

проблемного комплекса, состоящего как из мини-ЭВМ, так и из больших ЭВМ. Наличие соответствующего функционального обеспечения позволяет создавать небольшие вычислительные системы диагностики с доступными для лечебно-профилактических учреждений режимами эксплуатации.

*Поступила в редакцию 7 августа 1979 г.;
окончательный вариант — 20 ноября 1980 г.*

УДК 578.088.5

**А. Л. КОЗИОНОВ, С. Ю. НОВОЖИЛОВ, В. Е. СОЛОБОЕВ,
М. И. ШТОКМАН**
(Новосибирск)

СВЕТОИНДУЦИРОВАННАЯ ДИФФУЗИЯ ДНК: ТЕОРИЯ И АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

1. Введение. Изучение взаимодействия мощного лазерного света с ДНК весьма важно как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Особый интерес представляет метод селективного лазерного воздействия на заданный тип макромолекул или на заданные участки макромолекулы, предложенный в [1]. Этот метод основывается на возможности селективной окраски макромолекул (в частности, ДНК) с помощью специфических красителей с последующим облучением мощным лазерным светом видимого или ближнего ультрафиолетового (УФ) диапазона. Такой свет ДНК непосредственно не поглощается, а красителем, фиксированным на макрополе, поглощается квазирезонансно. Поглощение молекулой красителя двух квантов света приводит к ее возбуждению в высшее синглетное состояние с энергией 6—7 эВ. Кванты такой энергии интенсивно поглощаются ДНК. Поэтому со значительной вероятностью происходит безрадиационный перенос возбуждения с молекулы красителя на пространственно близкие к ней участки ДНК. Оценки [1] показывают, что первичный акт возбуждения ДНК происходит в окрестности нескольких ангстремов вокруг молекулы красителя. Переданной ДНК энергии достаточно для эффективного разрыва любой химической связи.

Осуществление описанного процесса в эксперименте [2, 3] привело к обнаружению нового явления — нелинейного лазерного фоторазрезания (НЛР) ДНК. При облучении ДНК, окрашенной специфическим (для ДНК) красителем 8-метоксипсораленом (8-МОП), с высоким квантовым выходом наблюдаются разрывы ДНК на фрагменты. Этот процесс оказался существенно нелинейным по интенсивности возбуждающего света в соответствии с теоретическими предсказаниями [1, 3].

Обнаружение НРЛ сразу же выявило ряд проблем экспериментального плана. Это явление было идентифицировано в [2, 3] с помощью гель-электрофореза, который как инструмент исследования НЛР обладает существенными недостатками. Во-первых, гель-электрофорез — медленный метод: время, необходимое для измерения, — от нескольких часов до суток. Поэтому он непригоден для детального исследования НРЛ, когда необходимо провести большое число экспериментов. Во-вторых, гель-электрофорез является возмущающим методом. По этой причине эксперименты [2, 3] не могли дать ответа на фундаментальный вопрос, который

всегда возникает при изучении воздействия света на ДНК (ср. [4]): приводит ли облучение к возникновению в ДНК разрывов или только слабых связей, которые впоследствии могут рваться при внешних возмущающих воздействиях, например при гель-электрофорезе.

Таким образом, для исследования НЛР необходим невозмущающий оперативный метод, который давал бы информацию о распределении молекул ДНК по размерам.

Среди известных до настоящего времени методов этим требованиям отчасти удовлетворяет только корреляционная спектроскопия рассеянного света (см., например, [5]). Однако в приложении к исследованию ДНК этот метод не лишен серьезных недостатков, которые являются следствием неселективности светорассеяния по типам рассеивающих частиц, малой величины светорассеяния на молекулах ДНК и малой величины сдвигов частоты в этом случае. Для проведения экспериментов на ДНК с использованием корреляционной спектроскопии необходимы сравнительно концентрированные растворы ДНК высокой чистоты; одновременное присутствие других макромолекул недопустимо. Требуется также обеспечить хорошую виброзащитенность установки, высокую стабильность и мощность источника света.

Мы предлагаем положить в основу исследования НЛР новый нелинейно-оптический эффект — светоиндуцированную диффузию (СИД) ДНК. Этот эффект, предсказанный и обнаруженный в [6, 7], тесно связан с явлением НЛР.

СИД ДНК возникает, если некоторый объем в растворе ДНК облучен лазерным светом в условиях, когда происходит НЛР. Тогда в этом объеме ДНК разрезается с образованием более коротких молекул, которые по сравнению с исходными имеют более высокие значения коэффициента диффузии D . Поэтому разрезанные молекулы диффундируют из облученного объема быстрее, чем туда успевают проникнуть целые молекулы из соседних областей. Вследствие этого после начала облучения через время порядка $\tau_D = a^2/4D$, где a — характерный (минимальный) размер облученного объема, формируется провал оптической плотности в облученном объеме. Поскольку ДНК не обесцвечивается фотохимически, то в соседних с облученным объемом областях образуется повышение оптической плотности ДНК.

Как пространственно-временные особенности эффекта СИД ДНК, так и его величина тесно связаны с характеристиками НЛР. В частности, время, за которое формируется провал, и его величина дают возможность узнать, какой процент молекул ДНК разрезан и сколько разрезов приходится на одну молекулу; по характеру поведения на больших расстояниях от облученной области можно получить информацию о наиболее коротких фрагментах ДНК и т. п. В принципе, измерение эффекта СИД ДНК после короткого облучения во многих пространственно-временных точках позволяет реконструировать распределение по размерам молекул ДНК, образовавшихся в результате НЛР.

В реальных экспериментальных условиях [6, 7] для получения детальной информации о СИД ДНК необходимо регистрировать оптическую плотность ДНК с погрешностью не более 1% при пространственном разрешении на уровне нескольких микрометров, размере области сканирования порядка миллиметра и затратах времени на измерение одной пространственной зависимости не более одной минуты. Эти требования, в частности, обусловлены размерами фокального пятна (десятки микрометров) и характерным временем развития эффекта (≈ 10 мин). Таким образом, затраты времени на измерение одной точки должны быть $\sim 0,1$ с.

Единственная возможность удовлетворить указанным требованиям — применить автоматизированную систему обработки, хранения, отображения информации и управления экспериментом на базе использования ЭВМ.

Принципиальные преимущества автоматизации становятся совершенно очевидными при сравнении результатов двух первых экспериментов, в которых был обнаружен эффект СИД ДНК: «ручного» эксперимента [6] и автоматизированного [7].

Цель настоящей работы — развить теорию эффекта СИД ДНК, описать автоматизированную установку для его исследования и представить основные качественные особенности этого эффекта, обнаруженные в автоматизированном эксперименте. В п. 2 приведена теория эффекта, в п. 3 описана оптико-механическая часть установки, в п. 4 — ее электронная часть и основные алгоритмы работы, в п. 5 представлены и обсуждены качественные проявления эффекта.

2. Теоретическое описание эффекта СИД ДНК. В этом разделе мы приведем теоретическое описание эффекта в форме, позволяющей легко осуществлять качественную интерпретацию экспериментальных данных.

Рассмотрим кинетическую постановку эксперимента, когда НЛР длится малое время по сравнению с характерным временем τ_D диффузии молекул ДНК из облученного объема. Такая постановка обладает существенным преимуществом: образующееся в процессе НЛР распределение молекул ДНК не успевает размыться за время облучения, и при последующем измерении оптической плотности могут быть зарегистрированы диффузионные явления во всей пространственно-временной области. Для простоты описания примем также предположение о монодисперсности исходного раствора ДНК, т. е. о том, что все неразрезанные молекулы ДНК имеют одинаковый коэффициент диффузии D_0 . Это предположение в нашем эксперименте выполняется.

При описании СИД ДНК следует учесть, что молекулы ДНК в среднем однородны по их длине и в наших условиях равномерно окрашены. Вследствие этого при НЛР образуются молекулы ДНК со случайными длинами, так как появление разрывов в любом участке молекулы равновероятно. Далее учтем, что коэффициент диффузии D длинной линейной молекулы ДНК с хорошей точностью обратно пропорционален ее длине (молекулярному весу), и введем относительную длину молекулы $l \equiv D_0/D$, которая изменяется в пределах от 0 до 1. Основной характеристикой НЛР в указанных условиях является распределение $P(\mathbf{r}, l)$ концентрации молекул ДНК в точке \mathbf{r} по их размерам l , возникающее к концу лазерного облучения. Распределение массовой плотности, очевидно, имеет вид $lP(\mathbf{r}, l)$; оно нормировано с учетом сохранения полной длины (массы) всех молекул при НЛР:

$$\int_0^1 lP(\mathbf{r}, l) dl = 1. \quad (1)$$

На качественные проявления СИД ДНК существенно влияет эффект гиперхромизма (повышение оптической плотности в полосе поглощения 256 нм) ДНК при НЛР, установленный в [7]. Как известно [8, 9], гиперхромизм ДНК возникает при нарушении ее исходной (нативной) структуры — расплетании двойной спирали Уотсона — Крика в результате химической или тепловой денатурации. Отметим, что указание на заметный ($\approx 5\%$) гиперхромизм ДНК при НЛР впервые было получено методом дифференциальной спектрофотометрии еще в работах [2, 3]. Ниже мы представим феноменологическое описание гиперхромизма ДНК при НЛР, из которого следует, что этот эффект несет существенную информацию о кинетике накопления разрывов в ДНК.

Чтобы понять причину возникновения гиперхромизма при НЛР, рассмотрим физическую картину [1—3] этого процесса. Энергии, переданной ДНК в одном акте, достаточно для эффективного разрыва только одной химической связи. Поэтому при облучении сначала появляются

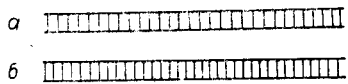


Рис. 1. Схематическое изображение расплетания ДНК в результате возникновения однонитевого разрыва:

поперечные линии изображают связи Уотсона — Крика; а — исходная (нативная) структура, б — на одной нити возник разрыв. * — вокруг разрыва молекула расплелась. спираль ДНК частично (флуктуационно) расплетается в пределах некоторой длины * $L_0 \approx 20$, определяемой свободной энергией связей Уотсона — Крика. Этот процесс схематически изображен на рис. 1. При локальном расплетании спирали параллельность плоскостей оснований — так называемый стэкинг — нарушается, что и вызывает гиперхромизм.

Рассмотрим случай не слишком больших доз облучения, когда вероятность совпадения (в пределах длины $\sim L_0$) двух однонитевых разрывов невелика, т. е. когда

$$N_1 L_0 / L_M \ll 1, \quad (2)$$

где N_1 — число разрывов на нить, $L_M \approx 4 \cdot 10^4$ — длина молекулы ДНК. Тогда, очевидно, гиперхромизм аддитивен по числу однонитевых разрывов и суммарная длина расплетенных участков молекулы $\approx 2N_1 L_0$. Поэтому относительное повышение оптической плотности в результате НЛР есть

$$\Delta \varepsilon / \varepsilon_0 = \alpha 2N_1 L_0 / L_M, \quad (3)$$

где α — феноменологическая константа гиперхромизма, оценка которой по максимальной величине этого эффекта $\Delta \varepsilon / \varepsilon_0 \approx 0,4$, наблюдавшейся при денатурации ДНК [8], составляет $\sim 0,4$. Отметим, что величина $\Delta \varepsilon / \varepsilon_0$ не зависит от длины молекулы (поскольку $N_1 \sim L_M$) и определяется только условиями облучения. Из (3) следует, что дифференциальное распределение $P_\varepsilon(\mathbf{r}, l)$ оптической плотности молекул по l имеет вид

$$P_\varepsilon(\mathbf{r}, l) = [1 + 2\alpha N_1(\mathbf{r}) L_0 / L_M] l P(\mathbf{r}, l). \quad (4)$$

Решение диффузионной задачи легко найти, если рассмотреть диффузию молекул с заданной длиной l , принимая (4) за начальное условие, а затем проинтегрировать по l . В результате для оптической плотности ДНК $\varepsilon(\mathbf{r}, t)$ в момент времени t после облучения получаем

$$\varepsilon(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \int_0^1 dl \int d^3 r' G_l(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t) P_\varepsilon(\mathbf{r}', l); \quad (5)$$

$$G_l(\mathbf{r}, t) = (l/4\pi D_0 t)^{3/2} \exp\{-\mathbf{r}^2/4D_0 t\}.$$

Выражение для $N_1(\mathbf{r})$ дано в [1, 3]. Полезно выразить эту величину через важную физическую характеристику НЛР $P_\varepsilon(\mathbf{r})$ — долю молекул ДНК, разрезанных при облучении [3]. В приближении (2) получается выражение, эквивалентное (4):

$$P_\varepsilon(\mathbf{r}, l) = (1 + \alpha \sqrt{(2L_0/L_M) \ln[1 - P_\varepsilon(\mathbf{r})]}) l P(\mathbf{r}, l). \quad (6)$$

Нелинейность связи между $N_1(\mathbf{r})$ и $P_\varepsilon(\mathbf{r})$ отражает нелинейность кинетики накопления разрезов (двунитевых разрывов) ДНК, которые возникают при случайном совпадении двух однонитевых разрывов на противоположных (комплементарных) нитях ДНК [2, 3]. Отметим, что условие (2)

* Все длины вдоль молекулы ДНК будем измерять в числах пар оснований.

в силу соотношения $L_m \gg L_0$ не накладывает, вообще говоря, существенных ограничений на величину P_s , которая может быть любой в пределах от 0 до 1.

Для описания СИД ДНК в замкнутой форме осталось определить $P(\mathbf{r}, l)$. Рассмотрим здесь только простой случай малой вероятности разрезания $P_s \ll 1$. Тогда наличие двух разрезов в одной молекуле маловероятно, и, поскольку разрезание происходит в случайном месте, распределение разрезанных молекул по l является однородным. Выражение для $P(\mathbf{r}, l)$, нормированное согласно (1), в этом случае имеет вид

$$P(\mathbf{r}, l) = 2P_s(\mathbf{r})\Theta(1-l)\Theta(l) + [1 - P_s(\mathbf{r})]\delta(1-l), \quad (7)$$

в котором первое слагаемое соответствует разрезанным, а второе — целым молекулам.

Подставляя (6), (7) в (5) и удерживая ведущие члены по параметру P_s , представим относительное изменение оптической плотности в процессе СИД ДНК в виде суммы двух слагаемых:

$$\begin{aligned} \Delta\varepsilon(\mathbf{r}, t)/\varepsilon_0 &\equiv (\varepsilon(\mathbf{r}, t) - \varepsilon_0)/\varepsilon_0 = A_1(\mathbf{r}, t) + A_2(\mathbf{r}, t); \\ A_1(\mathbf{r}, t) &= \int d^3r' P_s(\mathbf{r}') [1 + \alpha \sqrt{2P_s(\mathbf{r}') L_0/L_m}] [\bar{G}(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t) - G_1(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t)]; \\ A_2(\mathbf{r}, t) &= \alpha \int d^3r' G_1(\mathbf{r} - \mathbf{r}', t) \sqrt{2P_s(\mathbf{r}') L_0/L_m}; \\ \bar{G}(\mathbf{r}, t) &\equiv 2 \int_0^1 l G_1(\mathbf{r}, t) dl. \end{aligned} \quad (8)$$

В (8) вклады, пропорциональные \bar{G} , описывают диффузию разрезанных молекул ДНК, пропорциональные G_1 , — целых молекул, а вклады, пропорциональные α , — гиперхромный эффект.

Основные качественные проявления гиперхромизма при СИД ДНК [7] — увеличение оптической плотности при малых временах и положительный пространственный интеграл $\int \Delta\varepsilon(\mathbf{r}, t) d^3r$. Эти проявления целиком описываются слагаемым A_2 в (8), поскольку

$$\begin{aligned} A_1(\mathbf{r}, 0) &= 0, \quad \int d^3r' A_1(\mathbf{r}', t) = 0; \\ A_2(\mathbf{r}, 0) &= \alpha \sqrt{2P_s(\mathbf{r}) L_0/L_m}, \quad \int A_2(\mathbf{r}, t) d^3r = \alpha \int d^3r \sqrt{2P_s(\mathbf{r}) L_0/L_m}. \end{aligned} \quad (9)$$

Таким образом, члены, пропорциональные α в $A_1(\mathbf{r}, t)$, представляют собой качественно несущественную малую поправку и будут далее опускаться. Получающийся результат просто интерпретировать: при $P_s \ll 1$ основной вклад в гиперхромизм дают неразрезанные молекулы.

Чтобы выразить $\Delta\varepsilon(\mathbf{r}, t)$ в аналитической форме, учтем, что величина $P_s(\mathbf{r})$ отлична от нуля только внутри облученного объема, и параметризуем ее в виде

$$P_s(x) = P_0 \exp(-x^2/a^2), \quad (10)$$

где x — координата поперек возбуждающего пучка, $P_0 = \text{const}$ — доля разрезанных молекул в центре облученной области, a — характерный поперечный размер этой области. Принятая одномерная геометрия соответствует нашим экспериментальным условиям. Используя вид (10), из (8) получаем

$$\Delta\varepsilon(x, t)/\varepsilon_0 = P_0 \left\{ 2 \int_0^1 l F(t/l, x) dl - F(t, x) + \alpha \sqrt{2L_0/L_m P_0} F(t/2, x/\sqrt{2}) \right\}; \quad (11)$$

$$F(t, x) \equiv (1 + t/\tau_D)^{-1/2} \exp\{-(x/a)^2(1 + t/\tau_D)^{-1}\}, \quad \tau_D \equiv a^2/4D_0.$$

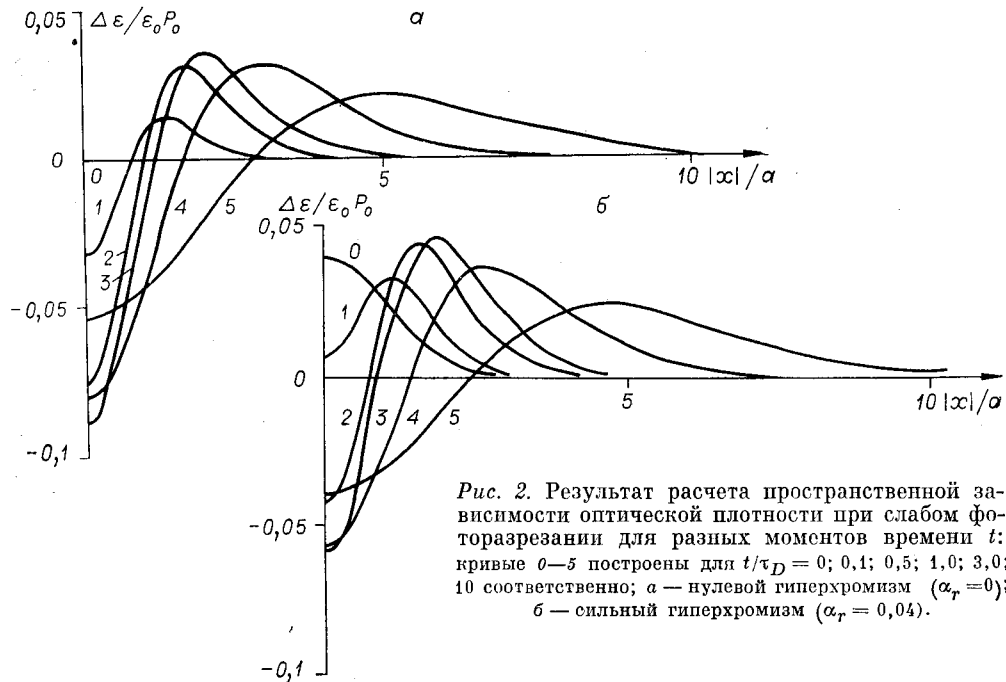


Рис. 2. Результат расчета пространственной зависимости оптической плотности при слабом фоторазрезании для разных моментов времени t : кривые 0–5 построены для $t/\tau_D = 0; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 10$ соответственно; а — нулевой гиперхромизм ($\alpha_r = 0$); б — сильный гиперхромизм ($\alpha_r = 0,04$).

Как следует из этого результата, форма зависимости $\Delta\epsilon(x, t)$ определяется одним параметром $\alpha_r = \alpha\sqrt{2L_0/L_N P_0}$ (относительным гиперхромизмом), а величина $|\Delta\epsilon|$ пропорциональна P_0 . Таким образом, влияние гиперхромизма на форму зависимости $\Delta\epsilon(x, t)$ сильнее при слабом облучении ($P_0 \rightarrow 0$), но в этом случае падает величина $|\Delta\epsilon(x, t)|$. Физически это объясняется тем, что гиперхромизм — линейный по дозе облучения эффект, а НЛР в рассматриваемом случае — эффект, квадратичный по дозе (ср. (4) и (6)), поскольку обусловлен совпадением двух односторонних разрывов.

Возникающий в (11) интеграл не выражается в стандартных функциях. На рис. 2, а приведен результат численного расчета для нулевого гиперхромизма ($\alpha_r = 0$). Как видно, в начальный момент времени $\Delta\epsilon = 0$, затем происходит быстрое возрастание $|\Delta\epsilon|$, достигающее максимума при $t \approx 1,5 \tau_D$. При этом формируются провал оптической плотности в центре и пики по краям облученной области в соответствии с качественным рассмотрением. При $t \gg \tau_D$ величина $|\Delta\epsilon|$ медленно падает, причем пики размываются быстрее провала, поскольку их расплывание обусловлено диффузией разрезанных молекул, а залечивание центрального провала — диффузией целых молекул. Во все моменты времени площадь под кривой $\Delta\epsilon(x)$ равна нулю. Описанная картина соответствует не «выжиганию» (фотохимическому обесцвечиванию) ДНК, а ее диффузионному «выталкиванию» из облученного объема.

Влияние гиперхромизма легко понять при сравнении описанной выше картины с результатом расчета для $\alpha_r = 0,04$, приведенным на рис. 2, б. При наличии гиперхромизма в начальный момент времени после облучения виден пик оптической плотности в облученном объеме. Затем в центре этого пика образуется провал, который быстро углубляется и расширяется, поглощая пик. Одновременно формируются боковые пики оптической плотности, которые здесь выражены несколько сильнее, чем на рис. 2, а, в то время как центральный провал заметно меньше. В целом гиперхромизм уменьшает максимальный контраст пространственной структуры $\Delta\epsilon(x, t)$. При больших временах развитие эффекта подобно

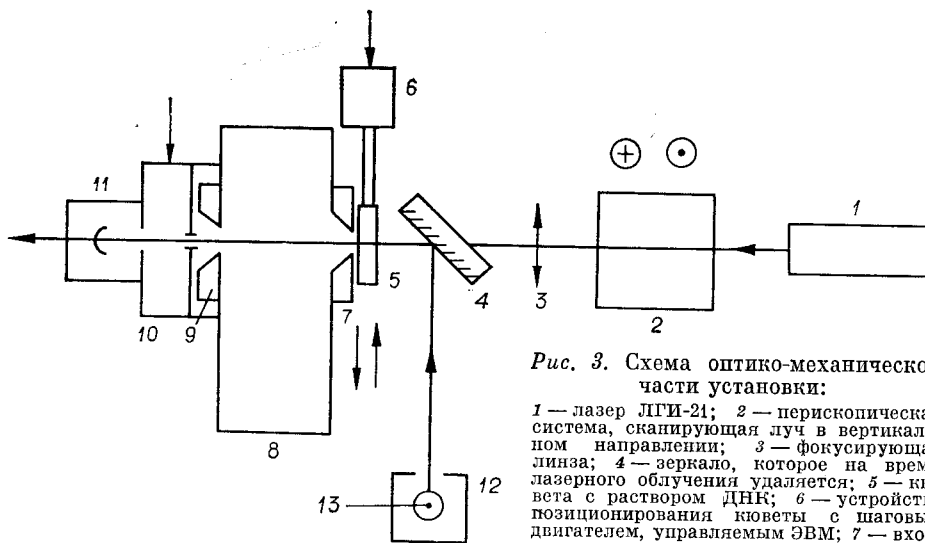


Рис. 3. Схема оптико-механической части установки:

1 — лазер ЛГИ-21; 2 — перископическая система, сканирующая луч в вертикальном направлении; 3 — фокусирующая линза; 4 — зеркало, которое на время лазерного облучения удаляется; 5 — кювета с раствором ДНК; 6 — устройство позиционирования кюветы с шаговым двигателем, управляемым ЭВМ; 7 — входная щель монохроматора; 8 — монохроматор СРМ-2 (Карл Цейсс, Йена); 9 — выходная щель монохроматора; 10 — затвор, разделяющий основной и опорные лучи, управляемый ЭВМ; 11 — фоторегистратор (ФЭУ-39); 12 — корпус лампы с диафрагмой; 13 — ртутная лампа ПРК-2.

приведенному на рис. 2, а, но площадь под кривой $\Delta\epsilon(x)$ положительна в соответствии с (9).

Результаты, представленные на рис. 2, б, отвечают сильному относительно гиперхромизму, поскольку при этом $P_0 = 2\alpha^2 L_0 / \alpha_r^2 L_M \sim 0,1$ и величина эффекта очень мала. При больших значениях α_r эффект становится труднонаблюдаемым. Поэтому в реальном эксперименте картина должна быть промежуточной между рис. 2, а и б.

Описанные выше качественные особенности и количественные зависимости позволяют однозначно идентифицировать в эксперименте проявления СИД ДНК и получить количественную информацию об этом эффекте. Вместе с тем они предъявляют жесткие требования к точности, разрешению и быстродействию описываемой ниже экспериментальной установки.

3. Оптико-механическая часть установки. Экспериментальная установка позволила осуществить НЛР и непосредственно после этого измерить пространственно-временную зависимость оптической плотности ДНК на длинах волн спектральных линий ртути. Схема оптико-механической части приведена на рис. 3.

В ходе эксперимента сначала в течение нескольких минут проводилось НЛР. В качестве источника света применялся N_2 -лазер ЛГИ-21; длина волны излучения 337 нм, частота повторения импульсов 100 Гц, средняя мощность 2,6 мВт. Излучение лазера через сканирующий перископ с фокусирующей линзой (фокусное расстояние 3 см) направлялось в кювету с раствором ДНК (оптическая толщина на длине волны лазера 0,13). Диаметр луча в фокусе ≈ 60 мкм, длина фокальной перетяжки превышала толщину кюветы. Использовалась ДНК из фага $T7^+$ (молекулярный вес $M_w \approx 10^7$) в концентрации $C_{DNA} = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (по основаниям), окрашенная кумариновым красителем 8-метоксипсораленом (8-МОП) в концентрации $C_D = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

С помощью сканирующего перископа фокальное пятно совершало возвратно-поступательное движение в плоскости кюветы (период 5 с, линейная скорость 0,4 см/с) параллельно щели монохроматора, которая

располагалась непосредственно за кюветой. При этом облучалась зона шириной ≈ 60 мкм и высотой 1 см. Сканирование при НЛР позволило на два порядка увеличить количество света, проходящего через облученный объем при измерении оптической плотности, по сравнению с тем, что было бы при неподвижном фокальном пятне. Кроме того, использованный способ облучения обеспечивал условия одномерной диффузии, при которой изменения плотности размываются значительно медленнее ($\Delta\varepsilon/\varepsilon \sim \sim 1/\sqrt{t}$), чем при двумерной диффузии ($\Delta\varepsilon/\varepsilon \sim 1/t$), которая имела бы место при неподвижном фокусе. Это значительно облегчило экспериментальное обнаружение эффекта СИД ДНК.

Поскольку НЛР — существенно нелинейный процесс [5], то весьма важной была точная фокусировка луча. Для ее контроля измерялась плотность мощности в фокусе с помощью эффекта нелинейной фотодеградации красителя [10] при замене кюветы с ДНК на кювету с раствором другого кумаринового красителя 4-метилумбеллиферона (4-МУ).

После проведения НЛР лазер выключался и включалась система регистрации. Измерение оптической плотности проводилось по двухлучевой схеме с одним фотодетектором. Источником света при измерении являлась ртутная лампа ПРК-2, питаемая стабилизированным постоянным током (2,5 А). Для увеличения интенсивности жестких УФ-линий и улучшения стабильности лампа охлаждалась вентилятором. Излучение лампы коллимировалось (угол расходимости $\sim 10^{-2}$) и через кювету направлялось на входную щель монохроматора (раскрытие ≈ 10 мкм), настроенного на линию ртути 254 нм, приходящуюся на максимум полосы поглощения ДНК. Выходная щель монохроматора была раскрыта примерно на 2 мм, чтобы полностью использовать свет, излучаемый в данной линии. Часть света пропусклась через этот же монохроматор, минуя кювету, и образовывала опорный пучок, служащий для компенсации дрейфов лампы по мощности и спектру. Разделение основного и опорного пучков производилось за выходной щелью монохроматора затвором, управляемым ЭВМ. Непосредственно за затвором находился фотодетектор.

Расположение монохроматора за кюветой позволило применить его входную щель как пространственный фильтр и, кроме того, обеспечило эффективное подавление паразитного влияния рассеянного света. Пространственное разрешение установки определялось шириной входной щели монохроматора и расходимостью излучения, проходящего через эту щель, и в указанных условиях составило ≈ 20 мкм.

Пространственная зависимость оптической плотности регистрировалась путем перемещения кюветы перпендикулярно щели монохроматора, которое осуществлялось с помощью шагового двигателя, вращающего микровинт. Двигатель управлялся ЭВМ; при одном шаге кювета смещалась на 4,2 мкм.

4. Электронная часть установки. Описываемая часть установки предназначена для управления оптико-механической частью, а также для обработки и отображения в реальном времени результатов измерений.

Электронная часть установки базировалась на ЭВМ М400 и была выполнена в стандарте КАМАК. Структурная схема установки приведена на рис. 4. Сигнал с выхода ФЭУ усиливался и подавался на вход АЦП (10-разрядный АЦП поразрядного уравнивания [11]). С помощью модуля «Выходной регистр» осуществлялось управление шаговым двигателем и затвором на входе ФЭУ. Вывод данных в ходе эксперимента производился с помощью блока внешней памяти с визуализацией ВМ-96 фирмы «Intertechnique» ($4K \times 12$, время доступа 16 мкс), подключенного к магистрали крейта через интерфейсный модуль ВМ-96. Кроме того, данные в виде гистограмм выводились на самописец «Endim 620.02» (с помощью модуля «Привод к осциллографу»), а также на стандартные внеш-

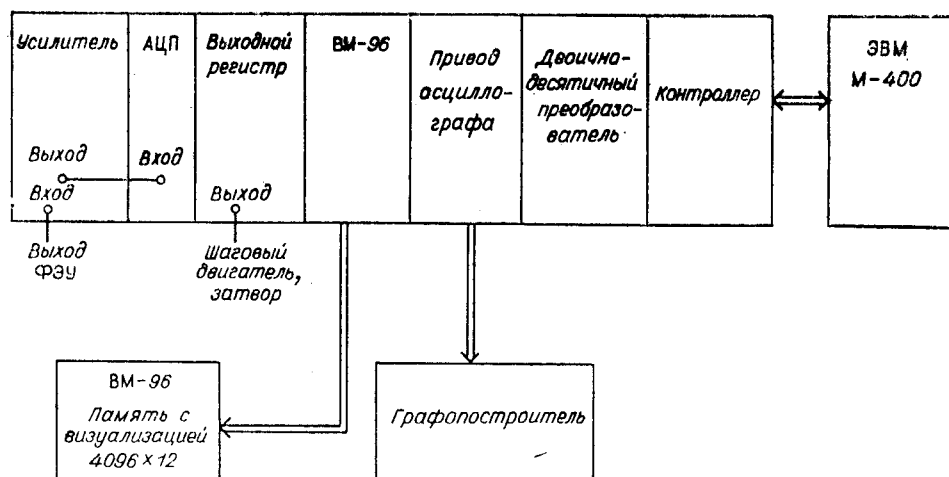


Рис. 4. Структурная схема электронной части установки

ние устройства ЭВМ — АЦПУ и перфторатор. Координаты кюветы отображались на электронном символьном дисплее РИН-609. Для двоично-десятичного преобразования значения координаты и результатов измерений (при выдаче на АЦПУ) использовался модуль «Преобразователь двоично-десятичный», имеющий время преобразования 1 мкс.

Программно задавались и варьировались в ходе эксперимента следующие параметры измерения.

1. Время нахождения кюветы в данном положении. Это время складывалось из паузы между коммутацией шагового двигателя и первым аналого-цифровым преобразователем, времени выполнения необходимого числа повторных измерений сигнала, времени переключения затвора и измерения величины опорного сигнала в этой же точке.

2. Число измерений значений основного и опорного сигналов в каждой точке.

3. Периодичность измерения опорного сигнала, который можно измерять в каждой точке либо пропуская несколько точек в зависимости от его стабильности.

На рис. 5 представлена блок-схема алгоритма работы установки.

Метрические характеристики установки оценивались по результатам измерения оптического пропускания раствора, не подвергнувшегося действию лазерного света. Измерения дублировались с разными кюветами, чтобы исключить оптические неоднородности самих кювет (использовались кварцевые кюветы к спектрофотометру «Specord»), и на разных пробах раствора ДНК (оптическая плотность ДНК варьировалась в пределах $8-12 \text{ см}^{-1}$).

Основным источником погрешности измерения были флуктуации интенсивности свечения лампы на данной длине волны. Для увеличения точности проводилось многократное измерение сигнала при одном значении координаты и усреднением полученных значений определялось оптическое пропускание раствора (число измерений 256, время на одно измерение 120 мкс). Для уменьшения влияния погрешности самого аналого-цифрового преобразования (плюс-минус единица младшего разряда) сигнал усиливался с учетом предполагаемых изменений до верхней границы диапазона входных сигналов АЦП (0—5 В). В результате разброс величин оптического пропускания при данной координате составил менее 1%. Долговременные изменения интенсивности свечения лампы учитывались с помощью измерений опорного луча.

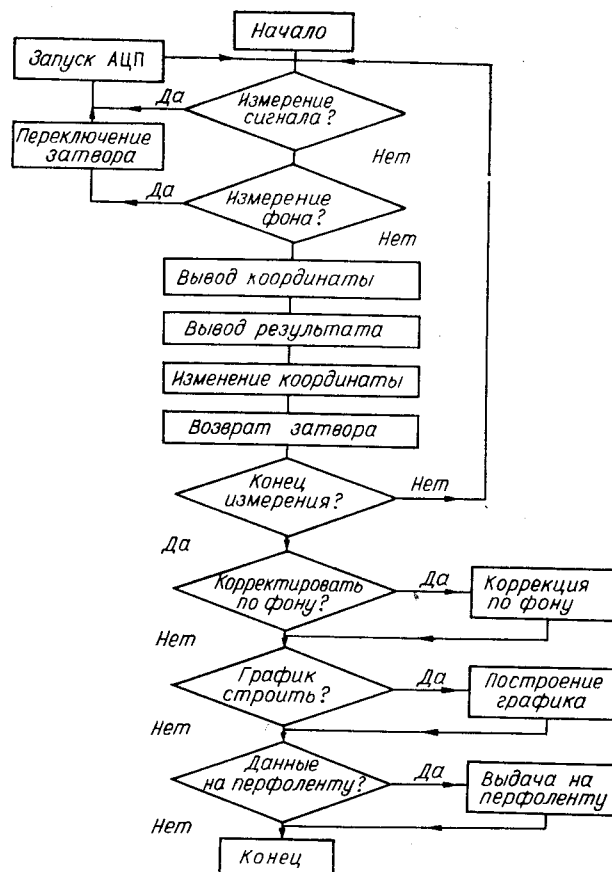


Рис. 5. Блок-схема использованного алгоритма работы установки.

На рис. 6 приведен результат фонового эксперимента. Измерено оптическое пропускание кюветы с раствором ДНК, не подвергавшейся воздействию лазерного излучения. Опорный луч измерялся в каждой точке. Коррекция результатов с учетом значений опорного сигнала проводилась по завершению измерений. Как видно, дисперсия измерения оптической

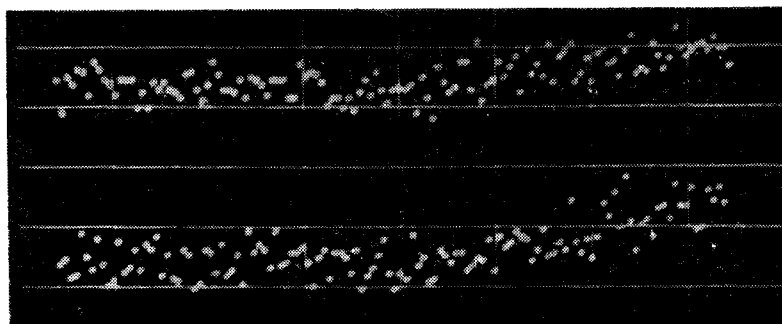


Рис. 6. Результат фонового эксперимента с необлученной кюветой. Снимок с экрана визуализатора блока памяти ВМ-96. Верхняя серия точек — результат измерения интенсивности основного луча, нижняя — опорного луча. Размер клетки по вертикали соответствует изменению интенсивности луча на 2%. Точки сняты через 4 мкм. Оптическая толщина раствора ДНК ≈ 1 .

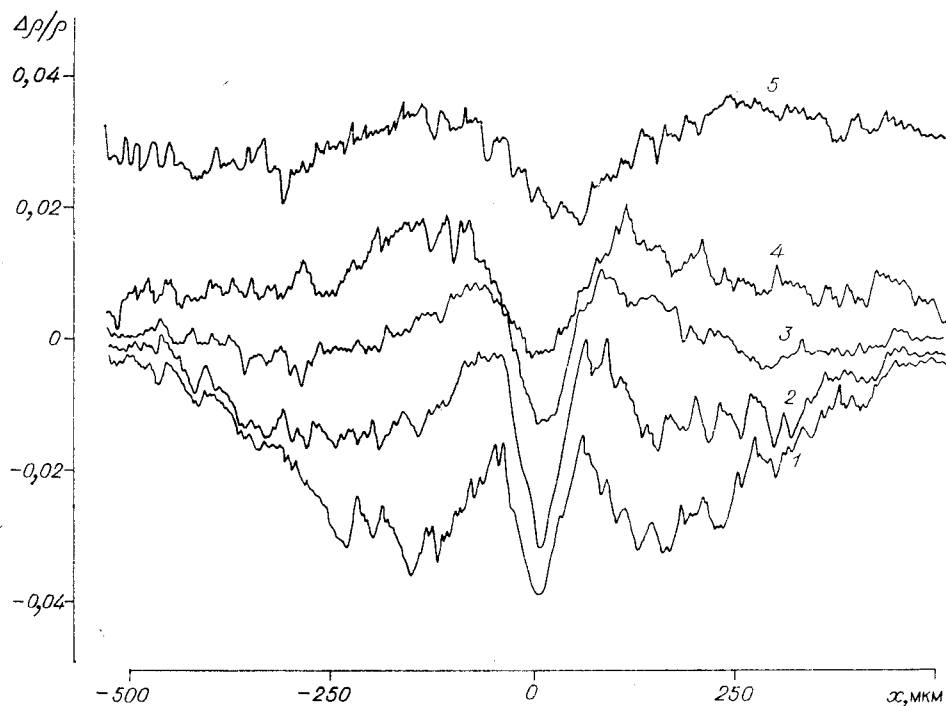


Рис. 7. Пространственные зависимости оптической плотности раствора ДНК после НЛР в течение 3 мин:

кривые 1—5 зарегистрированы при временах 0; 5; 10; 25; 65 мин соответственно после конца лазерного облучения. (Для удобства чтения кривые 4, 5 сдвинуты вверх по оси ординат.)

плотности при одной координате не превышала 0,5%. Время сканирования участка длиной 1 мм составляло ≈ 40 с. На рис. 6 отчетливо виден медленный дрейф интенсивности света, обусловленный изменением спектральной мощности лампы. Этот дрейф воспроизводится опорным пучком и после коррекции исключается из результатов.

5. Экспериментальные результаты и их обсуждение. При описанных параметрах установки и ранее оцененном квантовом выходе результатов ДНК (см. [3]) заметный эффект должен был наблюдаться при проведении НЛР в течение нескольких минут. Результаты измерения пространственной зависимости оптической плотности ДНК при длительности НЛР 4 мин приведены на рис. 7. На этом рисунке хорошо видны основные качественные особенности СИД ДНК: наличие провала оптической плотности в центре облученного объема и пиков по краям, а также рост эффекта на малых временах и медленное спадание на больших, причем центральный провал размывается медленнее, чем боковые пики в соответствии с теорией. Кроме того, на рис. 7 показан широкий и быстро исчезающий провал оптической плотности, наложенный на характерную структуру эффекта СИД ДНК. Этот провал, несомненно, вызван диффузией молекул свободного красителя*. В пользу такой интерпретации свидетельствует оценка коэффициента диффузии молекул, образующих центральный провал, которая на два порядка превышает значение D_0 для ДНК и согласуется с ожидаемым значением коэффициента диффузии кумаринового красителя (ср. [10]).

* В наших условиях с ДНК связано $\approx 40\%$ общего числа молекул красителя [2, 3].

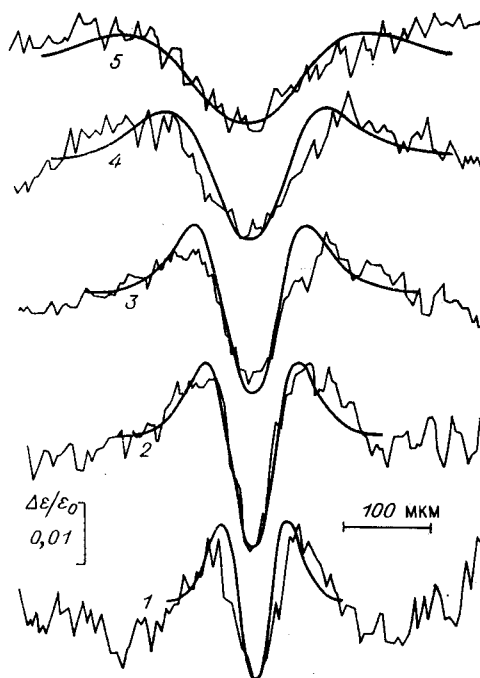


Рис. 8. Сравнение теоретических (при $\alpha_r = 0,04$) и экспериментальных (см. рис. 7) зависимостей оптической плотности ДНК.

Экспериментальные данные для простоты приведены с использованием кусочно-линейной интерполяции; зависимости 1—5 соответствуют временам 0; 5; 10; 25; 56 мин после конца облучения. Теоретические кривые (гладкие линии) построены для $t/\tau_D = 0,1; 0,5; 1,0; 3$ и 10 соответственно.

В области эффекта СИД ДНК изменение оптической плотности, связанное с диффузией красителя, ведет себя очень плавно и приводит только к сдвигу графика $\Delta\epsilon(x)$ как целого вниз. Поэтому после коррекции нулевой линии центральная часть зависимостей на рис. 7 может быть сопоставлена с теорией, не учитывающей диффузии красителя. Поскольку величина $\Delta\epsilon/\epsilon_0$ на рис. 7 не превышает нескольких процентов, возможно ее сравнение с развитой в п. 2 теорией в пределе слабого фото-

разрезания. Такое сравнение проведено на рис. 8 между теоретическими кривыми (см. рис. 2, б) и примерно соответствующими им по времени экспериментальными данными (см. рис. 7). Несмотря на то что единственный параметр теории α_r не варьировался, согласие между теорией и экспериментом является хорошим. Отметим, что на рис. 8 — 1 заметен гиперхромизм ДНК, влияние которого также описывается теорией. Некоторое расхождение с теорией на рис. 8 — 1, по-видимому, связано с тем, что время облучения при НЛР сравнимо в наших условиях с временем $\tau_D \approx 7$ мин. Эта оценка следует из сопоставления теоретической и экспериментальной зависимостей при больших временах (см. рис. 8 — 4), когда влияние конечной продолжительности НЛР становится несущественным. Соответствие времен для теоретических и экспериментальных кривых на рис. 8 — 2, 3 также является хорошим, если за эффективное начало диффузионного процесса принять середину НЛР (2 мин после начала облучения).

Из оценки для τ_D можно вычислить величину $D_0 = a^2/4\tau_D \approx 5 \cdot 10^{-9}$ см²/с. Это значение близко к ожидаемому для ДНК данного молекулярного веса. Таким образом, наблюдение эффекта СИД ДНК позволяет также определить значение коэффициента диффузии целых молекул ДНК, что представляет самостоятельный интерес для биофизики и биологии. Укажем, что неопределенность величины D_0 при данном способе измерения обусловлена в основном неопределенностью значения a . Поэтому отношение коэффициентов диффузии для двух различных ДНК может быть найдено с большей точностью.

Сравнение полученных экспериментальных результатов с теорией позволяет количественно оценить фундаментальный параметр теории НЛР [1, 3] — произведение квантового выхода η^* одонитевых разрывов после переноса возбуждения на ДНК на вероятность этого переноса ν . Действительно, соответствие масштабов по оси ординат (см. рис. 2, б) теоретических и экспериментальных графиков на рис. 8 позволяет оценить $P_s \approx 0,4$. В наших условиях реализуется случай слабого насыщения первого синглета красителя. Вследствие этого формулы работы [1, 3], связывающие

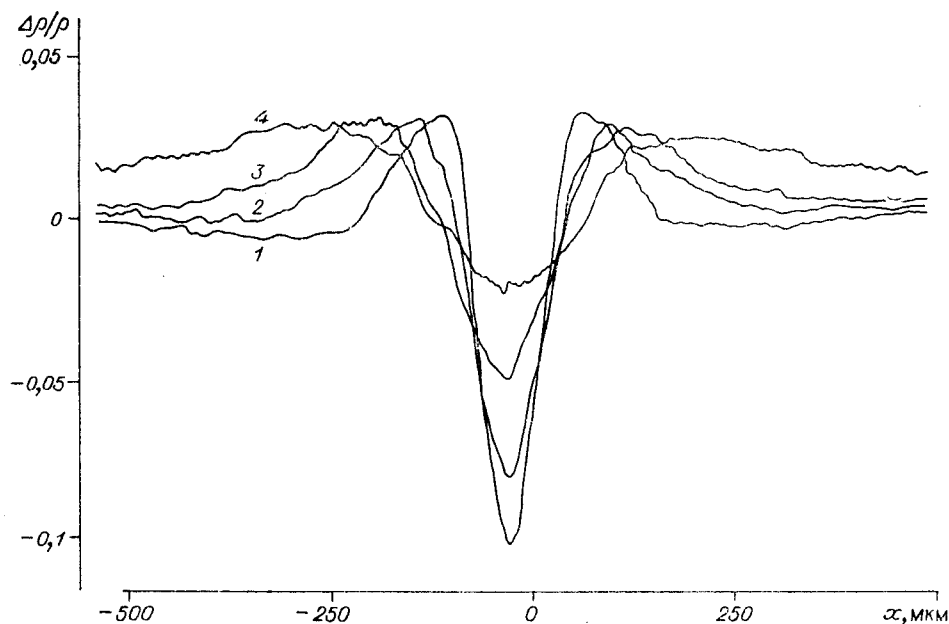


Рис. 9. Пространственные зависимости оптической плотности раствора ДНК после НЛР в течение 10 мин: кривые 1—4 зарегистрированы при временах 1; 10; 20; 50 мин после конца НЛР.

P_s и η^*v , приводят к выражению

$$\eta^*v = \sqrt{-2 \ln(1 - P_s) / L_M L_0 (2S / \sigma_{10} \sigma_{21} \tau_1 I_0 N_P k')}, \quad (12)$$

где сохранены обозначения [1, 3]: $N_P \approx 1,1 \cdot 10^{18}$ — полное число лазерных квантов за время облучения; $S = 1 \text{ см} \times 60 \text{ мкм}$ — площадь поперечного сечения облучаемого объема; $k' \approx 0,07$ [12] — доля мест связывания на ДНК, занятых молекулами красителя. В нашем эксперименте импульсная плотность мощности была $\approx 115 \text{ МВт/см}^2$, что соответствовало $I_0 \approx 1,9 \cdot 10^{26} \text{ с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$. Используя величины и значения прочих параметров из работы [3], получаем оценку

$$\eta^*v > 0,4 \cdot 10^{-4}, \quad (13)$$

согласующуюся с предварительным результатом [3]. Приведенное численное значение для η^*v найдено в предположении, что весь лазерный свет мощностью 2,6 мВт фокусируется в однородное пятно диаметром 60 мкм. Фактически же некоторая доля этого света, которую трудно оценить, образует широкий «ореол» вокруг фокального пятна, не дающий вклада в нелинейные фотопроцессы. Кроме того, примерно 20% лазерного света поглощается и рассеивается оптическими элементами установки. По этим причинам оценка (13) имеет вид неравенства.

Для обеспечения сильного фоторазрезания наиболее целесообразно увеличение мощности лазера, однако этого в описываемом эксперименте невозможно сделать. Поэтому была увеличена продолжительность НЛР до 10 мин. Результат регистрации СИД ДНК представлен на рис. 9. В этом случае пространственная структура СИД успевает полностью сформироваться уже за время облучения, а далее наблюдается только падение эффекта. Величина $|\Delta\epsilon|$ существенно превышает максимальное значение, достижимое в случае слабого фоторазрезания. Максимальный по времени контраст пространственной зависимости $(\Delta\epsilon_{\max} - \Delta\epsilon_{\min})/\epsilon_0 \approx 0,13$ превышает такую же величину при облучении в течение 4 мин (см. рис. 7) примерно в 4,3 раза. Поскольку удлинение облучения, наряду

с усилением фоторазрезания, приводит к смазыванию пространственной картины. Основная часть установки, а также основные алгоритмы ее работы. Установка позволяет измерять оптическую плотность ДНК с погрешностью не более 1% при пространственном разрешении не хуже 20 мкм и временном разрешении $\sim 0,1$ с. Управление установкой, измерение, обработка и отображение экспериментальных данных проводятся автоматически в реальном времени.

Экспериментально зарегистрированы проявления эффекта СИД ДНК. Показано количественное согласие эксперимента с теорией и определены константы, характеризующие ДНК: коэффициент диффузии D_0 и эффективный квантовый выход фоторазрезания η^*v . Подтверждена нелинейность величины эффекта СИД ДНК по дозе лазерного излучения.

Авторы выражают признательность Ю. Е. Нестерихину и С. Г. Раутиану за полезные обсуждения и поддержку, А. Л. Резнику за указание точного выражения для распределения молекул ДНК по длинам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stockmann M. I. Nonlinear Laser Photomodification of Macromolecules: Possibility and Applications.— *Phys. Lett.*, 1980, vol. 76A, p. 191.
2. Штокман М. И., Пархоменко А. И. Нелинейное лазерное фоторазрезание ДНК: [Труды VI Вавиловской конференции по нелинейной оптике. Новосибирск, 1979/Под ред. В. П. Чеботаева]. Ч. 2. Препринт № 112. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1979, ч. 2, с. 85.
3. Пархоменко А. И., Раутиан С. Г., Штокман М. И. Нелинейная лазерная фотомодификация макромолекул: расщепление ДНК.— *ДАН*, 1980, т. 250, с. 225.
4. Rahn R. O., Patric M. H. Photochemistry of DNA; Secondary Structure, Photosensitization. Base Substitution and Exogenous Molecules.— In: *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*/Ed. S. Y. Wang. N.-Y.: Academy Press, 1976, vol. 2, p. 97.
5. Каминин Г. З. Применение спектроскопии оптического смещения в биологии.— В кн.: *Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов*. М.: Мир, 1978, с. 278.
6. Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Солобоев В. Е., Штокман М. И. Эффект светопроиндуцированной диффузии ДНК в растворах при лазерном фоторазрезании. Препринт № 131. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1980.
7. Козионов А. Л., Новожилов С. Ю., Солобоев В. Е., Штокман М. И. Светопроиндуцированная диффузия ДНК в растворах при лазерном фоторазрезании.— *Письма в ЖЭТФ*, 1980, т. 31, с. 606.
8. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975.
9. Weissbluth M. Hyperchromism.— *Q. Rev. Biophysics*, 1971, vol. 4, p. 1.
10. Дударев В. П., Пархоменко А. И., Сафонов В. П., Штокман М. И. Нелинейные фотопроцессы в кумарине-4.— *ЖТФ*, 1980, т. 50, с. 1497.
11. Солоненко В. И. 10-разрядный аналого-цифровой преобразователь ± 5 .— В кн.: *Автоматизация эксперимента*/Под ред. Ю. Е. Нестерихина. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1976, с. 92.
12. Isaacs S. I., Shen C. J., Hearst J. L., Rapoport H. Synthesis and Characterization of New Psoralen Derivatives with Superior Photoreactivity with DNA and RNA.— *Biochemistry*, 1977, vol. 16, p. 1058.

Поступила в редакцию 17 сентября 1980 г.