

Четырехфотонная лазерная спектроскопия водных растворов биополимеров в микроволновом диапазоне

А.Ф.Бункин, А.А.Нурматов, С.М.Першин, Р.С.Хусаинова, С.А.Потехин

Получены спектры четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в субмиллиметровом диапазоне (75–95 см⁻¹) для деионизованной воды, водных растворов ДНК и белка α -химотрипсин. Зарегистрированы узкие резонансы, частоты которых совпадают в пределах разрешающей способности спектрометра с частотами вращательных переходов основного электронного и колебательного состояния орто- и параизомеров молекулы H₂O в газовой фазе, а также с частотами линий молекул H₂O₂ и OH⁻. Показано, что резонансный вклад вращательных линий ортоизомеров H₂O в сигнал четырехфотонного рассеяния нативных растворов биополимеров возрастает не менее чем в восемь раз по сравнению с их вкладом в сигнал рассеяния в воде и становится существенно больше вклада линий параизомеров. Денатурация ДНК после нагрева и охлаждения раствора приводит к исчезновению такой селективности.

Ключевые слова: нелинейная лазерная спектроскопия, четырехфотонное рассеяние, низкочастотная спектроскопия биополимеров, гидратация макромолекул.

1. Введение

Изучение оптических спектров низкочастотных молекулярных движений в жидкостях, образующих молекулярные комплексы, позволяет прояснить некоторые аспекты межмолекулярного взаимодействия, динамику и топологию молекулярных ассоциатов, особенности взаимодействия биологических макромолекул с водой, являющейся их естественной (нативной) средой. Однако использование классических методов оптической спектроскопии (ИК поглощение и спонтанное комбинационное рассеяние) в спектральном диапазоне от нескольких единиц до 100 см⁻¹ наталкивается на ряд экспериментальных трудностей, обусловленных сильным поглощением образцов и, следовательно, необходимостью использования тонких пленок среды, которые могут существенно нагреваться во время измерения.

Четырехфотонная спектроскопия [1, 2] дает возможность существенно повысить отношение сигнал/шум за счет фазирования в макроскопическом объеме атомных и молекулярных движений с помощью двух лазерных волн с частотами ω_1 и ω_2 , разность которых ($\omega_1 - \omega_2$) может сканироваться в широкой области спектра – от ближнего ИК до сантиметрового диапазона. Существенно, что частоты взаимодействующих волн лежат в области прозрачности среды и нагрева среды не происходит. Измеряемым параметром служит интенсивность излучения на частоте сигнала $\omega_s = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$, прошедшего через

поляризационный анализатор, скрещенный с направлением поляризации волны $E^{(2)}$. Источником этой волны является нелинейная поляризация [1, 2]

$$P_i^{(3)} = 6\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1)E_j^{(1)}E_k^{(2)}E_l^{(1)*}. \quad (1)$$

Здесь $\chi_{ijkl}^{(3)}$ – тензор кубической восприимчивости среды; $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ – амплитуды взаимодействующих полей. Интенсивность регистрируемого сигнала $I_s \propto |\chi_{ijkl}^{(3)}|^2 I_1^2 I_2$.

В [3, 4] с помощью такого подхода в воде был обнаружен вращательный спектр молекул H₂O и D₂O в области 0–100 см⁻¹, частоты линий которого совпадали в пределах погрешности ± 0.2 см⁻¹ с частотами вращательных резонансов этих молекул в газовой фазе. В водных растворах перекиси водорода [3] и белка α -химотрипсин [5, 6] на тех же частотах наблюдалось существенное (на порядок) увеличение вклада вращательных резонансов молекул воды в сигнал четырехфотонного рассеяния, так же как и при повышении температуры воды [7]. Качественно такое поведение вращательного спектра может быть объяснено существованием свободных молекул H₂O на границах воды с микропузырьками, твердыми микропримесями и большими молекулами биополимеров.

Отметим, что одной из фундаментальных задач, возникающих в физике жидкого состояния и, в частности, в физике воды, является выяснение особенностей образования водородной связи в средах, молекулы которых различаются ядерным спином атомов водорода. Примером таких молекул являются орто- и парамодификации молекул воды, в которых суммарный спин атомов водорода равен либо 1 (ортомолекулы) либо 0 (парамолекулы). Отношение концентраций молекул орто- и параизомеров H₂O при комнатной температуре составляет 3:1. Их вращательные спектры различаются [8] и хорошо идентифицируются в газовой фазе [9]. Ранее было обнаружено, что

А.Ф.Бункин, А.А.Нурматов, С.М.Першин. Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: abunkin@orc.ru

Р.С.Хусаинова. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, Московская обл., 142290 Пушкино

С.А.Потехин. Институт белка РАН, Россия, Московская обл., 142290 Пушкино

Поступила в редакцию 21 мая 2007 г., после доработки – 13 июля 2007 г.

при пропускании водяного пара через пористый материал с развитой поверхностью происходит обогащение паров воды молекулами ортоизомеров [9]. Сорбция спин-изомеров на поверхности высушенных органических пленок (ДНК, белок лизоцим) и неорганических соединений также происходит с различной скоростью [10].

Наблюдаемое селективное связывание спин-изомеров можно объяснить тем, что непрерывно вращающиеся ортоизомеры молекулы воды обладают большей подвижностью, а способные не вращаться парамолекулы характеризуются большей способностью к образованию комплексов. Вопрос о существовании и спектроскопических проявлениях орто- и паракомпонентов воды в жидкой фазе остается пока открытым. Не ясно также, существует ли какая-либо селективность спин-изомеров при межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах.

Целью данной работы являлось изучение вращательных спектров орто- и параизомеров молекулы H_2O в дистиллированной воде, в водных растворах обычных и денатурированных молекул ДНК и белка α -химотрипсин. Измерения проводились в диапазоне частотных отстройек $-75 \dots -95 \text{ см}^{-1}$, в котором, по данным [8], находится несколько достаточно сильных уединенных вращательных линий орто- и параизомеров H_2O .

2. Эксперимент

Эксперименты проводились на установке, описанной в [11]. Две встречные волны $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ с частотами ω_1 и ω_2 распространялись в кювете с образцом. Входное и выходное окна кюветы изготовлены из плавленого кварца и имели низкий уровень деполяризации проходящего лазерного излучения. Волна $E^{(1)}$ (излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера, работающего на одной продольной моде) имела круговую поляризацию. Перестраиваемая по частоте волна $E^{(2)}$ (излучение лазера на красителе) была линейно поляризована. При такой поляризации взаимодействующих волн [1, 11] в сигнале, определяемом источником (1), отсутствует вклад нерезонансного рассеяния.

Орты поляризации волны сигнала на частоте ω_s и волны $E^{(2)}$ неколлинеарны, а направления распространения этих волн совпадают. Сигнал выделялся призмой Глана. Ширина аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.2 \text{ см}^{-1}$) и спектральный диапазон ($-1200 \dots 300 \text{ см}^{-1}$) определялись выходными характеристиками лазера на красителе, который накачивался излучением третьей гармоники Nd:YAG-лазера и обеспечивал перестройку по частоте волны $E^{(2)}$ по программе, задаваемой компьютером. Для каждого значения частоты ω_2 проводилось усреднение сигнала по 10–30 отсчетам, затем частота лазера автоматически перестраивалась с шагом $\sim 0.119 \text{ см}^{-1}$. Нулевая частотная отстройка привязывалась с точностью до 0.02 см^{-1} к резонансам Бриллюэна, дальнейшая перестройка длины волны контролировалась по модам интерферометра Фабри–Перо с базой 7 мм. Погрешность регистрации сигнала четырехфотонного рассеяния задавалась программно в начале каждого измерения и обычно не превышала 10%. Точность измерения частот резонансов определялась шириной аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.2 \text{ см}^{-1}$). Остаточный люфт синусного механизма системы поворота дифракционной решетки лазера на красителе приводил к дополнительному раз-

бросу центра линии генерации на $\sim 0.2 \text{ см}^{-1}$ при частотных отстройках более 50 см^{-1} .

Измерения проводились в воде, очищенной по технологии Milli-Q (Milli-Q-вода), водных растворах белка α -химотрипсина (концентрация 17 мг/мл), нативной и денатурированной ДНК (15 мг/мл) в спектральном диапазоне $-75 \dots -95 \text{ см}^{-1}$. Денатурацию ДНК вызывали нагревом раствора до 90°C с последующим охлаждением до комнатной температуры. Образцы помещались в термостабилизированную при комнатной температуре кювету длиной 100 мм со специально отобранными окнами из плавленого кварца, не вносящими дополнительной деполяризации в зондирующее излучение. Сигнал четырехфотонного смещения возникал в области пересечения волн накачки длиной $\sim 5 \text{ мм}$. Дополнительная дегазация изучаемых жидкостей не проводилась.

ДНК из молок лососевых рыб выделяли путем экстракции в присутствии додецилсульфата натрия с последующим двукратным переосаждением этанолом. Для уменьшения светового рассеяния растворы ДНК были пропущены через гомогенизатор высокого давления. Средний молекулярный вес ДНК после такой обработки, оцененный по характеристической вязкости препарата [12], был равен $\sim 550 \text{ кДа}$ (килодальтоны) при pH раствора ДНК, равном ~ 7.0 . Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически [13].

3. Результаты экспериментов

На рис.1 приведен спектр четырехфотонного рассеяния в диапазоне $-75 \dots -90 \text{ см}^{-1}$ в воде, полученной из бидистиллированной воды путем пропускания через фильтры с отверстиями диаметром $\sim 300 \text{ нм}$ (Milli-Q-вода). В спектре отчетливо видны резонансы, относящиеся, по данным [8], к наиболее сильным вращательным переходам основного колебательного состояния пара- и ортоизомеров молекул H_2O , а также к вращательным переходам молекул H_2O_2 и OH^- , которые могут образовываться в воде при флеш-фотолизе под действием лазерного излучения [14, 15]. Отличие частот линий от таб-

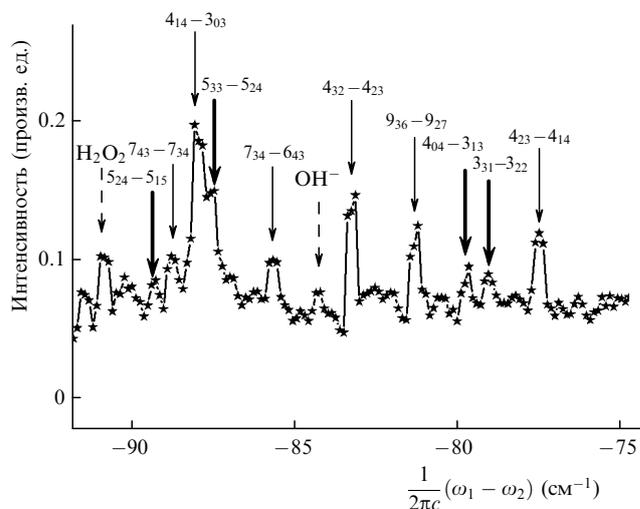


Рис.1. Спектр четырехфотонного рассеяния Milli-Q-воды. Тонкими и толстыми стрелками обозначены резонансы орто- и параизомеров H_2O соответственно, над стрелками указаны вращательные квантовые числа J_{K_a, K_c} начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекулы H_2O , штриховыми стрелками обозначены резонансы H_2O_2 и OH^- .

личных значений [8] для всех переходов находится в пределах 0.5 см^{-1} , что сравнимо с шириной аппаратной функции и разбросом частоты генерации лазера на красителе. Такое расхождение выглядит приемлемым, поскольку частоты многих линий вращательного и колебательно-вращательного спектров молекул воды по разным данным различаются в пределах нескольких десятых обратного сантиметра.

На рис.2 представлены спектры четырехфотонного рассеяния водных растворов белка α -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл), ДНК (15 мг/мл) и для сравнения спектр Milli-Q-воды. Видно, что спектры растворов обоих биополимеров и Milli-Q-воды подобны, в них присутствуют вращательные линии орто- и парамолекул воды, ранее наблюдавшиеся в водном растворе белка α -химотрипсин [4–6]. В спектрах обоих растворов происходит существенный рост (в ~ 8 раз) интенсивности вращательных резонансов в сигнале четырехфотонного рассеяния, по сравнению с их интенсивностью в спектре Milli-Q-воды.

Было проведено сравнение спектров биополимеров в нескольких узких диапазонах. На рис.3 приведены фрагменты спектров, показанных на рис.2, в диапазонах $-86 \dots -90 \text{ см}^{-1}$ и $-77 \dots -81 \text{ см}^{-1}$, где содержатся характерные линии орто- и параизомеров H_2O . Видно (рис. 3,а), что резонансы ортоизомеров H_2O присутствуют как в спектре Milli-Q-воды, так и в спектрах водных растворов обоих биополимеров, тогда как линии параизомеров H_2O в спектрах белка и ДНК подавлены (рис.3,б).

На рис.4 изображены спектры четырехфотонного рассеяния водных растворов ДНК (15 мг/мл) и денатурированной ДНК через два часа после нагревания. В спектрах наблюдаются вращательные резонансы орто- и параизомеров молекулы H_2O , а также молекул H_2O_2 . Видно, что денатурация ДНК в водном растворе приводит к существенной модификации вращательного спектра молекул H_2O . В частности, происходит примерно трехкратное уменьшение интенсивности вращательных линий. В отличие от водного раствора «живой» ДНК, в растворе денатурированной ДНК вращательные резонансы параизомеров H_2O хорошо различимы. Вблизи -80 и -79

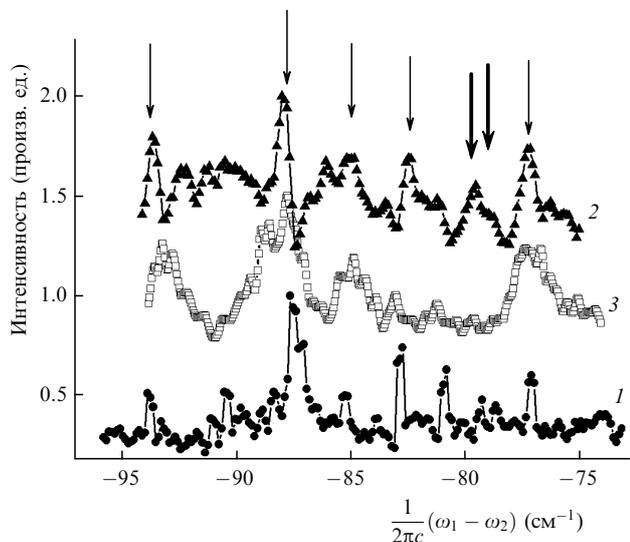


Рис.2. Спектры четырехфотонного рассеяния Milli-Q воды (1), а также водных растворов белка α -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл) (2) и ДНК (15 мг/мл) (3). Обозначения те же, что и на рис.1. Интенсивность спектра 1 увеличена в ~ 8 раз.

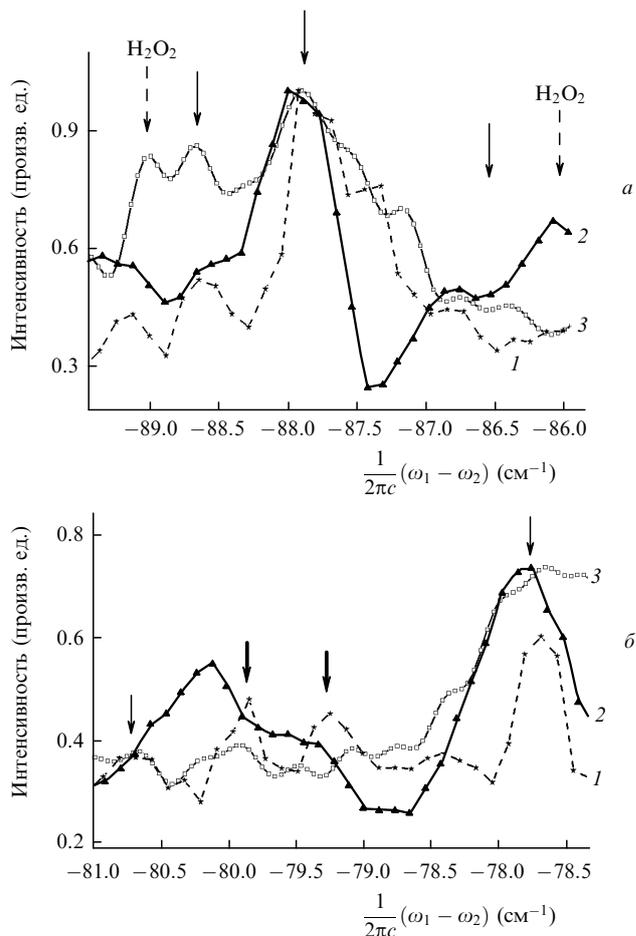


Рис.3. Фрагменты приведенных на рис.2 спектров Milli-Q-воды (1), а также водных растворов белка α -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл) (2) и нативной ДНК (15 мг/мл) (3). Обозначения те же, что и на рис.1.

см^{-1} в спектрах Milli-Q-воды и денатурированной ДНК отчетливо видны вращательные линии параизомеров H_2O , тогда как в спектре «живой» ДНК эти линии существенно подавлены. В спектре денатурированной ДНК

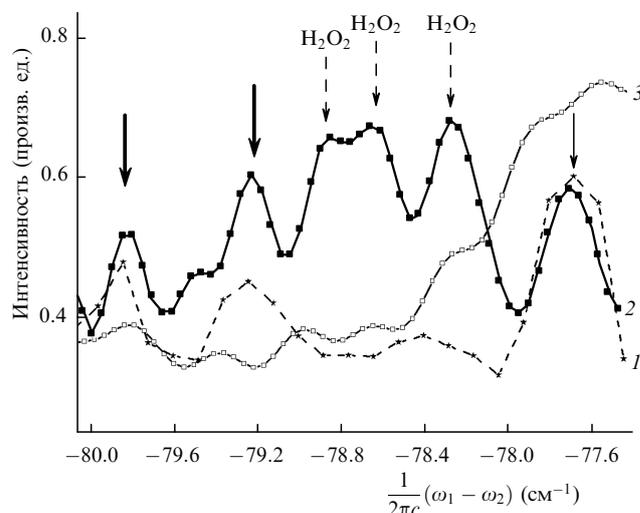


Рис.4. Спектры четырехфотонного рассеяния Milli-Q-воды (1), а также водных растворов денатурированной ДНК (2) и ДНК (3). Обозначения те же, что и на рис.1. Интенсивность спектра 2 увеличена в 2.5 раза.

также заметен рост интенсивности вращательных линий H_2O_2 .

4. Обсуждение

Известно, что вода – сильно ассоциированная жидкость. Каждая молекула воды способна образовать до четырех водородных связей со своими соседями. Среднее координационное число водородных связей при комнатной температуре равно 3.5 [16]. Проведенные нами эксперименты показывают, что в спектрах четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в воде и водных растворах возникают узкие резонансы, частоты которых с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра совпадают с частотами вращательных переходов основного электронного и колебательного состояния молекулы H_2O (рис.1). При этом в спектре отдельно идентифицируются линии, относящиеся как к орто-, так и к пара-модификациям основного изотопа молекулы H_2O . Отметим, что колебательно-вращательные спектры газовой фазы наблюдались для молекулы H_2O и некоторых других легких молекул в нанокляпях жидкого гелия [17, 18] и в матрицах твердого аргона [19], где были также зарегистрированы вращательные и колебательно-вращательные спектры радикалов OH , NH , NH_2 , совпадающие с их спектрами в газе. Более того, при медленном понижении температуры матрицы аргона от 27 до 4 К [19] наблюдались орто↔пара конверсия и вариация отношения концентраций орто- и парамолекул в соответствии с фактором Больцмана. В некоторых ситуациях хорошо разрешенный колебательно-вращательный спектр наблюдается и в жидкости при комнатной температуре. Примером таких сред является раствор HCl в CCl_4 [20]. В работах [19, 20] было показано, что для свободного вращения легких молекул типа H_2O , NH_2 , HCl достаточно сферической полости диаметром $\sim 4 \text{ \AA}$, сохраняющейся в течение времени ориентационной релаксации, которое для большинства жидкостей не превышает 10^{-12} с.

Причина возникновения вращательных линий молекулы H_2O в водных растворах биополимеров заключается, по-видимому, в физических свойствах воды, гидратированной на поверхности микропримесей [21–23]. Известно [22, 23], что гидратация приводит к структурированию молекул воды в сольватной оболочке примеси. Возникающие пространственные ограничения в этом случае препятствуют образованию новых водородных связей между молекулами воды и приводят к образованию полостей на поверхности микропримеси. В результате среднее число водородных связей, приходящихся на одну молекулу, заметно снижается, увеличивая вероятность появления свободных молекул в сольватной оболочке. Последнее обстоятельство подтверждается расчетами молекулярной динамики [23] и экспериментами по рентгеноструктурному анализу [21].

В спектрах водных растворов биологических (белок, ДНК) макромолекул (рис.2 и 3) наблюдаются вращательные линии, интенсивность которых почти на порядок выше интенсивности соответствующих линий в спектре воды. Это свидетельствует о способности молекул биополимеров существенно увеличивать эффективную концентрацию свободных молекул воды в сольватной оболочке макромолекулы. Это обстоятельство свидетельствует также в пользу того, что наблюдаемые в эксперименте линии вращательного спектра H_2O не связаны

с молекулами воды внутри пузырьков воздуха, которые могут присутствовать в исследуемых образцах.

Отношение интенсивностей линий вращательного спектра орто- и параизомеров воды при увеличении концентрации ДНК или белка в растворе увеличивается не пропорционально этим концентрациям. Интенсивность вращательного спектра ортоизомеров воды существенно превышает интенсивность вращательного спектра параизомеров в растворе использованных в наших экспериментах молекул биополимеров (рис.3). Отметим, что ранее [10] наблюдалась селективная сорбция параизомеров молекул воды из газовой фазы при их пропускании над поверхностью образцов пленок ДНК, лизоцима и коллагена.

Возможно, указанная селективность взаимодействия орто- и параизомеров воды с биологическими макромолекулами связана с обнаруженной недавно в модельных расчетах [22] резкой зависимостью характера гидратации (притягивания или отталкивания молекул H_2O) от флуктуаций поляризуемости комплекса молекула H_2O – молекула примеси. Эта характеристика может быть различной для орто- и параизомеров H_2O .

При денатурации ДНК селективность взаимодействия уменьшается (рис.4). С учетом того, что энергия гидратации определяет предпочтительность той или иной конформации макромолекулы в растворе, очевидно, что изменение отношения концентраций орто- и парамолекул воды в клетке может существенно влиять на равновесные концентрации функционально важных состояний макромолекул *in vivo* и, следовательно, на функционирование клеток.

5. Выводы

Получены спектры четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в водных растворах биополимеров (белок, ДНК, денатурированная ДНК) и в деионизованной Milli-Q-воде в субмиллиметровом диапазоне ($75–95 \text{ см}^{-1}$). В исследованных спектрах зарегистрированы линии вращательного спектра орто- и параизомеров основного изотопа молекулы H_2O , а также молекул H_2O_2 и OH^- .

Резонансный вклад вращательного спектра молекул H_2O в сигнал четырехфотонного рассеяния существенно возрастает при переходе от воды к растворам биополимеров. Механизм этого явления до конца не ясен, однако можно предположить, что присутствие молекул биополимеров приводит к нарушению исходной топологии сетки водородных связей в гидратной оболочке, увеличивая концентрацию слабо связанных и свободных молекул H_2O в микрополостях на границе биополимер – вода.

Обнаружено, что молекулы белка и ДНК в нативном растворе селективно взаимодействуют с параизомерами H_2O . При денатурации ДНК селективность взаимодействия не обнаружена.

Работа выполнялась при частичной поддержке грантов РФФИ № 05-02-16020, 07-02-12209 и 04-04-97317, программ РАН «Оптическая спектроскопия и стандарты частоты» и «Молекулярная и клеточная биология», а также гранта Президента РФ государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-8108.2006.2.

1. Ахманов С.А., Коротеев Н.И. *Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света* (М.: Наука, 1981).

2. Shen Y.R. *The Principles of Nonlinear Optics* (New York: Willey, 1984).
3. Бункин А.Ф., Першин С.М., Горчаков А.П., Нурматов А.А. *Письма в ЖТФ*, **32**, 20 (2006).
4. Бункин А.Ф., Нурматов А.А., Першин С.М. *УФН*, **176**, 883 (2006).
5. Бункин А.Ф., Лебедеко С.И., Нурматов А.А., Першин С.М. *Квантовая электроника*, **36**, 612 (2006).
6. Bunkin A.F., Nurmatov A.A., Pershin S.M. *Laser Phys. Lett.*, **3**, 275 (2006).
7. Bunkin A.F., Nurmatov A.A., Pershin S.M. *Laser Phys.*, **17**, 22 (2007).
8. Rothman L. et al. *J. Quant. Spectr. Rad. Transfer*, **96**, 139 (2005); www.elsevier.com/locate/jqsrt.
9. Tikhonov V.I., Volkov A.A. *Science*, **296**, 2363 (2002).
10. Potekhin S.A., Khusainova R.S. *Biophysical Chemistry*, **118**, 79 (2005).
11. Bunkin A.F., Nurmatov A.A. *Laser Phys.*, **13**, 328 (2003).
12. Doty P., McGill B.B., Rice S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **44**, 432 (1958).
13. Freifelder D. *Physical Biochemistry* (San Francisco: W.H.Freeman and Comp., 1982).
14. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. *Докл. РАН*, **384**, 821 (2002).
15. Бенсассон Р., Ленд Э., Праскот Т. *Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз* (М.: Мир, 1987).
16. Rahman A., Stillinger F.H. *J. Chem. Phys.*, **55**, 3336 (1971).
17. Frochtenicht R., Kalodis M., Koch M., Huisken F. *J. Chem. Phys.*, **105**, 6128 (1996).
18. Макаров Г.Н. *УФН*, **174**, 225 (2004).
19. Redington R.L., Milligan D.E. *J. Chem. Phys.*, **37**, 2162 (1962).
20. Robert D., Galary L. *J. Chem. Phys.*, **55**, 2347 (1971).
21. *Вода: структура, состояние, сольватация*. Под ред. А.М.Кутепова (М.: Наука, 2003).
22. Yamaguchi T., Chong S.-H., Hirata F. *J. Chem. Phys.*, **119**, 1021 (2003).
23. Yamaguchi T., Matsuoka T., Koda S. *J. Chem. Phys.*, **120**, 7590 (2004).