

ИНТЕГРАЦИЯ ДНК С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**Касьяненко Н.А., Варшавский М.С., Симанов Г.С., Бакулев В.М.**

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская набережная, 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Интеграция ДНК с наночастицами благородных металлов позволяет получать разнообразные структуры с уникальными свойствами из-за синергетической активности обоих компонентов, которые дают возможность создания различных наноразмерных инструментов для применения в тераностике, биоэлектронике, при биокатализе, для зондирования, маркировки и доставки биологически активных агентов. Такие системы востребованы при построении различных трехмерных конструкций на основе технологий ДНК-оригами и ДНК-лего, что дает возможность создания композитных материалов с уникальными оптическими, физическими и электрохимическими свойствами. В таких структурах обычно используют принцип комплементарности оснований. Однако в последнее время стали использовать не только уникальные архитектурные свойства ДНК, но и ее конформационные возможности, обеспечивающие распознавание самых разнообразных мишеней (от ионов до белков и надмолекулярных структур) и формирование сложных комплексов с заданными свойствами. В работе на примере восстановления ионов серебра после образования их комплексов с азотистыми основаниями ДНК рассматривается процесс металлизации ДНК в растворе. Показано, что оптические свойства формируемых структур зависят от целого ряда факторов – от концентраций компонентов, способа смешивания и др. Рассматриваются спектральные свойства растворов, содержащих высокомолекулярную ДНК с наночастицами серебра, методами динамического светорассеяния и атомной силовой микроскопии анализируются размеры наночастиц, получаемых путем химического восстановления ионов серебра при использовании нитрата серебра. Проводится анализ влияния ДНК на состояние наночастиц в растворе.

Ключевые слова: наночастицы серебра, высокомолекулярная ДНК, металлизация ДНК.

Сопряжение серебряных наночастиц (НЧ) с молекулой ДНК и металлизация ДНК представляют собой весьма актуальные задачи. Благодаря своим уникальным свойствам, молекула ДНК в современных нанотехнологических разработках используется, главным образом, как матрица для создания различных наноразмерных структур, находящихся применение в медицине, оптике, электронике и др. В частности, управляемая регулярная посадка наночастиц на молекулу ДНК может позволить конструировать так называемые наноантенны, многократно усиливающие действие электромагнитного излучения в определенных точках. Такие исследования в настоящее время проводятся, в основном, на основе техники ДНК-оригами, которая использует свойство комплементарности азотистых оснований при самосборке различных конструкций. Такая технология является достаточно дорогостоящей. Использование высокомолекулярной природной ДНК дает дополнительные возможности при таких разработках. Во-первых, возможно создание достаточно протяженных конструкций [1, 2]. Во-вторых, специальный подбор условий восстановления серебра может упростить и удешевить изготовление таких систем.

Целью работы являлось определение оптимального способа формирования наночастиц серебра в водном растворе, содержащем ДНК, рассмотрение условий, приводящих к формированию нанокластеров серебра, сопоставление конформационных параметров ДНК при формировании таких систем.

Сегодня существует широкий спектр способов, позволяющих получить наночастицы серебра с теми или иными свойствами (например, частицы разной геометрии - наносферы, наностержни, нанопризмы и пр.) [2, 3]. Глобально можно выделить два основных подхода: физический (с применением лазерной абляции, испарения/конденсации и пр.) и химический (с применением восстановителей: цитрата или боргидрида натрия, а также различных биоагентов (green synthesis)). В работе используется хорошо известный метод химического восстановления ионов серебра в растворе нитрата серебра AgNO_3 при добавлении боргидрида натрия NaBH_4 .

В работе применяли как готовые наночастицы серебра, так и восстановление ионов серебра после формирования их комплексов с молекулой ДНК. Исследования проводили с помощью микроскопии, динамического светорассеяния, спектральных и гидродинамических методов, которые дают информацию о состоянии вторичной и третичной структуры ДНК.

Металлические наночастицы обнаруживают особые оптические свойства, которые определяются так называемыми плазмонами, отвечающими за локализованный поверхностный плазмонный резонанс [4, 5]. Для формируемых в работе НЧ пик плазмонного резонанса наблюдается при 388 нм (рис. 1). Наночастицы серебра получались путем смешивания растворов нитрата серебра (AgNO_3) и боргидрида натрия (NaBH_4). Последний выступает и в качестве восстановителя серебра, а также в качестве стабилизатора наночастиц, что важно из-за высокой активности серебра, приводящей к быстрому окислению и агрегации формируемых наночастиц. Ниже приведена реакция синтеза серебряных наночастиц с использованием боргидрида натрия:



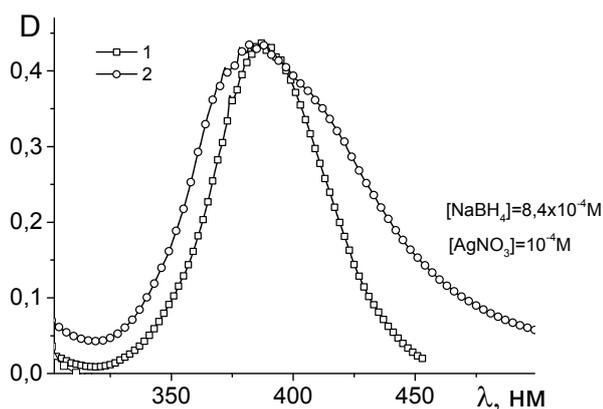


Рисунок 1. Пик плазмонного резонанса для формируемых в работе наночастиц серебра (1) и аналогичный пик после добавления в раствор ДНК (при смешивании равных объемов коллоидного раствора серебра и раствора ДНК в 0,005 М NaNO_3). $C(\text{ДНК}) = 0,0015\%$. Измерения проведены через 15 минут после приготовления систем

Результат формирования наночастиц зависит от порядка смешивания реагентов, скорости смешивания, интенсивности смешивания и др. Необходимо использовать свежеприготовленный раствор боргидрида натрия (уже через 30 минут раствор боргидрида натрия показывает более низкую восстановительную активность из-за быстрого протекающего гидролиза в водной среде с формированием $\text{Na}[\text{B}(\text{OH})_4]$).

Для характеристики спектральных свойств формируемых систем использовали спектрофотометр СФ-56 (ЛОМО, Россия). Использовали коммерческие химические реактивы марки хч (Вектон) и высокомолекулярную ДНК тимуса телят (Sigma Aldrich). Молекулярную массу используемого образца ДНК (9×10^6) определяли вискозиметрически. Образец растворяли в дистиллированной воде, после 4 суток выдержки при температуре 4°C добавляли раствор NaNO_3 до достижения необходимой концентрации поддерживающего электролита (обычно 0,005 М). После фильтрования концентрацию ДНК в растворе определяли методом А.С. Спирина [6]. Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК регистрировали с помощью автодихрографа Mark IV (Jobin Yvon, Франция). Измерения проводили в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Для измерения размеров наночастиц использовали метод динамического рассеяния света (ДРС), который позволяет определить коэффициент поступательной диффузии частиц D путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света, из которого находили гидродинамический радиус частиц R по формуле Стокса-Эйнштейна: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$, где k_B – константа Больцмана; T – абсолютная температура и η – вязкость растворителя.

Использовали установку Photocor Complex (Россия).

Исследование структур проводили также с использованием атомного силового микроскопа NanoScope 4 и микроскопа NTEGRA. Измерения проводили в режиме прямого сканирования. При исследовании образцов ДНК и комплексов ДНК с наночастицами (ДНК-НЧ) и с нанокластерами (ДНК-НК) использовали подложки со свежесколотой поверхностью слюды. Для фиксации макромолекул ДНК на поверхность в раствор добавляли соль MgCl_2 в концентрации 5×10^{-4} М. Фиксация отрицательно заряженных макромолекул ДНК с отрицательно заряженной слюдяной поверхностью осуществляется через положительно заряженные ионы Mg^{2+} . Отрицательный заряд образуется на слюдяной поверхности в процессе расщепления слоев. Заряд сохраняется в течение времени, необходимого для фиксации ДНК и комплексов ДНК-НЧ, ДНК-НК. Смешанные с MgCl_2 растворы наносили на подложку в объеме ~ 5 мкл, и спустя 3-и минуты подложка промывалась струей дистиллированной воды для удаления незафиксированных молекул. Затем образцы помещались в неплотно закрытые чашки Петри для высушивания. Стоит отметить, что НЧ фиксировались на слюдяную подложку без добавления каких-либо низкомолекулярных соединений. Для фиксации НЧ использовали метод высушивания коллоидного раствора НЧ пониженной концентрации. Пример изображения синтезируемых наночастиц представлен на рисунке 2. Коллоидный раствор сформированных наночастиц серебра использовали для изучения распределения частиц по размерам методом динамического светорассеяния (рис. 3). Этот метод позволяет получать информацию о коэффициенте поступательной диффузии частиц. При этом могут быть использованы как молекулярные растворы полимеров (частицы – макромолекулы в этом случае характеризуются значением гидродинамического радиуса (радиус сплошной сферы, которая имеет такой же коэффициент поступательной диффузии, как макромолекула), так и коллоидные растворы. Для наночастиц получаем реальный радиус сферической частицы (форма частиц определена с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ)).

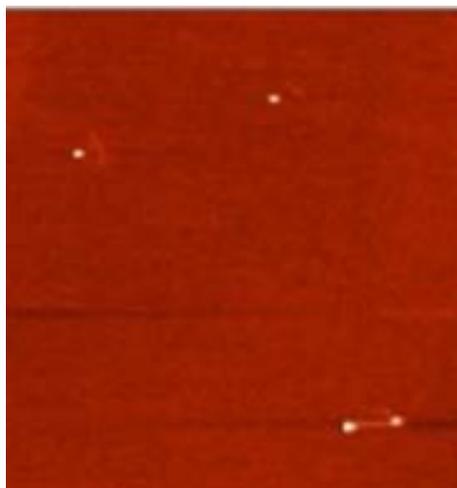


Рисунок 2. АСМ изображение наночастиц, высаженных на слюду (капля сильно разбавленного коллоидного раствора высыхала в вакуумном шкафу). Размер изображения 10 x 10 мкм

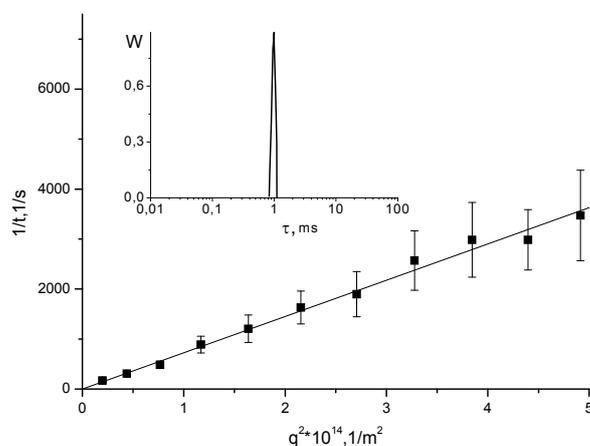


Рисунок 3. Результат исследования коллоидного раствора наночастиц серебра, полученных в работе методом химического восстановления, методом динамического светорассеяния. Из наклона зависимости скорости релаксации $1/\tau$ от q^2 (q - величина волнового вектора) получен коэффициент поступательной диффузии частиц. Вставка показывает распределение по временам релаксации. Гидродинамический радиус формируемых наночастиц равен 7,5 нм

При добавлении наночастиц серебра в раствор ДНК мы не наблюдаем смещения пика плазмонного резонанса (рис. 1), но его неоднородное уширение свидетельствует о появлении второй фракции частиц, связанных с ДНК (длинноволновое «плечо» свидетельствует о неразрешенной полосе около 425 нм). С течением времени картина меняется (рис.4). Заметим, что в этом опыте мы использовали большую концентрацию ДНК. Отчетливо виден сдвиг полосы плазмонного резонанса наночастиц при добавлении в раствор ДНК (спектры 4 и 5 на рис. 4).

Перейдем к рассмотрению результатов восстановления ионов серебра в растворах ДНК после их связывания с макромолекулой. Во всех растворах ДНК присутствовала соль $NaNO_3$ в концентрации 0,005 М в качестве поддерживающего электролита для ДНК. Образование комплексов ионов серебра с азотистыми основаниями ДНК в большой бороздке по позиции N7 гуанина [7] сопровождается характерным изменением спектра поглощения макромолекулы (рис. 4, спектр 2): происходит батохромный сдвиг максимума поглощения ДНК, свидетельствующий о связывании ионов серебра в большой бороздке ДНК с N7 гуанина.

С увеличением концентрации серебра в растворе наблюдается гиперхромный эффект. При локальном нарушении водородных связей в паре гуанин-цитозин ионы серебра располагаются между основаниями, связываясь с N3 цитозина. Добавление восстановителя после формирования комплексов приводит к появлению выраженного пика плазмонного резонанса (спектр 3 на рис. 4). В этом случае пик уширен и сдвинут в красную область относительно пика плазмонного резонанса свободных наночастиц серебра (спектр 5). Сдвиг пика однозначно свидетельствует о связывании формируемых наночастиц с ДНК. Полоса поглощения ДНК (спектральная область до 300 нм) при этом свидетельствует о наличии контактов серебра с азотистыми основаниями макромолекулы.

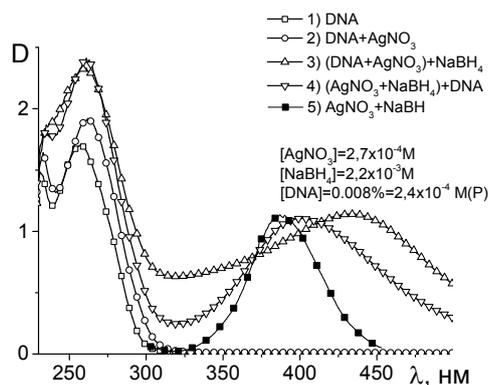


Рисунок 4. Спектры поглощения растворов ДНК (1), ее комплексов с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя, после смешивания растворов ДНК и готовых наночастиц (4) и пик плазмонного резонанса свободных наночастиц (5). Концентрации и порядок добавления компонентов указаны на рисунке

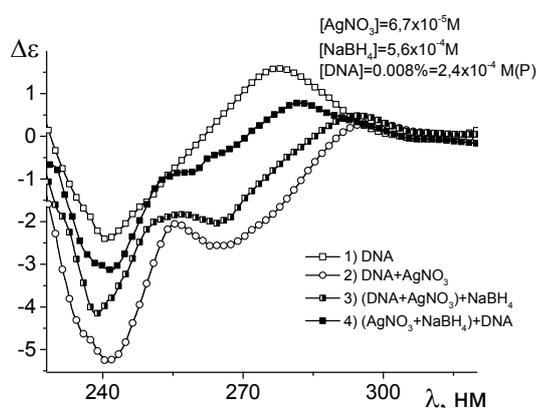


Рисунок 5. Спектры кругового дихроизма свободной ДНК (1), ДНК в комплексах с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя. Приведен также спектр КД ДНК в растворе после добавления готовых наночастиц ДНК (4). Концентрации и порядок добавления компонентов указаны на рисунке

Следует подчеркнуть, что восстановление серебра после формирования комплексов ионов серебра с азотистыми основаниями макромолекулы протекает существенно медленнее (более 1 часа при комнатной температуре), чем при добавлении восстановителя в раствор нитрата серебра (реакция идет несколько минут). При добавлении же ДНК в систему спустя 5 минут после восстановителя (после формирования наночастиц) равновесие наступает достаточно быстро.

Спектры кругового дихроизма ДНК для систем ДНК с наночастицами (рис. 5) показывают, что при восстановлении серебра на ДНК макромолекула частично возвращается в состояние, наблюдаемое до связывания с ионами серебра.

Известно, что при восстановлении серебра в растворах ДНК, содержащих малые концентрации нитрата серебра (при недостатке ионов серебра относительно количества связывающих центров - пар оснований ДНК) в системе формируются не наночастицы серебра, демонстрирующие ярко выраженный плазмонный резонанс, фиксируемый спектрально в области около 400 нм, а так называемые нанокластеры (НК) – существенно меньшие металлические частицы серебра, локализованные на ДНК, не показывающие плазмонного резонанса [8, 9]. Подчеркнем, что они расположены именно на ДНК, хотя невозможно полностью исключить возможность их существования в растворе независимо от присутствия макромолекул.

На рисунке 6 приведены спектры поглощения тройной системы, приготовленной с использованием малых концентрацией нитрата серебра. Для сравнения представлены также спектры поглощения свободной ДНК и ДНК в комплексе с ионами серебра. Следует обратить внимание на отсутствие видимого гиперхромного эффекта при связывании ионов серебра с ДНК в этом случае, хотя bathochromный сдвиг максимума поглощения ДНК свидетельствует о формировании комплексов. Обращает на себя внимание также отсутствие пика плазмонного резонанса в такой системе (спектр 3 на рис. 6), тогда как добавление ДНК в раствор готовых наночастиц при использовании тех же концентраций нитрата серебра и боргидрида натрия не влияет на выраженный пик плазмонного резонанса. Остается заключить, что практически все ионы серебра в растворе ДНК до добавления восстановителя находятся в связанном с макромолекулой состоянии, но из недостаток не позволяет формировать наночастицы, сопряженные с ДНК.

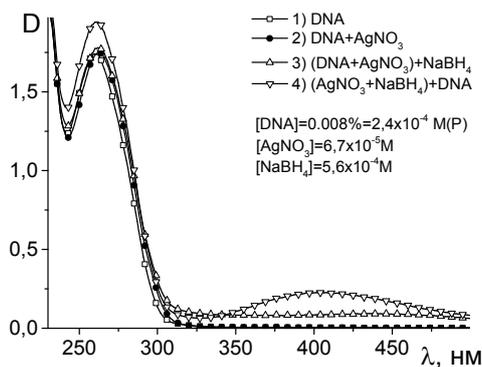


Рисунок 6. Спектры поглощения свободной ДНК (1), ДНК в комплексах с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя. Приведен также спектр поглощения раствора готовых наночастиц после добавления в него ДНК (4). Концентрации и порядок добавления компонентов отмечены на рисунке

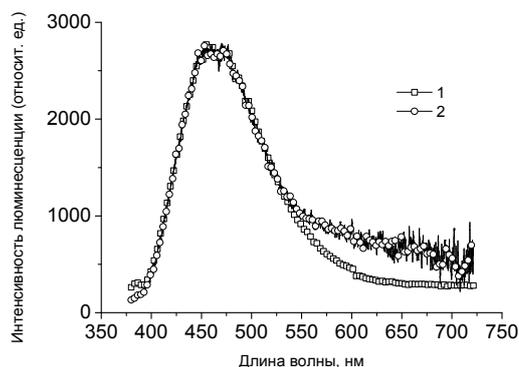


Рисунок 7. Спектры люминесценции раствора ДНК с нанокластерами при $\lambda_{ex}=340$ нм (1) и 270 нм (2)

Заметим, что формируемые при этом малые частицы серебра – нанокластеры способны люминесцировать [8-10]. При возбуждении в области поглощения ДНК ($\lambda_{ex} = 270$ нм) наблюдается нехарактерный для ДНК спектр флуоресценции с максимумом около 460 нм и длинноволновым «хвостом», простирающимся за 720 нм (рис. 7).

В спектре возбуждения флуоресценции ($\lambda_{em} = 460$ нм) (рис. 8) проявляются две полосы: основная с максимумом на 365 нм и более слабая полоса с максимумом 270 нм. Основная полоса находится в области плазмонного резонанса (рис. 9), поэтому ее можно приписать фракции наночастиц. При возбуждении в этой полосе ($\lambda_{ex} = 340$ нм) спектр флуоресценции практически не меняется: полуширина и максимум остаются такими же, как и при возбуждении 270 нм, но длинноволновый хвост исчезает (см. рис. 7, спектр 1).

Известно, что максимум в спектре возбуждения ДНК сдвинут в длинноволновую сторону на 10-20 нм относительно максимума в ее спектре поглощения. На основании этого можно приписать вторую более слабую полосу с максимумом 270 нм поглощению ДНК. Появление поглощения ДНК в спектре возбуждения наночастиц можно объяснить переносом энергии возбуждения с ДНК на связанные с ней люминесцирующие наночастицы. Квантовый выход флуоресценции данных наночастиц должен быть очень высоким, так как их люминесценция наблюдается при очень незначительном поглощении в области плазмонного резонанса (очень низкая концентрация наночастиц).

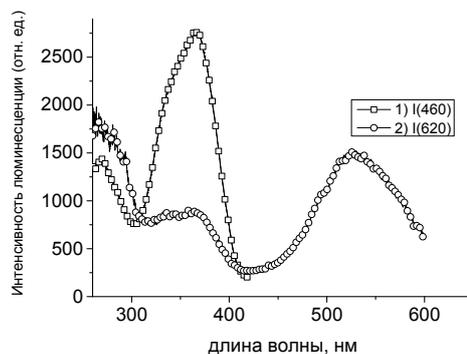


Рисунок 8. Спектры возбуждения флуоресценции $\lambda_{em} = 460$ (1) и 620 нм (2)

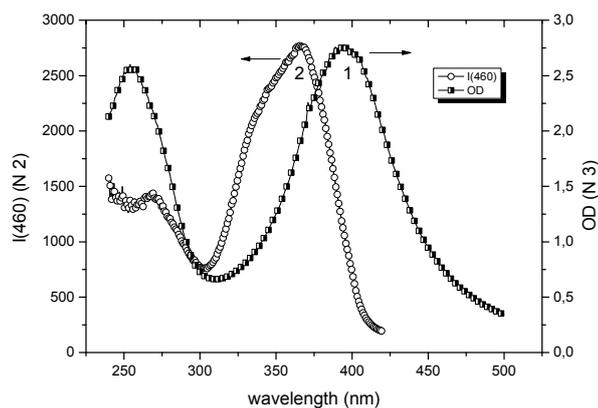


Рисунок 9. Спектр поглощения раствора 3 (синий) и спектр возбуждения при $\lambda_{\text{ем}} = 460$ нм раствора 2. Растворы 2 и 3 готовили одинаковым способом, но концентрации AgNO_3 и NaBH_4 в растворе 3 больше в 4 раза по сравнению с раствором 2

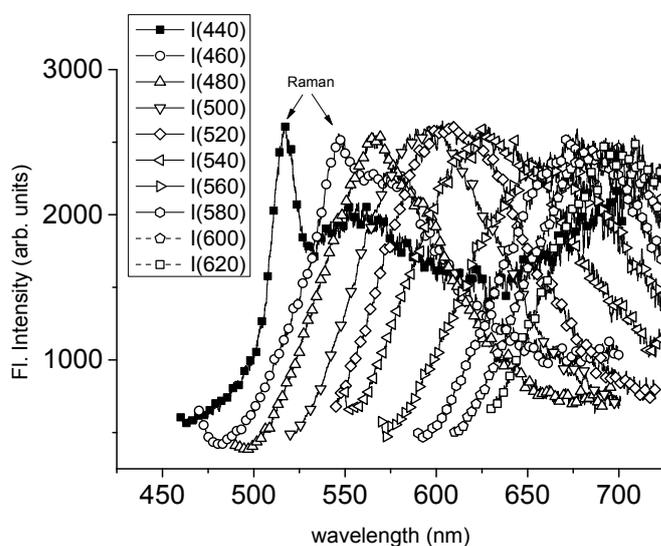


Рисунок 10. Спектры люминесценции раствора ДНК с нанокластерами серебра при возбуждении в длинноволновой области. Длины волн возбуждения указаны на рисунке

При регистрации слабой люминесценции в красной области (600-700 нм) в спектре возбуждения кроме выявленных полос с максимумами 270 и 365 нм проявляется еще одна более длинноволновая полоса. В отличие от полосы 365 нм, максимум этой длинноволновой полосы сдвигается при изменении длины волны регистрации (и наоборот, положение максимума спектра испускания зависит от длины волны возбуждения – см. рис. 10). Такие зависимости говорят о многокомпонентности люминесцирующей системы – каждой отдельной фракции соответствует своя полоса поглощения и своя полоса испускания. Ранее в аналогичных системах наблюдалась подобная люминесценция, которая была приписана флуоресценции адсорбированных на ДНК кластеров серебра [8, 9]. Таким образом, по изучению люминесценции можно сделать вывод о том, что в растворе присутствуют две люминесцирующие фракции: адсорбированные на ДНК малые частицы серебра с максимумом поглощения 365 нм и максимумом испускания 460 нм, и кластеры серебра различной структуры со спектрами поглощения в области 460-620 нм и испусканием 460-750 нм.

Заметим, что если мы добавляли ДНК к готовым наночастицам, которые получали, сливая раствор нитрата серебра и боргидрида натрия, мы вообще не наблюдали ни один из приведенных выше спектров люминесценции. Из этого можно сделать вывод, что люминесцирующие состояния серебра образуются только при восстановлении адсорбированных на цепи ДНК ионов серебра, а добавление ДНК в раствор с уже восстановленным серебром не дает такого эффекта.

АСМ изображение высаженной на слюду ДНК после восстановления серебра до состояния нанокластеров показало, что в этой системе также присутствуют наночастицы серебра (рис. 11). Возможно, они усиливают люминесценцию нанокластеров.

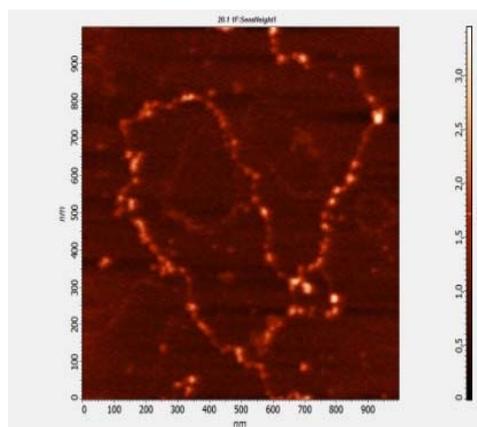


Рисунок 11. АСМ изображение ДНК на слюде после восстановления серебра с формированием нанокластеров. Использовали микроскоп NTEGRA

Таким образом, в работе показано, что возможен синтез наночастиц серебра, связанных с ДНК. При синтезе наночастиц в растворе ДНК, содержащем нитрат серебра, только часть ионов находится в связанном с ДНК состоянии, а остальные ионы остаются свободными. В этом случае часть формируемых наночастиц связана с макромолекулой, а остальные находятся в растворе в свободном состоянии. При малых концентрациях ионов серебра в растворе ДНК формируются люминесцирующие кластеры. Таким образом, подбирая концентрации ДНК, нитрата серебра и восстановителя, можно получить разные системы – сопряженные ДНК наночастицы, обладающие плазмонным резонансом, или располагающиеся на ДНК более маленькие люминесцирующие нанокластеры.

Список литературы / References:

1. Puchkova A.O., Sokolov P.A., Kasyanenko N.A., Petrov Y.V. Metallization of DNA on silicon surface. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, vol. 13, no. 9, pp. 3633-3641. DOI: 10.1007/s11051-011-0282-6.
2. Kasyanenko N., Varshavskii M., Ikonnikov E., Tolstyko E., Belykh R., Sokolov P., Bakulev V., Rolich V., Lopatko K. DNA modified with metal nanoparticles: preparation and characterization of ordered metal-DNA nanostructures in a solution and on a substrate. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 3237250. DOI: 10.1155/2016/3237250.
3. Sun Y., Xia Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 2002, vol. 298, no. 5601, pp. 2176-2179. DOI: 10.1126/science.1077229.
4. Maier S.A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer, Berlin, 2007, 345 p.
5. Ghosh S.R., Nath S., Kundu S., Esumi K., Pal T. Ligand Effects on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) of Gold Colloids. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, vol. 108, no. 37, pp. 13963-1397. DOI: 10.1021/jp047021q.
6. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот. *Биохимия*, 1958, т. 23, с. 656-662. [Spirin A.S. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. *Biokhimiya (USSR)*, 1958, vol. 23, pp. 656-662. (In Russ.)]
7. Касьяненко Н.А., Qiushi Z., Варшавский М.С., Бакулев В.М., Демидов В.Н. Металлокомплексы ДНК и металлизация макромолекулы в растворе. *Журнал структурной химии*, 2017, т. 58, № 2, с. 424-430. DOI: 10.15372/JSC20170227 [Kasyanenko N.A., Qiushi Z., Varshavskii M.S., Bakulev V.M., Demidov V.N. DNA metal complexes and metallization of a macromolecule in solution. *Journal of Structural Chemistry*, 2017, vol. 58, no. 2, pp. 406-412. DOI: 10.1134/S0022476617020275.]
8. Yeh H.-C., Sharma J., Han J.J., Martinez J.S., Werner H. A DNA-Silver Nanocluster Probe That Fluoresces upon Hybridization. *Nano Letters*, 2010, vol. 10, no. 8, pp. 3106-3110. DOI: 10.1021/nl101773c.
9. Díez I., Ras R.H.A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 2011, vol. 3, pp. 1963-1970. DOI: 10.1039/C1NR00006C.
10. Volkov I.L., Ramazanov R.R., Ubyivovk E.V., Rolich V.I., Kononov A.I., Kasyanenko N.A. Fluorescent silver nanoclusters in condensed DNA. *Chemphyschem: European journal of chemical physics and physical chemistry*, 2013, vol. 14, no. 15, pp. 3543-3550. DOI: 10.1002/cphc.201300673.

DNA INTEGRATION WITH METAL NANOPARTICLES

Kasyanenko N.A., Varshavskii M.S., Simanov G.C., Bakulev V.M.

St. Petersburg State University

University Embankment 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Abstract. Integration of DNA with nanoparticles of noble metals makes it possible to obtain various structures with unique properties due to the synergistic activity of both components, which make it possible to create various nanoscale tools for use in theranostic, bioelectronics, biocatalysis, for probing, labeling and delivering biologically active agents. Such systems useful when building various three-dimensional constructions based on DNA origami and DNA-Lego technologies, which makes it possible to create composite materials with unique optical, physical and electrochemical properties. In such structures, the principle of base complementarity is usually used. Recently, however, investigators began to use not only unique architectural properties of DNA, but also the conformational capabilities of DNA, that ensure recognition of a wide variety of targets (from ions to proteins and supramolecular structures) for the formation of complexes with desired properties. The reduction of silver ions after the formation of their complexes with nitrogenous bases of DNA is studied in this research. The process of DNA metallization in solution is considered. It is shown that the optical properties of the formed structures depend on a number of factors - on the concentrations of the components, on the method of mixing, etc. The spectral properties of solutions containing high-molecular DNA with silver nanoparticles were regarded. The dynamic light scattering method and atomic force microscopy to analyze the size of nanoparticles obtained by chemical reduction of silver ions using silver nitrate were used. The analysis of the influence of DNA on the state of nanoparticles in solution was carried out.

Key words: *silver nanoparticles, high molecular DNA, DNA metallization.*