широкий спектр флуоресценції — від 533 до 648 нм [14]. Різні полімерні композити, що утворюють

частинки (220 нм) мікрогелів [35] та молекулярні гідрогелі [22], сформовані полігліцеролом — блок-поліакриловою кислотою, вказують на необхідність наявності –COOH-груп для утворення кластерів. Під час фотохімічного відновлення тут утворюються кластери з випромінюванням у межах 600 нм.

Значно простіше та дешевше використовувати водні розчини широкодоступних полімерів, таких як поліметакрилова кислота [18]. За фотовідновлення при 365 нм тут утворюються кластери зі світінням при 620 нм з квантовим виходом 18,6%.

Пептидні та протеїнові матриці

Структури, що можуть бути створені лінійною комбінацією амінокислотних залишків у пептидах та протеїнах, і просторова організація останніх дають невичерпні можливості для створення матриць, які стабілізують кластери. У літературі існує багато даних про спорідненість деяких із цих залишків (зокрема проліну й метіоніну) до іонів срібла, проте досі не зрозуміло, чи існує залежність між зв'язуванням іонів та формуванням відновлених кластерів. Тому дослідники ідуть емпіричним шляхом, але результатів для певних узагальнень ще недостатньо.

Нещодавно було показано, що протеїн α -хімотрипсин може слугувати матрицею [29] під час хімічного відновлення іонів срібла. Даних про структуру та локалізацію цих кластерів у молекулі протеїну немає. Проте спостерігається їх інтенсивна емісія при 680 нм за збудження при 500 нм (рис. 7). Виявилося, що значний надлишок відновлювального реагента NaBH_4 відновлює дисульфідні зв'язки і призводить до часткової або повної денатурації. Однак його видалення шляхом діалізу відновлює ензимну активність зі збереженням інтенсивної флуоресценції.

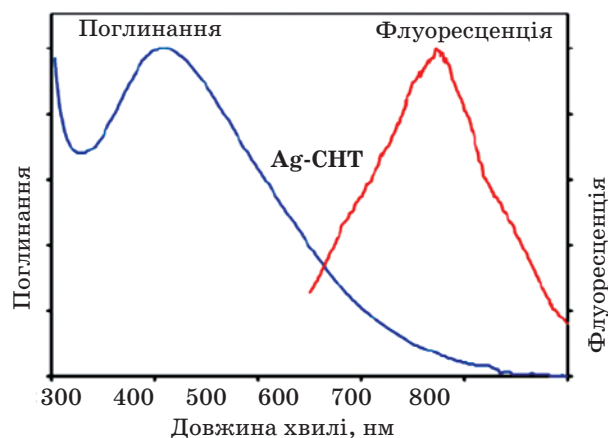


Рис. 7. Спектри поглинання і флуоресценції (збудження за 500 нм) кластерів Ag, сформованих у присутності молекул α -хімотрипсину. Використовували метод хімічного відновлення [29]

Дослідників цікавив ядерний протеїн нуклеолін, який має високу спорідненість до іонів срібла. Синтетичні пептиди, що подібні до фрагмента цього протеїну і мають у своїй структурі залишки цистеїну (С), глутамінової кислоти (Е), лізину (К) та аспарагінової кислоти (D), можуть бути ефективними матрицями [28], а за надлишку аргініну легко проникають у живі клітини.

Приготування кластерів у мікроемульсіях

Мікроскопічні краплинки води можна стабілізувати в гідрофобних розчинниках за допомогою детергентів. Вони можуть слугувати мікрореакторами для синтезу кластерів срібла. В одній з таких робіт детергентом був АОТ [синоніми: bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt, sulfosuccinic acid bis(2-ethylhexyl) ester sodium salt, docusate sodium], а відновлювальним агентом — гіпофосфіт натрію. При цьому утворюються кластери малого розміру — менше 10 атомів [36].

Стабілізація кластерів низькомолекулярними реагентами

Пошук низькомолекулярних стабілізаторів має на меті декілька завдань. По-перше, зробити кластери гомогенними за розмірами та композицією, що дозволило б уникнути гетерогенності в спектральних властивостях. По-друге, зменшити розмір наноконструкта, що часто складається з кількох кластерів на одній матриці, до одного стабілізованого кластера. По-третє, використовувати вільні реактивні групи стабілізатора з метою включення кластера в систему для сенсорики або ковалентного мічення різних субстратів. На момент написання цього огляду опубліковано повідомлення про декілька істотних розробок. Так, мезо-2,3-димеркаптосукцинат був використаний як відомий двовалентний SH-реагент для стабілізації хімічно відновлених (за допомогою NaBH_4) кластерів. Автори повідомили про синтез гомогенної популяції Ag_7 -кластерів [25]. В іншій роботі було синтезовано, зі стабілізацією меркаптосукцинатом, кластери Ag_7 і Ag_8 , що відрізнялися свіченням у синьо-зеленій та червоній ділянках спектра [37]. Використання ліпоєвої кислоти, що разом з іонами срібла відновлювалась NaBH_4 до дигідроліпоєвої кислоти, дало змогу створити і стабілізувати спектрально-гомогенні кластери невеликого розміру [38].

Вартим уваги є використання у процесі створення кластерів срібла фотохімічним відновленням барвника тіофлавіну Т [24]. Відомо, що багато гетероциклічних сполук, включаючи барвники, хелатують іони срібла. Проте невідомо, чи можуть вони бути матрицями для створення кластерів та стабілізувати їх.

Кластери срібла як молекулярні сенсори

Нещодавно було одержано перспективні результати [5, 38, 39] для кластерів срібла, стабілізованих молекулами дигідроліпоевої кислоти при детекції іонів ртуті (Hg^{2+}). Ці іони викликають селективне гасіння флуоресценції. Для концентрації кластерів 10^{-5} М ліміт детекції Hg^{2+} сягає таких низьких значень, як 10^{-10} М, а діапазон концентрацій, що визначаються, — 10^{-5} М. Причиною такого специфічного гасіння може бути включення Hg^{2+} в кластер срібла із перенесенням електрона з кластера на цей іон. Не виключається, однак, й утворення за участю іонів ртуті міжкластерних асоціатив.

Флуоресценція кластерів, сформованих на фрагментах ДНК, чутлива до їх взаємодії з іонами міді, причому спостерігається не гасіння, а навпаки, збільшення яскравості флуоресценції [6]. Виявляється висока се-

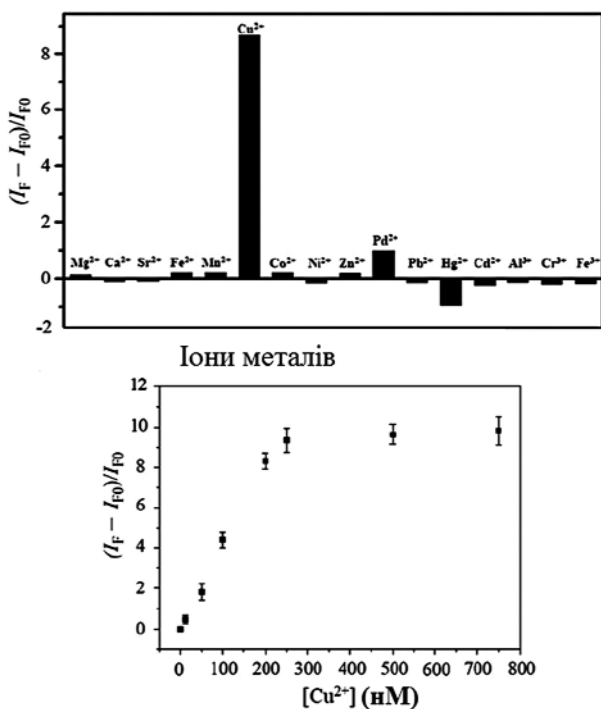


Рис. 8. Селективність та чутливість кластера DNA-Ag як сенсора на іони Cu^{2+} (а).

Концентрація іонів міді — 0,2 мМ, а кожного іншого іона металу — 10 мМ. Графік залежності відносного зростання флуоресценції від концентрації іонів міді (б) [6]

лективність до міді порівняно з іншими іонами. Ділянка детектування іонів Cu^{2+} — 10^{-8} – 10^{-6} М (рис. 8).

В іншому дослідженні [39] кластери срібла, сформовані на матриці поліметакрилової кислоти, реагують на присутність іонів Cu^{2+} в тому самому інтервалі концентрацій

гасінням флуоресценції. У цьому разі було показано, що зв'язування Cu^{2+} є оборотним. Гасіння флуоресценції цих кластерів відбувається також під впливом цистеїну, що може бути використано для визначення цієї метаболічно важливої амінокислоти [7] (рис. 9).

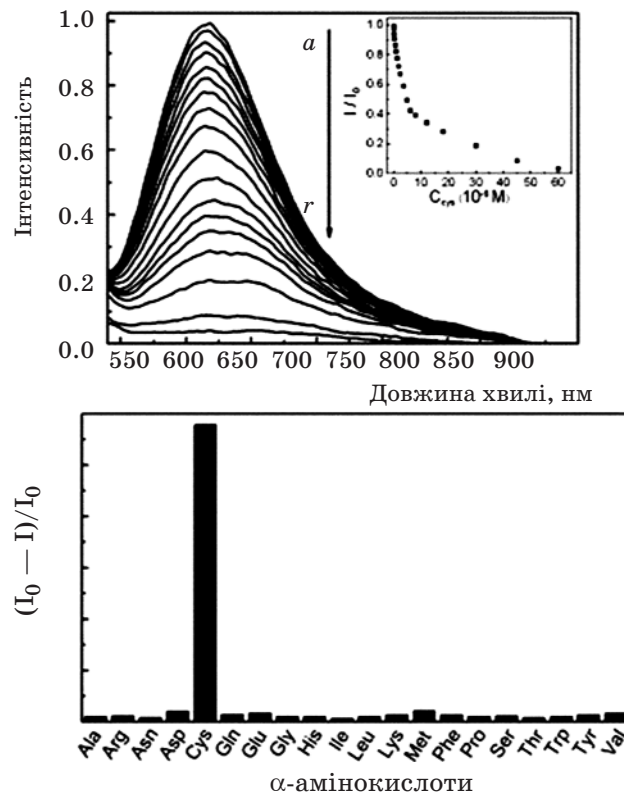


Рис. 9. Спектри флуоресценції кластерів ПМАА-Ag у присутності різних концентрацій цистеїну від 0 до $60 \cdot 10^{-6}$ М (а–r).

На вставці залежність інтенсивності флуоресценції при 615 нм від концентрації цистеїну. Знизу — відносна інтенсивність флуоресценції у присутності різних α -амінокислот [7]

Таким чином, у застосуванні кластерів атомів срібла в сенсорних технологіях робляться перші, але багатообіцяльні кроки. Найпростішим методом реєстрації сенсорної відповіді є інтенсивність флуоресценції, її зміни, що й було використано в цитованих роботах.

Застосування кластерів у клітинних дослідженнях

Кластери, сформовані на ДНК-матрицях, можуть бути ефективно використані у дослідженні клітини, чому сприяє високий квантовий вихід (до 30%) свічення в червоній ділянці спектра, де автофлуоресценція незначна [15, 16]. Так, оліго-С-кон'югат кластерів срібла, з'єднаний з авідином, дозволяє одержати зображення фіксованих

біотинізованих клітин, тимчасом як живі клітини захоплюють його за механізмом ендцитозу. Приєднання цих кон'югатів до гепаринсульфату замість авідину дає змогу спостерігати флуоресцентні ядра клітин [40].

Виявляється, інкубацією фіксованих клітин з іонами срібла можна досягти певної їх концентрації в клітині, а потім фотоопромінюванням створювати в ній флуоресцентні кластери. Для таких кластерів характерна флуоресценція в широкому діапазоні — від 500 до 700 нм [28]. Матрицею в цьому разі слугують невстановлені протеїни чи пептиди самих клітин.

Цікавим методичним прийомом може бути перенесення кластерів від однієї матриці до іншої. Це вкрай важливо під час мічення антигін, оскільки за хімічного відновлення їхні дисульфідні зв'язки, що стабілізують структуру, також відновлюються, і це призводить до денатурації. Тому було запропоновано кон'югати антигін з оліго-С мітити, інкубуючи з полімером, що містить вже створені кластери. Такий прийом дає можливість візуалізувати клітинні структури шляхом взаємодії з міченими антигінами [40, 41].

Хоча з часу перших робіт із синтезу кластерів срібла з декількох атомів у розчинах і демонстрації їх флуоресценції не минуло й 10 років, а ці кластери вже набули широ-

кого застосування. Їхні оптичні властивості схожі на ті, що спостерігаються для органічних барвників, оскільки в основі їх також є електронні переходи між квантовими енергетичними рівнями з енергіями, які відповідають поглинанню і випромінненню у видимій області спектра. Вони надто малі за розміром, мають високу яскравість випроміннення, не токсичні й фотостабільні. Їх настільки легко синтезувати, використовуючи різні фізичні та хімічні чинники для відновлення іонів срібла, що такий синтез можна легко здійснити навіть у шкільних кабінетах хімії. Необхідні для їх стабілізації матриці можуть бути різної природи, проте універсального рецепту для синтезу не існує, і дослідник мусить оптимізувати умови синтезу залежно від типу використовуваної матриці. Сенсорні технології на основі цих кластерів мають широку перспективу застосування, оскільки і положення спектрів, і їхня інтенсивність демонструють помітну залежність від молекулярного оточення, яке може слугувати основою для сенсорної відповіді. Специфіка утворення кластерів на певних матрицях може бути використана для селективного флуоресцентного мічення в біологічних системах, включаючи живі клітини. Перші успіхи надихають учених на подальші дослідження та розроблення цих систем.

ЛІТЕРАТУРА

1. Xu H., Suslick K. S. Water-soluble fluorescent silver nanoclusters // *Adv. Mater.* — 2010. — V. 22. — P. 1078–1082.
2. Diez I., Ras R. H. Few-Atom Silver Clusters as Fluorescent Reporters // A. P. Demchenko (ed.), *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II: Molecular Constructions, Polymers and Nanoparticles*, Springer Ser. Fluoresc. — 2010. — V. 9. — P. 307–332.
3. Vosch T., Antoku Y., Hsiang J. C. et al. Strongly emissive individual DNA-encapsulated Ag nanoclusters as single-molecule fluorophores // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2007. — V. 104. — P. 12616–1221.
4. Lee T. H., Gonzalez J. I., Zheng J., Dickson R. M. Single-molecule optoelectronics // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38. — P. 534–541.
5. Guo W., Yuan J., Wang E. Oligonucleotide-stabilized Ag nanoclusters as novel fluorescence probes for the highly selective and sensitive detection of the Hg²⁺ ion // *Chem. Commun. (Camb).* — 2009. — P. 3395–3397.
6. Lan G. Y., Huang C. C., Chang H. T. Silver nanoclusters as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions // *Ibid.* — 2010. — V. 46. — P. 1257–1259.
7. Shang L., Dong S. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters // *Biosens. Bioelectron.* — 2009. — V. 24. — P. 1569–1573.
8. Antoku Y., Hotta J., Mizuno H. et al. Transfection of living HeLa cells with fluorescent poly-cytosine encapsulated Ag nanoclusters // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2010. — V. 9. — P. 716–721.
9. Lin C.-A. J., Lee C.-H., Hsieh J.-T. et al. Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: Recent progress and present challenges // *J. Med. Biol. Eng.* — 2009. — V. 29. — P. 276–283.
10. Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes // *Chem. Rev.* — 2005. — V. 105. — P. 1025–1102.
11. Kreibitz U. Electronic properties of small silver particles. — Optical constants and their temperature dependence // *J. Phys. F. — Metal Phys.* — 1974. — V. 4. — P. 999–1014.

12. *Fedrigo S., Harbich W., Buttet J.* Optical response of Ag₂, Ag₃, Au₂ and Au₃ in argon matrices // *J. Chem. Phys.* — 1993. — V. 99. — P. 5712–5717.
13. *Conus F., Rodrigues V., Lecoultre S. et al.* Matrix effects on the optical response of silver nanoclusters // *Ibid.* — 2006. — V. 125. — P. 24511-1–24511-4.
14. *Zheng J., Dickson R. M.* Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — V. 124. — P. 13982–13983.
15. *Richards C. I., Choi S., Hsiang J. C. et al.* Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores // *Ibid.* — 2008. — V. 130. — P. 5038–5039.
16. *Sengupta B., Ritchie C. M., Buckman J. G. et al.* Base-directed formation of fluorescent silver clusters // *J. Phys. Chem. C.* — 2008. — V. 112. — P. 18776–18782.
17. *Petty J. T., Zheng J., Hud N. V., Dickson R. M.* DNA-templated Ag nanocluster formation // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — V. 126. — P. 5207–5212.
18. *Diez I., Pusa M., Kulmala S. et al.* Color tunability and electrochemiluminescence of silver nanoclusters // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2009. — V. 48. — P. 2122–2125.
19. *Maretti L., Billone P. S., Liu Y., Scaiano J. C.* Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131. — P. 13972–13980.
20. *Treguera M., Rocca F., Lelonga G. et al.* Fluorescent silver oligomeric clusters and colloidal particles // *Solid. State Sci.* — 2005. — V. 7. — P. 812–818.
21. *Xu H., Suslick K. S.* Sonochemical synthesis of highly fluorescent Ag nanoclusters // *ACS Nano.* — 2010. — V. 4. — P. 3209–3014.
22. *Shen Z., Duan H., Frey H.* Water-soluble fluorescent Ag nanoclusters obtained from multiarm star poly(acrylic acid) as «Molecular Hydrogel» templates // *Adv. Mat.* — 2007. — V. 19. — P. 349–352.
23. *Shang L., Dong S.* Facile preparation of water-soluble fluorescent silver nanoclusters using a polyelectrolyte template // *Chem. Commun. (Camb).* — 2008. — P. 1088–1090.
24. *Makarova N., Parfenov A., Baskakov I. V.* Water-soluble hybrid nanoclusters with extra bright and photostable emissions: a new tool for biological imaging // *Biophys. J.* — 2005. — V. 89. — P. 572–580.
25. *Wu Z., Lanni E., Chen W. et al.* High yield, large scale synthesis of thiolate-protected Ag₇ clusters // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131. — P. 16672–16674.
26. *Cathcart N., Mistry P., Makra C. et al.* Chiral thiol-stabilized silver nanoclusters with well-resolved optical transitions synthesized by a facile etching procedure in aqueous solutions // *Langmuir.* — 2009. — V. 25. — P. 5840–5846.
27. *Adhikari B., Banerjee A.* Short-Peptide-Based Hydrogel: A Template for the In Situ Synthesis of Fluorescent Silver Nanoclusters by Using Sunlight // *Chemistry — A European Journal.* — 2010. — V. 16. — P. 13698–13705.
28. *Yu J., Patel S. A., Dickson R. M.* In vitro and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2007. — V. 46. — P. 2028–2030.
29. *Narayanan S. S., Pal S. K.* Structural and functional characterization of luminescent silver-protein manobioconjugates // *J. Phys. Chem. C.* — 2008. — V. 112. — P. 4874–4879.
30. *Wilcoxon J. P., Abrams B. L.* Synthesis, structure and properties of metal nanoclusters // *Chem. Soc. Rev.* — 2006. — V. 35. — P. 1162–1194.
31. *Gwinn E. G., O'Neill P., Guerrero A. J. et al.* Sequence-dependent fluorescence of DNA-hosted silver nanoclusters // *Adv. Mater.* — 2008. — V. 20. — P. 279–283.
32. *Soto-Verdugo V., Metiu H., Gwinn E.* The properties of small Ag clusters bound to DNA bases // *J. Chem. Phys.* — V. 132. — 195102. (2010);doi:10.1063/1.34.19930 (10 pages).
33. *Guo W., Yuan J., Dong Q., Wang E.* Highly sequence-dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification // *J. Am. Chem. Soc.* — 2010. — V. 132. — P. 932–934.
34. *O'Neill P. R., Velazquez L. R., Dunn D. G. et al.* Hairpins with poly-C loops stabilize four types of fluorescent Ag:DNA // *J. Phys. Chem. C.* — 2009. — V. 113. — P. 4229–4233.
35. *Zhang J., Xu S., Kumacheva E.* Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels // *Adv. Mater.* — 2005. — V. 17. — P. 2336–2340.
36. *Ledo A., Martinez F., Lopez-Quintela M. A., Rivas J.* Synthesis of Ag clusters in microemulsions: a time-resolved UV-vis and fluorescence spectroscopy study // *Phys. B Condens. Matter.* — 2007. — V. 398. — P. 273–277.
37. *Rao T. U. B., Pradeep T.* Luminescent Ag₇ and Ag₈ clusters by interfacial synthesis // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2010. — V. 49. — P. 3925–3929.
38. *Adhikari B., Banerjee A.* Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing // *Chem. Mater.* — 2010. — V. 22. — P. 4364–4371.

39. Shang L., Dong S. Silver nanocluster-based fluorescent sensors for sensitive detection of Cu(II) // *J. Mater. Chem.* — 2008. — V. 18. — P. 4636–4640.
40. Yu J., Choi S., Dickson R. M. Shuttle-based fluorogenic silver-cluster biolabels // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2009. — V. 48. — P. 318–320.
41. Yu J., Choi S., Richards C. I. et al. Live cell surface labeling with fluorescent Ag nanocluster conjugates // *Photochem. Photobiol.* — 2008. — V. 84. — P. 1435–1439.

КЛАСТЕРЫ ИЗ НЕСКОЛЬКИХ АТОМОВ СЕРЕБРА ВО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

*А. П. Демченко
М. И. Канюк*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

*E-mail: alexdem@ukr.net;
kanyukni@ukr.net*

Кластеры из нескольких атомов серебра имеют уникальные оптические свойства, позволяющие рассматривать их как эффективную замену органическим красителям в различных флуоресцентных сенсорных технологиях. Описаны их свойства и примеры использования, техника создания и стабилизации с помощью различных высокомолекулярных и низкомолекулярных матриц. В частности, очень простыми являются методы получения кластеров с применением химических восстановителей, а также восстановления под действием света.

Продемонстрировано применение кластеров серебра для мечения ДНК и создания ДНК-сенсоров на основе их гибридизации с последующим детектированием флуоресценции кластеров. Чрезвычайно быстро развиваются другие перспективные направления, в частности детектирование ионов и мечение живой клетки, как в плане фундаментальных исследований, так и учитывая широкие возможности практического применения.

Ключевые слова: флуоресценция, кластеры атомов серебра, сенсорные технологии.

CLUSTERS FROM A FEW SILVER ATOMS IN FLUORESCENT SENSORY TECHNOLOGIES

*O. P. Demchenko
M. I. Kanyuk*

Palladian Biochemistry Institute of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: alexdem@ukr.net;
kanyukni@ukr.net*

Clusters out of several silver atoms possess unique optical properties that allows considering them as efficient substitutes to organic dyes in different fluorescent sensor technologies. The properties of these clusters and examples of their applications, techniques of synthesis and stabilization in different macromolecular and low-molecular matrices were described. In particular, the methods of cluster obtaining with chemical reducing agents, as well as the recovery in response to light were very simple.

Application of silver clusters for DNA labeling and a DNA-sensors creating were demonstrated on the basis of their hybridization followed by cluster fluorescence detection. Other prospective areas of application developed extremely fast, including ion detection and living cell labeling, both in terms of basic research and in view of ample opportunities for practical application.

Key words: fluorescence, clusters of atoms of silver, sensory technologies.