

УДК 546.26:577.3-022.532

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК И ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Г. К. Чудинова, И. А. Наговицын, М. А. Кононов,
И. А. Масляницын, В. Д. Шигорин, В. В. Савранский

Исследовано взаимодействие образцов ДНК, выделенных из листьев табака двух сортов, с углеродными нанотрубками (УНТ). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) получены изображения пленок комплексов ДНК-УНТ. Продемонстрирована возможность образования упорядоченных самособирающихся структур в пленке ДНК-УНТ.

В последнее время углеродные нанотрубки являются объектом пристального внимания, в частности, как биосовместимые материалы, имеющие биологическое и медицинское применение. Бионаноконпозиты на основе углеродных нанотрубок могут быть использованы для: 1 – производства биосенсоров; 2 – синтеза молекулярных структур для транспорта вакцин и лекарств в определенный орган человека; 3 – использования нанотрубок в качестве матрицы для роста клеток; 4 – создания биоэлектронных приборов, которые могут быть имплантированы в организм человека [1–5].

Использование нанотрубок при создании чувствительного элемента биосенсоров приводит к ощутимым преимуществам, а именно, возможно резкое увеличение чувствительности, уменьшение размера чувствительного элемента за счет развитой поверхности, а также повышение скорости измерений и воспроизводимости [6–13].

В качестве датчика сенсоров в последнее время успешно используется метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), который имеет огромный потенциал как для количественного, так и для качественного определения биоматериалов. АСМ является очень точным инструментом для характеристики получаемого изображения сложных биомолекулярных систем. Углеродные нанотрубки представляют собой идеальный материал для этих

целей. В последнее время АСМ в динамическом режиме используется для химического и молекулярно-биологического анализов ДНК и не только [13–27].

Данное исследование является первым из серии запланированных, объединенных общей целью, а именно, провести систематическое исследование по выбору оптимальных условий создания биопакокомпозигов на базе нанотрубок для чувствительного элемента биосенсора.

Экспериментальная часть. В работе были использованы одностенные очищенные нанотрубки (НТ), синтезированные по методике [28], содержание нанотрубок в исходном продукте – 20%.

Образцы ДНК (ДНК1 и ДНК2) были выделены из листьев двух сортов табака настоящего *Nicotiana Tabacum L.* по методике [29]. Исходная концентрация ДНК – $1.5 \cdot 10^{-6} M$ (ДНК1) и $3.3 \cdot 10^{-6} M$ (ДНК2).

Из литературы известно, что для экстрагирования непосредственно нанотрубок из реакционной смеси используются растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как, тритон X-100 в разных концентрациях [30, 31]. В данной работе сами молекулы ДНК были использованы сами в качестве активного вещества для экстрагирования НТ из исходного продукта.

Комплексы ДНК с НТ получали в воде (рН 6.0) и в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9.2), содержащем хлорид натрия в концентрации 0.02 М. Эксперимент проводили следующим образом: четыре навески неочищенных нанотрубок (2 мг) заливали горячими растворами (95 °С), содержащими ДНК1 или ДНК2 в количестве 200 мкл в 6 мл воды или буфера. Подготовленные образцы обрабатывались ультразвуком на приборе УЗДН-Ф в течение 90 мин. Для охлаждения раствора ДНК с НТ в процессе обработки ультразвуком использовали смесь льда, хлорида натрия и воды (исходная температура: –7 °С). Температура ДНК и НТ в течение этого процесса составляла в среднем 35 °С. Полученную суспензию центрифугировали 20 минут при 2000 об/мин на центрифуге ОП-8УХЛ4.4. Раствор, содержащий комплекс ДНК с НТ, микроинъекцией (максимальным объемом 200 мкл) наносили на полированные кварцевые подложки, размером $35 \times 10 \times 1.5$ мм, которые предварительно помещали в чашки Петри. Пластики сушили в течение суток в закрытых чашках Петри при комнатной температуре.

Спектры поглощения исходных растворов ДНК, растворов комплексов ДНК-НТ и пленок на кварцевых пластинках измеряли на спектрофотометре фирмы Shimadzu UV 250 (Япония). Исследования структуры пленок проводили на микроскопе P4-SPM-MDT

(ЗАО "NT-MDT", Россия) в режиме силового сканирования с использованием программы P7-SPM.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены спектры поглощения исходных концентрированных растворов ДНК1 и ДНК2 (а), и спектры поглощения полученного комплекса ДНК с нанотрубками после ультразвуковой обработки в растворе (б). На рис. 2 приведены спектры поглощения исходных образцов ДНК и комплексов ДНК с нанотрубками на кварцевых подложках после обработки ультразвуком и высушивания на воздухе. Как видно, максимум спектра поглощения комплекса ДНК с нанотрубками смещен на 15–20 нм в длинноволновую область относительно максимума поглощения ДНК и в растворе (рис. 1), и на кварцевой подложке (рис. 2). Это свидетельствует о том, что сдвиг максимума полосы поглощения ДНК при взаимодействии с НТ объясняется именно образованием комплекса ДНК с нанотрубками, а не изменением окружения при образовании пленки.

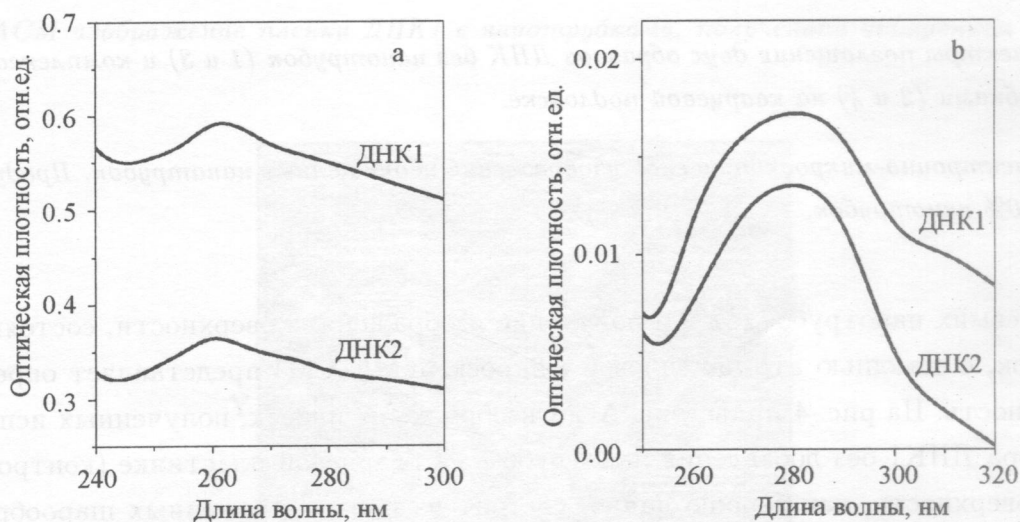


Рис. 1. а – Спектры поглощения исходных концентрированных растворов ДНК1 и ДНК2 до смешения с нанотрубками; б – Спектры поглощения ДНК1 и ДНК2 с нанотрубками после ультразвуковой обработки (200 мкл исходного концентрированного раствора ДНК1 или ДНК2 + 2 мг неочищенных нанотрубок в 6 мл 0.05 М буферного раствора).

Электронно-микроскопическое изображение неочищенных нанотрубок (исходного продукта, содержащего нанотрубки) приведено на рис. 3 (до ультразвуковой экстракции). На изображении видна аморфная структура исходного образца. Из-за небольших

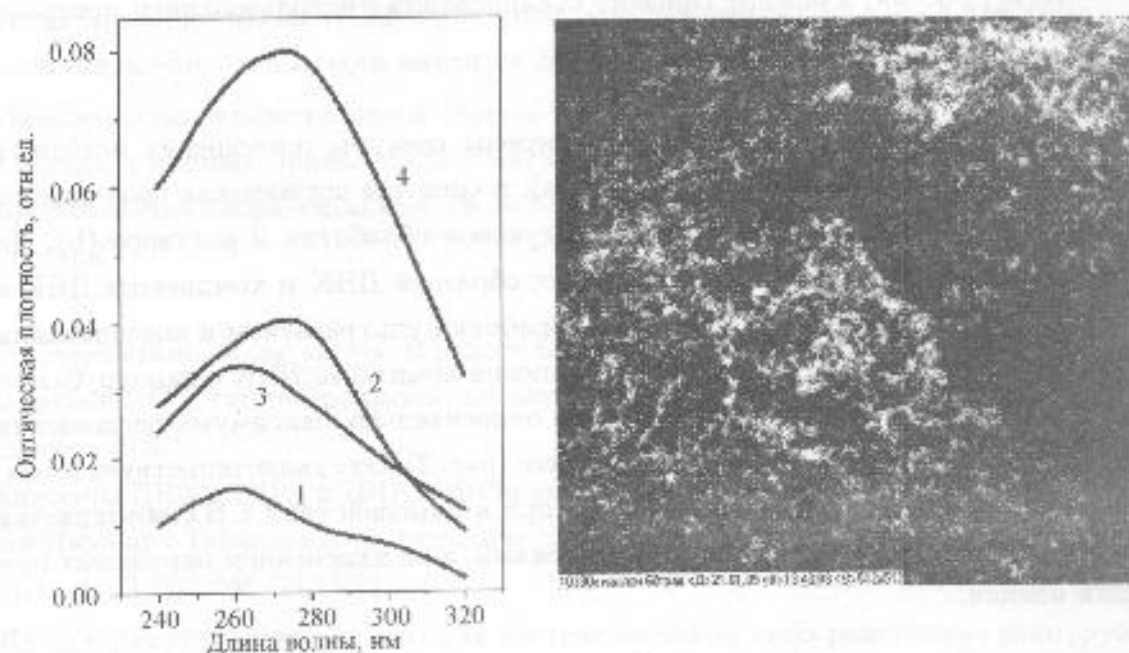


Рис. 2. Спектры поглощения двух образцов ДНК без нанотрубок (1 и 3) и комплексов ДНК с нанотрубками (2 и 4) на кварцевой подложке.

Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение неочищенных нанотрубок. Продукт содержит 20% нанотрубок.

размеров самих нанотрубок [32–34] получение изображения поверхности, состоящей из нанотрубок, с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) представляет определенную трудность. На рис. 4 приведены АСМ изображения пленок, полученных испарением раствора ДНК1 без добавления нанотрубок, на кварцевой пластинке (контрольный опыт). Поверхность, как хорошо видно, состоит из плотно уложенных шарообразных структур, диаметр которых составляет от 30 до 60 нм.

На рисунках 5 и 6 представлены изображения пленок образцов нанотрубок с ДНК1 и ДНК2 соответственно, полученных испарением водного раствора при pH 6.0 после обработки ультразвуком. Видно существенное различие как по размеру, так и по форме образовавшихся в плесках структур (рис. 5, 6) по сравнению со структурой однокомпонентной пленки ДНК1 (рис. 4). Структуры пленок комплексов ДНК1 с нанотрубками (рис. 5) напоминают ветку ели; размеры одного домена (“ветки”) 300 нм и больше. Структура пленок, содержащих комплексы ДНК2 с нанотрубками, представляют собой

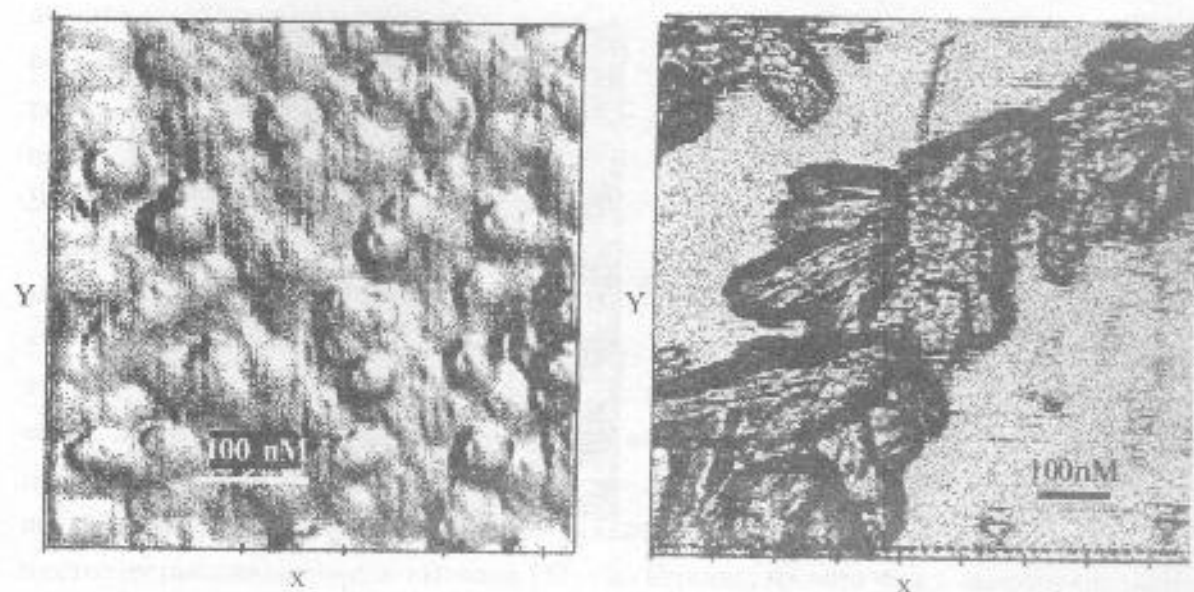


Рис. 4. АСМ изображение пленки ДПК1 (без нанотрубок).

Рис. 5. АСМ изображение пленки ДПК1 с нанотрубками, полученной испарением водного раствора.

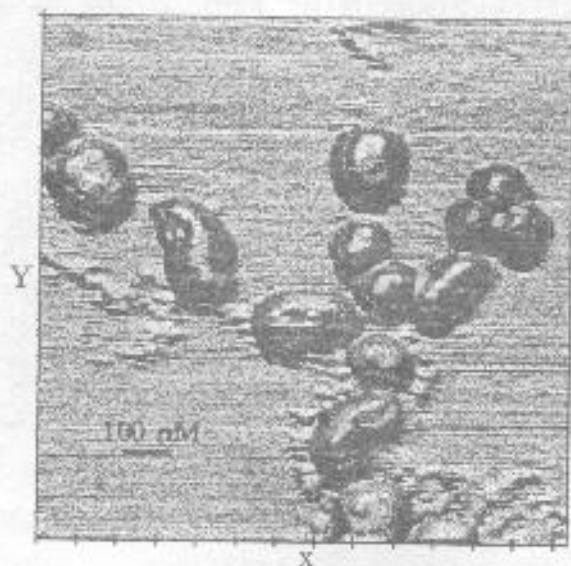


Рис. 6. АСМ изображение пленки ДПК2 с нанотрубками, полученной испарением водного раствора.

скопления из шарообразных (100–120 нм) и овальных (150–350 нм) структур (рис. 6).

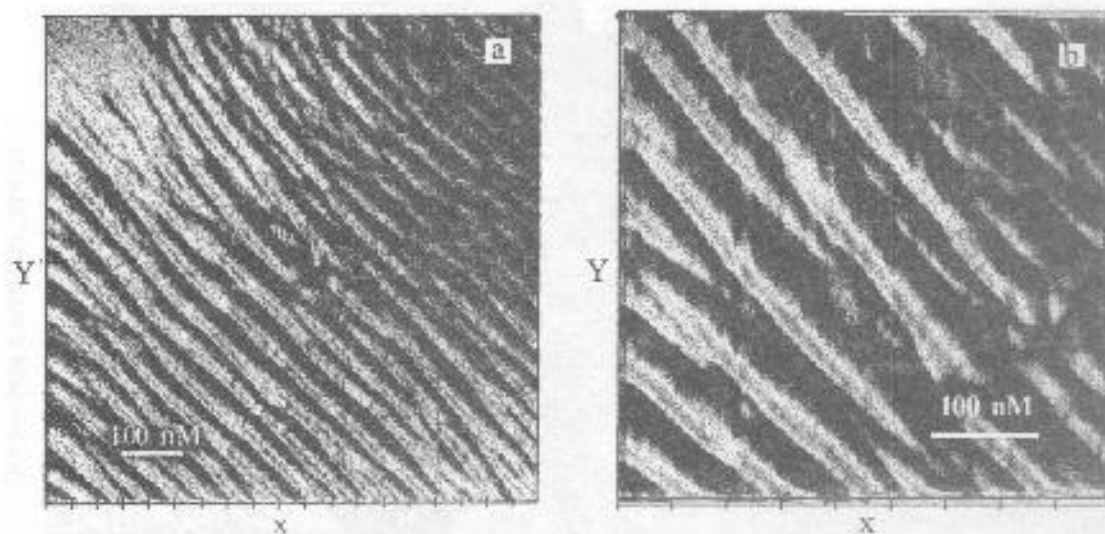


Рис. 7. АСМ изображение пленки ДНК1 с нанотрубками, полученной испарением буферного раствора ($\text{pH} = 9.2$).

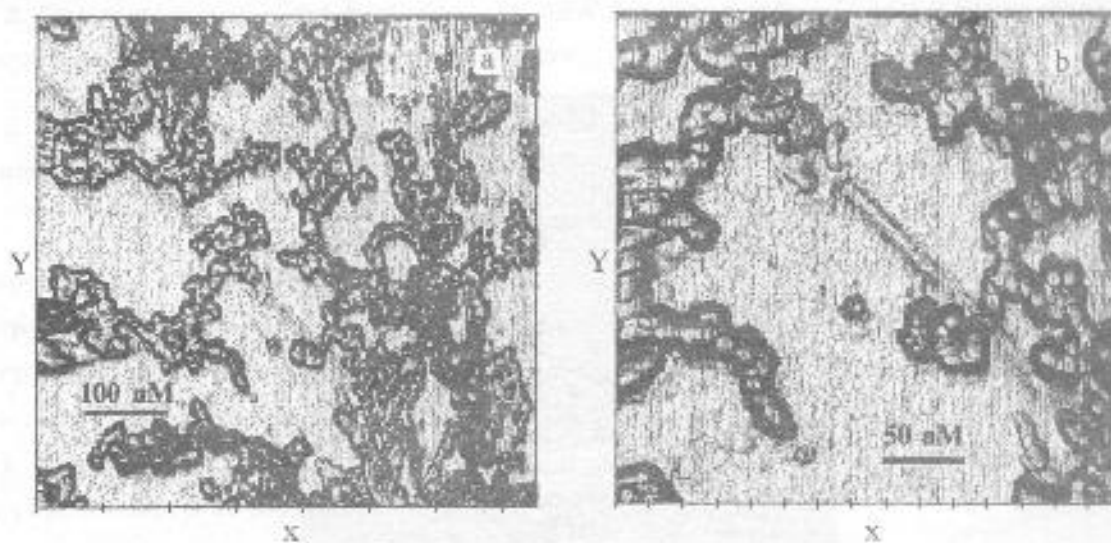


Рис. 8. АСМ изображение пленки ДНК2 с нанотрубками, полученной испарением буферного раствора ($\text{pH} = 9.2$).

Совсем другие изображения получаются для комплексов ДНК1 и ДНК2 с нанотрубками, полученных испарением буферного раствора ($\text{pH} 9.2$, в присутствии 0.02 M хлорида натрия), которые представлены на рис. 7 и 8. Для ДНК1 (рис. 7) наблю-

даются высокоупорядоченные шнуровидные структуры, равномерно распределенные по поверхности. Ширина одного "шнура" составляет величину порядка 100 нм, что не позволяет говорить о паличии в комплексе ДНК1 с УНТ лишь одной одностенной нанотрубки, оплетенной молекулой ДНК1 (схема комплекса приведена в работах [35, 36]). Выявление структуры полученного нами комплекса требует дальнейших исследований. Отметим, что атомно-силовое сканирование кварцевой пластинки во всех случаях показывает неоднородность полученной пленки. Это может быть связано, во-первых, с тем, что испарением раствора невозможно приготовить равномерной пленки, и, во-вторых, как это часто наблюдается для ленточных пленок, структура пленки представляет собой домены, между которыми располагается пустое пространство, так называемые дефекты. Уменьшение дефектов такой пленки за счет сближения доменов приводит к дестабилизации пленки (деструкции), видимо, такая структура чередования доменов и пустот термодинамически выгодна [37–40]. Однако, наличие факта самоорганизации комплексов ДНК1 с УНТ при испарении раствора. Подобные высокоупорядоченные системы могут в дальнейшем быть использованы при создании чувствительных элементов сенсорных систем.

В случае использования ДНК2 (рН 9.2) образуются нитевидные структуры (рис. 8А). При увеличении изображения (рис. 8В) видно, что нитевидные структуры составлены из шарообразных доменов размером от 100 нм и выше. Мы предполагаем, что в наблюдаемых нами доменах происходит агрегация комплексов ДНК2 и нанотрубок (агрегация нанотрубок продемонстрирована с помощью АСМ в работе [41]). Отметим, что шарообразные (ball) [42] и нитеобразные (filament) структуры описаны в литературе для разных типов ДНК [43].

Таким образом, на примере образцов ДНК, выделенных из листьев табака двух различных сортов, показано, что на форму агрегатов комплексов ДНК с УНТ, образующихся на поверхности кварцевой пластинки, влияет различие нуклеотидного состава ДНК. Показано, что на поверхности кварцевой пластинки образуются самоорганизованные упорядоченные домены, состоящие из комплексов ДНК с УНТ. Получены также предварительные результаты, которые показывают, что на форму комплекса также оказывают влияние условия его получения (рН, буфер, присутствие соли).

Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность Образцовой Е.Д. (ЦЕНИ ИОФ РАН), любезно предоставившей нанотрубки, Белецкому И.П. (ИТЭБ РАН), предоставившему ДНК и Васильевой Н.Д. (МЭИ) за получение электронномикроскопического изображения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-02-00160-а.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. Huczko, H. Lange, E. Caiko, et al. *Fullerene Sci. Technol. (Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.)* **9**, 251 (2001).
- [2] M. Shim, N. W. S. Kam, R. J. Chen, Y. Li, H. Dai. *Nano Lett.* **2**, 285 (2002).
- [3] K. Besteman, J. - O. Lee, F. G. M. Wiertz, et al. *Nano Lett.* **3**, 727 (2003).
- [4] A. Bianco, M. Prato. *Adv. Mater.* **15**, 1765 (2003).
- [5] J. Davis, K. Coleman, B. Azamian, et al. *Chem. Eur. J.* **9**, 3732 (2003).
- [6] Q. Zhao, Z. Gan, Q. Zhuang. *Electroanalysis* **14**, 1609 (2002).
- [7] P. J. Britto, K. S. V. Santhanam, P. M. Ajayan. *Bioelectrochem. Bioenergetics* **41**, 121 (1996).
- [8] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, Z. Gu. *Electroanalysis* **14**, 225 (2002).
- [9] K. Wu, X. Ji, J. Fei, S. Hu. *Nanotechnology* **15**, 287 (2004).
- [10] S. Tsang, Z. Guo, Y. Chen, et al. *Angew. Chem. Int. Edit.* **36**, 2198 (1996).
- [11] Z. Guo, P. J. Sadler, S. C. Tsang. *Adv. Mater.* **10**, 701 (1998).
- [12] M. B. Shenai, K. G. Putschakayala, S. A. Hessler, B. G. Orr, et al. *IEEE Trans. Nanobiosc.*, **3**, N 2, 111 (2004).
- [13] R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3838 (2001).
- [14] R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 4984 (2003).
- [15] C. Dwyer, V. Johri, M. Cheung, et al. *Nanotechnology* **15**, 1240 (2004).
- [16] P. He, M. Bayachou. *Langmuir* **21**, N 13, 6086 (2005).
- [17] A. Woolley, C. Guillemette, C. Cheng, D. Housman, C. Lieber. *Nat. Diotechnol.* **18**, 760 (2000).
- [18] D. Cai, J. Mataraza, Z. Qin, et al. *Nat. Methods* **2**, 449 (2005).
- [19] L. Chen, K. Haushalter, C. Lieber, G. Verdine. *Chem. Biol.* **9**, 345 (2002).
- [20] S. Iwabuchii, T. Mori, K. Ogawa, et al. *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 473 (2002).
- [21] C. Niemeyer. *Rev. Mol. Biotech.* **82**, 47 (2001).
- [22] Y. Dufrene. *Micron* **32**, 153 (2001).
- [23] A. Curulli, F. Valentini, C. Padeletti, et al. *Palleschi, Sens. Actuats B* **111/112**, 526 (2005).
- [24] P. Dahlgren, M. Karimov, P. Thumfort, et al. *Disease-a-Month* **51**, 374 (2005).
- [25] J. Zlatanova, S. Lindsay, S. Leuba. *Progress Biophys. Mol. Biol.* **74**, 37 (2000).

- [26] R. Colton D. Baselt, Y. Dufrene, et al. *Current Opinion Chem. Biol.* **1**, 370 (1997).
- [27] S. Zhang. *Biotechnol. Advances* **20**, 321 (2002).
- [28] C. Kingston, B. Simard. *Anal. Lett.* **26**, 3119 (2003).
- [29] J. J. Doyle, J. L. Doyle. *Phytochem. Bull* **19**, 11 (1987).
- [30] J. Riggs, D. Walker, D. Carroll, Y. Sun. *J. Phys. Chem. B* **104**, 7071 (2000).
- [31] K. Ausman, R. Piner, O. Lourie, R. Ruoff, M. Korobov. *J. Phys. Chem. B* **104**, 8911 (2000).
- [32] T. Yamade. *Synth. Met.* **70**, 1511 (1995).
- [33] А. В. Елецкий. *Успехи физ. наук* **167**, 945 (1997) [A. V. Eletskaa, *Physics Uspekhi* **40**, 899 (1997)].
- [34] Э. Г. Раков. *Успехи химии* **70**, 934 (2001) [E.G. Rakov, *Russ. Chem. Rev.* **70**, 827 (2001)].
- [35] M. Zheng, A. Jagota, M. S. Strano, et al. *Science* **302**, 1545 (2003).
- [36] M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, et al. *Nat. Mater.* **2**, 338 (2003).
- [37] G. Nechev, M. Hibimo, I. Natta. *Colloids & Surfaces A* **166**, 1 (2000).
- [38] J. Peng, G. Barnes. *Thin Solid Films* **252**, 44 (1994).
- [39] N. Peachey, C. Eckhardt. *Micron* **25**, 271 (1994).
- [40] A. Malinauskas, J. Malinauskas, A. Ramanavicius. *Nanotechnol.* **16**, R51 (2005).
- [41] B. Ohler, I. Revenko, G. Husted. *J. Struct. Biol.* **133**, 1 (2001).
- [42] E. Buranova, A. Karlash, G. Popova, et al. *Mater. Sci. Engin. C* **19**, 41 (2002).
- [43] K. Umemura, J. Komatsu, T. Uchikashi, K. Ichimura. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **281**, 390 (2001).

Институт общей физики
им. А.М. Прохорова РАН

Поступила в редакцию 19 ноября 2007 г.