

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 539.21:535.34:577.32

РЕАКТИВНІСТЬ ОДНОСТІННИХ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК ПРИ ВЗАЄМОДІЇ З БІОЛОГІЧНИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ — ДНК І БІЛКАМИ

Г. І. Довбешко¹, О. Д. Образцова², О. М. Фесенко¹, К. І. Яковкін¹

¹ Інститут фізики НАН України, пр. Науки, 46, м. Київ, 03028, Україна,
e-mail: gd@iop.kiev.ua.

² Центр природно-наукових досліджень Інституту загальної фізики РАН,
вул. Вавілова 38, Москва, 119991, Росія.

Анотація

РЕАКТИВНІСТЬ ОДНОСТІННИХ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК ПРИ ВЗАЄМОДІЇ З БІОЛОГІЧНИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ — ДНК І БІЛКАМИ

Г. І. Довбешко, О. Д. Образцова, О. М. Фесенко, К. І. Яковкін

В роботі представлено короткий огляд даних літератури щодо експериментальних і розрахункових відомостей по нековалентній взаємодії ДНК і білків з нефункціоналізованими вуглецевими нанотрубками. Наведено результати, що отримано методом комбінаційного розсіяння і електронної мікроскопії відносно характеристики вуглецевих нанотрубок, а також данні SEIRA (Surface Enhanced Infrared Absorption-підсилення інфрачервоного поглинання металевою поверхнею) спектроскопії по визначенню конформаційного стану ДНК і білка на прикладі бичачого сироваткового альбуміну (БСА) при взаємодії з одностінними вуглецевими нанотрубками. Ці експерименти дозволили зробити висновки про характер нековалентних взаємодій в системі трубка-біомолекула. Аналіз даних показав, що при взаємодії ДНК з нанотрубками відбувається їх зв'язування на поверхні нанотрубки з утворенням достатньо стабільних комплексів за участю Ван-дер-Ваальсових сил, в яких π -стекингу відводиться головна роль і які перебудовують водневі зв'язки в структурі біологічної молекули. Це означає, що змінюється сила зв'язку та відбувається розрив одних зв'язків з утворенням інших. Вважається, що внаслідок гідрофобної взаємодії і π -стекинга адсорбція альбуміну на поверхні нанотрубки відбувається на звичайні місця (сайти) зв'язування. А саме, це — тирозин (Tyr) та фенілаланін (Phe), аргінін (Arg) та подібні йому по структурі амінокислоти.

Ключові слова: ДНК, БСА (бичачий сироватковий альбумін), одностінні вуглецеві нанотрубки, SEIRA (Surface Enhanced Infrared Absorption — підсилення інфрачервоного поглинання металевою поверхнею).

Abstract

REACTIVITY SINGLE WALLED CARBON NANOTUBES UNDER INTERACTION WITH BIOLOGICAL MOLECULES – DNA AND PROTEINS

Г. І. Довбешко, О. Д. Образцова, О. М. Фесенко, К. І. Яковкін

Literature review of experimental and calculated data on non-covalent interaction of DNA and proteins with nonfunctional carbon nanotubes was done in the paper. The results on characterization of single walled carbon nanotubes with Raman spectroscopy and conformation analysis of main biological polymers — DNA and protein of bovine serum albumin (BSA) under interaction with single walled carbon nanotubes with SEIRA (surface enhanced infrared absorption) was presented.

The experiments give a possibility to conclude about non-covalent interaction in the complex nanotube-biomolecule. Analysis of the experimental data have proved that under DNA interaction with nanotubes, the bounding of DNA occurs at the nanotube surface, forming stable complex with Van-der-Waalse interaction .

In this case, π -stacking has a main role with intra H-bond reconstruction within the biomolecules. We suppose, that albumin adsorbtion on nanotube surface takes place with participation of conventional cite interaction for BSA, due to hydrophobic interaction and π -stacking. Experimental data on structural reconstruction of albumin is an evidence of this fact.

Key words: DNA, BSA (bovine serum albumin), single-walled carbon nanotubes, SEIRA (Surface Enhanced Infrared Absorption).

Резюме

РЕАКТИВНОСТЬ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ПРИ ВЗАЕМОДЕЙСТВИИ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ — ДНК И БЕЛКАМИ

Г. І. Довбешко, О. Д. Образцова, О. М. Фесенко, К. І. Яковкін

В работе представлен краткий обзор данных литературы относительно экспериментальных и расчетных данных по нековалентному взаимодействию ДНК и белков с нефункционализованными углеродными нанотрубками. Приведены результаты, полученные методом комбинационного рассеяния и электронной микроскопии по характеристике углеродных нанотрубок, а также данные метода SEIRA (Surface Enhanced Infrared Absorption) спектроскопии по изменению конформационного состояния ДНК и белка на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) при взаимодействии с одностенными углеродными нанотрубками. Последнее позволило сделать выводы о характере нековалентных взаимодействий в системе трубка–биомолекула. Анализ данных показал, что при взаимодействии ДНК с нанотрубками происходит их связывание на поверхности нанотрубки с образованием достаточно стабильных комплексов при участии Ван-дер-Ваальсовых сил, в которых π -стэкингу отводится основная роль и которые перестраивают водородные связи внутри биологической молекулы.

Это означает, что меняется сила связи и происходит разрыв одних связей с образованием других. Адсорбция альбумина на поверхность нанотрубки предположительно происходит на обычные места (сайты) связывания этого белка за счет гидрофобного взаимодействия и π -стэкинга, о чем свидетельствуют структурные перестройки в БСА. А именно, это — тирозин та фенилаланин, аргинин и подобные ему по структуре аминокислоты

Ключевые слова: ДНК, бычий сывороточный альбумин (БСА), одностенные углеродные нанотрубки, SEIRA (Surface Enhanced Infrared Absorption — усиление инфракрасного поглощения металлической поверхностью) спектроскопия.

Вступ

Відкриття вуглецевих нанотрубок (ВНТ) дало початок розвитку багаточислених біомедичних розробок: нових типів адсорбентів [1], систем доставки генів [2], ліків [3] в медицині, новітніх матеріалів для імплантатів [4], сенсорів для детектування реакцій гібридизації ДНК [5], мініатюрних електронних і оптичних пристроїв з розпізнавання ДНК [6], білків [7,8] і інших біологічних структур [9,10]. Важливі властивості ВНТ, такі як біосумісність, використання *in vivo*, висока чутливість до навколишнього середовища розширюють перспективи їх використання в біології і медицині. У зв'язку з цим фундаментальні аспекти взаємодії білків і ДНК з ВНТ мають особливе значення.

Але, отримані експериментальні данні і проведене моделювання поки що не дають повного розуміння того, як саме відбувається взаємодія ДНК з нанотрубкою. Це ж відноситься і до білків. Поки що не існує теорії взаємодії навіть простих молекул з ВНТ, не зрозуміло в яких випадках можливо входження молекул в середину нанотрубки, що є характерним при взаємодії біополімерів з нанотрубкою, яку роль відіграють π -стекинг і, дефекти нанотрубки, наскільки специфічна взаємодія ДНК і білків з нанотрубкою. Сьогодні, існує декілька моделей взаємодії ДНК з ВНТ [11-13]. Найбільш відома схема, що запропонована Смоллі з співавторами, де ДНК або інший полімер обгортається навколо нанотрубки [11]. В роботі [12] проведено моделювання з використанням *poly-T* і нанотрубки методом молекулярної динаміки і показано, що *poly-T* дійсно обгортає нанотрубку (Рис.1). Цікавим, але малозрозумілим є інший механізм, приведений в [13], де два ланцюжки ДНК об'єднуються шляхом перебудови міжмолекулярних водневих зв'язків і згортаються в шар, який в свою чергу, обгортається навколо нанотрубки, формуючи при цьому зовсім нову структуру ДНК.

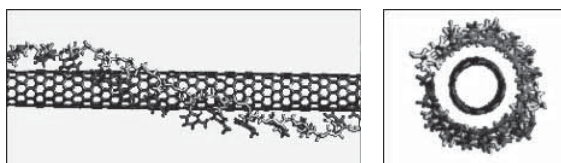


Рис. 1. Моделювання методом молекулярної динаміки показало, що *poly-T* дійсно обгортає нанотрубку [12]. Рис. наведено з дозволу "Natural publishing" і Prof.M. Zheng

Недавно [14] показано, що ДНК, як односпіральна так і двухспіральна, може обгортатись навколо нанотрубки (Рис.2) і навіть інкапсулюватись в ній (Рис.3) при певному тиску. Ці ж автори провели моделювання процесу входження ДНК в середину нанотрубки методом молекулярної динаміки [15]. Останнє, відкриває нові перспективи застосування ДНК-ВНТ не тільки в біології і медицині, але й в матеріалознавстві, а саме, як молекулярної матриці для інкапсулювання нанокластерів або квантових проволокон із металевих або напівпровідникових наночастинок або квантових точок в середині нанотрубки або інших нанопористих матеріалів.

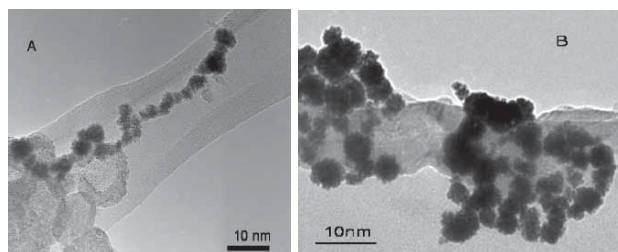


Рис. 2. Зображення отримані методом просвічуючої мікроскопії високої роздільності: А) молекули ДНК, які маркеровані Pt та приєднанні до зовнішньої стінки ВНТ, В) 2-х маркерованих Pt молекул ДНК обгорнутих навколо нанотрубки взяті із[14]

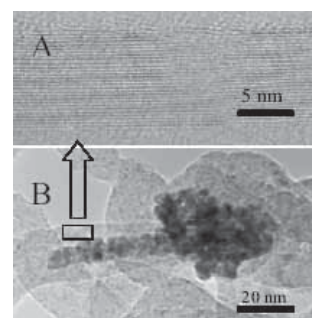


Рис. 3. Зображення ВНТ з частково інкапсульованими фрагментами нуклеїнової кислоти, які маркеровані платиновими наночастинами: локальне зображення стінок багатoshарової нанотрубки, яке отримане з допомогою електронної мікроскопії високої роздільної здатності (А), зображення маркерованих Pt фрагментів ДНК витягнутих в лінійний ланцюжок в середині нанотрубок; частина ДНК молекули в середині нанотрубки згортаються в глобулярну конформацію [14]. Рис.2 і 3 використанні з дозволу Tech Science Press і проф.Н.Gao і D.Cui із Штутгарта

Але якщо для ДНК існують моделі взаємодії з ВНТ, то з білками справа полягає інакше. В більшості робіт [7-9], припускається неспе-

цифічний характер адсорбції білка на поверхні нанотрубки, не вдаючись в деталі цієї взаємодії. Напевне, подібна ситуація виправдана великою різноманітністю білкових структур і їх властивостей та подібними фізичними механізмами при адсорбції [16]. Тому метою даної роботи було вивчити характер взаємодії ДНК і білка на прикладі альбуміну з одностінними нанотрубками і, базуючись на можливостях сучасної коливальної спектроскопії, охарактеризувати конформації біополімерів при їх взаємодії з нанотрубкою, а також можливі ковалентні і нековалентні зв'язки.

В роботі наведено данні по характеристичі одностінних вуглецевих нанотрубок методом комбінаційного розсіяння світла і електронної мікроскопії, а також викладено результати аналізу методом SEIRA (surface enhanced infrared absorption-підсилення інфрачервоного поглинання металевою поверхнею) спектроскопії [17], по визначенню характеру взаємодії і конформаційного стану нуклеїнових кислот і білків, адсорбованих на вуглецевих наноструктурах. Використання методу SEIRA дозволяє збільшити чутливість аналізу в 3-5 раз в спектрах поглинання біологічних макромолекул, адсорбованих на нанотрубках, а потім розміщених на шорсткій золотій поверхні (Рис.4) [17].

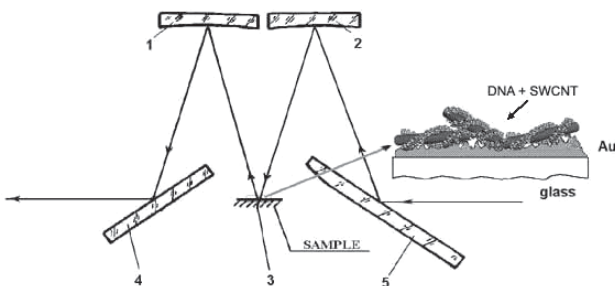


Рис. 4. Схема методу SEIRA з використанням геометрії на відбивання, яка використовується для визначення конформаційного складу ДНК або альбуміна

1. Характеристика ВНТ, що досліджувались

В роботі використано НірСО одностінні нанотрубки, які виготовлені International Carbon Nanotechnologies Incorporated. методом розкладу СО при високому тиску [18], а також одностінні нанотрубки, які синтезовані в московському інституті загальної фізики методом дугового розряду між двома графітовими

електродами в атмосфері Не [19], останні будемо умовно називати “дуговими”. Довжина нанотрубок склала 1-2 мкм, діаметр нанотрубок, отриманих методом дугового розряду, дорівнював 1.3-1.5 нм, для НірСО нанотрубок він був менший і складав 0.8-1 нм. Спектри комбінаційного розсіяння були отримані доктором Манфредом Вестермайером в Німеччині, Фрайбург на спектрометрі Брукер RFS 100/S з довжиною хвилі збудження $\lambda=1064$ нм. Спектри записувались від зразків нанотрубок, вкладених в скляні капіляри подібно до того як це робиться в ЯМР спектроскопії. Нам не вдалось застосувати традиційну методику пресування таблеток і розміщення її в отворі алюмінієвої пластини із-за того, що зразки зроблені таким чином вибухали після опромінення лазером в процесі експерименту. Спектри, що представлені на Рис.6 були зареєстровані в умовах, коли до зразку підводилась потужність 45 мВ. Зображення нанотрубок було отримано на оптичному мікроскопі Мікмед-2 (ЛОМО, Росія) (Рис.5а) і електронному просвічуючому мікроскопі ПЕМ-100 (Україна, Суми) (Рис.5б).

Для характеристики нанотрубок, як це має місце при дослідженні інших вуглецевих матеріалів, було використано такі коливальні моди [20]:

– **G-мода** (1593 cm^{-1} для дугових нанотрубок і 1590 cm^{-1} для НірСО нанотрубок)- характеризує тангенціальні коливання вуглецевих атомів графенового шару, симетрія коливань $-E_{2g}$, E_{1g} , A_{1g} і відповідає Г точці зони Брюлюена; ці коливання пов'язують з упорядкуванням кристалічної ґратки графенового шару [20, 21].

– **D-мода** (1275 cm^{-1} — для дугових нанотрубок і 1279 cm^{-1} для НірСО нанотрубок) відповідає дихальним коливанням кілець графенового шару, симетрія — A_{1g} в К точці зони Брюлюена; це коливання пов'язують з упорядкуванням кристалічної ґратки графенового шару [21].

– **Низькочастотна мода** (162 cm^{-1}) описує коливання трубки в цілому [20], симетрія коливання A_{1g} , характеризує діаметр нанотрубки.

В G моді дають внесок декілька коливань симетрії, що перекриваються, останні з яких ще й і вироджені, тому форма смуги може бути складною (Рис.7). Але напівширина G смуги є характеристикою одностінних нанотрубок і знаходиться в межах $10-30$ cm^{-1} , для D-моди напівширина більша і складає $30-50$ cm^{-1} .

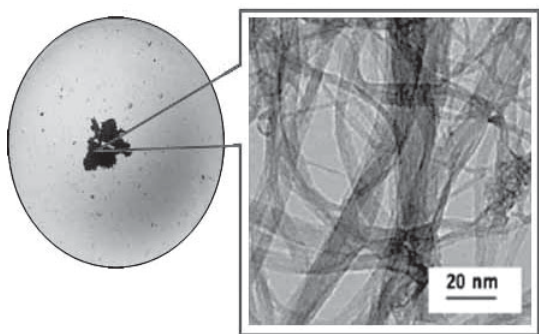


Рис. 5а. Зображення NiPcO нанотрубок, на вставці — пучок нанотрубок в оптичному мікроскопі при збільшенні 16.

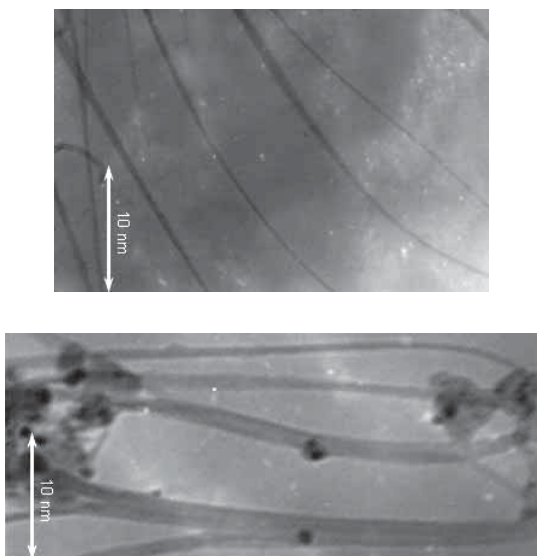


Рис. 5б. Зображення “московських” нанотрубок

D-мода характеризується значною дисперсією і тому її положення може значно змінюватись в різних експериментах (~50-70 см⁻¹). Співвідношення цих мод завжди менше одиниці і знаходиться поблизу 0.1-0.5 для одностінних нанотрубок.

В даному випадку нас більше цікавить “дихальна мода” через те, що ця мода є унікальною для одностінних нанотрубок (Рис.8) і практично не проявляється в інших графітовміщуючих матеріалах [22]. Крім того, положення максимуму дуже чутливе до діаметра нанотрубки, а густина станів залежить від частоти збуджуючого світла. Існує лінійна залежність між оберненим діаметром і положенням “дихальної моди”, що виражається простою

$$v \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{223.75}{D_1 \text{ (nm)}}; \text{ [23], яка отри-}$$

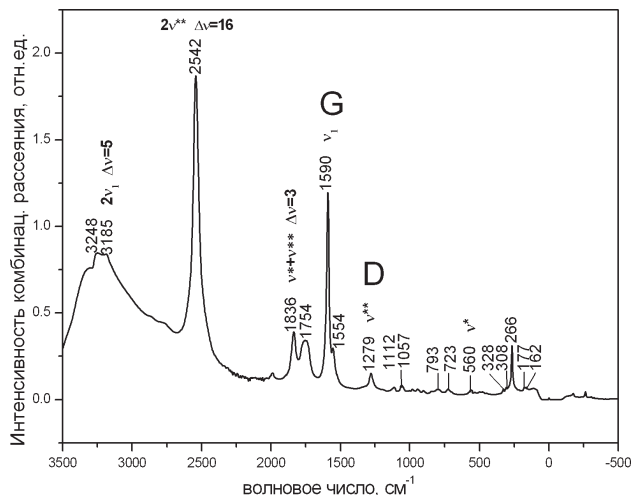


Рис. 6а. Спектр комбінаційного розсіяння NiPcO нанотрубок (а)

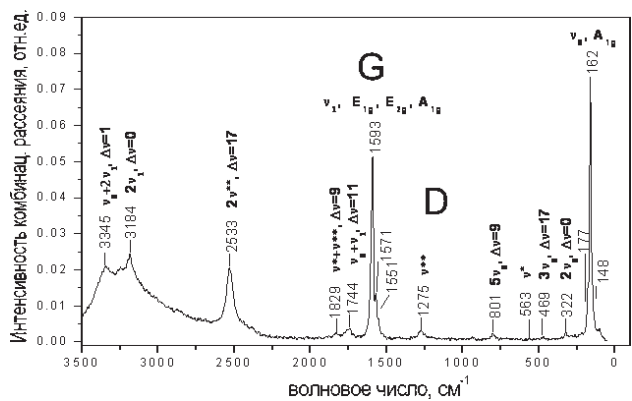


Рис. 6б. Спектр комбінаційного розсіяння “дугових” нанотрубок (б)

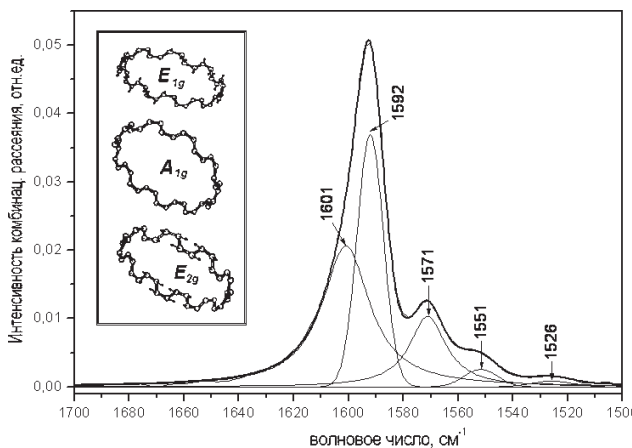


Рис. 7. Розклад G-моди “дугових” нанотрубок

мується зазвичай із розрахунків *ab initio*. Але, так як частіше всього експериментатори мають справу з низкою (в’язкою) нанотрубок, між якими існує Ван-дер-Ваальсова взаємодія,

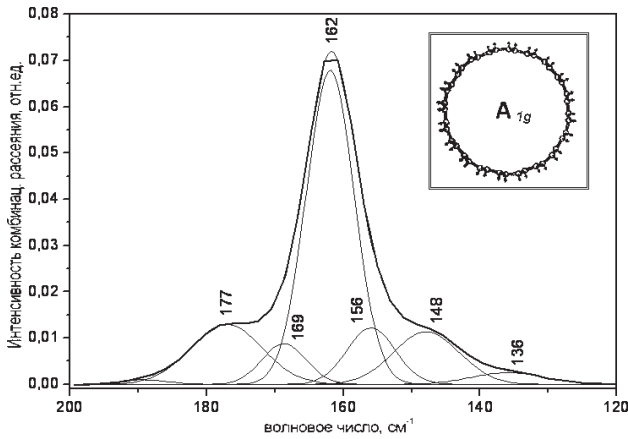


Рис. 8а. Розклад “дихальної моди” для нанотрубок (а) — дуговий метод

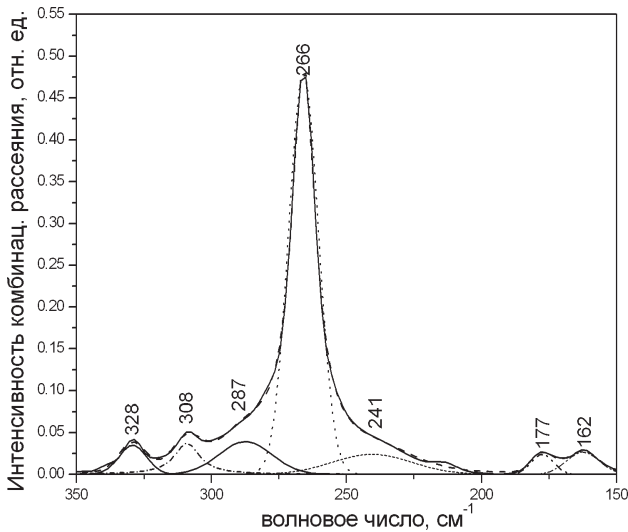


Рис. 8б. Розклад “дихальної моди” для HiPco нанотрубок

яка залежить як від діаметра нанотрубок, так і від кількості нанотрубок в пучці, то в формулі або з’являється додаткова постійна, або змінюється постійна в чисельнику. Наші московські колеги [24], чий нанотрубки ми використовували, користувались формулою в наступно-

му вигляді $\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{234}{D_2 \text{ (nm)}} + 10$, яка непогано узгоджується з їх даними взятими із електронної мікроскопії. При аналізі дихальної моди в літературі можна знайти і інші постійні в формулі, а саме:

$$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{223.5}{D_3 \text{ (nm)}} + 12.5 ; [25],$$

$$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{224}{D_4 \text{ (nm)}} + 14 ; [26],$$

$$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{238}{(D_5 \text{ (nm)})^{0.93}} ; [27],$$

$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{248}{D_6 \text{ (nm)}} ; [28]$. Отже, константи в формулі дуже близькі, але невеликі відмінності призводять до того, що розрахований діаметр може мати відмінності, що може призводити навіть до зміни типу нанотрубки. Різноманітність варіантів пов’язана з тим, що при розрахунках використовуються різні моделі і параметри, наприклад, в інтегралі перекриття π -станів, параметр γ_0 знаходиться в межах 2.5-3eV [23-28]. В реальній ситуації краще всього провести кореляцію між даними КР спектроскопії і електронної мікроскопії і підібрати константи, які добре описують нанотрубки, що використовуються.

Для детального розгляду “дихальної моди” нами було проведено розклад моди на складові з використанням програми Peak Fit. Для нанотрубок, отриманих дуговим методом, ми отримали набір “дихальних мод” з такими значеннями 136, 148, 156, 162, 169, 177 cm^{-1} (Рис.8). Для HiPco нанотрубок спостерігається зміщення основного максимуму у високочастотну область і розклад дав такі значення: 162, 177, 241, 266, 287, 308, 328 cm^{-1} . Як видно, коливальні моди 162 та 177 cm^{-1} присутні в обох спектрах, що вказує на наявність однакових типів нанотрубок в обох зразках. Зміщення основної моди в високочастотну область вказує на те, що HiPco нанотрубки мають діаметр менший, ніж нанотрубки синтезовані дуговим методом. Визначивши діаметр нанотрубок, можна перейти до визначення електронної структури и типу нанотрубок [20], що може виявитись чутливим параметром при взаємодії з біомолекулами [12]. Спектри КР, що наведено на (Рис.6-8) є характеристичними для нанотрубок і сильно відрізняються від любых інших вуглецевих матеріалів, графіта або сажі [20,21,22], де частіше всього спостерігаються дві інтенсивні смуги — G і D, не спостерігається дихальна мода і обертони. Останнє проявляється через те, що ці матеріали характеризуються сильним електрон — фононним зв’язком і як наслідок, високою ангармонічністю коливань, що посилюється при близькому до резонансу збудженні. Потрібно пам’ятати, що як положення, так і інтенсивність основних смуг можуть значно зміщатись при зміні дов-

жини хвилі збудження в силу різної дисперсійної залежності для різного типу коливань.

2. Результати та обговорення

2.1. ДНК-ВНТ взаємодія. В області 5300-380 cm^{-1} на спектрометрі IFS 48 Bruker в моді на відбивання (Рис.4) було вивчено SEIRA спектри комплексів ДНК і ВНТ, ДНК і сажа, яка отримана при синтезі фулеренів в порівнянні зі спектром ДНК (Рис.9). ДНК була попередньо денатурована і зразки готувались як описано в [29] із натрієвої солі ДНК, отриманої від фірми Serva. В результаті утворювались колоїдні розчини, що були стабільні більше 3-х

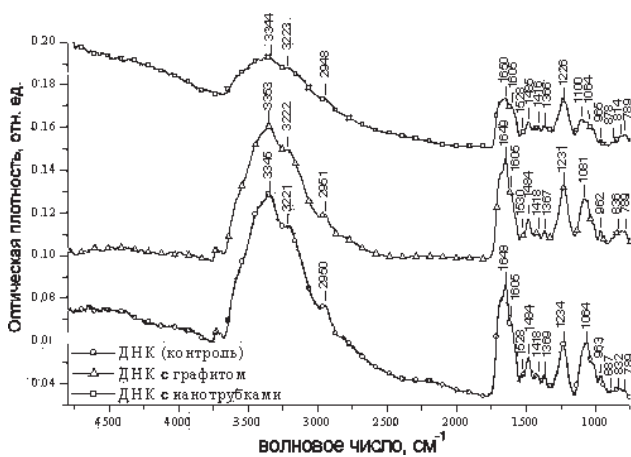


Рис. 9. SEIRA спектри ДНК, ДНК+ВНТ, ДНК+сажа

місяців. В спектрі комплексу ДНК — ВНТ виявили такі особливості:

i) в області коливань OH- , NH- , CH- (2950-3200 cm^{-1}) спостерігалось збільшення напівширини смуги до 527 cm^{-1} в порівнянні з 478 cm^{-1} в контролі, що вказує на формування сильних водневих зв'язків, так як уширення смуги йде з боку низьких частот; ii) в області коливань залишків азотних основ зросла інтенсивність поглинання на частотах, які відносяться до молекулярних груп C=O (1712, 1700, 1685 cm^{-1}) і C=N (1608 cm^{-1}), що свідчить на користь збільшення спіральної структури ДНК і водневого зв'язування азотних основ [30], які раніше було розірвано денатурацією, а збільшення інтегрального поглинання в області 1600-1700 cm^{-1} свідчить про те, що основи стали більш вільні ніж в В і А формі;

ii) значно зросла інтегральна інтенсивність смуг в області 600-900 cm^{-1} , які відповідають

коливанням залишків дезоксирибози, з'явилась смуга на 923 cm^{-1} [31-32], що можна пояснити появою фрагментів ДНК в Z-формі [32];

iii) збільшення інтенсивності смуги 830 cm^{-1} вказує на збільшення внеску В-форми ДНК [31];

iv) спостерігався зсув частотного положення асиметричного коливання фосфатної групи PO_2^- : з 1234 cm^{-1} (А-форма) в контролі на 1226 cm^{-1} (В-форма) [30]. При взаємодії ДНК з сажею, вище наведені зміни не відбувались або були виражені слабо (Рис.9) та детально обговорюються в [29]. Наші експериментальні дані показали, що при взаємодії ДНК з нанотрубками відбувається зміна структури ДНК, а саме, поряд з ДНК в А-формі, яку навізують наші експериментальні умови — 65% вологість, з'являються маркерні смуги В і Z форми, що говорить про наявність фрагментів ДНК або складових в цих формах або про глобальну перебудову її структури. Як саме відбувається відновлення спіральної структури ДНК відповісти складно. Можна припустити, що утворюються нові зв'язки в структурі молекули ДНК і потім знов утворена конформація накручується навколо нанотрубки з новим кроком, формуючи новий стабільний комплекс за рахунок нековалентної взаємодії основ з нанотрубкою. Дійсно, наші дані показують утворення нових водневих зв'язків в комплексі ДНК — нанотрубка, відновлення спіральної структури ДНК і збільшення інтенсивності переходів основних маркерних смуг, що свідчить про перебудову внутрішньо молекулярних водневих зв'язків. Напевно, реальна ситуація така, що ДНК взаємодіє з ВНТ по деяким схемам відразу, тобто відбувається як накручування ДНК, так і глобальна зміна її структури. В [33] була зроблена спроба промоделювати взаємодію одного із структурних блоків ДНК тіміна з фрагментом ВНТ методом *ab initio*. Із отриманих розрахункових даних можна зробити висновок, що між кільцем тіміна і поверхнею нанотрубки утворюються два типи комплексів з енергією 4.5 та 11.5 ккал/моль. В основі взаємодії лежить π -стекинг, що може слугувати підтвердженням механізму накручування ДНК на нанотрубку. Але, в цьому випадку конформація ДНК, скоріш за все, не повинна відповідати відомим канонічним формам, а повинна перейти в нову, раніше невідому фо-

рму [13, 29]. При наявності дефектів в нанотрубках можливе ковалентне зв'язування фрагмента ДНК з ВНТ, а також формування інших структур, наприклад, стопочних [34]. Взаємодія ДНК з нанотрубками залежить від структури ДНК, а саме від первинної і вторинної і може використовуватись для відбору і характеристики нанотрубок, як це було показано по залежності адсорбції різних нуклеотидних послідовностей від структури нанотрубки [12]. Отже, при взаємодії ДНК з нанотрубками відбувається їх зв'язування за участю нековалентної взаємодії Ван-дер-Ваальса, в якій стекинг відводиться основна роль і які формують достатньо стабільні комплекси, змінюючи водневі зв'язки в середині біологічної молекули і перебудовуючи її структуру. Як експериментально показано в [12], ця взаємодія залежить від нуклеотидної послідовності ДНК, хоча іноді в літературі називають взаємодію між біологічними молекулами неспецифічною, включаючи ДНК з ВНТ, і маючи на увазі π -стекинг. Здається дивним, що стекинг формує стійку структуру, але цей факт відомий, наприклад, при взаємодії бензолу “лицем до лиця” утворюються комплекси з енергією більшою 2 ккал/моль [35] або при формуванні стабільних комплексів ДНК з барвниками, які вибудовуються стопками на основі ДНК [34].

2.2. Альбумін — ВНТ взаємодія. Нами вивчалась взаємодія БСА- бичачого сировоткового альбуміну з вуглецевою поверхнею нанотрубок. Первинна структура БСА характеризується низьким вмістом триптофана і метіоніна, високим вмістом цистеїна і заряджених амінокислот; і нижче середнього значення для білків вмістом гліцина і ізолейцина. Вторинна структура БСА: α -спіраль — до 67%; β -складчаста структура — біля 20%; неупорядкована конформація — до 40%. Третинна структура характеризується трьома доменами, розділеними на 9 вузлів за рахунок 17 дисульфідних зв'язків [36].

Розчин білка готували, як описано в [37] а, потім його добавляли в колоїдний водний розчин нанотрубок, які попередньо обробляли ультразвуком впродовж 30 хвилин на мішалці Vandelin Sonorex ТК 52. В цьому розчині білок був інкубований з нанотрубками впродовж 3-4 годин при кімнатній температурі і багатократному розмішуванні, з нього осаджували краплину на золоті підкладинки і леофільно

висушували. Аналіз спектрів проводили по смузі Амід I ($1700-1600\text{ см}^{-1}$), яка є характерною для конформаційних станів білка. При взаємодії білка з ВНТ спостерігались такі спектральні зміни (Рис.10):

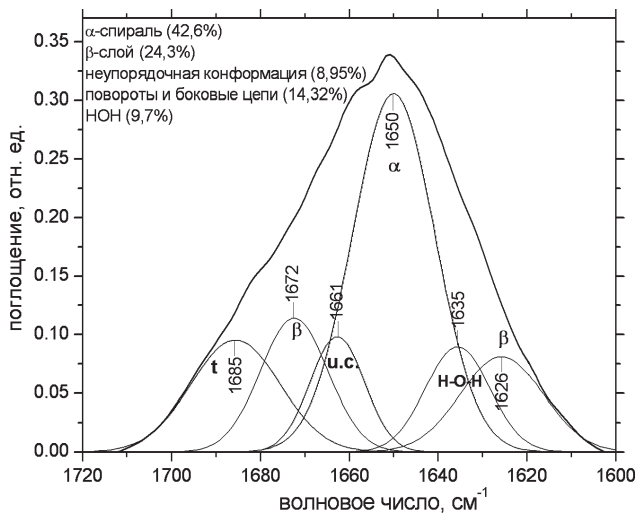


Рис. 10а. SEIRA спектри БСА в області Амід I до взаємодії з нанотрубками (а)

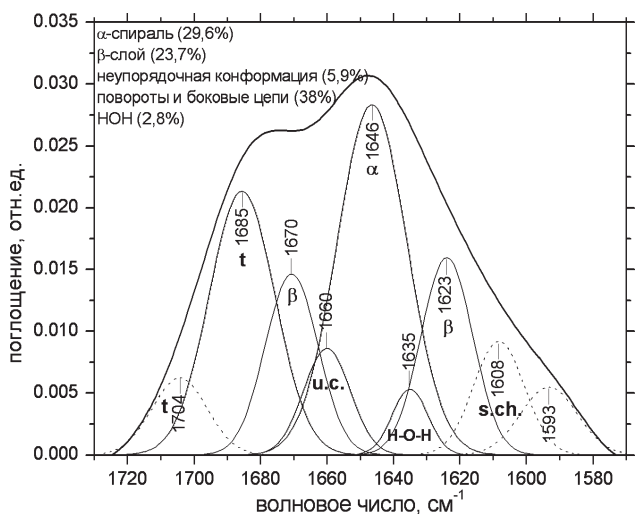


Рис. 10б. SEIRA спектри БСА в області Амід I після взаємодії з нанотрубками (б)

i) зсув смуги, яка є характерною для α -спіралі, з 1650 см^{-1} на 1646 см^{-1} , що може бути обумовлено зміною геометрії молекули білка після адсорбції на нанотрубки (Рис.11, 12);

ii) перерозподіл вкладів різних конформацій білка, в т.ч. поява смуги коливань на 1704 , 1608 , 1593 см^{-1} , які можна віднести до коливань бокових ланцюжків і поворотів молекули;

iii) загальне збільшення вкладів поворотів і бокових ланцюжків з 14 до 38%..

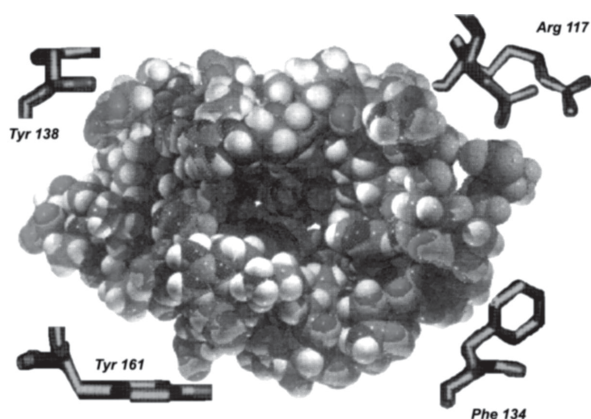


Рис. 11. Структура БСА та його активні сайти

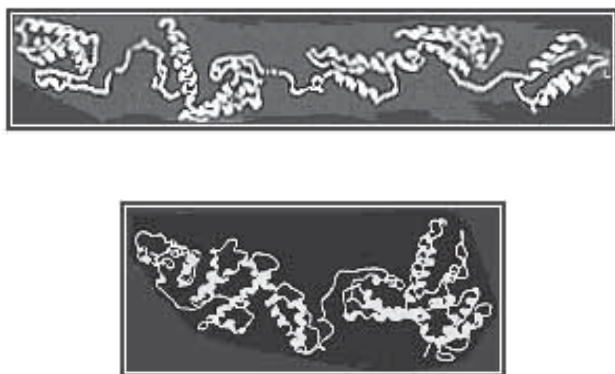


Рис. 12. Е та F форма альбуміна [36], ми припускаємо, що саме таку структуру має альбумін при адсорбції на нанотрубку

Процентний вклад α -спіралі ($1650\text{--}1646\text{ см}^{-1}$) зменшився — з 42,6 до 29,6%, хоча і залишився домінуючим, вміст води зменшився більш ніж в 3 рази. Експеримент по зв'язуванню ДНК і альбуміна з ВНТ, який наведений в роботі, був проведений на дугових нанотрубках. Використання НірСО нанотрубок привело до деяких несуттєвих змін, а саме, змінились вклади різних конформацій білка, перерозподілились інтенсивності переходів маркерних смуг, але напрям змін і їх суть залишились подібними.

Наведені зміни в структурі альбуміна, ймовірно, можуть бути описані в рамках існуючих уявлень про взаємодію цього білка з ліками та іншими речовинами [38], де суттєва роль відводиться гідрофобним взаємодіям за участю основних місць зв'язування, що представлено на (Рис. 11, 12) [39]. Для альбуміна це: Tyr 161, Tyr 138, Phe 134 (ароматичні амінокислоти) і зв'язування повинно відбуватись

шляхом стекинга. Для місць зв'язування Met 123 і Arg 117, ймовірно, відбувається перебудова структури навколишніх частин молекул в результаті гідрофобних взаємодій.

Логічно припустити, що в цьому випадку ароматичні амінокислоти будуть взаємодіяти з нанотрубками з участю π -стекинга. В [40] підтверджується можливість селективного зв'язування нанотрубок з пептидами по місцях, де міститься більше гістидина і триптофана, які теж є до ароматичними амінокислотами, хоча в більшості працях [7-9, 41, 42] основна увага акцентується на різних неспецифічних гідрофобних взаємодіях.

Висновки

1. Аналіз коливальних мод ДНК показав, що при взаємодії з одностінними вуглецевими нанотрубками відбуваються перебудови у вторинній структурі молекули ДНК. Ці зміни можуть бути описані як прояв А, В і Z форм в деяких фрагментах ДНК. Також, ймовірно, це може бути інтерпретовано як виникнення нових конформаційних станів ДНК, що адсорбована на поверхні нанотрубки. Наведені результати можуть бути покладено в основу моделі накручування ланцюжків ДНК навколо ВНТ, в якій π -стекингу відводиться основна роль.

2. Згідно даних SEIRA спектроскопії при взаємодії сироваткового альбуміну з ВНТ відбуваються конформаційні зміни в структурі білка, що характеризується зменшенням вмісту α -спіралі і води, а також підвищенням вмісту бокових ланцюжків і поворотів в білковій молекулі. Подібні зміни можуть вказувати на гідрофобний характер взаємодії БСА з ВНТ за участі π -стекинга і звичайних місць зв'язування для альбуміна.

3. Враховуючи характер взаємодії при адсорбції біологічних макромолекул на поверхні нефункціоналізованих вуглецевих нанотрубок можна зрозуміти, що утворені комплекси з енергією зв'язку ($\sim 2\text{--}20$ ккал/моль) можуть працювати як сенсори в ряді застосувань.

Автори виражають вдячність доктору Манфреду Вестермайеру, Фрайбург, Німеччина за вимірювання спектрів комбінаційного розсіювання вуглецевих матеріалів та професору Харкянену Валерію Миколайовичу за плідні дискусії, а також фінансовій підтримці проекту по темі ВЦ С № 240/44 "Детектування ма-

лих кількостей біологічних молекул та їх конформацій на основі ефекту підсилення оптичних сигналів”.

Література

1. Елецкий А.В. Углеродные нанотрубки // Успехи физ. наук. — 1997. — Т.167, № 9. — с. 945-971.
2. Pantarotto D., Singh R., McCarthy D., Erhardt M., Briand J., Prato M., Kostarelos K., Bianco A. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2004. — v.43, №39. — p. 5242-5246.
3. Bianco A. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules // *Expert Opin. Drug Deliv.* — 2004. — v.1, №1. — p. 57-65.
4. Hartgerink J., Benias E., Stupp S. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers // *Science.* — 2001. — v. 294. — p. 1684.
5. Maehashi K., Matsumoto K., Kerman K., Takamura Yu., Tamiya E. Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization Using Carbon Nanotube Field-Effect Transistors// *Jpn. J. Appl. Phys.* — 2004. — v.43, № 12 A. — p. L1558-L1560.
6. Williams K., Veenhuizen T., B. de la Torre, Eritja R., Dekker C. Carbon nanotubes with DNA recognition// *Nature.* — 2002. — v.420. — p. 761.
7. Besteman K., Lee J., Wiertz F., Heering H., Dekker C. Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors // *Nano Lett.* — 2003. — v.3, № 6, — p. 727-730.
8. Chen R., Zhang Y., Wang D., Dai H. Non-covalent Sidewall Functionalization of Single-walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization // *J. Am. Chem. Soc.* — 2001. — v.123, №16. — p. 3838-3839.
9. Wong S., Joselevich E., Woolley A., Cheung C., Lieber C. Covalently functionalized nanotubes as nanometer probes for chemistry and biology// *Nature.* — 1998. — v. 394. — p. 52-55.
10. Bekyarova E., Yingchun Ni Y., Malarkey E., Montana V., McWilliams J., Haddon R., Parpura V. Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology // *J. of Biomed. Nanotech.* — 2005. — v. 1, №1. — p. 3-17.
11. O'Connell M., Boul P., Ericson L., Huffman C., Wang Y., Haroz E., Kuper C., Tour J., Ausman K., Smalley R. Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping// *Chem. Phys. Lett* — 2001. — v.342, №3. — p. 265-271.
12. Zheng M., Jagota A., Semke E., Diner B., Mclean R., Lustig S., Richardson R., Tassi N. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes // *Nat. Mater.* — 2003. — v.2. — p. 338-342.
13. Zheng M., Jagota A., Strano M., Barone P., Chou S., Diner B., Dresselhaus M., McLean R., Onoa G., Samsonidze G., Semke E., Usrey M., Walls D. Structure-based carbon nanotube sorting by sequence-dependent DNA assembly // *Science.* — 2003. — v. 302. — p. 1545-1548.
14. Cui D., Ozkan C., Ravindran S., Kong Y., Gao H. Encapsulation of Pt-labelled DNA molecules inside carbon nanotubes // *Mechanics and Chemistry of Biosystems.* — 2004. — v.1, №.2. — p.113-121.
15. Gao H., Kong Y., Cui D., Ozkan C. Spontaneous Insertion of DNA Oligonucleotides into Carbon Nanotubes // *Nano Lett.* — 2003. — v. 3. — p. 471-473.
16. Финкельштейн А.Ф., Птицын О.Б. Физика белка. — М.: 2005. — . 455 с.
17. Dovbeshko G., Chegel V., Gridina N., Repnytska O., Shirshov Y., Tryndiak V., Todor I., Solyanik G. Surface enhanced infrared absorption of nucleic acids from tumour cells: an FTIR reflectance study // *Biospectroscopy.* — 2003. — v.67, №6. — p. 470-486.
18. Nikolaev P., Bronikovski M., Bradley R., Rohmund F., Colbert D., Smith K., Smalley R. Gas-phase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide // *Chem. Phys. Lett.* — 1999. — v.313. — p. 91-97.
19. Obratsova E., Bonard J., Kuznetsov V., Zaikovskii V., Pimenov S., Pozarov A., Terekhov S., Konov V., Obratsov A., Volkov A. Structural measurements for single-wall carbon nanotubes by Raman scattering technique // *Nanostruct. Mater.* — 1999. — v.12. — p. 567.
20. Dresselhaus M., Dresselhaus G., and Saito R. Physical Properties of Carbon Nanotubes. — London: Imperial College Press, 1998. — 251 p.
21. Ferrari A., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // *Physical review B.* — 2000. — v. 61, № 20. — p. 14095-14107.
22. Dovbeshko G.I., Gnatyuk O.P., Nazarova A.A., Sementsov Yu.I, Obratsova E.D. Vibrational spectra of carbonaceous materials: a SEIRA spectroscopy versus FTIR and Raman, // *Fullerenes, nanotubes and carbon nanostructures.* — 2005. — v.13, — p. 393-400.
23. Chen J., Hamon A., Hu H., Chen Y., Rao A., Eklund C., Haddon R. Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes // *Science.* — 1998. — v.282. — p. 95-98.
24. Бокова С.Н., Конов В.И., Образцова Е.Д., Осадчий А.В., Пожаров А.С., Терехов С.В. Лазерно-индуцированные эффекты в спектрах комбинационного рассеяния света в одностенных углеродных нанотрубках // *Квантовая электроника.* — 2003. — т. 33, № 7. — с. 645-650.
25. Krupke R., Hennrich F., Lohneysen H., Kappes M. Separation of Metallic from Semiconducting Single

- Walled Carbon Nanotubes // *Science*. — 2003. — v. 301. — p. 344.
26. Rao A., Chen J., Richter E., Eklund P., Haddon R., Venkateswaran U., Kwon Y., Tomanek D. Effect of Van der Waals Interaction on the Raman Modes in Single — Walled Carbon Nanotubes // *Phys. Rev. Lett.* — 2001. — v. 86. — p. 3895.
27. Rols S., et. al. Diameter distribution of single walled carbon nanotubes in nanobundles // *Eur. Phys. J. B*. — 2000. — v. 18. — p. 2001-2005.
28. Jorio A., Satio R., Hafner J., Lieber C., Hunter M., McClure T., Dresselhaus G., Dresselhaus M. Structural (n, m) Determination of Isolated Single — Walled Carbon Nanotubes by Resonant Raman Scattering // *Phys. Rev. Lett.* — 2001. — v. 86. — p. 1118.
29. Dovbeshko G., Repnytska O., Obraztsova E., Shtogun Y. DNA interaction with single-walled carbon nanotubes: a SEIRA study // *Chem. Phys. Lett.* — 2003. — v. 372. — p. 432-437.
30. Schrader B. *Infrared and Raman Spectroscopy*. — Weinheim-NewYork-Basel-Cambridge-Tokio: VCH, 1995. — 787 p.
31. Taillandier E., Liquier J., Taboury J. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. — Willey Heyden: ed. R.J.H. Clarc and R.E. Hester, 1985. — 65 p.
32. Tajmir-Riahi H., Neault J., Naoui M., Does DNA acid fixation produce left-handed Z structure? // *FEBS Lett.* — 1995. — v.370, №2. — p.105-108.
33. Dovbeshko G., Nazarova A., Shishkin O., Zubatyuk R., Bobrov O. SEIRA study of interaction of biological molecules with carbon nanotubes // VIII International Conference on Molecular Spectroscopy, Poland: Ladek Zdroj, -2005, — p.16.
34. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. Interactions of acridine orange with double stranded nucleic acids. Spectral and affinity studies // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1987. — v. 5, N1. — p. 127-143.
35. Sinnokrot M., Sherrill C. Unexpected Substituent Effects in Face-to-Face p-Stacking Interations // *J. Phys. Chem. A*. — 2003. — v. 107. — p. 8377.
36. Friedli G. — L. Interaction of SWP with bovine serum albumin (BSA): PhD Thesis. — EMMITSBURG. — USA. 1996. (<http://www.friedli.com>).
37. Dovbeshko G., Chegel V., Paschuk O., Shirshov Yu., Nazarova A., Kosenkov D., Fesenko O. Biological molecule conformations probed and enhanced by metal and carbon nanostructures: SEIRA, AFM and SPR data. — *Fronties of Multifunctional Integrated Nanosystems*. — Kluwer Academic Publishers: ed. E. Buzaneva, P. Scharff, 2004. — p.447-466.
38. Nevin N., Mueller Y.M., Bojczuk P., Rossi M., Katsikis P., Gogotsy Yu., Effect of carbon nanofibre structure on the binding of antibodies // *Nanotech.* — 2005. — v.16. — p. 567-571.
39. Houk K.N., Leach A. G., Kim S. P., Zhang X., Binding Affinities of Host-Guest, Protein-Ligand, and Protein-Transition-State Complexes // *Angewandte Chemie, International Edition*. — 2003. — v. 42, №40. — p. 4872-4897.
40. Naguib N., Mueller Y., Bojczuk P., Rossi M., Katsikis P., Gogotsy Yu. Effect of Carbon Nanofibre Structure on the Binding of Antibodies // *Nanotechnology*. — 2005. — v. 16. — p. 567-571.
41. Wang S., Humphreys E., Chung S., Delduco D., Lustig S., Wang H. et al., Peptides with selective affinity for carbon nanotubes // *Nature materials*. — 2003. — v. 2. — p. 196-200.
42. Werder Thomas Ulrich. *Multiscale Simulations of CNT in Aqueous Environments: Doctoral Thesis*, ETH No. 15832. — Swiss Fed. Inst. of Tech. Zurich. — 2005. — 202 p.