

О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАМАЛЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИМИ МИКРОЧАСТИЦАМИ ДНК

М. А. Колыванова^{1, 2}, М. А. Климович¹, А. В. Шибаева¹,
О. В. Дементьева³, В. М. Рудой³, В. А. Кузьмин¹, В. Н. Морозов^{1, *}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

²Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
ул. Живописная, 46, Москва, 123098 Россия

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Ленинский проспект, 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

*e-mail: morozov.v.n@mail.ru

Аннотация. Исследованы особенности взаимодействия синтезированных по методу Даффа ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ) с частицами оптически активных жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) ДНК, сформированных при варьируемых концентрациях NaCl и полиэтиленгликоля. Показано, что влияние НЧЗ на ЖКД с положительной и отрицательной ориентацией аномального сигнала кругового дихроизма различается. По-видимому, это отчасти обусловлено разной конформацией молекул ДНК, образующих соответствующие дисперсные частицы. Обсуждаются также кинетические аспекты взаимодействия НЧЗ с ЖКД ДНК и особенности «загрузки» в частицы ЖКД ультрадисперсного золота.

Ключевые слова: жидкие кристаллы, дисперсии, ДНК, круговой дихроизм, наночастицы золота

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.03.2025

После доработки 16.04.2025

Принята к публикации 19.04.2025

ON SOME FEATURES OF THE INTERACTION OF ULTRASMALL GOLD NANOPARTICLES WITH LIQUID-CRYSTALLINE DNA MICROPARTICLES

**M. A. Kolyvanova^{1,2}, M. A. Klimovich¹, A. V. Shibaeva¹, O. V. Dement'eva³,
V. M. Rudoy³, V. A. Kuzmin³, V. N. Morozov^{1, *}**

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

²*Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123098 Russia*

³*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: morozov.v.n@mail.ru

Abstract. The features of the interaction of ultrasmall gold nanoparticles (GNPs) synthesized via Duff method with particles of optically active liquid-crystalline dispersions (LCDs) of DNA formed at varying concentrations of NaCl and polyethylene glycol were studied. It was shown that the GNPs differently affect the LCDs with positive and negative orientation of the anomalous circular dichroism (CD) signal. Apparently, this is in a measure due to the various conformation of DNA molecules that form the corresponding dispersed particles. The kinetic aspects of the interaction of GNPs with DNA LCDs and the features of “loading” ultradispersed gold into the LCD particles are also discussed.

Keywords: liquid crystals, dispersions, DNA, circular dichroism, gold nanoparticles

Funding. This work was supported by ongoing institutional funding. No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

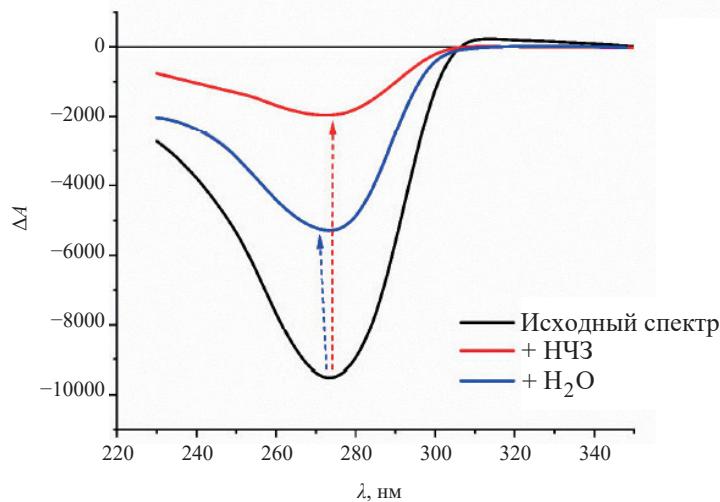
Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Received March 04, 2025

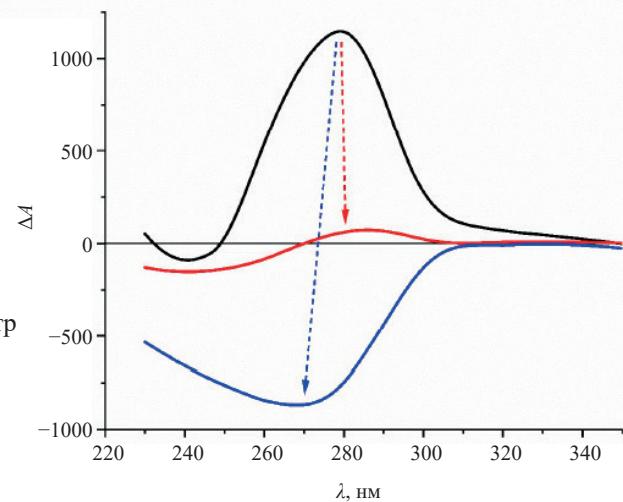
Revised April 16, 2025

Accepted April 19, 2025

ЖКД ДНК с отрицательным КД-сигналом



ЖКД ДНК с положительным КД-сигналом



ВВЕДЕНИЕ

В нашей недавней работе, посвященной изучению взаимосвязи между деструктивным и стабилизирующим действием¹ ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ) по отношению к упорядоченной внутренней структуре частиц жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) ДНК, получаемых с помощью так называемой *psi*-конденсации (также ψ ; акроним слов “*Polymer and Salt Induced*” [1]), была обнаружена зависимость весьма необычного вида. Речь идет о зависимости отношения площадей $S_{\text{НЧЗ}}/S_{\text{вода}}$ под графиками $\delta(V)$ для случаев обработки систем с разным содержанием полиэтиленгликоля (ПЭГ), т.е. с различным расстоянием между соседними молекулами ДНК в частицах ее ЖКД [2], гидрозолем ультрамалых НЧЗ и дистиллированной водой (см. [3]). Здесь δ – величина, на которую изменяется амплитуда характерного сигнала, также называемого аномальным [4], на спектре кругового дихроизма (КД) такой системы на каждом шаге ее титрования, отнесенная к амплитуде исходного сигнала, а V – величина внесенного в систему объема воды или исследуемого гидрозоля.

Эта зависимость (ее вид показан на Рис. 1) характеризуется двумя участками, обозначенными соответственно 1 и 2, между которыми (в области 21–24 масс. % ПЭГ) имеется ярко выраженный разрыв. Пользуясь предложенной ранее терминологией (см. [3]), его можно интерпретировать как резкий переход от доминирования деструктивного действия НЧЗ на ЖКД ДНК к доминированию их стабилизирующего действия. Примечательно, что этот переход совпадает со скачкообразной сменой отрицательной ориентации

аномального КД-сигнала на положительную [3, 5]. Однако данных для ответа на вопрос о существовании причинно-следственной связи между этими процессами

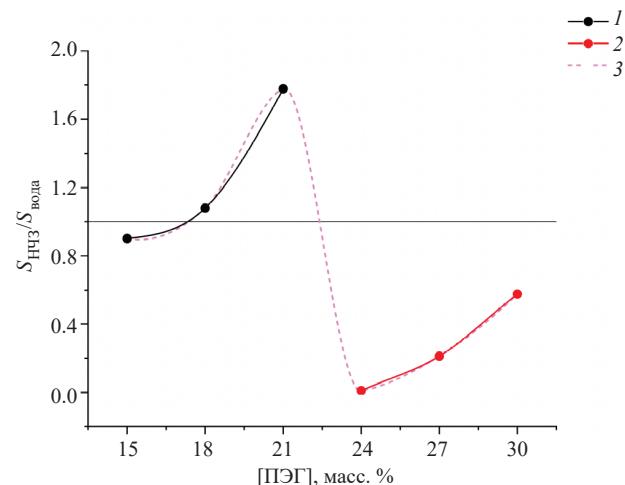


Рис. 1. Зависимость отношения площадей под графиками $\delta(V)$ для случаев обработки ЖКД ДНК ($[\text{NaCl}] = 0.3 \text{ M}$) золем НЧЗ ($S_{\text{НЧЗ}}$) и дистиллированной водой ($S_{\text{вода}}$) от содержания ПЭГ в системе. Участки 1 и 2 – экспериментальные данные, полученные для систем с отрицательно и положительно ориентированным аномальным КД-сигналом соответственно. Кривая 3 иллюстрирует гипотетический ход «полней» зависимости, включающей участки 1 и 2. Построено по данным [3].

Fig. 1. Dependence of the ratio of the areas under the $\delta(V)$ graphs for the cases of treating the DNA LCDs ($[\text{NaCl}] = 0.3 \text{ M}$) with GNP sol (S_{GNP}) and distilled water (S_{water}) on the PEG content in the system. Sections 1 and 2 show experimental data obtained for the systems with negatively and positively oriented anomalous CD signals, respectively. Curve 3 illustrates the hypothetical course of the “full” dependence, including sections 1 and 2. Built according to the data from [3].

¹ Напомним, что согласно существующим представлениям первое состоит главным образом в раздвижении и изменении угла закрутки слоев, формируемый молекулами нуклеиновой кислоты, а второе – в их связывании/«сшивании», благодаря чему дисперсные частицы становятся способны существовать даже в отсутствие высокого осмотического давления раствора.

недостаточно. Поэтому для ее прояснения мы провели эксперименты, в которых при приготовлении ЖКД ДНК вместе с изменением содержания ПЭГ варьировалась и концентрация NaCl. Как отмечено в работах [6, 7], именно осмотическим давлением раствора определяется плотность упаковки молекул ДНК в подобных системах. Однако особенности формирования ЖКД ДНК при значениях концентрации NaCl выше 2 М в литературе практически не рассматривались (см., к примеру, монографию Евдокимова и соавт., суммирующую итоги многолетних исследований этих систем [8]). Таким образом, целью настоящей работы являлось не только продолжение систематического изучения воздействия НЧЗ на частицы ЖКД ДНК, но также и углубление фундаментальных представлений об этих системах. Обсуждаются также кинетические аспекты взаимодействия НЧЗ с ЖКД ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Процедура синтеза гидрозоля ультрамалых сферических НЧЗ детально описана в наших предыдущих работах [9, 10]. В настоящем исследовании использованы НЧЗ золя возрастом 3 мес. Все это время золь после анализа его исходных характеристик хранили в холодильнике при 4°C. Затем он был повторно охарактеризован и сразу же использован в экспериментах.

Для приготовления ЖКД использовали коммерческий препарат выделенной из молок осетровых/лососевых рыб и деполимеризованной ультразвуком ДНК (Деринат®; (0.25–0.5) × 10⁶ Да (≈400–800 п. о.); Техномедсервис, Россия) и ПЭГ (4000 Да; Sigma, США). Их растворы приготавляли на основе водно-солевых буферов различной ионной силы: концентрацию NaCl варьировали от 0.3 до 5 М, тогда как концентрация Na₂HPO₄ была неизменной и составляла 0.01 М. Все буферные растворы были доведены до физиологического значения кислотности (pH ≈ 7.4) добавлением HCl (Компонент-реактив, Россия). Полученные после смешения растворов ДНК и ПЭГ образцы интенсивно перемешивали и, в соответствии с известными данными о кинетике формирования оптически активных ЖКД ДНК [5, 11], выдерживали при комнатной температуре не менее 1.5 ч. Содержание ДНК во всех образцах было равным 1.35 × 10⁻⁴ М (для ее спектрофотометрического определения использовали значение коэффициента экстинкции ε₂₆₀ ≈ 6600 М⁻¹ см⁻¹ [12]). Концентрацию ПЭГ при этом варьировали в диапазоне 0–300 мг/мл (0–30 масс. %). Поскольку в различных экспериментах при приготовлении ЖКД ДНК использовались исходные растворы ПЭГ разной концентрации (30 и 60 масс. % соответственно), этот аспект в каждом случае оговаривается отдельно (см. сноски). Готовые образцы ЖКД ДНК титровали (если не указано иное) дистиллированной водой или гидрозолем НЧЗ. Для этого к 1 мл дисперсии добавляли до 200 мкл (с шагом 20 мкл) воды или золя золота, что в последнем случае соответствовало максимальной достигаемой концентрации НЧЗ в системе, равной 19.33 × 10⁻⁸ М.

Сопоставление молярной концентрации НЧЗ в системе и величины вносимого в нее объема гидрозоля приведено в работе [3].

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра UV-3101 PC (Shimadzu, Япония), а спектры флуоресценции – с помощью спектрофлуориметра Флюорат-02-Панорама (Люмэкс, Россия). Спектры КД измеряли, используя дихромограф СКД-2М (Институт спектроскопии РАН, Россия), и представляли в виде зависимости разницы поглощения лево- и право-поляризованного света $\Delta A = A_L - A_R$ от длины волны λ. Для измерения кинетических кривых использовали дихромограф СКД-2. К образцам ЖКД ДНК непосредственно в его кюветном отделении вручную добавляли требуемый объем дистиллированной воды или золя НЧЗ («мертвое время», затраченное на перемешивание полученной смеси, составляло 3–7 с). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью уравнения

$$\Delta A(t) = \sum_{i=1}^n \Delta A_i e^{-k_i t}. \quad (1)$$

Погрешность определения констант скорости k_i не превышала 10%. Все вышеописанные измерения проводили в кварцевых кюветах (Hellma, Германия).

Частицы ЖКД ДНК визуализировали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) с помощью флуоресцентного красителя SYBR Green I (SG; Lumiprobe, США). Его концентрацию определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением коэффициента экстинкции ε₄₉₈ ≈ 73000 М⁻¹ см⁻¹ [13]. К 1 мл соответствующего образца ЖКД ДНК добавляли 1 мкл раствора SG в ДМСО с исходной концентрацией 7 × 10⁻⁴ М. Затем 20 мкл полученной дисперсии помещали на предметное стекло (Menzel-Gläser, Германия), краситель возбуждали аргоновым лазером на длине волны 488 нм, а его флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500–600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что присутствие NaCl, особенно в высокой концентрации, может индуцировать агрегацию отрицательно заряженных НЧЗ, подобных исследуемым, а в дальнейшем и седиментацию образовавшихся агрегатов. Поэтому на первом этапе с помощью абсорбционной спектроскопии было изучено их поведение в растворах с различным содержанием этой соли². В дистиллированной воде спектр поглощения предварительно выдержаных в течение 3 мес. НЧЗ,

² Целью этих экспериментов отнюдь не являлось полномасштабное исследование влияния соли на устойчивость золей НЧЗ. Они были призваны исключительно продемонстрировать, что в течение относительно небольшого промежутка времени, который требуется для взаимодействия НЧЗ с частицами ЖКД ДНК, золи не претерпевают критических изменений в плане агрегации.

синтезированных по методу Даффа, характеризуется зарождающейся полосой локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) вблизи 500 нм (кривая 0 на Рис. 2а). Непосредственно же после синтеза он представляет собой плавно спадающую кривую [14]. В буферном растворе, содержащем 0.3 М NaCl, плазмонная полоса заметно уширяется, ее интенсивность снижается, а максимум смещается к 525 нм (кривая 1 на том же рисунке). Отметим, что такая картина в целом характерна для ион-индуцируемой агрегации сферических НЧЗ, синтезированных самыми разными способами (см., например, работы [15–17]). В то же время сопровождающиеся изменением спектра поглощения процессы совершенствования кристаллической решетки (т. е. переход из квазиметаллического состояния в металлическое [18]) и укрупнения ультрамалых фосфониевых НЧЗ происходят без существенного смещения полосы ЛППР [19, 20]. Сопоставляя данные, приведенные на Рис. 2а с полученными нами ранее (см. [3]), можно заметить, что по мере увеличения времени предварительной выдержки НЧЗ (т. е. степени их «металлизации») величина сдвига ЛППР в присутствии соли возрастает. Начиная с концентрации NaCl, равной 0.7 М, характерный плазмонный сигнал быстро деградирует, что наглядно свидетельствует о нарушении не только агрегативной, но и седиментационной устойчивости системы (в качестве примера соответствующие данные о динамике этого процесса приведены на Рис. 3а).

Вместе с тем в водно-солевых растворах ПЭГ или ДНК золи исследуемых НЧЗ демонстрируют большую устойчивость (Рис. 2б и 2в). Так, спектр системы, содержащей 0.3 М NaCl и 15 масс. % ПЭГ, практически совпадает с регистрируемым для исходного золя (сравните Рис. 2а и 2б). Увеличение концентрации соли приводит к постепенному агрегированию НЧЗ и батохромному сдвигу максимума ЛППР. При этом интенсивность плазмонного пика сначала заметно возрастает, достигая наибольшей величины при $[NaCl] = 1$ М, а затем постепенно снижается вследствие седиментации агрегатов НЧЗ. С наибольшей скоростью этот процесс протекает в системе, содержащей 5 М NaCl (Рис. 3б). В присутствии 1.35×10^{-4} М ДНК также наблюдаются рост интенсивности и батохромный сдвиг полосы ЛППР. Однако в данном случае эти изменения наименее выражены. Так, к примеру, в растворе с 5 М NaCl плазмонный пик НЧЗ смещается лишь до 526 нм. Система при этом сохраняет стабильность в течение нескольких часов (Рис. 3в и 3г; данные для выдержки свыше 1 ч не приведены).

В ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ НЧЗ также демонстрируют достаточно высокую устойчивость к агрегации и седиментации во всем исследованном диапазоне концентраций NaCl (Рис. 2г). Рост интенсивности полосы ЛППР, как, впрочем, и смещение ее максимума в этом случае оказались более выражеными, чем в молекулярном растворе ДНК. Это вполне можно объяснить тем фактом, что помимо взаимодействия НЧЗ с дисперсными частицами ДНК (здесь подразумевается главным образом проникновение НЧЗ внутрь этих частиц и встраивание между

образующими их пространственно упорядоченными слоями молекул нуклеиновой кислоты [21]) в этой системе имеет место и их взаимодействие с молекулами ПЭГ. Другими словами, далеко не все НЧЗ аккумулируются в микрофазе ДНК – значительное их число находится в объеме раствора (дисперсионной среды). Агрегация при этом выражена заметно слабее, чем в случае «пустого» (не содержащего ДНК) водно-солевого раствора ПЭГ, рассмотренного выше, поскольку концентрация НЧЗ в дисперсионной среде вследствие такого распределения оказывается ниже. Здесь важно отметить, что, несмотря на довольно большое число публикаций, посвященных проблеме взаимодействия НЧЗ с ЖКД ДНК, соответствующие оценки их распределения между дисперсными частицами и объемной фазой раствора полимера пока не проведены. Еще один фактор, влияние которого на форму спектра поглощения нельзя исключать, – это показанное ранее образование агрегатов НЧЗ специфической близкой к линейной геометрии между слоями молекул ДНК [22–24]. Таким образом, можно заключить, что спектр НЧЗ в ЖКД ДНК фактически представляет собой результат суперпозиции нескольких их состояний. В целом же в этих условиях ансамбль НЧЗ также сохраняет долговременную стабильность (Рис. 3д и 3е).

На Рис. 4а представлены КД-спектры ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ и варьирующимся от 0.3 до 5 М содержанием NaCl³. Спектр такой системы, приготовленной по классической⁴ методике (иными словами, при $[NaCl] = 0.3$ М), характеризуется присущей холестерическим мезофазам ДНК высокоамплитудной отрицательной полосой в области поглощения азотистых оснований ($\lambda_{\min} = 260–280$ нм). Увеличение концентрации соли в системе приводит к заметному уменьшению амплитуды этой полосы, а также к изменению положения ее экстремума (соответствующие зависимости приведены на Рис. 4б). Принимая во внимание упомянутую выше принципиальную связь внутренней структуры частиц ЖКД ДНК и осмотического давления стабилизирующего их раствора полимера [2], можно заключить, что такие изменения обусловлены увеличением плотности упаковки молекул нуклеиновой кислоты. Любопытно также, что, хотя величина осмотического давления раствора уже при 0.7 М NaCl (≈ 34.25 атм без учета эффекта ПЭГ) намного превосходит таковую при содержании в системе 0.3 М NaCl и 22 масс. % ПЭГ (≈ 24.14 атм – точка перехода оптически активной системы в оптически неактивную в работах Евдокимова и др. (см. [2])), ни при этой концентрации соли, ни при более высоких ее значениях мы не наблюдали полной потери ЖКД ДНК оптической активности.

³ За исключением системы с 5 М NaCl (в этом случае использовался 40%-й исходный раствор ПЭГ) для приготовления ЖКД ДНК использовались исходные растворы полимера с концентрацией 60 масс. %.

⁴ Здесь мы подразумеваем способ, описанный в монографии Евдокимова и соавт. (см. [8]).

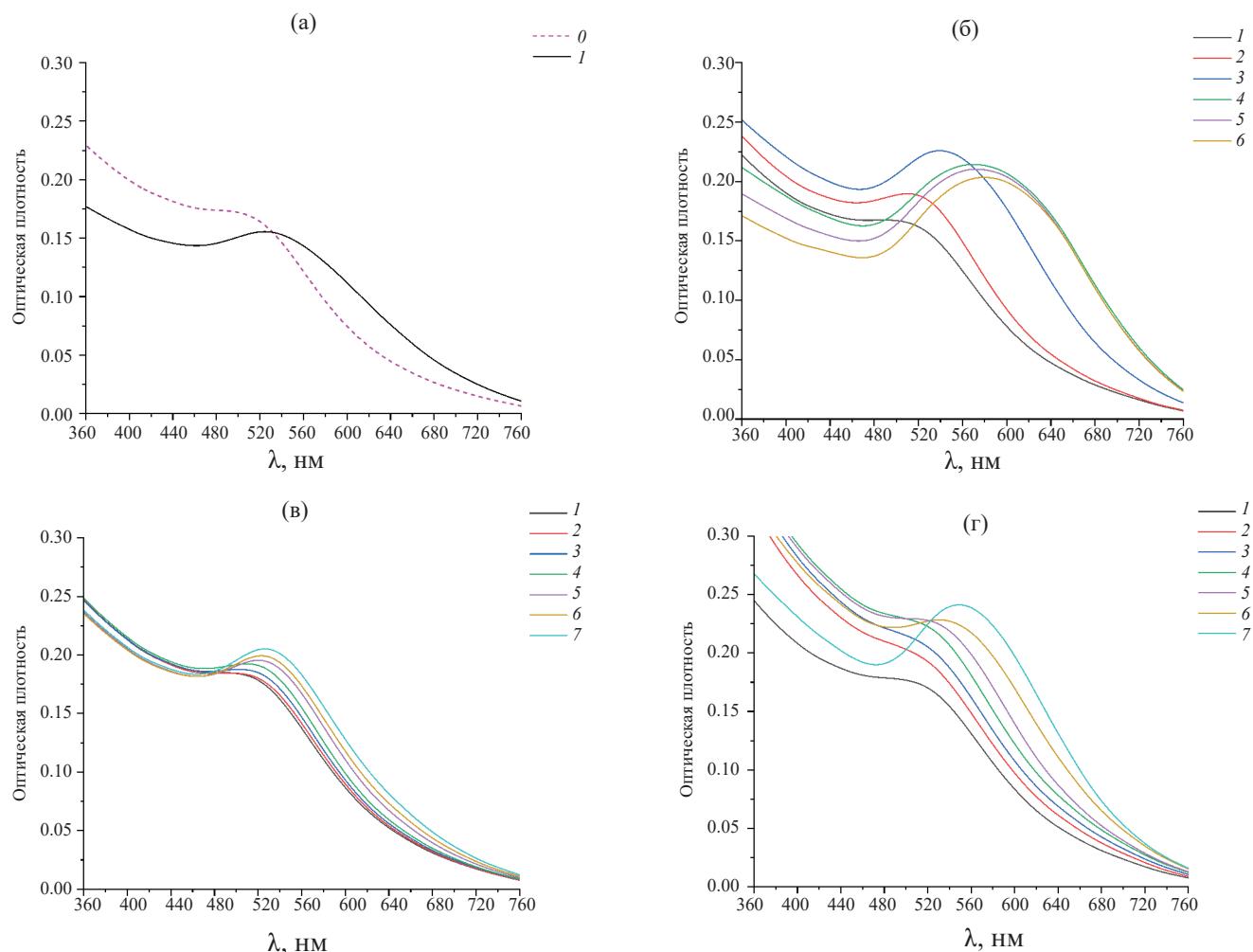


Рис. 2. Спектры поглощения 10.55×10^{-8} М НЧЗ (100 мкл золя) в системах с различным содержанием NaCl: (а) дистilledированная вода и буферный раствор, содержащий 0.3 М соли, (б, в) водно-солевые растворы ПЭГ (15 масс. %) и ДНК (1.35×10^{-4} М) соответственно, (г) ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ. Цветовая легенда для кривых на этих рисунках идентична: 0 – 0, 1 – 0.3, 2 – 0.7, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 3, 6 – 4, 7 – 5 М NaCl. Перед измерениями образцы выдерживались не менее 30–40 мин.

Fig. 2. Absorption spectra of 10.55×10^{-8} M GNP (100 μ L of sol) in the systems with different NaCl content: (a) distilled water and buffer solution containing 0.3 M salt, (b, c) aqueous saline solutions of PEG (15 wt %) and DNA (1.35×10^{-4} M) respectively, (d) DNA LCD with 15 wt % of PEG. The color legend for the curves in these figures is identical: 0 – 0, 1 – 0.3, 2 – 0.7, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 3, 6 – 4, 7 – 5 M NaCl. Before measurements, the samples were stored for at least 30–40 min.

На Рис. 5 в качестве примера показаны КД-спектры ЖКД ДНК, сформированных в присутствии 15 масс. % ПЭГ и 0.3 или 5 М NaCl и оттитрованных затем дистиллированной водой или золем НЧЗ. Для всех этих систем по мере увеличения объема вносимой жидкости наблюдается заметное уменьшение амплитуды аномального КД-сигнала. В то же время увеличение концентрации соли приводит к существенным различиям в их отклике на добавление воды или золя НЧЗ.

Рассмотрим обработку ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ и варьируемым содержанием NaCl дистиллированной водой и золем НЧЗ более детально. На Рис. 6 представлены соответствующие зависимости $\Delta A / \Delta A_0$

от величины вносимого объема (\mathcal{V}) этих жидкостей и полученные на их основе кривые $\delta(\mathcal{V})$. На графиках в правой колонке этого рисунка зеленой штриховкой обозначены области доминирования стабилизирующего действия НЧЗ, а красной – их деструктивного действия. Эффект разбавления с ростом $[NaCl]$ ожидаемо ослабевает (сравните кривые 1 на графиках левой колонки Рис. 6). Так, если в присутствии 0.3 М соли при добавлении 200 мкл дистиллированной воды наблюдается трансформация ЖКД ДНК в ее изотропный раствор (об этом свидетельствует исчезновение характерного КД-сигнала; в последней точке, где он был зарегистрирован, его амплитуда уменьшилась примерно

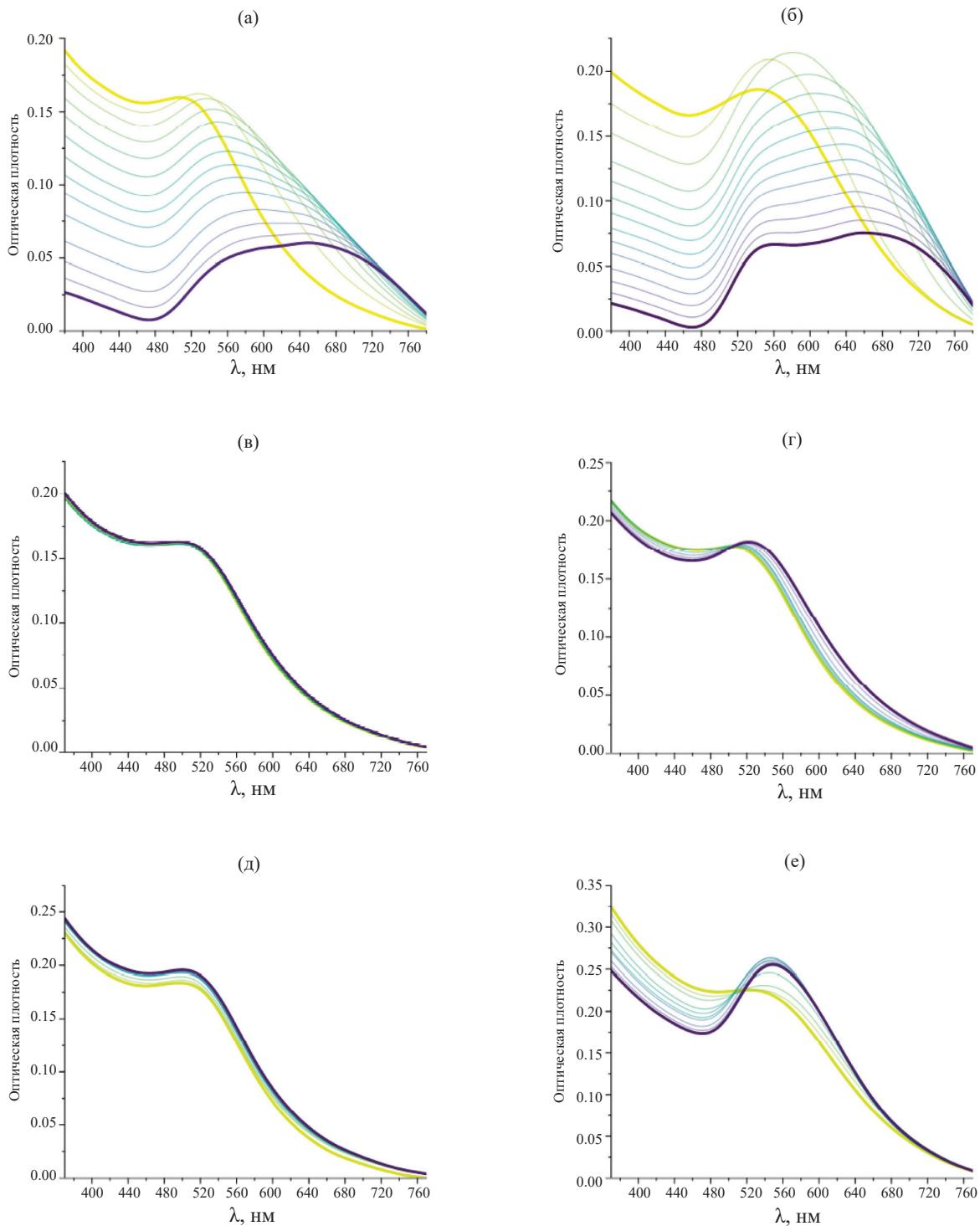


Рис. 3. (а, б) Динамика изменения во времени спектров поглощения НЧЗ в водно-солевых растворах с 0.7 М NaCl (а), а также с 5 М NaCl и 15 масс. % ПЭГ (б). Спектры записывали с интервалом в 30–40 с. (в–е) Спектры поглощения НЧЗ в растворах ДНК (1.35×10^{-4} М) с 0.3 М (в) и 5 М NaCl (г), а также в ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ и аналогичными концентрациями соли (д, е). Спектры записывали сразу после внесения НЧЗ, а также спустя 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин.

Fig. 3. (a, b) Dynamics of temporal changes in the absorption spectra of GNPs in aqueous saline solutions with 0.7 M NaCl (a), and with 5 M NaCl and 15 wt % of PEG (b). The spectra were recorded at 30–40 s intervals. (c–f) Absorption spectra of GNPs in DNA solutions (1.35×10^{-4} M) with 0.3 M (c) and 5 M NaCl (d), as well as in the DNA LCDs with 15 wt % of PEG content and similar salt concentrations (e, f). The spectra were recorded immediately after adding GNPs, and after 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45, and 60 min.

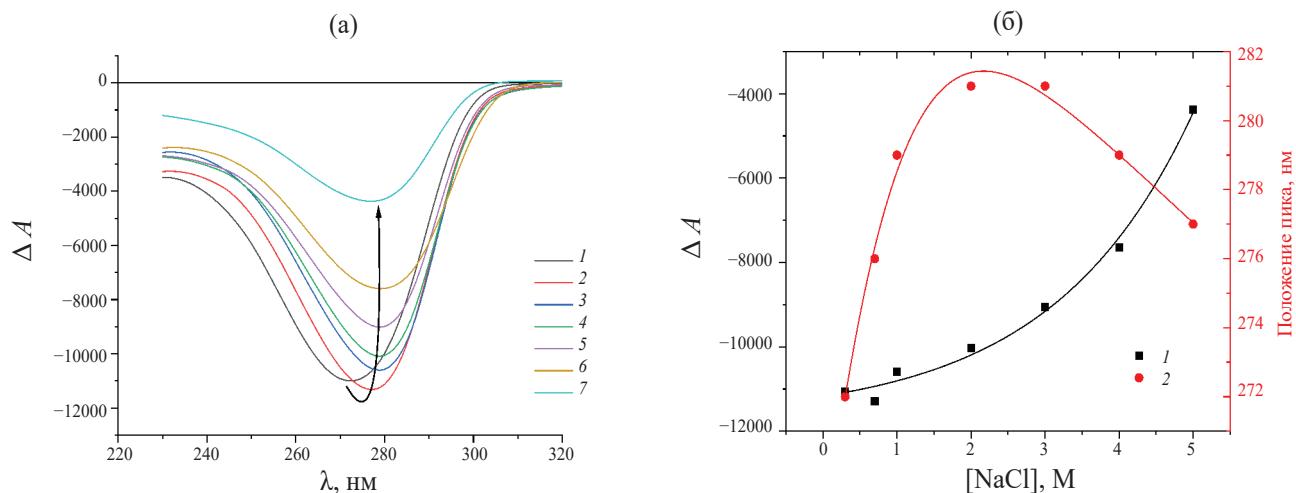


Рис. 4. (а) КД-спектры ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ, сформированных в присутствии NaCl в различной концентрации (1 – 0.3, 2 – 0.7, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 3, 6 – 4, 7 – 5 М); (б) соответствующие зависимости амплитуды аномального КД-сигнала (1) и положения его экстремума (2) от [NaCl].

Fig. 4. (a) CD spectra of the DNA LCDs with 15% PEG content, formed in the presence of NaCl at various concentrations (1 – 0.3, 2 – 0.7, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 3, 6 – 4, 7 – 5 M); (b) corresponding dependences of the amplitude of the anomalous CD signal (1) and position of its extremum (2) on [NaCl].

в 60 раз), то уже при содержании NaCl, равном 0.7 М, интенсивность аномальной полосы снижается всего на $\approx 56\%$ (т. е. в ≈ 2.27 раза). В присутствии 3 М NaCl максимальное уменьшение аномального сигнала составляет $\approx 38\%$, а в присутствии 5 М соли – примерно 32% (это соответствует падению его интенсивности в ≈ 1.61 и в ≈ 1.47 раза). Соответствующая зависимость относительной величины площади под графиками 1, приведенными в координатах $\delta(V)$ – [NaCl], интегрально характеризующая разбавление исследуемых систем, показана на Рис. 7а.

В то же время эволюция характера действия НЧЗ, наблюдающаяся с ростом концентрации NaCl в исследуемых системах, на своем начальном этапе очень близка к начальному этапу его эволюции, реализующемуся по мере увеличения концентрации ПЭГ в ЖКД ДНК с фиксированным содержанием соли (т. е. в диапазоне 15–21 масс. %; см. Рис. 1 и [3]). Так, при обработке гидрозолем ЖКД ДНК с 0.3 М NaCl, в полном соответствии с полученными ранее данными, НЧЗ не оказывают значимого деструктивного эффекта, а аномальный КД-сигнал сохраняется вплоть до внесения в систему всех 200 мкл гидрозоля (Рис. 6а и 6б). Последнее обстоятельство обусловлено стабилизирующим действием НЧЗ по отношению к упорядоченной внутренней структуре дисперсных частиц – встраиваясь между соседними молекулами нуклеиновой кислоты, они как бы «сшивают» их. По этой причине, как мы уже отмечали выше, «металлизированные» (т. е. содержащие значительное число НЧЗ) частицы ЖКД ДНК могут существовать даже в отсутствие высокого осмотического давления раствора [21]. При увеличении концентрации соли до 0.7 М наблюдаемая картина с точки зрения

поведения зависимости $\delta(V)$ фактически воспроизводит случай классической ЖКД ДНК с 18%-ным содержанием ПЭГ и 0.3 М NaCl (см. [3]) – она характеризуется следующими друг за другом областями разрушения и стабилизации ЖКД (соответственно «красная» и «зеленая» области на Рис. 6г). В свою очередь, зависимости δ от V в диапазоне концентрации NaCl от 1 до 5 М оказались довольно близкими по виду (Рис. 6е, 6з, 6к, 6м, 6о). Для всех этих систем доминирующим является деструктивное действие НЧЗ. Сопоставляя эти данные с полученными ранее, можно отметить их сходство с наблюдавшимися для системы, содержащей 21 масс. % ПЭГ [3]. Отметим, однако, что ни в одном из рассмотренных здесь случаев «зеленая» область не доминировала над «красной», как это имело место, например, для ЖКД ДНК с 27%-ным содержанием полимера [3]. В терминах отношения площадей $S_{\text{НЧЗ}}$ и $S_{\text{воды}}$ под соответствующими графиками $\delta(V)$ такое поведение иллюстрирует Рис. 7б: на полученной кривой отсутствует какой-либо разрыв, аналогичный показанному на Рис. 1.

Перейдем теперь к ЖКД ДНК с большим содержанием ПЭГ (от 18 до 30 масс. %) и варьируемым в том же, что и выше, диапазоне концентрации NaCl⁵. Отметим для начала, что увеличение [NaCl] определенным образом влияет на морфологию дисперсных частиц (Рис. 8). Так, в ЖКД ДНК с 0.3 М соли вплоть

⁵ Для их приготовления использовались исходные растворы ПЭГ с концентрацией 30 масс. %. Для получения системы с 30%-ным содержанием полимера ДНК вносили непосредственно в водно-солевой раствор ПЭГ в соотношении 18 мкл на 1 мл (здесь мы пренебрегаем разбавлением на 1.8%).

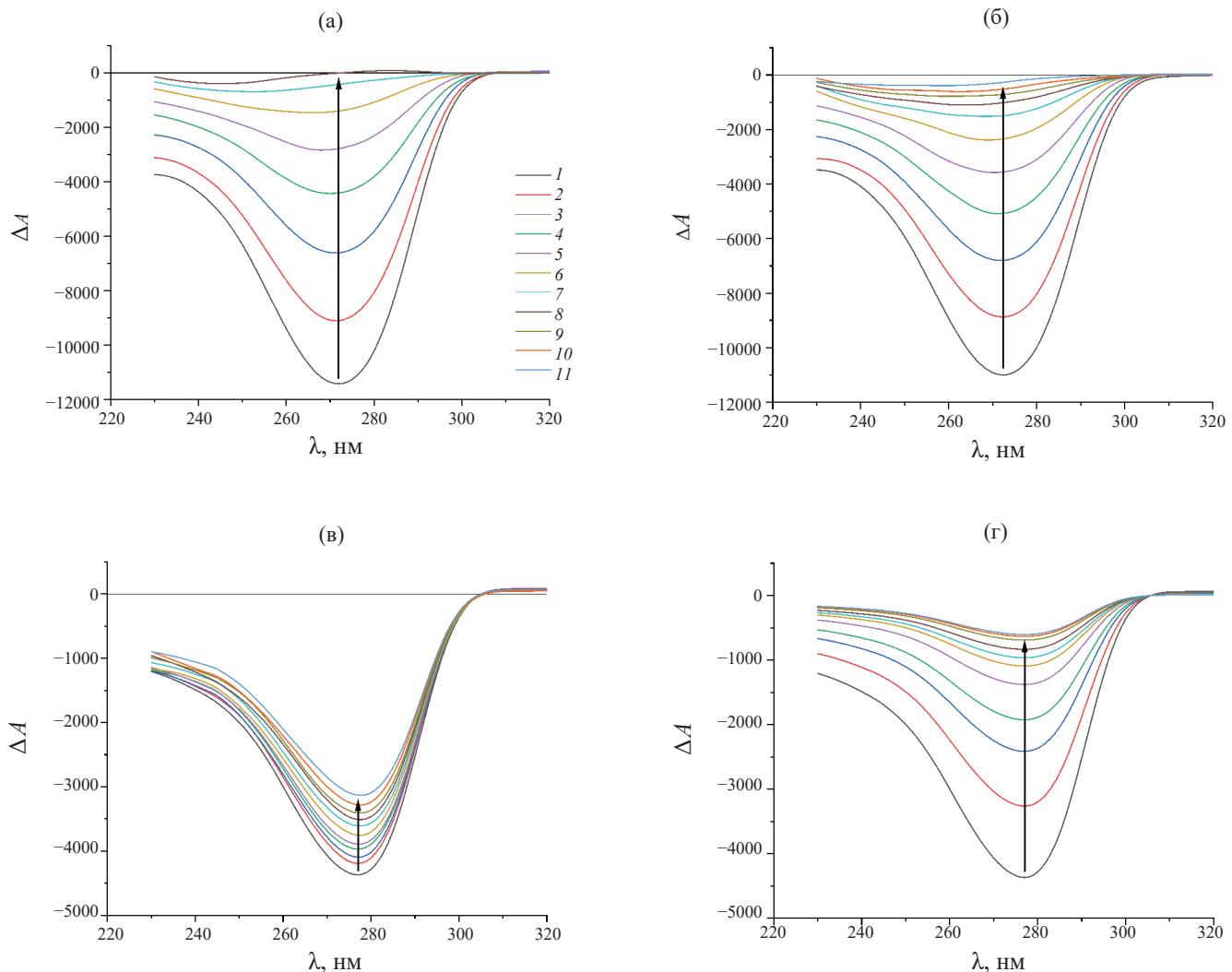


Рис. 5. КД-спектры, полученные при титровании ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ и различным содержанием NaCl (а, б – 0.3 М; в, г – 5 М) дистиллированной водой (а, в) или золем НЧЗ (б, г). Цветовая легенда для кривых на рисунках идентична: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 40, 4 – 60, 5 – 80, 6 – 100, 7 – 120, 8 – 140, 9 – 160, 10 – 180, 11 – 200 мкЛ.

Fig. 5. CD spectra of the DNA LCDs containing 15 wt % of PEG and different concentrations of NaCl (a, b – 0.3 M; c, d – 5 M) and titrated with distilled water (a, c) or GNP sol (b, d). The color legend for the curves in these figures is identical: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 40, 4 – 60, 5 – 80, 6 – 1000, 7 – 120, 8 – 140, 9 – 160, 10 – 180, 11 – 200 μ L.

до 21 масс. % ПЭГ наблюдаются только «классические» частицы сферической формы субмикронного/микронного размера. При 24%-ном содержании ПЭГ таких частиц в системе примерно столько же⁶, сколько и их агрегатов – несимметричных образований в форме грозььев (похожие частицы наблюдали в работе [25]), тогда как при 30 масс. % ПЭГ они практически отсутствуют. Отметим, что размер сферических частиц с ростом концентрации полимера заметно уменьшается. В системах с повышенной до 5 М концентрацией NaCl единичные агрегаты возникают уже начиная с 18%-ного содержания ПЭГ, а при 30 масс. % этого полимера агрегатов наблюдается

в 3 с лишним раза больше, чем «классических» частиц. Размеры их, однако, заметно меньше, чем в случае меньшей концентрации соли.

Результаты обработки этих систем дистиллированной водой и золем НЧЗ представлены на Рис. 9 (для удобства приведены данные только для граничных значений [NaCl]). Отметим, что все рассмотренные ЖКД ДНК характеризовались отрицательно ориентированным аномальным КД-сигналом. Хорошо видно, что по мере увеличения концентрации соли ни одна из них не проходит эволюционный путь, аналогичный пути системы с 15%-ным содержанием ПЭГ. Только у ЖКД ДНК с 18%-ным содержанием полимера наблюдаются значимые изменения отношения величин $S_{\text{НЧЗ}}$ и $S_{\text{вода}}$ (это отношение равно 1.04 при

⁶ Для каждой системы анализировали не менее 300 частиц.

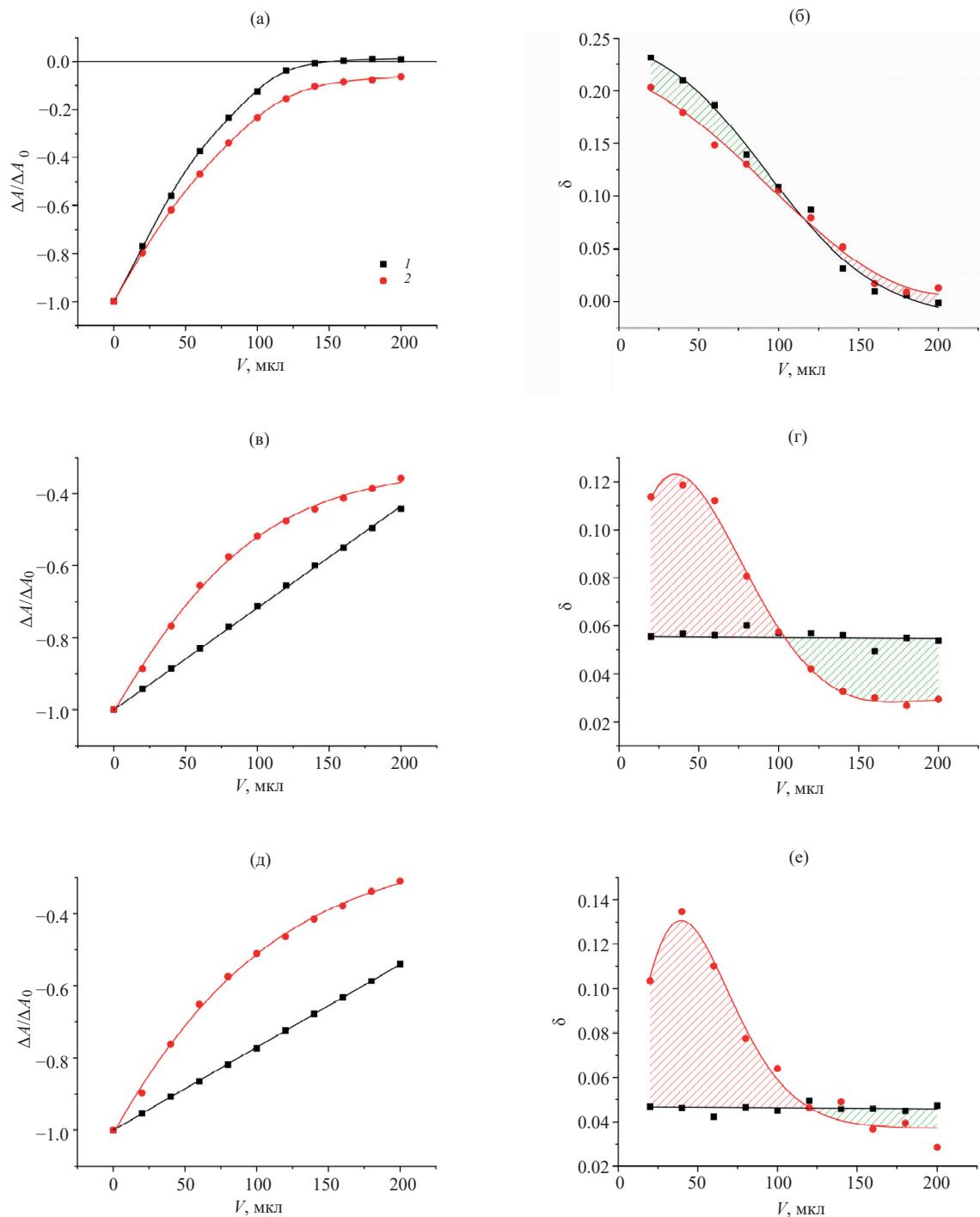


Рис. 6. Зависимости пиковой интенсивности КД-полосы, нормированной на абсолютное значение амплитуды сигнала соответствующего контрольного образца (а, в, д, ж, и, л, н), и рассчитанных значений δ (б, г, е, з, к, м, о) от вносимого объема дистиллированной воды (1) и гидрозоля НЧЗ (2) в ЖКД ДНК с фиксированным содержанием ПЭГ (15 масс. %) и варьируемой концентрацией NaCl: 0.3 (а, б), 0.7 (в, г), 1 (д, е), 2 (ж, з), 3 (и, к), 4 (л, м) и 5 М (н, о). Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (а, в, д, ж, и, л, н) и 14% (б, г, е, з, к, м, о).

Fig. 6. Dependences of the peak intensity of the CD band, normalized to the absolute value of the signal amplitude of the corresponding control sample (a, c, e, g, i, k, m), and calculated δ values (b, d, f, h, j, l, n) on the volume of distilled water (1) and GNP hydroxol (2) added to the DNA LCDs with fixed PEG content (15 wt %) and variable concentration of NaCl: 0.3 (a, b), 0.7 (c, d), 1 (e, f), 2 (g, h), 3 (i, j), 4 (k, l), and 5 M (m, n). Standard deviations calculated from three independent measurements do not exceed 7% (a, c, e, g, i, k, m) and 14% (b, d, f, h, j, l, n).

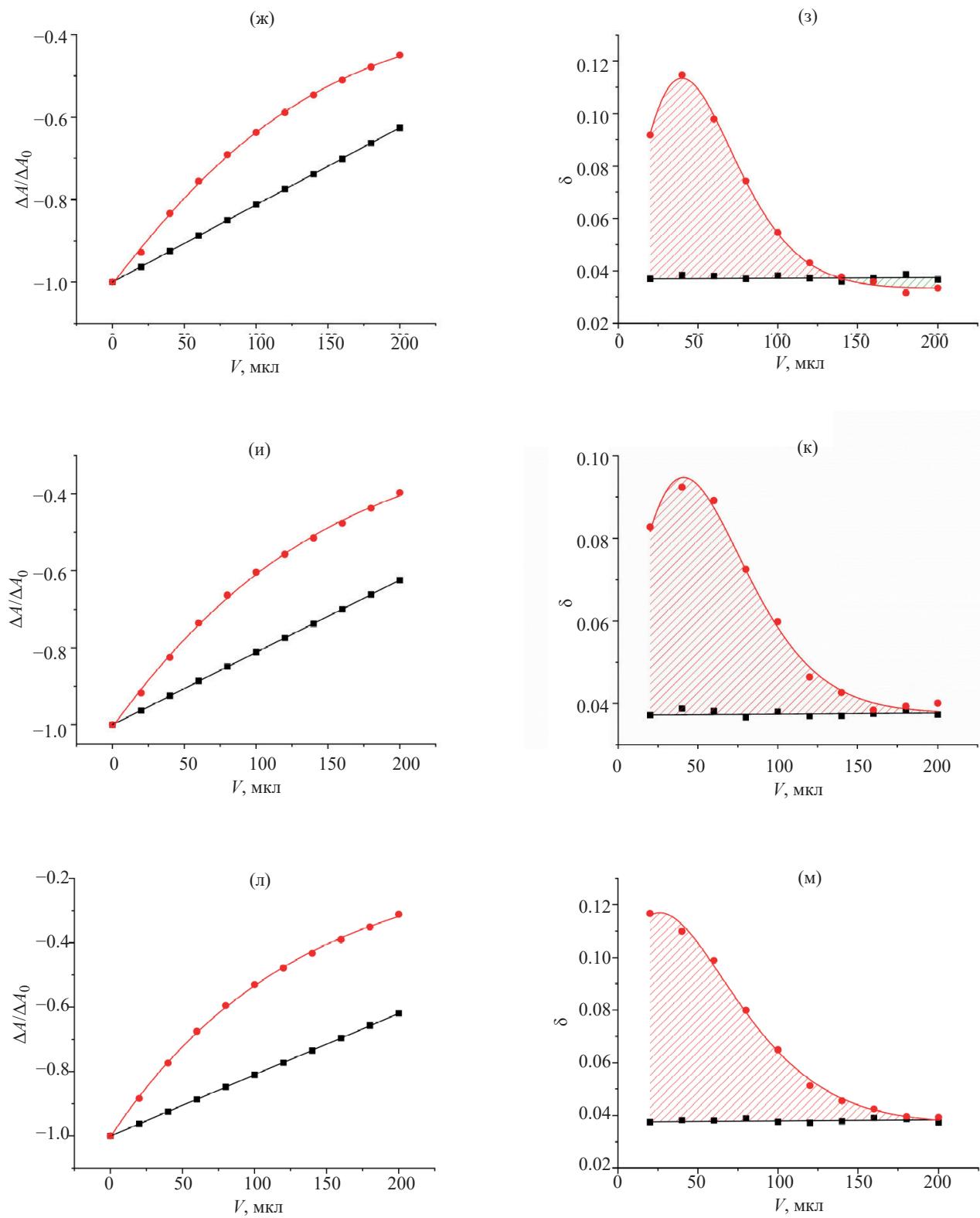


Рис. 6. Продолжение.
Fig. 6. (Continued).

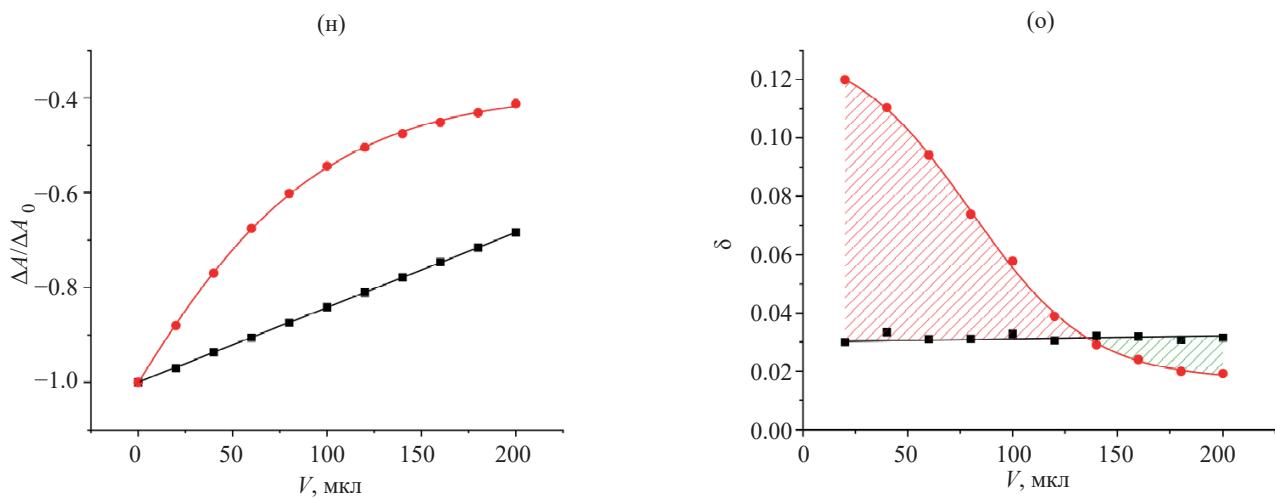


Рис. 6. Окончание.
Fig. 6. (End).

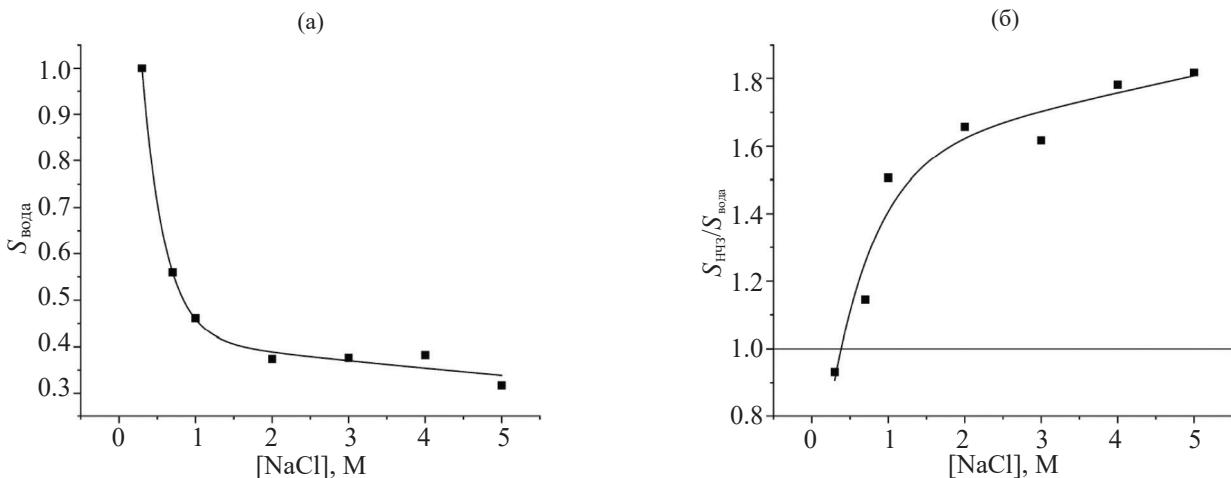


Рис. 7. Зависимости относительного значения $S_{\text{вода}}$ (а), а также отношения $S_{\text{НЧЗ}}/S_{\text{вода}}$ (б) от концентрации NaCl в ЖКД ДНК с 15%-ным содержанием ПЭГ.

Fig. 7. Dependences of the relative value of S_{water} (a), as well as the ratio $S_{\text{GNPs}}/S_{\text{water}}$ (b) on the NaCl concentration in the DNA LCDs with 15% PEG content.

$[\text{NaCl}] = 0.3 \text{ M}$ и 1.22 M при $[\text{NaCl}] = 5 \text{ M}$). Начиная же с 21 масс. % ПЭГ зависимости $\delta(V)$ при наименьшей и наибольшей концентрациях соли практически не различаются по своему виду.

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать заключение, что наблюдаемое скачкообразное изменение характера действия НЧЗ в области 21–24 масс. % ПЭГ (см. Рис. 1 и [3]), по-видимому, тесно связано с изменением ориентации аномального КД-сигнала. Положительно и отрицательно ориентированные полосы на спектре КД, характерные соответственно для левой и правой закрутки холестерических слоев в частицах ЖКД, могут быть получены при конденсации исходно право-

и левоориентированных молекул ДНК (в соответствии с принципом иерархической смены знака хиральности правоориентированные молекулы собираются в левозакрученные частицы и наоборот [26]). Кроме того, в определенных условиях может иметь место спонтанное изменение конформации молекул ДНК (например, их переход из правозакрученной *B*-формы в левозакрученную *Z*-форму при повышенной концентрации солей [27–29]). Тогда соответствующий вид может приобретать и КД-сигнал формируемой из них ЖКД [30]. Аналогичное изменение его ориентации в области высоких концентраций ПЭГ (начиная примерно с 24 масс. %), вызванное, по-видимому, различной степенью гидратации молекул этого

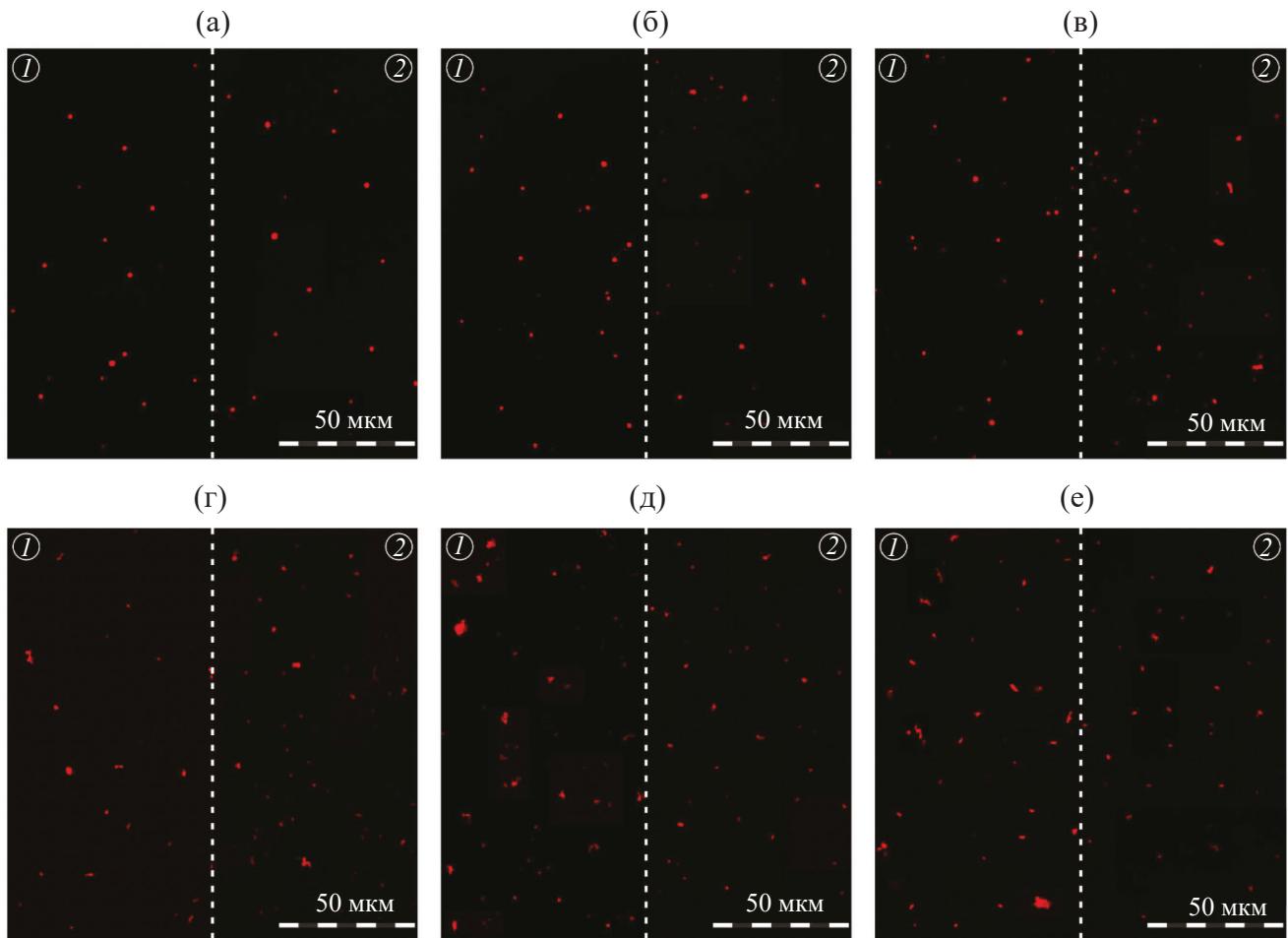


Рис. 8. Микрофотографии частиц ЖКД ДНК с разным содержанием NaCl (данные для 0.3 М соли показаны слева (1), а для 5 М – справа (2)) и ПЭГ (а – 15, б – 18, в – 21, г – 24, д – 27, е – 30 масс. %). Частицы визуализированы с помощью 7×10^{-7} М флуоресцентного красителя SG.

Fig. 8. Micrographs of the DNA LCD particles with different NaCl content (data for 0.3 M salt are shown on the left (1), and for 5 M – on the right (2)) and PEG content (a – 15, b – 18, c – 21, d – 24, e – 27, f – 30 wt %). The particles were visualized with 7×10^{-7} M fluorescent dye SG.

полимера в его исходных растворах варьирующейся концентрации, мы наблюдали в недавней работе [5]. Было сделано предположение, что в этих условиях для молекул ДНК также имеет место *B*–*Z* переход.

КД-спектры ЖКД ДНК, содержащих 30 масс. % ПЭГ, но приготовленных с использованием его исходных растворов различной концентрации (30 и 60 масс. %), приведены соответственно на Рис. 10а и 10б. В первом случае в области поглощения азотистых оснований присутствует высокointенсивная отрицательная полоса, а во втором – заметно менее интенсивная положительная. Вместе с тем, как было показано нами ранее, расстояния между соседними молекулами ДНК внутри дисперсных частиц этих двух систем идентичны [5]. Обработка же этих систем НЧЗ действительно приводит к различным результатам с точки зрения характера их действия (Рис. 10в–10е): в первом случае доминирует деструктивный эффект («красная» область заметно больше «зеленой»), а во втором – стабилизирующий (соотношение размеров

этих областей имеет обратный вид). При этом отношения площадей $S_{\text{НЧЗ}}$ и $S_{\text{вода}}$ для этих случаев равны соответственно 1.60 и 0.42, что подтверждает высказанное выше предположение. Поскольку Евдокимов и др. ранее также исследовали отклик ЖКД ДНК с правой и левой закруткой частиц на обработку ультрамалыми НЧЗ (см. [31, 32]; правозакрученные частицы авторы формировали из правозакрученных молекул *A*-ДНК), и регистрировавшиеся в их работах отклики КД-сигналов этих систем также различались, обсуждаемые здесь расхождения, по-видимому, можно отнести именно на счет различных форм молекул нуклеиновой кислоты. В таком случае наблюдаемое стабилизирующее действие НЧЗ может быть отчасти обусловлено тем, что, образуя комплекс с молекулами ДНК, они не дают последним сменить *Z*-форму закрутки на *B*-форму, как это, по-видимому, происходит при разбавлении системы водой.

Различия также были обнаружены в эффективности тушения флуоресценции красителя SG,

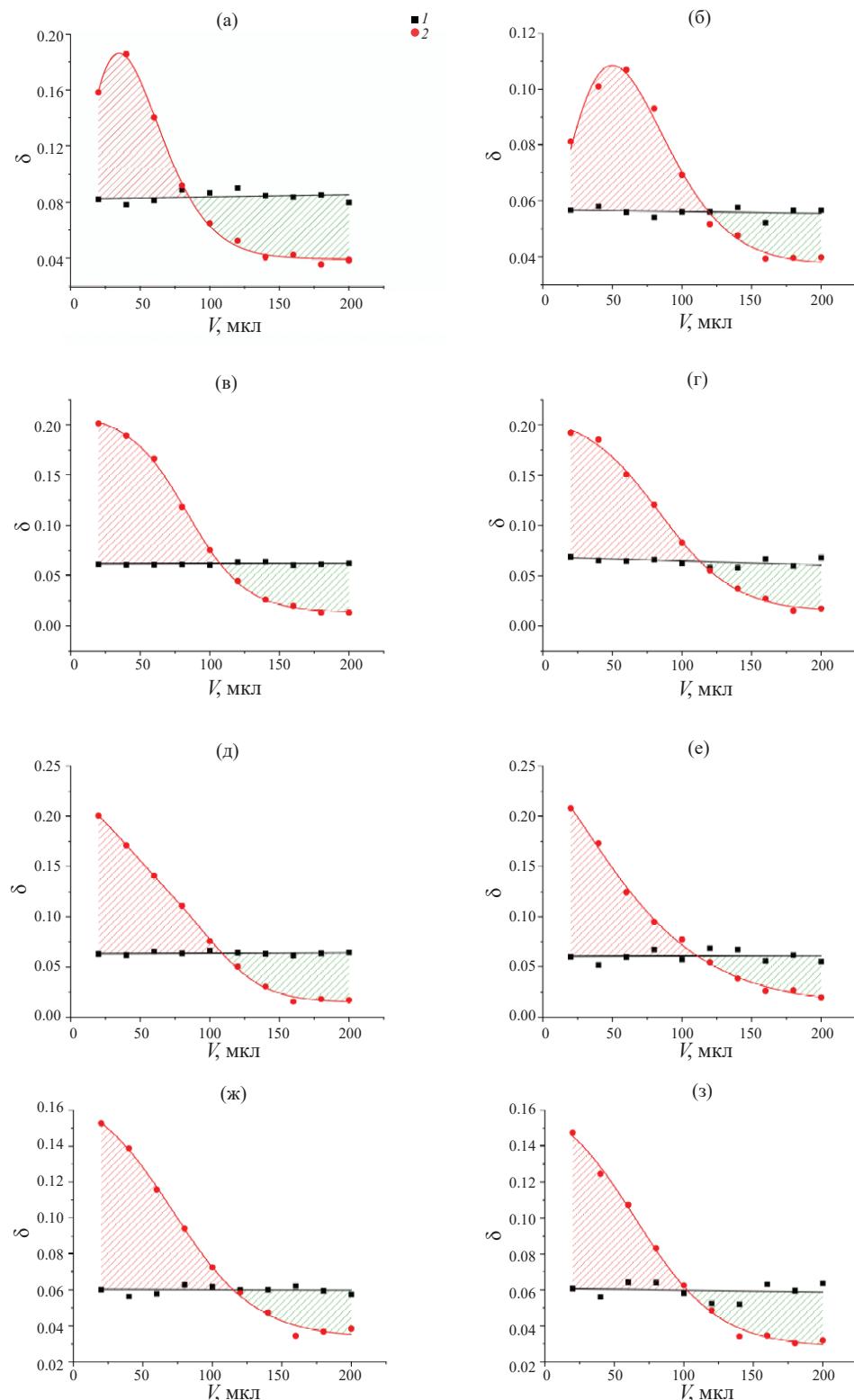


Рис. 9. Зависимости рассчитанных значений δ от вносимого объема дистиллированной воды (1) и гидрозоля НЧЗ (2) в ЖКД ДНК с разным содержанием ПЭГ (18 (а, б), 21 (в, г), 24 (д, е) и 27 масс. % (ж, з)) и NaCl (0.3 (а, в, д, ж), и 5 М (б, г, е, з)). Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 14%.

Fig. 9. Dependences of the calculated δ values on the volume of distilled water (1) and GNP hydrosol (2) introduced in the DNA LCDs with different contents of PEG (18 (a, b), 21 (c, d), 24 (e, f), and 27 wt % (g, h)) and NaCl (0.3 (a, c, e, g), and 5 M (b, d, f, h)). Standard deviations calculated from three independent measurements do not exceed 14%.

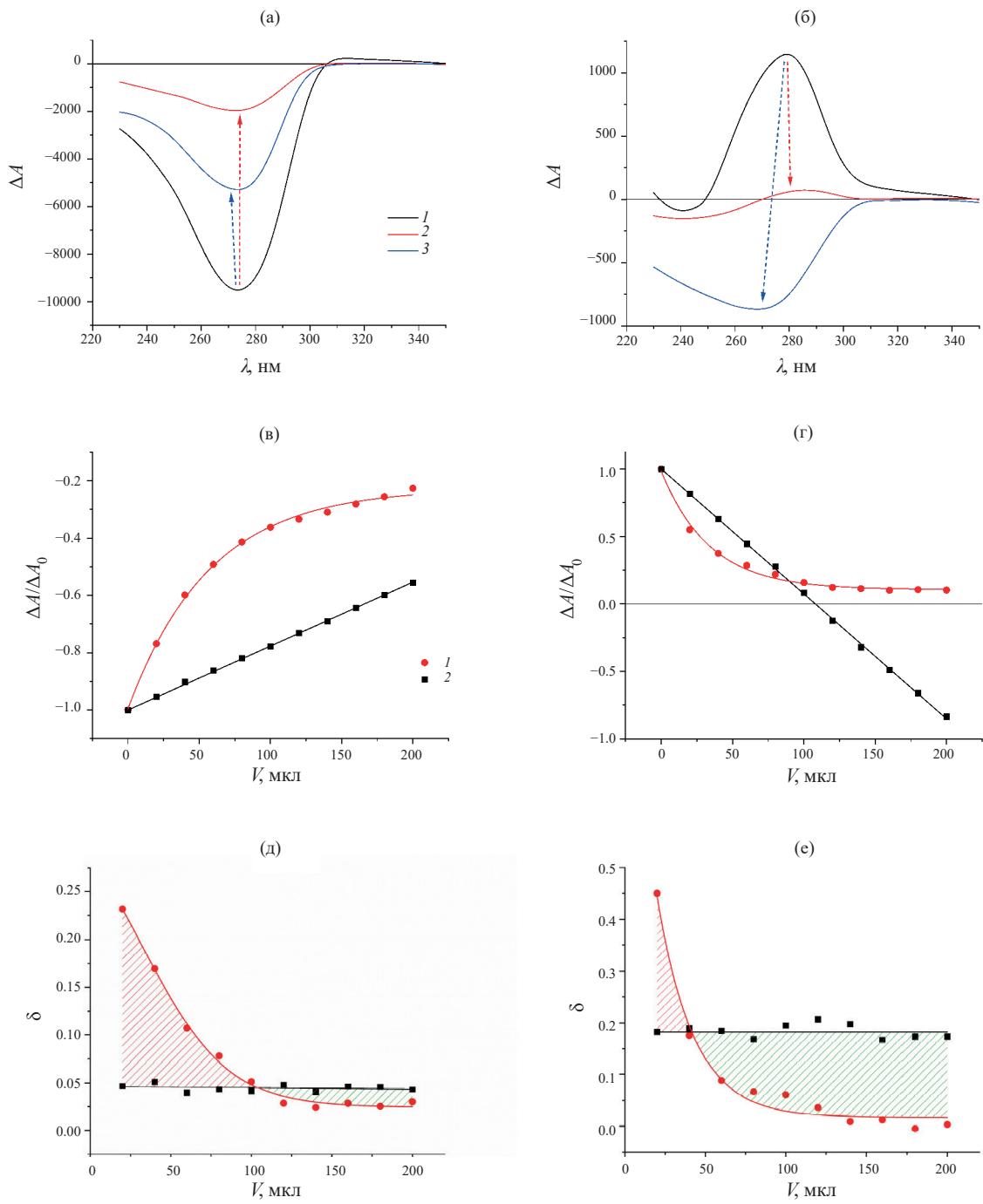


Рис. 10. Сопоставление действия ультрамалых НЧЗ на КД-сигналы ЖКД ДНК с 0.3 М NaCl и 30 масс. % ПЭГ, приготовленных с использованием исходных растворов этого полимера с концентрацией 30 масс. % (а, в, д) и 60 масс. % (б, г, е). (а, б) Исходные КД-спектры этих систем (1), а также записанные после добавления к ним 200 мкл золя НЧЗ (2) или дистиллированной воды (3). (в, г) Зависимости относительной величины амплитуды аномального КД-сигнала от вносимого объема гидрозоля НЧЗ (1) или дистиллированной воды (2). (д, е) Зависимости рассчитанных значений δ от величины вносимого объема жидкости; цветовая легенда идентична рисункам (в, г). Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (в, г) и 14% (д, е). **Fig. 10.** Comparison of the effect of ultrasmall GPNPs on the CD signals of DNA LCDs with 0.3 M of NaCl and 30 wt % of PEG, prepared using stock solutions of the polymer with concentration of 30 (a, c, e) and 60 wt % (b, d, f). (a, b) Initial CD spectra of these systems (1), as well as those recorded after adding 200 μ L of GNP sol (2) or the same volume of distilled water (3). (c, d) Dependences of the relative amplitude of the anomalous CD signal on the added volume of GNP hydrosol (1) or distilled water (2). (e, f) Dependences of the calculated δ values on the volume of liquid added; the color legend is identical to the figures (c, d). Standard deviations calculated from three independent measurements do not exceed 7% (c, d) and 14% (e, f).

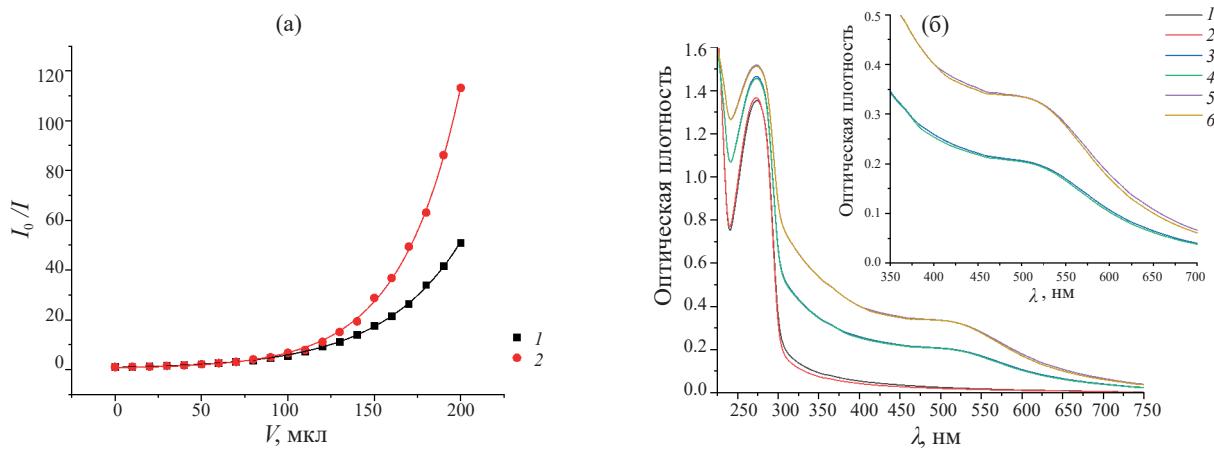


Рис. 11. (а) Зависимости отношения I_0/I от величины объема гидрозоля НЧЗ, добавляемого к ЖКД ДНК с 0.3 М NaCl и 30 масс. % ПЭГ, приготовленных с использованием исходных растворов полимера с концентрацией 30 масс. % (1) и 60 масс. % (2). Концентрация SG в обоих случаях равнялась 3.50×10^{-7} М. (б) Спектры поглощения исходных ЖКД ДНК (1, 2), а также обработанных 100 (3, 4) и 200 μL (5, 6) гидрозоля НЧЗ. Четные номера кривых соответствуют системам, приготовленным с использованием раствора ПЭГ с концентрацией 30 масс. %, а нечетные – системам на основе его 60%-го раствора. На вставке приведены спектры систем, содержащих НЧЗ, в диапазоне от 350 до 700 нм.

Fig. 11. (a) Dependences of the I_0/I ratio on the volume of GNP hydrosol added to the DNA LCDs with 0.3 M NaCl and 30 wt % of PEG, prepared using stock solutions of the polymer with concentration of 30 (1) and 60 wt % (2). (1) and 60 wt % (2). The SG concentration in both cases was 3.50×10^{-7} M. (b) Absorption spectra of the original DNA LCDs (1, 2), and those treated with 100 (3, 4) and 200 μL (5, 6) of GNP hydrosol. Even-numbered curves correspond to systems prepared using a stock solution of PEG with concentration of 30 wt %, and odd numbers – to the systems prepared using that of 60 wt %. Inset shows the spectra of the systems treated with GNP in the 350–700 nm range.

связанного с молекулами ДНК внутри частиц ее ЖКД. Соответствующие результаты представлены в координатах Штерна–Фольмера (I_0 и I – интенсивности сигнала в отсутствие и в присутствии НЧЗ; см. [33]) на Рис. 11а. Отметим, что в настоящей работе мы, как и ранее (см. [5]), не увидели существенных различий в интенсивности флуоресценции этого красителя в системах с положительной и отрицательной ориентацией аномального КД-сигнала (это собственно и свидетельствует о схожих расстояниях между молекулами нуклеиновой кислоты, формирующих такие дисперсные частицы), хотя было показано, что в комплексе с *Z*-ДНК она заметно ниже, чем в комплексе с *B*-ДНК [34]. Ранее мы также показали, что увеличение плотности их упаковки может приводить к более эффективному тушению флуоресценции связанного красителя при добавлении ультрамалых НЧЗ [9]. Однако возможны и исключения [10], поэтому сделать однозначный вывод о связи различающейся эффективности тушения флуоресценции и воздействия НЧЗ на структуру системы мы не можем. Отметим лишь, что существенных различий в спектрах поглощения исследуемых систем обнаружено не было (Рис. 11б).

Используя полученные данные, построим теперь зависимость относительной величины $S_{\text{НЧЗ}}$ от концентрации ПЭГ в ЖКД ДНК с 0.3 М NaCl. Отметим, что для приготовления всех систем этой серии использовался исходный раствор полимера с концентрацией

30 масс. %, а сами они характеризовались отрицательно ориентированным аномальным сигналом на спектрах КД. Сопоставим эту зависимость с полученной ранее Евдокимовым и др. зависимостью среднего расстояния между молекулами ДНК в дисперсных частицах (d), рассчитанного на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, от [ПЭГ] (Рис. 12). Видно, что динамика изменения величины $S_{\text{НЧЗ}}$ очень близка к таковой для величины d . Эти данные подтверждают сделанное в нашей недавней работе предположение о возможном ограничении проникновения НЧЗ в частицы ЖКД ДНК и росте «сопротивления» системы оказываемому ими возмущению по мере увеличения осмотического давления раствора ПЭГ (см. [3]).

В заключение мы хотели бы коснуться еще нескольких важных, на наш взгляд, моментов. Так, до сих пор до конца не определено, является ли действие ультрамалых НЧЗ деструктивным только по отношению к холестерической организации частиц ЖКД ДНК или же их внесение в эту систему может приводить к нарушению фазового разделения, иными словами, к распаду дисперсных частиц. Этот вопрос представляется принципиальным с точки зрения создания на основе ЖКД ДНК «металлизированных» наноконструкций для биомедицинских приложений (к примеру, флуоресцентных сенсорных систем, в которых НЧЗ могут выступать как «тушители» или,

напротив, «усилители» сигнала). С одной стороны, экспериментально установлено, что, возмущая холестерическую организацию молекул нуклеиновой кислоты в ее дисперсных частицах, ультрамалые НЧЗ могут и не разрушать сами эти частицы. Для описания такого воздействия ранее был предложен термин «нематизация» [21]. Кроме того, как уже упоминалось, образование межмолекулярных сшивок с участием НЧЗ обуславливает стабилизацию ЖКД при снижении осмотического давления раствора [31]. С другой стороны, как мы показали ранее, обработка ЖКД ДНК такими же НЧЗ в присутствии положительно заряженного красителя может приводить к разрушению ее частиц [35].

На Рис. 13а представлена классическая картина титрования холестерической ЖКД ДНК с 18%-ным содержанием ПЭГ⁷ золем ультрамалых НЧЗ. Мы не будем останавливаться на ее подробном описании и отметим лишь, что разделение фаз сохраняется во всем исследованном диапазоне концентраций НЧЗ (Рис. 13в). На Рис. 13б показан эффект разового добавления к такой же ЖКД ДНК исследуемого гидрозоля в объеме 200 мкл. Видно, что в этом случае аномальный КД-сигнал дисперсной системы сменяется хаотичным спектром молекулярного раствора ДНК, свидетельствующим об исчезновении фазового разделения и переходе системы в изотропное состояние. Этот вывод наглядно иллюстрируют данные конфокальной микроскопии (Рис. 13г). Итак, при одноразовом введении в ЖКД всех 200 мкл золя НЧЗ фактически не успевают стабилизировать внутреннюю структуру частиц ЖКД ДНК и оказывают на нее лишь деструктивное воздействие (как было показано ранее, «зеленая» область на зависимости $\delta(V)$ в такой системе идет после «красной» [3]), что вместе со снижением осмотического давления раствора в итоге приводит к распаду дисперсных частиц. Таким образом, можно заключить, что непосредственное действие НЧЗ на частицы ЖКД ДНК протекает параллельно с разбавлением системы. На Рис. 13д зависимости относительной амплитуды аномального КД-сигнала «классических» холестерических ЖКД ДНК от дробно или разово вносимого объема золя НЧЗ сопоставлены с аналогичной зависимостью, полученной при разбавлении такой системы дистиллированной водой. Примечательно, что на начальном этапе более сильное воздействие на КД-сигнал системы НЧЗ оказывают при ее титровании. Здесь важно учитывать, что разовое введение НЧЗ (особенно в высокой концентрации) больше способствует их агрегации при попадании в дисперсионную среду. Агрегаты должны обладать существенно сниженной способностью к проникновению внутрь частиц ЖКД ДНК. Образование же кластеров из НЧЗ между соседними молекулами (или их слоями) ДНК в частицах ее ЖКД, напротив, представляется более вероятным при титровании системы. Развивая это предположение, можно допустить, что во многом именно

⁷ Для ее приготовления использовался исходный раствор ПЭГ с концентрацией 60 масс. %.

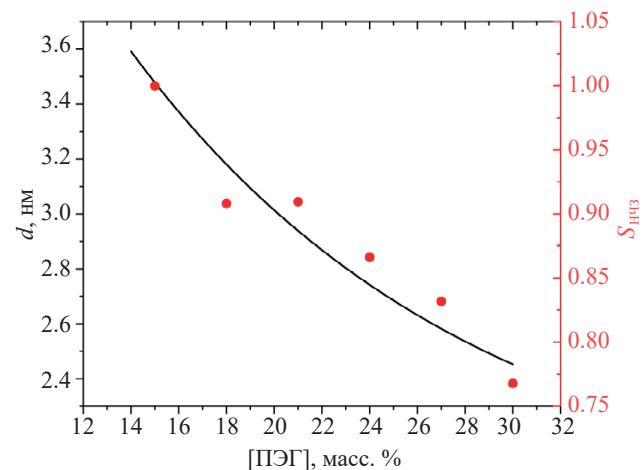


Рис. 12. Зависимости среднего расстояния d между соседними молекулами ДНК в частицах ее ЖКД (черная кривая, построенная по данным [2]) и относительного значения S_{HCh} (красные точки) от концентрации ПЭГ в системах с 0.3 М NaCl.

Fig. 12. Dependences of the average distance d between adjacent DNA molecules in its LCD particles (black curve, built according to data from [2]) and relative value of S_{GNPs} (red dots) on the PEG concentration in the systems with 0.3 M NaCl.

образованием таких агрегатов (см. [23, 24]) обусловлено стабилизирующее действие НЧЗ по отношению к внутренней структуре дисперсных частиц.

Обратимся теперь к кинетике взаимодействия ультрамалых НЧЗ с частицами ЖКД ДНК. Кинетические кривые изменения амплитуды аномального КД-сигнала, полученные при обработке «классической» холестерической дисперсной системы с 18%-ным содержанием ПЭГ дистиллированной водой и золем НЧЗ, представлены на Рис. 14 (кривые 1 и 2 соответственно). Обе зависимости имеют выраженный двухэкспоненциальный характер, а рассчитанные значения констант скорости в первом случае составляют 1.95×10^{-2} и $2.94 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, а во втором — 1.99×10^{-2} и $4.46 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$. К различиям этих зависимостей можно отнести более интенсивное падение сигнала при обработке системы золем НЧЗ, а также отсутствие выхода на плато кривой 2 в исследованном временном диапазоне. Последнее наблюдение, впрочем, хорошо согласуется с более ранними данными (см. [22]). Отметим, что с точки зрения изменения амплитуды аномального КД-сигнала взаимодействие НЧЗ с частицами ЖКД ДНК, как и разбавление этой системы — достаточно быстрые процессы, и «мертвое время» в 3–7 с не позволяет наблюдать их начальную стадию. Тем не менее, полученные данные скорее подтверждают предположение об их одновременном (или близком к таковому) протекании. Однако четко выделить непосредственное действие НЧЗ на частицы ЖКД ДНК, а также определить характерное время этого процесса и соответствующую константу скорости не представляется возможным.

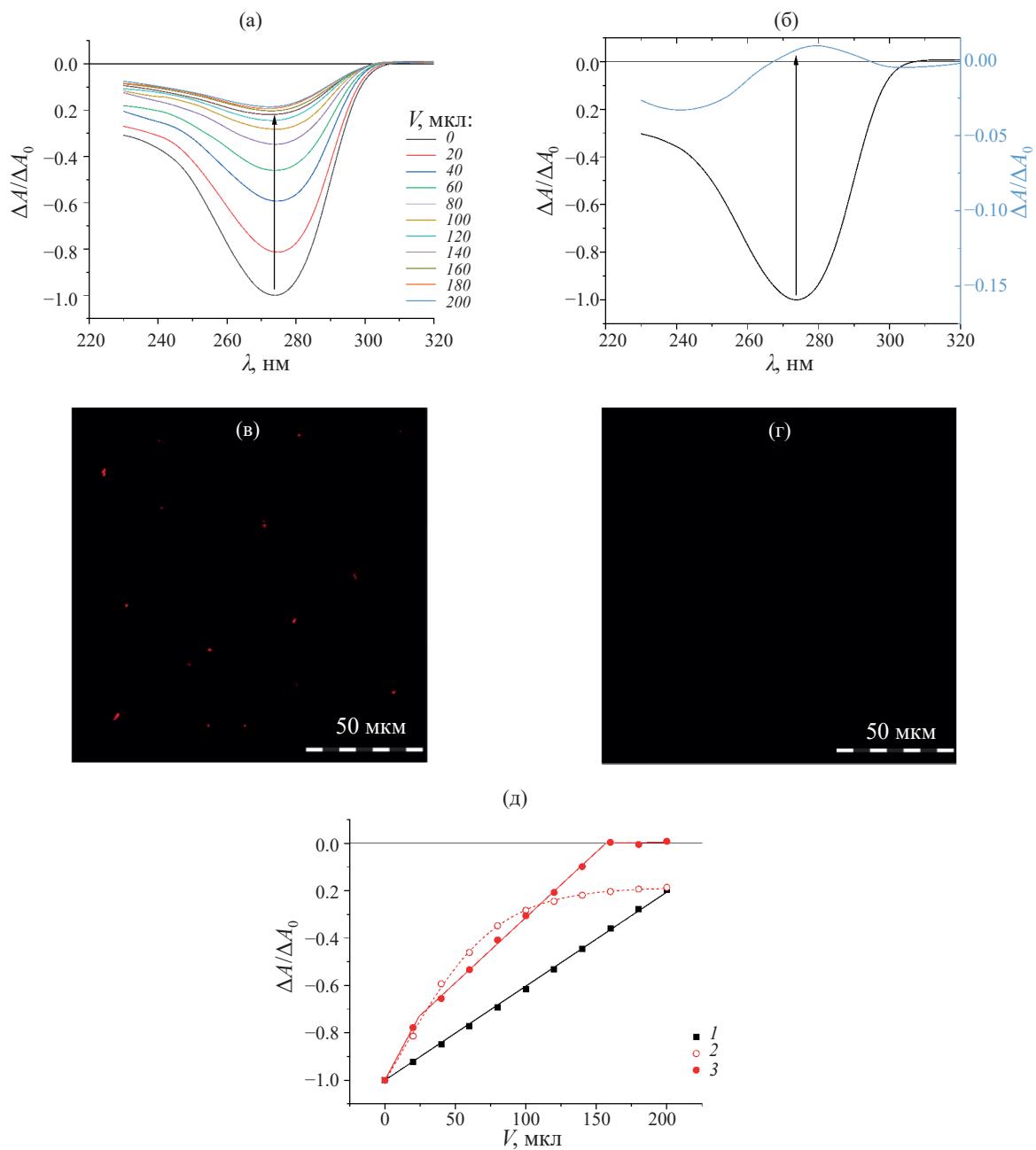


Рис. 13. (а, б) КД-спектры, полученные при титровании 1 мл «классической» холестерической ЖКД ДНК с 18%-ным содержанием ПЭГ 200 мкл золя НЧЗ с шагом 20 мкл (а) или при одноразовом введении в 1 мл такой системы 200 мкл золя (б). (в, г) Микрофотографии частиц этих ЖКД ДНК после дробного (в) и разового (г) введения 200 мкл золя НЧЗ. Частицы визуализированы с помощью 7×10^{-7} М флуоресцентного красителя SG. (д) Сопоставление зависимостей относительной амплитуды аномального КД-сигнала от величины внесенного объема дистиллированной воды (1) или золя НЧЗ (2 – титрование системы, 3 – разовое введение кратных 20 мкл объемов золя).

Fig. 13. (a, b) CD spectra of “classic” cholesteric DNA LCD with 18 wt % of PEG 200 μL of GNP sol in 20 μL increments (a) or treated with single injection of 200 μL of the sol (b). In both cases, the initial sample volume was 1 mL. (c, d) Micrographs of the particles of these DNA LCDs after fractional (c) and single (d) introduction of 200 μL of GNP sol. The particles were visualized with 7×10^{-7} M SG. (e) Comparison of the dependences of the relative amplitude of the anomalous CD signal on the value of introduced volume of distilled water (1) or GNP sol (2 – titration of the system, 3 – injections of the sol volumes multiple of 20 μL).

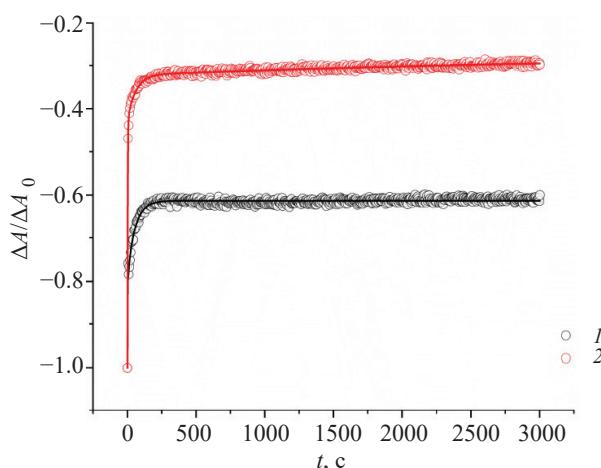


Рис. 14. Зарегистрированные на длине волны $\lambda = 270$ нм кинетические кривые снижения амплитуды аномального КД-сигнала «классической» холестерической ЖКД ДНК с 18%-ным содержанием ПЭГ при введении в нее 100 мкл дистиллированной воды (1) или гидрозоля НЧЗ (2).

Fig. 14. Kinetic curves of the decrease in the amplitude of the anomalous CD signal of "classic" cholesteric DNA LCD with 18 wt % of PEG content, recorded at a wavelength of $\lambda = 270$ nm, upon introduction of 100 μL of distilled water (1) or GNP hydrosol (2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, резюмируем основные выводы настоящего исследования. Показано, что при повышении в буферном растворе содержания NaCl синтезированные по методу Даффа НЧЗ быстро агрегируют и выпадают в осадок. Вместе с тем связывание с молекулами ПЭГ или ДНК существенно повышает агрегативную и седиментационную устойчивость системы. Выбранный метод варьирования осмотических условий не только за счет изменения концентрации ПЭГ, но также и за счет изменения концентрации соли позволил пролить свет на поведение НЧЗ в дисперсных системах с различной плотностью упаковки молекул ДНК, а именно, на баланс между их деструктивным и стабилизирующим действием. Показано, что ранее наблюдавшийся разрыв на зависимости отношения площадей $S_{\text{НЧЗ}}/S_{\text{вода}}$ под графиками $\delta(V)$ для случаев обработки ЖКД с разным содержанием ПЭГ гидрозолем ультрамалых НЧЗ и дистиллированной водой связан с различной ориентацией аномального КД-сигнала, вызываемой, по-видимому, изменением конформации молекул ДНК. Полученные данные также свидетельствуют о том, что взаимодействие ультрамалых НЧЗ с молекулами ДНК в различной конформации в конденсированной фазе может заметно различаться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jordan C.F., Lerman L.S., Venable J.H.* Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions // *Nature New Biology.* 1972. V. 236. № 64. P. 67–70.
<https://doi.org/10.1038/newbio236067a0>
2. *Yevdokimov Y.M., Skuridin S.G., Semenov S.V., et al.* Re-entrant cholesteric phase in DNA liquid-crystalline dispersion particles // *Journal of Biological Physics.* 2017. V. 43. № 1. P. 45–68.
<https://doi.org/10.1007/s10867-016-9433-4>
3. *Колыванова М.А., Климович М.А., Шишимакова Е.М. и др.* Взаимодействие ультрамалых наночастиц золота с жидкокристаллическими микрочастицами ДНК: разрушение vs стабилизация // *Коллоидный журнал.* 2024. Т. 86. № 3. С. 344–356.
<https://doi.org/10.31857/s0023291224030049>
4. *Keller D., Bustamante C.* Theory of the interaction of light with large inhomogeneous molecular aggregates. II. Psi-type circular dichroism // *The Journal of Chemical Physics.* 1986. V. 84. № 6. P. 2972–2980.
<https://doi.org/10.1063/1.450278>
5. *Morozov V.N., Klimovich M.A., Shibaeva A.V., et al.* Optical polymorphism of liquid-crystalline dispersions of DNA at high concentrations of crowding polymer // *International Journal of Molecular Sciences.* 2023. V. 24. № 14. P. 11365.
<https://doi.org/10.3390/ijms241411365>
6. *Stanley C.B., Hong H., Strey H.H.* DNA cholesteric pitch as a function of density and ionic strength // *Biophysical Journal.* 2005. V. 89. № 4. P. 2552–2557.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064550>
7. *Yasar S., Podgornik R., Valle-Orero J., et al.* Continuity of states between the cholesteric \rightarrow line hexatic transition and the condensation transition in DNA solutions // *Scientific Reports.* 2014. V. 4. P. 6877.
<https://doi.org/10.1038/srep06877>
8. *Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Семенов С.В. и др.* Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. Москва: Радиотехника. 2008.
9. *Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V., et al.* Fluorescence superquenching of SYBR Green I in crowded DNA by gold nanoparticles // *Journal of Luminescence.* 2020. V. 219. P. 116898.
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2019.116898>

10. Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V., et al. Comparison of quenching efficacy of SYBR Green I and PicoGreen fluorescence by ultrasmall gold nanoparticles in isotropic and liquid-crystalline DNA systems // Journal of Molecular Liquids. 2021. V. 321. P. 114751.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114751>
11. Клинович М.А., Колыванова М.А., Дементьева О.В. и др. Влияние старения ультрамалых наночастиц золота на их взаимодействие с холестерическими микрочастицами ДНК // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85. № 5. С. 583–592.
<https://doi.org/10.31857/s0023291223600542>
12. López Zeballos N.C., Gauna G.A., García Vior M.C., et al. Interaction of cationic phthalocyanines with DNA. Importance of the structure of the substituents // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2014. V. 136. P. 29–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.013>
13. Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications // Nucleic Acids Research. 2004. V. 32. № 12. P. e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>
14. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2301–2309.
<https://doi.org/10.1021/la00033a010>
15. Jin N.Z., Anniebell S., Gopinath S.C.B., et al. Variations in spontaneous assembly and disassembly of molecules on unmodified gold nanoparticles // Nanoscale Research Letters. 2016. V. 11. № 1. P. 399.
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1615-2>
16. Alba-Molina D., Martín-Romero M.T., Camacho L., et al. Ion-mediated aggregation of gold nanoparticles for light-induced heating // Applied Sciences. 2017. V. 7. № 9. P. 916. <https://doi.org/10.3390/app7090916>
17. Ramanathan S., Gopinath S.C.B., Arshad M.K.M., et al. A DNA based visual and colorimetric aggregation assay for the early growth factor receptor (EGFR) mutation by using unmodified gold nanoparticles // Mikrochimica Acta. 2019. V. 186. № 8. P. 546.
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3696-y>
18. Ериов Б.Г. Короткоживущие малые кластеры металлов в водных растворах: получение, идентификация и свойства // Известия Академии наук. Серия химическая. 1999. № 1. С. 1–15.
19. Дементьева О.В., Карцева М.Е., Сухов В.М. и др. Температурно-временная эволюция ультрамалых затравочных наночастиц золота и синтез плазмонных нанооболочек // Коллоидный журнал. 2017. Т. 79. № 5. С. 562.
<https://doi.org/10.7868/s0023291217050056>
20. Карцева М.А., Шишмакова Е.М., Дементьева О.В. и др. Рост фосфониевых наночастиц золота в щелочной среде: кинетика и механизм процесса // Коллоидный журнал. 2021. Т. 83. № 6. С. 644–650.
<https://doi.org/10.31857/s0023291221060057>
21. Евдокимов Ю.М. Наночастицы золота и жидкые кристаллы ДНК // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2015. Т. 56. № 3. С. 147–157.
22. Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Штыкова Э.В. и др. Фиксация наночастиц золота в структуре квазинематических слоев, образованных молекулами ДНК // Биологические мембранны. 2011. Т. 28. № 3. С. 191–198.
23. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Кац Е.И. и др. Кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // Acta Naturae. 2012. Т. 4. № 4 (15). С. 80–93.
24. Евдокимов Ю.М., Штыкова Э.В., Салянов В.И. и др. Линейные кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // Биофизика. 2013. Т. 58. № 2. С. 210–220.
25. Muzzopappa F., Hertzog M., Erdel F. DNA length tunes the fluidity of DNA-based condensates // Biophysical Journal. 2021. V. 120. № 7. P. 1288–1300.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.027>
26. Твердислов В.А., Малышко Е.В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы // Успехи физических наук. 2019. Т. 189. № 4. С. 375–385.
<https://doi.org/10.3367/ufn.2018.08.038401>
27. Doktycz M.J., Benight A.S., Sheardy R.D. Energetics of B-Z junction formation in a sixteen base-pair duplex DNA // Journal of Molecular Biology. 1990. V. 212. № 1. P. 3–6.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90297-y](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90297-y)

28. *Chen F.Y.H., Park S., Otomo H., et al.* Investigation of B-Z transitions with DNA oligonucleotides containing 8-methylguanine // *Artificial DNA: PNA & XNA*. 2014. V. 5. № 1. P. e28226. <https://doi.org/10.4161/adna.28226>
29. *Bao H.L., Masuzawa T., Oyoshi T., et al.* Oligonucleotides DNA containing 8-trifluoromethyl-2'-deoxyguanosine for observing Z-DNA structure // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. № 13. P. 7041–7051. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa505>
30. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Акименко Н.М.* Жидкокристаллические микрофазы низкомолекулярных двухцепочечных нуклеиновых кислот и синтетических полинуклеотидов // *Высокомолекулярные соединения*. 1984. Т. 26. № 11. С. 2403–2410.
31. *Скуридин С.Г., Салянов В.И., Попенко В.И. и др.* Структурные эффекты, вызываемые наночастицами золота, в частицах холестерических жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // *Химико-фармацевтический журнал*. 2013. Т. 47. № 2. С. 3–11.
32. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* Наночастицы золота влияют на «узнавание» двухцепочечных молекул ДНК и запрещают формирование их холестерической структуры // *Жидкие кристаллы и их практическое использование*. 2014. Т. 14. № 4. С. 5–21.
33. *Gehlen M.H.* The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map // *Journal of Photochemistry and Photobiology C*. 2020. V. 42. P. 100338. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338>
34. *Hur J.H., Lee A.R., Yoo W., et al.* Identification of a new Z-DNA inducer using SYBR green 1 as a DNA conformation sensor // *FEBS Letters*. 2019. V. 593. № 18. P. 2628–2636. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13513>
35. *Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др.* Взаимодействие наночастиц золота с цианиновыми красителями в холестерических субмикрочастицах ДНК. Влияние способа их введения в систему // *Химическая физика*. 2023. Т. 42. № 1. С. 64–72. <https://doi.org/10.31857/s0207401x23010065>