

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)
Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров
Направление «Физика»



Взаимодействие молекулы ДНК с соединениями серебра и металлизация формируемых структур

Магистерская диссертация студента

_____ **Осолодкова Михаила Ильича**

Научный руководитель:

_____ д. ф.-м. н., проф. **Касьяненко Н.А.**

Рецензент:

_____ к. ф.-м. н. **Меркурьева А.А.**

Санкт – Петербург

2017

Оглавление

Введение.....	4
1.1 Металлизация ДНК	5
1.2 Электрофизические свойства металлизированных ДНК структур	7
1.3 1,10 Фенантролин и его производные	8
Методы	10
2.1 Низкоградиентная вискозиметрия	10
2.2 Сканирующая электронная микроскопия	11
2.3 Спектроскопия поглощения	14
2.4 Круговой дихроизм	17
2.5 Сканирующая атомно-силовая микроскопия	18
2.6 Оптическая микроскопия.....	19
2.7 Исследование электрофизических свойств образцов	21
2.8 Используемое программное обеспечение	21
Материалы	22
Экспериментальные результаты	23
3.1 Исследование вязкости растворов ДНК с изучаемыми соединениями.....	23
3.2 Данные, полученные методом КД	24
3.3 Температурно-индуцированные спектральные изменения	27
3.3.1 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов свободного фенантролина	27
3.3.2 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов свободного Ag-Phen.....	32
3.3.3 Температурно-индуцированные спектральные изменения раствора ДНК	39
3.3.4 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с Phen	42
3.3.5 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с AgNO ₃ ..	46
3.3.6 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с Ag-Phen	50

3.3.7 Сравнение температурно-индуцированных спектральных изменений растворов ДНК с различными соединениями	54
3.4 Самоорганизующиеся в растворе структуры.....	57
3.4.1 Морфология структур, образующихся в растворе без восстановителя.....	58
3.4.2 Морфология структур, образующихся в растворе с восстановителем.....	67
3.4.3 Влияние pH на формирование надмолекулярных структур	74
3.4.4 Влияние изменения концентрации компонент в растворах	80
3.4.5 Образцы, полученные при взаимодействии ДНК с фенантролином	84
3.4.6 Структуры, образованные Ag-Phen без ДНК	86
Выводы из микроскопии	94
3.5 Исследование электрофизических свойств образцов	95
Выводы.....	106
Список литературы	107

Введение

В течение последних 30 лет активно ведется разработка методик и технологий создания разнообразных объектов и устройств нано- и микроскопических размеров с использованием молекулы ДНК¹⁻⁴. Диаметр равный 2 нанометрам и 3.4 нанометровый шаг витка двойной спирали, соответствующий нативной В форме макромолекулы, безусловно, делают ее чрезвычайно интересной с точки зрения создания подобных нанообъектов. Кроме того, длинные макромолекулы ДНК, а также короткие одно- и двуцепочечные олигонуклеотидные последовательности предлагают широкий спектр технологических возможностей в силу сайт-специфического связывания одноцепочечных нуклеотидных последовательностей по принципу комплементарности с образованием водородных связей между нуклеотидами. Это свойство позволяет применять ДНК для создания двух и трехмерных структур и адресного размещения на них различных объектов, что дает возможность получить новые функциональные свойства этих объектов в силу упорядоченного расположения. С этой целью на основу, созданную из ДНК, были контролируемо размещены такие объекты как белки^{5,6}, пептиды⁷, углеродные нанотрубки⁸ и наночастицы⁹⁻¹⁴ различных металлов.

Упорядоченное размещение наночастиц металлов представляет интерес с точки зрения создания наноразмерных проводящих структур. В большинстве работ по созданию подобных нанопроводов с использованием ДНК макромолекула или иные полинуклеотидные агрегаты используются в качестве основы, с которой связываются готовые наночастицы^{9,10,13,14} или затравки (этап активации ДНК), на которых впоследствии наночастицы агрегируют из раствора^{15,16}. Электрофизические свойства и линейные размеры получаемых объектов зависят от множества факторов, влияющих на формирование данных структур на каждом этапе. В конечном счете, их можно свести к таким параметрам как равномерность расположения металлических наночастиц, их размер и характерные расстояния между ними. Для улучшения проводимости образующихся нанопроводов требуется разработка методов наиболее равномерного распределения металлических наночастиц, что позволит минимизировать их размер без ущерба для электрофизических характеристик всей структуры и, следовательно, уменьшить толщину самих нанопроводов. В данной работе исследуется один из путей решения этой задачи, а именно использование ДНК связывающего лиганда, содержащего ион серебра, в качестве активирующего агента.

1.1 Металлизация ДНК

Существует два подхода к решению задачи контролируемого расположения наночастиц на макромолекуле ДНК. Один из них предполагает модификацию готовых наночастиц ДНК-связывающим агентом^{13,14}, например, короткой одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью. Именно за счет специфики взаимодействия данного агента с макромолекулой контролируется процесс расположения наночастиц на заданной структуре^{9,10}. Данный метод наиболее удобен для создания сложноорганизованных структур, состоящих из металлических и диэлектрических компонент. Его недостатком является большое количество подготовительных действий, таких как создание ДНК-связывающих агентов, модификация ими наночастиц и расположение парных к ним меток на матрице. К тому же, в силу электростатического отталкивания наночастиц друг от друга, данный метод не позволяет добиться их достаточно близкого расположения¹⁰. Поэтому чаще для получения однородных проводящих объектов применяется вторая методика. Она включает в себя три этапа¹⁷. Первый называют активацией. В ходе этого этапа ионы металла связываются с молекулой ДНК¹⁵ (на рисунке 1.1.1 показаны места возможного связывания ионов металла с молекулой ДНК). Таким образом, на матрице образуются затравки. Затем на этих затравках из раствора начинают образовываться металлические кластеры и наночастицы металла (Рис 1.1.2). Этого можно добиться добавлением химических восстановителей^{15,16}, например, боргидрида натрия, или даже путем облучения образцов солнечным светом¹⁸. В последнем случае сама макромолекула ДНК выступает в качестве донора электронов. Третий этап подразумевает срастание отдельных наночастиц в непрерывный слой металла по всей длине матрицы (Рис 1.1.3). Этот этап выделяют отдельно, так как после создания первичных наночастиц можно заменить металл и, например, восстанавливать золото на серебряных затравках^{19,20}.

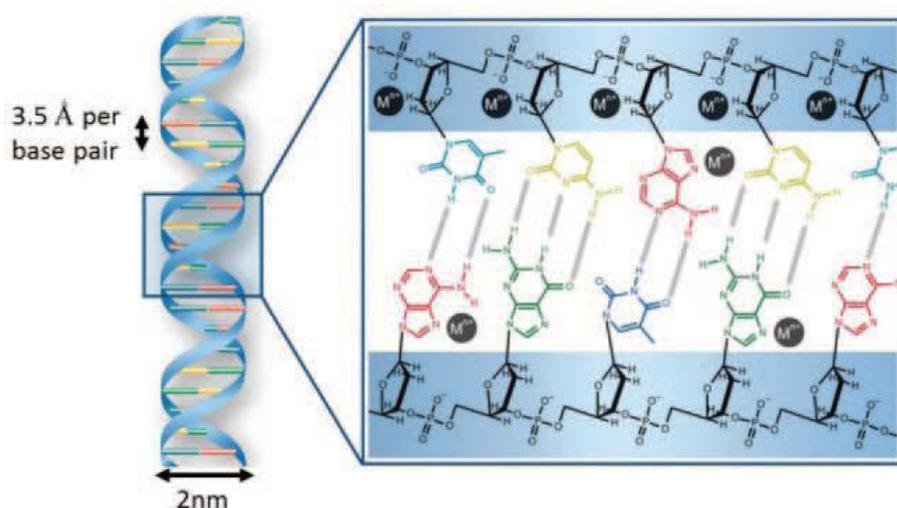


Рис. 1.1.1 Структура ДНК, состоящей из 4 нуклеотидов. Отмечены места связывания ионов металла^{11,12}.

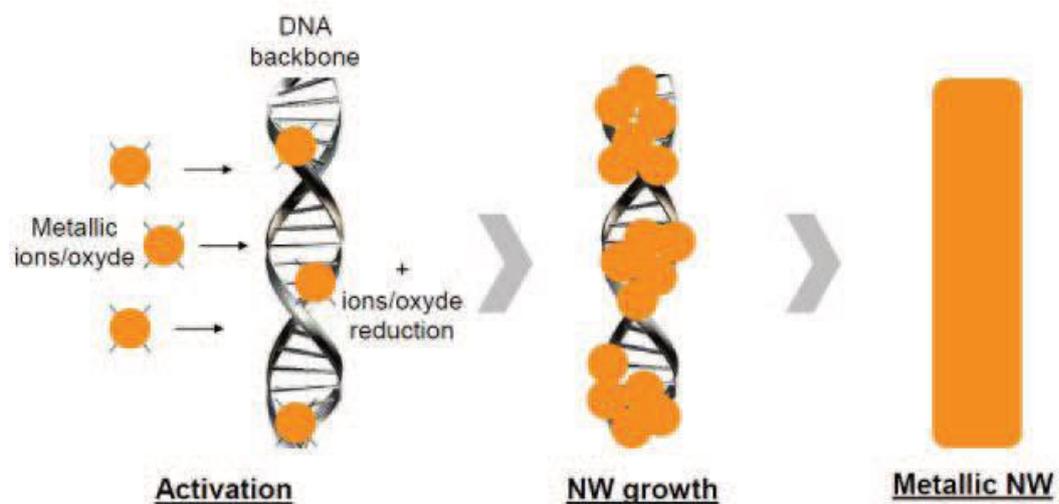


Рис. 1.1.2 Процесс металлизации ДНК¹¹.

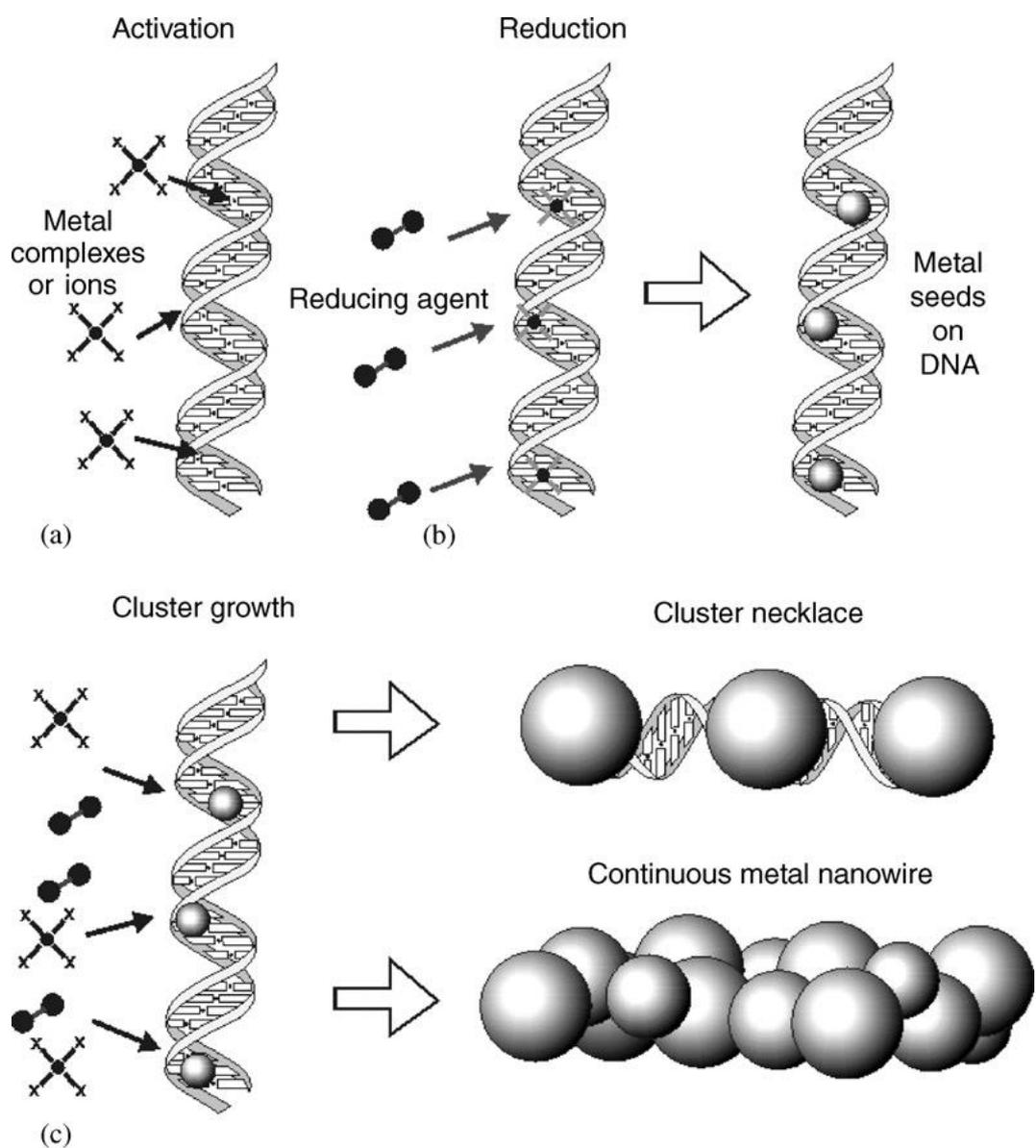


Рис. 1.1.3 Схематичное изображение роста металлических частиц на ДНК¹⁶.

1.2 Электрофизические свойства металлизированных ДНК структур

Макромолекуле ДНК со случайной последовательностью нуклеотидов большинство исследователей приписывают диэлектрические свойства^{4,16,21} (в работе [21] измеренная авторами величина сопротивления двуцепочечной молекулы ДНК длиной 80 пар оснований имеет порядок 40 ГОм в атмосферном окружении). По этой причине основной задачей создания комбинированных структур ДНК – металл было улучшение ее проводящих свойств. В ранних работах исследователям удалось получить серебряные нанопровода длиной порядка 100 нм и сопротивлением порядка 10 МОм¹⁵. В более поздних работах электропроводимость получаемых структур была заметно улучшена и для 50 нм нанопроводов значения сопротивления имели порядок 100 кОм¹³ и даже единицы кОм¹⁴. Кроме того, исследователям удалось добиться линейной вольт - амперной характеристики для данных объектов. В работе [14] оценка сопротивления отдельного нанопровода проводилась последовательным измерением сопротивления сети из проводов до и после перерезания одного из них иглой атомно-силового микроскопа. Расчет сопротивления данного провода был сделан из рассмотрения его и оставшейся системы проводов как параллельно включенных резисторов (Рис 1.2.1, 1.2.2).

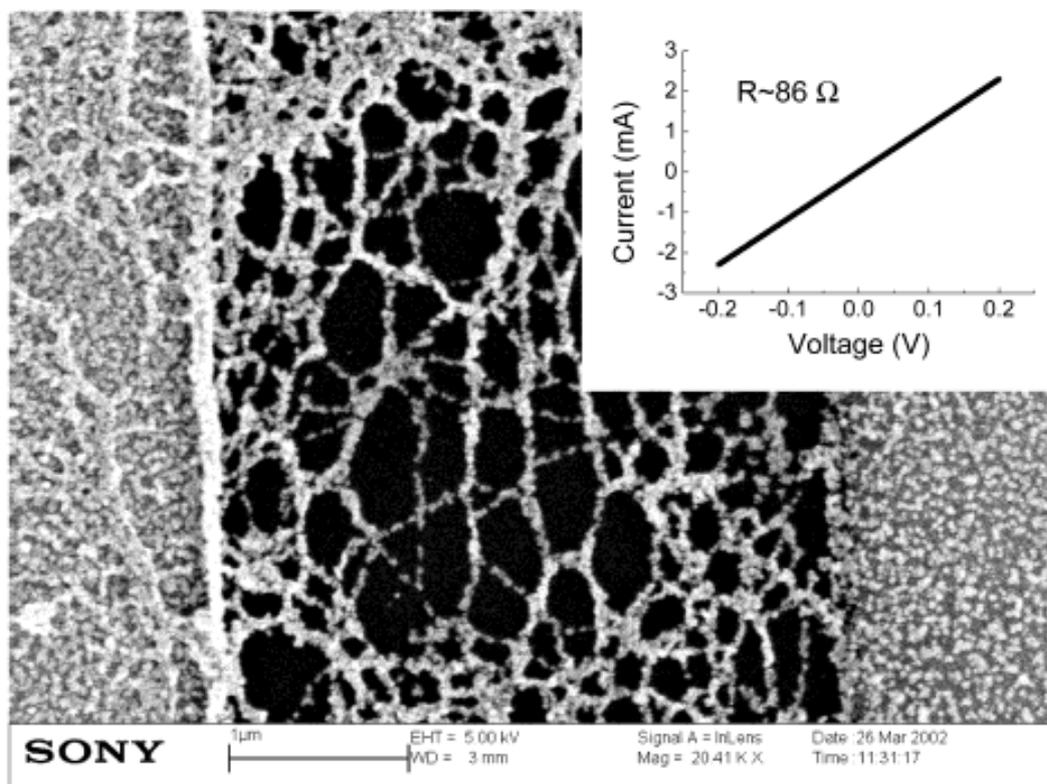


Рис. 1.2.1 СЭМ снимок сетки нанопроводов между двумя контактами и их суммарная вольт – амперная характеристика¹⁴.

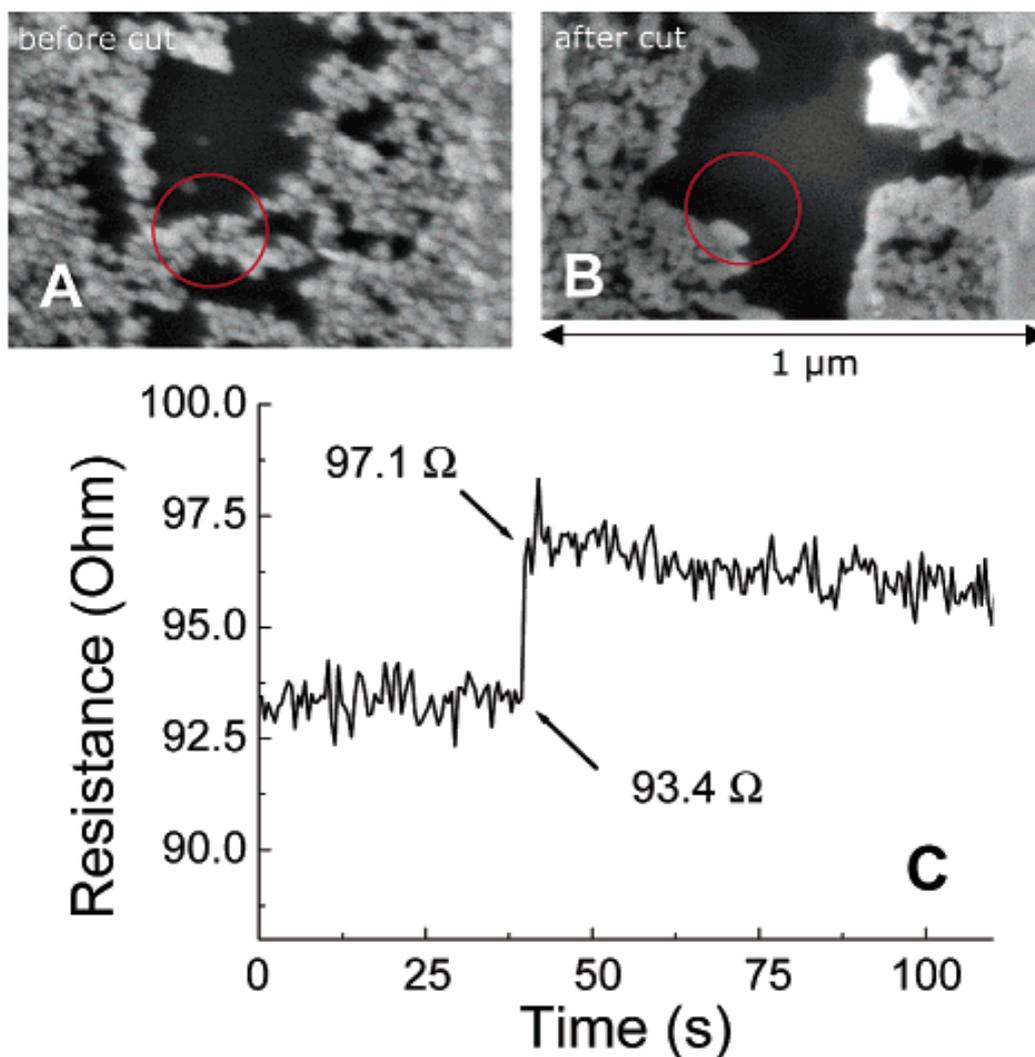


Рис. 1.2.2 Схема эксперимента по измерению сопротивления отдельного нанопровода¹⁴.

1.3 1,10 Фенантролин и его производные

1,10 Фенантролин и его производные показывают биологическую активность в качестве противоопухолевых препаратов и ДНК-связывающих агентов²²⁻²⁶. Структурная формула фенантролина представлена на рисунке 1.3.1. Эту активность исследователи связывают со способностью данного лиганда связываться с макромолекулой ДНК. Сам лиганд имеет плоскую структуру, что дает ему возможность интеркалировать между азотистыми основаниями макромолекулы. Кроме того, в силу подобной структуры, фенантролин обладает способностью к $\pi - \pi$ стэкинг взаимодействиям и за счет них образует стопки в водных растворах^{27,28}. При больших концентрациях данные стопки образуют упорядоченные однородные по толщине фибриллы. Наличие 2 атомов азота позволяет фенантролиновому лиганду входить в координационную сферу различных металлов. В данной работе исследуется соединение, обозначаемое Ag-Phen (Рис.1.3.2), которое представляет собой два фенантролиновых лиганда, входящих в координационную сферу иона

серебра. Как само исследуемое соединение Ag-Phen, так и входящие в него фенантролиновые лиганды растворимы в воде. При этом процедура растворения Ag-Phen подразумевает нагревание системы в процессе растворения кристаллической формы соединения в воде.

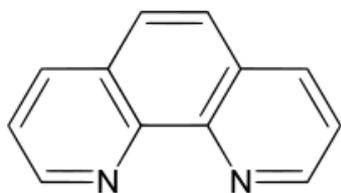


Рис. 1.3.1 1,10 фенантролин.

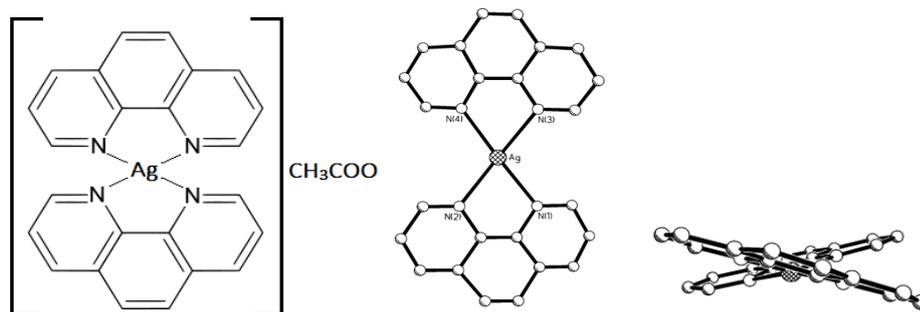


Рис. 1.3.2 Комплекс $\text{Ag}(\text{Phen})_2$ далее в работе обозначаемый как Ag-Phen.

Методы

2.1 Низкоградиентная вискозиметрия

Гидродинамические методы исследования высокомолекулярных соединений позволяют определить параметры молекулы как целого. При исследовании комплексообразования информация об изменении объема молекулярного клубка, произошедшего в результате взаимодействия макромолекулы с лигандом, позволяет сделать выводы о механизмах и характеристиках взаимодействия. В данной работе проводили измерения относительной вязкости растворов $\eta_r = \eta/\eta_0$, где η и η_0 – вязкости раствора и растворителя (η – коэффициент пропорциональности между τ – напряжением сдвига, и g – градиентом скорости в уравнении Ньютона: $\tau = \eta g$). Для определения этой величины использовался низкоградиентный ротационный вискозиметр типа Зимма–Крозерса²⁹ (схема его устройства приведена на рисунке 2.1.1). В приборе данного типа исследуемый раствор находится в зазоре между термостатируемым статором и плавающим за счет сил поверхностного натяжения в растворе ротором. Образующийся на поверхности раствора в зазоре миниск способствует центрированию ротора относительно статора. Ротор приводится в движение вращающимся постоянным магнитом, так как в него вделан стальной диск, откликающийся на изменения магнитного поля. Таким образом, под действием магнитного поля в растворе образуется фиксированное напряжение сдвига слоев жидкости друг относительно друга²⁶. В результате в растворе образуется стационарный поток с постоянным градиентом скорости. Для того, чтобы определить отношение вязкости двух растворов, или раствора и растворителя, достаточно определить отношение угловых скоростей ротора для данных растворов: $\eta_1/\eta_0 = \omega_0/\omega_1$.

Определив относительную вязкость, вычисляли удельную вязкость раствора ($\eta_{уд.} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1$) и его приведенную вязкость ($\eta_{уд.}/C$, где C – концентрация ДНК). В ходе эксперимента измеряли период вращения ротора для каждого раствора, а затем из их отношений определяли значения относительной вязкости.

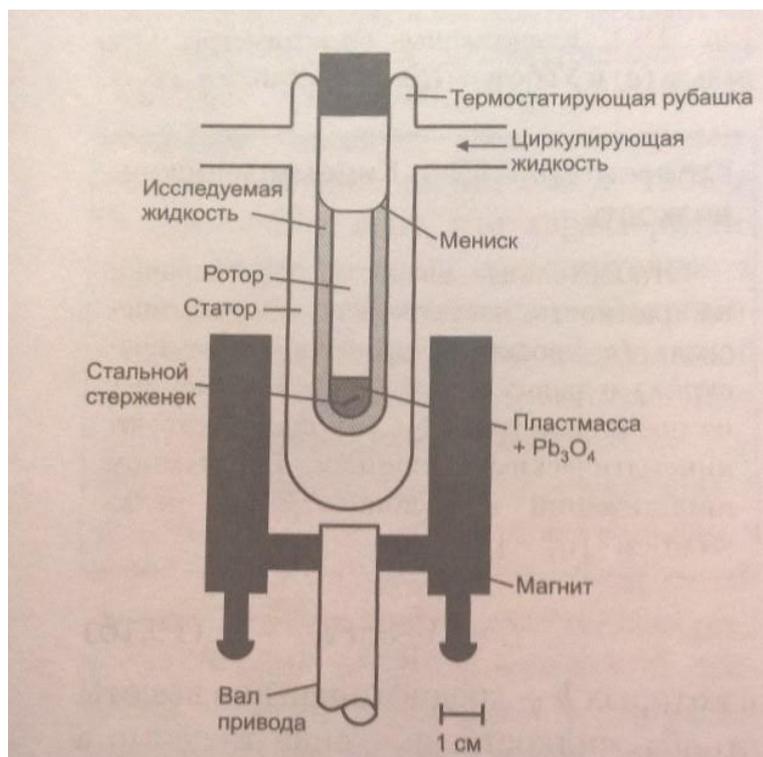


Рис. 2.1.1 Схема устройства вискозиметра, используемого в эксперименте²⁹.

2.2 Сканирующая электронная микроскопия

Уменьшение длины волны излучения, рассеяние которого детектируется после взаимодействия с образцом, позволяет значительно увеличить разрешающую способность микроскопа. В сканирующем электронном микроскопе в качестве излучения используется пучок электронов, разогнанный ускоряющим напряжением и фокусируемый на поверхности образца электронными линзами (схема устройства СЭМ приведена на рисунке 2.2.1). Это позволяет разрешать объекты нанометрового размера. В современных электронных микроскопах ускоряющие напряжения лежат в диапазоне от 1 до 30 кВ. Электронная отклоняющая система осуществляет растровое сканирование поверхности, позволяющее сформировать изображение. Первичные электроны пучка взаимодействуют с поверхностью образца и проникают вглубь в зависимости от величины их энергии и свойств материала образца (Рис 2.2.2)³⁰. В результате данного взаимодействия генерируются различные сигналы: обратнорассеянные электроны – первичные электроны, рассеянные на большие углы и вылетевшие из образца, вторичные электроны – электроны, выбитые с электронных орбиталей атомов образца, Оже-электроны – электроны, вылетевшие с внешних орбиталей атомов образца при электронных переходах на внутренних орбиталях, тормозное и характеристическое рентгеновское излучение. Каждый из этих сигналов несет определенную информацию о морфологии и составе образца. Так, вторичные электроны, обладающие низкой энергией, вылетают из приповерхностного слоя. В силу этого сигнал вторичных электронов очень

сильно зависит от угла падения пучка, что позволяет извлекать из него информацию о морфологии исследуемой поверхности. Поэтому области краев или углов будут выглядеть на изображении более светлыми (Рис 2.2.3). С другой стороны, по сигналу обратнорассеянных электронов можно судить о свойствах материала образца. В силу этого, участки с низкой работой выхода электронов, например, содержащие металл, будут выглядеть на изображении более светлыми. В силу того, что обратнорассеянные и вторичные электроны сильно отличаются по энергиям, стало возможным раздельное детектирование данных сигналов на разных типах детекторов. Это позволяет собрать больше информации об исследуемом образце. Кроме того, характеристическое рентгеновское излучение, индуцируемое электронным пучком, позволяет сделать выводы об элементном составе образца в конкретной области. Другим заметным преимуществом СЭМ является возможность формирования изображения в широком диапазоне увеличений. Это дает возможность наводиться на определенную область образца, что является значительным преимуществом в случае неоднородного размещения исследуемых объектов на подложке. К недостаткам данного метода, безусловно, относится необходимость поддержания высокого вакуума в электронно-оптической системе, что может сказываться на морфологии исследуемых объектов особенно в случае исследования органических комплексов, в составе которых при нормальных условиях всегда присутствует связанная вода. Кроме того, электронный пучок при долгом взаимодействии с органическими комплексами их разрушает. По этой причине при проведении подобных исследований необходимо подобрать оптимальное время выдержки, чтобы получить наилучшее качество изображения без заметных разрушений исследуемого объекта. Принцип действия сканирующего электронного микроскопа требует использования проводящих подложек. Это создает дополнительные сложности при изучении электропроводимости исследуемых структур и не позволяет измерять электрофизические свойства объектов на тех же образцах, которые были исследованы методом СЭМ. Несмотря на возможность детектирования различных сигналов и получения разнообразной информации об исследуемом объекте, метод сканирующей электронной микроскопии не дает истинной трехмерной структуры объекта, а в силу специфики каждого из сигналов, интерпретация полученных изображений представляется нетривиальной задачей.

Все снимки, приведенные в данной работе, были получены на растровом электронном микроскопе Carl Zeiss Merlin и электронном микроскопе Carl Zeiss Auriga. Для формирования изображений использовались внутрилинзовый детектор вторичных электронов (Inlens), детектор вторичных электронов Эверхарта-Торнли (SE2) и детектор обратнорассеянных электронов (ESB). В силу чувствительности исследуемых органических образцов к повреждениям, наносимым элек-

тронным пучком, в данной работе использовалось низкое ускоряющее напряжение (0,5 кВ). Образцы размещались на кремниевых подложках. Перед высаживанием исследуемых структур кремний проходил стандартную процедуру очистки, включающую ультразвуковую очистку в ацетоне (3 мин), этаноле (5 мин) и дистиллированной воде (7 мин). Далее подложка подвергалась плазменной обработке на установке Fischione NanoClean Model 1070 в течение 10 минут в газовой смеси, состоящей из 95% аргона и 5% кислорода. Все указанные приборы относятся к Междисциплинарному ресурсному центру СПбГУ по направлению “Нанотехнологии”.

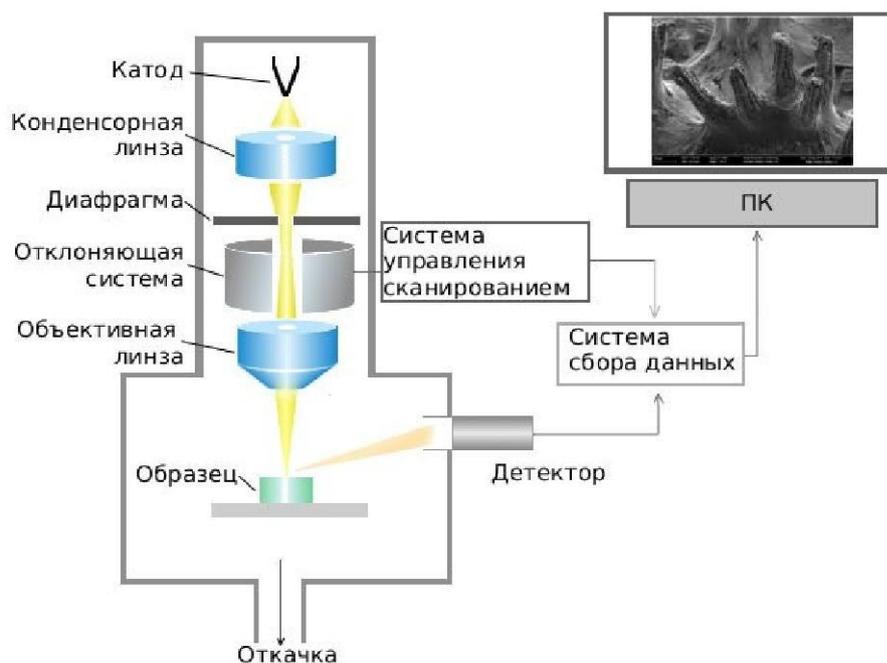


Рис. 2.2.1 Схема устройства сканирующего электронного микроскопа³⁰.

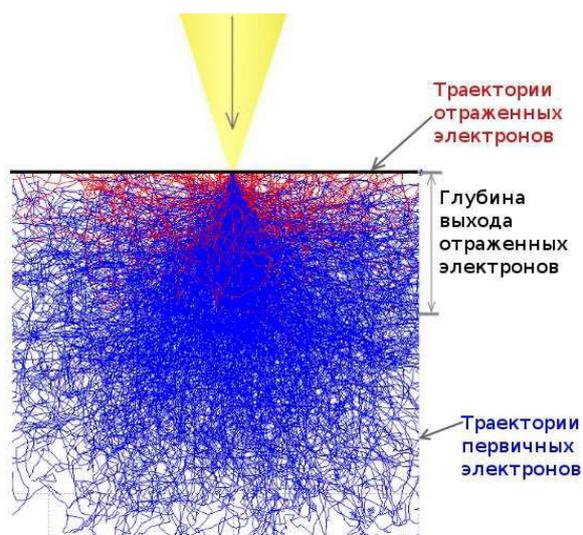


Рис. 2.2.2 Траектории электронов в образце³⁰.

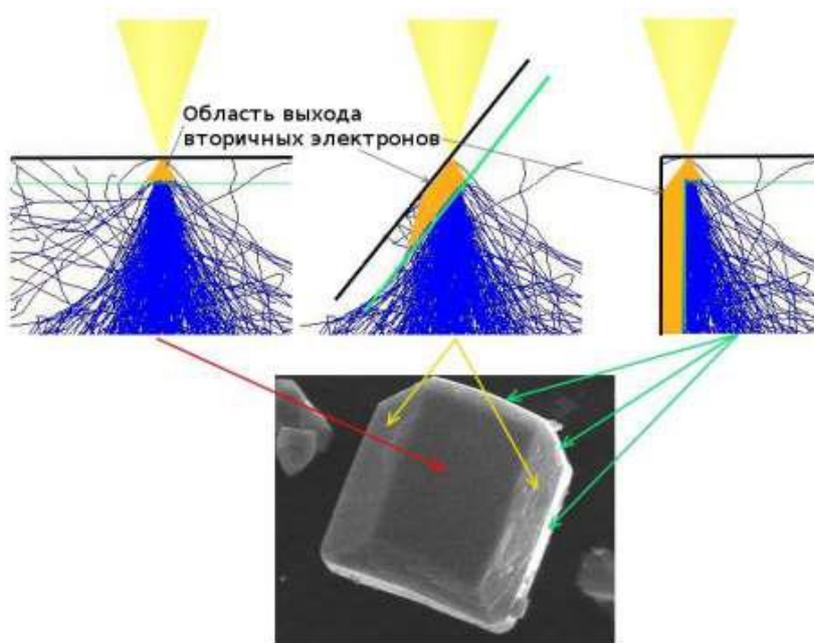


Рис. 2.2.3 Выход вторичных электронов при различных углах падения пучка³⁰.

2.3 Спектроскопия поглощения

Метод спектроскопии поглощения основан на измерении разницы между интенсивностью испущенного света I_0 и интенсивностью света, попавшего на приемник после прохождения оптической системы I . В случае, если системой является однородная поглощающая среда, данные величины связаны формулой Ламберта-Бугера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-D}, \text{ где } D \text{ – оптическая плотность среды, в нашем случае – раствора}^{29}.$$

В данной серии экспериментов измеряли относительное поглощение – разность поглощения раствора и растворителя при тех же условиях. Для однородных разбавленных растворов в широком диапазоне концентраций применима формула Бэра, связывающая поглощение раствора с концентрацией растворенного вещества:

$D = \epsilon Cl$, где C – концентрация растворенного поглощающего вещества, l – длина оптического пути в растворе, ϵ – коэффициент молярной экстинкции (поглощение, приведенное к единице концентрации).

Таким образом, в конечном виде закон Ламберта-Бугера-Бэра выглядит так:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon Cl$$

В данной работе использовалась электронная спектроскопия – оптический и ближний УФ диапазон длин волн. В каждой молекуле на заданной длине волны поглощают специфические группы атомов – хромофоров, а наблюдаемый спектр молекулы складывается из поглощения хромофоров ее составляющих. Поглощение хромофора в УФ и видимой области спектра обусловлено переходами электронов между энергетическими уровнями. Энергия электромагнитного излучения поглощается веществом, если она равна разности энергий квантовых состояний:

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1}$$

Свет с длиной волны λ и скоростью распространения в среде c будет поглощен веществом только в том случае, если выполняется это соотношение (E_1 – энергетический уровень электронной орбитали молекулы, на которой находился электрон до поглощения, E_2 – энергетический уровень электронной орбитали молекулы, на которую был совершен переход электрона в результате поглощения света). Другими словами, за счет энергии электромагнитного излучения электрон совершает переход с одной орбитали на другую. Спектр поглощения вещества формируется за счет различия вероятности переходов при взаимодействии со светом разных длин волн. Оптические спектры молекул связаны с квантовыми переходами валентных электронов внешних электронных оболочек. Валентные электроны, образующие связи, располагаются на σ и π орбиталях. Не участвующие в образовании валентных связей электроны неподеленных пар образуют n - орбитали. Поглощение света сопровождается переходом со связывающих (σ , π) или n – орбиталей на разрыхляющие орбитали, таким образом, различают $\sigma - \sigma^*$, $n - \sigma^*$, $\pi - \pi^*$ и $n - \pi^*$ переходы (Рис 2.3.1). В том случае, если дипольные моменты переходов близкорасположенных хромофоров параллельны, суммарное поглощение системы будет меньше суммы их поглощений в невзаимодействующем состоянии.

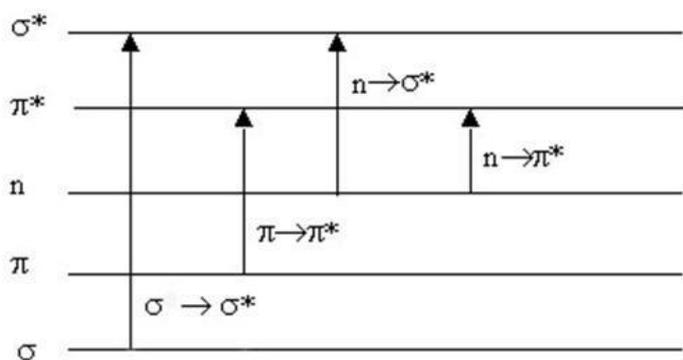


Рис. 2.3.1 Типы электронных переходов.

В общем случае двуспиральные полинуклеотиды поглощают меньше в расчете на нуклеотид, чем сумма составляющих их нуклеотидов. Это связано с тем, что поглощение нуклеиновых кислот и полинуклеотидов обусловлено поглощением азотистых оснований, а именно $\pi - \pi^*$ и $n - \pi^*$ переходами. В упорядоченной двуспиральной конформации макромолекулы азотистые основания взаимодействуют друг с другом вдоль цепи за счет стэкинг взаимодействий. В азотистых основаниях дипольный момент $\pi - \pi^*$ перехода (отвечающего поглощению в области 260 нм) поляризован в плоскости оснований. Так как в двойной спирали основания расположены перпендикулярно оси и параллельно друг другу, дипольные моменты $\pi - \pi^*$ переходов лежат в параллельных плоскостях. Таким образом, нативная двуспиральная ДНК поглощает меньше, чем та же макромолекула в денатурированной форме – форме клубка. Это свойство позволяет наблюдать и изучать температурно-индуцированную денатурацию нативной двуспиральной макромолекулы ДНК – плавление методом спектроскопии поглощения. Температурой плавления называют температуру, при которой цепи ДНК диссоциированы наполовину. Ее можно определить из зависимости относительного поглощения раствора макромолекулы от температуры – кривой плавления (Рис. 2.3.2). Данный параметр также можно рассматривать для системы ДНК - лиганд. Так, связывание с различными лигандами может стабилизировать или дестабилизировать вторичную структуру макромолекулы и увеличивать или, соответственно, уменьшать значение температуры плавления системы. При охлаждении растворов ДНК после температурной денатурации наблюдается частичная ренатурация – часть молекул вновь образует водородные связи с комплементарными участками и приобретает двуспиральную структуру. Этот процесс можно наблюдать по уменьшению величины поглощения растворов после их охлаждения. Взаимодействие с лигандами может влиять на процесс ренатурации как препятствуя ему, так и стимулируя.

В данной работе для проведения эксперимента по определению кривых плавления нативной ДНК и ее комплексов с исследуемым соединением и составляющими его лигандами использовался прибор SPECORD 200 PLUS оборудованный элементом Пельтье и системой термостатирования. Для измерений использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

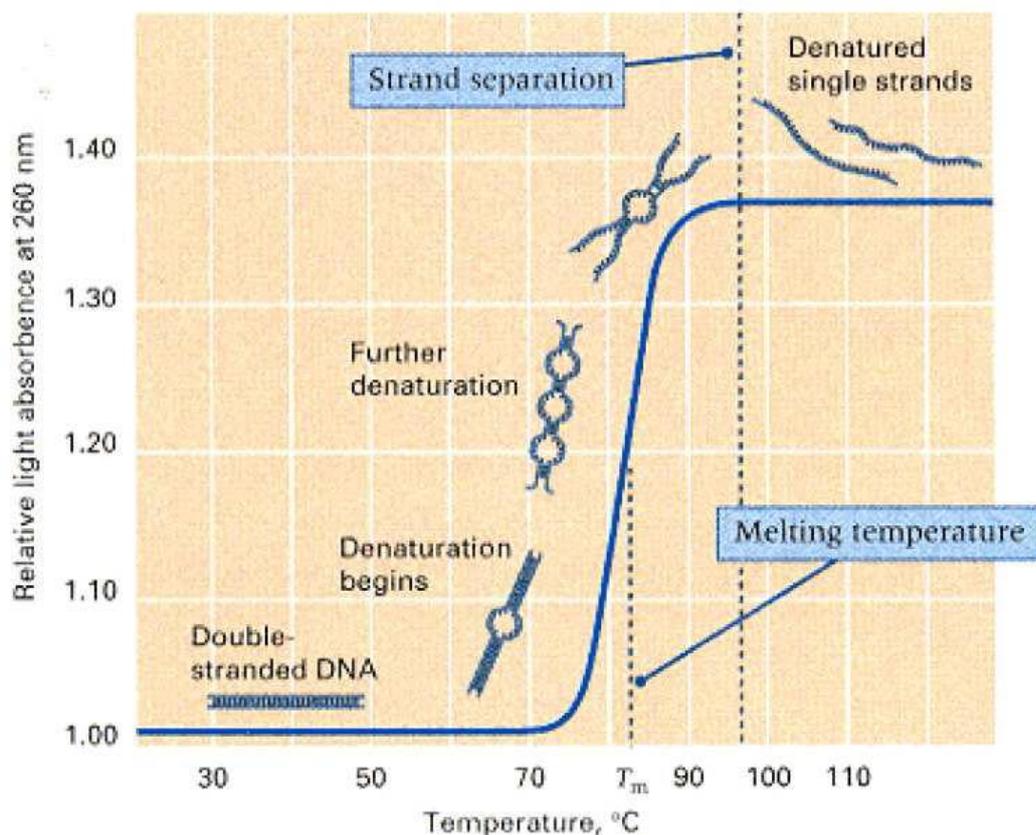


Рис. 2.3.2 Зависимость относительного поглощения раствора макромолекул ДНК на 260 нм от температуры при денатурации – плавлении.

2.4 Круговой дихроизм

Круговой дихроизм – это разница поглощения право- и левополяризованного света при прохождении через исследуемый объект. Метод КД основан на определении этой разницы поглощения для растворов оптически активных веществ ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, ϵ – молярный коэффициент экстинкции). Величина $\Delta\epsilon$ измеряется на разных длинах волн в диапазоне поглощения хромофора. Она может иметь значения обоих знаков²⁹.

Биополимеры (в том числе нуклеиновые кислоты) обладают естественной оптической активностью. Вид спектра КД нуклеиновой кислоты зависит от ее конформации. Таким образом, данный метод позволяет детектировать изменения конформации макромолекулы под действием различных условий и судить о вторичной структуре ДНК при образовании комплексов.

В работе использовался автодихрограф Mark IV (Jovin Ivon, Франция). Для измерений использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

2.5 Сканирующая атомно-силовая микроскопия

Помимо уменьшения длины волны излучения, взаимодействующего с образцом, другим подходом к решению задачи разрешения структур, размеры которых имеют порядок 200 нм и меньше, является использование зондов, взаимодействующих с поверхностью образца. Одним из видов микроскопов, построенных на таком принципе, является атомно-силовой микроскоп. Изображение исследуемого объекта строится по точкам, в каждой из которых регистрируется силовое взаимодействие между поверхностью образца и острием зонда, закрепленном на упругом кантилере (Рис. 2.5.1). В результате взаимодействия острия зонда с образцом кантилевер изгибается. Величина изгиба кантилевера детектируется при помощи лазерного луча, отражающегося от его внешней стороны на поверхность фотодетектора. По смещению отраженного луча на фотодетекторе можно сделать вывод об изгибе кантилевера и, соответственно, о рельефе исследуемого образца. Перемещение зонда по поверхности с нанометровым шагом осуществляется при помощи пьезоэлементов²⁹.

Атомно-силовой микроскоп позволяет получить трехмерное изображение исследуемой поверхности высокого разрешения. Использование бесконтактного и полуконтактного мода уменьшает разрушительное воздействие зонда на образец, что в случае органических объектов является серьезным преимуществом. Кроме того, данный метод не требует высокого вакуума и проводящей подложки, в отличие от сканирующего электронного микроскопа. При этом атомно-силовой микроскоп имеет ряд серьезных недостатков, таких как хрупкость зонда и зависимость качества получаемого изображения от состояния иглы, способной разрушиться в процессе измерения. Кроме того, исследование образцов, неоднородно распределенных по поверхности подложки, усложняется отсутствием возможности масштабирования изображения (для наведения на определенный участок подложки используется вспомогательный оптический микроскоп), что делает задачу наведения на определенный участок образца чрезвычайно сложной.

В данной работе использовался АСМ Bruker Multimode8 в режиме ScanAssist in air. В данных экспериментах образцы размещались как на кремниевых подложках, так и на подложках из свежесколотой слюды.

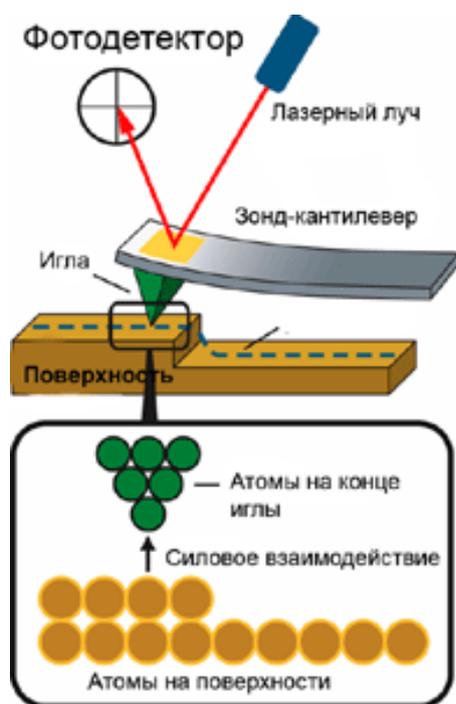


Рис. 2.5.1 Принцип работы АСМ.

2.6 Оптическая микроскопия

Для получения изображений сравнительно крупных объектов в работе применялся метод оптической микроскопии. В данном методе с исследуемым образцом взаимодействует свет видимого диапазона, и его рассеяние на объекте детектируется непосредственно глазом исследователя или фото матрицей (схема устройства оптического микроскопа приведена на рисунке 2.6.1). Оптическое увеличение изображения исследуемого образца достигается за счет геометрических свойств элементов оптической системы²⁹. Кроме того, волновая природа света накладывает на разрешающую способность оптического микроскопа так называемый дифракционный предел, линейно связанный с длиной волны используемого излучения (Рис. 2.6.2).

В данной работе использовался диапазон небольших увеличений: от 5 до 50 кратного. Метод оптической микроскопии применялся для расположения маски на поверхности высаженного образца перед напылением золотых контактов. Все снимки, приведенные в работе, были получены с помощью оптического микроскопа Olympus BX51, относящегося к Междисциплинарному ресурсному центру СПбГУ по направлению “Нанотехнологии”.

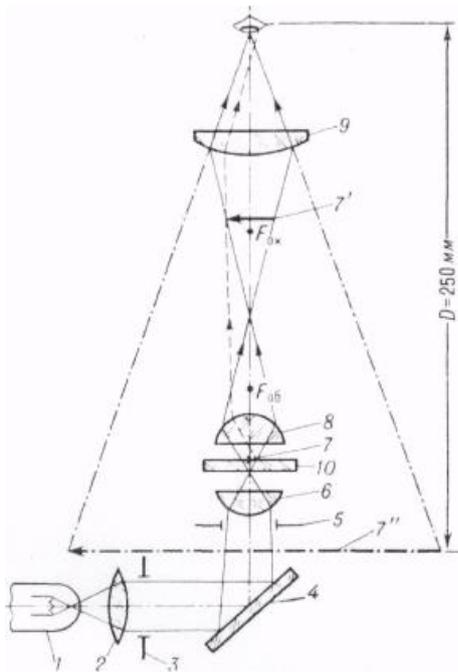


Рис. 2.6.1 Оптическая схема прямого микроскопа проходящего света. Рассматриваемый объект (препарат) 7 располагают на предметном стекле 10. Конденсор 6 концентрирует на объекте пучок света, отражающегося от зеркала 4. Источником света чаще всего служит специальный осветитель, состоящий из лампы и линзы-коллектора (соответственно 1 и 2). Диафрагмы — полевая 3 и апертурная 5 ограничивают световой пучок и уменьшают в нём долю рассеянного света, попадающего на препарат «со стороны» и не участвующего в формировании изображения.

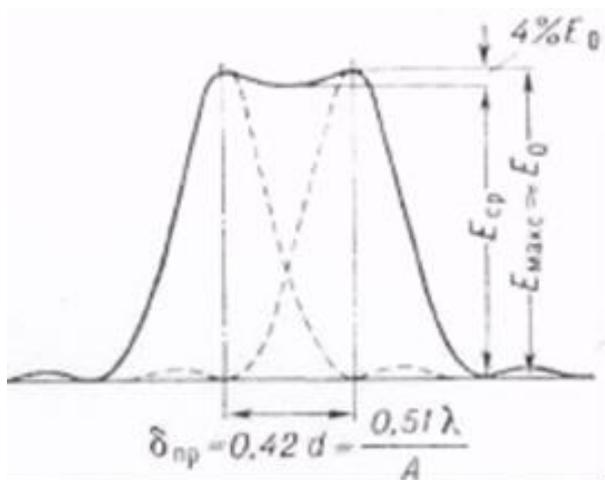


Рис. 2.6.2 Распределение интенсивности рассеянного света двумя близкими точками в предельном случае их разрешения. A — числовая апертура объектива, равная $A = n \cdot \sin u_m$ (n — показатель преломления среды, разделяющей светящуюся точку и объектив, u_m — половина угла раствора светового пучка, исходящего из точки и попадающего в объектив).

2.7 Исследование электрофизических свойств образцов

Для исследования электрофизических свойств изучаемых структур, образующихся в растворе, их фиксировали и высушивали на поверхности стеклянных чипов, очищенных в ультразвуковой ванночке в течении 5 минут последовательно в ацетоне, этаноле и воде (аналогично кремниевым чипам для метода СЕМ, за исключением этапа плазменной очистки). Фиксация структур на поверхности чипов проводилось как высушиванием малых объемов (порядка 10 мкл) исходных растворов при атмосферных условиях, так и высушиванием во время вращения подложки с частотой 3000 оборотов в минуту при помощи спинкоатера Laurell Modular Spin Coater WS-650 Lite. Затем на поверхности образовавшихся пленок создавали золотые контакты методом вакуумного напыления на установке TORR. Между контактами образовывался 10 микрометровый зазор за счет расположения на пути пучка напыляемого золота проволоки соответствующего диаметра. Далее, при помощи специального крепления к данным контактам подключали электроды и измеряли вольт – амперные характеристики полученной системы. Данные измерения проводили при помощи прибора Keithley 6517 В. На рисунке 2.7.1 приведены фотографии экспериментальной установки. Она оборудована герметичным теплоизолирующим кожухом, вакуумным насосом и криостатом, что дает возможность исследовать температурную зависимость электрофизических свойств образца, а так же изменение этих свойств в условиях вакуума. Все этапы подготовки образца и последующие измерения его свойств проводились на оборудовании МРЦ СПбГУ “Нанотехнологии”.



Рис. 2.7.1 Экспериментальная установка для исследования электрофизических свойств образцов.

2.8 Используемое программное обеспечение

Обработка ВАХ, зависимостей вязкости от концентрации, спектров поглощения, спектров КД и кривых плавления проводилась в программе Origin pro 8.

Обработка АФМ изображений проводилась при помощи программ Gwyddion и FiJi.

Обработка СЭМ изображений проводилась в программе FiJi.

Материалы

В данной работе использовали ДНК тимуса теленка фирмы Sigma М 10 млн Да (15000 пар оснований). В качестве электролита, поддерживающего ионную силу в растворах использовали фильтрованный раствор NaNO_3 . Для понижения рН использовали химически чистую HNO_3 . Все реактивы растворяли в сверхчистой воде (класс 1) предоставляемой ресурсным центром СПбГУ “Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники”. Свободный фенантролин и соединение Ag-Phep были синтезированы д.х.н. Демидовым В.Н. В качестве восстановителя использовался свежеприготовленный (менее 4 часов) раствор NaBH_4 .

Растворы ДНК после приготовления были очищены центрифугированием. Концентрация растворов ДНК определялась методом Спирина^{31,32}.

Для проведения исследований были приготовлены исходные растворы:

1. Ag-Phep в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М
2. Фенантролин в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М
3. ДНК в концентрации 0,02% = $3 \cdot 10^{-4}$ М bp в 0,005 М NaNO_3
4. NaBH_4 в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М
5. AgNO_3 в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М

Экспериментальные результаты

3.1 Исследование вязкости растворов ДНК с изучаемыми соединениями

В данном разделе представлены полученные в работе графики зависимости приведенной вязкости растворов ДНК с различными соединениями от концентрации этих соединений в растворах (часть приведенных данных была получена аспиранткой Чжан Цюши). Концентрация ДНК во всех системах равна $0,009\% = 1,4 \cdot 10^{-4}$ М бр. В растворах поддерживается постоянная ионная сила $0,005$ М NaNO_3 . Как видно из рисунка 3.1.1, зависимость приведенной вязкости растворов ДНК от концентрации исследуемого комплекса Ag-Phen похожа на соответствующую зависимость для свободного фенантролина (заметим, что в составе молекулы Ag-Phen содержится две молекулы Phen). В обоих случаях возрастание приведенной вязкости раствора при увеличении концентрации соединения может говорить об интеркаляционном типе связывания. При этом описываемый эффект достигает насыщения при концентрации соединения $1 \div 2 \cdot 10^{-5}$ М, что соответствует соотношению 1 молекулы соединения на $7 \div 14$ пар оснований макромолекулы ДНК в растворе. Дальнейшее увеличение концентрации Ag-Phen и Phen не приводит к существенному возрастанию приведенной вязкости растворов. Необходимо отметить, что увеличение концентрации ионов серебра в растворе ДНК добавлением AgNO_3 не вызывает изменения обсуждаемых характеристик макромолекулы. Кроме того, добавление восстановителя NaBH_4 в растворы ДНК с Ag-Phen приводит к падению приведенной вязкости данных растворов относительно растворов, содержащих ДНК без добавления рассматриваемых соединений.

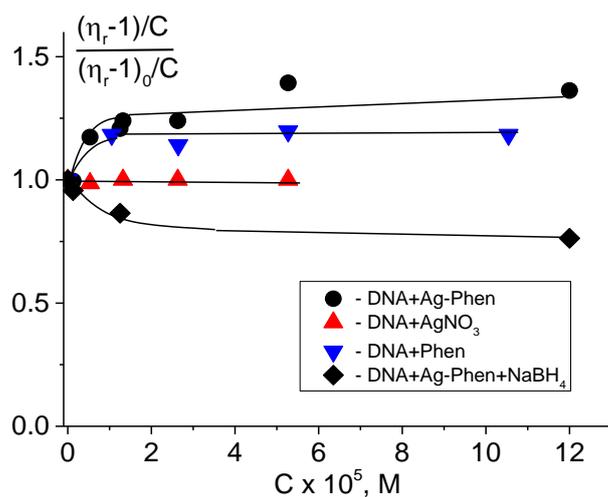


Рис 3.1.1 Зависимость приведенной вязкости растворов ДНК от концентрации используемых соединений.

Для выяснения обратимости связывания Ag-Phen с ДНК был проведен эксперимент по разбавлению раствора, содержащего комплекс ДНК с Ag-Phen в 0,005 М NaNO₃ (концентрации в исходном растворе C(ДНК) = 0,009% = 1,4 · 10⁻⁴ М бр, C(Ag-Phen) = 2 · 10⁻⁵ М). Указанная концентрация соединения находится в области прекращения роста приведенной вязкости растворов от концентрации Ag-Phen (Рис. 3.1.1). Данный раствор последовательно разбавляли либо 0,005 М NaNO₃, либо раствором Ag-Phen в 0,005 М NaNO₃ (C(Ag-Phen) = 2 · 10⁻⁵ М). Значения приведенной вязкости для обоих способов разбавления совпали (Рис. 3.1.2). Действительно, два способа разбавления исходного раствора приводят к разным концентрациям Ag-Phen, что при дополнительном связывании или, напротив, при уменьшении фракции связанных с ДНК молекул Ag-Phen неизменно должно привести к изменению приведенной вязкости раствора (см. Рис. 3.1.1). Из полученных данных можно сделать вывод о необратимом характере связывания исследуемого комплекса с макромолекулой. Только в случае образования координационной связи можно получить результаты, представленные на рисунке 3.1.2.

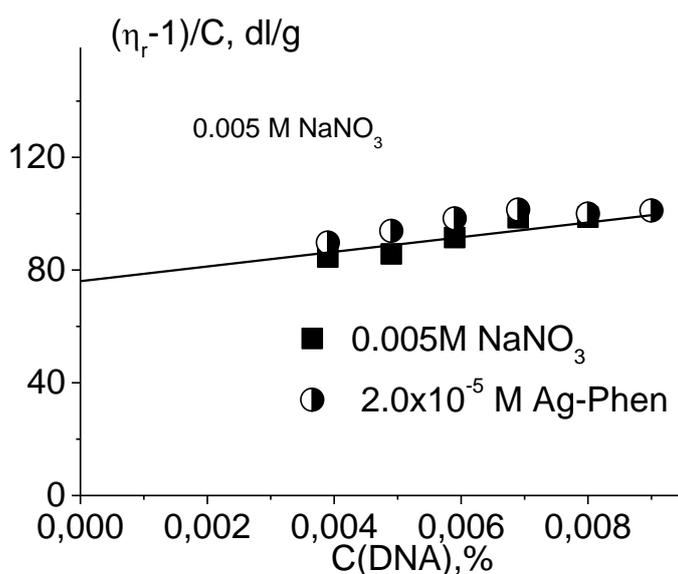


Рис. 3.1.2 Приведенная вязкость растворов ДНК в эксперименте по последовательным разбавлениям.

3.2 Данные, полученные методом КД

В данной части работы измеряли спектры КД растворов ДНК концентрации 0,0025% = 3,8 · 10⁻⁵ М бр в 0,005 М NaNO₃ с разными концентрациями Ag-Phen: 0, 0,5 · 10⁻⁵ М (0,13), 0,9 · 10⁻⁵ М (0,24), 1,4 · 10⁻⁵ М (0,37), 2,3 · 10⁻⁵ М (0,6), 3,2 · 10⁻⁵ М (0,84) (соответствующие значения γ – отношение концентрации соединения к концентрации пар оснований макромолекулы ДНК указаны в скобках). Как видно из рисунка 3.2.1, увеличение концентрации Ag-Phen приводит к возрастанию величины Δε положительной полосы ДНК, причем форма спектра практически не изменяется, хотя

наблюдается “плечо” при $\lambda > 280$ нм. Необходимо отметить, что оптическая активность свободного Ag-Phen в рассматриваемой области спектра имеет противоположный знак (Рис. 3.2.2). Отсутствие пропорционального изменения кругового дихроизма раствора ДНК в коротковолновой области спектра можно объяснить наличием в растворе несвязавшегося Ag-Phen и его влиянием на наблюдаемую оптическую активность раствора. Действительно, заметное увеличение амплитуды положительной полосы и тип спектра КД свидетельствуют об упорядоченном расположении лигандов в составе Ag-Phen на поверхности макромолекулы.

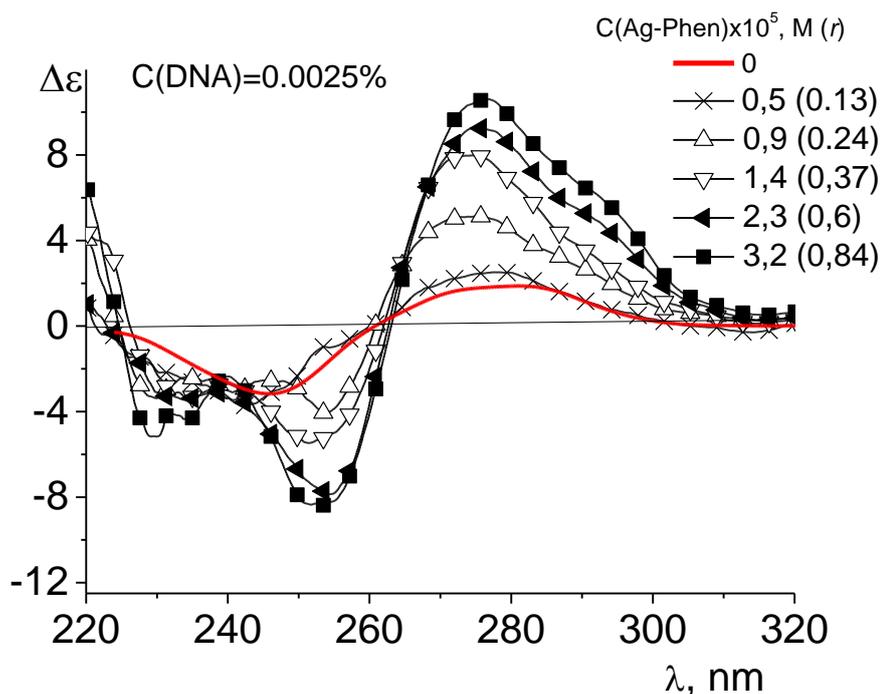


Рис. 3.2.1 Спектры КД растворов ДНК с разными концентрациями Ag-Phen.

Сравнение спектров КД растворов ДНК с разными реагентами показывает явное отличие для комплексов ДНК с Ag-Phen, Phen и AgNO₃ (Рис. 3.2.2). При этом, последовательное добавление Phen и AgNO₃ в результате дает спектры весьма схожие с соответствующими Ag-Phen. Необходимо отметить, что разная последовательность добавления Phen и AgNO₃ в раствор ДНК не сказывается на форме спектров КД результирующей системы.

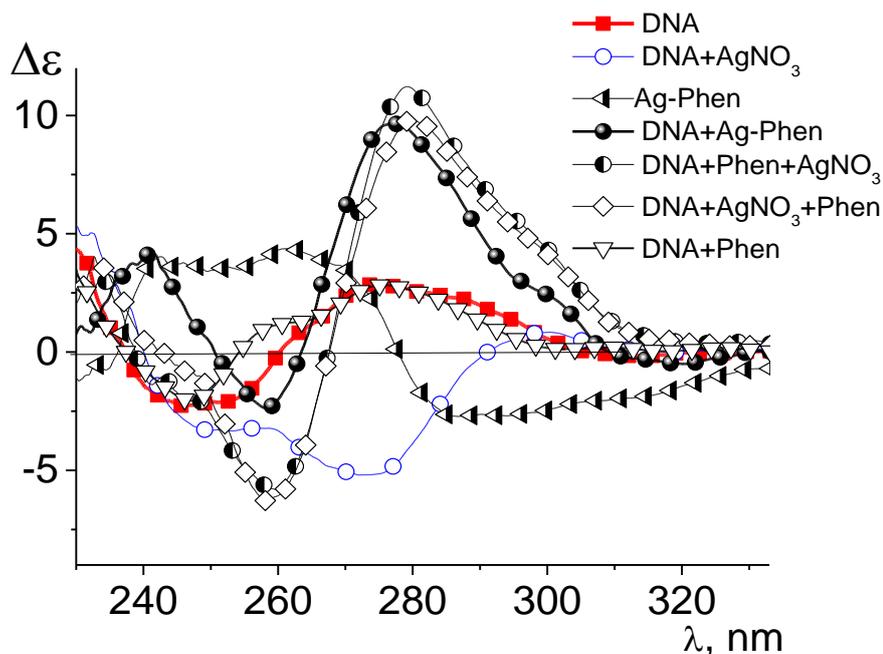


Рис. 3.2.2 Спектры КД растворов ДНК с разными соединениями и их свободных компонент.

Добавление восстановителя NaBH_4 в растворы ДНК с Ag-Phen заметно сказывается на спектрах КД системы – на положительной полосе ДНК величины $\Delta\epsilon$ принимают значения, соответствующие свободной макромолекуле ДНК (Рис. 3.2.3, $C(\text{ДНК}) = 0,0025\% = 3,8 \cdot 10^{-5} \text{ М bp}$, $C(\text{Ag-Phen}) = C(\text{NaBH}_4) = 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $r=0,13$). Отличия величины $\Delta\epsilon$ в коротковолновой области можно объяснить оптической активностью свободного Ag-Phen в растворе. Можно предположить, что восстановление серебра на ионах, находящихся в связанном состоянии с макромолекулой, приводит к выходу из координационной сферы этих ионов в раствор фенантролиновых лигандов, упорядоченно расположенных на макромолекуле до восстановления. Гиперхромизм на полосе поглощения фенантролина со сдвигом в коротковолновую область, наблюдаемый в спектрах поглощения рассматриваемых растворов, согласуется с предложенной моделью (Рис. 3.2.3, NaBH_4 в данном диапазоне не поглощает). Кроме того, в результате восстановления локально нарушаются водородные связи между парами оснований в области связывания ионов серебра. Этим может быть объяснено падение приведенной вязкости растворов комплексов ДНК с Ag-Phen после добавления восстановителя, относительно значений, соответствующих раствору свободной макромолекулы ДНК.

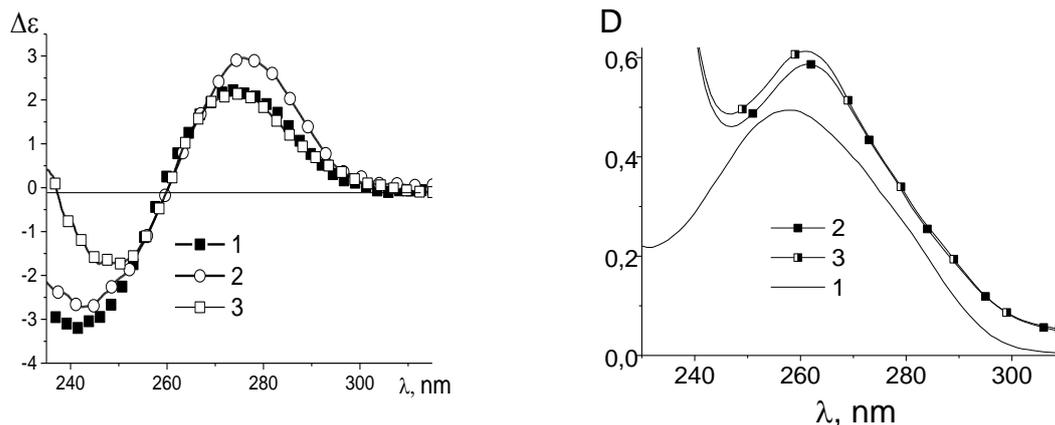


Рис. 3.2.3 Спектры КД и спектры поглощения растворов ДНК (1), комплекса ДНК с Ag-Phen до (2) и после (3) добавления восстановителя (NaBH_4).

3.3 Температурно-индуцированные спектральные изменения

3.3.1 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов свободного фенантролина

В данном разделе рассматриваются изменения спектров поглощения растворов свободного фенантролина, индуцированные повышением температуры. Концентрация Phen в растворах равна соответственно $3 \cdot 10^{-6}$ М (1); $6 \cdot 10^{-6}$ М (2); $1,2 \cdot 10^{-5}$ М (3) (далее в разделе 3.3.1 используется данная нумерация для указания концентраций соединения в растворах). Спектры растворов соединения измеряли при 30 градусах Цельсия, затем при 90 градусах и после охлаждения вновь до 30 градусов. Нагревание осуществлялось при помощи элемента Пельтье, которым оборудована измерительная ячейка спектрофотометра, в течение 30 минут со скоростью 2 градуса в минуту. Охлаждение осуществлялось в течение 5 минут при помощи жидкостной системы охлаждения измерительной ячейки спектрофотометра.

Так как NaNO_3 поглощает в исследуемой области спектра, было проведено измерение по описанной выше методике раствора фенантролина в воде. Концентрация соединения в растворе $1,2 \cdot 10^{-5}$ М (номер 3). Как видно из рисунка 3.3.1.1, нагревание водного раствора фенантролина сопровождается небольшим сдвигом полосы поглощения в коротковолновую область и незначительным гипохромным эффектом. После охлаждения до исходной температуры, поглощение раствора принимает значения, соответствующие раствору до нагревания. Если нормировать данные спектры на максимум, становится заметно изменение формы спектра в длинноволновой области (> 280 нм) при нагревании, по отношению к растворам при комнатной температуре (Рис. 3.3.1.2).

После охлаждения раствора, форма спектра принимает исходный вид. Таким образом, изменения, происходящие со свободным фенантролином в водном растворе при нагревании незначительны и имеют обратимый характер.

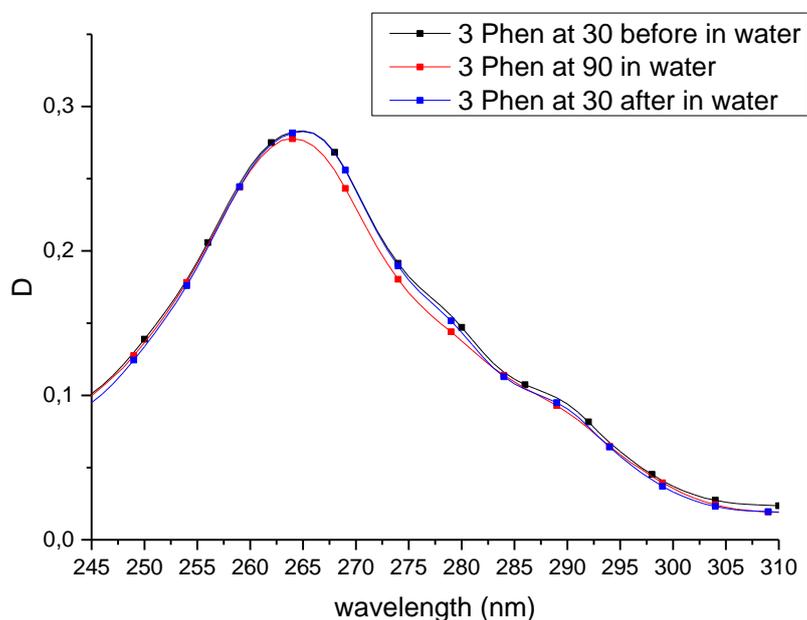


Рис. 3.3.1.1 Спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в воде при разных температурах.

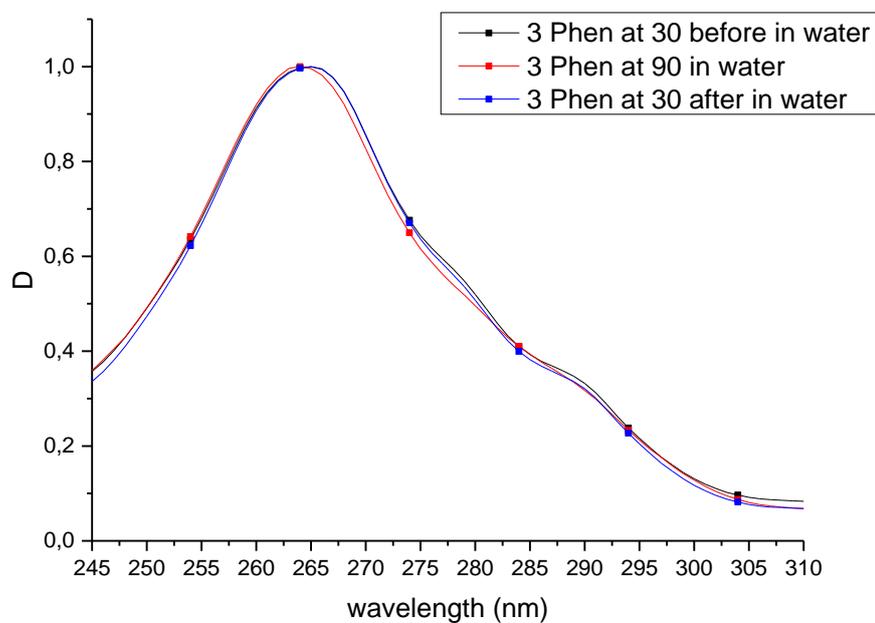


Рис. 3.3.1.2 Нормированные на максимум спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в воде при разных температурах.

Аналогичное исследование было проведено для растворов фенантролина разных концентраций в 0,005 М NaNO_3 (Рис. 3.3.1.3 – 3.3.1.5, поглощение соли вычтено из приведенных спектров, масштаб по оси Y на данных трех рисунках одинаков для большей наглядности изменений поглощения по абсолютной величине). Как видно из приведенных рисунков, поглощение растворов фенантролина в 0,005 М NaNO_3 при нагревании заметно падает. При охлаждении до исходной температуры, поглощение растворов незначительно возрастает, но не достигает исходных значений. При увеличении концентрации соединения в растворе, наблюдаемый эффект становится менее выраженным по величине отношения поглощений на максимуме растворов как при нагревании, так и при охлаждении (Таблица 3.3.1). Как видно из абсолютных величин поглощения на максимуме растворов фенантролина в NaNO_3 до нагревания, поглощение линейно зависит от концентрации соединения. Это может означать отсутствие образования агрегатов в растворе при увеличении концентрации. Для растворов при 90 градусах и после охлаждения эта зависимость не выполняется. Необходимо отметить, что сдвиг полосы поглощения в коротковолновую область при нагревании наблюдается у всех растворов и наиболее заметен для раствора наименьшей концентрации (номер 1). Таким образом можно предположить, что в растворах фенантролина в NaNO_3 малых концентраций при нагревании происходят изменения, приводящие к уменьшению поглощения. С увеличением концентрации соединения данный эффект становится менее выраженным. Рассмотрим растворы наибольшей концентрации (номер 3) в воде и в 0,005 М NaNO_3 . Стоит отметить, что до нагревания раствор в NaNO_3 поглощает больше, чем в воде, а на 90 градусах и после охлаждения величины их поглощений на максимуме совпадают. Если нормировать спектры, отвечающие раствору в NaNO_3 на максимум, становится заметен обсуждаемый выше небольшой сдвиг полосы поглощения в коротковолновую область и изменение формы спектра в длинноволновой области (>280 нм) при нагревании, по отношению к растворам при комнатной температуре (Рис. 3.3.1.6). После охлаждения раствора, форма спектра принимает исходный вид. Перечисленные изменения формы спектра поглощения раствора фенантролина в 0,005 М NaNO_3 при нагревании соответствуют изменениям формы спектра водного раствора. В то же время, отличие величин поглощения соединения до нагревания и после охлаждения в присутствии соли указывает на необратимый характер изменений, происходящих в растворе 0,005 М NaNO_3 при нагревании.

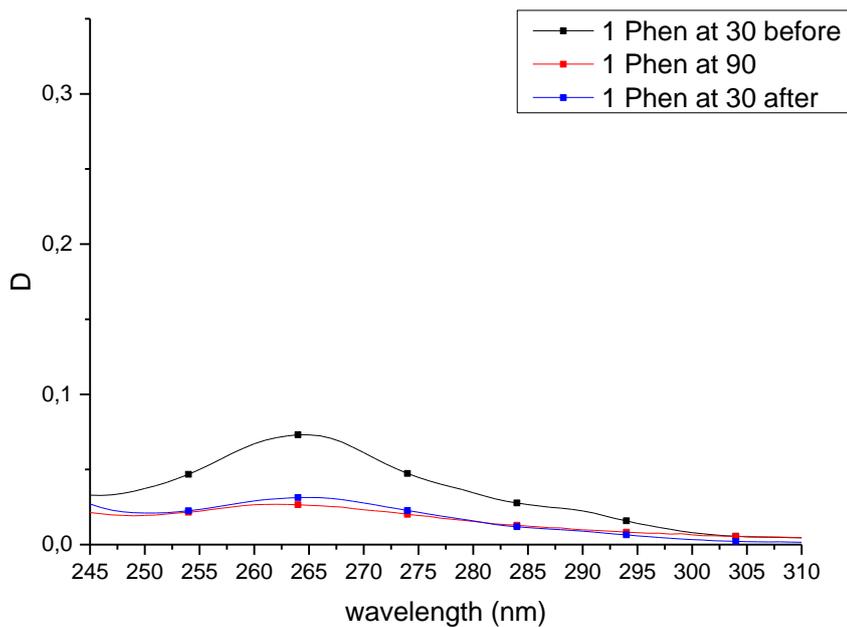


Рис. 3.3.1.3 Спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 3 \cdot 10^{-6}$ M) в $0,005$ M NaNO_3 при разных температурах.

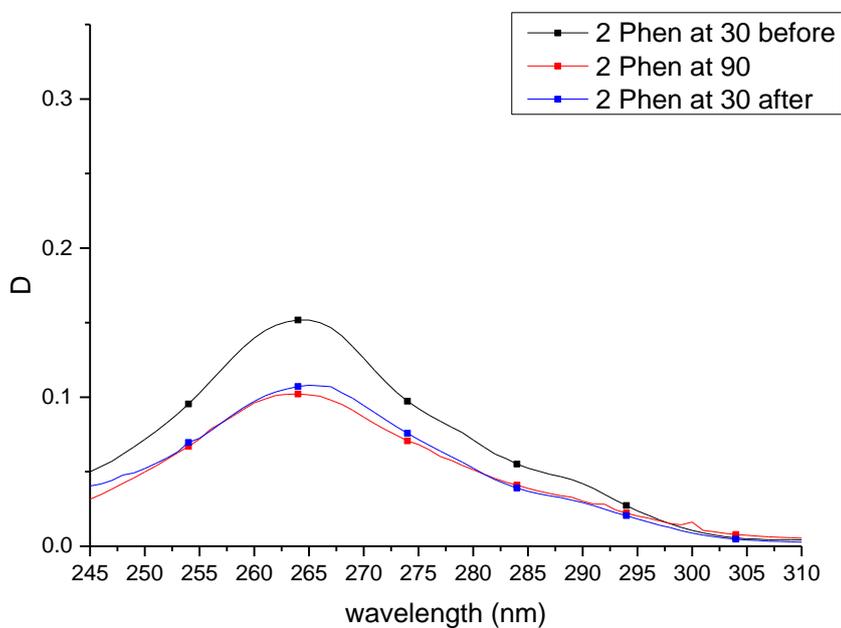


Рис. 3.3.1.4 Спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 6 \cdot 10^{-6}$ M) в $0,005$ M NaNO_3 при разных температурах.

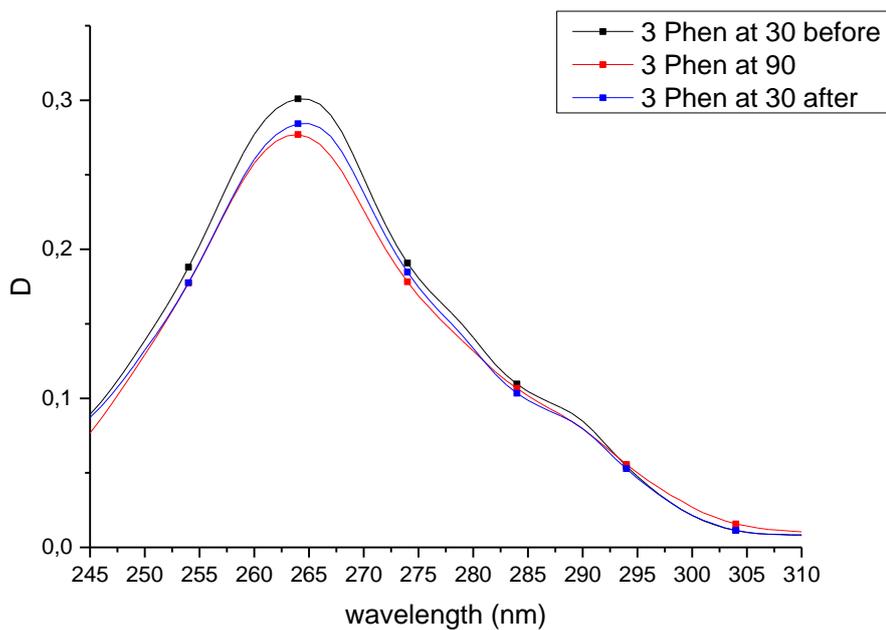


Рис. 3.3.1.5 Спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

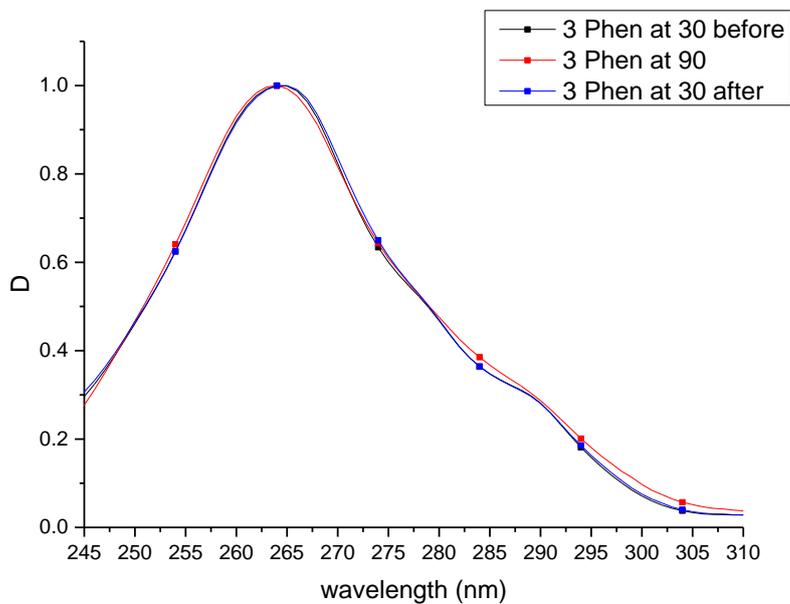


Рис. 3.3.1.6 Нормированные на максимум спектры поглощения раствора Phen ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

Концентрация	$1,2 \cdot 10^{-5}$ М	$3 \cdot 10^{-6}$ М	$6 \cdot 10^{-6}$ М	$1,2 \cdot 10^{-5}$ М
Растворитель	вода	0,005 М NaNO ₃		
До нагревания	265 нм	264 нм	265 нм	264 нм
	0,283	0,073	0,152	0,301
При 90°C	264 нм	262 нм	264 нм	264 нм
	0,277	0,027	0,102	0,277
После охлаждения	265 нм	264 нм	265 нм	265 нм
	0,283	0,031	0,108	0,284
D ₉₀ /D _{30 до}	0,98	0,37	0,67	0,92
D _{30 после} /D ₉₀	1,02	1,15	1,06	1,03

Таблица 3.3.1 Длина волны, величина поглощения на максимуме и отношения величин поглощения на максимуме растворов Phen различной концентрации.

3.3.2 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов свободного Ag-Phen

В данном разделе рассматриваются изменения спектров поглощения растворов свободного Ag-Phen, индуцированные повышением температуры. Концентрация Ag-Phen в растворах равна соответственно $1,5 \cdot 10^{-6}$ М (1); $3 \cdot 10^{-6}$ М (2); $6 \cdot 10^{-6}$ М (3) (далее в разделе 3.3.2 используется данная нумерация для указания концентраций соединения в растворах). Так как в составе одной молекулы Ag-Phen содержится две молекулы фенантролина, данные концентрации соответствуют концентрациям растворов свободного фенантролина из раздела 3.3.1. Температурный диапазон и время нагревания и охлаждения растворов аналогичны описанным в разделе 3.3.1.

Так как NaNO₃ поглощает в исследуемой области спектра, было проведено измерение раствора Ag-Phen в воде. Концентрация соединения в растворе $6 \cdot 10^{-6}$ М (номер 3). Как видно из рисунка 3.3.2.1, нагревание водного раствора Ag-Phen сопровождается небольшим сдвигом полосы поглощения в коротковолновую область и незначительным гипохромным эффектом. После охлаждения до исходной температуры вновь наблюдается гипохромный эффект, но в то же время, полоса поглощения сдвигается на исходное положение. Стоит отметить, что величина поглощения данного раствора практически совпадает с величиной поглощения водного раствора фенантролина соответствующей концентрации (Таблица 3.3.2). Если нормировать данные спектры на максимум, становится заметно изменение формы спектра в длинноволновой области (>280 нм) при нагревании, по отношению к растворам при комнатной температуре (Рис. 3.3.2.2). После

охлаждения раствора, форма спектра принимает исходный вид. Перечисленные изменения формы спектра аналогичны изменениям в растворах фенантролина при нагревании. При этом, наблюдаемый при охлаждении раствора Ag-Phen в воде гипохромизм указывает на различия происходящих в данных растворах процессов.

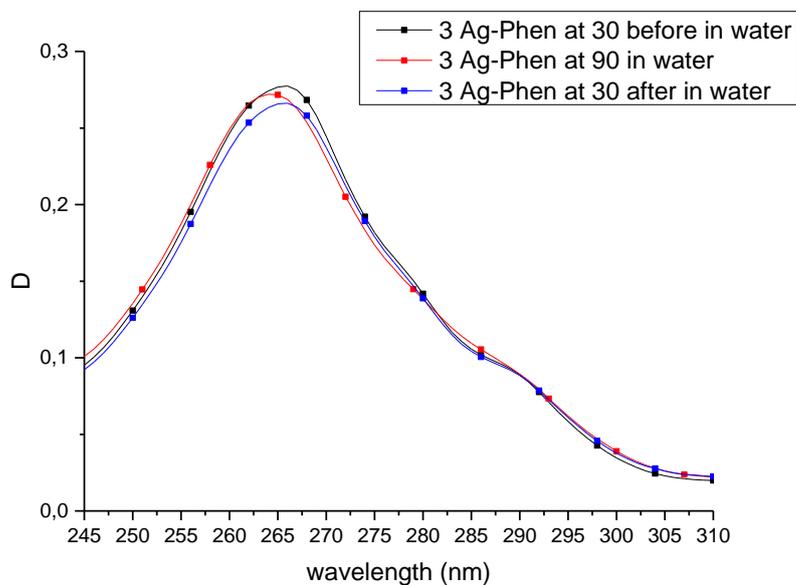


Рис. 3.3.2.1 Спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в воде при разных температурах.

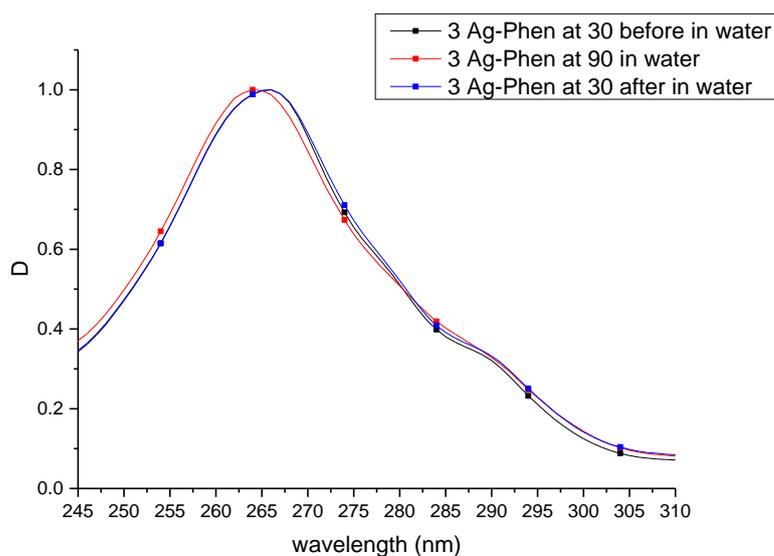


Рис. 3.3.2.2 Нормированные на максимум спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в воде при разных температурах.

Аналогичное исследование было проведено для растворов Ag-Phen в 0,005 М NaNO₃ (Рис. 3.3.2.3 – 3.3.2.5, поглощение соли вычтено из приведенных спектров, масштаб по оси Y на данных трех рисунках одинаков для большей наглядности изменений поглощения по абсолютной величине). При малой концентрации соединения (номер 1) при нагревании наблюдается гипохромизм со сдвигом полосы поглощения в коротковолновую область (Таблица 3.3.2). После охлаждения поглощение раствора принимает исходные значения. При увеличении концентрации соединения (номера 2,3) при нагревании наблюдается сдвиг полосы и гиперхромизм, наиболее заметный для системы 3. Охлаждение раствора 2 приводит к незначительному возрастанию поглощения, а охлаждение раствора 3 приводит к падению поглощения, но конечное значение превышает поглощение системы до нагревания. Сдвиг полосы поглощения при нагревании в коротковолновую область и возвращение после охлаждения к исходному значению наблюдается во всех системах в одинаковой степени. Если нормировать спектры поглощения системы 3 на максимум можно заметить обсуждаемый выше сдвиг полосы поглощения при нагревании в коротковолновую область и изменение формы спектра в длинноволновой области (>280 нм) (Рис. 3.3.2.6). После охлаждения форма спектра принимает исходный вид. Как видно из абсолютных величин поглощения на максимуме растворов Ag-Phen в NaNO₃, линейная зависимость поглощения от концентрации не выполняется при всех температурах. Как можно судить из приведенных данных, поглощение до нагревания раствора Ag-Phen и Phen под номерами 1 практически совпадают, а при увеличении концентрации (номера 2,3) расхождение становится все более значительным. Для объяснения полученных данных можно предположить наличие в растворе Ag-Phen двух фракций: целого комплекса и двух его частей, образующихся при выходе одного из фенантролиновых лигандов из координационной сферы иона серебра. При увеличении концентрации Ag-Phen доля распавшегося комплекса возрастает. Кроме того, при температурной обработке часть молекул Ag-Phen распадается, а при последующем охлаждении часть распавшихся реассоциирует. Это может выражаться в гиперхромизме при нагревании раствора и незначительном гипохромизме при последующем охлаждении. С увеличением концентрации данный эффект будет все более выражен. В совокупности с обсуждаемыми в разделе 3.3.1 спектральными изменениями растворов свободного фенантролина (гипохромизм при нагревании с незначительным гиперхромизмом при последующем охлаждении), чья выраженность уменьшается с увеличением концентрации, мы получим эффект, наблюдаемый в эксперименте.

Для большей наглядности на рисунке 3.3.2.7 построены спектры поглощения растворов Ag-Phen и Phen под номерами 3 в 0,005 М NaNO₃ ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6}$ М, $C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ М, то есть концентрация фенантролинового лиганда в растворах одинакова). Как видно из приведенных

спектров, растворы свободного фенантролина поглощают больше, чем соответствующие концентрации Ag-Phen. Из этого можно сделать вывод, что даже на 90 градусах Цельсия при указанной концентрации в растворе часть комплекса Ag-Phen не диссоциирует и остается в связанном состоянии. На рисунке 3.3.2.8 представлены нормированные на максимум спектры поглощения тех же растворов. Можно заметить, что при 90 градусах формы спектров практически совпадают. До и после нагревания в длинноволновой области (>280 нм) наблюдается дополнительный пик. Его можно различить на спектрах всех систем при 30 градусах. Перечисленные изменения формы спектра аналогичны изменениям в растворах фенантролина при нагревании, но в растворах Ag-Phen более заметно выражены.

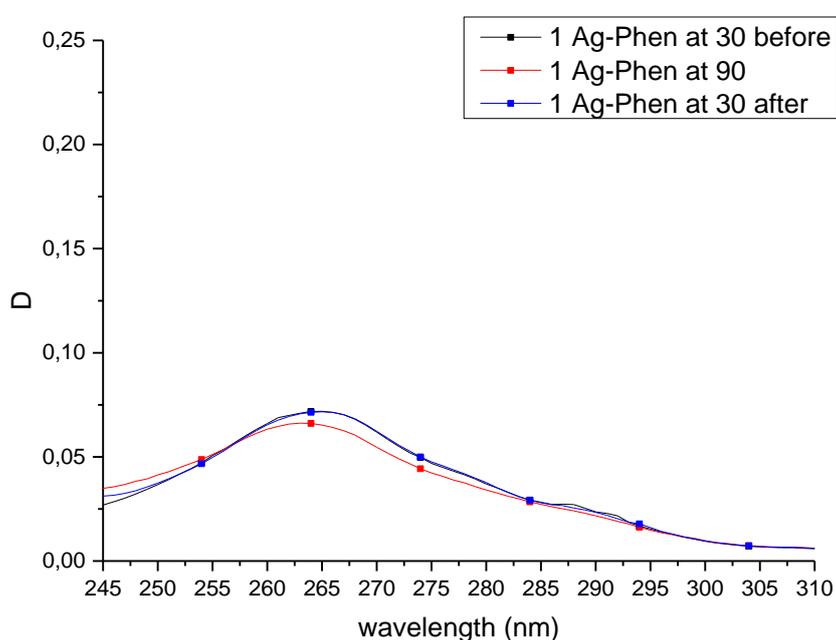


Рис. 3.3.2.3 Спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 1,5 \cdot 10^{-6}$ М) в 0,005 М NaNO_3 при разных температурах.

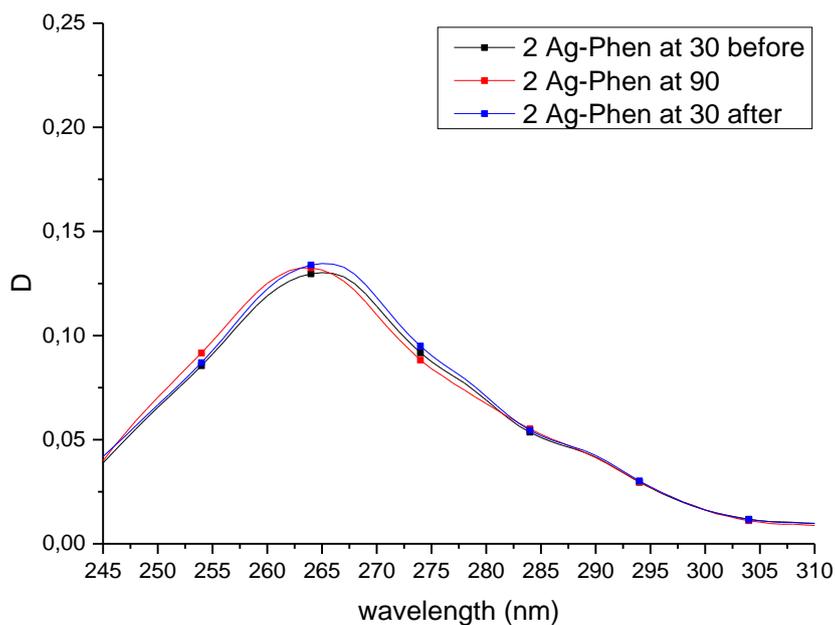


Рис. 3.3.2.4 Спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

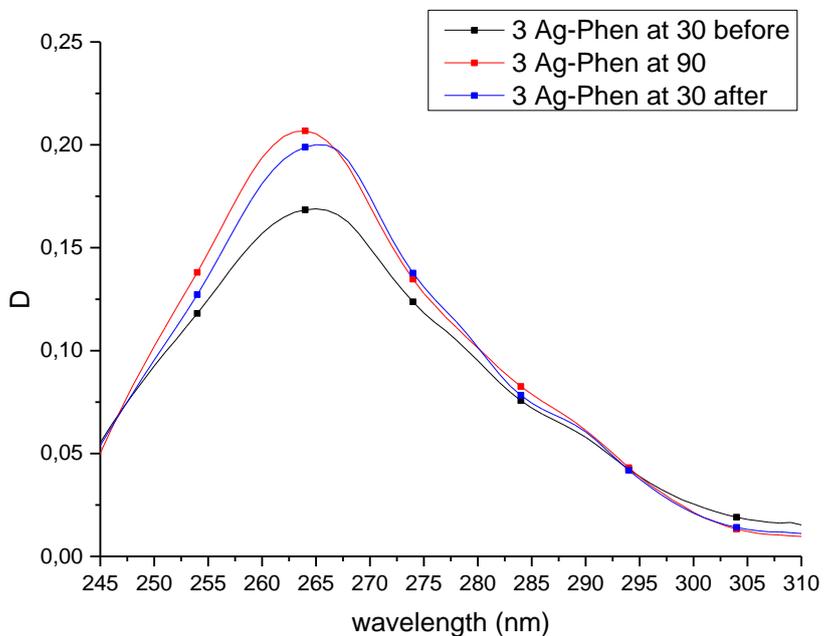


Рис. 3.3.2.5 Спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

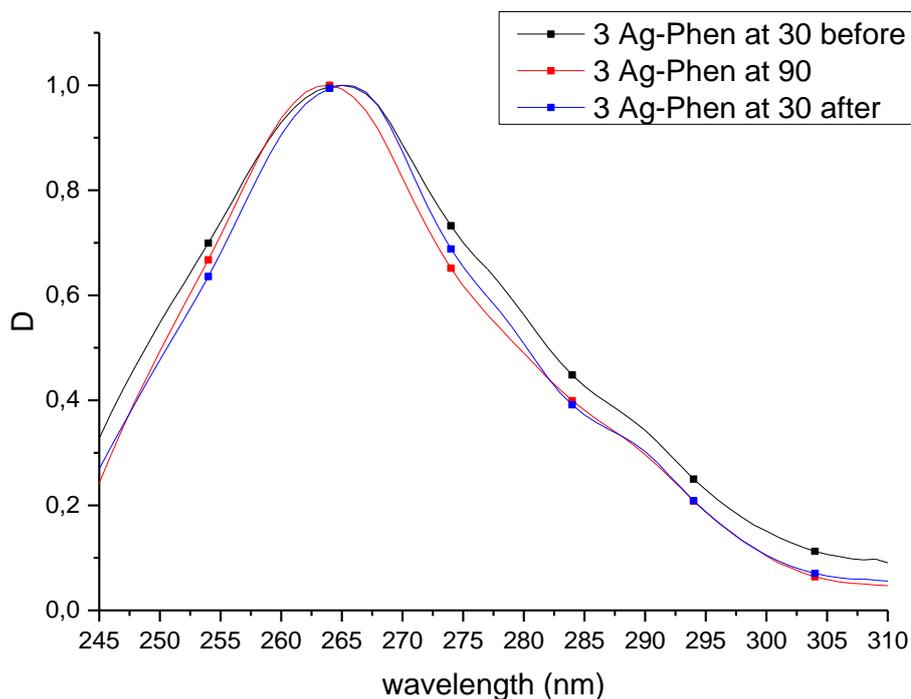


Рис. 3.3.2.6 Нормированные на максимум спектры поглощения раствора Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

Концентрация	$6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Растворитель	вода	$0,005 \text{ M NaNO}_3$		
До нагревания	266 нм	265 нм	265 нм	265 нм
	0,277	0,072	0,130	0,169
При 90°C	264 нм	263 нм	264 нм	264 нм
	0,272	0,066	0,133	0,207
После охлаждения	266 нм	265 нм	265 нм	265 нм
	0,266	0,072	0,135	0,200
$D_{90}/D_{30 \text{ до}}$	0,98	0,92	1,02	1,23
$D_{30 \text{ после}}/D_{90}$	0,98	1,09	1,02	0,97

Таблица 3.3.2 Длина волны, величина поглощения на максимуме и отношения величин поглощения на максимуме растворов Ag-Phen различной концентрации.

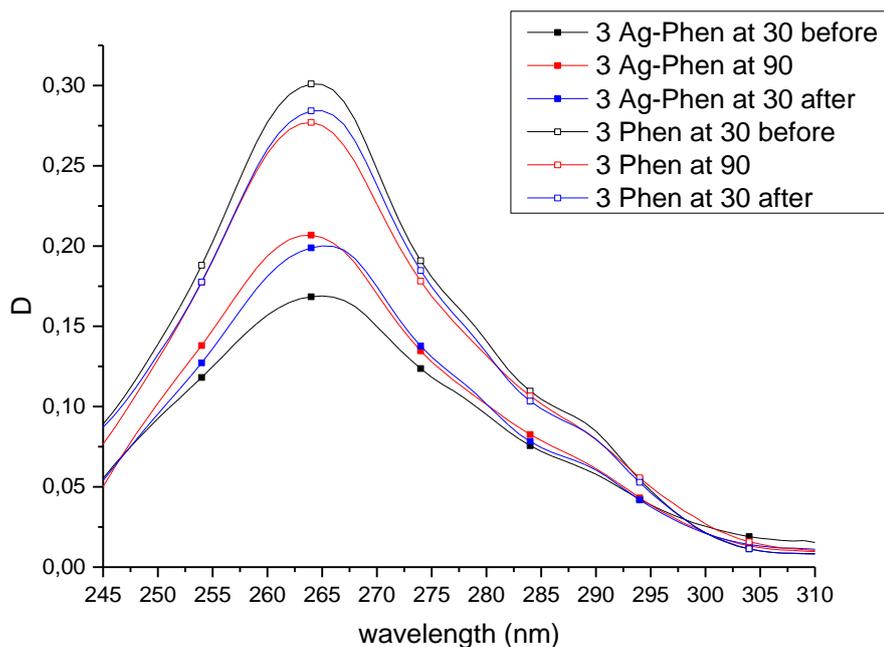


Рис. 3.3.2.7 Спектры поглощения растворов Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) и Phен ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

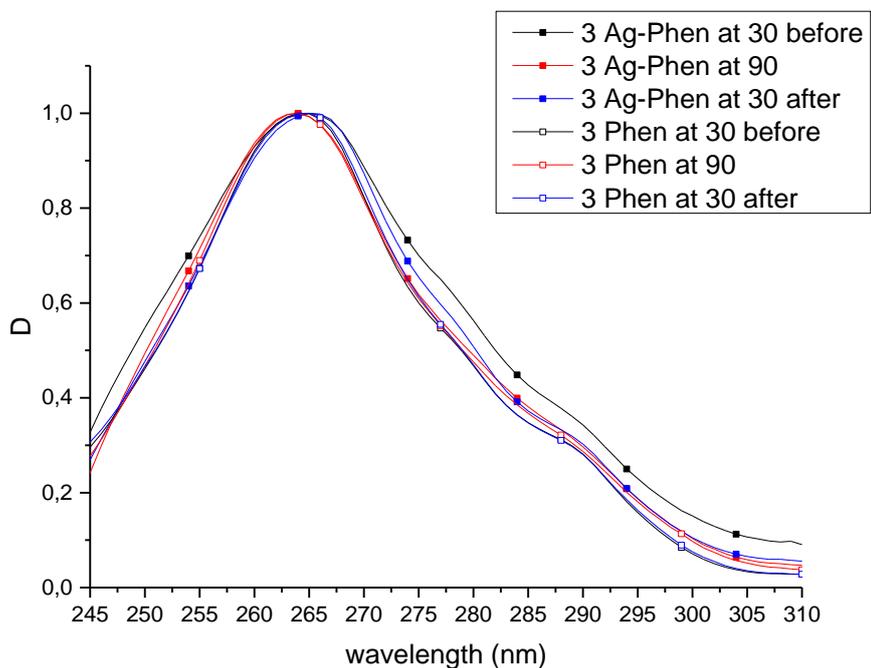


Рис. 3.3.2.8 Нормированные на максимум спектры поглощения растворов Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) и Phен ($C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

3.3.3 Температурно-индуцированные спектральные изменения раствора ДНК

В данном разделе представлены данные по плавлению ДНК. Концентрация исследуемого раствора составляла $0,001\% = 1,5 \cdot 10^{-5}$ М bp в $0,005$ NaNO₃. Температурный диапазон и время нагревания и охлаждения раствора аналогичны описанным в разделе 3.3.1. Нативность макромолекулы ДНК (а соответственно и относительное увеличение поглощения при денатурации) зависит от времени ее хранения, поэтому в каждой серии экспериментов, результаты которых обсуждаются в следующих разделах, приведены данные для раствора свободной ДНК соответствующего данным системама. Приведенный в данном разделе образец отвечает серии экспериментов с Ag-Phen, обсуждаемой в разделе 3.3.6.

На рисунке 3.3.3.1 представлены спектр поглощения раствора ДНК до температурно-индуцированной денатурации, спектр, полученный при 90 градусах Цельсия и спектр того же раствора после охлаждения (поглощение соли вычтено из всех спектров). Как видно из рисунка, после охлаждения раствора макромолекула ДНК частично восстанавливает двуспиральную структуру, но значительная часть оснований не образует водородных связей и остается в денатурированном состоянии. Из нормированных на максимум спектров поглощения видно уширение полосы поглощения ДНК при денатурации (Рис. 3.3.3.2). Сдвига полосы не наблюдается.

На рисунке 3.3.3.3 представлена кривая плавления – зависимость поглощения раствора ДНК на длине волны 260 нм от температуры, а на рисунке 3.3.3.4 первая производная этой кривой. Как видно из данных зависимостей, температура плавления ДНК $T_m = 60 \pm 2$ градусов Цельсия. Абсолютная величина поглощения раствора ДНК при денатурации на 260 нм возросла примерно на 40% (гиперхромный эффект) (Таблица 3.3.6).

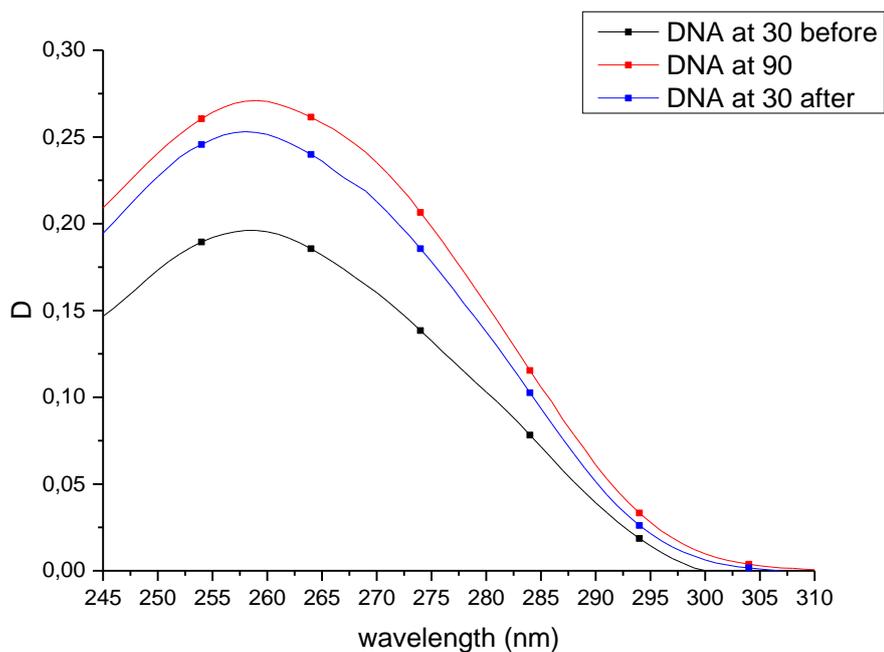


Рис. 3.3.3.1 Спектры поглощения раствора ДНК ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

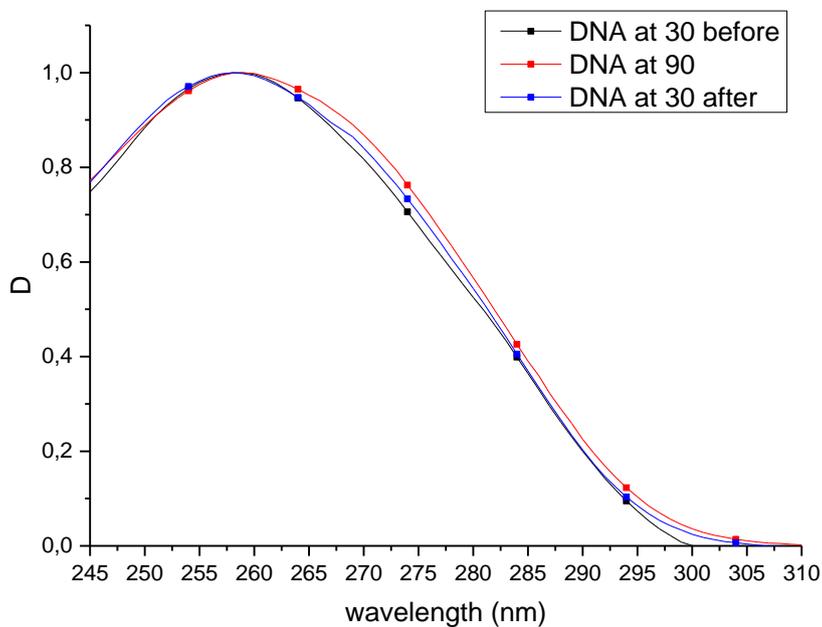


Рис. 3.3.3.2 Нормированные на максимум спектры поглощения раствора ДНК ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

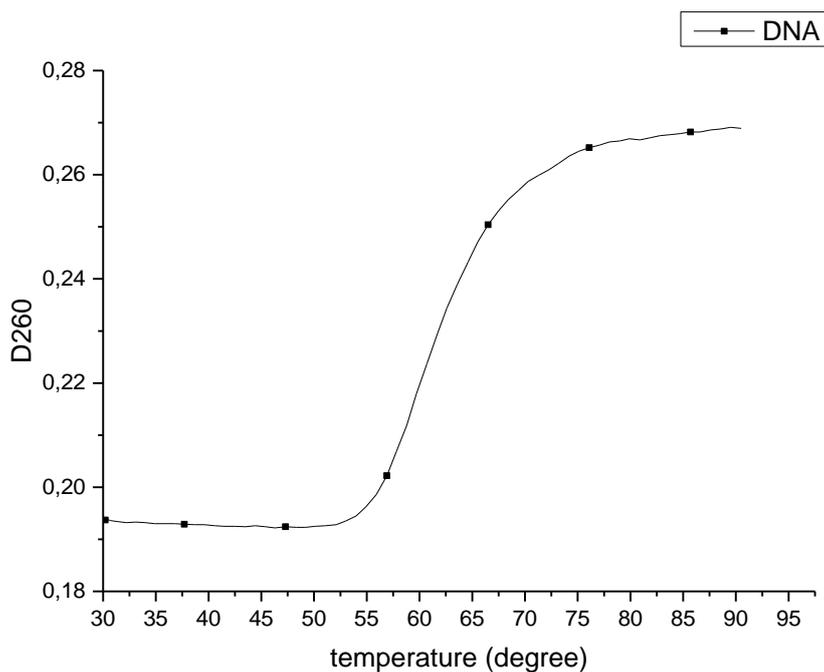


Рис. 3.3.3.3 Зависимость поглощения раствора ДНК на длине волны 260 нм от температуры.

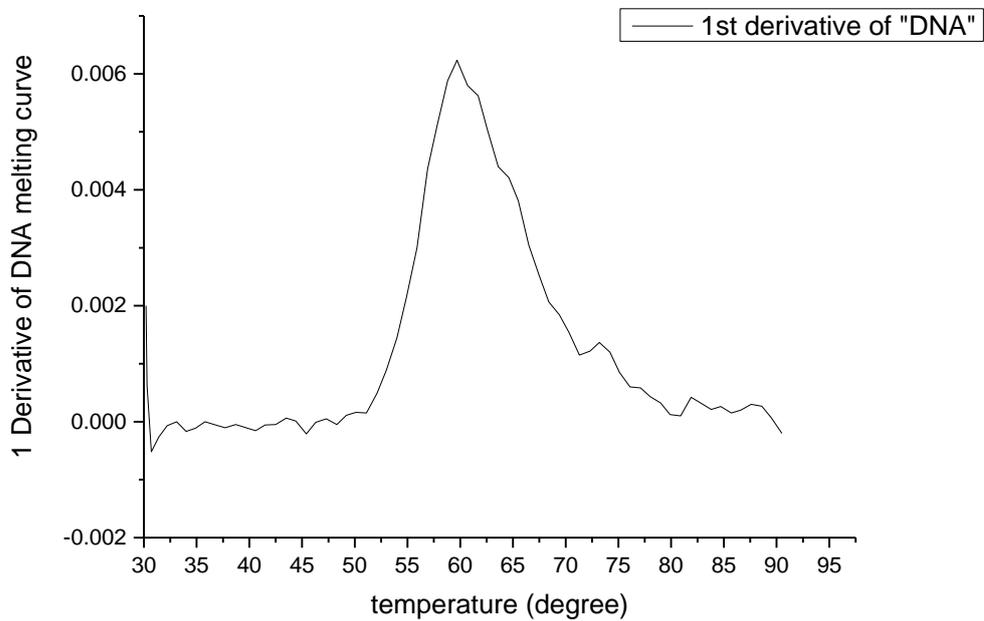


Рис. 3.3.3.4 Первая производная кривой плавления раствора ДНК, представленной на Рис. 3.3.3.3.

3.3.4 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с Phen

В данном разделе представлены данные по плавлению ДНК в растворе с концентрацией 0,001% = $1,5 \cdot 10^{-5}$ М bp с Phen в 0,005 NaNO₃. Концентрация Phen в растворах равна соответственно $3 \cdot 10^{-6}$ М (1); $6 \cdot 10^{-6}$ М (2); $1,2 \cdot 10^{-5}$ М (3) (концентрации соответствуют растворам свободного Phen в разделе 3.3.1). Температурный диапазон и время нагревания и охлаждения раствора аналогичны описанным в разделе 3.3.1.

На рисунках 3.3.4.1 – 3.3.4.3 представлены вычисленные спектры поглощения ДНК в растворах с фенантролином, который присутствует в растворах в разных концентрациях. Как видно из полученных данных, увеличение концентрации фенантролина увеличивает относительную величину гиперхромизма при денатурации макромолекулы (Таблица 3.3.4). Невыполнение этой зависимости для системы 3 может быть объяснено увеличением падения абсолютной величины поглощения при нагревании растворов фенантролина с уменьшением концентрации, обсуждаемом выше. При денатурации макромолекулы освобождаются места связывания фенантролина, и концентрация его свободной формы в растворе падает. Действительно, если посмотреть на вычисленные кривые плавления ДНК в растворах с фенантролином (Рис. 3.3.4.4) на кривых отвечающих растворам 2 и 3 видно падение поглощения в высокотемпературной области, причем для раствора 3 оно выражено заметнее. Так же, из данного рисунка видно, что при увеличении концентрации фенантролина в растворе поглощение макромолекулы увеличивается. Стоит отметить, что при высоких температурах величины отвечающие разным концентрациям фенантролина имеют близкие значения. Кроме того, из вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с фенантролином видно, что присутствие соединения в растворе никак не сказывается на величине температуры плавления макромолекулы. Подтверждением этого наблюдения являются зависимости первых производных этих кривых от температуры, представленные на рисунке 3.3.4.5. При охлаждении растворы с большей концентрацией фенантролина показывают меньшее относительное падение величины поглощения. Это может свидетельствовать о свойстве фенантролина препятствовать ренатурации ДНК. Например, это может осуществляться через стэкинг взаимодействия с плоскими основаниями ДНК, утратившими водородные связи, что препятствует образованию вторичной спиральной структуры.

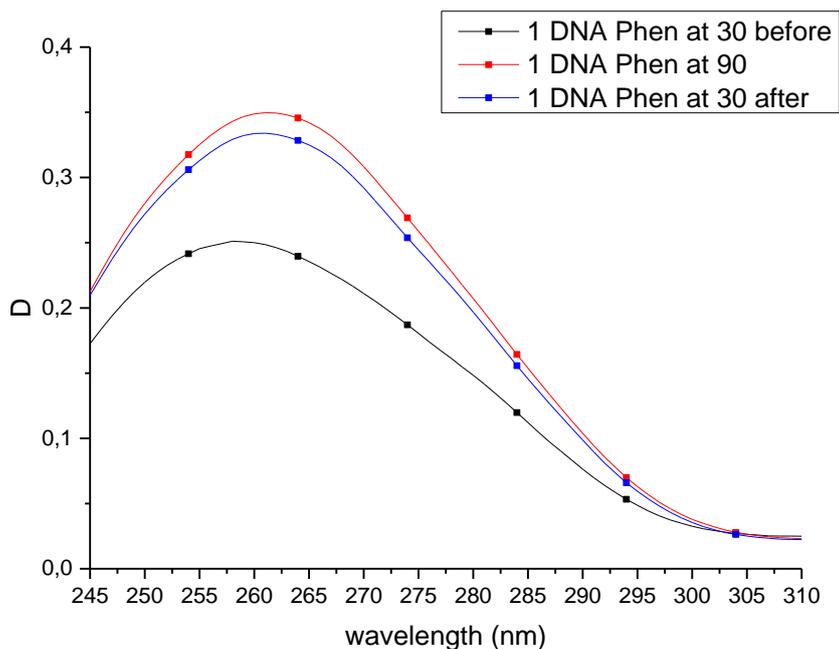


Рис. 3.3.4.1 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Phen 1 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Phen}) = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

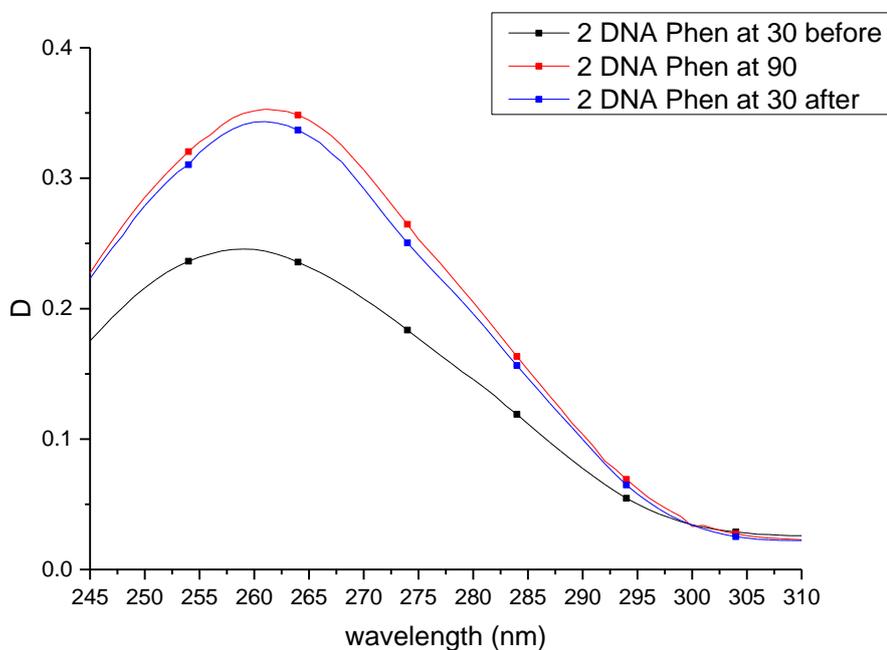


Рис. 3.3.4.2 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Phen 2 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

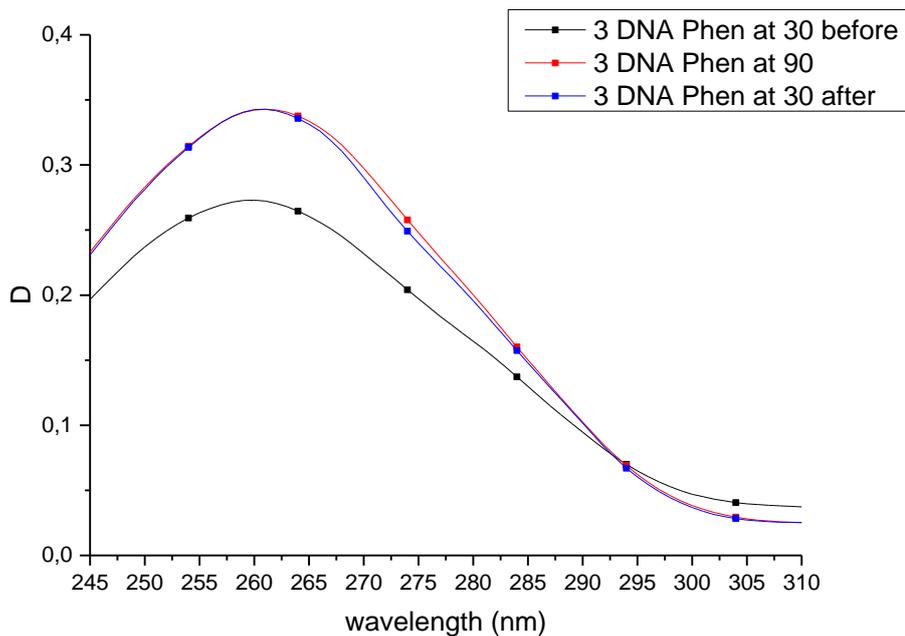


Рис. 3.3.4.3 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Phen 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

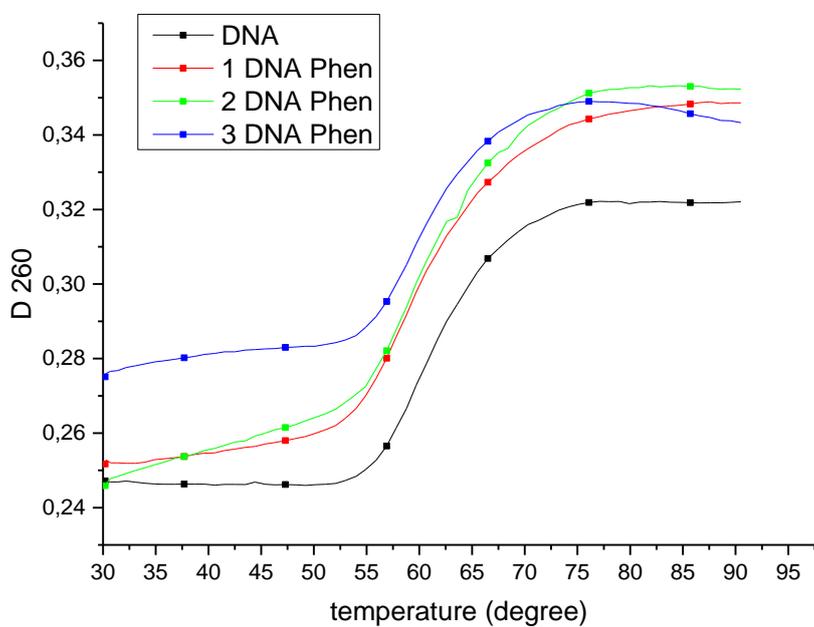


Рис. 3.3.4.4 Зависимость поглощения раствора свободной ДНК и вычисленные зависимости поглощения ДНК в растворах с Phen на длине волны 260 нм от температуры.

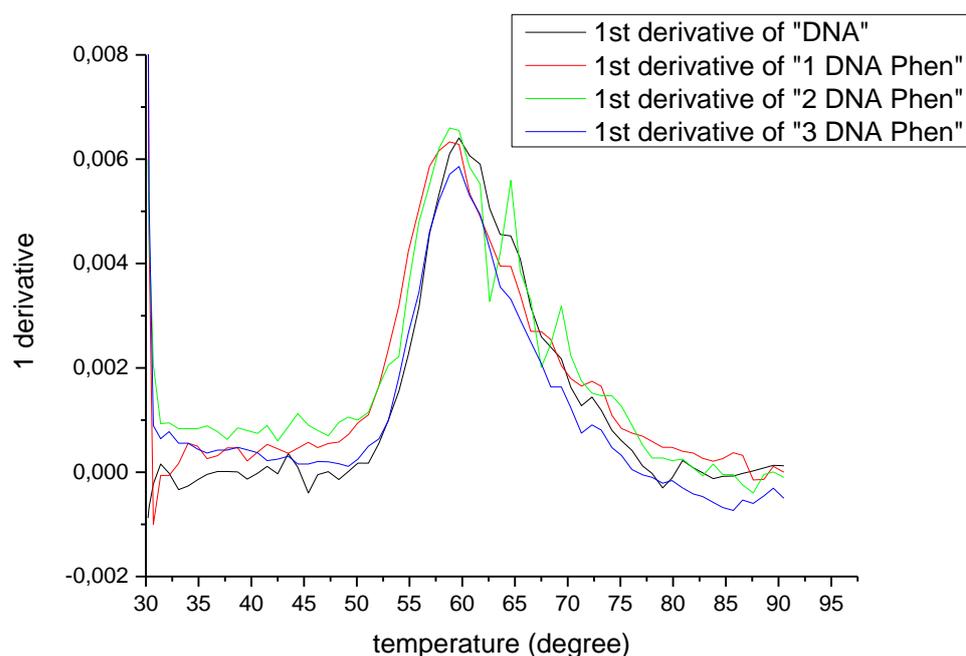


Рис. 3.3.4.5 Зависимость первой производной кривой плавления раствора свободной ДНК и вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с Phen на длине волны 260 нм от температуры.

Концентрация Phen	0	$3 \cdot 10^{-6}$ М	$6 \cdot 10^{-6}$ М	$1,2 \cdot 10^{-5}$ М
До нагревания	259 нм	259 нм	259 нм	260 нм
	0,247	0,251	0,246	0,273
При 90°C	259 нм	261 нм	261 нм	261 нм
	0,322	0,350	0,353	0,343
После охлаждения	259 нм	261 нм	261 нм	261 нм
	0,306	0,334	0,343	0,343
D_{90}/D_{30} до	1,30	1,39	1,44	1,26
D_{30} после/ D_{90}	0,95	0,95	0,97	1

Таблица 3.3.4 Длина волны, величина поглощения на максимуме и отношения величин поглощения на максимуме вычисленных спектров ДНК в растворах с Phen различной концентрации.

3.3.5 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с AgNO_3

В данном разделе представлены данные по плавлению ДНК в растворе с концентрацией 0,001% = $1,5 \cdot 10^{-5}$ М бр с AgNO_3 в 0,005 NaNO_3 . AgNO_3 в данном диапазоне не поглощает. Концентрация AgNO_3 в растворах равна соответственно $1,5 \cdot 10^{-6}$ М (1); $3 \cdot 10^{-6}$ М (2); $6 \cdot 10^{-6}$ М (3) (этим значениям соответствуют соотношения ионов серебра к парам оснований $r = 0,1; 0,2; 0,4$). Температурный диапазон и время нагревания и охлаждения раствора аналогичны описанным в разделе 3.3.1.

На рисунках 3.3.5.1 – 3.3.5.3 представлены вычисленные спектры поглощения ДНК в растворах с AgNO_3 разных концентраций. Как видно из приведенных спектров, увеличение концентрации AgNO_3 не сказывается на величине гиперхромизма при денатурации макромолекулы (Таблица 3.3.5). Отхождение системы 3 от данной зависимости может быть объяснено тем, что для нее не было достигнуто плато на кривой плавления в исследуемом диапазоне температур, и соответственно максимальное значение поглощения соответствующее полной денатурации занижено. Это хорошо видно из вычисленных кривых плавления ДНК (Рис. 3.3.5.4). Так же из этого рисунка видно, что добавление AgNO_3 не приводит к росту поглощения макромолекулы. При охлаждении растворы с большей концентрацией AgNO_3 показывают более выраженное падение величины поглощения. Это может свидетельствовать о свойстве AgNO_3 способствовать ренатурации ДНК. Кроме того, из вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с AgNO_3 видно, что присутствие ионов серебра в растворе увеличивает значение величины температуры плавления макромолекулы (Рис. 3.3.5.4). Подтверждением этого наблюдения являются зависимости первых производных этих кривых от температуры, представленные на рисунке 3.3.5.5. Таким образом, связывание ионов серебра с макромолекулой делает ее более стабильной по отношению к температурной денатурации и, кроме того, способствует обратной ренатурации ДНК при охлаждении раствора денатурированной ДНК.

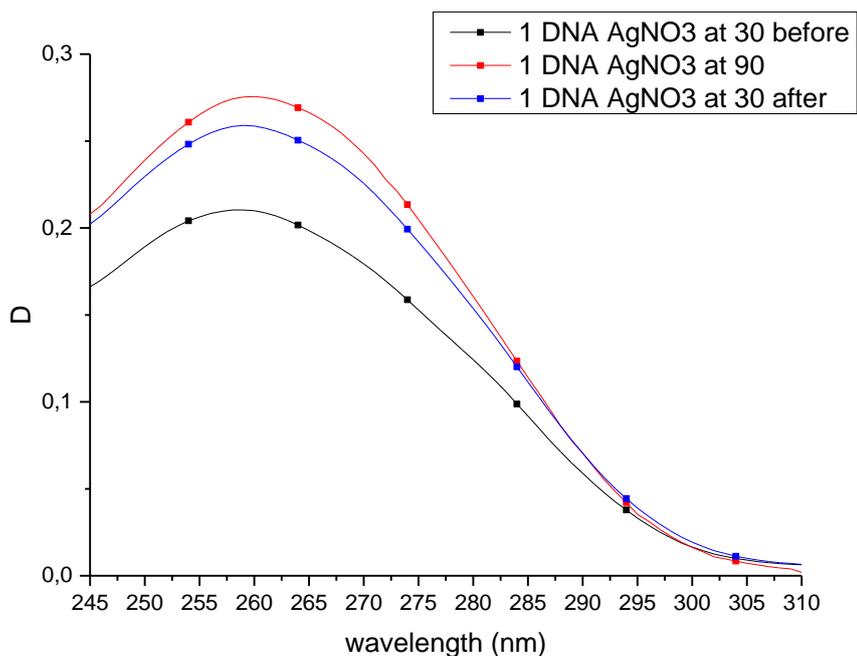


Рис. 3.3.5.1 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с AgNO_3 1 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{AgNO}_3) = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

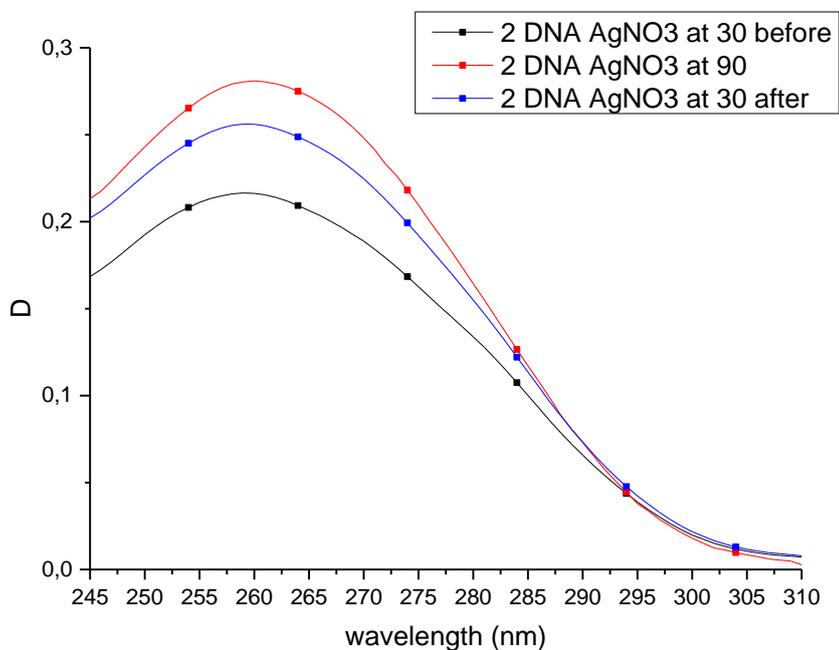


Рис. 3.3.5.2 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с AgNO_3 2 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{AgNO}_3) = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

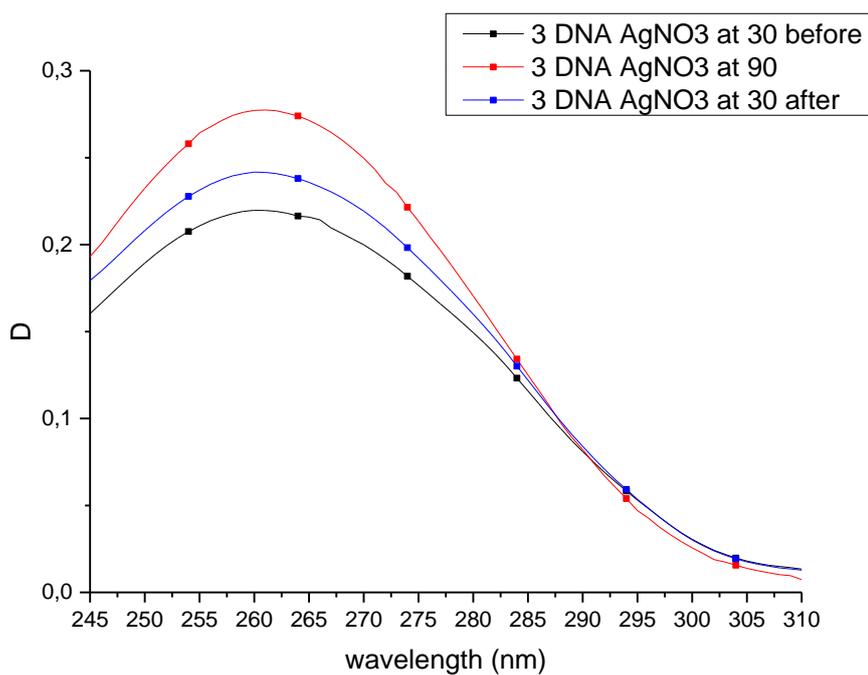


Рис. 3.3.5.3 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с AgNO_3 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{AgNO}_3) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

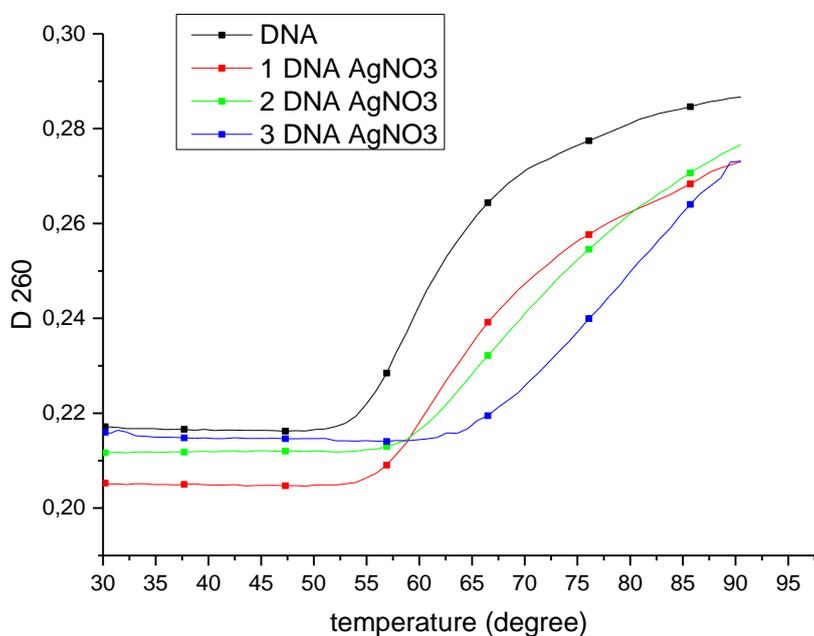


Рис. 3.3.5.4 Зависимость поглощения раствора свободной ДНК и вычисленные зависимости поглощения ДНК в растворах с AgNO_3 на длине волны 260 нм от температуры.

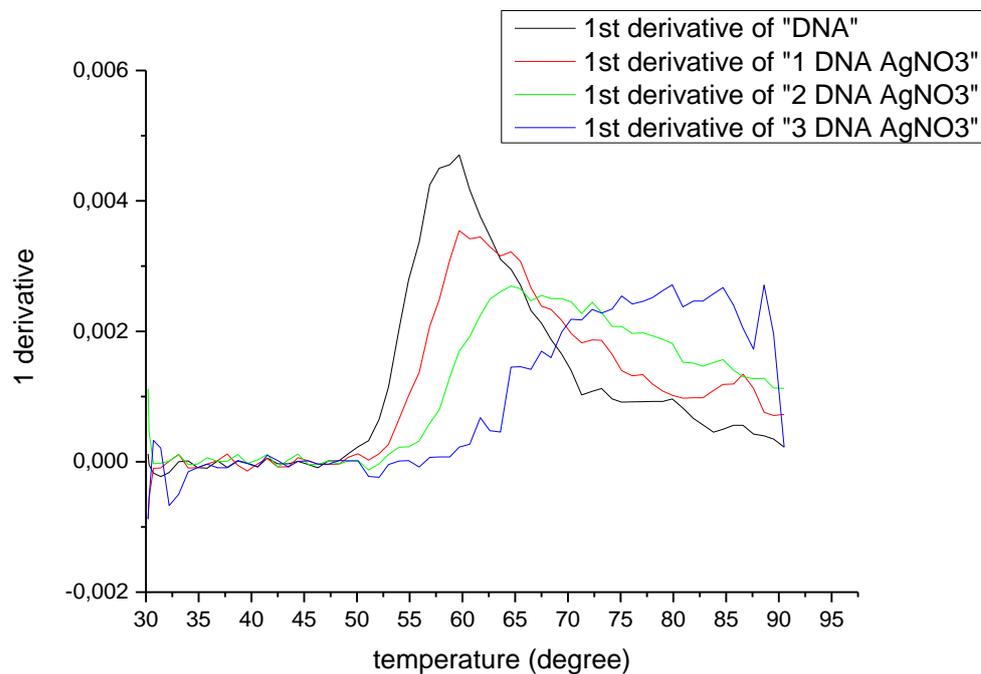


Рис. 3.3.5.5 Зависимость первой производной кривой плавления раствора свободной ДНК и вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с AgNO_3 на длине волны 260 нм от температуры.

Концентрация AgNO_3	0	$1,5 \cdot 10^{-6}$ М	$3 \cdot 10^{-6}$ М	$6 \cdot 10^{-6}$ М
До нагревания	259 нм	259 нм	259 нм	260 нм
	0,217	0,210	0,217	0,220
При 90°C	260 нм	260 нм	260 нм	260 нм
	0,287	0,276	0,281	0,277
После охлаждения	260 нм	260 нм	260 нм	260 нм
	0,276	0,259	0,256	0,242
D_{90}/D_{30} до	1,32	1,31	1,30	1,26
D_{30} после/ D_{90}	0,96	0,94	0,90	0,87

Таблица 3.3.5 Длина волны, величина поглощения на максимуме и отношения величин поглощения на максимуме вычисленных спектров ДНК в растворах с AgNO_3 различной концентрации.

3.3.6 Температурно-индуцированные спектральные изменения растворов ДНК с Ag-Phen

В данном разделе представлены данные по плавлению ДНК в растворе с концентрацией 0,001% = $1,5 \cdot 10^{-5}$ М bp с Ag-Phen в 0,005 NaNO₃. Концентрация Ag-Phen в растворах равна соответственно $1,5 \cdot 10^{-6}$ М (1); $3 \cdot 10^{-6}$ М (2); $6 \cdot 10^{-6}$ М (3) (этим значениям соответствуют соотношения ионов серебра к парам оснований $r = 0,1; 0,2; 0,4$; аналогичные соотношения ионов серебра к парам оснований в разделе 3.3.5). Так как одна молекула Ag-Phen содержит две молекулы фенантролина, данные концентрации соответствуют концентрациям фенантролина в разделе 3.3.4. Температурный диапазон и время нагревания и охлаждения раствора аналогичны описанным в разделе 3.3.1.

На рисунках 3.3.6.1 – 3.3.6.3 представлены вычисленные спектры поглощения ДНК в растворах с Ag-Phen разных концентраций, а на рисунке 3.3.6.4 приведены вычисленные кривые плавления ДНК в данных растворах. Как видно из приведенных спектров, увеличение концентрации Ag-Phen увеличивает вычисленное поглощение ДНК (Таблица 3.3.6). Этот эффект более выражен, чем в растворах с соответствующей концентрацией свободного фенантролина. Это может быть объяснено увеличением поглощения Ag-Phen при взаимодействии с ДНК, например, в результате выхода одного из фенантролиновых лигандов в раствор при связывании иона серебра с ДНК. Наблюдаемое в растворах с фенантролином увеличение относительной величины гиперхромизма при нагревании с ростом концентрации в данных растворах не обнаружено. При охлаждении растворы с большей концентрацией Ag-Phen показывают более выраженное падение величины поглощения. Это свойство Ag-Phen очень похоже на свойство AgNO₃. Аналогия становится еще более заметной, если обратиться к вычисленным кривым плавления ДНК в растворах с Ag-Phen и их первым производным (Рис. 3.3.6.4-5). Можно заметить, что взаимодействие Ag-Phen с ДНК увеличивает температуру плавления макромолекулы сходным с AgNO₃ образом.

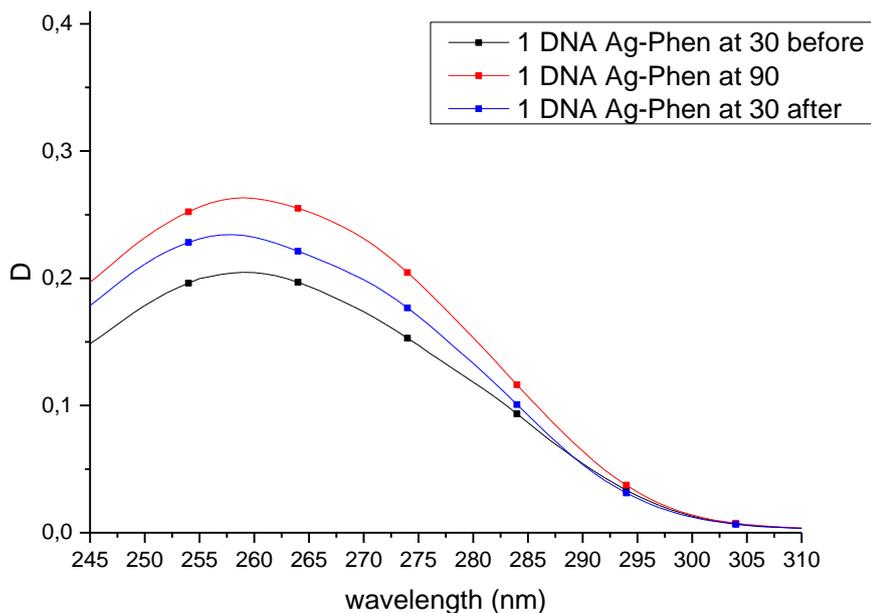


Рис. 3.3.6.1 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Ag-Phen 1 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phen}) = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

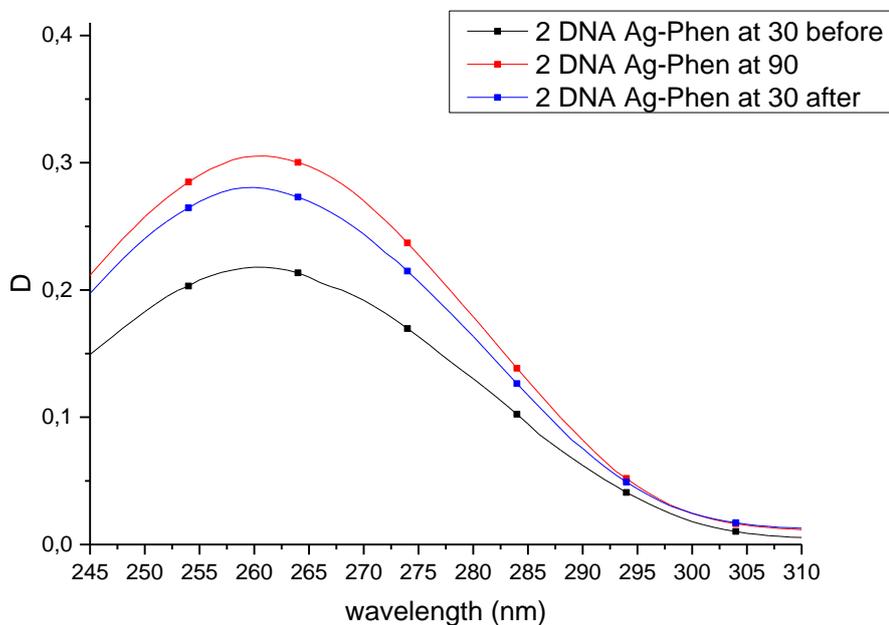


Рис. 3.3.6.2 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Ag-Phen 2 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phen}) = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

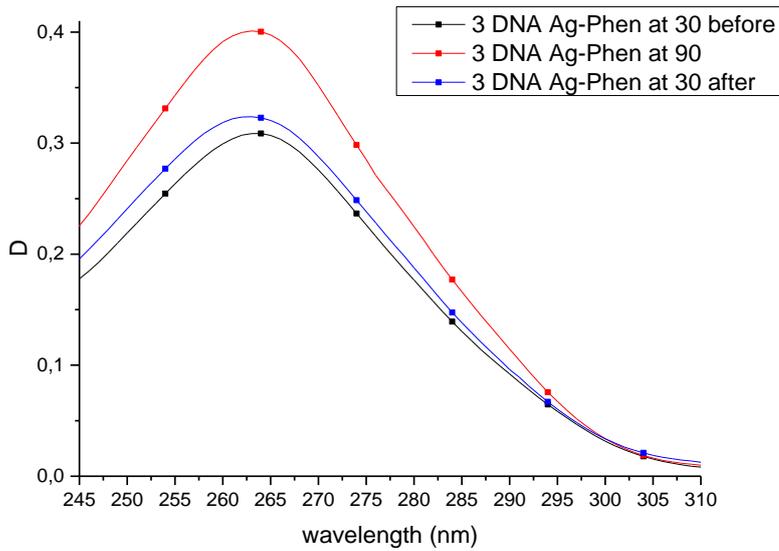


Рис. 3.3.6.3 Вычисленные спектры поглощения ДНК в растворе ДНК с Ag-Phen 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в $0,005 \text{ M NaNO}_3$ при разных температурах.

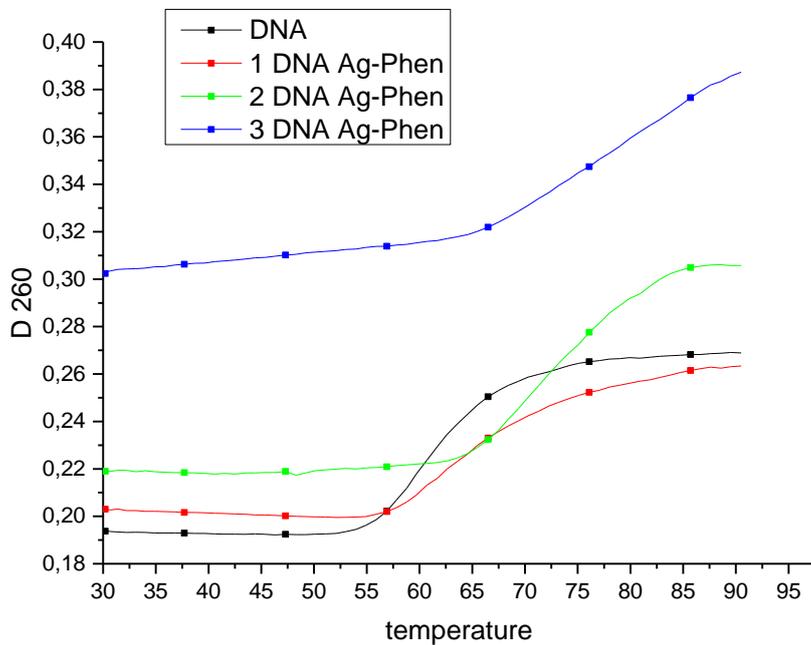


Рис. 3.3.6.4 Зависимость поглощения раствора свободной ДНК и вычисленные зависимости поглощения ДНК в растворах с Ag-Phen на длине волны 260 нм от температуры.

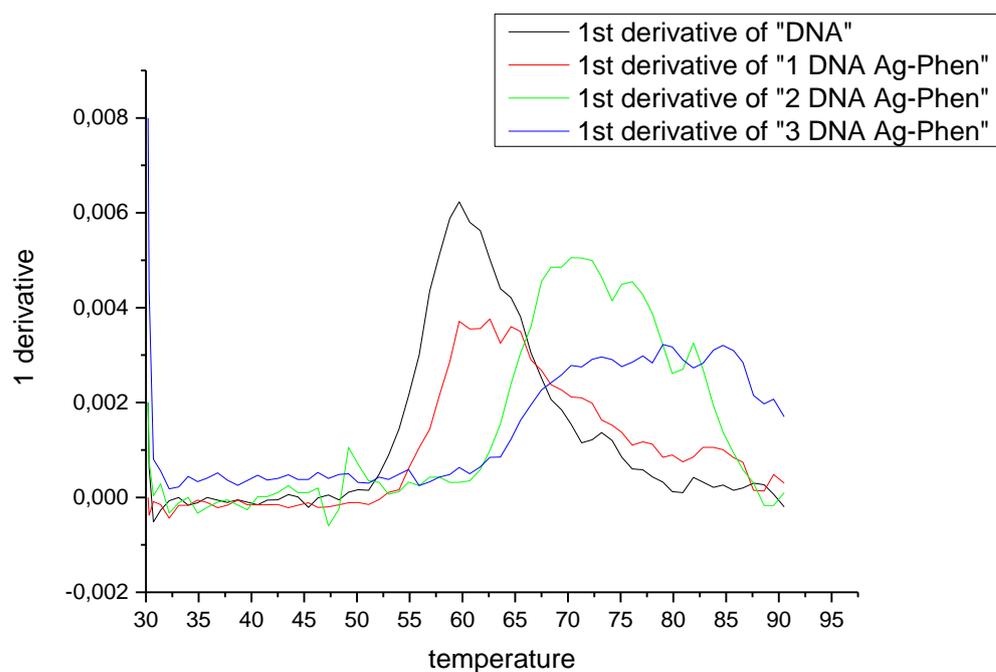


Рис. 3.3.6.5 Первая производная кривой плавления раствора свободной ДНК и вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с Ag-Phen на длине волны 260 нм от температуры.

Концентрация Ag-Phen	0	$1,5 \cdot 10^{-6}$ М	$3 \cdot 10^{-6}$ М	$6 \cdot 10^{-6}$ М
До нагревания	259 нм	259 нм	260 нм	263 нм
	0,196	0,205	0,218	0,309
При 90°C	259 нм	259 нм	260 нм	263 нм
	0,271	0,263	0,305	0,401
После охлаждения	259 нм	258 нм	260 нм	263 нм
	0,253	0,234	0,281	0,324
D_{90}/D_{30} до	1,38	1,28	1,40	1,30
D_{30} после/ D_{90}	0,93	0,89	0,92	0,81

Таблица 3.3.6 Длина волны, величина поглощения на максимуме и отношения величин поглощения на максимуме вычисленных спектров ДНК в растворах с Ag-Phen различной концентрации.

3.3.7 Сравнение температурно-индуцированных спектральных изменений растворов ДНК с различными соединениями

Таким образом, в растворах с Ag-Phen макромолекула ДНК оказалась более устойчива к температурным воздействиям, чем в свободном состоянии. Это выразилось в смещении температуры плавления в область больших температур и в усилении ренатурации после охлаждения. Данные два эффекта аналогичны наблюдаемым при взаимодействии ДНК с ионами серебра и их выраженность так же зависит от концентрации (Таблица 3.3.7.1). Это может означать связывание ионов серебра с ДНК в растворе с Ag-Phen. В то же время, при взаимодействии с Ag-Phen наблюдается рост вычисленного поглощения ДНК, аналогичный системам с Phen. Этот эффект не был обнаружен в системах с ионами серебра. Это может означать, что вышедший из соединения фенантролин также взаимодействует с макромолекулой. В то же время, это взаимодействие не сказывается на способности макромолекулы к ренатурации. Это может быть объяснено не полным расхождением цепей ДНК, стабилизированных ионами серебра и соответственно меньшим количеством мест связывания фенантролина, занятие которых препятствует ренатурации. Полученные спектральные данные хорошо согласуются с гипотезой о распадении Ag-Phen в растворах.

Концентрация соединения (для Phen в 2 раза больше)	0	$1,5 \cdot 10^{-6}$ М	$3 \cdot 10^{-6}$ М	$6 \cdot 10^{-6}$ М
Phen	$60 \pm 2^\circ$	$59 \pm 2^\circ$	$59 \pm 2^\circ$	$60 \pm 2^\circ$
AgNO ₃	$60 \pm 2^\circ$	$63 \pm 3^\circ$	$70 \pm 3^\circ$	$80 \pm 5^\circ$
Ag-Phen	$60 \pm 2^\circ$	$63 \pm 3^\circ$	$70 \pm 3^\circ$	$80 \pm 5^\circ$

Таблица 3.3.7.1 Положения максимумов первой производной вычисленных кривых плавления ДНК в растворах с Phen, AgNO₃ и Ag-Phen на длине волны 260 нм от температуры в градусах Цельсия.

Для выяснения изменений в форме полосы поглощения ДНК в растворах с обсуждаемыми соединениями на рисунках 3.3.7.1 – 3.3.7.3 представлены вычисленные нормированные на максимум спектры поглощения ДНК в растворах до нагревания, на 90 градусах и после охлаждения (концентрация соединений в растворах соответствует номеру 3). Как видно из приведенных данных, до плавления система с Ag-Phen имеет более длинноволновый пик чем остальные системы (Таблица 3.3.7.2). Система с AgNO₃ также поглощает больше других систем в этой области. Стоит отметить, что в коротковолновой области спектра все системы кроме содержащей Ag-Phen поглощают практически одинаково и больше, чем содержащая Ag-Phen система. На 90 градусах

содержащая Phен система в длинноволновой области имеет форму спектра, аналогичную системе с Ag-Phен. За счет уширения полосы поглощения свободной ДНК на 90 градусах в длинноволновой области форма спектра свободной ДНК и системы с ионами серебра практически совпали. После охлаждения поглощение системы с Ag-Phен в коротковолновой области выросло, и форма спектра приняла вид формы спектра системы с Phен. В длинноволновой области поглощение системы с Ag-Phен превышает поглощения системы с Phен в области, где сильно поглощает система с ионами серебра. Полученные данные хорошо согласуются с обсуждаемой выше гипотезой об одновременном взаимодействии с ДНК в растворах с Ag-Phен как ионов серебра, так и фенантролина. Причем, при нагревании не связавшийся Ag-Phен распадается, и образующийся в результате фенантролин также вступает во взаимодействия с макромолекулой ДНК.

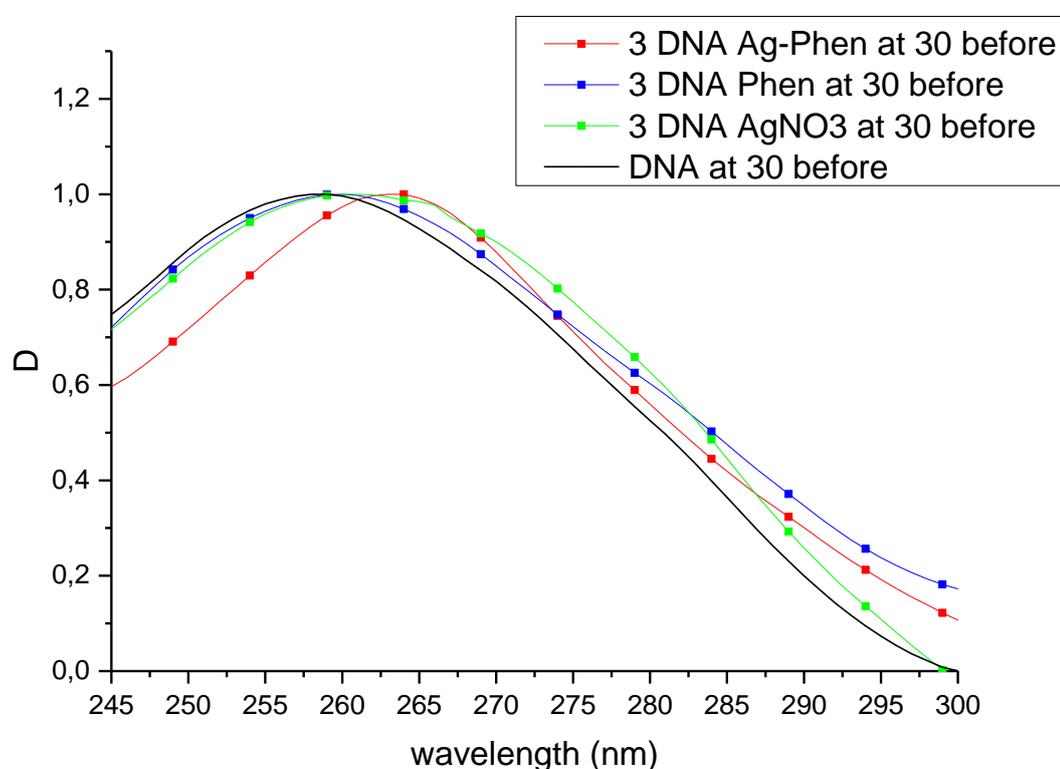


Рис. 3.3.7.1 Вычисленные нормированные на максимум спектры поглощения ДНК в растворах ДНК с Ag-Phен 3, AgNO₃ 3 и Phен 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phен}) = C(\text{AgNO}_3) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $C(\text{Phен}) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в 0,005 M NaNO₃ до нагревания.

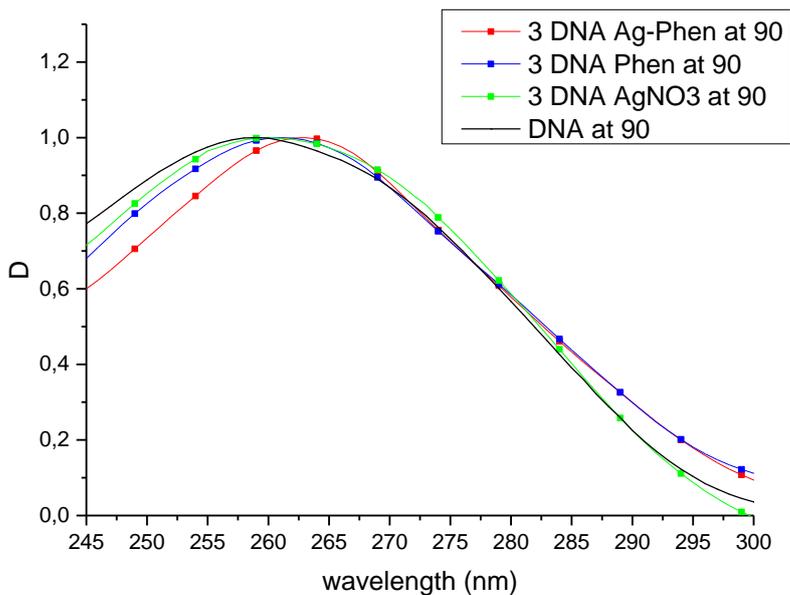


Рис. 3.3.7.2 Вычисленные нормированные на максимум спектры поглощения ДНК в растворах ДНК с Ag-Phen 3, AgNO₃ 3 и Phen 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phen}) = C(\text{AgNO}_3) = 6 \cdot 10^{-6}$ М, $C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,005 М NaNO₃ при 90 градусах Цельсия.

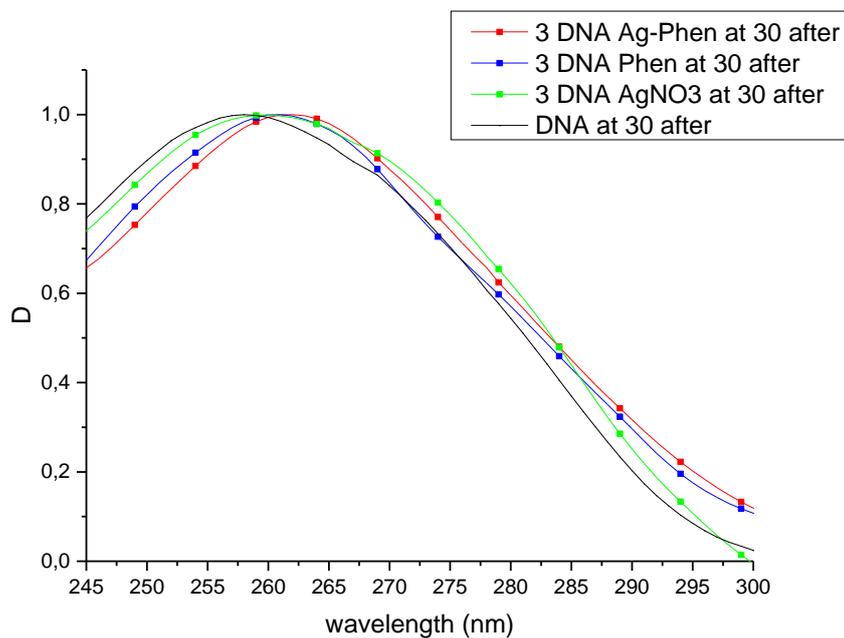


Рис. 3.3.7.3 Вычисленные нормированные на максимум спектры поглощения ДНК в растворах ДНК с Ag-Phen 3, AgNO₃ 3 и Phen 3 ($C(\text{ДНК}) = 0,001\%$, $C(\text{Ag-Phen}) = C(\text{AgNO}_3) = 6 \cdot 10^{-6}$ М, $C(\text{Phen}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,005 М NaNO₃ после охлаждения.

Температура	30° до	90°	30° после
-	259 нм	259 нм	258 нм
Phen	260 нм	261 нм	261 нм
AgNO ₃	260 нм	260 нм	260 нм
Ag-Phen	263 нм	263 нм	262 нм

Таблица 3.3.7.2 Положения максимумов вычисленных полос поглощения ДНК в растворах с обсуждаемыми соединениями в концентрациях, отвечающих номеру 3.

3.4 Самоорганизующиеся в растворе структуры

Было замечено, что в растворах с высокими концентрациями ДНК и исследуемого соединения Ag-Phen самопроизвольно образуются нитевидные структуры, которые выпадают из раствора. Итоговые концентрации компонентов в таких растворах: $C(\text{ДНК}) = 0,0045\% = 7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ bp, $C(\text{Ag-Phen}) = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $0,005 \text{ М NaNO}_3$. Таким образом, на одну пару оснований приходится 6 молекул Ag-Phen. Порядок приготовления данной системы (в дальнейшем именуемой стандартной):

1 DNA (0,02%) + 2 NaNO₃ (5 mM) + 1 Ag-Phen ($2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$)

В результате связывания макромолекул с Ag-Phen в растворе образуется белая гелеобразная взвесь (Рис.3.4.1). Спустя сутки в раствор добавляли $0,4 \text{ NaBH}_4$ ($5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) (тем самым итоговая концентрация $C(\text{NaBH}_4) = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$). После добавления восстановителя данная взвесь приобретает характерный желтый цвет, аналогичный цвету раствора серебряных наночастиц сферической формы, и выпадает в осадок. С течением времени данные структуры темнеют вплоть до черного цвета, что может быть объяснено ростом среднего размера наночастиц в их составе. Цвета структур аналогичны цветам растворов, описанным в работе [18] (Рис.3.4.1), при этом окружающий растворитель остается прозрачным и бесцветным.

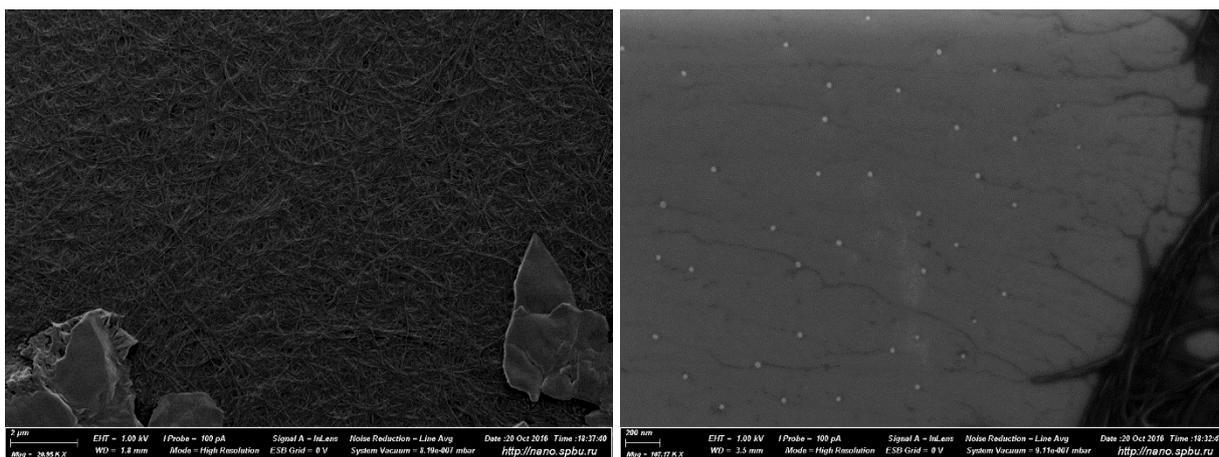
В данном разделе представлены результаты исследования методом СЭМ и АСМ морфологических свойств структур, полученных описанным образом, и структур, образующихся в растворах различных комбинаций компонент описанной системы. Так же изучается влияние различных воздействий на данные структуры. Для исследования, объекты размещены на кремниевых подложках и на слюде.



Рис. 3.4.1 Фотография растворов исследуемых структур без добавления восстановителя, через 5 и 10 минут после добавления боргидрида натрия и фотография из работы [18] растворов наночастиц серебра, слева направо по уменьшению размера.

3.4.1 Морфология структур, образующихся в растворе без восстановителя

Через сутки после приготовления стандартной трехкомпонентной системы без добавления восстановителя (растворы хранили в холодильнике при 5 градусах Цельсия) исследуемые структуры фиксировали на поверхность кремниевых подложек двумя способами: высушиванием 10 микролитров раствора в атмосфере и сбрасыванием 10 микролитров раствора на вращающуюся на спинкоатере подложку (при этом капля раствора не удерживается на поверхности кремния, а сразу слетает с нее под действием центробежного ускорения). В результате этих двух методов фиксации на подложках были сформированы одинаковые образования с незначительными различиями (Рис. 3.4.1.1-2). Как видно из рисунков, исследуемые структуры имеют нитевидную форму. Они сплетены в более крупные образования, но хорошо разрешаются методом СЭМ и АСМ.



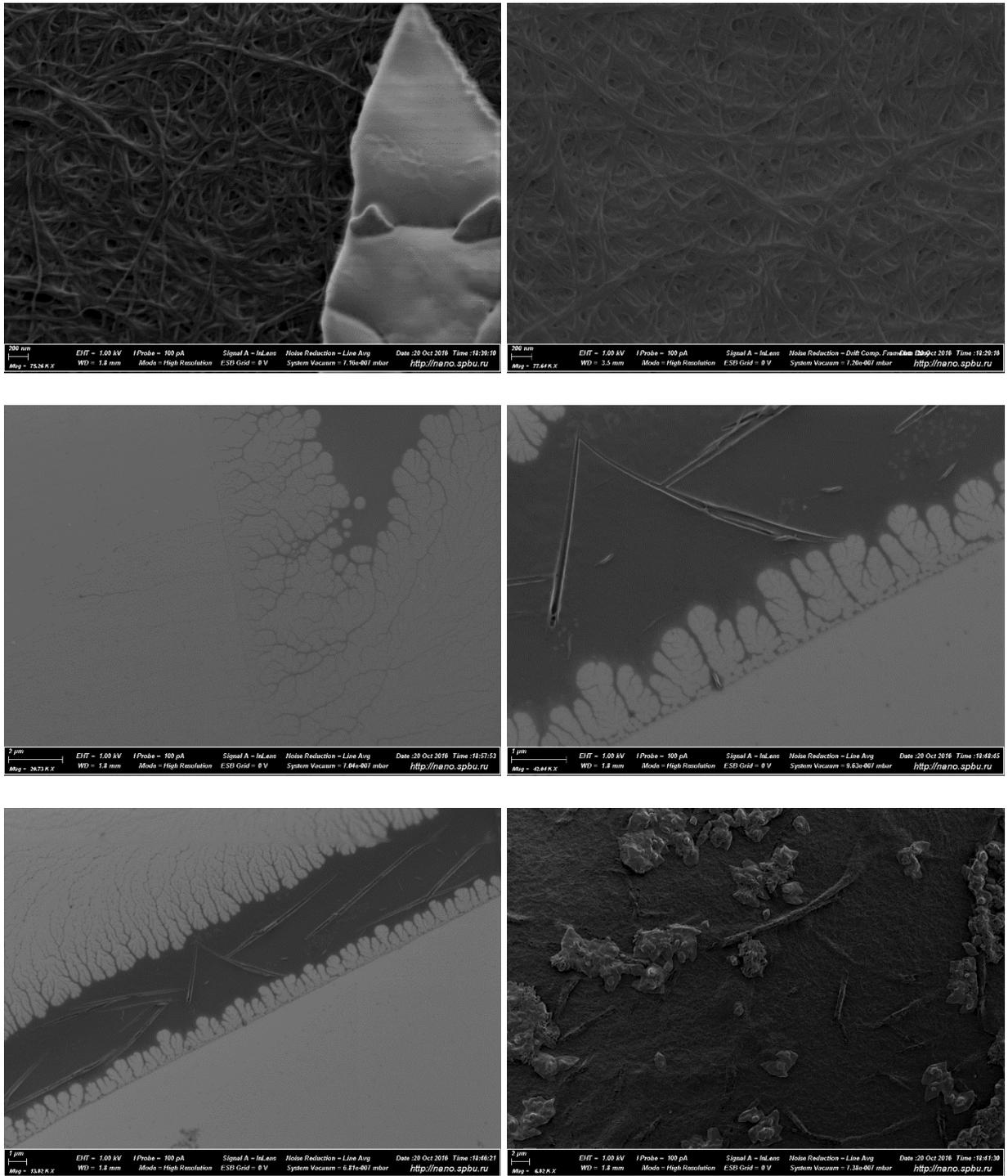
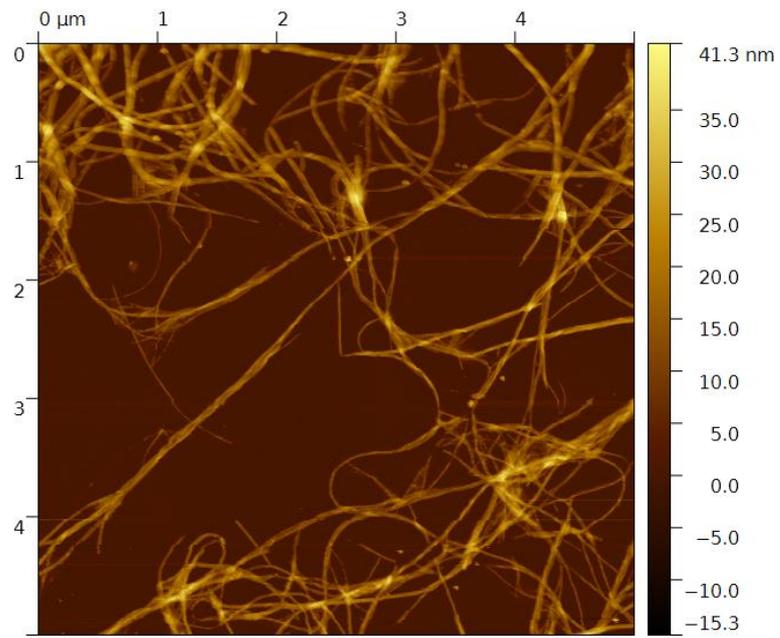
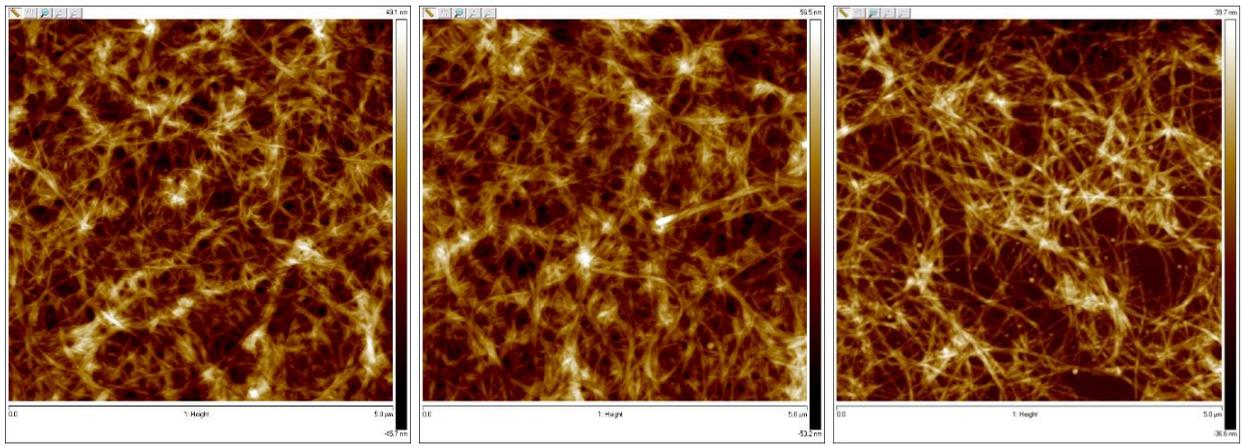
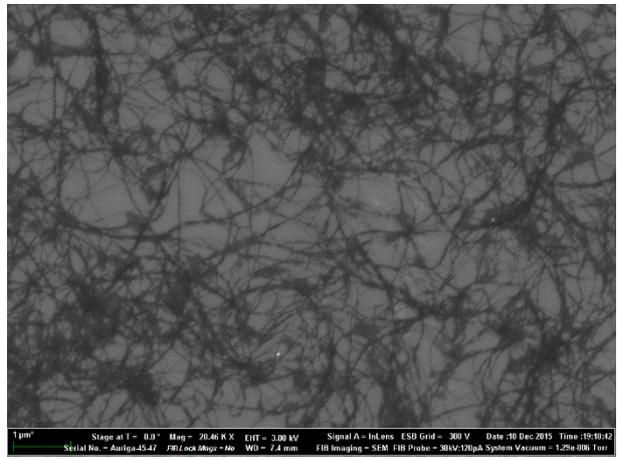
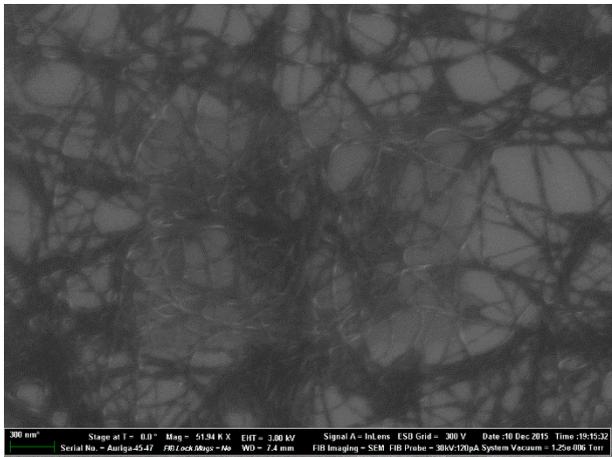
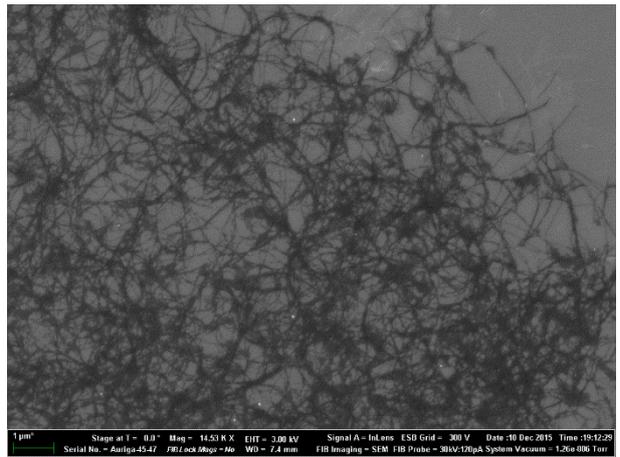
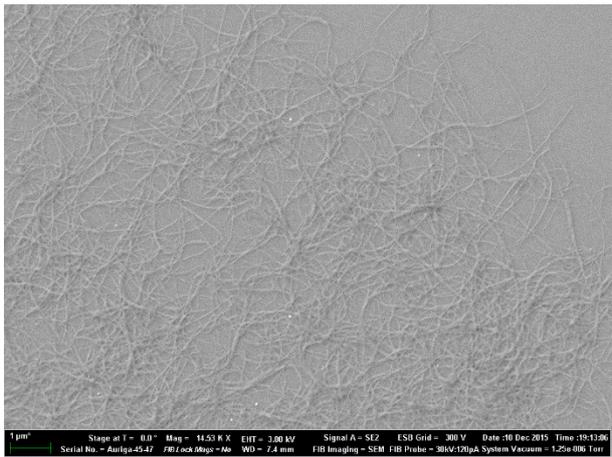
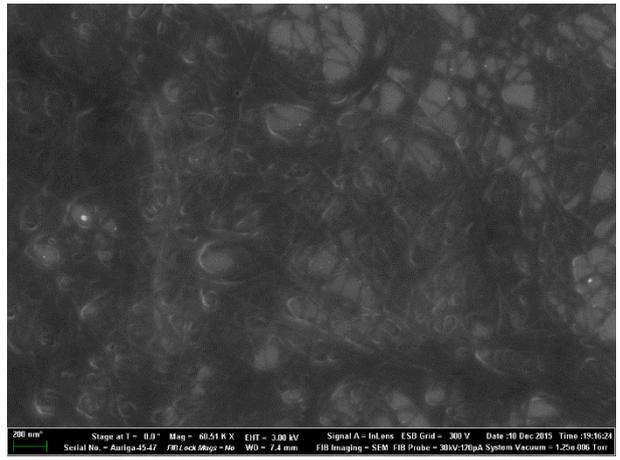
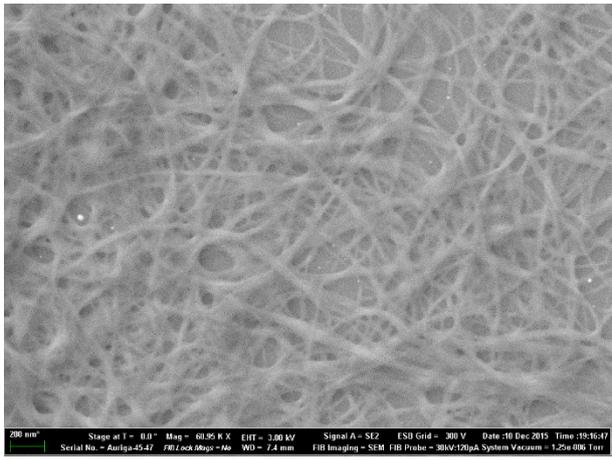


Рис. 3.4.1.1 Стандартная система без восстановления. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.





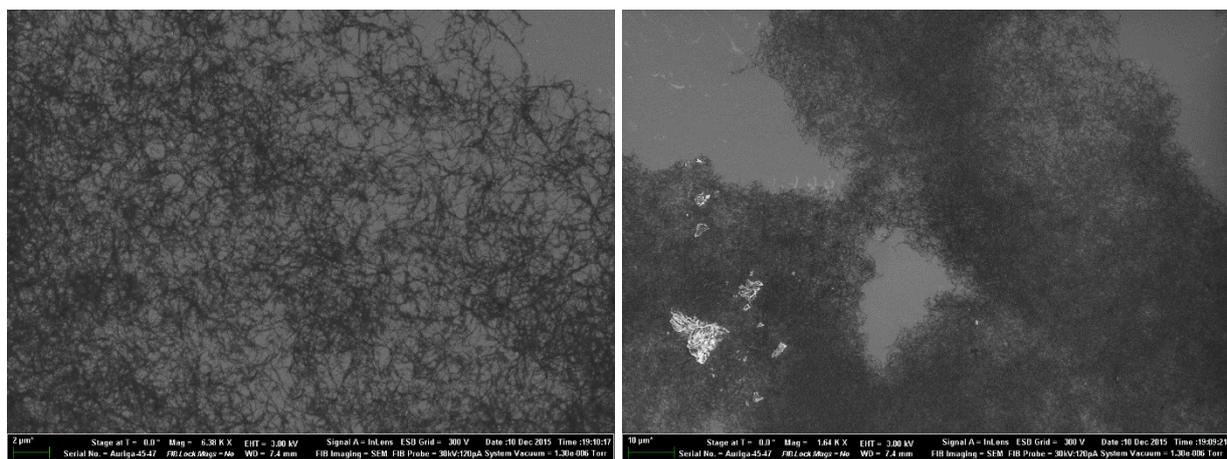
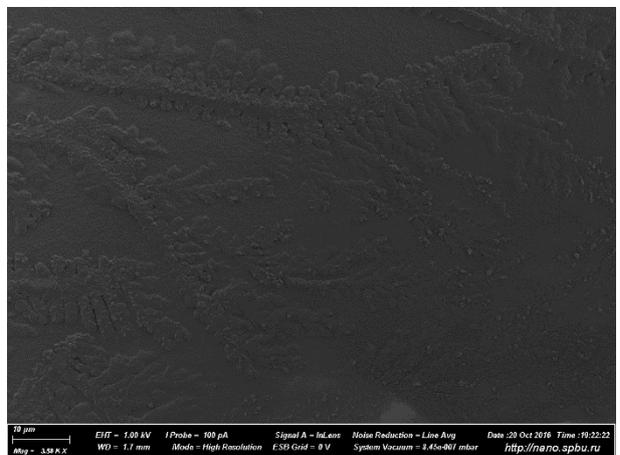
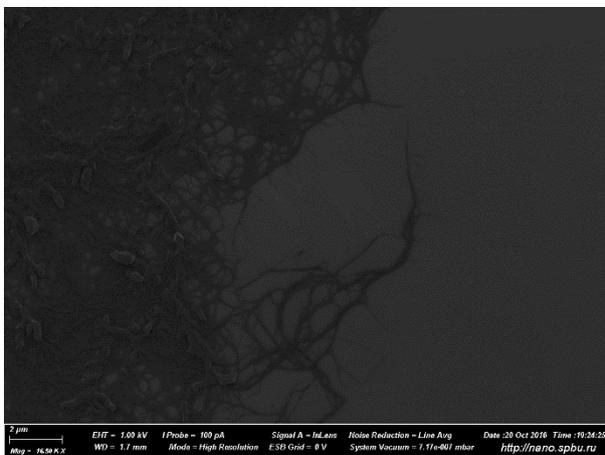
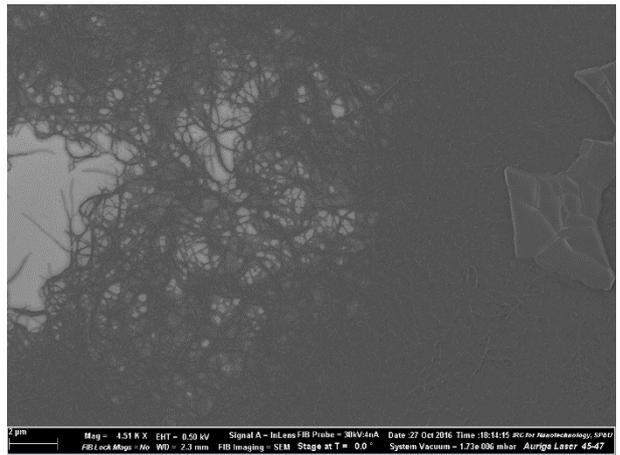
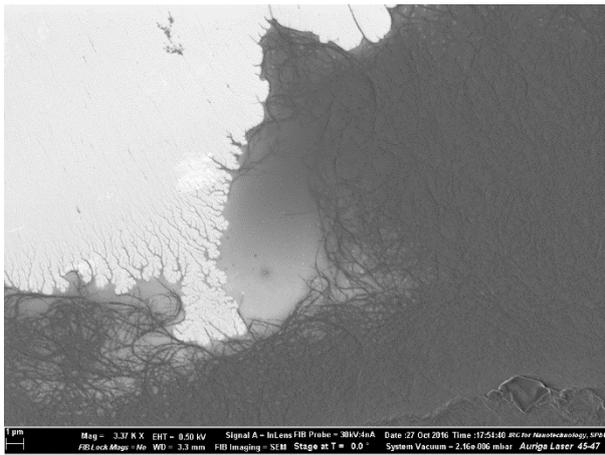
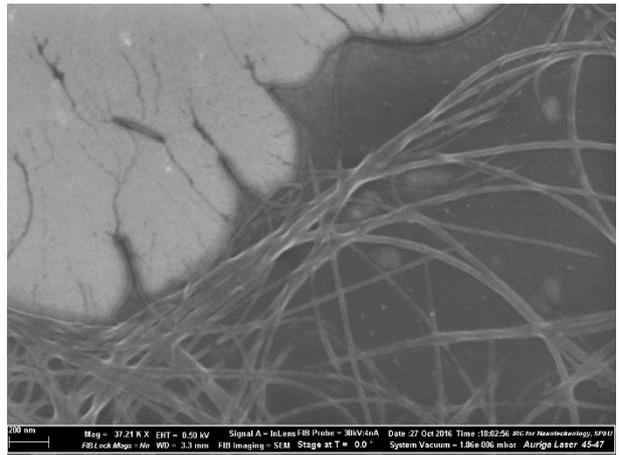
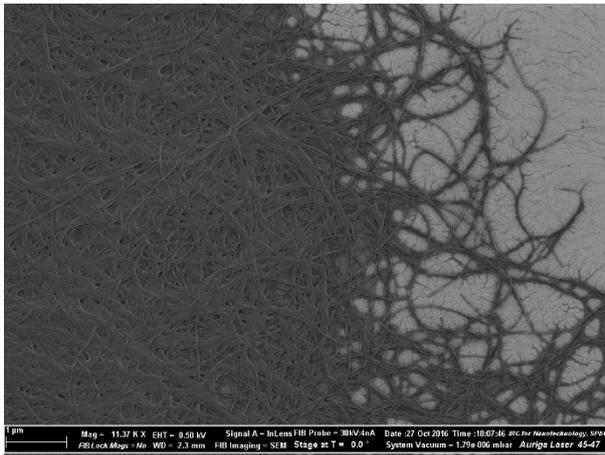


Рис. 3.4.1.2 Стандартная система без восстановления. Снимки АСМ и СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась при помощи спинкоатера.

Необходимо отметить расщепление более крупных фибрилл вблизи края скопления на тонкие ветвящиеся нити на образце, представленном на рисунке 3.4.1.1 (на нем фиксация осуществлялась высушиванием капли раствора). При этом на образце, фиксированном с помощью спинкоатера (Рис. 3.4.1.2), края фибрилл гладкие и не имеют подобных образований. Можно предположить, что описанные особенности структуры возникают в процессе высыхания капли раствора на поверхности кремния, а не в растворе.

В целях выяснения стабильности данных объектов было проведено разбавление исходного раствора в 5 раз с помощью NaNO_3 (5 mM) и высушивание 10 микролитров разбавленного раствора на кремниевой подложке. Как видно из приведенных на рисунке 3.4.1.3 снимков, морфология структур не изменилась в результате разбавления. На границе образца наблюдается схожий эффект, что и для неразбавленной системы (Рис. 3.4.1.1). Как и в неразбавленной системе фиксированной высушиванием, в составе образцов обнаружены крупные однородные гранулы с гладкой поверхностью. Часть этих гранул расположена на поверхности сплетений нитевидных структур, другие находятся внутри и оплетены ими. По сравнению с неразбавленной системой, на образце, полученном в результате пятикратного разбавления, количество гранул заметно больше. Можно предположить, что хорошо разрешаемые в оптический микроскоп ветвящиеся образования представляют собой данные гранулы, частично оплетенные исследуемыми нитевидными структурами. Стоит отметить, что обсуждаемые гранулы разрушаются при многократном воздействии пучком электронов, что продемонстрировано на снимках, полученных при повторном сканировании одного и того же места на поверхности образца (Рис. 3.4.1.4).



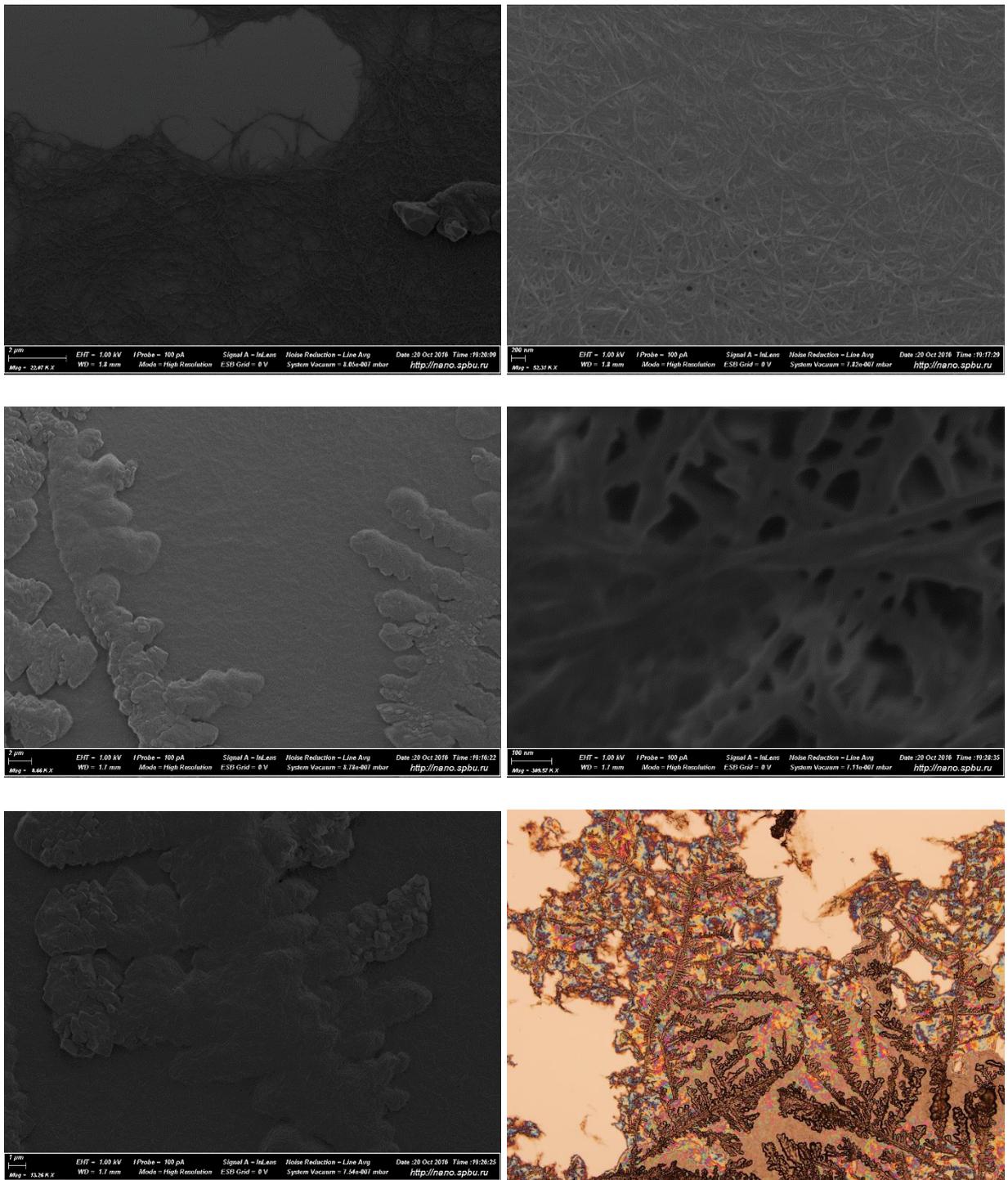


Рис. 3.4.1.3 Стандартная система без восстановления после разбавления в 5 раз. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens и снимок оптического микроскопа с 20 кратным увеличением. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

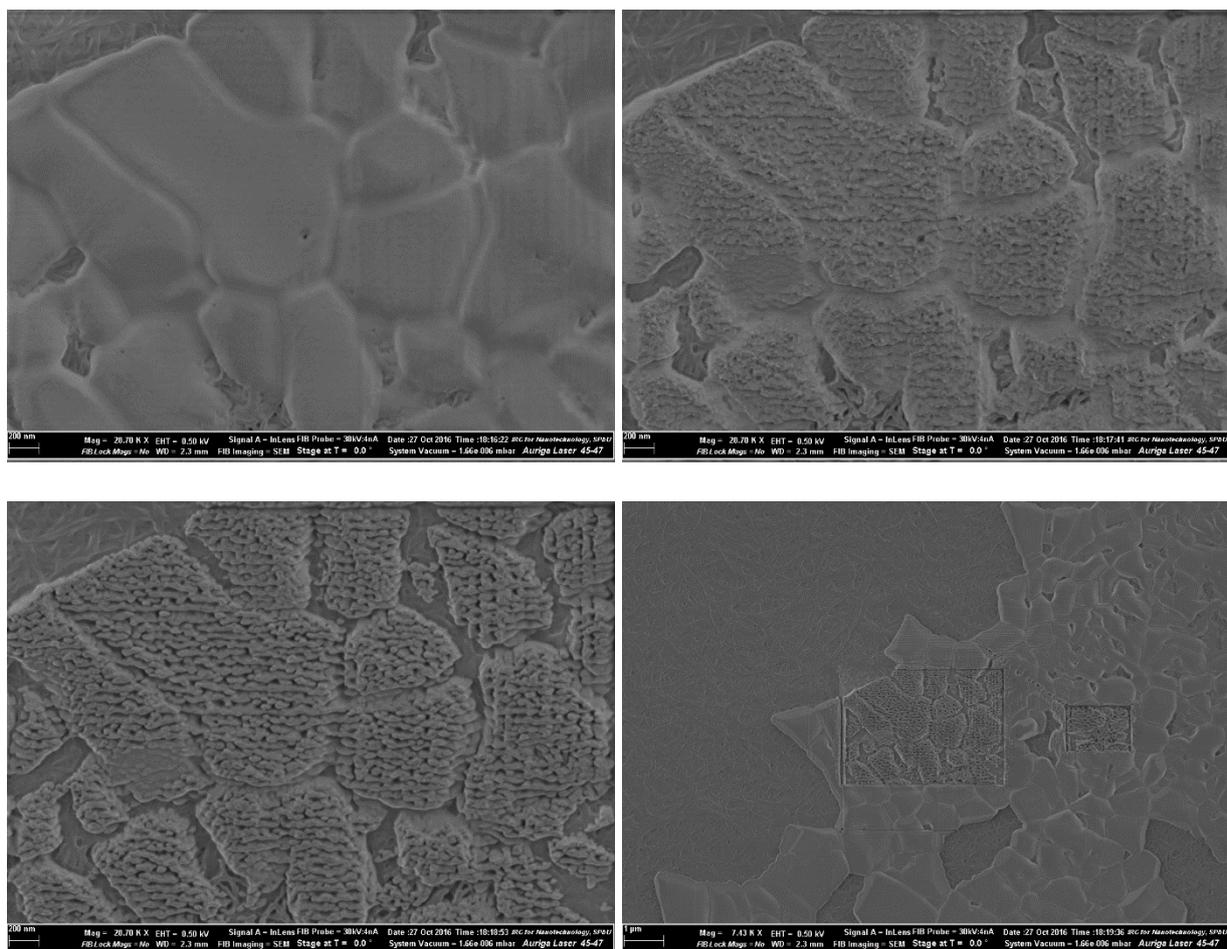
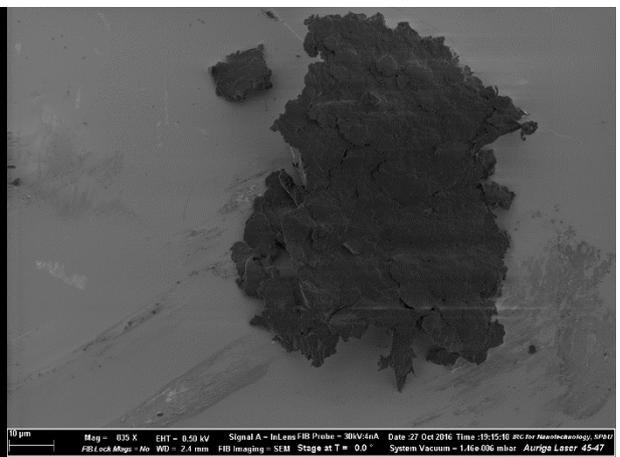
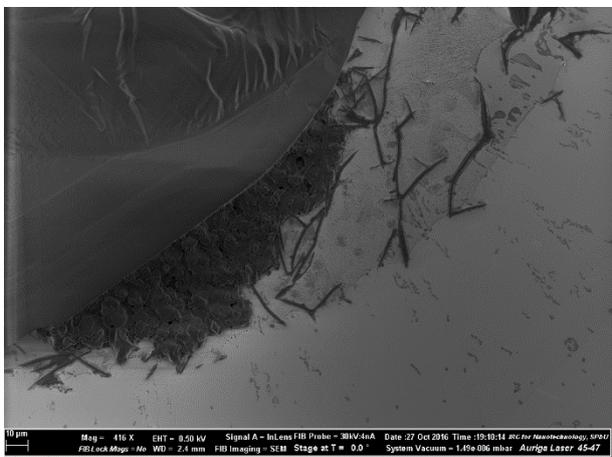
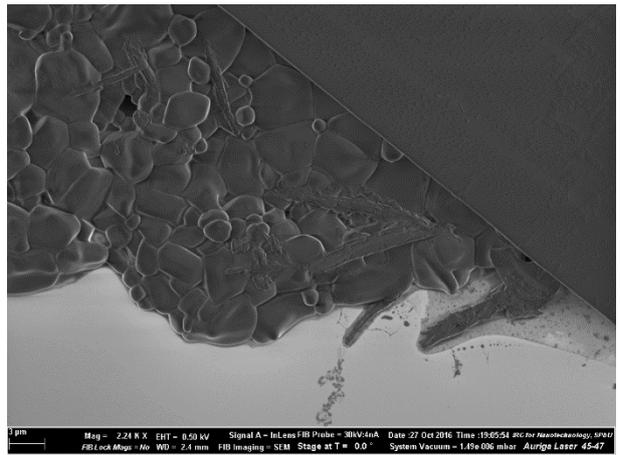
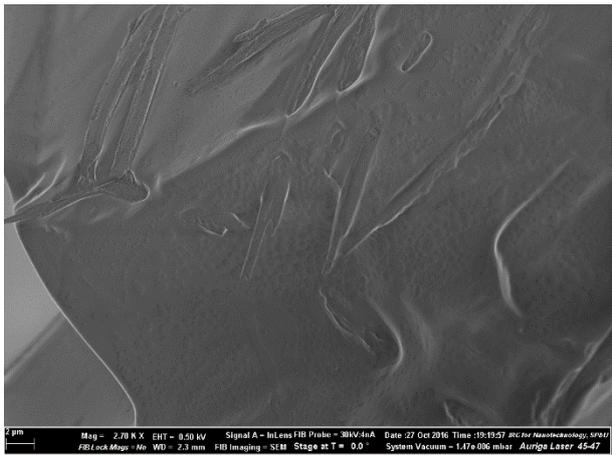
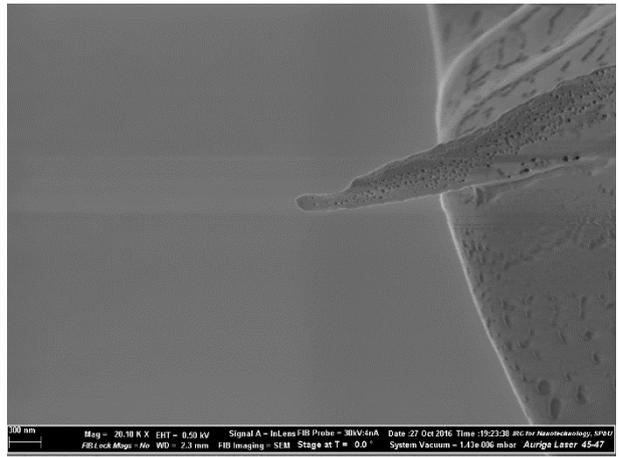
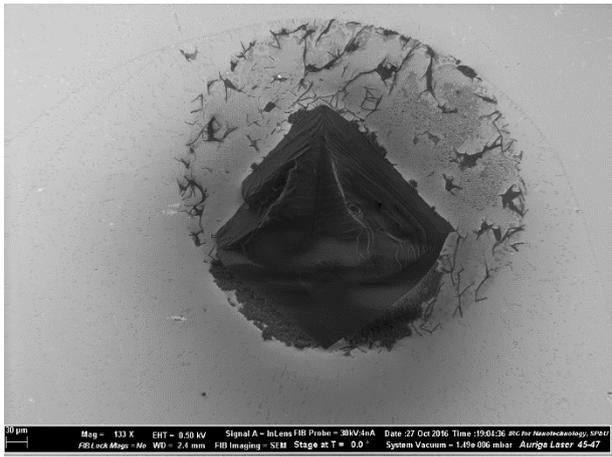


Рис. 3.4.1.4 Стандартная система без восстановления после разбавления в 5 раз. Хорошо заметны области, на которых проводилось повторное сканирование пучком электронов. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens.

При разбавлении данного раствора еще в 5 раз, то есть 25 кратном разбавлении исходного, и последующем высушивании на чипе 10 микролитров этого раствора исследуемые структуры не обнаружены (Рис. 3.4.1.5). Наблюдаемое крупное скопление похоже по свойствам поверхности на гранулы на рисунке 3.4.1.4, но в меньшей степени разрушается под воздействием пучка электронов. На поверхности чипа в нескольких местах обнаружены ветвящиеся тяжи, аналогичные обсуждаемым выше особенностям краев образцов, фиксированных высушиванием.



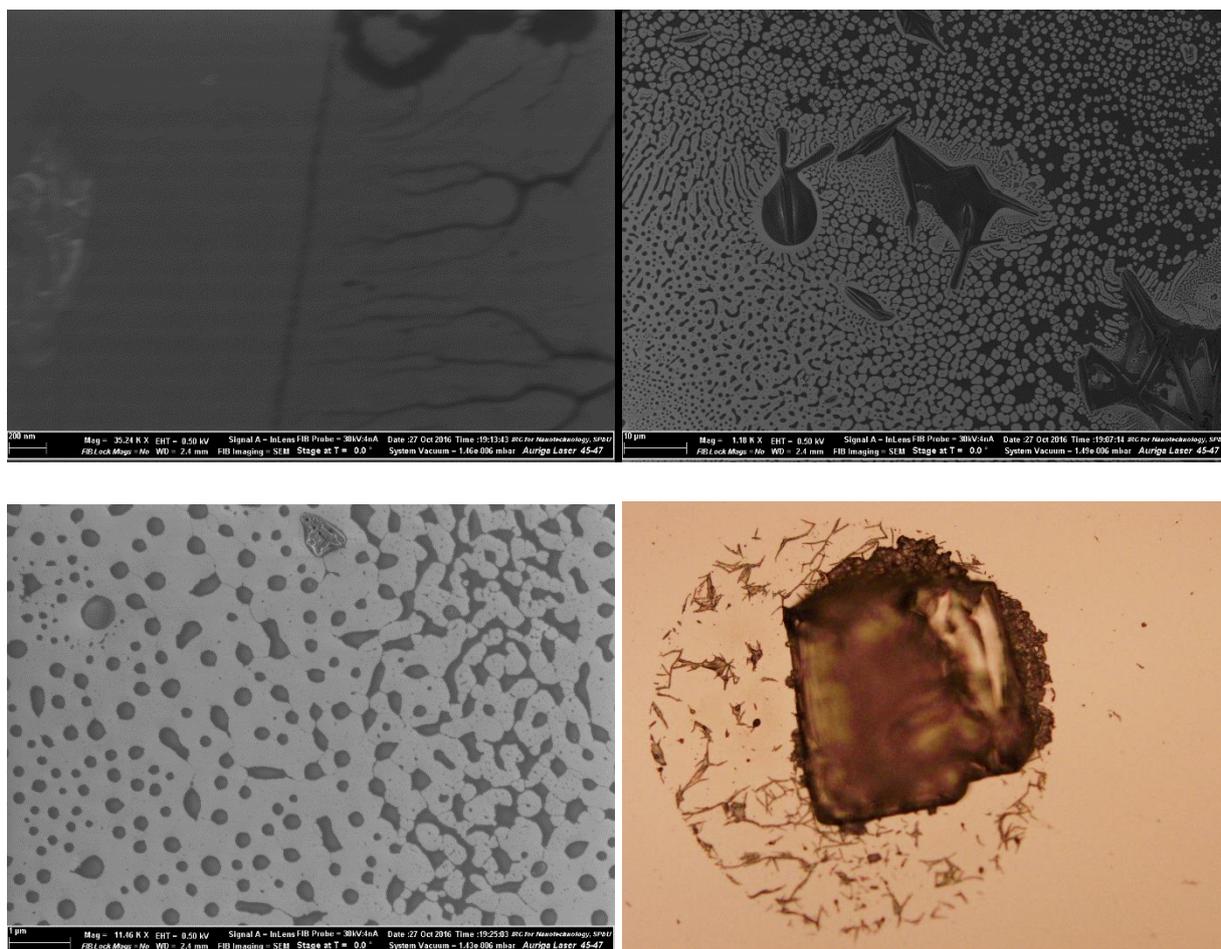
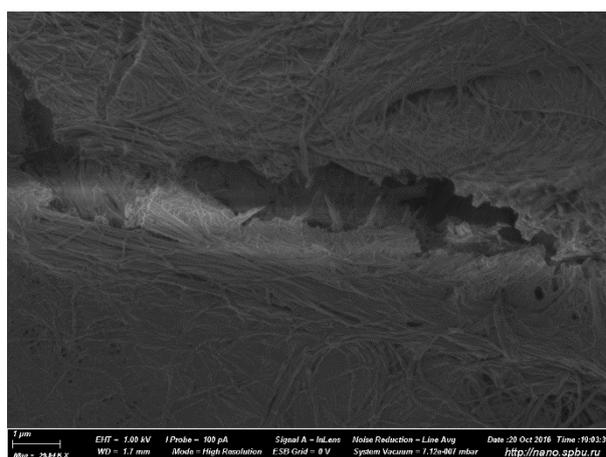
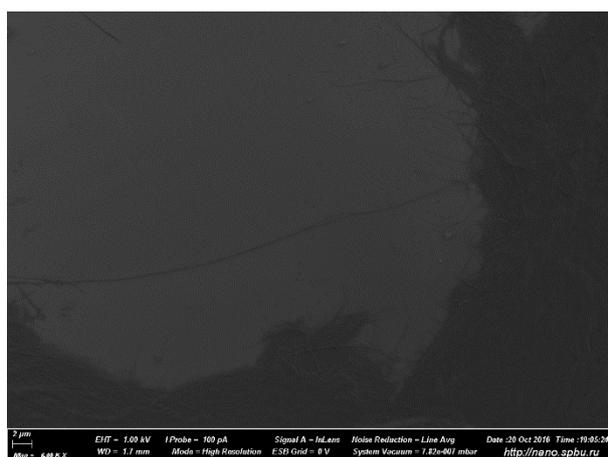
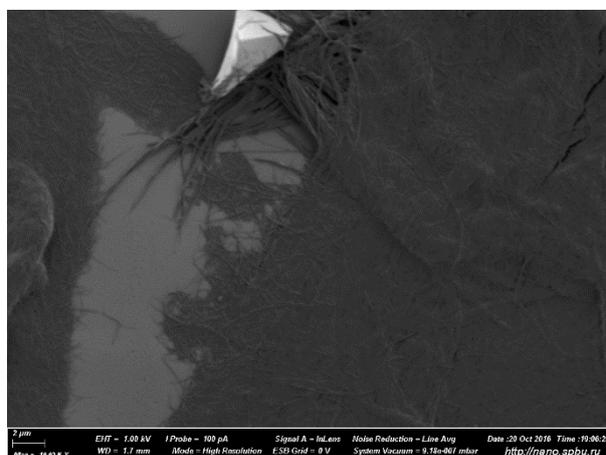
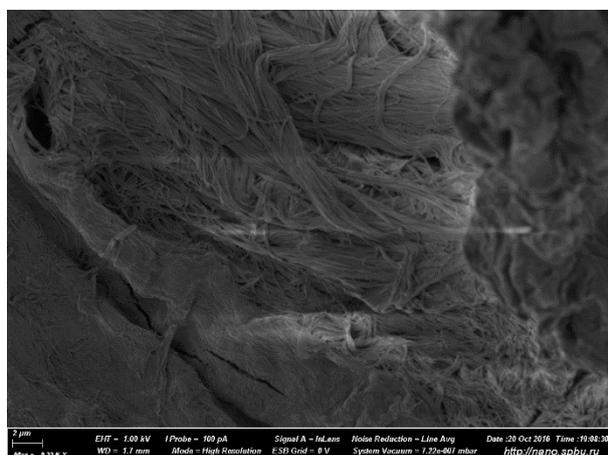
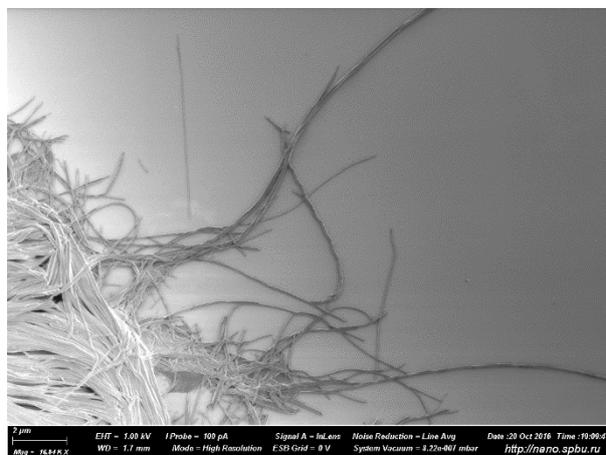
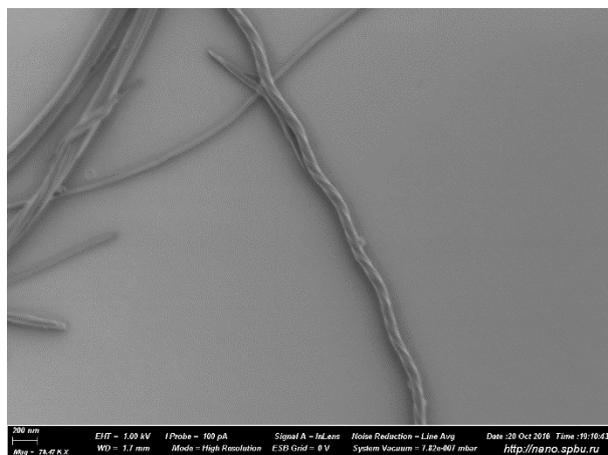


Рис. 3.4.1.5 Стандартная система без восстановления после разбавления в 25 раз. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens и снимок оптического микроскопа с 20 кратным увеличением. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

3.4.2 Морфология структур, образующихся в растворе с восстановителем

Через сутки после приготовления стандартной трехкомпонентной системы (растворы хранили в холодильнике при 5 градусах Цельсия) в раствор был добавлен боргидрид натрия. Спустя час исследуемые структуры фиксировали на поверхности кремниевых подложек двумя способами, описанными в разделе 3.4.1. Необходимо отметить, что в обоих случаях забирали 10 микролитров прозрачного раствора без хорошо различимого невооруженным глазом осадка. В результате на поверхности чипов образовались морфологически схожие с соответствующими системе без восстановителя структуры с некоторыми отличиями (Рис. 3.4.2.1-2). Наиболее заметно отличие морфологии на крае образцов. В восстановленных системах края фибрилл четко организованы и ветвления, наблюдавшиеся в образцах без восстановления, отсутствуют. Структуры после восстановления имеют похожее строение, но примерно в два раза большую толщину, чем до, о чем

можно судить по данным АСМ. Кроме того, на образце, представленном на рисунке 3.4.2.2, хорошо заметны наночастицы серебра, но они не включены в органические нитевидные структуры, а смешаны с ними.



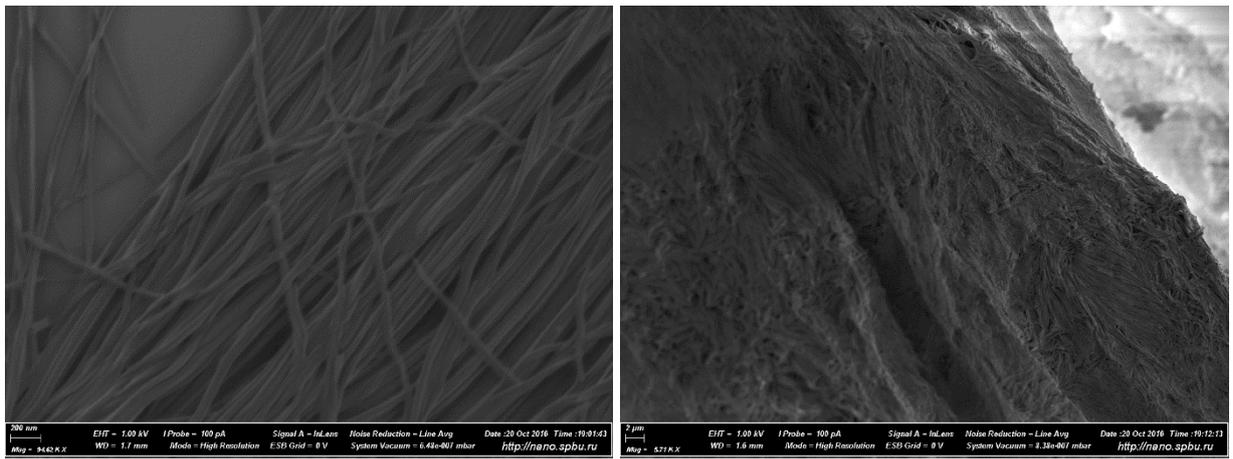
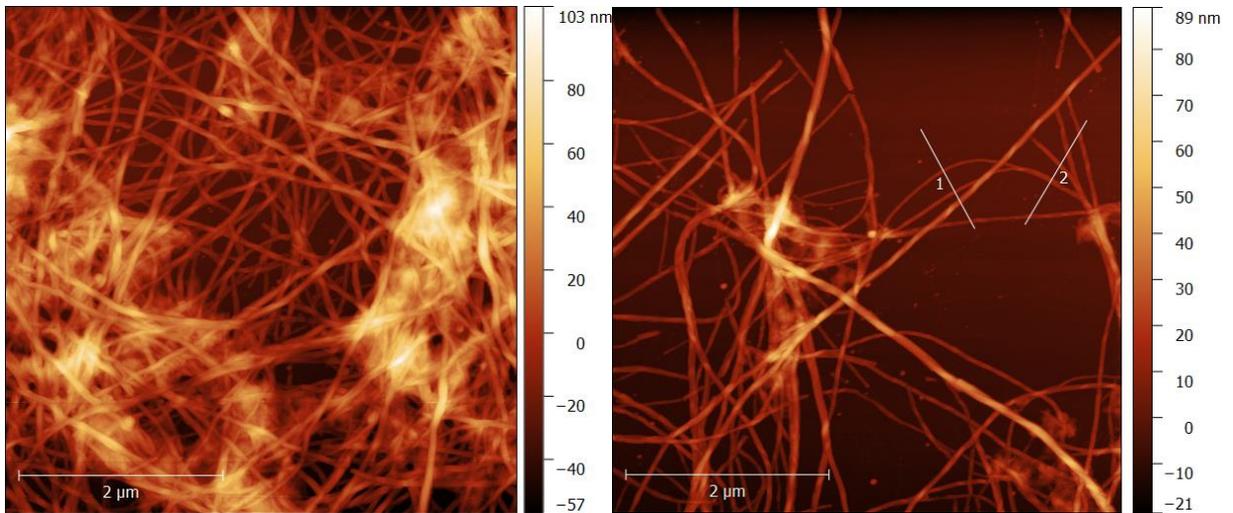
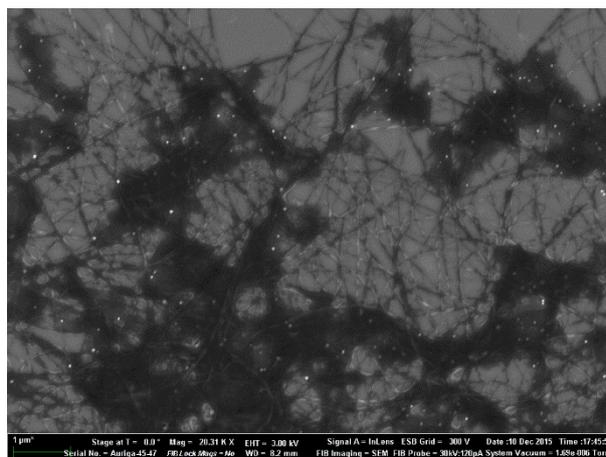
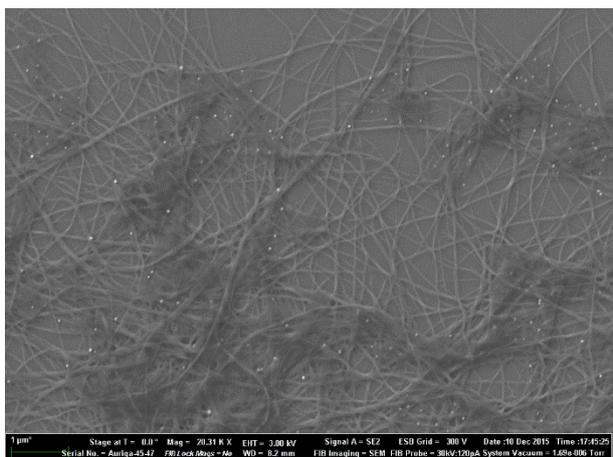
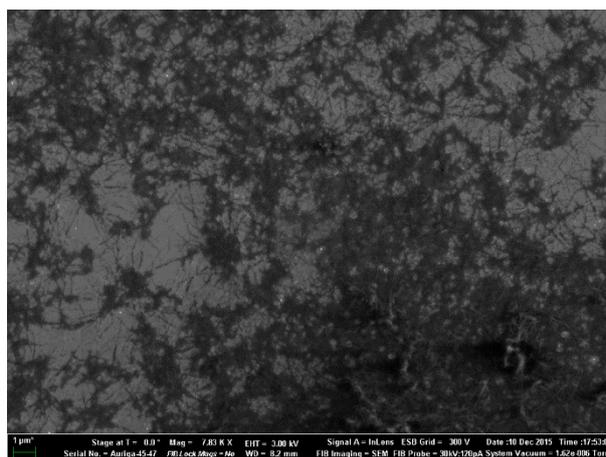
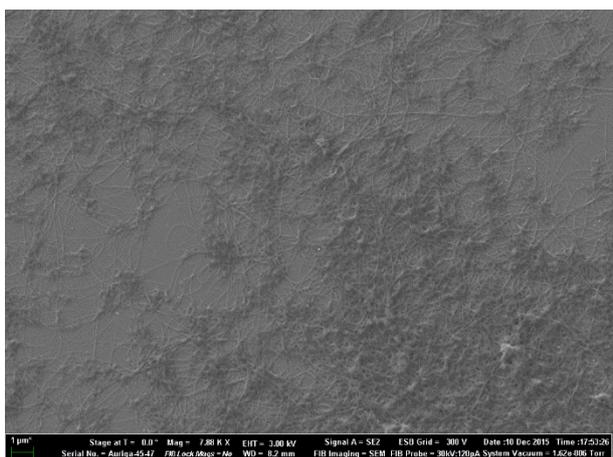
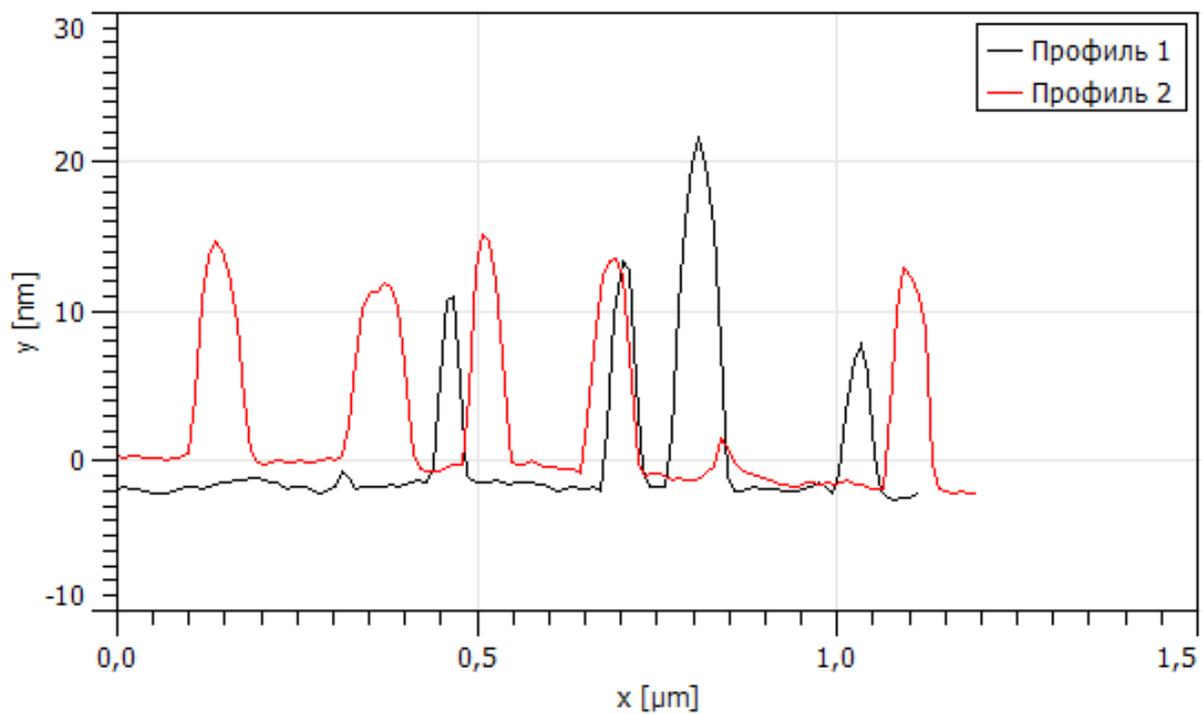
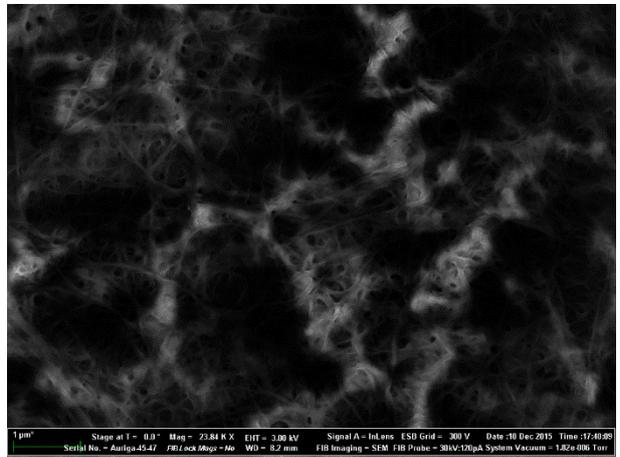
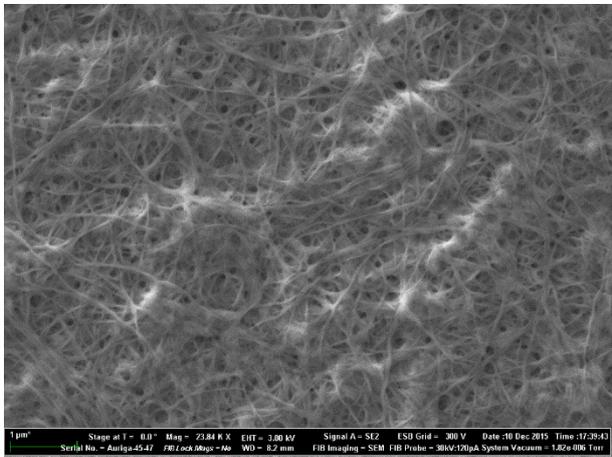
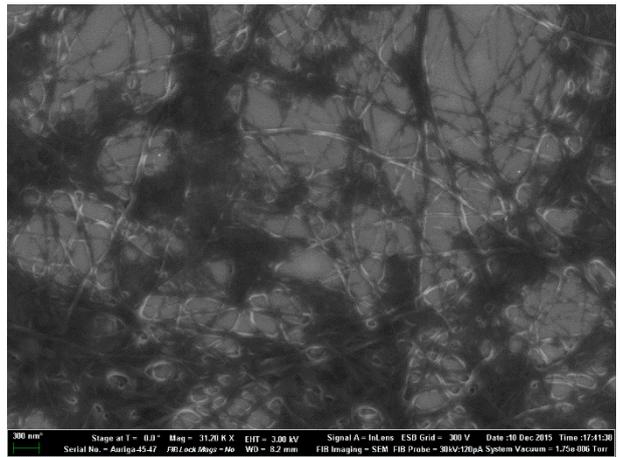
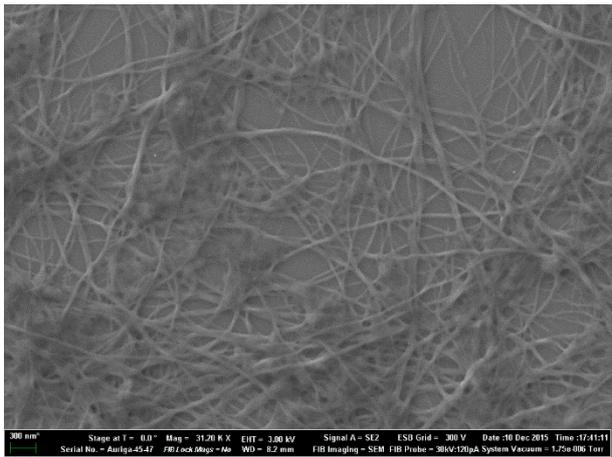
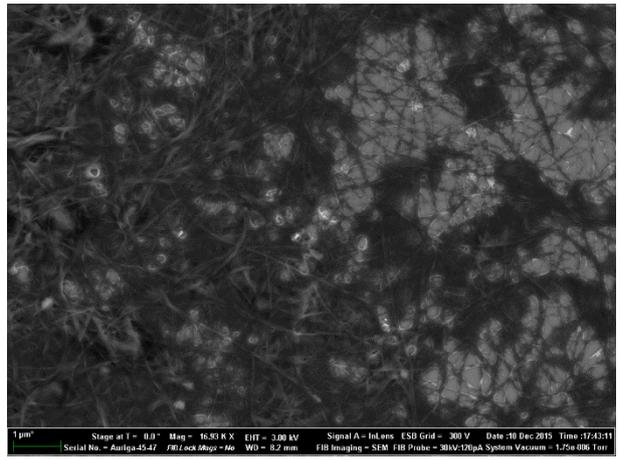
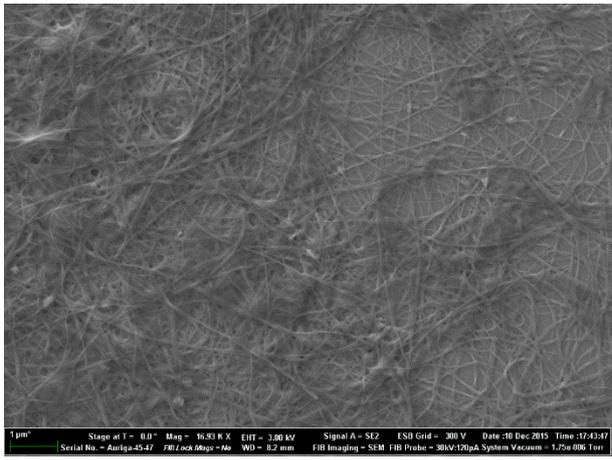
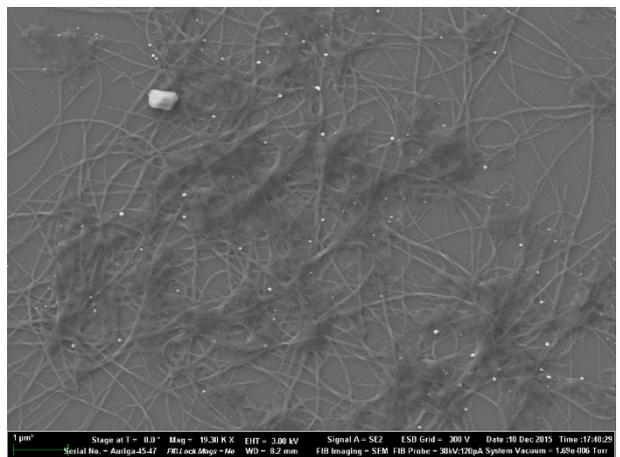
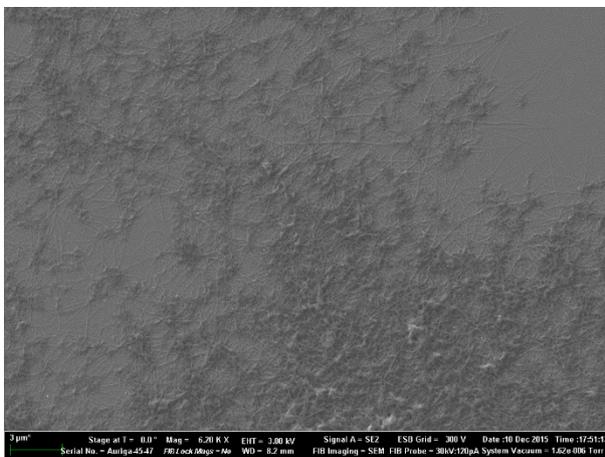
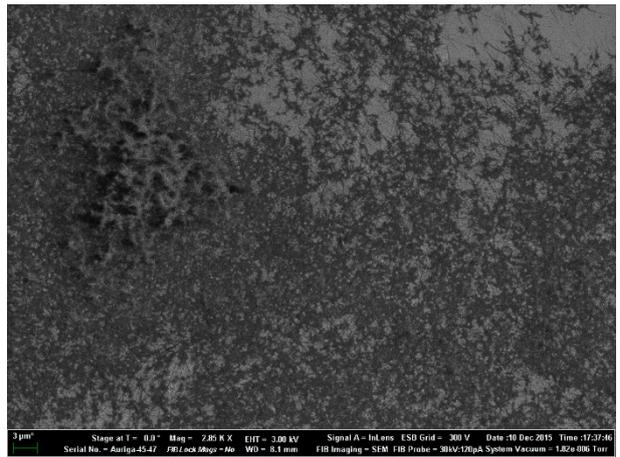
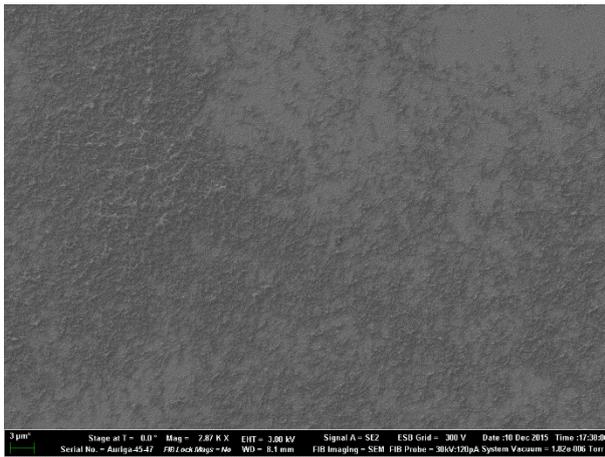
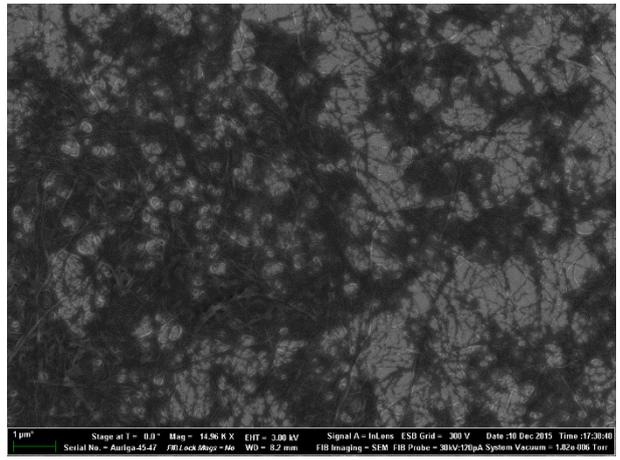
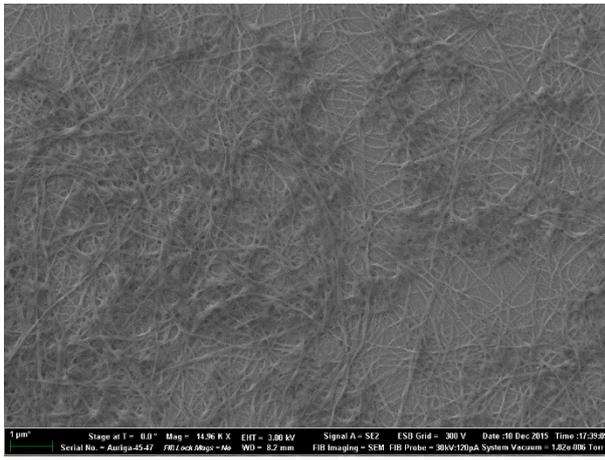


Рис. 3.4.2.1 Стандартная система после восстановления. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.









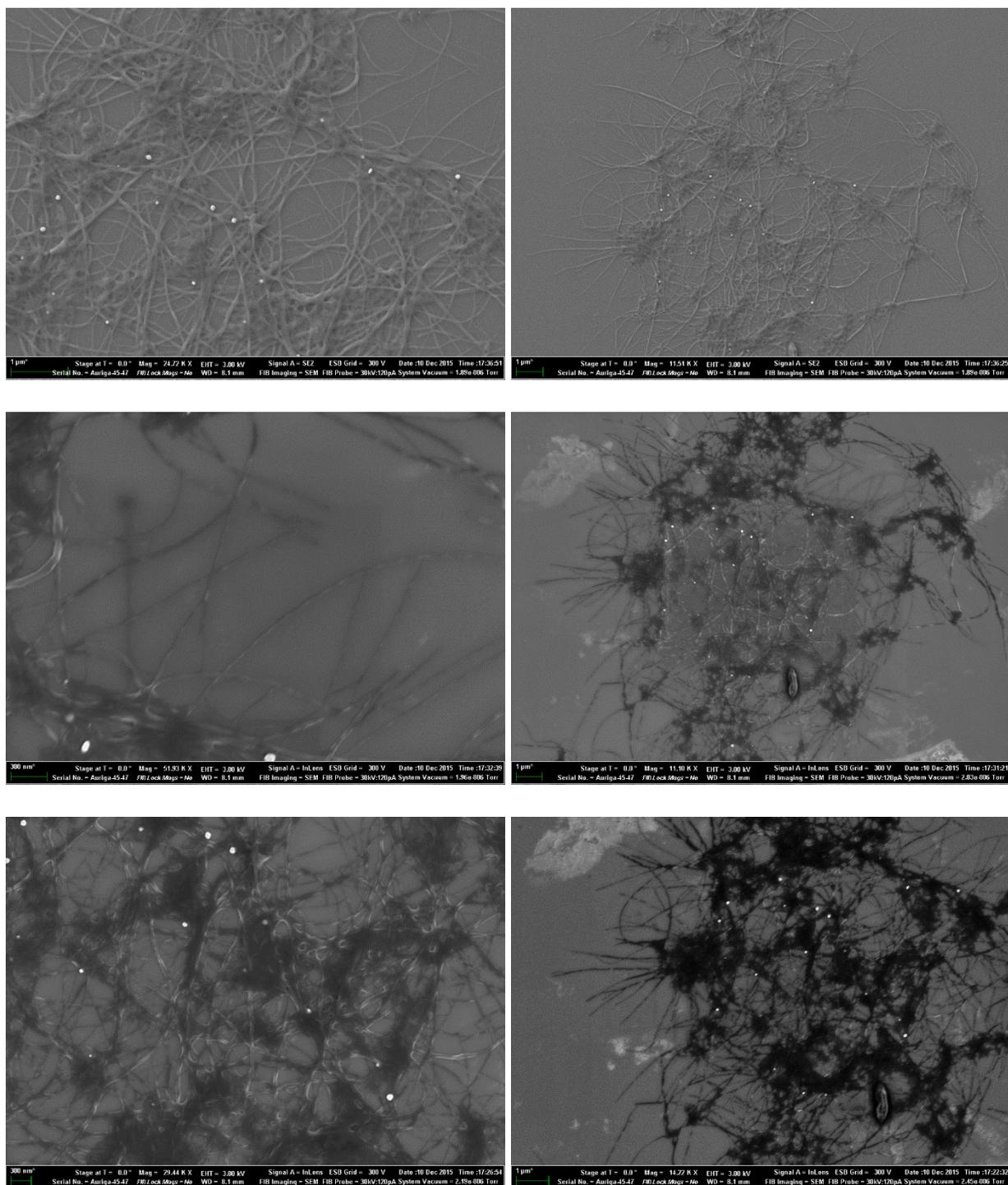


Рис. 3.4.2.2 Стандартная система после восстановления. Снимки АСМ (приведены высотные профили, отвечающие местам на снимках, отмеченным линиями) и СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась при помощи спинкоатера.

Разбавление данного раствора в 5 раз с последующим высушиванием 10 микролитров разбавленного раствора не привело к заметным изменениям морфологии фиксированных на поверхности

структур (Рис. 3.4.2.3). Следует отметить, что на образцах, полученных из растворов с добавлением восстановителя не наблюдаются гранулярные объекты с гладкой поверхностью, обсуждаемые в разделе 3.4.1.

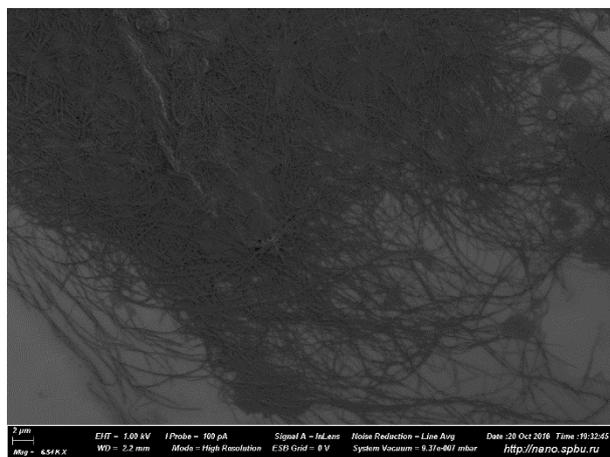
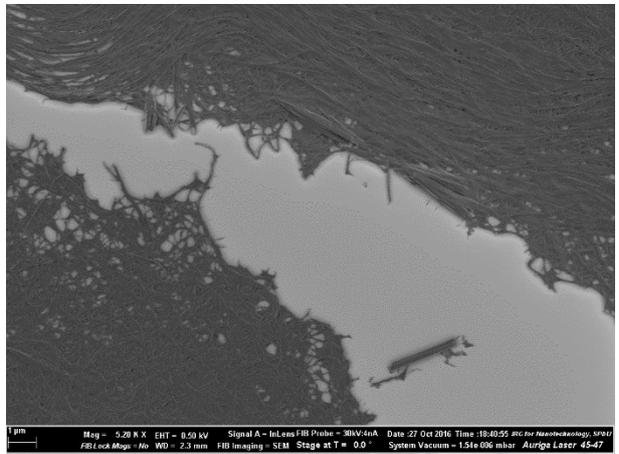
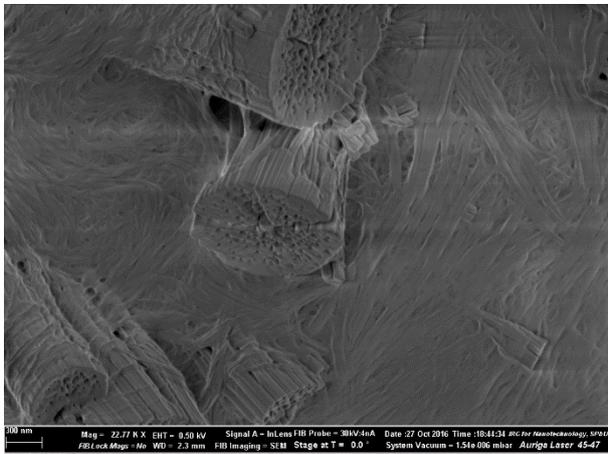
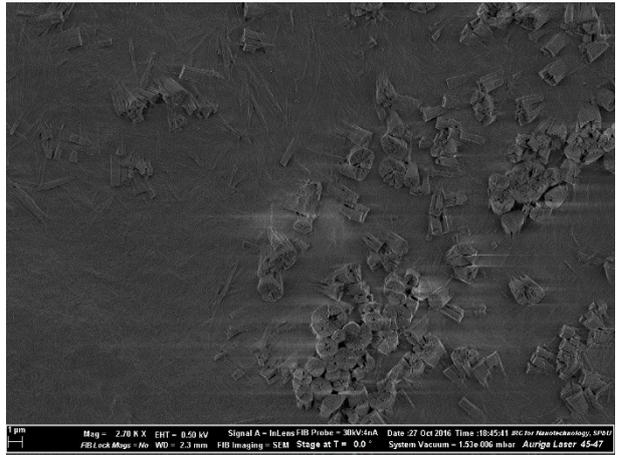
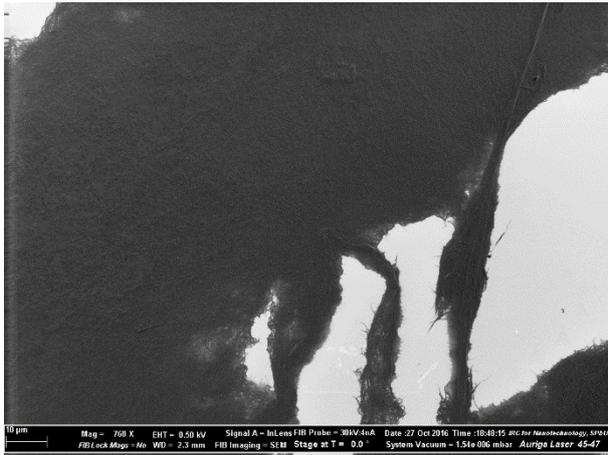
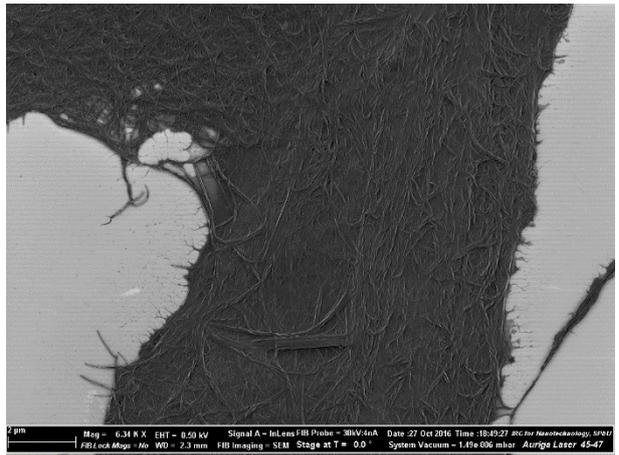
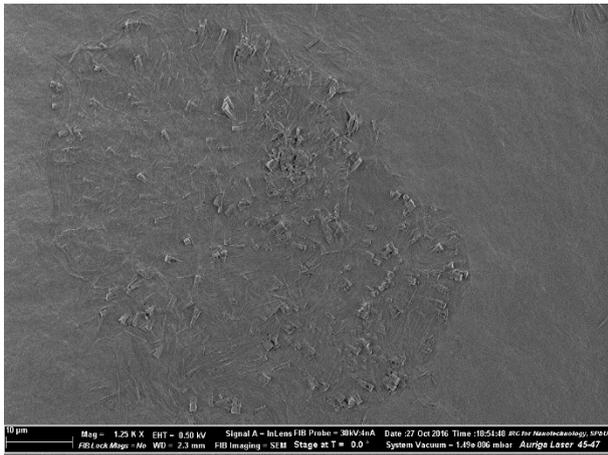


Рис. 3.4.2.3 Стандартная система после восстановления, разбавленная в 5 раз. Снимок СЭМ при помощи детектора InLens. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

3.4.3 Влияние pH на формирование надмолекулярных структур

В целях изучения стабильности исследуемых структур по отношению к изменениям кислотности среды в стандартно приготовленном растворе без добавления восстановителя был понижен pH до 3,5 добавлением HNO_3 . Фиксация на поверхности осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора. В результате на подложке были получены структуры, схожие со структурами, образующимися при нейтральном значении pH. При этом в скоплениях стандартных фибрилл встречаются нетипичные образования похожие по строению на трубки (Рис. 3.4.3.1). Эти объекты крупнее и имеют четко обозначенный край. Можно предположить наличие стандартных фибрилл в их составе. Стоит отметить наличие обсуждаемой выше особенности на краю скоплений фибрилл, как и на образцах, соответствующих нормальному pH. Также на данной подложке был обнаружен нетипичный крупный тяж, расположенный отдельно от сплетения фибрилл.



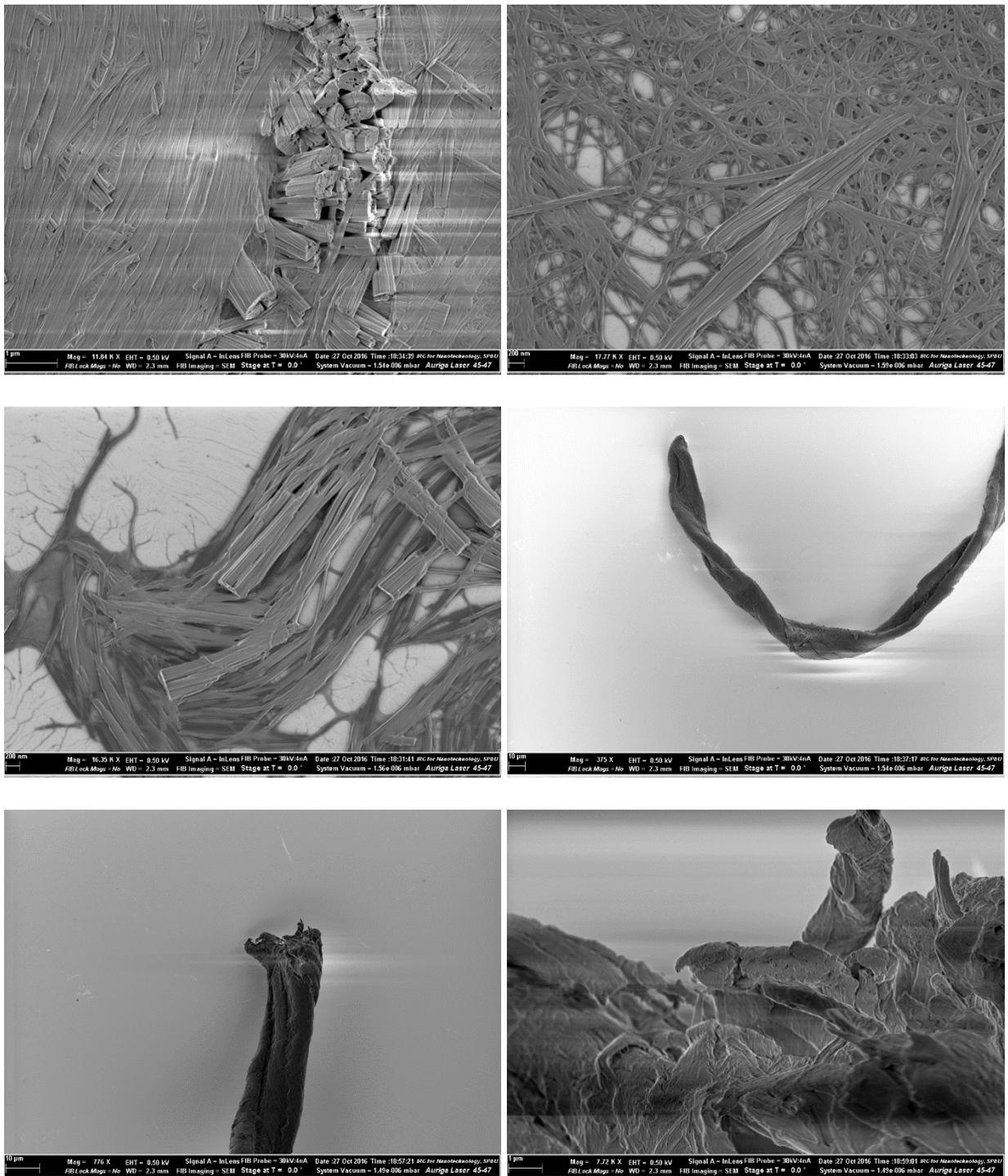
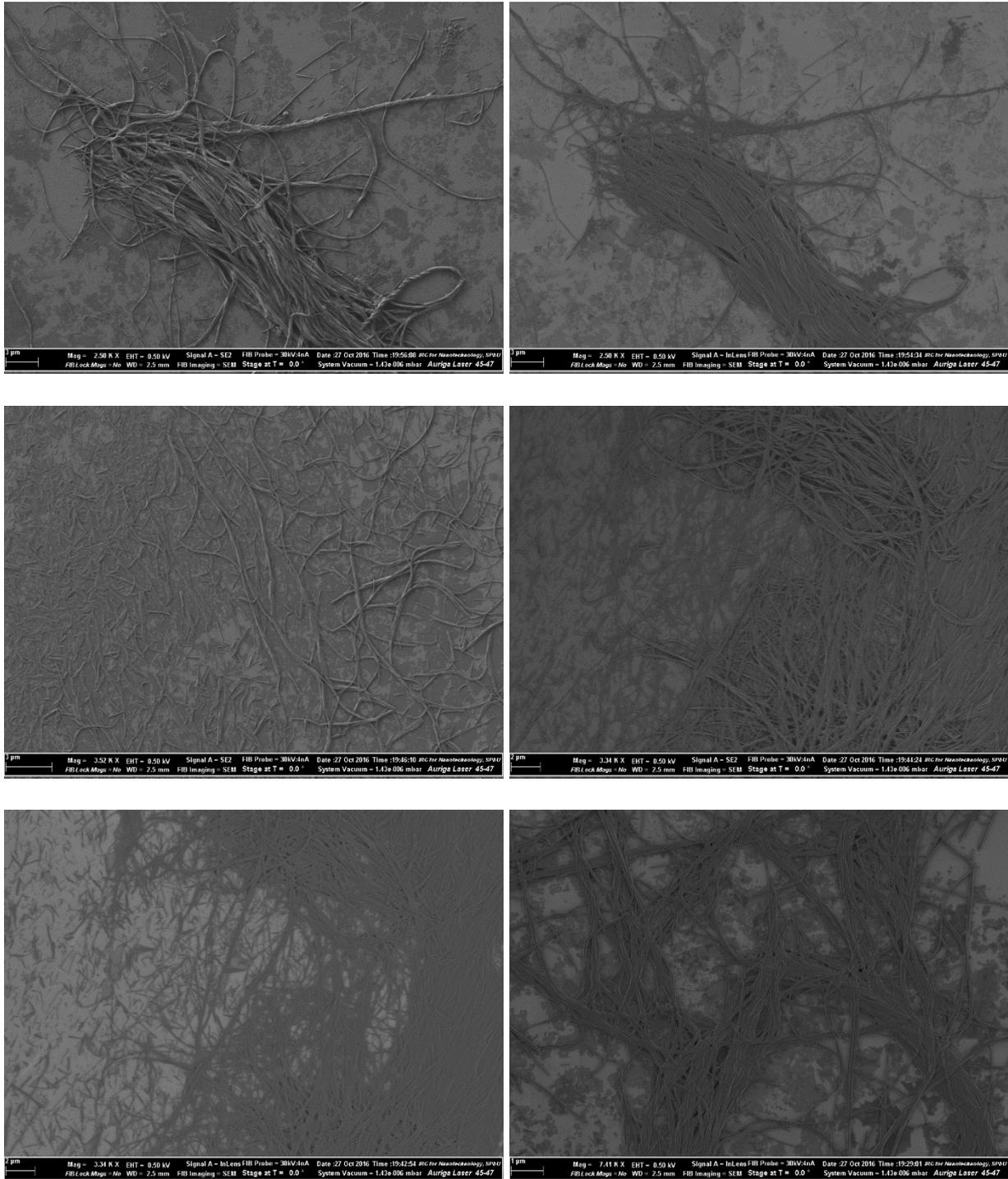


Рис. 3.4.3.1 Стандартная система без восстановления после понижения рН до 3,5. Снимки СЭМ при помощи детектора InLens. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

Аналогичное изменение рН в растворе с восстановителем и последующее высушивание 10 микролитров данного раствора на кремниевой подложке привело к образованию ничем не отличающихся от соответствующих нейтральному рН структур (Рис. 3.4.3.2). Из этого можно сделать вывод, что добавление восстановителя в раствор делает структуры более устойчивыми к изменениям кислотности среды. На приведенных снимках можно наблюдать крупный тяж, сплетенный

из обычных фибрилл, похожий на наблюдаемый на рисунке 3.4.3.1. Он одним концом закреплен на поверхности чипа, а другим висит в воздухе.



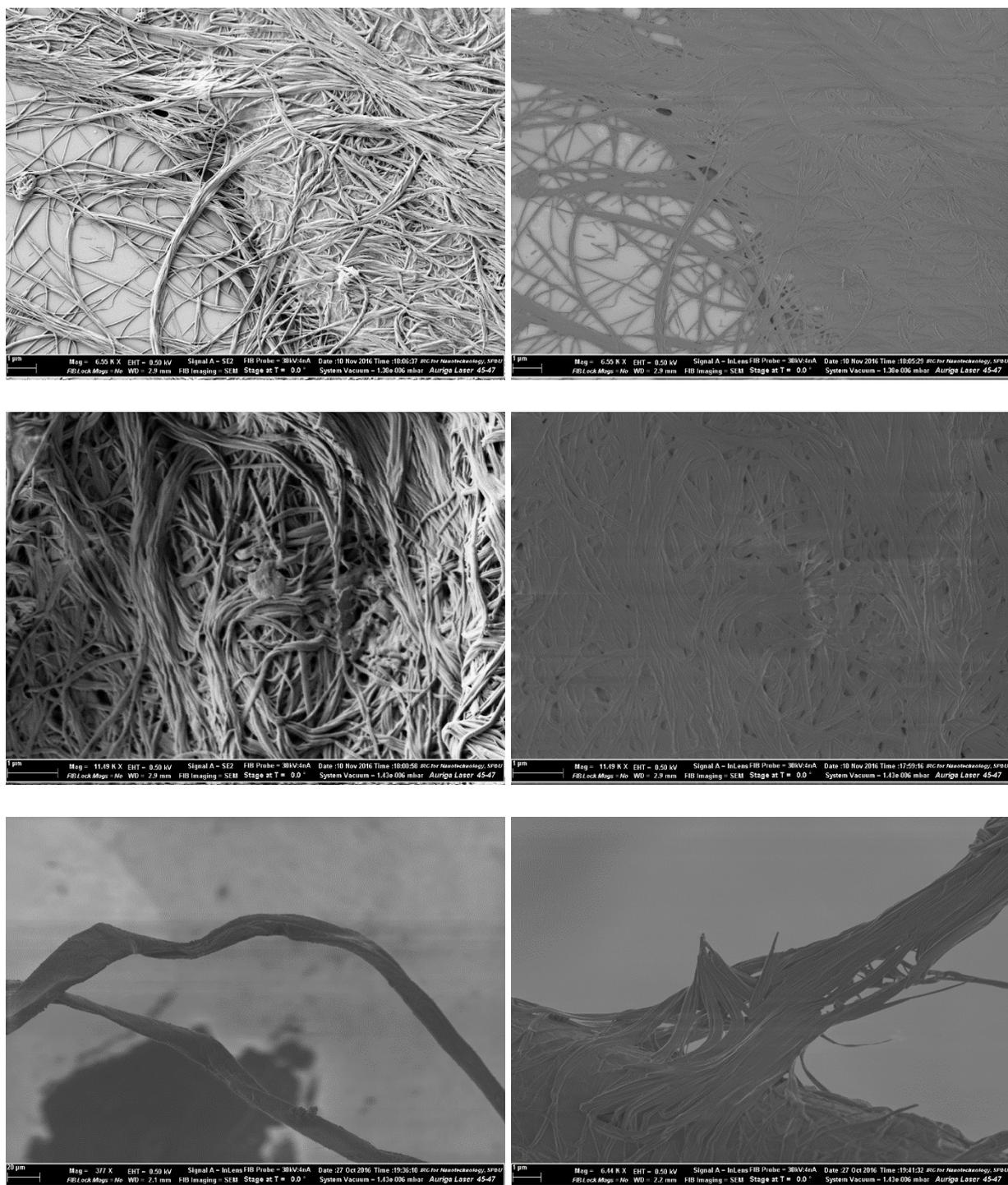
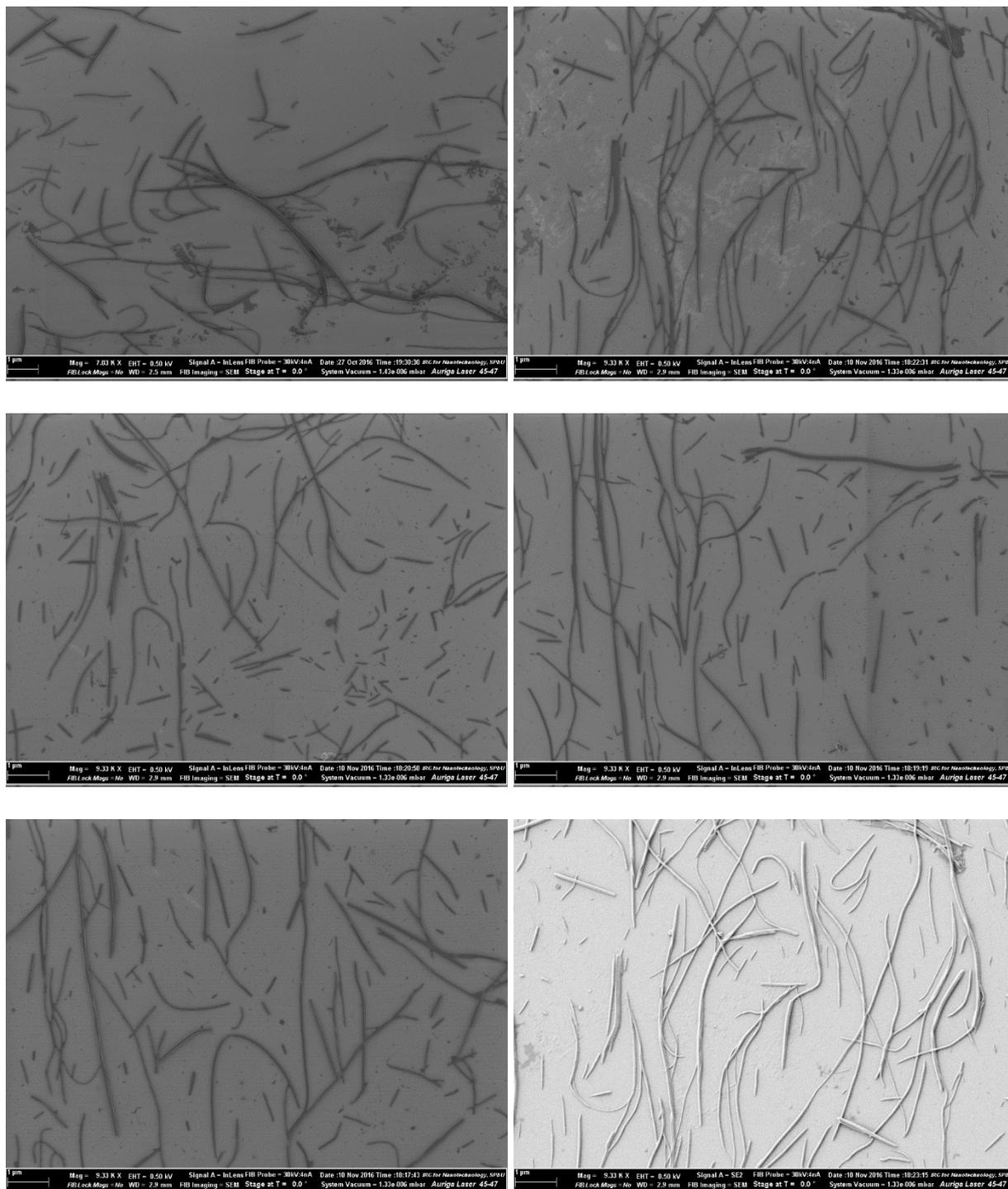


Рис. 3.4.3.2 Стандартная система после восстановления и понижения pH до 3,5. Снимки СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

Так же для данного раствора был проведен эксперимент по промыванию структур, выпадающих из раствора, на поверхности чипа. Это позволило получить хорошо разрешенные фибриллы, фиксированные на поверхности (Рис. 3.4.3.3). По полученным снимкам было проведено статистическое исследование их характерных диаметров (данный анализ проводили при помощи программного обеспечения “FiJI” с использованием алгоритма, описанного в работе [33]). Из полученных

данных можно утверждать, что средний диаметр фибрилл равен 75 ± 5 нм. Необходимо отметить, что понижение pH способствовало разделению и фиксации отдельных фибрилл на поверхности кремния при промывании. Эксперименты, проведенные по аналогичной методике для стандартной системы без добавления кислоты, не привели к получению разделенных фибрилл на подложке (часть результатов этих экспериментов представлена на рисунке 3.4.3.3).



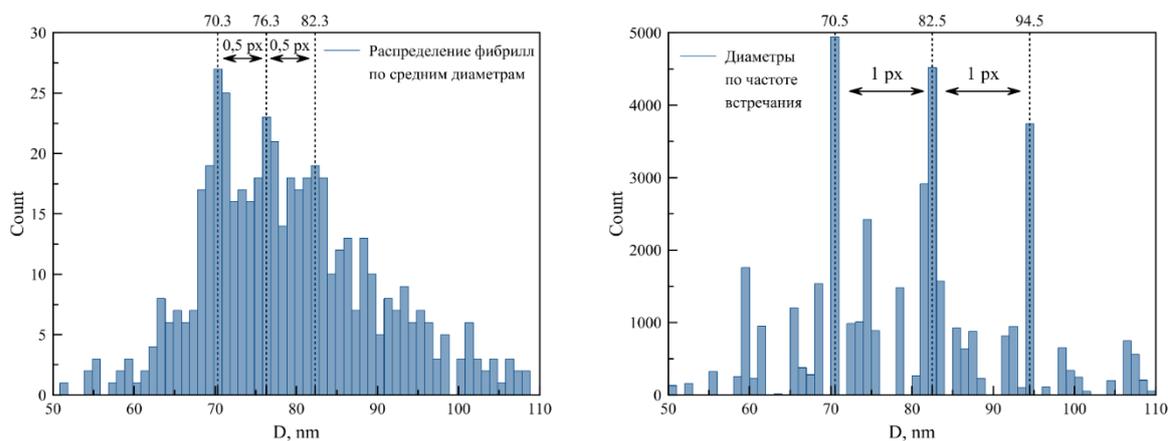


Рис. 3.4.3.3 Стандартная система после восстановления и понижения pH до 3,5 промыта на подложке. Снимки СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2 и статистический анализ разрешенных структур.

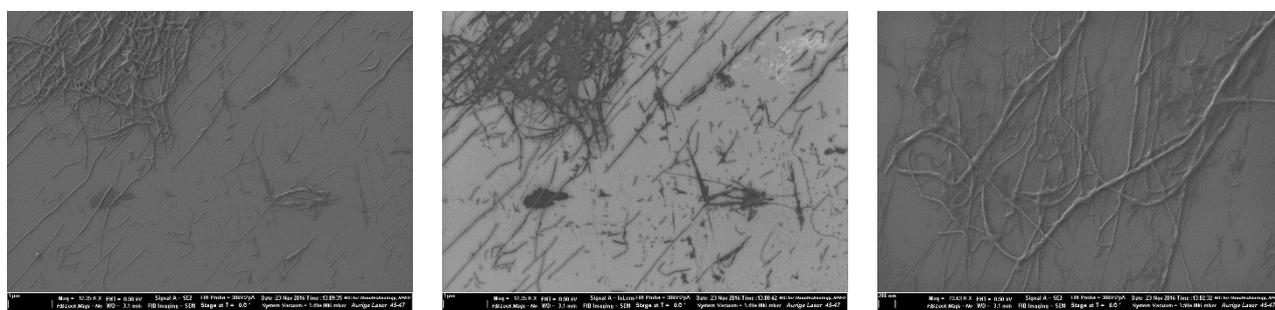


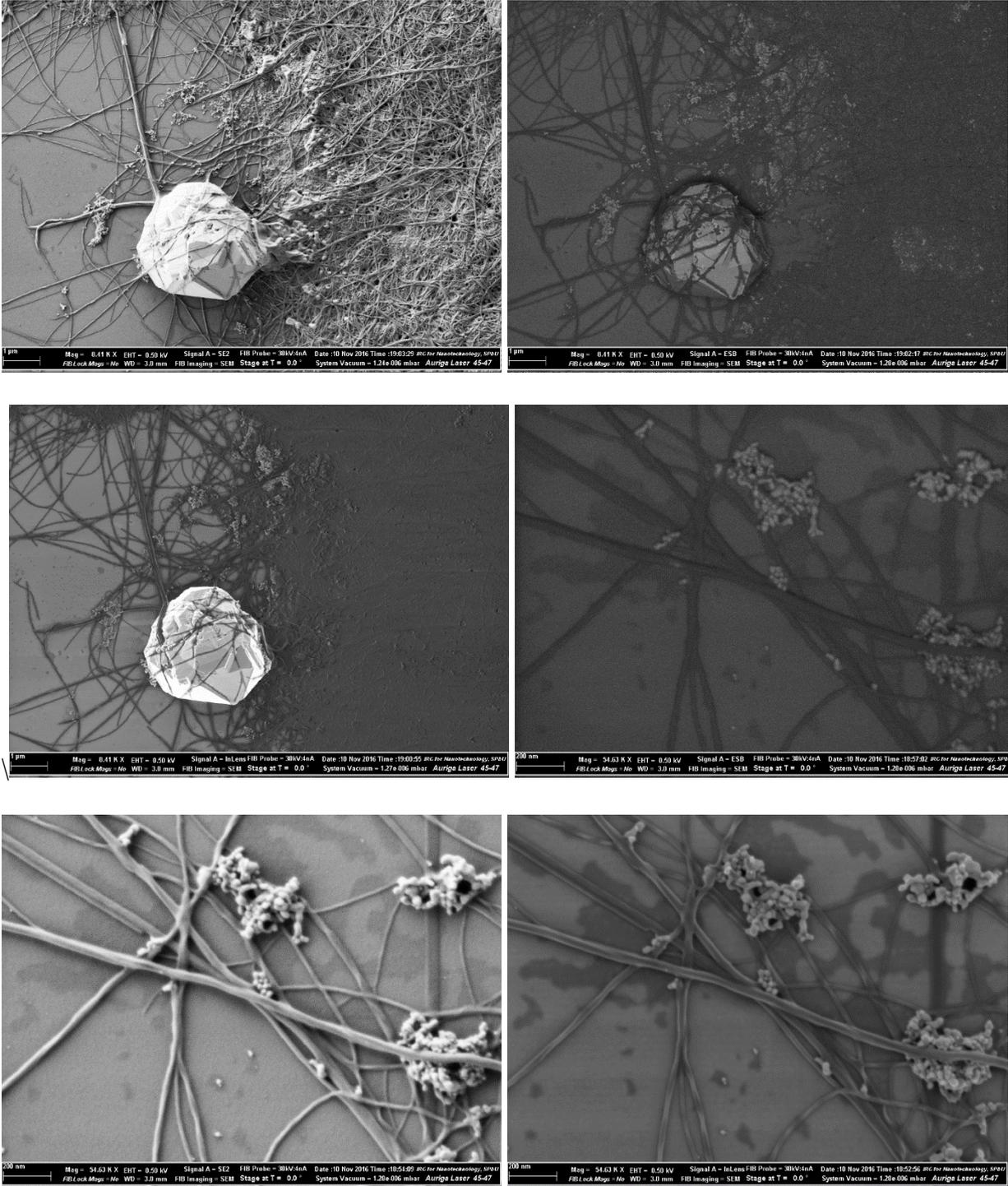
Рис.

3.4.3.3 Стандартная система после восстановления промыта на подложке. Снимки СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2.

3.4.4 Влияние изменения концентрации компонент в растворах

Так как металлизация обсуждаемых фибрилл является одной из задач проведенного исследования, представляет интерес увеличение количества атомов серебра, включенных в их состав. С этой целью был приготовлен раствор стандартной концентрации с добавлением AgNO_3 в соотношении 1:1 к атомам серебра в составе Ag-Phen ($C(\text{AgNO}_3) = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Далее в данный раствор был добавлен восстановитель и 10 микролитров раствора были высушены на подложке в соответствии со стандартной процедурой. На приведенных на рисунке 3.4.4.1 снимках хорошо различимы “грозди” наночастиц серебра. Дополнительное серебро не интегрировано в фибриллы, а агрегировало отдельно. Об этом можно судить по изображениям, полученным при помощи ESB детектора – детектора обратно рассеянных электронов. На этих изображениях хорошо видно различие яркости металлических скопления и темных, по отношению к ним, фибрилл. Из этого можно сделать вывод о большей работе выхода электронов в приповерхностном слое фибрилл чем в металлических скоплениях, то есть о низком содержании металла в приповерхностном слое

фибрилл. Таким образом, в составе исследуемых структур металлическая форма серебра может содержаться только внутри фибрилл под слоем диэлектрика.



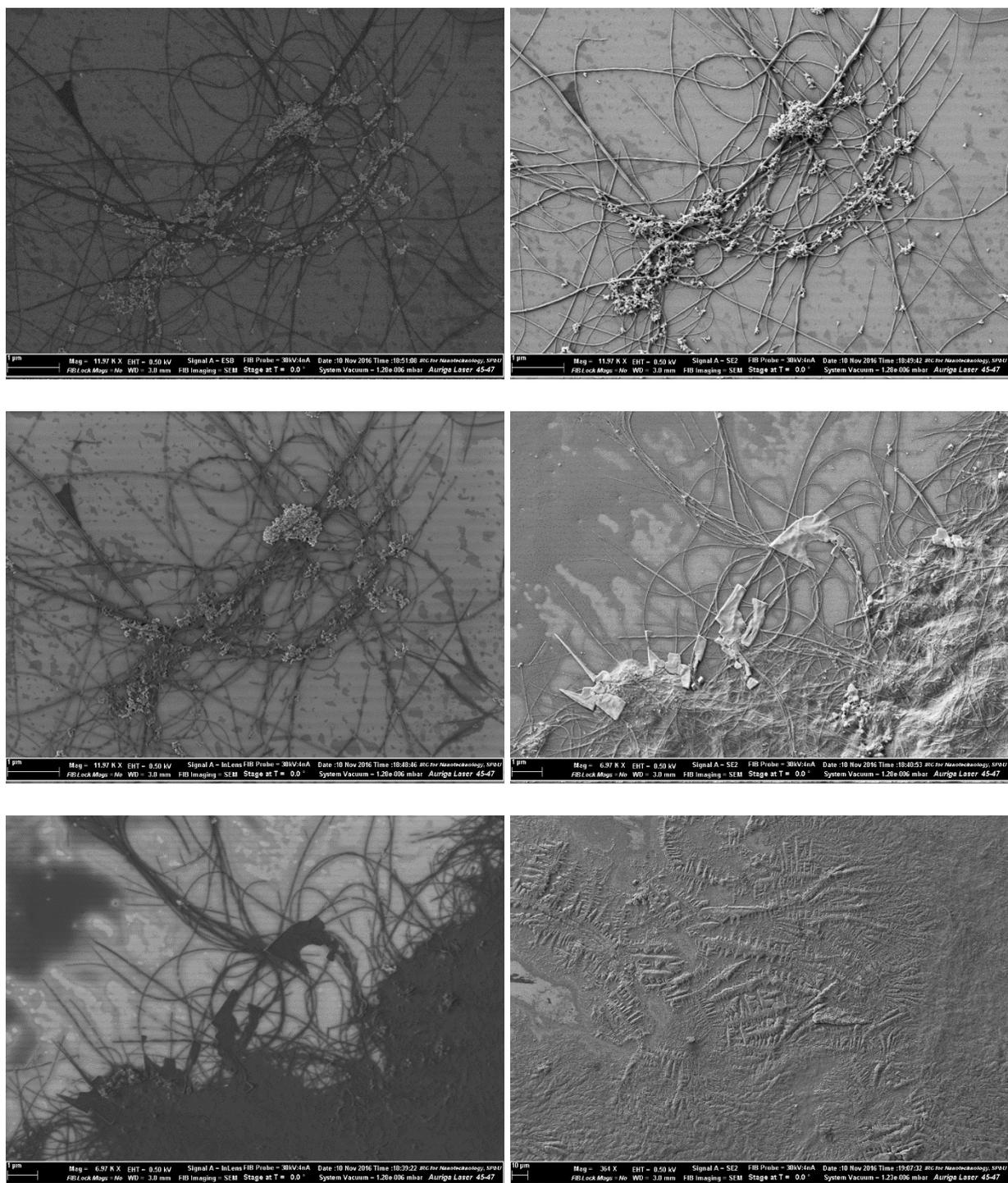


Рис. 3.4.4.1 Стандартная система с добавлением ионов серебра и восстановителя. Снимки СЭМ при помощи детекторов InLens, ESB и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

При уменьшении концентрации Ag-Phen в растворе в 10 раз ($C(\text{Ag-Phen}) = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) и последующем высушивании 10 микролитров раствора на подложке (в данный раствор добавлено стандартное количество восстановителя) исследуемые фибриллы не обнаружены (Рис. 3.4.4.2). На представленных изображениях хорошо видны наночастицы серебра. Можно сделать вывод, что

концентрация Ag-Phep играет решающую роль в образовании обсуждаемых фибриллярных структур на основе ДНК.

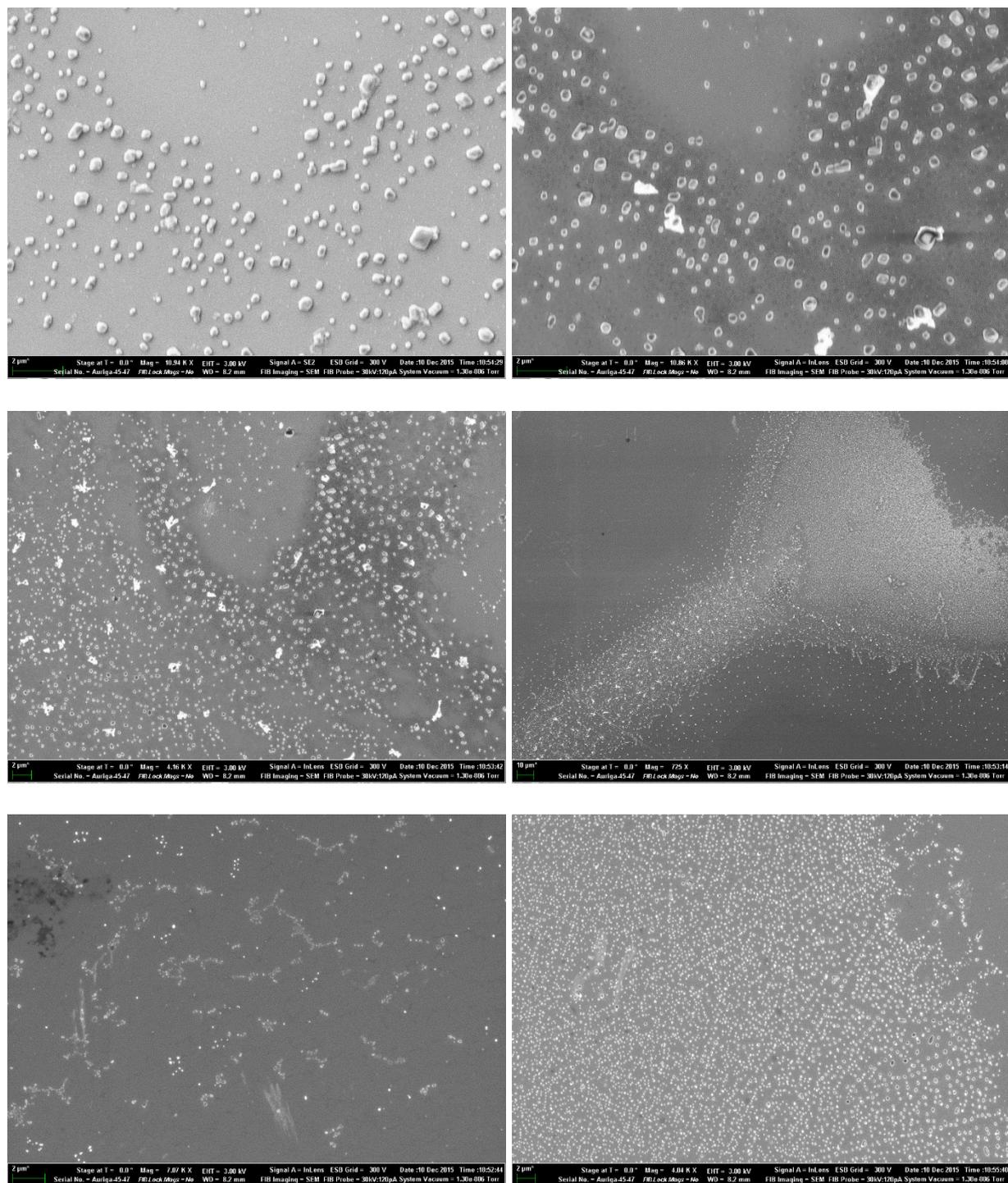
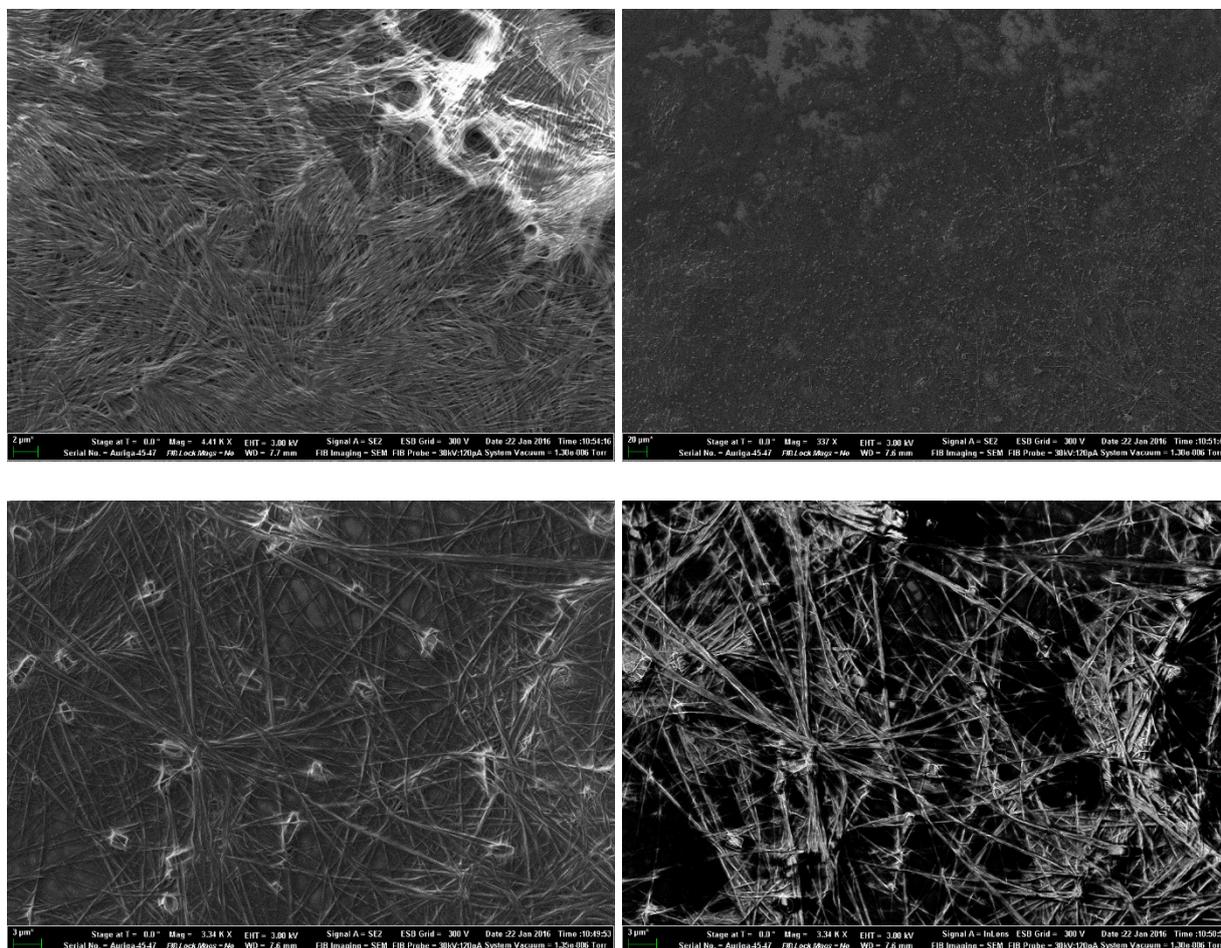
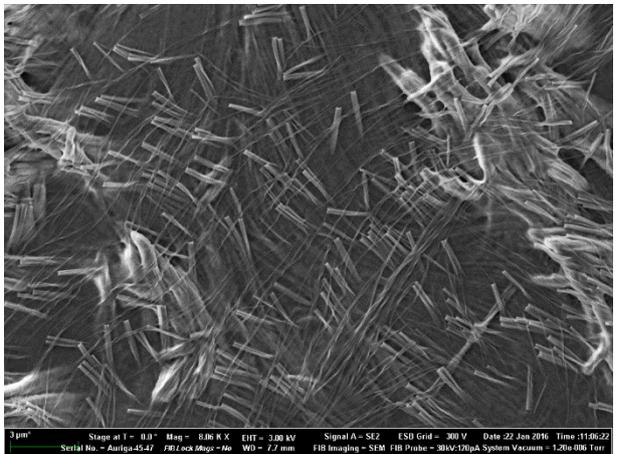
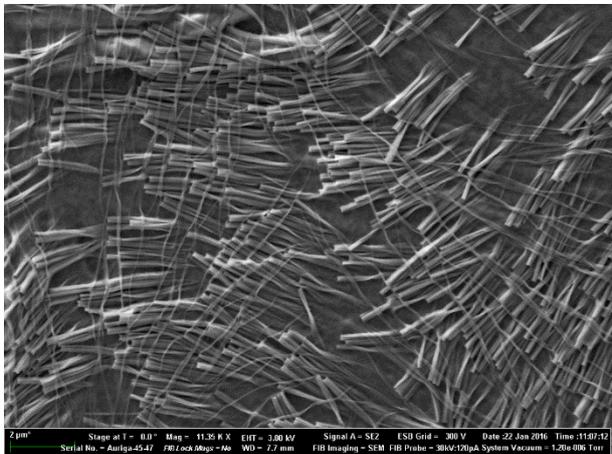
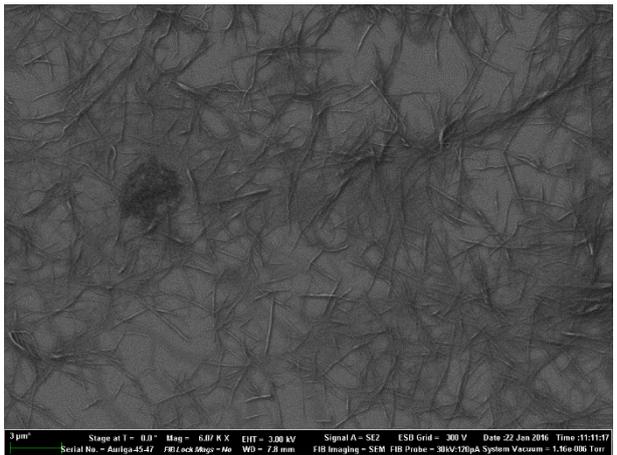
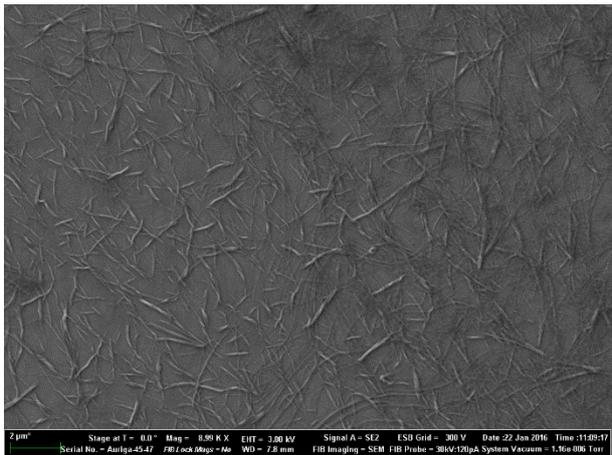
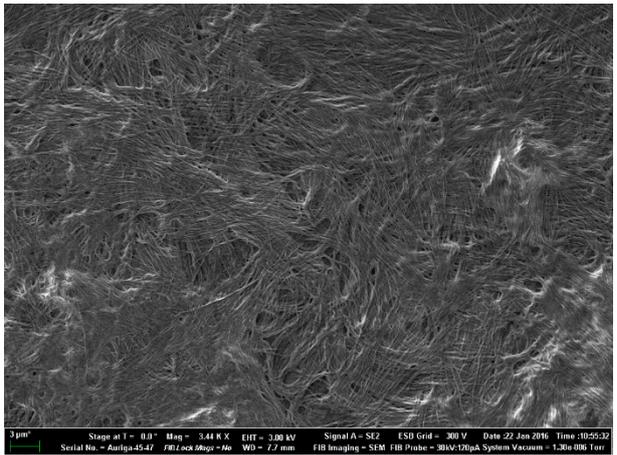
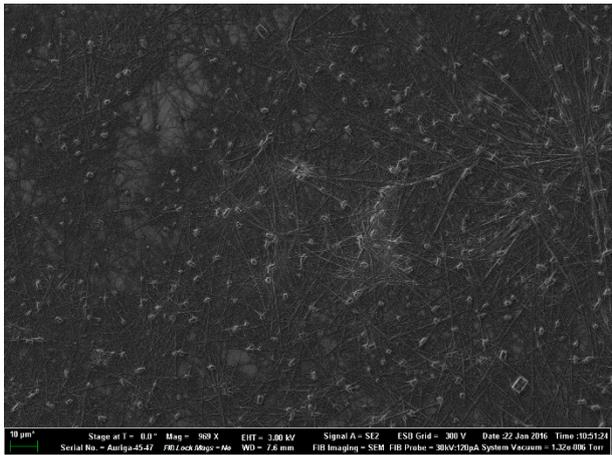


Рис. 3.4.4.2 Система с 0,1 концентрацией Ag-Phep и стандартной концентрацией восстановителя. Снимки СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась при помощи спинкоатера.

3.4.5 Образцы, полученные при взаимодействии ДНК с фенантролином

Представляет интерес выявить роль фенантролина в составе Ag-Phen в процессе образования фибриллярных структур. С этой целью был приготовлен раствор стандартной концентрации ДНК с фенантролином удвоенной концентрации по отношению к концентрации Ag-Phen в стандартной системе с целью сохранения одинаковой концентрации фенантролинового лиганда в растворах ($C(\text{ДНК}) = 0,0045\% = 7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ br, $C(\text{Phen}) = 9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Фиксация на подложке осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора как описано выше. Как и Ag-Phen, фенантролин в комплексе с ДНК способствует образованию фибриллярных структур (Рис. 3.4.5.1). Но для данных двух соединений морфология структур заметно различается. Структуры, образованные фенантролином, заметно крупнее чем соответствующие, полученные с использованием Ag-Phen, и имеют во многом отличное строение.





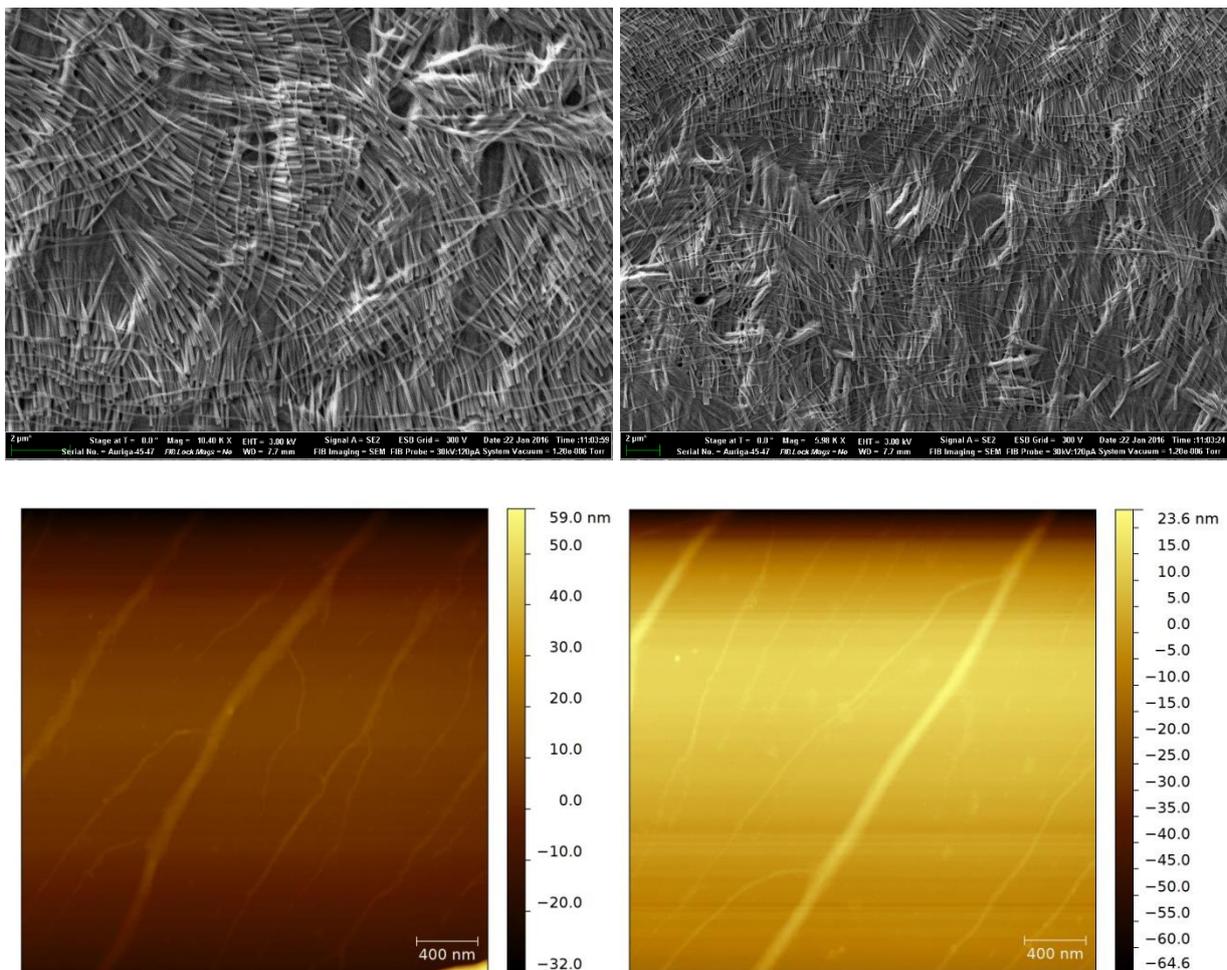


Рис.

3.4.5.1 Система с фенантролином $C(\text{Phen}) = 9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Снимки АСМ и СЭМ при помощи детекторов InLens и SE2. Фиксация на кремнии осуществлялась высушиванием 10 микролитров раствора.

3.4.6 Структуры, образованные Ag-Phen без ДНК

Для понимания механизмов образования исследуемых структур представляет интерес исследование растворов свободного Ag-Phen и объектов, образующихся при высушивании на подложках данных растворов.

При высушивании 10 микролитров раствора Ag-Phen концентрации $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ на слюде образуется равномерный слой однородной толщины с редко встречающимися тонкими нитевидными структурами на его поверхности (Рис. 3.4.6.1).

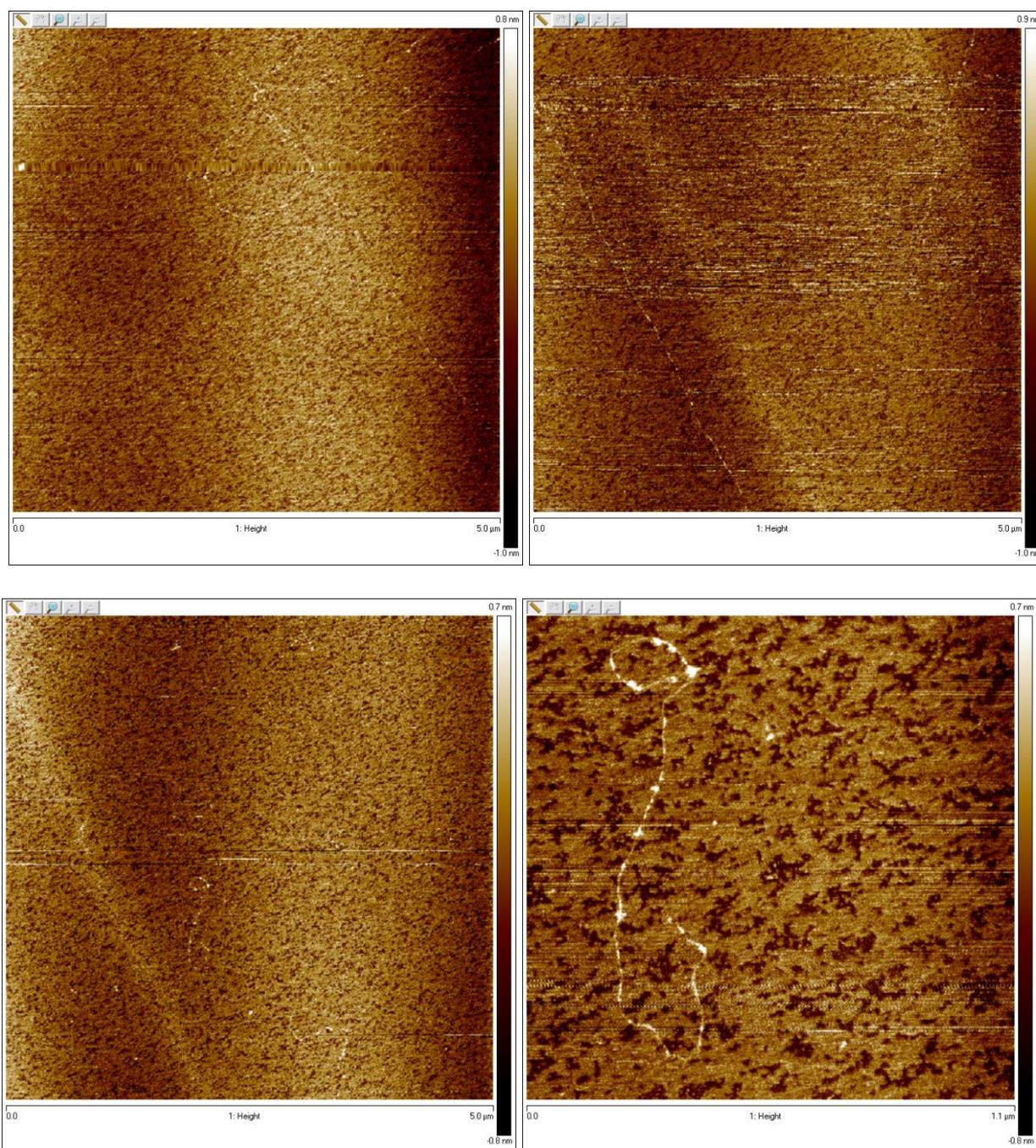


Рис. 3.4.6.1 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phep концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М на слюде. Снимки АСМ.

В целях проверки полученных результатов был проведен эксперимент по высушиванию того же раствора Ag-Phep (концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М) на поверхности слюды в течении 15, 30 и 45 минут (Рис. 3.4.6.2). Как видно из приведенных данных, с течением времени на поверхности подложки образуется однородный слой вещества. После чего на этом слое могут располагаться тонкие нитевидные структуры.

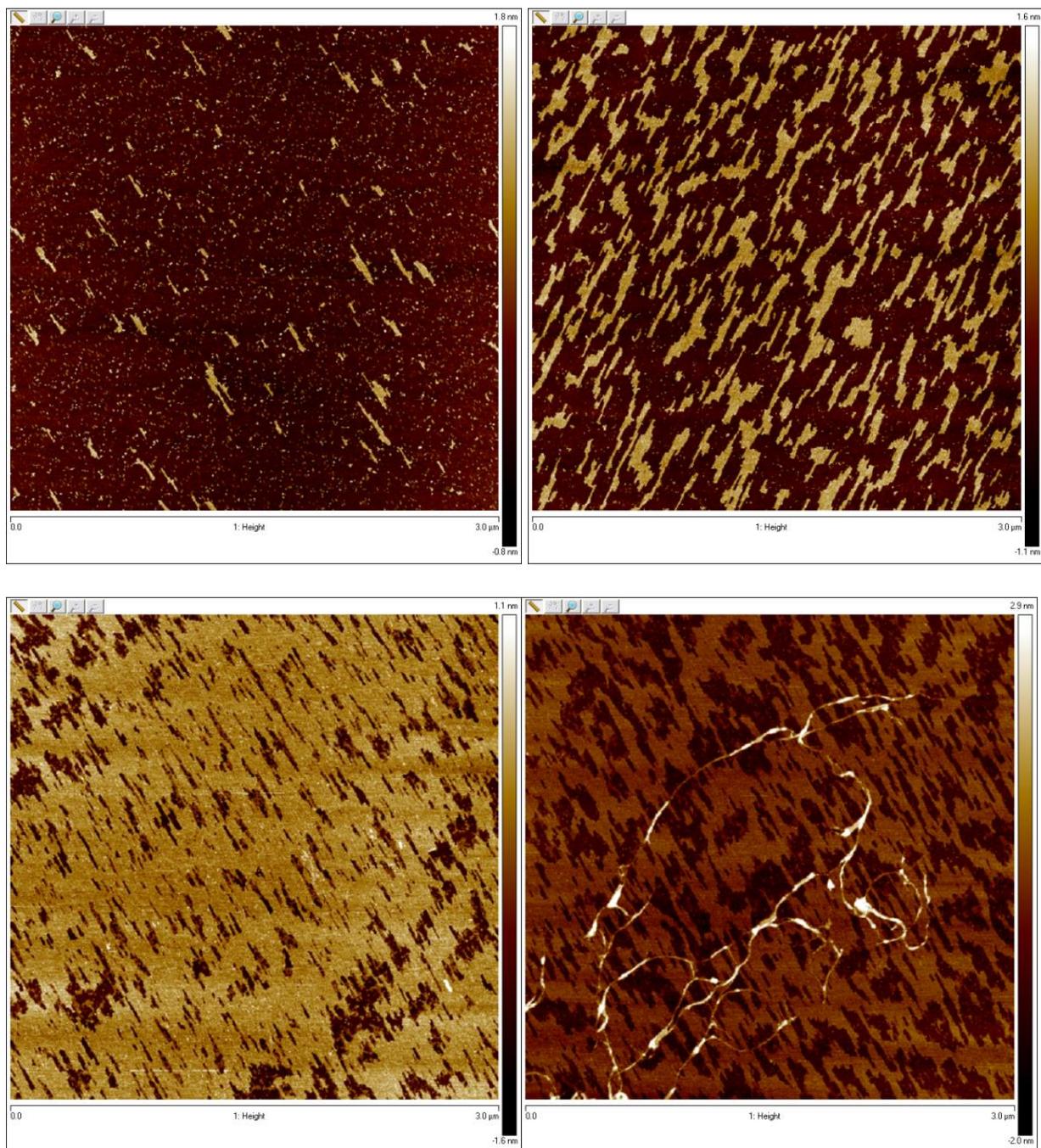


Рис. 3.4.6.2 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phen концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М на слюде в течении 15, 30 и 45 минут (2 снимка) с последующим сдуванием капли. Снимки АСМ.

Повторение аналогичного эксперимента (концентрации Ag-Phen = $2 \cdot 10^{-3}$ М) с выдерживанием в течение 30 минут на кремниевой подложке приводит к образованию принципиально иных объектов (Рис. 3.4.6.3). Это означает, что свойства подложки имеют значительное влияние на структуру образующихся комплексов исследуемого соединения.

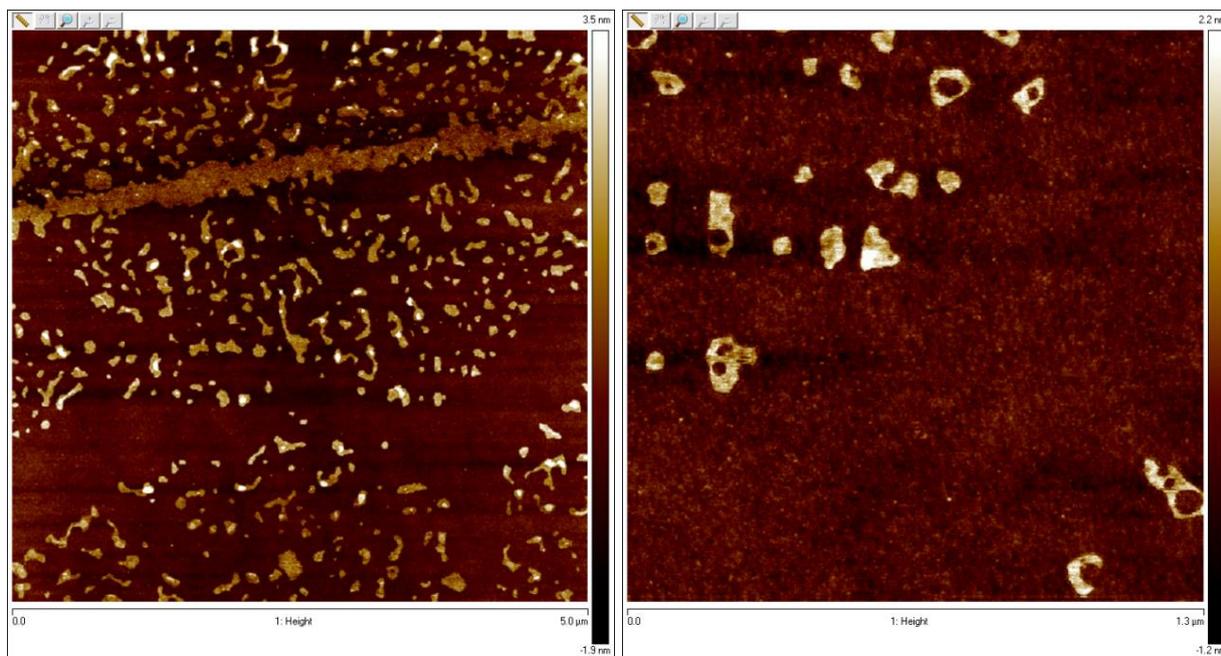


Рис. 3.4.6.3 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phep концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М на кремнии в течении 30 минут с последующим сдуванием капли. Снимки АСМ.

Так же был проведен эксперимент по выдерживанию в течении 30 минут раствора Ag-Phep той же концентрации на кремниевой подложке с предварительно высаженной ДНК (Рис. 3.4.6.5) (снимки подложки с предварительно высаженной ДНК представлены на Рис. 3.4.6.4). Невозможно судить о влиянии макромолекулы на формирование объектов на поверхности чипа. Следует отметить образование двух хорошо различимых слоев агрегата.

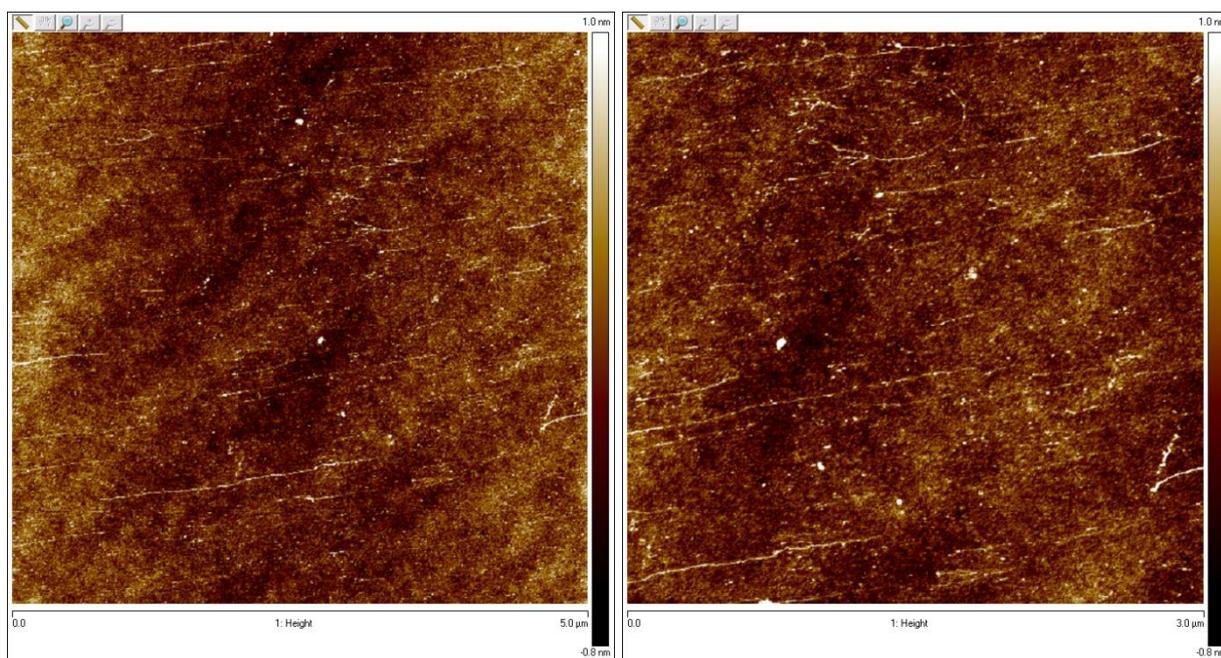


Рис. 3.4.6.4 ДНК растянутая на кремнии сдвиганием кремниевой подложки. Снимки АСМ.

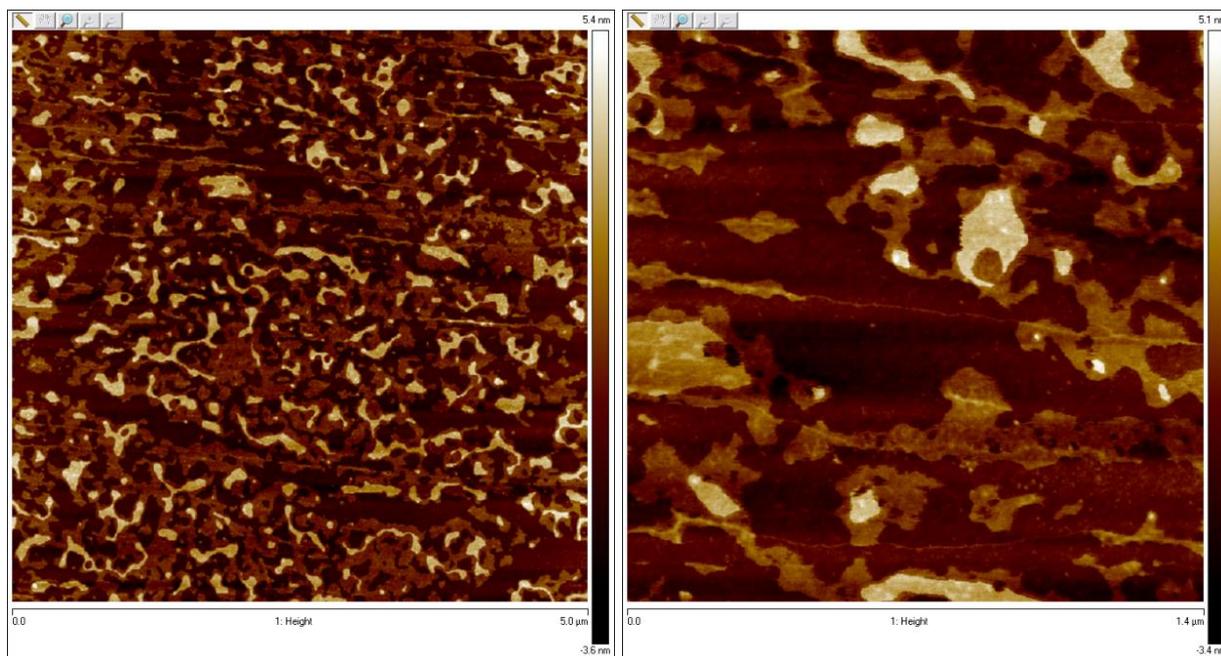


Рис. 3.4.6.5 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phep концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М на кремнии с предварительно фиксированной ДНК в течении 30 минут с последующим сдуванием капли. Снимки АСМ.

Для исследования самоорганизации Ag-Phep был приготовлен раствор концентрации $4,5 \cdot 10^{-4}$ М, равной концентрации данного компонента в стандартной системе. Затем 20 микролитров данного раствора были высушены на поверхности слюды (Рис. 3.4.6.7). На приведенных снимках наблюдаются вытянутые фибриллы равномерной толщины. Кроме того, хорошо заметна двуслойная организация структуры.

При высушивании 20 микролитров того же раствора на поверхности кремния с предварительно высаженной ДНК образуются структуры, аналогичные эксперименту по высаживанию раствора большей концентрации на модифицированную ДНК кремниевую подложку (Рис. 3.4.6.8). В очередной раз наблюдается слоистая организация образца. Роль ДНК в агрегации объектов утверждать не представляется возможным.

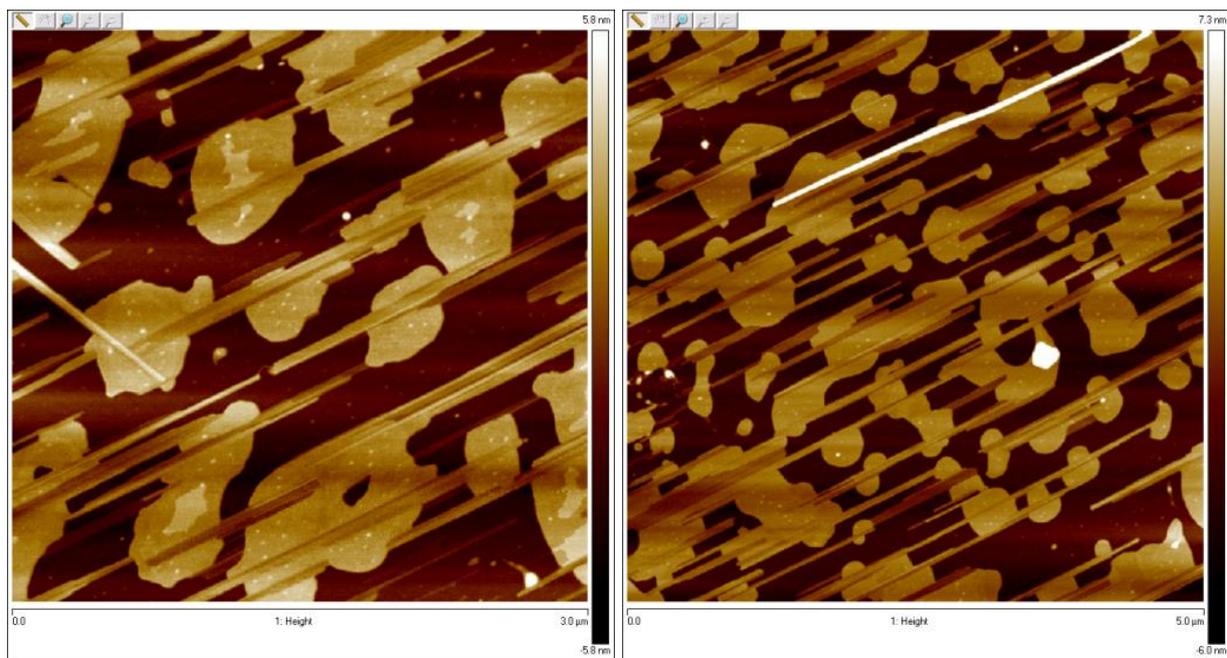


Рис. 3.4.6.7 Высушивание 20 микролитров раствора Ag-Pphen концентрации $4,5 \cdot 10^{-4}$ М на слюде. Снимки АСМ.

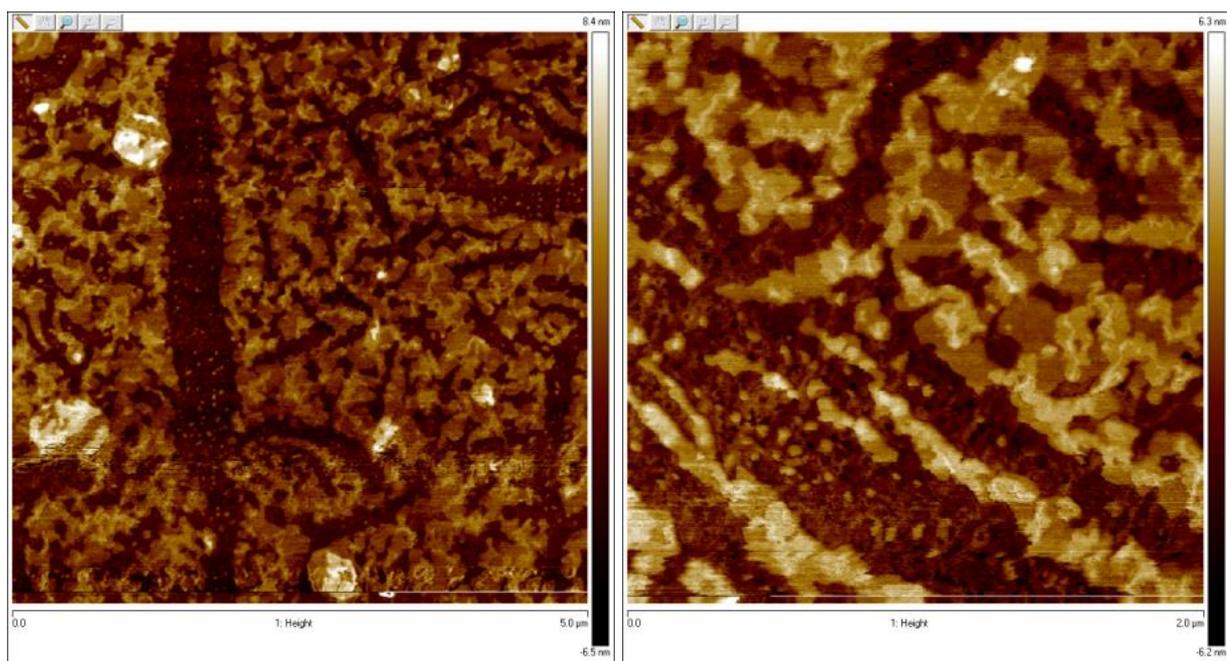
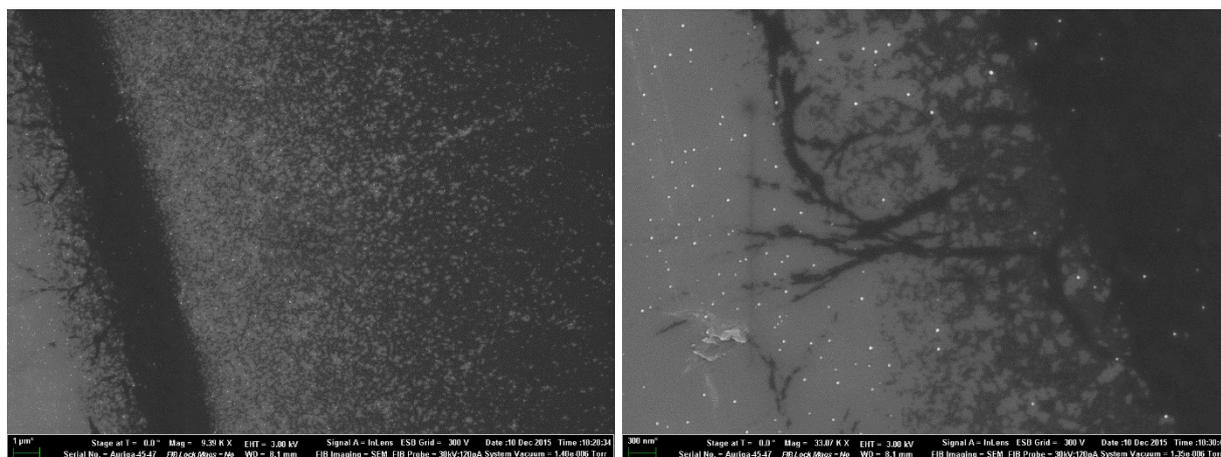
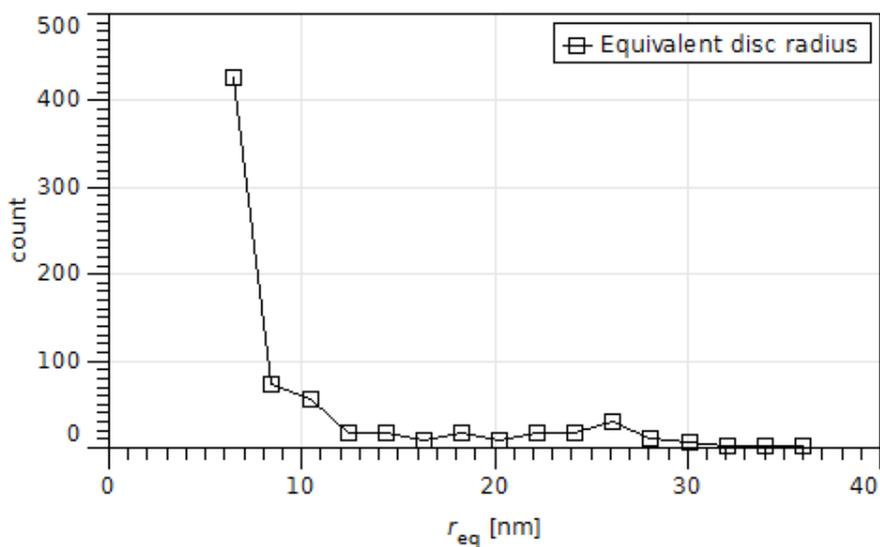
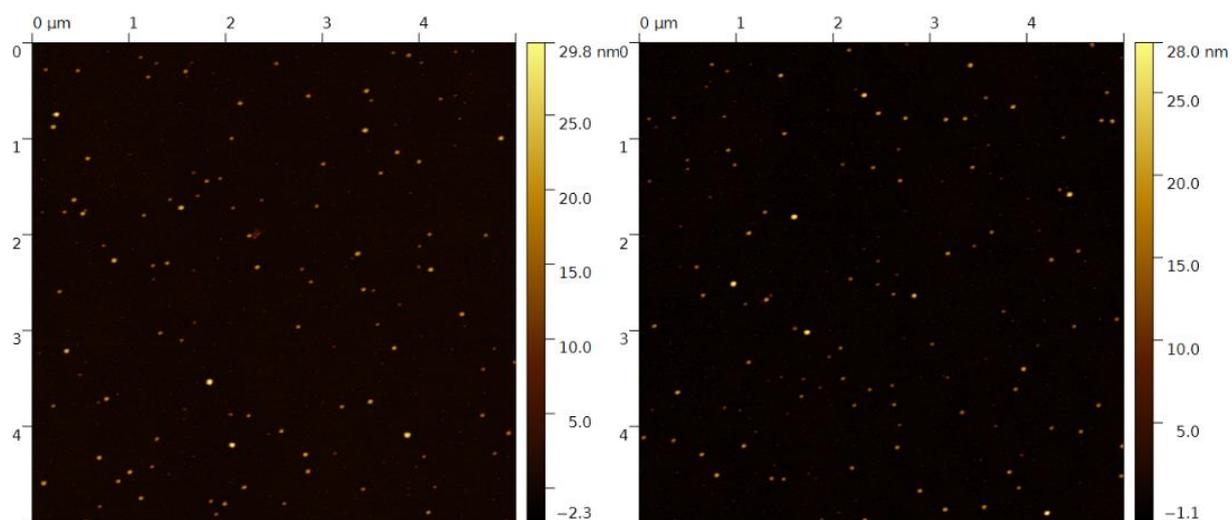


Рис. 3.4.6.8 Высушивание 20 микролитров раствора Ag-Pphen концентрации $4,5 \cdot 10^{-4}$ М на кремнии с предварительно фиксированной ДНК. Снимки АСМ.

В данный раствор был добавлен восстановитель ($\text{Ag-Pphen} = \text{NaBH}_4 = 4,5 \cdot 10^{-4}$ М) и 10 микролитров образовавшегося раствора были высушены на поверхности кремния (Рис. 3.4.6.9). Как видно из представленных изображений, без ДНК исследуемые фибриллы не образуются. На подложке

обнаружены наночастицы серебра. Приведенный на рисунке статистический анализ их размеров из данных АСМ позволяет утверждать, что их средний диаметр равен 50 ± 4 нм.



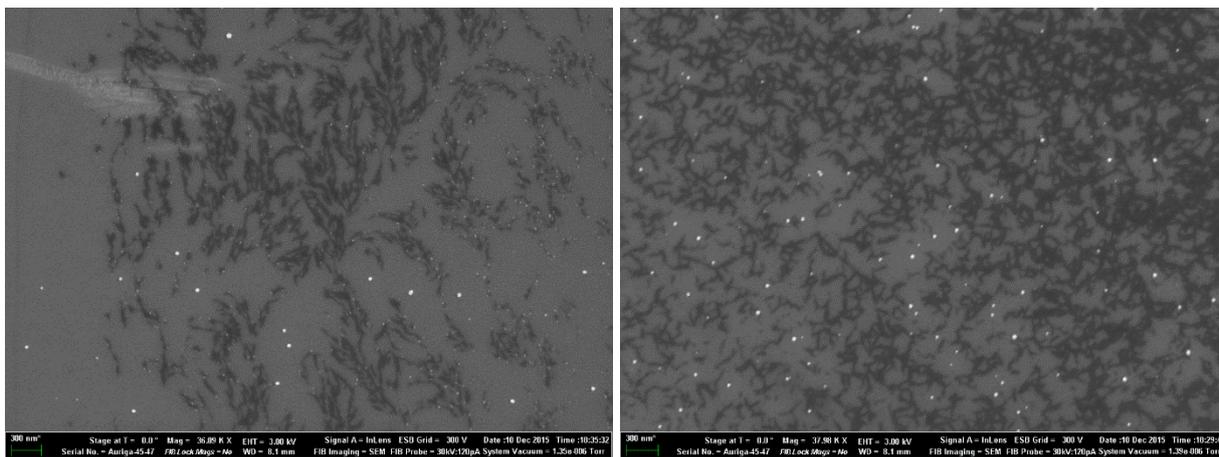
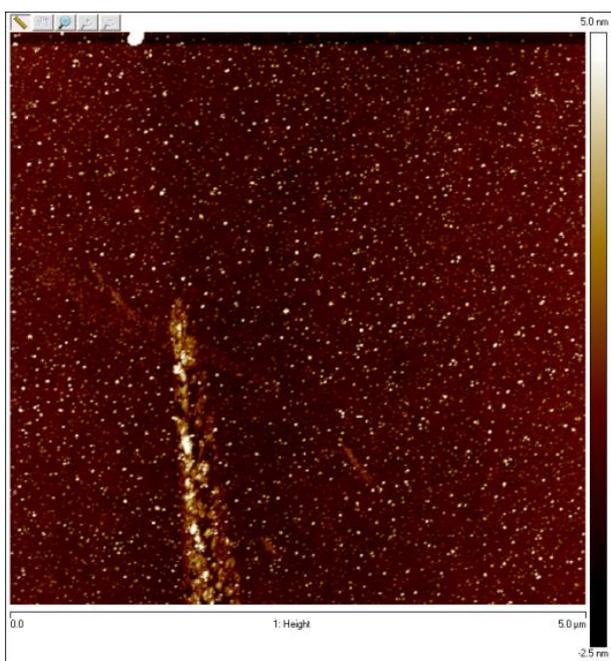


Рис. 3.4.6.9 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phen с восстановителем (концентрация Ag-Phen = $\text{NaBH}_4 = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) на кремнии. Снимки АСМ (представлено распределение частиц по радиусам эквивалентных дисков) и СЭМ при помощи детектора InLens.

Для сравнения, на поверхности кремния было высушено 10 микролитров раствора невосстановленного Ag-Phen той же концентрации, а затем данный чип, модифицированный исследуемым соединением, был помещен на несколько минут в раствор боргидрида натрия ($\text{NaBH}_4 = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) (Рис. 3.4.6.10). Образовавшиеся структуры заметно отличаются от представленных на рисунке 3.4.6.10, но также не содержат исследуемых фибрилл. Таким образом, присутствие макромолекулы ДНК в растворе является необходимым условием образования исследуемых фибрилл. Хотя Ag-Phen обладает способностью к агрегации в растворе с образованием протяженных комплексов, ДНК выступает матрицей для организации данных систем.



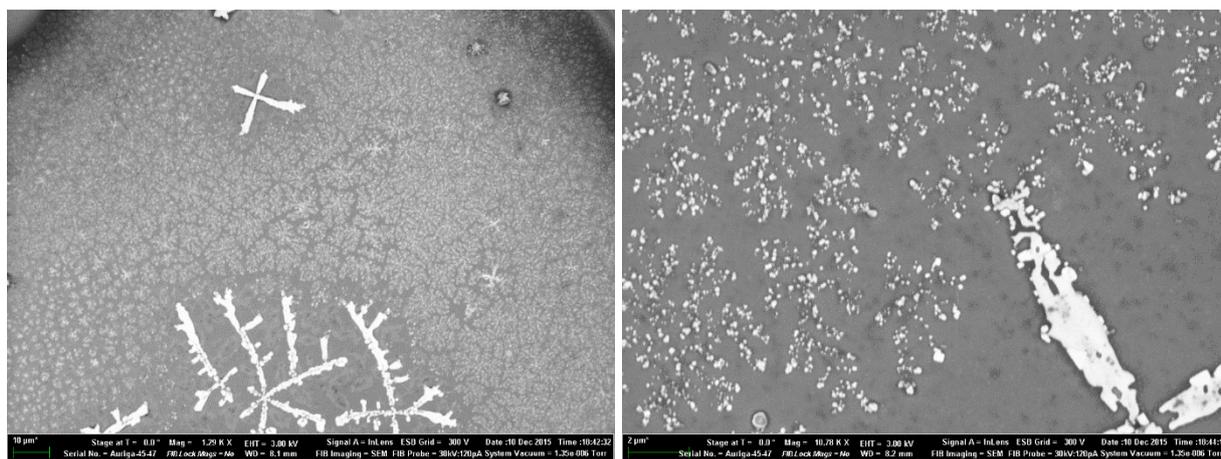


Рис. 3.4.6.9 Высушивание 10 микролитров раствора Ag-Phen без восстановителя на кремнии и последующее помещение данного чипа в раствор боргидрида нитрия на несколько минут (концентрация Ag-Phen = $\text{NaBH}_4 = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Снимки АСМ и СЭМ при помощи детектора InLens.

Выводы из микроскопии

На основании рассмотренных в этом разделе результатов можно сформулировать следующие выводы: исследуемые фибриллы образуются в растворе, а не на подложке при фиксации, и для их образования ДНК является необходимым компонентом. Можно предположить, что в растворе ДНК выступает в качестве основы, на которой формируется упорядоченный слой комплекса. Уменьшение концентрации Ag-Phen в растворе в 10 раз не привело к образованию фибрилл. Это хорошо согласуется с предположением об их составе, приведенном выше. Замена в растворе Ag-Phen на соответствующую концентрацию свободного фенантролина приводит к формированию структур отличной морфологии, что говорит о принципиальном значении связанного состояния фенантролина с ионом серебра в составе Ag-Phen для формирования исследуемых структур. Добавление восстановителя в раствор приводит к формированию фибрилл схожих по строению, но примерно в два раза большей толщины, чем без восстановителя. Их края более прочные и не разрушаются при высыхании капли раствора на подложке. Кроме того, восстановленные структуры оказываются стабильнее по отношению к таким воздействиям как разбавление и понижение pH. Следует отметить, что понижение pH улучшает фиксацию фибрилл на поверхности кремния и способствует их разделению. Увеличение концентрации ионов серебра в растворе добавлением AgNO_3 и последующее добавление восстановителя привело к формированию наночастиц серебра расположенных отдельно или смешанных с фибриллами, а не интегрированных в их состав. Из снимков этой системы хорошо видно, что работа выхода электронов из фибрилл значительно больше, чем из наночастиц серебра. Это свидетельствует о малом содержании металла в составе фибрилл.

Свободный Ag-Phen сам по себе склонен к агрегации. Свойства поверхности, контактирующей с раствором, оказывают значительное влияние на этот процесс. Кроме того, исходная концентрация Ag-Phen в растворе имеет заметное влияние на морфологию образующихся объектов. Вне зависимости от этих факторов, агрегировавшие структуры из Ag-Phen уложены хорошо различными методом АСМ слоями.

3.5 Исследование электрофизических свойств образцов

В первую очередь на очищенную стеклянную подложку были нанесены золотые контакты, как описано в разделе 2.7. На рисунке 3.5.1 представлена вольт – амперная характеристика данного устройства.

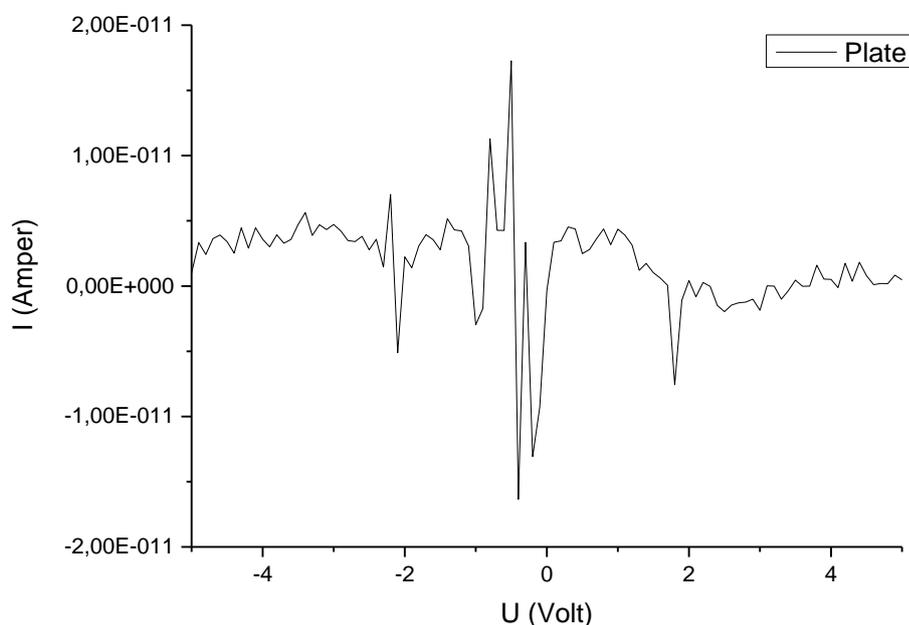


Рис. 3.5.1 ВАХ золотого контакта на стекле без образца.

Для понимания роли каждого из компонентов исследуемой системы в формировании ее электрофизических свойств были приготовлены растворы свободного Ag-Phen, Ag-Phen восстановленного с использованием NaBH_4 , свободной макромолекулы ДНК и ее комплексов с Ag-Phen до и после добавления восстановителя. Концентрации во всех растворах соответствуют концентрациям данных составляющих в системе, описанной в разделе 3.4 (ДНК = 0,0045% = $7 \cdot 10^{-5}$ М вр, Ag-Phen = $4,5 \cdot 10^{-4}$ М, NaBH_4 = $4,5 \cdot 10^{-4}$ М в 0,005 М NaNO_3). Отсутствующие компоненты стандартной системы в данных растворах заменялись соответствующими объемами 0,005 М NaNO_3 . Затем 10 микролитров каждого раствора высушивались на стеклянных чипах, поверхность которых была предварительно очищена по методу, описанному в разделе 2.7. Необходимо отметить,

что в данном эксперименте из растворов макромолекулы с Ag-Phen до и после восстановления брали для высаживания прозрачную жидкость, а не выпавшие в осадок структуры. Затем на поверхность высохших капель были напылены золотые контакты с 10 микрометровым промежутком между ними методом, описанным в разделе 2.7. К контактам были подключены электроды, после чего были измерены электрофизические свойства данных систем. На рисунках 3.5.2 – 3.5.6 приведены снимки зазора между контактами на поверхности высушенных капель, полученные с помощью оптического микроскопа.

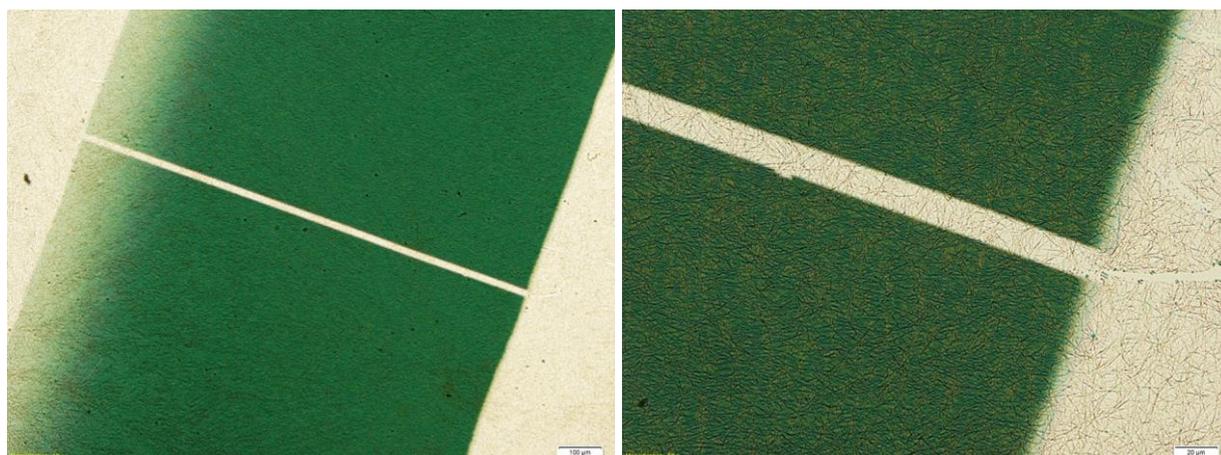


Рис. 3.5.2 Зазор между контактами на поверхности высушенной капли Ag-Phen.



Рис. 3.5.3 Зазор между контактами на поверхности высушенной капли Ag-Phen + NaBH₄.

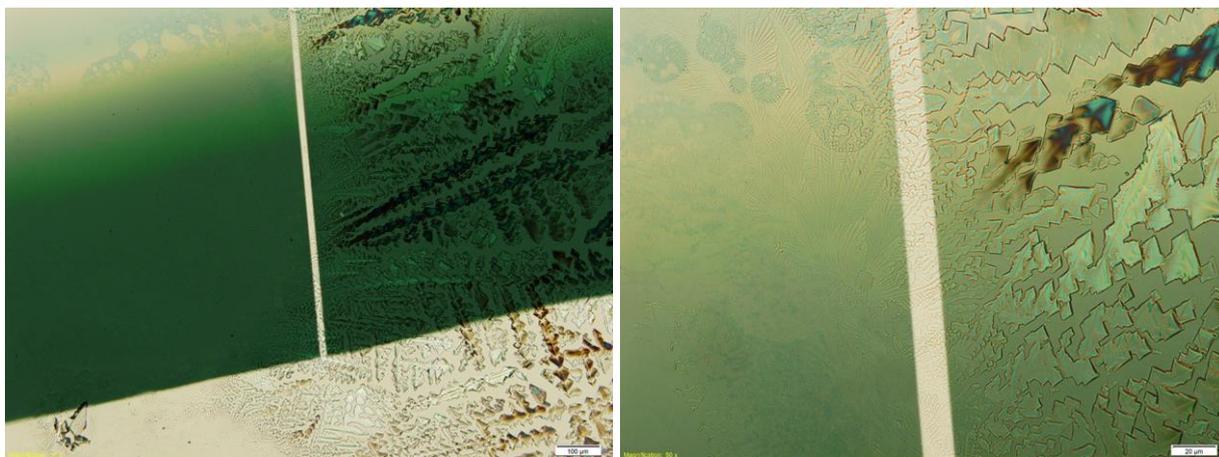


Рис. 3.5.4 Зазор между контактами на поверхности высушенной капли ДНК.

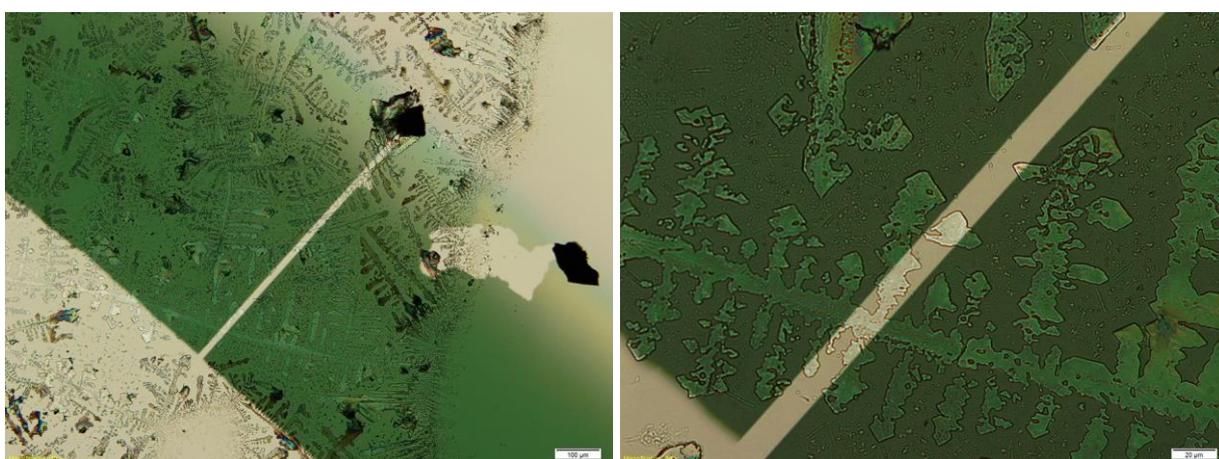


Рис. 3.5.5 Зазор между контактами на поверхности высушенной капли ДНК + Ag-Phen.

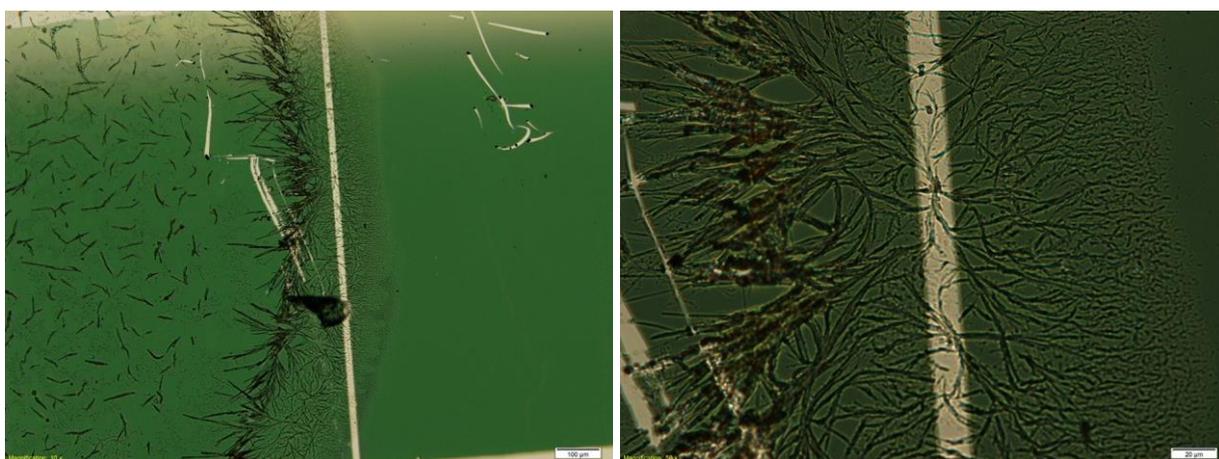


Рис. 3.5.6 Зазор между контактами на поверхности высушенной капли ДНК + Ag-Phen + NaBH_4 .

На последнем образце (Рис 3.5.6) зазор между контактами располагали вблизи границы высушенной капли, так как на ней образуются нитевидные структуры, хорошо разрешающиеся в оптический микроскоп.

Далее приведены вольт – амперные характеристики каждого из образцов с использованием линейной (Рис 3.5.7) и логарифмической шкалы (Рис 3.5.8). Значения силы тока измерялись в диапазоне напряжений от -3 до 3 Вольт и от 3 до -3 Вольт. Вольт – амперная характеристика для прямого и обратного сканирования отличается. Из этого можно сделать вывод о накоплении заряда в образце. Кроме того, в диапазоне от -1 до 1 Вольта зависимость носит линейный характер, а при больших абсолютных значениях напряжения приобретает характер степенной функции. Общий вид ВАХ всех образцов похож на ВАХ системы с двумя барьерами, чью роль в данном случае играют контакты между золотом и органическим образцом. Необходимо отметить, что проводимость комплекса ДНК с Ag-Phen после восстановления заметно больше проводимости всех ее компонент.

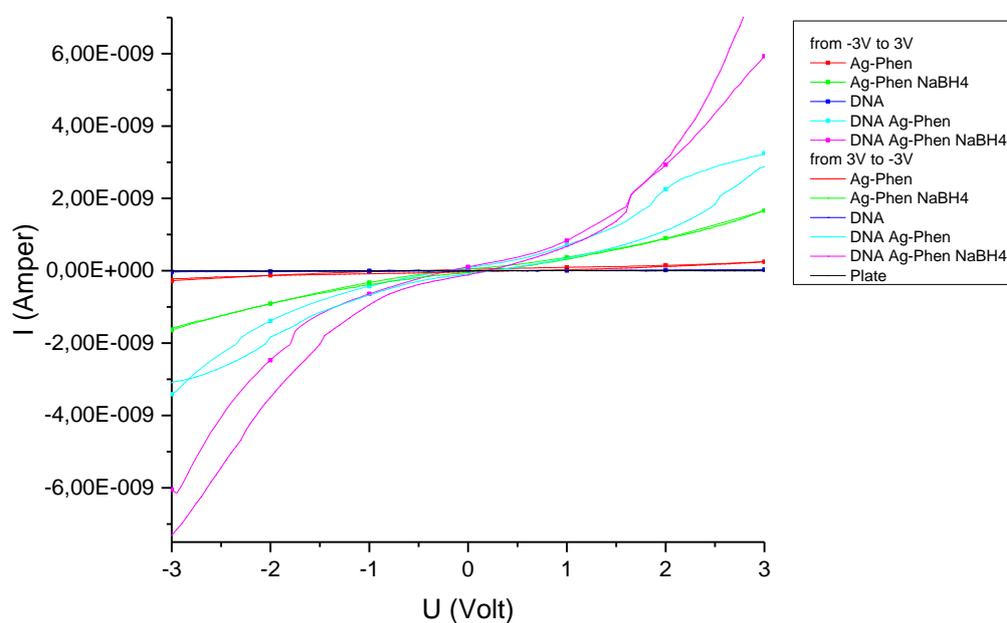


Рис. 3.5.7 Вольт – амперные характеристики образцов на линейных шкалах.

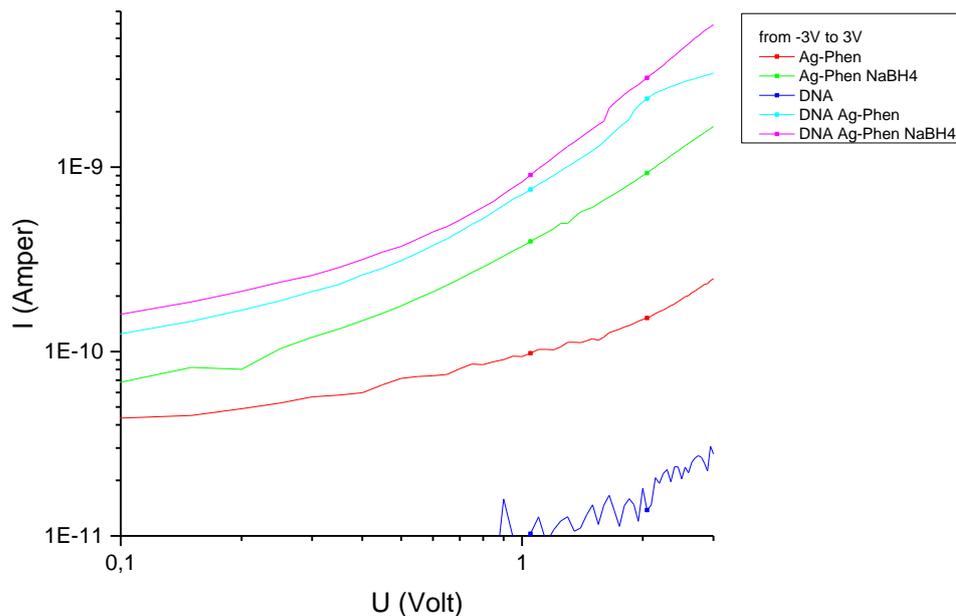


Рис. 3.5.8 Вольт – амперные характеристики образцов на логарифмических шкалах.

Электрофизические свойства восстановленного комплекса ДНК с Ag-Phen (Рис 3.5.6) были измерены в вакууме. На рисунке 3.5.9 представлены кривые зависимости силы тока от напряжения для системы до откачивания, в вакууме и после напуска воздуха. Наибольшие значения силы тока наблюдаются при первом измерении, а при повторных измерениях той же системы эти значения падают. Кроме того, при откачивании проводимость образца падает практически до значений, соответствующих пустой подложке, но при напуске воздуха электрофизические свойства восстанавливаются. Данное свойство может быть объяснено наличием связанных молекул воды в составе системы и осуществлении ими протонного механизма проводимости. Схожее свойство для аналогичных систем описано в работе [18], в которой авторы использовали его для создания детекторов относительной влажности воздуха на основе таких структур. При откачивании воздуха вода выходит из системы, чем и объясняется падение проводимости, а при напуске воздуха в систему вода обратно связывается с ней.

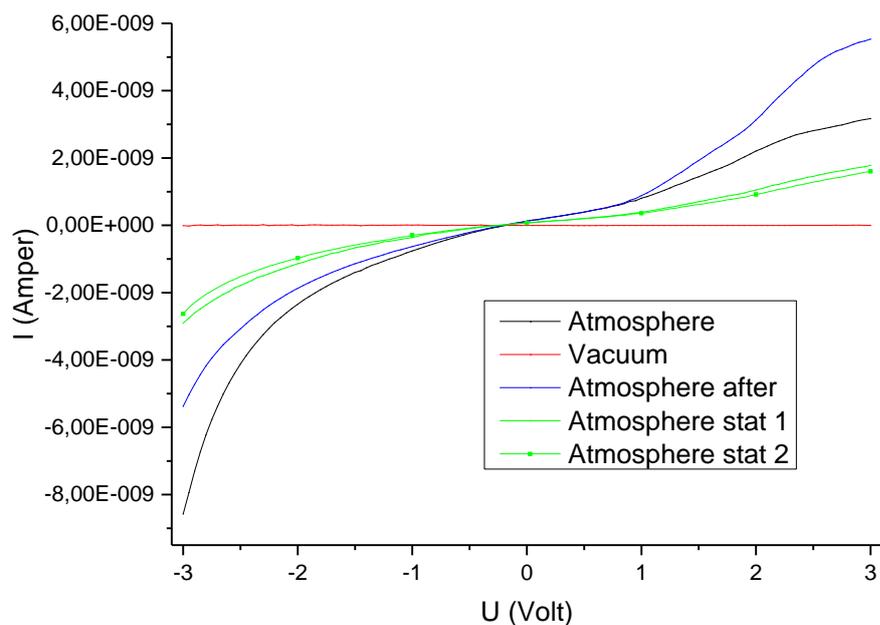


Рис. 3.5.9 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ до откачки, в вакууме и после напускания воздуха.

С данной гипотезой хорошо согласуются результаты эксперимента по нагреванию того же образца в атмосфере (Рис 3.5.10). С увеличением температуры проводимость падает, что может быть объяснено выходом из системы молекул воды под действием температуры.

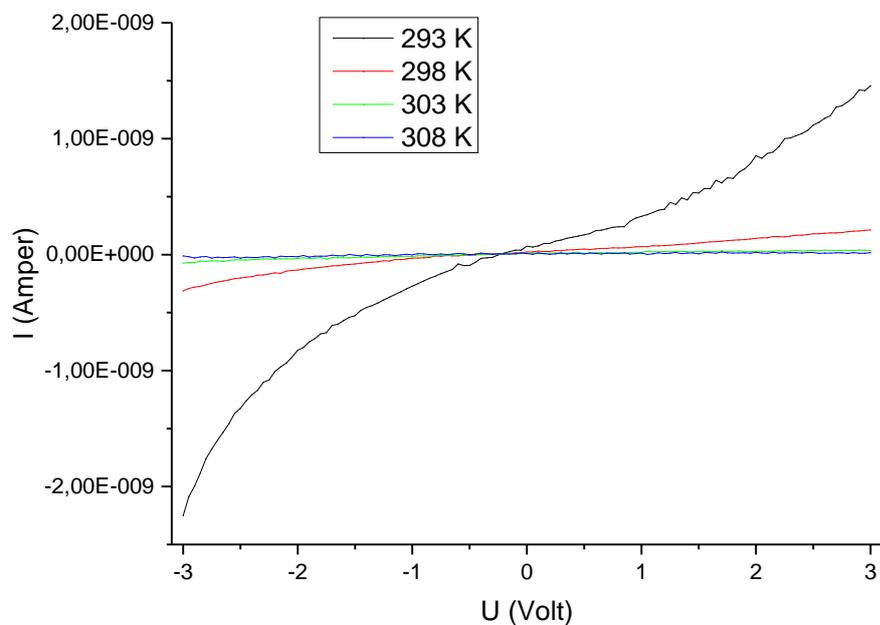


Рис. 3.5.10 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ в атмосфере при разных температурах.

Охлаждение данного образца в вакууме никак не сказалось на его проводимости, имеющей в данных условиях значения соответствующие пустой подложке (Рис 3.5.11).

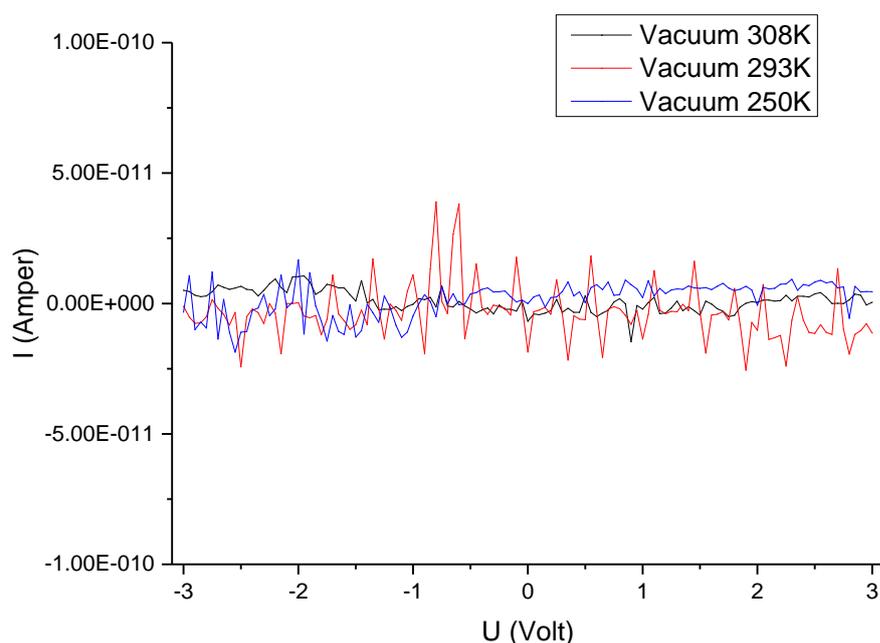


Рис. 3.5.11 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ в вакууме при разных температурах.

Далее был приготовлен раствор стандартной восстановленной системы ДНК + Ag-Phen + NaBH₄. В целях достижения более равномерного расположения исследуемых структур на стеклянных подложках, на поверхности подложек наносили структуры из раствора в каплях объемом порядка 2 микролитров и затем их высушивали во время вращения на спинкоатере с частотой 3000 оборотов в минуту. Далее на поверхность образовавшихся структуры были напылены золотые контакты (см раздел 2.7). Данная серия из 4 образцов обладала схожими морфологическими и электрофизическими свойствами. На рисунке 3.5.12 приведены снимки с оптического микроскопа зазора между контактами на поверхности высушенной структуры одного из образцов серии, а на рисунке 3.5.13 его вольт – амперная характеристика. Порядок величины проводимости согласуется с предыдущим экспериментом. Как и в предыдущем эксперименте, помещение образца в вакуум понижает его проводимость до уровня пустой подложки.

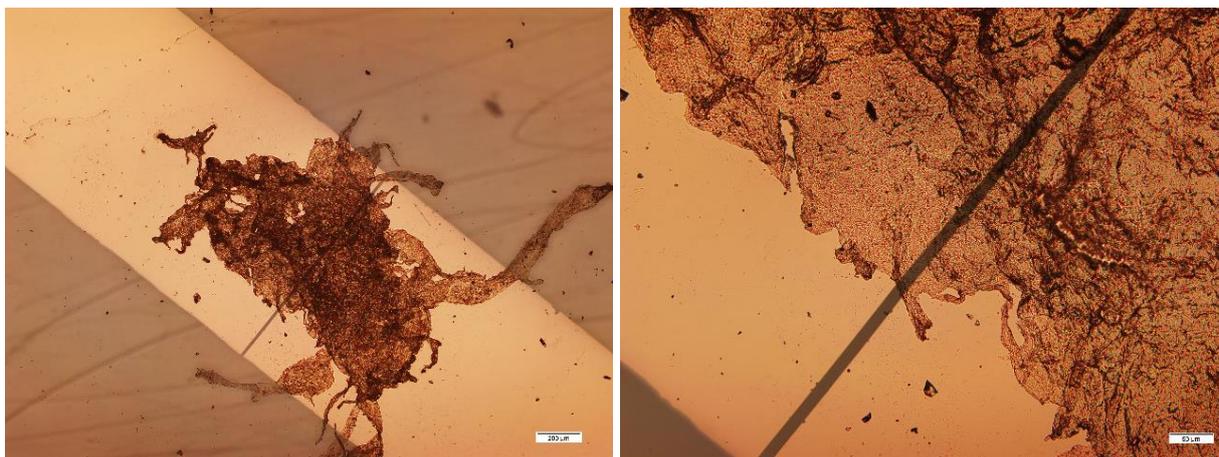


Рис. 3.5.12 Зазор между контактами на поверхности высушенной структуры из раствора ДНК + Ag-Phen + NaBH_4 .

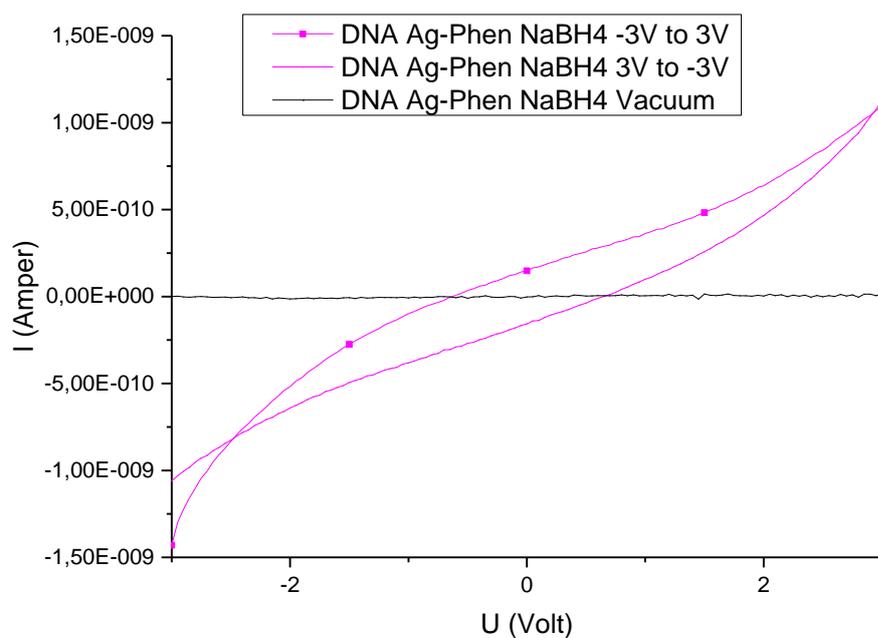


Рис. 3.5.13 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH_4 до откачки и в вакууме.

Был проведен эксперимент с аналогичной методикой фиксации структур на подложках при помощи спинкоатера с предварительным более длительным выдерживанием структур в растворе после добавления восстановителя. Образовавшийся в результате осадок имел более темный, практически черный цвет, отвечающий более крупным наночастицам серебра. Несмотря на это, образцы данной серии показали проводимость на уровне шума.

Также в целях увеличения содержания металлического серебра в составе структур был приготовлен образец с утроенной концентрацией Ag-Phen ($C(\text{Ag-Phen}) = 13,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). На поверхности стекла был высушен осадок из раствора и на него напылены контакты (на рис 3.5.13 представлены снимки контактов на поверхности образца). Электрофизические свойства данного образца схожи со свойствами системы со стандартной концентрацией компонент, но величины токов имеют на два порядка большие значения при аналогичных напряжениях (Рис 3.5.14 и 3.5.15). Так, в вакууме проводимость заметно падает, а затем, с течением времени после напуска атмосферы, начинает восстанавливаться. Необходимо отметить, что в этом образце восстановление проводимости происходит заметно медленнее, чем в стандартной системе.

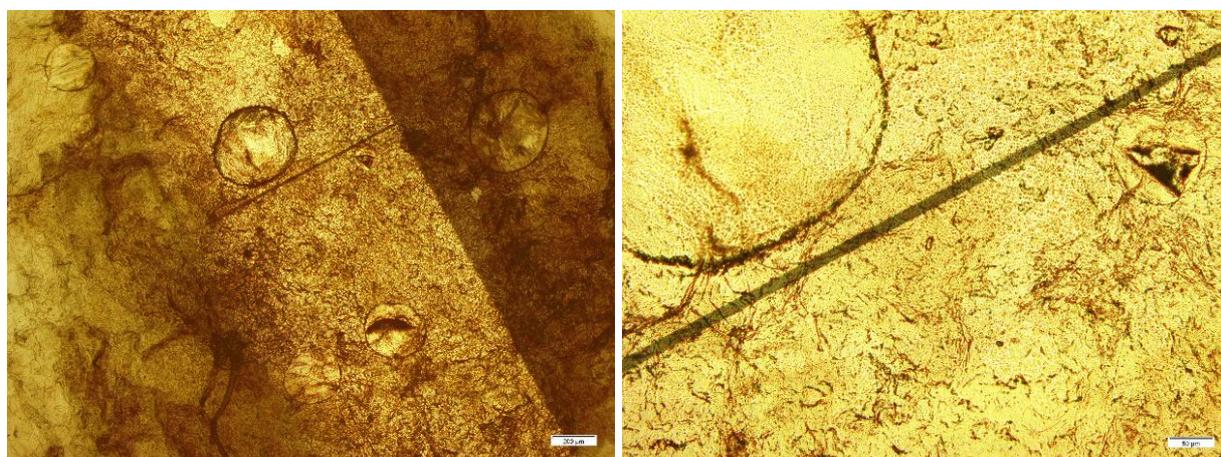


Рис. 3.5.13 Зазор между контактами на поверхности высушенной структуры из раствора ДНК + Ag-Phen + NaBH_4 с утроенной концентрацией Ag-Phen.

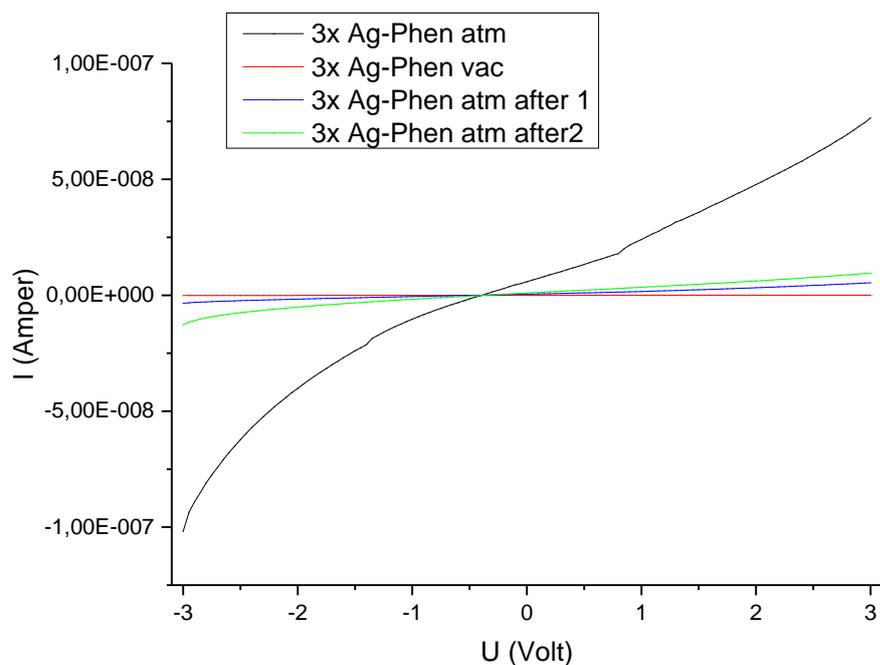


Рис. 3.5.14 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ с утроенной концентрацией Ag-Phen до откачки, в вакууме и после напускания воздуха на линейных шкалах.

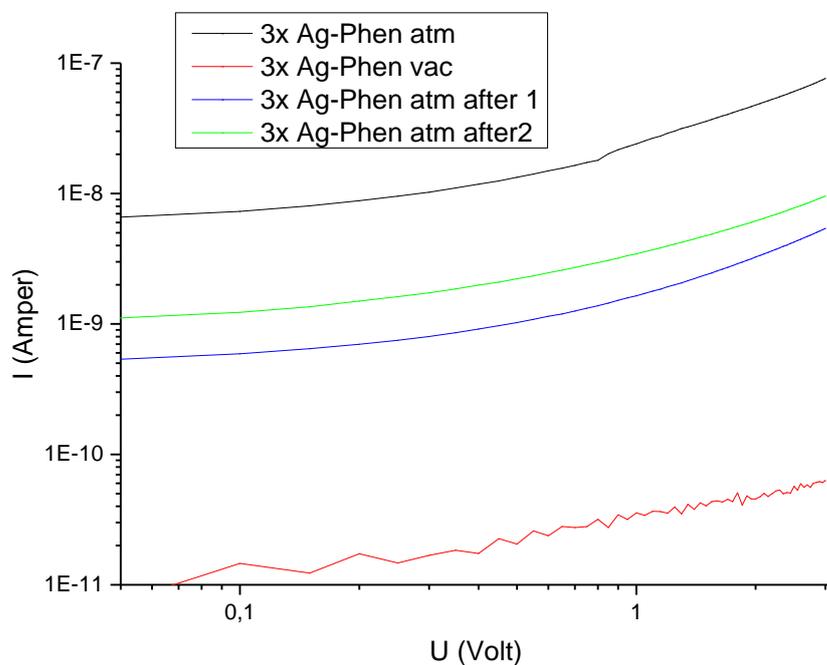


Рис. 3.5.15 ВАХ образца ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ с утроенной концентрацией Ag-Phen до откачки, в вакууме и после напускания воздуха на логарифмических шкалах.

Таким образом, комплекс ДНК + Ag-Phen + NaBH₄ обладает заметно лучшей проводимостью, чем все компоненты его составляющие. При этом основной механизм проводимости обусловлен молекулами воды, связанными с исследуемой структурой в атмосферном окружении. При помещении данных структур в вакуум проводимость падает до уровня шума, но при напуске атмосферы постепенно восстанавливается, что может также быть объяснено связыванием молекул воды. При этом присутствие серебра играет решающую роль (проводимость ДНК без серебра существенно меньше). Количество восстановленного серебра и его способ расположения (например, размер серебряных наночастиц) в составе структур влияет на величину их проводимости, но не сказывается на механизме переноса заряда.

Выводы

- Показано, что в растворе соединение взаимодействует с молекулой ДНК. При этом формируются комплексы, в которых серебро координируется к атомам азота оснований ДНК, а фенантролин, связанный с серебром, упорядоченно располагается на поверхности спирали. Фенантролиновый лиганд, выходящий в раствор, вступает во взаимодействие с макромолекулой, интеркалируя между основаниями.
- При больших концентрациях Ag-Phen или фенантролина в растворе ДНК образуются фибриллы. Наличие иона серебра в составе исследуемого соединения необходимо для образования более устойчивых, крупных и однородных структур.
- Добавление восстановителя изменяет свойства поверхности фибрилл и делает их более стабильными по отношению к таким воздействиям, как понижение pH.
- Восстановленные структуры имеют лучшую проводимость, чем любые компоненты данной системы в различных сочетаниях. Увеличение количества серебра в составе структур увеличивает их проводимость. Увеличение концентрации восстановителя или времени восстановления напротив, сказываются на ней негативно. Во всех системах проводимость осуществляется за счет связанных молекул воды и при помещении образца в вакуум падает до уровня шума.

Список литературы

1. A.V. Pinheiro, D. Han, W.M. Shih and H. Yan. Challenges and Opportunities for Structural DNA Nanotechnology. *Nat. Nanotechnol.* (2011) 6: 763 – 72.
2. N.C. Seeman. Nanomaterials Based on DNA. *Annu. Rev. Biochem.* (2010) 79: 65 – 87.
3. C. Lin, Y. Liu, H. Yan. Designer DNA Nanoarchitectures. *Biochemistry* (2009) 48: 1663 – 1674.
4. E. Stulz, G.H. Clever, K. Yamana, A. Erbe, J.K. Barton, A.L. Furst, M.A. Grodick, J. Choi and T. Majima. DNA in Supramolecular Chemistry and Nanotechnology. (2015).
5. H. Yan et al. DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires. *Science* (2003) 301: 1882 – 1884.
6. B. Saccà et al. Orthogonal Protein Decoration of DNA Origami. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2010) 49: 9378 – 9383.
7. B.A.R Williams et al. Self-Assembled Peptide Nanoarrays: an Approach to Studying Protein-Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2007) 46: 3051 – 3054.
8. H.T. Maune et al. Self-Assembly of Carbon Nanotubes into Two-Dimensional Geometries Using DNA Origami Templates. *Nature Nanotech.* (2010) 5: 61 – 66.
9. C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic and J.J. Storhoff. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* (1996) 382: 607.
10. J. Zhang, Y. Liu, J. Ke and H. Yan. Periodic Square-like Gold Nanoparticle Arrays Templated by Self-Assembled 2D DNA Nanogrids on a Surface. *Nano Lett.* (2006) 6: 248 – 251.
11. C. Brun, C. Tidiane-Diagne, C. Carmignani, S. Torrenco, P.H. Elchinger, P. Reynaud, A. Thuairre, S. Cheramy, D. Gasparutto, R. Tiron, A. Filoramo and X. Baillin. Development of a Statistical Approach for DNA-Based Nanowires Electrical Study. *Microelectronics Packaging Conference* (2015).
12. J. Pate. Fabrication and Characterisation of DNA-Templated Copper Nanowires. Newcastle University (2013).
13. A. Ongaro, F. Griffin, P. Beecher, L. Nagle, D. Iacopino, A. Quinn, G. Redmond and D. Fitzmaurice. DNA-Templated Assembly of Conducting Gold Nanowires between Gold Electrodes on a Silicon Oxide Substrate. *Chem. Mater.* (2005) 17: 1959 – 1964.
14. O. Harnack, W.E. Ford, A. Yasuda and J.M. Wessels. Tris(hydroxymethyl)phosphine-Capped Gold Particles Templated by DNA as Nanowire Precursors. *Nanoletters* (2002) 2(9): 919 – 923.
15. E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan and G. Ben-Yoseph. DNA Templated Assembly and Electrode Attachment of a Conducting Silver Wire. *Nature* (1998) 391: 775.
16. J. Richter. Metallization of DNA. *Physica E* (2003) 16: 157 – 173.

17. Q. Gu, C. Cheng, R. Gonela, S. Suryanarayanan, S. Anabathula, K. Dai and D.T. Haynie. DNA Nanowire Fabrication. *Nanotechnology* (2006) 17: R14 – R25.
18. J. Lu, L. Yang, A. Xie and Y. Shen. DNA-Templated Photo-Induced Silver Nanowires: Fabrication and Use in Detection of Relative Humidity. *Biophysical Chemistry* (2009) 145: 91 – 97.
19. B. Uprety, E.P. Gates, Y. Geng, A.T. Woolley and J.N. Harb. Site-Specific Metallization of Multiple Metals on a Single DNA Origami Template. *Langmuir* (2014) 30: 1134 – 1141.
20. T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.M. Lin, H. Jaeger and S.L. Lindquist. Conducting Nanowires Built by Controlled Self-Assembly of Amyloid Fibers and Selective Metal Deposition. *PNAS* (2003) 100(8): 4527 – 4532.
21. S. Roy, H. Vedala, A.D. Roy, D. Kim, M. Doud, K. Mathee, H. Shin, N. Shimamoto, V. Prasad and W. Choi. Direct Electrical Measurements on Single-Molecule Genomic DNA Using Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters* (2008) 2(1): 26 – 30.
22. R.K. Narla, Y. Dong, O.J. D’Cruz, C. Navara and F.M. Uckun. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) Sulfatoxovanadium(IV) as a Novel Apoptosis-Inducing Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research* (2000) 6: 1546 – 1556.
23. S. Roy, K.D. Hagen, P.U. Maheswari, M. Lutz, A.L. Spek, J. Reedijk and G.P. van Wezel. Phenanthroline Derivatives with Improved Selectivity as DNA-Targeting Anticancer or Antimicrobial Drugs. *ChemMedChem* (2008) 3: 1427 – 1434.
24. P. Thapa and E.S. Lee. 2,4-Diaryl-5,6-dihydro-1,10-phenanthrolines with Furyl or Thienyl Moiety at 4-Position: Synthesis, Topoisomerase I and II Inhibitory Activity, and Cytotoxicity. *Bull. Korean Chem. Soc.* (2012) 33(5): 1769 (N).
25. W.H. Mahmoud, G.G. Mohamed and M.M.I. El-Dessouky. Synthesis, Characterization and in vitro Biological Activity of Mixed Transition Metal Complexes of Lornoxicam with 1,10-phenanthroline. *Int. J. Electrochem. Sci.* (2014) 9: 1415 – 1438.
26. A. Bencinia and V. Lippolis. 1,10-Phenanthroline: A Versatile Building Block for the Construction of Ligands for Various Purposes. *Coordination Chemistry Reviews* (2010) 254(17–18): 2096 – 2180.
27. M. Grzelczak, N. Kulisic, M. Prato and A. Mateo-Alonso. Multimode Assembly of Phenanthroline Nanowires Decorated with Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* (2010) 46: 9122 – 9124.
28. M. Grzelczak, N. Kulisic, M. Prato and A. Mateo-Alonso. The Influence of Molecular Structure on the Self-Assembly of Phenanthroline Derivatives into Crystalline Nanowires. *Part. Part. Syst. Charact.* (2014) 31: 121 – 125.

29. И. Сердюк, Н. Заккай и Дж. Заккай. Методы в Молекулярной Биофизике. (2009) 1, 2.
30. Теоретические Основы Сканирующей Электронной Микроскопии для Пользователей МРЦ-НТ.
31. А.С. Спирин. Биохимия (1958) 23: 656 – 662.
32. A.S. Spirin. Spectrophotometry Determination of Total Amount of Nucleic Acids. Biokhimiya (1958) 23(4): 656 – 662.
33. P.A. Sokolov, N.V. Bazlov, A.O. Puchkova, O.F. Vyvenko and N.A. Kasyanenko. DNA Immobilization on n-type Silicon Surface and Electrophysical Properties of Au-DNA-(n-Si) Structures. Prot. Met. Phys. Chem. Surf. (2011) 47: 566, doi:10.1134/S2070205111050170.