

14,09

## Комбинационное рассеяние света высокого спектрального разрешения в олигонуклеотидах

© Ф.Б. Байрамов<sup>1,2</sup>, Е.Д. Полоскин<sup>2</sup>, А.Л. Чернев<sup>1</sup>, В.В. Топоров<sup>2</sup>, М.В. Дубина<sup>1</sup>,  
А. Lashkul<sup>3</sup>, Е. Lahderanta<sup>3</sup>, Н. Lipsanen<sup>4</sup>, Б.Х. Байрамов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский академический университет — Научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Lappeenranta University of Technology, Lappeenranta, Finland

<sup>4</sup> Department of Micro- and Nanosciences, Micronova, Aalto University, Aalto, Finland

E-mail: bairamov@mail.ioffe.ru

(Поступила в Редакцию 17 декабря 2013 г.)

Обнаружены спектры высокого спектрального разрешения высокочувствительным методом нерезонансного комбинационного рассеяния света в одноцепочечных коротких олигонуклеотидах на примере системы  $d(20G, 20T)$ , где  $G$  — гуанин,  $T$  — тимин. Исследуемые образцы получены химическим синтезом с использованием твердофазного амидофосфитного метода на автоматическом синтезаторе. Показано, что наблюдаемые спектры в диапазоне частот  $500\text{--}1500\text{ см}^{-1}$  могут быть достаточными для выделения спектральных составляющих, соответствующих колебаниям отдельных молекул олигонуклеотидов, содержащих большое число атомов в элементарной ячейке.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 „Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов“, программы Санкт-Петербургского научного центра РАН по комплексным междисциплинарным проектам и частично 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. Введение

Короткие олигонуклеотиды, получаемые химическим синтезом, являются фрагментами дезоксирибонуклеиновых (ДНК) или рибонуклеиновых (РНК) кислот. Это 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. Они находят самое широкое многофункциональное применение во многих областях современной молекулярной биологии, генетической инженерии и медицине [1], например 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 биологии, позволяющим многократно копировать и получать 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.

Поэтому правильный дизайн, синтез и степень чистоты олигонуклеотидных молекул, определяющих эффективность амплификации и их последующее применение, имеют решающее значение. Синтез коротких олигонуклеотидов с определенной последовательностью мононуклеотидов — высокотехнологичный процесс. Он осуществляется наиболее экономичным путем с помощью интенсивно развиваемых методов 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, различные постсинтетические обработки, такие как удаление из состава олигонуклеотидов различных защитных функциональных групп, непрореагировавших реагентов и недостроенных продуктов, не способствуют получению особо чистых олигонуклеотидов. Проблема получения высокочистых олигонуклеотидов представляется очень важной как для научных, так и для технологических целей. Поэтому очень значимыми являются исследования, направленные на фундаментальное понимание молекуляр-

ной структуры и механизмов взаимодействия между отдельными атомами, молекулами и функциональными группами олигонуклеотидов, а также изучение их зависимости от физико-химических свойств окружающей среды. Вследствие этого весьма актуальной задачей является необходимость развития принципиально новых подходов к разработке эффективных методов исследования структуры олигонуклеотидов на молекулярном уровне.

Традиционно визуализация и выявление олигонуклеотидов осуществляются с использованием флуоресцентных красителей, которые встраиваются между отдельными мононуклеотидами. Одним из общих недостатков такого метода является то, что увеличение флуоресценции в процессе ПЦР может быть связано с накоплением не специфического продукта. Помимо всего прочего атомы и молекулы красителей сами вступают в химические реакции с атомами и молекулами олигонуклеотидов. Поэтому для получения наиболее корректных данных о молекулярной структуре и механизмах межмолекулярных взаимодействий необходимы новые методы, 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. После обнаружения эффекта гигантского поверхностного усиления [2–4] комбинационного рассеяния — в англоязычной литературе Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) — на 6–12 порядков величины в присутствии металлических наноструктур, на которых адсорбируются органические молекулы, интерес исследователей к этому важному явлению все более возрастает [5–21].

Такое внимание к SERS помимо фундаментального научного интереса 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. работу [21] и ссылки в ней). Для получения большого отклика системы важно, чтобы сами агрегирующие металлические наночастицы образовывали дискретные кластеры. Для их формирования используются различные красители, адсорбированные на наночастицах, и к такой модифицированной поверхности присоединяются молекулы ДНК. Несмотря на отсутствие установившегося единого мнения о механизмах такого усиления, считается, что поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние света вызывается совместным действием двух механизмов усиления: электромагнитного [5–7] и химического [8,10,12]. Большинство исследователей считает, что электромагнитный механизм является доминирующим механизмом усиления. Он обуславливается усилением напряженности локального электрического поля падающей световой волны вблизи шероховатостей

поверхности металлических частиц путем резонансного возбуждения локализованных плазменных колебаний. При этом 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. Хотя масштаб такого усиления может достигать одного-двух порядков величины [8], важно отметить, что при этом может образовываться комплекс адсорбированной молекулы и металлической наночастицы.

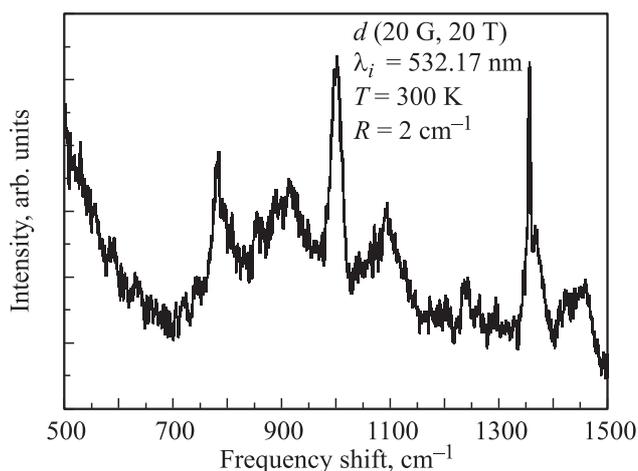
В результате действия двух указанных эффектов возникающие внутренние гигантские электрические поля и комплексообразование молекул сильно зависят от ряда физико-химических свойств рассматриваемой системы и могут существенно влиять на спектральные параметры соответствующих линий рассеянного света.

Ключом к более корректным исследованиям может быть развитие высокочувствительных методов молекулярной спектроскопии в отсутствие металлических наноструктур и флуоресцентных меток. Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что разработанная альтернативная высокочувствительная методика нерезонансной спектроскопии неупругого рассеяния света высокого спектрального разрешения может быть использована для изучения молекулярной структуры и выяснения химической природы межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий в синтетических олигонуклеотидах.

## 2. Эксперимент

Исследования комбинационного рассеяния света выполнены для одноцепочных олигонуклеотидов 20G (гуанин) и 20T (тимин) нуклеотидных оснований —  $d(20G, 20T)$ , синтезированных твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе компании Applied Biosystems.

Возбуждение спектров комбинационного рассеяния света осуществлялось излучением второй гармоники лазера на алюмоиттриевом гранате с длиной волны  $\lambda_i = 532 \text{ nm}$  по методике, описанной в [22–24]. Спектральный состав рассеянного света регистрировался с помощью спектрометра LabRAM HR800 (France), оснащенного охлаждаемой ПЗС (CCD)-матрицей в качестве детектора. Излучение мощностью 0.05 mW фокусировалось на поверхность образца с использованием 100× микроскопного объектива (Olympus). Диаметр пятна лазерного излучения в фокусе составлял  $0.9 \mu\text{m}$ . Эта величина задавала пространственное разрешение измерительной системы, которое составляло  $2 \text{ cm}^{-1}$ .



Экспериментальный спектр комбинационного рассеяния света, полученный при комнатной температуре в синтетических олигонуклеотидах  $d(20G, 20T)$ , в диапазоне частот 500–1500  $\text{cm}^{-1}$ . Спектральное разрешение 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. Результаты и обсуждение

Типичный спектр нерезонансного комбинационного рассеяния света в синтетических олигонуклеотидах  $d(20G, 20T)$ , обнаруженный нами в диапазоне частот 100–1200  $\text{cm}^{-1}$ , приведен на рисунке.

Наиболее важной особенностью полученного спектра является обнаружение наряду с довольно интенсивными широкими полосами узких спектральных линий. Так, полуширина (полная ширина линии на половине высоты) линии при 1335.6  $\text{cm}^{-1}$  равна 3.6  $\text{cm}^{-1}$ .

В целом, спектр комбинационного рассеяния света олигонуклеотидов  $d(20G, 20T)$  определяется их пространственной структурой, задаваемой большим числом входящих в нее атомов, совершающих колебания относительно положений равновесия. В спектрах комбинационного рассеяния света таких макромолекул наблюдаются сильно перекрывающиеся спектральные вклады, генерируемые большим набором атомов для всех функциональных групп как самой структуры макромолекулы, так и испытывающих влияние парных взаимодействий и окружающей среды. Макромолекулы коротких олигонуклеотидов, как и макромолекулы белков, не содержат 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 [25,26].

### 4. Заключение

Полученные на примере олигонуклеотидов  $d(20G, 20T)$  экспериментальные результаты показывают, что достигнутые высокое спектральное разрешение и чувствительность регистрации оказались достаточными для выделения спектральных составляющих, соответствующим

этим колебаниям отдельных молекул, в сложных спектрах коротких олигонуклеотидов с большим числом атомов в элементарной ячейке.

Таким образом, высокочувствительная методика нерезонансного комбинационного рассеяния света высокого спектрального разрешения может быть успешно использована для исследования молекулярной структуры коротких синтетических олигонуклеотидов.

### Список литературы

- [1] H. Marnix, M.H. Medema, R. Raaphorst, E. Takano, R. Breitling. *Nature Rev. Microbiol.* **10**, 191 (2012).
- [2] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163 (1974).
- [3] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne. *J. Electroanal. Chem.* **84**, 1 (1977).
- [4] M.G. Albrecht, J.A. Creighton. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215 (1977).
- [5] S.L. McCall, P.M. Platzman, P.A. Wolff. *Phys. Lett. A.* **77**, 381 (1980).
- [6] D.S. Wang, M. Kerker, H.W. Chew. *Appl. Opt.* **19**, 2315 (1980).
- [7] J.I. Gersten, 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* / Eds M. Cardona, G. Guntherodt. Springer-Verlag, Berlin (1984). P. 289.
- [9] K. Kneipp, D. Fessler. *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, W. Akemann. *J. Phys.: Cond. Matter* **4**, 1143 (1992).
- [13] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667 (1997).
- [14] S. Nie, S.R. Emory. *Science* **275**, 1102 (1997).
- [15] A. Campion, P. Kambhampati. *Chem. Rev.* **27**, 241 (1998).
- [16] Y.C. Cao, R. Jin, C.A. Mirkin. *Science* **297**, 1536 (2002).
- [17] V.P. Drachev, M.D. Thoreson, E.N. Khaliullin, V.J. Davison, V.M. Shalaev. *J. Phys. Chem.* **108**, 18 046 (2004).
- [18] T. Vo-Dinh, F. Yan, M.B. Wabuyele. *J. Raman Spectroscopy* **36**, 640 (2005).
- [19] X. Qian, X. Peng, D.O. Ansari, Q. Yin-Goen, G.Z. Chen, M.D. Shin, L. Yang, A.N. Young, M.D. Wang, S. Nie. *Nature Biotechnol.* **26**, 83 (2008).
- [20] L. Sun, 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, M.A. Stroschio. В кн: *Комбинационное рассеяние — 80 лет исследований*. ФИАН им. П.Н. Лебедева, М. (2008) С. 326.
- [23] F.H. Bayramov, G. Irmer, V.V. Toporov, V.H. Bairamov. *Jap. J. Appl. Phys.* **50**, 05FE06 (2011).
- [24] Ф.Б. Байрамов, В.В. Топоров, Е.Д. Полоскин, Б.Х. Байрамов, C. Röder, C. Sprung, G. Bohmhammel, K. Seidel, G. Irmer, A. Lashkul, E. Lahderanta, Y.W. Song. *ФТП* **47**, 608 (2013).
- [25] Yu.E. Kitaev, A.G. Panfilov, V.P. Smirnov, P. Tronc. *Phys. Rev. E.* **67**, 011 907 (2003).
- [26] G. Rosenman, P. Beker, I. Koren, M. Yevnin, B. Bank-Srouer, E. Mishinab, S. Semin. *J. Peptide. Sci.* **17**, 75 (2011).