

УДК 620.3

## ФИЗИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОПОЛИМЕРОВ С НАНОЧАСТИЦАМИ

А. В. Космынцева<sup>1</sup>, И. О. Петрова<sup>1</sup>, Ю. П. Ракович<sup>1-3</sup>,  
А. В. Суханова<sup>4</sup>, И. Р. Набиев<sup>1,4</sup>

*С помощью флуоресцентного резонансного переноса энергии исследовалось физическое взаимодействие наночастиц с биополимерами на примере взаимодействия квантовых точек (донор энергии) с двухцепочечными олигонуклеотидами, мечеными флуоресцирующим органическим красителем BDP TR (акцептор энергии). Высокоэффективный резонансный перенос энергии от квантовых точек к органическому красителю не только позволяет изучить зависимость его эффективности от молярного соотношения донора и акцептора, но и представляет собой эффективный инструмент исследования взаимодействий олигонуклеотидов различной структуры с наноразмерными объектами.*

**Ключевые слова:** квантовые точки, олигонуклеотиды, флуоресцентный резонансный перенос энергии.

*Введение.* С интенсивным развитием нанотехнологий увеличивается количество наночастиц, окружающих человека. При их проникновении в кровь, клетки и ткани организма человека в первую очередь происходит взаимодействие с биополимерами, такими как белки клеток и биологических жидкостей человека, а также ДНК и РНК [1, 2]. В результате этих взаимодействий образуются комплексы, состоящие из наночастиц, окруженных биополимерами. Получающиеся таким образом объекты не обладают химической специфичностью, и их свойства определяются только размерами и физико-

<sup>1</sup> НИЯУ «МИФИ», 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31; e-mail: alyona130193@gmail.com.

<sup>2</sup> Center for Materials Physics and University of the Basque Country, Paseo Manuel de Lardiza-bal 5, Donostia – San Sebastián, Spain.

<sup>3</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Maria Diaz de Haro 3, Bilbao, Spain.

<sup>4</sup> Laboratoire de Recherche en Nanosciences, EA4682-LRN, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

химическими параметрами этих агрегатов [3]. Для понимания структуры и свойств конечного объекта необходимо изучить фундаментальные механизмы взаимодействия его составляющих, что обеспечит возможность контроля процесса образования комплексов, регулирования их размеров, а также областей их распределения в организме и механизмов выведения [1–3].

В настоящей работе проведено исследование механизма взаимодействия флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов с флуоресцентными водорастворимыми квантовыми точками (КТ) структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) в буферном растворе. Качественными и количественными характеристиками взаимодействия биополимера с наночастицей являлись особенности и эффективность флуоресцентного резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer – FRET) от донора (КТ) к акцептору (флуоресцентная метка олигонуклеотида).

FRET представляет собой результат диполь-дипольного взаимодействия двух близкорасположенных хромофоров [4]. Основным условием его возникновения является перекрывание спектров испускания флуоресценции донора и поглощения акцептора, а также сближенность донора и акцептора на нанометровые расстояния. Эффективность FRET зависит от таких факторов, как степень перекрывания спектров испускания флуоресценции донора и поглощения акцептора, расстояние между донором и акцептором, время жизни возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора, а также взаимной ориентации дипольных моментов донора и акцептора относительно друг друга. На практике для определения эффективности FRET, как правило, используют различия поведения донора в присутствии акцептора по сравнению с его поведением в отсутствие акцептора при прочих равных условиях, что и применялось в данной работе.

*Описание методики измерений.* Для изучения зависимости эффективности FRET от молярного соотношения КТ/олигонуклеотид была проведена серия экспериментов в 10 мМ натрий-фосфатном буфере ( $pH = 7.4$ ). Исходя из свойств используемых образцов, были выбраны оптимальные условия комплексообразования, а также построена схема экспериментов с учетом проведения всех необходимых контролей. В качестве изучаемых наночастиц и биополимеров были выбраны квантовые точки состава CdSe/ZnS (ядро/оболочка), с максимумом испускания флуоресценции 530 нм, покрытые лигандами PEG-OH и PEG-NH<sub>2</sub> в соотношении 70% к 30%, соответственно, и двухцепочечные олигонуклеотиды с последовательностями 5' → 3' [BDP-TR]ATAAAAAG, CTTTТТAT. Соотношение PEG-OH и PEG-NH<sub>2</sub> было подобрано таким образом, чтобы после со-

любиллизации КТ обладали положительным поверхностным зарядом, что способствует увеличению вероятности их электростатического взаимодействия с олигонуклеотидами, имеющими отрицательный поверхностный заряд. Таким образом, для различных молярных соотношений донор/акцептор были исследованы растворы, содержащие меченые олигонуклеотиды и КТ, олигонуклеотиды без метки и КТ, BDP TR и КТ, буфер и КТ, а для проверки стабильности – меченые олигонуклеотиды, олигонуклеотиды, BDP TR.

С помощью спектрофотометрических и спектрофлуориметрических методов проводили регистрацию спектров поглощения и флуоресценции. Далее все полученные спектры обрабатывали с использованием вычислительных средств, и на основании получаемых результатов проводили определение интенсивности отдельных спектральных линий. В данном случае спектры поглощения использовали для контроля агрегации элементов смесей, а спектры флуоресценции – для контроля агрегации и для определения эффективности FRET.

Для получения достоверных результатов по оценке эффективности FRET, а также для доказательства тушения КТ именно за счет механизма FRET, длина волны возбуждения на спектрофлуориметре была выбрана так, чтобы, с одной стороны, в этой области происходило бы достаточно интенсивное возбуждение КТ, а с другой стороны – возбуждение красителя было бы минимальным.

*Методика анализа.* Для определения различия в поведении свободного красителя и красителя, связанного с олигонуклеотидами, были получены спектры возбуждения флуоресценции этих растворов, а также спектры испускания флуоресценции на двух длинах волн возбуждения: 530 нм, соответствующей максимуму флуоресценции используемого образца КТ, и 440 нм, соответствующей минимальному возбуждению красителя в этой области по спектральным данным для подтверждения малости возбуждения на этой длине волны.

При изучении влияния олигонуклеотидов на КТ также проводили наблюдение за спектрами флуоресценции получаемых образцов. Для того чтобы убедиться, что в данной системе происходит именно перенос энергии с КТ на краситель, было необходимо сравнить спектры флуоресценции смесей с отдельными спектрами флуоресценции красителя и меченого олигонуклеотида на той же длине волны возбуждения.

Определение эффективности FRET было проведено не только для системы меченого олигонуклеотида и КТ, но и для системы свободного красителя и КТ. В обоих слу-

чаях определяли изменения интенсивности флуоресценции донора при наличии акцептора, а также в отсутствие акцептора. Для оценки эффективности FRET использовали формулу:

$$E = 1 - \frac{I'}{I}, \quad (1)$$

где  $I$  – интенсивность флуоресценции донора в отсутствие акцептора,  $I'$  – интенсивность флуоресценции донора в присутствии акцептора.

*Результаты.* По полученным спектрам возбуждения флуоресценции меченого олигонуклеотида и красителя были установлены длины волн их минимального возбуждения, которые оказались в области 440 нм. Спектры испускания флуоресценции и поглощения для данных образцов показали незначительное различие в поведении свободного и связанного красителя, что позволило в дальнейшем использовать одинаковые параметры для получения данных, а также для их анализа.

Влияние олигонуклеотидов на КТ оценивали по сравнению спектров флуоресценции КТ в чистом виде и в смеси с олигонуклеотидами. Полученные результаты показали отсутствие какого-либо значимого воздействия олигонуклеотидов на интенсивность флуоресценции и характеристики её спектра. Данный результат доказывает, что в дальнейших экспериментах все изменения обусловлены присутствием красителя BDP TR.

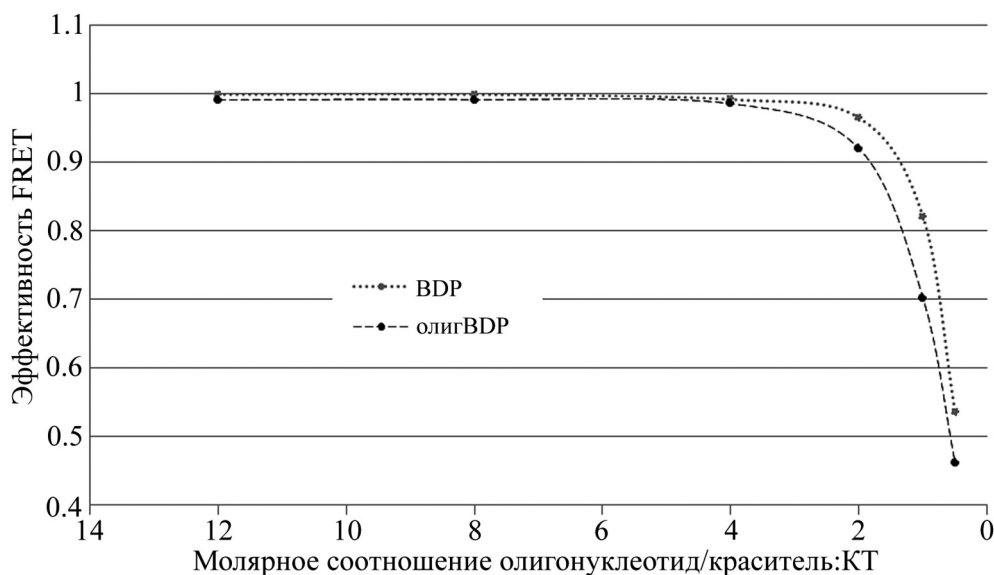


Рис. 1: Зависимость эффективности FRET от молярных соотношений компонентов акцептор/донор в системах “краситель–квантовые точки” и “меченый олигонуклеотид–квантовые точки”.

Одним из проявлений FRET, помимо тушения донора, является увеличение интенсивности флуоресценции акцептора. В данной работе этот эффект также наблюдали с помощью сравнения спектров флуоресценции красителя и меченых олигонуклеотидов на длине волны возбуждения 440 нм в чистом буфере и в смеси с КТ. При этом, в случае свободного красителя, данный эффект был более интенсивным, чем для связанного с олигонуклеотидами, что доказывает влияние олигонуклеотидов на эффективность FRET.

По полученным результатам была исследована зависимость эффективности FRET для свободного красителя и меченых олигонуклеотидов от молярного соотношения акцептора и донора (рис. 1).

Полученные результаты экспериментов по изучению зависимости эффективности FRET от молярного соотношения олигонуклеотид/КТ показывают высокую эффективность FRET как в случае свободного красителя, так и красителя, связанного с олигонуклеотидом, для высоких молярных соотношений акцептор/донор, а также её значительное снижение при уменьшении этого соотношения. Также было выявлено существенное влияние присутствия олигонуклеотидов на эффективность FRET. Полученные результаты открывают перспективы использования предложенного метода для систематических исследований взаимодействий биополимеров различных структур с наночастицами различного химического состава.

Данное исследование было поддержано Министерством высшего образования и науки Российской Федерации, грант № 14.Y26.31.0011.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. Shemetov, I. Nabiev, and A. Sukhanova, ACS NANO **6**(6), 4585 (2013).
- [2] I. Nabiev et al., Nano Lett. **7**(11), 3452 (2007).
- [3] M. Mahmoudi et al., Chem. Rev. **111**(9), 5610 (2011).
- [4] С. Б. Бричкин, Химия высоких энергий **47**(6), 411 (2013).

Поступила в редакцию 26 сентября 2019 г.

После доработки 7 октября 2019 г.

Принята к публикации 7 октября 2019 г.

*Публикуется по рекомендации VIII Международной молодежной научной школы-конференции “Современные проблемы физики и технологий” (НИЯУ “МИФИ”, Москва, 2019 г.).*