

ПРИМЕНЕНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ К МОНИТОРИНГУ СТРУКТУРНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В НАНОСТОЛБИКАХ НА ОСНОВЕ ДНК И CdSe/CdZnSe/ZnS-КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

И. Г. Мотевич¹, Т. Erdem², А. Акрема², С. А. Маскевич³, Н. Д. Стрекаль^{1*}

УДК 535.375.5;620.3

¹ Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь; e-mail: nat@grsu.by

² Университет имени Абдулаха Гюля, Кокасинан, Кейсери, Турция

³ Белорусский государственный университет,

Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова, Минск, Беларусь

(Поступила 15 марта 2023)

С использованием технологии вакуумного напыления и неорганического синтеза созданы прототипы чиповых систем в виде наностолбиков из комплексов ДНК с CdSe/CdZnSe/ZnS-квантовыми точками, иммобилизованных на плазмонной пленке золота. Конструкция и наличие концевой ДНК, меченной цианиновыми красителями Cy3, позволяет осуществлять реакцию гибридизации этой концевой нити с комплементарными ДНК и контролировать этот процесс по изменению сигнала гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) и флуоресценции. Эффект молекулярного узнавания комплементарных ДНК сопровождается изменением спектра ГКР, увеличением интенсивности флуоресценции в 20 раз и уменьшением длительности затухания флуоресценции.

Ключевые слова: квантовые точки, гигантское комбинационное рассеяние света, наностолбики.

Prototypes of chip systems have been created in the form of nanopillars from DNA complexes with CdSe/CdZnSe/ZnS quantum dots immobilized on a plasmonic gold film using the technology of vacuum deposition and inorganic synthesis. The design of nanopillars and the presence of terminal DNA labeled with Cy3 cyanine dyes makes it possible to carry out the reaction of hybridization of this terminal strand with complementary DNA and to control this process by changing the surface-enhanced Raman scattering (SERS) signal and fluorescence. The effect of molecular recognition of complementary DNA is accompanied by a change in the SERS spectrum, an increase in the fluorescence intensity by a factor of 20, and a decrease in the fluorescence decay time.

Keywords: quantum dots, surface-enhanced Raman scattering, nanopillars.

Введение. Научная школа спектроскопии, основанная Б. И. Степановым, А. Н. Севченко, Г. П. Гуриновичем, А. М. Саржевским и другими всемирно известными учеными, и сегодня открывает новые горизонты международного сотрудничества. Данная работа стала результатом научного взаимодействия ученых университета имени Абдулаха Гюля (г. Кейсери, Турция) и ГрГУ имени Янки Купалы (г. Гродно, Беларусь). Созданы прототипы чиповых систем в виде ансамбля наностолбиков из молекул ДНК с квантовыми точками (КТ) на поверхности плазмонной пленки золота, связанных посредством ковалентного присоединения α -SH ДНК окончания и открытых к оптически контролируемому специфическому связыванию внешних молекул ДНК, меченных органическими хромофо-

APPLICATION OF CONFOCAL MICROSCOPY TO MONITOR THE STRUCTURAL TRANSFORMATIONS IN NANOPILLARS BASED ON DNA AND CdSe/CdZnSe/ZnS QUANTUM DOTS

I. G. Motevich¹, T. Erdem², A. Akrema², S. A. Maskevich³, N. D. Strekal^{1*} (¹ Yanka Kupala Grodno State University, Grodno, Belarus; e-mail: nat@grsu.by; ² Abdullah Gul University, Kokasinan, Kayseri, Türkiye; ³ Belarusian State University, A. D. Sakharov International State Ecological Institute, Minsk, Belarus)

рами. Уникальная технология контролируемой самосборки молекул ДНК, меченных квантовыми точками и цианиновыми красителями, применена для формирования наностолбиков ДНК на поверхности плазмонных пленок золота, полученных в ГрГУ им. Янки Купалы. Связывание комплементарных нитей ДНК и вызванное этим изменение конформации наностолбиков, приводящее к изменению энергии экситон-плазмонных взаимодействий, открывает перспективу реализации наночипов для оптически контролируемого молекулярного узнавания генетических фрагментов.

Ранее нами были опубликованы результаты [1] по формированию флуоресцирующих квази-одномерных структур на основе электростатических комплексов катионных CdSe/ZnS КТ с ДНК, используемой как молекулярный шаблон, а также комплексов ДНК с алкалоидами чистотела [2, 3], имеющими прикладное значение в онкологии. В данной работе рассматривается формирование конъюгатов ДНК-КТ [4] с использованием карбодиимида.

Принципиальное отличие молекулярного маяка на наностолбиках от молекулярных маяков, функционирующих в растворах на основе механизма переноса энергии электронного возбуждения Фёрстера, — возможность регистрации в режиме реального времени трех оптически не перекрывающихся откликов: смещения полосы плазмонного резонанса, флуоресценции КТ и комбинационного рассеяния ДНК и ее молекулярной метки. В настоящей работе показано, как изменяется сигнал вторичного свечения наностолбиков в зависимости от конформации ДНК и от расстояния от нее до плазмонной поверхности с помощью конфокальной микроспектротометрии.

Эксперимент. Плазмонные пленки золота получены методом вакуумного напыления золота на кварцевые подложки с помощью вакуумного поста ВУП-5, как описано в [5, 6]. КТ CdSe/CdZnSe/ZnS, флуоресцирующие в красной области спектра, синтезированы в соответствии с протоколом, разработанным в Университете им. Абдулаха Гюля [7, 8]. Согласно выполненным с помощью просвечивающего растрового электронного микроскопа (Университет им. Абдулаха Гюля) измерениям, используемые в работе КТ ядро/оболочка имеют размеры 8—10 нм (рис 1, а). Очистку полученных КТ осуществляли на центрифуге со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин для удаления непрореагировавших реагентов. Супернатант собирали и КТ осаждали избытком этанола. Скорость вращения КТ на центрифуге составляла 5000 об/мин в течение 5 мин, затем осадок повторно диспергировали в гексане. Процедура повторялась два раза для получения чистых КТ.

Солюбилизацию поверхности КТ осуществляли с помощью меркаптопроионовой (МПК) и тиогликолевой (ТГК) кислот. Сначала 500 мкл КТ с концентрацией 10 мг/мл флокулировали избытком ацетона и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок повторно диспергировали в 1 мл CHCl_3 . Далее добавляли этилендиамин и при интенсивном перемешивании 0.15 М раствор ТГК или МПК, смесь перемешивали в течение 1 ч. Органическую и водную фазы разделяли и микропипеткой собирали КТ в водной фазе. Собранные водные КТ центрифугировали с избытком метанола для удаления оставшихся примесей.

Модифицированные аминоклассами и цианиновыми красителями ДНК были приобретены у компании Oligomer. Для конъюгации модифицированных аминоклассами одонитевых молекул ДНК (амин-ss-ДНК) с карбоксильными группами, присутствующими на поверхности КТ, покрытых МПК или ТГК, использовали химию карбодиимидных сшивающих агентов. В типичной реакции раствор 8 мкМ КТ (25 мкл) разбавляли 50-мМ боратным буфером (200 мкл, pH ~ 6.1) в стеклянном флаконе объемом 4 мл. Затем 50-мМ водный раствор гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, 8 мкл) и 50-мМ водный раствор N-гидроксисукцинимид (NHS, 8 мкл) смешивали с раствором КТ. Затем немедленно добавляли раствор амин-ss-ДНК с соотношением КТ/ДНК 1:100 и содержимое осторожно перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. В ходе реакции конъюгации концентрацию соли в растворе повышали с интервалом времени 30 мин от $[\text{NaCl}] = 0$ М до $[\text{NaCl}] = 1$ М. Далее неконъюгированные ДНК удаляли с помощью установки ультрафильтрации с отсечением молекулярной массы 100000, а именно центрифугированием в режиме 5000 об/мин, 30 мин, и промывке 3—4 раза 50-мМ боратным буфером (pH ~ 6.1). В отдельном эксперименте тестировались конъюгаты ДНК-КТ на предмет успешной конъюгации с помощью комплементарной ДНК, меченной Cy5 (не приведено). Стехиометрическое отношение ДНК/КТ составляло 22 молекулы ДНК на одну КТ. Данное соотношение оценивалось по методике [9].

Для формирования наностолбиков КТ с ДНК необходимо экранировать электростатическое отталкивание, поэтому к дисперсии нанокристаллов добавляли NaCl так, чтобы концентрация соли достигала 100 мМ. Нанокристаллы, покрытые альфа-ДНК (α -ДНК-КТ) (60 мкл), помещали на наноструктуру золота, покрытые -SH-ДНК, с помощью микропипетки, и систему закрывали с помощью чаш-

ки Петри для ограничения испарения в течение 30 мин. Через 30 мин оставшийся раствор удаляли пипеткой, а плазмонную пленку с добавленными нанокристаллами трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью микропипетки для удаления любых непокрытых нанокристаллов. Таким образом был сформирован первый слой комплексов ДНК-КТ. Далее аналогичным образом осаждались второй, третий и последующие слои ДНК-КТ при чередовании α -ДНК-КТ и α' -ДНК-КТ. В данной технологии образование наностолбиков осуществляется за счет гибридизации одонитевых α -ДНК и комплементарных к ним α' -ДНК в двухнитевые стержни ДНК, располагающиеся между КТ в получаемой слоистой структуре Zoom view (рис. 1).

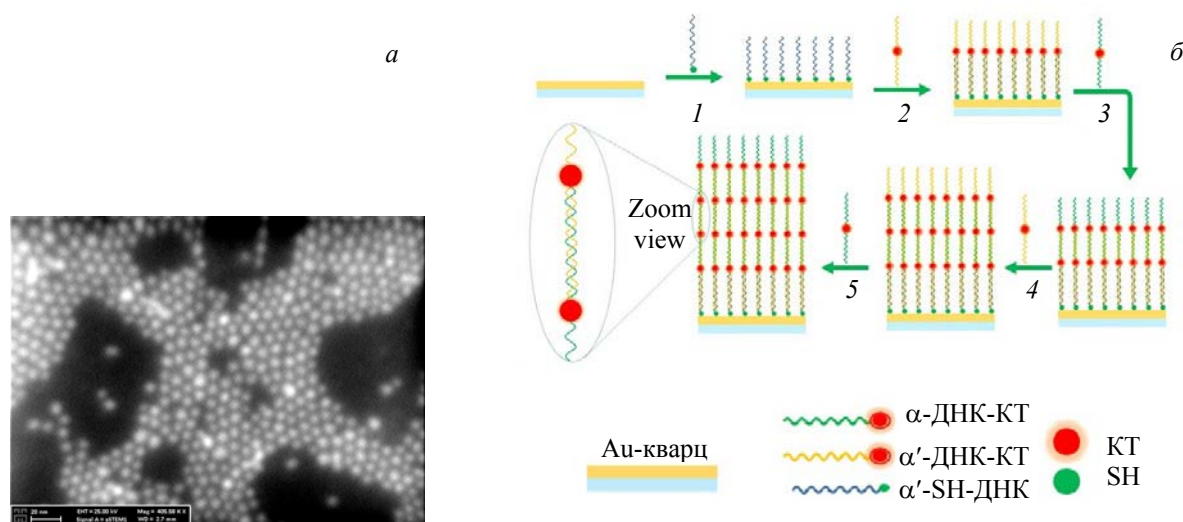


Рис. 1. Изображение CdSe/CdZnSe/ZnS, полученное с помощью просвечивающего растрового электронного микроскопа (а) и схема формирования наностолбиков на основе ДНК и КТ на поверхности плазмонных пленок золота (б)

Два образца, каждый из которых покрыт ДНК α -SH и α' -SH на наностолбиках золота (рис. 1, б) в количестве пяти слоев, имеют длину ~ 205 нм (по количеству оснований в наностолбиках). Далее к верхнему слою этой структуры присоединяли меченную цианиновым красителем длинноцепочечную α -Cu3-ДНК, где Cu3 — цианиновый краситель. Для изменения конформации наностолбиков от булавочной (нежесткой, рис. 2, а) к жесткой стержнеподобной (рис. 2, б) к ним присоединялись длинноцепочечные (61 основание) комплементарные нити. Так, участок 4 (рис. 2, а) характеризуется последовательностью оснований

CGGTCGTGGCAACCTAGTTGCAGGCCAACGACAGCATTCGGTTAGGAGAGTGCGAGTCGCG

и заканчивается красителем Cu3. На рис. 2, б с этим участком комплементарно связывается одонитевая ДНК, имеющая последовательность оснований

CGCAGCACCGTTGGATCAACGTCCGGTTGCTGTCTGTAAGCCAATCCTCTCACGCTCAGCGC.

Гибкость молекул ДНК (рис. 2) зависит от того, является молекула одноцепочечной или двухцепочечной. Если ДНК двухцепочечная, она будет жесткой, тогда как одноцепочечная ДНК может принимать различные конформации [10].

Спектры вторичного свечения наностолбиков ДНК, меченных КТ и цианиновым красителем, измерены с помощью 3D-сканирующего конфокального микроскопа со спектрометром Nanofinder S (SOL Instruments, Беларусь) непосредственно с подложек в безводной фазе. В качестве источника возбуждения использовано лазерное излучение на $\lambda = 532$ нм. Спектры получены с помощью спектрометра Nanofinder S., оснащенного 100 \times объективом с пьезосканером. Длительность затухания свечения измерена на пикосекундном импульсном спектрофлуориметре [11]. В качестве источника излучения использован импульсный лазер PDL 800-B ("Пикоквант", Германия) с лазерной головкой LDH 400, максимум спектральной плотности излучения которой приходится на $\lambda = 407$ нм, а полуширина спектральной линии ~ 4 нм. Частота следования возбуждающих лазерных импульсов 0.25 МГц.

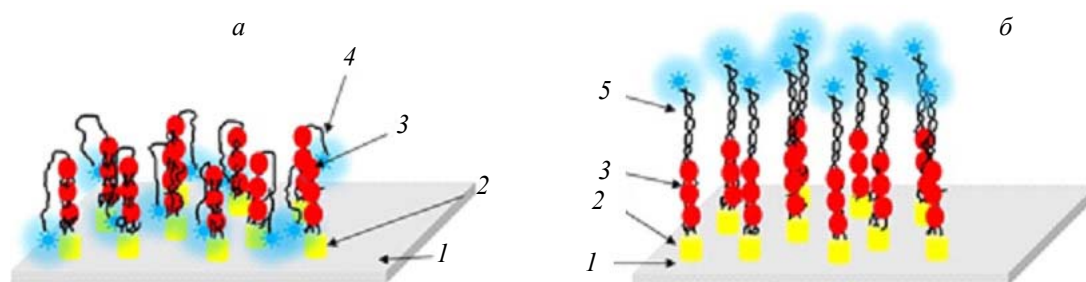


Рис. 2. Принцип “умной” самосборки ДНК на плазмонных пленках золота: наностолбики ДНК на поверхности плазмонной пленки золота до (а) и после (б) присоединения комплементарных молекул ДНК: 1 — кварцевая подложка; 2 — островки золота; 3 — меченные молекулами ДНК квантовые точки; 4 — однонитевые молекулы ДНК, меченные красителем; 5 — присоединение комплементарных молекул ДНК (последовательность оснований указана в тексте)

Результаты и их обсуждение. На рис. 3, а приведены спектры вторичного свечения осажденных на плазмонной пленке золота наностолбиков ДНК булавочной конформации, содержащих КТ и Cu_3Z в качестве флуоресцирующих меток. (Спектры на рис. 3 представлены в двух шкалах — абсолютной в нм и относительной в см^{-1} ; на вставке диапазон 0—2000 см^{-1} соответствует диапазону 530—600 нм.)

Как видно из рис. 3, а в стоксовой области относительно лазерного возбуждения в одном из спектров присутствует полоса флуоресценции красителя Cu_3Z на $\lambda = 574$ нм. В других спектрах имеются полосы флуоресценции КТ с максимумами на $\lambda = 627$ —639 нм. Смещение полосы флуоресценции КТ и преимущественное тушение флуоресценции красителя Cu_3Z свидетельствует об отсутствии хорошо упорядоченной структуры ансамбля наностолбиков на плазмонной пленке золота вследствие их малой относительной жесткости. Некоторые концевые группы ДНК с Cu_3Z окончанием плотно примыкают к поверхности золота, поэтому флуоресценция красителя потушена. Лишь один из пяти спектров характеризуется заметной флуоресценцией Cu_3Z и при этом еще более слабой флуоресценцией КТ. Таким образом, в тех же точках ансамбля наностолбиков, где хорошо потушена флуоресценция Cu_3Z , ярко выражена полоса флуоресценции КТ, положение максимума которой испытывает гипсохромный сдвиг при заметном гипохромизме.

Колебательные полосы на частотах 765, 1336, 1505, 1567, 1578 и 1584 см^{-1} принадлежат усиленным поверхностью плазмонной пленки золота колебаниям ДНК [12]. Наибольшую относительную интенсивность эти полосы имеют для одной из точек ансамбля, где они сравнимы с интенсивностью полосы флуоресценции КТ. Это соответствует фрагменту наностолбиков, который контактирует с поверхностью золота в месте связывания ДНК с КТ.

Ситуация кардинально меняется для образца наностолбиков ДНК-КТ- Cu_3Z стержнеподобной (рис. 2, б) конформации (рис. 3, б). Так относительная интенсивность флуоресценции КТ увеличивается в 20 раз и более для этой конформации по сравнению с наностолбиками в конформации нежесткой булавочной (рис. 2, а), что может быть обусловлено как минимум двумя факторами. Во-первых, в системе изменяются расстояния между основными донорно-акцепторными хромофорами — красителем Cu_3Z , КТ и плазмонной пленкой. Основной вклад в общий сигнал флуоресценции вносят КТ. Во-вторых, ансамбль наностолбиков на поверхности приобретает упорядоченную структуру и свечение может носить когерентный характер [13]. Подтверждением формирования отдельных доменов с когерентным свечением может служить уменьшение среднего времени затухания флуоресценции КТ от 0.168 до 0.156 нс по сравнению с наностолбиками в булавочной конформации. Как и для предыдущего образца, положение максимума флуоресценции КТ испытывает некоторое смещение. В точках образца, где флуоресценция КТ потушена, проявляется слабый (по сравнению с интенсивностью флуоресценции) спектр ГКР, состоящий из полос 957, 1353, 1336, 1525, 1581 и 1603 см^{-1} . При этом полосу 1580 см^{-1} по характеристичности ее проявления можно отнести как к колебаниям Cu_3Z , так и ДНК. На частотах 1336 и 1525 см^{-1} могут проявляться колебания цианиновой метки ДНК [12].

Таким образом, реакция гибридизации и изменение конформации концевой ДНК в ансамбле наностолбиков ДНК-КТ- Cu_3Z приводят к существенному увеличению интенсивности и уменьшению длительности затухания флуоресценции ансамбля. Полезным для практического применения пред-

ставляется изучение зависимости интенсивности отдельных полос в спектре вторичного свечения наностолбиков ДНК от расстояния до поверхности плазмонной пленки, т. е. сканирование по координате Z (при этом плоскость образца соответствует координатам XY).

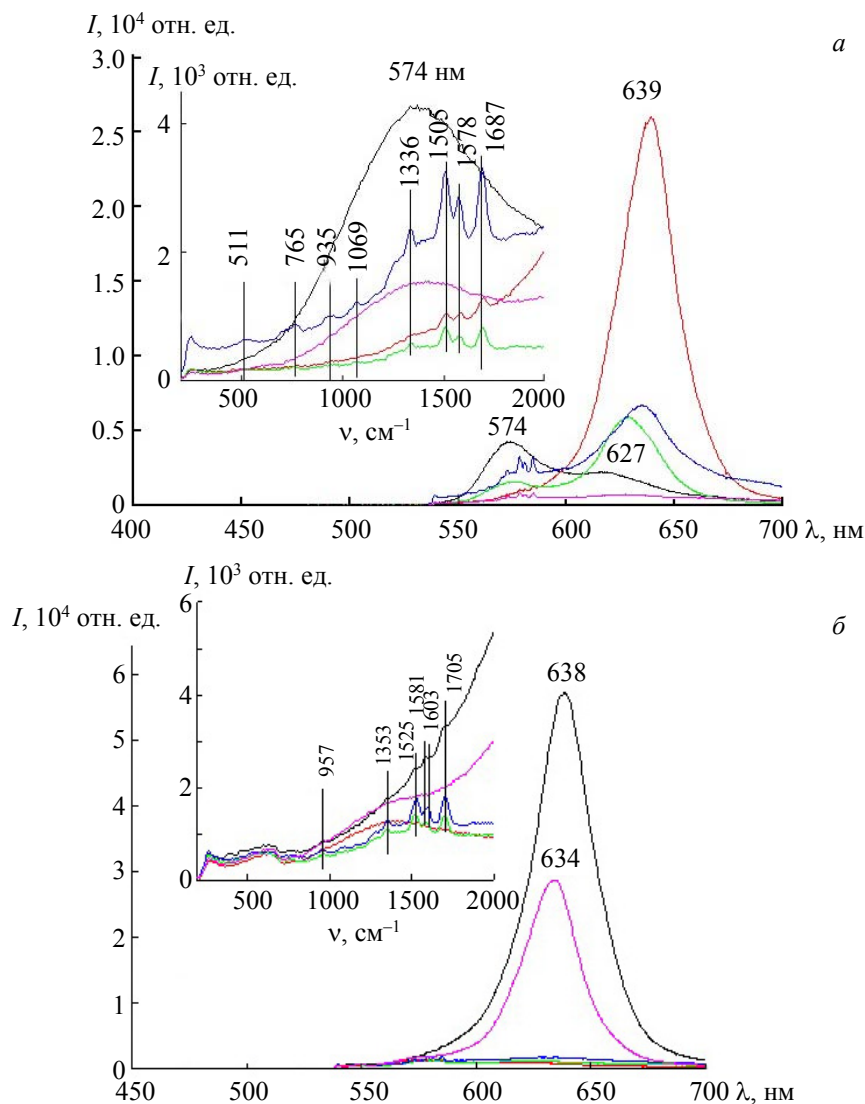


Рис. 3. Спектры вторичного свечения образца ансамбля наностолбиков ДНК-КТ- Cu_3 в нежесткой булавочной (а) и стержнеподобной (б) конформациях, зарегистрированные с пространственным разрешением по поверхности образца в различных точках

На рис. 4 представлены зависимости интенсивности флуоресценции на $\lambda = 630$ нм, т. е. в максимуме полосы флуоресценции КТ для образцов в булавочной и стержнеподобной конформациях. Видно, что по мере удаления от поверхности плазмонной пленки, т. е. с увеличением Z (расстояния до наностолбиков), интенсивность флуоресценции в наностержнях ДНК (рис. 4, б) изменяется незначительно вблизи поверхности, достигает своего максимума на расстоянии от образца $\sim 2\lambda$ и затем монотонно (примерно по экспоненте) убывает. На убывающей части зависимости наблюдаются максимумы на длинах волн $\sim 4\lambda$, $\sim 6\lambda$ и $\sim 8\lambda$. Немонотонный характер зависимости и наличие кратных 2λ ($\lambda = 630$ нм) осцилляций указывают на интересные оптические свойства созданных наноструктур. В то же время интенсивность флуоресценции КТ от наностолбиков булавочной конформации (рис. 4, а) практически не изменяется на всех расстояниях от образца и имеет низкую интенсивность. Данный факт указывает на то, что в булавочной конформации имеет место тушение флуоресценции КТ плазмонной поверхностью.

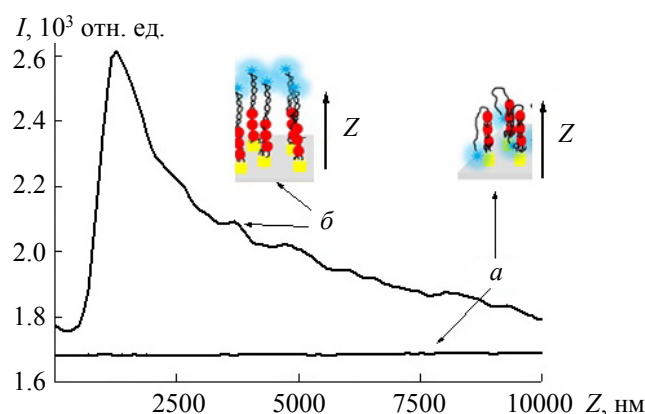


Рис. 4. Зависимости интенсивности флуоресценции на $\lambda = 630$ нм для наностолбиков ДНК-КТ в булавочной (а) и стержнеподобной (б) конформациях от расстояния до подложки (координаты Z вдоль нормали от образцов)

Заключение. Созданные прототипы чиповых наноструктур на основе ДНК, CdSe/CdZnSe/ZnS-квантовых точек и органической метки Cu₃ на поверхности плазмонных пленок золота позволяют отслеживать реакцию молекулярного узнавания одноцепочечных нитей ДНК как результат изменения спектров гигантского комбинационного рассеяния света, интенсивности и длительности флуоресценции. Обнаружено, что супрамолекулярная структура полученных образцов обладает новыми оптическими свойствами, проявляющимися в немономонной зависимости сигнала флуоресценции в отраженном свете.

Авторы выражают благодарность С. В. Гапоненко за инициирование работ в данном направлении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках международного сотрудничества Tübitak-BRFFR (гранты Ф21ТЮБ-021 и 220N155).

- [1] В. Степура, А. Суханова, В. Артемьев, Е. Устинович, Н. Стрекаль, С. Маскевич, О. Кулакович, К. Мочалов, И. Набиев, В. Олейников. *Опт. и спектр.*, **100**, № 6 (2006) 935—942
- [2] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, Я. В. Новицкий, С. А. Маскевич. *Докл. НАН Беларуси*, **52**, № 1 (2008) 54—57
- [3] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, Я. В. Новицкий, С. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **77**, № 3 (2010) 425—431 [I. G. Motevich, N. D. Strekal, J. W. Nowicky, S. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **77** (2010) 394—399]
- [4] Б. В. Ронищенко, Е. А. Улащик, А. С. Круглик, М. Ю. Татульченков, А. В. Радченко, В. В. Шманай, М. В. Артемьев. *Журн. прикл. спектр.*, **86** (2019) 954—961 [B. A. Ranishenka, E. A. Ulashchik, A. S. Kruhlik, M. Yu. Tatulchenkov, A. V. Radchanka, V. V. Shmanai, M. V. Artemyev. *J. Appl. Spectr.*, **86** (2019) 1064—1070]
- [5] Н. Д. Стрекаль. *Вестн. ГрГУ*, **1**, № 25 (2004) 62—66
- [6] G. Vasilyuk, S. Maskevich, I. Sveklo, G. Zanevsky, G. Gachko, N. Strekal. *J. Mol. Struct.*, **410-411** (1997) 223—227
- [7] M. Adam, T. Erdem, G. M. Stachowski, Z. Soran-Erdem, J. F. L. Lox, C. Bauer, A. Eychmüller. *ACS Appl. Mater. & Interfaces*, **7**, N 41 (2015) 23364—23371
- [8] T. Erdem, Z. Soran-Erdem, Y. Kelestemur, N. Gaponik, H. V. Demir. *Opt. Express*, **24**, N 2 (2016) 74—84
- [9] A. Banerjee, Chl. Grazon, B. Nadal, T. Pons, Ya. Krishnan, B. Dubertret. *Bioconjugate Chem.*, **26**, N 8 (2015) 1582—1589
- [10] A. Pal, Ya. Levy. *PLoS Comput. Biol.*, **1** (2019) 15(1—4)
- [11] Г. А. Гачко, В. К. Зыбельт, Л. Н. Кивач, С. А. Маскевич, А. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **47** (1987) 335—339 [G. A. Gachko, V. K. Zybel't, L. N. Kivach, S. A. Maskevich, A. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **47** (1987) 849—852]
- [12] A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, N. J. Halas. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, N 16 (2008) 5523—5529
- [13] В. В. Железняков. *УФН*, **159**, № 2 (1989) 193—260