

37. Dowling J P, Gea-Banacloche J *Adv. Atom. Mol. Opt. Phys.* **37** 1 (1996)
38. Passerat de Silans T et al. *Appl. Phys. B* **82** 367 (2006)
39. Афанасьев А Е, Мелентьев П Н, Балькин В И *Письма в ЖЭТФ* **86** 198 (2007); Afanasiev A E, Melentiev P N, Balykin V I *JETP Lett.* **86** 172 (2007)
40. Zhang Z, Lagally M G *Science* **276** 377 (1997)
41. Capasso F (Ed.) "Special issue: Nanoscale and ultrafast devices" *Phys. Today* **43** (2) (1990)
42. Асеев А Л *Российские нанотехнологии* **1** (1–2) 97 (2006)
43. Kien F L, Nakuta K *Phys. Rev. A* **75** 013423 (2007)
44. Kien F L, Dutta Gupta S, Nakuta K *Phys. Rev. A* **75** 062904 (2007)
45. Nayak K et al., in *Quantum Electronics and Laser Science Conf., Long Beach, Calif., USA, May 21, 2006. Technical Digest*, paper QThC3
46. Junge C et al. *Phys. Rev. Lett.* **110** 213604 (2013)
47. Chang D E et al. *New J. Phys.* **14** 063003 (2012)
48. Chang D E, Cirac J I, Kimble H J *Phys. Rev. Lett.* **110** 113606 (2013)
49. Kien F L et al. *Phys. Rev. A* **72** 063815 (2005)
50. O'Shea D et al. *Phys. Rev. Lett.* **111** 193601 (2013)

PACS numbers: **87.64.**–t, 87.85.Qr, 87.85.Rs
DOI: 10.3367/UFNr.0184.201406i.0665

Структурная нанотехнология нуклеиновых кислот: жидкокристаллический подход

Ю.М. Евдокимов, О.Н. Компанец

1. Введение

Бионанотехнология — раздел нанотехнологии, задачей которого является создание пространственных, характеризующихся размерными свойствами, наноконструкций (нанообъектов), "строительными блоками" которых являются молекулы биологического происхождения [1]. Несмотря на многообразие биологических молекул, реальные практические результаты получены пока только в одном направлении бионанотехнологии, а именно в области *нанотехнологии нуклеиновых кислот*. Нанотехнология нуклеиновых кислот — это создание пространственных объектов (наноструктур, наноконструкций) с регулируемыми свойствами, строительными блоками которых являются молекулы нуклеиновых кислот (НК) или их комплексы. Это направление бионанотехнологии называют также *структурной нанотехнологией нуклеиновых кислот* [2].

В настоящей статье рассмотрены основные принципы жидкокристаллического подхода к созданию пространственных нанообъектов на основе двухцепочечных (дц) молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (deoxyribonucleic acid, DNA), обладающих разными свойствами. При этом физическая химия полимеров, в том числе нуклеиновых кислот и их комплексов, свидетельствует о том, что возможно несколько вариантов создания таких нанообъектов с учётом представления об

упорядочении соседних молекул двухцепочечных НК в частицах жидкокристаллических дисперсий¹.

2. "Жидкие" частицы жидкокристаллических дисперсий на основе двухцепочечных молекул ДНК

Известно, что фазовое исключение жёстких, линейных, двухцепочечных молекул НК [3], имеющих молекулярную массу менее 1×10^6 Да, из водно-солевых растворов некоторых полимеров, например полиэтиленгликоля (ПЭГ), сопровождается образованием дисперсий НК. Эффективность фазового исключения зависит от целого ряда указанных на рис. 1 факторов. Необходимо отметить особое значение двух факторов: молекулярной массы и растворимости молекул дц-ДНК. Чем выше молекулярная масса ДНК, тем ниже совместимость этой молекулы с раствором ПЭГ и тем выше эффективность фазового исключения. Чем ниже растворимость молекул ДНК, тем выше как их несмешиваемость с раствором ПЭГ, так и эффективность фазового исключения [3].

Теоретические оценки, основанные на применении разных методов (седиментационный анализ, рассеяние ультрафиолетового (УФ) излучения, динамическое светорассеяние и др.), показали, что для дц-ДНК с молекулярной массой $(0,6–0,8) \times 10^6$ Да средний диаметр частиц дисперсии близок к 500 нм. Молекулярная масса одной частицы дисперсии $\sim 10^{10}$ Да, частица содержит в себе примерно 10^4 молекул ДНК [3].

У частиц дисперсии есть несколько характерных особенностей. Во-первых, полимер не входит в состав частиц дисперсии. Во-вторых, соседние молекулы ДНК располагаются на расстоянии 2,5–5,0 нм, т.е. частицы обладают свойством, характерным для кристаллов; кроме того, соседние молекулы ДНК подвижны, т.е. частицам присуще свойство, характерное для жидкости. Указанные факты позволяют использовать для описания таких частиц термины *жидкокристаллические дисперсии* (ЖКД) или даже *жидкая частица* ДНК. В-третьих, взаимодействие между соседними молекулами ДНК благодаря их хиральности приводит к формированию пространственно-закрученной структуры частиц дисперсии.

Все отмеченные выше свойства частиц ЖКД ДНК, включая их ламеллярную (слоистую) структуру [4], учитывались при создании феноменологической теории кругового дихроизма (КД) таких частиц [5, 6]. Эта теория позволила описать и предсказать многие особенности спектров КД частиц ЖКД ДНК. Поскольку в составе молекул ДНК есть хромофоры (азотистые основания), поглощающие УФ-излучение, теория предсказывает появление очень интенсивной (аномальной) полосы в спектре КД частиц ЖКД ДНК в области поглощения азотистых оснований. Наличие этой полосы, регистрируемое спектрометром КД, является однозначным сви-

¹ Дисперсные системы — это микрогетерогенные системы с сильно развитой внутренней поверхностью раздела между фазами, состоящие из двух или большего числа фаз, причём по крайней мере одна из фаз (дисперсная фаза) распределена в окружающей сплошной дисперсионной среде — газе, жидкости или твёрдом теле — в виде мелких частиц (кристалликов, капелек, пузырьков). Часто вместо термина "дисперсная фаза" употребляют просто слово "дисперсия", общепринятыми в химии являются также выражения "полимерные дисперсии" или "жидкокристаллические дисперсии".

Ю.М. Евдокимов. Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, РФ
E-mail: yevdokim@imbi.ru
О.Н. Компанец. Институт спектроскопии РАН,
Троицк, Москва, РФ
E-mail: onkomp@isan.troitsk.ru

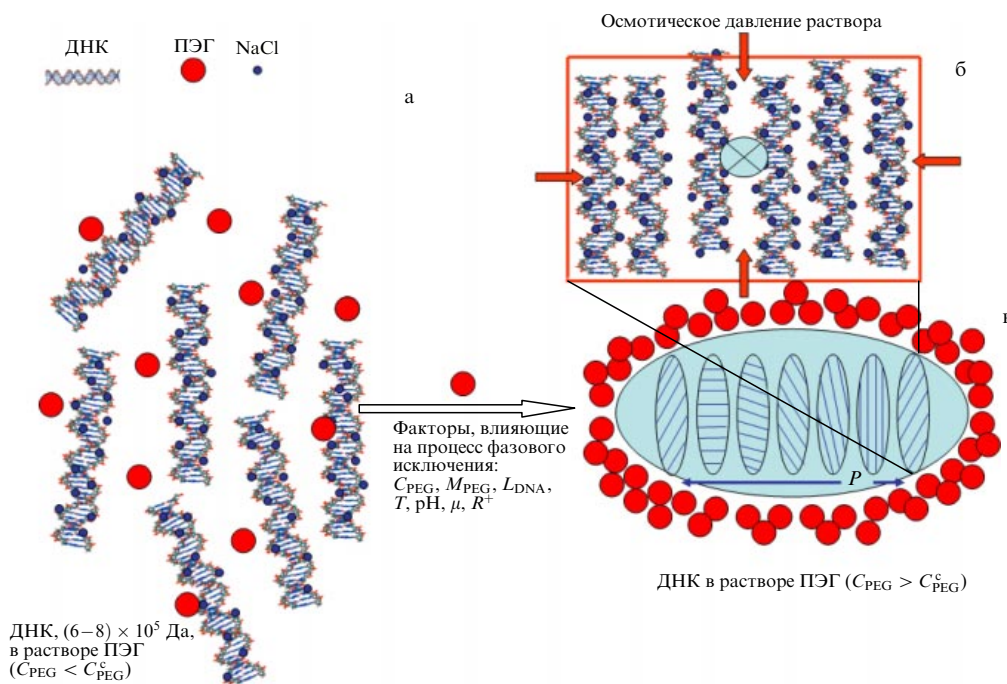


Рис. 1. Принципиальная схема формирования частиц ЖКД ДНК в результате фазового исключения жёстких двухцепочечных молекул ДНК из водно-солевого ПЭГ-содержащего раствора. C_{PEG} — концентрация ПЭГ в растворе, M_{PEG} — молекулярная масса ПЭГ, L_{DNA} — длина молекулы ДНК, T — температура (обычно диапазон изменения от 4°C до $\approx 96^\circ\text{C}$), μ — ионная сила раствора (обусловленная концентрацией соли, необходимой для нейтрализации отрицательных зарядов фосфатных групп ДНК), R^+ — однозарядный катион соли, используемой для создания ионной силы раствора. (а) Двухцепочечные молекулы ДНК в ПЭГ-содержащем растворе при C_{PEG} ниже критического значения C_{PEG}^c (молекулы ПЭГ показаны кружками). (б) Квазинематический слой, образованный двухцепочечными молекулами ДНК (кружок в центре означает ось вращения холестерической структуры). Прямоугольная рамка и стрелки соответствуют осмотическому давлению ПЭГ-содержащего раствора. (в) Обладающая специфическими оптическими свойствами частица с пространственно-закрученной (холестерической) структурой, сформированная при концентрации ПЭГ, превышающей C_{PEG}^c (P — шаг спиральной структуры).

детельством макроскопической (холестерической) закрутки соседних квазинематических слоёв, образованных молекулами ДНК. Чтобы подчеркнуть и эту особенность, для обозначения таких дисперсных систем используют термины *холестерическая жидкокристаллическая дисперсия* (ХЖКД) или *холестерик* ДНК [6, 7].

Таким образом, при исследовании физико-химических свойств частиц ХЖКД ДНК получена достаточно подробная информация об условиях их формирования и факторах, позволяющих управлять их свойствами. Эта информация положена в основу подходов к превращению "жидких" частиц ХЖКД ДНК в "твёрдые" бионаобъекты.

3. Создание "твёрдых" частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК

3.1. Физико-химический подход

Оценивая свойства "жидких" частиц ДНК с учётом химии полимеров, можно отметить, что имеются всего лишь два варианта физико-химического подхода к созданию "твёрдых" частиц ЖКД ДНК: 1) "сшивание" соседних молекул ДНК внутри частиц ХЖКД ДНК; 2) высаливание молекул ДНК внутри частиц ХЖКД ДНК.

3.1.1. Сшивание соседних молекул ДНК внутри частиц ХЖКД. На рисунке 2а представлена гипотетическая структура "жидкой" частицы дц-ДНК. Исходя из общих соображений физики полимеров [8], можно предпо-

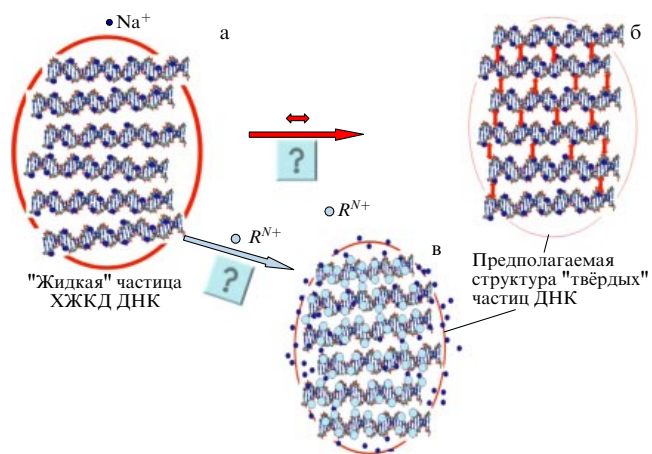


Рис. 2. Гипотетическая структура "жидкой" частицы дц-ДНК (а) и возможные варианты её трансформации в "твёрдую" частицу: в результате сшивания соседних молекул ДНК (б) или вследствие высаливания молекул ДНК в квазинематических слоях, приводящего к локальной деформации молекул в слоях (в). R^+ — многозарядный катион соли, используемой для нейтрализации отрицательных зарядов фосфатных групп ДНК; стрелками на рис. б показаны наномостики, "сшивающие" молекулы ДНК в квазинематических слоях.

жить, что переход частицы из "жидкого" состояния в "твёрдое" может произойти в результате образования "мостиков" между соседними молекулами дц-ДНК (рис. 2б, в). Учитывая расстояние между молекулами (2,5–5,0 нм, в зависимости от осмотического давления раствора), такие "мостики" можно назвать *наномости-*

ками, возникающую при этом конструкцию — наноконструкцией на основе молекул дц-ДНК или бионано-объектом, а сам подход — наноконструированием на основе ДНК.

Основную идею этого варианта создания "твёрдых" частиц ДНК можно сформулировать следующим образом. Молекулы ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД находятся в "растворимом" состоянии и между этими молекулами имеется "свободное" пространство. Молекулы химических или биологически активных соединений ("гостей"), оказавшиеся за счёт диффузии в свободном пространстве, могут "сшить" соседние молекулы ДНК. В результате такого сшивания может сформироваться интегрированная структура, содержащая все молекулы ДНК, упорядоченные в квазинематических слоях частицы ХЖКД.

Интегрированная структура, имеющая очень высокую молекулярную массу, будет несовместима с полимеросодержащим раствором. Это означает, что сшивание соседних молекул ДНК приведёт к переходу частиц ХЖКД из жидкого состояния в твёрдое.

С физико-химической точки зрения предложенный вариант аналогичен, по существу, гелеобразованию в результате образования химических "сшивков" между соседними молекулами дц-ДНК (при этом следует иметь в виду, что при классическом гелеобразовании наномостики между молекулами полимеров могут иметь разную длину и располагаться в пространстве произвольным образом [8].) В рассматриваемом случае гелеобразование должно быть реализовано таким образом, чтобы фиксированное расстояние между соседними молекулами дц-ДНК в квазинематических слоях одной частицы ХЖКД не изменялось, а пространственная спиральная структура частиц ХЖКД ДНК сохранялась. Следовательно, мы имеем дело с достаточно специфическим процессом гелеобразования "внутри частицы", имеющей нанометрические параметры.

Предложенный подход был реализован экспериментально [1]. Было показано, что наномостики, состоящие из чередующихся молекул антрациклинового антибиотика дауномицина и ионов двухвалентной меди, соединяют молекулы ДНК, расположенные как в одном, так и в соседних квазинематических слоях. Такой способ гелеобразования существенно меняет свойства жидких частиц ХЖКД ДНК и позволяет формировать твёрдые частицы. Образование твёрдых частиц резко увеличивает амплитуду аномальной полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров ДНК ($\lambda \sim 270$ нм), а также индуцирует появление аномальной полосы в области поглощения хромофоров дауномицина ($\lambda \sim 510$ нм), входящих в состав наномостиков (рис. 3).

Стабильность твёрдых частиц ДНК зависит от числа и свойств наномостиков, а не от осмотического давления раствора. В этом случае появляется возможность для иммобилизации твёрдых частиц на поверхности мембранного фильтра и определения их формы и размера (жидкостной характер упаковки молекул ДНК в исходных частицах ХЖКД не позволял это делать). Изображения твёрдых частиц в атомно-силовом микроскопе (АСМ) приведены на рис. 4. Форма частиц близка к сфероцилиндрической, и, хотя их размеры изменяются от 100–200 нм до 800–1000 нм, средний диаметр частиц лежит в пределах 400–500 нм, т.е. совпадает с размерами исходных частиц ХЖКД ДНК, оцениваемыми теорети-

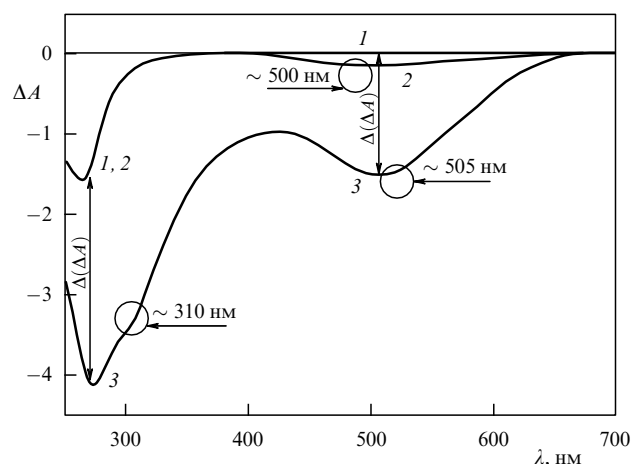


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма ХЖКД ДНК до и после её обработки: 1 — спектр КД исходной ХЖКД ДНК, 2 — спектр КД той же ХЖКД ДНК после её обработки противоопухолевым антрациклиновым антибиотиком (дауномицином), 3 — спектр КД ХЖКД-комплекса (ДНК–дауномицин) после обработки CuCl_2 . $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-3}$ (в оптических единицах) — разность в поглощении излучения, циркулярно поляризованного влево (A_L) и вправо (A_R), длина оптического пути $l = 1$ см. $\Delta(\Delta A)$ — приращение полос в результате образования наномостиков.

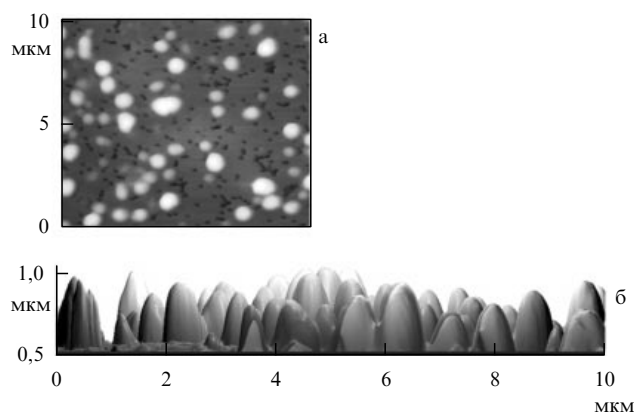


Рис. 4. Вид "твёрдых" частиц, сформированных в результате образования искусственных наномостиков между двухцепочечными ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД и иммобилизованных на ядерном мембранном фильтре: (а) вид сверху, (б) вид сбоку. Изображения получены с помощью АСМ.

чески для случая растворов, имеющих фиксированное осмотическое давление (см. выше).

Результаты, полученные с помощью АСМ, позволяют оценить несколько параметров твёрдых частиц ДНК [2]. Было показано, что одна твёрдая частица ДНК содержит примерно $1,6 \times 10^4$ молекул ДНК, молекулярная масса одной твёрдой частицы $\approx (1,0 - 1,2) \times 10^{10}$ Да, т.е. достаточно близка к молекулярной массе исходных частиц ХЖКД ДНК, образующихся при фазовом исключении ($4,76 \times 10^{10}$ Да). Наконец, плотность упаковки азотистых оснований (хромофоров) ДНК составляет около 1 хромофора на 1 нм^3 . Эта оценка также важна, поскольку она показывает, что теоретические требования [6] для появления аномальной полосы в спектре КД сохраняются и в случае твёрдых частиц ДНК.

Таким образом, первый вариант позволяет создавать твёрдые частицы ДНК, пригодные для манипулирования ими.

3.1.2. Высаливание молекул ДНК внутри частиц ХЖКД. Результат второго подхода к созданию твёрдых частиц ДНК иллюстрирует рис. 2.

Идея этого подхода может быть сформулирована следующим образом. *Соседние молекулы ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД находятся в "растворимом" состоянии. Многозарядные катионы, диффундирующие в частицы дисперсии, могут вытеснять ионы натрия и эффективно нейтрализовать отрицательные заряды фосфатных групп молекул ДНК, резко понижая растворимость этих молекул (вплоть до выпадения ДНК в осадок — так называемого высаливания ДНК [3]. Взаимодействие даже между отдельными фрагментами соседних комплексов дц-ДНК — многозарядный катион может привести к формированию интегрированной (твёрдой) структуры, содержащей все молекулы ДНК, упорядоченные в квазинематических слоях частицы ХЖКД. Созданная структура будет существовать в отсутствие осмотического давления полимерсодержащего раствора.*

С физико-химической точки зрения, предлагаемый подход отличается от подхода, описанного в разделе 3.1.1, поскольку он основан не на химическом сшивании дц-молекул ДНК, а на иницировании гелеобразования в результате физического сшивания ДНК. Такое гелеобразование внутри частицы ХЖКД осуществляется в результате понижения растворимости молекул дц-ДНК (высаливания ДНК).

Для случая высаливания молекул ДНК особый интерес представляют катионы редкоземельных элементов (РЗЭ). Во-первых, катионы РЗЭ нейтрализуют отрицательные заряды фосфатных групп ДНК, причём комплексы этих катионов с фосфатными группами практически нерастворимы (например, константа растворимости фосфата гадолиния составляет около 10^{-12} М). Во-вторых, взаимодействуя с парами оснований линейной дц-ДНК, эти катионы вызывают локальные нарушения её вторичной структуры, аналогичные известному $B \rightarrow Z$ -переходу [9], т.е. превращению правоспиральной формы молекулы ДНК (В-формы) в левоспиральную форму (Z-форму).

При разработке основ второго подхода к получению "твёрдых" частиц ДНК использовались соли гадолиния. Было показано [10, 11], что при определённой концентрации катионов гадолиния (Gd) в ПЭГ-содержащих ХЖКД ДНК-растворах происходит усиление отрицательной аномальной полосы в их КД-спектре. При этом неоднородная химическая природа пар оснований в молекулах ДНК такова, что взаимодействие катионов Gd с дц-ДНК в составе частиц ХЖКД приводит к локальным нарушениям вторичной структуры ДНК, которые проявляются в уменьшении (вплоть до полного исчезновения) характеристического пика на кривых малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на фазах, сформированных из частиц ХЖКД ДНК, обработанных раствором соли Gd [12]. (Несмотря на исчезновение упорядоченного расположения соседних двухцепочечных молекул ДНК в квазинематических слоях, хромофоры не выходят из плоскостей этих слоёв.)

Следует подчеркнуть, что увеличение амплитуды полосы КД происходит при высокой концентрации гадолиния в ПЭГ-содержащем растворе, при которой имеет место не только замещение ионов натрия ионами гадолиния в ближайшем окружении молекул дц-ДНК, но и сами молекулы дц-ДНК, фосфатные группы которых

образуют комплексы с ионами Gd, утрачивают свою растворимость (происходит высаливание молекул ДНК в частицах ХЖКД [10]). В этих условиях взаимодействие между соседними молекулами (фрагментами) ДНК в квазинематических слоях усиливается и приводит к формированию интегрированной структуры частицы ХЖКД. Высокая молекулярная масса такой частицы в сочетании с эффектом высаливания дц-ДНК делает интегрированную структуру несовместимой с ПЭГ-содержащим раствором и происходит превращение "жидких" частиц ХЖКД ДНК в "твёрдые" [1].

Такие частицы могут существовать в отсутствие осмотического давления ПЭГ-содержащего раствора, что и подтверждает их иммобилизация на поверхности ядерного мембранного фильтра. Из рисунка 5 видно, что частицы существуют как независимые объекты, что указывает на наличие у них некомпенсированного поверхностного заряда, предотвращающего их агрегацию. Средний размер "твёрдых" частиц, который лежит в пределах 400–500 нм (совпадает с размером исходных частиц ХЖКД ДНК), указывает на сохранение высокой плотности упаковки пар оснований (хромофоров) молекул ДНК в "твёрдых" частицах, образованных комплексами (ДНК – Gd).

Таким образом, второй вариант позволяет создавать "твёрдые" частицы ДНК, также пригодные для манипулирования ими. Отметим, что рассмотренные выше варианты охватывают практически все подходы к созданию "твёрдых" частиц ДНК, возможные с точки зрения физической химии полимеров.

3.2. Нанотехнологический подход

Развитие нанотехнологии открыло возможность ещё одного варианта создания "твёрдых" частиц ДНК.

В последние годы появился ряд обзоров [13–16], посвящённых исследованиям свойств жидких кристаллов низкомолекулярных соединений в присутствии наночастиц разного происхождения. В этих обзорах показано, что наночастицы разной природы не только являются совместимыми с жидкокристаллическими фазами низкомолекулярных соединений, но и при определённых условиях вызывают изменение структуры этих фаз. Такие исследования формируют новое, ещё не имеющее собственного названия, направление в нанотехнологии, которое открывает возможность направленного изменения оптических и электрооптических характеристик жидких кристаллов под действием наночастиц как "управляющих" добавок и создания на их основе материалов, обладающих новыми свойствами.

Появление этого направления (рис. 6) позволяет сформулировать идею нанотехнологического подхода к созданию "твёрдых" частиц ДНК следующим образом. *Молекулы дц-ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД находятся в "растворимом" состоянии, и между этими молекулами имеется "свободное" пространство. Наночастицы, имеющие размер, сопоставимый с расстоянием между соседними молекулами дц-ДНК, могут заполнять свободное пространство, играя роль гомогенной среды, через которую осуществляется взаимодействие между дц-молекулами ДНК в квазинематических слоях. В этих условиях может сформироваться интегрированная структура, содержащая все молекулы ДНК, упорядоченные в квазинематических слоях частицы ХЖКД, и несовместимая с водно-полимерным раствором.*

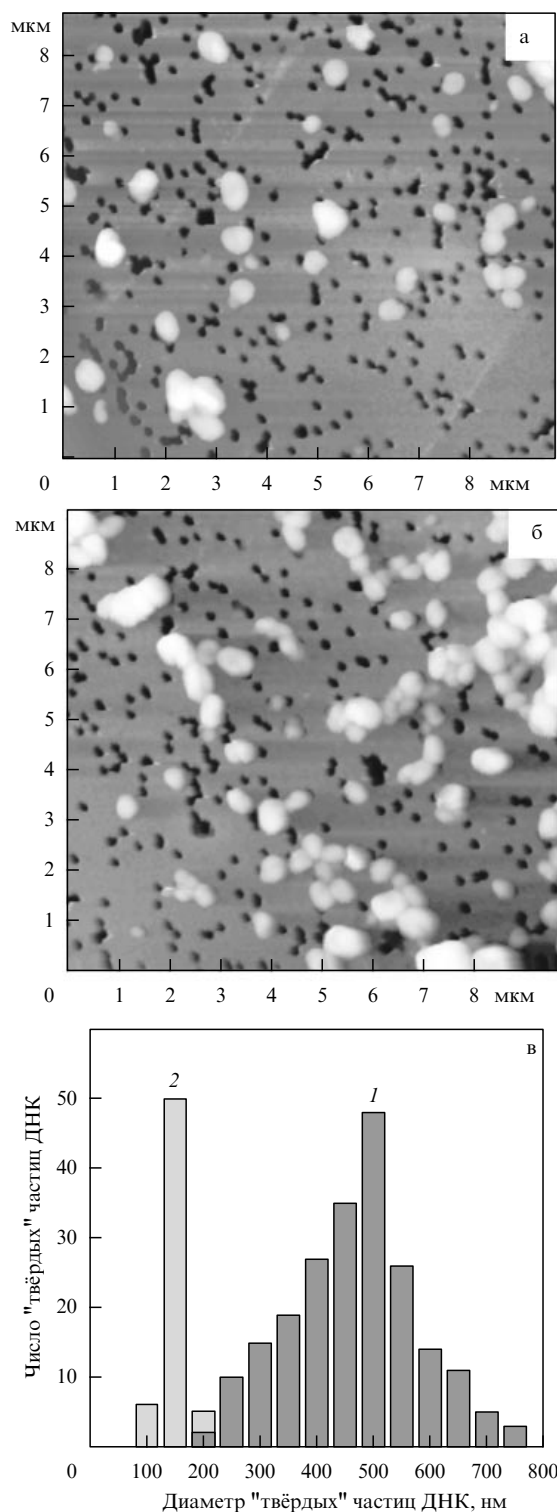


Рис. 5. (а, б) Двумерные АСМ-изображения "твёрдых" частиц ДНК (при разных концентрациях), образованных при обработке частиц ХЖКД ДНК ионами Gd и иммобилизованных на ядерном мембранном фильтре. Небольшие тёмные области — отверстия в ядерном мембранном фильтре из полиэтиленфталата (ПЭТФ). (в) Распределение по размерам "твёрдых" частиц ДНК (1) и пор в ядерном мембранном фильтре (2).

С нанотехнологической точки зрения наибольший интерес вызывают наночастицы золота (нано-Au). Во-первых, нано-Au обладают уникальными химическими и физическими свойствами, зависящими от размера, фор-

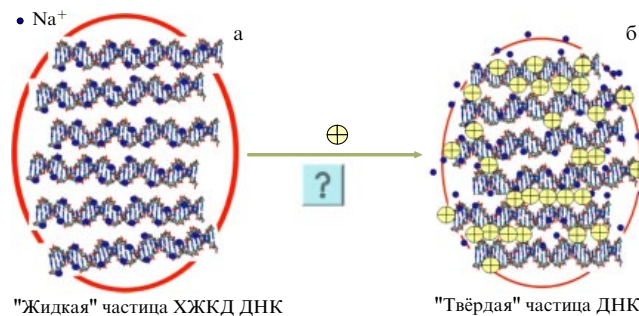


Рис. 6. Наночастицы (показанные кружками с крестом) с размером, сопоставимым с расстоянием между соседними молекулами дц-ДНК в жидкой частице ХЖКД ДНК (а), могут заполнять "свободное" пространство, играя роль гомогенной среды, через которую осуществляется взаимодействие между молекулами дц-ДНК в квазинематических слоях частиц ХЖКД (б).

мы, структуры и их диэлектрического окружения [17]. Во-вторых, известно, что нано-Au могут образовывать ансамбли (агрегаты) вблизи поверхности линейных одноцепочечных молекул ДНК. Показано, что образование ансамблей из нано-Au сопровождается формированием суперструктур, состоящих из чередующихся дц-молекул ДНК и нано-Au. Эти результаты свидетельствуют о том, что молекулы ДНК после взаимодействия с нано-Au могут образовывать планарные структуры, несмотря на наличие анизотропных свойств у исходных молекул ДНК. В-третьих, процесс сближения соседних нано-Au и образование агрегатов из таких наночастиц вблизи одноцепочечных молекул ДНК приводит к усилению так называемой полосы локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в видимой области спектра поглощения и к взаимодействию между соседними "плазмонами" ("перекрыванию плазмонов"), сопровождающемуся смещением полосы ППР в красную или синюю спектральные области в зависимости от ряда параметров (расстояния между частицами, размера и формы образующихся агрегатов, диэлектрической постоянной среды, наличия прослоек между соседними нано-Au и т.д.) [17].

Следует добавить, что ответ на вопрос о причинах, определяющих образование агрегатов из соседних нано-Au вблизи молекул ДНК, особенно нано-Au малого размера (5 нм и менее), в настоящее время отсутствует [13, 18]. Наконец, исследования действия нано-Au на свойства жидких кристаллов или ЖКД дц-молекул ДНК находятся в начальной стадии [24], хотя результаты таких исследований интересны как с биологической [25], так и нанотехнологической точек зрения.

Спектры кругового дихроизма холестерических жидкокристаллических дисперсий, образованных из двух типов НК и обработанных нано-Au, показаны на рис. 7. Видно, что амплитуды аномальных полос резко уменьшаются при увеличении концентрации нано-Au в полимерсодержащем растворе (дзета-потенциал (электрокинетический потенциал) нано-Au лежит в пределах $-(30-40)$ мВ, т.е. наночастицы несут отрицательный заряд). Уменьшение амплитуды аномальной полосы начинается с критической концентрации нано-Au, составляющей приблизительно 1000 нано-Au на одну частицу ХЖКД ДНК, и зависит от размера наночастиц. Такое уменьшение оптической активности свидетельствует, со-

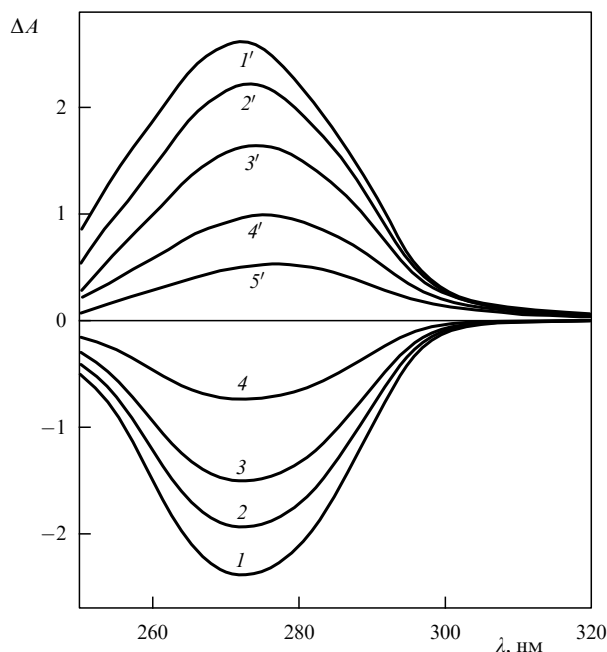


Рис. 7. Спектры кругового дихроизма ХЖКД двухцепочечной ДНК (кривые 1–4) и ХЖКД двухцепочечных молекул полирибонуклеотида (poly (I) × poly (C)) (кривые 1'–5'), обработанных наночастицами Au (2 нм) в разной концентрации; $C_{\text{DNA}} = C_{\text{poly (I)} \times \text{poly (C)}} = 9 \text{ мкг мл}^{-1}$; $C_{\text{PEG}} = 150 \text{ мг мл}^{-1}$; $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ (оптические единицы), $l = 1 \text{ см}$.

гласно теории [6], о раскрутке пространственной спиральной структуры частиц ХЖКД, т.е. о нематизации их структуры, независимо от особенностей вторичной структуры нуклеиновых кислот. Таким образом, частицы ХЖКД ДНК, обработанные нано-Au, в отличие от "твёрдых" частиц ХЖКД ДНК другого происхождения, не обладают аномальной оптической активностью.

Отмеченный эффект уменьшения аномальной оптической активности является уникальным, поскольку ни одно из химически значимых веществ или биологически активных соединений, взаимодействующих с молекулами ДНК, упорядоченными в структуре частиц ХЖКД, не вызывает нематизации пространственной структуры этих частиц при комнатной температуре.

С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния был проведён структурный анализ фаз, сформированных из частиц ХЖКД ДНК и нано-Au. Этот анализ показал: а) рентгенографическая упорядоченность соседних молекул дц-ДНК в таких частицах не нарушается, и расстояние между молекулами, если и увеличивается, то незначительно [12]; б) в свободном пространстве между молекулами двухцепочечной ДНК, упорядоченными в квазинематических слоях частиц ХЖКД, присутствуют кластеры золота, линейный размер которых достигает 40–50 нм [21].

Образование кластеров золота между молекулами ДНК может сопровождаться, во-первых, нарушением пространственного расположения соседних квазинематических слоёв — в этих условиях спиральная закрутка слоёв в частице ХЖКД ДНК должна изменяться. Во-вторых, фиксация единичных нано-Au между соседними молекулами ДНК и формирование между ними протяжённых кластеров золота означает, что в результате действия нано-Au на частицы ХЖКД ДНК происходит

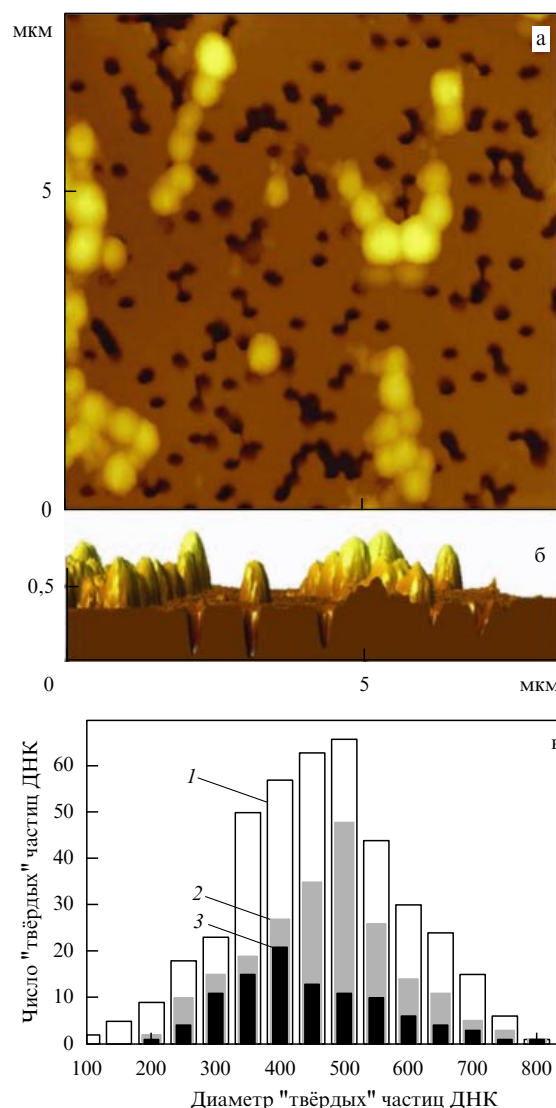


Рис. 8. В свободном пространстве между молекулами дц-ДНК, упорядоченными в квазинематических слоях частиц ХЖКД, присутствуют кластеры золота, размер которых может достигать 40–50 нм. (а) Двумерное АСМ-изображение "твёрдых" частиц ДНК, образованных при обработке частиц ХЖКД ДНК наночастицами золота и иммобилизованных на ядерном мембранном фильтре. (б) Вид тех же частиц сбоку. (в) Распределение по величине (диаметру) "твёрдых" частиц ДНК, полученных в результате: 1 — сшивания молекул ХЖКД ДНК наномостиками, 2 — обработки частиц ХЖКД ДНК солями гадолиния, 3 — обработки частиц ХЖКД ДНК наночастицами золота.

их "металлизация". В-третьих, образование кластеров золота в свободном пространстве между молекулами ДНК, фиксированными в квазинематических слоях частиц ХЖКД ДНК, приводит к тому, что взаимодействие между этими молекулами, реализуемое как через единичные наночастицы, так и особенно через кластеры золота, усиливается и происходит физическое сшивание соседних молекул ДНК в квазинематических слоях. В этих условиях образуется интегрированная структура, которая включает в себя практически все молекулы ДНК одной частицы. Растворимость этой структуры, имеющей высокую молекулярную массу, уменьшается, и она становится несовместимой с ПЭГ-содержащим раствором. Стабильность интегрированной структуры

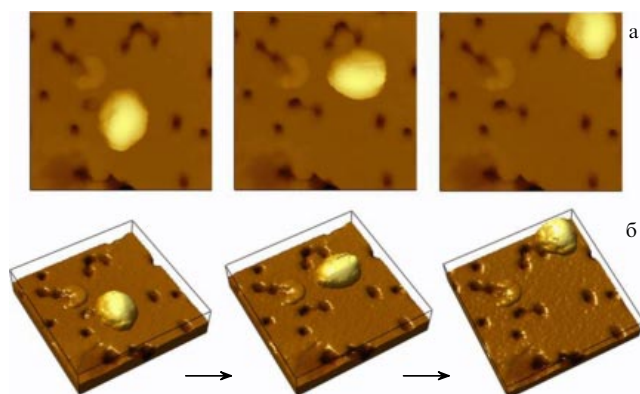


Рис. 9. Металлизированные частицы ХЖКД ДНК перемещаются по поверхности мембранного фильтра при приближении кантилевера АСМ, и их можно фиксировать в определённых местах на фильтре: (а) двумерное АСМ-изображение, (б) трёхмерное АСМ-изображение.

определяется не свойствами исходного раствора ПЭГ, а числом и свойствами единичных нано-Au и кластеров золота в её составе. Это означает, что происходит переход частиц ХЖКД ДНК из "жидкого" состояния в "твёрдое". "Твёрдая" (нерастворимая) структура может существовать даже в отсутствие высокого осмотического давления раствора (рис. 8).

"Твёрдые" металлизированные частицы комплексов (ДНК – нано-Au), в отличие от "твёрдых" частиц, сформированных в результате гелеобразования внутри частиц (см. раздел 3.1), слабо связаны с поверхностью ядерного мембранного фильтра. Вследствие этого металлизированные частицы ХЖКД ДНК перемещаются по поверхности мембранного фильтра при приближении кантилевера АСМ и их можно фиксировать в определённых местах на фильтре (рис. 9). Перемещение металлизированных частиц ХЖКД ДНК может представлять дополнительный интерес с нанотехнологической точки зрения, поскольку открывает возможность создания матриц, обладающих специфическими свойствами.

Таким образом, нанотехнологический вариант позволяет создавать "твёрдые" частицы ДНК, также пригодные для эффективного манипулирования ими.

4. Области применения жидких и твёрдых наноконструкций на основе двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот и их комплексов

Уже сейчас можно говорить о следующих применениях наноконструкций на основе двухцепочечных молекул ДНК (РНК):

1. "Жидкие" наноконструкции на основе двухцепочечных молекул ДНК (РНК) (или их комплексов) представляют собой полифункциональные сенсорные элементы (биодатчики) для оптических аналитических систем (биосенсоров), позволяющих определять биологически активные соединения (БАС): антибиотики, генотоксиканты, наночастицы и т.д. — в лабораторных и физиологических жидкостях в задачах *медицины (диагностика, фармакокинетика), экологии, биотехнологии*.

2. "Твёрдые" наноконструкции, в которых концентрация ДНК (РНК) или "гостевых" молекул (БАС) превышает несколько сотен миллиграммов на 1 мл, могут быть

использованы в качестве носителей БАС, вводимых в состав этих структур, в *медицине (терапия), биотехнологии*, например в качестве носителей гадолиния при нейтрон-захватной терапии злокачественных новообразований.

3. "Твёрдые" наноконструкции с управляемыми физико-химическими свойствами, включённые в состав полимерных плёнок (гидрогелей), могут быть использованы в технике (*оптике, электронике*), в частности, в качестве вторичных стандартов оптической активности или фильтров, молекулярных сит и т.д.

Другие примеры практического применения "жидких" и "твёрдых" частиц ДНК, созданных на основе разных вариантов жидкокристаллического подхода, приведены в работах [1–3].

5. Заключение

Результаты изучения свойств жидкокристаллических дисперсий открывают дорогу для нового направления структурной нанотехнологии ДНК. Рассматривая разные варианты подхода к формированию "твёрдых" частиц ХЖКД дц-ДНК с точки зрения структурной нанотехнологии, подчеркнём ещё раз ряд принципиальных моментов.

Во-первых, во всех вариантах в качестве "строительных" наноразмерных блоков выбирались молекулы дц-ДНК, образующие квазинематические слои в частицах ХЖКД, причём молекулы ДНК рассматриваются просто как химические соединения, обладающие специфической пространственной структурой.

Во-вторых, во всех случаях использован процесс, который реализуется на нанометровых расстояниях между молекулами ДНК в квазинематических слоях (этот процесс можно условно назвать *гелеобразованием внутри частиц ХЖКД ДНК*).

В-третьих, все варианты жидкокристаллического подхода приводят к формированию интегрированной структуры ДНК, которая несовместима с ПЭГ-содержащим раствором.

Наконец, создаваемые интегрированные структуры ДНК, несмотря на постоянство их пространственных параметров, различаются не только по содержанию в них химически значимых веществ или биологически активных соединений, но и по своим специфическим свойствам.

Таким образом, жидкокристаллический подход к структурной нанотехнологии позволяет формировать "твёрдые" частицы ХЖКД ДНК (наноконструкции ДНК) с разными свойствами [2], которые могут найти самые разнообразные (иногда неожиданные) применения.

Благодарности. Представленные в данной статье результаты получены при финансовой поддержке Президиума РАН в рамках программы фундаментальных исследований "Фундаментальные науки — медицине" и Министерства образования и науки РФ (государственный контракт 14.527.12.0012).

Список литературы

1. Yevdokimov Yu M, Salyanov V I, Skuridin S G *Nanostructures and Nanoconstructions Based on DNA* (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2012)

2. Yevdokimov Yu M et al. *Structural DNA Nanotechnology: Liquid-Crystalline Approach* (Kerala, India: Transworld Research Network, 2012); http://www.trnres.com/ebook/uploads/yuric/T_1358250432Yuri%20e-book.pdf
3. Yevdokimov Yu M et al. *DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions* (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2011)
4. Dogic Z, Frenkel D, Fraden S *Phys. Rev. E* **62** 3925 (2000)
5. Belyakov V A et al. *Liquid Cryst.* **20** 777 (1996)
6. Yevdokimov Yu M et al. *The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid-Crystalline Dispersions* (New York: Nova Science, 2011)
7. Goldar A, Thomson H, Seddon J M *J. Phys. Condens. Matter* **20** 035102 (2008)
8. Тареп А А *Физикохимия полимеров* (М.: Химия, 1978); Tager A *Physical Chemistry of Polymers* (Moscow: Mir Publ., 1978)
9. Gersanovski D et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gene Struct. Express.* **824** 313 (1985)
10. Yevdokimov Yu M et al. *Int. J. Biol. Macromol.* **37** 165 (2005)
11. Yevdokimov Yu M et al. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2** (3) 281 (2011)
12. Shtykova E V et al. *Eur. Biophys. J.* **39** 1313 (2010)
13. Louis C, Pluchery O *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology* (London: Imperial College Press, 2012)
14. Hegmann T, Qi H, Marx V M *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **17** 483 (2007)
15. Nealon G L et al. *Beilstein J. Org. Chem.* **8** 349 (2012)
16. Stamatiou O et al. *Topics Current Chem.* **318** 331 (2012)
17. Дыкман Л А и др. *Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение* (М.: Наука, 2008)
18. Jin R et al. *J. Am. Chem. Soc.* **125** 1643 (2003)
19. Скуридин С Г и др. *Биол. мембраны* **28** (3) 191 (2011); Skuridin S G et al. *Biochemistry A Membrane Cell Biol.* **5** 191 (2011)
20. Захидов С Т и др. *Изв. РАН. Сер. биол.* (6) 645 (2013); Zakhidov S T et al. *Biol. Bull.* **40** 493 (2013)
21. Евдокимов Ю М и др. *Биофизика* **58** 210 (2013); Yevdokimov Yu M et al. *Biophysics* **58** 148 (2013)

PACS numbers: 42.62.Be, 42.62.If, 42.65.Re,
63.20.kd, **63.20.-e**, 78.47.J-, 78.47.jg
DOI: 10.3367/UFNr.0184.201406j.0672

Фемтосекундная спектроскопия перспективных материалов

С.В. Чекалин

1. Введение

Одним из наиболее мощных инструментов для исследования динамики и структуры различных материалов являются неразрушающие оптические методы, позволяющие сохранить в ходе исследования все функциональные свойства исследуемого образца. Очевидно, что в свойствах перспективных наноструктурированных материалов определяющую роль играет пространственное распределение компонентов наноструктур, их взаимная упаковка, а также их взаимодействие. В свою очередь информацию об этом можно получить, исследуя релаксационные свойства вещества. Нанометровые размеры субъединиц предполагают, что минимальные времена релаксации возбуждений лежат в фемтосекундном диапазоне. Поэтому фемтосекундная спектроскопия может использоваться для исследования и сертификации таких

материалов. Это было продемонстрировано в экспериментах по сверхбыстрой спектроскопии фотоиндуцированных процессов в наноструктурах фуллерен – металл различных типов [1, 2], где обнаружена сильная зависимость наблюдавшейся релаксации не только от соотношения количеств металла и фуллерена, но и от их взаимной упаковки в образцах.

Почти четыре последних десятилетия из сорокапятилетней истории Института спектроскопии РАН (ИСАН) связано со сверхбыстрой спектроскопией с помощью ультракоротких лазерных импульсов (УКИ) [1]. Работы по применению УКИ в научных исследованиях начались в 1973 г. с пикосекундными лазерами (см. [3] и приведённые там ссылки). Тогда же был понят механизм генерации фемтосекундных импульсов при самофокусировке излучения в активном элементе [4], используемый в твердотельных лазерах "третьего поколения" [5], получивших в настоящее время наибольшее распространение. Первый в СССР фемтосекундный генератор УКИ на красителе был запущен в ИСАН [6] в 1979 г., однако потребовалось ещё несколько лет для создания аппаратуры, позволившей провести первый эксперимент по исследованию сверхскоростной динамики с фемтосекундным временным разрешением [7]. В начале 2004 г. современная, использующая лазеры третьего поколения, фемтосекундная техника, появившаяся в ИСАН благодаря поддержке РАН и других организаций, была собрана в единый уникальный спектрометрический комплекс в Центре коллективного пользования (ЦКП) [1]. Это позволило начать совместные эксперименты со многими российскими институтами, круг которых в настоящее время непрерывно расширяется, как и экспериментальные возможности комплекса.

2. Фемтосекундный лазерный комплекс Центра коллективного пользования Института спектроскопии РАН

Лазерный комплекс ЦКП "Оптико-спектральные исследования" ИСАН подробно описан в [1], поэтому упомянем только о расширении его возможностей за прошедшие восемь лет.

1. Выходная энергия лазерного импульса на длине волны 800 нм увеличилась до 4 мДж, а длительность импульса сократилась до 30 фс.

2. Запущен терагерцевый канал (см. раздел 4.2).

3. Запущена схема возбуждения – зондирования на основе фотоионизационного времяпролётного масс-спектрометра, сопряжённого с импульсным сверхзвуковым соплом для исследования динамики кластеров (см. раздел 3.1.3).

4. Разработаны одноканальные системы регистрации для видимого и инфракрасного (ИК) диапазонов с чувствительностью до 10^{-5} .

5. Созданы нанолокализованные источники электронов, ионов и рентгеновского излучения на основе микрокапилляров с возможностью перемещения в пространстве с нанометровой точностью (см. разделы 3.3, 4.1).

3. Эксперименты на оборудовании Центра коллективного пользования

В основных начатых и планируемых в ближайшем будущем экспериментах можно выделить два главных

С.В. Чекалин. Институт спектроскопии РАН,
Троицк, Москва, РФ
Email: chekalin@isan.troitsk.ru