

УДК 535.321

ЛОКАЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА ДНК

В. С. Горелик, А. С. Крылов, В. П. Свербиль

Зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния света твёрдотельной фазы дезоксирибонуклеиновой кислоты в широком диапазоне частот: от 7 до 4000 см⁻¹. Обнаружено, что в области низких частот присутствует интенсивная полоса с максимумом вблизи 26 см⁻¹, которая на порядок интенсивнее полос в средней и высокочастотной областях. Эта интенсивная низкочастотная полоса соответствует колебаниям пар комплементарных нуклеиновых оснований. В диапазоне средних частот (600–1800 см⁻¹) присутствует ряд резких линий, соответствующих внутримолекулярным модам нуклеиновых оснований.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние, лазер, спектр, колебания, нуклеиновые основания, низкочастотная мода.

Введение. Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) представляет собой двойную спираль, упакованную в различные пространственные структуры. Молекула формируется из двух цепей – сахарофосфатных нитей, соединённых между собой парами комплементарных нуклеиновых оснований [1]. Нуклеиновые основания соединены между собой в длинные полинуклеотидные цепи. Эти цепи в подавляющем большинстве случаев (за исключением некоторых вирусов, имеющих одноцепочечный ДНК-геном) попарно объединяются при помощи водородных связей во вторичную структуру. Двойная спираль ДНК стабилизирована водородными связями, расположенными между обращёнными друг к другу нуклеиновыми основаниями входящих в неё цепей. В природе эта спираль, чаще всего, является правозакрученной. Ширина двойной спирали составляет 2.2–2.4 нм, длина каждого нуклеотида 0.33 нм [1].

Микроструктура ДНК непосредственно связана со спектрами вторичного излучения, в частности, со спектрами комбинационного рассеяния (КР). Молекулы ДНК мо-

ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: gorelik@sci.lebedev.ru.

гут существовать в различных конформациях в зависимости от внешних условий [1]. При переходе из одной конформации в другую может изменяться колебательный спектр молекулы ДНК. Это изменение можно обнаружить по изменению спектров комбинационного рассеяния света.

В работах [2–6] были получены спектры КР ДНК теленка в водном растворе в области 600–1800 см^{-1} . В работе [7] зарегистрированы спектры КР А- и В-форм ДНК в виде водного геля в области 50–300 см^{-1} . В работах [8–11] был исследован вид спектров КР ДНК при различной влажности или в водном растворе в диапазоне 10–300 см^{-1} . В работе [12] были зарегистрированы спектры КР ДНК в сухом виде в области 10–300 см^{-1} . При этом мощность возбуждающего излучения на образце составляла 200 мВт.

В работе [13] исследовались низкочастотные спектры КР ДНК в виде кристаллических тонких пленок. Авторы работы [14] изучали низкочастотные колебания другой биологической молекулы – глицина.

В цитируемых работах спектры КР ДНК регистрировались от достаточно большого объёма образцов. Отметим, что до настоящего времени не было получено информации о полном спектре КР ДНК в широком спектральном диапазоне, включающем как низкочастотную область, так и область частот внутренних колебаний молекулярных групп, входящих в состав ДНК. Кроме того, не выполнялись исследования локальных спектров КР ДНК, полученных методом микроскопии КР. В данной работе ставилась задача получения информации о полном спектре КР в диапазоне 7–4000 см^{-1} с высоким пространственным разрешением (7 мкм).

На рис. 1 приведена блок-схема используемой установки. В качестве источника излучения (1) использовался аргоновый лазер с длиной волны генерации $\lambda = 514.5$ нм, работающий в непрерывном режиме с максимальной мощностью 15 мВт. После системы поворотных зеркал (2, 3) и делителя (4) лазерное излучение с помощью микрообъектива (5) фокусировалось на образце (6). Использовался 50-кратный объектив ($f = 0.8$ мм) с численной апертурой 0.75. Размер пятна возбуждающего излучения на волокнах ДНК составлял 7 мкм. В качестве объекта исследования была выбрана ДНК телёнка в виде высушенных волокон (приготовлена по методике [15]).

Рассеянное излучение регистрировалось в обратном направлении (180-градусная геометрия) с использованием объектива (5), поворотного зеркала (7) и линзы (8). Спектры регистрировались при $T = 23$ °С на тройном монохроматоре (9) Horiba Jobin Yvon T64000. В качестве приёмника излучения использовалась ССD-матрица (10), сигнал с которой обрабатывался компьютером (11). Для получения спектров КР в качестве

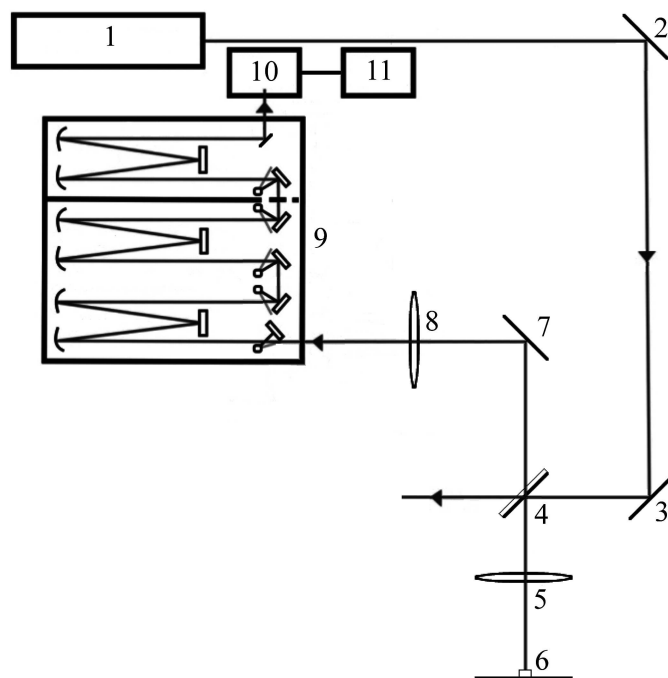


Рис. 1: Оптическая схема эксперимента: 1 – лазер, 2, 3, 7 – зеркала, 4 – светоделитель, 5 – объектив микроскопа, 6 – образец, 8 – линза, 9 – монохроматор, 10 – CCD-матрица, 11 – компьютер.

источника возбуждения было использовано излучение 514.5 нм Ar^+ лазера (Spectra Physics Stabilite 2017) мощностью 0.2 мВт на образце, что соответствует плотности лазерного излучения 500 Вт/см². С целью максимального ослабления крыла упругого рассеяния для получения низкочастотных спектров использовался режим тройного монохроматора со сложением дисперсии, при этом спектральное разрешение составляло 2 см⁻¹, что соответствует использованию дифракционных решёток 1800 штрихов/мм и ширине входной щели 0.1 мм.

На рис. 2 приведена микрофотография участка волокна ДНК, с которого была произведена регистрация спектра КР. Время накопления полного спектра составляло около трёх часов.

Зарегистрированный спектр КР в диапазоне 7–4000 см⁻¹ от участка, показанного в виде светлого пятна на рис. 2, приведен на рис. 3. Как видно из этого рисунка, спектр КР состоит из ряда полос и резких линий, находящихся в различных спектральных диапазонах: в низкочастотной области колебаний молекулярных групп, входящих в состав ДНК, в диапазоне частот внутримолекулярных мод этих групп, а также в высокоча-

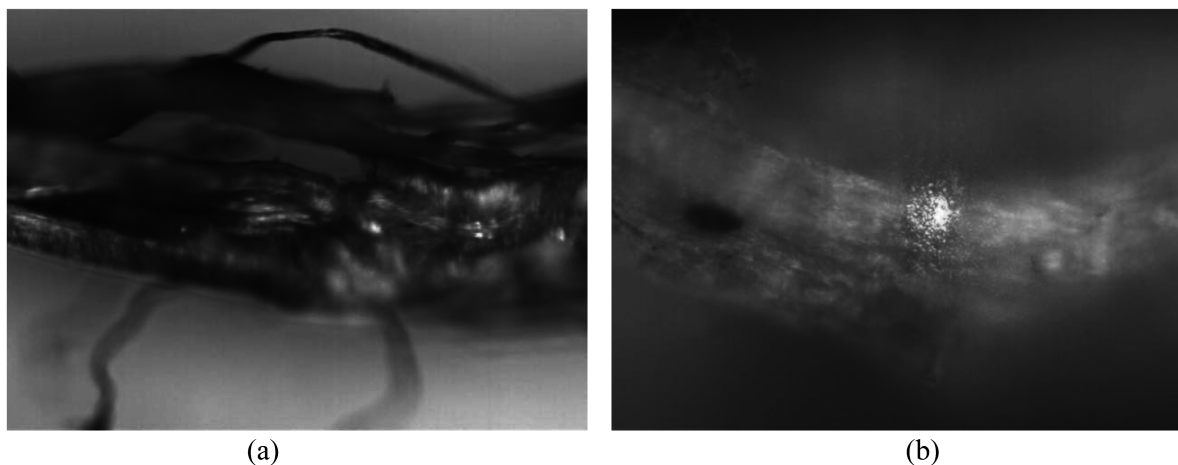


Рис. 2: Фотографии участка волокна ДНК, с которого был зарегистрирован спектр КР (середина изображения); (a) размер по горизонтали 700 мкм, (b) размер по горизонтали 140 мкм, размер лазерного пятна при съемке 7 мкм.

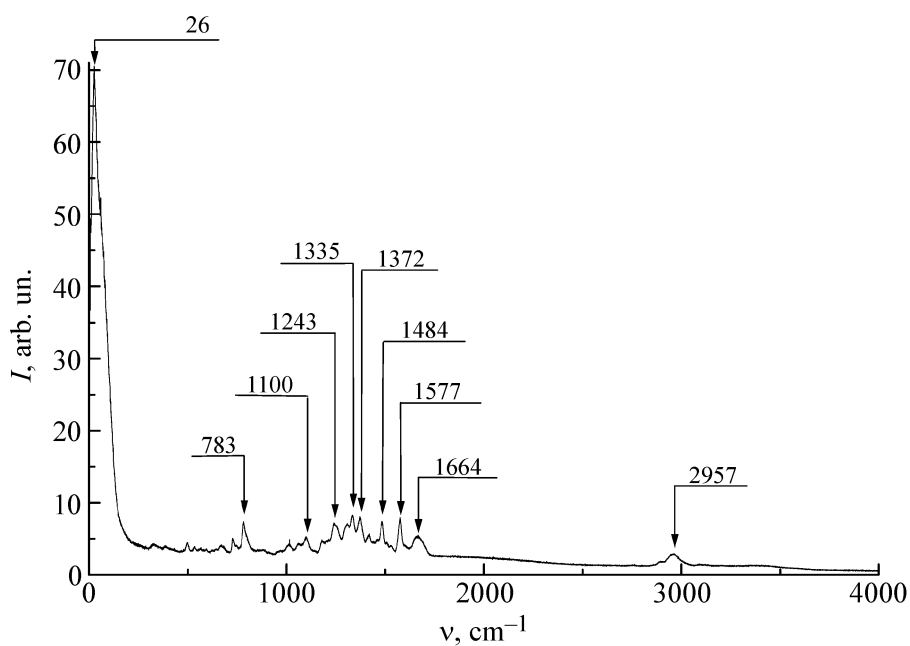


Рис. 3: Спектр КР ДНК телёнка в виде волокон при $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ в широком диапазоне 7–4000 cm^{-1} .

стотной области, соответствующей колебаниям СН-группы. В области низких частот (26 cm^{-1}) присутствует полоса, интенсивность которой более чем на порядок превышает интенсивность полос, соответствующих внутримолекулярным колебаниям нуклеино-

вых оснований и сахаров. В области высоких частот присутствует хорошо выраженная полоса с максимумом 2956 см^{-1} , соответствующая колебаниям СН-группы.

Т а б л и ц а 1

Относительные интенсивности линий в спектре КР ДНК

Частоты пиков в спектре КР ДНК, см^{-1} (наши данные)	Интенсивности пиков (наши данные)	Частоты пиков в спектре КР А-формы ДНК, см^{-1} [4]	Частоты пиков в спектре КР В-формы ДНК, см^{-1} [4]	Отнесение колебаний [4]*
26	670			А-Т, Г-Ц
327	10	335	329	А
386	8	394	390	d
497	12	499	499	Г; Т
534	7	537	535	А
593	4	592	595	Ц; Г
625	3	622		А; Ц; Т
645	4	642	643	А; Ц
666	10	663	669	Т; Г; А
682	9	682	681	Г
729	20	727	729	А
743	11	748	751	Т; d
783	43	781	787	Ц
1012	13	1011	1013	d
1060	15	1055	1054	d(CO)
1100	23	1099	1094	d(PO ₂ ⁻)
1181	20	1182	1182	Т; Ц
1243	44	1243	1237	Т
1308	43	1301	1304	А
1335	55	1336	1339	А
1372	53	1373	1376	Т; А; Г
1418	29	1418	1422	Т; d(CH ₂)
1460	22	1461	1463	d(CH ₂)

Т а б л и ц а 1 (продолжение)

Частоты пиков в спектре КР ДНК, см^{-1} (наши данные)	Интенсивности пиков (наши данные)	Частоты пиков в спектре КР А-формы ДНК, см^{-1} [4]	Частоты пиков в спектре КР В-формы ДНК, см^{-1} [4]	Отнесение колебаний [4]*
1484	50	1483	1489	А; Г
1508	18	1512	1511	А
1528	14	1537	1538	Ц
1577	53	1574	1577	Г; А
1664	28	1669	1669	Т; Г(C=O)
2892	6	2894	2896	d(CH)
2957	17	2950	2964	d(CH)
		2968		d(CH)

* А – аденозин, Г – гуанин, Т – тимидин, Ц – цитозин, d – дезоксирибоза сахарофосфатного остова.

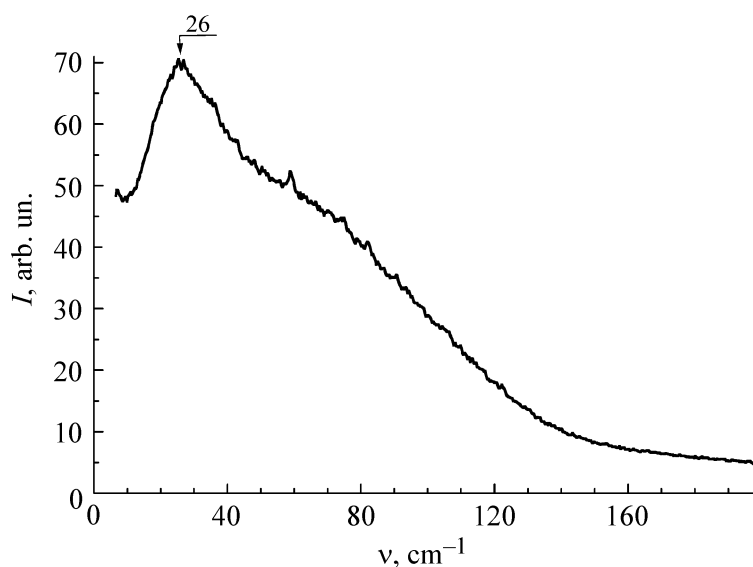


Рис. 4: Спектр КР ДНК телёнка в виде волокон при $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ в диапазоне $7\text{--}200 \text{ см}^{-1}$.

На рис. 4 приведен низкочастотный спектр в диапазоне $7\text{--}200 \text{ см}^{-1}$. Как видно из этого рисунка, в области низких частот присутствует интенсивная полоса с максимумом 26 см^{-1} , а также менее интенсивные размытые полосы в диапазоне $60\text{--}100 \text{ см}^{-1}$.

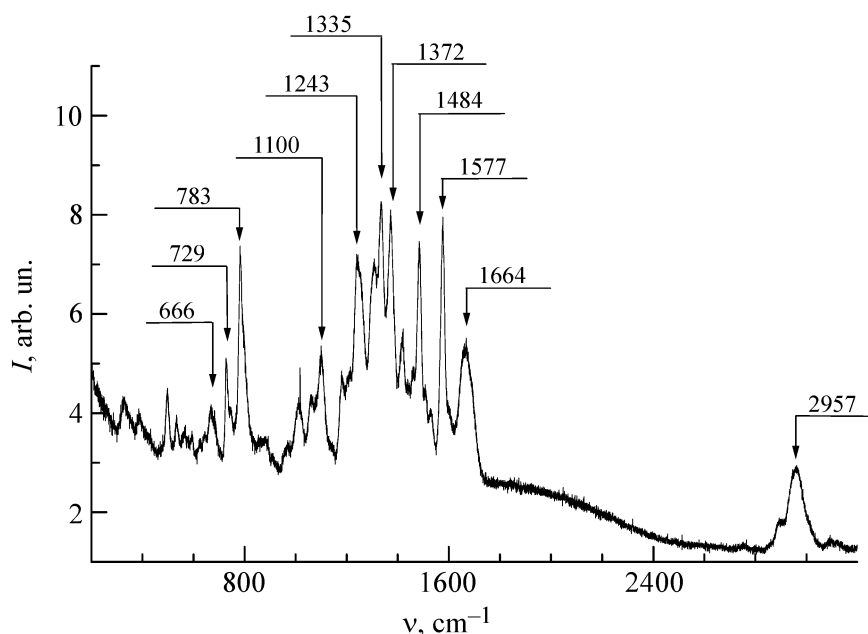


Рис. 5: Спектр КР ДНК телёнка в виде волокон при $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в диапазоне $200\text{--}3200\text{ см}^{-1}$.

В диапазоне средних частот ($600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$) присутствует ряд резких линий (рис. 5), соответствующих внутримолекулярным модам нуклеиновых оснований. Данные о частотах и относительных интенсивностях линий в зарегистрированном нами спектре КР приведены в табл. 1. Для сравнения приводятся данные о соответствующих частотах и типах колебаний, взятые из работы [4].

Для анализа колебаний молекулы ДНК предлагались различные модели [16–19]. Интенсивная полоса в области с максимумом вблизи 26 см^{-1} , по мнению авторов работ [16, 17], соответствует “твист”-модам комплементарных пар нуклеиновых оснований.

Такое предположение представляется естественным, поскольку “твист”-моды характеризуются большой амплитудой и малым затуханием. Таким образом, интенсивность “твист”-мод является наибольшей.

Таким образом, в данной работе были зарегистрированы спектры комбинационного рассеяния света твёрдотельной фазы ДНК в широком диапазоне частот: от 7 до 4000 см^{-1} от участка диаметром 7 мкм . Обнаружено, что в области низких частот присутствует полоса с максимумом вблизи 26 см^{-1} , интенсивность которой на порядок превышает интенсивность максимумов в средней и высокочастотной областях. Эта полоса соответствует колебаниям пар комплементарных нуклеиновых оснований, распо-

ложенных в соседних цепях ДНК. В диапазоне средних частот (600–1800 см⁻¹) присутствует ряд резких линий, соответствующих внутримолекулярным модам нуклеиновых оснований. В высокочастотной области обнаруживается полоса с максимумом вблизи 2956 см⁻¹. Сравнение спектров в нескольких точках образца показало отсутствие статистически значимых различий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 13-02-90420, 13-02-00449).

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] *Биофизика*. Под ред. П. Г. Костюка (Киев, Выща школа, 1988).
- [2] S. C. Erfurth, W. L. Peticolas, *Biopolymers* **14**, 247 (1975).
- [3] Ruixin Dong, Xunling Yan, Xiaofeng Pang, Shenggang Liu, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **60**(3), 557 (2004).
- [4] B. Prescott, W. Steinmetz, G. J. Thomas, Jr., *Biopolymers* **23**, 235 (1984).
- [5] John G. Duguid, Victor A. Bloomfield, James M. Benevides, George J. Thomas, Jr., *Biophysical J.* **71**, 3350 (1996).
- [6] C. M. Muntean, G. M. J. Segers-Nolten, *Biopolymers* **72**, 225 (2003).
- [7] Om. P. Lamba, A. H.-J. Wang, George J. Thomas Jr., *Biopolymers* **28**(2), 667 (1989).
- [8] H. Urabe and Y. Tominaga, *Biopolymers* **21**, 2477 (1982).
- [9] S. M. Lindsay, S. A. Lee, J. W. Powell, et al., *Biopolymers* **27**, 1015 (1988).
- [10] Hisako Urabe, Yasunori Tominaga, and Kenji Kubota, *J. Chem. Phys.* **78**(10), 5937 (1983).
- [11] C. Demarco, S. M. Lindsay, M. Pokorny, et al., *Biopolymers* **24**, 2035 (1985).
- [12] Paul C. Painter, Lue Mosher, Carol Rhoads, *Biopolymers* **20**, 243 (1981).
- [13] H. Urabe, Y. Sugawara, M. Ataka and A. Rupprecht, *Biophysical Journal* **74**, 1533 (1998).
- [14] N. V. Surovtsev, V. K. Malinovsky, and E. V. Boldyreva, *Journal of Chemical Physics* **134**, 045102 (2011).
- [15] A. A. Akhrem, V. P. Egorova, A. S. Egorov, et al., *Biopolymery i Kletka* **5**(5), 44 (1989).
- [16] Kuo-Chen Chou, *Biochem. J.* **221**, 27 (1984).
- [17] Kuo-Chen Chou, Gerald M. Maggiora, Boryeu Mao, *Biophys. J.* **56**, 295 (1989).
- [18] S. N. Volkov, A. M. Kosevich, G. E. Wainreb, *Biopolimery i Kletka* **5**(6), 32(1989).
- [19] S. M. Perepelytsya, S. N. Volkov, *Eur. Phys. J.* **24**, 261 (2007).

Поступила в редакцию 5 мая 2014 г.