

УДК 577.152.192.3

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩЕГО ПОЛИ(3,4-ЭТИЛЕНДИОКСИТИОФЕНА) НА ПРИРОДНОЙ МАТРИЦЕ ДНК

И.С. Васильева¹, М.Е. Хлупова¹, Г.П. Шумакович¹, Е.А. Зайцева²,
О.В. Морозова¹, А.И. Ярополов^{1*}

(¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; *e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru)

Проведена ферментативная окислительная полимеризация 3,4-этилендиокситиофена на матрице биополимера ДНК. Грибная лакказа *Trametes hirsuta* с высоким редокс-потенциалом служила катализатором полимеризации мономера, окислителем был атмосферный кислород. Фосфатные группы биополимера ДНК, будучи допантами основной цепи синтезированного поли(3,4-этилендиокситиофена) (ПЭДОТ), обеспечивают его электропроводность. Изучены физико-химические свойства полученного комплекса и его морфология. Электропроводность ПЭДОТ/ДНК составляла ~0,15 мСм/см. Синтезированный электропроводящий биосовместимый интерполимерный комплекс ПЭДОТ/ДНК потенциально может быть использован для различных биомедицинских целей.

Ключевые слова: ферментативный синтез, грибная лакказа, электропроводящие полимеры, 3,4-этилендиокситиофен, ДНК, матричная полимеризация.

Соединение поли(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДОТ), относящееся к классу электропроводящих полимеров, обладает высокой стабильностью, оптической прозрачностью и биосовместимостью. Электропроводность ПЭДОТ обусловлена допированием его основной цепи кислотами. ДНК может быть допантом за счет фосфатных групп биополимера. Биоконпозиты на основе ПЭДОТ могут быть использованы при разработке биосенсоров, нейроинтерфейсов, в биоэлектронике, а также в качестве электроактивного материала электродов суперконденсатора в целях энергообеспечения имплантированных биомедицинских микроустройств, для которых требуется кратковременная подача электрического импульса большой мощности [1–6].

Молекулы ДНК – уникальные строительные блоки для создания биосовместимых наноматериалов. Они не обладают собственной электронной проводимостью [7, 8], однако фосфатные группы в составе биополимера могут служить допантами основной цепи ПЭДОТ, в результате чего образуется электропроводящий комплекс ПЭДОТ/ДНК.

Обычно электропроводящие полимеры, включая ПЭДОТ, получают химическим способом в сильноокислой среде с использованием сильных окислителей (персульфата аммония, солей трех-

валентного железа и др.) в значительном количестве [2]. В литературе имеется несколько публикаций по химическому синтезу ПЭДОТ на матрице ДНК [5, 9], однако в условиях проведения химической полимеризации мономера ДНК нестабильна. Альтернативой химическому синтезу нанобиоконпозита ПЭДОТ/ДНК может служить биокаталитический подход, позволяющий проводить окислительную полимеризацию мономера ЭДОТ в «мягких» условиях (комнатная температура, слабнокислое значение рН).

Цель настоящей работы – получение биосовместимого электропроводящего нанобиоконпозита ПЭДОТ/ДНК с использованием в качестве катализатора грибной лакказы *Trametes hirsuta* с высоким редокс-потенциалом, а в качестве окислителя полимеризации ЭДОТ на матрице ДНК атмосферного кислорода.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе использованы следующие реактивы: 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония (АБТС) и 3,4-этилендиокситиофен (ЭДОТ) («Sigma-Aldrich»); NaN_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaOH , NaCl , лимонная кислота, цитрат натрия («Fluka»); ДНК из молок лосося Деринат® (ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия).

Все используемые растворы готовили с применением деионизированной воды, полученной на установке «Milli-Q» («Millipore», США).

Ферменты. Лакказы из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilat Quel была очищена до гомогенного состояния, как описано в работе [10]. Концентрацию белка определяли по разности значений оптической плотности при длине волны 228,5 и 234,5 нм с использованием калибровочной кривой [11]. Активность фермента измеряли спектрофотометрическим методом с использованием 1 мМ АБТС в качестве хромогенного субстрата ($\lambda = 420$ нм, $\varepsilon = 36000$ М⁻¹·см⁻¹) при комнатной температуре (21–22 °С) в Na-цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5). За единицу активности (МЕ) принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельная активность лакказы составляла ~149 МЕ/мг белка.

Ферментативная полимеризация ЭДОТ на матрице ДНК. Ферментативный синтез интерполимерного комплекса ПЭДОТ/ДНК проводили в 0,01 М Na-цитратном буфере (рН 4,5) при разных соотношениях мономера ЭДОТ и ДНК. Предварительно раствор ДНК диализовали против 0,01 М Na-цитратного буфера (рН 4,5). Далее к раствору ДНК с концентрацией 0,5 мг/мл добавляли ЭДОТ (весовое соотношение ЭДОТ:ДНК составляло 1:1, 2:1 и 4:1) и затем в течение 1 ч раствор инкубировали при постоянном перемешивании. Реакцию полимеризации мономера инициировали путем добавления лакказы. Удельная активность фермента в реакционной среде

составляла 1 МЕ/мл. Синтез проводили на воздухе в течение 48 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

Характеризация комплекса ПЭДОТ/ДНК. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «Shimadzu UV 1240 mini» («Shimadzu», Япония). ИК-спектры с преобразованием Фурье записывали, используя таблетку KBr, на ИК-спектрометре «Frontier FTIR/FIR» («PerkinElmer Inc.»). Электропроводность образцов измеряли четырехточечным методом на приборе «Loresta GP» (Япония). АСМ- и ПЭМ-изображения получали с помощью микроскопов «NTEGRA» («NT-MDT Spectrum Instruments», Россия) и «JEM-100CX/SFG» («Jeol», Япония) соответственно.

Электрохимические исследования проводили методом циклической вольтамперометрии с использованием трехэлектродной однокамерной ячейки на электрохимическом анализаторе «CV-50W» («BAS», США). В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод («BAS», США), вспомогательным электродом служила платиновая сетка. В качестве рабочего электрода использовали спектральный графит (RW0, «Ringsdorff-Werke GmbH», Германия) с нанесенной пленкой интерполимерного комплекса ПЭДОТ/ДНК.

Результаты и обсуждение

Проведен лакказы-катализируемый синтез поли(3,4-этилендиокситиофена) (ПЭДОТ) на матрице ДНК и изучены физико-химические характеристики полученного нанобиокомпозита. По данным электрофореза в агарозном геле

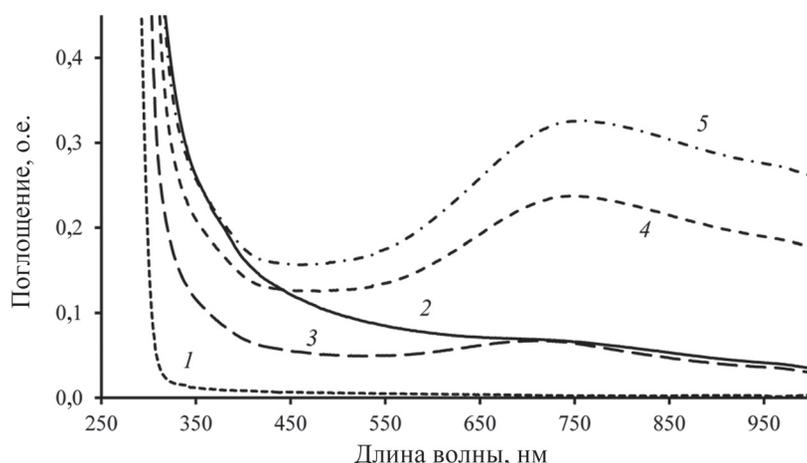


Рис. 1. УФ-видимые спектры ДНК (1), смеси ЭДОТ и ДНК (соотношение 4:1) (2), и интерполимерных комплексов ПЭДОТ/ДНК, ферментативно синтезированных при разном весовом соотношении ЭДОТ:ДНК – 1:1 (3), 2:1 (4), 4:1 (5)

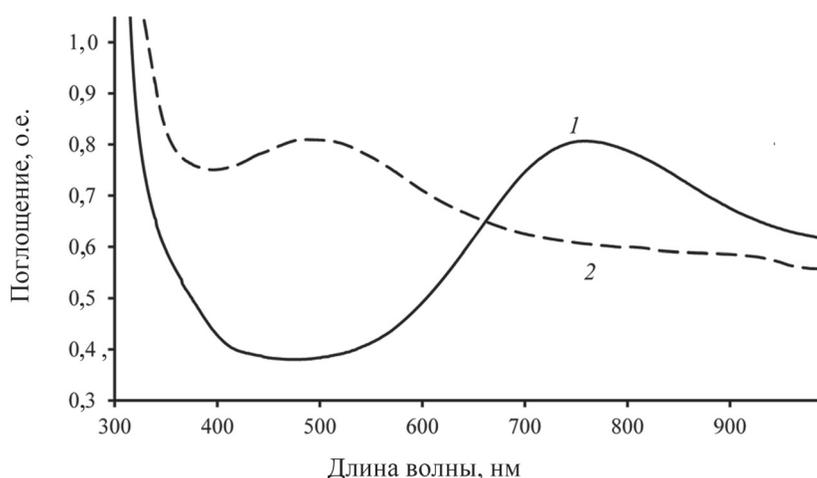


Рис. 2. Электронные спектры интерполимерного комплекса ПЭДОТ/ДНК:
1 – допированная форма, 2 – дедопированная форма

молекулы ДНК содержали 50–800 пар нуклеотидов. Двухцепочечные молекулы ДНК выступали в роли «мягкой» матрицы, на которой происходила ориентация и последующая полимеризация молекул мономера ЭДОТ. При этом фосфатные группы ДНК выполняли роль кислотного допанта ПЭДОТ, переводя его в электропроводящую форму.

В результате ферментативной полимеризации ЭДОТ на матрице ДНК были получены водные дисперсии интерполимерных комплексов ПЭДОТ/ДНК, которые имели синий цвет, характерный для ПЭДОТ. Дисперсии были стабильны, по крайней мере, в течение 1 месяца. Электронные спектры водных дисперсий ПЭДОТ/ДНК, синтезированных при разных весовых соотношениях ЭДОТ:ДНК, представлены на рис. 1. На спектрах ПЭДОТ/ДНК комплексов присутствовал пик поглощения в области 700–850 нм, соответствующий допированному состоянию ПЭДОТ [12], и длинноволновый «хвост», характерный для электропроводящих полимеров с сильно делокализованными электронами [13]. Необходимо отметить, что в контрольном эксперименте в отсутствие ДНК ферментативная полимеризация ЭДОТ не протекала, что указывает на ключевую роль «мягкой» матрицы ДНК в лакказа-катализируемом синтезе электропроводящего ПЭДОТ.

Известно, что допированное (электропроводящее) и дедопированное (неэлектропроводящее) состояния ПЭДОТ имеют различные спектральные характеристики [14]. Дедопирование ПЭДОТ в составе интерполимерного комплекса проводили с использованием водного раствора гидразина. Обработка комплек-

са гидразином (рис. 2) приводит к исчезновению полосы поглощения, соответствующей электропроводящему ПЭДОТ, и появлению пика в области 500 нм, который связан с π - π^* -электронными переходами дедопированного ПЭДОТ [13, 15].

Исследования ДНК и комплекса ПЭДОТ/ДНК методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (рис. 3) показало, что пики, соответствующие колебаниям различных групп в молекуле ДНК в комплексе ПЭДОТ/ДНК имеют меньшую интенсивность, что подтверждает формирование комплекса в ходе лакказа-катализируемой полимеризации ЭДОТ. Пунктирными линиями на рис. 3 обозначены колебания, характерные для ДНК: C–C- и C–O-дезоксирибозы (961 и 1016 cm^{-1}), симметричные и асимметричные колебания PO_2^- (1094 и 1237 cm^{-1}), растяжение C–N-связи цитозина и гуанина (1371 cm^{-1}), деформационные колебания C–H, N–H и растяжение C–N (1416 cm^{-1}), вибрационные колебания колец цитозина/гуанина (1483 cm^{-1}), плоскостные колебания гуанина, цитозина (1532 cm^{-1}) и аденина (1604 cm^{-1}), растяжение C=O-связи цитозина/тимина и плоскостные вибрации тимина (1649 cm^{-1}), растяжение C=O-связи гуанина/тимина и N–H-связи тимина (1692 cm^{-1}) [16]. Небольшие пики в области 696, 712 и 960 cm^{-1} соответствуют колебаниям C–S-связи тиафенового кольца, а пики в области 1067 и 1284 cm^{-1} – колебаниям этилендиокси-групп [17].

Морфология синтезированного интерполимерного комплекса ПЭДОТ/ДНК была изучена методами атомно-силовой (рис. 4) и просвечивающей электронной микроскопии (рис. 5). Ис-

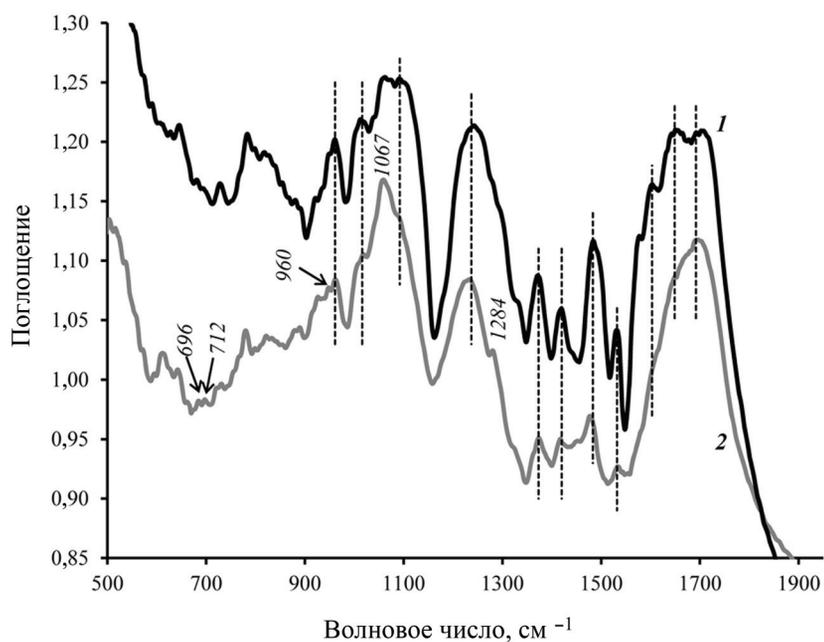


Рис. 3. ИК-спектры ДНК (1) и комплекса ПЭДОТ/ДНК (2); пунктирными линиями обозначены колебания, характерные для ДНК

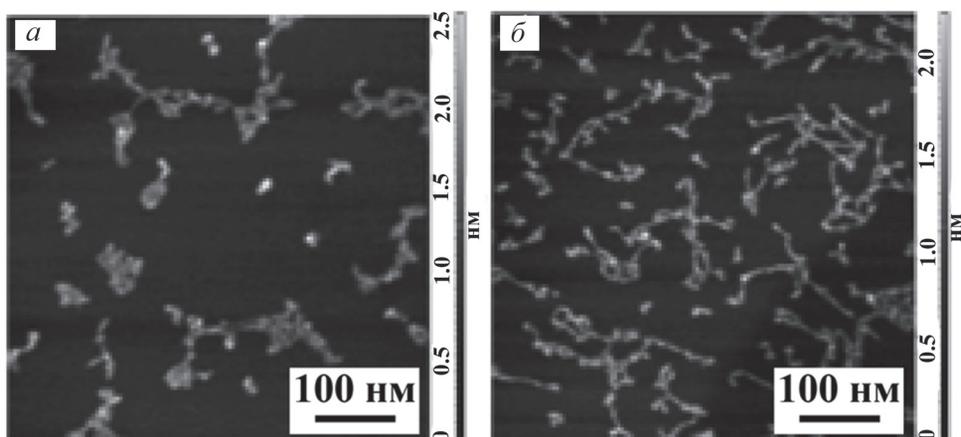


Рис. 4. АСМ-изображение ДНК (а) и комплекса ПЭДОТ/ДНК (б)

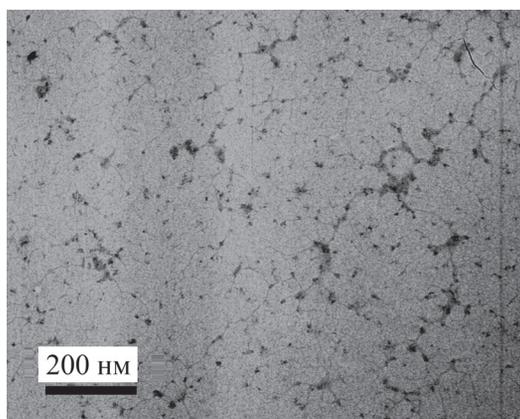


Рис. 5. ПЭМ-изображение комплекса ПЭДОТ/ДНК

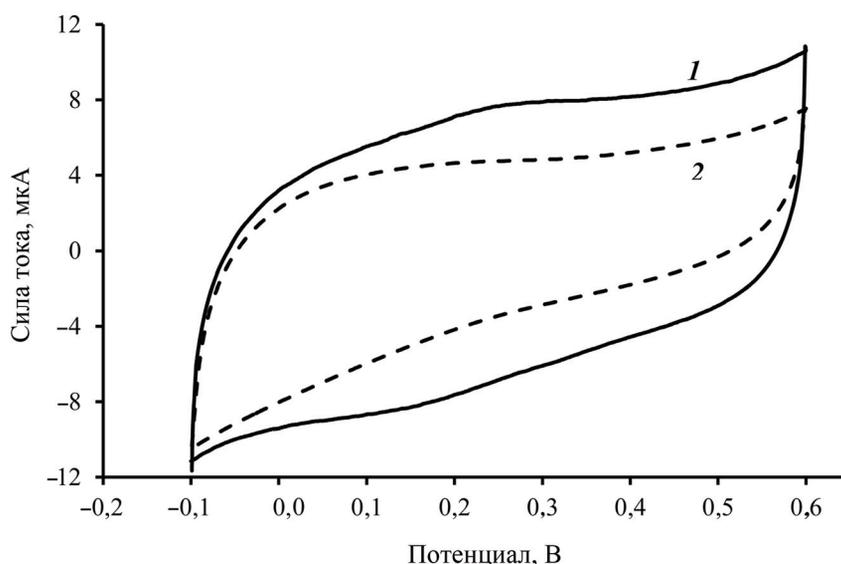


Рис. 6. Циклические вольтамперограммы ПЭДОТ/ДНК (1) и ДНК (2), записанные в 0,1 М растворе NaCl при скорости сканирования потенциала 50 мВ/с

ходная ДНК представляет собой нитевидные скрученные объекты длиной 50–300 нм (рис. 4, а). Длина одного нуклеотида составляет 0,34 нм, а расчетная длина молекул используемого препарата ДНК (50–800 п.н.), соответственно, составляет 20–300 нм. На АСМ-изображении комплекса ПЭДОТ/ДНК (рис. 4, б) отсутствуют объекты иной морфологии, отличной от контрольных нитей ДНК. Это дает основание предполагать, что при лакказы-катализируемой полимеризации ЭДОТ полимер синтезируется преимущественно вдоль нитей ДНК. Нитевидная морфология комплекса ПЭДОТ/ДНК была подтверждена также методом ПЭМ (рис. 5).

Наилучшей электропроводностью, равной ~0,15 мСм/см, обладал комплекс, синтезированный при исходном весовом соотношении ЭДОТ:ДНК = 2:1. Электрохимические характеристики этого нанобиокомпозита были изучены методом циклической вольтамперометрии в 0,1 М NaCl. На вольтамперограмме ПЭДОТ/ДНК (рис. 6, 1) видны псевдообратимые сглаженные катодный ($E_k \approx 0,15$ В) и анодный ($E_a \approx 0,27$ В) максимумы с потенциалом средней точки $E_{ср.т.} \approx 0,21$ В), в то время как на вольтамперограмме ДНК (рис. 6, 2) никаких редокс-процессов не наблюдалось. Удельная

электрохимическая емкость интерполимерного комплекса была рассчитана по формуле

$$C_{уд.} = \int IdE/v\Delta Em,$$

где $C_{уд.}$ – удельная емкость (Ф/г), I – ток (А), ΔE – интервал потенциалов (В), v – скорость изменения потенциала электрода (В/с), m – масса композита, нанесенного на электрод. При скорости изменения потенциала 50 мВ/с удельная емкость композита составляла ~14,5 Ф/г.

Выводы

Проведена ферментативная полимеризация 3,4-этилендиокситиофена на «мягкой» матрице природного полимера ДНК с использованием лакказы *Trametes hirsuta* в качестве биокатализатора. Синтез проводили в «мягких» условиях, не приводящих к нарушению структуры биополимера. Получен электропроводящий нанобиокомпозит ПЭДОТ/ДНК, обладающий собственной электропроводностью, что позволяет использовать его для разработки биосовместимых устройств.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00378а). Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thompson L.A., Kowalik J., Josowicz M., Janata J. // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125. N 2. P. 324.
2. Groenendaal L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J.R. // Adv. Mater. 2000. Vol. 12. N 7. P. 481.
3. Malliaras G.G. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1830. N 9. P. 4286.

4. Hsiao Y.S., Luo S.C., Hou S., Zhu B., Sekine J., Kuo C.W., Chueh D.Y., Yu H., Tseng H.R., Chen P. // *Small*. 2014. Vol. 10. N 15. P. 3012.
5. Ouchen F., Yaney P.P., Bartsch C.M., Heckman E.M., Grote J.G. // *Proc. SPIE*. 2010. Vol. 7765. Article N 77650A.
6. Lota K., Khomenko V., Frackowiak E. // *J. Phys. Chem. Solids*. 2004. Vol. 65. N 2–3. 295.
7. de Pablo P.J., Moreno-Herrero F., Colchero J., Herrero J. G., Herrero P., Baró A.M., Ordejón P., Soler J.M., Artacho E. // *Phys. Rev. Lett*. 2000. Vol. 85. N 23. P. 4992.
8. Legrand O., Côte D., Bockelmann U. // *Phys. Rev. E*. 2006. Vol. 73. N 3. Article N 031925.
9. Ner Y., Invernale M.A., Grote J.G., Stuart J.A., Sotzing G.A. // *Synth. Met*. 2010. Vol.160. N 5–6. P. 351.
10. Gorshina E.S., Rusinova T.V., Biryukov V.V., Morozova O.V., Shleev S.V., Yaropolov A.I. // *Appl. Biochem. Microbiol*. 2006. Vol. 42. N 6. P. 558.
11. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // *Anal. Biochem*. 1973. Vol. 54. N 2. P. 454.
12. Ahonen H.J., Lukkari J., Kankare J. // *Macromolecules*. 2000. Vol. 33. N 18. P. 6787.
13. Hohnholz D., MacDiarmid A.G., Sarno D.M., Jones Jr W.E. // *Chem. Commun*. 2001. N 23. P. 2444.
14. Han M.G., Foulger S.H. // *Small*. 2006. Vol. 2. N 10. P. 1164.
15. Zhang X., MacDiarmid A.G., Manohar S.K. // *Chem. Commun*. 2005. N 42. P. 5328.
16. de Lima S.V., de Oliveira H.P., Andrade C.A.S., de Melo C.P. // *Colloids Surf. A*. 2015. 471, 139-147.
17. Kvarnström C., Neugebauer H., Blomquist S., Ahonen H.J., Kankare J., Ivaska A. // *Electrochim. Acta*. 1999. Vol. 44. N 16 P. 2739.

Поступила в редакцию 10.03.2019

Получена после доработки 12.03.2019

Принята к публикации 14.03.2019

BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF CONDUCTING POLY(3,4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE) USING NATURAL TEMPLATE DNA

I.S. Vasil'eva¹, M.E. Khlupova¹, G.P. Shumakovich¹, E.A. Zaitseva², O.V. Morozova¹,
A.I. Yaropolov^{1*}

(¹Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology RAS; ²Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru)

The enzymatic oxidative polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene on the matrix of DNA biopolymer was carried out. A high redox-potential laccase from fungus *Trametes hirsuta* was used as a biocatalyst for the polymerization of the monomer. Atmospheric oxygen served as an oxidant. Phosphate groups of DNA biopolymer served as dopant of the main chain of poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). The physicochemical properties of the obtained complex and its morphology were studied. The conductivity of the PEDOT/DNA was ~0,15 mS/ m. Synthesized conducting biocompatible interpolymer complex PEDOT/DNA can be potentially used for various biomedical purposes.

Key words: enzymatic synthesis, fungal laccase, conducting polymers, 3,4-ethylenedioxythiophene, DNA, matrix polymerization.

Сведения об авторах: Васильева Ирина Сергеевна – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. хим. наук (irinasin@yandex.ru); Хлупова Мария Евгеньевна – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук (dave80@yandex.ru); Шумакович Галина Петровна – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук (shumakovich1945@yandex.ru); Зайцева Елена Анатольевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (ezaitseva2008@gmail.com); Морозова Ольга Владимировна – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. хим. наук (morozova@inbi.ras.ru); Ярополов Александр Иванович – зав. лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, профессор, докт. хим. наук (yaropolov@inbi.ras.ru).