

## **СВЕТОИНДУЦИРОВАННАЯ ДИФФУЗИЯ ДНК В РАСТВОРАХ ПРИ ЛАЗЕРНОМ ФОТОРАЗРЕЗАНИИ**

*А.Л.Козионов, С.Ю.Новожилов, В.Е.Солобеев,  
М.И.Штокман*

Теоретически предсказан и экспериментально обнаружен новый нелинейно-оптический эффект в растворах: молекулы ДНК выталкиваются из лазерного фокуса по диффузионному механизму.

В работах [1, 2] было предсказано и обнаружено новое явление – нелинейное лазерное разрезание (НЛР) ДНК. При облучении растворов ДНК, окрашенной специфическим красителем, сфокусированным лазерным светом с высокой эффективностью происходит расщепление длинных линейных молекул ДНК на более короткие отрезки. Это явление объясняется переносом двухквантового возбуждения красителя на ДНК. В нас-

тоящем сообщении обсуждается влияние НЛР на пространственное распределение плотности ДНК.

Пусть в условиях, когда НЛР имеет место [1, 2], облучена некоторая область в растворе ДНК. Если НЛР происходит непосредственно при облучении<sup>1)</sup>, то в облученном объеме появляются разрезанные молекулы, которые имеют большие значения коэффициента диффузии  $D$ , чем у исходных молекул, и диффундируют из этого объема быстрее, чем туда проникают целые молекулы из соседних областей. Поэтому формируется провал (оптической) плотности<sup>2)</sup> ДНК в облученном объеме и ее повышение в соседних областях. Описанный эффект подобен диффузионному перераспределению плотности атомов в газах [3] и был назван нами светоиндуцированной диффузией ДНК (СИД/ДНК).

Рассмотрим случай, когда время облучения  $\tau_{ir}$  значительно меньше диффузионного времени  $\tau_D = a^2/4D$ , где  $a$  — характерная длина облучаемой области. Тогда сразу после облучения оптическая плотность  $\rho$  еще постоянна, а ее изменение  $\Delta\rho$  формируется за время  $t \sim \tau_D$ ; при  $t \gg \tau_D$ :  $|\Delta\rho| \sim (\tau_D/t)^{1/2}$ . В процессе НЛР образуются молекулы с разными длинами, т.е. в каждой точке  $\mathbf{r}$  формируется распределение  $P(\mathbf{r}, D)$  плотности ДНК по значениям  $D$ . Решение диффузионной задачи имеет вид

$$\Delta\rho(\mathbf{r}, t) = \int d^3r' dD G_D(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t) [P(\mathbf{r}', D) - \bar{P}(\mathbf{r}') \delta(D - D_0)]; \quad (1)$$

$$G_D(\mathbf{r}, t) \equiv (4\pi Dt)^{-3/2} \exp(-r^2/4Dt), \quad \bar{P}(\mathbf{r}) \equiv \int dD P(\mathbf{r}, D),$$

где  $D_0$  — значение  $D$  для исходных молекул ДНК. Определим  $P(\mathbf{r}, D)$  при слабом облучении, когда возникновение двух разрывов в одной молекуле маловероятно. Принимая реалистические предположения о том, что в условиях [2] НЛР разрывы возникают в случайном месте вдоль цепи молекулы и что величина  $D^{-1}$  приблизительно пропорциональна длине молекулы, получим  $P(\mathbf{r}, D) = 2D_0^2 D^{-3} \theta(D - D_0) \bar{P}(\mathbf{r})$ . Рассмотрим одномерную задачу, когда облучаемая область имеет вид пластины с шириной  $2a$  вдоль оси  $x$ . Параметризуя  $\bar{P}(\mathbf{r}) = \rho P_S \exp(-x^2/a^2)$ , где  $P_S = \text{const}$  — доля разрезанных молекул в центре, из (1) получим:

$$\Delta\rho(\mathbf{r}, t) = \rho P_S \int_0^1 [2 \int f(k) k dk - f(1)];$$

$$f(k) \equiv (1 + t/\tau_k)^{-1/2} \exp[-(x/a)^2 (1 + t/\tau_k)^{-1}], \quad (2)$$

где  $\tau_k \equiv a^2/4kD$ . Эта зависимость проиллюстрирована на рис.1.

<sup>1)</sup> Альтернативной возможностью, которую до настоящего времени нельзя было исключить, является образование в молекулах ДНК неустойчивых связей, рвущихся спустя некоторое время или под воздействием внешних условий. Такое воздействие, например, мог оказывать гель-электрофорез, использованный в [2] для обнаружения разрывов.

<sup>2)</sup> Поскольку при НЛР оптическая плотность ДНК меняется (увеличивается) не более, чем на несколько процентов [2], то можно с хорошей точностью считать ее пропорциональной массовой плотности ДНК.

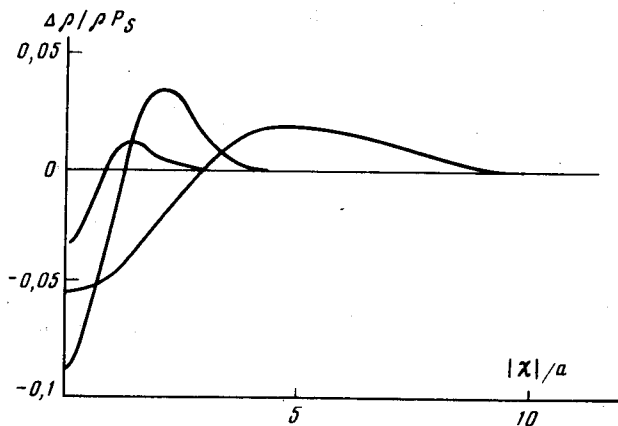


Рис.1. Теоретические пространственные зависимости оптической плотности. Кривые 1, 2, 3 соответствуют временам  $t/\tau_1 = 0, 1, 1, 3$  (максимальный эффект); 10

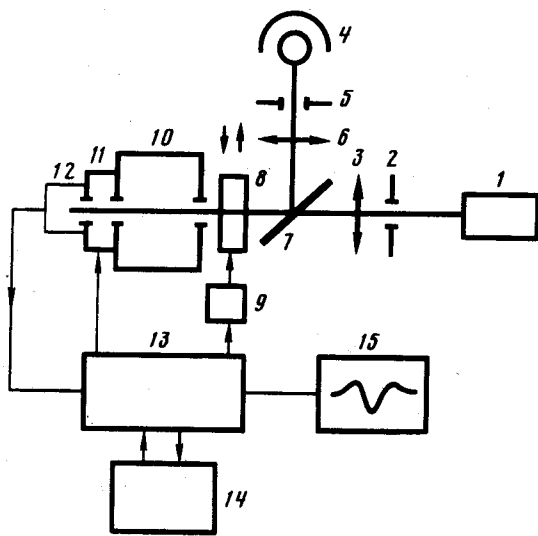


Рис.2. Схема экспериментальной установки (вид сверху): 1 – азотный лазер ЛГИ-21; 2, 5 – диафрагмы, 3 – линза и перископическое устройство, перемещающее лазерный фокус в вертикальной плоскости; 4 – ртутная лампа ПРК-2; 6 – кварцевая линза; 7 – зеркало (показано измерение; на стадии облучения зеркало убирается); 8 – кювета; 9 – устройство ее позиционирования (направление движения кюветы при измерении указано стрелка -

ми); 10 – монохроматор SPM-2 (Карл Цейсс, Иена); 11 – устройство управления затвором, переключающим фоторегистратор с измерительного луча на опорный; 12 – ФЭУ-39; 13 – стойка КАМАК; 14 – ЭВМ М-400; 15 – графопостроитель

Нами был проведен эксперимент по обнаружению СИД/ДНК; схема установки дана на рис.2. Эксперимент состоял из двух стадий. Сначала проводилось НЛР: раствор окрашенной ДНК в кварцевой кювете толщиной (вдоль луча) 0,1 см облучался сфокусированным светом азотного лазера. Тип ДНК, краситель, их концентрации и параметры света были такими же, как и в [2]. Фокальное пятно перемещалось параллельно плоскости кюветы, засвечивая площадку с шириной  $2a = 60$  мкм и высотой 0,6 см, так что условия одномерности выполнялись. При параметрах НЛР [2] и  $\tau_{ir} \leq 5$  мин можно оценить  $P_S \lesssim 0,5$ ; таким образом вероятность двух разрывов на молекулу не велика. Для данной ДНК  $\tau_1 = a^2/4D_0 \approx 10$  мин  $> \tau_{ir}$ . Следовательно, условия применимости (2) качественно выполнялись. По истечении времени  $\tau_{ir}$  лазер выключался и включалась система регистрации (рис.2). Кювета просвечивалась сколлимированным светом ртутной лампы. Непосредственно за задней плоскостью кюветы находи-

лась входная щель (раскрытие 7 мкм) монохроматора, настроенного на максимум поглощения ДНК ( $\lambda = 254$  нм). Эта щель была параллельна направлению движения луча при НЛР. Часть света пропусклась через эту же щель мимо кюветы и образовывала опорный пучок. Пространственная зависимость оптической плотности ДНК снималась путем сдвига кюветы перпендикулярно щели монохроматора при помощи прецизионной механической системы с разрешением не хуже 4 мкм. Управление экспериментом, обработка и отображение результатов измерения производились автоматически в реальном времени ЭВМ М-400 через электронную систему стандарта КАМАК.

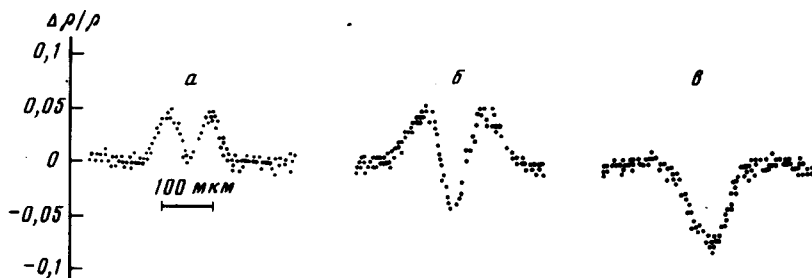


Рис.3. Экспериментальные пространственные зависимости оптической плотности ДНК. Время облучения — 5 мин. Кривые *a*, *b*, *c* соответствуют временам 0; 13; 55 мин после конца облучения. Кривые расположены последовательно для удобства чтения. Точки снимались с интервалом в 4 мкм

Результаты измерения представлены на рис.3. Их основные качественные особенности: наличие провала  $\Delta\rho$  в центре и пиков по краям; рост  $\Delta\rho$  при  $t \lesssim \tau_1$  и медленное убывание при  $t \gg \tau_1$ ; расплывание провала и более быстрое расплывание пиков  $\Delta\rho$  находятся в согласии с теорией (рис.1), также как и величины  $\tau_1$  и  $P_S$ , вычисленные по данным рис.3. Различием с теорией является повышение  $\Delta\rho/\rho$  в облученном объеме на величину  $\approx 0,02$  (рис. 3, *a*). Это увеличение находится в согласии с наблюдавшимся при НЛР [2] гиперхромизмом ДНК и может быть легко учтено.

Оценки показывают, что вклад стрикционных сил, а также термодиффузии в наших условиях ничтожно мал. Чтобы исключить эти и другие неспецифические эффекты, мы провели фоновый эксперимент с заменой использованного при НЛР красителя 8-метокси-6,7-фурукумарина на близкий по строению и спектрам краситель 7-гидрокси-4-метилкумарин, который однако, судя по дифференциальной спектрофотометрии, комплексов с ДНК не образует. Эффект при этом отсутствовал.

Совокупность приведенных экспериментальных данных показывает, что обнаруженный эффект СИД/ДНК возникает по теоретически предсказанному механизму. Этот эффект может быть использован для исследования взаимодействия мощного излучения с ДНК.

Авторы благодарны Ю.Е.Нестерихину и С.Г.Раутиану за полезные обсуждения и поддержку, А.М.Шалагину за ценные замечания.

Институт автоматике  
и электрометрии  
Академии наук СССР

Поступила в редакцию  
15 апреля 1980 г.

### Литература

- [1] M.I. Stockmann. Phys. Lett., A 1980 – to be published.
  - [2] А.И.Пархоменко, С.Г.Раутиан, М.И.Штокман. ДАН, 250, 225, 1980.
  - [3] Ф.Х.Гельмуханов, А.М.Шалагин. ЖЭТФ, 77, 461, 1979.
-