

тивными. Напротив, лазерная спектроскопия КР позволяет получать весьма детальную информацию о строении белков и других биологически функциональных веществ. Получаются прекрасные спектры КР растворов, кристаллических и аморфных

Т а б л и ц а 5.3. Характеристики полос амид I и амид II

Конформация	Обозначения колебаний	Частота, см ⁻¹	
		амид I	амид II
Неупорядоченная	ν_0	1658	1520
Антипараллельная	ν_{\parallel}	1658 (сл.)	1530 (с.)
β -форма	ν_{\perp}	1632 (с.)	1510 (сл.)
	ν_{\perp}	1668 (о. сл.)	1550 (сл.)
	ν_{\parallel}	1648 (сл.)	1530 (с.)
Параллельная	ν_{\parallel}	1632 (о. сл.)	1530 (сл.)
	ν_{\perp}	1650 (с.)	1516 (сл.)
α -спираль	ν_{\parallel}	1646 (сл.)	1546 (с.)

с. — сильная, сл. — слабая, о. сл. — очень слабая полосы в ИК-спектре, \parallel и \perp — полосы, отвечающие колебаниям дипольного момента, параллельным и перпендикулярным к полимерной цепи.

веществ, а также веществ в газовой фазе. Наиболее интересные результаты получаются с помощью *резонансного комбинационного рассеяния* (РКР). В этом случае длина волны рассеиваемого лазерного света попадает в область собственного поглощения хромофора биологической молекулы. Интенсивности РКР очень велики, что позволяет изучать биологические молекулы даже при очень малых концентрациях. Методом РКР изучены гемсодержащие белки, хлорофилл, фермент-субстратные комплексы и т. д.

Если молекула не содержит хромофора, необходимого для наблюдения РКР, то хромофор в качестве метки может быть введен посредством химического или нехимического связывания.

В последнее время проведены расчеты форм и частот нормальных конформационных, т. е. крутильных, колебаний для ряда белков. Исследованы колебания доменов относительно друг друга (Левитт). Участки с различной вторичной структурой характеризуются разными областями частот: α -спирали 50—110 см⁻¹, β -слои 5—30 см⁻¹, неупорядоченные поворотные участки 5—75 см⁻¹. Колебательные линии в этих низкочастотных областях действительно удается наблюдать в спектрах КР белков. Соответствующие движения имеют коллективный характер.

§ 5.10. Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса

Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса (ЯМР и ЭПР) широко применяются в биофизике.

Рассмотрим сущность парамагнитного резонанса.

Внесем частицу с магнитным моментом μ в постоянное магнитное поле напряженностью H_0 . Магнитный момент будет прецессировать вокруг направления поля (рис. 5.24, а) с частотой, пропорциональной H_0 (ср. (5.46)):

$$\omega_0 = \gamma H_0 = \frac{\mu}{p} H_0, \quad (5.56)$$

где p — механический момент количества движения частицы (например, спин электрона). Подвергнем прецессирующую частицу действию слабого переменного поля H_1 , направленного перпендикулярно H_0 . Линейно поляризованное поле H_1 можно разложить на две круговых компоненты (с. 148). Одна из этих компонент совпадает по направлению с прецессией. Если частота колебаний H_1 совпадает с ω_0 , то возникает резонанс, сильное поглощение волны H_1 . Это явление было открыто в 1945 г. Завойским.

Таково элементарное классическое описание эффекта. Квантовая механика показывает, что уровни энергии частицы, обладающей магнитным моментом, расщепляются в магнитном поле. Начнем с ЯМР. Атомные ядра, у которых нечетно хотя бы одно из двух чисел — масса или порядковый номер, — имеют ядерный спин и, тем самым, ядерный магнитный момент. Ядерный спин равен нулю у ^{12}C , ^{16}O и т. д. и не равен нулю у H , D , ^{13}C , ^{19}F и т. д.

Если J — ядерное спиновое число, то соответствующий магнитный момент равен $[J(J+1)]^{1/2} \gamma \hbar$, где $\gamma \hbar = g \mu_0$ — гиромагнитное отношение, g — фактор расщепления, а μ_0 — ядерный магнетон. В магнитном поле H_0 вследствие зеемановского расщепления (см. с. 159) возникает $2J+1$ уровней с энергиями

$$E = -\gamma \hbar H_0 m \quad (m = J, J-1, \dots, -J). \quad (5.57)$$

Расстояние между соседними уровнями равно $\gamma \hbar H_0$. Для протона $J = 1/2$ и в поле H_0 возникают два уровня, соответствующие параллельному и антипараллельному направлениям спина (рис. 5.24, б). Резонанс происходит при

$$\hbar \omega_0 = \gamma \hbar H_0 = g \mu_0 H_0, \quad (5.58)$$

где

$$\mu_0 = \frac{e \hbar}{2m_p c} = 5,05 \cdot 10^{-24} \text{ эрг/Гс}, \quad (5.59)$$

e — заряд протона, m_p — его масса. Фактор g для протона равен 5,58. Если $H_0 = 10\,000$ Гс, то резонансная частота для протонов равна 42,6 МГц, что соответствует диапазону метровых радиоволн.

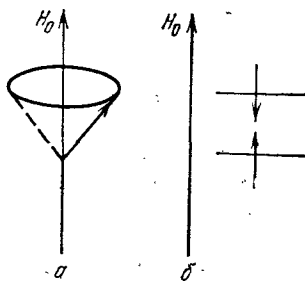


Рис. 5.24. Схема парамагнитного резонанса: классическая (а) и квантовомеханическая (б) модели

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 (см. с. 160)

$$\exp(-\hbar\omega_0/kT) = \exp(-g\mu_0 H_0/kT) \approx 1 - g\mu_0 H_0/kT. \quad (5.60)$$

Экспонента заменяется двумя первыми членами разложения в ряд, так как $g\mu_0 H_0 \ll kT$ при $T = 300$ К и обычных значениях H_0 . При $H_0 = 10^4$ Гс фактор Больцмана равен $(1-14) \cdot 10^{-6}$.

При включении радиочастотного поля H_1 происходят переходы с нижнего уровня на верхний (поглощение) и обратно (испускание). Если вероятности обоих процессов одинаковы, то должно возникнуть быстрое насыщение уровней — их населенности выравниваются и поглощение прекратится. Это, однако, не наблюдается, так как ядерные спины способны отдавать свою энергию и без излучения. Происходит релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Он возникает вследствие взаимодействия ядерных спинов с *решеткой*, т. е. с другими ядрами, находящимися в состоянии теплового движения. При выключении поля H_1 выделяющаяся энергия превращается в тепловую энергию решетки. Изменение населенности уровней после выключения поля H_1 описывается уравнением

$$\Delta n(t) = \Delta n(0) \exp(-t/T_1), \quad (5.61)$$

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 выключения поля $t = 0$, T_1 — *время спин-решеточной релаксации*. Время T_1 зависит 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} с. Ширина спектральной линии ЯМР тем больше, чем меньше время жизни ядра на данном энергетическом уровне. Спин-решеточная релаксация вносит вклад в ширину линии порядка T_1^{-1} .

Имеется и второй процесс — *спин-спиновое взаимодействие* магнитных ядер. На каждый спин действует кроме поля H_0 локальное поле, создаваемое соседними ядрами и равное

$$H_{\text{лок}} = \frac{\mu}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1), \quad (5.62)$$

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

$$\omega_0 = \gamma(H_0 + H_{\text{лок}}), \quad (5.63)$$

а не (5.56), справедливый для изолированного спина. Порядок величины $H_{\text{лок}}$ — несколько гаусс. Спин-спиновое взаимодействие

также дает вклад в ширину линии, как вследствие неоднородности поля, так и благодаря определяемому этим взаимодействием обмену энергией между протонами. *Время спин-спиновой релаксации* T_2 в твердых телах много меньше T_1 , и ширина линии определяется только T_2 . В вязких жидкостях T_2 того же порядка, что и T_1 , и ширина линии составляет доли герца.

Спектры ЯМР жидкостей и растворов содержат ряд сравнительно узких линий, отвечающих структурно неэквивалентным протонам. Так, в спектре 1,1,2-трихлорэтана $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_3$ при невысоком разрешении наблюдаются две линии, отвечающие протонам группы CH_2 и CH с отношениями интенсивностей 2 : 1. Это происходит благодаря экранирующему воздействию электронного окружения ядра на его спин. Электроны прецессируют в направлении, противоположном прецессии ядер, и создают вторичное поле $H' = -\sigma H_0$. На ядро действует эффективное поле

$$H_{\text{эф}} = H_0 + H' = (1 - \sigma) H_0; \quad (5.64)$$

σ — *постоянная экранирования*. Ее значение различно вдоль различных направлений в молекуле, т. е. σ — величина анизотропная. В жидкости она усредняется.

Положение спектральной линии ЯМР относительно некоторой эталонной линии называется *химическим сдвигом*. Обычный эталон для протонного резонанса органических соединений — тетраметилсилан $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, для водных растворов биополимеров — ДСС (2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоновая кислота). Химический сдвиг выражается отношением сдвига частоты (поля) к эталонному значению, умноженным на 10^6 :

$$\delta = \frac{\Delta\omega}{\omega_0} \cdot 10^6 = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6. \quad (5.65)$$

У биополимеров δ для алифатических протонов варьирует от $-0,5$ до $-2,0$, ароматических — от $-6,0$ до $-8,5$ и т. д.

При высоком разрешении наблюдается *сверхтонкая* (мультиплетная) *структура* линий ЯМР. Она возникает вследствие магнитного взаимодействия между ядрами, передаваемого через электроны связи, т. е. непрямого спин-спинового взаимодействия. Так, в $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_3$ протон группы CH может находиться в двух состояниях — со спином $+1/2$ и $-1/2$. Поэтому линия протонов соседней группы CH_2 расщепляется на две. В группе CH_2 возможны три неэквивалентных состояния пары протонов: $+1/2, +1/2$; $+1/2, -1/2$ ($-1/2, +1/2$); $-1/2, -1/2$. Линия протона CH испытывает триплетное расщепление (рис. 5.25).

На рис. 5.26 показаны спектры ядерного магнитного резонанса ядер ^{13}C для карбоангидразы В крупного рогатого скота при различных значениях рН. Спектры отражают конформационные изменения и взаимодействия атомов.

Изучение химических сдвигов и сверхтонкой структуры дает количественную информацию о расположении и взаимодействиях атомных ядер. Пользуясь приборами высокого разрешения

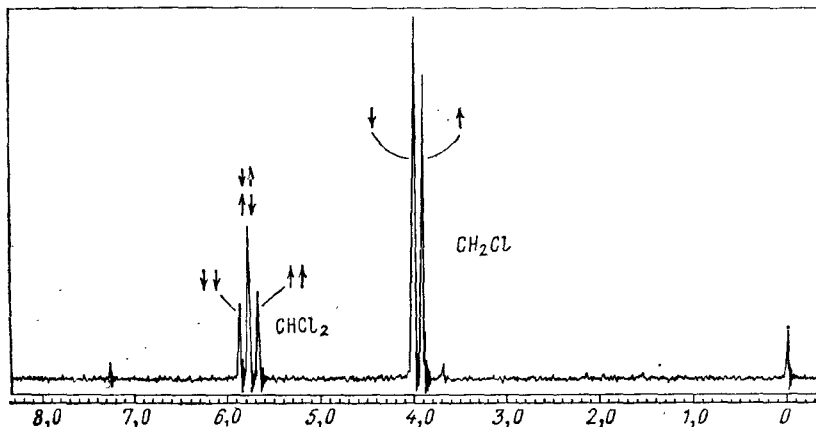


Рис. 5.25. Спектр протонного резонанса $\text{ClH}_2\text{C}-\text{CHCl}_2$. Сверхтонкая структура

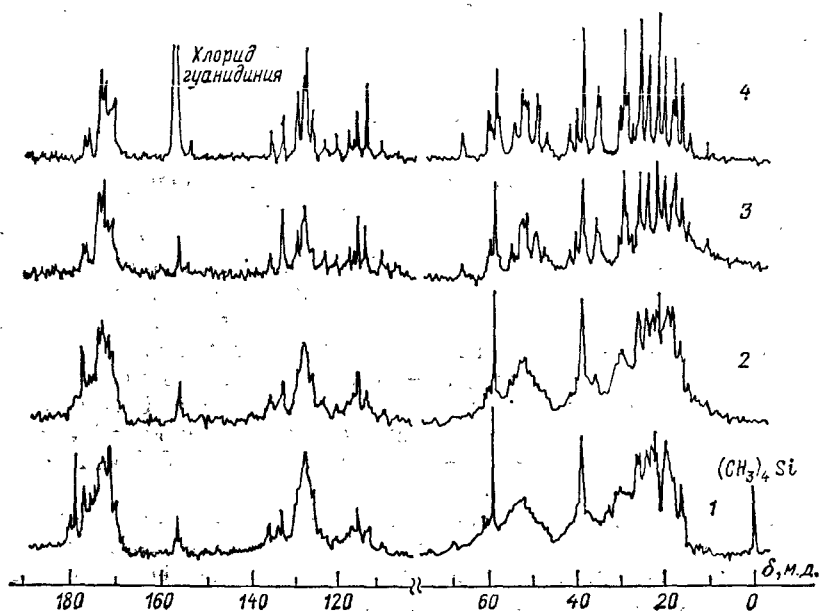


Рис. 5.26. Спектры ЯМР ядер ^{13}C карбоангидразы В рогатого скота: 1 — нативная форма рН 5,2; 2 — рН 3,8; 3 — рН 2,1; 4 — денатурированный белок (Лишма и соавторы).

(сильные сверхпроводниковые магниты, частоты порядка 300 МГц), удается разделить множество перекрывающихся линий протонного резонанса в белках. Здесь существенно и селективное дейтерирование белка. Методы ЯМР были эффективно применены к исследованиям конформационных свойств биополимеров, взаимодействий белков с фармакологическими веществами, взаимодействий фермент — лиганд, антиген — антитело и т. д. Возможности спектроскопии ЯМР в молекулярной биофизике неограниченны.

Методы ЯМР непрерывно совершенствуются. Не имея возможности здесь о них рассказать, укажем лишь, что в стационарном случае эффективным оказывается *двойной резонанс*, существенно упрощающий спектр. На образец подаются сразу два сигнала, различающиеся по частоте соответственно разности химических сдвигов или двух взаимодействующих ядер. Эта так называемая двумерная ЯМР-спектроскопия особенно информативна. Двойной резонанс может сопровождаться так называемым *эффектом Оверхаузера*. Как уже сказано, в настоящее время применяются и импульсные методы.

ЯМР на ^{31}P и ^{13}C эффективно применяется и к изучению живых клеток и тканей. С помощью методов Фурье-преобразования возможно отделить слабые сигналы от фона. При этом используются мощным радиочастотным импульсом, возбуждающим одновременно целый резонансный спектр, отдельные частоты которого отсортировываются с помощью компьютера. Так были изучены явления в живой мышце — изменения концентрации АТФ и креатин-фосфата при сокращении мышцы (см. § 12.3). Положение пика ^{31}P неорганического фосфата в сердечной мышце зависит от pH и поэтому смещается при кислородной недостаточности. Это открывает принципиальные возможности для применения ЯМР в кардиологии.

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 (ср. (5.58))

$$\hbar\omega_0 = g\mu_B H_0, \quad (5.66)$$

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

$$\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e c} = 0,93 \cdot 10^{-20} \text{ эрг/Гс}, \quad (5.67)$$

m_e — масса электрона. Для свободного электрона $g = 2,0023$. В поле $H_0 = 10^4$ Гс резонансная частота $\nu_e = 2,8 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$ ($\nu_p = 4,26 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$).

В подавляющем большинстве органических соединений спины электронов скомпенсированы и ЭПР отсутствует. ЭПР наблюдается у *свободных радикалов* и у молекул с нечетным числом

электронов. Здесь ЭПР дает важнейшую информацию об электронном строении системы.

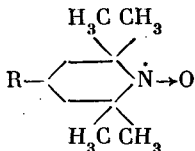
Линии ЭПР испытывают сверхтонкое расщепление вследствие локального поля, создаваемого магнитными моментами ядер. Так, ядро ^{14}N имеет $J=1$, и, следовательно, проекции ядерного спина на направление поля H_0 отвечают значениям магнитного квантового числа $m = 1, 0, -1$. Локальное поле, действующее на электрон свободного радикала, находящегося вблизи ядра ^{14}N , имеет три значения и пик ЭПР расщепляется в триплет.

Так называемая *тонкая структура* возникает в кристаллах вследствие *анизотропии g-фактора*. Вместо одной линии наблюдается группа линий, положения и интенсивности которых зависят от ориентации поля H_0 относительно кристаллических осей. В жидкости тонкая структура не наблюдается.

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Времена T_1 и T_2 зависят от подвижности частиц с ненулевыми спинами (T_2) и от подвижности окружающих молекул (T_1). Время спин-спиновой релаксации T_2 почти не зависит от температуры и определяется концентрацией парамагнитных частиц. Время T_1 возрастает при понижении температуры.

ЭПР эффективно применяется к решению многих проблем биологии и биофизики. Свободные радикалы образуются в ряде ферментативных окислительно-восстановительных процессов, при воздействии радиации и т. д. ЭПР дает весьма ценную информацию об этих процессах. ЭПР очень важен для изучения белков, содержащих в качестве кофакторов атомы металла с нескомпенсированным спином (гемопротейны, см. § 6.8 и т. д.).

Широко развиты исследования ЭПР биополимеров, основанные на методе *спиновой метки*. К биополимеру присоединяют устойчивый свободный радикал, содержащий непаренный электрон. Особенно удобны нитроксильные радикалы, как, например,



Спин-метка чувствительна к своему окружению, ее спектр ЭПР зависит от конформационного состояния биополимера. Подвижность метки связана с локальной подвижностью биополимера и подвижностью его молекулы как целого. С помощью спин-меток установлены важные особенности строения и динамики белковых молекул. Эти методы весьма эффективны и при изучении биологических мембран.

Зондирование молекулярной или надмолекулярной биологической системы с помощью спин-меток родственно применению люминесцентных меток (с. 147). Зачастую целесообразно сочетать оба метода.