

области от 210 до 450 нм. Степень кислотности растворов определялась с помощью рН-метра «рН-304». Облучение растворов проводилось в кюветном отделении спектрофлуориметра. Интенсивность облучения составляла ~ 1 Вт/м², использовалась односантиметровая кювета. Для проверки степени включения фотобиотина был проведен гибридизационный анализ нанесенной на нейлоновый фильтр предварительно денатурированной тимусной ДНК [4, 5].

Полученные спектральные и фотохимические характеристики ФБ сопоставлялись с аналогичными характеристиками ранее исследованных фотобиотина фирмы Clontech (США) — ФБС и полимерного фотоактивного биотинового производного (ПФБ) [3], которые уже используются как соединения для нерадиоизотопного мечения нуклеиновых кислот в гибридизационном анализе, в частности при диагностике простого герпеса 2-го типа и гриппа А [6].

Результаты и обсуждение

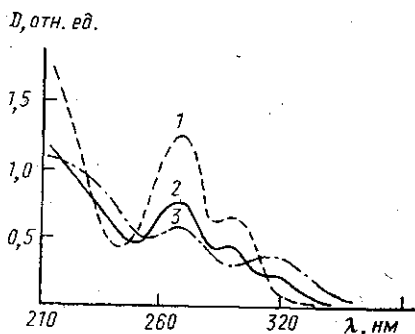


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов ФБ при $C=10$ моль/л и рН 4 (1), 7 (2) и 10 (3)

Спектр поглощения нейтрального (рН 7) водного раствора ФБ (рис. 1) содержит три максимума при $\lambda=273, 304$ и 323 нм, интенсивности которых относятся соответственно как 1:0,5:0,25. В спектре поглощения водного раствора полимерного биотинового производного ПФБ, имеющего общую с ФБ гидронитрофенильную фотоактивируемую группу, максимумы поглощения наблюдаются приблизительно при тех же длинах волн: $\lambda=271$ и 305 нм.

В спектре же ФБС, фотоактивируемой у которого является другая — азидонитрофенильная группа, максимумы поглощения соответствуют $\lambda=262$ и 472 нм. Таким образом, максимум поглощения при $\lambda=260-270$ нм является общим для биотиновых производных, а фотоактивируемая группа, различная у разных производных, отвечает за максимум при $\lambda=472$ нм у ФБС и за максимумы при $\lambda=304-305$ нм у ФБ и ПФБ. Все три фотобиотина интенсивно поглощают свет в области длин волн $\lambda < 200$ нм, но природа этой полосы пока не ясна.

Подкисление раствора ФБ до рН 3 не приводит к заметным изменениям формы спектра поглощения (рис. 1), но увеличивается интенсивность максимумов, и они немного сдвигаются в коротковолновую область (максимум при $\lambda=273$ нм смещается до 271 нм). При подщелачивании исходного раствора ФБ от рН 7 до рН 10 происходит уменьшение интенсивности максимума при $\lambda=273$ нм, полное исчезновение полосы с максимумом при $\lambda=304$ нм, а также появление двух новых полос поглощения при $\lambda=238$ и 334 нм. Аналогично выглядит спектр щелочного раствора ПФБ (рН 10): наблюдаются три максимума при $\lambda=240, 270$ и 330 нм. Спектр поглощения подкисленного раствора ПФБ (рН 2) также мало отличается от спектра нейтрального раствора.

При облучении раствора ФБ ультрафиолетовым светом с длинами волн $250-350$ нм время полного необратимого разложения составля-

ет 10—15 мин, что практически в 2 раза меньше времени разложения ФБ (~20 мин) и в 4 раза меньше, чем у ФБС (35—40 мин). Сокращение времени разложения ФБ может быть использовано для ускорения процесса мечения нуклеиновых кислот с использованием нового фотобиотина в гибридационном анализе ДНК и РНК. В спектре поглощения водного раствора ФБ в процессе облучения происходит постепенное падение интенсивности максимумов при $\lambda=273$ и 304 нм. Спектры поглощения в зависимости от длительности облучения характеризуются изобестической точкой при $\lambda=288$ нм (рис. 2). Аналогичная картина наблюдается и при облучении раствора ПФБ. Оба максимума в спектре ($\lambda=271$ и 305 нм) уменьшаются одновременно. Спектры поглощения ПФБ в зависимости от длительности облучения характеризуются тремя изобестическими точками: при $\lambda=230$, 240 и 320 нм. Наличие изобестических точек свидетельствует о присутствии в водных растворах ФБ и ПФБ двух типов поглощающих центров — исходной молекулы и продукта ее фоторазложения. При облучении водного раствора ФБС картина несколько усложняется. В спектре поглощения также практически одновременно происходит падение интенсивности полос с максимумами при $\lambda=262$ и 472 нм и, кроме того, возникают полосы поглощения фотопродукта при $\lambda=284$ и 514 нм. Появляется также полоса поглощения с максимумом при $\lambda=353$ нм.

Воздействие на ФБ облучения с длиной волны меньше 230 нм не приводит к существенным изменениям спектра поглощения. Аналогичная картина наблюдается и при облучении ФБС светом $\lambda>320$ нм [3]. Для ПФБ подобных данных в литературе нет.

При облучении УФ-светом подкисленного раствора ФБ (рН 4) одновременно исчезают максимумы при $\lambda=271$ и 305 нм (рис. 3). Спектры поглощения этого раствора в зависимости от длительности облучения имеют две изобестические точки — при $\lambda=258$ и 334 нм. Время полного разложения по сравнению с нейтральным раствором увеличивается до 20—25 мин.

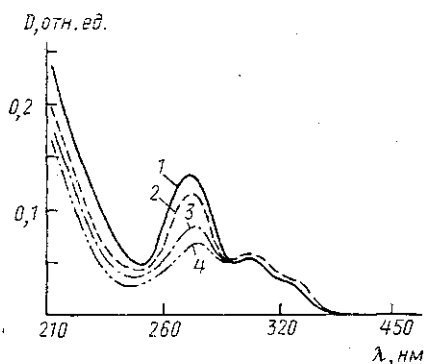


Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов ФБ при $C=1$ моль/л и рН 7 до (1) и после облучения УФ-светом в течение 2 (2), 6 (3) и 10 мин (4)

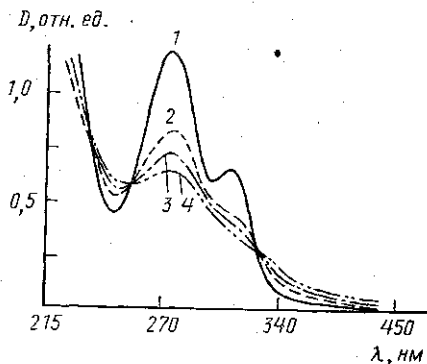


Рис. 3. Спектры поглощения раствора ФБ при $C=10$ моль/л и рН 4 до (1) и после облучения в течение 5 (2), 10 (3) и 20 мин (4)

В спектрах поглощения подщелаченного раствора ФБ в зависимости от времени облучения наблюдается одновременное падение максимумов при $\lambda=238$, 273 и 334 нм.

Время полного разложения ФБ в щелочном растворе соответствует времени разложения в нейтральном растворе и составляет 10—15 мин. Аналогично облучение изначально подкисленного раствора ПФБ (рН 2) не приводит к существенным изменениям спектров поглощения по сравнению с нейтральным раствором, однако время полного разложения не увеличивается, как в случае ФБ, а уменьшается приблизительно в 2 раза по сравнению с нейтральным раствором.

Так же как и для ФБ, интенсивности полос с максимумами при $\lambda=240, 270$ и 330 нм в спектре поглощения щелочного раствора ПФБ при облучении уменьшаются, причем коротковолновый максимум исчезает быстрее, чем два других. Время полного разложения ПФБ в данном случае также не изменяется [3].

При подкислении исходного раствора ФБС (рН 2) максимумы поглощения при $\lambda=284$ и 514 нм отсутствуют, в то же время наблюдается полоса поглощения при $\lambda=340$ нм, обусловленная фотопродуктом. Отметим, что время разложения ФБС при указанном уменьшении рН составляет также 40 мин. Аналогичные спектральные изменения происходят при облучении щелочного (рН 10) раствора ФБС в воде [3].

Наличие азидной группы в молекулах фотобиотина обуславливает высокую фотохимическую активность этих соединений. При облучении растворов фотобиотинов ультрафиолетовым светом образуется очень активный радикал нитрен, который может участвовать в различных химических реакциях, в частности, он может присоединяться к молекулам нуклеиновых кислот по связям С—Н, О—Н, N—Н. При эквимольных соотношениях включается 5—10 молекул фотобиотина на 1000 оснований ДНК [7]. Точное место присоединения фотобиотинов к ДНК и РНК пока неизвестно.

Для проведения гибридизационного анализа ДНК зонд готовили путем модификации тимусной ДНК фотобиотином. Проверку степени включения биотина и условий модификации проводили путем нанесения ДНК-зонда на нейлоновый фильтр. Для определения меченых ДНК использовали конъюгат коллоидного углерода с авидином. Биотинилированную ДНК наносили на нейлоновую подложку в количествах $10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}$ и 10^{-13} г. Затем фильтр с нанесенным ДНК-зондом помещали в раствор, содержащий соль NaCl, увеличивающую ионную силу и стабилизирующую тем самым структуру ДНК, детергент Тритон X100, обеспечивающий отсутствие связывания зонда с подложкой, и хаотропные реагенты, связывающие воду. После обработки фильтра конъюгатом авидин—углерод окраску дали места фильтра, на которые было нанесено от 10^{-11} до 10^{-10} г ДНК.

Это означает, что чувствительность нашей системы составляет $\sim 10^{-10}$ г. Чувствительность метода можно значительно улучшить, используя высокоактивные ферменты — пероксидазу, щелочную фосфатазу и их хромогенные субстраты. Увеличивая время проявления в указанных условиях, можно добиться возрастания чувствительности до единиц пикограмма [5].

Выводы

В работе исследована динамика электронных спектров поглощения водных растворов нового фотобиотина при изменении их рН и дозы облучения. Выяснена возможность использования этого соединения для мечения нуклеиновых кислот. Оптические свойства нового фотобиотина сопоставлены со свойствами ранее изученных фотобиотинов.

Применение нового фотобиотина дает возможность сократить время мечения нуклеиновых кислот в 2 раза по сравнению с ПФБ и почти в 4 раза по сравнению с ФБС. Мечение эффективнее проводить в нейтральной или подщелаченной среде при облучении светом с длинами волн от 250 до 350 нм. Чувствительность метода одинакова для всех трех фотобиотинов и достигает единиц пикограмма биотинилированной нуклеиновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buckland R. M. // Nature. 1986. 320. P. 557.
2. Brigati D. J., Myerson D., Leary J. J. et al. // Virology. 1983. 126. P. 32.
3. Щербо С. Н., Пацаева С. В., Южаков В. И., Турчинский М. Ф. // Биофизика. 1992. 37, № 1. С. 34.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.
5. Альжанова А. Т., Генералова В. М. // Молекулярная биология. 1988. 22, № 3. С. 780.
6. Урываев Л. В., Русавская Е. А., Синагатуллина Н. М. и др. // Вопросы вирусологии. 1990. № 6. С. 464.
7. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. C., Symons R. H. // Nucleic Acid Res. 1985. 13, N 3. P. 745.

Поступила в редакцию
26.06.95

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1996. № 3

ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 615.315.592

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ СЕГНЕТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПЛЕНОК НА ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТРУКТУР КРЕМНИЙ—СЕГНЕТОЭЛЕКТРИК

Н. Л. Левшин, А. Н. Невзоров, А. Г. Петрухин
(кафедра общей физики и молекулярной электроники)

Исследовано влияние состояния поляризации сегнетоэлектрика на вольт-фарадные и вольт-амперные характеристики структур металл—пленка сегнетоэлектрика—кремний. Показано, что термополевые обработки приводят не только к переполяризации сегнетоэлектрика, но и к перезарядке электронных ловушек. Методом масс-спектропии зарегистрирована десорбция различных атомов и молекул с поверхности структуры при прохождении температуры фазового перехода.

1. Введение

Весьма перспективным материалом для создания ячеек хранения информации является структура полупроводник—сегнетоэлектрическая пленка. В последние годы свойства этих структур широко исследуются (см., напр., [1—2]). Вместе с тем нет окончательной ясности в вопросе о влиянии поляризации пленок сегнетоэлектрика (СЭ) на емкостные и токовые характеристики. В настоящей работе в качестве модельной структуры был выбран кремний с нанесенной сегнетоэлектрической пленкой.