

УДК 577.152.192.3

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ БИОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ДНК И ОПТИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПОЛИАНИЛИНА

© 2012 г. Ю. С. Зейфман\*, И. О. Майборода\*, Ю. В. Грищенко\*, О. В. Морозова\*\*,  
И. С. Васильева\*\*, Г. П. Шумакович\*\*, А. И. Ярополов\*\*

\*НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182

\*\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

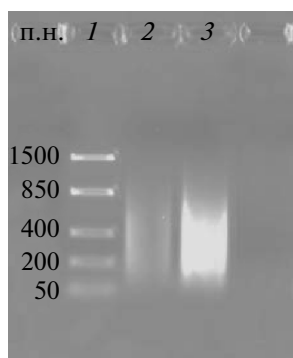
Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

Методом окислительной полимеризации анилина с использованием двух различных биокатализаторов: пероксидазы из корней хрена и биомиметика – микропероксидазы-11 синтезированы электропроводящие интерполимерные комплексы полианилина на матрице ДНК. Исследованы спектральные характеристики и морфология полученных биоконструктов. Показано различие стереоспецифичности получаемых образцов интерполимерных комплексов в зависимости от используемого биокатализатора. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли биокатализатора в формировании направления закручивания спирали электропроводящего полимера на матрице ДНК, т.е. оптическая активность получаемых образцов полимеров, по-видимому, связана со свойствами биокатализатора.

Молекулы ДНК являются уникальными строительными блоками для создания биосовместимых наноматериалов и молекулярных электрических схем благодаря их самоорганизации, а также возможности получать различные наноструктуры высокой сложности. В последние годы было получено большое количество подобных наноструктур из молекул ДНК, например различные двумерные ансамбли [1, 2], геометрические объекты (кубы [3], октаэдры [4]) и др. Исследования также показали отсутствие существенной собственной проводимости ДНК [5, 6], что обуславливает необходимость разработки композитов на основе нуклеиновых кислот и электропроводящих материалов для создания электронных структур на их основе. Ранее была показана возможность использования ДНК в качестве матрицы для синтеза металлических нанопроводов [7], полупроводниковых наночастиц [8] и электропроводящих полимеров [9–11]. В частности, использование электропроводящих полимеров при конъюгации с ДНК может стать основой для разработки биоконструктивных материалов и создания молекулярных устройств, контролируемых влиянием внешних факторов на биологические системы, например высвобождение лекарственных препаратов, конструирование нервных имплантатов и искусственных мышц [12], а также имплантируемых источников электропитания (суперконденсаторов) [13].

Полианилин (ПАНИ) является одним из наиболее важных электропроводящих полимеров в

силу своей высокой химической стабильности, простоты получения, относительно высокой электропроводности и способности изменять физико-химические свойства при различных физических воздействиях (рН, электрическое напряжение). Классический химический метод синтеза электропроводящего ПАНИ, в котором окислителем реакции полимеризации мономера выступает персульфат аммония, требует эквимолярного количества окислителя и проведения реакции в сильно кислых средах при температуре, близкой к 0°C [14]. Использование ферментов при синтезе ПАНИ позволяет проводить процесс в экологически чистых и мягких условиях и получать полимер, не загрязненный продуктами разложения окислителя. В работах [9, 15, 16] была продемонстрирована возможность использования лакказы (КФ 1.10.3.2) и пероксидазы из корней хрена (ПХ, КФ 1.11.1.7) для синтеза электропроводящего ПАНИ. Кроме того, было показано, что в зависимости от используемых ферментов может быть получен электропроводящий полимер с различной оптической активностью [17, 18]. Однако при использовании ПХ в качестве биокатализатора полимеризации анилина и различных оптических изомеров сульфокамфорной кислоты в качестве допантов, оптическая активность ферментативно синтезированного ПАНИ была одинаковой [17]. При использовании другого фермента – грибной лакказы, катализирующего, как и ПХ, реакцию ферментативной полимеризации анилина, оптическая активность синтезированного ПАНИ раз-



**Рис. 1.** Результаты электрофореза препарата ДНК в 1%-ном геле агарозы. 1 – маркеры, 2 и 3 – ДНК в количестве 150 нг и 1.5 мкг соответственно.

личалась в зависимости от хиральности используемой сульфокамфорной кислоты [18]. Следует отметить, что ввиду отсутствия асимметричных атомов в основной цепи ПАНИ его оптическая активность обусловлена спиралевидной конформацией полимера, которая достигается путем использования в синтезе хиральных допантов.

Цель работы – подбор условий и проведение синтеза электропроводящего ПАНИ на матрице короткоцепочечной ДНК с использованием в качестве катализаторов реакции окислительной полимеризации анилина двух биокатализаторов: пероксидазы из корней хрена и ранее не используемого для синтеза электропроводящих полимеров биомиметика – микропероксидазы-11, а также исследование физико-химических характеристик полученных интерполимерных комплексов.

## МЕТОДИКА

Ферментативный синтез интерполимерного комплекса ПАНИ/ДНК проводили при 25°C с использованием ПХ и при 4°C с использованием микропероксидазы-II (МП). Раствор ДНК с концентрацией 0.5 мг/мл в 10 мМ Na-цитратном буфере с pH 4.3, содержащий 1.55 мМ анилина (соотношение фосфатных групп ДНК и анилина равно 1 : 1), инкубировали при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре для установления электростатического равновесия между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и протонированными аминогруппами молекул анилина. После инкубации в реакционную среду добавляли соответствующий фермент с конечными концентрациями в реакционной смеси 85 мкг/мл для ПХ и 110 мкг/мл для МП соответственно. Удельные активности используемых биокатализаторов, измеренные по окислению АБТС в 0.1 М Na-цитратном буфере, pH 4.5, составляли 8.3 и 0.1 мкмоль/с · мг для ПХ и МП соответственно. Реакцию полимеризации мономера инициировали добавлением пероксида во-

дора. Последний добавляли 4 порциями в течение 30 мин до конечной концентрации 1.55 мМ. Исходную концентрацию раствора пероксида водорода определяли перед проведением эксперимента по поглощению при длине волны 230 нм (молярный коэффициент экстинкции 72.7 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Реакцию полимеризации анилина на матрице ДНК проводили в течение 4 ч при использовании ПХ и 24 ч при использовании МП. Для удаления непрореагировавшего мономера полученные биокомпозиты диализовали против 2000-кратного избытка деионизованной воды, подкисленной соляной кислотой до pH 4.3, в течение 16 ч при 4°C. До проведения измерений полученные образцы хранили при 4°C.

Дедопированные образцы ПАНИ/ДНК получали добавлением ~1 мкл 0.1 М раствора NaOH к 100 мкл образца биокомпозита. Редопирование проводили добавлением ~1 мкл 1 М раствора соляной кислоты.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Evolution 60 “Thermo Scientific” (США).

Измерения спектров кругового дихроизма (КД) проводила на КД-спектрометре Chirascan “Applied Photophysics” (Англия).

FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) – исследование биокомпозитов проводили по стандартной методике с использованием таблеток KBr на спектрофотометре IRPrestige-21 “Shimadzu” (Япония).

Морфологию синтезированных комплексов ПАНИ/ДНК изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием микроскопа NTEGRA “NT-MDT” (Россия) в полуконтактном режиме.

В работе использовали следующие реактивы: ДНК (“Деринат”) – “Техномедсервис ЗАО ФП” (Россия); маркеры для ДНК-электрофореза 50–1500 п.н. SM1108 “Fermentas” (Литва); лимонная кислота, пероксидаза из корней хрена – RZ 2.5–4.0, микропероксидаза-11 – “Sigma-Aldrich” (США); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH, HCl – реактивы марки о.с.ч (Россия). Перед проведением синтеза ПАНИ анилин (“Химмед”, Россия) очищали вакуумной дистилляцией. Все растворы готовили с использованием воды, очищенной на установке Milli-Q “Millipore” (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез электропроводящих биокомпозитов ПАНИ/ДНК.** Для синтеза интерполимерного комплекса использовали коммерчески доступный препарат дезоксирибонуклеата натрия (“Деринат”), содержащий молекулы ДНК от 50 до 900 пар нуклеотидов (рис. 1). В результате проведения реакции полимеризации анилина на матрице ДНК

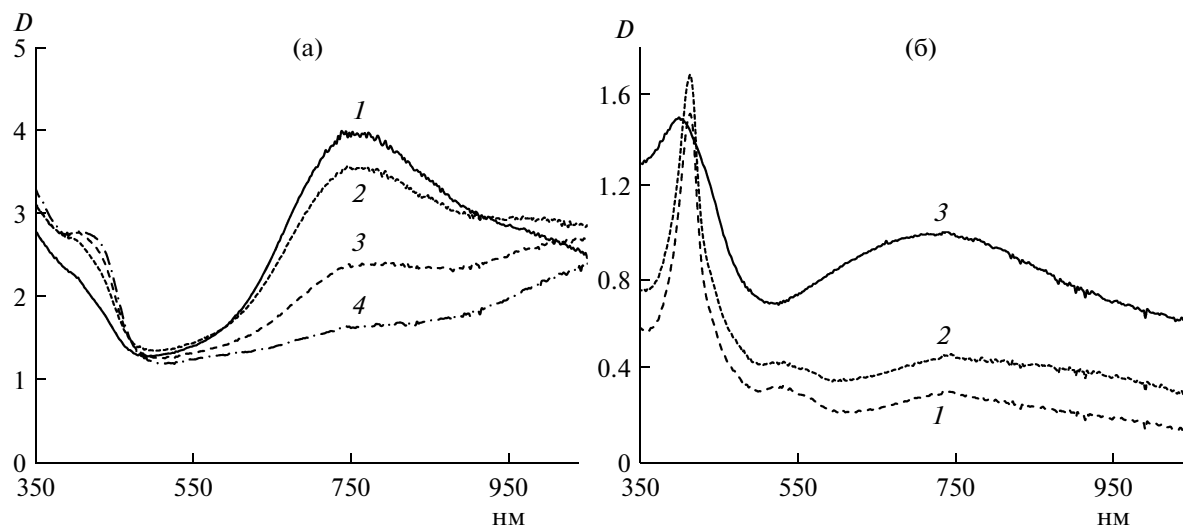


Рис. 2. Изменение электронных спектров комплекса ПАНИ/ДНК от времени синтеза: а – синтез с использованием ПХ (1 – 5, 2 – 15, 3 – 60, 4 – 240 мин), б – синтез с использованием МП (1 – 30 мин, 2 – 120 мин, 3 – 24 ч).

с использованием обоих биокатализаторов были получены водные дисперсии интерполимерных комплексов ПАНИ/ДНК зеленого цвета. УФ-видимые спектры, записанные для этих водных дисперсий, демонстрировали наличие пиков поглощения в областях 420–750 нм, соответствующих электропроводящему ПАНИ [9], в составе обоих биоконпозитов (рис. 2). В контрольном эксперименте при том же самом значении рН реакционной среды (рН 4.3) в отсутствие ДНК при полимеризации анилина происходило образование коричневого водонерастворимого осадка разветвленного полимера. Это свидетельствовало о влиянии матрицы ДНК на образование электропроводящего полимера. На рис. 2а представлено изменение спектров поглощения комплекса ПАНИ/ДНК при различных временах синтеза с использованием ПХ (образец ПАНИ/ДНК/ПХ). Пик поглощения в области 750 нм, присутствовавший на ранних стадиях протекания реакции, и отсутствие максимума поглощения в области 420 нм свидетельствовали об образовании пернигранилина, согласно [9]. В процессе протекания реакции поглощение при этой длине волны уменьшалось, в то время как пик поглощения при 420 нм увеличивался, что может указывать на протонирование основной цепи ПАНИ и образование электропроводящего ПАНИ с более упорядоченной структурой. Увеличение времени синтеза также приводило к появлению широкой полосы поглощения в диапазоне длин волн 700–1100 нм, что может свидетельствовать об увеличении длины цепи  $\pi$ -сопряжения, т.е. длины растущих полимерных молекул. В спектрах поглощения ПАНИ/ДНК, синтезированного с использованием МП (образец ПАНИ/ДНК/МП) также происходило увеличение пика на 420 нм в процессе протекания

реакции (рис. 2б), однако вследствие существенно более низкой удельной активности МП время проведения реакции составляло сутки, а не несколько часов, как в случае с ПХ.

Для обоих полученных образцов интерполимерных комплексов ПАНИ/ДНК были записаны УФ-видимые спектры в дедопированном (неэлектропроводящем) состоянии (рис. 3). Форма спектров для системы ДНК/ПАНИ/ПХ (рис. 3а) как в допированном, так и в дедопированном состоянии хорошо согласуется с ранее полученными литературными данными [9] с использованием высокомолекулярной ДНК. Близким является и спектр для дедопированного комплекса ПАНИ/ДНК, полученного с использованием МП (рис. 3б). При переводе интерполимерных комплексов ПАНИ/ДНК в щелочную среду в обоих случаях исчезал пик поглощения при 420 нм и появлялся интенсивный пик с максимумом в области 550 нм, соответствующий поглощению хиноидного кольца, что свидетельствует о переходе ПАНИ в основную форму. Также полностью исчезла широкая полоса поглощения в области выше 700 нм. При этом дедопирование интерполимерных комплексов было обратимым процессом, о чем свидетельствовало возвращение к исходному виду спектров при доведении рН образцов снова до низких значений (рис. 3, кривые 3).

**Исследование комплексов ПАНИ/ДНК методом ФТИР-спектроскопии.** На рис. 4 (кривые 1, 2) представлены ФТИР-спектры образцов интерполимерных комплексов ПАНИ/ДНК, синтезированных с использованием ПХ и МП. Спектры обоих образцов были достаточно близки и имели характерные для полимера, синтезированного традиционным химическим методом с использованием низкомолекулярных допантов, колеба-

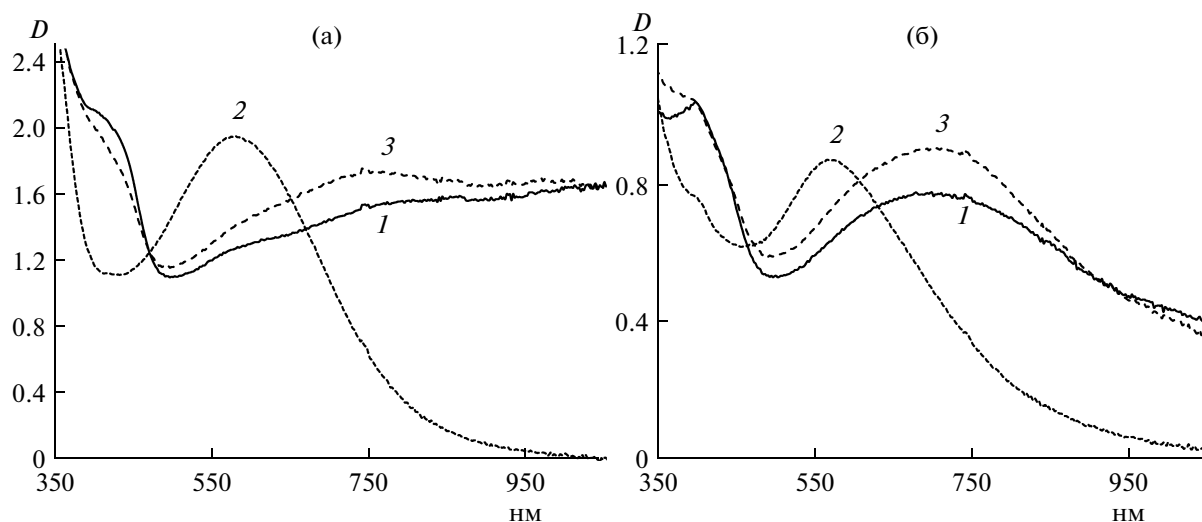


Рис. 3. Электронные спектры комплексов ПАНИ/ДНК, полученных с использованием ПХ (а) и МП (б). 1 – допированная форма, 2 – дедопированная форма, 3 – редопированный ПАНИ.

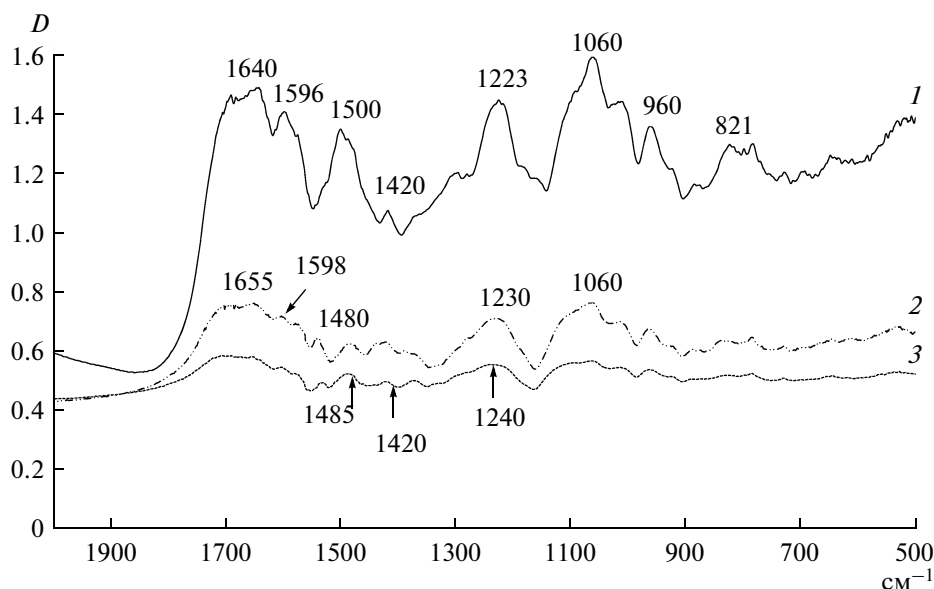


Рис. 4. FTIR-спектры комплексов ПАНИ/ДНК, синтезированных с участием ПХ (1), МП (2) и контрольного образца – матрицы ДНК (3).

тельные полосы, FTIR-спектры ПАНИ, синтезированного с использованием обоих биокатализаторов, имели характерные для электропроводящего ПАНИ волновые числа в областях  $1480\text{--}1500\text{ см}^{-1}$  и  $1590\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ , отвечающие за поглощение, соответственно, хинондииминных и фенилендиаминных групп в повторяющихся звеньях электропроводящего полимера [19]. Для сравнения на рис. 4 (кривая 3) приведен FTIR-спектр используемой в настоящем исследовании матрицы – ДНК.

**Изучение морфологии полученных комплексов методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).** Морфология и структура синтезированных с ис-

пользованием двух биокатализаторов комплексов ПАНИ/ ДНК была изучена АСМ. На полученных АСМ-изображениях видно (рис. 5), что ПАНИ синтезировался преимущественно вдоль нитей ДНК, поскольку на изображениях отсутствовали объекты иной морфологии, отличные от контрольных нитей ДНК. Также наблюдалось увеличение высоты объектов образцов ПАНИ/ДНК по сравнению с контрольным образцом исходной ДНК, что может свидетельствовать о покрытии молекул ДНК ПАНИ.

**Спектры КД синтезированных комплексов ПАНИ/ДНК.** Спектры КД позволяют получить информацию о вторичной структуре полимера, синтезированного на матрице ДНК. Как уже от-

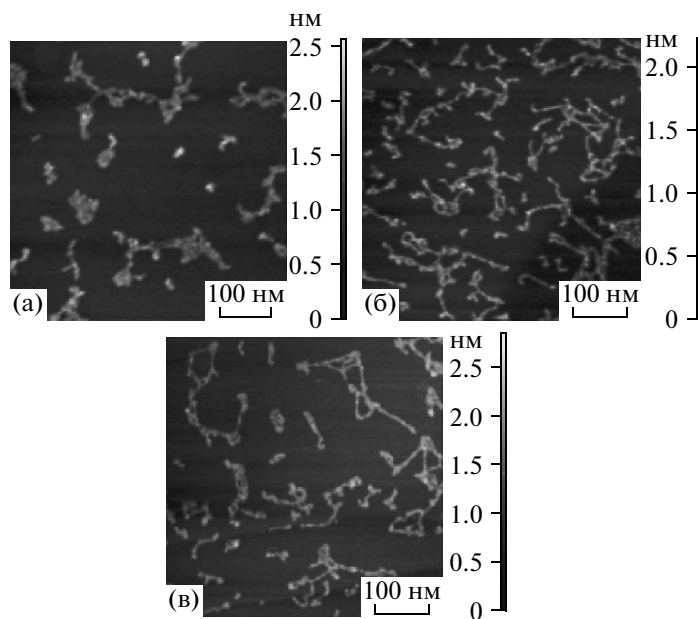


Рис. 5. АСМ-изображения образцов ДНК (а), ПАНИ/ДНК (б), синтезированных с использованием ПХ, и ПАНИ/ДНК (в), синтезированного с использованием МП.

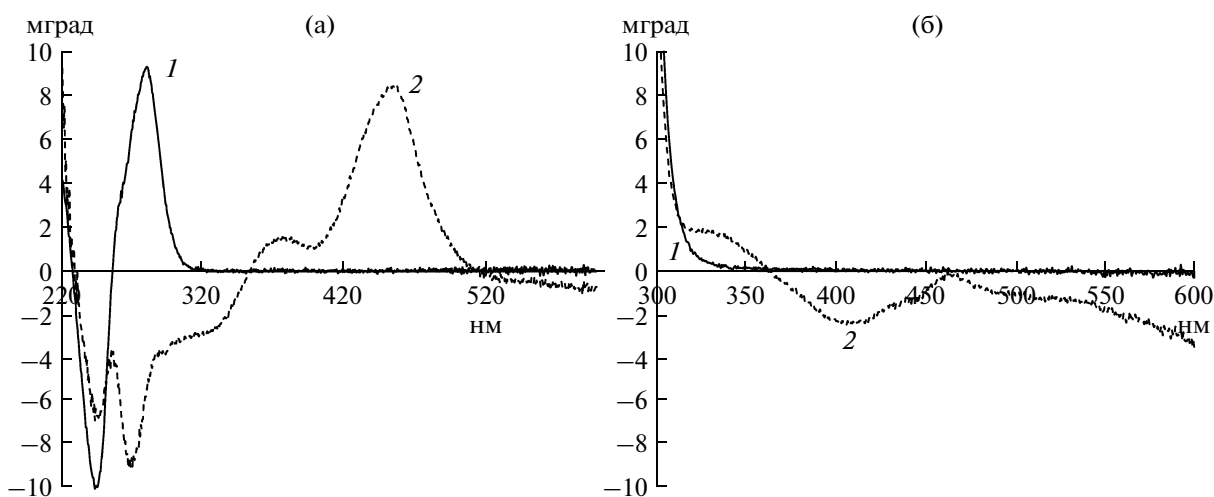


Рис. 6. Спектры КД интерполимерных комплексов ПАНИ/ДНК, синтезированных с использованием ПХ (а) и МП (б). 1 – ДНК, 2 – ПАНИ/ДНК.

мечалось ранее, ПАНИ не содержит асимметричных атомов углерода в своей структуре и его оптическая активность связана со спиралевидной конформацией за счет оптической активности матрицы ДНК. Хиральный ПАНИ ранее был получен с использованием ПХ на различных как хиральных (ДНК), так и ахиральных (полиакриловая кислота) матрицах. В последнем случае (использование оптически неактивной матрицы) хиральный электропроводящий полимер получали за счет добавления низкомолекулярных хиральных допантов, например энантиомеров суль-

фокамфорной кислоты. Следует отметить, что при использовании ПХ в синтезе хирального ПАНИ оптическая активность полимера не зависела от оптической активности низкомолекулярного энантиомера, выбранного в качестве допанта [17]. По мнению авторов, оптическая активность ПАНИ определялась только внутренними свойствами фермента.

КД-спектры образцов ПАНИ/ДНК, полученных в настоящей работе с использованием ПХ, согласуются с данными литературы [9, 17]. На спектре (рис. 6а) присутствовали два широких

пика в области 370 и 450 нм с положительной оптической активностью, которые соответствовали электропроводящему ПАНИ и отсутствовали в контрольных спектрах исходной ДНК. На КД-спектре дедопированного полимера эти пики также отсутствовали (данные не приведены). Спектры кругового дихроизма образцов ПАНИ/ДНК, полученных с использованием МП, представлены на рис. 6б. Использование МП в качестве катализатора ферментативного синтеза полимера на матрице ДНК позволило получить ПАНИ с противоположной оптической активностью по сравнению с образцом ДНК/ПАНИ/ПХ. На КД-спектре интерполимерного комплекса, синтезированного с участием МП, появлялся соответствующий отрицательной поляризации света пик в области 420 нм, а также отрицательная полоса поглощения в области выше 460 нм. Различия в стереоспецифичности получаемых биоконструктов свидетельствуют об основополагающей роли биокатализатора в создании направления закручивания спирали электропроводящего полимера на матрице ДНК, т.е. оптическая активность получаемых образцов полимеров, по-видимому, связана с внутренними свойствами и строением фермента.

Полученные результаты могут являться основой для создания имплантируемых суперконденсаторов в качестве резервного источника электроэнергии для стимулирования сердечной мышцы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winfree E., Liu F.R., Wenzler L.A., Seeman N.C. // *Nature*. 1998. V. 394. P. 539–544.
2. Yan H., Park S.H., Finkelstein G., Reif J.H., LaBean T.H. // *Science*. 2003. V. 301. P. 1882–1884.
3. Chen J.H., Seeman N.C. // *Nature*. 1991. V. 350. P. 631–633.
4. Zhang Y.W., Seeman N.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 116. P. 1661–1669.
5. de Pablo P.J., Moreno-Herrero F., Colchero J., Gómez Herrero J., Herrero P., Baró A.M., Ordejón P., Soler J.M., Artacho E. // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. № 23. P. 4992–4995.
6. Legrand O., Côte D., Bockelmann U. // *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 2006. V. 73. № 3. Pt 1:031925.
7. Braun E., Eichen Y., Sivan U., Ben-Yoseph G. // *Nature*. 1998. V. 391. P. 775–778.
8. Coffey J.L., Bigam S.R., Li X., Pinizzotto R.F., Rho Y.G., Pirtle R.M., Pirtle L.M. // *Appl. Phys. Lett.* 1996. V. 69. P. 3851–3853.
9. Nagarajan R., Liu W., Kumar J., Tripathy S.K. // *Macromolecules*. 2001. V. 34. P. 3921–3927.
10. Moon H.K., Kim H.J., Kim N.H., Roh Y. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010. V. 10. № 5. P. 3180–3184.
11. Ner Y., Invernale M.A., Grote J.G., Stuart J.A., Gregory A.S. // *Synthetic. Metals*. 2010. V. 160. P. 351–353.
12. Wallace G., Spinks G. // *Soft. Matter*. 2007. V. 3. P. 665–671.
13. Tang H., Chen L., Xing C., Guo Y.-G., Wang S. // *Macromol. Rapid. Commun.* 2010. V. 31. P. 1892–1896.
14. Huang W.S., Humphrey B.D., MacDiarmid A.G. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1986. V. 82. № 80. P. 2385–2400.
15. Karamyshev A.V., Shleev S.V., Koroleva O.V., Yaropolov A.I., Sakharov I.Yu. // *Enz. Microb. Technol.* 2003. V. 33. № 5. P. 556–564.
16. Nickels P., Dittmer W.U., Beyer S., Kotthaus J.P., Simmel F.C. // *Nanotechnology*. 2004. V. 15. P. 1524–1529.
17. Thiagarajan M., Samuelson L.A., Kumar J., Cholli A.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 11502–11503.
18. Vasil'eva I.S., Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Sakharov I.Yu., Yaropolov A.I. // *Synthetic. Metals*. 2007. V. 157. P. 684–689.
19. Louarn G., Lapkowski M., Quillard S., Pron A., Buisson J.P., Letrant S. // *J. Phys. Chem.* 1996. V. 100. P. 6998–7006.

## Enzymatic Synthesis of Electroconductive Biocomposites Based on DNA and Optically Active Polyaniline

Yu. S. Zeifman<sup>a</sup>, I. O. Maiboroda<sup>a</sup>, Yu. V. Grishchenko<sup>a</sup>, O. V. Morozova<sup>b</sup>, I. S. Vasil'eva<sup>b</sup>, G. P. Shumakovich<sup>b</sup>, and A. I. Yaropolov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> National Research Centre Kurchatov Institute, Moscow, 123182 Russia

<sup>b</sup> Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Received August 26, 2011

**Abstract**—Electroconductive interpolymer polyaniline complexes are synthesized on the DNA matrix, using the method of oxidative polymerization of aniline with two different biocatalyzers: horseradish root peroxidase and micropiroxidase-11 biomimetic. The spectral characteristics and morphology of the acquired biocomposites have been studied. The stereospecificity of the acquired samples of interpolymer complexes is shown, depending on the biocatalyzers used. The results acquired indicate the important role of a biocatalyzer in the formation of the twist direction of an electroconductive polymer spiral on the DNA matrix; i.e., the optical activity of the polymer samples acquired is apparently associated with the biocatalyzer properties.