

Echtzeitdetektion der Adsorption einzelner Nanopartikel auf funktionalisierten Oberflächen mittels hochauflösender SPR-Mikroskopie

*Vitali Scherbahn, Shavkat Nizamov, Franziska Klemm, Karin Tonder, Vladimir M. Mirsky
Nanobiotechnologie, Fakultät für Naturwissenschaften,
Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg,
01968 Senftenberg, Deutschland*

Vladimir.Mirsky@b-tu.de, Vitali.Scherbahn@b-tu.de

Zusammenfassung

In dieser Arbeit präsentieren wir eine neue Methode für die ultra-sensitive und markierungsfreie Detektion und Visualisierung von einzelnen Nanopartikeln in Echtzeit. Die Anwendung basiert auf der SPR-Mikroskopie mit CCD-Kamera als Lichtdetektor. Durch eine spezielle optische Konfiguration wird eine $\sim 1 \text{ mm}^2$ große Sensoroberfläche abgebildet. Werden die erzeugten SPR-Bilder anschließend differenziert, können geringste Änderungen im Brechungsindex, die z.B. durch die Adsorption von Nanopartikeln an der Sensoroberfläche entstehen, abgebildet werden. Je nach Material und Größe der Nanopartikel zeigen sie unterschiedliche Bildmuster, ähnlich einem Fingerabdruck.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Interaktion von Nanopartikeln an funktionalisierten planaren Sensoroberflächen untersucht. Die Erhöhung der Ionenstärke spielt hierbei eine entscheidende Rolle und führt zur Änderung des Adsorptionsverhaltens der Nanopartikel. Darauf aufbauend wird im nächsten Schritt die selektive Adsorption von Nanopartikeln auf array-artig strukturierten Sensoroberflächen mit positiv und negativ geladenen Arealen untersucht.

Um die Messtechnologie mit realen Proben zu testen, die möglicherweise mit Nanopartikeln kontaminiert sind, wurden verschiedene Testflüssigkeiten (Mineralwasser, Weißwein und Apfelsaft) mit Nanopartikeln bekannter Art, Größe und Konzentration versetzt und gemessen.

Die Anwendung des hier vorgestellten SPR-Mikroskops zeigt ein starkes Potential zur Entwicklung von ultra-sensitiven bioanalytischen Techniken für die Detektion industriell hergestellter Nanopartikel, Viren, Proteinaggregate und weiterer Biomoleküle. Außerdem besteht die Möglichkeit, das SPR-Mikroskop mit anderen Techniken, z.B. elektrochemische Methoden, zu koppeln.

Schlagwörter: SPR-Mikroskopie, einzelne Nanopartikel, markierungsfrei, Oberflächenmodifizierung

Einleitung

Der Begriff Nanopartikel umfasst alle nanoskaligen Objekte mit einer Größe von 1 bis 100 nm. Dazu gehören sowohl biologische als auch industriell hergestellte Partikel. Seit mehreren Jahrzehnten steigt die Produktion und Anwendung industriell hergestellter Nanopartikel (NP) stetig an. Gelangen diese in die Umwelt können aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften langfristige Schäden für Mikroorganismen und höhere Lebewesen entstehen. Studien haben gezeigt, dass Nanopartikel im Gewebe kumulieren und einen zytotoxischen Effekt aufweisen können [1-3].

Neben den industriell hergestellten Nanopartikeln gehören Proteine und Viren, darunter zahlreiche Krankheitserreger, zu den biologischen Nanopartikeln. Der Nachweis und die Charakterisierung industriell hergestellter als auch biologischer Nanopartikel erfordern den Einsatz höchst sensibler diagnostischer Methoden.

In dieser Studie präsentieren wir die Anwendung eines höchst-sensitiven SPR-Mikroskops, mit dessen Hilfe einzelne Nanopartikel in Echtzeit auf einer Sensoroberfläche abgebildet werden können. Diese analytische Methode basiert auf der SPR-Spektroskopie (*engl.* SPR = *surface plasmon resonance*), mit der sich kleinste Änderungen des Brechungsindex an einer Sensoroberfläche nachweisen lassen. Wird eine

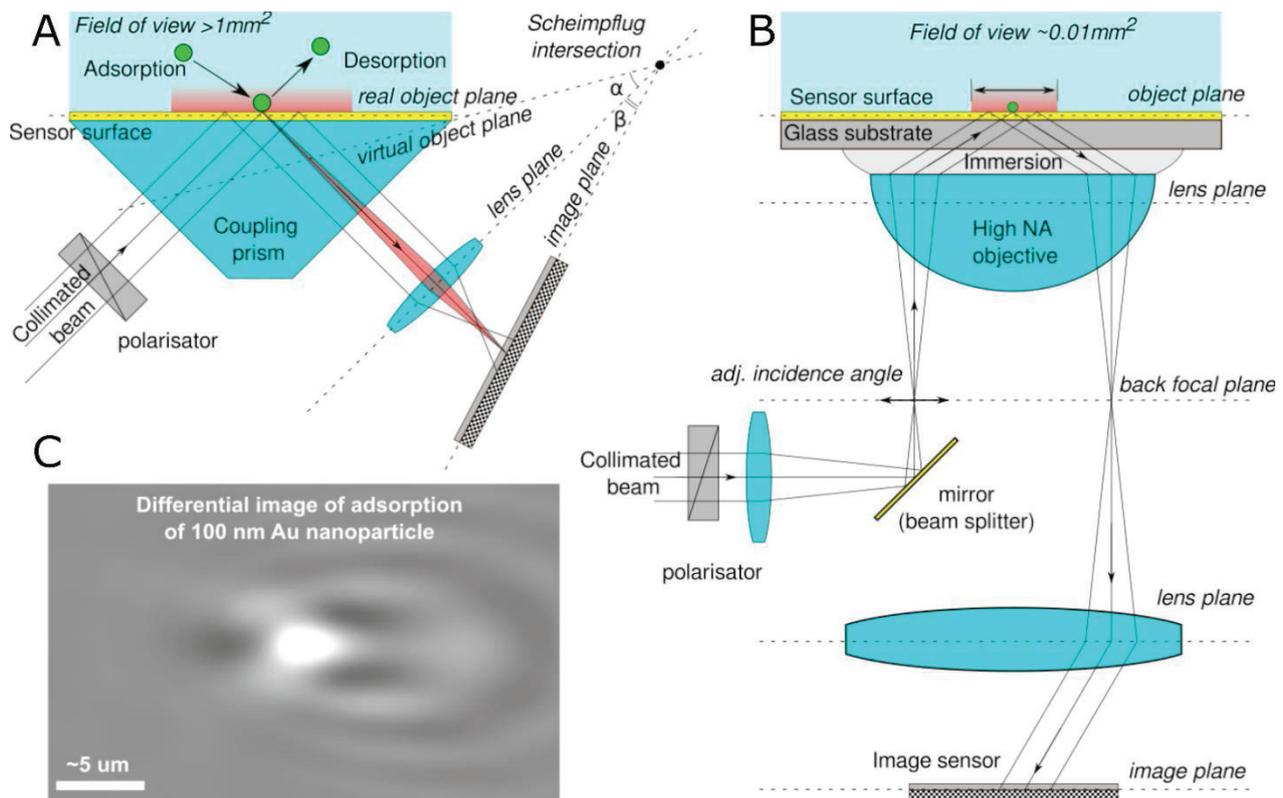


Abb. 1: Zwei mögliche Konfigurationen der SPR-Mikroskopie. **A)** verwendete Messanordnung für die vorgestellte Methode mit deutlich größerem sichtbarem Sensorfeld ($> 1 \text{ mm}^2$). **B)** Anordnung mit hoher numerischer Apertur (Sichtfeld $\sim 0,01 \text{ mm}^2$). **C)** Typisches differenzielles Bild eines detektierten 100 nm Goldnanopartikels [5].

CCD-Kamera als Detektor für eine hochempfindliche bildgebende Plattform eingesetzt, können damit Wechselwirkungen auf der Sensoroberfläche in sehr kurzen Zeitabständen und sehr präzise visualisiert werden. Die Visualisierung von adsorbierten Nanopartikeln auf funktionalisierten Sensoroberflächen ermöglicht eine Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Nanopartikeln in Bezug auf deren Oberflächenbeschaffenheit sowie auf die der Sensoroberfläche. Eine andere Möglichkeit besteht in der Erzeugung von Sensor-Arrays mit heterogen funktionalisierten Oberflächen, mit deren Hilfe die Nanopartikel selektiv detektiert werden. Des Weiteren stellen reale Medien wie Mineralwasser, Wein und Saft eine potentielle Quelle für Kontamination durch Nanopartikel dar. Durch die Anwendung der hier vorgestellten Technologie besteht die Möglichkeit zugesetzte Nanopartikel in den oben genannten Medien zu detektieren.

Prinzip des SPR-Mikroskops

Oberflächenplasmonenresonanz entsteht durch Bestrahlung einer Sensorschicht (meist $\sim 50 \text{ nm}$

Goldschicht auf Glas) mit p-polarisiertem Licht unter den Bedingungen der Totalreflexion. Dabei tritt ein Teil der Lichtenergie in Resonanz mit den oszillierenden Elektronen der Goldschicht, wobei eine energetische Plasmonenwolke, das sogenannte evaneszente Feld, entsteht. Kleinste Änderungen im Brechungsindex an der Sensoroberfläche können sehr präzise aufgrund von Änderungen der Resonanz detektiert werden. Das grundlegende Prinzip der SPR-Mikroskopie ist in Abb. 1 mit zwei möglichen Konfigurationen (Abb. 1 A-B) dargestellt. Für unsere Anwendung wurde die Messanordnung A übernommen. Eine nähere Beschreibung ist in [4] zu finden. Auf der ca. 1 mm^2 großen abgebildeten Sensoroberfläche können von 1 bis ca. 1000000 adsorbierte Nanopartikel detektiert werden. Adsorbieren Nanopartikel an die Sensoroberfläche, entsteht ein charakteristisches Intensitätsmuster für jeden Nanopartikel, ähnlich einem Fingerabdruck (Abb. 1C). Dieses Muster variiert mit Größe, Form und Material des Nanopartikels, wodurch verschiedene Arten von Nanopartikeln unterschieden werden können.

Ergebnisse

Visualisierung und Auswertung der Daten

Interagiert ein Nanopartikel mit der Sensoroberfläche im evaneszenten Feld, entsteht ein schwaches optisches Signal. Durch gezielte Bildverarbeitung werden diese Signale verstärkt, so dass einzelne Nanopartikel ≥ 20 nm detektiert werden können [5]. Durch die Erzeugung von differenziellen Abbildungen durch die Division von nacheinander folgenden SPR-Aufnahmen ist es möglich Änderungen, die beispielsweise durch die Adsorption oder Desorption von Nanopartikeln hervorgerufen werden, bildlich darzustellen. Die bildliche Darstellung ist ein Intensitätsmuster des Nanopartikels und keine reale Abbildung. Werden die qualitativen Merkmale der erzeugten Signalmuster betrachtet, erscheinen diese als helle oder dunkle Punkte (Spots) umgeben von einem

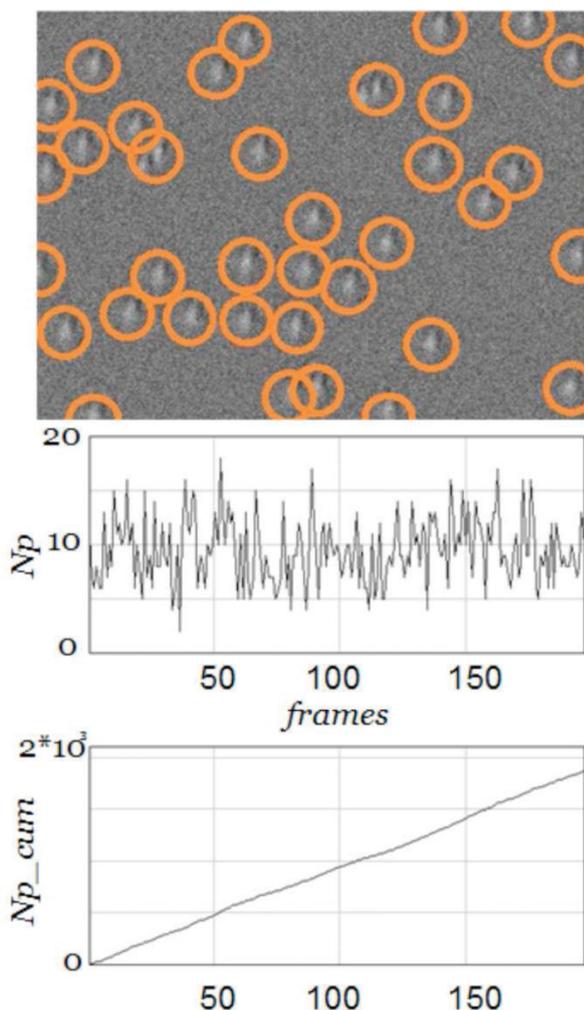


Abb. 2: **Oben:** Softwareunterstützte Erkennung von Nanopartikeln. **Mitte:** Anzahl an Nanopartikel pro Bild. **Unten:** Kumulative Anzahl an Nanopartikeln in einer Bildsequenz [4].

oder mehreren Ovalen (Abb. 1 C). Plasmonische Abbildungen von Nanopartikeln, die durch analytische Modelle beschrieben wurden [6], weisen hohe Übereinstimmungen mit unseren experimentellen Daten auf. Für jeden Typ von Nanopartikeln entstehen einzigartige Intensitätsmuster, die eine Differenzierung der Nanopartikel ermöglichen. Die Quantifizierung von adsorbierten/desorbierten Nanopartikeln kann entweder manuell oder computerunterstützt durch eine von uns entwickelte Bildbearbeitungssoftware erfolgen (Abb. 2). Damit kann eine weitreichende Analyse der Nanopartikel, sowohl qualitativ als auch quantitativ, durchgeführt werden, wodurch verschiedene Parameter, wie z.B. Anzahl an adsorbierten Nanopartikeln (Abb. 2), Adsorptions- und Desorptionsrate, aber auch physikochemische Eigenschaften sowie die Größe der Nanopartikel in der Suspension bestimmt werden können.

Detektion einzelner Nanopartikel auf modifizierten planaren Oberflächen

Eine wichtige Bedingung für die erfolgreiche Adsorption von Nanopartikeln besteht in der Auswahl geeigneter Modifizierungen der Sensoroberfläche. Für die Beschichtung der Sensoroberfläche werden Derivate folgender Alkylthiole eingesetzt: HS-C15-CH₃, HS-C16-NH₂, HS-C16-N⁺(CH₃)₃, HS-C15-COOH, HS-C11-PO₃²⁻, HS-C11-(O-CH₂-CH₂)₄-OH. Diese Oberflächen weisen aufgrund ihrer jeweiligen endständigen Gruppe unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Oberflächenladung, Hydrophilität und Hydrophobizität auf und bilden daher eine wichtige Grundlage für die Untersuchung der Adsorption von Nanopartikeln. Diese erfolgt zunächst bei niedrigen Ionenstärken (1,2 mM Phosphatpuffer, pH 7, Abb. 3) und im nächsten Schritt in Anwesenheit von 200 mM NaCl im gleichen Puffer (Tab. 1). Beim visuellen Vergleich der Spots (Adsorption einzelner Nanopartikel) von Gold- und Polystyren-Nanopartikeln ähnlicher Größe (~ 100 nm) können unterschiedliche Signalmuster und Intensitäten beobachtet werden (Abb. 3 A3-A4). Anhand dieser Effekte ist es möglich, Nanopartikel aus unterschiedlichem Material eindeutig voneinander zu differenzieren. Werden nur Goldnanopartikel betrachtet, kann ein Zusammenhang zwischen der Größe der Nanopartikel und der Größe der Signalmuster

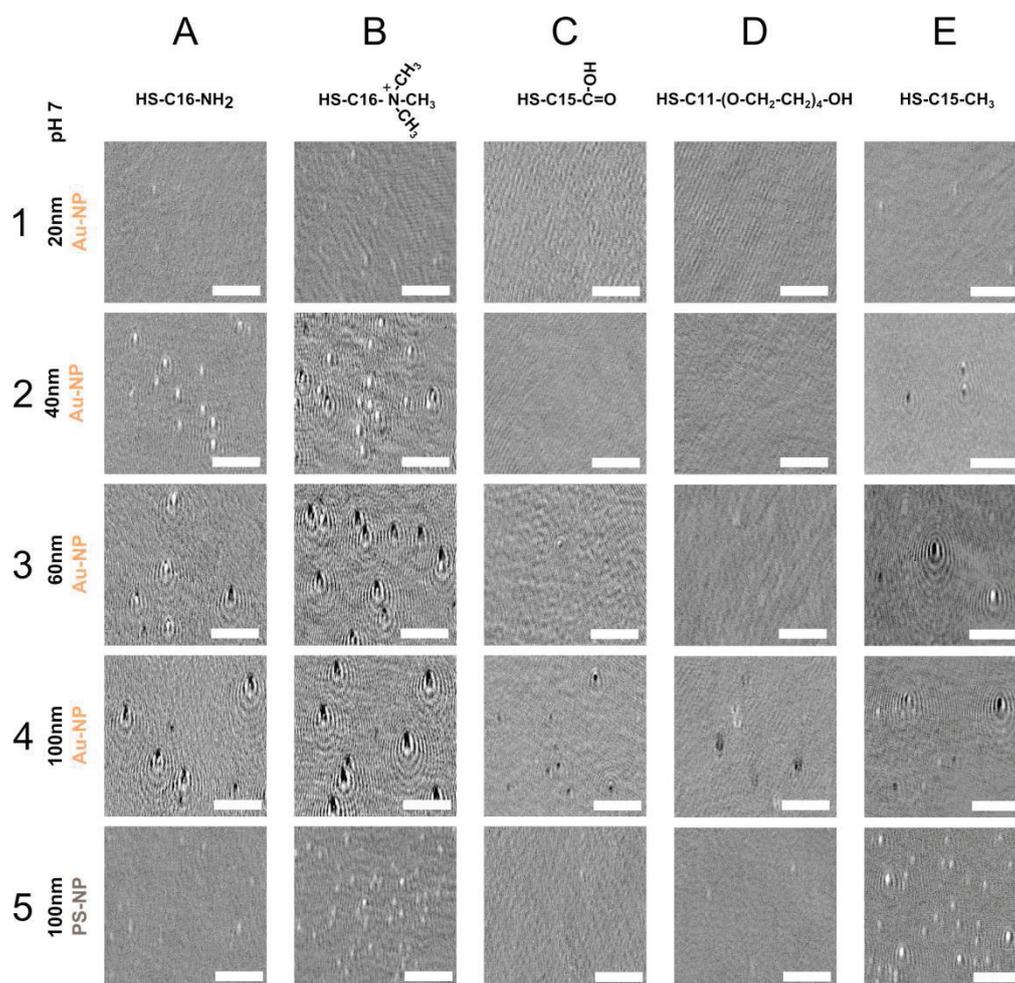


Abb. 3: Ausschnitte der Sensoroberfläche als Differenzial-Abbildung. Sensoroberfläche funktionalisiert mit (A) HS-C16-NH₂, (B) HS-C16-N⁺(CH₃)₃, (C) HS-C15-COOH, (D) (HS-C11-(O-CH₂-CH₂)₄-OH, (E) HS-C15-CH₃. Zugabe von (1) 20 nm, (2) 60 nm, (3) 100 nm Gold- und (4) 100 nm Polystyren-Nanopartikel Im Durchflusssystem mit einem Waschschrift zwischen jedem Batch an Nanopartikeln. Maßstab-Balken = 40 µm.

Tab. 1: Semiquantitative Auswertung der Anzahl an adsorbierten Gold- (Au-NP) und Polystyren-Nanopartikeln (PS-NP) auf unterschiedlich modifizierten Sensoroberflächen bei verschiedener NaCl-Konzentration. Zeichen in der Tabelle: + = 1-20 Nanopartikel pro mm² × s, ++ = 20-100 Nanopartikel pro mm² × s, +++ = > 100 Nanopartikel pro mm² × s, O = keine Nanopartikel. Buchstaben für Oberflächenmodifizierung entsprechen denen aus der Abb. 3.

Bedingungen		Au-NP				PS-NP
Oberflächen-modifizierung	[NaCl]	20 nm	40 nm	60 nm	100 nm	100 nm
A	0mM	+	+++	+++	+++	++
	200mM	++	+++	+++	+++	++
B	0mM	+++	+++	+++	+++	+++
	200mM	++	+	+	++	+
C	0mM	O	O	O	++	O
	200mM	+	++	++	+++	+++
D	0mM	O	O	O	+	+
	200mM	+	+++	+++	+++	+
E	0mM	+	+	+	++	++
	200mM	+++	+++	+++	+++	O

festgestellt werden (Abb. 3 A1-3, B1-3). Dieser Befund ermöglicht eine Größenbestimmung von Nanopartikeln identischer Zusammensetzung. Bei Sensoren mit positiv geladener Oberfläche (HS-C16-NH₂ und HS-C16-N⁺(CH₃)₃, Abb. 3 A, B) adsorbieren sowohl Gold- als auch Polystyren-Nanopartikel vorwiegend durch elektrostatische Wechselwirkungen. Im Gegensatz dazu zeigen die negativ geladene HS-C15-COOH- (Abb. 3 C) sowie die (HS-C11-(O-CH₂-CH₂)₄-OH- (Abb. 3 D) Sensoroberfläche, erwartungsgemäß, eine verminderte Adsorption der Nanopartikel, wobei nur größere Goldnanopartikel (> 60 nm) detektiert werden können. Die hydrophobe Beschichtung (HS-C15-CH₃) weist eine höhere Affinität zu Polystyren-Nanopartikeln als zu Goldnanopartikeln auf (Abb. 3E). Die semiquantitative Auswertung der Anzahl an adsorbierten Nanopartikeln aus Suspensionen von 10⁸ – 5 x 10⁸ NP/ml auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen sowie bei unterschiedlicher NaCl-Konzentration ist in Tab. 1 dargestellt. Die Anwesenheit von 200 mM NaCl begünstigt die Adsorption der Gold- und Polystyren-Nanopartikel unabhängig von der Modifizierung der Sensoroberfläche. Davon weichen die HS-C16-N⁺(CH₃)₃-Beschichtung für Gold- sowie die HS-C15-CH₃- Beschichtung für Polystyren-Nanopartikel ab. Das veränderte Adsorptionsverhalten der Nanopartikel in Anwesenheit von 200 mM NaCl kann mit einer Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkungen aufgrund der Abschirmung der Oberflächenladungsträger durch die anwesenden Salzionen erklärt werden [7].

Selektive Detektion von einzelnen Nanopartikeln auf heterogen strukturierten Sensoroberflächen

Aufbauend auf den Resultaten aus dem vorhergehenden Abschnitt wurde die Selektivität der Nanopartikel auf heterogen funktionalisierten Sensoroberflächen untersucht. Dazu wurden Areale mit positiver und negativer Oberflächenladung erzeugt, um die Adsorption der Nanopartikel vorwiegend durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorzurufen. Es konnte beobachtet werden, dass negativ geladene mit Citrat stabilisierte 60 nm Goldnanopartikel selektiv auf den positiv geladenen Sensorarealen adsorbieren (Abb 4 A-B). Dieses Ergebnis bildet die Basis für weiterführende Entwicklungen von Sensorarrays für eine höchst sensitive und

selektive Detektion von Nanopartikeln. Dabei können Nanopartikel nach ihren Eigenschaften auf einer heterogen strukturierten Sensoroberfläche unterschieden werden.

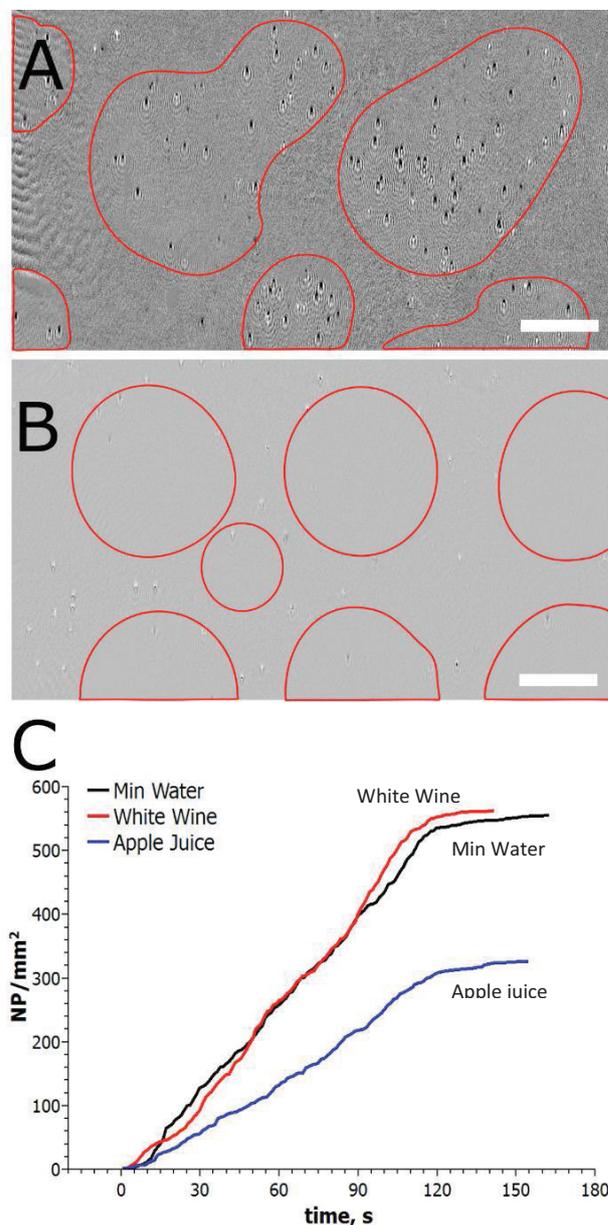


Abb. 4: Differential-Abbildungen heterogen strukturierter Sensoroberflächen mit (A) HS-C16-NH₂-Arealen (umkreist mit rot) und HS-C15-COOH-Restfläche. (B) HS-C11-PO₃²⁻-Arealen (umkreist mit rot) und HS-C16-NH₂-Restfläche. Zugabe von ~10⁸ NP/ml 60 nm Goldnanopartikel. (C) Anzahl von detektierten 50 nm Goldnanopartikeln aus Mineralwasser (schwarz), Weißwein (rot), Apfelsaft (blau) auf einer planaren HS-C16-NH₂-funktionalisierten Sensoroberfläche. Maßstab-Balken = 100µm.

Detektion einzelner Nanopartikel in realen Medien

Neben der Detektion von Nanopartikeln in relativ einfachen synthetischen Lösungen kann diese auch in komplexen Medien durchgeführt werden. Dazu wird zunächst eine bestimmte Konzentration an 50 nm Goldnanopartikeln ($\sim 10^7$ NP/ml) zu klaren Flüssigkeiten wie Mineralwasser, Weißwein und Apfelsaft hinzugefügt und mit dem SPR-Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Goldnanopartikel einzeln detektiert und visualisiert werden können. Es konnten keine weiteren Nanopartikel detektiert werden außer den zugesetzten. Obwohl die Konzentration der zugesetzten Nanopartikel in allen Proben gleich ist, wird im Mineralwasser sowie im Wein im Vergleich zu Apfelsaft eine etwas höhere Anzahl an Nanopartikeln detektiert (Abb. 4C). Es ist anzumerken, dass die untersuchten Medien verschiedene organische Moleküle enthalten, die zusätzlich das Adsorptionsverhalten der Nanopartikel als auch die Oberflächeneigenschaft beeinflussen können. Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit dieser Methode möglich ist, eine Kontamination der untersuchten Probe mit Nanopartikeln nachzuweisen.

Schlussfolgerung

Im vorliegenden Beitrag wurde die Anwendung von SPR-Mikroskopie für den ultra sensitiven Nachweis von Nanopartikeln vorgestellt. Mit dieser Methode können einzelne Nanopartikel ≥ 20 nm auf modifizierten planaren sowie array-artigen Sensoroberflächen markierungsfrei in Echtzeit detektiert, visualisiert und analysiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Technologie für die Detektion und Visualisierung von Nanopartikeln in realen Medien wie Mineralwasser, Wein und Apfelsaft geeignet ist. Diese höchst sensitive Technologie bietet auch vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Bioanalytik, beispielsweise für die schnelle Detektion biologischer, insbesondere pathogener Nanopartikel. Darüber hinaus besteht die Option das SPR-Mikroskop mit anderen Techniken, wie z.B. elektrochemischen Verfahren, zu koppeln.

Literatur

- [1] Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., & Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 552–558.
- [2] Li, Y., Zhang, Y., & Yan, B. (2014). Nanotoxicity Overview: Nano-Threat to Susceptible Populations. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3671–3697.
- [3] Johnston, H. J., Semmler-Behnke, M., Brown, D. M., Kreyling, W., Tran, L., & Stone, V. (2010). Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1), 66–78.
- [4] Zybin, A., Kuritsyn, Y. A., Gurevich, E. L., Temchura, V. V., Überla, K., & Niemax, K. (2010). Real-time detection of single immobilized nanoparticles by surface plasmon resonance imaging. *Plasmonics*, 5(1), 31–35.
- [5] Sidorenko, I., Nizamov, S., Hergenröder, R., Zybin, A., Kuzmichev, A., Kiwull, B., Mirsky, V. M. (2015). Computer assisted detection and quantification of single adsorbing nanoparticles by differential surface plasmon microscopy. *Microchimica Acta*.
- [6] Demetriadou, A., & Kornyshev, A. a. (2015). Principles of nanoparticle imaging using surface plasmons. *New Journal of Physics*, 17(1), 13041.
- [7] Pfeiffer, C., Rehbock, C., Hühn, D., Carrillo-Carrion, C., de Aberasturi, D. J., Merk, V., Parak, W. J. (2014). Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 11(96), 20130931.