

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ДНК С УНТ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОНАНОСЕНСОРОВ НА ИХ ОСНОВЕ

В.И. Крот<sup>1</sup>, А.С. Егоров<sup>2</sup>, В.П. Егорова<sup>3</sup>, Г.В. Крылова<sup>1</sup>,  
Н.В. Плешко<sup>1</sup>, Л.В. Табулина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Белорусский государственный педагогический университет  
имени Максима Танка, Минск, Беларусь*

<sup>4</sup>*Белорусский государственный университет информатики и  
радиоэлектроники, Минск, Беларусь*

Углеродные нанотрубки (УНТ) – наиболее перспективные структуры для разработки на их основе диагностических ДНК-содержащих наносенсоров, предназначенных для экспрессного определения генетических нарушений, генотоксического эффекта физико-химических факторов, изменяющих структуру и свойства ДНК, и узнавания ДНК и белков. Однако, отсутствие достаточно полной физико-химической характеристики ДНК-УНТ-комплексов, надежной оценки их чистоты (имеются в виду примеси белков в ДНК, примеси аморфного углерода, наночастиц графита, частиц с металлами-катализаторами, частиц мелкодисперсного носителя из оксида металлов в УНТ) приводит к плохой воспроизводимости экспериментальных результатов.

Целью данной работы является изучение процесса комплексообразования ДНК с УНТ как важнейшего этапа на пути создания ДНК-содержащих наносенсоров и его обсуждение на основе результатов электронно-микроскопического (включая атомно-силовую микроскопию), дифракционного, спектрального, электрофоретического и термодинамического анализа ДНК, УНТ и комплекса ДНК-УНТ в целом. Особое внимание уделяется исследованию конформационного состояния ДНК в комплексе и влиянию на него физико-химических характеристик исходных препаратов ДНК и УНТ, ультразвукового способа дезагрегации и метода функционализации УНТ, наличия примесей разнообразной природы.

В работе использованы карбоксилированные УНТ, синтезированные каталитическим пиролизом углеводородов (CVD-метод) с использованием катализатора на основе оксида железа с добавкой оксида молибдена, нанесенного на мелкодисперсный носитель из оксида магния, или ката-

лизатора на основе оксида железа, нанесенного на мелкодисперсный носитель из оксида алюминия. В качестве углеводородного реагента использовался метан.

Препараты ДНК получены из клеток тимуса теленка с помощью мягкого метода многократной очистки внутриклеточного ядерного материала от белков, РНК и других примесей органической и неорганической природы. Полученные образцы ДНК имели следующие характеристики: электрофоретически определенная молекулярная масса  $\sim 10^7$  Да; длины волн, соответствующие минимуму и максимуму в спектре поглощения раствора ДНК в 0,01 М NaCl (рН=7,0) равнялись 224 нм и 259 нм соответственно; величина гиперхромного эффекта составляла  $35\div 37\%$ ; содержание белка и РНК в препарате  $< 0,5\%$  и  $< 0,1\%$  соответственно.

Для приготовления суспензии углеродных нанотрубок порошок УНТ высыпался в дистиллированную воду и подвергался для диспергирования ультразвуковой обработке (УЗДН-1, 22 кГц) в течение 15 минут. Полученную таким образом водную суспензию УНТ для очистки от имеющихся в ней агрегатов центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 15 минут и для работы использовали надосадочную часть раствора.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) (JEM-100 С X со сканирующей приставкой ASID4D) водных растворов комплексов показала, что препараты ДНК имеют характерные для этих объектов размеры: диаметр  $\sim 2$  нм и варьирующую длину  $\sim 10^4$  нм –  $10^6$  нм (увеличение диаметра некоторых участков ДНК связано со взаимным перепутыванием этих молекул, с их агрегацией). Препараты УНТ и комплексов ДНК-УНТ также характеризуются большим разнообразием морфометрических характеристик: диаметр УНТ находится в интервале от 2 нм до 20-30 нм, длина их достигает нескольких микрон. В отдельных участках комплексных ДНК-УНТ структур отмечается закручивание ДНК на УНТ, что подтверждается также при атомно-силовом рассмотрении этих объектов на микроскопе Solver P47 (Россия). Более того, результаты атомно-силового изучения позволили высказать предположение об изменении структурного состояния ДНК (о частичной дестабилизации ее вторичной структуры в комплексе). С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ LEO1455VP, фирма «Карл Цейс») рассмотрены морфометрические характеристики слоев УНТ с разной степенью их функционализации карбоксильными группами (УНТ были подвергнуты отжигу при разных температурах: от 120 до 140 °С) а также проанализирован элементный состав этих образцов УНТ. Принципиальных различий в размерах трубок и способах укладки в тонкие слои УНТ при этом отмечено не было. Элементный состав характеризуется некоторым отличием содер-

жания углерода и кислорода и приблизительно одинаковым количеством алюминия, серы и железа в исследованных образцах.

Проведенный с помощью рентгеновского дифрактометра (Rigaku Ultima IV с медной трубкой,  $\lambda=0,154179$  нм. Japan) анализ наличия функционально активных групп на поверхности УНТ показал существенное отличие в числе функциональных групп на поверхности исследованных образцов: в трубках, отожженных в течение одного часа при температуре  $140^{\circ}\text{C}$ , их меньше, чем в трубках, выдержанных при  $T=120^{\circ}\text{C}$  и  $130^{\circ}\text{C}$ .

Наличие различных функциональных групп (амино-, карбоксильных, гидроксильных, эфирных, сульфатов и др.) на поверхности немодифицированных и подвергнутых различным обработкам УНТ анализировалось также с помощью ИК спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр Vertex 70), позволившей охарактеризовать состав поверхностных групп в УНТ, необходимый для понимания процессов взаимодействия ДНК с функционализированными УНТ.

Спектроскопия комбинационного рассеяния света УНТ, ДНК и комплексов ДНК-УНТ (2 D – сканирующий рамановский конфокальный микроскоп Nanofinder HE, Lotis ТП (Беларусь) – Tokyo Instruments (Japan)) позволила определить параметры УНТ (разброс числа стенок в нанотрубках), относительное количество дефектов в карбоксилированных трубках, контролировать исходное состояние ДНК и ее конформационные изменения при комплексообразовании с УНТ (дестабилизация, сопровождающаяся смещением на  $9\text{ см}^{-1}$  полосы колебаний фосфоэфирной связи  $1090\text{ см}^{-1}$ , на  $5\text{ см}^{-1}$  полосы колебаний атомных групп аденина  $1421\text{ см}^{-1}$  и на  $14\text{ см}^{-1}$  колебательной полосы гуанина  $679\text{ см}^{-1}$ ).

Изменение конформационного состояния ДНК обнаруживалось и при плавлении ДНК в комплексе с УНТ (UV –VIS spectrophotometer PB 2201 со специальной термостатирующей приставкой, Solar (Беларусь)), а также при нагревании растворов ДНК с УНТ в микрокалориметре ДАСМ – 4 (Россия).

Таким образом, проведенное рассмотрение процесса комплексообразования ДНК с УНТ с помощью ряда физических методов исследования не только позволяет установить целый ряд структурно-функциональных параметров компонентов комплекса, которые необходимо контролировать при формировании требований к ним при создании ДНК-содержащих бионаносенсоров на основе углеродных нанотрубок, но и выявить исключительные особенности процесса комплексообразования: кинетические и термодинамические особенности взаимодействия ДНК с УНТ, приводящего к изменению структурного состояния ДНК в комплексе.