

PACS numbers: 78.40.Ri, 78.67.Ch, 81.05.ub, 81.07.De, 81.07.Pr, 82.65.+r, 87.14.gk

Адсорбция одностенной и двунитевой ДНК на одностенных углеродных нанотрубках

Г. О. Гладченко, М. В. Карачевцев, А. Ю. Гламазда, В. А. Валеев,
В. С. Леонтьев, В. А. Карачевцев

*Физико-технический институт низких температур НАН Украины,
просп. Ленина, 47,
61103 Харьков, Украина*

Получены устойчивые водные суспензии одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) в окружении одностенной или двунитевой ДНК (он-ДНК, дн-ДНК). Эти суспензии были исследованы методами УФ-спектроскопии поглощения и люминесценции в ближнем ИК-диапазоне. Небольшие сдвиги (до 50 см^{-1}) спектральных полос в спектре люминесценции полупроводниковых ОУНТ при замене окружения с он-ДНК на дн-ДНК указывают на слабое влияние структурной организации полимера на электронную структуру нанотрубок. Уменьшение гиперхромного эффекта при нагреве суспензии он-ДНК:ОУНТ до 90°C в сравнении с несвязанной он-ДНК указывает на π -стэкинг взаимодействия азотистых оснований с поверхностью нанотрубки. Как следует из кривых плавления дн-ДНК:ОУНТ и свободной дн-ДНК, адсорбция двунитового полимера на поверхность нанотрубки приводит к его термической стабилизации (на $2\text{--}5^\circ\text{C}$). Нагрев суспензий до 90°C и последующее охлаждение не приводит к реадсорбции полимеров с поверхности нанотрубок, что указывает на стабильность образованных гибридов. Предложена модель образования наногбрида, в которой фрагмент дн-ДНК, состоящий из двунитового участка и расплетенных одностенных концов, вначале адсорбируется на нанотрубке за счет гибких концевых участков полимера, основания которого связываются с ОУНТ через π -стэкинг, а затем адсорбируется и двунитовый участок.

Одержано стійкі водні суспензії одностінних вуглецевих нанотрубок (ОВНТ) в оточенні одностіткової або двоніткової ДНК (он-ДНК, дн-ДНК). Ці суспензії були досліджені методами УФ-спектроскопії вбирання й люмінесценції в близькому ІЧ-діапазоні. Невеликі зсуви (до 50 см^{-1}) спектральних смуг у спектрі люмінесценції напівпровідникових ОВНТ при заміні оточення з он-ДНК на дн-ДНК указують на слабкий вплив структурної організації полімеру на електронну структуру нанотрубок. Зменшення гіперхромного ефекту при нагріванні суспензії он-ДНК:ОВНТ до 90°C у порівнянні з незв'язаною он-ДНК указує на π -стекінг взаємодії азотистих

основ з поверхнею нанорурки. Як впливає з кривих топлення дн-ДНК:ОВНР і вільної дн-ДНК, адсорбція двониткового полімеру на поверхню нанорурки призводить до його термічної стабілізації (на 2–5°C). Нагрівання суспензій до 90°C і наступне охолодження не призводить до реадсорбції полімерів з поверхні нанорурок, що вказує на стабільність утворених гібридів. Запропоновано модель утворення наногібрида, у якому фрагмент дн-ДНК, що складається з двониткової ділянки й розплетених одноститкових кінців, спочатку адсорбується на нанорурці за рахунок гнучких кінцевих ділянок полімеру, основи якого зв'язуються з ОВНР через π -стекинг, а потім адсорбується й двониткова ділянка.

Stable water suspensions of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) surrounded with single- or double-stranded DNA (ss- or ds-DNA) are obtained. The suspensions are investigated by absorption UV spectroscopy and luminescence in the near IR range. Small (up to 50 cm⁻¹) shifts of spectral bands in the luminescence spectrum of semiconducting SWNTs after the substitution of ss-DNA with ds-DNA are evidences of a weak influence of the polymer structural organization on the electronic structure of nanotubes. The decrease of the hyperchromic effect under the ss-DNA:SWNT suspension heating up to 90°C (in comparison with the unbound ss-DNA) points to π -stacking interactions of nitrogen bases with the nanotube surface. As seen from melting curves of ds-DNA:SWNT and free ds-DNA, adsorption of the double-stranded polymer to the nanotube surface results in DNA thermal stabilization (by 2–5°C). The suspension heating up to 90°C and the following cooling do not induce readsorption of polymers from the nanotube surface, evidencing the stability of the hybrids formed. A model is proposed for the formation of a nanohybrid, in which the ds-DNA fragment consisting of the double-stranded part and untwisted single-stranded ends is adsorbed first to the nanotube via flexible end sections of the polymer, the bases of which bound to SWNT through π -stacking, and then the double-stranded part is adsorbed too.

Ключевые слова: углеродные одностенные нанотрубки, ДНК, бионаногрибрид, люминесценция, УФ-спектроскопия.

(Получено 22 ноября 2007 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) представляют собой новый класс материалов, обладающих уникальными свойствами и большим потенциальными возможностями нанотехнологий [1]. В последние годы появился значительный интерес к использованию этого наноматериала в биологии и медицине [2, 3]. Уникальные физические свойства нанотрубок в сочетании с распознающими способностями биомолекул могут привести к созданию миниатюрных биологических устройств [4]. Выявление специфических одноститковых последовательностей в составе генома через гибридизацию с комплементарной ДНК-пробой, расположенной на нанотрубке,

может быть одним из применений этого наноматериала в медицине при диагностике патогенных и генетических заболеваний [5].

Первый шаг на пути создания основанных на ДНК бионанотехнологий является присоединение молекулы нуклеиновой кислоты к поверхности нанотрубки. Нековалентная функционализация ОУНТ позволяет решить проблему биосовместимости нанотрубок при сохранении их электронных свойств. Недавно было показано, что короткие фрагменты (не более 50 оснований) однонитевой (он-)ДНК [6] являются одним из наиболее эффективных полимеров для нековалентной функционализации нанотрубок. Стабильные гомогенные водные дисперсии отдельных ОУНТ удалось получить с помощью ультразвуковой обработки водных смесей углеродных нанотрубок и он-ДНК. Как было показано с помощью теоретического моделирования [6] он-ДНК взаимодействует с гидрофобной поверхностью ОУНТ через π -стэкинг с гидрофобными азотистыми основаниями, а гидрофильный сахаро-фосфатный остов при этом направлен к воде, что делает образованный гибрид в целом гидрофильным. Такая избирательная особенность отдельных фрагментов ДНК взаимодействовать с ОУНТ, а также спиралевидная структура самого полимера приводит к его навиванию на нанотрубку. Гибриды ОУНТ с двунитевой (дн-) ДНК практически ранее не изучались. Наши предварительные исследования показали, что гибриды дн-ДНК:ОУНТ могут образовываться в воде [7] и являются довольно стабильными.

Настоящая работа посвящена детальному спектральному исследованию водных суспензий он-ДНК, дн-ДНК с ОУНТ и сравнению их свойств со свободным полимером методами УФ-спектроскопии поглощения и люминесценции в ближнем ИК-диапазоне. Полученные результаты позволили предложить возможную модель взаимодействия дн-ДНК с ОУНТ.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Углеродные нанотрубки, полученные химическим методом (метод CVD), очищались путем обработки соляной кислотой и последующим термическим окислением на воздухе. Наши оценки чистоты нанотрубочного материала давали в результате 98–99% степень чистоты ВОНТ.

В качестве полимера бралась нативная ДНК, извлеченная из эритроцитов цыпленка (Reanal, Hungary) с молекулярным весом 10^7 Da. Полимер растворялся в какодилатном буфере (0,01 M Na⁺, pH7) (Serva, Germany) с $2 \cdot 10^{-4}$ M Na₂EDTA (Sigma, USA).

Однонитевой полимер получался путем нагрева нативного полимера до 90°C и его быстрого охлаждения.

Водные суспензии нанотрубок получали при воздействии ультразвука (УЗДН-1, Украина, частота 44 кГц, мощность 1 Вт) на взвесь

ОУНТ с полимером в течение 40 минут. Весовое соотношение полимер:ОУНТ выбиралось как 1:1. Загрузочный вес нанотрубок для приготовления одного образца составлял около 100 мкг. Нерасщепленные жгуты нанотрубок удалялись посредством ультрацентрифугирования (120 000 g, Superspeed-65, MSE, GB) в течение 1 часа. С помощью электрофореза была определена средняя длина двуникового полимера, которая составила 200–300 пар оснований. Кроме того, было установлено, что фрагмент дн-ДНК имеет как двуниковый участок, так и однонитевые части, которые образовались в результате ультразвукового воздействия и, скорее всего, находящиеся на концах фрагмента [7].

Температурные зависимости оптического поглощения ДНК (кривые плавления) измерялись с помощью автоматизированного УФ-спектрометра (M-40, Carl Zeiss, Jena, Германия) по дифференциальной двулучевой схеме с двумя кюветами. Температура растворов менялась в диапазоне 10–100°C и стабилизировалась с точностью до 0,1°C.

Люминесценция полупроводниковых ОУНТ выделялась посредством двойного монохроматора ДФС-12 (ЛОМО, Россия) (9000–12000 см⁻¹) и детектировалась с помощью охлаждаемого ФЕУ-83 при возбуждении диодным лазером с длиной волны генерации 532 нм.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Люминесценция нанотрубок. Как известно [8], 2/3 ОУНТ обладают полупроводниковыми свойствами и, как было недавно установлено [9], они могут люминесцировать в ближнем ИК-диапазоне. Нами была изучена высокоэнергетическая часть спектра излучения водных суспензий он-ДНК:ОУНТ и дн-ДНК:ОУНТ в диапазоне 9000–12000 см⁻¹ при возбуждении диодным лазером с $\lambda = 532$ нм (рис. 1). В спектре наблюдается 6 полос, каждая из которых соответствует свечению полупроводниковых нанотрубок определенного диаметра. Свечение нанотрубок соответствует электронным переходам E^{11} между нижайшими пиками плотности состояний (сингулярности Ван-Хоффа) в валентной зоне и зоне проводимости (ширина запрещенной зоны). Возбуждение лазером выполнялось в полосу перехода E^{22} , который осуществляется между вторыми пиками сингулярностей Ван-Хоффа. Возбуждение затем безызлучательно релаксировало в более низкое по энергии состояние, с которого и высвечивало. Как видно из рисунка, оба спектра нанотрубок в окружении разных полимеров имеют сходство. Каждый из спектров был аппроксимирован суммой лоренцианов, которые показаны на рисунке штриховыми линиями. Ширина отдельных полос не превышала 340 см⁻¹. Для водной суспензии дн-ДНК:ОУНТ отмечается небольшой спектральный сдвиг в красную область до 50 см⁻¹, по сравнению с соответствующими поло-

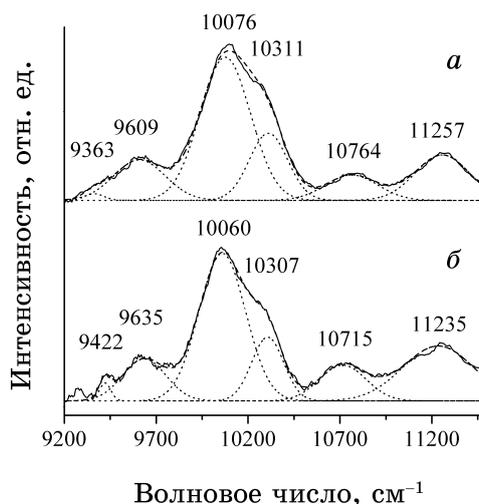


Рис. 1. Высокоэнергетическая часть спектра излучения водных суспензий он-ДНК:ОУНТ (а) и дн-ДНК:ОУНТ (б), полученных при возбуждении диодным лазером с $\lambda = 532$ нм. Штрихованными линиями показаны лоренцианы, с помощью суммы которых были аппроксимированы оба спектра.

сами суспензии с он-ДНК:ОУНТ.

Сдвиги полос в спектрах люминесценции водных суспензий нанотрубок при варьировании внешнего окружения, в основном, связывают с изменением степени покрытия поверхности нанотрубок полимером или поверхностно-активным веществом [10]. При уменьшении покрытия поверхности нанотрубок полимером возрастает их поверхностный контакт с водой и величина перехода E^{11} уменьшается, а полосы люминесценции, соответственно, сдвигаются в более низкоэнергетическую область. Кроме сдвига полос в красную область, падает общая интенсивность свечения [7], что связывается с уменьшением количества нанотрубок в суспензии, хотя загрузочные весовые соотношения полимера и нанотрубок были примерно одинаковыми для исследуемых двух полимеров. Это указывает на то, что эффективность удержания нанотрубок в воде фрагментированной двойной ДНК ниже в сравнении с однонитевым полимером. Изменение люминесцентных свойств полупроводниковых нанотрубок при замене он-ДНК на дн-ДНК указывает на то, что взаимодействие этих полимеров с нанотрубкой различное, а, следовательно, может быть и различной модель гибрида.

УФ-спектроскопия поглощения ДНК, адсорбированной на ОУНТ. При исследовании гибридов, образованных углеродными нанотрубками с различными синтезированными короткими олигонуклеотидами, внимание исследователей в основном было сосредоточено на изучении свойств нанотрубок. Какие-либо выводы о гибриде дела-

лись на основании полученной информации о нанотрубках. В отличие от такого направления исследований, мы предприняли изучение свойств непосредственно биополимера, адсорбированного на поверхности нанотрубки. С этой целью были выполнены исследования спектров поглощения водных суспензий гибридов он-ДНК:ОУНТ и дн-ДНК:ОУНТ в УФ-спектральном диапазоне, которые сравнивались со спектрами свободных полимеров. В диапазоне 200–400 нм, кроме полос поглощения биополимеров, наблюдается и поглощение нанотрубок. Применение дифференциальной методики спектров поглощения позволило нам исключить из рассмотрения спектр поглощения нанотрубок. Мы также в наших исследованиях применили методику нагрева ДНК до 90°C, контролируя при этом изменение поглощения света в полосе поглощения самого полимера. Поглощение на 260–280 нм обусловлено поглощением света азотистыми основаниями. На рисунке 2, а показано возрастание поглощения света с ростом температуры для свободного однонитчатого полимера (кривая 1) и для он-ДНК, адсорбированного на нанотрубку (кривая 2). Рост поглощения света объясняется структурным разупорядочением он-ДНК при нагреве, при котором разрушается частичное стэкинг-упорядочение азотистых оснований, наблюдаемое при комнатной температуре [11]. Отметим, что прирост поглощения с ростом температуры меньше для суспензии он-ДНК:ОУНТ. Этот экспериментальный факт может быть объяснен образованием гибрида во время ультразвукового воздействия, при котором происходит формирование л-стэкинга азотистых оснований с поверхностью нанотрубки. На этом же рисунке показан обратный ход кривой поглощения света, регистрируемый при охлаждении растворов. Процесс охлаждения в наших условиях был медленным и занимал более 4 часов. Как следует из этих зависимостей, в течение охлаждения полимер в обоих случаях восстанавливал полностью свои оптические характеристики. Отметим также, что в результате термического циклирования он-ДНК не покидает нанотрубку, что указывает на довольно сильное взаимодействие между ними.

Нами было также исследовано подобное температурное воздействие на другую пару образцов: дн-ДНК и дн-ДНК:ОУНТ (рис. 2, б). В отличие от однонитчатых полимеров прирост поглощения света с повышением температуры двунитевой ДНК имеет характерную S-форму в диапазоне 70–80°C, связанную с гиперхромным эффектом. Этот эффект обусловлен разъединением двух нитей полимера за счет кооперативного разрыва водородных связей между основаниями противоположных нитей при нагреве. Такая зависимость поглощения света полимером от температуры получила название кривой плавления ДНК, а температура, соответствующая половине прироста поглощения (T_m), называется температурой плавления ДНК. Адсорбция полимера на нанотрубку приводит к возрастанию его термической стабильности. При ионной силе 10^{-1} MNa⁺ величина термостабилизации полимера ($\delta T = T - T_m$) составила 2°C. С уменьшением

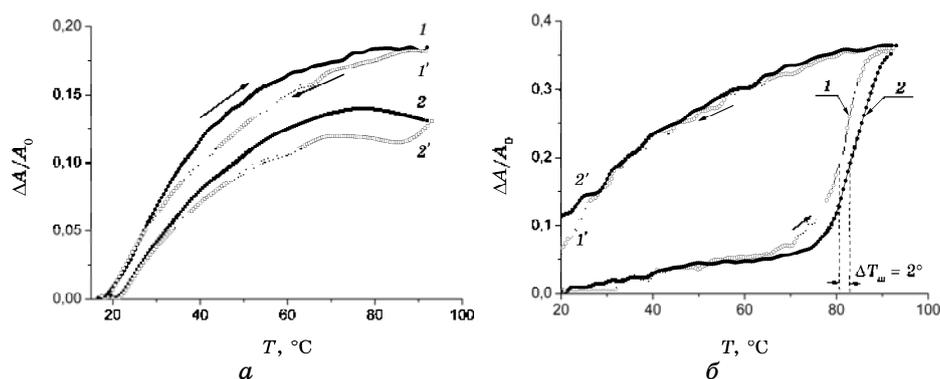


Рис. 2. Зависимости поглощения света (длина волны 260 нм) водных растворов: *a* — он-ДНК (1) и он-ДНК:ОУНТ (2) и *б* — дн-ДНК (1) и дн-ДНК:ОУНТ (2) от температуры. Стрелками показано направление температурного хода. Кривые 1 и 2 соответствуют нагреванию, а 1' и 2' — охлаждению растворов.

ионной силы величины ΔT возрастает: при 10^{-2} MNa^+ эта величина равна 6°C . Плавная зависимость кривой поглощения света при охлаждении раствора и возврат к начальным значениям поглощения указывает на восстановление двойного полимера как свободного, так и адсорбированного на нанотрубку. Как и для однонитевого полимера, фрагментированная двуниевая ДНК не покидает нанотрубку при термическом воздействии, что свидетельствует и в этом случае о сильной связи между полимером и нанотрубкой. Отметим также, что для кривой плавления свободной дн-ДНК характерен выход на насыщение при температуре выше 80°C , в тоже время это не наблюдается для ДНК, адсорбированной на нанотрубку, что является дополнительным аргументом в пользу термостабилизации полимера.

Модель адсорбции полимера на поверхности нанотрубки. С помощью AMBER силового поля мы выполнили компьютерное моделирование наногбридов, образованных нанотрубкой и навитыми вокруг нее однонитевой и двуниевой ДНК. Углеродная нанотрубка имела индексы хиральности (16,0) (зигзаг), длину 14,2 нм и 1,3 нм в диаметре. В качестве однонитевого полимера была сконструирована 35-нуклеотидная последовательность АТГЦ. При оптимизации структуры учитывалась вода (700 молекул) и ионы Na^+ для нейтрализации заряда полимера. Анализ оптимизированной структуры показал, что при расположении витка полимера под углом примерно в 45° к оси нанотрубки (величина угла была определена с помощью спектроскопии кругового дихроизма [12]) менее половины азотистых оснований находятся в стэкинге с поверхностью нанотрубки (рис. 3, верх). Остальные основания расположены под некоторыми углами к поверхности нанотрубки. Скорее всего, это связано с тем, что чередующиеся

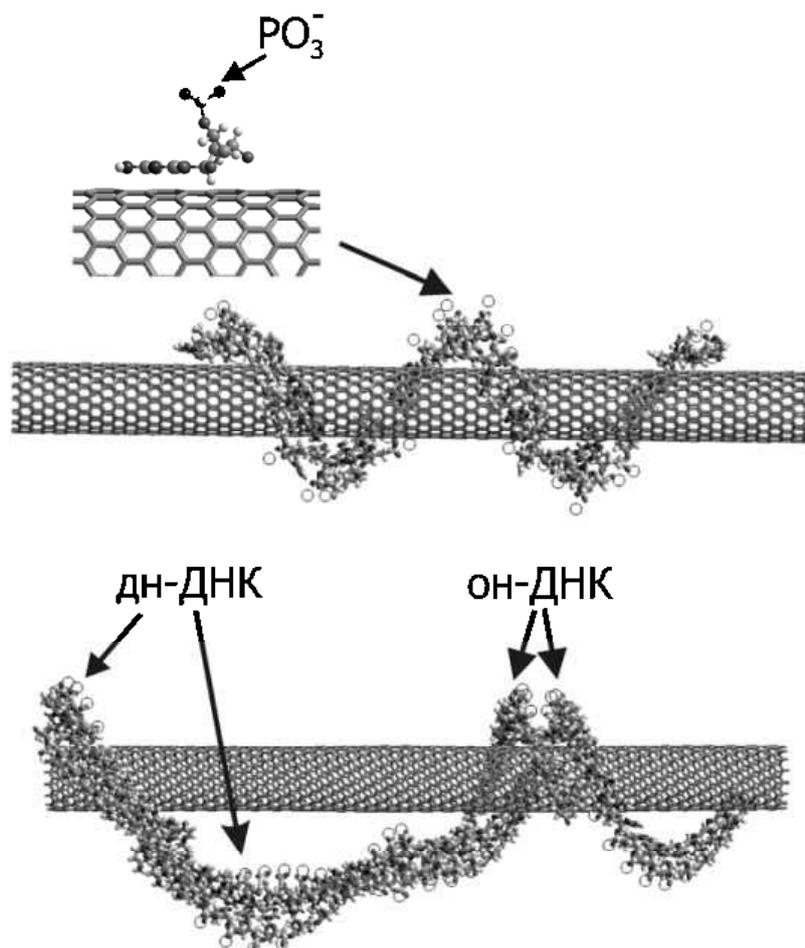


Рис. 3. Модель наногридов, образованных нанотрубкой (16,0) с навитыми вокруг нее: одноститевой (верх) ДНК (35-нуклеотидная последовательность АТГЦ...) и двунитевой ДНК. На вставке в верхней части рисунка показано расположение нуклеотида относительно поверхности нанотрубки, стрелка с PO_3^- показывает расположение фосфатной группы.

пуриновые и пиримидиновые основания из-за стерических условий не могут все расположиться плоскостями параллельно к поверхности нанотрубки в стэкинге, при условии, что они соединены с фосфатным остовом через довольно короткий циклический молекулярный фрагмент (молекула сахара).

Для двунитевого полимера азотистые основания вообще не образуют стэкинг-структуры с поверхностью нанотрубки. Это следовало предполагать, поскольку сшивка двух одноститевых полимеров в двойную спираль приводит к образованию водородных связей меж-

ду основаниями этих нитей, и как результат, расположение этих гидрофобных оснований внутри полимера с образованием стопочной упаковки между ними. Из общих соображений следует, что такая структура не способствует образованию π -стэкинга азотистых оснований с поверхностью нанотрубки, как это происходит с однонитевым полимером. По всей видимости, реализуется другая ситуация.

В качестве модели для дн-ДНК–ОУНТ гибрида можно предположить, что молекула фрагментированной ДНК своими денатурированными однонитевыми участками (рис. 3, снизу) вначале образует связи с поверхностью нанотрубки благодаря нековалентным взаимодействиям (гидрофобные силы, π -стэкинг и др.). Однонитевые участки обладают большой гибкостью при вращении вокруг связей сахара-фосфатного остова, что позволяет им находить низкоэнергетические состояния с максимальным взаимодействием с поверхностью ОУНТ. Эти участки служат своего рода «якорем», удерживающим двунитевые ДНК вблизи нанотрубки. Затем силы электростатического изображения (фосфатный остов отрицательно заряжен) приводят к дальнейшей стабилизации комплекса, располагая ДНК на минимальном расстоянии от поверхности нанотрубки.

Исследования были выполнены при частичной финансовой поддержке в рамках программы НАН Украины «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології» (грант 106/07-Н).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. A. Guiseppi-Elie, Ch. Lei, and R. H. Baughman, *Nanotechnology*, **13**: 559 (2002).
2. *Nanomaterials for Biosensors* (Ed. C. Kumar) (Wiley-VCH Verlag GmbH&Co/KGaA: 2007).
3. G. Gruner, *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**: 322 (2006).
4. K. Besteman, J. O. Lee, F. G. Wiertz, H. A. Heering, and C. Dekker, *Nano Lett.*, **3**: 727 (2003).
5. R. J. Chen and Y. Zhang, *J. Phys. Chem. B*, **110**: 54 (2006).
6. M. Zheng, A. Jagota, E. Semke, B. Diner, R. Mclean, S. Lustig, R. E. Richardson, and N. G. Tassi, *Nature Materials*, **2**: 338 (2003).
7. G. O. Gladchenko, M. V. Karachevtsev, V. S. Leontiev, V. A. Valeev, A. Yu. Glamazda, A. M. Plokhotnichenko, and S. G. Stepanian, *Molec. Physics*, **104**, No. 20–21: 3193 (2006).
8. M. S. Dresselhaus and P. C. Eklund, *Adv. Phys.*, **49**: 705 (2000).
9. M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, and R. E. Smalley, *Science*, **297**: 593 (2002).
10. M. S. Strano, M. Zheng, A. Jagota, G. B. Onoa, D. A. Heller, P. W. Barone, and M. L. Usrey, *Nano Letters*, **4**: 543 (2004).
11. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure* (New York: Springer-Verlag: 1984), p. 458.
12. J. Rajendra and A. Rodger, *Chem. Eur. J.*, **11**: 4841 (2005).