

УДК 539.213;535.21

А.А. Велигура¹, А.С. Егоров², В.П. Егорова¹, Г.В. Крылова³,
И.В. Липневич³, Б.Г. Шулицкий⁴

¹Белорусский государственный педагогический университет,
ул. Советская, 18, 220005, Минск
e-mail: alla.veligura@mail.ru

²Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28, 220072, Минск

³Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск

⁴Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
ул. П.Бровки, 6, 220013, Минск

ТУШЕНИЕ ФЛУОРОФОРА В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СЛОЯХ, САМООРГАНИЗОВАННЫХ НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

Способность комплекса многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидами функционировать как «нанотушитель» флуорофора FAM продемонстрирована электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез). Найден дискретный набор оптимальных толщин олигонуклеотидного покрытия, приходящегося на одну углеродную трубку, для эффективного тушения FAM-флуоресценции в комплексах МУНТ/олигонуклеотид.

Ключевые слова: олигодезоксирибонуклеотид, углеродная нанотрубка, самоорганизация, флуоресценция.

Введение

Одним из наиболее актуальных направлений олигонуклеотид-основанного анализа является разработка методов определения доли ДНК в спиральном двухцепочечном и в негибридизированном одноцепочечном состояниях [1, 2]. Однако до настоящего времени не разработаны доступные оптические методы регистрации изменения характеристик слоистых олигонуклеотид-содержащих наногетероструктур при адгезии биологически значимых веществ на ее биологический подслои. Это связано с отсутствием наногетероструктур, которые обладают не только устойчивостью к внешним воздействиям, но и способностью эффективно связывать биологические компоненты.

Кроме того, интеркалирование флуорофоров в структуру ДНК влияет на степень гидратации ДНК [3]. Интенсивность свечения ассоциатов флуоресцентно-меченой одонитевой ДНК зависит от наличия в них воды, так как молекулы связанной воды гасят флуоресценцию

ДНК. Исследование влияния УНТ на гидратационное тушение свечения нуклеотидов также не проводилось.

В данной работе полученные комплексы МУНТ с олигодезоксирибонуклеотидами детально охарактеризованы с использованием флуоресцентных зондов и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Целью работы является синтез термодинамически устойчивых комплексов из смеси многослойных углеродных нанотрубок и олигодезоксирибонуклеотида в условиях самосборки.

Экспериментальная часть

FAM-меченный олигонуклеотид FAM-ON1 (структура последовательности: 5'-FAM-GCCATATACTCTCCSTTGGTGACA-3') и олигонуклеотид ON1 синтезированы на ООО «Праймтех» (Минск). Исходную концентрацию олигонуклеотида определяли по оптической плотности водного раствора, измеренной при 260 нм, на спектрофотометре SOLAR RV-2201 (Беларусь). В данной работе использова-

лись карбоксилированные МУНТ, полученные методом химического парофазного осаждения с последующей ковалентной функционализацией их поверхности карбоксильными группами [4]. Эксперименты проводились в деионизованной, бидистиллированной воде. Все остальные используемые вещества были класса химически чистых аналитических реактивов.

Комплексификация осуществлена двумя методами: ультразвуковой обработкой смеси из МУНТ и FAM-олигонуклеотида, суспензированных в ТЕ буфере в различной концентрации и формированием МУНТ/олигонуклеотидных комплексов методом Ленгмюра – Блоджетт (ЛБ) с использованием дополнительной нековалентной функционализации МУНТ молекулами стеариновой кислоты [5]. Эффективность комплексикации оценивали по интенсивности флуоресценции несвязанного с МУНТ олигонуклеотида FAM-ON1 методом ПААГ-электрофореза олигонуклеотидов. В качестве маркера молекулярной массы использовали «ДНК маркер молекулярного веса, М1Кб» («Праймтех», Беларусь). Гель окрашивали в растворе Zuber Green I («Праймтех», Беларусь) в течение 2 мин.

Визуализация геля-электрофореза проводилась посредством облучения ультрафиолетовым светом на длине волны 302 нм с детектированием излучения красителей на длине волны 500 нм на системе ImageQuant 300 (GE Healthcare, США).

Электроннограммы получены на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEM-100CX TEM (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

Результаты и обсуждение

Структурный анализ. Был проведен структурный анализ МУНТ и комплексов МУНТ/олигонуклеотид. Распределение МУНТ в ТЕ буфере после ультразвуковой обработкой показана на рис. 1а. Как видно из рис. 1а, за время ультразвуковой обработки в течение 10 мин МУНТ равномерно распределяются по объему. Морфология

монослоев МУНТ, нековалентно функционализированных стеариновой кислотой, показана на рис. 1б. Согласно ПЭМ-изображениям на рис. 1б диаметр используемых углеродных нанотрубок варьируется от 3,0 нм до 20 нм, длина – от 0,5 до 2,5 микрон.

Нековалентно функционализированные стеариновой кислотой, карбоксилированные углеродные нанотрубки в ЛБ-моно слоях формируют высокоупорядоченные ЛБ-УНТ-кластеры (рис. 1б). На рис. 1в видно, что ЛБ-комплексы олигонуклеотид/МУНТ представляют собой МУНТ со слоем молекул олигонуклеотида; толщина нуклеотидного слоя – порядка от 2 до 10 нм. МУНТ однородно распределены и полностью покрыты плотными самоорганизованными олигонуклеотидными слоями.

Оптический анализ. ПААГ-электрофорезом выявлен эффект УНТ-зависимого тушения флуоресценции FAM-олигонуклеотида в смеси МУНТ и FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах на полиакриламидном геле. Для однонитчатого олигонуклеотида вероятность образования спаренных нуклеотидных оснований с интеркалированными молекулами Zuber Green I пренебрежимо мала. Поэтому флуоресценция однонитчатого олигонуклеотида в геле обусловлена высвечиванием FAM, экстрадированным наружу.

Оценим присутствие несвязанного (свободного) FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах смеси МУНТ и FAM-олигонуклеотида, предварительно озвученной ультразвуком в течение 1 мин.

Как видно из рис. 2, интенсивность флуоресценции FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах такой смеси снижается с возрастанием концентрации карбоксилированных МУНТ $c_{\text{МУНТ}}$ с 0,01 до 0,15 мг/мл.

Такое понижение содержания свободного FAM-ON1 в полиакриламидном геле происходит из-за π - π стэкингового взаимодействия между цепью нуклеотидных оснований олигонуклеотида и поверхностью углеродной нанотрубки [1, 2], в результате чего FAM-ON1, связанные с МУНТ, локализуются при других значениях массы.

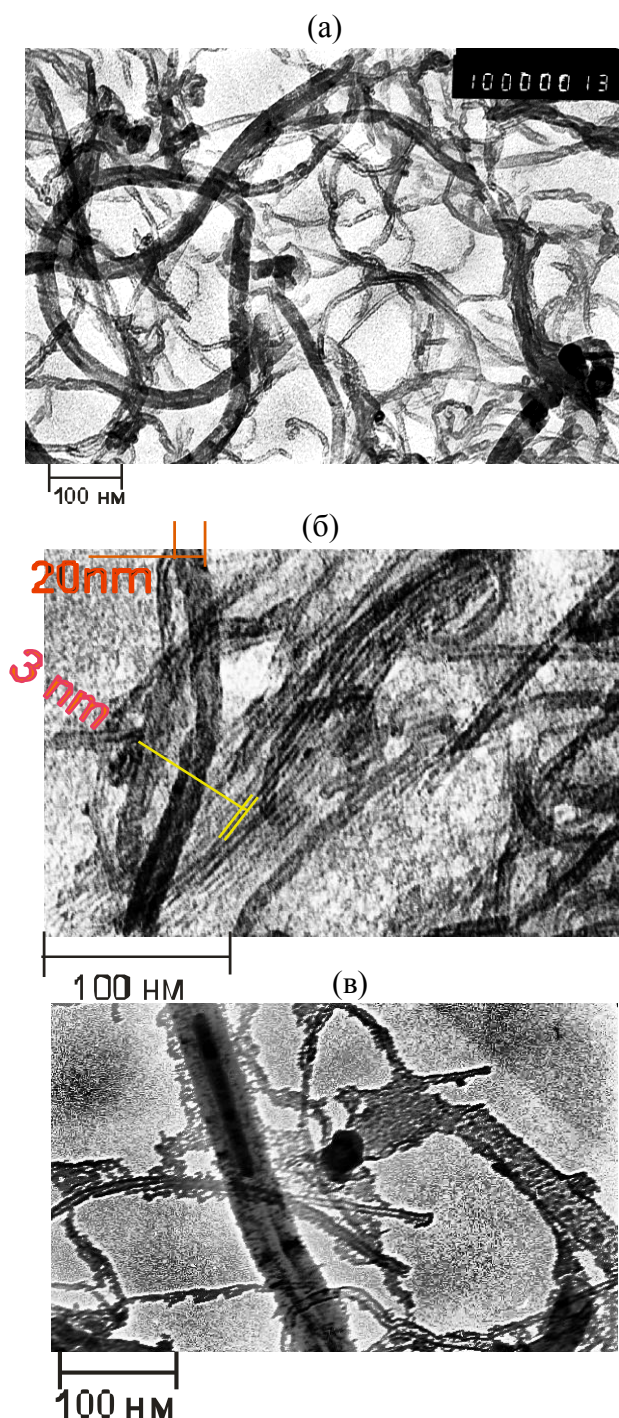


Рис. 1. (а) - ПЭМ-изображение МУНТ на форм-варовом покрытии; (б) - ПЭМ-изображение 2-х монослойных церий-содержащих ЛБ-пленок смеси МУНТ – стеариновая кислота, расположенных на 3-х железосодержащих полимерных ЛБ-монослоях; (в) - ПЭМ-изображение 2-х монослоев смеси МУНТ – олигонуклеотид – стеариновая кислота, расположенных на 5-и монослойной железосодержащей полимерной ЛБ-пленке.

Так как с возрастанием расстояния от олигонуклеотида до поверхности МУНТ $\pi - \pi$ взаимодействие ослабевает, то имеет место эффект насыщения, при котором дальнейшее присоединение молекул FAM-

ON1 к МУНТ становится энергетически невыгодно. Поэтому присоединение молекул FAM-ON1 к МУНТ происходит самоорганизованно при определенных соотношениях их концентраций.

Нами также установлен эффект тушения FAM-флуоресценции в гидратированных олигонуклеотидных ассоциатах. Концентрация свободного FAM-ON1 в электрофоретических пробах с МУНТ уменьшается за счет комплексообразования. С уменьшением концентрации свободного FAM-ON1 вероятность образования олигонуклеотидных ассоциатов со связанными молекулами воды внутри падает, а вероятность выталкивания FAM-флуорофора из нуклеотидного окружения возрастает. Соответственно, число экструдированных наружу, непотушенных флуоресцентных FAM-меток возрастает.

Число нуклеотидных ассоциатов, в которых молекулы связанной воды гасят FAM-флуоресценцию, становится больше в отсутствие МУНТ. Поэтому можно подобрать такую концентрацию МУНТ, при которой свечение FAM больше, чем в отсутствие МУНТ.

Таким образом, возрастание интенсивности флуоресценции FAM-олигонуклеотида при достаточно низких концентрациях МУНТ в геле можно считать обусловленной высвечиванием FAM-флуорофора. Так как концентрация свободного FAM-ON1 в электрофоретических пробах уменьшается, то величина гидратного тушения флуоресценции этого несвязанного с МУНТ олигонуклеотида падает.

Поэтому незначительное добавление углеродных нанотрубок, например, при МУНТ-концентрациях 0,01 мг/мл, приводит к тому, что свечение несвязанного FAM-ON1 выше, чем флуоресценция электрофоретической пробы чистого FAM-олигонуклеотида, как видно из сравнения дорожек 2 и 3 электрофореграммы на рис. 2а. Такое усиление флуоресценции свободного FAM-ON1 за счет уменьшения вклада безизлучательного переноса возбуждения на молекулы связанной воды

соответствует концентрациям МУНТ не более 0,04 мг/мл согласно электрофоретической картине на рис. 2а.

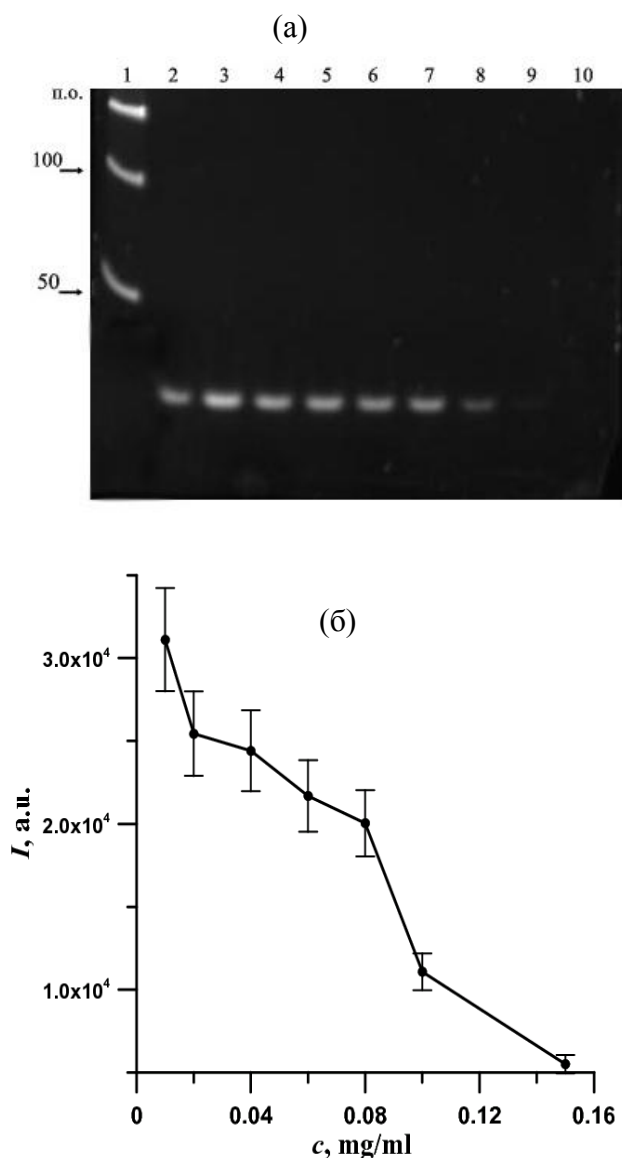


Рис. 2. (а) - Электрофореграмма комплексов МУНТ/FAM-ON1. Дорожки 1 – ДНК-маркер, 2 – FAM-ON1, 3 – 7: комплекс МУНТ/ FAM-ON1 с концентрацией МУНТ $c_{\text{МУНТ}} = 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,15$ мг/мл, соответственно; 10 – МУНТ ($c_{\text{МУНТ}} = 0,1$ мг/мл). (б) - Зависимость интенсивности флуоресценции FAM-меченного олигонуклеотида от концентрации МУНТ.

По результатам ПААГ-электрофореза высвечение МУНТ (рис. 2а, дорожка 10) и

комплексов МУНТ/FAM-ON1 (рис. 2а, дорожки 3 – 9) отсутствует.

Так как согласно структурным исследованиям термодинамически выгодно образование кристаллического олигонуклеотида толщиной l_{st} , и гель-электрофорезом установлен концентрационный тип тушения флуоресценции в ассоциатах чистого ON1 с кристаллической водой, то вышеописанное МУНТ-зависимое тушение флуоресценции FAM в комплексах МУНТ/FAM-ON1, обусловлено плотной упаковкой олигонуклеотида на поверхности МУНТ за счет стэкингового притяжения углеродной нанотрубкой молекул олигонуклеотида.

Заключение

Итак, показана возможность синтеза термодинамически устойчивых комплексов из смеси многослойных, карбоксилированных углеродных нанотрубок и олигонуклеотида в условиях самосборки.

Получены комплексы флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов с карбоксилированными МУНТ и ЛБ-комплексы олигонуклеотидов с МУНТ, нековалентно функционализированными стеариновой кислотой.

Установлены эффект УНТ-зависимого тушения флуоресценции FAM-олигонуклеотида в комплексе МУНТ/FAM-олигонуклеотид и эффект тушения FAM-флуоресценции в гидратированных олигонуклеотидных ассоциатах с помощью ПААГ-электрофореза. Связывание МУНТ с молекулами флуоресцентно-меченного олигонуклеотида позволяет им функционировать в качестве «нанотушителя» флуорофора FAM.

Полученные результаты показали, что олигонуклеотид – МУНТ – наногетероструктуры формируются в результате самоорганизации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Li H., Tian J., Wang L. et al. // J. Mater. Chem., 2011. - 21, 824.
- Egorov A.S., Egorova V.P., Krot V.I. et al., in: Materials of XVI Int. Conference – School “Foundations & Advances in Nonlinear Science” (Minsk, 2012), С. 57-58.
- Хорунжая О.В., Кашпур В.А.,

Песина Д.А. и др. // Біофізичний вісник, 2010. - 24(1). - 5.

4. Labunov V., Shulitski B., Prudnikava A. et al. Semiconductor Physics, Quantum

Electronics & Optoelectronics 2, 2010. - 137.

5. Egorov A.S., Krylova H.V., Lipnevich I.V. et al. // J. Nonlin. Phen. in Complex Sys., 2012. - 15, 121.

Стаття надійшла до редакції 20.04.2013

A.A. Veligura¹, A.S. Egorov², V.P. Egorova¹,
H.V. Krylova³, I.V. Lipnevich³, B.G. Shulitsky⁴

¹Belarusian State Pedagogical University, Sovetskaya Str., 18, 200005, Minsk

e-mail: alla.veligura@mail.ru

²Institute of Physiology, Nat. Acad. Sci. of Belarus, Academicheskaya Str., 28, 220072, Minsk

³Belarusian State University, Nezavisimosti Ave., 4, 200030, Minsk

⁴Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, P. Brovki Str., 6, 200013, Minsk

FLUOROPHORE QUENCHING IN OLIGONUCLEOTIDE LAYERS SELF-ORGANIZED ON CARBON NANOTUBES

The ability of the complex of multiwalled carbon nanotubes (MCNT) with fluorescently labeled oligonucleotides to act as a “nano-quencher” of FAM-fluorophore was confirmed using electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG-electrophoresis). We have found a discrete set of optimal widths of oligonucleotide coverage per one nanotube required for effective FAM-fluorescence quenching in the MCNT-oligonucleotide complexes.

Keywords: oligodeoxyribonucleotide, nanotube, self-organization, fluorescence.

A.A. Велігура¹, А.С. Егоров², В.П. Егорова¹, Г.В. Крилова³,
І.В. Ліпневич³, Б.Г. Шуліцкій⁴

¹Білоруський державний педагогічний університет, вул. Радянська, 18, 220005, Мінськ

e-mail: alla.veligura@mail.ru

²Інститут фізіології НАН Білорусі, вул. Академічна, 28, 220072, Мінськ

³Білоруський державний університет, пр. Незалежності, 4, 220030, Мінськ

⁴Білоруський державний університет інформатики і радіоелектроніки, вул. П. Бровкі, 6, 220013, Мінськ

ГАСІННЯ ФЛУОРОФОРУ В ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ШАРАХ, САМООРГАНІЗОВАНИХ НА ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБКАХ

Здатність комплексу багат шарових вуглецевих нанотрубок (БВНТ) з флуоресцентно-міченими олігонуклеотидами функціонувати як «наногасник» флуорофора FAM продемонстрована електрофорезом в поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез). Знайдений дискретний набір оптимальних товщин олігонуклеотидних покриття, що припадає на одну вуглецеву трубку, для ефективного гасіння FAM-флуоресценції в комплексах БВНТ/ олігонуклеотид.

Ключові слова: олігодезоксірибонуклеотиди, вуглецева нанотрубка, самоорганізація, флуоресценція.