ФИЗИКА МОЛЕКУЛ

УДК 57.086.2

Г.Е. Побегалов, А.Н. Арсениев , А.Д. Ведяйкин, М.Л. Соколова, Я.В. Федорова, А.В. Сабанцев

ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛЫ ДНК ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМ КРАСИТЕЛЕМ YOYO-1

G.E. Pobegalov, A.N. Arseniev, A.D. Vedyaykin, M.L. Sokolova, Ya.V. Fedorova, A.V. Sabantsev

St. Petersburg State Polytechnical University,
29 Politekhnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia

CHANGING OF DNA MOLECULE MECHANICAL PROPERTIES DURING INTERACTION WITH YOYO-1 INTERCALATING DYE

Предложена методика регистрации динамики изменения длины одиночной молекулы ДНК в ходе взаимодействия с лигандом. Данная методика опробована для случая взаимодействия молекулы ДНК с интеркалирующим красителем YOYO-1. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие об изменении длины и механических свойств молекулы ДНК при взаимодействии с красителем.

Предложенная методика может быть рекомендована для исследования взаимодействия одиночной молекулы ДНК с различными лигандами, такими как красители и ДНК-связывающие белки, а также для исследования других биополимеров, в том числе амилоидных фибрилл.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ. ОПТИЧЕСКИЙ ЗАХВАТ. УСТАНОВКА «ЛАЗЕРНЫЙ ПИНЦЕТ». ДНК. YOYO-1. ИНТЕРКАЛЯЦИЯ.

The method for registration of a single DNA molecule length change during interaction with a ligand is proposed. The method is tested in the case of DNA molecule interaction with intercalating YOYO-1 dye. The experimental data obtained signifies both DNA elongation and mechanical properties alteration upon YOYO-1 binding.

The proposed method can be used to study single DNA molecule interaction with different ligands, including dyes and DNA-binding proteins. Also this method can be used to study other biopolymers, including amyloid fibrils.

FLUORESCENCE MICROSCOPY. OPTICAL TRAPPING. LASER TWEEZERS SET-UP. DNA. YOYO-1. INTERCALATION.

Интеркалирующий краситель YOYO-1 применяется в различных методах, требующих визуализации ДНК; таких например, как гель-электрофорез, проточная цитометрия, создание геномных карт [1]. Тот же краситель широко используется при исследовании структурных изменений ДНК в ходе различных клеточных процессов [2] и для построения изображений ДНК субдифракционного разрешения [3]. YOYO-1 представляет собой гомодимер оксазола желтого (YO) – красителя нуклеиновых кислот, имеющий химическую формулу 1,1′-(4,4,7,7-тетраметил-4,7-диазаундекаметилен)-бис-4-[3-метил-2,3-дигидро-(бензо-1,3-оксазол)-2-метилиден]-

хинолиниум тетраиодид) [4]. YOYO-1 обладает высокой афинностью к нуклеиновым кислотам с константой связывания порядка $10^{10} – 10^{12}$ л/моль [2]. Квантовый выход флуоресценции YOYO-1 возрастает более, чем в 1000 раз при взаимодействии с ДНК за счет снижения вероятности безызлучательной релаксации возбужденных молекул [4] и, как следствие, увеличения соотношения сигнал/шум при наблюдении флуоресценции.

При помощи одномолекулярных методов оптического пинцета [5 – 9], магнитного пинцета [10] и атомно-силовой микроскопии [11] было показано, что при связывании ДНК с YOYO-1 контурная длина ДНК увеличивается в среднем на 30 %. Особый интерес представляет кинетика связывания YOYO-1 с ДНК при различных условиях. В работе [12] была предпринята попытка исследовать динамику этого процесса при помощи флуоресцентной микроскопии посредством регистрации изображений молекул ДНК, закрепленных одним концом за поверхность покровного стекла и выпрямляемых потоком жидкости в ходе окрашивания красителем YOYO-1. Однако качество результатов, получаемых таким методом, оставляет желать лучшего в связи с тем, что невелика точность определения длины молекулы ДНК по ее флуоресцентному изображению. Кроме того, в таком эксперименте невозможно определить длину молекулы до окрашивания, а фотообесцвечивание красителя и фотоиндуцированные разрывы ДНК накладывают на процесс наблюдения существенные ограничения.

В данной работе предлагается метод регистрации изменения длины одиночной молекулы ДНК при взаимодействии с различными лигандами, лишенный указанных недостатков.

Предлагаемый метод сочетает оптический захват, флуоресцентную микроскопию и систему микрофлюидных ламинарных потоков. Эксперимент проводится в четырехканальной проточной камере, внутри которой путем перемещения оптических ловушек между различными потоками осуществляется захват микросфер, покрытых стрептавидином, закрепление на них единичной молекулы ДНК посредством взаимодействия биотин-стрептавидин, а также осуществляется быстрая смена внешних условий инкубации ДНК.

Такая конфигурация позволяет измерять зависимость длины ДНК от приложенной силы в различных условиях, а также регистрировать динамику изменения этой длины в ходе взаимодействия с лигандом при постоянной приложенной силе. Для этого одна из микросфер удерживается в ловушке, а вторая отпускается, после чего вся конструкция (молекула ДНК, растянутая между двумя микросферами) перемещается в канал, содержащий лиганд. Анализ серии изображений такой конструкции, растягиваемой потоком жидкости с постоянной силой, позволяет зарегистрировать изменение длины молекулы ДНК в ходе взаимодействия с лигандом. Работоспособность предлагаемой методики продемонстрирована на примере взаимодействия молекулы ДНК бактериофага λ с красителем YOYO-1.

Материалы и методы

Экспериментальная установка с двойной оптической ловушкой. Схема экспериментальной установки, частично описанная ранее [3], представлена на рис. 1. Установка с двойной

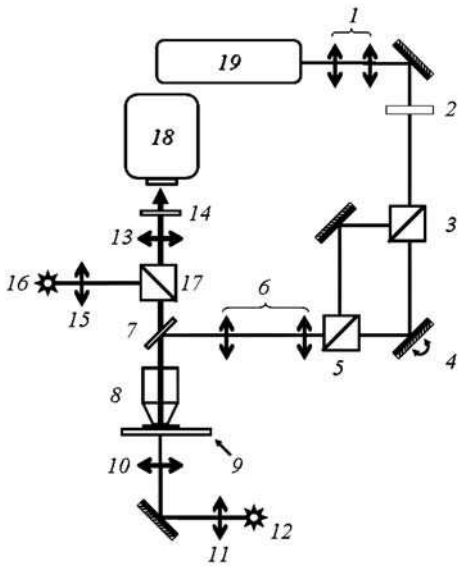

Рис. 1. Оптическая схема установки с двойной оптической ловушкой:
1, 6 – двухлинзовые телескопы; *2* – полуволновая пластинка; *3, 5* – поляризационные светоделительные кубы; *4* – пьезозеркало; *7*– дихроическое зеркало; *8* – объектив микроскопа; *9* – пьезостолик; *10* – конденсор; *11, 15* – линзы; *12* – галогеновая лампа; *13* – тубусная линза; *14*– инфракрасный фильтр; *16* – ксеноновая лампа; *17* – набор фильтров для регистрации флуоресценции; *18* – ПЗС-камера; *19* – лазер

оптической ловушкой создана на базе инфракрасного лазера *19* (Spectra-Physics BL-106C, рабочая длина волны – 1064 нм, максимальная мощность – 5 Вт, работа в непрерывном режиме). Диаметр лазерного луча увеличивается при помощи расширителя пучка *1* (Melles Griot CWBX-7.0-2X). Луч, падая на поляризационный светоделительный куб *3*, разделяется на две ортогональные составляющие, одна из которых модулируется при помощи пьезозеркала *4* (Physik Instrumente S-334 FSM). При помощи второго поляризационного куба *5* лучи сводятся вместе и, отражаясь от дихроического зеркала *7*, заводятся в объектив микроскопа *8*. При создании оптической ловушки диаметр лазерного пучка на входе в объектив должен быть слегка меньше входного зрачка объектива для оптимального использования мощности лазерного излучения [13]. В экспериментах с оптическими ловушками используется масляный иммерсионный объектив с числовой апертурой 1,46 («Plan-Apochromat» 100x/1.46 Oil DIC) производства фирмы Carl Zeiss. Проходя через объектив, оба луча фокусируются, образуя две оптические ловушки. Задняя фокальная плоскость объектива сопряжена с поверхностью пьезозеркала за счет установки телескопа *6*, составленного из двух линз в 4*f*-конфигурации. Это позволяет изменять положение одной ловушки в фокальной плоскости объектива при повороте пьезозеркала. Поворотом полуволновой пластины *2* осуществляется настройка распределения оптической мощности между двумя ловушками.

Для регистрации изображений используется охлаждаемая ПЗС-камера *18* (Photometrics Cascade II 1024). С целью предотвращения попадания в камеру отраженных лучей лазера на входе камеры установлен ИК фильтр *14*. Для возбуждения молекул флуоресцентного красителя YOYO-1 образец облучается ксеноновой лампой *16*. Для регистрации флуоресценции используется стандартный набор фильтров *17* (Filter Set 10) фирмы Carl Zeiss .

Система ламинарных потоков в четырехканальной проточной камере. Четырехканальная проточная камера представляет собой микрофлуидное устройство с четырьмя входными каналами шириной 1 мм, сходящимися в общий канал шириной 4 мм. Каналы формируются в слое двухстороннего скотча (толщина 110 мкм), заключенном между предметным и покровным стеклами микроскопа. К входным каналам при помощи прозрачного эпоксидного клея (POXIPOL) герметично крепятся полиэтиленовые трубки Warner Instruments PE-10 (внутренний диаметр 280 мкм). К общему каналу крепится трубка Warner Instruments PE-10 (внутренний диаметр 500 мкм), через которую отводится жидкость.

К входным трубкам подсоединяются пластиковые шприцы BD MicroFine U-100 объемом 300 мкл, поршни которых предварительно смазываются глицерином для обеспечения плавности хода. Равномерная подача жидкостей в каналы камеры и регулировка скорости потока осуществляются при помощи шприцевого насоса Harvard Apparatus Pump 11 Pico Plus, модернизированного для крепления четырех шприцев.

Подготовка микросфер. В эксперименте с молекулами ДНК используются микросферы из полистирола диаметром 3 мкм, покрытые стрептавидином (CP01N, Bangs Laboratories). Перед использованием микросферы разводятся до концентрации 0,1 мг/л в буфере Tris-HCl (pH = 8,2) 50 ммоль/л и дважды промываются посредством центрифугирования (11400*g*, 5 мин) и ресуспендирования осадка в том же буфере.

Приготовление ДНК-субстрата. Двунитевая ДНК бактериофага λ (New England Biolabs) модифицируется биотином с обоих концов путем лигации с двумя биотинилированными олигонуклеотидами, комплиментарными «липким» концам ДНК бактериофага λ, согласно следующему протоколу:

1. 81 мкл Tris-Hcl 10 мМ (pH = 7,5) смешивается с 6,75 мкл раствора ДНК бактериофага λ (0,3 мг/мл) и с 0,45 мкл 150 мкМ раствора 3′-биотинилированных олигонуклеотидов

(5′-AGGTCGCCGCCC-Biotin),

фосфорилированных с 5′-конца, и 1,8 мкл 5М раствора NaCl.

2. Раствор инкубируется в термошейкере при 75 °С в течение 20 мин для расплавления замкнутых «липких» концов ДНК бактериофага λ.

3. В течение 2 ч температура постепенно снижается до комнатной для отжига олигонуклеотидов.

4. Олигонуклеотиды лигируются с ДНК бактериофага λ путем добавления 10 мкл 10х Т4 ДНК лигазного буфера (10 мМ АТФ, 100 мМ DTT, 100 мМ $MgCl_2$, 500 мМ Tris-Hcl (pH = 7,5) и 0,4 мкл Т4 ДНК-лигазы (Fermentas Life Science).

5. Реакционная смесь инкубируется при комнатной температуре в течение одного часа.

6. Реакционная смесь инкубируется при 65 °С в течение 10 мин для инактивации Т4 ДНК-лигазы.

7. Избыточные олигонуклеотиды и АТФ выводятся из раствора путем фильтрации через спин-колонку MicroSpin S-400 HR, GE Healthcare (центрифугирование 850*g*, 5 мин).

8. К раствору добавляется 0,5 мкл 100 мкМ раствора 3′-биотинилированных олигонуклеотидов

(5′-GGGCGGCGACCT-Biotin),

фосфорилированных с 5′-конца, 0,4 мкл Т4 лигазы (1000 ед.) и 10 мкл 10х Т4 ДНК лигазного буфера.

9. Реакционная смесь инкубируется при комнатной температуре в течение одного часа.

10. Реакционная смесь инкубируется при 65 °С в течение 10 мин для инактивации Т4 ДНК-лигазы.

11. Избыточные олигонуклеотиды и АТФ выводятся из раствора путем фильтрации через спин-колонку MicroSpin S-400 HR, GE Healthcare (центрифугирование 850*g*, 5 мин).

Протокол эксперимента. Непосредственно перед проведением эксперимента внутренняя поверхность камеры и трубок подвергается очистке путем последовательного вмывания в каждый канал 100 мкл этанола, 300 мкл дистиллированной воды и 200 мкл 15%-го раствора сахарозы в Tris-Hcl 50 мМ (pH = 8,2).

В ходе эксперимента в каждом канале формируется ламинарный поток, скорость которого поддерживается на уровне порядка 100 мкм/с. В данных условиях объединение потоков в общем канале приводит к их незначительному смешению [14]. Путем сдвига пьезостолика может осуществляться быстрое перемещение между потоками объектов, удерживаемых в оптических ловушках.

Во всех каналах присутствует SM-буфер (Tris-Hcl 50 мМ, pH = 8,2, $MgCl_2$ 1 мМ, 2-меркаптоэтиламин 100 мМ). Помимо него в первом канале содержатся микросферы (0,01%), во втором – 25 пМ биотинилированных молекул ДНК и 200 нМ YOYO-1, в третьем – 10 мМ $MgCl_2$, в четвертом – 50 нМ YOYO-1.

Схема проведения эксперимента в четырехканальной проточной камере представлена на рис. 2. Эксперимент состоит из следующих этапов:

в первом канале происходит оптический захват двух микросфер;

сдвигом пьезостолика микросферы переносятся во второй канал для прикрепления к одной из микросфер молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1 за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия. Прикрепление молекулы ДНК фиксируется посредством наблюдения ее изображения во флуоресцентном режиме;

микросферы переносятся в третий канал, где путем перемещения подвижной ловушки свободный конец ДНК прикрепляется ко второй микросфере;

в течение 2 – 3 мин осуществляется обесцвечивание ДНК (вымывание YOYO-1) в силу наличия в третьем канале 10 мМ $MgCl_2$;

ДНК растягивается путем увеличения расстояния между микросферами с шагом 10 нм и средней скоростью 50 нм/с. На каждом шаге с помощью ПЗС-камеры фиксируется изображение микросфер в режиме дифференциального интерференционного контраста;

стационарная ловушка выключается путем перекрывания соответствующего пучка света, в результате чего одна микросфера удерживается подвижной ловушкой, а вторая растягивает ДНК за счет гидродинамической силы, действующей на микросферу со стороны потока;

микросферы с закрепленной ДНК переносятся в четвертый канал, содержащий 50 нМ YOYO-1. За счет постоянства скорости потока обеспечивается постоянство силы растяжения ДНК. Удлинение ДНК приводит к увеличению расстояния между микросферами. Динамика удлинения регистрируется с помощью ПЗС-камеры;

после завершения процесса удлинения ДНК стационарная ловушка снова включается и осуществляется растягивание ДНК между ловушками с шагом 10 нм и средней скоростью 50 нм/с.

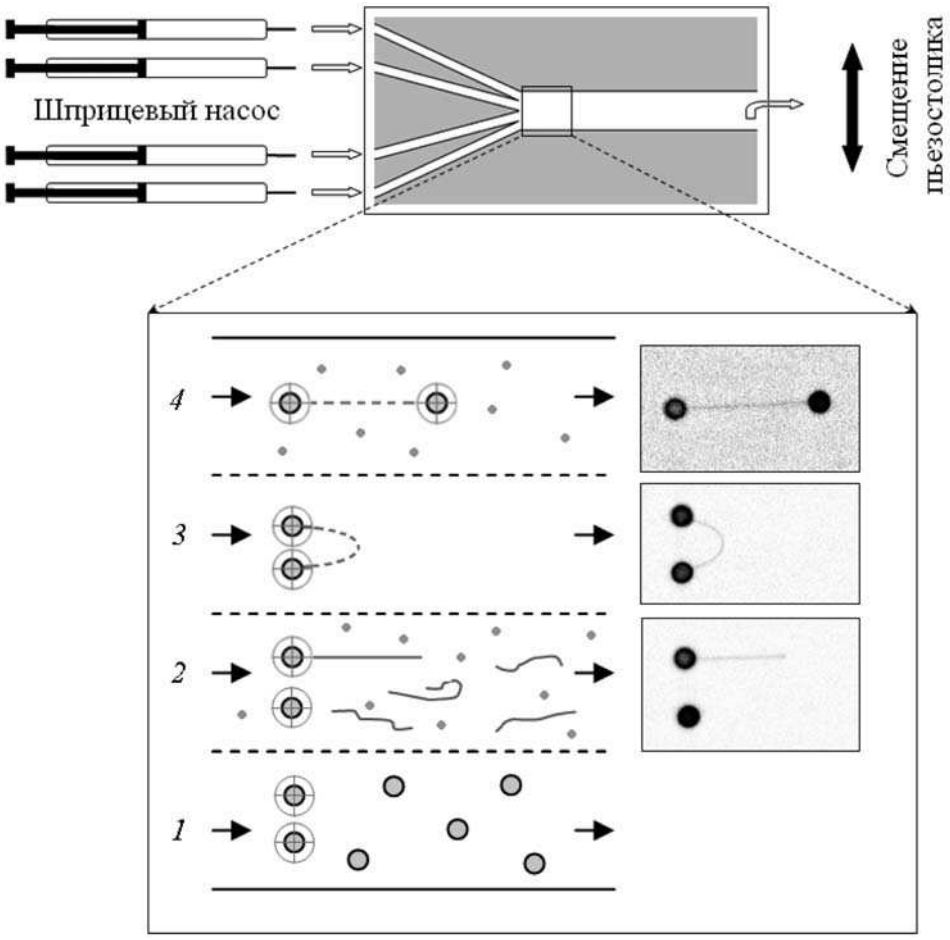

Рис. 2. Схема проведения эксперимента в четырехканальной проточной камере: *1* – захват двух микросфер; *2* – закрепление ДНК на одной из микросфер; *3* – прикрепление свободного конца ДНК ко второй микросфере, обесцвечивание ДНК; *4* – инкубация в 50 нМ растворе YOYO-1

Обработка экспериментальных данных. Указанные данные обрабатывались при помощи программного пакета с открытым кодом ImageJ [15] (сборка Fiji [16]). Для определения положения микросфер по их изображениям в режиме дифференциального интерференционного контраста использовался специально созданный плагин для ImageJ, осуществляющий определение максимума нормированной кросс-корреляции изображения с шаблоном. В качестве шаблона при исследовании динамики встраивания YOYO-1 в молекулу ДНК выбирались изображения микросфер в первый момент времени. При построении зависимости силы растяжения от длины ДНК в качестве шаблона использовалась предварительно полученная серия изображений микросферы, закрепленной на поверхности стекла, при различном ее положении относительно фокуса микроскопа. Такой подход позволяет определять положение объекта с точностью до 1 пикселя (в данном случае до 135 нм). Для дальнейшего уточнения положения микросферы использовалась нелинейная регрессия нормированной кросс-корреляции при помощи двумерной функции Гаусса.

Результаты и их обсуждение

Длина молекулы ДНК бактериофага λ составляет 16,4 мкм (48500 пар оснований) [7]. Длина ДНК увеличилась на 37 % и составила 22,6 мкм при инкубации в 50 нМ растворе YOYO-1. При этом стандартное отклонение ин-

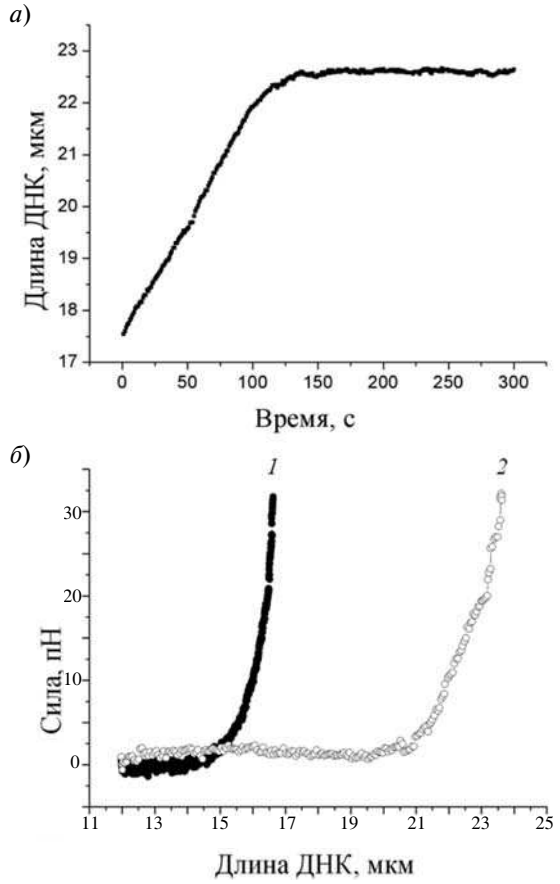

Рис. 3. Результаты применения предлагаемого метода: *а* – динамика удлинения молекулы ДНК в присутствии 50 нМ красителя YOYO-1; *б* – зависимости силы растяжения ДНК от ее длины до (*1*) и после (*2*) встраивания молекул красителя

дивидуальных измерений длины ДНК составило 27 нм. На рис. 3,*а* приведена зависимость длины молекулы ДНК от времени в присутствии YOYO-1. В начальный момент регистрации молекула ДНК уже является удлиненной. Данный факт указывает на то, что встраивание YOYO-1 начинается мгновенно при внесении ДНК в четвертый канал. Перемещение молекулы ДНК в середину канала, где осуществляется наблюдение, занимает примерно 20 с. За это время длина молекулы ДНК успевает увеличиться на 1,1 мкм (6,7 %). В течение 150 с длина ДНК линейно возрастает, после чего процесс интеркаляции YOYO-1 в ДНК выходит на насыщение и длина ДНК остается постоянной. Линейная регрессия первого участка зависимости позволила определить скорость удлинения молекулы ДНК за счет интеркаляции; она составила 44 ± 4 нм/с. На рис. 3,*б* приведена зависимость силы растяжения молекулы ДНК от ее длины до и после встраивания YOYO-1. В присутствии 50 нМ YOYO-1 данная зависимость существенно отличается от случая неокрашенной молекулы ДНК. Помимо очевидного удлинения ДНК следует отметить увеличение наклона кривой, что свидетельствует об изменении механических свойств ДНК при связывании с YOYO-1.

Предложен новый метод регистрации динамики изменения длины одиночной молекулы ДНК, основанный на использовании системы микрофлуидных ламинарных потоков в комбинации с методами оптической ловушки и флуоресцентной микроскопии. Этот метод позволил успешно охарактеризовать процесс связывания красителя YOYO-1 с молекулой ДНК бактериофага λ. Было зарегистрировано увеличение длины молекулы ДНК в присутствии YOYO-1 на 37 %, так что измеренная длина комплекса ДНК–YOYO-1 составила 22,6 мкм. Кроме того, была измерена зависимость длины молекулы ДНК от времени в присутствии 50 нМ красителя YOYO-1. При этом погрешность индивидуальных измерений длины молекулы ДНК составила менее 30 нм. Установлено, что присутствие в растворе красителя YOYO-1 в концентрации 50 нМ приводит к линейному росту длины молекулы ДНК со скоростью 44 ± 4 нм/с, при этом равновесное состояние комплекса ДНК –YOYO-1 достигается за 150 с.

Проведенные эксперименты продемонстрировали работоспособность предложенного метода. Есть все основания полагать, что данный метод может найти широкое применение при исследовании процессов взаимодействия молекул ДНК с различными лигандами, в том числе красителями, ДНК-связывающими белками и другими веществами. Кроме того, представляется возможным использование этого метода для исследования других биологических полимеров, в том числе представляющих большой практический интерес амилоидных фибрилл. Данные о влиянии различных агентов на механические свойства амилоидных фибрилл могут оказаться чрезвычайно ценными для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Работа проведена с использованием уникальной установки «Лазерный пинцет» при финансовой поддержке Минобрнауки России (ГК № 16.518.11.7045), РФФИ (гранты №12-04-31536 и №12-04-32060) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Nyberg, L.K.** A single-step competitive binding assay for mapping of single DNA molecules [Text] / L.K. Nyberg, F. Persson, J. Berg [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2012.– Vol. 417.– Iss. 1.– P. 404 – 408.

2. **Wong, M.** Oxazole yellow homodimer YOYO-1-labeled DNA: a fluorescent complex that can be used to assess structural changes in DNA following formation and cellular delivery of cationic lipid DNA complexes [Text] / M. Wong, S. Kong, W.H. Dragowska, M.B. Bally // Biochim. Biophys. Acta.– 2001.– Vol. 1527.– Iss. 1-2.– P. 61 – 72.

3. **Сабанцев, А.В.** Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением [Текст] / А.В. Сабанцев, Г.Е. Побегалов, С.В. Мурашов, А.С. Мельников, М.А. Ходорковский // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки.– 2012.– № 2 (146).– С. 94 – 99.

4. **Rye, H.S.** Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: Properties and applications / H.S. Rye, S. Yue, D.E. Wemmer [et al.] // Nucleic Acids Res.– 1992.– Vol. 20.– Iss. 11.– P. 2803 – 2812.

5. **Ashkin, A.** Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [Text] / A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, S. Chu // Opt. Lett.– 1986.– Vol. 11.– Iss. 5.– P. 288.

6. **Bennink, M.** Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers: interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1 [Text] / M.L. Bennink, O.D. Scharer, R. Kanaar, [et al.] // Cytometry.– 1999.– Vol. 36.– Iss. 3.– P. 200 – 208.

7. **Murade, C.U.** Interaction of oxazole yellow dyes with DNA studied with hybrid optical tweezers and fluorescence microscopy [Text] / C.U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, M.L. Bennink // Biophys. J.– 2009.– Vol. 97.– Iss. 3.– P. 835 – 843.

8. **Paik, D.H.** Dynamics and multiple stable binding modes of DNA intercalators revealed by single-molecule force spectroscopy [Text] / D.H. Paik, T.T. Perkins // Angew. Chem. Int. Ed. Engl.– 2012.– Vol. 51.– Iss. 8.– P. 1811 –1815.

9. **Sischka, A.** Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands [Text] / A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel [et al.] // Biophys. J.– 2005.– Vol. 88.– Iss. 1.– P. 404 – 411.

10. **Gunther, K.** Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA [Text] / K. Gunther, M. Mertig, R. Seidel // Nucleic Acids Res.– 2010.– Vol. 38.– Iss. 19.– P. 6526 – 6532.

11. **Eckel, R.** Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes [Text] / R. Eckel, R. Ros, A. Ros [et al.] // Biophys. J.– 2003.– Vol. 85.– Iss. 3.– P. 1968 – 1973.

12. **Reuter, M.** The kinetics of YOYO-1 intercalation into single molecules of double-stranded DNA [Text] / M. Reuter, D.T. Dryden // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2010.– Vol. 403.– Iss. 2.– P. 225 – 229.

13. **Mahamdeh, M.** Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers [Text] / M. Mahamdeh, C.P. Campos, E. Schaffer. // Opt. Express.– 2011.– Vol. 19.– Iss. 12.– P. 11759 – 11768.

14. **Brewer, L.R.** Laminar flow cells for single-molecule studies of DNA-protein interactions [Text] / L.R. Brewer, P.R. Bianco // Nat. Methods.– 2008.– Vol. 5.– Iss. 6.– P. 517 – 525.

15. **Schneider, C.A.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis [Text] / C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri // Nat. Methods.– 2012.– Vol. 9.– Iss. 7.– P. 671 – 675.

16. **Schindelin, J.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis [Text] / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // Nat. Methods.– 2012.– Vol. 9. – Iss. 7.– P. 676 – 682.

ПОБЕГАЛОВ Георгий Евгеньевич – *аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
lwdrums@gmail.com

АРСЕНИЕВ Анатолий Николаевич – *инженер НОЦ «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
arsenievanatoly@gmail.com

ВЕДЯЙКИН Алексей Дмитриевич – *студент радиофизического факультета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
god-fish@mail.ru

СОКОЛОВА Мария Леонидовна – *студентка физико-механического факультета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*
195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
arimiora@gmail.com

ФЕДОРОВА Яна Витальевна – *студентка физико-механического факультета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*
195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
kedrovka126@rambler.ru

САБАНЦЕВ Антон Владимирович – *аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.*
195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
sabantsev.a.v@gmail.com

© Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 2013