

На правах рукописи



ЛИСИЦЫНА Екатерина Сергеевна

**ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ КРАСИТЕЛЕЙ С ДНК И ИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: Кузьмин Владимир Александрович
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты Ванников Анатолий Вениаминович
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией электронных и
фотонных процессов в полимерных
наноматериалах Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
физической химии и электрохимии имени А.Н.
Фрумкина Российской академии наук, Москва

Гришин Максим Владиславович
доктор физико-математических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории химической
физики наноструктур Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института химической физики им. Н.Н.
Семенова Российской академии наук, Москва

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт проблем
химической физики Российской академии наук.

Защита состоится «15» октября 2014 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета
Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по
адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н.
Семенова Российской академии наук и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/2014/>

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Кандидат химических наук



Мазалецкая Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Настоящая работа посвящена изучению спектрально-кинетических характеристик комплексов различных классов красителей с ДНК. В последние десятилетия, наряду с открытием, выделением и изучением различных ДНК-связывающихся регуляторных белков (таких как репрессоры, активаторы транскрипции, эндонуклеазы рестрикции, ДНК- и РНК-полимеразы), сформировалось отдельное и весьма разветвленное направление исследования взаимодействий с ДНК различных низкомолекулярных лигандов (красителей, антибиотиков, коротких пептидов и других биологически активных соединений). Эти лиганды являются не только объектами самостоятельного изучения, но и нашли широкое применение в противоопухолевой и противовирусной терапии, а также в качестве ДНК-специфичных молекулярных зондов в различных исследованиях. Таким образом, изучение комплексообразования красителей с биомакромолекулами, в частности с ДНК, является актуальным.

Интерес к катионным производным тетрафенилпорфиринов (ТФП) в отношении к ДНК обусловлен применением их в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ), а, следовательно, возможностью связывания с ДНК при локализации ФС в ядре клетки. Однако способность связываться с ДНК очевидно коррелирует со структурой исследуемых порфиринов, таким образом, анализ комплексообразования данных лигандов с ДНК позволяет подобрать наиболее перспективный ФС для дальнейших фотодинамических исследований.

Другим классом красителей, которые представляют интерес для исследователей в связи с ДНК, являются цианиновые красители. Цианиновые красители широко применяются в качестве флуоресцентных зондов для детекции ДНК и определения ее концентрации в биологических объектах. В частности, представители данного класса красителей с успехом применяются в экспериментах проточной цитометрии и методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Выбранный для исследования в данной работе цианиновый краситель SYBRGreen (SG) отличается высоким квантовым выходом флуоресценции в комплексе с ДНК по сравнению с выходом красителя в растворе, что обуславливает увеличение флуоресценции красителя при комплексообразовании с ДНК в > 1000 раз. Это свойство позволяет рассматривать краситель SG как весьма перспективный флуоресцентный зонд. Однако для красителей цианинового ряда характерен эффект самотушения при повышенных концентрациях, что может привести к некорректным результатам флуоресцентного анализа. Следовательно, актуальным является исследование процессов самотушения данного красителя в комплексе с биомакромолекулами. Процессы концентрационного самотушения красителей могут также иметь полезное практическое значение, которое состоит в применении красителя в качестве детектора процессов конденсации-деконденсации биомакромолекул.

Исследование различных характеристик наноразмерных частиц (НЧ) золота давно привлекает внимание исследователей, поскольку НЧ золота обладают уникальными свойствами – оптическими, магнитными, электронными и химическими, которые могут быть использованы в дальнейшем для различных биохимических и биомедицинских применений. Системы флуорофор-тушитель, включающие НЧ благородных металлов в качестве тушителя и молекулы органического красителя, выступающие в качестве флуоресцентных меток, получили большое распространение в биофотонике в последнее время. Способность золотых НЧ эффективно тушить флуоресценцию и биолюминесценцию находящихся рядом органических флуорофоров может применяться при разработке аналитических методов на основе флуориметрии. Поскольку подобные сенсорные системы можно использовать для качественного и количественного определения биомакромолекул, в частности, ДНК, важным является изучение природы взаимодействий в тройных системах краситель/ДНК/НЧ золота. Подобные знания могут помочь в создании более чувствительных и/или более селективных методов анализа ДНК *in vitro*, а в перспективе и *in vivo*.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение взаимосвязи структуры красителей, типа их комплексообразования с ДНК и спектрально-кинетических характеристик таких комплексов, а также исследование природы взаимодействий в тройных системах краситель/ДНК/НЧ золота методом спектрофлуориметрии и другими оптическими методами.

Основные задачи исследования:

- изучить влияние размера заместителей и наличия координированного металла в ядре тетрафенилпорфиринов на спектрально-кинетические характеристики их комплексов с ДНК;
- исследовать процессы самотушения флуоресценции красителя SYBRGreen в системах на основе ДНК с различной степенью молекулярной организации и выяснить механизм данного явления;
- изучить процесс комплексообразования в тройной системе, включающей краситель SYBRGreen, ДНК и наночастицы золота;
- определить спектрально-кинетические характеристики тройных систем на основе комплексов красителя SYBRGreen и молекул ДНК и наночастиц золота.

Научная новизна. Впервые проведено исследование комплексообразования новых синтетических катионных тетрафенилпорфириновых красителей с дц-ДНК, определены эффективные константы комплексообразования и установлена способность ТФП образовывать два типа комплексов с нуклеиновой кислотой (интеркаляционный и внешний, в малой бороздке). Установлена корреляция между структурой тетрафенилпорфиринов и их способностью связываться с ДНК, а также характером их связывания с ДНК. Впервые обнаружен эффект самотушения красителя SG в

молекулярно-организованных структурах на основе ДНК. Доказано, что резонансный перенос энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя лежит в основе эффекта самотушения флуоресценции. Обнаружен эффект «супертушения» флуоресценции SG наноразмерными золотыми частицами ($d \sim 2,5$ нм) на матрице ДНК, и впервые установлен механизм этого явления. Показано, что ключевым фактором в механизме этого эффекта является статическое тушение за счёт кооперативного связывания НЧ золота с красителем. Кооперативный характер связывания НЧ золота с красителем SG, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса обуславливает явление «супертушения» флуоресценции небольших мономерных флуорофоров наночастицами золота, природа которого до настоящего времени оставалась малоизученной.

Практическая значимость. Установленная в настоящей работе корреляция структуры катионных тетрафенилпорфиринов и их способности к комплексообразованию с ДНК представляет критерий отбора наиболее перспективных лигандов для последующих исследований на предмет фотодинамической активности. Данные, представленные в настоящей работе, раскрывают характер процессов самотушения красителя SG в различных системах на основе ДНК, накладывающих ограничения на его применение в качестве флуоресцентного зонда для детекции упорядоченных форм ДНК в биологических объектах. Таким образом, для корректного применения красителя во флуоресцентном анализе необходимо учитывать вклад процессов самотушения. С другой стороны, обнаруженный эффект концентрационного самотушения красителя SG позволяет применять его в качестве зонда для наблюдения за процессами конденсации-деконденсации ДНК, в том числе, в экспериментах с живыми клетками. Обнаружение эффекта супертушения флуоресценции красителя SG под действием наночастиц золота в водном растворе ДНК может стать основой для разработки высокочувствительных сенсоров, работающих на принципе тушения флуоресценции. Установленный механизм супертушения открывает возможность управлять работой такой сенсорной системы, а также подбирать оптимальные варианты флуорофоров и тушителей для этих целей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Увеличение стерических затруднений в молекуле порфирина (удлинение метиленового спейсера и введение металла) препятствует комплексообразованию красителя с ДНК и приводит к преобладанию менее прочного типа комплекса залегания по малой бороздке ДНК над более стабильным интеркаляционным типом комплекса.
2. При высоких уровнях заполнения ДНК красителем SG в дополнение к интеркаляционному комплексу происходит образование ассоциата красителя в малой бороздке ДНК.

3. В упорядоченных системах на основе ДНК осуществляется эффект самогашения флуоресценции красителя SG по механизму резонансного переноса энергии (hetero-FRET) с возбужденного состояния красителя на нефлуоресцирующий ассоциат красителя.
4. Эффект супертушения флуоресценции красителя SG под действием НЧ золота в растворе ДНК обусловлен, главным образом, статическим тушением за счёт кооперативного связывания НЧ золота с SG, интеркалированным в ДНК, с образованием нефлуоресцирующего комплекса ДНК/SG/Au₃.

Личный вклад автора. Соискатель участвовал в постановке задач, обсуждаемых в данной диссертации, затем проводил лично подготовку образцов и непосредственно все спектральные и кинетические эксперименты, а также обработку полученных данных. Автор также проводил анализ данных и принимал участие в формулировании выводов и подготовке статей к публикации.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на симпозиумах и конференциях: Всероссийский симпозиум "Современная химическая физика", Туапсе 2009, 2010; Ежегодная Международная молодёжная конференция ИБХФ РАН – ВУЗы, Москва 2009, 2010, 2011, 2012; 5 Международная конференция по порфиринам и фталоцианинам ICPP-5, 2008, Москва, Россия; 10 Международная конференция по химии порфиринов и их аналогов ICPC-10, 2009, Иваново, Россия; 5 Европейская конференция молодых ученых EYIC-5, 2011, Франкфурт-на-Одере, Германия, 12 Конференция по методам и применениям флуоресценции MAF-12, 2011, Страсбург, Франция; 1 Международная конференция по флуоресцентным биомолекулам и их составляющим – Структура и применения (FB³), 2012, Гётеборг, Швеция.

Публикации. Основные результаты работы по теме диссертации представлены в 10 печатных работах: 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 6 тезисов докладов конференций.

Структура и объем работы. Работа изложена на 118 страницах, включает 50 рисунков, 5 таблиц и список литературы (146 источников). Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

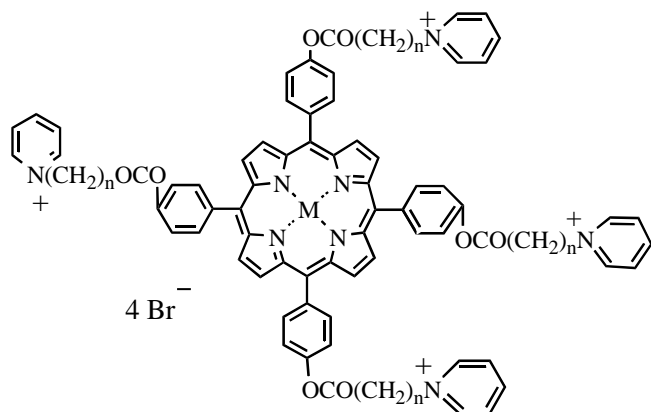
Во введении охарактеризована тема работы, обоснована ее актуальность, определены цель и задачи исследования.

Глава 1 содержит обзор литературы по теме диссертации, рассмотрена известная литература о комплексообразовании соединений-лигандов с биомакромолекулами и его значении в различных фотохимических и фотобиологических процессах, описаны все возможные типы комплексообразования лигандов с ДНК. Подробно представлены два исследованных в работе класса красителей, такие как катионные тетрафенилпорфирины и

цианиновые красители, их комплексообразование с ДНК, а также значение и возможные применения в биологии и медицине. Проведен анализ литературы по наночастицам золота различных размеров и форм, а также их физико-химическим свойствам и применениям. Рассмотрен резонансный перенос энергии по Ферстеру (FRET) как способ визуализации нуклеиновых кислот при помощи гетерохромофорных систем, а также систем, включающих наночастицы металлов.

В **Главе 2** приведены описания *материалов* и изложены *методы*, которые применялись для достижения цели данной работы.

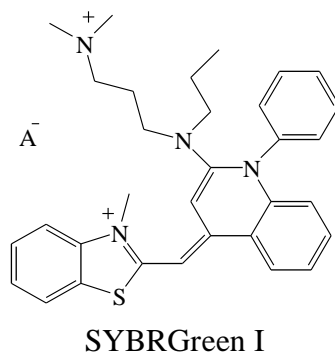
Объектами исследования одной из частей настоящей работы являются приведенные ниже **производные катионных ТФП**, которые были синтезированы на кафедре Химии и технологии биологически активных соединений Московского государственного университета тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова под руководством к.х.н., доц. Н.А. Брагиной.



MF004	n = 5, M = H ₂
MF005	n = 10, M = H ₂
MF016	n = 10, M = Zn

ТФП исследованного ряда отличаются длиной метиленовых спейсеров, прикрепляющих пиридиновую группу к макроциклу и наличием металла в координационной сфере порфирина.

Наряду с катионными ТФП в работе был использован широко распространенный катионный краситель цианинового ряда **SYBRGreen I** (Sigma, США).



Еще одним важным объектом исследования в данной работе были **наночастицы (НЧ) золота**, синтезированные в лаборатории Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина под руководством к.х.н. В.М. Рудого. Исследуемые НЧ

золота представляют собой коллоидный раствор (гидрозоль), содержащий частицы золота со средним диаметром $d \approx 2,5$ нм (данные динамического рассеяния света) и числовой концентрацией около 10^{15} мл⁻¹ ($\approx 2 \times 10^{-6}$ М). Молярную концентрацию НЧ золота определяли на основании количества частиц золота и постоянной Авогадро.

В качестве модельной ДНК была выбрана ДНК из молок осетровых рыб с молекулярной массой $(0,27-0,5) \times 10^6$ Да (Деринат®, Россия).

В работе были использованы такие методы, как **спектрофотометрия, флуоресцентная спектроскопия, поляризационная флуоресцентная спектроскопия, метод однофотонного счета** для определения времен жизни флуоресценции и **круговой дихроизм**.

В **Главе 3** описаны результаты спектрального исследования комплексообразования катионных ТФП с ДНК методами абсорбционной спектроскопии, кругового дихроизма и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

В параграфе 3.1 установлено комплексообразование трех производных ТФП MF004, MF005 и MF016 с дц-ДНК в буферном растворе. Отличительной особенностью спектров поглощения порфиринов является наличие полосы Sore ($\lambda \sim 220-240$ нм) и нескольких Q-полос в области от ~ 520 до ~ 650 нм. Комплексообразование исследуемых ТФП с ДНК характеризуется такими изменениями в спектрах поглощения порфиринов, как батохромный сдвиг всех полос спектра, гипохромный эффект полосы Sore (уменьшение коэффициента экстинкции при комплексообразовании), а также гиперхромный эффект Q-полос спектра (увеличение коэффициента экстинкции при комплексообразовании), как можно видеть на примере производного MF005 (рисунок 1). Отсутствие изобестической точки в спектрах поглощения MF005 при титровании возрастающими концентрациями ДНК свидетельствует о том, что образуется больше одного типа комплексов.

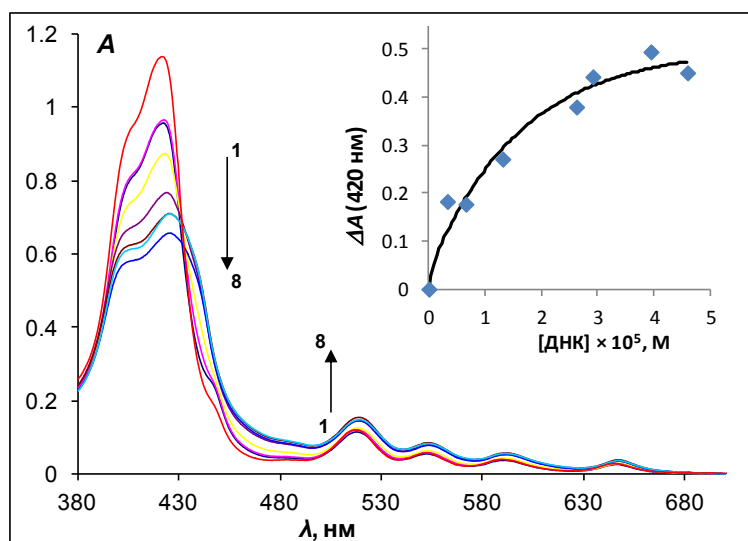


Рисунок 1. Спектры поглощения MF005 (1×10^{-5} М) в 10 мМ Na⁺-фосфатном буферном растворе (рН = 7) при различных концентрациях ДНК $C_{\text{ДНК}} = 0$ (1); $3,28 \times 10^{-6}$ (2); $6,56 \times 10^{-6}$ (3); $1,31 \times 10^{-5}$ (4); $2,62 \times 10^{-5}$ (5); $2,91 \times 10^{-5}$ (6); $3,94 \times 10^{-5}$ (7); $4,59 \times 10^{-5}$ (8) М. Вставка: зависимость изменения оптической плотности при 420 нм для MF005 от концентрации ДНК.

Равновесную константу комплексообразования для исследуемых катионных ТФП с ДНК определяли по изменению оптической плотности в полосе Core, для MF005 при $\lambda = 420$ нм, при добавлении ДНК согласно уравнению Бенеша-Гильдебранда (уравнение 1):

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon [MF]} + \frac{1}{K_b (\Delta \varepsilon [MF])} \cdot \frac{1}{[DNA]} \quad (1),$$

где ΔA представляет собой изменение оптической плотности ТФП MF при добавлении ДНК, $\Delta \varepsilon$ – разность коэффициентов экстинкции свободного и связанного состояний лиганда MF и K_b – константа комплексообразования, определяемая по уравнению 2 из рисунка 2.

$$K_b = \left(\frac{1}{\Delta \varepsilon [MF]} \right) / \left(\frac{1}{K_b \cdot \Delta \varepsilon [MF]} \right) \quad (2)$$

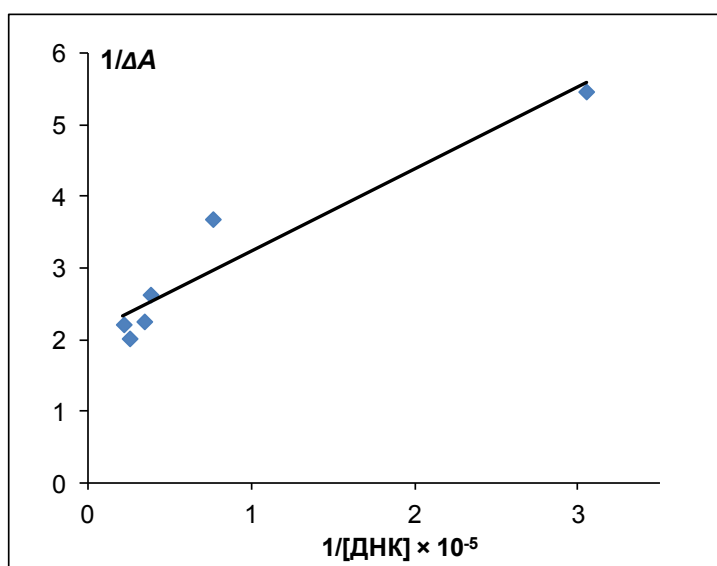


Рисунок 2. Зависимость поглощения MF005 (1×10^{-5} М) от концентрации ДНК в координатах Бенеша-Гильдебранда.

Полученные эффективные константы комплексообразования (таблица 1) сильно зависят от строения порфиринов, и склонность к комплексообразованию определяется наличием стерических препятствий, которые обусловлены наличием цепей различной длины в *мезо*-положениях порфирина. При переходе от соединения, несущего спейсеры из пяти CH_2 -групп, (MF004) к соединению, имеющему спейсеры с десятью CH_2 -группами, (MF005) увеличение стерических препятствий приводит к резкому уменьшению равновесной константы комплексообразования. Можно предположить, что наличие Zn в соединении MF016 приводит к такому изменению геометрии порфиринового кольца, которое препятствует интеркаляции макроцикла порфирина между азотистыми основаниями в молекуле ДНК. Кроме того, наличие двухзарядного иона Zn^{2+} в порфириновом кольце и отсутствие двух атомов водорода в макроцикле не дает возможности образовывать водородные связи между молекулами порфирина и образующими двойную спираль основаниями в структуре ДНК. Этот факт обуславливает сильное уменьшение константы комплексообразования металлокомплекса (MF016) по сравнению с безметалльным производным (MF005).

Таблица 1. Эффективные константы комплексообразования ТФП с ДНК

Формула соединения	K_b, M^{-1}
MF004, $n = 5$; $M = H_2$	$8,7 \pm 0,3 \times 10^5$
MF005, $n = 10$; $M = H_2$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^5$
MF016, $n = 10$, $M = Zn$	$1,3 \pm 0,5 \times 10^4$

В параграфе 3.2 представлено дополнительное подтверждение образования комплексов порфиринов и молекул ДНК по возникновению индуцированного КД сигнала в области поглощения ТФП. Поскольку молекулы исследуемых ТФП в растворе не имеют асимметричного атома углерода и являются оптически неактивными, возникновение индуцированной оптической активности в области полосы Core спектра поглощения порфиринов в присутствии молекул ДНК является неоспоримым доказательством взаимодействия лиганда и нуклеиновой кислоты.

В параграфе 3.3 на основании спектров кругового дихроизма определен тип комплекса исследуемых катионных ТФП с ДНК, используя оптические свойства молекулярно организованной структуры хжкд-ДНК. Было показано образование двух типов комплексов (интеркаляция между парами оснований ДНК и залегание в малой бороздке ДНК) всех трех исследованных ТФП с ДНК. Однако соотношение вкладов каждого из комплексов различается и коррелирует со структурой порфиринов. Увеличение длины спейсера и введение металла в координационную сферу порфирина уменьшает возможность образования им интеркаляционного комплекса с ДНК и, соответственно, увеличивает вклад комплекса залегания по малой бороздке ДНК.

Образование двух типов комплексов порфиринов с ДНК в различном соотношении в зависимости от структуры порфирина было также подтверждено измерениями времен жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$) исследуемых ТФП в отсутствие и в присутствии ДНК, описанными в параграфе 3.4. Результаты сведены в таблице 2.

Таблица 2. Изменение времени жизни флуоресценции производных ТФП в зависимости от растворителя.

Состав раствора	$\lambda_{возб}, \text{нм}$	$\lambda_{изм}, \text{нм}$	$\tau_{фл}, \text{нс}$
MF004 $(CH_2)_5$ в ДМСО	440	656	11,0 (100%)
MF004 $(CH_2)_5$ в буфере	440	656	10,7 (100%)
MF004 $(CH_2)_5$ и ДНК в буфере	440	656	2,6 (25%) 8,3 (75%)
MF005 $(CH_2)_{10}$ в ДМСО	440	656	10,5 (100%)
MF005 $(CH_2)_{10}$ в буфере	440	656	9,0 (100%)
MF005 $(CH_2)_{10}$ и ДНК в буфере	440	656	0,9 (38%) 5,4 (62%)
MF016 $Zn(CH_2)_{10}$ в EtOH	440	608	1,8 (100%)
MF016 $Zn(CH_2)_{10}$ в буфере	440	608	1,8 (100%)
MF016 $Zn(CH_2)_{10}$ и ДНК в буфере	440	656	1,0 (80%) 4,5 (20%)

Ошибка измерения не превышала 2%

ТФП в составе интеркаляционного комплекса с ДНК имеет более длительное время жизни флуоресценции по сравнению с ТФП в составе внешнего комплекса ДНК. Основанием для отнесения более долгоживущего комплекса к интеркаляционному типу является описанное ранее в литературе явление образования более жесткого комплекса, защищенного от тушения посторонними примесями, что, как правило, увеличивает время жизни флуоресценции и делает его соизмеримым со временем жизни, измеренным при охлаждении раствора. Из процентного соотношения вклада каждого из времен жизни в общую флуоресценцию очевидно преобладание в растворе интеркаляционного типа комплексов для MF004, комплексов залегания для MF016 и примерно равного вклада этих двух типов комплексов для производного MF005 (таблица 2).

В Главе 4 приведены результаты исследования концентрационного тушения цианинового красителя SG при комплексообразовании с ДНК в растворе, а также в составе жидкокристаллических дисперсий.

Краситель SG имеет небольшой Стоксов сдвиг (≈ 30 нм), что обуславливает перекрывание спектров поглощения и флуоресценции красителя (рисунок 3) и при повышении его концентрации приводит к тушению его флуоресценции при сближении молекул красителя в образце на достаточное расстояние для осуществления переноса энергии по механизму homo-FRET. Для исследуемой пары SG-SG был рассчитан ферстеровский радиус – 4,68 нм.

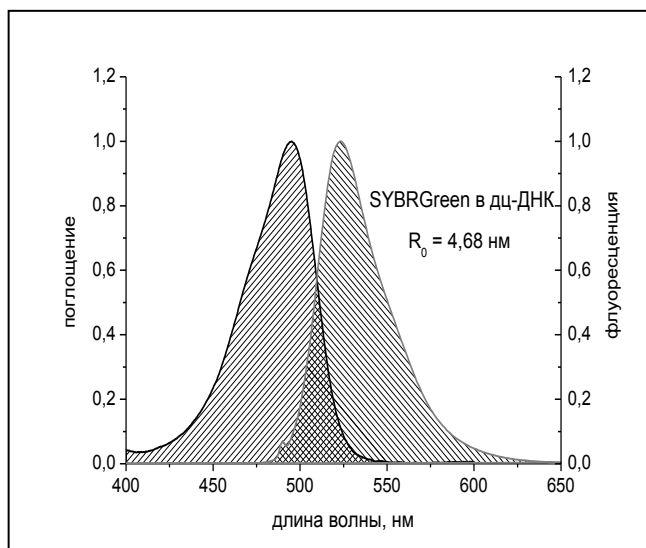


Рисунок 3. Спектры поглощения и флуоресценции красителя SG в комплексе с двухцепочечной ДНК. Спектр флуоресценции зарегистрирован при длине волны возбуждения 490 нм. Заштрихованная область показывает перекрывание спектров поглощения и флуоресценции красителя.

В параграфе 4.1 представлены результаты флуоресцентного титрования различных систем на основе дц-ДНК, красителем SG, а также титрование в ДМСО в качестве контроля (рисунок 4). При смешивании красителя SG с дц-ДНК в буферном растворе (pH = 7) происходит сильное увеличение квантового выхода флуоресценции SG, которое обусловлено образованием жестких интеркаляционных комплексов красителя с молекулами дц-ДНК. При увеличении концентрации SG в растворе дц-ДНК наблюдается пропорциональное увеличение флуоресценции до концентрации красителя 4×10^{-6} М,

после которой зависимость интенсивности флуоресценции отклоняется от линейной, что, вероятно, обусловлено процессом насыщения молекул ДНК молекулами красителя (рисунок 4, ромб), а не процессами самотушения. В растворе ДМСО также не осуществляется самотушение красителя, и возрастание интенсивности флуоресценции при увеличении количества SG в том же диапазоне концентраций, что и для комплексов с дц-ДНК, является линейным (рисунок 4, круг).

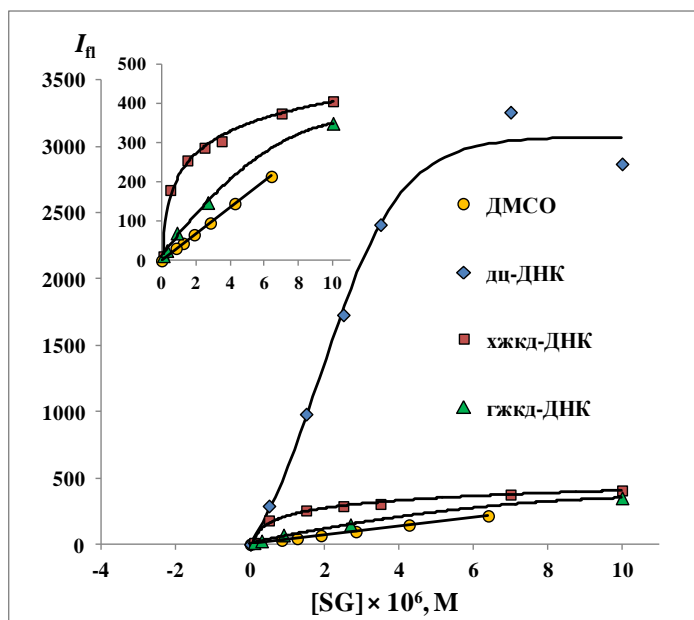


Рисунок 4. Зависимости интенсивности флуоресценции красителя SG от его концентрации: круг – в растворе ДМСО; ромб – в растворе дц-ДНК; квадрат – в хжкд-ДНК; треугольник – в гжкд-ДНК; [ДНК] = $1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

Взаимодействие красителя SG с молекулярно организованными системами на основе ДНК, такими как холестерическая и гексагональная жкд-ДНК, характеризуется нелинейностью возрастания интенсивности флуоресценции при увеличении количества SG, начиная с очень низких концентраций красителя (5×10^{-7} М) (рисунок 4, квадрат и треугольник). Интенсивность флуоресценции красителя в системах жкд-ДНК примерно на порядок меньше, чем интенсивность флуоресценции SG в дц-ДНК (рисунок 4, ромб). Нелинейность данных зависимостей и низкие интенсивности флуоресценции для комплексов SG с хжкд-ДНК и с гжкд-ДНК при концентрациях красителя в том же диапазоне, что и для экспериментов с дц-ДНК, свидетельствуют о наличии эффективного самотушения красителя SG. Расстояние между квазинематическими слоями при переходе от хжкд-ДНК к гжкд-ДНК сокращается от $d \approx 3,4$ нм до $d \approx 2,6$ нм, соответственно. Самотушение флуоресценции SG в гексагональной структуре происходит более эффективно, чем в холестерической структуре, в силу более компактной организованной структуры молекул ДНК в составе гжкд-ДНК по сравнению с хжкд-ДНК (рисунок 4, треугольник и квадрат, соответственно).

Осуществление переноса энергии по механизму homo-FRET в комплексах красителя SG с дц-ДНК в растворе и в составе упорядоченных структур жкд-ДНК было доказано результатами измерения анизотропии флуоресценции красителя в описанных системах, которые представлены в параграфе 4.2. Известно, что при осуществлении

переноса энергии между одинаковыми молекулами или миграции энергии происходит деполаризация флуоресценции возбужденных молекул, таким образом, уменьшение анизотропии флуоресценции является доказательством осуществления процесса homo-FRET.

Уменьшение анизотропии флуоресценции SG наблюдалось при добавлении увеличивающихся концентраций красителя как к раствору дц-ДНК, так и к дц-ДНК в составе упорядоченных структур жкд-ДНК, что является доказательством осуществления переноса энергии по механизму homo-FRET во всех вышеупомянутых системах (рисунок 5, А, Б). В жкд-ДНК эффект деполаризации проявляется более ярко (рисунок 5, квадрат и треугольник), чем в растворе дц-ДНК (рисунок 5, ромб), что объясняется более высокими локальными концентрациями красителя SG в молекулярно организованных структурах, а, соответственно, уменьшением расстояния между молекулами, в результате чего миграция энергии между молекулами SG становится более эффективной.

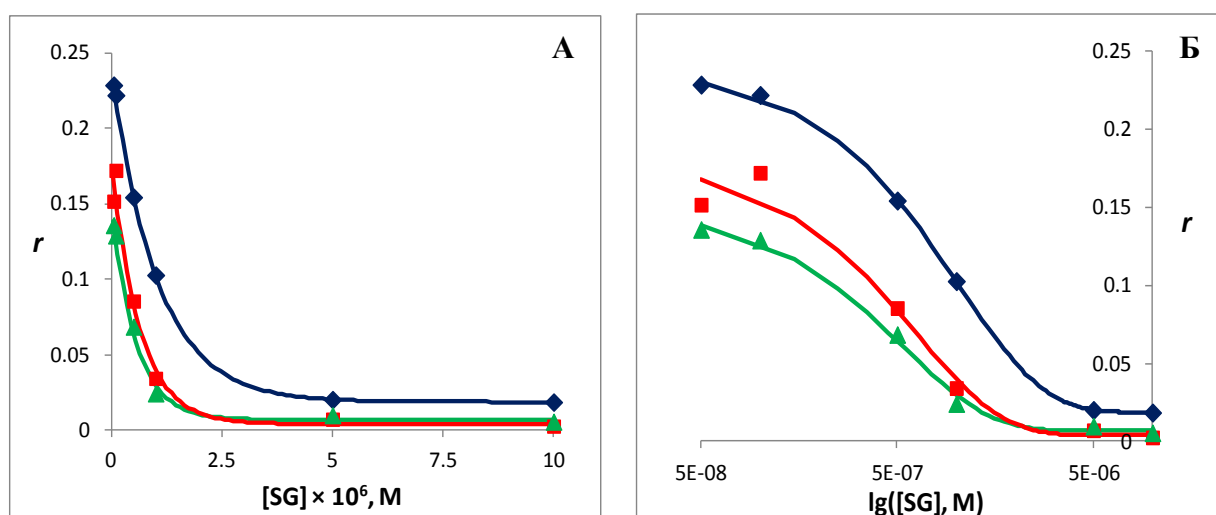


Рисунок 5. А – Зависимость анизотропии флуоресценции красителя SG от его концентрации в растворе дц-ДНК (ромб), жкд-ДНК (квадрат) и гжкд-ДНК (треугольник), $[ДНК] = 1,5 \times 10^{-5} M$ п. о. Б – Та же зависимость с осью абсцисс, представленной в логарифмических координатах.

В параграфе 4.3 представлены результаты измерения времен жизни флуоресценции красителя SG в составе всех систем, описанных в 4.1, 4.2. Показано, что даже при самой большой концентрации SG в ДМСО ($1 \times 10^{-5} M$) самотушение красителя не наблюдается, при этом время жизни флуоресценции SG остается неизменным в большом интервале концентраций ($\sim 3,30 \pm 0,15$ нс, (таблица 3)). В водно-солевом буферном растворе время жизни флуоресценции красителя SG не удалось зафиксировать в наносекундном диапазоне, что согласуется с литературными данными, согласно которым оно составляет ~ 3 пс в Трис-ЭДТА буферном растворе. Однако при комплексообразовании красителя SG с дц-ДНК наблюдается возрастание времени жизни флуоресценции до $\tau \sim 5,50 \pm 0,23$ нс (таблица 3). При добавлении увеличивающихся концентраций SG в раствор дц-ДНК время жизни флуоресценции остается постоянным и кинетики затухания флуоресценции следуют моноэкспоненциальному закону.

Таблица 3. Времена жизни красителя SG в свободном состоянии в ДМСО и в комплексе с молекулами дц-ДНК, $[ДНК]=3 \times 10^{-5}$ М п. о.

[SG], М	$\tau_{\text{фл, нс}}$ дц-ДНК	$\tau_{\text{фл, нс}}$ ДМСО
5×10^{-8}	5,5	-
1×10^{-7}	5,1	
5×10^{-7}	5,2	3,1
1×10^{-6}	5,3	3,5
5×10^{-6}	5,7	
1×10^{-5}	5,6	

Ошибка измерения не превышала 5%.

структурах также является признаком самотушения SG в описанных системах, наряду с непропорциональным увеличением квантового выхода флуоресценции при увеличении концентрации красителя. Резкое уменьшение квантового выхода и времени жизни флуоресценции интеркалированного красителя SG при переходе от дц-ДНК к жкд-ДНК системам может быть обусловлено двумя причинами: 1. изменение окружения красителя в жкд-ДНК по сравнению с раствором дц-ДНК (различные диэлектрические постоянные и коэффициенты преломления); 2. сокращение расстояния между молекулами ДНК (а, следовательно, и молекулами SG), которое обеспечивает реализацию процесса переноса энергии по механизму FRET.

Таблица 4. Времена жизни флуоресценции SG в комплексе с ДНК в составе холестерической и гексагональной жкд-ДНК, $[ДНК]=1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

[SG], М	$\tau_{\text{фл, нс}}$ холестерическая жкд-ДНК	$\tau_{\text{фл, нс}}$ гексагональная жкд-ДНК
5×10^{-8}	4,6	4,3
1×10^{-7}	4,5	4,3
5×10^{-7}	4,2	3,9
1×10^{-6}	4,1	3,5
5×10^{-6}	3,4	2,2
1×10^{-5}	-	1,8

Ошибка измерения не превышала 5%.

В литературе описано несколько механизмов концентрационного тушения, такие как образование нефлуоресцирующих димеров, перенос энергии на нефлуоресцирующие димеры, образование эксимеров и др. В исследуемой системе наиболее вероятным механизмом является перенос энергии с мономера SG в возбужденном состоянии на нефлуоресцирующий димер или агрегат красителя (hetero-FRET). Кроме того, перенос энергии на нефлуоресцирующий димер/агрегат может происходить как от непосредственно возбужденного мономера, так и от мономера, получившего энергию от другого мономера в результате миграции возбуждения (homo-FRET). Данный механизм тушения может осуществляться, поскольку в молекулярно организованных жкд-ДНК системах создаются высокие локальные концентрации SG, превышающие

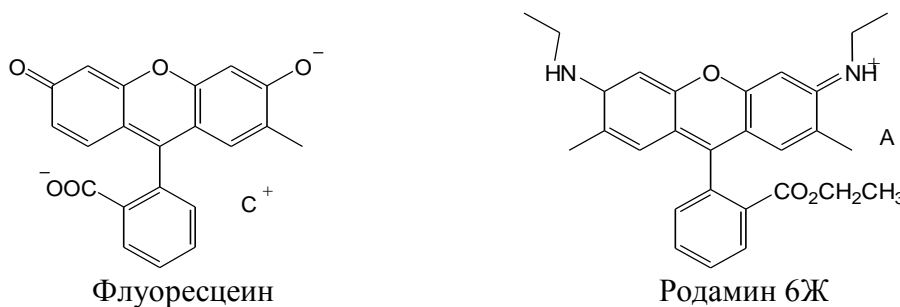
Время жизни флуоресценции SG при переходе от раствора дц-ДНК к системам жкд-ДНК и гжкд-ДНК уменьшается с увеличением концентрации красителя от 5,5 до 3,4 и 1,8 нс, соответственно, (таблица 4). Уменьшение времени жизни флуоресценции красителя в упорядоченных

соответствующие концентрации в гомогенных растворах на несколько порядков, что увеличивает вероятность образования ассоциатов SG на ДНК между квазинематическими слоями жкд-ДНК.

В параграфе 4.4 структурным методом кругового дихроизма впервые доказана способность красителя SG образовывать больше одного типа комплексов с дц-ДНК: интеркаляционный при малых концентрациях красителя и внешний комплекс, в малой бороздке ДНК, при высоких уровнях заполнения ДНК. Кроме того, в параграфе 4.5 методом спектрофотометрии показано, что при высоких концентрациях SG возможно формирование Н-димеров красителя в малой бороздке ДНК.

В **Главе 5** обсуждается эффект супертушения красителя SG наночастицами золота в среде ДНК, который заключается в эффективном тушении флуоресценции красителя с высокой константой Штерна-Фольмера ($K_{SV} > 10^7$). Рассмотрены различные модели взаимодействия НЧ золота и SG.

В параграфе 5.1 рассматривается тушение флуоресценции органических красителей наночастицами золота ($d \sim 2,5$ нм).



Широко известные флуорофоры родамин 6Ж и флуоресцеин были выбраны для данного исследования, поскольку они имеют схожую гетероциклическую структуру в основе, а отличаются только заместителями и обусловленным ими зарядом. Флуоресцеин присутствует в растворе в виде дианиона при нейтральном значении pH, тогда как родамин 6Ж несет один положительный заряд при pH = 7, что позволит определить роль заряда при взаимодействии красителя с НЧ золота. Данные красители были выбраны для исследования в буферном растворе, так как они обладают высокими квантовыми выходами флуоресценции, 0,92 и 0,95 для флуоресцеина и родамина, соответственно, тогда как краситель SG, например, практически не флуоресцирует в отсутствие ДНК в буферном растворе.

Показано, что при взаимодействии НЧ золота с положительно заряженным красителем родамином 6Ж происходит эффективное тушение флуоресценции уже при двукратном молярном избытке НЧ относительно красителя (рисунок 6, А). Однако флуоресценция отрицательно заряженного флуоресцеина тушится гораздо менее эффективно (рисунок 6, Б).

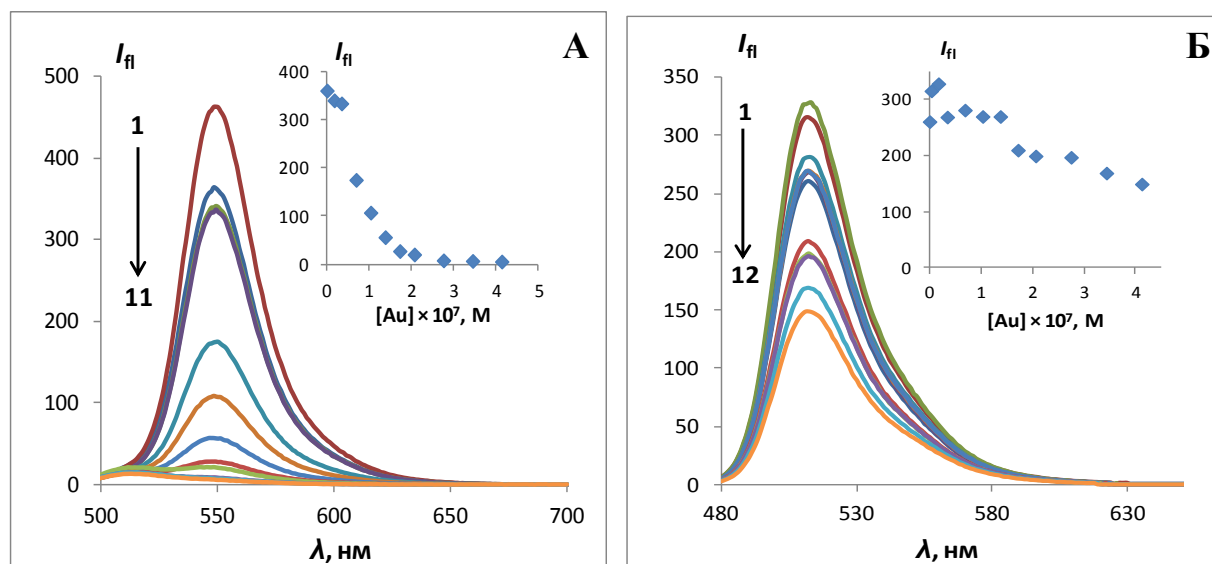


Рисунок 6. Спектры флуоресценции **А** – красителя родамин 6Ж (1×10^{-7} М) при титровании НЧ золота: 0 (1); $1,72 \times 10^{-8}$ (2); $3,43 \times 10^{-8}$ (3); $6,87 \times 10^{-8}$ (4); $1,03 \times 10^{-7}$ (5); $1,37 \times 10^{-7}$ (6); $1,72 \times 10^{-7}$ (7); $2,06 \times 10^{-7}$ (8); $2,75 \times 10^{-7}$ (9); $3,43 \times 10^{-7}$ (10); $4,12 \times 10^{-7}$ (11) М; **Б** – красителя флуоресцеин (1×10^{-7} М) при титровании НЧ золота: 0 (1); $3,43 \times 10^{-9}$ (2); $1,72 \times 10^{-8}$ (3); $3,43 \times 10^{-8}$ (4); $6,87 \times 10^{-8}$ (5); $1,03 \times 10^{-7}$ (6); $1,37 \times 10^{-7}$ (7); $1,72 \times 10^{-7}$ (8); $2,06 \times 10^{-7}$ (9); $2,75 \times 10^{-7}$ (10); $3,43 \times 10^{-7}$ (11); $4,12 \times 10^{-7}$ (12) М. Вставки: зависимости интенсивности флуоресценции родамина 6Ж при 550 нм (**А**) и флуоресцеина при 512 нм (**Б**).

Равновесная константа комплексообразования родамина 6Ж с НЧ золота была рассчитана по методу Скетчарда по результатам тушения флуоресценции красителя. В случае тушения флуоресценции флуоресцеина НЧ золота константа была рассчитана по кривой насыщения при уменьшении сигнала на 50%. Константы комплексообразования красителей с НЧ золота составили $K_b = 2,8 \pm 0,3 \times 10^8 \text{ М}^{-1}$ и $K_b = 2,1 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ для родамина 6Ж и флуоресцеина, соответственно. Энергия Гиббса взаимодействий обоих красителей с НЧ золота дает дополнительные сведения о типе взаимодействия. Так для комплекса родамин 6Ж/НЧ золота она составляет $\Delta G = -48 \text{ кДж/моль}$, а для комплекса флуоресцеин/НЧ золота $\Delta G = -35 \text{ кДж/моль}$. Поскольку наночастицы золота имеют сильный отрицательный заряд (~ -12), то можно говорить о наличии электростатической компоненты взаимодействия заряженных красителей с данными НЧ наряду с неэлектростатической. Для связывания родамина 6Ж и НЧ золота энергия Гиббса выражается как $\Delta G = \Delta G_{\text{nel}} + \Delta G_{\text{el}}$; тогда как для связывания флуоресцеина и НЧ золота она представляет собой $\Delta G = \Delta G_{\text{nel}} - \Delta G_{\text{el}}$, где ΔG_{nel} и ΔG_{el} являются энергиями Гиббса для неэлектростатической и электростатической составляющих взаимодействия. Краситель родамин 6Ж имеет один положительный заряд, следовательно, электростатическая компонента энергии Гиббса обеспечивается одним электростатическим контактом, оценочная величина энергии Гиббса которого составляет $\sim 5 \text{ кДж/моль}$. Таким образом, можно приблизительно рассчитать значение энергии Гиббса для неэлектростатической составляющей взаимодействия красителей, обладающих подобной структурой, с НЧ золота как $\Delta G_{\text{nel}} = \Delta G - \Delta G_{\text{el}} = -48 - (-5) = -43 \text{ (кДж/моль)}$.

При сравнении полученной величины с энергией взаимодействия флуоресцеина и НЧ золота ($\Delta G = -35$ кДж/моль) очевидно, что отрицательные заряды флуоресцеина также вносят вклад в энергию взаимодействия, уменьшая ее на $\Delta\Delta G = 8$ кДж/моль, что приблизительно соответствует наличию двух электростатических отталкиваний в системе дианион флуоресцеина/НЧ золота.

5.2. Супертушение флуоресценции красителя SG наночастицами золота в растворе дц-ДНК. При введении в раствор комплекса красителя SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М) с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п.о.) НЧ золота ($d \sim 2,5$ нм) наблюдается интенсивное тушение флуоресценции даже при очень низких концентрациях тушителя (НЧ золота) $\leq 1 \times 10^{-7}$ М (рисунок 7, А, Б), что свидетельствует о статическом механизме тушения внутри комплекса SG/Au, образованного НЧ золота и молекулой интеркалированного в ДНК красителя.

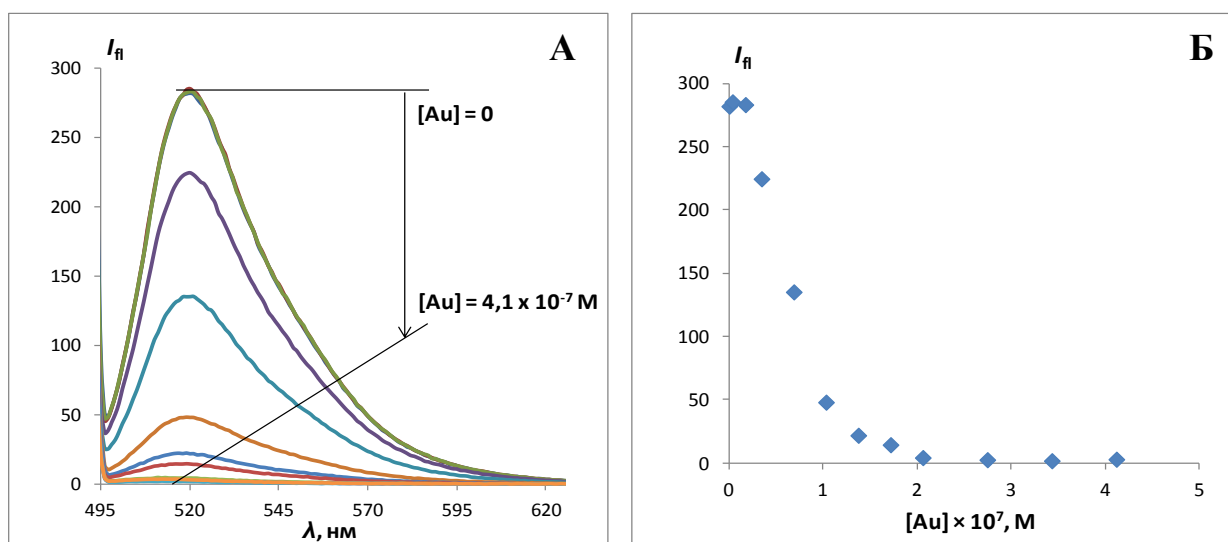


Рисунок 7. А – Спектры флуоресценции красителя SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) в присутствии различных концентраций НЧ золота: 0 ; $3,43 \times 10^{-9}$; $1,72 \times 10^{-8}$; $3,43 \times 10^{-8}$; $6,87 \times 10^{-8}$; $1,03 \times 10^{-7}$; $1,37 \times 10^{-7}$; $1,72 \times 10^{-7}$; $2,06 \times 10^{-7}$; $2,75 \times 10^{-7}$; $3,43 \times 10^{-7}$; $4,12 \times 10^{-7}$ М. Б – Зависимость интенсивности флуоресценции красителя SG от концентрации НЧ золота при 520 нм.

Обнаруженное эффективное тушение флуоресценции красителя SG наночастицами золота в растворе ДНК известно в литературе под названием «супертушение», однако природа данного явления для таких систем ранее не была установлена.

В параграфе 5.2.1 предложены модели взаимодействия красителя SG с НЧ золота в растворе дц-ДНК.

Некоторые авторы предприняли попытки описать подобное супертушение флуоресценции хромофоров наночастицами золота (параграф 5.2) в рамках модели тушения флуоресценции Штерна-Фольмера (уравнение 3).

$$I_0/I \approx 1 + K_{LQ}[Q]_0, \quad (3)$$

где I и I_0 – интенсивности флуоресценции SG в присутствии различных концентраций тушителя и в отсутствие тушителя, соответственно, K_{LQ} – константа равновесия

комплексообразования и $[Q]_0$ – исходная концентрация тушителя. Однако в данной работе использованы сравнимые концентрации люминофора и тушителя, следовательно, использование обычного уравнения Штерна-Фольмера (уравнение 3), которое справедливо лишь при $[Q]_0 \gg [L]_0$, исключается. Это подтверждается также нелинейностью зависимости Штерна-Фольмера для исследованного красителя (рисунок 8). Константа Штерна-Фольмера, оцененная по начальному линейному участку данной зависимости, составляет $K_{SV} = 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (рис. 8, вставка).

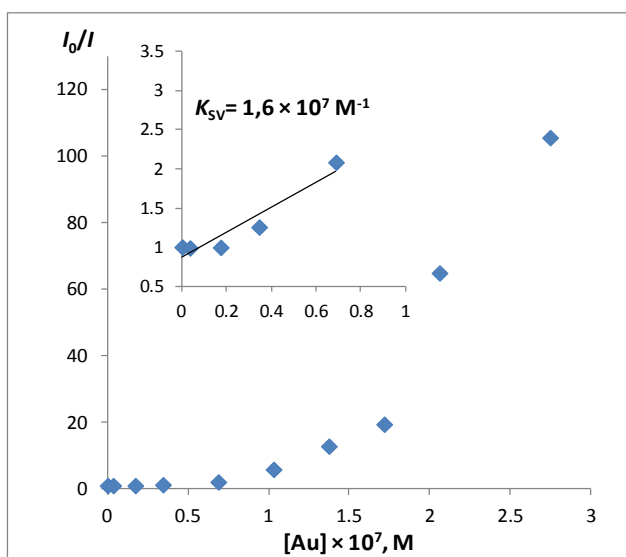
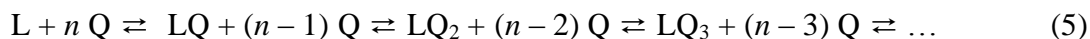


Рисунок 8. Зависимость Штерна-Фольмера для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота. Вставка: начальный участок зависимости Штерна-Фольмера для диапазона концентраций НЧ золота $0 - 6,9 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Второй моделью, которая была использована для описания взаимодействия SG с НЧ золота в среде относительно жестких коротких молекул дц-ДНК (~ 600 п. о.), была модель Перрена. Для применения данной модели было сделано предположение, что специфическое взаимодействие молекул люминофора и тушителя между собой в основном электронном состоянии отсутствует. В таком случае тушение флуоресценции описывается уравнением Перрена (уравнение 4), соответствующим статистическому распределению молекул в среде

$$I_0/I = \exp(-V_Q[Q]_0) = \exp(-(V_Q[L]_0)([Q]_0/[L]_0)), \quad (4)$$

где V_Q – эффективный объем так называемой «сферы тушения» и $[L]_0$ – исходная концентрация SG. Такое же выражение получится, если рассматривать образование бесконечного ряда стехиометрических комплексов (5)



с одинаковыми значениями констант равновесия на каждой стадии $K = V_Q$.

Аппроксимация данных в полулогарифмических координатах Перрена (уравнение 4) должна представлять собой прямую линию, выходящую из 1, что не соблюдается: кривые в данных координатах имеют нелинейный вид (рисунок 9, А). Кроме того, анализ экспериментов по тушению НЧ золота флуоресценции красителя SG при различных уровнях заполнения ДНК показал, что константа взаимодействия и объем сферы тушения уменьшаются при увеличении концентрации SG (рисунок 9, Б). Полученные данные

исключают статистическое связывание между SG и НЧ золота и свидетельствуют в пользу стехиометрического типа связывания.

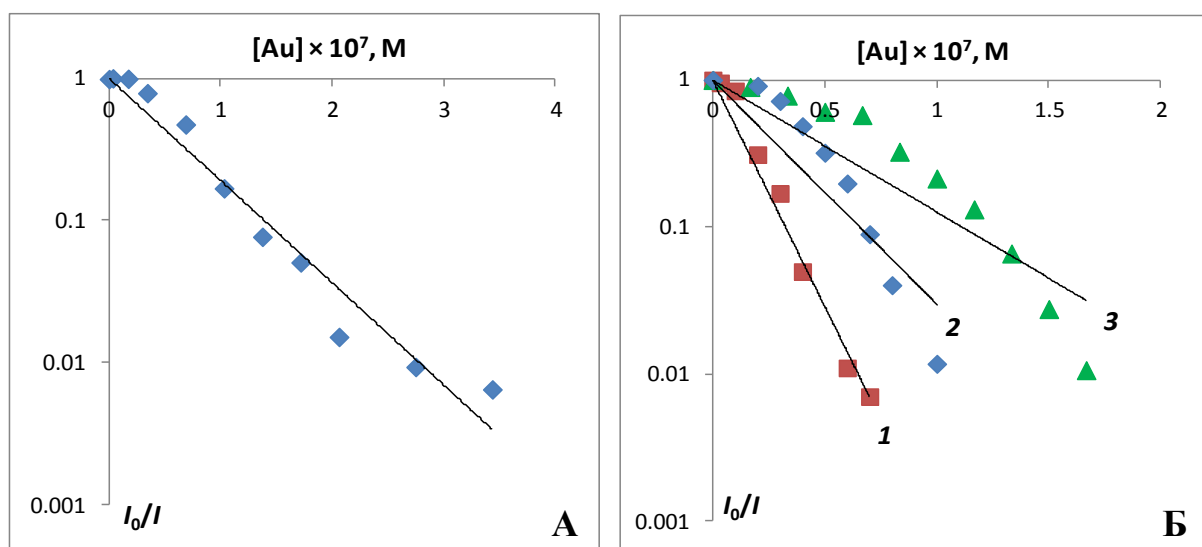


Рисунок 9. А – Зависимость Перрена для тушения флуоресценции SG ($8,9 \times 10^{-8}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота. Б – Зависимости Перрена для тушения флуоресценции SG: 1 – $3,33 \times 10^{-8}$; 2 – $1,0 \times 10^{-7}$; 3 – $3,0 \times 10^{-7}$ М.

Поскольку модель статистического взаимодействия должным образом не описывает взаимодействие красителя SG с НЧ золота на ДНК, то для описания экспериментальных данных была предложена стехиометрическая модель Скетчарда, которую можно представить в виде уравнения 6:

$$r/C_{\text{free}} = K_a(n - r) \quad (6)$$

где $r = C_{\text{bound}}/[Au]$, C_{bound} – концентрация связанного SG, C_{free} – концентрация свободного SG, K_a – равновесная константа комплексообразования и n – стехиометрический коэффициент. Однако при аппроксимации полученных данных для тушения флуоресценции SG при добавлении различных концентраций НЧ золота в координатах Скетчарда (уравнение 6) была получена зависимость с максимумом (рисунок 10).

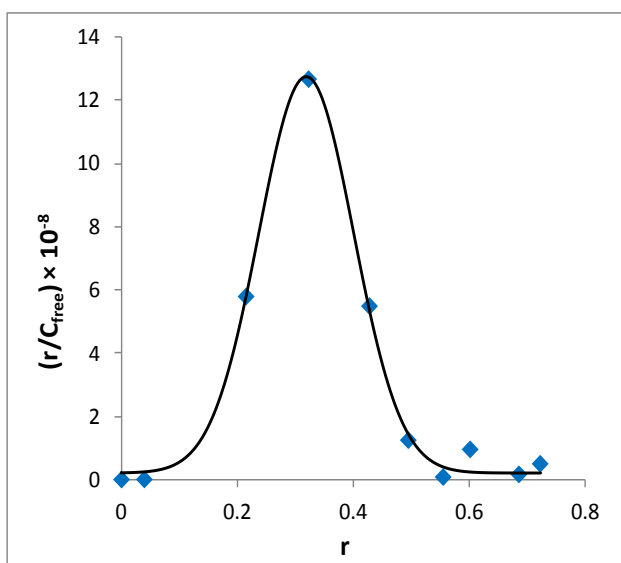


Рисунок 10. Отложение Скетчарда для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении НЧ золота: 0; $3,43 \times 10^{-9}$; $1,72 \times 10^{-8}$; $3,43 \times 10^{-8}$; $6,87 \times 10^{-8}$; $1,03 \times 10^{-7}$; $1,37 \times 10^{-7}$; $1,72 \times 10^{-7}$; $2,06 \times 10^{-7}$; $2,75 \times 10^{-7}$; $3,43 \times 10^{-7}$; $4,12 \times 10^{-7}$ М.

Такая выпуклая форма кривой Скэтчарда предполагает кооперативное взаимодействие SG с НЧ золота на ДНК и может быть адекватно описана уравнением Хилла (уравнение 7):

$$\lg(\theta/(1-\theta)) = n \lg([Au]) + \lg K_b \quad (7)$$

где, $\theta = (I_0 - I)/I_0$, K_b – суммарная константа комплексообразования. Для применения данной модели необходимо сделать допущение, согласно которому несколько золотых наночастиц могут связываться с красителем SG. Усредненная константа комплексообразования для каждого комплекса, K_a , определяется из выражения $K_b = (K_a)^n$. Кооперативное взаимодействие характеризуется S-образной кривой насыщения, которая была получена для исследуемой системы SG/НЧ Au на ДНК в растворе (рисунок 11, А).

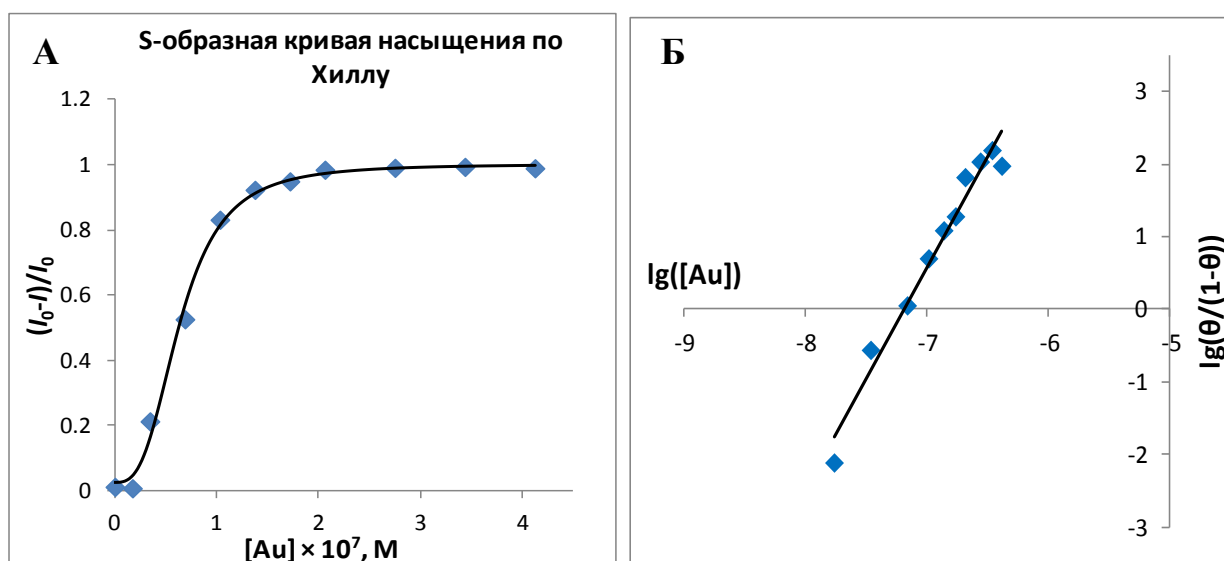


Рисунок 11. S-образная кривая насыщения (А) и график Хилла (Б) для тушения флуоресценции SG ($1,0 \times 10^{-7}$ М, $\lambda = 520$ нм) в комплексе с двухцепочечной ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) при добавлении различных концентраций НЧ золота.

Положительная кооперативность ($n > 1$) характеризуется тем, что присоединение одной НЧ Au к субстрату (SG) увеличивает сродство к субстрату остальных НЧ. Из графика Хилла получено значение суммарной константы взаимодействия НЧ золота с SG $K_b = 7,9 \pm 0,8 \times 10^{21} \text{ М}^{-1}$, а также значение $K_a = 2,0 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ М}^{-1}$ на матрице ДНК (рисунок 11, Б). Такое высокое значение константы комплексообразования свидетельствует о формировании высокоспецифичного прочного комплекса между НЧ золота и интеркалированными флуорофорами, что и обуславливает эффективное тушение флуоресценции в системе. Полученный коэффициент Хилла $n \sim 3$ свидетельствует о том, что при исследуемом взаимодействии образуются кластеры из трех НЧ золота вблизи одного красителя.

Образование кластеров из нескольких НЧ золота в присутствии комплексов SG/ДНК также было подтверждено методом спектрофотометрии в параграфе 5.2.4.

Еще одним новым подходом для описания эффекта «супертушения» флуоресценции красителя SG, наряду с моделью кооперативного связывания, является

рассмотрение раствора ДНК как двухфазной системы, которая содержит объемную фазу (буферный раствор) и микрофазу (молекулы ДНК). Локальные концентрации реагентов внутри микрофазы могут быть на несколько порядков больше, чем их действительные концентрации в общем растворе, что также может обуславливать более яркие оптические эффекты в подобных системах.

С учетом эффекта концентрирования реагентов в микрофазе концентрацию НЧ золота и красителя SG в микрофазе молекул ДНК можно определить как $[Q]_m = [Q]/v$ и $[L]_m = [L]/v$, где $[Q]$, $[L]$ и $[Q]_m$, $[L]_m$ – концентрации тушителя и лиганда в растворе и в микрофазе ДНК, соответственно, а v – объемная доля микрофазы в растворе, рассчитанная исходя из объема одной молекулы ДНК и количества молекул в растворе на основании концентрации ДНК в М пар оснований ($v = 1 \times 10^{-5}$). Применение модели Хилла с учетом микрофазного подхода дает значение суммарной константы комплексообразования НЧ золота с SG на ДНК $K_b = 4,6 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, а также значение $K_a = 1,66 \pm 0,06 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, которое почти на пять порядков меньше значения $K_a = 2,0 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, полученного для той же системы, рассматриваемой как гомогенный раствор ДНК. Таким образом, можно заключить, что эффективное тушение флуоресценции обусловлено эффектом концентрирования флуорофора и тушителя с довольно низкой константой комплексообразования и специфичностью взаимодействия между ними. Данный подход подразумевает, что все НЧ золота находятся в микрофазе, что, вероятно, свидетельствует о высоком сродстве НЧ золота к ДНК, а не к флуорофорам SG, интеркалированным в ДНК.

Итак, в параграфе 5.2.1 было рассмотрено несколько моделей, в том числе стехиометрических и статистических, для описания взаимодействия SG с НЧ золота в среде биомакромолекулы. Кооперативное связывание по Хиллу хорошо описывает взаимодействие НЧ золота с красителем, интеркалированным в ДНК, в результате которого образуются довольно прочные комплексы SG/ДНК/Au_n с коэффициентом кооперативности $n \sim 3$. Однако применение микрофазного подхода позволяет предположить, что ключевую роль в исследуемых тройных системах играет высокая аффинность НЧ золота к ДНК, которая приводит к концентрированию наночастиц в микрофазе ДНК и образованию неспецифических комплексов с красителями в среде биомакромолекулы. Таким образом, образование агрегатов из трех наночастиц опосредовано в случае гомогенной модели высокой специфичностью взаимодействия НЧ золота с красителем в комплексе с ДНК, тогда как в случае микрофазного подхода концентрированием наночастиц золота в микрофазе нуклеиновой кислоты.

В параграфе 5.2.2 обсуждаются механизмы тушения флуоресценции красителя SG наночастицами золота на матрице ДНК. Тушение флуоресценции SG в комплексе с двухцепочечной ДНК при введении НЧ может быть обусловлено несколькими процессами. Статическое тушение может происходить при образовании нефлуоресцирующего комплекса SG/НЧ Au на матрице ДНК (тип 1). Также возможно

осуществление резонансного переноса энергии от красителя SG на НЧ золота, не находящуюся в непосредственном контакте с молекулой красителя, а залегающую, например, в малой бороздке ДНК (тип 2), поскольку выполняется условие спектрального перекрытия флуоресценции донора (SG) и поглощения акцептора (НЧ Au). Для подтверждения наличия в системе того или иного процесса были измерены времена жизни флуоресценции комплекса SG/ДНК в присутствии различных концентраций НЧ золота (таблица 5).

Таблица 5. Времена жизни флуоресценции SG в комплексе с дц-ДНК в растворе в присутствии различных концентраций НЧ золота, $[SG] = 1 \times 10^{-7}$ М, $[ДНК] = 1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.

[Au], М	$\tau_{\text{фл}}$, нс
0	4,9
$1,3 \times 10^{-8}$	4,8
$2,4 \times 10^{-8}$	4,7
$4,4 \times 10^{-8}$	4,9

Ошибка измерения не превышала 5%.

переноса энергии от возбужденного состояния красителя на НЧ золота в данной системе не реализуется, т.к. расстояние между донором и акцептором энергии в комплексах 2 типа значительно больше, чем требуется для реализации процесса переноса энергии. Данный факт также подтверждается постоянством анизотропии флуоресценции при различных концентрациях НЧ золота в исследуемой системе SG/ДНК. Флуоресцируют интеркалированные в ДНК молекулы красителя, которые не образуют комплекс с золотыми наночастицами и находятся на значительном расстоянии от НЧ.

Еще одним возможным процессом, обуславливающим уменьшение интенсивности флуоресценции интеркалированного в ДНК красителя в присутствии НЧ золота, является ускорение интеркомбинационной конверсии под действием внешнего тяжелого атома (атомы золота в НЧ). В присутствии тяжелого атома усиливается спин-орбитальное взаимодействие, в результате чего снимается запрет по мультиплетности для перехода в триплетное состояние; и происходит ускорение интеркомбинационной конверсии.

На основании анализа литературы и свойств наночастиц золота была предположена возможность осуществления переноса электрона с красителя на НЧ золота. Были сделаны попытки зафиксировать перенос электрона с SG на НЧ золота на матрице ДНК, который, по-видимому, может происходить, в силу более высокой электроотрицательности наночастиц металлов по сравнению с массивными образцами того же металла, и тем более высокой электроотрицательности маленьких ($d \sim 2,5$ нм) частиц, которые использованы в данном исследовании, по сравнению с частицами больших размеров. Однако подтвердить перенос электрона при помощи микросекундного импульсного фотолиза и наносекундного лазерного фотолиза не удалось, что может говорить в пользу

Обнаружено, что время жизни флуоресценции красителя, интеркалированного в ДНК, ($\sim 4,8$ нс) в присутствии чрезвычайно малых концентраций ($(1-4) \times 10^{-8}$ М) золотых НЧ не изменяется (таблица 5), что свидетельствует о преимущественно статическом механизме тушения флуоресценции. Процесс резонансного

сверхбыстрого обратимого переноса электрона в фемтосекундной шкале времен и требует дополнительных исследований.

Таким образом, было установлено, что тушение флуоресценции в системе, включающей комплексы SG/ДНК и НЧ золота, происходит, главным образом, по механизму статического тушения за счет образования нефлуоресцирующего комплекса SG/ДНК/Au_n, а также вероятен сверхбыстрый перенос электрона от красителя на крайне электроотрицательную НЧ Au и ускорение интеркомбинационной конверсии.

В параграфе 5.2.3 был проведен анализ кинетических кривых уменьшения флуоресценции красителя SG в комплексе с ДНК под действием НЧ золота в различных количествах (рисунок 12, А). Установлена зависимость наблюдаемой константы скорости взаимодействия НЧ золота с красителем от добавляемой концентрации НЧ золота (рисунок 12, Б).

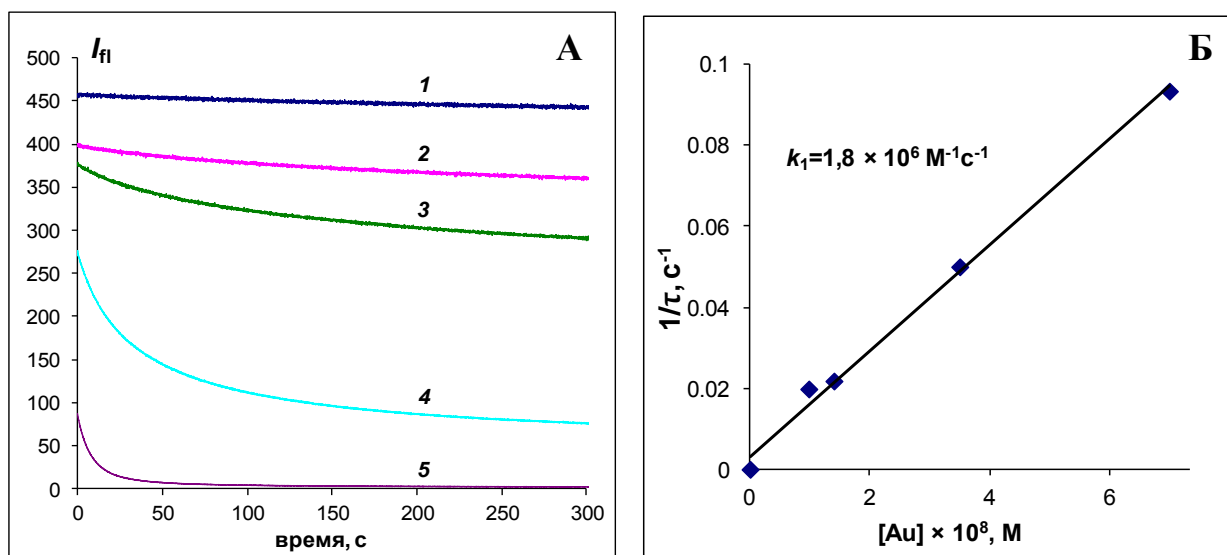


Рисунок 12. А – Кинетические кривые уменьшения флуоресценции красителя SG ($1,1 \times 10^{-7}$ М) в комплексе с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М) при добавлении различных концентраций НЧ золота: 0 (1); $8,8 \times 10^{-9}$ (2); $1,76 \times 10^{-8}$ (3); $3,5 \times 10^{-8}$ (4); 7×10^{-8} (5) М. Б – Зависимость наблюдаемой константы скорости взаимодействия НЧ золота с SG в комплексе с дц-ДНК, рассчитанной по моноэкспоненциальной модели, от добавляемой концентрации НЧ золота, $k_1 = 1,8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$.

Данная зависимость позволяет определить кинетическую константу бимолекулярной реакции взаимодействия SG с наночастицами золота на матрице ДНК, $k_1 = 1,8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$. На основании той же зависимости можно заключить, что в данном равновесии константа скорости обратной реакции (k_{-1}) много меньше константы скорости прямой реакции k_1 , и, следовательно, образуется очень прочный комплекс SG/НЧ Au на матрице дц-ДНК.

Полученное значение константы меньше значения диффузионной константы ($\sim 4,1 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$), что говорит о диффузионном контроле данной реакции со стерическим фактором $f = k_1/k_{diff} = 4,4 \times 10^{-4}$, обусловленным наличием биополимера ДНК в растворе. Кроме того, диффузионно-контролируемый режим данной реакции был подтвержден

зависимостью константы бимолекулярного взаимодействия SG/Au от концентрации дц-ДНК в растворе, т. е. от вязкости раствора.

В параграфе 5.2.4 представлено исследование образования ассоциатов НЧ золота в присутствии комплекса красителя SG с дц-ДНК методом спектрофотометрии.

На рисунке 13 представлены спектры поглощения НЧ золота в воде (кривая 1), в присутствии дц-ДНК (кривая 2) и в присутствии комплексов SG/дц-ДНК (кривая 3). При добавлении НЧ золота к дц-ДНК происходит образование кластеров из нескольких НЧ золота, что сопровождается появлением слабо выраженного максимума плазмонной полосы при 507 нм в спектре поглощения НЧ золота. Полоса плазмонного резонанса становится более ярко выраженной в присутствии комплексов SG с дц-ДНК и смещается в длинноволновую область ($\lambda = 531$ нм) по сравнению с соответствующим спектром в отсутствие красителя SG, что соответствует увеличению размера образующегося кластера.

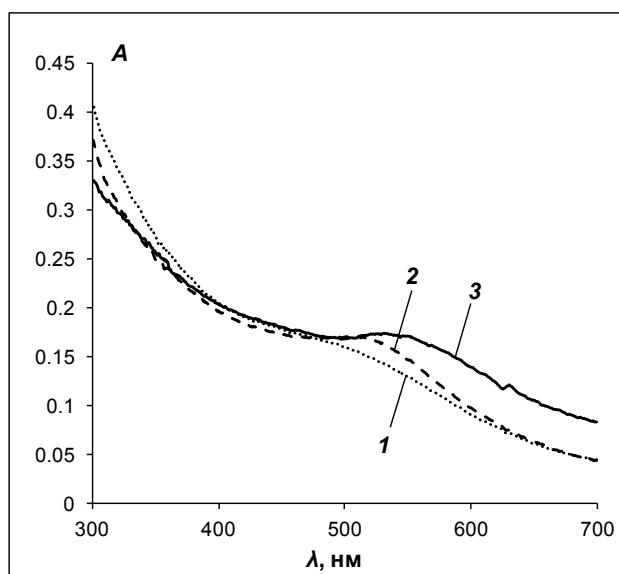


Рисунок 13. Спектры поглощения НЧ золота ($1,8 \times 10^{-7}$ М) в воде – 1, в присутствии дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) – 2 и в присутствии комплексов SG (1×10^{-7} М) с дц-ДНК ($1,5 \times 10^{-5}$ М п. о.) – 3.

Полученные данные согласуются с предложенной моделью кооперативного взаимодействия НЧ золота с красителем SG на матрице дц-ДНК. Кроме того, можно сделать вывод о том, что НЧ золота специфически взаимодействуют с красителем, интеркалированным в ДНК, а не с любыми участками ДНК статистическим образом. Это согласуется с результатами, полученными при помощи предложенной в 5.2.1 модели Хилла для описания взаимодействия SG с НЧ золота в растворе дц-ДНК, рассматриваемом как гомогенный раствор.

ВЫВОДЫ

1. Константа комплексообразования тетрафенилпорфиринов с ДНК уменьшается вследствие стерических препятствий, обусловленных увеличением размера заместителей и введением атома металла в координационную сферу макроцикла.
2. Катионные ТФП способны образовывать два типа комплексов с ДНК: интеркаляционный и внешний, в малой бороздке ДНК. Увеличение объёма заместителей и введение металла в макроцикл приводит к преимущественному формированию внешнего комплекса залегания.
3. Карбоцианиновый краситель SG образует два типа комплексов с ДНК: интеркаляционный при низких концентрациях красителя и внешний комплекс при высоких уровнях заполнения ДНК с образованием ассоциата в малой бороздке.
4. Эффект самотушения красителя SG обнаружен в упорядоченных структурах дисперсий на основе ДНК. Эффективность данного процесса возрастает с увеличением компактизации молекул ДНК. Этот эффект обусловлен переносом энергии по Фёрстеру (hetero-FRET) с возбужденного состояния интеркалированного в ДНК мономера SG на нефлуоресцирующий ассоциат красителя в малой бороздке ДНК.
5. Обнаружен эффект «супертушения» флуоресценции в системах SG/дц-ДНК при введении наночастиц золота, удовлетворительно описываемый моделью кооперативного связывания по Хиллу, которая подразумевает статический тип тушения за счет образования нефлуоресцирующего комплекса ДНК/SG/Au₃.
6. Образование агрегатов из трёх наночастиц золота в исследуемых тройных системах, включающих комплексы SG/ДНК и наночастицы золота, объясняется в рамках гомогенной модели специфическим прочным связыванием наночастиц с красителем SG, интеркалированным в ДНК, или в рамках микрофазной модели эффектом неспецифического концентрирования наночастиц.
7. Доказан диффузионный характер взаимодействия наночастиц золота с красителем SG в комплексах с ДНК.

Основные результаты диссертации изложены в статьях:

1. Kuzmin, M.G. Microphase Mechanism of "Superquenching" of Luminescent Probes in Aqueous Solutions of DNA and Some Other Polyelectrolytes / M. G. Kuzmin, I. V. Soboleva, N. A. Durandin, E. S. Lisitsyna, V. A. Kuzmin // J. Phys. Chem. B. – 2014. – V. 118. – Issue 15. – P. 4245–4252.
2. Лисицына, Е. С. Самотушение флуоресценции красителя SYBRGreen в комплексе с ДНК и в молекулярно организованных системах ДНК / Е. С. Лисицына, Н. А. Дурандин, Д. Н. Калюжный, В. А. Кузьмин // Химия высоких энергий. – 2013. – Т. 47. – Вып. 1. – С. 39–43.

3. Лисицына, Е. С. Супертушение флуоресценции красителя SYBRGreen в комплексе с ДНК под действием наночастиц золота / Е. С. Лисицына, О. Н. Лыго, Н. А. Дурандин, О. В. Дементьева, В. М. Рудой, В. А. Кузьмин // *Химия высоких энергий*. – 2012. – Т. 46. – Вып. 6. – С. 458–463.
4. Novikov, N. V. DNA-interaction study with water soluble tetra-cationic porphyrins / N. V. Novikov, E. S. Lisitsyna, N. A. Bragina, A. F. Mironov, V. A. Kuzmin // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. – 2008. – V. 12. – Issue 3. – P. 659–660.

и тезисах:

1. Lisitsyna, E. S. SYBRGreen fluorescence self-quenching in DNA detection / E. S. Lisitsyna, S. G. Skuridin, Yu. M. Evdokimov, V. A. Kuzmin // *Book of Abstracts on 1st International conference on Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks – Design and Applications (FB³)*. – Gothenburg: Chalmers University of Technology, 2012. – P. 22.
2. Лисицына, Е. С. Спектрально-кинетические характеристики комплексов цианиновых красителей с ДНК и наночастицами золота / Е. С. Лисицына, Н. А. Дурандин, В. М. Рудой, О. В. Дементьева, М. Г. Кузьмин, В. А. Кузьмин // *Сборник научных трудов XII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ, ИБХФ, Москва*. – М.: РУДН, 2012. – С. 95–96.
3. Фролова, М. А. Исследование процессов комплексообразования производных тетрафенилпорфиринов с ДНК. Самогашение производных тетрафенилпорфиринов в комплексе с различными формами ДНК / М. А. Фролова, Е. С. Лисицына, К. А. Формировский, Н. А. Брагина, А. Ф. Миронов, В. А. Кузьмин // *Сборник научных трудов XII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ, ИБХФ, Москва*. – М.: РУДН, 2012. – С. 186–189.
4. Lisitsyna, E. S. Nature of SYBRGreen fluorescence quenching on DNA matrix under Au nanoparticles action / E. S. Lisitsyna, S. G. Skuridin, Yu. M. Evdokimov, V. M. Rudoy, O. V. Dementieva, V. A. Kuzmin // *Book of Abstracts on the 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF-12)*. – Strasbourg: University of Strasbourg, 2011. – P. 202. One of the three best poster awards has been received.
5. Лисицына, Е. С. Спектрально-кинетические характеристики комплексов катионных карбоцианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами / Е. С. Лисицына, С. Г. Скуридин, Б. И. Шапиро, И. В. Шелаев, О. М. Саркисов, В. А. Кузьмин // *Сборник тезисов 22 Симпозиума «Современная химическая физика»*. – М.: ООО «Парк-медиа», 2010. – С. 46.
6. Лисицына, Е. С. Комплексообразование с ДНК и фотосенсибилизирующие свойства водорастворимых тетракатионных порфиринов и их металлопроизводных / Е. С. Лисицына, Н. В. Новиков, Н. А. Брагина, А. Ф. Миронов, А. В. Карпенко, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин // *Сборник научных трудов XX Международной конференции по физической и координационной химии порфиринов и их аналогов (ICPC-10)*. – Иваново: ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет, 2009. – С. 133–134.