

УДК 535.375.54

КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЙЯНИЕ ВЫСУШЕННОЙ ДНК ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗБУЖДЕНИИ

В.С. Горелик¹, Г.И. Довбешко², А.С. Крылов³, А.Ю. Пятыхшев⁴

¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Российская Федерация
e-mail: gorelik@sci.lebedev.ru

²Институт физики НАН Украины, Киев, Украина

³Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН,
Красноярск, Российская Федерация

⁴МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, Российская Федерация

Впервые зарегистрирован и исследован полный спектр комбинационного рассеяния высушенной ДНК при лазерном возбуждении в широком диапазоне значений частоты 6...4000 см⁻¹ с высоким пространственным (≈10 мкм) и спектральным (≈1 см⁻¹) разрешением. Обнаружены новые комбинационные спутники, соответствующие колебаниям нуклеотидов ДНК. Установлено, что в области низких частот наблюдается пик с частотой 25 см⁻¹, соответствующий осцилляциям нуклеиновых оснований. Интенсивность этого комбинационного спутника более чем на порядок превышает интенсивность линий, соответствующих внутримолекулярным колебаниям. В области высоких частот (≈3000 см⁻¹) определен интенсивный максимум, который соответствует колебаниям СН-группы. Выполнено отнесение комбинационных спутников к внутренним колебаниям нуклеиновых оснований. Полученные данные о виде спектров комбинационного рассеяния молекулы ДНК могут быть использованы для отождествления различных типов ДНК и для анализа генетической информации, связанной с молекулярной структурой этой молекулы.

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

RAMAN SCATTERING OF A DRIED DNA EXPOSED TO LASER EXCITATION

V.S. Gorelik¹, G.I. Dovbeshko², A.S. Krylov³, A.Yu. Pyatyshev⁴

¹Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
e-mail: gorelik@sci.lebedev.ru

²Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Kirensky Institute of Physics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Krasnoyarsk, Russian Federation

⁴Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russian Federation

For the first time a full Raman scattering spectrum of the dried DNA exposed to laser excitation within a wide frequency range of 6–4000 cm⁻¹ at a high spatial (≈10 μm) and spectral (≈1 cm⁻¹) resolution is recorded and investigated. New combinational satellites corresponding to oscillations of DNA nucleotides are detected. It is found

that the 25 cm^{-1} peak corresponding to oscillations of nucleic bases is observed in the low-frequency region. An intensity of this combinational satellite exceeds more than by an order of magnitude the intensity of lines relating to intramolecular vibrations. An intensive maximum is determined in the high-frequency region ($\approx 3000\text{ cm}^{-1}$) corresponding to the CH-group oscillations. The combinational satellites are ascribed to internal oscillations of nucleic bases. The obtained data on the form of Raman scattering spectra of the DNA molecule may be used for identification of different DNA types and for analysis of genetic information associated with the molecular structure of this molecule.

Keywords: Raman scattering, DNA, nucleic bases, laser, spectrum, oscillations.

Нуклеиновые кислоты присутствуют в биоструктурах и играют важную роль в процессах жизнедеятельности. Изучение их структуры и динамических характеристик — одна из актуальных областей молекулярной физики. Пример таких кислот — это дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), которая была открыта Иоганном Фридрихом Мишером в 1868 г. Из остатков клеток, содержащихся в гное, он выделил вещество, в состав которого входят азот и фосфор. Сначала новое вещество получило название нуклеин. Позднее, когда Мишер определил, что это вещество обладает кислотными свойствами, оно получило название нуклеиновая кислота [1]. Биологическая функция этого вещества была неясна, и долгое время ДНК считалась запасником фосфора в организме. Даже в начале XX в. многие биологи полагали, что ДНК не имеет никакого отношения к передаче информации.

Расшифровка структуры ДНК стала одним из поворотных моментов в истории биологии. В 1962 г. за выдающийся вклад в это открытие была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Исследованию спектров комбинационного рассеяния (КР) ДНК посвящено большое число работ [2–6]. В работах [2, 3] был получен спектр КР в диапазоне значений частоты $600 \dots 1800\text{ cm}^{-1}$ водного раствора ДНК тимуса телят при температуре 25, 80, 98 °С и кислотности $\text{pH} = 7$ в присутствии 0,01 моль/л какодилата натрия и 0,001 м ЭДТА. При этом суммарная концентрация ионов Na^+ составляла 0,0075 моль/л. Авторами обнаружено, что при приближении к температуре плавления интенсивности отдельных линий, обусловленных колебаниями всех четырех оснований ДНК, постепенно увеличиваются. В работе [4] были исследованы спектры КР в диапазоне значений частоты $600 \dots 1800\text{ cm}^{-1}$ сухой ДНК тимуса телят при температуре –100, 20 и 130 °С. В этой же работе исследовали спектр КР водного раствора ДНК тимуса телят при температуре –100, 20 и 96 °С. Установлено, что при снижении температуры значения частоты, соответствующие аденину и гуанину, сдвигаются в сторону меньших значений, а значения частоты, соответствующие тимину и цитозину, не изменяются. Значения частоты, которые соответствуют аденину,

гуанину, тимину и цитозину, также были определены. При этом разные группы исследователей получили близкие значения частоты для соответствующих оснований.

В работах [5, 6] изучены конформационные изменения водных растворов молекулы ДНК с применением противоионов Na^+ , Cs^+ и Mg^{2+} в различных позициях в макромолекуле. Противоионы нейтрализуют фосфатные группы в двойном спиралевидном остове молекулы ДНК. В результате исследований были получены низкочастотные спектры комбинационного рассеяния в диапазоне значений $60 \dots 140 \text{ см}^{-1}$.

В работах [2, 7] были исследованы конформационные изменения молекулы ДНК в водных растворах с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния в диапазоне значений $600 \dots 1800 \text{ см}^{-1}$ при добавлении соли NaCl концентрацией $3 \dots 4\%$ и относительной влажности 75 и 92%. Если относительная влажность превышала 92%, то ДНК переходила из А-формы в В-форму.

В работах [8–10] рассмотрено взаимодействие аспирина, доксорубина и бромистого этидия с ДНК, зарегистрированы спектры КР и резонансного КР (РКР) молекул этих соединений в диапазоне значений частоты $500 \dots 1800 \text{ см}^{-1}$. В результате установлено изменение структуры двойной спирали ДНК после взаимодействия с этими соединениями. Выполненные исследования являются важными с позиции влияния аспирина на микроструктуру ДНК, а также вследствие того, что доксорубин используется при лечении рака, а бромистый этидий — сильный мутаген. В диапазоне значений частоты $600 \dots 1800 \text{ см}^{-1}$ происходят заметные изменения, что свидетельствует о взаимодействии молекул ДНК с указанными соединениями.

Несмотря на большое число работ по исследованию спектров КР ДНК, остаются малоизученными в области низких ($5 \dots 100 \text{ см}^{-1}$) и высоких (до 4000 см^{-1}) частот в этой молекуле. В связи с этим в настоящей работе была поставлена задача регистрации и анализа спектров КР высушенной ДНК в широком диапазоне значений частоты ($6 \dots 4000 \text{ см}^{-1}$) с высоким спектральным разрешением (1 см^{-1}).

Дезоксирибонуклеиновая кислота представляет собой биополимер, мономером которого является нуклеотид [11, 12]. Каждый нуклеотид состоит из остатка фосфорной кислоты, присоединенного к сахару дезоксирибозе, к которому также через гликозидную связь присоединено одно из четырех азотистых оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т).

Полимер ДНК обладает довольно сложной структурой. Нуклеотиды ковалентно связаны в длинные полинуклеотидные цепи, которые в подавляющем большинстве случаев попарно объединяются с помощью водородных связей во вторичную структуру, получившую название двойной спирали (рис. 1) [13, 14]. Остов каждой цепи состоит

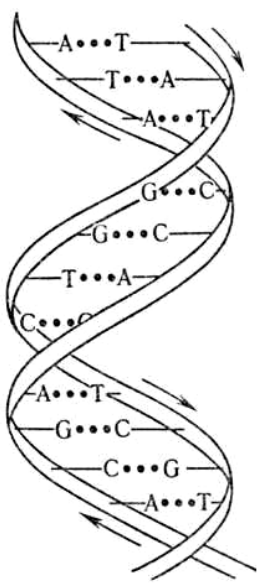


Рис. 1. Участок двойной спирали ДНК

из чередующихся фосфатов и сахаров [15]. В природе эта спираль в основном правозакрученная. Ширина двойной спирали составляет 2,2... 2,4 нм, длина нуклеотида 0,33 нм [16]. Подобно тому, как в винтовой лестнице сбоку можно увидеть ступеньки, на двойной спирали ДНК в промежутках между фосфатным остовом молекулы можно видеть ребра оснований, кольца которых расположены в плоскости, перпендикулярной продольной оси макромолекулы.

Для возбуждения и регистрации спектров КР использовалась следующая экспериментальная установка. Лазерное излучение с помощью полупрозрачного зеркала направлялось (рис. 2) на подложку с исследуемым веществом, вторичное излучение (КР) с помощью полупрозрачного зеркала — на входную щель тройного монохроматора Т64000, связанного с компьютером. При этом

в качестве источника возбуждающего излучения применялся аргоновый лазер с длиной волны излучения 514,5 нм и мощностью 15 мВт. Изображение исследуемой ДНК, полученное микроскопом, приведено на рис. 3.

После компьютерной обработки были построены спектры КР ДНК (рис. 4) в различных диапазонах значений частоты.

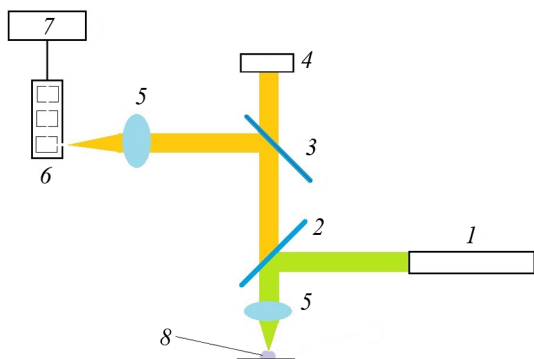


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для регистрации спектров КР:

1 — аргоновый лазер; 2 — прозрачное зеркало; 3 — полупрозрачное зеркало; 4 — микроскоп; 5 — собирающие линзы; 6 — тройной монохроматор Т64000; 7 — компьютер; 8 — исследуемое вещество

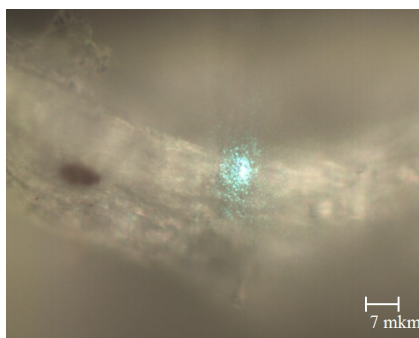


Рис. 3. Изображение ДНК, полученное микроскопом (пятно возникло от лазерного излучения, размер которого составлял 7 мкм)

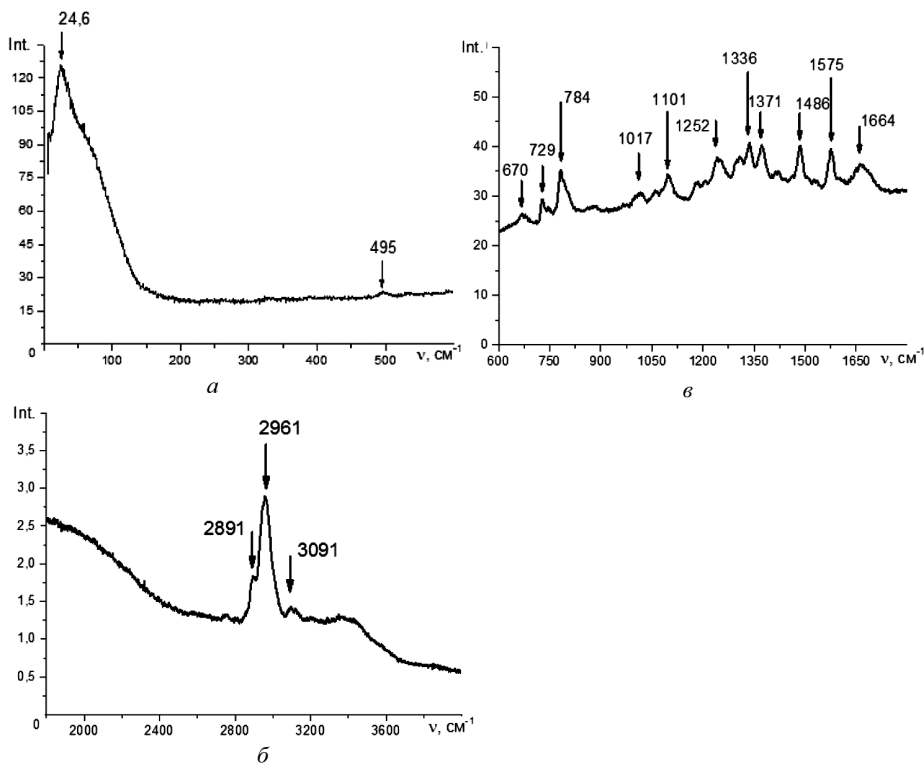


Рис. 4. Спектр КР ДНК в диапазонах значений частоты ν равно 6...600 (а), 600...1800 (б) и 1800...4000 (в) cm^{-1}

Сравнение значений частоты КР ДНК, полученных в литературе [2–4] и в настоящей работе, приведено в таблице.

Значения частоты КР ДНК, полученные в литературе [2–4] и в настоящей работе

Частота, cm^{-1}			Частота, cm^{-1}		
Из работ [2, 3]	Из работы [4]	Полученная в настоящей работе	Из работ [2, 3]	Из работы [4]	Полученная в настоящей работе
–	–	24,6	–	1333	1336
–	–	495	–	1371	1371
667	–	670	–	1417	–
729	728	729	1487	1484	1486
744	–	–	1508	–	–
783	–	784	1534	–	–
–	–	786	–	1575	1575
–	–	1017	–	–	1664
1063	–	–	–	–	2891
–	1101	1101	–	–	2961
1240	–	–	–	–	3091
–	1255	1252	–	–	–

Согласно приведенным данным (см. таблицу), в спектрах КР, определенных в этой работе, обнаружены дополнительные частоты, см^{-1} : 24,6; 495; 1017; 1664; 2891; 2961; 3091. Частота 670 см^{-1} соответствует тимину, частоты 729 и 1336 см^{-1} — аденину, частота 1101 см^{-1} — фосфодиэфирной связи; частота 1252 см^{-1} — цитозину и аденину; частота 1371 см^{-1} — гуанину, аденину и тимину; частоты 1486 и 1575 см^{-1} — гуанину и аденину.

Вывод. В настоящей работе зарегистрирован полный спектр КР (в диапазоне значений $6 \dots 4000 \text{ см}^{-1}$) высушенной ДНК теленка с высоким спектральным ($\approx 1 \text{ см}^{-1}$) и пространственным ($\approx 10 \text{ мкм}$) разрешением. Определены новые комбинационные спутники, соответствующие колебаниям нуклеотидов ДНК. Выполнено отнесение комбинационных частот к нуклеиновым основаниям. Полученные данные могут быть использованы для установления различных типов ДНК и анализа генетической информации, связанной с молекулярной структурой ДНК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 11-02-00164, 12-02-00491, 12-02-90422, 12-02-90021, 13-02-90420).

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA // *Developmental Biology*. 2005. P. 274–278.
2. Carey P.R. Biochemical applications of Raman and Resonance Raman spectroscopies. Academic Press, 1982. 272 p.
3. Erfurth S.C., Peticolas W.L. Melting and premelting phenomenon in DNA by laser Raman scattering. *Biopolymers*. 1975. Vol. 14. I. 2. P. 247–264.
4. Dong R., Yan X., Pang X., Liu Sh. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA // *Spectrochimica Acta*. P. A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2004. Vol. 60. I. 3. P. 557–561.
5. Perepelytsya S.M., Volkov S.N. Conformational vibrations of ionic lattice in DNA: Manifestation in the low-frequency Raman spectra // *J. of Molecular Liquids*. 2011. Vol. 164. I. 1–2. P. 113–119.
6. Perepelytsya S.M., Volkov S.N. Low-frequency vibrations of DNA with counterions in cross-stranded position // *Ukr. J. Phys.* 2010. Vol. 55. No. 11. P. 1182–1188.
7. Erfurth S.C., Bond P.J., Peticolas W.L. Characterization of the A in equilibrium B transition of DNA in fibers and gels by laser Raman spectroscopy // *Biopolymers*. 1975. 14 (6). P. 1245–1257.
8. Angeloni L., Smulevich G., Marzocchi M.P. Absorption, fluorescence and resonance Raman spectra of Adriamycin and its complex with DNA // *Spectrochimica Acta*. 1982. Vol. 38 A. No. 2. P. 213–217.
9. Neault J.F., Naoui M., Manfait M., Tajmir-Riahi H.A. Aspirin – DNA interaction studied by FTIR and laser Raman difference Spectroscopy // *FEBS Letters* 382. 1996. P. 26–30.
10. Blyzniuk Iu.N., Bolbukh T.V., Kruglova O.B., Semenov M.A., Maleev V.Ya. Investigation of complexation of ethidium bromide with DNA by the method of Raman spectroscopy. *Biopolymers and cell*. 2009. Vol. 25. No. 2. P. 126–132.
11. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York, Garland Science, 2002. 1392 p.

12. Butler J.M. Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers. London: Academic Press, 2001. 335 p.
13. Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. 1953. No. 171. P. 737–738.
14. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry. NY., 2012. 608 p.
15. Ghosh A., Bansal M. A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr. Sec. D*. 2003. Vol. 59. P. 620–626.
16. Mandelkern M., Elias J.G., Eden D., Crothers D.M. The dimensions of DNA in solution // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 152 (1). P. 153–161.

REFERENCES

- [1] R. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 2005, vol. 278, no. 2, pp. 274–278.
- [2] Carey P.R. Biochemical applications of Raman and Resonance Raman spectroscopies. Academic Press, 1982. 272 p.
- [3] Erfurth S.C., Peticolas W.L. Melting and premelting phenomenon in DNA by laser Raman scattering. *Biopolymers*, 1975, vol. 14, i. 2, pp. 247–264.
- [4] Dong R., Yan X., Pang X., Liu Sh. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. *Spectrochimica Acta. P. A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2004, vol. 60, i. 3, pp. 557–561.
- [5] Perepelytsya S.M., Volkov S.N. Conformational vibrations of ionic lattice in DNA: Manifestation in the low-frequency Raman spectra. *J. of Molecular Liquids*, 2011, vol. 164, i. 1–2, pp. 113–119.
- [6] Perepelytsya S.M., Volkov S.N. Low-frequency vibrations of DNA with counterions in cross-stranded position. *Ukr. J. Phys*, 2010, vol. 55, no. 11, pp. 1182–1188.
- [7] Erfurth S.C., Bond P.J., Peticolas W.L. Characterization of the A in equilibrium B transition of DNA in fibers and gels by laser Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 1975, no. 14 (6), pp. 1245–1257.
- [8] Angeloni L., Smulevich G., Marzocchi M.P. Absorption, fluorescence and resonance Raman spectra of Adriamycin and its complex with DNA. *Spectrochimica Acta*, 1982, vol. 38 A, no. 2, pp. 213–217.
- [9] Neault J.F., Naoui M., Manfait M., Tajmir-Riahi H.A. Aspirin – DNA interaction studied by FTIR and laser Raman difference Spectroscopy. *FEBS Letters* 382, 1996, pp. 26–30.
- [10] Blyzniuk Iu.N., Bolbukh T.V., Kruglova O.B., Semenov M.A., Maleev V.Ya. Investigation of complexation of ethidium bromide with DNA by the method of Raman spectroscopy. *Biopolymers and cell*, 2009, vol. 25, no. 2, pp. 126–132.
- [11] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York, Garland Science, 2002. 1392 p.
- [12] Butler J.M. Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers. London: Academic Press, 2001. 335 p.
- [13] Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, no. 171, pp. 737–738.
- [14] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry. NY., 2012. 608 p.
- [15] Ghosh A., Bansal M. A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr. Sec. D*, 2003, vol. 59, pp. 620–626.
- [16] Mandelkern M., Elias J.G., Eden D., Crothers D.M. The dimensions of DNA in Solution. *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 152 (1), pp. 153–161.

Статья поступила в редакцию 26.10.2013

Владимир Семенович Горелик — д-р физ.-мат. наук, профессор кафедры “Физика” МГТУ им. Н.Э. Баумана, заведующий лабораторией “Комбинационное рассеяние” Физического института им. П.Н. Лебедева РАН. Автор более 150 научных работ в области физики.

Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинский пр-т, д. 53.

V.S. Gorelik — Dr. Sci. (Phys.–Math.), professor of “Physics” department of the Bauman Moscow State Technical University, head of “Raman Scattering” laboratory of the Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences. Author of more than 150 publications in the field of physics.

Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr., 53, Moscow, 119991 Russian Federation.

Галина Ивановна Довбешко — д-р физ.-мат. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела физики биологических систем Института физики НАН Украины. Автор более 150 научных работ в области физики.

Институт физики НАН Украины, Украина, Киев, Институт физики НАН Украины, проспект Науки, д. 46.

G.I. Dovbeshko — Dr. Sci. (Phys.–Math.), professor, principal researcher of department of physics of biological systems of the Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine. Author of more than 150 publications in the field of physics.

Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, pr. Nauki 46, Kyiv, Ukraine.

Александр Сергеевич Крылов — канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник Института физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН.

Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН, Российская Федерация, 660036, Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 38.

A.S. Krylov — Cand. Sci. (Phys.–Math.), senior researcher of the Kirensky Institute of Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Kirensky Institute of Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademgorodok 50, stroenie 38, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation.

Александр Юрьевич Пятышев — студент кафедры “Физика” МГТУ им. Н.Э. Баумана. МГТУ им. Н.Э. Баумана, Российская Федерация, 105005, Москва, 2-я Бауманская, д. 5.

A.Yu. Pyatyshev — student of “Physics” department of the Bauman Moscow State Technical University.

Bauman Moscow State Technical University, Vtoraya Baumanskaya ul. 5, Moscow, 105005 Russian Federation.