

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот менее информативна по причине большой сложности их химической структуры, недостаточной характеристичности ряда полос и т. д. Ограничимся сведениями о некоторых типичных колебаниях нуклеиновых кислот (табл. 5.15) [201].

Таблица 5.15

ИК-спектры нуклеиновых кислот

Частоты, $см^{-1}$	Обозначения колебаний ¹⁾	Отнесение колебаний
2800—3500	{ ν(OH) ν(NH) ν(CH)	H ₂ O, сахар Азотистые основания Сахар и основания
1500—1800	{ ν(C=O) ν(C=N) ν(C=C) δ(NH) δ(НОН)	Основания, смешанные колебания
~ 1200	{ ν(PO ₂ ⁻)	
1000—1100	{ ν(PO ₂ ⁻) ν(CO)	Симметричное, валентное Сахар Фосфат
700—1000	{ ν(PO) ν(CO) τ(NH)	Сахар Основания, неплоское, деформационное колебание
300—600		Скелетные деформации

¹⁾ ν — валентные, δ и τ — деформационные колебания.

Развитие лазерной техники открыло возможность получать четкие колебательные спектры комбинационного рассеяния биополимеров. В работах [216] приведены прекрасные спектры КР лизоцима и химоотрипсина. Значительный интерес привлекли измерения низкочастотных полос в спектрах КР (с частотами до 50 $см^{-1}$). Эти полосы чувствительны к конформационным изменениям и, возможно, характеризуют конформационные колебания (см., например, [282]).

§ 5.10. СПЕКТРЫ ЯДЕРНОГО И ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Спектры парамагнитного резонанса эффективно применяются в исследованиях биополимеров и, в частности, ферментов. Рассмотрим сущность явления парамагнитного резонанса — ядерного (ЯМР) и электронного (ЭПР).

Внесем частицу с магнитным моментом μ в постоянное магнитное поле напряженностью H_0 . Магнитный момент будет прецессировать вокруг направления поля с частотой Лармора, равной

$$\omega_H = \frac{\mu}{\rho} H_0 = \gamma H_0, \quad (5,154)$$

где ρ — механический момент количества движения частицы (например, спин электрона). Подвергнем прецессирующую частицу действию слабого переменного поля H_1 , направленного перпендикулярно H_0 (считаем, что H_0 ориентировано вдоль оси z). Линейно поляризованное поле H_1 можно разложить на две компоненты, поляризованные по кругу вправо и влево (см. стр. 290). Одна из этих компонент совпадает с направлением прецессии. Если частота колебаний переменного поля совпадает с частотой прецессии ω_H , то воздействие такого поля на магнитный момент чрезвычайно велико — происходит резонанс. Энергия прецессирующего магнита равна $-\mu H_0$. При увеличении угла между μ и H_0 , вызываемом действием поля H_1 , энергия возрастает. Эффект особенно велик при $\omega = \omega_H = \gamma H_0$.

Это явление было открыто Завойским [217].

Таково элементарное классическое его описание. Квантовая механика показывает, что уровни энергии частицы, обладающей магнитным моментом, расщепляются в магнитном поле в соответствии с правилом пространственного квантования.

Начнем с ЯМР. Атомные ядра, у которых нечетно хотя бы одно из двух чисел — масса или порядковый номер, — обладают отличным от нуля моментом количества движения, т. е. ядерным спином. Ядерный спин равен нулю у C^{12} , O^{16} и т. д. и не равен нулю у H , D , C^{13} , F^{19} и т. д. Тем самым, эти ядра имеют и магнитный момент.

Если J — ядерное спиновое число, то момент количества движения численно равен $[J(J+1)]^{1/2}h/2\pi$, а магнитный момент $[J(J+1)]^{1/2}\gamma h/2\pi$, где $\gamma = g\mu_0$ — гиромагнитное отношение, g — фактор расщепления, а μ_0 — ядерный магнетон. В магнитном поле H_0 вследствие зеемановского расщепления возникает $2J + 1$ уровней с энергиями

$$\mathcal{E} = -\gamma \frac{h}{2\pi} H_0 m \quad (m = J, J-1, \dots, -J) \quad (5,155)$$

и с расстоянием между уровнями, т. е. с разностью их энергий, равной $\gamma \frac{h}{2\pi} H_0$. Для протона $J = 1/2$ и в поле H_0 имеются два уровня, соответствующие параллельному и антипараллельному направлениям спина (рис. 5.30). Если поле H_1 колеблется с частотой ω , то резонанс происходит при поглощении кванта

с энергией $h\nu \equiv \hbar\omega$, равной разности энергий соседних уровней

$$\frac{\hbar}{2\pi} \omega = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} H_0 = 2\mu H_0. \quad (5,156)$$

Здесь $\mu = g\mu_0 J$. Условие (5,156) эквивалентно (5,154).

При $J > 1/2$ и большем числе уровней условие резонанса имеет тот же смысл, так как разрешены переходы лишь между соседними уровнями.

Для величины ядерного магнетона имеем

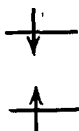
$$\mu_0 = \frac{eh}{4\pi M_p c} = 5,0493 \cdot 10^{-24} \text{ эрг/гс}, \quad (5,157)$$

где e — заряд протона, M_p — его масса, c — скорость света. Фактор g безразмерен. Для протона $g = 5,58$. Если напряженность поля H_0 равна 10 000 гс, то резонансная частота для протонов составляет 42,6 Мгц, что соответствует диапазону метровых радиоволн.

При данной температуре T число протонов на нижнем уровне несколько больше, чем на верхнем. Отношение населенностей верхнего и нижнего уровней в равновесии выражается фактором Больцмана

$$\exp(-h\nu_0/kT) = \exp(-2\mu H_0/kT) \approx 1 - 2\mu H_0/kT; \quad (5,158)$$

Рис. 5.30. Расщепление уровней спина протона в магнитном поле.



последнее приближенное равенство справедливо, так как $2\mu H_0 \ll kT$ при комнатной температуре и обычно применяемых H_0 . Действительно, при $H_0 = 10^4$ гс фактор Больцмана равен $1 - 14 \cdot 10^{-6}$. При включении радиочастотного поля происходят переходы с нижнего уровня на верхний (поглощение) и обратно (спонтанное испускание) (см. рис. 5.30). Если вероятности обоих процессов одинаковы, то должно возникнуть быстрое насыщение уровней (выравнивание населенностей обоих уровней) и поглощение прекратится. Это, однако, не наблюдается в реальном веществе. Очевидно, что в системе спинов должен происходить процесс, позволяющий спином отдавать свою энергию без излучения. Это — релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Он происходит вследствие взаимодействия ядерных спинов с решеткой, т. е. с окружающими данное ядро другими ядрами в веществе, находящимися в состоянии теплового движения.

При выключении поля H_1 выделяющаяся энергия превращается в тепловую энергию решетки, происходит *спин-решеточная релаксация*. Изменение населенности уровней во времени

после выключения поля H_1 описывается уравнением

$$\Delta n(t) = \Delta n(0) \exp(-t/T_1), \quad (5,159)$$

где $\Delta n(t)$ — избыток протонов в момент времени t на верхнем уровне по сравнению с равновесной населенностью, $\Delta n(0)$ — то же в момент $t = 0$, T_1 — время *спин-решеточной релаксации*, зависящее от концентрации магнитных ядер в веществе, от подвижности молекул и от температуры. В кристаллах T_1 порядка минут, в газах и жидкостях порядка секунд и меньше. Присутствие парамагнитных примесей может сократить T_1 до 10^{-4} сек.

Ширина спектральной линии ЯМР, согласно принципу неопределенности квантовой механики, определяется временем жизни ядра на данном энергетическом уровне. Для неопределенности резонансной части имеем

$$\Delta \nu \approx \frac{\Delta \mathcal{E}}{h} \approx \frac{1}{2\pi\tau}. \quad (5,160)$$

Спин-решеточная релаксация вносит вклад в ширину линии порядка T_1^{-1} .

Наряду со спин-решеточной релаксацией имеется второй процесс — процесс прямого взаимодействия неподвижных магнитных ядер друг с другом (*спин-спиновое взаимодействие*). На каждый спин действует, кроме поля H_0 , локальное поле, создаваемое соседними ядрами и равное

$$H_1 = \frac{\mu}{r^3} (3 \cos^2 \vartheta - 1), \quad (5,161)$$

где r — расстояние от ядра до данной точки, ϑ — угол между векторами μ и g . Условие резонанса поэтому имеет вид

$$\nu = \frac{\nu}{2\pi} (H_0 + H_1), \quad (5,162)$$

отличный от условия (5,156), справедливого для изолированного спина. Порядок величины H_1 — несколько гаусс. Спин-спиновое взаимодействие также вносит вклад в ширину линии порядка $H_1\gamma/2\pi$. Однако спин-спиновое взаимодействие вызывает уширение линии не только вследствие неоднородности поля. Оно создает возможность обмена энергией между протонами в те моменты, когда совпадают фазы их прецессии, и, тем самым, уменьшает время их жизни в данном состоянии. Рационально ввести второе характеристическое время T_2 — время *спин-спиновой релаксации*, которому соответствуют оба вклада в ширину линии, обусловленные спин-спиновым взаимодействием. Для твердых тел $T_1 \gg T_2$ и ширина линии определяется только T_2 , т. е.

$$\Delta \nu \sim 1/T_2.$$

В невязких жидкостях T_2 того же порядка, что и T_1 , и $\Delta\nu$ составляет доли герца:

$$\Delta\nu \sim 1/T_1 + 1/T_2 + \Delta'\nu,$$

где $\Delta'\nu$ — аппаратурный эффект, определяемый неоднородностью поля H_0 .

Спектры ЯМР жидкостей и растворов содержат ряд сравнительно узких линий, отвечающих структурно неэквивалентным протонам. Если протоны эквивалентны (например, для протона в H_2O), то наблюдается одна линия. Напротив, протонам групп CH_3 , CH_2 и OH в молекуле C_2H_5OH отвечают разные частоты. Это происходит потому, что на ядерный спин действует электронное окружение ядра. Электроны прецессируют в направлении, противоположном направлению прецессии ядер, и создают вторичное магнитное поле H' , пропорциональное H_0 . Вблизи ядра оно равно

$$H' = -\sigma H_0, \quad (5,163)$$

и на ядро действует эффективное поле

$$H_{эфф} = H_0 + H' = H_0(1 - \sigma). \quad (5,164)$$

Константа σ называется *постоянной экранирования*. Величины H' , т. е. σ , неодинаковы вдоль различных направлений в молекуле, т. е. анизотропны. В жидкостях молекулы быстро изменяют свою ориентацию, и поэтому в них мы имеем дело с усредненным значением σ .

Положение спектральной линии ЯМР относительно некоторой эталонной линии называется *химическим сдвигом*. В качестве эталона для протонного резонанса в органических соединениях обычно применяется тетраметилсилан (ТМС) $(CH_3)_4Si$. Химический сдвиг выражается безразмерной величиной — отношением сдвига частоты (поля) к эталонному значению, умноженным на 10^6 :

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6. \quad (5,165)$$

Для протонов ТМС $\delta = 0$, и сдвигам линий ПМР (протонного резонанса), расположенным при меньших $H_{эфф}$, приписывается положительный знак. Величины δ варьируют от $+18$ до -5 ; каждая атомная группа характеризуется своим определенным значением δ .

При изучении ПМР биополимеров пользуются водорастворимым эталоном ДДС (2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоновая кислота). Тогда химические сдвиги алифатических протонов варьируют от $-0,5$ до $-2,0$, ароматических — от $-6,0$ до $-8,5$.

На рис. 5.31 показан спектр ПМР 1,1,2-трихлорэтана, записанный при недостаточно высоком разрешении. Наблюдаются два пика, отвечающие протонам групп CH_2Cl и CHCl_2 со своими сдвигами. Отношение интенсивностей составляет 2:1. При высоком разрешении первая линия расщепляется на две, а вторая — на три компоненты (рис. 5.32), т. е. наблюдается *сверхтонкая* (мультиплетная) структура. Она возникает вследствие магнитного взаимодействия между ядрами, передаваемого через электроны связи, т. е. непрямого спин-спинового взаимодействия. Расстояния между компонентами не зависят от H_0 . Протон группы CHCl_2 может находиться в двух состояниях — со спином $+1/2$ и $-1/2$. Поэтому на протон этой группы действует либо одно, либо другое локальное поле, и ее линия ПМР испытывает дублетное спин-спиновое расщепление. В метиленовой

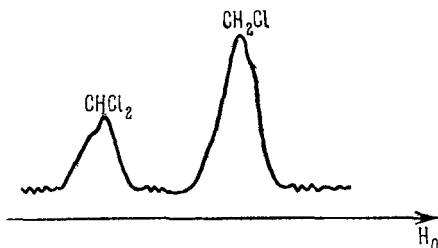


Рис. 5.31. Спектр ПМР 1, 1, 2-трихлорэтана при малом разрешении.

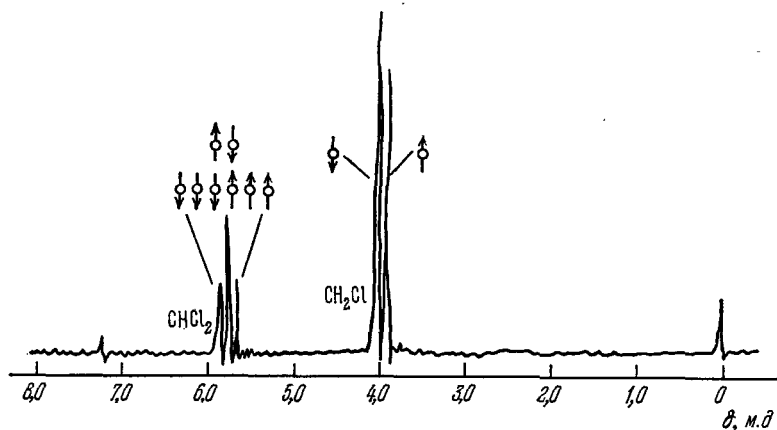


Рис. 5.32. Спектр ПМР 1, 1, 2-трихлорэтана при высоком разрешении.

группе возможны три неэквивалентных состояния пары протонов: $+1/2, +1/2$; $+1/2, -1/2$ или $-1/2, +1/2$; $-1/2, -1/2$. Соответственно линия ПМР группы CHCl_2 испытывает триплетное расщепление.

Изучение химических сдвигов и сверхтонкой структуры позволяет получить количественные сведения о взаимном

расположении ядер и об их взаимодействиях. С другой стороны, исследование спектров ЯМР малого разрешения дает информацию о динамических релаксационных свойствах молекул, т. е. о подвижности атомных групп в молекуле и самой молекулы как целого.

Теория ЯМР, экспериментальные методы (которых мы здесь не касались) и разнообразные приложения ЯМР в химии и физике описаны в ряде монографий [218—226].

Спектр ПМР белка состоит из множества перекрывающихся линий. Их удается разделить, пользуясь приборами высокого разрешения (сверхпроводниковые магниты, частоты до 300 Мгц) и селективным дейтерированием белка [227].

Жардецкий и другие исследователи эффективно применили эти методы к решению ряда задач (см. [228—230]). Изучение химических сдвигов позволило установить детали взаимодействия фармакологических веществ (сульфамидов и антибиотиков) с белками [231]. В химических сдвигах протонных резонансов полиаминокислот отчетливо проявляются переходы спираль — клубок [232]. ЯМР дает информацию о взаимодействиях гаптен — антитело [233].

Важные результаты были получены при исследовании ферментов, в частности рибонуклеазы (Р), нуклеазы стафилококков (Н), лизоцима (Л). На рис. 5.33 показаны резонансы протонов нуклеазы стафилококков в спектральной области, отвечающей ароматическим аминокислотам, при четырех значениях рН [234]. Разрешаются пять пиков, смещаемых изменением рН. Два из них Н2а и Н2b относятся к одному и тому же остатку Гис, что доказывается рядом фактов. Относительные интенсивности этих пиков и расстояние между ними меняются с рН, что можно объяснить медленным конформационным изменением, затрагивающим окружение Гис Н2. Изменение локально, так как другие пики не меняются. Расстояние между Н2а и Н2b определяет нижний предел времени жизни τ остатка Гис в каждой конформации: $\tau \gg 1/2\pi \Delta\nu \approx 40$ мсек.

Расширение пиков и особенности их изменений при рН 6,3—7,5 объясняются увеличением скорости взаимного превращения двух конформаций. Их константа равновесия K определяется как отношение площадей пиков Н2b и Н2а. При рН 4,7, 5,0 и 7,5 величины K равны соответственно 0,5, 0,7 и 3—5 [234].

Таким образом, ЯМР позволяет изучать конформационные превращения. Исследование лизоцима выявило интересные особенности его денатурации [235]. При изучении рибонуклеазы определены резонансы четырех отдельных остатков Гис, которые удается точно локализовать [236]. Изучено воздействие на эти остатки ингибиторов фермента и на основе полученных данных построена модель комплекса фермент — ингибитор [237].

Изучение гемоглобина, миоглобина и их комплексов с различными лигандами дало важные подтверждения рентгенографических данных. Тем самым четко показано тождество структур этих белков в кристалле и растворе, установлено отсутствие

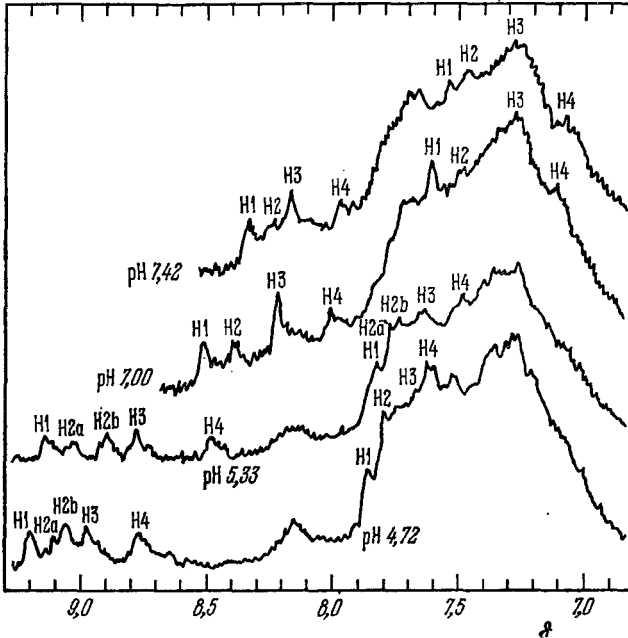


Рис. 5.33. Спектры ЯМР нуклеазы стафилококка при различных pH в спектральной области, отвечающей ароматическим аминокислотам.

прямого взаимодействия гем-групп в гемоглобине (см. стр. 425), изучены тонкие взаимодействия между аминокислотными остатками (см. [230]).

Эти немногие примеры далеко не исчерпывают уже проведенные исследования биополимеров и доказывают очень большие возможности ЯМР-спектроскопии (см. также [238]).

Обратимся теперь к ЭПР. Электрон имеет спин $s = 1/2$, его энергетический уровень в поле H_0 расщепляется на два с расстоянием между ними, отвечающим условию резонанса

$$h\nu = g\mu_B H_0, \tag{5,166}$$

где μ_B — магнетон Бора, превышающий ядерный магнетон в 1836 раз

$$\mu_B = \frac{eh}{4\pi m_e c} = 0,93 \cdot 10^{-20} \text{ эрг/гс}, \tag{5,167}$$

m_e — масса электрона. Фактор g для полностью свободного спина равен 2,0023. Подставляя эти значения, находим, что в поле $H_0 = 10^4$ гс резонансная частота $\nu_{\text{эл}} = 2,8 \cdot 10^{10}$ сек $^{-1}$ ($\nu_{\text{протон}} = 4,26 \cdot 10^7$ сек $^{-1}$).

В подавляющем большинстве органических соединений спиновые моменты электронов скомпенсированы, их суммарный спин равен нулю и ЭПР не наблюдается. Напротив, ЭПР хорошо наблюдается у свободных радикалов и у молекул с нечетным числом электронов. Спектры ЭПР служат основным источником сведений о строении свободных радикалов и парамагнитных ионов, а также об их взаимодействиях с окружающими частицами.

Если в данном соединении имеется лишь один неспаренный электрон, то

$$h\nu = g\mu_B(H_0 + H_I). \quad (5,168)$$

Локальное поле H_I создается магнитными моментами атомных ядер, находящихся вблизи этого электрона, в частности N^{14} . Для ядра N^{14} $J = 1$ и, следовательно, проекции ядерного спина на направление поля H_0 отвечают значениям $m = 1, 0, -1$. Локальное поле, действующее на электрон, имеет три значения и пик ЭПР расщепляется в триплет. Обычно для наблюдения спектров применяется клистрон как источник микроволнового излучения (поля H_I) с частотами, близкими к 9000 Мгц. При этом резонанс наблюдается в области 3200 гс. Локальные поля, вызывающие описанное сверхтонкое расщепление, равны по порядку величины десяткам гаусс.

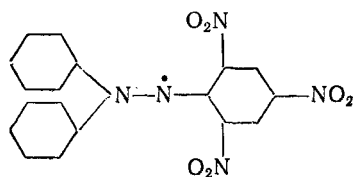
Описанное взаимодействие электронного спина с постоянным и локальным полем можно представить гамильтонианом

$$\mathcal{H} = \mu_B \tilde{S} \hat{g} \mathbf{H}_0 + h \tilde{S} \tilde{T} \tilde{J} - g_N \mu_N \tilde{J} \mathbf{H}_0. \quad (5,169)$$

Здесь \tilde{S} и \tilde{J} — операторы дипольного и ядерного спиновых моментов, \hat{g} — тензор фактора расщепления для электрона (g -фактор анизотропен), \tilde{T} — тензор дипольного взаимодействия электронного и ядерного спинов, g_N — g -фактор ядра N^{14} . Первый член (5,169) представляет взаимодействие электронного спинового момента с внешним полем, второй — «сверхтонкое» взаимодействие электрона и ядра, третий — взаимодействие ядра азота с внешним полем. Наблюдаемые спектральные линии соответствуют разрешенным переходам между собственными состояниями этого гамильтониана.

В общем случае при ядерном спине 1 в спектре ЭПР должно наблюдаться $2J + 1$ эквидистантных линий сверхтонкой структуры. Рассмотрим, например, устойчивый свободный радикал —

дифенилпикрилгидразил



Его спектр ЭПР содержит пять линий с отношением интенсивностей $1:2:3:2:1$. Это легко объяснить, если считать, что неспаренный электрон «размазан» между двумя атомами азота. Суммарный спин двух ядер равен 2, проекции на направление поля: $+2, +1, 0, -1, -2$. Крайние значения могут быть получены только одним способом ($2 = 1 + 1, -2 = -1 - 1$), значения $+1$ и -1 — двумя ($1 = 1 + 0 = 0 + 1, -1 = -1 + 0 = 0 - 1$), нулевое — тремя ($0 = 0 + 0 = +1 - 1 = -1 + 1$).

Все сказанное относится к сверхтонкой структуре спектра. Тонкая структура возникает в кристаллах вследствие анизотропии g -фактора. При суммарном электронном спине, большем $1/2$, зеемановские уровни перестают быть эквидистантными, спектр меняется из-за спин-орбитального взаимодействия. Вместо одной линии наблюдается группа линий, положения и интенсивность которых зависят от ориентации поля \mathbf{H}_0 относительно кристаллических осей. В жидкостях и растворах тонкая структура не разрешается, имеется лишь некоторое уширение линии.

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Время спин-спиновой релаксации T_2 характеризует скорость установления равновесия между магнитными моментами всех парамагнитных частиц (между спинами электронов), время спин-решеточной релаксации T_1 — скорость восстановления равновесия между системой спинов и тепловыми колебаниями решетки. T_2 практически не зависит от температуры и определяется концентрацией спинов, T_1 быстро возрастает с понижением температуры. Очевидно, что и T_1 и T_2 определяются подвижностью частиц с ненулевыми спинами и окружающих молекул.

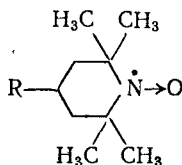
Подробное изложение теории ЭПР и экспериментальных методов содержится в ряде монографий (см., например, [239—242]).

Электронный парамагнитный резонанс давно применяется к решению биологических и биофизических проблем. Свободные радикалы образуются в ряде ферментативных окислительно-восстановительных реакций, а также при воздействии радиации. Свободные радикалы возникают из коферментов (например,

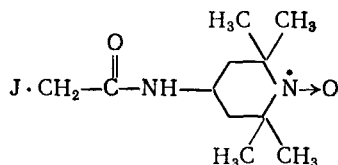
семихиноны из флавинов и флавиопротеидов) и субстратов, в частности, при окислении аскорбиновой кислоты, гидрохинона и др. пероксидазой. При коротковолновом облучении органических соединений и биологических систем также образуются свободные радикалы, регистрируемые методом ЭПР. Тем самым, этот метод весьма полезен в радиобиологии и при исследовании фото-биологических процессов. Сведения о свободных радикалах, возникающих в биологических системах и в модельных биохимических реакциях, приведены в [243—245] (см. также [242]).

В последние годы были развиты исследования ЭПР биополимеров, основанные на методе спиновой метки.

К молекуле белка присоединяют устойчивый свободный радикал, содержащий неспаренный электрон. Широко применяются иминоксильные радикалы с общей формулой [246]



Впервые спин-меченые белки были получены в 1965 г. [247]. Иминоксильные радикалы можно связать (в зависимости от группы R) с различными группами белков, в частности, с SH-группами. В работах [248, 249] метку



присоединяли к Цис β93 гемоглобина (Hb), алкилируя SH-группу. Гемоглобин кристаллизовали и изучали зависимость спектров ЭПР от ориентации кристалла в магнитном поле. На рис. 5.34 показаны спектры ЭПР Hb(CO)₄ и метгемоглобина (Мет Hb) при pH 7,0. Сигналы 1 и 2 отвечают разным ориентациям кристалла, их интенсивности зависят от ионного состава кристаллизующегося раствора. Совпадение сигналов 1 и 2 для Hb(CO₄) и Мет Hb доказывает, что конформации этих белков вблизи Цис β93 почти одинаковы.

Подвижность метки отчетливо проявляется в спектрах ЭПР. Молекулярное движение делает гамма-функцию (5,169) зависящим от времени

$$\mathcal{H}(t) \equiv \langle \mathcal{H}(t) \rangle + \{ \mathcal{H}(t) - \langle \mathcal{H}(t) \rangle \}; \quad (5,170)$$

здесь $\langle \mathcal{H}(t) \rangle$ — среднее значение гамильтониана, $\{ \}$ — его флуктуация. Если основные особенности спектра определяются $\langle \mathcal{H} \rangle$, то это означает большую скорость движения. Так, иминоксильный радикал, дающий три резкие линии со сверхтонким расщеплением, равным $1/3 (T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$, испытывает быстрое крутильное движение с обратным временем корреляции τ^{-1} , большим по сравнению с наибольшим анизотропным членом в \mathcal{H} , пропорциональным $|T_{zz} - T_{xx}|$. Влияние флуктуаций на линии

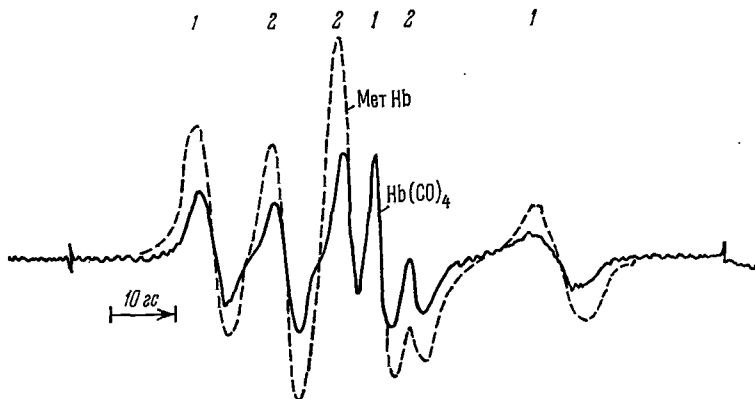


Рис. 5.34. Спектры ЭПР $\text{Hb}(\text{CO})_4$ (сплошные линии) и метгемоглобина (пунктир).

ЭПР рассмотрено в [250—252]. Изучение зависимости \mathcal{H} от t позволяет исследовать конформационные изменения в макромолекулах. Подробно изучался Нб в растворе [253, 254]. Установлено, что метка «чувствует» две конформации белка при его оксигенации. Варьируя метки, удалось показать наличие локальной области в молекуле Нб, имеющей структуру, которая зависит от состояния оксигенации более чем одного гема. Следовательно, обнаружены взаимодействия субъединиц Нб (см. § 7.1).

Лихтенштейн и сотрудники применяли метки различной длины и гибкости к исследованию структуры и конформационной подвижности ряда белков — лизоцима, миоглобина, миозина, альбуминов и т. д. [255—258]. В работе [259] были установлены изменения в спектрах ЭПР аспаратаминотрансферазы, меченой иминоксильными радикалами, при образовании комплексов фермента с субстратом и родственными соединениями. Эти изменения указывают на возрастание подвижности радикала в комплексе — время корреляции в исходном белке составляет $(8,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$ сек, в комплексе белка с лигандом — $(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-10}$ сек.

Для теоретического рассмотрения движений метки, связанной с белком гибкой «ножкой», развита модель «ротатора на ротаторе» [260], позволяющая рассчитать время корреляции как функцию внутренних вращений. Применение двойной метки позволяет определять расстояния между взаимодействующими радикалами и, тем самым, геометрию конформационных изменений (см. [255, 261, 262]).

Метод спиновых меток оказался весьма эффективным для изучения структуры биологических мембран и конформационных явлений в мембранах [263, 264]. Весьма перспективно изучение ядерной релаксации в биополимерах, содержащих парамагнитную метку. Время релаксации зависит от взаимодействия спинов ядра и электрона и, следовательно, от расстояния между ними (T пропорционально r^6). Тем самым, можно получить информацию о геометрии молекулы и о ее движениях [265]. В работах [266] изучались спектры ЭПР и ЯМР алкогольдегидрогеназы, меченной аналогом никотинамидадениндинуклеотида. Оказалось, что метка конкурирует с НАД-Н в месте связывания ферментом, сильно иммобилизуется белком, резко изменяет время релаксации протонов воды, причем величина T сильно зависит от концентрации спирта. Установлено место связывания спирта этим ферментом и оценены кинетические и геометрические характеристики системы.

Еще не использованы такие возможности методов ЭПР, как изучение различий в релаксации в разных областях спектра [263]. Двойной электронный резонанс может оказаться полезным для определения расстояний между метками [267] (дальнейшие подробности см. в [255, 268, 269, 283, 284]).

Изучение структуры, конформационных изменений, внутренней динамики сложных биополимерных молекул естественно требует применения методов зондирования с помощью чувствительных меток. В этом смысле спиновые метки подобны люминесцентным.

Литература

1. М. Перути, в сб. «Молекулы и клетки», «Мир», 1966.
2. С. Blake, Adv. Protein Chem. 23, 59 (1968).
3. М. Бургер, Рентгеновская кристаллография, ИЛ, 1948.
4. А. Гинье, Рентгенография кристаллов, Физматгиз, 1961.
5. А. И. Китайгородский, Рентгеноструктурный анализ, Гостехиздат, 1950.
6. А. И. Китайгородский, Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел, Гостехиздат, 1952.
7. А. И. Китайгородский, Теория структурного анализа, Изд-во АН СССР, 1957.
8. М. Бургер, Структура кристаллов и векторное пространство, ИЛ, 1961.
9. Б. К. Вайнштейн, Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах, Изд-во АН СССР, 1963.