

УДК 577.354

## БИОНАНОКОМПОЗИТЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ БАКТЕРИОРОДОПСИН И УГЛЕРОДНЫЕ НАНОВОЛОКНА. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г. К. Чудинова, И. А. Наговицын, О. В. Дегтярева<sup>1</sup>, М. А. Кононов,  
В. В. Савранский, Э. Г. Раков<sup>2</sup>, Г. Г. Комиссаров<sup>3</sup>

*Впервые исследовано взаимодействие бактериородопсина с углеродными нановолокнами (диаметр 40–100 нм) методом атомно-силовой микроскопии. Показано образование плоских наноструктур шириной 200–250 нм в пленках, полученных испарением водного раствора. Получены лэнгмюровские пленки, содержащие нановолокна и липид. Исследовано взаимодействие нановолокон и тритона X-100.*

В настоящее время взаимодействие биологических объектов с наноматериалами вызывает повышенный интерес [1–5]. Так, на основе наноматериалов создаются новые типы биосенсоров, которые уже используются в коммерческих целях [5]. Важными являются исследования физиологического действия и токсичности наноматериалов, взаимодействие наноматериалов с клетками, однако, количество работ, посвященных этим вопросам, крайне незначительно [1–4].

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская 3.

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, 125047, Москва, А-47, Миусская пл., 9.

<sup>3</sup>Институт Химической Физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119991, ГСП-1, Москва, В-334, ул. Косыгина, д. 4.



Бактериородопсин (БР) был выделен из культуры архебактерий *Halobacterium salinarum*, (ранее *Halobacterium halobium*) штамма ET 1001 [6]. Этот ретинальсодержащий трансмембранный белок действует как светозависимый протонный насос. Функцией бактериородопсина является преобразование солнечной энергии в химическую энергию (в форме протонного градиента); в основе этого процесса лежит фотохимический цикл превращений бактериородопсина; началом фотоцикла бактериородопсина является светозависимая цис-транс изомеризация ретиналя [7–10]. Бактериородопсину посвящено очень большое количество работ, механизм фотоцикла бактериородопсина интенсивно изучается и в настоящее время [11, 12].

Фотовольтаические методики являются эффективным средством для исследования процессов преобразования энергии [13]. Фотовольтаическая ячейка является адекватным устройством для моделирования функций фотосинтетических мембран [13, 14]. Первичные процессы фотопревращений бактериородопсина сходны с таковыми в реакционных центрах фотосинтеза, поэтому естественно, что фотовольтаические методики используются для исследования процессов разделения зарядов в бактериородопсине [15–17] и для исследования механизма фотосинтеза [13]. Высокая квантовая эффективность, большая сила осциллятора, широкая полоса поглощения, термическая стабильность и быстрый фотовольтаический отклик бактериородопсина делают его привлекательным материалом для создания светочувствительных элементов в быстродействующих фотоприемниках [18–20].

Углеродные наноматериалы (фуллерены, нанотрубки) используются для моделирования процессов преобразования световой энергии в фотосинтезе [21], а также для разработки высокоэффективных преобразователей световой энергии [21–23]. Как уже отмечалось, взаимодействие нанотрубок и наноматериалов вообще с биологическими системами в настоящее время – мало исследованная область [3, 24]. Так в процессе обзора литературы мы нашли только одну работу, посвященную взаимодействию БР и углеродных нанотрубок, да и та посвящена математическому моделированию, а не экспериментальному исследованию [25]. Помимо применения углеродных наноструктур, возможно также создание нанокомпозитных материалов на основе БР и полимеров [26], БР и липидов (нанодиски) [27].

Целью настоящей работы было получение бионанокомпозитов на основе углеродных нановолокон и бактериородопсина и их исследование методом атомно-силовой микроскопии. В дальнейшем мы планируем исследование фотовольтаических характеристик лэнгмюровских пленок этого бионанокомпозита, что в дальнейшем, возможно, позволит



разработать подходы к созданию новых фотоприемников, а также даст дополнительную информацию о преобразовании энергии света бактериородопсином.

*Материалы и методы.* Углеродные нановолокна (УНВ) получены в РХТУ им. Д.И. Менделеева по методике, описанной в [28]. Бактериородопсин (БР) выделен в ИБК РАН по стандартной методике [29]. Получение бионаноконкомпозитов из препаратов пурпурных мембран и углеродных нановолокон проводили в водных растворах под действием ультразвука (30 мин, ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-А). Концентрация нановолокон – 0.4 мг/мл. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. Объем исходного раствора пурпурных мембран составлял 4, 20 и 40 мкл на 1 мл общего объема образца для серий 1, 2 и 3 соответственно. Концентрация УНВ в образцах серии 4 составляла « 0.2 мг/мл, а объем исходного раствора пурпурных мембран 20 мкл на 1 мл общего объема образца. Оптическая плотность однокомпонентного водного раствора бактериородопсина, содержащего 20 мкл БР в 1 мл, составляет 0.069 при 560 нм. Для АСМ-исследований растворы (после обработки ультразвуком) при комнатной температуре выдерживали сутки, наносили микропипеткой на кварцевую пластинку, сушили в течение суток.



Рис. 1. Изображение углеродных нановолокон, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Для приготовления ленгмюровских пленок УНВ и композитов УНВ-БР в качестве амфифильной матрицы использовали L- $\alpha$ -фосфатидилхолин дипальмитоил (ФХДП),



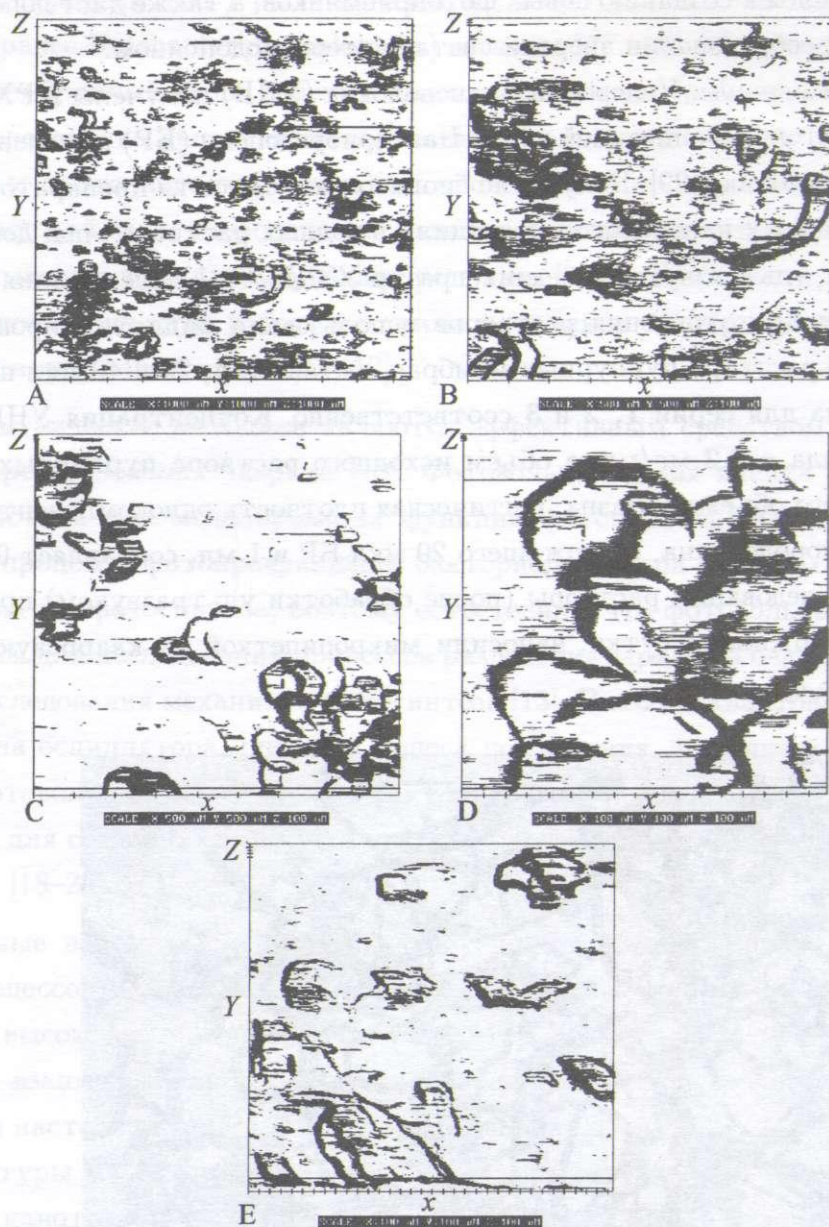


Рис. 2. АСМ-изображение комплексов бактериородопсина и углеродных нановолокон. А, В – образец 3, С, D – образец 2, Е – образец 1. Одно деление по шкале абсцисс составляет 1000 нм (А), 500 нм (В,С), 100 нм (Е).

производства Sigma Chem. Corp. В раствор липида в хлороформе (5 мл,  $10^{-3}$ М) добавляли УНВ (2 мг) и обрабатывали ультразвуком в течении 1.5 часов. Во всех случаях пленки с поверхности водной субфазы переносили на подложки (кварцевые и стеклянные).



ные пластинки, оптически прозрачное стекло, допированное диоксидом олова) методом Ленгмюра–Шефера (метод касания) [30]. Пленки готовили на установке Jouce Loebel (Великобритания). Более подробно методика приготовления пленок приведена в [31]. Обработку ультразвуком УНВ в водном растворе 0.5% Тритона X-100 проводили в течение 30 мин.

Спектры поглощения снимали на спектрофлуориметре Shimadzu UV-250. Исследования структуры пленок проводили на микроскопе P4-SPM-MDT (ЗАО “NT-MDT”, Россия) в режиме силового сканирования с использованием программы P7-SPM. Использовали кремниевые кантилеверы (ЗАО “NT-MDT”, Россия) с радиусом кривизны 10 нм.

*Результаты и их обсуждение.* Углеродные нановолокна (УНВ) по данным просвечивающей электронной микроскопии представляют собой нитевидные образования диаметром от 20 до 100 нм (преимущественно 40–60 нм) и длиной до 0.5 – 1.0 и до 4 мкм (рис. 1). Под действием ультразвука волокна укорачиваются. Они представляют собой структуру из неправильных конусов, вставленных один в другой (“елка”, “рыбья кость”), сами конусы образованы графеновыми листами, то есть содержат атомы углерода в углах сочлененных шестиугольников, на внешней поверхности нановолокон конусы могут быть попарно сшиты друг с другом, образуя малопроницаемую для газов или жидкостей оболочку. Говорить о структурной единице и молекулярной массе, как у полимеров, применительно к нановолокнам, нельзя, т.к. конусы могут отличаться друг от друга по размеру. Молекулярная масса таких структур составляет как минимум несколько десятков миллионов а.е.м. По структуре и свойствам нановолокна резко отличаются и от сажи, и от кристаллов графита, и от нанотрубок.

Достоинством УНВ является их большая удельная поверхность – 80–100 м<sup>2</sup>/г, причем путем химического активирования ее можно увеличить до 200–250 м<sup>2</sup>/г. Мы полагаем, что их можно использовать в качестве адсорбента для биологических макромолекул при создании чувствительных поверхностей для биосенсоров и, в случае взаимодействия с бактериородопсином, как фотоприемников.

По данным электронной микроскопии в интактных клетках и в изолированных препаратах бактериородопсин присутствует не в форме отдельных молекул белка, а в форме пурпурных бляшек, крупных мембранных участков – пурпурных мембран (части цитоплазматических мембран *Halobacterium salinarum*, содержащих бактериородопсин), которые представляют собой дисковидные образования диаметром 0.5 мкм и толщиной 5–6 нм. Бактериородопсин в мембране расположен симметричными группами по три



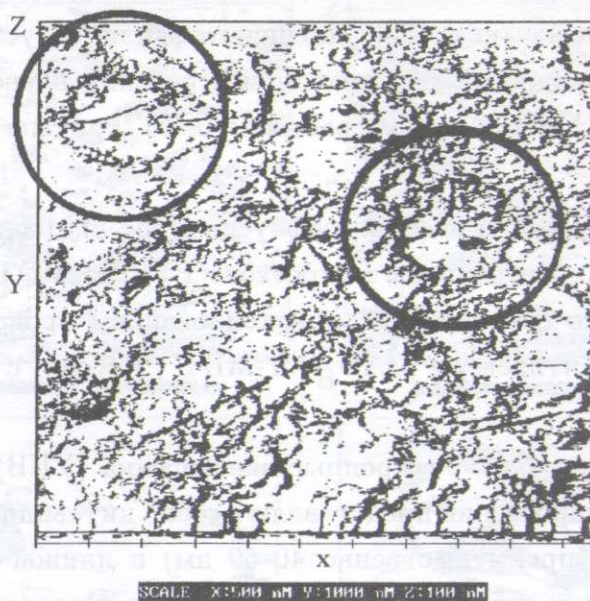


Рис. 3. АСМ-изображение испаренной пленки бактериородопсина. Черным цветом обведены кольцеобразные структуры диаметром около 1 мкм.

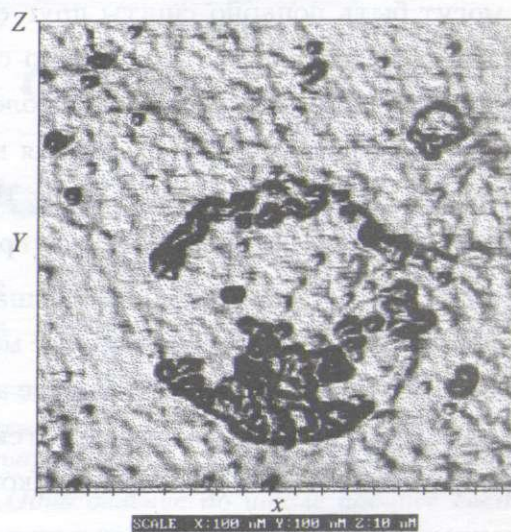
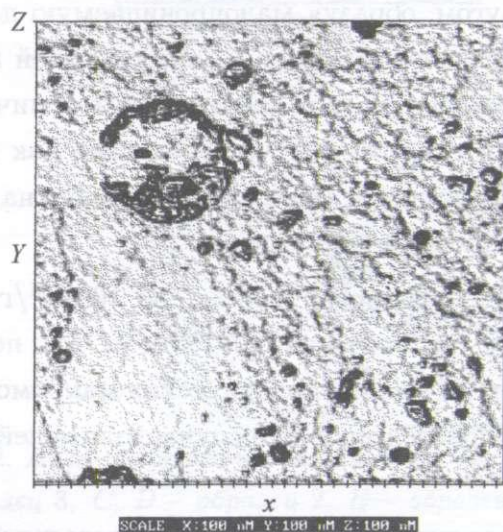


Рис. 4. АСМ-изображения испаренных пленок образцов 4 (количество УНВ 0.2 мг/мл). Одно деление по шкале абсцисс составляет 100 нм.

молекулы, причем каждый такой тример стабилизирован 12–14 молекулами липидов. Размер ячейки составляет 0.6 нм. Тримеры, в свою очередь, образуют двумерную гек-



сагональную “кристаллическую” решетку в плоскости мембраны с периодом 6.3 нм [32].

Изображения полученных нами комплексов УНВ-БР представлены на рис. 2. Видно образование плоских структур шириной 200-250 нм, т.е. их ширина более чем в два раза превосходит диаметр УНВ. По-видимому, уплощенная форма обусловлена тем, что плоская пурпурная мембрана при ультразвуковой обработке и образовании комплекса с УНВ не распадается полностью, а сохраняет свою плоскую форму. Это предположение косвенно подтверждается контрольным опытом: водный раствор, содержащий только БР, диспергировали 30 мин. При этом спектр поглощения не претерпел существенных изменений (оптическая плотность увеличилась на 3% процента), и можно заключить, что структура БР в целом сохраняется неизменной. Измерение ИК фурье спектров БР и комплексов УНВ-БР в геометрии диффузного отражения-поглощения также показало сохранение структуры БР при образовании комплекса с УНВ. Неоднородность формы и размеров полученных структур (рис. 2) можно объяснить неоднородностью исходных нановолокон (рис. 1).

Испаренные пленки, полученные из разбавленного раствора БР (без обработки ультразвуком), также были исследованы методом АСМ. Изображения этих пленок приведены на рис. 3. Образование плоских структур, таких, как в комплексах УНВ-БР, не обнаружено; отметим образование кольцеобразных структур, обведены черным цветом. Аналогичные структуры были найдены нами в образцах серии 4 (рис. 4). Диаметр кольцеобразных структур составляет около 1 мкм. Это дает основания говорить, что наблюдаемые структуры в серии образцов 4 образованы БР, а не комплексом УНВ-БР. Другой тип структур, наблюдаемый нами в серии 4, приведен на рис. 5. Они имеют дисковидную форму, и размер их составляет около 500 нм, т.е. соответствуют размерам пурпурных мембран (см. выше). Толщина этих структур (рис. 5, В,С) составляет не менее 100 нм, тогда как толщина пурпурной мембраны составляет 5–6 нм. Мы можем предложить два варианта для объяснения этого факта: во-первых, как мы полагаем, в разбавленном растворе пурпурные мембраны могут взаимодействовать друг с другом, образуя полислойные ассоциаты, аналогичные по структуре пленкам Ленгмюра–Блоджетт Y-типа (схематическое изображение пленок Y-типа см., например в [33]), во-вторых, нельзя исключать образование комплексов УНВ-БР.

Получение пленок Ленгмюра, содержащих углеродные наноструктуры, представляет значительный интерес для получения электропроводящих материалов, в том числе для преобразователей солнечной энергии [22]. Поскольку нановолокна обладают элек-



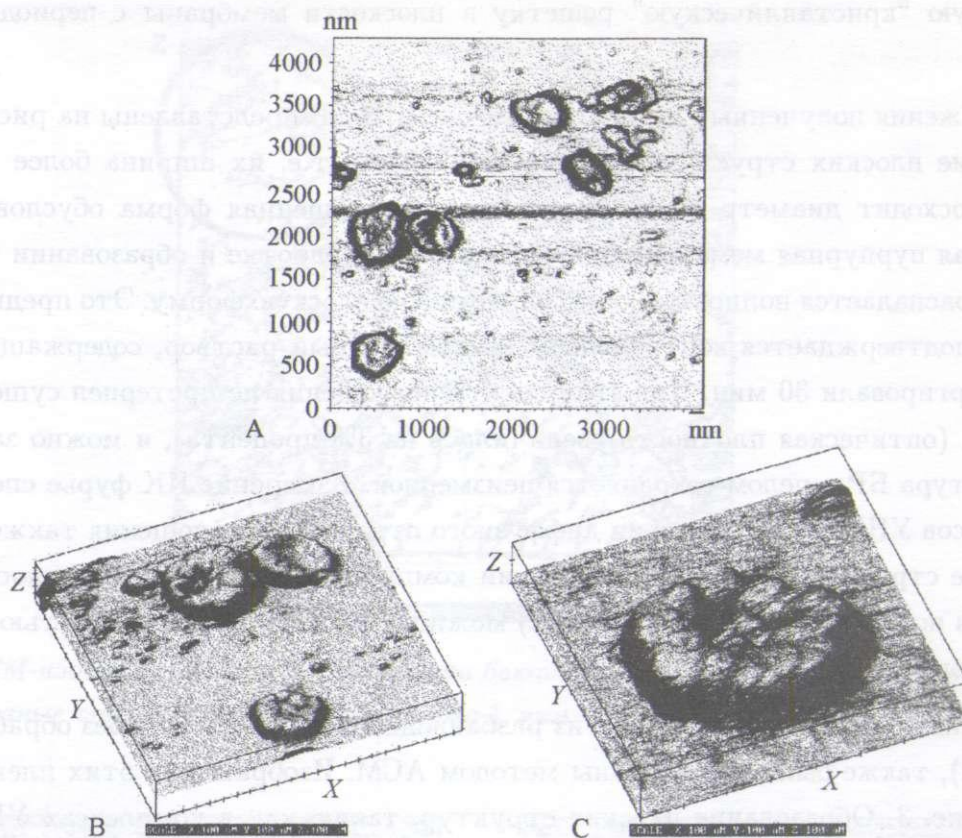


Рис. 5. АСМ-изображения испаренных пленок образцов 4 (количество УНВ 0.2 мг/мл). Одно деление по шкале абсцисс составляет 100 нм, по оси Z (B,C) – 100 нм.

тропроводностью, содержащие их пленки Ленгмюра также могут обладать электропроводностью в том случае, если УНВ будут находиться в контакте друг с другом.

АСМ-изображения пленок Ленгмюра-Шефера смеси УНВ и липида (ФХДП) представлены на рис. 6. Пленка содержит неоднородные по размеру участки нановолокон. В нашем случае концентрация липида ( $10^{-3}$  М), очевидно, слишком велика для того, чтобы получить пленку, где нановолокна находились бы в контакте друг с другом. Взаимодействие с липидом приводит к тому, что наблюдаемый диаметр УНВ (рис. 6, В) возрастает не менее чем вдвое по сравнению с диаметром УНВ (рис. 1). Возможно, что липид образует на поверхности УНВ комплексы, аналогичные тем, которые образуют на поверхности углеродных нанотрубок тритон X-100, додецилсульфат натрия и другие поверхностно-активные вещества [34, 35].

Обработка ультразвуком УНВ в 0.5% растворе Тритона X-100 приводила к образованию наиболее равномерного и наиболее стабильного коллоидного раствора из всех



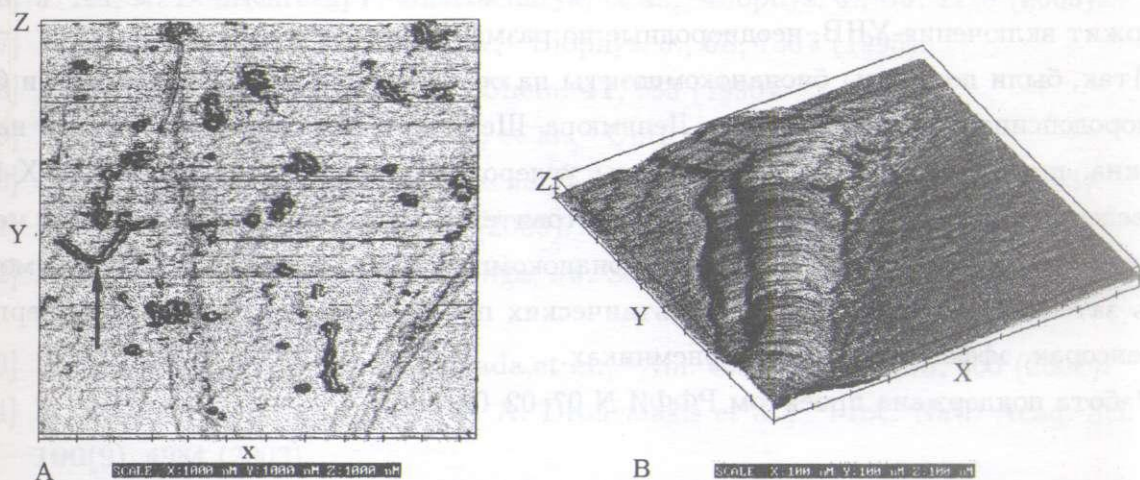


Рис. 6. АСМ-изображение монослойных пленок Ленгмюра-Шефера смеси УНВ и липида (ФХ-ДП) на кварцевой подложке. Поверхностное давление переносимого монослоя 30 мН/м. На рис. А стрелкой отмечено место, в увеличенном виде представленное на рис. В.

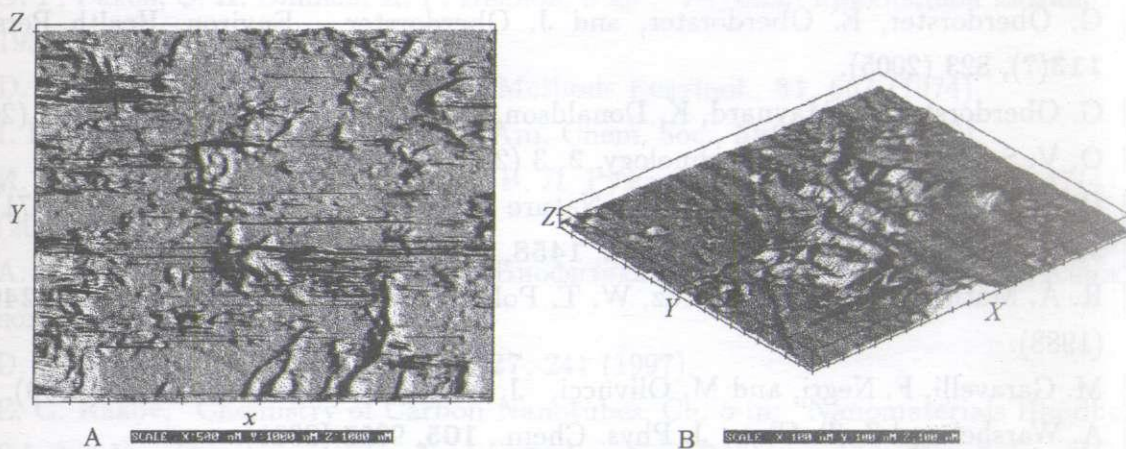


Рис. 7. АСМ-изображения пленок смеси УНВ и Тритона X-100, полученных испарением раствора. Одно деление по шкале абсцисс составляет 500 нм (А), 100 нм (В) по оси Z (В) – 100 нм.

исследованных нами. АСМ-изображения пленок УНВ в Тритоне X-100 приведены на рис. 7. Плохое качество изображения (горизонтальные черные полосы) объясняется, по-видимому, тем, что полученная пленка слишком мягкая и кантилевер атомно-силового микроскопа “разрезает” ее. Поэтому для получения изображения на рис. 7В применялись программные инструменты сглаживания, доступные в программе P7-SPM. Полу-



ченные изображения свидетельствуют о том, что, как и в предыдущих случаях, пленка содержит включения УНВ, неоднородные по размеру и форме.

Итак, были получены бионаноконкомпозиты на основе углеродных нановолокон и бактериородопсина, получены пленки Ленгмюра–Шефера, содержащие углеродные нановолокна, получены коллоидные растворы углеродных нановолокон и тритона X-100. Проведенные исследования являются подготовительным этапом для разработки методов получения упорядоченных пленок бионаноконкомпозитных материалов, которые могут быть затем использованы в фотовольтаических преобразователях солнечной энергии, биосенсорах, эффективных фотоприемниках.

Работа поддержана проектом РФФИ N 07-02-00160-а.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] R. S. Kane and A. D. Stroock, *Biotechnol. Prog.*, **23**(2), 316 (2007).
- [2] P. H. M. Hoet, I. Brüske-Hohlfeld, and O. V. Salata, *J. Nanobiotechnology*, **2**, 12 (2004).
- [3] G. Oberdorster, E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Environ. Health Perspect.*, **113**(7), 823 (2005).
- [4] G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson, et al., *Part. Fibre Toxicol.*, **2**, 8 (2005).
- [5] O. V. Salata, *J. Nanobiotechnology*, **2**, 3 (2004).
- [6] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Nature (London) New Biol.*, **233**, 149 (1971).
- [7] J. Heberle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 135 (2000).
- [8] R. A. Mathles, C. H. BrittoCruz, W. T. Pollard, and C. V. Shank, *Science*, **240**, 777 (1988).
- [9] M. Garavelli, F. Negri, and M. Olivucci, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1023 (1999).
- [10] A. Warshel and Z. T. Chu, *J. Phys. Chem.*, **105**, 9857 (2001).
- [11] G. I. Groma, F. Colonna, J. -C. Lambry, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(21), 7971 (2004).
- [12] *Биохимия*, **66**(11), (2001) (весь номер посвящен бактериородопсину и его аналогам); Р. В. Белоусов, А. К. Кукушкин. *Биофизика*, **51**(4), 704 (2006).
- [13] Г. Г. Комиссаров, *Фотосинтез: физико-химический подход*, (М., Едиториал УРСС, 2003).
- [14] Г. Г. Комиссаров, Ю. С. Шумов, Ю. Е. Борисевич, *ДАН СССР*, **187**(3), 670 (1967).
- [15] G. I. Groma, G. Szabo, and G. Varo, *Nature*, **308**, 557 (1984).



- [16] J. Xu, A. B. Stickrath, P. Bhattacharya, et al., *Biophys. J.*, **85**, 1128 (2003).
- [17] B. Robertson and E. P. Lukashov, *Biophys. J.*, **68**, 1507 (1995).
- [18] R. R. Birge, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**, 683 (1990).
- [19] P. Bhattacharya, J. Xu, G. Varo, et al., *Optics Lett.*, **27**, 839 (2002).
- [20] J. Xu, A. B. Stickrath, P. Bhattacharya, et al., *Biophys. J.*, **85**, 1128 (2003).
- [21] P. Kamat, *Interface*, **15**(1), 45 (2006).
- [22] E. Kymakis and G. A. Amaratunga, *J. Solar Energy Material & Solar Cell*, **80**, 465 (2003).
- [23] H. Imahori, H. Norieda, H. Yamada, et al., *Am. Chem. Soc.*, **123**, 100 (2001).
- [24] R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(9), 4984 (2003).
- [25] S. S. Tatke, V. Renugopalakrishnan, and M. Prabhakaran, *Nanotechnology*, **15**, S684 (2004).
- [26] D. Ho, B. Chu, H. Lee, et al., *Nanotechnology*, **16**, 3120 (2005).
- [27] D. Lu, A. Aksimentiev, A. Y. Shih, et al., *Phys. Biol.*, **3**, S40 (2006).
- [28] Э. Г. Раков, С. Н. Блинов, И. Г. Иванов, и др., *Журнал прикладной химии*, **77**(2), 193 (2004).
- [29] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667 (1974).
- [30] I. Langmuir and V. J. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.*, **58**(1), 284 (1936).
- [31] И. А. Наговицын, Г. К. Чудинова, В. Д. Румянцева, и др., *Биофизика*, **47**(4), 625 (2002).
- [32] А. Б. Рубин, *Биофизика В 2 т. 2: "Биофизика клеточных процессов"* (М., Книжный дом "Университет", 2000).
- [33] D. K. Schwartz, *Surf. Sci. Report*, **27**, 241 (1997).
- [34] E. G. Rakov, *Chemistry of Carbon Nanotubes*. Ch. 5 in: "Nanomaterials Handbook". Ed. by Yu. Gogotsi, (CRC, Taylor & Francis, 2006), p. 103; Ch. 3 in: "Carbon Nanomaterials". Ed. by Yu. Gogotsi (CRC, Taylor & Francis, 2006), p. 77; Ch. 2 in: "Nanotubes and Nanofibers". Ed. by Yu. Gogotsi, (CRC, Taylor & Francis, 2006), p. 37.
- [35] M. F. Islam, et al., *Nano Lett.*, **3**, 269 (2003).

Институт общей физики  
им. А. М. Прохорова РАН

Поступила в редакцию 29 ноября 2007 г.