

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 539.22

**МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЕ УЗНАВАНИЕ НА ПОЛИМЕРИЗУЕМЫХ
ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЯХ, СОДЕРЖАЩИХ
НУКЛЕОЛИПИДЫ****С. Н. Старицын, С. А. Яковенко, Е. В. Дубровин, А. М. Ломоносов,
И. В. Яминский***(кафедра биофизики; кафедра полимеров и кристаллов)*

E-mail: staritsyn@phys.msu.ru

Получены и охарактеризованы монослои нуклеолипидов и дииновой кислоты. Монослои, содержащие нуклеолипиды, комплементарно связывают содержащиеся в водной субфазе молекулы полинуклеотидов. Конформация связанных с монослоем нуклеиновых кислот зависит от его состава. Фотополимеризация дииновой кислоты фиксирует полученную структуру монослоя, который может служить основой нового типа модельной системы для изучения молекулярного узнавания на поверхности биологических мембран.

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем современной биофизики является исследование физико-химических механизмов структурообразования и функционирования высокоорганизованных молекулярных и надмолекулярных структур, в огромном разнообразии представленных в живых организмах. В основе этих процессов лежит так называемое «молекулярное узнавание», т. е. специфические межмолекулярные взаимодействия по принципу комплементарности поверхностей молекул. Так, основой накопления, хранения, воспроизведения и эволюционной модификации генетической информации является высокоспецифичное взаимодействие комплементарных пар нуклеиновых оснований. Поскольку репликация и другие процессы с участием ДНК происходят в клетках, представляет интерес изучение взаимного узнавания нуклеиновых оснований в условиях, имитирующих клеточные системы, которые характеризуются прежде всего наличием мембран. Поэтому в настоящей работе изучается взаимодействие азотистых оснований в ленгмюровских монослоях, которые могут служить моделями мембранных систем [1]. В 1980-е годы были синтезированы амфифильные производные азотистых оснований (АПАО) — соединения, не растворимые в воде, с общей формулой «нуклеотидное основание» (гидрофильная часть молекулы) плюс ковалентно пришитая «углеводородная цепочка» (гидрофобная часть молекулы). Монослои, образованные такими модифицированными липидами (нуклеолипидами), могут эффективно связывать комплементарные им основания, когда последние находятся в водной субфазе [2–13]. Авторы отмечают важность данных работ для понимания фундаментальных принципов молекулярного узнавания, самосборки и т. д. Из возможных практических применений нуклеолипи-

дов отмечают возможность создания биосенсоров, а в [3–5] предполагают, что стеккинг-агрегаты азотистых оснований, выстроенные в монослоях, смогут служить «молекулярными проводниками», что представляет интерес для нанoeлектроники. В большинстве этих работ изучается взаимодействие монослоев нуклеолипидов на границе раздела фаз вода–воздух с растворенными в воде нуклеозидами. Лишь в [6, 9] проводились опыты по взаимодействию монослоев нуклеолипидов с олигонуклеотидами, и только в [12, 13] монослои нуклеолипидов были закреплены на твердой подложке. Поэтому в настоящей работе мы изучали взаимодействие монослоев (как на границе раздела фаз вода–воздух, так и перенесенных на твердую подложку, что представляет больший интерес для практических применений) нуклеолипида олеилтимина с различными полинуклеотидами.

Экспериментальная часть

Стеариновая кислота и NaCl были приобретены у фирмы «Sigma» и использовались без дальнейшей очистки. Генейкозо-10,12-дииновая кислота $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ (ГДК) была любезно предоставлена СКБ РАН, г. Фрязино. Синтез олеилтимина (ОТ) был проведен в РХТУ им. Д. И. Менделеева В. В. Захарычевым и В. В. Мамашиним так, как описано в работе [14]. Полинуклеотиды полиаденин (полиА), полиурацил (полиУ), полигуанин (полиГ), полицитозин (полиЦ) были также приобретены у фирмы «Sigma» и имели молекулярную массу в диапазоне 10^5 – 10^6 Д (по данным «Sigma»), что соответствует длине одонитевой цепочки в 300–3000 оснований. Использовались растворы полинуклеотидов концентрации 0.003 мг/мл, что соответствует концентрации мономеров 10^{-5} М (отметим, что в работах [2–10] использовались концентрации нуклеозидов $0.5 \cdot 10^{-3}$ – 10^{-2} М).

Исследование монослоев проводилось на ленгмюровской ванне (размеры 14×25 см) путем записи изотерм сжатия, т.е. зависимостей поверхностного давления π (мН/м) от средней площади, приходящейся на молекулу, A ($\text{\AA}^2$). Точность измерения площади была $1.0 \text{ \AA}^2$, а давления 0.2 мН/м. Во всех экспериментах использовалась вода электропроводностью не менее $18 \text{ мОм}\cdot\text{см}^{-1}$ (Millipore Milli-RO system). Все эксперименты проводились при комнатной температуре (20°C).

ОТ и ГДК раздельно растворяли в хлороформе (10^{-3} М), хлороформ после испарения не давал изотерм сжатия. При изучении смешанных монослоев растворы этих веществ смешивали в соответствующем объемном соотношении непосредственно перед использованием. После нанесения ПАВ на поверхность субфазы монослой выдерживался в течение 10 мин (или 30 мин, если субфаза содержала полинуклеотиды) перед сжатием. В случае субфазы, не содержащей полинуклеотидов, вид изотерм сжатия ПАВ не зависел от времени выдержки (10–30 мин) монослоя перед сжатием. Изотермы записывались при скорости сжатия монослоя $10 \text{ \AA}^2\cdot\text{мол}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$ (если не указано иначе), время записи изотермы при этом составляло 10 мин.

Для исследований с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) монослои переносились методом вертикального погружения на слюду с предварительно перенесенным на нее монослоем стеариновой кислоты Z-типа («голова» — к подложке, гидрофобный «хвост» — от подложки), похожий способ при переносе монослоев нуклеолипидов на подложки использовался в работе [13].

Скорость подложки при переносе на нее монослоев ОТ, ГДК и их смесей составляла 3 мм/мин. Подложки погружались через монослой один раз. Поверхностное давление (15 мН/м) при переносе монослоев поддерживалось постоянным. Судя по коэффициенту переноса (1.0 ± 0.1), перенос монослоя происходил при движении подложки вниз и не происходил при ее движении вверх (менее 0.1). Таким образом получены бислойные пленки, в которых первый монослой был из стеариновой кислоты, ориентированной карбоксильными группами к слюде, а второй — из нуклеолипида и/или ГДК, ориентированными гидрофобными «хвостами» к подложке, а карбоксильными группами или нуклеотидными основаниями обращенными от подложки, и следовательно, способные при погружении подложки в воду взаимодействовать с растворенными в ней веществами.

Все АСМ-измерения проводились на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA) в режиме прерывистого контакта. Для измерений на воздухе использовались коммерческие кантилеверы из кремния жесткостью 42 Н/м (резонансная частота лежала в диапазоне 280–310 кГц). Частота сканирования устанавлива-

лась около 2 Гц. Толщина, как и само наличие (би)монослоя на поверхности подложки, определялась по глубине дефектов (пор) монослоя. Обработка и анализ изображений проведены с использованием программного пакета ФемтоСкан Онлайн (ООО НПП «Центр перспективных технологий») [15].

Для полимеризации пленок использовалась ультрафиолетовая лампа Medicor В-15.1 (Medicor, Hungary) мощностью 60 Вт, располагавшаяся на высоте 30 см над монослоем. Время облучения выбрано на основании наших опытов с монослоями (см. ниже), а также согласно [16], где при изучении кинетики полимеризации моно- и полислоев диацетиленов для полной полимеризации монослоя требовалось 30 мин.

Также были синтезированы олеил-производные аденина, гуанина, цитозина. Данные экспериментов с ними здесь не приводятся, но в целом они повторяют результаты, полученные для олеилтимина.

Результаты и обсуждение

1. Изотермы сжатия монослоев ОТ и ГДК

На рис. 1 представлены изотермы сжатия монослоев ГДК и ОТ на субфазах различного состава, которые подтверждают, что эти вещества способны формировать стабильные монослои. Вид изотерм сжатия ГДК (рис. 1, а) сильно зависит от ионного состава субфазы — стабильность монослоев увеличивается на 1 М растворах NaCl (площадь, приходящаяся на одну молекулу в точке коллапса, уменьшается, а поверхностное давление увеличивается).

Так как молекулы ГДК имеют сопряженные тройные связи, то, как и другие диацетилены, они легко полимеризуются при облучении ультрафиолетом (УФ) [6, 16, 17]. УФ-облучение во время сжатия сильно влияло на вид изотерм сжатия монослоев, содержащих ГДК: монослои удавалось поджать до более высоких давлений и меньших площадей, приходящихся на одну молекулу, что является характерным эффектом при полимеризации молекул монослоя. При этом с уменьшением скорости поджатия изотерма ГДК становится все менее вогнутой, и при скорости поджатия $3 \text{ \AA}^2\cdot\text{мол}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$ (что соответствует времени сжатия и УФ-облучения в 30 мин) изотерма становится «линейной», поэтому для полимеризации перенесенных пленок было выбрано время 30 мин, которое гарантировало бы, по нашему мнению, полную полимеризацию пленки. Это также согласуется с работой [6], где при УФ-облучении ленгмюровских пленок нуклеолипидов, имеющих диацетиленовую группу в липофильной части молекулы, изменения в спектрах их поглощения происходили как минимум в течение 20 мин. Весьма интересным представляется тот факт, что изотермы сжатия ГДК без УФ и при УФ-облучении со скоростью $3 \text{ \AA}^2\cdot\text{мол}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$ имеют одну общую

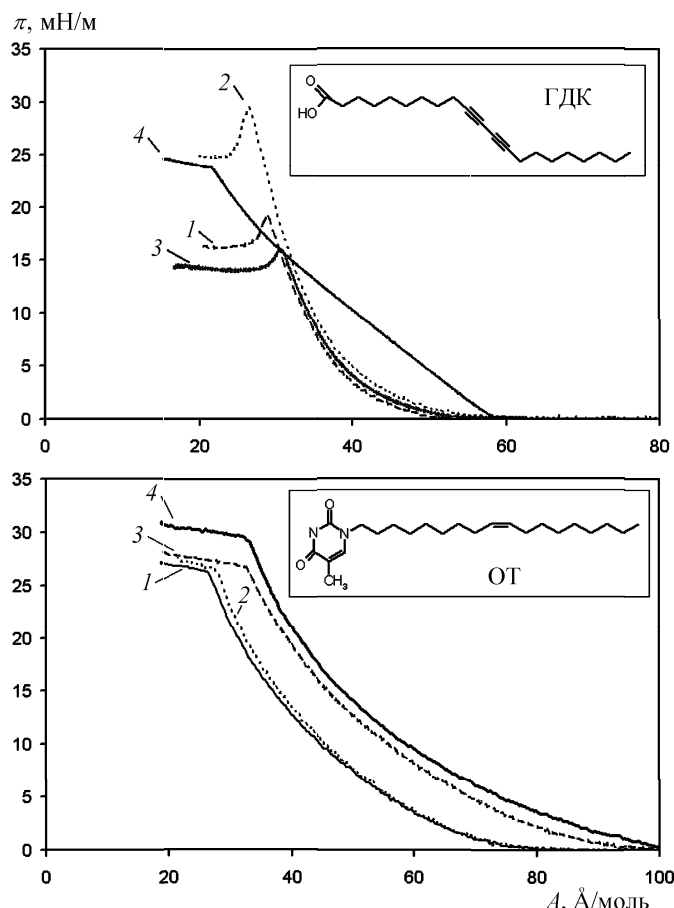


Рис. 1. Изотермы сжатия монослоев ГДК (а) и ОТ (б). Используемые субфазы: (а) 1 — чистая вода, 2 — 1 М раствор NaCl, 3 — чистая вода (сжатие в течение 30 мин), 4 — чистая вода (облучение УФ во время сжатия в течение 30 мин); (б) 1 — чистая вода, 2 — 1 М раствор NaCl, 3 — 1 М раствор NaCl плюс некомплементарные полинуклеотиды, 4 — 1 М раствор NaCl плюс полиаденин.

На врезках показаны структурные формулы веществ

точку, соответствующую точке коллапса неполимеризованной ГДК.

2. Взаимодействие монослоев ОТ с полинуклеотидами

Добавление соли в субфазу слабо влияет на вид изотерм сжатия монослоев ОТ (рис. 1, б). Гораздо более сильные изменения в виде изотерм сжатия происходили при добавлении в субфазу полинуклеотидов. Изменения в изотермах, вызываемые полинуклеотидами (полиУ, полиГ, полиЦ), некомплементарными монослою, были одинаковы. Более сильные изменения происходили при добавлении под монослой комплементарных ему полинуклеотидов (полиА). Общим является изменение плотности упаковки молекул в коллапсе монослоя (изотерма сжатия сдвигается вправо). Это можно объяснить тем, что наличие сахаров и остатков фосфорной кислоты в молекулах полинуклеотидов накладывает дополнительные ограничения (которых нет в монослоях АПАО) на максимальную плотность упаковки нуклеотидных оснований, а значит, добавление полинуклеотидов в субфазу может приводить к сдвигу

изотермы сжатия монослоя вещества, связанного с растворенными полинуклеотидами, вправо. Поверхностное давление монослоя в коллапсе на водных растворах полинуклеотидов меняется незначительно, но при формировании монослоев на 1 М растворе NaCl комплементарные полинуклеотиды вызывают более значительные изменения давления.

Хотя при УФ-облучении монослоев нуклеолипидов возможна димеризация тиминов [2, 7], мы считаем, что в условиях наших экспериментов этого не происходило. Изотермы сжатия нуклеолипидов не претерпевали каких-либо изменений при УФ-облучении во время сжатия с различными скоростями (от 10 до $3 \text{ \AA}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

3. Изучение морфологии пленок с помощью АСМ-микроскопии

АСМ изображения (рис. 2) монослоев индивидуальных веществ и их смесей в соотношении $[\text{ГДК}] : [\text{ОТ}] = 4 : 1$ представляют собой ровную однородную поверхность с порами (количество, размеры и глубина которых различны для образцов различного состава), а для монослоев смешанного состава это позволяет утверждать, что при соотношении $[\text{ГДК}] : [\text{ОТ}] = 4 : 1$ они формируют истинные 2 D растворы (т.е. без разделения на компоненты) [18]. На рис. 3 представлено АСМ-изображение той же подложки, что и на рис. 2, но только после УФ-облучения. Уменьшение числа дефектов и уменьшение толщины монослоя подтверждает полимеризацию монослоя [16].

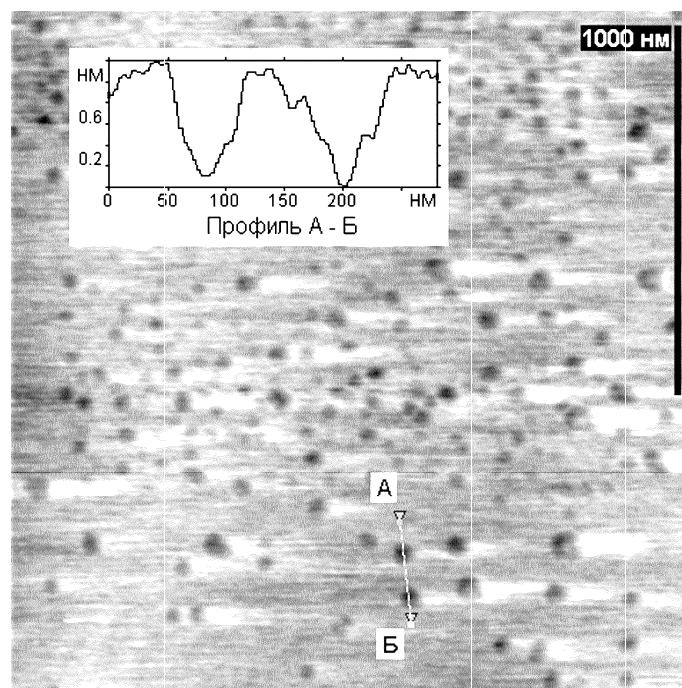


Рис. 2. АСМ-изображение монослоя ГДК (монослой перенесен с поверхности чистой воды). О наличии монослоя, как и о его толщине, можно судить по наличию пор глубиной около 1 нм

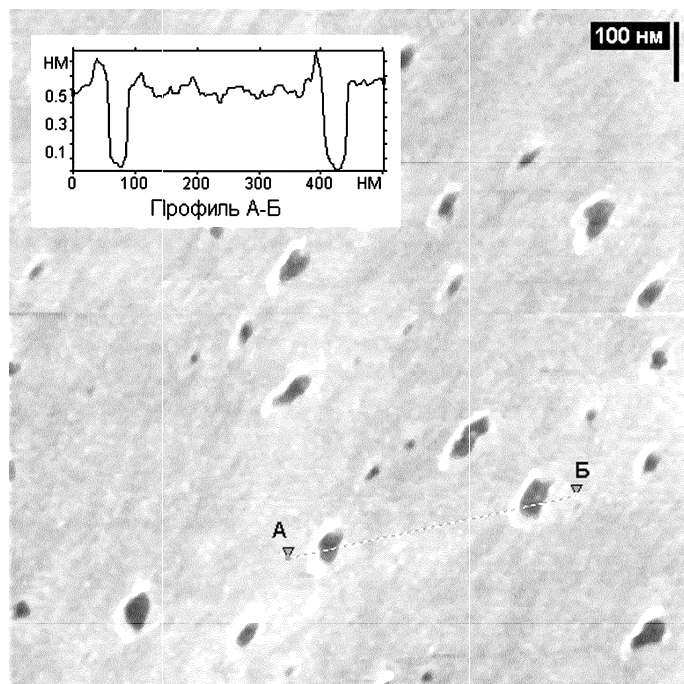


Рис. 3. АСМ-изображение монослоя ГДК после УФ облучения в течение 30 мин. Количество пор значительно уменьшилось. Видимая толщина монослоя около 0.6 нм

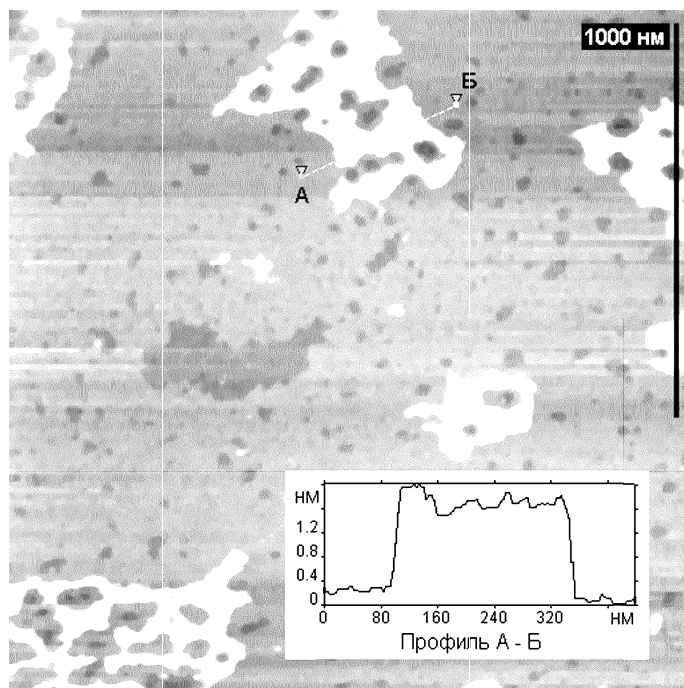


Рис. 4. АСМ-изображение монослоя смеси ГДК:ОТ = 4:1 после повторного погружения в воду. На нем видны «пористые» структуры высотой 1.4–1.8 нм, которые могут быть остатками монослоя смеси ГДК + ОТ

Было обнаружено, что при повторном погружении в воду подложки, необлучавшихся УФ, поверхностное давление субфазы увеличивалось. Такое может происходить, когда ранее перенесенное вещество переходит с подложки обратно на поверхность субфазы («смывается»). АСМ-изображение (рис. 4) таких подложек показывает наличие «остатков» пленки в виде нерегулярно расположенных кусков раз-

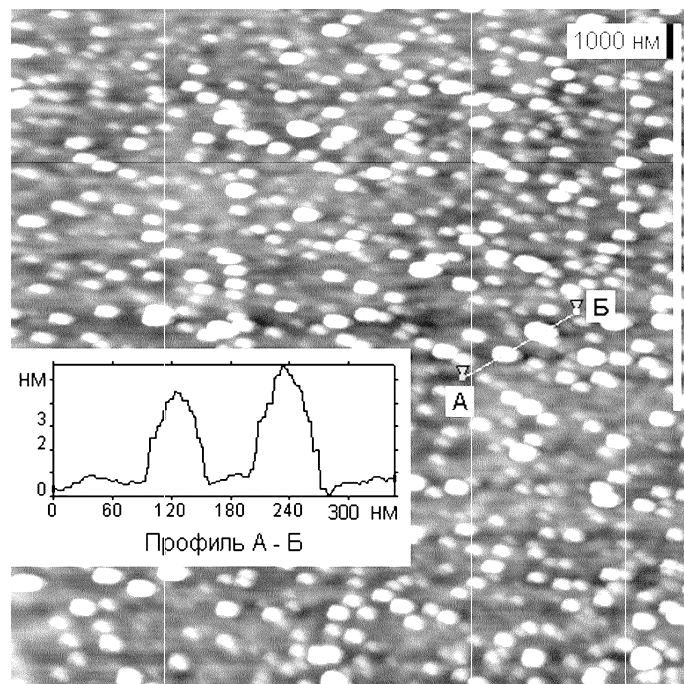


Рис. 5. АСМ-изображение молекул полиаденина, связанного с монослоем ОТ. На поверхности монослоя ОТ, полученного с субфазы (1 М раствор NaCl), содержащей полиА, видно большое количество глобул поперечными размерами 30–80 нм и высотой до 6 нм

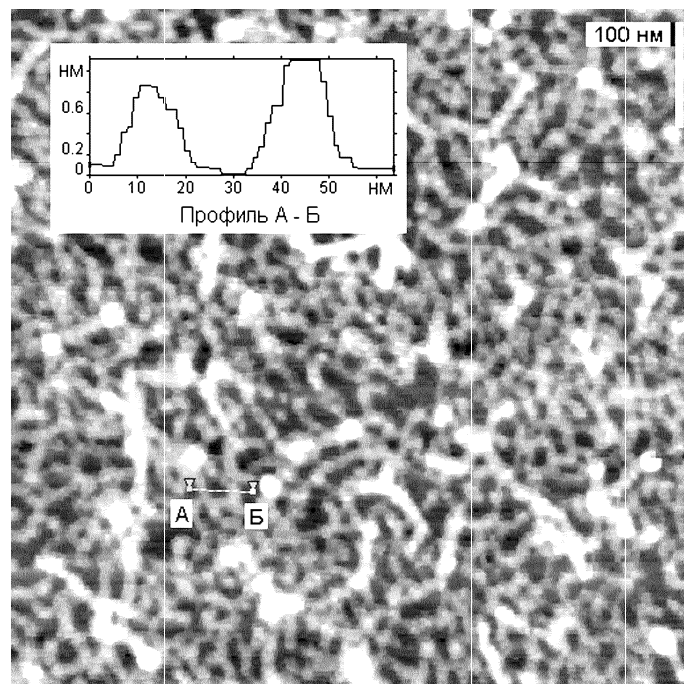


Рис. 6. АСМ-изображение молекул полиаденина, связанных с монослоем смеси ГДК:ОТ = 4:1. Монослой перенесен с субфазы (1 М раствор NaCl), содержащей полиА. На поверхности видны нитевидные структуры с размерами, характерными для цепочек нуклеиновых кислот (высотой 0.6–1.2 и шириной 12–14 нм)

личных размеров. Напротив, пленки, подвергнутые УФ-облучению, демонстрировали большую механическую стойкость (не разрушались при повторном погружении в воду с температурой до 95°C), что свидетельствует об их полимеризации.

При изучении монослоев ОТ, перенесенных с субфазы (независимо от ее ионного состава), содержащей полинуклеотиды, на поверхности пленки были обнаружены «глобулы», по всей вероятности, «свернутые» молекулы полинуклеотидов, рис. 5. Когда в субфазе присутствовал полиаденин (комплементарный олеилтими́ну), то на поверхности перенесенных пленок обнаруживалось гораздо большее количество «глобул», нежели в случае некомплементарных полинуклеотидов, что позволяет утверждать об узнавании и специфическом связывании. Тем не менее и некомплементарное связывание также имеет место. Наличие некомплементарных полинуклеотидов на поверхности монослоя можно объяснить тем, что они «осадились» из капелек воды, которые могут остаться на поверхности пленки после погружения подложки в субфазу. Однако в этом случае на подложке должны были бы присутствовать кристаллики соли (на АСМ-изображениях пленок, полученных с субфазы, содержащей NaCl), чего не наблюдается.

При изучении смешанных монослоев ГДК + ОТ, перенесенных с растворов полиаденина (в 1 М растворе NaCl), на подложках было обнаружено большое количество «нитеподобных» структур, которые, по нашему мнению, являются молекулами полиаденина (рис. 6). Отметим, что при переносе с субфазы, содержащей некомплементарные полинуклеотиды, нам не удалось обнаружить на поверхности смешанных монослоев связанных с ней полинуклеотидов. Это свидетельствует о том, что смешанные монослои кроме улучшенных механических свойств характеризуются большей избирательностью связывания полинуклеотидов.

Подобные структуры были также обнаружены на подложке с перенесенным из чистой воды и полимеризованным монослоем смеси ГДК + ОТ после повторного погружения в воду, содержащую полиаденин. Следовательно, будучи перенесенными на твердые подложки, нуклеолипиды сохраняют способность к избирательному связыванию нуклеиновых кислот.

Литература

1. Геннис Р. // Биомембраны: молекулярная структура и функции. М., 1997.
2. Kitano H., Ringsdorf H. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1985. **58**, N 10. P. 2826.
3. Shimomura M., Nakamura F., Ijio K. et al. // Thin Solid Films. 1996. **284–285**. P. 691.
4. Shimomura H., Nakamura F., Ijio K. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1997. **119**, N 9. P. 2341.
5. Nakamura F., Ijio K., Shimomura M. // Thin Solid Films. 1998. **327–329**. P. 603.
6. Shimomura M., Mitamura R., Matsumoto J., Ijio K. // Synthetic Metals. 2003. **133–134**. P. 473.
7. Huang J., Liang Y. // Thin Solid Films. 1998. **325–326**. P. 210.
8. Miao W., Du X., Liang Y. // Langmuir. 2003. **19**, N 13. P. 5389.
9. Ebara Y., Mizutani K., Okahara Y. // Langmuir. 2000. **16**, N 6. P. 2416.
10. Radler U., Heiz C., Luisi P., Tampe R. // Langmuir. 1998. **14**, N 23. P. 6620.
11. Berti D., Franchi L., Baglioni P., Luisi P. // Langmuir. 1997. **13**, N 13. P. 3438.
12. Weissner M., Kashammer J., Menges B. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2000. **122**, N 1. P. 87.
13. Berndt P., Kurihara K., Kunitake T. // Langmuir. 1995. **11**, N 8. P. 3083.
14. Tohda K., Tange M., Odashima K. et al. // Anal. Chem. 1992. **64**. P. 960.
15. Филонов А.С., Гаврилко Д.Ю., Яминский И.В. Программное обеспечение «ФемтоСкан» для обработки трехмерных изображений. М., 2001; <http://www.spm.genebee.msu.ru/manual/ru/index.html>.
16. Кручинин В.Н., Репинский С.М., Свешникова Л.Л. и др. // Поверхность. Физика, химия, механика. 1991. № 12. С. 5.
17. Ulman A. An introduction to ultrathin organic films from Langmuir–Blodgett to self-assembly. London, 1991.
18. Старицын С.Н., Мамашин В.В., Захарычев В.В. и др. // Биофизика. 2004. **49**, № 4. С. 635.

Поступила в редакцию
10.09.04