

УДК 577.113.7

## ИЗУЧЕНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК И ПОЛИЛИЗИНА МЕТОДАМИ НАНОГРАВИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*Р.Ф. Фахруллин, З.И. Абрамова, О.А. Коновалова, М.Х. Салахов*

### Аннотация

Методы нанотехнологии в биохимических исследованиях позволяют получить информацию о процессах взаимодействия биологических макромолекул *in situ*. В настоящей работе методом наногравиметрического анализа установлено влияние вторичной структуры полинуклеотида на процесс межмолекулярного взаимодействия ДНК и полилизина. Определены время насыщения и время связывания полипептида с нативной ДНК. Установлен эластичный характер нанопленки полилизин – ДНК. Методом атомно-силовой микроскопии проанализирована топография поверхностей золотого электрода, полилизиновой нанопленки и нанопленки полилизин-ДНК и установлены параметры перепада высот и среднеквадратичной шероховатости для каждой из поверхностей. Результаты исследования могут быть использованы при создании пьезокварцевых ДНК-биосенсоров.

### Введение

Исследование взаимодействия нуклеиновых кислот и белков является одним из актуальных направлений в биологии. Такие взаимодействия осуществляются на всех этапах репликации и экспрессии ДНК, а также в ходе многочисленных процессов регуляции, следовательно, их роль в функционировании живых систем чрезвычайно велика [1]. В качестве экспериментальной модели нередко выступает полипептид полилизин, обладающий высоким сродством к ДНК [2]. Способность полилизина к комплексообразованию с ДНК используется в генной инженерии [3] и иммобилизации ДНК для проведения иммунологического анализа [4]. Кроме того, многослойные пленки ДНК-полилизин активно изучаются как элемент в системе контролируемого высвобождения ДНК в сложных системах [5].

Нанотехнология как междисциплинарное направление, сформировавшееся в науке в течение последних 15 лет, изучает объекты, размер которых составляет примерно 0.1–100 нм [6]. К объектам нанотехнологии можно отнести такие биополимеры, как ДНК и полилизин. Методологический арсенал нанотехнологии включает в себя разнообразные подходы к изучению сверхмалых объектов. Например, сканирующая электронная, туннельная и атомно-силовая микроскопии позволяют осуществить подробный анализ поверхностной структуры исследуемого вещества [6], а сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса [7] или кварцевой наногравиметрии [8] регистрируют при соединении сверхмалых (до единичных молекул) количеств вещества к исследуемому объекту.

дуемой поверхности. Использование некоторых методов нанотехнологии в биохимических исследованиях позволяет получить информацию о процессах взаимодействия между макромолекулами *in situ*.

Наногравиметрический анализ основан на масс-чувствительности кварцевых микровесов (КМ). КМ – высокочувствительный сенсор, позволяющий определять приращение массы на поверхности в субнанограммовом диапазоне. Чувствительным элементом КМ является кварцевый резонатор (кристалл) с напыленными на его поверхности металлическими электродами (рис. 1, см. цветную вклейку).

При приложении разности потенциалов к электродам в резонаторе возникает переменное электрическое поле. Напряжение изменяет исходную ориентацию кристаллической решетки, что вызывает возникновение механических колебаний (стоячей волны) внутри кварцевого диска. Данная волна имеет определенную частоту колебаний, называемую основной (резонансной) частотой резонатора. Присоединение дополнительной массы к поверхности электрода обуславливает пропорциональное уменьшение частоты колебаний, что позволяет использовать кварцевые резонаторы в качестве микровесов [9].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет всесторонне исследовать структуру поверхностей, в том числе и тонких пленок, сформированных из биологических макромолекул. В процессе сканирования регистрируют вариации силового взаимодействия кончика иглы с исследуемой поверхностью. Игла расположена на конце специальной консольной балки (кантилевера), способной изгибаться под действием небольших сил взаимодействия Ван-дер-Ваальсового типа, возникающих между острием иглы и сканируемой поверхностью. Деформация кантилевера регистрируется с помощью чувствительных датчиков, что дает возможность после соответствующих преобразований воссоздать с высоким разрешением топографию исследуемой поверхности [6].

В данной работе показано применение методов наногравиметрического анализа и атомно-силовой микроскопии для изучения межмолекулярного взаимодействия ДНК и полилизина.

## 1. Материалы и методы

**1.1. Теория наногравиметрического анализа.** Изменение массы нанесенного на электрод слоя обуславливает изменение частоты колебаний резонатора. Зависимость частоты от массы нанесенного вещества описывается формулой Зауэрбрея [10]:

$$\Delta f = \frac{2f_0^2 \Delta m}{(\rho_q \mu_q)^{1/2} S}, \quad (1)$$

где  $\Delta f = f_0 - f$  – изменение частоты колебаний резонатора при нанесении слоя (Гц);  $f_0$  – резонансная частота колебаний резонатора (Гц);  $\Delta m$  – масса нанесенного покрытия на единицу площади (г/см<sup>2</sup>);  $S$  – площадь электродов (см<sup>2</sup>);  $\rho_q$  – плотность кварца (2.648 г·см<sup>-3</sup>);  $\mu_q$  – модуль сдвига кварца (2.947·10<sup>11</sup> г·см<sup>-1</sup>·с<sup>-2</sup>).

Уравнение справедливо только для тонких плотных однородных пленок, сформированных на электроде.

Использование КМ в жидкой среде предполагает погружение одной из сторон кристалла в исследуемый раствор. Контакт электрода с жидкостью обуславливает значительное изменение частоты колебаний. При работе в жидкой среде изменение частоты колебаний резонатора в результате нанесения дополнительной массы на электрод определяется уравнением Каназавы и Гордона [11]:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \left( \frac{\rho_l \eta_l}{(\rho_q \mu_q)} \right)^{1/2}, \quad (2)$$

где  $\rho_l$  – плотность пленки, контактирующей с электродом резонатора;  $\eta_l$  – вязкость пленки, контактирующей с электродом резонатора.

Механические колебания кварцевого резонатора могут быть представлены в виде эквивалентного электрического контура Баттерворфа – Ван Дайка представленного на рис. 2 [12].

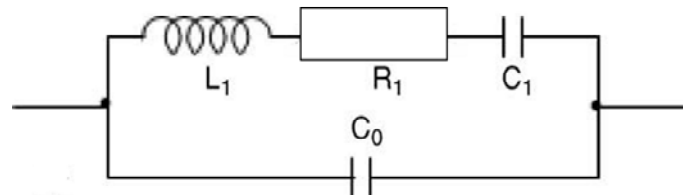


Рис. 2. Принципиальная схема эквивалентного электрического контура Баттерворфа – Ван Дайка

Физические значения параметров контура:  $C_0$  – статическая емкость, обусловленная емкостью электродов и проводки,  $L_1$  и  $C_1$  – индуктивность и емкость, обусловленные инерционностью колеблющегося кварца и его механической упругостью. Реактивное сопротивление ( $R_1$ ) зависит от вязкости и плотности тонкой поверхностной пленки, нанесенной на электрод резонатора. Зависимость определяется уравнением [13]:

$$R_1 = \frac{S(2\pi f_0 \rho_l \eta_l)^{1/2}}{k^2}, \quad (3)$$

где  $k^2$  – электромеханическая константа связывания. При контакте одного из электродов с жидкостью значение реактивного сопротивления может быть определено из уравнения [14]:

$$R_1 = \frac{4\pi L_1 \Delta f_l \sqrt{f \mu_q}}{\sqrt{c_{66} f_g}}, \quad (4)$$

где  $L_1$  – индуктивность кварца в воздухе;  $c_{66}$  – коэффициент упругости кварца ( $2.957 \cdot 10^{11}$  Г·см<sup>-1</sup>·с<sup>-2</sup>);  $f_l$  и  $f_g$  – частота колебаний резонатора в жидкости и на воздухе соответственно. Исходя из уравнения (4), можно определить вязкост-

но-эластичные свойства нанесенной на электрод пленки [15]. Формируемая на электроде эластичная пленка обуславливает изменения  $\Delta f$  и  $\Delta R$ , пропорциональные квадратному корню произведения вязкости и плотности пленки (2). Соотношение  $\Delta R/\Delta f < 0.24$  Ом/Гц характерно для эластичных пленок, тогда как вязкие пленки характеризуются  $\Delta R/\Delta f > 0.24$  Ом/Гц [16].

Для эластичных пленок возможно использование уравнения Зауэрбрея для оценки изменения массы при присоединении вещества в жидкости.

**1.2. Реактивы и растворы.** Реактивы марок «х.ч.» и «ч.д.а» были изготовлены следующими фирмами: поли-L-лизин (190 000 Да) (Sigma); ДНК эритроцитов цыплят (Reanal); Tris-HCl, глицин, ЭДТА (Serva); NaOH, HCl, NaCl (Рeахим). Для приготовления всех растворов и отмывок использовали деионизованную воду. pH определяли при помощи pH-метра Delta-320 (Mettler-Toledo). ДНК растворяли в 0.01 М Tris-HCl буфере (ТСБ), содержащем 0.15 М NaCl и 0.001 М ЭДТА. ДНК денатурировали кипячением в течение 15 мин. и последующим помещением в ледяную баню. Концентрацию ДНК в растворах определяли на спектрофотометре СФ-101 «Аквилон» (ЛОМО).

**1.3. Экспериментальная установка.** В работе использовали кварцевые микровесы QCM 200 (Stanford Research Systems, США). Кварцевые резонаторы с основной частотой колебаний 5 МГц (Stanford Research Systems, США) были изготовлены из полированного кварцевого диска. Два золотых электрода разной площади (контактный – 0.40 см<sup>2</sup> и рабочий – 1.37 см<sup>2</sup>) нанесены на титановую подложку. Резонатор устанавливали таким образом, что два О-образных водонепроницаемых кольца (материал – Viton®) изолировали контактный электрод от внутренней полости ячейки и лишь рабочий электрод был погружен в жидкость во время анализа. Для обработки экспериментальных данных использовали программу LabVIEW 1.0 (National Instruments, США), позволяющую одновременно измерять частоту колебаний ( $\Delta f$ ) и сопротивление ( $\Delta R$ ) кварцевого резонатора.

Аксиальную проточную ячейку погружали в наполненный водой резервуар, термостатированный при помощи ультратермостата. Ячейку соединяли силиконовыми трубками ( $\varnothing$  2 мм) с инжектором и перистальтическим насосом (рис. 3).

Скорость жидкости в проточной системе составляла 80 мкл/мин. Необходимый объем раствора вносили в инжектор при помощи микродозатора.

**1.4. Очистка электрода кварцевого резонатора.** Непосредственно перед экспериментом электрод очищали по следующей схеме:

- 15 мин. обработки ультрафиолетом (на расстоянии 10 см от источника);
- 10 мин. отмывки в 1 М NaOH;
- 5 мин. отмывки в 1 М HCl;
- 15 мин. обработки ультрафиолетом.

В промежутках между указанными стадиями резонатор ополаскивали в воде.

**1.5. Иммуобилизация полилизина.** Полилизин растворяли в 0.05 М глицин-NaOH буфере (рН 10.6) до концентрации 0.1 мг/мл. 200 мкл раствора наносили на очищенный электрод, инкубировали при комнатной температуре во влажной камере (для предотвращения высыхания). Затем электрод ополаскивали в воде и высушивали при +37°C.

**1.6. Изучение взаимодействия полилизина и ДНК.** После иммуобилизации полилизина резонатор помещали в проточную ячейку. Температура жидкости составляла +37°C. Через ячейку пропускали рабочий буфер до стабилизации сигнала и фиксации базовой линии. Затем в систему вносили раствор нативной или денатурированной ДНК (50 мкг/мл). Неприсоединившиеся молекулы удаляли, пропуская рабочий буфер. В качестве контроля была определена сорбция ДНК на золотой электрод, не обработанный полилизином. Все эксперименты производили в трех повторах. Статистическую обработку осуществляли при помощи программы SigmaPlot 9.0.

**1.7. Визуализация наноструктурированных поверхностей с помощью АСМ.** Визуализацию проводили в полуконтактном режиме на воздухе при комнатной температуре на АСМ Solver Р47Н (ЗАО «НТ-МДТ»), сканер 50 мкм. Прибор Р47Н оснащен сканирующей измерительной головкой «Смена Б», которая позволяет исследовать образец как на воздухе, так и в жидкости. Используются кремниевые кантилеверы NSG11 (ЗАО «НТ-МДТ») длиной 100 мкм с коэффициентом жесткости 11.5 Н/м, типичный радиус кривизны острия кантилеверов меньше 10 нм, резонансная частота определялась в пределах 190÷275 кГц. Сканирование проводили с разрешением 1024 × 1024 точек. Обработка АСМ изображений сканированных объектов проводилась с помощью программного обеспечения Nova RC 1.0.26.578 для зондовых микроскопов (ЗАО «НТ-МДТ»).

**Полуконтактный режим сканирования.** Одним из вибрационных методов, получившим широкое распространение для исследования биологических объектов, является полуконтактный метод. Его особенность состоит в том, что колеблющееся острие кантилевера (зонда) находится настолько близко к поверхности, что при сканировании оно периодически контактирует с поверхностью в нижней части области размаха колебаний. При этом большую часть периода колебаний кантилевер не касается поверхности и вообще относительно слабо взаимодействует с образцом. При приближении иглы к поверхности взаимодействие резко усиливается. В зависимости от характера взаимодействия может меняться амплитуда колебаний кантилевера на его резонансной частоте и сдвиг фазы основной гармоники колебаний относительно возбуждающего сигнала. При сканировании в каждой точке система обратной связи удерживает амплитуду колебаний зонда на величине, заданной оператором, перемещая зонд по нормали к поверхности, тем самым отображая рельеф.

По сравнению с амплитудой фаза колебаний является более чувствительным параметром к изменениям взаимодействия зонда и поверхности. Получение изображения сигнала фазы одновременно с топографическим изображением поверхности дает некоторую дополнительную информацию о деталях по-

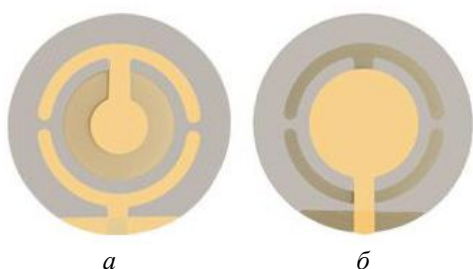


Рис. 1. Кварцевый резонатор для жидкостного анализа (*a* – контактный, *б* – рабочий электроды)

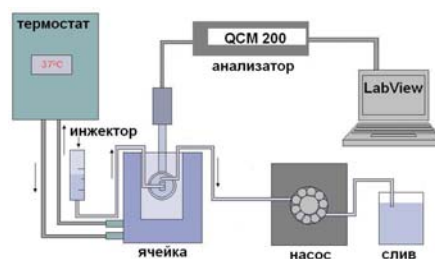


Рис. 3. Схематическое изображение экспериментальной установки

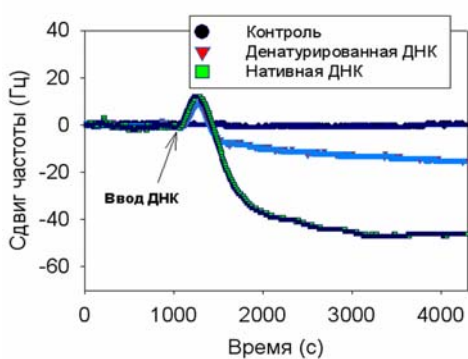


Рис. 4. Изменение частоты колебаний резонатора, модифицированного полилизин, при взаимодействии с нативной и денатурированной ДНК

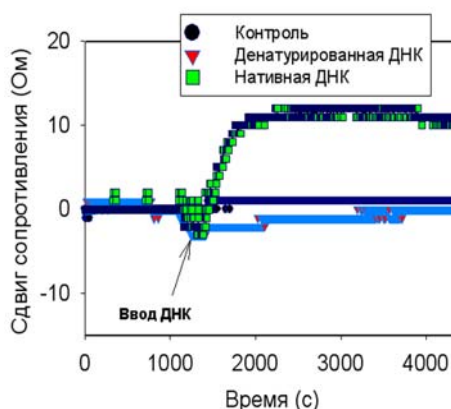


Рис. 5. Изменение сопротивления резонатора, модифицированного полилизин, при взаимодействии с нативной и денатурированной ДНК

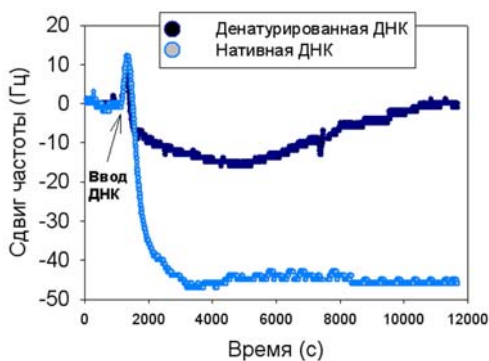


Рис. 6. Изменение частоты колебаний резонатора при отмывке нанопленки полилизин – ДНК в ТСБ

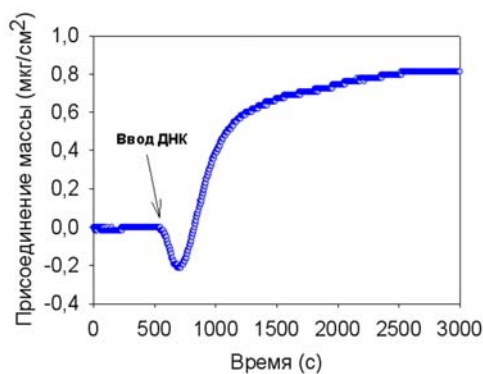
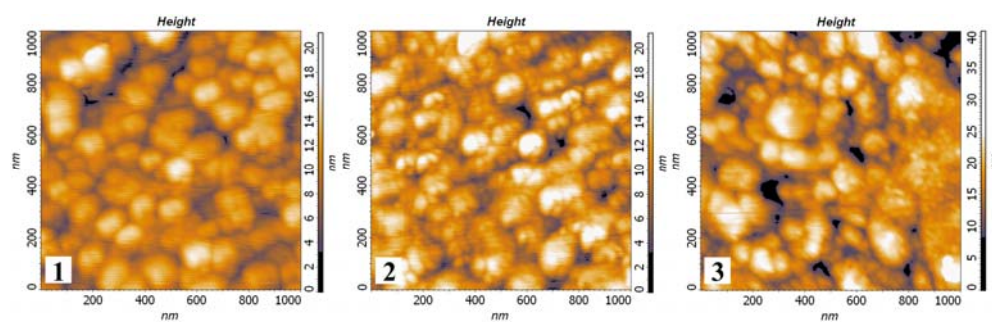
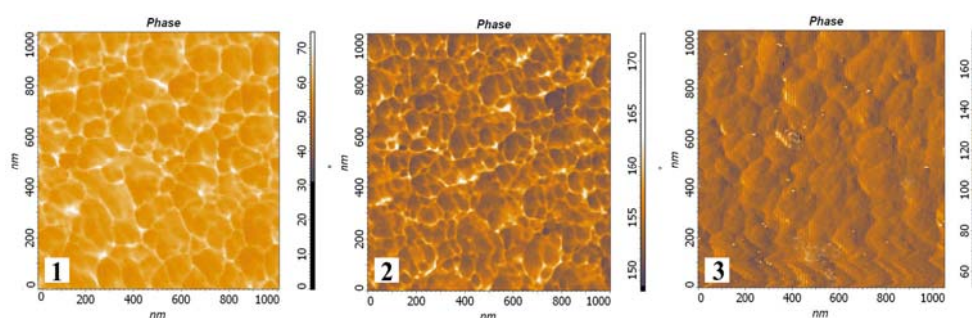


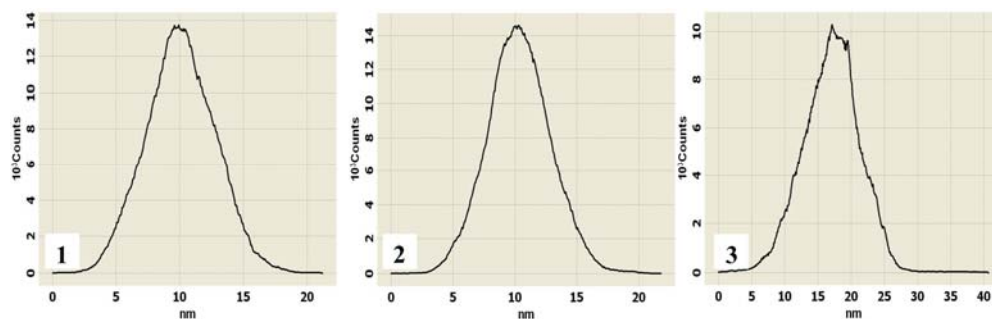
Рис. 7. Присоединение массы при связывании нативной ДНК иммобилизованным полилизин



Режим топографии



Режим фазового контраста



Гистограмма распределения высоты точек

Рис. 8. Изучение структуры ДНК-содержащей пленки методом АСМ: 1 – очищенная поверхность золотого электрода; 2 – поверхность золотого электрода, модифицированная полилизинном; 3 – поверхность золотого электрода, модифицированная полилизинном и ДНК

верхностной структуры. Данный режим получил название «метод фазового контраста». Более того, сдвиг фазы определяется не только рельефом, он обнаруживает также и сильную зависимость от таких свойств образца, как адгезия, упругость и вязкость.

Взаимодействие кантилевера с поверхностью в полуконтактном режиме состоит из Ван-дер-Ваальсового взаимодействия или комбинации дальнедействующих сил притяжения и короткодействующих сил отталкивания. В общем случае эти силы зависят от расстояния между зондом и поверхностью образца и описываются движением с характерными нелинейными эффектами [17].

Поведение колеблющегося зонда около поверхности образца [17] описывается следующим выражением:

$$z(z_c, t) = z_0(z_c) + A(z_c) \cos[wt - \phi(z_c)], \quad (5)$$

где  $z_0$ ,  $A$ ,  $w$  и  $\phi$  – значения отклонения, амплитуды, угловой частоты и фазового сдвига колебаний соответственно,  $z_c$  – расстояние между зондом и образцом в состоянии покоя в отсутствии любого взаимодействия. Как отклонение, так амплитуда и фазовый сдвиг зависят от расстояния между зондом и образцом [17].

## 2. Результаты и обсуждение

Полилизин образует стабильные комплексы с нативной ДНК [1]. Наибольшим сродством к полинуклеотиду обладает L-полилизин, находящийся в форме  $\alpha$ -спирали [18]. Это связано с тем, что при взаимодействии правозакрученной  $\alpha$ -спирали полилизина с правозакрученной двойной спиралью ДНК устраняется внутреннее электростатическое отталкивание как в аминокислотных группах полипептида, так и в фосфатных группах нуклеиновой кислоты, что обуславливает высокую стабильность комплекса [19]. Отсюда следует, что для эффективного связывания ДНК необходимо использовать полилизин в  $\alpha$ -спиральной конформации. По литературным данным [20], полилизин может быть иммобилизован на золотой поверхности. Методом инфракрасной Фурье-спектроскопии установлено, что при иммобилизации полилизина, находящегося в  $\alpha$ -спиральном состоянии, на твердую поверхность молекула полипептида частично сохраняет свою пространственную структуру [21]. Полилизин переходит в состояние  $\alpha$ -спирали при нейтрализации зарядов  $-\text{NH}_2$  групп при значениях  $\text{pH} > 9$ . В связи с этим иммобилизацию полилизина на золотую поверхность осуществляли в 0.05 М глицин-NaOH буфере ( $\text{pH} 10.6$ ).

Значения сдвигов частоты ( $\Delta f$ ) и сопротивления ( $\Delta R$ ) при иммобилизации полилизина, равные соответственно  $27 \pm 1$  Гц и  $0.3 \pm 0.001$  Ом, свидетельствуют о формировании эластичной пленки ( $\Delta R/\Delta f = 0.011 \pm 0.001$  Ом/Гц) на электроде.

На рис. 4 показано изменение частоты колебаний резонатора, электрод которого модифицирован полилизином в форме  $\alpha$ -спирали, при пропускании через проточную ячейку нативной и денатурированной ДНК. В качестве контроля использовали не модифицированную полилизином поверхность электрода.



ДНК не связывается с чистой золотой поверхностью, о чем свидетельствует нулевой сдвиг частоты и сопротивления.

При взаимодействии ДНК с иммобилизованным полилизинном наблюдается значительное изменение частоты колебаний. Насыщение происходит в течение 30 мин. с момента ввода ДНК в ячейку. Характер взаимодействия полипептида с нативной и денатурированной ДНК существенно различается. Присоединение нативной ДНК обуславливает  $\Delta f_{\max} = 60 \pm 12$  Гц, денатурированной –  $\Delta f_{\max} = 21 \pm 3$  Гц.

Изменение реактивного сопротивления в процессе присоединения ДНК, показанное на рис. 5, также свидетельствует о различиях в механизме присоединения нативной и денатурированной ДНК. Связывание нативной ДНК обуславливает  $\Delta R_{\max} = 11 \pm 1$  Ом, тогда как значение  $\Delta R_{\max}$  при связывании денатурированной ДНК находится в пределах  $\pm 1$  Ом.

Также нами была изучена стабильность иммобилизованного комплекса полилизина с нативной и денатурированной ДНК. Для этого через проточную ячейку в течение длительного времени после образования комплекса пропускали ТСБ и наблюдали процесс десорбции. На рис. 6 показано, что денатурированная ДНК постепенно удаляется с поверхности модифицированного полилизинном электрода, тогда как нативная ДНК остается в связанном состоянии.

Известно, что нуклеиновые кислоты формируют стабильные комплексы с полилизинном. Связывание происходит за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными  $\delta$ -аминогруппами полилизина. Однако ранее было высказано предположение, что важную роль в процессе комплексообразования между поли-L-лизинном и ДНК играет вторичная структура полинуклеотида [1]. В данной работе впервые исследованы образование и стабильность комплекса полилизин – ДНК в реальном времени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что денатурированная ДНК значительно менее эффективно связывается с полилизинном. Можно предположить, что в основе связывания однонитевой ДНК лежит исключительно электростатическое взаимодействие, поэтому при отмывке в избытке ТСБ денатурированная ДНК удаляется с поверхности электрода. В то же время в комплексе полилизина с нативной ДНК электростатическое связывание дополняется конформационным взаимодействием, что обуславливает высокую стабильность комплекса. Данное свойство позволяет использовать комплекс полилизин-ДНК в качестве ДНК-содержащей нанопленки, например, для конструирования ДНК-биосенсоров.

Для определения вязкостно-эластичных свойств нанопленки использовали соотношение  $\Delta R/\Delta f$ , равное 0.183 Ом/Гц, что соответствует эластичному характеру слоя. Следовательно, для определения присоединившейся массы ДНК возможно применение уравнения Зауэрбрея (1).

На рис. 7 показано присоединение массы при связывании нативной ДНК полилизинном, иммобилизованным на поверхности электрода.

При вводе в проточную ячейку ДНК происходит незначительная десорбция полилизина. Возможно, это связано с тем, что при иммобилизации полилизина на золотом электроде формируется монослой полипептида, связанный непо-

Табл. 1

Параметры перепада высот и среднеквадратичной шероховатости при поэтапном формировании ДНК-содержащей нанопленки

Пленка	$S_y$ , нм	$S_q$ , нм
Золото	$19.75 \pm 2.0$	$2.7 \pm 0.07$
Полилизин	$28.43 \pm 4.68$	$3.19 \pm 0.31$
ДНК	$37.86 \pm 4.61$	$4.55 \pm 0.13$

средственно с металлической подложкой, однако, на поверхности монослоя могут находиться не удаленные во время отмывок молекулы полилизина. При пропускании ДНК через ячейку прочно связанные молекулы полипептида связываются с молекулами нуклеиновой кислоты и удаляются с поверхности электрода. Дальнейшее присоединение ДНК происходит за счет связывания с монослоем полилизина. При этом плотность связывания составляет порядка  $1 \text{ мкг/см}^2$ .

Для изучения топографии поверхности последовательно нанесенных пленок полилизина и ДНК был применен метод атомно-силовой микроскопии. Сканирование образцов проводилось в двух режимах: при постоянной амплитуде (топография) и в режиме фазового контраста. На рис. 8 видно, что режим фазового контраста позволяет получить изображение с более высоким разрешением, которое дает детальную информацию о поверхностных структурах не модифицированного электрода, электрода, модифицированного полилизином и пленки полилизин – ДНК.

На рис. 8 показаны АСМ-изображения золотой поверхности и последовательно иммобилизованных нанослоев, а также гистограммы распределения высоты точек для каждого из изображений.

Для характеристики их структуры и геометрических размеров использовали гистограммы высот, параметр перепада высот ( $S_y$ ) и параметр среднеквадратичной шероховатости ( $S_q$ ). Результаты представлены в табл. 1.

Результаты исследования показывают, что полилизин формирует нанопленку толщиной около 8 нм, что соответствует толщине мономолекулярного слоя полипептида, связанного с поверхностью золотого электрода [22]. Первоначальная десорбция адсорбированных молекул полилизина, предположительно не связанных непосредственно с золотым электродом, при введении ДНК в проточную ячейку, подтверждает гипотезу о формировании полилизином монослоя, так как связывание ДНК происходит именно с иммобилизованным полилизином.

Нанесение нативной ДНК приводит к образованию ДНК-содержащей нанопленки, по толщине (16 нм) значительно превосходящей полилизиновый слой. Изменение структуры поверхности (рис. 7, III) по сравнению со структурой полилизиновой нанопленки, наблюдаемое как при сканировании при постоянной амплитуде, так и в режиме фазового контраста, можно объяснить тем, что молекула ДНК компактизуется в конденсированные формы различной морфологии при взаимодействии с полилизином или другими ДНК-связывающими полипептидами [1].

Таким образом, в работе методом наногравиметрического анализа установлено влияние вторичной структуры полинуклеотида на процесс межмолекулярного взаимодействия ДНК и полилизина и определены некоторые свойства нанопленки полилизин – ДНК. Топография поверхностей золотого электрода, полилизиновой нанопленки и нанопленки полилизин – ДНК охарактеризована методом атомно-силовой микроскопии. Полученные в исследовании результаты будут использованы в дальнейших работах по конструированию ДНК-биосенсоров.

Авторы выражают благодарность студентам Казанского государственного университета М.В. Матвеевой, Д.И. Нурмухамметовой и Д.Х. Гиниятовой за помощь в оформлении работы.

Работа посвящается светлой памяти Виктора Георгиевича Винтера, профессора кафедры биохимии, вдохновителя исследований по созданию пьезокварцевых биосенсоров в Казанском государственном университете.

#### Summary

*R.F. Fakhrullin, Z.I. Abramova, O.A. Konvalova, M.Kh. Salakhov.* Intermolecular interaction between DNA and polylysine studied by quartz crystal nanogravimetry and atomic force microscopy.

Nanotechnology approaches in biochemistry can be a useful tool to study the processes of biomacromolecules interactions *in situ*. The interaction between polylysine immobilised on gold electrode of quartz crystal and DNA was studied by quartz crystal nanogravimetry, using simultaneous measurement of resonant frequency and motional resistance. The effect of polynucleotide secondary structure on DNA binding was found. Double-stranded DNA was found to organise a thin film via interaction with poly-L-lysine immobilised in  $\alpha$ -helical conformation. Visco-elastic properties of the film were defined. Tapping mode atomic force microscopy was applied to obtain the images of bare electrode, polylysine and DNA nanofilms. The results of recent study will be used in future studies for biosensors development.

#### Литература

1. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
2. *von Hippel P.H., McGhee J.D.* DNA-protein interactions // *Annu. Rev. Biochem.* – 1972. – V. 41. – P. 231–300.
3. *Pouton C.W., Lucas P., Thomas B.J., Uduehi A.N., Milroy D.A., Moss S.H.* Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids // *J. Control Release.* – 1998. – V. 53. – P. 289–299.
4. *Fakhrullin R.F., Kharintsev S.S., Konvalova O.A., Salakhov M.Kh., Vinter V.G.* The development of DNA-nanosensors based on piezoelectric resonators // *Problems of non-linear analysis in engineering systems.* – 2005. – V. 2(23). – P. 37–48.
5. *Ren K., Ji J., Shen J.* Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-L-lysine/DNA films // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – P. 1152–1159.
6. *Андреевский П.А., Рагуля А.В.* Наноструктурные материалы. – М.: Академия, 2005. – 192 с.

7. *Rella R., Spadavecchia J., Manera M.G., Siciliano P., Santino A., Mita G.* Liquid phase SPR imaging experiments for biosensors applications // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 20. – P. 1140–1148.
8. *Nicolini C., Erokhin V., Facci P., Guerzoni S., Ross A., Paschkevitsch P.* Quartz balance DNA sensor // *Biosens. Bioelectron.* – 1997. – V. 12, No 7. – P. 613–618.
9. *Renee L., Jarvi E.J., Rosentreter J.J.* Piezoelectric quartz crystal biosensors // *Talanta.* – 1998. – V. 46. – P. 1223–1236.
10. *Sauerbrey G.* Verwendung von Schwingquarzen für Wägung Dünner Schichten und für Mikrowägung // *Z. Physik.* – 1959. – V. 155. – P. 206–222.
11. *Kanazawa K.K., Gordon II J.G.* The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquids // *Anal. Chim. Acta.* – 1988. – V. 212. – P. 61–72.
12. *Martin S.* Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading // *Anal. Chem.* – 1991. – V. 63. – P. 2272–2281.
13. *Muramatsu H., Tamiya E., Karube I.* Computation of equivalent circuit parameters of quartz crystals in contact with liquids and study of liquid properties // *Anal. Chem.* – 1988. – V. 60. – P. 2142–2146.
14. *Xie Q., Xiang C., Yuan Y., Zhang Y., Nie L., Yao S.* A novel dual-impedance-analysis and electrochemical impedance measurements during adsorption of bovine serum albumin onto bare and cysteine- or thiophenol modified gold electrodes // *J. Electroanal. Chem.* – 1999. – V. 478. – P. 1–8.
15. *Nkanwo E., Durning C.J.* Impedance analysis of thickness-shear mode quartz crystal resonators in contact with linear viscoelastic media // *Rev. of scientific instruments.* – 1998. – V. 69(6). – P. 2375–2384.
16. *Xie Q., Zhang Y., Xiang C., Tang J., Li Y., Zhao Q., Yao S.* A comparative study on the viscoelasticity and morphology of polyaniline films galvanostatically grown on bare and 4-aminothiophenol-modified gold electrodes using an electrochemical quartz crystal impedance system and SEM // *Anal. Sci.* – 2001. – V. 17, No 5. – P. 613–621.
17. *San Paulo A., Garcia R.* Unifying theory of tapping-mode atomic-force microscopy // *Phys. Rev.* – 2002. – V. 66. – P. 041406-1–041406-4.
18. *Rodriguez-Maldonado L., Fernandez-Nieves A., Fernandez-Barbero A.* Dynamic light scattering from high molecular weight poly-L-lysine molecules // *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2005. – V. 270–271. – P. 335–339.
19. *Niwa M., Morikawa M., Yagi K., Higashi N.* Interaction between polylysine monolayer and DNA at air-water interface // *Int. J. of biological macromolecules.* – 2002. – V. 30. – P. 47–54.
20. *Benites M.M., Jimenes J.S.* A method of reversible biomolecular immobilization for the surface plasmon resonance quantitative analysis of interacting biological macromolecules // *Anal. Biochem.* – 2002. – V. 302. – P. 161–168.
21. *Muller M.* Orientation of  $\alpha$ -helical poly(L-lysine) in consecutively adsorbed polyelectrolyte multilayers on texturized silicon substrates // *Biomacromolecules.* – 2001. – V. 2. – P. 262–269.
22. *Van den Beucken J.J.J.P., Vos M.R.J., Thüne P.C., Hayakawa T., Fukushima T., Okahata Y., Walboomers X.F., Sommerdijk N.A.J.M., Nolte R.J.M., Jansen J.A.* Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27, No 5. – P. 691–701.

**Фахруллин Равиль Фаридович** – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: *biosensor@bk.ru*

**Абрамова Зинаида Ивановна** – доктор биологических наук, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета.

**Коновалова Ольга Анатольевна** – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и спектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: *Olga.Konovalova@bk.ru*

**Салахов Мякзюм Халимуллович** – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой оптики и спектроскопии, ректор Казанского государственного университета.