

УДК 535.34+535-1

## ПРИМЕНЕНИЕ ТГц СПЕКТРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ

© 2014 г. Ю.С. Шатрова,<sup>1,2</sup> Е.А. Собакинская,<sup>1,2</sup> В.Л. Вакс,<sup>1,2</sup> А.Н. Панин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup> Институт физики микроструктур РАН, Н. Новгород

yulia@ipmras.ru

Поступила в редакцию 25.09.2013

Проведено экспериментальное исследование спектра ДНК в терагерцевом (ТГц) частотном диапазоне при помощи спектрометра с высоким разрешением на основе синтезатора частоты и высокочастотного резонатора. В результате измерений определены интенсивные полосы поглощения ДНК, которые сопоставлены с данными, известными из литературы.

*Ключевые слова:* терагерцевая спектроскопия, ДНК, высокочастотный резонатор, высокое спектральное разрешение, синтезатор частот ТГц диапазона.

### Введение

ТГц частотный диапазон является весьма перспективным для ряда приложений, и во всем мире прилагаются большие усилия по его освоению. Интерес обусловлен тем, что наиболее интенсивные переходы во вращательном спектре многих газов, а также низкочастотные колебания многоатомных молекул, представляющие интерес для разных приложений, лежат в этом диапазоне.

Интересной и актуальной областью применения спектроскопии ТГц диапазона является изучение биологических молекул (ДНК, РНК, белков и т.д.) [1, 2].

Результаты спектроскопических исследований биомолекул, известные из литературы, позволяют говорить, что анализ ТГц спектров данных молекул может быть использован для ряда приложений, например:

- идентификации биологических молекул [3];
- определения конформационных состояний и мутаций [4];
- изучения взаимодействия биомолекул с различными веществами с целью выявления механизмов действия фармацевтических препаратов [5].

Эти и многие другие результаты были получены с использованием традиционных широкополосных спектрометров на основе фемтосекундного лазера и ИК Фурье-спектрометров. Однако спектральное разрешение в таких приборах находится на уровне нескольких ГГц, в результате чего спектры представляют собой некоторую огибающую, которая дает лишь ка-

чественное представление о спектре исследуемого вещества. Дальнейшее продвижение в области исследований свойств биологических веществ в терагерцевом диапазоне напрямую связано с развитием методов ТГц спектроскопии, позволяющих одновременно реализовать высокие спектральное разрешение и чувствительность.

Одним из вариантов таких методов может стать ТГц спектроскопия на основе синтезатора частоты и высокочастотного резонатора (ТСВР), аналогичная методу cavity-ring-down spectroscopy (CRDS), реализованному в ИК и оптическом диапазонах [6]. Данный подход основан на регистрации изменений характеристик высокочастотного резонатора с исследуемым веществом при прохождении через него излучения. За счет переотражения излучения от зеркал резонатора увеличивается эффективная длина взаимодействия образца с излучением, и, таким образом, увеличивается изменение сигнала, прошедшего через образец, что повышает чувствительность анализа. Использование высокостабильных источников излучения позволит добиться наилучшей разрешающей способности метода. Первые шаги в реализации и апробации метода ТСВР были предприняты в работе [7], где с использованием спектрометра на основе синтезатора частоты на лампе обратной волны (ЛОВ) и высокочастотного резонатора был измерен спектр растворов ДНК в диапазоне 300–375 ГГц.

Цель настоящей работы заключается в прецизионном экспериментальном исследовании полос поглощения ДНК, полученных в работе

[7], необходимом для определения истинной структуры спектра. Поэтому полученные результаты сопоставлялись с результатами для образцов ДНК того же типа, но в виде растворов с водой.

### Эксперимент

*Пробоподготовка.* Для проведения исследований применялась деградированная ДНК сельди в виде сухого порошка. В экспериментах использовались образцы ДНК (в виде порошка) массой 0.05 г и 0.03 г, находившиеся в полиэтиленовой пленке.

*Экспериментальная установка.* Детальное описание экспериментальной установки и методики измерений приведены в статье [7]. Ключевыми блоками установки являются: синтезатор частот на ЛОВ в качестве источника излучения, обеспечивающий высокую стабильность сигнала и спектральное разрешение не хуже 100 кГц; высокочастотный перестраиваемый резонатор; приемная система, включающая в себя гармонический смеситель и гетеродин (синтезатор Rohde&Schwarz), а также спектроанализатор (Agilent).

*Метод измерений.* В эксперименте регистрировались изменение интенсивности прошедшего через резонатор с образцом излучения, пропорциональное коэффициенту поглощения внесенного образца, а также сдвиг центральной частоты резонансной кривой. Пример изменения резонансной характеристики при внесении внутрь резонатора образца ДНК и полиэтилено-

вой пленки показан на рис. 1. На данном изображении с экрана спектроанализатора отчетливо видны различия в интенсивности прошедшего излучения и сдвиг центральной частоты резонансной характеристики.

В ходе эксперимента был измерен спектр поглощения ДНК (в двух концентрациях) с разрешением 50 МГц в диапазоне 300–320 ГГц при помощи разработанной установки.

### Результаты и их обсуждение

Результаты представлены в виде графиков, где интенсивные полосы поглощения соответствуют наиболее глубоким провалам. Вертикальная ось соответствует интенсивности поглощения в отн. ед., по горизонтальной оси отложены частоты в ГГц. Для сравнения спектров ДНК в порошке и ДНК в растворе, полученных в [7] с разрешением 200 МГц и 3 ГГц, графики представлены парами.

Рисунок 2 показывает, что интенсивная полоса поглощения вблизи 306 ГГц из [7] разрешается на две.

Картины спектров ДНК, полученные для образцов в сухом виде и в форме растворов, качественно отличаются друг от друга, о чем свидетельствует рис. 3, но особенности поглощения вблизи 305.5 ГГц наблюдаются для обоих случаев. Вместо двух интенсивных полос, как в случае с растворами ДНК, для «сухих» образцов была обнаружена целая группа интенсивных пиков поглощения, центр которой находится примерно на 305.5 ГГц, и она, возможно,

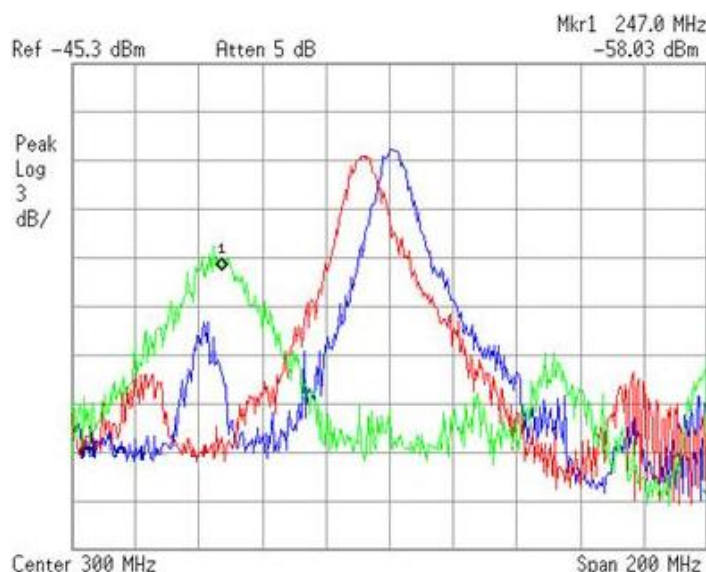


Рис. 1. Характеристики резонатора: синяя кривая – пустой резонатор, красная – в резонаторе полиэтиленовая пленка без ДНК, зеленая – с ДНК. Кривые представляют собой распределение мощности излучения в резонаторе (dBm) по частоте (MHz)

Таблица

**Интенсивные полосы поглощения ДНК в виде порошка и некоторые из полос поглощения ДНК в водных растворах из диапазона 300–320 ГГц, зарегистрированные с использованием прецизионного ТГц-спектрометра**

Частоты полос поглощения для раствора ДНК [7], ГГц	Частоты полос поглощения для порошка ДНК, ГГц
304.60, 306.50 (интенсивные)	304.25, 304.85, 305.30, 305.70, 306.10, 306.30
317.00, 318.30 (менее интенсивные)	317.00, 317.25, 317.40, 317.75, 318.25
Отсутствуют	300.4, 301, 301.75

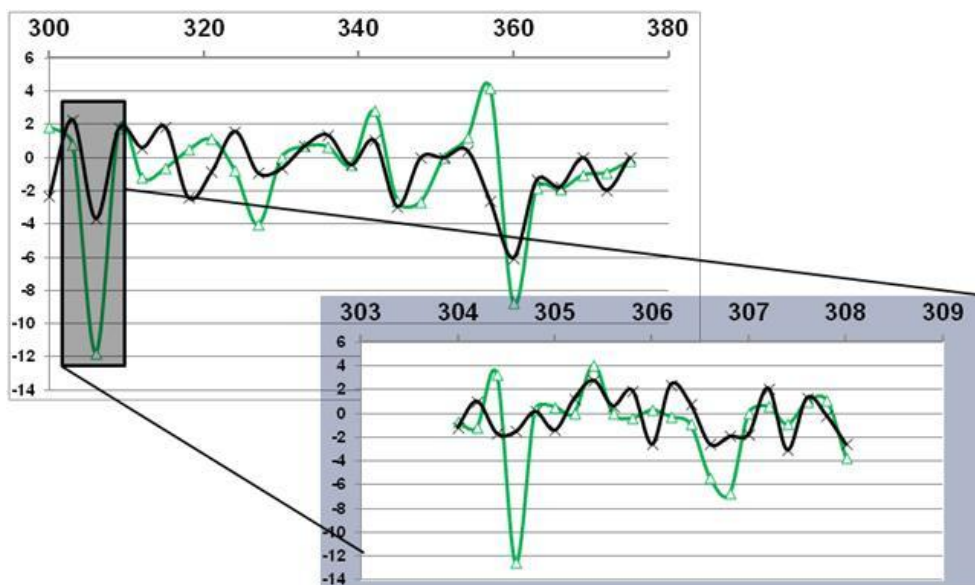


Рис. 2. Спектр поглощения ДНК в растворе [7], записанный с шагом 3 ГГц (вверху) и 200 МГц (внизу). Зеленый график соответствует меньшей концентрации ДНК, черный – большей. Вертикальная ось – интенсивности поглощения в отн. ед., горизонтальная ось – частоты в ГГц

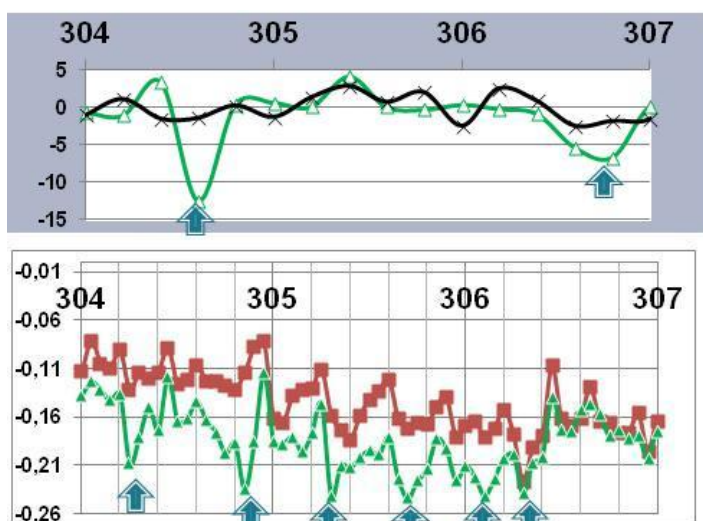


Рис. 3. Участок спектра ДНК в диапазоне 304–307 ГГц, записанный с шагом 200 МГц (вверху, ДНК в растворе [7]) и 50 МГц (внизу, ДНК в сухом виде). Зеленый график соответствует большей концентрации, красный – меньшей. Вертикальная ось – интенсивности поглощения в отн. ед., горизонтальная ось – частоты в ГГц

принадлежит собственным колебаниям в молекуле ДНК. Также есть основание предположить, что отсутствие в случае с раствором других интенсивных полос поглощения на частотах выше 305 ГГц связано с изменением конформационного состояния молекул ДНК под влиянием растворителя, сопровождающимся прекращением определенных взаимодействий в молекулах ДНК и возникновением новых.

Рисунок 3 представлен для сравнения участка спектра ДНК в разных состояниях (раствор и сухой порошок), основные же результаты работы сведены в таблицу, где приводятся центральные частоты обнаруженных полос поглощения.

### Заключение

В рамках работы были проведены измерения спектра ДНК с помощью метода спектроскопии высокого разрешения ТГц частотного диапазона, который позволил различить тонкую структуру спектра ДНК, недоступную для традиционных спектрометров этого диапазона. С помощью данного метода были проведены измерения участков спектра, представляющих наибольший интерес для детального анализа с высоким спектральным разрешением в диапазоне 300–320 ГГц. В результате измерений определены группы наиболее интенсивных полос поглощения (в областях 300–302 ГГц, 303.5–307.4 ГГц и 316.3–318.6 ГГц) в спектре ДНК. Группа полос поглощения с центральными частотами на 305 ГГц и 317.5 ГГц, возможно, принадлежит собственным колебаниям в молекуле ДНК, поскольку была зарегистрирована также и для образцов с различными растворителями. Группа интенсивных полос поглощения в окрестности 301 ГГц, которая не наблюдалась в случае растворов ДНК, может принадлежать связям ДНК с пленкой.

Таким образом, представленный в данной работе метод ТГц спектроскопии, основанный

на применении стабильных по частоте источников излучения и высокодобротного резонатора, позволяет изучать тонкую структуру сложных спектров биомолекул, что дает возможность практического использования полученных результатов для решения ряда биологических задач.

*Работа выполнена при поддержке гранта проректорства РФ № 11.G34.31.0066, программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», гранта РФФИ-Поволжье 13-02-97103-а и гранта Минобрнауки РФ № 2014/134.*

### Список литературы

1. Parrott E.P.J., Sun Y., Pickwell-MacPherson E. Terahertz spectroscopy: Its future role in medical diagnoses // *Journal of Molecular Structure*. 2011. Vol. 1006. P. 66–76.
2. Nazarov M.M., Shkurinov A.P., Tuchin V.V., Zhernovaya O.S. Modification of terahertz pulsed spectrometer to study biological samples // *Saratov Fall Meeting 2006: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VIII*, edited by Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE. 2007. Vol. 6535, 65351J.
3. Fischer B.M. Far-Infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 3807–3814.
4. Markelz A. THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 3797–3805.
5. Xiaojun Wu, Yiwen E, Xinlong Xu, and Li Wang. Label-free monitoring of interaction between DNA and oxaliplatin in aqueous solution by terahertz spectroscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2012. V. 101. P. 033704.
6. Shucheng Xu, Guohe Sha, and Jinchun Xie. Cavity ring-down spectroscopy in the liquid phase. // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73. 255 p.
7. Цуркан М.В., Балбекин Н.С., Собакинская Е.А. и др. Исследование спектра ДНК методами ТГц спектроскопии // *Оптика и спектроскопия*. 2013. Т. 114. № 6. С. 981–986.

## APPLICATION OF HIGH RESOLUTION THZ SPECTROSCOPY FOR STUDYING BIOMOLECULES

*Yu.S. Shatrova, E.A. Sobakinskaya, V.L. Vaks, A.N. Panin*

The article reports on an experimental study of the DNA terahertz spectrum by a high resolution spectrometer based on a frequency synthesizer and a high-Q cavity. Intensive absorption bands of DNA have been measured and compared with the data known from the literature.

*Keywords:* terahertz spectroscopy, DNA, high-Q cavity, high spectral resolution, THz frequency synthesizer.

## References

1. Parrott E.P.J., Sun Y., Pickwell-MacPherson E. Terahertz spectroscopy: Its future role in medical diagnoses // *Journal of Molecular Structure*. 2011. Vol. 1006. P. 66–76.
2. Nazarov M.M., Shkurinov A.P., Tuchin V.V., Zernovaya O.S. Modification of terahertz pulsed spectrometer to study biological samples // *Saratov Fall Meeting 2006: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VIII*, edited by Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE. 2007. Vol. 6535, 65351J.
3. Fischer B.M. Far-Infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 2002. 47, P. 3807–3814.
4. Markelz A. THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 3797–3805.
5. Xiaojun Wu, Yiwen E, Xinlong Xu, and Li Wang. Label-free monitoring of interaction between DNA and oxaliplatin in aqueous solution by terahertz spectroscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2012. V. 101. P. 033704.
6. Shucheng Xu, Guohe Sha, and Jinchun Xie. Cavity ring-down spectroscopy in the liquid phase. // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73. 255 p.
7. Curkan M.V., Balbekin N.S., Sobakinskaja E.A. i dr. Issledovanie spektra DNK metodami TGc spektroskopii // *Optika i spektroskopija*. 2013. T. 114. № 6. S. 981–986.