

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Физический
ИНСТИТУТ
имени
П.Н.Лебедева



Ф И А Н

препринт

20

В.С. ГОРЕЛИК, К.В. ГЛАГОЛЕВ,
Л.И. ЗЛОБИНА, Г.В. КОЗЛОВА,
Ю.П. КУРКИН, А.Н. МОРОЗОВ,
К.В. ПОКАЗЕЕВ, М.Ю. ПОПОВА,
П.П. СВЕРБИЛЬ

**ИЗОХРОННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ В
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ
СОЕ**

МОСКВА 2003

АННОТАЦИЯ

В работе рассматривается возможность применения метода изохронной флуоресцентной спектроскопии для сравнительного анализа образцов генетически модифицированной и натуральной соевой муки.

Разработанный метод основан на спектральном анализе вторичного излучения, возникающего в пищевых объектах при их облучении ультрафиолетовым источником света ($\lambda_0=255,3; 271,2; 289,1$ нм). Ультрафиолетовое излучение получается в результате нелинейно-оптического преобразования частоты импульсно-периодического лазера на парах меди, генерирующего излучение с длинами волн 510,6 и 578,2 нм.

Установлено, что вторичное излучение (фотолюминесценция) присутствует в исследуемых объектах в ближнем ультрафиолетовом диапазоне и в синей области спектра (300-500 нм). В области ультрафиолетового диапазона обнаружено различие спектров фотолюминесценции для модифицированных и немодифицированных образцов сои.

Установлено, что с введением временной задержки (0-100 нс) интенсивность вторичного излучения уменьшается более чем на порядок; при этом меняется число и вид наблюдаемых максимумов. Для всех модифицированных образцов максимумы фотолюминесценции сдвигаются в длинноволновую область.

Наблюдаемые эффекты объяснены на основе поляритонной модели.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект №02-02-16221.

ВВЕДЕНИЕ.

В настоящее время весьма актуальной является задача анализа изменений на молекулярном уровне в биологических объектах, приводящих к процессам генетической модификации. Такие изменения связаны с трансформацией исходных структур цепей ДНК, РНК и белков [1] в результате влияния различных химических процессов, физических факторов (температуры, давления, проникающей радиации), биологических воздействий и т.д. Одним из важных биологических объектов являются растения, применяемые, в частности, в качестве пищевых продуктов. Концентрированная генетическая информация о растении содержится в семенах, в которых присутствуют ДНК, РНК и необходимые для дальнейшего развития растения питательные вещества. Изменение молекулярной структуры генетически модифицированного – трансгенного (ТГ) биологического объекта должно приводить к изменению соответствующих электронных и колебательных спектров биологических структур. Таким образом, возникает задача диагностики генетической модификации в ТГ биологических объектах на основе современных методов оптической спектроскопии. В настоящее время в связи с развитием методов спектрального анализа [2,3] и техники лазерной спектроскопии [4-6] представляется перспективным решение обсуждаемой задачи на основе регистрации спектров флуоресценции (ФЛ), возбуждаемых в генетически модифицированных и контрольных биологических объектах.

В данной работе в качестве объектов исследования были выбраны семена сои в виде муки, подвергнутые генетической модификации в результате определённых технологических процессов. Была поставлена задача исследования и сравнения спектров ФЛ в различных образцах соевой муки, в частности, в генетически модифицированной соевой муке.

1.МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Исследования были выполнены на экспериментальной установке, принципиальная схема которой приводится на рис. 1. Данная установка включает в себя совокупность блоков, объединенных в едином комплексе: малогабаритный импульсно-периодический лазер на парах меди с активным элементом «Кулон» и воздушным охлаждением; нелинейно-оптический кристалл, преобразующий видимое излучение лазера в ультрафиолетовое; набор специальным образом подобранных кювет для испытываемых проб; автоматизированный спектрометр МСД-2; фотоумножитель; систему стробирования; компьютер, управляющий монохроматором МСД-2 и считывающий информацию с фотоприемника; несущий оптико-механический модуль с микрометрическими координатниками и необходимыми

оптическими элементами (линзами, зеркалами, светофильтрами, диафрагмами).

В качестве источника возбуждающего излучения применялся лазер на парах меди с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм. Лазер работал в импульсно-периодическом режиме с частотой следования 10 кГц коротких (20 нс) импульсов монохроматического излучения средней мощностью один ватт. Исходное излучение видимого диапазона преобразовывалось в ультрафиолетовое излучение с помощью нелинейно-оптического кристалла ВаВ₂О₄. Кристалл был вырезан в направлении углового синхронизма для генерации вторых гармоник и смешанной частоты исходных линий генерации (510,6 и 578,2 нм). Этот кристалл обеспечивал эффективное преобразование лазерной генерации в ультрафиолетовое излучение с длинами волн 255,3; 271,2 и 289,1 нм. Средняя мощность возбуждающего ультрафиолетового излучения составляла 1-10 мВт.

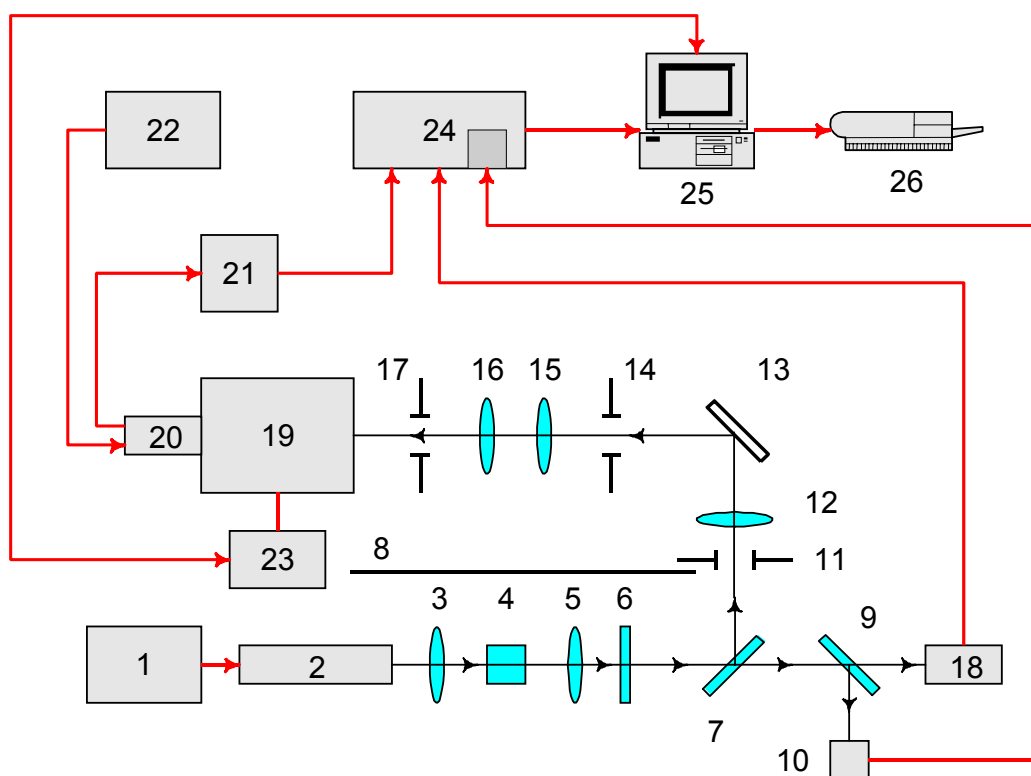


Рис.1. Схема установки для регистрации спектров фотолюминесценции: 1 – блок питания лазера; 2 – активный элемент лазера; 3,5,12,15,16 – кварцевые линзы; 4 – нелинейно-оптический кристалл; 6,7,9 – диэлектрические зеркала; 8 – экран; 10 - блок формирования строб-импульса; 11,14,17 - диафрагмы; 13 – кювета с исследуемым веществом; 18 - фотодиод; 19 – монохроматор; 20 – фотоумножитель; 21 – усилитель; 22 – блок питания ФЭУ; 23 - шаговый двигатель; 24 – система регистрации; 25 - компьютер; 26 – принтер.

При таком режиме возбуждения фотолюминесценции не наблюдалось существенной модификации спектров под влиянием возбуждающего излучения. Регистрация спектров фотолюминесценции проводилась на малогабаритном автоматизированном спектрометре МСД-2 с использованием компьютерной системы обработки и анализа наблюдаемых спектров. Спектрометр МСД-2 состоял из двух блоков: оптико-механического и блока управления. Блок управления был соединён с компьютером, управляющим шаговым двигателем, поворачивающим дифракционную решетку (точность установки длины волны 0,1 нм). Использовалась сферическая решетка с переменным шагом и числом штрихов 1200 мм^{-1} , при этом спектральный диапазон монохроматора составлял 200 – 800 нм, а обратная линейная дисперсия – 4,6 нм/мм. В системе регистрации использовался фотоумножитель ФЭУ-106 в режиме счёта фотонов с временным стробированием. Применение строба в системе регистрации позволило получать спектры фотолюминесценции в диапазоне 200-800 нм, как синхронные с импульсом накачки, так и задержанные во времени в диапазоне 0-150 нс. Использование временной задержки в системе регистрации при анализе спектров флуоресценции открывает возможность для изучения кинетики флуоресценции и характера эволюции этих спектров со временем. Кроме того, это позволяет существенно подавить возбуждающее излучение и проводить анализ слабых сигналов флуоресценции, не искаженных «паразитным» фоном интенсивных линий лазерного источника света.

Используемые при исследованиях кюветы представляли собой плоскопараллельные кварцевые пластины, между которыми находился слой соевой муки толщиной 1 мм.

Сигнал вторичного излучения поступал на компьютер из системы регистрации для его запоминания и выведения на печатающее устройство. Используемое программное обеспечение позволяло ввести начальные условия, получить спектры вторичного излучения в цифровом и графическом виде в заданном диапазоне длин волн.

Идентификация анализируемого образца производилась сопоставлением полученного спектра с эталонным. При этом использовался ряд характерных признаков, выделяющихся в спектре вторичного излучения. В качестве таких признаков были использованы следующие: 1) длина волны, соответствующая положению максимума интенсивности в спектре вторичного излучения; 2) форма контура в наблюдаемом спектре вторичного излучения; 3) полуширина основной полосы в спектре вторичного излучения; 4) положение крутых подъёмов в спектре вторичного излучения. Разработанная установка позволяла отделять быстротекущие процессы от процессов вторичного излучения, задержанных во времени.

Анализ спектров вторичного излучения состоял из двух серий измерений. Первая серия измерений проводилась с так называемым контрольным образцом – немодифицированной соевой мукой, полученной путём тщательного измельчения зрелых генетически немодифицированных бобов. Во второй серии исследовались образцы ТГ-сои, полученной в результате применения специальных технологических методов генетической модификации.

2.РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

На рис.2 приводятся спектры ФЛ образцов сои трёх сортов (кривые 1-3), полученные по схеме, представленной на рис.1. Все три спектра зарегистрированы с нулевой задержкой, т.е. синхронно с импульсом возбуждающего излучения. Спектр, соответствующий кривой (1), получен для образца немодифицированной соевой муки. Спектры (2) и (3) получены для двух сортов сои (производство США) с генетически изменёнными свойствами, т.е. для ТГ-образцов. Спектр (1) на рис.2 состоит из нескольких взаимно перекрывающихся полос, расположенных в диапазоне 280-600 нм.

I, arb. un.

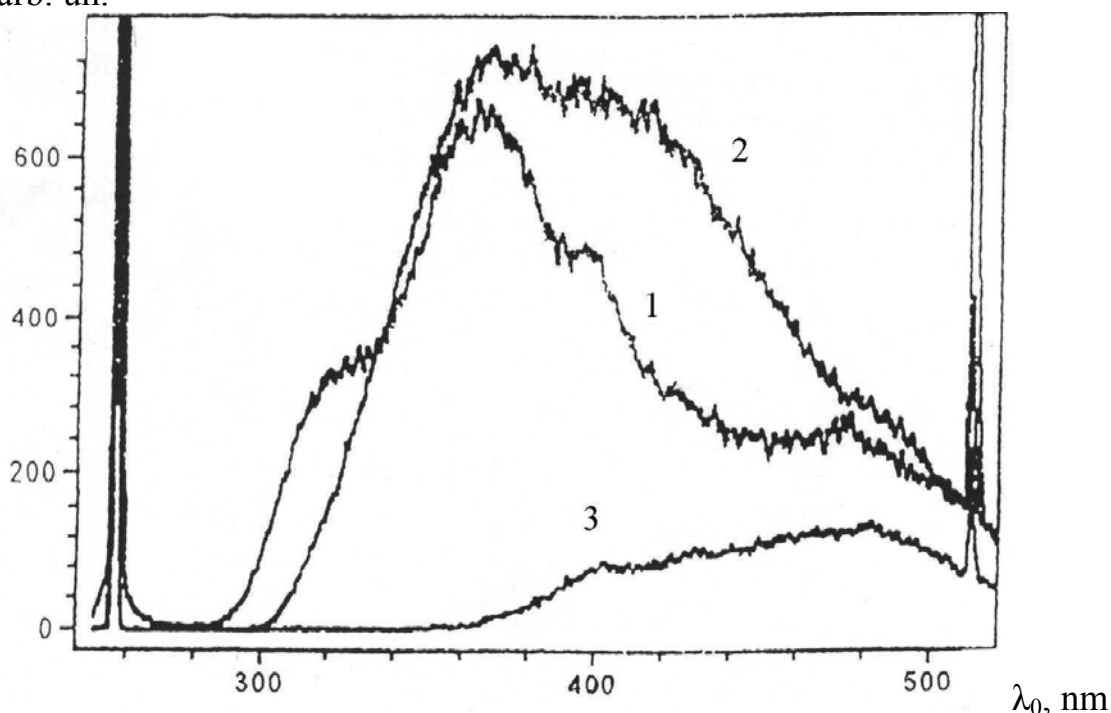


Рис.2. Спектры флуоресценции соевой муки, снятые с нулевой задержкой (синхронно с импульсом возбуждающего излучения); (1) - спектр муки немодифицированной сои; (2) и (3) - спектры муки генетически модифицированной сои. Слева находится пик возбуждающего излучения с длиной волны $\lambda_0 = 255,3$ нм, соответствующий второй оптической гармонике линии генерации лазера на парах меди с длиной волны $\lambda_0 = 510,6$ нм (пик справа).

В ультрафиолетовой области (вблизи 300 нм) обнаруживается «ступенчатый» максимум (см. рис.2, кривая 1). Этот максимум относится к проявлению хромофорных групп нуклеиновых оснований, входящих в состав ДНК и РНКВ области 360 нм для образца (1) присутствует ярко выраженный максимум. В этой области спектра обычно обнаруживается полоса флуоресценции белков, связанная главным образом с проявлением гетероароматической аминокислоты - триптофана. Кроме того, вклад в этот максимум может вносить также соответствующая хромофорная группа нуклеиновых оснований, входящих в состав ДНК и РНК соевой муки. Для образца (2), соответствующего ТГ-сое, обнаруживается уширение спектра ФЛ без проявления каких-либо отчетливых максимумов. Интенсивность этого спектра незначительно увеличивается по сравнению со спектром образца (1).

В отличие от образца (1) для обсуждаемого спектра образца (2) «ступенчатый» максимум в ультрафиолетовой области (300 нм) не наблюдается. В случае образца (3) спектр ФЛ характеризуется резким уменьшением интенсивности и смещением полос ФЛ в длинноволновую область спектра. Максимум ФЛ образца (3) соответствует 480 нм.

Рис. 3 иллюстрирует характер изменения ФЛ немодифицированной соевой муки при задержке строга на $\tau = 50$ нс. При включении задержки интенсивность спектра ФЛ резко падает. Вместо одного сравнительно резкого максимума в области 360 нм, при задержке в наблюдаемом спектре обнаруживается дополнительный максимум в области 390 нм (на рис.3 показан стрелкой). Кроме того, при задержке «ступенчатая» полоса в области 300 нм сильно ослабляется (см. рис. 3).

На рис.4 представлены спектры ФЛ трёх образцов сои, полученные с задержкой $\tau = 50$ нс. Кривая (1) соответствует спектру ФЛ немодифицированной сои, кривые (2) и (3) - спектрам двух сортов ТГ-сои. Интенсивность спектра «задержанной» ФЛ более чем на порядок меньше интенсивности спектра, полученного с нулевой задержкой. В отличие от исходного спектра ТГ-сои (образец 2), снятого с нулевой задержкой (см. рис. 2, кривая 2), в спектре (2) «задержанной» ФЛ, представленном на рис.4, соответствующем образцу (2), наблюдается «сужение» полосы и появление достаточно резкого максимума интенсивности на длине волны 430 нм (показан стрелкой на рис. 4). Максимум спектра на кривой (2) рис.4, соответствующего ТГ-сое, существенно сдвинут (на 60 нм) в длинноволновую область по отношению к коротковолновому (370 нм) максимуму спектра (1) на рис.4, соответствующему образцу немодифицированной сои. Интенсивность спектра ФЛ другого образца ТГ-сои (образец №3) - (кривая (3) на рис. 4) оказалась существенно меньше интенсивности спектров немодифицированной сои (кривая (1) рис.4) и ТГ-сои (образец 3) (кривая (2) рис.4). При этом спектр ФЛ для образца №3 ТГ-сои (кривая (3) рис.4) сдвинут в длинноволновую область

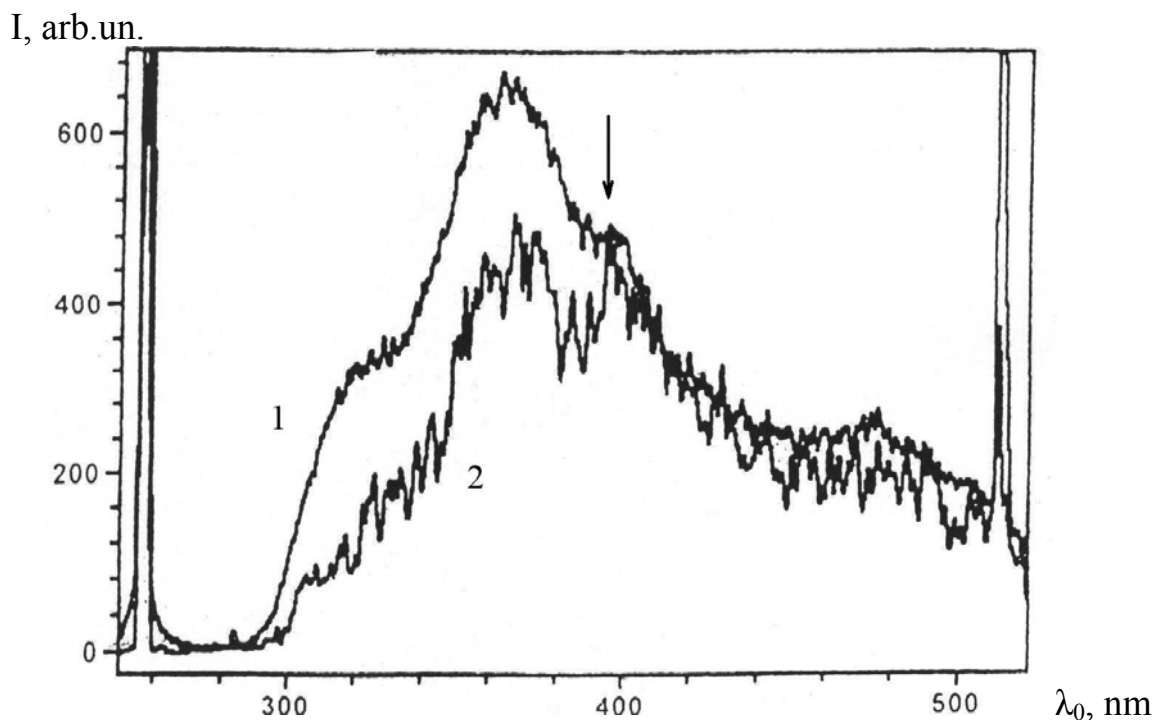


Рис.3. Спектры флуоресценции немодифицированной соевой муки, полученные с нулевой задержкой (кривая 1) и с задержкой $\tau = 50$ нс (кривая 2). Кривая 2 приведена с 15-кратным увеличением.

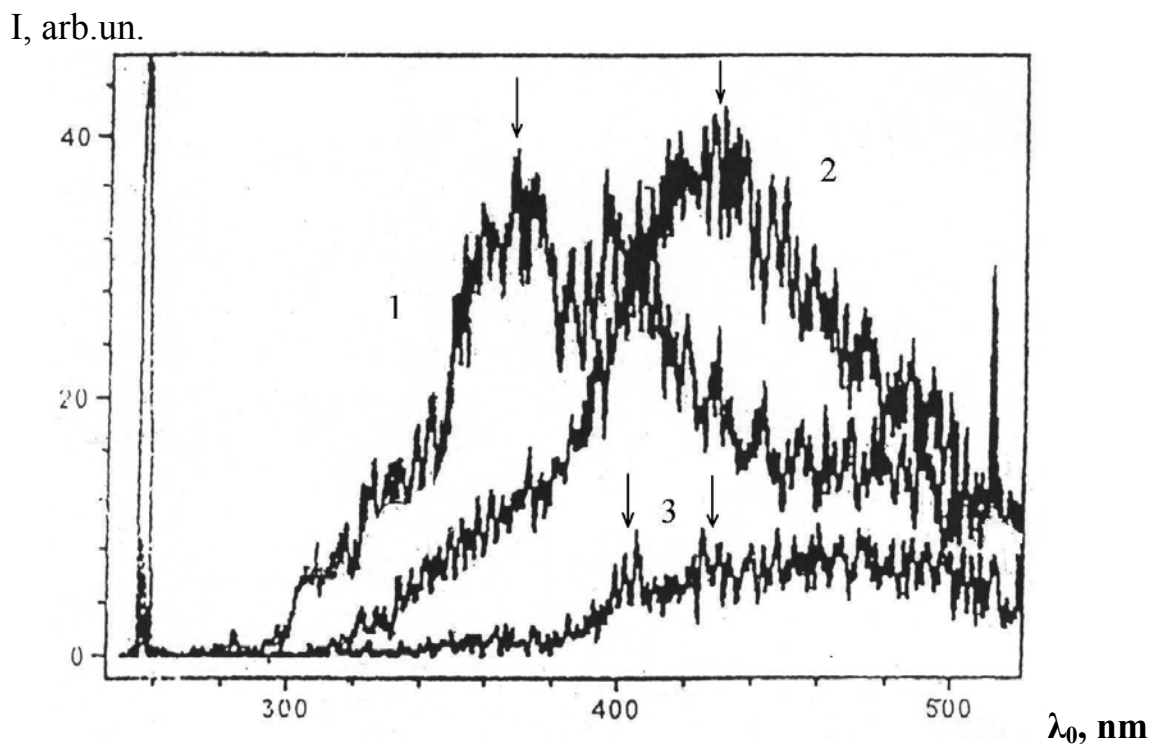


Рис.4. Спектры флуоресценции соевой муки, полученные с задержкой $\tau = 50$ нс; (1) - спектр муки немодифицированной сои, (2) и (3) - мука из генетически модифицированной сои, два разных образца.

по отношению к спектрам (1) и (2). Отметим также, что для образца №3 ТГ-сои обнаруживаются дополнительные максимумы, соответствующие длинам волн 405 и 430 нм (см. стрелки вблизи кривой (3) на рис.4).

3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Обнаруженные в наших экспериментах особенности при переходе от «синхронных» спектров к спектрам «задержанной» ФЛ можно объяснить на основе поляритонной теории конденсированных сред [7]. При этом в качестве простейшей модели конденсированной среды может быть использована модель периодически расположенных заряженных лорентцевых осцилляторов (см. рис. 5). Остановимся на рассмотрении характерных свойств спектров электромагнитных волн для такой модели [8].

Согласно этой модели предполагается, что внутри материальной среды имеются равномерно распределенные в пространстве заряженные частицы, колеблющиеся около своих положений равновесия – лорентцевы осцилляторы. Важно отметить, что, если равновесные положения электронных осцилляторов несущественно изменяются в процессе электронных колебаний, то модель Лорентца может быть использована для описания свойств поляритонных волн не только в кристаллах, но и в других, менее упорядоченных средах: аморфных телах, стеклах, жидкостях и, с учетом некоторых ограничений, в гетерогенных биологических объектах. Модель Лорентца может быть использована также для описания свойств электромагнитных волн в твердых телах, содержащих равномерно распределенные в пространстве примесные центры. Роль таких примесных центров в рассматриваемом случае могут играть хромофорные молекулярные группы.

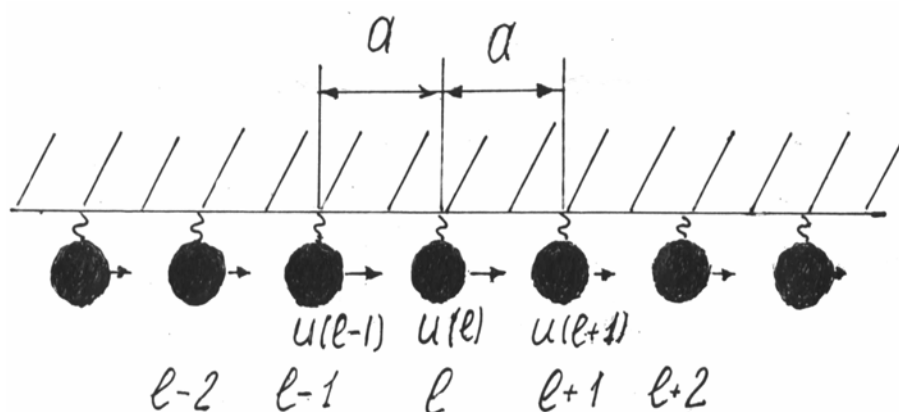


Рис.5. Цепочка лорентцевых осцилляторов материальной среды.

Обозначим через $\vec{u}(\vec{l})$ - вектор отклонения заряженной частицы (электрона) от положения равновесия. Здесь $\vec{l} = l_1\vec{a}_1 + l_2\vec{a}_2 + l_3\vec{a}_3$ - так называемый вектор трансляции, задающий положение элементарной ячейки в

кубической кристаллической решетке; l_1, l_2, l_3 - целые числа. Запишем уравнение движения заряженной частицы с массой m и зарядом $e\sqrt{F}$ (F - так называемая сила осциллятора, характеризующая величину заряда колеблющейся частицы, e - заряд электрона; $F \cong 1$) в поле электромагнитных волн с напряженностью \vec{E} . При этом для простоты будем полагать, что поле \vec{E} вблизи заряженной частицы (так называемое эффективное поле) совпадает по амплитуде с внешним полем электромагнитной волны в вакууме. При этом получаем:

$$m \frac{d^2 \vec{u}(\vec{l})}{dt^2} = -\gamma_0 \cdot \vec{u}(\vec{l}) + e\sqrt{F} \vec{E} \quad (1)$$

В правой части уравнения (1) присутствует сила, действующая на заряженный осциллятор и обусловленная электрическим полем в области движения заряженной частицы. Уравнение движения (1) необходимо рассматривать совместно с системой уравнений Максвелла в материальной среде. Запишем эти уравнения в виде:

$$\begin{aligned} \text{rot} \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad \text{rot} \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \\ \text{div} \vec{D} &= 0, \quad \text{div} \vec{B} = 0. \end{aligned} \quad (2)$$

Система уравнений (2) написана для материальной среды с отсутствием свободных зарядов ($\rho = 0$) и отсутствуют токи ($j = 0$). Кроме того, для простоты полагается, что среда является немагнитной, т.е. $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$ ($\mu = 1$).

Решение системы уравнений (1) для вещества и для электромагнитного поля (2) ищется в виде плоских монохроматических волн:

$$\begin{aligned} \vec{E} &= \vec{E}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t), \quad \vec{H} = \vec{H}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t), \quad \vec{D} = \vec{D}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t), \\ \vec{B} &= \vec{B}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t), \quad \vec{u} = \vec{u}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t). \end{aligned}$$

Здесь $\omega = \frac{2\pi}{T} = 2\pi f$ - круговая частота, характеризующая колебания рассматриваемых величин в процессе распространения волны (f - обычная частота, измеряемая в герцах; $\vec{k} = [2\pi/\lambda] \vec{j}$ - волновой вектор, направление которого задает направление распространения волны в пространстве; λ - длина волны в материальной среде, \vec{j} - единичный вектор). Проанализируем первое из уравнений системы (2). Применим операцию "rot" к левой и правой части этого уравнения и используем известное тождество векторного анализа:

$$\text{rot rot} \vec{a} = \text{grad} \cdot \text{div} \vec{a} - \nabla^2 \vec{a} \quad , \quad \text{где } \nabla - \text{оператор векторной производной,}$$

$(\nabla^2 = \Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$ - оператор Лапласа). В результате приходим к соотношению:

$$\text{grad div } \vec{E} - \Delta \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial}{\partial t} \frac{\partial \varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}}{\partial t} \quad (3)$$

При этом мы использовали известные материальные соотношения: $\vec{D} = \varepsilon_0 \varepsilon \vec{E}$ и $B = \mu_0 \mu \vec{H}$ ($\mu=1$), а также второе уравнение Максвелла ($\text{rot } \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$) системы (2).

Подставим в третье уравнение системы (2) решение в виде плоских монохроматических волн. В результате, используя правила векторного дифференцирования $\text{div } \vec{E}_0 \exp[i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)] = i\vec{k} \vec{E}_0 \exp[i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)] = 0$, получаем соотношение:

$$i \varepsilon_0 \varepsilon \vec{k} \vec{E}_0 \exp[i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)] = 0 \quad (4)$$

Относительная диэлектрическая проницаемость ε в общем случае предполагается зависящей от частоты ω электромагнитной волны, т.е. $\varepsilon = \varepsilon(\omega)$.

В вакууме электромагнитная волна характеризуется только поперечной поляризацией, т.е. имеет место: $\vec{E}_0 \perp \vec{k}$. В материальной среде необходимо рассмотреть возможность существования как поперечных ($\vec{E}_0 \perp \vec{k}$), так и продольных ($\vec{E}_0 \parallel \vec{k}$) волн. Для продольных волн имеет место: $\vec{E}_0 \vec{k} = E_0 k \cos \theta \neq 0$. Поэтому для выполнения соотношения (4) необходимо, чтобы диэлектрическая проницаемость ε обращалась в нуль для некоторого значения частоты $\omega = \omega_l$: $\varepsilon(\omega_l) = 0$, (т.е. ω_l - нуль диэлектрической проницаемости).

Для поперечных ($\vec{E}_0 \perp \vec{k}$) волн в соответствии с (4) диэлектрическая проницаемость может быть отлична от нуля:

$$\varepsilon(\omega) \neq 0 \quad (5)$$

Остановимся на нахождении зависимости $\varepsilon(\omega)$ для поперечных волн. В этом случае соотношение (3) с учетом (5) переходит в волновое уравнение для напряженности поля \vec{E} :

$$\left(\Delta - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) \vec{E} = 0 \quad (6)$$

Здесь вводится обозначение $c = \frac{c_0}{\sqrt{\varepsilon(\omega)}}$ для фазовой скорости

поляритонной волны.

При подстановке в уравнение (6) решения в виде плоской монохроматической волны $\vec{E} = \vec{E}_0 \exp[i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)]$ приходим к следующему алгебраическому соотношению:

$$\omega = \frac{c_0 k}{\sqrt{\varepsilon(\omega)}} \quad (7)$$

Это соотношение в неявном виде задает так называемый закон дисперсии для поляритонной волны: $\omega = \omega(\vec{k})$.

Остановимся теперь на анализе зависимости $\omega(\vec{k})$, т.е. закона дисперсии электромагнитных волн в материальной среде (поляритонных волн), исходя из соотношения (7). Используем выражение для диэлектрической проницаемости

[7]: $\varepsilon(\omega) = \frac{\omega_l^2 - \omega^2}{\omega_0^2 - \omega^2}$, где $\omega_l^2 = \omega_0^2 + \omega_p^2$. Здесь $\omega_0 = \sqrt{\frac{\gamma_0}{m}}$ - частота

поперечной моды, ω_l - значение частоты, при котором $\varepsilon(\omega)$ обращается в нуль, $\omega_p^2 = \frac{e^2 F}{m V \varepsilon_0}$ - квадрат так называемой плазменной частоты. Тогда получаем:

$$\omega^2 = \frac{c_0 k^2 (\omega_0^2 - \omega^2)}{\omega_l^2 - \omega^2} \quad (8)$$

Отсюда приходим к биквадратному уравнению для круговой частоты ω :

$$\omega^4 - \omega^2 (\omega_l^2 + c_0^2 k^2) + c_0^2 k^2 \omega_0^2 = 0 \quad (9)$$

Таким образом, для рассматриваемой модели материальной среды имеются два типа поляритонных волн, соответствующие двум дисперсионным ветвям, т.е. зависимостям $\omega^2(\vec{k})$:

$$\omega_+^2 = \frac{\omega_l^2 + c_0^2 k^2}{2} \left(1 + \sqrt{1 - \frac{4c_0^2 k^2 \omega_0^2}{(\omega_l^2 + c_0^2 k^2)^2}} \right) \quad (10a)$$

$$\omega_-^2 = \frac{\omega_l^2 + c_0^2 k^2}{2} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4c_0^2 k^2 \omega_0^2}{(\omega_l^2 + c_0^2 k^2)^2}} \right) \quad (10b)$$

При переходе от круговых частот ω к волновым числам ν ($\omega = 2\pi c_0 \nu$) вместо (10 а, б) получаем:

$$v_+^2 = \frac{4\pi^2 v_l^2 + k^2}{8\pi^2} \left(1 + \sqrt{1 - \frac{16\pi^2 k^2 v_0^2}{(4\pi^2 v_l^2 + k^2)^2}} \right), \quad (11a)$$

$$v_-^2 = \frac{4\pi^2 v_l^2 + k^2}{8\pi^2} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{16\pi^2 k^2 v_0^2}{(4\pi^2 v_l^2 + k^2)^2}} \right). \quad (11b)$$

Вид этих кривых для поляритонов в рассматриваемой материальной среде показан на рис.6.

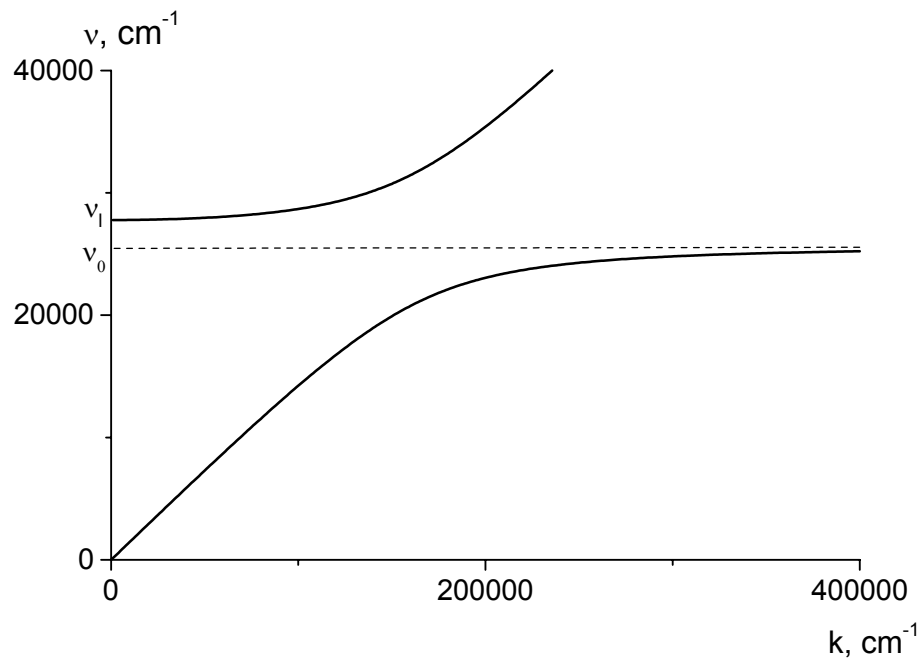


Рис.6. Закон дисперсии поляритонов в соевой муке в ближней ультрафиолетовой области.

Остановимся на анализе зависимости групповой скорости v поляритонов верхней ветви от модуля волнового вектора \vec{k} . Продифференцировав (9), для групповой скорости поляритонов верхней ветви получим:

$$\frac{d\omega}{dk} = \frac{2\pi c_0^3 [v^2(k) - v_0^2] k}{v(k) [8\pi^2 c_0^2 v^2(k) - 4\pi^2 c_0^2 v_l^2 - c_0^2 k^2]} \quad (12)$$

График зависимости групповой скорости поляритонов верхней ветви от волнового вектора приведен на рис.7.

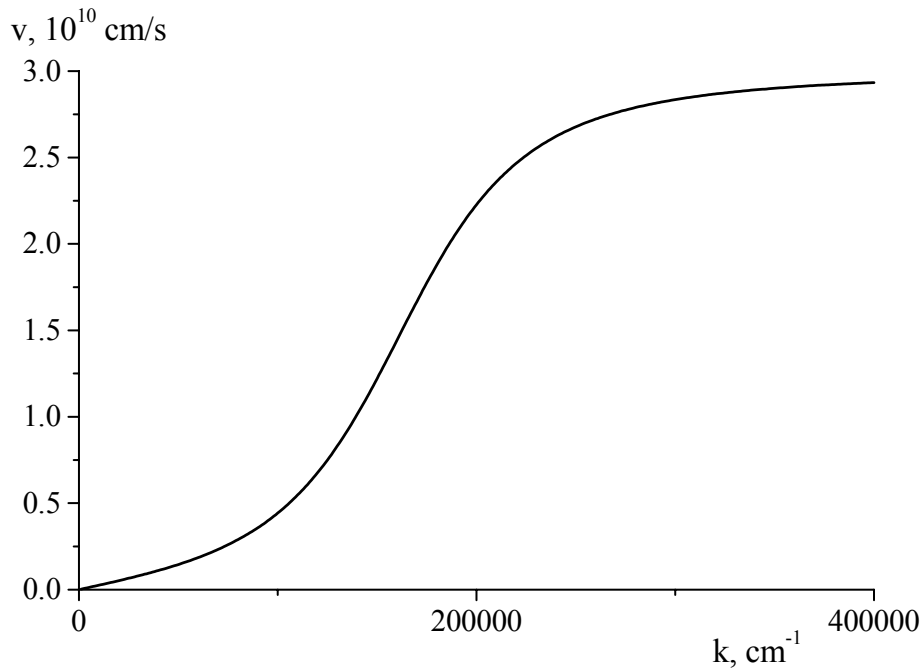


Рис.7. Зависимость групповой скорости поляритонов верхней ветви от волнового вектора.

При толщине слоя вещества в кювете, равной L , получаем, что время нахождения поляритонов внутри вещества по порядку величины составляет $\tau = \frac{L}{d\omega/dk}$. При малых значениях k из закона дисперсии (10а) следует

выражение для групповой скорости в виде: $\frac{d\omega}{dk} = \frac{c^2 k}{\sqrt{\omega_l^2 + c^2 k^2}}$, где $c^2 = c_0^2 \left(1 - \frac{v_0^2}{v_l^2}\right)$.

При использовании задержки τ в системе регистрации вторичное излучение характеризуется проявлением поляритонов с групповыми скоростями $\frac{d\omega}{dk} = \frac{L}{\tau}$, т.е. соответствует диапазону волновых векторов:

$$k \leq k_0 = \frac{2\pi c_0 v_l L}{c^2 \tau}. \quad (13)$$

Это приводит к тому, что при увеличении времени задержки должно происходить сужение полосы ФЛ (см. рис.6). При очень больших временах задержки τ ширина наблюдаемой полосы ФЛ определяется временем жизни соответствующего квантового состояния ($V=V_l$).

Соответственно для нижней поляритонной ветви при больших τ должны проявляться поляритоны с частотой, близкой к ν_0 ($k \rightarrow k_{\max}$).

Полученные экспериментальные результаты подтверждают теоретический вывод о том, что при увеличении времени задержки τ ширина полосы фотолюминесценции уменьшается. При этом наблюдаемые пики при больших задержках ($\tau = 50$ нс) должны быть близки к частотам продольных и поперечных мод лорентцевых осцилляторов хромофорных молекулярных групп, ответственных за проявление фотолюминесценции.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в данной работе показано, что в соевой муке при возбуждении импульсным ультрафиолетовым излучением возникает ФЛ, в спектре которой обнаруживаются максимумы в области 300-500 нм. Такие максимумы соответствуют характерным полосам хромофорных групп молекул нуклеиновых оснований и белков, входящих в состав соевой муки. При введении временной задержки в систему регистрации в спектрах ФЛ наблюдаются существенные изменения: сужение полос, смещение их максимумов в длинноволновую область спектра, расщепление на две компоненты и уменьшение интенсивности полос ФЛ.

Наблюдаемые изменения спектров ФЛ при введении временной задержки согласуются с выводами, основанными на анализе поляритонных эффектов. В результате сравнения полученных спектров ФЛ для различных образцов соевой муки, включая генетически модифицированные образцы, установлено, что при переходе от немодифицированных к ТГ-продуктам основные максимумы ФЛ смещаются в длинноволновую область, а их форма видоизменяется. Особенно отчетливо этот эффект проявляется при использовании временной задержки в системе регистрации. Такой эффект возникает в связи с тем, что при осуществлении генетической модификации происходит возмущение исходной структуры материала на молекулярном уровне. В частности, такие возмущения осуществляются в результате процесса модификации молекулярной структуры ДНК.

Для создания ТГ растений к настоящему времени разработаны методы, позволяющие вырезать из молекул ДНК необходимые фрагменты, модифицировать их соответствующим образом, реконструировать в одно целое и клонировать. Остановимся более подробно на одном из них: методе биологической баллистики. В этом методе используются так называемые векторные молекулы (векторы), т.е. молекулы, способные присоединять чужеродную ДНК и обеспечивать ее репликацию и экспрессию. Сущность метода состоит в том, что на мельчайшие частицы золота или вольфрама, диаметром 0,6-1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Несущие ДНК частицы наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биологической баллистической пушки. Далее эти частицы с большой скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные мембраны, входят в

цитоплазму и ядро клеток, подвергающихся генной модификации. Следующий шаг состоит в переносе этих клеток в заданную среду для дальнейшего культивирования и регенерации. Описанный метод биологической баллистики является одним из самых эффективных и позволяющих получать стабильные ТГ растения.

Один из известных биологических методов выявления трансгенных объектов основан на обнаружении специфических белков, экспрессирующихся в этих объектах (так называемый иммунологический ELISA-тест).

Другой метод основан на использовании так называемой полимеразной цепной реакции. В этом методе выявляется рекомбинантная ДНК на основе характерных процессов её взаимодействия с определенными веществами.

Полученные нами результаты открывают возможности для проведения анализа и контроля молекулярного состава трансгенных пищевых продуктов методом изохронной флуоресцентной спектроскопии, основанном на применении ультрафиолетового импульсно-периодического лазерного источника света для возбуждения спектров флуоресценции и системы регистрации со стробированием.

В отличие от упомянутых биологических методов, метод изохронной флуоресцентной спектроскопии является неразрушающим, экспрессным и весьма чувствительным к изменению генетической структуры образца, так как связан с анализом спектральных и временных характеристик электронно-колебательной системы, сильно зависящих от микроструктуры материальной среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильков С.Л. Анализ параметров экситонов в ДНК. Экситонные волны в ДНК как одна из причин мутагенеза. Биофизика Т.48, В.1, с.27-34, 2003.
2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. – Изд-во МГУ, 1994. – 320 с.
3. Кэри П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
4. Горелик В.С., Агальцов А.М., Моро Р.А. Лазерный анализатор молекулярной структуры и состава воды. «Наука – производству», №6, с. 7–12, 2000.
5. Gorelik V. S. Impulsive ultraviolet excitation of biological structures. – J. of Russian Laser Research, V.20, N 2, p.152-171, 1999.
6. Gorelik V. S., Agaltsov A.M., Bordeniounk A.N. Ultraviolet luminescence of microorganisms and DNA excited by nanosecond laser pulses. – J. of Russian Laser Research, V.23, N 1, p.31-48, 2002.
7. Агранович В.М. Теория экситонов. – М.: «Наука», 1968. –382 с.
8. Горелик В.С. Идеализированные модели кристаллических решеток. В сборнике «Неупругое рассеяние света», гл. редактор – Н.Г. Басов. Труды ФИАН, Т.180, с.87-126, 1987.