

**ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ДНК, АТФ И АДФ,  
НАХОДЯЩИХСЯ В ФОТОННЫХ ЛОВУШКАХ,  
ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ ЧЕТВЕРТОЙ ГАРМОНИКОЙ  
ЛАЗЕРА YAG:ND<sup>3+</sup>**

В. С. Горелик<sup>1,2</sup>, Г. И. Довбешко<sup>3</sup>, А. Ю. Пятышев<sup>2</sup>

*При комнатной температуре зарегистрированы спектры фотолюминесценции ДНК, АТФ и АДФ, помещённых в фотонные ловушки, при ультрафиолетовом возбуждении. Обнаружено, что использование лазерного ультрафиолетового импульсно-периодического излучения для возбуждения фотолюминесценции ДНК, АТФ и АДФ существенно повышает их квантовый выход и открывает возможность для осуществления лазерной генерации в этих веществах.*

**Ключевые слова:** фотолюминесценция, ДНК, АТФ, АДФ, лазер, ультрафиолетовое излучение, фотонная ловушка, спектр.

Нуклеиновые кислоты присутствуют в биоструктурах и играют важную роль в процессах жизнедеятельности. Изучение их структуры и динамических характеристик является одной из актуальных областей молекулярной биологии. Примером таких кислот является дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК. ДНК была открыта Иоганном Фридрихом Мишером в 1868 году.

ДНК является биополимером, в состав которого входят нуклеотиды [1–3]. Каждый нуклеотид состоит из остатка фосфорной кислоты, присоединённого к сахару дезоксирибозе, к которому через гликозидную связь присоединено одно из четырёх азотистых оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т). Полимер ДНК обладает довольно сложной структурой [4–6]. Остов каждой из цепей ДНК состоит из чередующихся фосфатов и сахаров [6]. Некоторые физические свойства приведены в [7–12].

<sup>1</sup> ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail:gorelik@sci.lebedev.ru.

<sup>2</sup> Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана, Москва, Россия.

<sup>3</sup> Институт физики НАН Украины, Киев, Украина.

Аденозинтрифосфат (АТФ) представляет собой нуклеотид, который играет исключительно важную роль в обмене энергии и веществ в организмах. В первую очередь, это соединение известно как универсальный источник энергии для большинства биохимических процессов, протекающих в живых системах. Известно, что АТФ является основным переносчиком энергии в клетке [13].

Аденозиндифосфат (АДФ) – нуклеотид, состоящий из аденина, рибозы и двух остатков фосфорной кислоты. АДФ образуется в результате переноса концевой фосфатной группы аденозинтрифосфата (АТФ). АДФ участвует в энергетическом обмене во всех живых организмах [14]. В высших организмах присутствует белковый комплекс, осуществляющий специфический перенос через биологические мембраны АТФ в обмен на АДФ (транслоказа адениновых нуклеотидов) и являющийся первым, хорошо изученным белком-переносчиком [15].

Как известно, квантовый выход фотолюминесценции нуклеиновых оснований и ДНК очень мал [16–19], что приводит к трудности регистрации соответствующих спектров флуоресценции. В [18] анализируется зависимость флуоресценции ДНК от pH раствора. При этом возбуждение флуоресценции осуществлялось дуговой ксеноновой лампой ДКСШ-1000, а регистрация спектров проводилась при помощи монохроматора DMR-4. Зарегистрированные спектры имели континуальный характер и находились в диапазоне длин волн 300–450 нм; в спектре присутствовало широкое крыло и полоса в коротковолновой области. В [20–22] анализировались спектры фотолюминесценции водных растворов нуклеиновых оснований и ДНК при низких температурах. Возбуждение вторичного излучения осуществлялось ртутной лампой, а регистрация спектров проводилась при помощи спектрофлуориметров Hitachi 850 и MPF-4. Полученные в этих статьях спектры фосфоресценции и флуоресценции были зарегистрированы только в диапазоне длин волн 400–550 нм. Анализ спектров фотолюминесценции ДНК при комнатной температуре проводился при введении в растворы различных красителей [23–25], что приводило к появлению в видимой области дополнительных полос, обусловленных флуоресценцией красителей. В [26] предлагалось использовать пористый кремний для улучшения условий регистрации спектров фотолюминесценции в водных растворах биологически активных веществ: ДНК, РНК и некоторых лекарств. В [27] была показана возможность наблюдать свечение молекул ДНК, находящихся на поверхности синтетического опала (без понижения температуры и без использования красителей). Было установлено, что повысить квантовый выход возможно за счет создания

комплексных соединений ДНК с углеродными нанотрубками [28] или при добавлении в раствор различных ионов или квантовых точек [29, 30].

Для исследования АТФ использовались методы биолюминесценции [31] и фотолюминесценции [32]. Анализ спектров фотолюминесценции АТФ, модифицированного гибридным биосенсором, посвящена статья [33]. При этом возбуждение спектров фотолюминесценции осуществлялось гелий-неоновым лазером с длиной волны 632.8 нм. Наблюдаемый в этом случае спектр фотолюминесценции соответствовал не собственным электронным переходам в АТФ, а был обусловлен переходами в биосенсоре и имел вид гауссовой кривой с пиком около 880 нм. В [34] исследования спектров фотолюминесценции АТФ проводились для продуктов ферментативной реакции между гексокиназой и глюкозооксидазой в присутствии АТФ и квантовых точек InP/ZnS. Возбуждение фотолюминесценции осуществлялось излучением с длиной волны 370 нм, а регистрация проводилась спектрометром Horiba Jobin Yvon FL3-11. Спектры были зарегистрированы в диапазоне длин волн 500–700 нм и имели вид гауссовой кривой с пиком вблизи 600 нм.

Зависимость спектров фотолюминесценции растворов аденозиндифосфата от pH среды исследовалась в [35, 36]. Возбуждение фотолюминесценции осуществлялось ксеноновой лампой Osram XBO 450 W, а регистрация спектров проводилась спектрофотометром Zeiss ZFM 4 C и спектрофлуориметром Farrand. Исследования проводились в диапазоне длин волн 380–400 нм. Было установлено, что максимальная интенсивность фотолюминесценции регистрируется при pH=3.5. В [37] предлагается использовать АДФ как флуоресцентную метку при исследовании процессов метаболизма в клетках животных. В [38, 39] был проведен анализ содержания аденозиндифосфата и других нуклеотидов в плазме крови и крови человека и животных с использованием биолюминесценции.

В данной работе ставилась задача исследования спектров вторичного излучения ДНК, АТФ и АДФ, помещенных в фотонные ловушки, при лазерном ультрафиолетовом импульсно-периодическом возбуждении.

Для возбуждения и регистрации спектров вторичного излучения использовалась волоконно-оптическая методика. Принципиальная схема экспериментальной установки приведена на рис. 1.

В качестве источника возбуждающего ультрафиолетового излучения использовалась четвертая гармоника ( $\lambda_{\text{ex}} = 266$  нм) лазера на алюмоиттриевом гранате DTL-389QT, генерирующего импульсно-периодическое излучение с длиной волны 1064 нм,

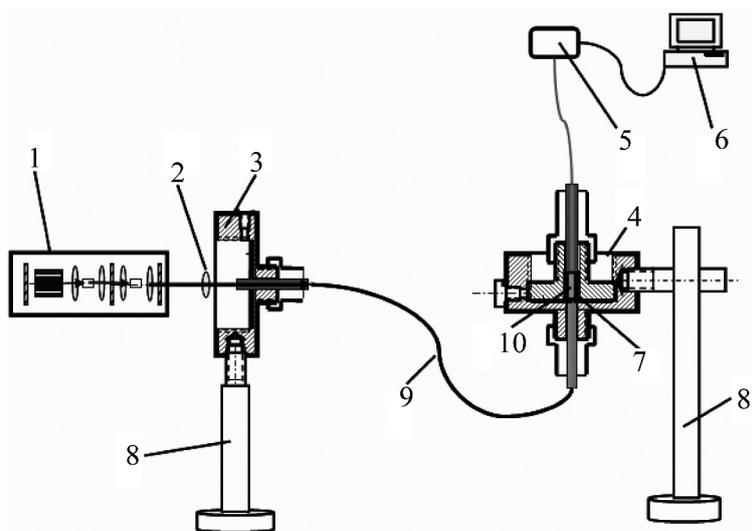


Рис. 1: Схема экспериментальной установки для регистрации спектров фотолуминесценции: 1 – лазер DTL-389QT; 2 – собирающая линза; 3 – устройство крепления световода; 4 – кювета в сборе; 5 – миниспектрометр FSD-8; 6 – компьютер; 7 – зонд с одним световодом; 8 – устройство крепления; 9 – световод; 10 – фотонная ловушка с веществом.

со средней мощностью генерации 10 мВт, с частотой следования импульсов 3 кГц при их длительности 10 нс. Возбуждающее излучение с помощью кварцевого световода направлялось в кювету с исследуемым веществом, находящимся в фотонной ловушке. Данная ловушка представляет собой цилиндр объемом  $\sim 1 \text{ мм}^3$ . Использование фотонной ловушки позволяет добиться преобразования значительной доли падающего ультрафиолетового излучения в фотолуминесценцию находящегося в ней вещества. Вторичное излучение (фотолуминесценция) направлялось другим световодом к входной щели миниспектрометра FSD-8. Цифровые данные о спектре вторичного излучения передавались на компьютер.

На рис. 2 приведено сравнение спектров фотолуминесценции ДНК, представленных в литературе [18, 21], со спектрами фотолуминесценции двух высушенных образцов ДНК телёнка (№1 и №2), помещённых в фотонные ловушки (см. рис. 1).

Из рис. 2 видно, что в спектрах вторичного излучения ДНК, помещаемых в фотонные ловушки, присутствуют интенсивный максимум в ультрафиолетовой области спектра (298 нм; 306 нм) и широкое крыло в сине-фиолетовой области спектра. При этом спектр излучения ДНК в сине-зеленой области для образца №2 имеет меньшую

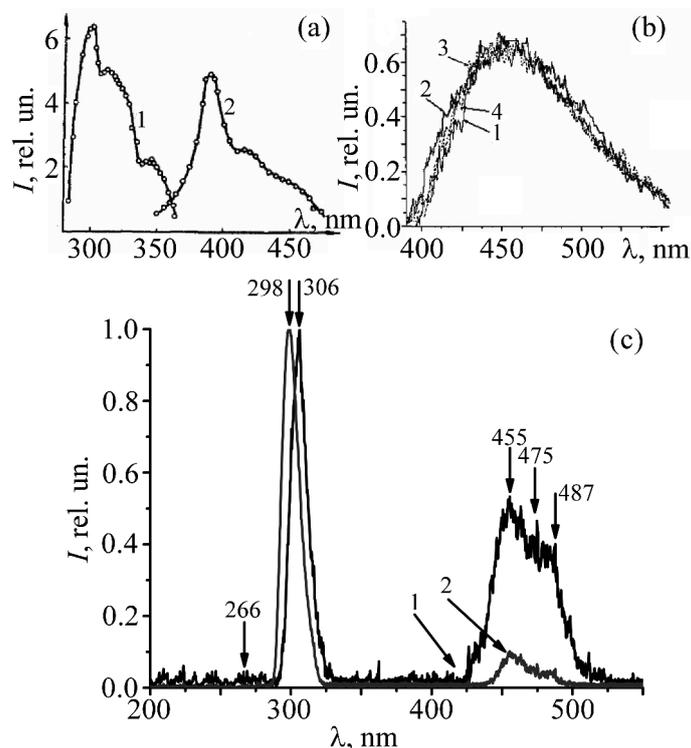


Рис. 2: Сравнение спектров вторичного излучения ДНК: (а) спектры фотолюминесценции раствора ДНК ( $pH = 7.1$ ) при возбуждении длинами волн 270 нм (1) и 320 нм (2) [18]; (б) спектры фотолюминесценции водных растворов ДНК (1) и родственных соединений (2 – 4) зарегистрированных при температуре 77 К [21]; (с) спектры вторичного излучения ДНК № 1(1) и ДНК № 2(2),  $\lambda_{ex} = 266$  нм.

интенсивность, чем для образца № 1. Из сравнения рис. 2((а)–(с)) следует, что использование лазера, генерирующего ультрафиолетовое излучение с длиной волны 266 нм, и фотонной ловушки приводит к существенному изменению вида спектров вторичного излучения ДНК, по сравнению со спектрами, возбуждаемыми ксеноновой лампой.

На рис. 3 показан спектр вторичного излучения высушенного АТФ, находящегося в фотонной ловушке (см. рис. 1). Спектр возбуждался ультрафиолетовым лазерным излучением (266 нм) лазера на  $YAG:Nd^{3+}$ . Как видно из этого рисунка, в спектре фотолюминесценции обнаруживается одна полоса с максимумом на длине волны 293 нм, близкая по длине волны к соответствующей полосе в ДНК (см. рис. 2(с)).

На рис. 4 приведен аналогичный спектр водного раствора (1 мг/л) АДФ. Из этого рисунка видно, что в спектре присутствует интенсивная полоса с максимумом в ультрафиолетовой области (305 нм), аналогичная максимуму, наблюдаемому в спектре фото-

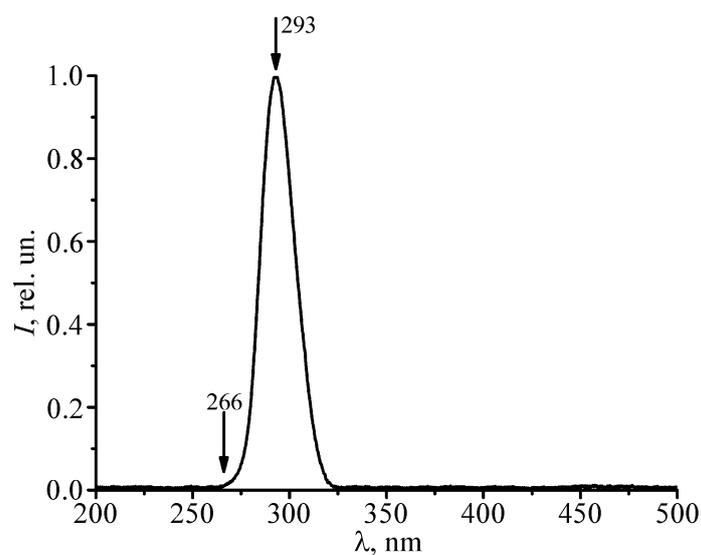


Рис. 3: Спектр вторичного излучения высушенного АТФ,  $\lambda_{\text{ex}} = 266$  нм.

люминесценции ДНК (см. рис. 2), а также два менее интенсивных максимума в синей области спектра. При этом спектр вторичного излучения водного раствора АДФ существенно отличается от соответствующего спектра водного раствора АТФ.

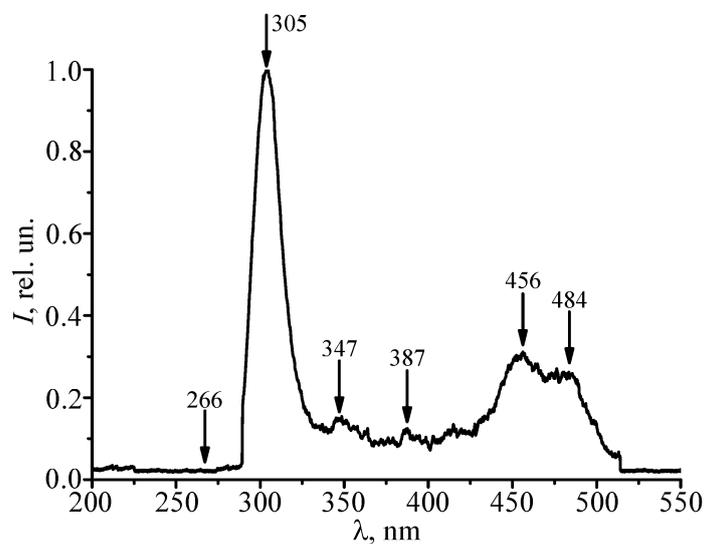


Рис. 4: Спектр вторичного излучения водного раствора 1 мг/л АДФ,  $\lambda_{\text{ex}} = 266$  нм.

В таблице 1 приведены литературные данные и результаты наших исследований спектров фотолюминесценции АТФ и АДФ.

Т а б л и ц а 1

Сравнение литературных и экспериментальных данных  
по спектрам вторичного излучения АТФ и АДФ

Соединение	Литературные данные		Наши данные
	[35]	[36]	
	Длина волны максимума интенсивности фотолюминесценции, нм		Длина волны максимума интенсивности фотолюминесценции, нм
АТФ	400	390	293
АДФ	390	390	305

Как видно из табл. 1, полученные в нашей работе спектры фотолюминесценции характеризуются присутствием интенсивного максимума в ультрафиолетовой области, аналогичного пикам интенсивности, присутствующих в ДНК.

Наблюдаемые эффекты перераспределения интенсивности в спектрах вторичного излучения исследуемых соединений можно объяснить переходом от режима спонтанной фотолюминесценции к режиму суперлюминесценции, реализуемому в фотонных ловушках при импульсно-периодическом лазерном возбуждении. Это обусловлено эффективным заселением возбуждённого синглетного терма ароматической молекулы под действием интенсивного импульсного ультрафиолетового лазерного излучения. Природа усиления в этом случае аналогична известному механизму в лазерах на красителях [40–44]. Коэффициент усиления при этом имеет вид:

$$K = \sigma \cdot (N_{S_1} - N_{S_0}) \approx \sigma \cdot N_{S_1}. \quad (1)$$

При условии, что величина эффективного сечения  $\sigma \sim 10^{-16} \text{ см}^2$ , а концентрация молекул в водном растворе  $N_{S_1} \sim 10^{17} - 10^{18} \text{ см}^{-3}$ , получаем, что коэффициент усиления  $K \sim 10 - 100 \text{ см}^{-1}$ . В соответствии с законом Бугера для активной среды имеем:

$$I(L) = I_0 \cdot e^{K \cdot L} \sim (10^2 - 10^3) \cdot I_0 \quad (2)$$

для  $L \sim 0.1 - 1 \text{ мм}$ . Выполненные оценки объясняют наблюдаемые особенности спектров фотолюминесценции ДНК, АТФ и АДФ, помещаемых в фотонные ловушки. Особенностью наблюдаемого эффекта является проявление суперлюминесценции в ультрафиолетовой области спектра, соответствующей переходу первого возбуждённого электронного синглетного терма в основное состояние в исследуемых веществах.

Наблюдаемый эффект суперлюминесценции представляет интерес для изучения возможностей лазерной генерации в биологических структурах.

Таким образом, в данной работе зарегистрированы спектры фотолюминесценции ДНК, АТФ и АДФ, находящихся в фотонных ловушках. Установлено, что использование фотонной ловушки и ультрафиолетового излучения приводит к существенному изменению спектра фотолюминесценции исследуемых соединений, обусловленному переходом от режима спонтанной фотолюминесценции к суперлюминесценции. На основе выполненных экспериментов делается вывод о возможности лазерной генерации в дезоксирибонуклеиновой кислоте и близких по структуре биологических соединениях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 14-02-00256, 12-02-00491, 13-02-00449, 13-02-90420, 14-02-00190).

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides and G. J. Thomas Jr, *Biophysical Journal* **71**, 3350 (1996).
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al., *Molecular Biology of the Cell* (New York, Garland Science, 2002).
- [3] J. M. Butler, *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers* (Academic Press, London, 2001).
- [4] J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 737 (1953).
- [5] J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer, *Biochemistry, 7th edition* (W. H Freeman and Company, New York, 2012).
- [6] A. Ghosh and M. Bansal, *Acta Crystallographica Section D* **59**, 620 (2003).
- [7] V. K. Fedyanin and L. V. Yakushevich, *Studia Biophysica* **103**, 171 (1984).
- [8] S. N. Volkov, *Journal of Theoretical Biology* **143**, 485 (1990).
- [9] M. D. Barkley and B. H. Zimm, *Journal of Chemical Physics* **70**, 2991 (1979).
- [10] K. C. Chou, *Biochemical Journal* **221**, 27 (1984).
- [11] R. H. Sarma, in: *Biomolecular stereodynamics: proceedings of a symposium held at the State University of New York at Albany* (Adenine Press, New York, 26 - 29 April 1981).
- [12] M. Tsuboi, Y. Tominaga, and H. Urabe, *The Journal of Chemical Physics* **78**, 991 (1983).

- [13] F. Lipmann, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1**, 99 (1941).
- [14] A. M. Michelson, *The chemistry of nucleosides and nucleotides* (Academic Press, London and New York, 1963).
- [15] В. Л. Кретович, К. Ф. Шольц, *Методы современной биохимии* (Наука, Москва, 1977).
- [16] M. M. Stimson and M. A. Reuter, *Journal of the American chemical society* **63**, 697 (1941).
- [17] A. Adrien and D. J. Brown, *Journal of the Chemical Society* **1954**, 2060 (1954).
- [18] A. N. Pisarevskii, S. N. Cherenkevich, and V. T. Andrianov, *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii* **5**, 621 (1966).
- [19] В. М. Ящук, *Особенности люминесценции ДНК и РНК. Материалы XIX Международной школы-семинара "Спектроскопия молекул и кристаллов"* (Украина, Крым, Береговое, 20–27 сентября 2009).
- [20] V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, S. M. Levchenko, and N. V. Yevtushenko, *Наукові записки НАУКМА: Серія Фізико-математичні науки* **61**, 39 (2007).
- [21] V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytskyu, et al., *Наукові записки НАУКМА: Серія Фізико-математичні науки* **51**, 48 (2006).
- [22] V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytskyu, et al., *Journal of Molecular Liquids* **127**, 79 (2006).
- [23] P. Vigny and A. Favre, *Photochemistry and Photobiology* **20**, 345 (1974).
- [24] J. P. Morgan and M. Daniels, *Photochemistry and Photobiology* **31**, 101 (1980).
- [25] V. M. Yashchuk, S. M. Yarmoluk, V. Yu. Kudrya, et al., *Advances in Optical Technologies* **2008**, 908246 (2008).
- [26] В. Б. Шевченко, О. І. Даценко, О. В. Шабликін и др., *Український біохімічний журнал* **84**, 74 (2012).
- [27] V. Boyko, G. Dovbeshko, O. Fesenko, et al., *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **535**, 30 (2011).
- [28] M. Ito, T. Kobayashi, Y. Ito, et al., *Appl. Phys. Lett.* **104**, 043102 (2014).
- [29] Youn Sun Kim, U Ra Lee, Jung Eun Lee, et al., *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **519**, 227 (2010).
- [30] C. J. Murphy, E. B. Brauns and L. Gearheart, *Material research society Processing* **452**, 597 (1996).

- [31] J. A. Cruz-Aguado, Y. Chen, Z. Zhang, et al., *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6878 (2004).
- [32] D. Miyamoto, Z. Tang, T. Takarada, and M. Maeda, *Chemical Communications* **45**, 4743 (2007).
- [33] H. A. Budz, M. M. Ali, Y. Li and R. R. LaPierre, *Journal of applied physics* **107**, 104702 (2010).
- [34] S. Massadeh and T. Nann, *Nanomaterials and Nanotechnology* **4**, 15 (2014).
- [35] E. Walaas, *Acta Chemica Scandinavica* **17**, 461 (1963).
- [36] Hans Chr. Børresen, *Acta Chemica Scandinavica* **17**, 921 (1963).
- [37] A. Kumar, P. Prasher and P. Singh, *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**, 3071 (2014).
- [38] C. M. Jabs, W. J. Ferrell, and H. J. Robb, *Clinical Biochemistry* **11**, 190 (1978).
- [39] M. W. Gorman, D. R. Marble, K. Ogimoto and E. O. Feigl, *Luminescence* **18**, 173 (2003).
- [40] B. B. McFarland, *Appl. Phys. Lett.* **10**, 208 (1967).
- [41] O. G. Peterson and B. B. Shanvely, *Appl. Phys. Lett.* **12**, 238 (1967).
- [42] O. Svelto, *Principles of Laser* (Plenum Publishing Co, USA, 1976).
- [43] Г. С. Ландсберг, *Оптика* (М., Наука, 1976).
- [44] Н. М. Годжаев, *Оптика* (М., Высшая школа, 1977).

Поступила в редакцию 27 октября 2014 г.