

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

возбужденного состояния в невозбужденное с излучением кванта света есть f , а вероятность безызлучательного перехода g , то

$$dn = -fn dt - gn dt \quad (5,141)$$

и

$$n(t) = n(0) \exp[-(f + g)t]. \quad (5,142)$$

Средняя длительность возбужденного состояния

$$\tau = \int_{t=0}^{\infty} t dn / \int_{t=0}^{\infty} dn = \frac{1}{f + g}. \quad (5,143)$$

Интенсивность флуоресценции убывает экспоненциально. В большинстве случаев τ равно по порядку величины 10^{-8} — 10^{-9} сек, но может быть и гораздо выше.

Квантовый выход выражается отношением числа переходов с излучением к общему числу переходов

$$\gamma = f/(f + g). \quad (5,144)$$

В растворе вследствие взаимодействия с молекулами растворителя устанавливается равновесное распределение молекул по их запасам колебательной энергии. Это распределение не зависит от избытка колебательной энергии, полученной при возбуждении, и, следовательно, от длины волны $\lambda_{\text{возб}}$ возбуждающего света. Следовательно, τ и γ также не зависят от $\lambda_{\text{возб}}$ (закон Вавилова).

Флуоресцентное излучение сложных молекул (в частности, красителей) поляризовано даже при естественном возбуждающем свете. Теория поляризованной люминесценции детально разработана Вавиловым [162] (см. также [163]). Возбуждающий свет поглощается молекулами, определенным образом ориентированными по отношению к электрическому вектору \mathbf{E} световой волны. После поглощения энергия излучается в результате другого электронного перехода, которому отвечает, вообще говоря, иная поляризация в молекуле, т. е. иное направление дипольного момента перехода. Люминесценция поляризована, если время жизни возбужденного состояния, т. е. время передачи энергии от поглощающего к излучающему диполю, мало по сравнению с временем переориентации молекулы.

Степень поляризации выражается величиной

$$P = \frac{J_z - J_x}{J_z + J_x}, \quad (5,145)$$

где J_z и J_x — интенсивность излучения с составляющими электрического вектора вдоль осей z и x при направлении падающего света вдоль оси y . Простой расчет показывает, что предельное значение P при естественном падающем свете для

неподвижных молекул равно $1/3$. Вращательное движение люминесцирующих молекул или групп деполаризует свечение. Теория приводит к формуле Левшина — Перрена [162, 163] (для естественного падающего света)

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + \frac{1}{3} \right) \frac{kT}{V\eta} \tau; \quad (5,146)$$

здесь P — наблюдаемая степень поляризации, P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполаризации, т. е. при $T \rightarrow 0$ или при вязкости среды $\eta \rightarrow \infty$, V — молекулярный объем, τ — время жизни возбужденного состояния.

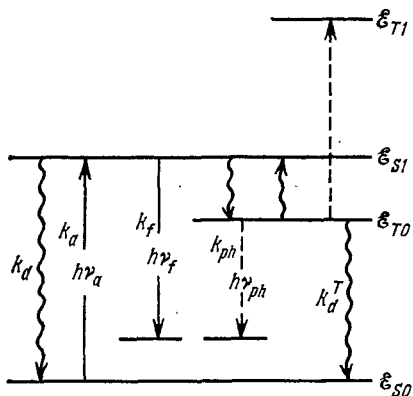


Рис. 5.24. Схема энергетических переходов при люминесценции.

ϵ_{S0} , ϵ_{S1} — синглетные уровни, ϵ_{T0} , ϵ_{T1} — триплетные уровни, $h\nu$ — кванты, k — константы скорости соответствующих переходов. Волнистыми стрелками показаны безызлучательные переходы.

может перейти без излучения на метастабильный, триплетный уровень ϵ_{T0} , растрчивая часть энергии возбуждения и колебаний. В дальнейшем энергия ϵ_{T0} может выделиться в виде фотона фосфоресценции $h\nu_{ph}$ или превратиться в колебательную с деградацией ее в тепло. Все эти процессы представлены схематически на рис. 5.24.

Другой существенной причиной уменьшения квантового выхода является тушение люминесценции. Оно может вызываться посторонними веществами, в частности кислородом. Для биофизики особый интерес представляют процессы, которые проявляются, в частности, в концентрационном тушении и в концентрационной деполаризации люминесценции.

При увеличении концентрации флуоресцирующих молекул до 10^{-4} моль/л начинается резкое падение квантового выхода и сте-

Таким образом, степень поляризации убывает с увеличением подвижности излучающей молекулы и может служить мерой подвижности.

Безызлучательные переходы, делающие квантовый выход η меньшим единицы, сводятся к интерконверсии и деградации световой энергии [164]. Молекула, возбужденная фотоном $h\nu_a$ до некоторого синглетного уровня ϵ_{S1} , может с вероятностью f истратить эту энергию в результате флуоресценции, т. е. излучения фотона $h\nu_f$; в ней может произойти внутренняя конверсия энергии в колебания с сопутствующей деградацией в тепло; она может

пени поляризации свечения. И то и другое объясняется миграцией энергии возбуждения от молекулы к молекуле. Речь идет не об излучении с последующей реабсорбцией света, но о прямой передаче энергии возбуждения вследствие резонансного взаимодействия молекул. Условием такого взаимодействия является сильное перекрывание полос поглощения и испускания молекул. Взаимодействие, естественно, убывает с увеличением расстояния между молекулами. Феноменологическое рассмотрение этих явлений было проведено Вавиловым [165], строгая квантовомеханическая теория резонанса развита Ферстером [166, 167] (см. также [168]).

Резонансное взаимодействие, определяющее миграцию энергии, подобно экситонному взаимодействию в молекулярных кристаллах, исследованному Давыдовым (см. стр. 286). Различие этих двух явлений имеет количественный характер. Миграция энергии происходит при большой энергии взаимодействия, сильно превышающей ширину электронно-колебательной зоны. В этом случае сильного взаимодействия передача энергии происходит весьма быстро, и можно не учитывать влияния колебаний. Соответственно, в отличие от экситонных спектров молекулярных кристаллов, возникающих при слабом взаимодействии (энергия взаимодействия значительно меньше ширины зоны, но много больше ширины отдельного колебательного подуровня); в спектрах резонансно взаимодействующих молекул не наблюдается колебательная структура.

Миграция энергии вызывает деполяризацию люминесценции. Молекула, поглощающая квант, ориентирована в пространстве определенным образом. Если бы излучение происходило в той же молекуле, то оно характеризовалось бы некоторым значением P . Однако за время, протекающее между поглощением и излучением, возможны многократные акты передачи энергии на другие молекулы с несколько отличными ориентациями. По прошествии определенного времени все возбужденные молекулы теряют первоначальную ориентацию, которая была в момент поглощения, и излучение оказывается полностью деполяризованным.

Нужно подчеркнуть, что миграция энергии возможна как между тождественными, так и между разными молекулами при условии перекрывания полосы поглощения молекул одного сорта и полосы флуоресценции молекул другого сорта.

Представления о миграции энергии, возникшие в результате изучения люминесцентных явлений, легли в основу попыток объяснения ряда биологических процессов. Как уже указывалось, многие биологические процессы протекают по принципу «все или ничего» с большой скоростью (см. стр. 44). Истинное объяснение этих явлений, по-видимому, должно исходить прежде

всего из представлений об их кооперативности. Применительно ко многим задачам такое объяснение получено. Однако соображения о миграции энергии в биополимере или в окружающей его «структурированной воде» также фигурируют в литературе, список которой начинается известной книгой Сцент-Дьёрдьи [169]. Такого рода «миграционные» представления в большинстве случаев не оправданы, но они могут оказаться существенными при исследовании электронно-конформационных взаимодействий (см. стр. 408). С другой стороны, миграция энергии, по-видимому, играет существенную роль в процессах фотосинтеза.

Изучение особенностей люминесценции, связанных с миграцией энергии, важно для биофизики. Передача энергии с одного люминесцирующего участка биополимера на другой позволяет получить информацию об их относительном расположении.

Люминесценции биополимеров посвящен ряд монографий (см., например, [170—172]).

Циклические π -электронные системы часто являются люминофорными. Ароматические аминокислотные остатки в белках Фен, Тир и Три оказываются в этом смысле неравноценными. Соответствующие аминокислоты характеризуются спектральными свойствами, приведенными в табл. 5.10.

Таблица 5.10

Спектральные характеристики ароматических аминокислот

Аминокислота	$\lambda_{\text{макс}}', \text{ \AA}$ (поглощение)	Молекулярный коэффициент поглощения	$\lambda_{\text{макс}}', \text{ \AA}$ (флуоресценция)	Квантовый выход γ
Фенилаланин	2570	200	2820	0,04
Тирозин	2570	1300	3030—3040	0,21
Триптофан	2800	5600	3530	0,205

Флуоресценция Фен практически не видна. Свечение Тир и Три существенно зависит от рН и полярности среды, от протонизации соседних групп. В нативных белках γ для Тир значительно меньше приведенного; напротив, γ для Три может оказаться увеличенным до 0,32. Денатурация мочевиной выравнивает эти значения: квантовый выход первого остатка увеличивается, второго — уменьшается. Таким образом, для Тир и Три квантовые выходы конформационно чувствительны. Это объясняется зависимостью тушения люминесценции Тир и Три от окружения, в частности от того, гидрофобно оно или гидрофильно. Люминесценция остатков, переходящих при конформационных изменениях из внутренности глобулы на ее поверхность, легче тушится и посторонними тушителями. Исследование

собственной люминесценции белков (ароматические остатки) позволило получить важные сведения о конформационных свойствах белков, об их взаимодействиях с малыми молекулами и ионами [173—180, 274, 275]. Ароматические остатки служат, таким образом, чувствительными метками.

Как уже сказано, поляризация люминесценции зависит от подвижности люминофора. Определяя P , можно найти релаксационные характеристики макромолекулы. Теория поляризованной люминесценции полимеров развита в работах [181, 182]. Среднее квадратичное время вращательной релаксации в макромолекуле τ_r можно определить по зависимости степени поляризации люминесценции для раствора полимера от вязкости растворителя

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + \frac{1}{3} \right) \frac{3\tau}{\tau_r} \quad (5,147)$$

(ср. (5,146)), τ — длительность свечения. Для простейшего случая жестких частиц $\tau_r \sim \eta/T$. Этот метод был, в частности, применен к изучению подвижности и конформационных превращений ряда синтетических полимеров (полиметакриловой и полиакриловой кислот, полиметилметакрилата и др.) с люминесцентными метками как в боковых привесках, так и в основной цепи [183—185]. Были определены энергии активации конформационных переходов и установлено сильное влияние гидрофобных взаимодействий на внутримолекулярную подвижность.

Метод поляризованной люминесценции эффективно применяется к изучению комплексов макромолекул нуклеиновых кислот с малыми молекулами, в частности с молекулами акридиновых красителей. Исследования таких комплексов дают важную информацию о конформационной структуре нуклеиновых кислот (см. [276] и гл. 8).

Конформационные превращения и их динамика проявляются и в других характеристиках люминесценции. Так, средство α -химотрипсина в различных конформациях к люминесцирующему веществу (профлави́ну) сказывается на интенсивности свечения [186]. Положения максимумов в спектрах люминесценции полярных молекул в конденсированных полярных средах зависят от релаксационных свойств микроокружения. Теория дает выражение, связывающее положение «центра тяжести» полосы флуоресценции ν_c с величинами τ и τ_r [187]:

$$\nu_c = \nu_\infty + (\nu_0 - \nu_\infty) \frac{\tau_r}{\tau_r + \tau}, \quad (5,148)$$

где ν_∞ — значение ν_c при $\tau_r \ll \tau$, ν_0 — при $\tau_r \gg \tau$. Данные о ν_c были использованы при изучении релаксационных свойств ряда полимеров с люминесцентными метками [188].