

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 α -спиралей и β -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 π_2 отвечает связывающей, уровень π^* — несвязывающей орбите CO, уровень π_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), ϵ — молекулярный коэффициент поглощения. Поглощение в данной полосе, отвечающей

переходу $0 \rightarrow j$, выражается так называемой *силой осциллятора* f_{0j} , определяемой интенсивностью полосы поглощения

$$f_{0j} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int \epsilon_{0j} dv'; \quad (5,36)$$

здесь v' — волновое число, выраженное в $см^{-1}$, а интегрирование проводится по всей полосе поглощения. Теория дает

$$f_{0j} = \frac{2m}{3\hbar e^2} \omega_{0j} p_{0j}^2, \quad (5,37)$$

где e и m — заряд и масса электрона, ω_{0j} — круговая частота, соответствующая переходу, а p_{0j} — матричный элемент электрического дипольного момента, отвечающий переходу $0 \rightarrow j$:

$$p_{0j} = (0 | \mathbf{p} | j) \equiv \int \psi_0 \mathbf{p} \psi_j^* d\tau. \quad (5,38)$$

Величина p_{0j}^2 называется *дипольной силой* перехода.

Переход $\pi\pi^*$ в амидной группе имеет малую дипольную силу, так как электронные облака π - и π^* -состояний почти перпендикулярны друг другу и слабо перекрываются (см. рис. 5.12).

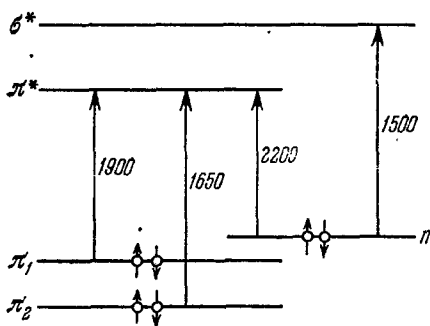


Рис. 5.11. Электронные переходы в амидной группе.

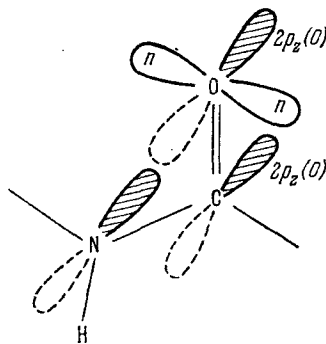


Рис. 5.12. Волновые функции амидной группы.

Теоретические расчеты дают следующие длины волн, соответствующих переходам: $\pi\pi^*$ 2340, $\pi_1\pi^*$ 1605, $\pi_2\pi^*$ 1347 Å. В спектре миристамиды наблюдаются полосы 2200, 1850, 1600 Å [54], в спектре формамида 1717, 1345 Å [53].

Дипольный момент перехода $\pi_1\pi^*$ лежит в плоскости HNC=O под углом 9° к линии, соединяющей атомы O и N, а перехода $\pi\pi^*$ перпендикулярен к этой плоскости [51, 59].

Спектры амидных групп в полипептидной цепи изменяются вследствие электронного взаимодействия этих групп друг с другом. В частности, энергетические уровни для концевых групп цепи отличаются от уровней для внутренних групп [51].

Наибольший интерес для биофизики представляют эффекты, возникающие вследствие *экситонного резонансного взаимодействия*, а именно, *давидовское расщепление* и *гипохромизм*.

Строя теорию спектров молекулярных кристаллов, Давыдов показал, что в регулярной совокупности хромофорных групп между их возбужденными энергетическими уровнями может происходить резонансная передача энергии возбуждения. Следовательно, в регулярной системе возможно распространение волны возбуждения — *экситона*. В результате взаимодействия энергетических уровней они расщепляются, образуя широкую

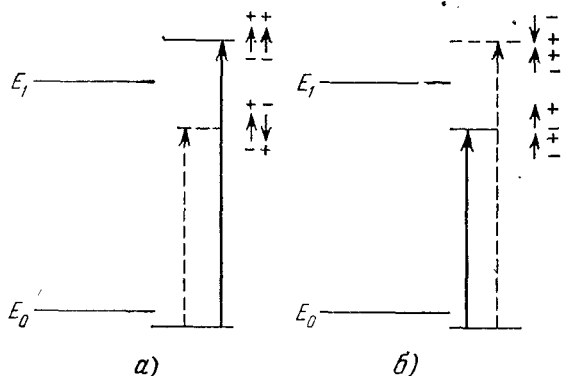


Рис. 5.13. Уровни энергии для системы параллельных (а) и коллинеарных (б) дипольных моментов перехода.

зону. Правила отбора разрешают переходы при поглощении и испускании света не на любые уровни зоны, а на строго определенные, причем поляризация полос поглощения определяется симметрией регулярной системы как целого [60, 61].

Резонансное взаимодействие возможно уже в димере, и в нем оно приводит к расщеплению исходного уровня на два. На рис. 5.13 показана схема такого расщепления для случаев параллельного и коллинеарного расположения дипольных моментов перехода. Сплошные стрелки указывают разрешенные переходы, пунктирные — запрещенные.

Моффитт провел теоретический расчет экситонного расщепления для перехода π, π^* (1900 Å) в амидной группе α -спирали [62]. Согласно теории Давыдова эта полоса расщепляется на две компоненты, из которых одна поляризована вдоль оси спирали, а вторая — перпендикулярно к ней. Частота первой полосы на 2700 см^{-1} меньше, чем второй, что согласуется с опытом.

Следует учесть, кроме того, что пептидные связи в белках находятся в окружении атомных групп, несущих заряды и обладающих постоянными дипольными моментами и поляризуемо-

стями, т. е. в некоторой конденсированной среде. Взаимодействия хромофоров со средой также меняют частоты переходов. Непорент и Бахшиев провели детальное теоретическое и экспериментальное исследование влияния межмолекулярных взаимодействий на электронные спектры сложных молекул (см., например, [63, 64]). Возрастание дипольного момента и поляризуемости молекул среды уменьшает частоты переходов. Изменение среды, вызывающее денатурацию белка, приводит к переносу пептидных групп из окружения с большей в окружение с меньшей поляризуемостью, что должно увеличивать частоту перехода. Такого рода эффекты действительно наблюдаются [65].

Особенно интересны и показательны изменения интенсивности полос, вызываемые экситонными эффектами. Резонансное взаимодействие приводит к перераспределению интенсивностей спектральных полос. В случае двух коллинеарных дипольных моментов перехода полоса с меньшей частотой (большей длиной волны) увеличивает свою интенсивность за счет интенсивности коротковолновой полосы. Возникает *гиперхромизм* длинноволновой полосы. Напротив, в случае параллельных дипольных моментов понижается интенсивность длинноволновой полосы и увеличивается интенсивность коротковолновой. Возникает *гипохромизм* длинноволновой полосы. Именно этот эффект наблюдается в спектрах α -спиральных полипептидов и белков, а также нативных нуклеиновых кислот. Если дипольные моменты перпендикулярны друг другу, то перераспределения интенсивности нет.

Теория гипохромизма основывается на учете электростатического диполь-дипольного и поляризационного взаимодействий дипольных моментов перехода в упорядоченной системе биополимера. Можно улучшить расчеты, рассматривая вместо дипольных взаимодействий взаимодействия зарядов (монополей). Расчет дает [59] следующую величину отношения сил осцилляторов в жесткой (нативной) и разупорядоченной (денатурированной) системах:

$$\frac{f_{0a}}{f_{0a}^{(0)}} = 1 - \frac{3\lambda_a^2 e^2}{2\pi^2 m c^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i} \sum_{b \neq a} \frac{f_{0b}^{(0)} \lambda_b^2 G_{ij} \mathbf{e}_i \mathbf{e}_j}{\lambda_a^2 - \lambda_b^2}, \quad (5,39)$$

где f_{0a} — сила осциллятора для группы в жесткой конформации, $f_{0a}^{(0)}$, $f_{0b}^{(0)}$ — то же для изолированных групп, \mathbf{e}_i , \mathbf{e}_j — единичные векторы, характеризующие ориентацию взаимодействующих групп, общее число которых равно N . Величина G_{ij} выражает взаимодействие монополей

$$G_{ij} = \sum_s \sum_t \frac{\rho_{is} \rho_{jt}}{R_{istj}}, \quad (5,40)$$

где ρ_{is} , ρ_{jt} — матричные элементы монополей для i -й и j -й групп.

Обзор различных форм теории гипохромизма можно найти в [66] (см. также [67, 71]). Классические или полуклассические модели (ср. стр. 299) дают результаты, эквивалентные полученным при помощи квантовомеханических экситонных моделей. В классической модели рассматриваются колебания осцилляторов, связанных диполь-дипольным взаимодействием, в экситонной теории применяется теория возмущений, не зависящих от времени. Можно воспользоваться для расчета гипохромизма и квантовой теорией возмущений, зависящих от времени.

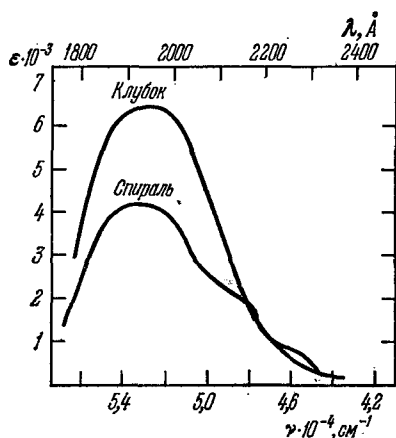


Рис. 5.14. Спектр поглощения ПГК.

ионной силы — в [73]. В табл. 5.2 приведены данные, характеризующие гипохромизм полиаминокислот [51].

Очевидно, что исчезновение гипохромизма при переходе спираль — клубок, при денатурации, может дать количественную меру α -спиральности белка. Ввиду трудностей, с которыми сопряжены спектрофотометрические измерения в дальней ультрафиолетовой области вблизи 2000 Å, этот метод в применении к белкам малоупотребителен. Напротив, он весьма прост и эффективен в случае нуклеиновых кислот при определениях степени спаривания цепей. Длинноволновые электронные полосы поглощения нуклеиновых кислот лежат вблизи 2600 Å. Эти полосы, обуславливаемые $\pi\pi^*$ -переходами, характеризуются дипольными моментами, лежащими в плоскостях азотистых оснований. В табл. 5.3 приведены характеристики полос поглощения в спектрах азотистых оснований [71].

Параллельные переходы в области 2600 Å — это $\pi\pi^*$ -переходы с молярными коэффициентами поглощения 8000—10 000. В области 1900 Å лежат также параллельные $\pi\pi^*$ -переходы с более интенсивными полосами (коэффициенты поглощения

На рис. 5.14 показаны экспериментальные результаты, полученные для полиглутаминовой кислоты (ПГК) [59]. При pH 4,9 полимер имеет вид α -спирали, при pH 8 — клубка. Хорошо наблюдаются две полосы, возникшие в результате давидовского расщепления, и сильный гипохромизм. Отношение $f_{0a}/f_{0a}^{(0)}$ равно 0,7, что хорошо согласуется с теорией (см. [67]).

Зависимость гипохромного эффекта от длины цепи была изучена в [72], зависимость от

Таблица 5.2

Молярное поглощение полипептидов в α -спиральной и неупорядоченной формах ¹⁾

	Коэффициенты молярного поглощения, $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$				Сила осцилля- тора
	в макси- муме полосы	при 1900 Å	при 1970 Å	при 2050 Å	
К л у б о к					
Поли-L-глутаминовая кис- лота без соли при ионной силе 0,0004 при ионной силе 2,0	7100	7000 (7200) (6050)	6500 (6600) (5350)	3500 (4850) (3700)	0,115
Поли-L-лизин	7100 (6600)	6900 (6500)		3300	0,106
Среднее		6950		3400	0,110
α -с п и р а л ь					
Поли-L-глутаминовая кис- лота	4200	4200	3300	2150	0,0778
Поли-L-лизин	4400	4400	3500	2300	0,0720
Среднее		4300	3400	2200	0,0749

¹⁾ Числа без скобок заимствованы из работы [74], числа в скобках — из работы [73].

Таблица 5.3

Характеристики полос поглощения в спектрах азотистых оснований

	Максимумы, Å	Полуширина, Å	Дипольный момент перехода дебан	Направление момента ¹⁾
Аденин	2600	260	3,90	-2°
	2400	200	1,68	-156°
Цитозин	2713	305	3,04	82°
	2400	280	2,63	180°
Гуанин	2775	235	2,46	-83°
	2510	290	3,87	165°
Урацил	2625	315	3,29	173°
	2400	190	1,16	160°

¹⁾ Угол отсчитывается против часовой стрелки от линии, соединяющей атомы 3 и 6 в пуринах, или от линии, соединяющей атомы 1 и 4 в пиримидинах (см. стр. 83).

20 000—25 000). Длинноволновые переходы вблизи 2800 Å — перпендикулярные $\pi\pi^*$ -переходы с малыми коэффициентами поглощения (< 5000).

Плоскости азотистых оснований параллельны друг другу в двойной спирали ДНК (см. стр. 489) и почти параллельны (угол 7°) в двуспиральных участках РНК (см. стр. 500). Гипохромизм полосы 2600 Å ДНК достигает 40%.

Квантовомеханические расчеты положений первых π -электронных уровней пар азотистых оснований в ДНК проведены в ряде работ, в частности в [75, 76].

§ 5.5. ТЕОРИЯ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Спектрополяриметрия — один из важнейших и наиболее доступных методов изучения биополимеров. Поэтому расскажем о ней подробно.

Оптическая активность — способность асимметричной среды поворачивать плоскость поляризации проходящего света — впервые была обнаружена Араго в 1811 г. Как показал Френель (1820 г.), оптическая активность означает наличие кругового двулучепреломления, т. е. она определяется различием в скоростях распространения в среде света, поляризованного по кругу вправо и влево. В правой волне вектор напряженности электрического поля \mathbf{E} в луче, идущем в глаз наблюдателя, вращается по часовой стрелке, в левой — в противоположную сторону. Соответственно для правой (D) и левой (L) волн, распространяющихся вдоль оси z ,

$$E_y = iE_x \text{ (D)}, \quad E_y = -iE_x \text{ (L)}, \quad (5,41)$$

т. е. в правой волне фаза E_y отличается от фазы E_x на $1/2\pi$ ($i \equiv \exp 1/2\pi$), в левой — на $-1/2\pi$. В среде электрическое поле световой волны характеризуется вектором электрической индукции

$$\mathbf{D} = n^2\mathbf{E}, \quad (5,42)$$

где n — показатель преломления. Опишем правую и левую волны выражениями $D_D = D_x - iD_y$, $D_L = D_x + iD_y$. Если $D_D = 0$, то условие существования L-волны имеет вид $D_y = -iD_x$, если $D_L = 0$, то для D-волны получим $D_y = iD_x$. Пусть при входе в вещество волна с амплитудой 1 линейно поляризована вдоль оси x ($D_x = 1$, $D_y = 0$, $D_D = D_L = 1$). Скорости распространения правой и левой волн в веществе различны, т. е. $n_D \equiv n_+$ отличен от $n_L \equiv n_-$. Тогда при выходе из слоя вещества толщиной l имеем

$$D_D = D_+ = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} n_+ l\right), \quad D_L = D_- = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} n_- l\right), \quad (5,43)$$