

Дальнейшие перспективы рентгеноструктурного анализа биологически функциональных веществ связаны с двумя направлениями исследований. Это, во-первых, усовершенствование методов прямого определения фаз по сильным рефлексам. При этом удается обходиться без изоморфного замещения. Во-вторых, возможности изоморфного замещения далеко не исчерпаны, и этот метод подлежит дальнейшей разработке. В частности, представляется перспективным применение не полностью изоморфных производных.

Наряду с изучением биологических макромолекул для развития биофизики необходимы структурные исследования надмолекулярных биологических систем в нативном состоянии, например мембран, мышечных волокон и т. д. Перспективы этих исследований определяются развитием скоростной рентгенографии, т. е. созданием мощных источников рентгеновского излучения с мало расходящимися пучками лучей. По-видимому, здесь может оказаться эффективным синхротронное, магнитнотормозное излучение, возникающее при центростремительном ускорении электронов в магнитном поле. В отличие от обычного рентгеновского излучения, синхротронное излучение характеризуется большой мощностью, малой расходимостью пучка, но высокой степенью поляризации (см. [37]).

### **§ 5.3. РАССЕЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ В РАСТВОРЕ**

Дискретное рассеяние рентгеновских лучей под малыми углами есть частный случай дифракции на кристаллах — малый угол, под которым наблюдаются интерференции, соответствует периодам решетки, значительно большому длине волны.

Диффузное рассеяние под малыми углами позволяет изучать макромолекулы в растворе. При этом наблюдается суммарное рассеяние на беспорядочно расположенных отдельных макромолекулах, т. е. происходит усреднение интенсивности рассеянного излучения по их всевозможным ориентациям. Фазы рассеяния при таком усреднении смешиваются, и поэтому можно построить лишь функцию, аналогичную функции Паттерсона. Эта функция, однако, позволяет охарактеризовать форму и размеры рассеивающего объекта. Ситуация здесь подобна той, с которой мы имеем дело при изучении рассеяния света растворами макромолекул (см. стр. 159 и далее). Получение такой ограниченной информации много проще, чем при рентгеноструктурном анализе кристаллов.

Непосредственно определяется лишь радиус инерции распределения электронной плотности молекулы и (при измерении интенсивности в абсолютной шкале) молекулярный вес. Радиус

инерции еще не характеризует формы молекулы, которая устанавливается путем расчета моделей и сравнения теоретических кривых с экспериментальными. Основы теории метода изложены в [38, 39].

Пусть рассеяние происходит на частице, состоящей из центров (атомов) с рассеивающей способностью  $f_i$ -го центра  $f_i$ . Тогда для интенсивности рассеянного излучения, представляющей квадрат амплитуды, имеем

$$J(\mathbf{h}) = A_e^2(\mathbf{h}) \sum_k \sum_i f_i f_k \cos(\mathbf{h} \mathbf{r}_{ki}), \quad (5,29)$$

где  $\mathbf{h} = \frac{2\pi}{\lambda}(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$  — вектор, пропорциональный разности единичных векторов рассеянной и падающей волн,

$$J_e(\mathbf{h}) = A_e^2(\mathbf{h}) = 7,9 \cdot 10^{-26} J_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2r^2} \quad (5,30)$$

— интенсивность излучения, рассеянного одним электроном; здесь  $J_0$  — интенсивность падающего пучка, а  $r$  — расстояние между частицей и приемником,  $\theta$  — угол рассеяния. В случае частиц, ориентированных в объеме хаотически, принимая во внимание, что  $\overline{\cos(\mathbf{h} \mathbf{r})} = \overline{\sin(\mathbf{h} \mathbf{r})} / \mathbf{h} \mathbf{r}$ , придем к формуле Дебая (см. стр. 160)

$$J(\mathbf{h}) = J_e(\mathbf{h}) \left( \sum_k f_k \frac{\sin(\mathbf{h} \mathbf{r}_k)}{\mathbf{h} \mathbf{r}_k} \right)^2. \quad (5,31)$$

Для малых углов второй множитель в правой части можно разложить в ряд по степеням  $h$

$$F^2(h) = \sum_k \sum_i \left( 1 - \frac{h^2}{3!} r_{ki}^2 + \frac{h^4}{5!} r_{ki}^4 + \dots \right). \quad (5,32)$$

Так как  $\sum_k f_k = \sum_i f_i = N$  (напомним, что  $N$  — число электронов в частице), то первый член разложения (5,31) есть  $N^2$  и, выбрав за начало отсчета электронный центр инерции, получим с точностью до членов 4-го порядка малости выражение для средней интенсивности

$$\overline{F^2(h)} = N^2 \exp(-1/3 N^2 R_0^2), \quad (5,33)$$

где

$$R_0 = \frac{\sum f_k r_k^2}{\sum f_k} \quad (5,34)$$

— электронный радиус инерции.

Чтобы получить рассеяние  $n$  частицами, надо просто умножить интенсивность на  $n$ . Однако при нулевом угле рассеяния

все центры рассеивают в фазе и интенсивность пропорциональна  $n^2$ . С увеличением величины  $hR_0$  начинают вносить свой вклад члены более высокого порядка, дающие информацию о форме макромолекулы. Однако выводы о форме нельзя делать только на основе анализа индикатрис рассеяния, необходимо привлекать и определенные предположения о форме молекул. Так, если заранее принять, что молекулу можно аппроксимировать эллипсоидом или цилиндром, то сравнение экспериментальной кривой с семейством теоретических кривых, рассчитанных для этих тел при разном соотношении осей, позволяет определить асимметрию молекул.

Для сильно вытянутых фигур анализ затруднен, так как теоретические кривые при большой асимметрии, очевидно, практически сливаются друг с другом. Зато в этом случае можно провести анализ применительно к поперечному сечению, что особенно результативно, если заранее известно, что макромолекула имеет цилиндрическую форму (молекула ДНК в растворе). При умножении интенсивности рассеянного излучения на соответствующий угол рассеяния получается функция  $hJ(h)$ , характеризующая сечение молекулы, и по ней определяется (совершенно так же, как и при нахождении радиуса инерции  $R_0$ ) радиус инерции поперечного сечения [40]. Определить векторы, соответствующие поперечным размерам молекул, позволяет и умножение интенсивности на  $h^2$ , т. е. построение фурье-свертки. Этот метод был с успехом применен Федоровым и Птицыным для интерпретации индикатрис рассеяния [41].

При выборе модели основываются на данных других методов, результатах физико-химических исследований. Проводится такое комбинирование разных методов обработки кривой рассеяния под малыми углами, чтобы найденные различными способами параметры находились в согласии друг с другом. Получению единой картины способствует метод Ритланда [42], основанный на том, что для частиц с разными молекулярными весами, но постоянной плотностью величина  $R_0/\sqrt[3]{M}$  есть функция только отношения осей. Построив номограмму, выражающую зависимость  $R_0/\sqrt[3]{M}$  от отношения осей, можно по известному радиусу инерции и молекулярному весу определить отношение осей. Совпадение результатов расчета и опыта свидетельствует о правильности выбранной модели.

Применение метода диффузного рассеяния под малыми углами особенно удобно для белков с не слишком большим молекулярным весом. Так была изучена морфология многих белков, в частности пепсина [43], трипсина [44], аспаратаминотрансферазы [45]. Были определены размеры и форма транспортной РНК [46]. Метод рассеяния под малыми углами позволяет

решать различные задачи молекулярной биофизики. В качестве примера приведем исследование растворимого комплекса антиген — антитело [47].

Упомянем еще о методах, позволяющих непосредственно по кривой рассеяния под малыми углами оценивать объем [48] и отношение поверхности к объему [38].

Оказалось, что рассеяние рентгеновских лучей под сравнительно большими углами дает информацию о конформационном ближнем порядке в синтетических полимерах и в глобулярных белках [49, 50]. Было установлено, в частности, что параметр  $(4\pi/\lambda) \sin \theta$  для максимумов интенсивности имеет разные значения для  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -форм белков. Неупорядоченные участки максимумов не дают вовсе, и, следовательно, этот метод позволяет изучать денатурацию.

#### § 5.4. ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Все аминокислотные остатки и пептидные (амидные) группы —CO—NH— поглощают свет в ультрафиолетовой области спектра. Ароматические остатки Три, Фен, Тир имеют характерные полосы поглощения в области 2800 Å.

Для спектроскопии синтетических полипептидов и белков особый интерес представляет более далекая ультрафиолетовая область (2400—1850 Å), в которой располагаются полосы поглощения пептидной связи. Мономер белковой цепи подобен молекуле амида  $R_1—CO—NH—R_2$ . В результате изучения электронных спектров простых амидов (формамид, метилацетамид, мистамид) установлена схема электронных переходов в амидной группе (рис. 5.11) [51—54]. Эта схема основана на теоретических расчетах, выполненных как простым методом Хюккеля [55], так и с учетом самосогласованного поля [56—58]. На рис. 5.12 показаны волновые функции амидной группы, соответствующие ее наиболее подвижным электронам. На рис. 5.11 уровень  $\pi_2$  отвечает связывающей, уровень  $\pi^*$  — несвязывающей орбите CO, уровень  $\pi_1$  — несвязывающей орбите азота, уровень  $n$  — состоянию неподеленной пары электронов кислорода. Переход  $n\sigma^*$  — ридберговский атомный переход в кислороде.

В соответствии с законом Бугера — Ламберта — Бэра, интенсивность света, прошедшего через слой поглощающего вещества толщиной  $l$ , равна

$$I = J_0 \exp(-\epsilon cl), \quad (5.35)$$

где  $J_0$  — интенсивность падающего света,  $c$  — концентрация поглощающего вещества (моль/л),  $\epsilon$  — молекулярный коэффициент поглощения. Поглощение в данной полосе, отвечающей