

09;14

Рамановское рассеяние света высокого спектрального разрешения в олигонуклеотидах

© Ф.Б. Байрамов, Е.Д. Полоскин, А.Л. Чернев,
В.В. Топоров, М.В. Дубина, Е. Lahderanta,
A. Lashkul, H. Lipsanen, Б.Х. Байрамов

Санкт-Петербургский Академический университет —
Научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, Россия
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург,
Россия

Lappeenranta University of Technology, Lappeenranta, FI-53851, Finland
Department of Micro- and Nanosciences, Micronova, Aalto University,
FI-00076, Aalto, Finland
E-mail: bairamov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 25 декабря 2013 г.

Обнаружены спектры высокого спектрального разрешения высокочувствительным методом нерезонансного рамановского рассеяния света в одноцепочных коротких олигонуклеотидах, полученных химическим синтезом с использованием твердофазного амидофосфитного метода на автоматическом синтезаторе.

Олигонуклеотиды, получаемые химическим синтезом, являются короткими 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 широкое применение во многих областях современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Например, в качестве зондов для определения комплементарных последовательностей ДНК и РНК или праймеров для секвенирования и амплификации ДНК при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ясно, что правильный дизайн, синтез и степень чистоты олигонуклеотидных молекул, опре-

деляющих эффективность амплификации, имеют решающее значение. Синтез олигонуклеотидов с определенной последовательностью мононуклеотидов — это 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 различные 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 его состава различных защитных функциональных групп и недостроенных продуктов, не способствуют получению особочистых олигонуклеотидов.

Получение высокочистых олигонуклеотидов представляется очень важным как в научных, так и в технологических целях. Чрезвычайно важными представляются исследования, направленные на изучение фундаментального понимания механизмов взаимодействия между отдельными атомами, молекулами и функциональными группами самих олигонуклеотидов, а также их зависимости от физико-химических свойств окружающей среды. Актуальной проблемой является необходимость развития и разработки новых эффективных методов исследования структуры олигонуклеотидов на молекулярном уровне.

Традиционно визуализация и выявление олигонуклеотидов осуществляются с использованием флуоресцентных красителей, которые встраиваются между отдельными мононуклеотидами. Общим недостатком такого метода является то, что увеличение флуоресценции в процессе ПЦР может быть связано с накоплением неспецифического продукта. Кроме этого, атомы и молекулы красителей сами вступают в химические реакции с атомами и молекулами олигонуклеотидов. Поэтому для получения корректных результатов о молекулярной структуре и о механизмах межмолекулярных взаимодействий необходимы новые методы, не основанные на использовании олигомеров, содержащих такие метки.

Эффективным аналитическим методом исследования структуры материалов на молекулярном уровне является спектроскопия рамановского рассеяния света. С обнаружением эффекта гигантского поверхностного усиления рамановского рассеяния — в англоязычной литературе

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), на 6–12 порядков величины в присутствии металлических наноструктур, на которых адсорбируются органические молекулы, это важное явление привлекает все более возрастающий интерес исследователей [1–7]. Такое значительное внимание к SERS, помимо фундаментального научного интереса, связано с появлением возможности создания высокочувствительных аналитических методик, а также и развития высокоселективных биосенсорных технологий с вовлечением в исследования все новых высокоэффективных наноструктурированных материалов разных металлов ([7] и ссылки в ней). Для получения большого отклика системы важно, чтобы агрегирующие металлические наночастицы образовывали дискретные кластеры. Для их образования 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 рамановское рассеяние света вызывается совместным действием двух механизмов усиления — электромагнитного и химического. Большинство исследователей считает, что электромагнитный механизм является доминирующим механизмом усиления. Он обуславливается сильным 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 [7].

Помимо этого, для адсорбированных 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 1–2 порядков величины [3], но при этом может образовываться комплекс адсорбированной молекулы и металлической наночастицы.

В результате действия 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.

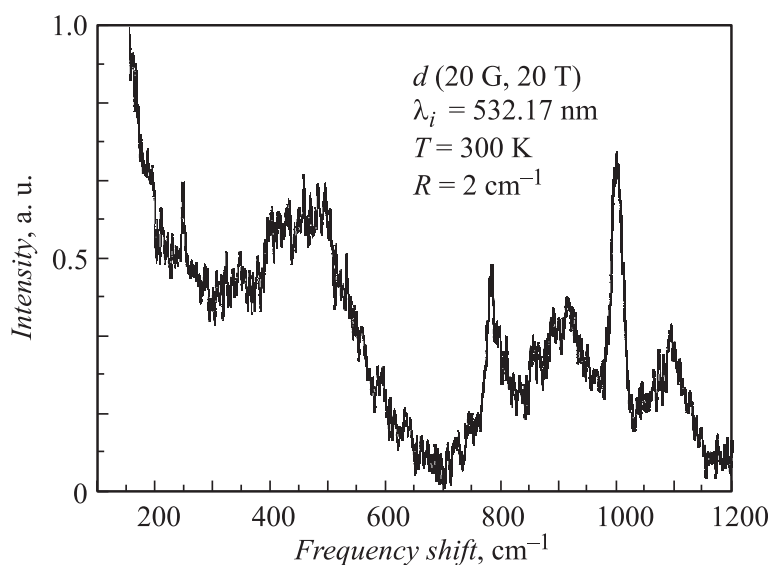
Ключом к более корректным исследованиям может быть развитие высокочувствительных методов молекулярной спектроскопии в отсутствие металлических наноструктур и флуоресцентных меток. Результаты, полученные в данной работе, показывают, что разработанная альтернативная высокочувствительная методика нерезонансной 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.

Исследования рамановского 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 рамановского рассеяния света осуществлялось излучением второй гармоники лазера на алюмоиттриевом гранате с длиной волны $\lambda_i = 532 \text{ nm}$ по методике, приведенной в [8,9]. Спектральный состав рассеянного света анализировался с помощью спектрометра LabRAM HR800 (France), снабженного охлаждаемой ПЗС (CCD) матрицей в качестве детектора. Излучение мощностью 0.05 mW фокусировалось на поверхность образца с использованием $100\times$ микроскопного объектива (Olympus). Диаметр пятна лазерного излучения в фокусе составлял $0.9 \mu\text{m}$. Эта величина задавала пространственное разрешение измерительной системы. Спектральное разрешение составляло 2 cm^{-1} .

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

Наиболее важной особенностью полученного спектра является обнаружение наряду с довольно интенсивными широкими полосами достаточно узких спектральных линий. Они также имеют довольно большие интенсивности. Фон широкой полосы в диапазоне $350\text{--}550 \text{ cm}^{-1}$, возможно, частично обусловлен влиянием сигнала от стеклянной подложки.

В целом рамановский спектр олигонуклеотидов d(20G, 20T) определяется их пространственной структурой, задаваемой большим числом входящих в нее атомов, совершающих колебания относительно положений равновесия. Макромолекулы коротких олигонуклеотидов, как



Спектр рамановского рассеяния света в синтетических олигонуклеотидах $d(20\text{G}, 20\text{T})$ в диапазоне частот $100\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$.

и макромолекулы белков, не содержат ни центров инверсии, ни зеркальной симметрии. Структурное упорядочение таких систем является результатом низкой симметрии их элементарных ячеек, обладающих винтовой или хиральной асимметрией [10]. В спектрах рамановского рассеяния таких макромолекул наблюдаются сильно перекрывающиеся спектральные полосы, обусловленные большим набором атомов в элементарной ячейке.

Полученные экспериментальные результаты на примере олигонуклеотидов $d(20\text{G}, 20\text{T})$ демонстрируют, что достигнутое высокое спектральное разрешение и чувствительность регистрации оказались достаточными для выделения спектральных составляющих, соответствующих колебаниям отдельных молекул, в сложных спектрах коротких олигонуклеотидов с достаточно большим числом атомов в элементарной ячейке.

Работа выполнена при 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.

Список литературы

- [1] *Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J.* // Chem. Phys. Lett. 1974. V. 26 (2). P. 163.
- [2] *McCall S.L., Platzman P.M., Wolff P.A.* // Physics Letters. A. 1980. V. 77. P. 381.
- [3] *Otto A.* // Light scattering in solids IV. Electronic scattering, spin effects. SERS and morphic effects / Eds by M. Cardona, G. Guntherodt. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1984.
- [4] *Kneipp K., Fassler D.* // Chem. Phys. Lett. 1984. V. 106. P. 498.
- [5] *Moskovits M.* // Rev. Mod. Phys. 1985. V. 57. P. 783–826.
- [6] *Nie S., Emory S.R.* // Science. 1997. V. 275. N 5303. P. 1102.
- [7] *Кукушкин В.И., Ваньков А.Б., Кукушкин И.В.* // Письма в ЖЭТФ. 2013. Т. 98(2). С. 72.
- [8] *Bayratov F.H., Irmer G., Toporov V.V., Bairatov B.H.* // Jap. J. Phys. 2011. V. 50. P. 05FE06.
- [9] *Байрамов Ф.Б., Топоров В.В., Полоскин Е.Д., Байрамов Б.Х., Röder C., Sprung C., Bohmhammel G., Seidel K., Irmer G., Lashkul A., Lahderanta E., Song Y.W.* // ФТТ. 2013. Т. 47. С. 607.
- [10] *Kitaev Yu.E., Panfilov A.G., Smirnov V.P., Tronc P.* // Phys. Rev. E. 2003. V. 67. P. 011 907-(1–8).