

державших биополимеров. Можно использовать для структурных определений γ -излучающие изотопы в качестве меченых атомов и эффект Мёссбауэра как анализатор.

Наряду с абсорбционными γ -резонансными спектрами изучаются и эмиссионные. В этом случае источник содержит атомные ядра, материнские по отношению к мёссбауэровским. Эмиссионным методом изучено строение ряда порфириновых соединений кобальта — витамин В₁₂ и др. Чувствительность эмиссионного метода очень велика, с его помощью удается следить за быстропротекающими биологическими процессами.

Изучение белков, меченых ⁵⁷Fe, посредством этого метода показало, что подвижность их составных частей отлична от подвижности молекул в обычных кристаллах и жидкостях. О том же свидетельствуют исследования *рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения* (Гольданский). Конформационная подвижность в белках сохраняется и при низких температурах.

Перспективы применения γ -резонансной спектроскопии связаны, во-первых, с созданием «мёссбауэрографии», т. е. рентгенографии на излучении мёссбауэровских ядер. Во-вторых, началась разработка γ -лазеров, что в принципе обещает возможность голографии на молекулярном уровне.

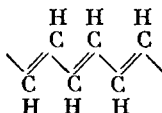
§ 5.4. Электронные спектры поглощения

В конечном счете все оптические и спектроскопические свойства молекул, дающие важнейшую информацию об их строении, определяются расстояниями между энергетическими уровнями молекулы и вероятностями перехода между ними. Эти уровни отвечают различным электронным, колебательным и вращательным состояниям молекул.

Электронные переходы полипептидных и полинуклеотидных цепей и, тем самым, белков и нуклеиновых кислот расположены в ультрафиолетовой области спектра. Полосы поглощения пептидной связи —СО—NH— лежат в области 185—240 нм, здесь же и в более коротковолновой области расположены полосы алифатических боковых цепей аминокислотных остатков. Аромагические остатки Трп, Фен, Тир имеют полосы поглощения в области 280 нм. Азотистые основания в нуклеиновых кислотах поглощают свет в области 260 нм. Таким образом, белки и нуклеиновые кислоты бесцветны, они не поглощают видимый свет.

Это вполне согласуется с диэлектрической природой биополимеров и делает мало правдоподобными утверждения об их электронной проводимости. Мы уже говорили о том, что для свободного перемещения электронов вдоль полимерной цепи она должна быть жесткой сопряженной системой, состоящей из чередующихся двойных и единичных связей или из сопряженных ароматических циклов. Гибкость цепи несовместима с ее электропроводностью. Короткие сопряженные цепи окрашены (каротин — красный, см. с. 49), а достаточно длинные поглощают весь

видимый свет, т. е. они черные или даже металлоподобные. Так, недавно был получен полимер ацетилена $\text{HC}\equiv\text{CH}$



обладающий металлическим блеском. Квантовомеханические расчеты действительно показывают, что для возбуждения электронов проводимости в белках необходима затрата очень большой энергии, не менее 3,5 эВ (т. е. 340 кДж/моль).

Некоторые кристаллические полупроводники бесцветны, но это не дает оснований считать биополимеры полупроводниками. По-видимому, малая электропроводность биополимеров объясняется присутствием трудно отделяемых ионов металлов и биологического значения не имеет.

Мономер белковой цепи подобен молекуле амида $\text{R}_1-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}_2$. В результате изучения электронных спектров простых амидов (формамид, метилацетамид, миристамид) установлены электронные переходы в амидной группе (рис. 5.8). Схема электронных переходов основана на квантовомеханических расчетах. На рис. 5.9 показаны волновые функции амидной группы,

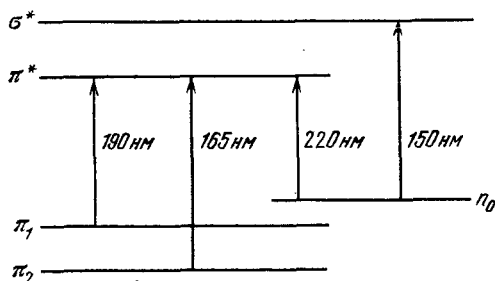


Рис. 5.8. Электронные переходы в амидной группе

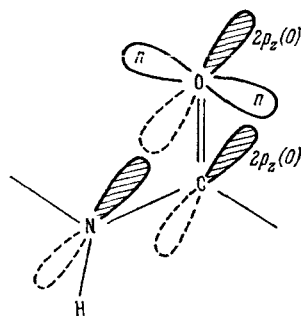


Рис. 5.9. Волновые функции амидной группы

соответствующие ее наиболее подвижным электронам. На рис. 5.8 уровень π_2 отвечает связывающей, уровень π^* — несвязывающей орбиталим $\text{C}=\text{O}$, уровень π_1 — несвязывающей орбитали азота, уровень n — состоянию неподеленной пары электронов атома кислорода. Переход $n\sigma^*$ — атомный электронный переход в кислороде.

Согласно закону Бугера — Ламберта — Бэра, интенсивность света, прошедшего через слой поглощающего вещества толщины l , равна

$$I = I_0 \exp(-\epsilon cl), \quad (5.3)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, c — концентрация поглощающего вещества (в моль/л), ϵ — молярный коэффициент

поглощения (в л/(моль · см)). Поглощение в данной полосе, отвечающей переходу с начального уровня 0 на возбужденный уровень j , выражается так называемой *силой осциллятора* f_{0j} , определяемой интенсивностью полосы поглощения:

$$f_{0j} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int \epsilon_{0j} d\tilde{\nu}. \quad (5.4)$$

Здесь $\tilde{\nu}$ — волновое число, т. е. частота световой волны, деленная на скорость света; интегрирование проводится по всей полосе поглощения. Теория дает

$$f_{0j} = \frac{2m_e}{3\hbar e^2} \omega_{0j} p_{0j}^2, \quad (5.5)$$

где e и m_e — заряд и масса электрона, ω_{0j} — круговая частота, соответствующая переходу $0 \rightarrow j$:

$$\omega_{0j} = (E_j - E_0)/\hbar, \quad (5.6)$$

E_0 , E_j — энергии основного и возбужденного состояний. Наконец, p_{0j} — матричный элемент дипольного момента, отвечающий переходу $0 \rightarrow j$, или *переходный дипольный момент*:

$$p_{0j} = \int \psi_0 \mathbf{r} \psi_j^* d\tau. \quad (5.7)$$

Величина p_{0j}^2 называется *дипольной силой* перехода. Сила осциллятора есть величина безразмерная, ее значения для разных полос меняются от очень малых величин до порядка 0,1—1,0. Формула (5.7) показывает, что p_{0j}^2 и сила осциллятора тем больше, чем сильнее перекрываются волновые функции начального и конечного состояний ψ_0 и ψ_j . Переход $n\pi^*$ в амидной группе имеет малую дипольную силу, так как электронные облака n - и π^* -состояний почти перпендикулярны друг другу и слабо перекрываются (рис. 5.9).

Теоретические расчеты дают следующие длины волн λ_{0j} , соответствующие переходам: $n\pi^*$ 234, $\pi_1\pi^*$ 160, $\pi_2\pi^*$ 135 нм. В спектре мериостамида наблюдаются полосы 220 ($n\pi^*$), 190 ($\pi_1\pi^*$) и 165 нм ($\pi_2\pi^*$). Переходный дипольный момент $\pi_1\pi^*$ лежит в плоскости HNSO под углом 9° к линии, соединяющей атомы O и N, а момент перехода $n\pi^*$ перпендикулярен к этой плоскости.

Спектры амидных групп в полимерной цепи изменяются вследствие электронного взаимодействия этих групп друг с другом. В частности, энергетические уровни для концевых групп цепи отличаются от уровней для внутренних групп. Наибольший интерес для биофизики представляют спектральные эффекты, возникающие вследствие экситонного резонансного взаимодействия, а именно *давидовское расщепление* и *гипохромизм*.

Исследуя оптические свойства молекулярных кристаллов, Давыдов показал, что в регулярной совокупности тождественных хромофорных (светопоглощающих) групп между их возбужденными энергетическими уровнями может происходить резонансная

передача энергии возбуждения. В регулярной системе может распространяться волна возбуждения — *экситон* (Френкель). В результате резонансного взаимодействия энергетические уровни расщепляются, образуя широкую зону. Правила отбора разрешают переходы при поглощении и испускании света не на любые,

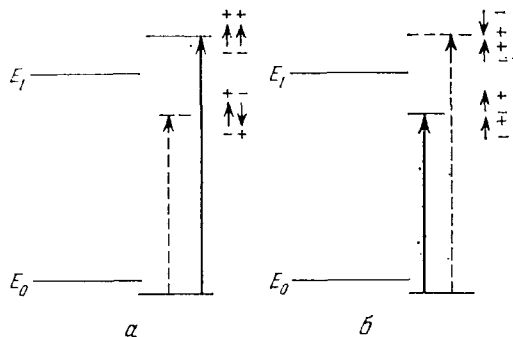


Рис. 5.10. Уровни энергии для системы параллельных (а) и коллинеарных (б) дипольных моментов перехода

но на строго определенные уровни зоны, причем поляризация полос поглощения определяется симметрией регулярной системы как целого.

Резонансное взаимодействие возможно уже в димере, и в нем оно приводит к расщеплению исходного уровня на два. На рис. 5.10 показана схема такого расщепления для случаев параллельного и коллинеарного расположения переходных диполей. Сплошные стрелки указывают разрешенные переходы, прерывистые — запрещенные. Моффит провел теоретический расчет экситонного расщепления для перехода лдл* 190 нм в α -спирали. Согласно теории Давыдова, эта полоса расщепляется на две, причем одна из полос поляризована вдоль оси спирали, а вторая — перпендикулярно к ней. Разность частот двух полос составляет 2700 см^{-1} (или $\sim 10 \text{ нм}$ в шкале длин волн).

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

На рис. 5.11 показаны экспериментальные результаты, полученные для полиглутаминовой кислоты (ПГК). При pH 4,9 полимер находится в форме α -спирали, при pH 8,0 — в форме клуб-

ка. Хорошо наблюдаются две полосы, возникшие в результате давидовского расщепления, и сильный гипохромизм.

Сила осциллятора длинноволновой полосы α -спирали понижена на 30%. В форме клубка длинноволновые полосы ПГК и полилизина характеризуются силой осциллятора 0,110, в α -спиральной форме — 0,075.

Гипохромный эффект был детально изучен и экспериментально, и теоретически. Исследована зависимость эффекта от окружающей среды, от pH и ионной силы.

Очевидно, что исчезновение гипохромизма при переходе спираль — клубок может дать количественную меру α -спиральности белка. Ввиду трудностей, с которыми сопряжены спектрофотометрические измерения в далекой ультрафиолетовой области вблизи 200 нм, этот метод малоупотребителен при изучении белков.

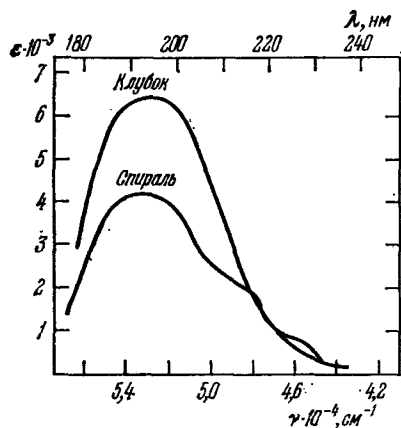


Рис. 5.11. Спектр поглощения ПГК

Напротив, он прост и эффективен для нуклеиновых кислот, длинноволновые полосы которых лежат вблизи 260 нм.

§ 5.5. Люминесценция

Подобно спектрам поглощения, спектры люминесценции (флуоресценции) сложных молекул размыты и лишены тонких деталей. Информативными оказываются не столько длины волн максимумов полос, сколько интенсивность, поляризация и длительность свечения.

Допустим, что в момент $t = 0$ имеется $n(0)$ возбужденных молекул. Если вероятность перехода за 1 с из возбужденного состояния в невозбужденное с излучением кванта света есть f , а вероятность безызлучательного перехода, в котором энергия возбуждения превращается в тепло, есть g , то

$$dn = -(f + g)n dt \quad (5.8)$$

и

$$n(t) = n(0) \exp [-(f + g)t]. \quad (5.9)$$

Средняя длительность возбужденного состояния

$$\tau = \int_{t=0}^{\infty} t dn / \int_{t=0}^{\infty} dn = \frac{1}{f + g}. \quad (5.10)$$