

УДК 681.784.88, 535.36

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА МОЛЕКУЛЫ ДНК  
В ТЕРАГЕРЦОВОЙ ОБЛАСТИ ЧАСТОТ**

М.В. Цуркан, Е.А. Собакинская, О.А. Смолянская, В.Г. Беспалов, В.Л. Вакс, Н.С. Балбекин

Проведено исследование спектра деградированной ДНК в диапазоне частот 0,1–1,3 ТГц. Определены собственные линии поглощения ДНК, идентифицированы линии поглощения, отвечающие за взаимодействие с водой и конформационные изменения.

**Ключевые слова:** терагерцовое излучение, спектроскопия, спектр ДНК, линии поглощения.

**Введение**

Спектроскопический анализ биомолекул в терагерцовой (ТГц) области частот привлекает внимание исследователей во всем мире [1–5]. Связано это, прежде всего с тем, что диэлектрическая функция макромолекул в ТГц диапазоне сформирована низкочастотными колебаниями, представляющими собой коллективные движения больших групп атомов, образующих молекулу. Такие колебания очень чувствительны к внутримолекулярной структуре вещества и дают информацию о его конформационных состояниях. Эта информация крайне важна для биологии, так как конформационная гибкость биомолекул (ДНК, РНК, белки, витамины, и т.д.) напрямую связана со способностью молекулы изменять свою структуру, и поэтому играет важную роль в биохимических реакциях.

Методика, позволяющая определять возможные конформационные состояния, выявлять мутации, а также влиять на ход биохимических реакций, была бы крайне востребована, прежде всего, для анализа молекулы ДНК, являющейся основой многих химических процессов, происходящих в клетке. Спектр этой молекулы и ее компонентов в дальнем инфракрасном и ТГц диапазонах являлся предметом исследования нескольких работ. Существование специфических спектральных особенностей при изучении спектра нуклеотидов и нуклеозидов методами ТГц продемонстрировано в работах [1, 2]. Было показано, что для каждого из 4 оснований существуют специфические спектральные особенности как для коэффициента поглощения, так и для коэффициента отражения [2]. Найденные полосы поглощения были идентифицированы как резонансы водородных связей, ответственных за агрегацию молекул в микрокристаллическое состояние. Влияние степени гидратации ДНК на характеристики АТ и GC пар стало предметом исследования [3]. Регистрация спектра ДНК в растворе с водой была продемонстрирована в работах [4, 5].

В работе [6] получены линии поглощения и показатели преломления пленок ДНК сельди. В частности, было показано, что спектры гибридных и денатурированных молекул хорошо различаются между собой, что в принципе позволяет с помощью регистрации характерных полос поглощения различать состояния ДНК. Ключевым моментом такой методики является точное знание частот образца. Фактически информация о собственных частотах ДНК, а также о частотах связей этой молекулы с другими важными биовеществами (вода, белки) может дать новый импульс развитию других приложений: диагностика функционального состояния ДНК, выявление мутированных образцов, управление химическими реакциями.

В связи с этим целью данной работы стало подробное изучение спектра ДНК в диапазоне 0,1–1,3 ТГц, что включало в себя определение характерных собственных частот, а также линий поглощения, соответствующих связям молекулы с различными веществами.

**Описание подготовки образцов и методики измерений**

Для проведения исследований использовалась деградированная ДНК сельди (Канада) в виде сухого порошка. ДНК сельди – один из самых распространенных объектов исследования, что позволяет сопоставлять полученные данные с известными данными из литературы. Образцы ДНК готовились в виде пленок на двух различных подложках (полиэтиленовой и кварцевой), которые обеспечивали хорошее пропускание в ТГц диапазоне. В качестве растворителя использовались ректифицированный этиловый спирт и дистиллированная вода. Порошок ДНК смешивался в различных концентрациях  $K$  ( $K_1 > K_2 > K_3$ ) с растворителем и помещался на подложку, где оставался высыхать в атмосферных условиях до появления твердой пленки.

Первый этап проведения измерений заключался в приготовлении образцов. Затем регистрировался спектр очищенной подложки. Для этого подложка очищалась ректифицированным спиртом, промывалась в дистиллированной воде и затем высушивалась. Далее проводилось измерение спектра образцов ДНК. Для проверки воспроизводимости результатов регистрация спектра для каждого образца проводилась 3 раза. Измерения проведены для различных концентраций ДНК.

## Схема установки

В работе использовалась схема, представленная на рис. 1. Пучок накачки от фемтосекундного Yb:KYW-лазера Solar FL-1 ( $\lambda = 800$  нм;  $t_{\text{имп}} = 45$  фс;  $f = 80$  МГц;  $P = 1,5$  Вт), пройдя через моторизованную линию оптической задержки, попадает на полупроводниковый кристалл арсенида индия, помещенный в постоянное магнитное поле, который генерирует ТГц излучение. Получаемое ТГц излучение обладает следующими параметрами: спектральный диапазон 0,1–1,3 ТГц, средняя мощность 48 мкВт, длительность импульса 2,5 пс. Генерируемое излучение после прохождения фильтра из тефлона, отсекающего диапазон длин волн, меньших 50 мкм, попадает на ТГц поляризатор, выделяющий горизонтальную составляющую. Поляризованное излучение проходит сквозь образец, обладающий некоторым амплитудно-фазовым пропусканием. Образец фиксируется в вертикальном положении в фокусной плоскости, перпендикулярной лучу, с помощью двухкоординатного предметного столика, и при прохождении сквозь него происходит дифракция ТГц излучения. При одновременном попадании пробного пучка фемтосекундного излучения и пучка ТГц излучения на электрооптический кристалл CdTe ТГц импульс в кристалле наводит двулучепреломление для пробного пучка вследствие электрооптического эффекта. Величина двулучепреломления прямо пропорциональна напряженности электрического поля ТГц волны в данной временной точке  $E(t)$ . Схема измерения двулучепреломления состоит из четвертьволновой пластины, призмы Волластона, балансного фотодетектора собственной разработки (диоды BPW34, микросхема усилителя OP177 фирмы Analog Devices) и синхронного усилителя LIA-MV-150 фирмы Femto, управляемого от оптико-механического модулятора MC-1000A фирмы Thorlabs, помещенного в пучок накачки. В отсутствие ТГц излучения пробный пучок не испытывает двулучепреломления и после прохождения четвертьволновой пластины, превращающей горизонтальную поляризацию пучка в круговую, и призмы Волластона разделяется на два пучка с ортогональными поляризациями одинаковой интенсивности, при этом с балансного фотодетектора не регистрируется сигнал. При наведении ТГц импульсом двулучепреломления в пробном пучке пучки после призмы Волластона имеют уже не одинаковую интенсивность, и на балансном фотодетекторе регистрируется сигнал рассогласования. При изменении поляризации ТГц импульса меняется и знак двулучепреломления, что соответственно вызывает изменение поляризации сигнала с фотодетектора. С помощью линии оптической задержки изменяется время пересечения ТГц импульса и импульса пробного пучка в кристалле. Таким образом, измеряя при различных задержках сигнал рассогласования, можно измерить зависимость амплитуды ТГц излучения от времени  $E(t)$ . Для увеличения соотношения сигнал/шум в схеме используется синхронный усилитель. Отфильтрованный и усиленный сигнал передается в компьютер посредством цифрового вольтметра NI-4065 фирмы National Instruments. Схема регистрации установки обеспечивает частотную погрешность меньше 5,5 ТГц.

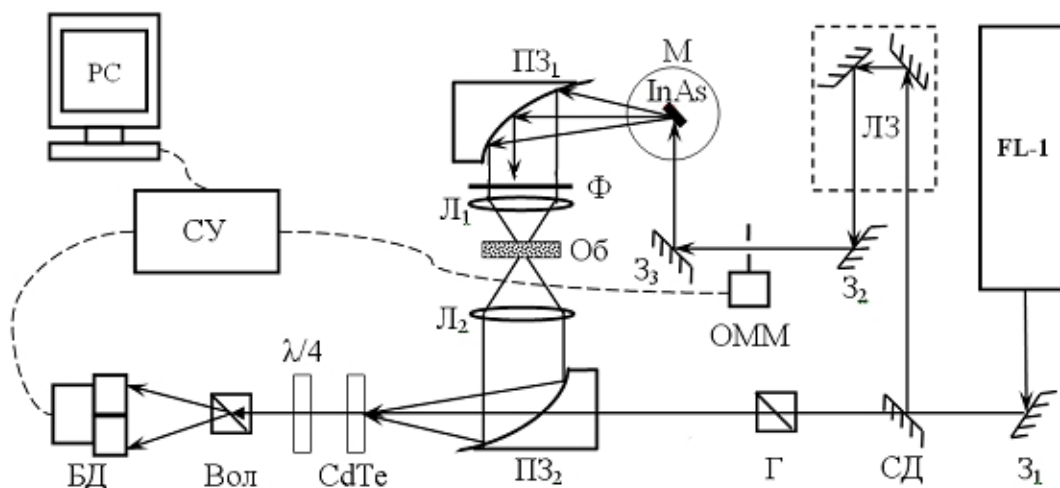


Рис. 1. Схема терагерцового спектрофотометра TS-5: FL-1 – Yb:KYW-лазер фемтосекундных световых импульсов; З<sub>1</sub>, З<sub>2</sub>, З<sub>3</sub> – плоские зеркала; СД – светоделитель; ЛЗ – линия задержки; ОММ – оптико-механический модулятор; InAs – кристалл; М – постоянный магнит; Г – призма Глана; ПЗ<sub>1</sub> и ПЗ<sub>2</sub> – параболические зеркала; Ф – фильтр; Л<sub>1</sub> и Л<sub>2</sub> – линзы; Об – объект; CdTe – электрооптический кристалл;  $\lambda/4$  – фазовая пластинка; Вол – призма Волластона; БД – балансный детектор; СУ – синхронный усилитель; PC – компьютер

Программное обеспечение для спектрофотометра осуществляется через виртуальный прибор, созданный в среде разработки LabView, управляющий задержкой и процессом измерения и позволяющий осуществлять съемку временного профиля ТГц импульса. На дисплее компьютера отображается кривая

$E(t)$  ТГц излучения. Полученные профили полей проходят предварительную обработку в программе Origin 6.0, конечный вид спектра рассчитывается в программе Mathcad 13.

#### Анализ данных

Некоторые зарегистрированные спектры для разных подложек и растворителей показаны на рис. 2–4. На графиках по оси ординат отложена интенсивность сигнала в относительных единицах, а по оси абсцисс – частота. Прямоугольниками выделены линии поглощения образцов ДНК.

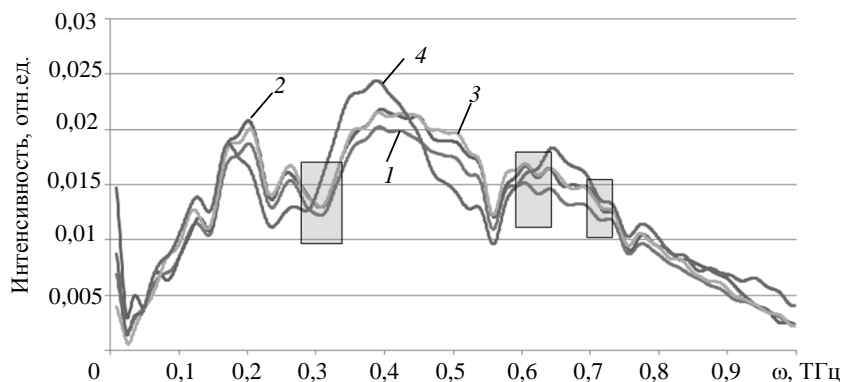


Рис. 2. Спектр образцов ДНК в растворе с водой, концентрация  $K_2$ , на кварцевой подложке: 1 – первое измерение образца; 2 – второе измерение образца; 3 – третье измерение образца; 4 – спектр подложки. Прямоугольниками выделены полосы поглощения на 0,300; 0,625 и 0,712 ТГц

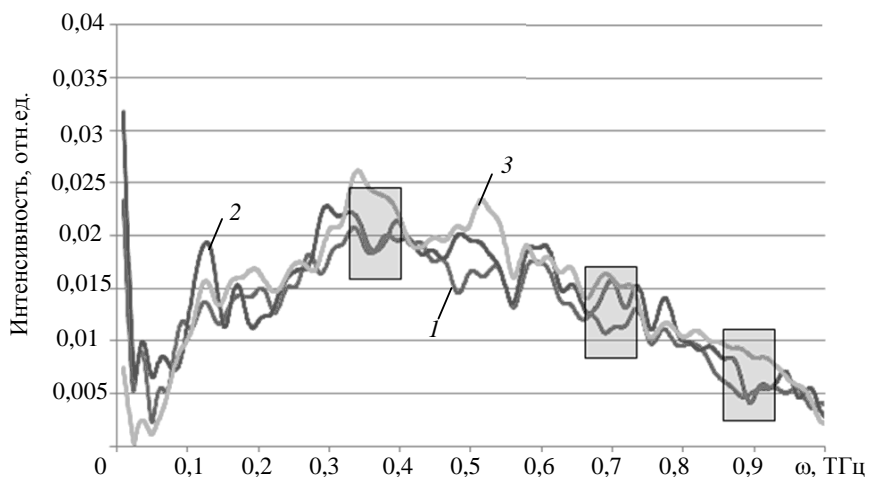


Рис. 3. Спектр образцов ДНК в растворе с водой, концентрация  $K_2$ , на полиэтиленовой подложке: 1 – первое измерение образца; 2 – второе измерение образца; 3 – спектр подложки. Серыми прямоугольниками выделены полосы поглощения на 0,368; 0,711 и 0,900 ТГц

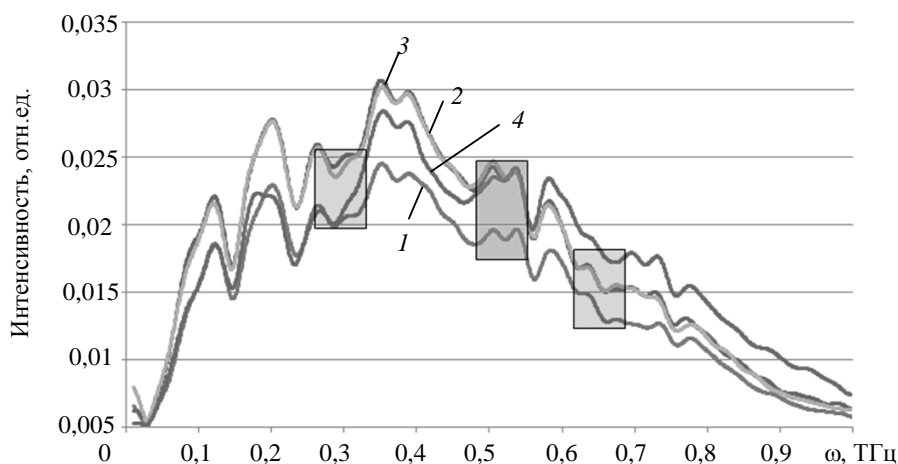


Рис. 4. Спектр образцов ДНК в растворе со спиртом, концентрация  $K_1$ , на полиэтиленовой подложке: 1 – первое измерение образца; 2 – второе измерение образца; 3 – третье измерение образца; 4 – спектр подложки. Серыми прямоугольниками выделены полосы поглощения на 0,315; 0,519 и 0,662 ТГц

Определение характерных линий поглощения ДНК осуществлялось по зарегистрированным спектрам для разных подложек и растворителей. Критериями отбора служили отличия линий поглощения образца от спектральных линий подложки в центральной частоте, интенсивности и профиле. Все найденные линии поглощения образцов сведены в таблицу.

Подложка	Частоты линий поглощения образцов ДНК с водой, ТГц	Частоты линий поглощения образцов ДНК со спиртом, ТГц
Полиэтиленовая подложка	0,368; 0,623; 0,667; 0,711; 0,900	0,315; 0,519; 0,662
Кварцевая подложка	0,300; 0,481; 0,625; 0,712	0,415; 0,520; 0,665; 0,712

Таблица. Зарегистрированные линии поглощения образцов ДНК, усредненные по нескольким данным

Полученные данные были проанализированы путем сопоставления со спектрами бактериальной ДНК в растворе с водой [4], спектрами ДНК сельди в твердом состоянии [6] и спектрами воды [7]. Линии поглощения ДНК, зарегистрированные в работе [6] с помощью Фурье-спектрометра IFS-66 (спектральное разрешение порядка 6 ГГц), были получены без использования растворителей. Близость полученных авторами частот к результатам работы [6] считалась определяющей для собственных линий поглощения ДНК сельди. Таким образом, в настоящей работе следующие частоты были идентифицированы как собственные частоты ДНК: 0,368; 0,623 (0,625); 0,662 (0,665) ТГц.

Линии поглощения 0,315; 0,415; 0,519 (0,520); 0,711 (0,712) ТГц, близкие к линиям поглощения бактериальной ДНК, были отнесены к конформационным колебаниям в связи с тем, что в работе [4] они были получены для другого типа ДНК с разными растворителями. Линия поглощения на частоте 0,667 ТГц, полученная с использованием воды в качестве растворителя, отвечает за взаимодействие с водой, так как совпадает с линией поглощения бактериальной ДНК, также растворенной в воде [4]. Две линии поглощения на частотах 0,300 и 0,900 ТГц не были идентифицированы.

### Заключение

С помощью спектрофотометра ТГц диапазона проведено исследование спектра деградированной ДНК сельди в диапазоне 0,1–1,3 ТГц. Исследования проведены для образцов в твердой фазе на подложках из полиэтилена и кварца. В результате исследования идентифицированы собственные линии поглощения ДНК. Впервые для ДНК сельди получены частоты, отвечающие за конформационные связи молекулы и за колебания связей ДНК с водой. Таким образом, в отличие от имеющихся в литературе работ по спектрам ДНК, в настоящей работе получены как собственные частоты образца, так и частоты конформационных колебаний и связей с растворителем.

Фактически такая информация является основой для создания методик диагностики состояния ДНК (структура, наличие мутаций) по собственным частотам и управления биохимическими реакциями через активацию/деактивацию связей с окружающими веществами.

Однако для непосредственного применения в указанных приложениях полученные данные нуждаются в уточнении. В связи с этим следующим этапом работы станет исследование спектров ДНК вблизи полученных частот с более высоким спектральным разрешением, что даст возможность провести тщательный анализ результатов по профилю линии поглощения, сдвигу центральной частоты и изменению интенсивности. Такой анализ позволит уточнить центральные частоты и подтвердить идентификацию линий, что в конечном итоге обеспечит получение достоверных данных.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 16.513.11.3070 и ГК № 14.740.12.0841).

### Литература

1. Markelz A.G., Roitberg A., Heilweil E.J. Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz // *Chemical Physics Letters*. – 2000. – V. 320. – P. 42–48.
2. Fischer B.M. Far-infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* – 2002. – V. 47. – P. 3807–3814.
3. Semenov M., Bolbukh T., Maleev V. Infrared study of the influence of water on DNA stability in the dependence on AT/GC composition // *Journal of Mol. Structure*. – 1997. – V. 408/409. – P. 213–217.
4. Globus T., Khromova T., Gelmont B., Woolard D., Tamm L.K. Terahertz characterization of dilute solutions of DNA // *Proc. of SPIE*. – 2006. – V. 6093. – P. 609308-1–609308-12.
5. Cherkasova O.P., Nazarov M.M., Shkurinov A.P. and V.I. Fedorov. Terahertz spectroscopy of biological molecules // *Radiophysics and Quantum Electronics*. – 2009. – V. 52. – № 7. – С. 518.
6. Parthasarathy R., Globus T., Khromova T., Swami N., Woolard D. Dielectric properties of biological molecules in the Terahertz gap // *Appl. Phys. Lett.* – 2005. – V. 87. – P. 113901-1–113901-3.

7. Globus T., Anwar Mehdi, DeMaria Anthony J., Shur Michael S. Low-Terahertz spectroscopy of liquid water // Terahertz Physics, Devices and Systems II // Proc. of SPIE. – 2007. – V. 6772. – P. 67720S-1–67720S-11.

- Цуркан Мария Валериевна** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, мл. научный сотрудник, tsurkan.maria@yandex.ru
- Собакинская Екатерина Александровна** – Институт физики микроструктур РАН, инженер, katja@ipm.sci-nnov.ru
- Смолянская Ольга Алексеевна** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат физ.-мат. наук, доцент, o\_smolyanskaya@mail.ru
- Беспалов Виктор Георгиевич** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор физ.-мат. наук, профессор, victorbespaloff@gmail.com
- Вах Владимир Лейбович** – Институт физики микроструктур РАН, кандидат физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник, зав. отделом, vax@ipm.sci-nnov.ru
- Балбекин Николай Сергеевич** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, студент, Godnikolay@yandex.ru