

Теория дает

$$\varepsilon_L - \varepsilon_D = \frac{\pi\nu}{c} f(\nu - \bar{\nu}) \sum'_{i,j} \sum_a \nu_{i0a} \left\{ \sum_{s,t} \frac{\rho_s^{i0a}}{r_{st}^3} r_{st} \right\} \alpha'_i \mathbf{p}_{i0a} \mathbf{R}_{ij} + \\ + \frac{\pi\nu}{2c} \frac{\partial f(\nu - \bar{\nu})}{\partial \nu} \sum'_{i,j} \sum_{a,b} \nu_{i0a} \left\{ \sum_{s,t} \frac{\rho_s^{i0a} \rho_t^{j0b}}{r_{st}^3} \right\} \mathbf{R}_{ij} [\mathbf{p}_{i0a} \mathbf{p}_{j0b}], \quad (5,134)$$

где α'_i — поляризуемость i -й группы s -го полимера.

Таким образом, для расчета нужно знать лишь свойства мономеров и их взаимную ориентацию. Функция $f(\nu - \bar{\nu})$ берется как среднее по полосам всех четырех оснований. Удовлетворительное согласие теории с опытом свидетельствует о том, что КД для полинуклеотидов определяется в основном $\pi\pi^*$ -, а не $\pi\pi^*$ -переходами. На рис. 5.22 показаны кривые КД и АДОВ для ДНК и РНК [143]. Относительная малость этих эффектов объясняется взаимной компенсацией вращательных сил, отвечающих ряду полос.

§ 5.7. СПЕКТРОПОЛЯРИМЕТРИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Итак, для различных конформаций полипептидов графики АДОВ и КД различны (рис. 5.23). В табл. 5.7 [144] приведены характерные значения минимумов и максимумов на кривых АДОВ.

Таблица 5.7

Характерные величины АДОВ для разных конформаций L-полипептидов

Конформация	Минимум, Å	Точка пересечения кривой АДОВ с осью абсцисс ($[M]=0$), Å	Максимум, Å
α -спираль	2320—2330 1820—1840	2240 1900	1980—1990
β -форма	2290—2300 1900	2200 1960	2050
Неупорядоченная	2380 (малый) 2040—2050	— 1980	2280 (малый) 1890
Поли-L-пролин II	2100	2030	1940

Таким образом, измерение АДОВ дает сведения о конформации системы. Очевидно, что КД дает более четкую информацию, так как он определяется лишь вращательной силой, соответствующей данной полосе. Чистая α -спираль характеризуется эллиптичностью $[\theta] = 3300(\varepsilon_L - \varepsilon_D)$, равными для 2060 Å — 36 000, для 2220 Å — 38 000 и для 1900 Å + 71 000 [145]. Эти

три значения эллиптичности типичны для α -формы. Хорошей мерой степени α -спиральности является $[\theta]$ для 2220 Å, обозначаемая $[\theta]_{2220}$, — остаточная эллиптичность для белка в неупорядо-

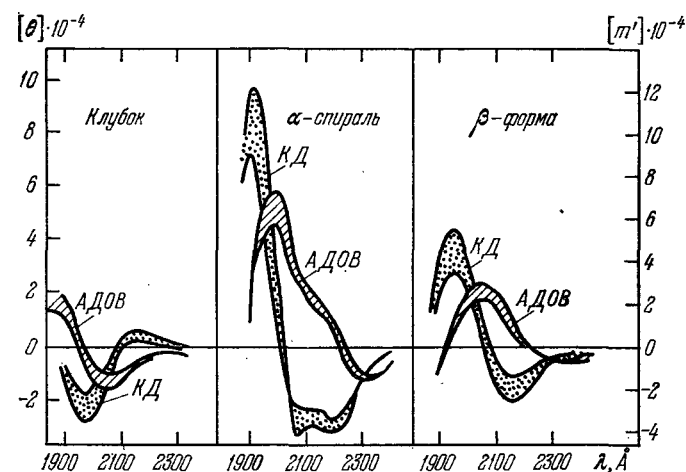


Рис. 5.23. Графики АДОВ и КД для L-полипептидов в различных конформациях.

ченном состоянии. В работе [145] приведен ряд таких данных (табл. 5.8) (см. также [146]).

Таблица 5.8

КД для белков в различных условиях

Белок	Растворитель	$[\theta]_{2220} \cdot 10^4$	Доля α -спиралей x
Лизоцим	pH 7,0, фосфатный буфер	-1,30	$(1,30 - 0,29)/3,8 = 0,27$
	8M мочевины	-1,26	$(1,26 - 0,29)/3,8 = 0,26$
	5M гуанидин HCl	-0,29	0
Инсулин	2-хлорэтанол	-3,0	$(3,0 - 0,29)/3,8 = 0,7$
	pH 7,0, фосфатный буфер	-1,46	$(1,46 - 0,64)/3,8 = 0,21$
Гемоглобин	8M мочевины	-0,64	0
	pH 7,0, фосфатный буфер	-3,1	$(3,1 - 0,34)/3,8 = 0,72$
	8M мочевины	-0,34	0

Изучение КД позволяет определить содержание не только α -спиралей, но и β -форм и неупорядоченных звеньев в белке.

Для этой цели развит эмпирический метод [147]. Строятся графики КД для трех белков (рибонуклеаза, лизоцим и миоглобин), для которых доли α - и β - и неупорядоченной форм x , y , z известны из рентгеновских данных. Составляют систему уравнений для трех белков

$$[\theta]_1 = x_1 [\theta]_\alpha + y_1 [\theta]_\beta + (1 - x_1 - y_1) [\theta]_r,$$

$$[\theta]_2 = x_2 [\theta]_\alpha + y_2 [\theta]_\beta + (1 - x_2 - y_2) [\theta]_r,$$

$$[\theta]_3 = x_3 [\theta]_\alpha + y_3 [\theta]_\beta + (1 - x_3 - y_3) [\theta]_r.$$

Из экспериментальных значений $[\theta]_1$, $[\theta]_2$, $[\theta]_3$ для любых λ и заданных значений x и y находим параметры $[\theta]_\alpha$, $[\theta]_\beta$, $[\theta]_r$ для любых λ . С помощью этого метода интерпретации КД были найдены значения x и y для карбоксипептидазы А и α -химотрипсина, хорошо согласующиеся с результатами, полученными методом рентгенографии.

Более доступны конформационные определения по кривым ДОВ вне области собственного поглощения. Пользуясь уравнением Моффита, можно оценить долю α -формы x_α как отношение измеренного значения b_0 к величине b_0 α -спирали

$$x_\alpha = b_0/b_0^\alpha = -b_0/630.$$

Вместе с тем константу a_0 для частично спирализованного белка можно представить в виде

$$a_0 = a_0^{\text{ак}} + x_\alpha a_0^\alpha,$$

где $a_0^{\text{ак}}$ определяется вращением, обусловленным самими аминокислотными остатками. Иными словами, для частично спирализованного белка

$$[M] = a_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + x_\alpha \left(a_0^\alpha \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^\alpha \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \quad (5,135)$$

Разлагая первый член в ряд по $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-1}$, получаем

$$[M] = a_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_0^4}{(\lambda_0^2 - \lambda_0^2)^2} + x_\alpha \left(a_0^\alpha \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^\alpha \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \quad (5,136)$$

Соответственно

$$x_\alpha = \frac{b_0 - b_0^{\text{ак}}}{b_0^\alpha - b_0^{\text{ак}}} = -\frac{b_0 - b_0^{\text{ак}}}{630}.$$

Обычно $b_0^{\text{ак}}$ мало и лежит в пределах ± 50 . В работе [148] было применено иное выражение, не имеющее, однако, принципиальных отличий от приведенного.

Величине a_0^a можно с достаточными основаниями приписать значение $630-650 \text{ град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Величина a_0^{aK} находится из данных о ДОВ для денатурированного белка.

При построении зависимости $[M] (\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)$ от $(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)^{-1}$ получается прямая линия с наклоном $x_\alpha b_0^a$; отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $a_0^{aK} + x_\alpha a_0^a$. Таким образом, x_α можно определить двумя независимыми способами. Следует отметить, что присутствие ароматических аминокислотных остатков сильно влияет на значения констант Моффитта.

Другой эмпирический способ определения x_α основан на применении одночленной формулы Друде

$$[M] = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$$

(K — константа) в предположении о линейной зависимости λ_0 от x_α . Для $x_\alpha = 0,4$ $\lambda_0 = 2680 \text{ \AA}$, для $x_\alpha = 0,0$ (клубок) $\lambda_0 = 2120 \text{ \AA}$.

Блоут и Шехтер предложили применять для определения x_α двучленную формулу Друде [130, 149, 150]. Вместо эффективного значения λ_0 в этой формуле фигурируют экспериментально наблюдаемые максимумы поглощения $\lambda_1 = 1930 \text{ \AA}$ и $\lambda_2 = 2250 \text{ \AA}$. Имеем

$$[M] = \frac{a_{1930} \lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{a_{2250} \lambda_2^2}{\lambda^2 - \lambda_2^2}, \quad (5,137)$$

причем $a_{1930} > 0$, $a_{2250} < 0$. Эти константы оказываются связанными линейным соотношением. В водных растворах полиаминокислот (диэлектрическая проницаемость $\epsilon > 30$)

$$a_{2250} = -0,55a_{1930} - 430, \quad (5,138)$$

в органических растворителях ($\epsilon < 30$)

$$a_{2250} = -0,55a_{1930} - 280. \quad (5,139)$$

Однако последнее соотношение менее надежно [144]. На основе данных для поли-L-глутаминовой кислоты в воде при рН 4 (спираль) и рН 7 (клубок) Шехтер и Блоут определяют x_α как

$$x_\alpha = \frac{a_{1930} + 750}{3650} \quad (5,140)$$

или

$$x_\alpha = -\frac{a_{2250} + 60}{1990}. \quad (5,140a)$$

Предполагается, что оба эти значения совпадают и, следовательно, экспериментальные значения a_{1930} и a_{2250} должны удовле-

творять линейной зависимости (5,138), если белок содержит только α -спиральную и неупорядоченную конформации. Отклонение от прямой свидетельствует о наличии других структур, например β -формы. В действительности метод (равно как и метод определения a_0 при помощи уравнения Моффитта) слишком груб для получения таких выводов (дальнейшие подробности см. в [133, 144]).

В табл. 5.9 сопоставлены значения x_α для ряда белков, определенные различными методами. Эти данные находятся, в общем, в разумном согласии с результатами рентгеноструктурного анализа для белков, отмеченных звездочками.

Таблица 5.9

Степень α -спиральности белков в водном растворе

Белок	b_0	a_0	$a_{19,16}$	a_{2250}
Тропомнозин	0,90	0,90	0,85	0,85
Гемоглобин *	0,70—0,80	—	—	—
Миоглобин *	0,70—0,80	—	—	—
Альбумин плазмы	0,45	0,60	0,55	0,55
Инсулин	0,40	0,60	—	—
Фибриноген	0,35	—	0,35	0,30
Овальбумин	0,30	0,50	—	—
Лизоцим *	0,30	0,40	—	—
Гистон	0,20	0,30	—	—
Рибонуклеаза *	0,15	0,15	—	—
Химотрипсиноген	0,10	0,10	—	—
β -лактоглобулин	0,0—0,1	0,70	0,30	0,20

Таким образом, исследование ДОВ, АДОВ и КД эффективно при определении α -спиральности белков и полипептидов. С другой стороны, весьма перспективно изучение ИОА комплексов белков с красителями и ионами металлов, ИОА коферментов и простетических групп. Такие исследования дают сведения о конформациях и в сочетании с химией позволяют расшифровать события, протекающие в активном центре ферментов (см. гл. 6 и [135]). Изучению структуры белков методом КД посвящен обзор [272].

Недавно начались работы по изучению оптической активности полипептидов в близкой инфракрасной области спектра (в водных растворах до 1,2 $\mu\text{м}$ и в органических растворителях 2,2 $\mu\text{м}$) [151]. Так как оптическая активность определяется отношением размеров молекулы к длине волны (см. стр. 292), в ИК-области оптическая активность есть малый эффект. Малы и вращательные силы, отвечающие не электронным, а

колебательным переходам. Тем не менее полученные результаты представляются обнадеживающими; возможно, что новый метод позволит определять содержание β -форм в белках.

АДОВ и КД различны для ДНК и РНК (см. стр. 314) и позволяют изучать конформации последних. Теоретическая интерпретация КД для ДНК и РНК в водном растворе согласуется с конформациями, установленными рентгенографически (см. [273]).

Изучение олигонуклеотидов, выявившее, в частности, различия АДОВ и КД для 16 динуклеотидов [152, 153], дает основания надеяться на получение сведений о первичной структуре фрагментов нуклеиновых кислот. По-видимому, оптическую активность одноцепочечных полимеров можно представить в виде суммы вкладов димеров [154].

Спектрополяриметрия позволила получить интересные сведения о состоянии нуклеиновых кислот в рибосомах [155, 157], вирусах [157], нуклеогистонах [158] и т. д.

Наряду с естественной оптической активностью вращение плоскости поляризации и КД в магнитном поле оказываются очень ценными методами исследования биополимеров, прежде всего гемсодержащих белков. Эти явления описаны в §§ 7.3, 7.4.

§ 5.8. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Сложные молекулы характеризуются большим числом колебательных степеней свободы, сильным взаимодействием колебаний и поэтому непрерывным перемещением колебательной энергии от одной степени свободы к другой. Соответственно колебательные уровни энергии сложных молекул образуют, как правило, сплошную совокупность. Электронное и колебательные движения взаимодействуют друг с другом. Разделение этих видов движения, с хорошей степенью приближения реализуемое в случае простых молекул, оказывается, в сущности, невозможным для сложных молекул. Это связано с большим запасом колебательной энергии, приближающимся к величине, достаточной для возбуждения электронной оболочки (см. также стр. 400) [159, 160].

Таким образом, спектры флуоресценции, равно как и спектры поглощения сложных молекул, размыты и лишены тонких деталей (это не относится к линейчатым спектрам Шпольского, наблюдаемым в особых условиях [161]). Информативными оказываются не столько длины волн максимумов полос, сколько интенсивность, поляризация и длительность свечения.

Интенсивность флуоресценции характеризуется величиной квантового выхода γ . Допустим, что в момент $t=0$ имеется $n(0)$ возбужденных молекул. Если вероятность перехода за 1 сек из