



УДК [546.26-03]-042.4:[602+604]

**О. М. Бурлака, Я. В. Пірко, П. С. Смертенко, О. Ф. Коломис,
В. О. Глазунова, Т. Є. Константинова, А. І. Ємець,
академік НАН України Я. Б. Блюм**

Функціоналізація вуглецевих нанотрубок за допомогою молекул біологічного походження різної природи

З метою розширення можливостей застосування вуглецевих нанотрубок (ВНТ) у біотехнології досліджено здатність молекул біологічного походження взаємодіяти із ВНТ. Показано формування стабільних водних полідисперсних колоїдних систем одношарових та багатшарових ВНТ, нековалентно функціоналізованих за допомогою ряду біомолекул — дволанцюгової ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, аденозинтрифосфату натрію, бичачого сироваткового альбуміну, білків екстракту склистої тіла, гумату натрію. Наведено результати раманівської спектроскопії, трансмісійної електронної та атомно-силової мікроскопії зразків функціоналізованих ВНТ, що свідчать про ряд морфологічних та структурних змін, спричинених функціоналізацією. Обговорюються механізми нековалентної взаємодії біомолекул з ВНТ.

Залучення нанотехнологічного інструментарію до вирішення сучасних завдань біотехнології відкриває якісно новий етап у розробці нових методів спрямованої доставки “сполук інтересу” в клітини як прокаріотів, так і еукаріотів. У рамках вдосконалення існуючих та розробки нових методів генетичної трансформації вуглецеві нанотрубки (ВНТ), які мають низку виняткових властивостей, можна розглядати як потенційно високоефективні переносники чужинної ДНК у рослинні клітини [1–3]. ВНТ здатні проникати крізь мембрану клітин і клітинну стінку усередину клітин рослин, не виявляючи при цьому значної цитотоксичності [4]. Крім того, вони можуть проходити не лише в ядро, а й у такі субклітинні структури, як мітохондрії та пластиди, що дає можливість прогнозувати їх застосування у ході розробки нових методів модифікації генетичного матеріалу цих органел. Основними напрямками розробки методів застосування ВНТ у біологічних дослідженнях є підвищення біологічної сумісності ВНТ, керованості процесу їх проникнення усередині організму та зниження токсичності. З огляду на недоліки та обмеження існуючих методів опанування шляхів екологічно безпечної і біологічно сумісної функціоналізації ВНТ є пріоритетним напрямом для розширення можливостей біологічного застосування [3]. Вирішення цього

© О. М. Бурлака, Я. В. Пірко, П. С. Смертенко, О. Ф. Коломис, В. О. Глазунова, Т. Є. Константинова, А. І. Ємець, Я. Б. Блюм, 2015

завдання здебільшого передбачає зміну поверхневих характеристик ВНТ (функціоналізацію) за допомогою методів їх ковалентної та нековалентної хімічної модифікації.

Оскільки в біологічних системах основним розчинником і дисперсним середовищем є вода, подолання гідрофобності ВНТ є вихідним етапом подальших розробок у даній сфері. На сьогодні розроблена значна кількість методів ковалентної функціоналізації ВНТ, проте використання продуктів такої функціоналізації в біологічних дослідженнях обмежується рядом факторів. Ковалентно функціоналізовані ВНТ часто мають підвищену реактивність та токсичність порівняно з чистими ВНТ, що обмежує їх застосування в живих системах. Крім того, для ковалентної функціоналізації ВНТ використовуються токсичні реагенти (кислоти, карбени, фтор, арильні радикали, азометинові іліди) та значні енергетичні ресурси, внаслідок чого ці підходи є екологічно небезпечними і економічно неефективними [5]. Звісно, реалізація таких підходів суперечить загальній тенденції “озеленення” нанотехнологій у рамках розгортання стратегій “зеленої хімії” [6]. А поряд з цим застосування вищевказаних методів функціоналізації ВНТ обмежує можливості розробки та впровадження ефективних нанотехнологічних рішень у розв’язання існуючих завдань генетичної інженерії.

Для того щоб досягти прогресу у вирішенні цього питання, необхідно охарактеризувати закономірності здатності різних молекул біологічного походження та їх похідних нековалентно взаємодіяти з ВНТ. Нековалентна функціоналізація ВНТ базується на використанні сил Ван-дер-Ваальса та π - π -стекинг взаємодій між поліароматичною графеновою поверхнею нанотрубок та ароматичними ділянками функціоналізованих молекул. При цьому реактивність ВНТ пов’язана з розбіжністю π -орбіталей суміжних атомів карбону внаслідок деформації, індукованої просторовим викривленням [7]. Власне, процес функціоналізації реалізується шляхом адсорбції чи згортання амфифільних молекул, ароматичних сполук, полімерів тощо навколо поверхні ВНТ [3, 5]. При цьому дистальне орієнтування гідрофільних доменів функціоналізованих молекул опосередковує диспергування ВНТ у водному середовищі.

Оскільки нековалентна функціоналізація ВНТ з використанням біомолекул розглядається як доцільна альтернатива існуючим методам зміни їх поверхневих властивостей, з’ясування цих закономірностей допоможе вирішити проблему отримання нековалентно функціоналізованих ВНТ для подальшого використання в генетичній інженерії, зокрема для їх застосування як переносників ДНК у рослинні клітини. Саме тому метою даного дослідження було охарактеризувати здатність ряду молекул біологічного походження, які належать до різних класів, та їх похідних нековалентно взаємодіяти з ВНТ.

У проведеному дослідженні використовували комерційні одношарові та багатшарові ВНТ (табл. 1). Для їх функціоналізації застосовувалися такі речовини: нуклеїнова кислота — дволанцюгова плазмідна ДНК (0,5 мг/мл), ізольована за методом [8] із попередньо трансформованих компетентних клітин *Escherichia coli* штаму DH5 α ; суміш рівних кількостей мономерів ДНК — чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів дНТФ (сумарна концентрація 1 мг/мл) (“Sigma”, США); аденозинтрифосфат натрію (АТФ-Na) (10 мг/мл) (“Дарниця”, Україна); бичачий сироватковий альбумін (БСА) — глобулярний білок із молекулярною масою 64 кДа (10 мг/мл) (“Sigma”, США); високомолекулярна органічна сполука — гумат натрію (10 мг/мл) (“Humintech GmbH”, Німеччина); екстракт склистої тіла (“Біофарма”, Україна), що містить білки та гіалуронову кислоту; амінокислота L-пролін (10 мг/мл) (“Sigma”, США); продукт часткового ферментативного гідролізу білків — пептон (10 мг/мл) (“Альфарус”, Україна) та сечовину (“Sigma”, США).

До всіх зразків додавали ВНТ у концентрації 1 мг/мл. В експериментах з функціоналізації ВНТ використовували бідистильовану воду, отриману за допомогою Barnstead EasyPure II ("Thermo Scientific", США). Як контроль також використовували бідистильовану воду. Зразки перемішували на вортексі протягом 3 хв (Microspin, BioSan FV-2400, Латвія), після чого обробляли ультразвуком частотою 22 кГц (UM-4, Unitra, Unima Olsztyn, Польща) при 25 °С протягом різних проміжків часу (20, 40, 60 хв). Ультразвукову обробку застосовували для ініціювання процесу функціоналізації ВНТ, оскільки вона сприяє подоланню вандерваальсових взаємодій між гідрофобними поверхнями ВНТ та дезагрегації останніх [9], а також забезпечує зміни конформації функціоналізованих молекул, сприятливі для взаємодії їх гідрофобних сайтів з поверхнею ВНТ [10]. Після ультразвукової обробки зразки центрифугували 10 хв при 16000 g (Eppendorf 5417R, Німеччина) для видалення агломератів недиспергованих ВНТ. Для подальших аналізів отримані колоїдні розчини зберігали при 4 °С.

Трансмисійну електронну мікроскопію зразків функціоналізованих ВНТ проводили за допомогою мікроскопа JEM-200 A ("JEOL", Японія) у режимі білого поля при прискорюючій напрузі 200 кВ [11]. Спектри комбінаційного розсіювання світла (КРС, раманівські спектри) були отримані при кімнатній температурі за допомогою спектрометра Horiba Jobin Yvon T64000 (Японія), оснащеного конфокальним мікроскопом Olympus BX-41 (Японія) (довгофокусний 50-кратний об'єктив, апертура 0,60), і реєструвалися за допомогою охолодженого 1024 × 256 CCD-детектора ("Andor", Ірландія). Збудження мікро-КРС здійснювали за допомогою безперервного випромінювання Ar-Kr лазера моделі 2018-RM ("Spectra-Physics", Німеччина) з енергією збуджуючого випромінювання $E_{збуд} = 2,54$ еВ (488,0 нм). Атомно-силову мікроскопію проводили на приладі Dimension 3000 ("Digital Instruments", США).

У результаті проведених досліджень було встановлено формування стабільних водних колоїдних систем одношарових та багатшарових ВНТ, нековалентно функціоналізованих молекулами дволанцюгової ДНК, сумішшю дНТФ, АТФ-На, БСА, гумату натрію та компонентами екстракту склистого тіла. Утворені колоїдні розчини зберігали стабільність протягом 6 місяців, при цьому спостерігалася дуже незначна і повільна агрегація компонентів диспергової фази. L-пролін, пептон, спермідин та сечовина не виявили здатності нековалентно зв'язуватися з поверхнею ВНТ та диспергувати останні у воді. Очевидно, ключова роль у формуванні гідрофільних комплексів на основі ВНТ належить біомолекулам з гідрофобно-гідрофільними властивостями. Саме вони утворюють проміжну фазу, яка виступає дисперсним середовищем для гідрофобних ВНТ. У свою чергу, наявність гідрофільних доменів обумовлює здатність утворених кон'югатів диспергуватись у воді. При цьому орга-

Таблиця 1. Характеристики використаних ВНТ

Показник	Одношарові ВНТ ("Argy", Німеччина; ARS002)*	Багатшарові ВНТ ("Aldrich, США; 698849)*
Довжина, мкм	5–20	2,5–20 (10 — середня)
Діаметр, нм	1–2	6–13 — зовнішній 2–6 — внутрішній
Ступінь чистоти, мас. частка, %	90	99
Площа поверхні, м ² /г	400	220
Кількість шарів графену в стінці	1	7–13
Метод синтезу	Хімічне парофазне осадження (каталітичний піроліз вуглеводнів)	

*У дужках вказані виробник і номер продукту.

нізуюча роль у вказаних взаємодіях належить механічним ефектам ультразвукової обробки (деагрегація ВНТ і просторове розгортання молекул) та координаційному ефекту водного оточення.

Відомо, що при утворенні комплексів ДНК з ВНТ азотисті основи біомолекули вступають у π - π -стекинг взаємодію з поверхнею ВНТ, а гідрофільні цукро-фосфатні групи спрямовуються в бік дисперсного водного середовища [12]. При цьому використання дволанцюгових молекул ДНК, не поступаючись у ефективності функціоналізації, є більш ефективним і методично простим, ніж одноланцюгових. Застосування окремих дНТФ та їх похідних також може мати ряд переваг у спрощенні та підвищенні функціональності біологічного покриття ВНТ. Так, АТФ є однією з ключових енергетичних сполук біологічних систем. Адсорбована на поверхні ВНТ АТФ потенційно здатна підвищувати ефективність перенесення цільових вантажів нанотрубками у клітини-мішені за рахунок реалізації атрактивного ефекту.

Білки як природні сполуки, що містять гідрофільні та гідрофобні домени, є перспективним класом біомолекул для функціоналізації ВНТ. Їхня гідрофобність залежить від послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюзі та значення рН середовища. Взаємодія ВНТ з водорозчинними білками та подальше утворення здатних диспергуватися у водному середовищі комплексів пов'язується з конформаційними змінами, які реалізуються шляхом розгортання та згортання молекул білка [13]. Саме цими процесами, очевидно, і може бути обумовлено диспергування ВНТ у водному середовищі, опосередковане БСА та компонентами водного екстракту склистого тіла. Останній містить протеоглікани, до складу яких входить гіалуронова кислота. Ця кислота може посилювати стабільність диспергування комплексів, які утворюються при взаємодії протеоглікану із ВНТ. При цьому гідрофобні домени органічної молекули зв'язуються зі стінкою нанотрубки, а високогідрофільна гіалуронова кислота міцно “заякорює” комплекс у водному середовищі.

Що стосується взаємодії з ВНТ гумінових кислот, останні за своїми властивостями є високомолекулярними аморфними органічними сполуками, що утворюються при розкладанні органічних решток внаслідок природних процесів. У структурі гумінових кислот загалом виділяють слабо конденсовані та заміщені ароматичні ядра, зв'язані між собою ділянками неароматичного характеру. До складу їх молекул входять карбоксильні та карбонільні групи, спиртові та фенольні гідроксили, іноді — метоксильні групи. Очевидно, наявність ароматичних ділянок та специфічних хімічних груп обумовлює здатність цих сполук та їх похідних взаємодіяти з ВНТ і диспергувати останні у водному середовищі, що і спостерігалось в наших дослідженнях.

Згідно з результатами трансмісійної електронної мікроскопії зразків функціоналізованих ВНТ можна зробити висновок про те, що біологічні молекули утворюють стабільне покриття ВНТ з формуванням седиментаційно стійкої та стійкої до інтенсивних механічних впливів дисперсної системи з низьким ступенем структурного впорядкування (рис. 1). При цьому біологічне покриття виявляє високу спорідненість до поверхні ВНТ і, взаємодіючи з поверхнею окремих нанотрубок, зумовлює ефективність їх диспергування у водному середовищі. Результати електронної мікроскопії засвідчили також, що ультразвукова обробка спричиняє істотне вкорочення ВНТ (у діапазоні 0,1–5 мкм проти вихідних 2,5–20 мкм). Важливо відзначити, що вкорочені ВНТ вважаються потенційно більш здатними ефективно проникати усередину клітин, ніж довгі ВНТ.

За результатами раманівської спектроскопії зразків (рис. 2) було зафіксовано ряд змін у ділянці радіальної дихальної моди (Radial breathing mode, RBM) — смуги низькочастот-

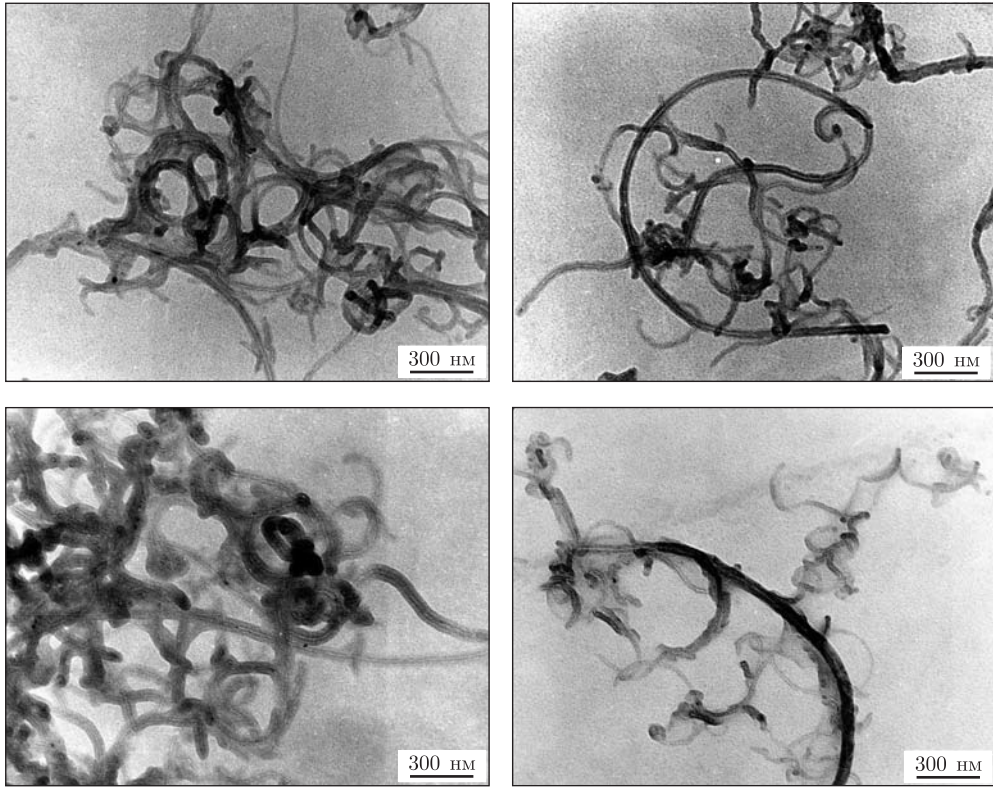


Рис. 1. Трансмісійно-електронне зображення багат шарових ВНТ, функціоналізованих молекулами дволанцюгової ДНК. ДНК утворює аморфне суцільне покриття нанотрубок

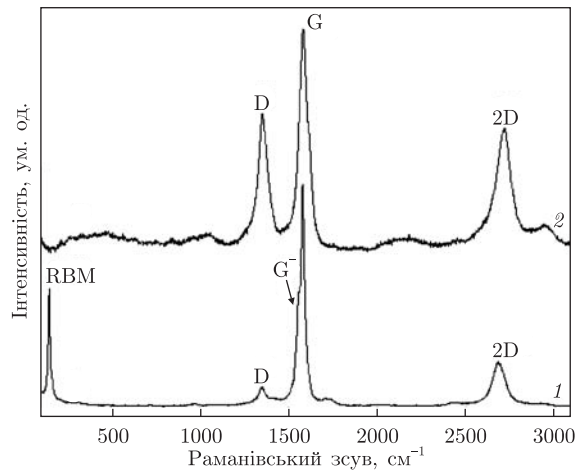


Рис. 2. Спектри раманівського розсіювання світла необроблених одношарових ВНТ (1) та функціоналізованих ДНК одношарових ВНТ (2). Смуги спектра: RBM — радіальна дихальна мода, D-смуга, G-смуга, 2D-смуга

них коливань в області частот $150\text{--}250\text{ см}^{-1}$ — спектрів функціоналізованих ВНТ, порівняно з необробленими ВНТ. Наявність даної смуги обумовлена симетричними радіальними коливаннями атомів вуглецю в стінці нанотрубки. Наявність і чітка вираженість цієї смуги є характерною ознакою одношарових ВНТ, оскільки в багат шарових ВНТ радіаль-

ним коливанням атомів вуглецю перешкоджають стінки сусідніх шарів трубок. У зразку функціоналізованих одношарових ВНТ дана смуга відсутня через наявність функціоналізуючого покриття на поверхні нанотрубки.

Іншою характерною особливістю спектрів КРС ВНТ є наявність у них G-смуги, яка є найбільш інтенсивною і знаходиться в області 1500–1600 cm^{-1} . Дана смуга обумовлена тангенціальними коливаннями атомів вуглецю в площині графенового шару. Пік G^+ даної смуги викликаний коливаннями атомів вздовж осі ВНТ, тоді як G^- пік пов'язаний із коливаннями в перпендикулярних до осі напрямках. Залежно від структурної досконалості та величини викривленості графенового шару G-смуга може відрізнитися за частотою і формою. Наприклад, у спектрах КРС (раманівських спектрах) чистого графіту G-смуга має вузьку і нерозділену форму. У зразку функціоналізованих молекулами ДНК одношарових ВНТ напівширина G-смуги значно переважає напівширину даної смуги зразка вихідних одношарових ВНТ.

D-смуга присутня в діапазоні 1250–1450 cm^{-1} спектрів КРС усіх вуглецевих матеріалів, включаючи аморфний вуглець. Вона обумовлена коливальною модою, пов'язаною з крайовими ефектами графену і, певною мірою, може вказувати на наявність порушень його структури. Підвищена інтенсивність цієї смуги може бути спричинена високою концентрацією аморфної фази, високим вмістом дефектних трубок чи великою кількістю коротких трубок, у яких крайові ефекти є більш вираженими. За інтенсивністю цієї смуги визначають дефектність, тобто ступінь порушення симетрії ідеального графітового шару з sp^2 -гібридизацією атомів вуглецю. Відношення значень інтенсивності смуг D/G характеризує співвідношення у зразку кількості матеріалів з неупорядкованою і упорядкованою структурою. Згідно з отриманими результатами, для функціоналізованих зразків одношарових ВНТ було помітно зростання співвідношення D/G порівняно з таким для вихідних ВНТ, що може свідчити про підвищення ступеня порушення симетрії, збільшення дефектності ідеальної sp^2 -гібридизованої структури ВНТ та переважання фракції коротких ВНТ після функціоналізації.

Результати атомно-силової мікроскопії зразків (рис. 3) підтверджують збільшення діаметра структур на основі функціоналізованих ВНТ порівняно з необробленими ВНТ. Так, наведений на рис. 3, в топографічний профіль показує, що діаметр функціоналізованої багатошарової ВНТ за шкалою становить близько 30 нм, тоді як максимальний зовнішній діаметр використаних у дослідженні чистих багатошарових ВНТ — 13 нм згідно з даними виробника (див. табл. 1). Діаметр функціоналізованих одношарових ВНТ також істотно збільшувався після функціоналізації. Це явище, загалом, підтверджує адсорбцію функціоналізуючих молекул на поверхні нанотрубок з утворенням суцільного покриття індивідуальних ВНТ біомолекулами.

Таким чином, у результаті проведених досліджень показано нековалентну взаємодію ряду біологічних молекул та їх похідних із одношаровими та багатошаровими ВНТ, яка приводить до утворення здатних стабільно диспергуватися у водних середовищах комплексів. Встановлено, що процес взаємодії відбувається на рівні окремих нанотрубок та ініціює ряд змін морфологічних і структурних характеристик ВНТ. Ключова роль у формуванні водно-диспергованих комплексів належить біологічним молекулам з гідрофобно-гідрофільними властивостями. Найбільш ефективними сполуками для функціоналізації одношарових та багатошарових ВНТ, за результатами наших досліджень, виявилися дволанцюгова ДНК, суміш дНТФ, натрієва сіль АТФ, БСА, компоненти екстракту склистого тіла та гумат натрію.

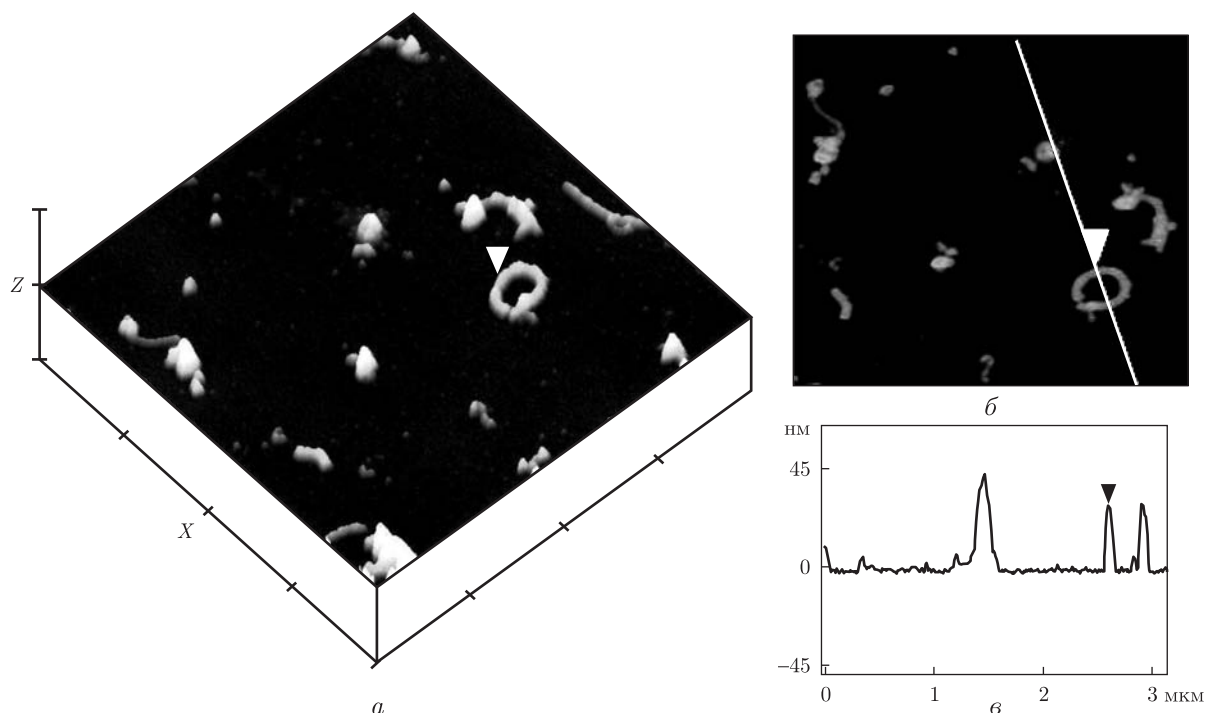


Рис. 3. Результати атомно-силової мікроскопії зразків функціоналізованих за допомогою ДНК багат шарових ВНТ. *a* – тривимірне зображення, ціна поділки по осі *X* – 1000 нм, по осі *Z* – 200 нм; *б* – двовимірне зображення з лінією топографічного перерізу в перпендикулярній площині; *в* – двовимірний топографічний переріз. Трикутник вказує на функціоналізовану ВНТ

1. Serag M. F., Kaji N., Gaillard C. et al. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells // *ACS Nano*. – 2011. – **5**, No 1. – P. 493–499.
2. Rafsanjani M. S., Alvari A., Samim M. et al. Application of novel nanotechnology strategies in plant biotransformation: a contemporary overview // *Recent Pat. Biotechnol.* – 2012. – **6**. – P. 69–79.
3. Ramos-Perez V., Cifuentes A., Coronas N. et al. Modification of carbon nanotubes for gene delivery vectors // *Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1025 / Eds. P. Bergese, K. Hamad-Schifferli. – New York: Springer Science, 2013. – P. 261–269.
4. Liu Q., Chen B., Wang Q. et al. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells // *Nano Lett.* – 2009. – **9**, No 3. – P. 1007–1010.
5. Karousis N., Tagmatarchis N., Tasis D. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes // *Chem. Rev.* – 2010. – **110**, No 9. – P. 5366–5397.
6. Virkutyte J., Varma R. S. Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization // *Chem. Sci.* – 2011. – **2**. – P. 837–846.
7. Geckeler K. E., Premkumar T. Carbon nanotubes: are they dispersed or dissolved in liquids? // *Nanosc. Res. Lett.* – 2011. – **6**. – 136, 3 p.
8. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. – 1990. – **96**. – P. 23–28.
9. Cheng Q., Debnath S., Gregan E., Byrne H. J. Ultrasound-assisted SWNTs dispersion: effects of sonication parameters and solvent // *J. Phys. Chem. C*. – 2010. – **14**. – P. 8821–8827.
10. Lamprecht C., Danzberger J., Lukanov P. et al. AFM imaging of functionalized doublewalled carbon nanotubes // *Ultramicroscopy*. – 2009. – **109**, No 8. – P. 899–906.
11. Шиммель Г. Методика электронной микроскопии. – Москва: Мир, 1972. – 300 с.
12. Nakashima N., Okuzono S., Murakami H. et al. DNA dissolves single-walled carbon nanotubes in water // *Chem. Lett.* – 2003. – **32**, No 5. – P. 456–457.

13. Zorbas V., Smith A. L., Xie H. et al. Importance of aromatic content for peptide/single-walled carbon nanotube interactions // J. Amer. Chem. Soc. – 2005. – **127**. – P. 12323–12328.

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова

НАН України, Київ

Донецький фізико-технічний інститут

ім. О. О. Галкіна НАН України

Надійшло до редакції 01.10.2014

**О. Н. Бурлака, Я. В. Пирко, П. С. Смертенко, А. Ф. Коломыс,
В. А. Глазунова, Т. Е. Константинова, А. И. Емец,
академик НАН Украины Я. Б. Блюм**

Функционализация углеродных нанотрубок с помощью молекул биологического происхождения различной природы

Для расширения возможностей применения углеродных нанотрубок (УНТ) в биотехнологии исследована способность молекул биологического происхождения взаимодействовать с УНТ. Показано формирование стабильных водных полидисперсных коллоидных систем однослойных и многослойных УНТ, нековалентно функционализированных с помощью ряда биомолекул – двуцепочной ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, аденозинтрифосфата натрия, бычьего сывороточного альбумина, белков экстракта стекловидного тела, гумата натрия. Приведены результаты рамановской спектроскопии, трансмиссионной электронной и атомно-силовой микроскопий функционализированных УНТ, которые свидетельствуют о ряде морфологических и структурных изменений, вызванных функционализацией. Обсуждаются механизмы нековалентного взаимодействия биомолекул с УНТ.

**O. M. Burlaka, Ya. V. Pirko, P. S. Smertenko, O. F. Kolomys,
V. O. Glazunova, T. E. Konstantinova, A. I. Yemets,
Academician of the NAS of Ukraine Ya. B. Blume**

Functionalization of carbon nanotubes using biological molecules of various nature

In order to expand biotechnological applications of carbon nanotubes (CNTs), the ability of biological molecules to interact with CNTs is studied. We report the formation of stable aqueous polydisperse colloidal systems of SWNTs and MWNTs non-covalently functionalized with several biomolecules – double-stranded DNA, deoxyribonucleotide triphosphates, adenosine triphosphate sodium salt, bovine serum albumin, vitreous body extract proteins and sodium humate. The results of Raman spectroscopy, transmission electron and atomic-force microscopies of functionalized CNTs demonstrating morphological and structural changes in CNTs caused by the functionalization are shown. Mechanisms of non-covalent biomolecules-CNTs interactions are discussed.