Письма в ЖЭТФ, том 99, вып. 7, с. 437 – 442 © 2014 г. 10 апреля

Обнаружение спектров комбинационного рассеяния света высокого спектрального разрешения в коротких олигонуклеотидах

Ф. Б. Байрамов[+*1)], *Е. Д. Полоскин*[*], *А. Л. Чернев*[+], *В. В. Топоров*[*], *М. В. Дубина*[+], *Е. Лахдеранта*[×2)], *Х. Липсанен*[○2)], *Б. Х. Байрамов*[*]

[+] *С.-Петербургский академический университет – Научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, 194021 С.-Петербург, Россия*

[*] *Физико-технический институт им. Иоффе РАН, 194021 С.-Петербург, Россия*

[×] *Lappeenranta University of Technology, FI-53851 Lappeenranta, Finland*

[○] *Department of Micro- and Nanosciences, Micronova, Aalto University, FI-00076 Aalto, Finland*

Поступила в редакцию 26 декабря 2013 г.

После переработки 26 февраля 2014 г.

Высокочувствительным методом нерезонансного комбинационного рассеяния света в биомакромолекулах получены спектры высокого спектрального разрешения на примере одноцепочечных коротких олигонуклеотидов d(20G, 20T), где d – сокращение от дезоксирибонуклеозидов, G – гуанин, T – тимин. Помимо большой самостоятельной многофункциональной значимости, короткие олигонуклеотиды привлекают интерес в качестве идеальных модельных объектов для выявления малоизученных особенностей третичных и четвертичных структур ДНК. Обнаружение узких спектральных линий позволило определить характерный масштаб времен. Оно также дает возможности для изучения динамики быстропротекающих релаксационных процессов колебательных движений атомов в биомакромолекулах. Установлено, что для наиболее узкой спектральной линии при 1355.4 см$^{-1}$, приписанной колебаниям метильной группы dT, полная ширина на половине высоты равна 14.6 см$^{-1}$. Соответствующее время жизни оказалось равным 0.38 пс.

DOI: 10.7868/S0370274X14070030

Введение. Короткие олигонуклеотиды, получаемые химическим синтезом, являются фрагментами дезоксирибонуклеиновых (ДНК) или рибонуклеиновых (РНК) кислот. Они представляют собой линейные полимеры, состоящие из фрагментов нуклеотидов с заданной химической структурной последовательностью. Нуклеотиды, в свою очередь, являются комбинацией азотистого основания, рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Синтетические олигонуклеотиды находят многофункциональное применение во многих областях современной молекулярной биологии, генетической инженерии и медицине [1]. Например, они используются в качестве зондов для определения комплементарных последовательностей ДНК и РНК или праймеров для секвенирования и амплификации ДНК при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время метод ПЦР является одним из важнейших достижений молекулярной биофизики, позволяющим получать и многократно копировать большие фрагменты исследуемых последовательностей ДНК. При проведении ПЦР используются различные реакционные смеси. При этом одним из основных компонентов смеси являются синтетические олигонуклеотиды. Они служат затравкой – отправной точкой для начала синтеза новой цепи НК ферментом ДНК-полимеразой.

На основе коротких синтетических олигонуклеотидов также интенсивно развиваются новые направления биотехнологии, связанные с конструированием и созданием новейших лекарственных препаратов.

Поэтому правильные дизайн, синтез и методы оценки степени чистоты олигонуклеотидов на молекулярном уровне, определяющие эффективность амплификации и их последующие применения, имеют решающее значение.

Современный синтез коротких олигонуклеотидов с заранее заданными химическими составными элементами и с определенной последовательностью мононуклеотидов – высокотехнологичный, трудоемкий и дорогой процесс. Он осуществляется наиболее эко-

---

1)e-mail: bairamov@mail.ioffe.ru

2)E. Lahderanta; H. Lipsanen.

номичным путем с помощью интенсивно развиваемых методов программируемого автоматического параллельного синтеза на многоканальных синтезаторах. Олигонуклеотиды синтезируются в несколько этапов, как правило в одной емкости. При этом используются реагенты очень высокой степени чистоты, очистка которых осуществляется с использованием важнейших методов высокоэффективной жидкостной хроматографии либо электрофореза в полиакриламидном геле.

Несмотря на все эти достижения, постсинтетические обработки, такие, как удаление из состава олигонуклеотида различных защитных функциональных групп, непрореагированных реагентов и недостроенных продуктов, не способствуют получению особо чистых олигонуклеотидов. Проблема получения высокочистых олигонуклеотидов представляется очень важной как в научном, так и в технологическом плане. Поэтому наиболее значимыми являются исследования, направленные на фундаментальное понимание молекулярной структуры и механизмов взаимодействия между отдельными атомами, молекулами и функциональными группами самих олигонуклеотидов, а также изучение их зависимости от физико-химических свойств окружающей среды. Вследствие этого весьма актуальной задачей является развитие стратегии принципиально новых подходов в разработке эффективных методов надежного и достоверного исследования структуры олигонуклеотидов на молекулярном уровне.

Традиционно визуализация и выявление олигонуклеотидов осуществляются с использованием флуоресцентных красителей, которые встраиваются между отдельными мононуклеотидами. По сути, этот метод является одним из ключевых в научных исследованиях и медицинской практике. Одним из общих недостатков данного метода оказывается то, что увеличение флуоресценции в процессе ПЦР может быть связано с накоплением неспецифического продукта. Кроме того, атомы и молекулы красителей сами вступают в химические реакции с атомами и молекулами олигонуклеотидов. Поэтому для получения более точных сведений о молекулярной структуре необходимы новые методы исследований, не основанные на использовании олигомеров, содержащих такие метки.

Одним из наиболее эффективных аналитических методов исследования структуры материалов на молекулярном уровне является спектроскопия комбинационного рассеяния света. С момента обнаружения эффекта гигантского поверхностного усиления [2–4] комбинационного рассеяния (*Surface Enhansed Raman Scattering*, SERS), на 6–12 порядков величины в присутствии металлических наноструктур, на которых адсорбируются органические молекулы, интерес исследователей к данному явлению все более возрастает [5–21]. Помимо фундаментального научного значения, это связано с появлением возможности создания высокочувствительных аналитических методик, а также развития высокоселективных биосенсорных технологий с вовлечением в исследования все новых высокоэффективных наноструктурированных материалов разных металлов (см. [21] и ссылки в ней). Для большого отклика системы важно, чтобы сами агрегирующие металлические наночастицы образовывали дискретные кластеры. Для их формирования используются различные красители, адсорбированные на наночастицах. К такой модифицированной поверхности присоединяются молекулы ДНК. Несмотря на отсутствие установившегося единого мнения о механизмах подобного усиления, считается, что поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние света вызывается совместным действием двух механизмов усиления: электромагнитного [5–7] и химического [8, 10, 12]. Большинство исследователей полагает, что электромагнитный механизм является доминирующим механизмом усиления. Он обусловливается значительным усилением напряженности локального электрического поля падающей световой волны вблизи шероховатостей поверхности металлических частиц путем резонансного возбуждения локализованных плазменных колебаний. Параметры такого резонансного возбуждения, масштаб усиления и спектральные характеристики существенно зависят от морфологии поверхности, проводимости металла и свойств диэлектрического окружения [21]. Помимо этого, для хемиадсорбированных молекул, находящихся в непосредственном контакте с металлической поверхностью, может иметь место дополнительное усиление, обусловленное возникновением связи электронных орбиталей молекулы и состояний зоны проводимости металла. Масштаб такого усиления может достигать одного-двух порядков величины [8]. Отметим, однако, что при этом может образовываться комплекс адсорбированной молекулы и металлической наночастицы. В результате проявления двух таких эффектов возникающие внутренние гигантские электрические поля и комплексообразование молекул сильно зависят от целого ряда физико-химических свойств рассматриваемой системы и могут существенно влиять на спектральные параметры соответствующих линий рассеянного света. В итоге в целом аналитические возможности спектроскопии поверхностноусиленного комбинационного рассеяния света ограничиваются, если целью таких исследований является изучение неискаженной молекулярной структуры исходных олигонуклеотидов и ДНК. Для получения наиболее корректных результатов исследований молекулярной структуры и механизмов межмолекулярных взаимодействий необходимы дополнительные новые методы, основанные на использовании олигомеров, не содержащих также и металлические наноструктуры.

Таким образом, ключом к получению более корректных результатов исследований молекулярной структуры и механизмов межмолекулярных взаимодействий может послужить параллельное развитие высокочувствительных методов молекулярной спектроскопии непосредственно молекул ДНК без молекулярных зондов (металлических наноструктур и флуоресцентных меток). В данной работе на примере синтетических олигонуклеотидов d(20G, 20T) показано, что разработанная альтернативная высокочувствительная методика нерезонансной спектроскопии неупругого рассеяния света высокого спектрального и пространственного разрешений может быть эффективно использована для изучения молекулярной структуры биомакромолекул.

Наряду с приведенными обстоятельствами многофункциональной значимости олигонуклеотидов для фундаментальной и прикладной биофизики, очень важны и такие экспериментальные исследования молекулярной структуры коротких одноцепочечных олигонуклеотидов как идеальных модельных объектов. Подробные исследования указанных моделей требуются для выявления малоизученных особенностей третичных и четвертичных структур ДНК, когда двойная спираль ДНК образована двумя линейными молекулами, соединенными друг с другом по всей длине водородными связями. Обнаружение узких спектральных линий открывает новые возможности для изучения природы различного рода слабых взаимодействий и структурных флуктуаций в биомакромолекулах, обусловливающих широкий спектр их конформационных состояний.

Эксперимент. Измерения спектров комбинационного рассеяния света были выполнены для одноцепочечных олигонуклеотидов 20G (гуанин) и 20T (тимин) нуклеотидных оснований – d(20G, 20T), синтезированных твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе компании Applied Biosystems (США). Исследовались образцы, растворенные в ацетатном буфере и лиофилизованные при низких температуре и давлении. Возбуждение спектров осуществлялось излучением второй гармоники твердотельного лазера с длиной волны $\lambda_i = 532$ нм по методике, приведенной в [22–24]. Спектральный состав рассеянного света анализировался спектрометром LabRAM HR800, HORIBA Jobin Yvon SAS (Франция), оснащенным в качестве детектора охлаждаемой ПЗС (CCD) матрицей. Излучение мощностью 0.05 мВт фокусировалось на поверхность образца с помощью 100x микроскопного объектива (Olympus). Диаметр пятна лазерного излучения в фокусе составлял 900 нм. Эта величина задавала пространственное разрешение измерительной системы. Спектральное разрешение составляло 2 см$^{-1}$. Возбуждение спектров также осуществлялось и излучением He–Ne лазера с длиной волны $\lambda_i = 632.817$ нм. В этом случае использовался модифицированный и автоматизированный нами двойной дифракционный спектрометр ДФС-24 (ЛОМО). Его работа контролировалась персональным компьютером. Спектральное разрешение спектрометра 1 см$^{-1}$. Детектором служил охлаждаемый фотоумножитель Hamamatsu 943-02, работающий в режиме счета фотонов с темновыми отсчетами меньше одного фотона в секунду [22–24].

Результаты и обсуждение. Разработанная нами высокочувствительная методика спектроскопии неупругого рассеяния света высоких спектрального и пространственного разрешений позволяет получить высококачественные спектры бимакромолекул. Типичные спектры нерезонансного комбинационного рассеяния света для синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов d(20G, 20T), обнаруженные нами в диапазоне низких частот 300–1800 см$^{-1}$, приведены на рис. 1, а в диапазоне высоких частот 2300–3800 см$^{-1}$ – на рис. 2. Эти спектры были получены с использованием линии возбуждения 532 нм. Аналогичные спектры получаются и при использовании линии возбуждения 632.817 нм. Это подтверждает то, что все наблюдаемые спектральные особенности действительно обусловлены комбинационным рассеянием света.

В целом спектры комбинационного рассеяния света коротких олигонуклеотидов определяются их пространственной структурой, задаваемой большим числом входящих в нее атомов, совершающих колебания относительно положений равновесия. Соответственно в спектрах комбинационного рассеяния света таких макромолекул для множества колебательных возбуждений для всех функциональных групп неизбежно должны наблюдаться сильно перекрывающиеся спектральные вклады, генерируемые большим набором атомов и молекул. К тому же такие полосы должны испытывать влияние как парных вза-

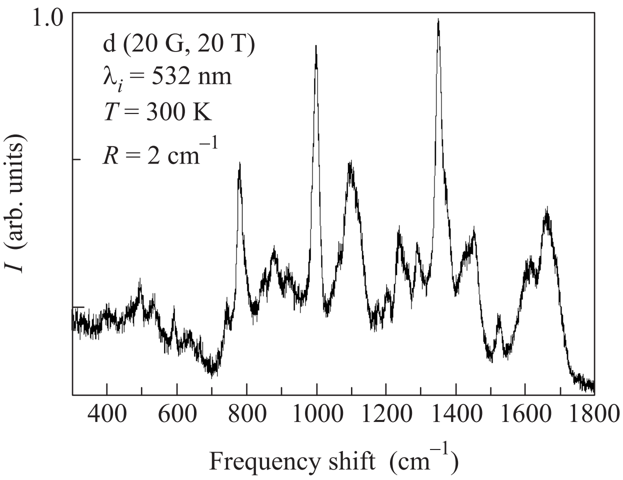

Рис. 1. Экспериментальный спектр комбинационного рассеяния света в синтетических олигонуклеотидах d(20G, 20T), полученный при комнатной температуре в диапазоне частот 300–1800 см$^{-1}$. Спектральное разрешение 2 см$^{-1}$

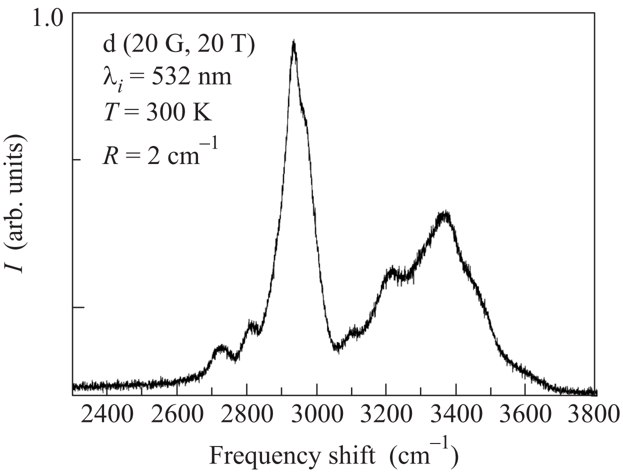

Рис. 2. Экспериментальный спектр комбинационного рассеяния света в синтетических олигонуклеотидах d(20G, 20T), полученный при комнатной температуре в диапазоне частот 2300–3800 см$^{-1}$. Спектральное разрешение 2 см$^{-1}$

имодействий, так и окружающей среды. Макромолекулы коротких олигонуклеотидов, как и макромолекулы белков, не имеют ни центров инверсии, ни зеркальной симметрии. Структурное упорядочение таких систем (в любом масштабе) является результатом низкой симметрии их элементарных ячеек, обладающих винтовой или хиральной асимметрией [25]. Казалось бы, для биомакромолекул трудно ожидать присутствия узких спектральных особенностей при комбинационном рассеянии света.

Вместе с тем одной из наиболее важных особенностей полученных нами специально не сглаженных спектров нерезонансного комбинационного рассеяния света является именно наличие множества спектральных линий. Это хорошо видно из спектров, приведенных на рис. 1 и 2, в которых наряду с довольно широкими полосами наблюдаются и не предвиденные достаточно узкие и интенсивные спектральные линии. Естественным критерием реальности наблюдаемых характерных спектральных особенностей является их строгая воспроизводимость в независимых сериях измерений. Эти линии отражают химическую индивидуальность отдельных молекул и их структурные свойства. При этом они определяются совокупностью и конфигурацией большого числа химических связей, а следовательно, и валентными взаимодействиями между входящими в состав молекулы атомами, определяющими стабильность и основные свойства как ее, так и всей макромолекулы d(20G, 20T) в целом.

Несмотря на высокую активность многоплановых экспериментальных исследований комбинационного рассеяния света в олигонуклеотидах и ДНК и достигнутые серьезные успехи (см., например, [9–21], [26–31]), в целом между спектрами, полученными при невысоком и высоком спектральных разрешениях, при всем их внешнем сходстве имеются и принципиальные различия. В сильно сглаженных (из-за небольшого отношения сигнал/шум) спектрах с перекрывающимися широкими полосами (в частности, и вследствие невысокого спектрального разрешения) узких спектральных линий, которые позволили бы выявить естественную ширину линии, выделено не было. Соответственно времена жизни колебательных состояний в биомакромолекулах не определялись.

Хорошо спектрально разрешенные линии на рис. 1 и 2 обусловлены вкладом отдельных атомов, участвующих в формировании химических связей. Обсуждавшиеся выше литературные данные были получены с невысоким спектральным разрешением. При этом наблюдались спектральные полосы существенно нелоренцевской формы, искаженные суперпозицией с другими спектральными линиями. Наши же прецезионные измерения контуров исследуемых спектральных линий позволяют выявить их лоренцевскую форму. Это дает качественно новые возможности для количественного исследования сложных молекулярных систем. Так, для наиболее узкой спектральной линии при 1355.4 см$^{-1}$, соответствующей колебаниям метильной группы dT [26], наблюдается существенное (в 2–3 раза) сужение ширины по сравнению со спектрами, полученными для водного раствора олигонуклеотидов [26–28]. Такое сужение до порядка естественной ширины позволило надежно выделить лоренцевскую форму этой узкой линии с полушириной (полной шириной на половине высоты) $\Gamma = 1/2\pi c\tau$, где c – скорость света, τ – время жизни возбуждения. Непосредственное измерение естественной полуширины дает возможность впервые определить временной масштаб элементарных колебательных возбуждений в биомакромолекулах. Для измеренного значения полуширины $\Gamma = 14.6\,\text{см}^{-1}$ соответствующее характерное время жизни для колебаний метильной группы dT при комнатной температуре оказалось равным 0.38 пс.

Таким образом, обнаружение узких спектральных линий делает возможным экспериментальное изучение внутренних динамических свойств быстропротекающих релаксационных процессов колебательных движений атомов в биомакромолекулах. Измеренная величина естественной полуширины линий и/или времени жизни колебательных состояний может также служить надежной мерой специфичности и степени совершенства молекулярной структуры биомакромолекул. Другая узкая полоса, при $1000\,\text{см}^{-1}$, характерна для фосфатных групп PO_2-сахарофосфатного остова спиральной структуры ДНК. Ее обнаружение прямо указывает на формирование устойчивой и стабильной пространственной молекулярной структуры синтезированных коротких одноцепочечных олигонуклеотидов длиной в 40 нуклеотидов последовательности d(20G, 20T), состоящей из 4 витков спирали, а также на сохранение этой структуры в лиофилизованном твердом состоянии. В целом выводы об устойчивости, стабильности и высоком совершенстве молекулярной структуры синтезированных одноцепочечных олигонуклеотидов d(20G, 20T) подтверждаются многими спектральными особенностями и наличием наиболее характерных максимумов, наблюдаемых во всем диапазоне частот на спектрах, приведенных на рис. 1 и 2. Помимо этого, полученные результаты прямо указывают на то, что механизм подавления различных молекулярных взаимодействий в водном растворе олигонуклеотидов намного более эффективен, чем ангармонические взаимодействия элементарных колебаний их решетки.

Заключение. Полученные нами для олигонуклеотидов d(20G, 20T) экспериментальные результаты демонстрируют, что достигнутые высокие спектральное разрешение и чувствительность регистрации спектров оказались достаточными для обнаружения узких спектральных линий. Это дает возможность выделения спектральных составляющих, соответствующих колебаниям отдельных молекул, в сложных спектрах коротких олигонуклеотидов с достаточно большим числом атомов в элементарной ячейке. Выделение лоренцевской формы таких узких линий позволяет получить информацию о динамических свойствах, а именно впервые определить временной масштаб элементарных колебательных возбуждений в биомакромолекулах. Показано, что полная ширина на половине высоты наиболее узкой спектральной линии при $1355.4\,\text{см}^{-1}$, приписываемой колебаниям метильной группы dT, равна $14.6\,\text{см}^{-1}$. Соответствующее время жизни составляет 0.38 пс. Помимо этого, обнаруженная узкая полоса при $1000\,\text{см}^{-1}$, характерная для фосфатных групп PO_2^- сахарофосфатного остова спиральной структуры ДНК, указывает на формирование устойчивой и стабильной молекулярной структуры синтезированных коротких олигонуклеотидов d(20G, 20T), состоящей всего из 4 витков одноцепочечной спирали, и на сохранение этой структуры в твердом состоянии. Таким образом, высокочувствительная методика нерезонансного комбинационного рассеяния света высокого спектрального разрешения может успешно применяться для исследования молекулярной структуры коротких синтетических олигонуклеотидов и ДНК. Разработанный подход указывает на потенциал и перспективы использования обнаруженных узких линий в качестве спектральных маркеров и открывает новые возможности для изучения природы различного рода внутри- и межмолекулярных слабых взаимодействий, а также динамики молекулярных изменений и структурных флуктуаций в биомакромолекулах, включая влияние на эти процессы всевозможных внешних условий. По существу, такие взаимодействия и флуктуации обусловливают широкий спектр конформационных состояний биомакромолекул, оказывающих большое влияние на различные биохимические процессы и в живых системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН # 24, С.-Петербургского научного центра РАН по комплексным междисциплинарным проектам, гранта Президента РФ # НШ-3008.2012.2, проекта Академии Финляндии по программируемым материалам # 263 566 и проекта Финского агентства по поддержке технологий и инноваций (Tekes) по функциональным материалам "Granbis".

1. H. Marnix, M. H. Medema, R. Raaphorst, E. Takano, and R. Breitling, Nat. Rev. Microbiol. **10**, 191 (2012).

2. M. Fleischmann, P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, Chem. Phys. Lett. **26**, 163 (1974).
3. D.L. Jeanmaire and R.P. Van Duyne, J. Electroanal. Chem. **84**, 1 (1977).
4. M.G. Albrecht and J.A. Creighton, J. Am. Chem. Soc. **99**, 5215 (1977).
5. S.L. McCall, P.M. Platzman, and P.A. Wolff, Phys, Lett. A. **77**, 381 (1980).
6. D.S. Wang, M. Kerker, and H.W. Chew, Appl. Opt. **19**, 2315 (1980).
7. J.I. Gersten and A. Nitzan, J. Chem. Phys. **75**, 1139 (1981).
8. A. Otto, in *Light Scattering in Solids IV. Electronic Scattering, Spin Effects, SERS and Morphic Effects*, ed. by M. Cardona and G. Guntherodt, Springer-Verlag, Berlin, Germany (1984).
9. K. Kneipp and D. Fassler, Chem. Phys. Lett. **106**, 498 (1984).
10. M. Moskovits, Rev. Mod. Phys. **57**, 783 (1985).
11. И.Р. Набиев, Р.Г. Ефремов, Г.Д. Чуманов, УФН **154**, 459 (1988).
12. A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann, J. Phys.: Cond. Matter. **4**, 1143 (1992).
13. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, and M.S. Feld, Phys. Rev. Lett. **78**, 1667 (1997).
14. S. Nie and S.R. Emory, Science **275**, 1102 (1997).
15. A. Campion and P. Kambhampati, Chem. Rev. **27**, 241 (1998).
16. Y.C. Cao, R. Jin, and C.A. Mirkin, Science **297**, 1536 (2002).
17. V.P. Drachev, M.D. Thoreson, E.N. Khaliullin, V.J. Davisson, and V.M. Shalaev, J. Phys. Chem. **108**, 18046 (2004).
18. T. Vo-Dinh, F. Yan, and M.B. Wabuyele, J. Raman Spectrosc. **36**, 640 (2005).
19. X. Qian, X. Peng, D.O. Ansari, Q. Yin-Goen, G.Z. Chen, D.M. Shin, L. Yang, A.N. Young, M.D. Wang, and S. Nie, Nat. Biotechnol. **26**, 83 (2008).
20. L. Sun and J. Irudayar, Biophys. J. **96**, 4709 (2009).
21. В.И. Кукушкин, А.Б. Ваньков, И.В. Кукушкин, Письма в ЖЭТФ **98**, 72 (2013).
22. Б.Х. Байрамов, В.В. Топоров, Ф.Х. Байрамов, G. Irmer, M. Dutta, and M.A. Stroscio, *Комбинационное рассеяние – 80 лет исследований*, ФИАН, М. (2008), 326 с.
23. F.H. Bayramov, G. Irmer, V.V. Toporov, and B.H. Bairamov, Jap. J. Apl. Phys. **50**, 05FE06 (2011).
24. Ф.Б. Байрамов, В.В. Топоров, Е.Д. Полоскин, Б.Х. Байрамов, C. Roder, C. Sprung, G. Bohmhammel, K. Seidel, G. Irmer, A. Lashkul, E. Lahderanta, and Y.W. Song, ФТТ **47**, 607 (2013).
25. Yu.E. Kitaev, A.G. Panfilov, V.P. Smirnov, and P. Tronc, Phys. Rev. E **67**, 011907-1-8 (2003).
26. D. Serban, J.M. Benevides, and G.J. Thomas, Jr., Biochemistry **42**, 7390 (2003).
27. K. Wojtuszewski and I. Mukerji, Protein Sci. **13**, 2416 (2004).
28. S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson, and J. Murran, Molecules. J. **13**, 2608 (2008).
29. A. Ruiz-Chica, M. Medina, F. Sanchez-Jimeanez, and F.J. Ramirez, Nucleic Acids Res. **32**, 579 (2004).
30. S. Ponkumar, P. Duraisamy, and N. Iyandurai, Am. J. Biochem. Biotech. **7**, 135 (2011).
31. G.J. Lee, Y.W. Kwon, Y.H. Kim, Y. Yong, Y.H. Kwon, and E.H. Choi, Appl. Phys. Lett. **102**, 021911 (2013).