

Лантух Ю.Д., Пашкевич С.Н.
Оренбургский государственный университет
E-mail: lantukh@yandex.ru

СУПЕРЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В ПЛЕНОЧНЫХ СТРУКТУРАХ ДНК-КРАСИТЕЛЬ

Предложен способ получения оптически однородных пленочных структур на основе дуплексной ДНК, сформированных по принципу «гость-хозяин», в которых молекулы красителя («гость») обладают высокой флуоресцентной способностью. Получена суперлюминесценция красителя пиронина G в такой системе.

Ключевые слова: пленки ДНК, принцип «гость-хозяин», пиронин G, суперлюминесценция.

Актуальность

Молекула ДНК, являющаяся носителем генетической информации, в последнее время рассматривается в качестве одного из кандидатов на роль основного конструктивного элемента при создании новых материалов в нанотехнологиях [1].

Такой подход основан на специфических физико-химических свойствах, присущих ДНК, например, способности к самосборке и формированию упорядоченных структур из встраиваемых наночастиц, наличии отрицательного заряда, достаточной жесткости в ближнем порядке и др.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования по применению ДНК в молекулярной фотонике [2].

Нуклеиновые кислоты не обладают светочувствительностью в видимой области спектра (максимум поглощения оснований ДНК находится в районе 260 нм), поэтому создание материалов для оптоэлектронных приложений требует введения в их состав спектральных sensibilizаторов. В качестве таковых могут быть использованы органические красители.

Многие органические красители (акридиновые, тиазиновые и др.) являются биологически активными соединениями, демонстрирующими мутагенную активность и фотодинамическое действие. Такие эффекты возможны благодаря связыванию молекул красителей с ДНК. Обладая высоким квантовым выходом флуоресценции, некоторые красители широко используются в биологии в качестве молекулярных люминесцентных зондов.

Информация о механизмах связывания органических красителей с ДНК важна также для создания оптоэлектронных материалов и устройств на базе таких систем.

Взаимодействие органических красителей, в том числе акридиновых и ксантеновых, с нуклеиновыми кислотами в растворах интенсивно изучалось с использованием различных методов в течение последних десятилетий. Спектроскопические исследования позволили получить важную информацию о комплексах связывания таких красителей как акридиновый оранжевый и пиронин G с ДНК в водных буферных растворах [3-7]. Однако спектрально-люминесцентные свойства полимерных пленок ДНК с внедренными молекулами красителей практически не изучены.

В работе [8] нами с помощью спектроскопических методов было проведено исследование конформационного состояния ДНК в форме пленочных структур, содержащих органический краситель акридиновый оранжевый. Было показано, что молекулы ДНК в сухих пленках при комнатной влажности воздуха (о.в. ~ 50%) денатурированы, краситель связывается с биополимером с образованием нескольких типов комплексов. Молекулы красителя, связанные с биополимером в виде комплексов различного типа, представляют собой разнородные оптические центры. Присутствие в системе таких центров приводит к различию частот электронных переходов, что обуславливает проявление неоднородного уширения оптических спектров. Было показано также, что флуоресценция красителя в сухих пленках ДНК практически отсутствует. По нашему мнению этот факт может объясняться присутствием в системе нелюминесцирующих ассоциатов красителя, переносом энергии электронного возбуждения от мономерных молекул красителя на такие ассоциаты, а также повышенной конформационной подвижностью одноцепочечных фрагментов

ДНК, что может приводить к увеличению вклада процессов безызлучательной релаксации.

Нами установлено, что эффект стабилизации В-формы ДНК даже при пониженных значениях о.в. среды может быть достигнут путем внесения в полимерные пленки добавок глицерина. Данные электронной и колебательной спектроскопии [8] свидетельствуют о том, что в исследуемых образцах наблюдается сохранение двуспиральной структуры ДНК. По нашему мнению, стабилизирующее влияние добавки может быть обусловлено, как высокой способностью глицерина удерживать сорбционную воду, так и непосредственным взаимодействием молекул глицерина с ДНК, сопоставимым с влиянием молекул воды на состояние двойной спирали. Молекулы красителя акридинового оранжевого в такой системе присутствуют в виде наноразмерных оптически активных центров одного типа, которые формируются благодаря самосборке по принципу «гость-хозяин». В качестве «гостя» выступают молекулы красителя, а «хозяина» – сайты связывания интеркаляционного типа молекул нативной ДНК. При этом неоднородное уширение спектров красителя отсутствует, и люминесцентный канал дезактивации энергии электронного возбуждения получает высокую эффективность.

Цель

Исследование люминесцентных свойств биополимерных пленок ДНК-пиронин G-глицерин и получение эффекта суперлюминесценции в такой системе.

Материал и методы

Исследования проводили с натриевой солью высокомолекулярной ДНК (MP Biomedicals), выделенной из молок лосося. Для приготовления пленок ДНК растворяли в бидистиллированной воде до получения гомогенного раствора.

Глицерин (Эколаб) очищали двойной вакуумной перегонкой. Пиронин G (Sigma) использовали без дополнительной очистки.

Пленки ДНК с красителем на стеклянных подложках получали по методике, использованной в работе [8]. Соотношение содержания ДНК и красителя в растворе, выражае-

мое как отношение концентрации нуклеотидов к концентрации лиганда P/D, составляло 40 – 100.

Спектры поглощения и люминесценции регистрировали на оптоволоконном спектрометре AvaSpec 2048 (Avantes). Для возбуждения флуоресценции использовали перестраиваемый аргоновый лазер Lexcel-88 (LEXEL) и DPSS YAG-Nd cw лазер KLM-532/SLN (ФТИ-Оптроник). В качестве импульсного источника возбуждения флуоресценции использовали YAG-Nd лазер LQ-129 (Солар ЛС).

Измерения выполнялись при комнатной температуре (20 – 25 °С).

Результаты и обсуждение

В работе [8] нами был предложен способ получения оптически однородных пленочных структур на основе двуспиральной ДНК, сформированных по принципу «гость-хозяин». Интеркалированные в двойную спираль ДНК молекулы красителя акридинового оранжевого («гость») обладают высокой флуоресцентной способностью, являются однородными оптическими центрами, спектр флуоресценции которых не зависит от длины волны возбуждения.

В настоящей работе нами исследованы флуоресцентные свойства красителя пиронина G, внедренного в матрицу ДНК в форме биополимерной пленки, стабилизированной глицерином.

На рисунке 1 кривая 1 представлен спектр флуоресценции пиронина G в пленочной матрице ДНК-глицерин, полученный при лазерном возбуждении на длине волны 532 нм от DPSS YAG-Nd лазера. Такие же (по форме) спектры регистрируются при возбуждении аргоновым лазером на длинах волн 488 и 514 нм. Мощность возбуждающего лазерного излучения во всех случаях составляла 1 мВт. Наличие интенсивной флуоресценции и независимость ее спектра от длины волны возбуждения свидетельствуют о том, что, как и в случае использования красителя акридинового оранжевого, молекулы пиронина G в пленке ДНК, стабилизированной глицерином, представляют собой оптически активные центры одного типа. В сухих пленках ДНК флуоресценция пиронина G отсутствует.

Учитывая возрастающий интерес к разработкам полимерных оптических волокон

и пленок с органическими красителями как активным средам перестраиваемых лазеров [9], нами была предпринята попытка получить суперлюминесценцию биополимерных пленок ДНК– пиронин G-глицерин используя для накачки вторую гармонику импульсного YAG-Nd лазера ($\lambda=532$ нм).

Схема эксперимента с поперечной накачкой приведена на рисунке 2.

Пучок излучения лазера накачки фокусировался цилиндрической линзой на поверхности образца. Область возбуждения имела форму полоски шириной менее миллиметра. Энергия импульсов возбуждения $E_{имп}$ изменялась в пределах от 0,05 до 5 мДж, длительность импульсов составляла 15 нс. Флуоресценция образца снималась с торца пленки. Спектр флуоресценции красителя регистрировался после каждого импульса лазерного возбуждения при помощи волоконного спектрометра AvaSpec 2048, работающего по принципу полихроматора. При малых энергиях импульсов накачки (~0,1 мДж) спектр флуоресценции практически совпадает со спектром, полученным при возбуждении непрерывными лазерами (кривая 1 на рис. 1). По мере увеличения энергии импульсов возбуждения происходило возрастание интенсивности флуоресценции, а начиная с некоторого значения, оно принимало нелинейный характер. При этом наблюдалось сужение спектра люминесценции и ее индикатрисы. Пример регистрируемого в этом случае спектра флуоресценции пиронина G приведен на рисунке 1, кривая 2 ($E_{имп} = 3$ мДж, величина сигнала уменьшена в 400 раз).

Из рисунка 1 видно, что при достаточном увеличении плотности мощности накачки сигналы флуоресценции изменялись по форме спектра и интенсивности от обычной люминесценции, обусловленной спонтанным излучением (кривая 1), до суперлюминесценции (кривая 2).

Полученный результат по нашему мнению обусловлен тем, что в полимерных пленках ДНК– пиронин G с добавкой глицерина молекулы красителя интеркалированы в двойную спираль ДНК, являются оптически активными центрами одного типа и обладают высоким выходом флуоресценции.

Следующим этапом исследований по данному направлению предполагается полу-

чение лазерной генерации в активной среде на основе ДНК-краситель-глицерин посредством придания пленочному образцу соответствующей геометрической формы и использования схемы накачки с распределенной обратной связью.

В литературе известны примеры применения материалов, основанных на комплексах ДНК-краситель, для получения суперлюминесценции [10-12], но все они содержат поверхностно-активные вещества (ПАВ) в качестве компонентов, обеспечивающих внешнее связывание красителя с ДНК.

Отличительной особенностью нашего подхода к созданию пленочных структур на основе комплексов ДНК – органический краситель является отсутствие ПАВ как необходимого компонента. Это существенно упрощает процедуру получения пленок, и главное, позволяет использовать преимущества внутриспиральной упаковки молекул красителей.

Выводы

Таким образом, в настоящей работе показано, что в пленочных образцах на примере системы ДНК-пиронин G-глицерин реализуется принцип «гость-хозяин» путем самосборки однородных супрамолекулярных структур

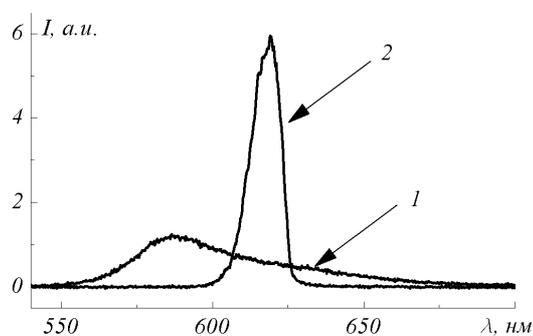


Рисунок 1. Спектры флуоресценции пиронина G в матрице ДНК-глицерин, P/D=50, полученные при разных условиях возбуждения

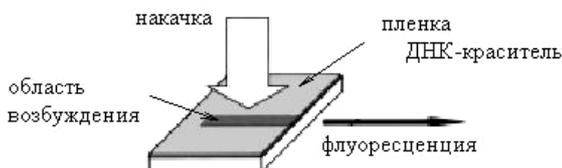


Рисунок 2. Схема эксперимента по возбуждению суперлюминесценции в пленочных образцах ДНК-краситель

по методике «снизу-вверх» и указанные пленочные структуры можно отнести к наноструктурированным материалам с заранее за-

данными свойствами. В образцах ДНК-пиронин G-глицерин получена суперлюминесценция красителя.

15.10.2012

Работа выполнялась при поддержке РФФИ, грант № 11-02-97021-р_поволжье_а.

Список литературы:

1. Seeman N.S. Nanomaterials based on DNA // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – V. 79. – P. 65–87.
2. Steckl A.J., Spaeth H., et al. DNA as an Optical Material // *OPN Optics & Photonics News.* – 2011 – P.35-39.
3. Fredericq E., Houssier C. Study of the Interaction of DNA and Acridine Orange by Various Optical Methods // *Biopolymers* – 1972. – V. 11, – N. 11. – P. 2281-2308.
4. Geacintov N.E., Waldmeyer J., Kuzmin V.A., Kolubayev T. Dynamics of the Binding of Acridine Dyes to DNA Investigated by Triplet Excited State Probe Techniques // *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY* – 1981. – V.85(24). – P. 3608-3613.
5. Kononov A.I., Moroshkina E. B., Tkachenko N. V., Lemmetyinen H. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – V.105 (2). – P. 535-541.
6. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. Interactions of Pyronin Y(G) With Nucleic Acids // *Cytometry.* – 1987. – V. 8 – P.129-137.
7. Darzynkiewicz Z., Kapuscinski J., Traganos F., Crissman H.A. Application of Pyronin Y(G) in Cytochemistry of Nucleic Acids // *Cytometry.* – 1987. – V. 8 – P.138-145.
8. Лантух Ю.Д., Пашкевич С.Н. и др. Спектроскопические свойства биополимерных пленок ДНК – акридиновый оранжевый // *Оптика и спектроскопия.* – 2011. – Т. 110. – №6. – С. 932–937.
9. Майер Г.В., Копылова Т.Н. и др. Активные полимерные волокна с органическими красителями. Генерация и усиление когерентного излучения // *Квантовая электроника.* – 2007. – Т. 37. – №1. – С. 53-59.
10. Thin-film lasers based on dye-deoxyribonucleic acid-lipid complexes // *Appl. Phys. Lett.* – 2002. – V. 81. – P. 1372–1374.
- 11 Kawabe Y., Wang L., Horinouchi S., T., Ogata N. Amplified Spontaneous Emission from Fluorescent-Dye-Doped DNA±Surfactant Complex Films. // *Adv. Mater.* – 2000. – 12. – N. 17. – P. 1281-1283.
12. Mysliwiec J., Sznitko L., et al. Lasing effect in a hybrid dye-doped biopolymer and photochromic polymer system // *APPLIED PHYSICS LETTERS.* – 2010. – V. 96. – P. 141106-1 – 141106-3

UDC 547.97: 535.34/37

Lantukh Yu.D., Pashkevich S.N.

SUPERLUMINESCENCE IN THE DNA-DYE FILM STRUCTURES

The method of production of optical uniform double-helical DNA film structures is proposed. These structures were formed according to the «guest-host» principle and the dye molecules act as the «guest» and demonstrate high fluorescence capability. Superluminescence of Pyronin G is realized in such system.

Key words: DNA films, «guest-host» principle, Pyronin G, superluminescence

Bibliography:

1. Seeman N.S. Nanomaterials based on DNA // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – V. 79. – P. 65–87.
2. Steckl A.J., Spaeth H., et al. DNA as an Optical Material // *OPN Optics & Photonics News.* – 2011 – P.35-39.
3. Fredericq E., Houssier C. Study of the Interaction of DNA and Acridine Orange by Various Optical Methods // *Biopolymers* – 1972. – V. 11, – N. 11. – P. 2281-2308.
4. Geacintov N.E., Waldmeyer J., Kuzmin V.A., Kolubayev T. Dynamics of the Binding of Acridine Dyes to DNA Investigated by Triplet Excited State Probe Techniques // *Journal of physical chemistry* – 1981. – V.85(24). – P. 3608-3613.
5. Kononov A.I., Moroshkina E. B., Tkachenko N. V., Lemmetyinen H. Photophysical processes in the complexes of DNA with ethidium bromide and acridine orange: A Femtosecond Study // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – V.105 (2). – P. 535-541.
6. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. Interactions of pyronin Y(G) with nucleic acids // *Cytometry.* – 1987. – V. 8 – P.129-137.
7. Darzynkiewicz Z., Kapuscinski J., Traganos F., Crissman H.A. Application of pyronin Y(G) in cytochemistry of nucleic acids // *Cytometry.* – 1987. – V. 8 – P.138-145.
8. Lantukh Yu.D., Pashkevich S.N. et al. Spectroptical features of biopolymer DNA films – acridine orange // *Optics and spectroscopy.* – 2011. – Vol. 110. – №6. – P. 932–937.
9. Mayer G.V., Kopylova T.N. et al. Active polymer fibers with organic stain // *Quantum electronics.* – 2007. – Vol. 37. – №1. – P. 53-59.
10. Thin-film lasers based on dye-deoxyribonucleic acid-lipid complexes // *Appl. Phys. Lett.* – 2002. – V. 81. – P. 1372–1374.
- 11 Kawabe Y., Wang L., Horinouchi S., T., Ogata N. Amplified spontaneous emission from fluorescent-dye-doped DNA±surfactant complex films. // *Adv. mater.* – 2000. – 12. – No. 17. – P. 1281-1283.
12. Mysliwiec J., Sznitko L., et al. Lasing effect in a hybrid dye-doped biopolymer and photochromic polymer system // *Applied physics letters.* – 2010. – Vol. 96. – P. 141106-1 – 141106-3