

ФОТОФИЗИКА ОПТИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ БИОПОЛИМЕРОВ С ОРГАНИЧЕСКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ

Исследование физико-химических свойств комплексов органических красителей с биополимерами различной природы является важной задачей в связи с большим потенциалом использования таких систем в медицине, нанотехнологиях, молекулярной электронике, фотонике.

В данной работе представлены результаты исследований оптических свойств пленочных супрамолекулярных структур на основе органических красителей и биополимеров (ДНК, хитозан), а также возможностей применения таких материалов в оптоэлектронике.

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

Разработана методика получения эффективных люминофоров на основе системы анионный краситель – хитозан. В пленочной системе сульфородамин В – хитозан также получен эффект суперлюминесценции красителя.

Экспериментально продемонстрирована возможность применения пленочного материала ДНК-краситель в качестве бесконтактного датчика (сенсорного элемента) относительной влажности воздуха.

В работе показано, что исследуемые оптические функциональные материалы на основе систем биополимер – краситель могут быть использованы в качестве высокоэффективных люминофоров, бесконтактных датчиков и других устройств в оптоэлектронике.

Ключевые слова: ДНК, хитозан, органические красители, пленочные материалы, наноразмерные комплексы, электронные спектры, люминесценция, лазеры, суперлюминесценция, сенсор влажности, оптоэлектроника.

Введение

Биологические молекулы в последнее время являются предметом многочисленных исследований, посвященных разработке новых наноструктурных материалов и другим применениям в нанотехнологиях и оптоэлектронике.

Молекула ДНК, являющаяся носителем генетической информации, обладает специфическими физико-химическими свойствами и рассматривается в последнее время в качестве одного из основных конструктивных элементов 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, наличию 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 сенсibilизаторов. 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.

Интерес к изучению хитозана возник благодаря комплексу уникальных физико-химических и биологических свойств этого биополимера, обуславливающих многообразие областей его применения (невирусные носители в генной терапии, биосенсоры, сорбенты и др.).

Целью работы являлось изучение комплексов катионных и анионных молекул органических красителей с ДНК (полианион) и хитозаном (поликатион) в пленочной форме и целенаправленное изменение свойств таких комплексов для создания прототипов оптоэлектронных устройств на базе указанных материалов.

Одной из возможных областей применения материалов краситель – биополимер является создание активных сред лазеров на красителях при обеспечении высокой степени упорядоченности активных центров (молекул красителей) в матрице биополимера. Реализация такой упорядоченности, т. е. расположение наночастиц в нужном месте и формирование между ними стабильных связей является одной из основных задач при создании наноматериалов. Для ее решения предложено использовать принцип самосборки по типу «снизу-вверх», реализуемый в системах краситель – биополимер.

Другим примером применения разрабатываемых материалов является оптический датчик относительной влажности воздуха (гигрометр), принцип действия которого основан на спектроскопическом мониторинге спектральных свойств органического красителя в сенсорном пленочном элементе, которые изменяются при изменении влажности окружающей среды.

Объекты и методика эксперимента

Исследования проводили с натриевой солью высокомолекулярной ДНК (MP Biomedicals), выделенной из молока лосося. Использовали хитозан фирмы MP Biomedicals. Глицерин (Эколаб) очищали двойной вакуумной перегонкой.

Красители пиронин G, сульфородамин В (SB) и акридиновый оранжевый (АО) (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, выражаемое как отношение концентрации нуклеотидов к концентрации лиганда P/D, составляло 40 – 100.

Пленки хитозана получали поливом из раствора полимера в слабой уксусной кислоте, к которому добавляли необходимое количество водного раствора красителя.

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

Для исследования суперлюминесценции образцов использовалась схема с поперечной накачкой, подобная схеме из работы [9]. В этом случае пучок излучения лазера накачки (LQ-129, 532 нм) фокусировался цилиндрической линзой на поверхности образца. Область возбуждения имела форму полоски шириной менее миллиметра. Флуоресценция снималась с торца пленки.

Результаты и обсуждение

ДНК-краситель

В работе [8] нами с помощью спектроскопических методов было проведено исследование конформационного состояния ДНК в форме пленки, содержащей 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 повышен-

ной конформационной подвижностью одноцепочечных фрагментов ДНК, что может приводить к увеличению вклада процессов безызлучательной релаксации.

В результате анализа спектров, полученных в [8], 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 ИК спектроскопии 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 взаимодействием молекул глицерина с ДНК, сопоставимым с влиянием молекул воды на состояние двойной спирали. Молекулы красителя 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.

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 пленке ДНК-глицерин, полученный при лазерном возбуждении на длине волны 532 нм DPSS YAG-Nd лазером. 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 молекулы пиронина G в пленке ДНК, стабилизированной глицерином, представляют собой оптически активные центры одного типа. В сухих пленках ДНК флуоресценция пиронина G практически отсутствует.

Учитывая возрастающий интерес к разработкам полимерных оптических волокон и пленок с органическими красителями как активным средам перестраиваемых лазеров [10], нами была пред-

принята попытка получить суперлюминесценцию биополимерных пленок ДНК – пиронин G – глицерин, используя для накачки вторую гармонику импульсного YAG-Nd лазера ($\lambda = 532$ нм) и схему возбуждения с поперечной накачкой пленочного образца.

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 по форме 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).

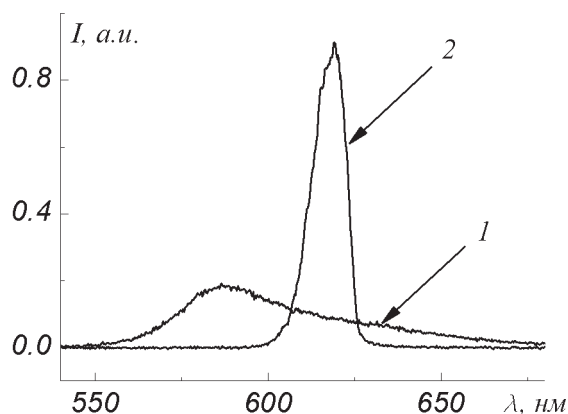


Рисунок 1. Спектры флуоресценции пиронина G в матрице ДНК-глицерин, P/D = 50, полученные при разных условиях возбуждения. Величина сигнала для кривой 2 уменьшена в 400 раз

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.

В литературе известны примеры применения материалов, основанных на комплексах ДНК–краситель, для получения суперлюминесценции [9], [11], [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.

Хитозан-краситель.

В данном разделе приведены результаты спектрально-люминесцентных исследований комплексов красителя сульфородамина В с хитозаном.

Поскольку хитозан является поликатионным полимером, то связывание анионных красителей с ним должно (в случае антикооперативного характера такого связывания) приводить к формированию комплексов мономерный краситель – хитозан с высокой плотностью упаковки красителя (методика самосборки наноструктур типа «снизу-вверх»). Люминесцентный канал дезактивации энергии электронного возбуждения (квантовый выход флуоресценции) в молекуле красителя в этом случае должен быть максимально высоким. На этом базируется идея создания пленочного активного элемента лазера на красителях.

На рисунках 2 и 3 представлены спектры поглощения и люминесценции сульфородамина В в пленках хитозана. Концентрации красителя (в пленке) для кривых 1–4 на рис. 2 и 3 равны: 1 – $6,5 \times 10^{-4}$, 2 – $3,2 \times 10^{-4}$, 3 – $1,6 \times 10^{-4}$, 4 – 8×10^{-5} , моль/л.

Характерной особенностью известного люминофора анионного красителя сульфородамина В является его высокая способность к обра-

зованию ассоциатов в водных растворах. Это существенно снижает выход люминесценции красителя.

Введение SB в матрицу хитозана приводит к формированию комплексов «мономер красителя – биополимер», что значительно уменьшает количество ассоциатов красителя в системе (рис. 2) и способствует развитию люминесцентного канала дезактивации энергии возбуждения (рис. 3).

Пунктирная кривая на рисунке 2 представляет спектр поглощения раствора SB в воде с концентрацией 10^{-5} моль/л.

На рисунке 4 представлены спектры люминесценции пленочной системы SB – хитозан при импульсном возбуждении второй гармоникой YAG –Nd лазера ($\lambda = 532$ нм) по схеме с поперечной накачкой.

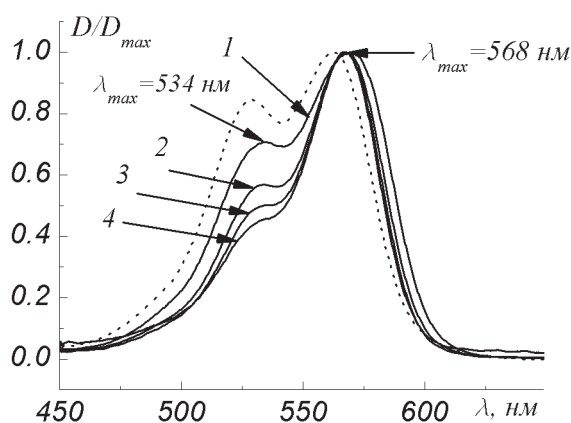


Рис. 2 Нормированные спектры поглощения сульфородамина В в плёнках хитозана.

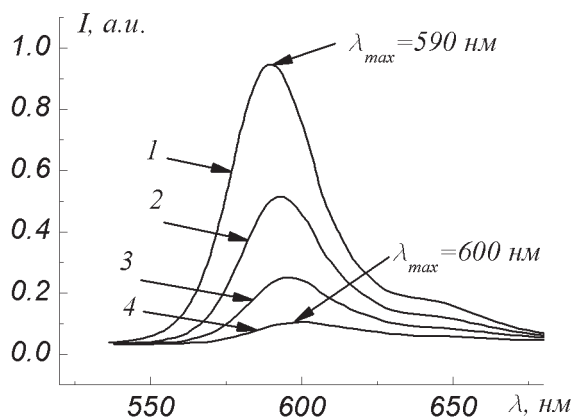


Рис. 3 Спектры люминесценции сульфородамина В в плёнках хитозана.

Концентрация красителя в пленке составляла 8×10^{-5} моль/л.

Из рисунка видно, что по мере увеличения энергии накачки от 0,26 мДж (кривая 1) до 1,25 мДж (кривая 2) и 2,55 мДж (кривая 3) имеет место резкое нелинейное увеличение интенсивности сигнала и сужение его спектра. Также происходило сужение индикатрисы люминесцентного сигнала до нескольких мрад. Все это свидетельствует о проявлении в данной системе эффекта суперлюминесценции красителя.

Сенсор влажности на основе пленки ДНК – краситель

Существуют некоторые задачи измерения влажности, относящиеся к наиболее сложным. Это измерение влажности в замкнутых объемах, удаленный (до нескольких метров) мониторинг влажности сред, а также измерения, не позволяющие пользоваться электропитанием в сенсорных устройствах.

По нашему мнению, именно решению таких задач может способствовать предлагаемый нами подход с использованием функционального материала на основе наноконплексов ДНК – краситель.

Принцип действия такого сенсорного элемента основан на изменении конформационного состояния ДНК в форме пленочного образца при изменении влагосодержания пленки.

На рисунке 5 представлены спектры поглощения пленки акридиновый оранжевый – ДНК при различных уровнях относительной влажности воздуха.

Если сухую пленку ДНК-АО подвергнуть увлажнению, ее спектр поглощения в видимой области претерпевает изменения: димерная полоса в области 476 нм исчезает, а мономерный максимум при 502 нм растет, и при относительной влажности среды 95% спектр становится полностью «мономерным». На рисунке 5 такие изменения соответствуют переходу от спектра 1 к спектру 2. При высыхании пленки ее спектр возвращается к исходному виду 1. Число циклов «увлажнение-высыхание», сопровождающихся отмеченной трансформацией спектров, в наших экспериментах составляло более 20 без заметных изменений свойств пленки.

Процессы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов, связаны с обратимым конформацион-

ным переходом между денатурированной ДНК и ее нативной В-формой. Такой переход приводит к изменению типа комплексов связывания АО с ДНК. При увлажнении сухой пленки происходит диссоциация димеров красителя с последующей интеркаляцией мономерных молекул между парами оснований. По мере понижения о.в. происходит перераспределение красителя: часть молекул высвобождается из двойной спирали, образуя димерные агрегаты, связанные с ДНК по внешнему типу.

Отмеченный процесс, как видим, доступен для мониторинга спектрофотометрически в видимой области, что может быть положено в основу создания оптического датчика влажности.

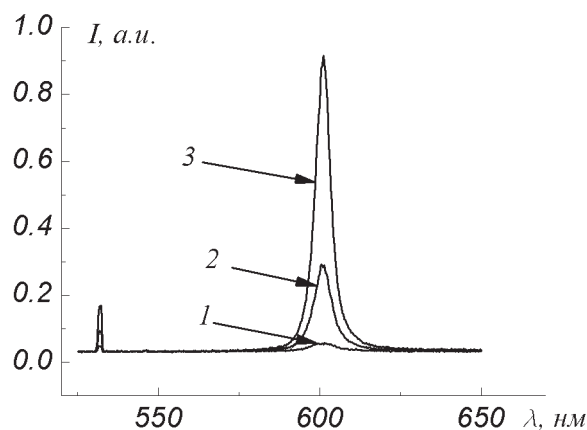


Рис.4. Спектры люминесценции (суперлюминесценции) пленки сульфородамин В – хитозан при импульсном возбуждении второй гармоникой YAG –Nd лазера ($\lambda = 532$ нм).

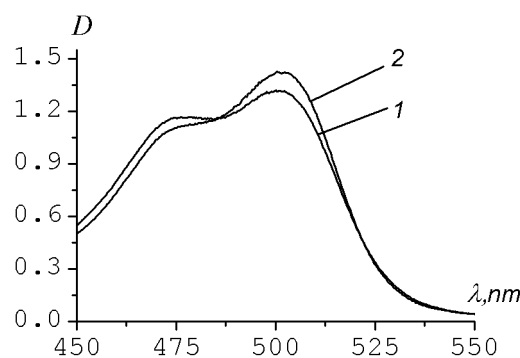


Рис. 5 – Спектры поглощения акридинового оранжевого в плёнке ДНК при различных уровнях относительной влажности. 1 – о.в. 50%, 2 – о.в. 95%.

Таким образом, в настоящей работе показано, что в пленочных образцах на примере систем ДНК-краситель и хитозан – краситель реализуется принцип самосборки однородных супрамолекулярных структур по методике «снизу-вверх» и указанные пленочные структуры можно отнести к функциональным материалам с заранее заданными свойствами. В образцах ДНК-пиронин G-глицерин и хитозан – SB получена суперлюминесценция красителя.

Экспериментально продемонстрирована возможность применения пленочного материала

ДНК-краситель в качестве бесконтактного датчика (сенсорного элемента) относительной влажности воздуха.

В качестве других примеров наших разработок оптоэлектронных приложений систем на основе биополимерных матриц (ДНК, хитозан) с внедренными органическими красителями можно привести регистрирующие среды для записи голограмм [13]–[15], пленочные системы, содержащие J-агрегаты красителей и другие.

10.12.2015

**Работа выполнялась при поддержке РФФИ, грант №11-02-97021-р_поволжье_а.
Работа выполнялась при поддержке Минобрнауки РФ, ГЗ на проведение НИР №450
от 01.02.2014 г.**

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 // *J. Phys. Chem.* — 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. Kawabe Y. et al. Thin-film lasers based on dye-deoxyribonucleic acid-lipid complexes // *Appl. Phys. Lett.* — 2002. — V. 81. — P. 1372–1374.
10. Майер Г.В., Копылова, В.А. и др. Активные полимерные волокна с органическими красителями. Генерация и усиление когерентного излучения // *Квантовая электроника.* — 2007. — Т. 37. — №1. — С. 53-59.
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 // *Appl. Phys. Lett.* — 2010. — V. 96. — P. 141106-1 – 141106-3
13. Лантух Ю.Д., Пашкевич С.Н. и др. Нестационарная голографическая запись в биополимерных пленках ДНК – акридиновый оранжевый // *Оптика и спектроскопия* — 2013. — Т. 114. — С. 312-317.
14. Lantukh Yu.D., Ketsle G.A. et al. Holographic investigation of DNA activated by organic dyes // *Proc. SPIE.* 2004. V. 5447. P. 375–380
15. Lantukh Yu.D., Paschkevich S.N., et al Investigation of DNA – acridine orange biopolymer films by holographic and spectroscopic techniques // *Proc. SPIE.* 2008. V. 7006. P. 7006141-7006148.

Сведения об авторах

Лантух Юрий Дмитриевич, старший научный сотрудник Института микро– и нанотехнологий Оренбургского государственного университета, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния физического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент. E-mail: lantukh@yandex.ru

Пашкевич Сергей Николаевич, директор Института микро– и нанотехнологий Оренбургского государственного университета, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния физического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент. E-mail: ppsnya@yandex.ru

Алиджанов Эскендер Кургаметович, старший научный сотрудник Института микро– и нанотехнологий Оренбургского государственного университета, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния физического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук. E-mail: ekaalid@yandex.ru

460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13