

# Изучение физики гидратирования биомолекул и наночастиц методом когерентной лазерной спектроскопии

А.Ф. Бункин, С.М. Першин

*Научный центр волновых исследований института общей физики им. А.М.Прохорова, РАН, лаборатория лазерной спектроскопии*

В связи с развитием био- и нанотехнологий пристальное внимание уделяется изучению состояния вещества на границах воды и био/наночастиц. Физическое состояние воды в гидратной оболочке биополимеров и наночастиц существенно зависит от характера взаимодействия молекулы  $H_2O$  и гидратируемого нанообъекта.

К настоящему времени накоплен обширный материал, показывающий, что гидрофильные биомолекулы (белки, ДНК и др.) могут структурировать молекулы воды в гидратном слое. Основная трудность изучения гидратных слоев биомолекул и наночастиц с помощью оптической спектроскопии состоит в малом количестве молекул, входящих в гидратный слой, сигнал от которых нужно выделить на фоне сигнала молекул воды в объеме вне этого слоя. Поэтому, применяемый метод должен быть (1)- неразрушающим и чувствительным (т.е. иметь высокое отношение сигнал – шум), и (2)- обеспечивать измерения в той области, где оптический спектр максимально зависит от межмолекулярных взаимодействий. Для воды этой областью является диапазон от единиц до  $\sim 200\text{ см}^{-1}$ , где расположены трансляционные ( $\sim 180\text{ см}^{-1}$ ) и поперечные ( $\sim 60\text{ см}^{-1}$ ) межмолекулярные колебания.

Исследования в указанной области с помощью оптической, ИК и СВЧ спектроскопии являются трудноосуществимыми, поскольку, с одной стороны, в настоящее время отсутствуют эффективные, перестраиваемые в широкой области ( $0-200\text{ см}^{-1}$ , т.е.  $0-6\text{ ТГц}$ ) источники микроволнового излучения для терагерцовой спектроскопии. С другой стороны, успешному применению спонтанного комбинационного рассеяния (КР) препятствует слабость резонансов, относящихся к межмолекулярным колебаниям, и высокий уровень засветок упругого рассеяния излучения лазера. Дополнительным препятствием для использования ИК или СВЧ-спектроскопии является неконтролируемый нагрев образца и, соответственно, невозможность изучения молекул внутри объема образца в нативных условиях.

Эффективным подходом к изучению свойств гидратных слоев нанообъектов является когерентная спектроскопия четырехфотонного рассеяния (ЧФР) света, которая обеспечивает существенное повышение контраста наблюдаемых линий в низкочастотной области спектра. Это происходит за счет поляризационного подавления когерентного фона, вызванного

электронной нелинейностью среды, и фазирования молекулярных колебаний и вращений в макроскопическом объеме с помощью двух лазерных волн с частотами  $\omega_1$  и  $\omega_2$  разность которых сканируется во всей области низкочастотных резонансов. Измеряемым параметром служит интенсивность когерентно-рассеянного излучения, прошедшего поляризационный анализатор, скрещенный с поляризацией излучения когерентного фона.

Отдельный интерес представляет когерентная гигагерцовая спектроскопия Мандельштам-Бриллюэновского (МБ) рассеяния с пространственной селекцией объема в конденсированных средах. Величина сдвига МБ отражает изменение упругих свойств среды на масштабах гидратной оболочки нанообъекта, а ширина линии - диссипацию гиперзвуковых волн в ней.

Другой важной задачей, решение которой позволяет существенно прояснить физику гидратирования, является изучение особенностей взаимодействия спиновых изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  и (био) наночастиц с учетом отличий суммарного ядерного спина протонов в молекуле воды.

Целью данного цикла работ являлось изучение физики гидратирования биополимеров и наночастиц в водных растворах на контактной границе с использованием техники когерентного четырехфотонного рассеяния света. Измерения проводились в наиболее трудной для оптической и микроволновой спектроскопии области  $0\text{-}200\text{ см}^{-1}$  в водных растворах ДНК, белка и суспензиях углеродных нанотрубок. Уникальная способность ЧФР света регистрировать резонансы различной физической природы в микрообъеме конденсированной среды в тера- и субтерагерцовой области позволила нам предположить и обосновать образование каркасных структур типа гексагонального льда при гидратировании предпочтительно из спиновых изомеров пара- $\text{H}_2\text{O}$ , вклад которых уменьшается и одновременно увеличивается вклад орто- $\text{H}_2\text{O}$ , способных разместиться в каналах этих каркасов с диаметром канала до  $7.4\text{ \AA}$ .

Сформулируем результаты, полученные в предлагаемом цикле работ:

1. Зарегистрирован и полностью расшифрован спектр четырехфотонного когерентного рассеяния на вращательных переходах молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  в легкой и тяжелой воде, а также их 50% растворе в диапазоне  $10\text{-}100\text{ см}^{-1}$  с разрешением  $0.1\text{ см}^{-1}$ . На основании этих данных была оптически измерена относительная концентрация молекул  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}:\text{HDO}$  в 50% растворе  $\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  [1], которая соответствовала табличным данным 1:1:2 и использовалась в дальнейшем как калибровочный результат.
2. Зарегистрированы узкие вращательные резонансы в ЧФР-спектрах водных растворов биополимеров (белок, ДНК, денатурированная ДНК) [7, 8, 10, 12] и суспензии

углеродных нанотрубок [2, 4, 14] в диапазоне 0-200 см<sup>-1</sup>, которые отнесены к переходам орто- и пара- спин-изомеров молекул H<sub>2</sub>O, и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Отношения интенсивности линий молекул впервые позволяет напрямую оптическим методом измерять вариацию относительной концентрации спин-изомеров H<sub>2</sub>O в жидкости. Обнаружено, что вклад молекул орто-H<sub>2</sub>O в сигнал ЧФР в растворах биополимеров существенно возрастает (в 8 раз) [10, 12], что говорит о соответствующем повышении концентрации свободных молекул орто-H<sub>2</sub>O в гидратных оболочках биополимеров.

3. Обнаружено уменьшение вклада пара-H<sub>2</sub>O в регистрируемый спектр (почти до нуля) [10, 12]. Это впервые показало, что физика гидратирования молекул белка и ДНК в естественных условиях избирательна к квантовым отличиям спиновых изомеров H<sub>2</sub>O. Повышенная вероятность связывания пара-H<sub>2</sub>O биополимерами в растворе коррелирует с обогащением паров воды изомерами орто-H<sub>2</sub>O при обтекании высушенных белков, измеренным независимо другими авторами. При денатурации ДНК отмеченная избирательность утрачивается [10, 12]. Денатурация ДНК приводит к существенному росту вклада вращательных резонансов молекул перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в сигнал когерентной спектроскопии, что свидетельствует о росте концентрации молекул H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в гидратных слоях. Этот факт был подтвержден в независимых химических экспериментах.
4. Когерентная спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна позволила обнаружить зависимость скорости гиперзвука в водных растворах биополимеров и суспензиях нанотрубок от концентрации примеси. Обнаружено, что резонансы Мандельштама-Бриллюэна в растворе биомолекул и водной суспензии нанотрубок сдвигаются в противоположные стороны [2, 10, 12, 14]. Увеличение скорости гиперзвука интерпретировано как уменьшение макроскопической сжимаемости жидкости в изучаемом микрообъеме, обусловленное индуцированием льдоподобных структур в гидратном слое на границах некоторых биомолекул, что согласуется с обсуждаемыми в литературе моделями гидратного слоя. При этом обнаружена кубическая зависимость концентрационной зависимости [10, 12] сдвига МБ, которая указывает на трехмерный характер процесса гидратирования, аналогичного объемному росту кристаллов из раствора.
5. Экспериментально обнаружено, что при кавитационном испарении дистиллированной воды с последующей конденсацией соответствующего аэрозоля происходит обогащение сконденсированной жидкости молекулами орто- спин-изомеров H<sub>2</sub>O [3, 6]. Этот факт независимо подтвержден в экспериментах по ЯМР.

Впервые вариации равновесного орто/пара отношения 3:1 спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  обнаружены в гексагональном льду [11] и в дистиллированной воде при изменениях температуры [5].

6. Проведено обоснование [15] предположения о локализации мономеров  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в воде и гидратных слоях в каналах структур подобных гексагональному льду *Ih* на основании измеренных нами ранее [11] спектров  $\text{H}_2\text{O}$  в гексагональном льду.

Список статей, выдвигаемых на конкурс:

1. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, "Observation of water isotopes and spin-isomers rotational transitions induced by four-wave mixing in liquid" *Journal of Raman Spectr.* v.39, 726-729, 2008.
2. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, "Selective interaction water - hydrophilic/hydrophobic impurities observed by four-photon Brillouin spectroscopy" *Laser Physics*, v.18, #10, 1143-1147, 2008.
3. S.M. Pershin, A.F. Bunkin, N.V. Anisimov, Yu.A. Pirogov "Water Enrichment by H<sub>2</sub>O *ortho*-Isomer: Four-Photon and NMR Spectroscopy" *Laser Physics*, v.19, #3, 410-413, 2009.
4. A.F. Bunkin, S.M. Pershin "Four-wave Mixing Spectroscopy of Hydration Layers in Biopolymers and Carbon Nanotubes Aqueous Solutions" *Journal of Raman Spectr.* v.40, #7, 836-839, 2009
5. S.M. Pershin, A.F. Bunkin "Temperature Evolution of the Relative Concentration of the H<sub>2</sub>O Ortho/Para Spin Isomers in Water Studied with Four Photon Laser Spectroscopy" *Laser Physics*, v.19, #7, 1410-1414, 2009
6. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, "Water Enrichment by Hydroxyl and Hydrogen Peroxide Due to Cavitation Treatment: GHz Four Wave Mixing Spectroscopy" *Laser Physics*, v.19, #10, 1977-1980, 2009.
7. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, "Four-photon microwave laser spectroscopy of molecules in the hydration layers of biopolymers and nanoparticles" *Quantum Electronics* v. 39 (7) 638 - 642 (2009), КЭ, т.39, №7, 638-642
8. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, «Low Frequency Four\_Wave Mixing Spectroscopy of Biopolymer Hydration Layers in Aqueous Solutions», *Laser Physics*, v.20, #1, 230-237, 2010.
9. А.Ф.Бункин, С.М.Першин «Четырехфотонная спектроскопия вращательных переходов в жидкости: регистрация изменения химического состава воды под действием кавитации» *Квант. Электр.* Т.40, №3, 189-191, 2010.
10. А.Ф.Бункин, С.М.Першин «Низкочастотная спектроскопия четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в водных растворах биополимеров» *Оптика и спектроскопия*, т.108, №6, 901-906 (2010).
11. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, «Observation of Rotational Resonances of Ortho and Para Spin Isomers of the H<sub>2</sub>O Molecule in Hexagonal Ice Using Four-Photon Laser Spectroscopy» *Physics of Wave Phenomena*, Vol. 18, No. 4, p. 237-239 (2010).
12. А.Ф. Бункин, С.М. Першин, "Низкочастотная спектроскопия биомолекул в водных растворах с помощью четырехволнового смешения", *Квант. электроника*, 2010, **40** (12), 1098–1102.
13. А.Ф. Бункин, В.Г. Михалевич, С.М. Першин, В.Н. Стрельцов «Когерентная спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в пространственно неоднородных средах» *ЖЭТФ*, том140, вып.2(8), стр.241-246 (2011).
14. A.F. Bunkin, S.M. Pershin, "Four-Wave Mixing Spectroscopy of Single-Wall Carbon Nanotubes Aqueous Suspensions in the Range 0.1–10 and 100–250cm<sup>-1</sup>" *J. Raman Spectrosc.* V. 42, #10, 1908–1912 (2011).
15. С.М.Першин, А.Ф. Бункин, В.Л. Голо, Мономеры H<sub>2</sub>O в каналах льдоподобных молекулярных комплексов воды, *ЖЭТФ*, **142**(6), (2012)