

09.1

Исследование спектров комплексного показателя преломления пленок мононуклеотидов на кремнии в терагерцевом диапазоне

© А.С. Кулагина¹, В.Н. Трухин², Д.Д. Ступин³, А.Л. Чернев⁴, М.В. Дубина⁵, Г.Э. Цырлин^{1–3,6}¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия³ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия⁴ Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland⁵ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия⁶ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: a.s.panfutova@gmail.com

Поступило в Редакцию 10 марта 2021 г.

В окончательной редакции 14 мая 2021 г.

Принято к публикации 26 мая 2021 г.

Впервые показана возможность получения спектров комплексного показателя преломления мононуклеотидов, осажденных в виде пленок на полированную кремниевую пластину, в терагерцевом (THz) диапазоне. С помощью THz-спектрометра измерено пропускание образцов биополимеров. Определены собственные частоты поглощения и спектр показателя преломления аденозина в терагерцевом диапазоне.

Ключевые слова: ДНК, терагерцевая спектроскопия, безметочный метод регистрации собственных частот поглощения олигонуклеотидов, технологии на кремнии.

DOI: 10.21883/PJTF.2021.17.51383.18757

Частотную дисперсию оптических параметров ДНК сегодня исследуют, применяя комбинационное рассеяние света, инфракрасную Фурье-спектроскопию, терагерцевую времязрешенную спектроскопию. Собственные частоты поглощения олигонуклеотидов лежат в THz-диапазоне [1]. В [1] показано, что из таких спектров может быть получена информация о вторичной и третичной структуре олигонуклеотидов. Недостатками современных методов секвенирования являются накопление ошибок при использовании дополнительного звена в виде флуоресцентного красителя, неточность сбора данных при исследовании гомополимерных олигонуклеотидных молекул, некорректный анализ образцов с олигонуклеотидными полиморфизмами [2]. В настоящей работе впервые реализован простой метод прямого нанесения олигонуклеотидов из исходных растворов на кремниевую подложку для последующего получения спектров собственных частот поглощения мононуклеотидов без использования модификаторов, флуоресцентных меток и красителей в режиме реального времени при комнатной температуре.

Объектом исследований являлись мононуклеотиды (dATP — аденозинтрифосфат, dTTP — тимидинтрифосфат, dGTP — гуанозинтрифосфат, dCTP — цитидинтрифосфат), синтезированные в ООО „ДНК-Синтез“ (Москва). В качестве подложек использовались нелегированные полированные с обеих сторон кремниевые пластины (100) толщиной 350 μm . Подложки были подготовлены по стандартной процедуре с использованием изопропилового спирта, дистиллированной деионизиро-

ванной воды и ацетона. В процессе пробоподготовки было замечено, что однородность осажденной капельным способом пленки напрямую зависит от концентрации мононуклеотидов и температуры подложки (рис. 1). На рис. 1, *a* представлен результат осаждения мононуклеотидов на подложку, охлажденную до температуры -80°C , которая обычно используется в технологии выделения ДНК в режиме шоковой заморозки [3]. Однако лучшего смачивания капель подложки удалось добиться, когда температура подложки равнялась комнатной (рис. 1, *b*). Отметим, что ранее при комнатной температуре были исследованы образцы ДНК-оснований, спрессованных в таблетку с порошком полиэтилена толщиной 200–400 μm [4]. В наших исследованиях наиболее однородный слой мононуклеотидов на кремнии был получен при следующих условиях: раствор dATP в деионизированной воде, имеющий концентрацию 0.05 М, в объеме 50 μl осаждался на кремниевую пластину при комнатной температуре, а затем высушивался в лиофильной камере Alfa 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) на протяжении 4–5 h (рис. 1, *b*, ряд 2).

Оптические измерения пленки, изображенной на рис. 1, *b* в ряду 2, проводились с помощью THz-спектрометра (рабочий диапазон 0.1–3 THz), подробное описание которого представлено в работе [5]. Регистрировались волновые формы THz-импульсов, прошедших через чистую кремниевую подложку и через нее же, но с осажденными олигонуклеотидами. Ввиду того что образцы (пленки мононуклеотидов) имели малую толщину (около 20 μm), для снижения погрешности для

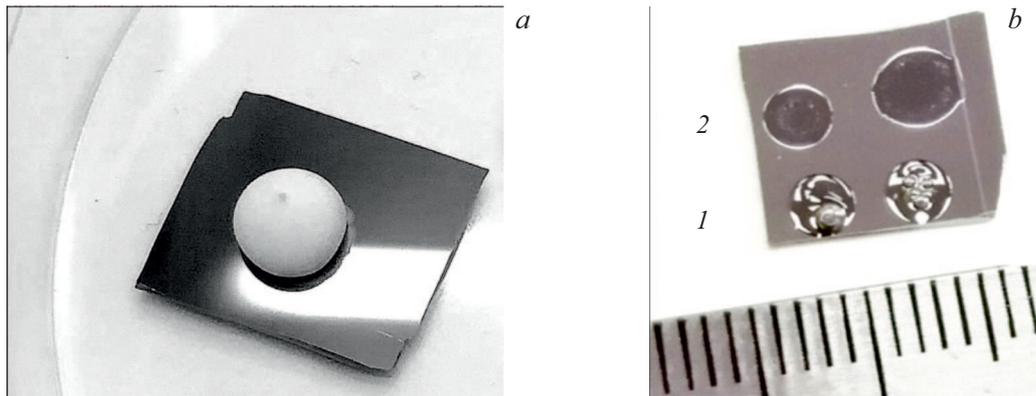


Рис. 1. Фотографии мононуклеотидов dATP, осажженных на кремниевую пластину. *a* — пластина охлаждена до -80°C ; *b* — при комнатной температуре: в ряду *1* концентрация составляет 0.5 М, в ряду *2* — 0.05 М; шаг линейки 1 мм.

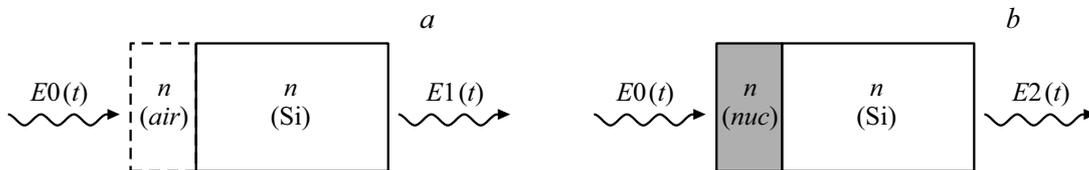


Рис. 2. Схема распространения THz-излучения через образцы. $E_0(t)$ — поле входной волны, $E_1(t)$, $E_2(t)$ — поля волны, прошедшей через слой воздуха и нуклеотидов соответственно.

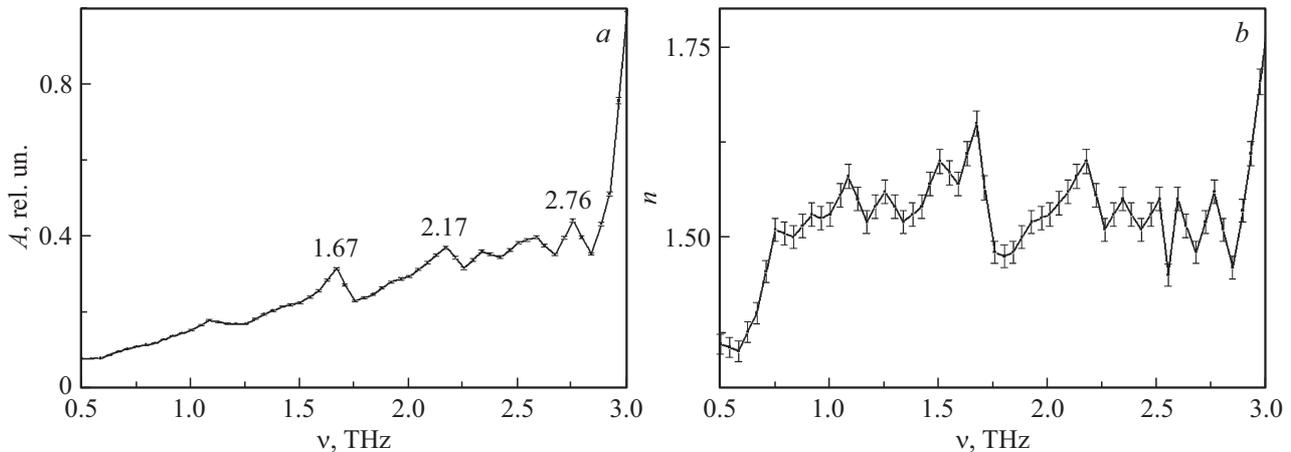


Рис. 3. Нормированный спектр поглощения (*a*) и дисперсия показателя преломления (*b*) мононуклеотидов dATP на кремнии. Вертикальными отрезками показана величина погрешности.

каждого типа нуклеотидов использовалась своя подложка. Частотные характеристики спектров показателя преломления и поглощения определялись с помощью преобразования Фурье волновой формы нормированного дифференциального сигнала. Комплексный показатель преломления пленки нуклеотидов рассчитывался по известной из эксперимента зависимости амплитуды THz-импульса, прошедшего через образцы чистой подложки Si (рис. 2, *a*) и подложки с осажженными нуклеотидами (рис. 2, *b*).

Учитывая, что поглощение THz-излучения в Si мало, а толщина биополимера мала по сравнению с длиной

волны, выражение для изменения пропускания за счет слоя нуклеотидов можно записать в виде [6]:

$$\frac{E_2(\omega) - E_1(\omega)}{E_1(\omega)} = T(\omega) = i \frac{\omega d}{c(n_{\text{Si}} + 1)} (\hat{n}_{\text{nuc}}^2 - 1). \quad (1)$$

Здесь ω — круговая частота падающего излучения, d — толщина слоя нуклеотидов, $E_2(\omega)$ и $E_1(\omega)$ — Фурье-образы THz-импульсов $E_2(t)$ и $E_1(t)$, c — скорость света, n_{Si} — показатель преломления кремниевой пластины, n_{nuc} — показатель преломления нуклеотидов ($\hat{n}_{\text{nuc}}^2 = \epsilon'_{\text{nuc}} + i\epsilon''_{\text{nuc}}$, где ϵ'_{nuc} и ϵ''_{nuc} — действительная и мнимая части диэлектрической проницаемости для

случая нормального падения). По определению относительную дифференциальную величину пропускания $T(\omega)$ можно представить в виде $T(\omega) = \rho(\omega)e^{i\Delta(\omega)}$, где ρ и Δ — амплитуда и фаза Фурье-спектра дифференциального нормированного сигнала. Соответственно коэффициент поглощения и показатель преломления мононуклеотидов можно выразить через действительную и мнимую части диэлектрической проницаемости [7], которые определяются, согласно (1), как

$$\begin{aligned}\varepsilon'_{nuc} &= 1 + \frac{c}{\omega d} (n_{Si} + 1) \rho \sin \Delta, \\ \varepsilon''_{nuc} &= -\frac{c}{\omega d} (n_{Si} + 1) \rho \cos \Delta.\end{aligned}\quad (2)$$

В исследуемом диапазоне частот показатель преломления Si оставался постоянным и равным по величине 3.42 [8]. С помощью выражений (1) и (2) исходя из экспериментальных результатов нами были определены собственные частоты поглощения и спектр показателя преломления пленки dATP на кремнии (рис. 3).

Как видно из сравнения со спектрами dATP, полученными в работе [4], основные полосы поглощения, а также величина показателя преломления в пределах разрешения эксперимента совпадают. Аналогичные спектры были получены для пленок dTTP, dGTP, dCTP и показали хорошее совпадение с литературными данными.

Практическая ценность работы заключается в расширении способов характеристики олигонуклеотидов в ТГц-диапазоне частот без использования модификаторов, флуоресцентных меток и красителей в режиме реального времени при комнатной температуре.

Финансирование работы

Экспериментальные исследования проведены при поддержке субсидии Комитета по науке и высшей школе Санкт-Петербурга молодым ученым 2019 г. Содержательная часть работы выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-72-30020.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D.L. Woolard, W.R. Loerop, M.S. Shur, *Terahertz sensing technology volume: emerging scientific applications and novel device concepts* (World Scientific, Singapore, 2004), vol. 2.
- [2] E.R. Mardis, *Ann. Rev. Anal. Chem.*, **6** (1), 287 (2013). DOI: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- [3] S. Viale-Bouroncle, M. Gosau, C. Morsczeck, *Arch. Oral Biology*, **59** (12), 1249 (2014). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.07.013
- [4] B.M. Fischer, M. Walther, P.U. Jepsen, *Phys. Med. Biol.*, **47** (21), 3807 (2002). DOI: 10.1088/0031-9155/47/21/319
- [5] В.Н. Трухин, А.Д. Буравлёв, И.А. Мустафин, Г.Э. Цырлин, Д.И. Курицын, В.В. Румянцев, С.В. Морозов, J.P. Kakko, T. Huhtio, H. Lipsanen, *ФТП*, **50** (12), 1561 (2016). DOI: 10.1134/S1063782616120241
- [6] A.V. Andrianov, A.N. Aleshin, V.N. Trukhin, A.V. Bobylev, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **44** (26), 265101 (2011). DOI: 10.1088/0022-3727/44/26/265101
- [7] М. Борн, Э. Вольф, *Основы оптики* (Наука, М., 1973).
- [8] J. Dai, J. Zhang, W. Zhang, D. Grishkovskii, *J. Opt. Soc. Am. B*, **21** (7), 1379 (2004). DOI: 10.1364/JOSAB.21.001379