

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 малоупотреб-

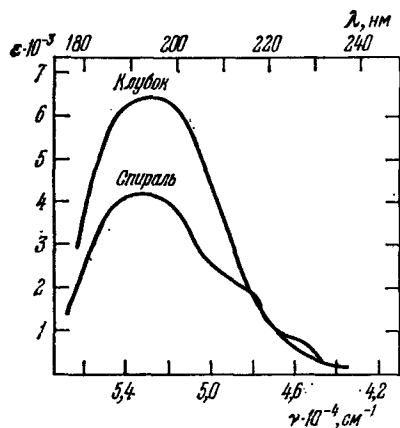


Рис. 5.11. Спектр поглощения ПГК

бителен при изучении белков. 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

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

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

Квантовый выход выражается долей переходов с излучением

$$\gamma = f / (f + g). \quad (5.11)$$

В растворе равновесное распределение молекул по их запасам колебательной энергии не зависит от избытка этой энергии, полученной при возбуждении и, следовательно, от длины волны $\lambda_{\text{возб}}$ возбуждающего света. Значит, τ и γ также не зависят от $\lambda_{\text{возб}}$ (*закон Вавилова*).

Флуоресцентное излучение сложных молекул (в частности красителей) поляризовано даже при естественном падающем свете. Теория поляризации люминесценции разработана Вавиловым и Феофиловым. Возбуждающий свет поглощается молекулами, определенным образом ориентированными по отношению к электрическому вектору световой волны. После поглощения энергия излучается в результате другого электронного перехода, которому отвечает, вообще говоря, иная поляризация в молекуле, т. е. иное направление переходного диполя. Если время жизни возбужденного состояния, т. е. время передачи энергии, малó по сравнению с временем переориентации молекулы, то люминесценция поляризована. *Степень поляризации* выражается величиной

$$P = \frac{I_z - I_x}{I_z + I_x}, \quad (5.12)$$

где I_z и I_x — интенсивности излучения с составляющими электрического вектора вдоль осей z и x при направлении падающего света вдоль оси y (рис. 5.12). Расчет показывает, что предельное значение P при естественном падающем свете для неподвижных произвольно ориентированных молекул равно $1/3$. Вращательное движение молекул или атомных групп деполяризует свечение. Теория дает *формулу Левшина — Перрена*

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + \frac{1}{3} \right) \frac{\kappa T}{V \eta} \tau. \quad (5.13)$$

Здесь P — наблюдаемая степень поляризации; P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполяризации, т. е. при $T \rightarrow 0$, или при вязкости среды $\eta \rightarrow \infty$; V — объем молекулы, τ — время жизни возбужденного состояния. Степень поляризации убывает с увеличением подвижности излучающей молекулы и может служить мерой подвижности.

Безызлучательные переходы, благодаря которым квантовый выход γ меньше 1, сводятся к превращению световой энергии в тепло. Молекула, возбужденная фотоном $\hbar\omega_a$ до некоторого синглетного уровня E_{s1} , может с вероятностью f излучить квант $\hbar\omega_f$; в ней может произойти внутренняя конверсия энергии в колебания с сопутствующей деградацией в тепло; молекула может пе-

рейти без излучения на метастабильный триплетный уровень E_{T_0} , растрачивая часть энергии возбуждения. В дальнейшем энергия E_{T_0} может выделиться в виде фотона фосфоресценции $\hbar\omega_{ph}$ или деградировать в тепло. Все эти процессы представлены на рис. 5.13.

Другая важная причина уменьшения квантового выхода — тушение люминесценции. Оно может вызываться посторонними веществами или миграцией энергии возбуждения от молекулы к

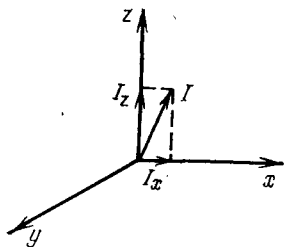


Рис. 5.12. Схема, поясняющая поляризацию люминесценции

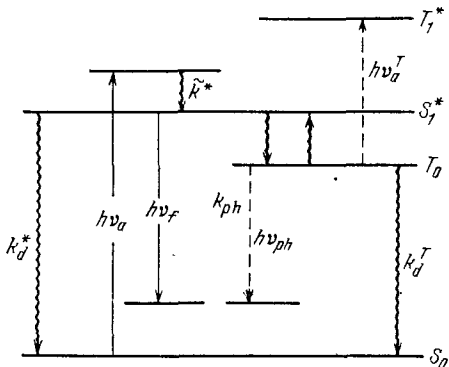


Рис. 5.13. Схема энергетических переходов при люминесценции

молекуле (концентрационное тушение). Речь идет не об излучении с последующей реабсорбцией света, но о прямой передаче энергии возбуждения вследствие резонансного взаимодействия молекул, которое растет с уменьшением расстояний между молекулами, т. е. с увеличением концентрации. Условием такого взаимодействия является сильное перекрыwanie полос поглощения и испускания молекул.

Различие между резонансным и экситонным (с. 143) взаимодействиями количественное. Резонансная миграция энергии происходит, если энергия взаимодействия велика, т. е. сильно превышает ширину электронно-колебательной зоны. В этом случае передача энергии происходит быстро и можно не учитывать влияния колебаний. В отличие от экситонных спектров, возникающих при слабом взаимодействии (энергия которого значительно меньше ширины зоны), в спектрах резонансно взаимодействующих молекул не наблюдается колебательной структуры.

Миграция энергии вызывает деполаризацию люминесценции. Молекула, поглощающая квант, как-то ориентирована в пространстве. Если бы та же молекула излучала свет, то он обладал бы некоторым значением степени поляризации P . Однако за время τ , протекающее между поглощением и излучением, возможны многократные акты передачи энергии другим молекулам с несколько отличными ориентациями. По прошествии определенного времени все возбужденные молекулы теряют первоначальную ориентацию и излучение оказывается деполаризованным.

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.

Изучение особенностей люминесценции, связанных с миграцией энергии, важно для биофизики. Передача энергии с одного

Т а б л и ц а 5.1. Спектральные свойства ароматических аминокислот

Аминокислота	λ_{max} , нм (поглощение)	ϵ , моль ⁻¹ ·л ⁻¹	λ_{max} , нм (флуоресценция)	γ
Фенилаланин	257	200	282	0,04
Тирозин	257	1300	303—304	0,21
Триптофан	280	5600	353	0,21

люминесцирующего участка биополимера на другой позволяет оценить их относительное расположение. Изучение поляризованной люминесценции дает информацию о конформационной структуре и ее динамике — о подвижности макромолекулы и отдельных ее групп. Люминофорами часто являются циклические π -электронные системы. Так, светятся ароматические аминокислотные остатки в белках. Спектральные свойства соответствующих аминокислот указаны в табл. 5.1.

Флуоресценция Фен практически не видна. Свечение Тир и Три существенно зависит от pH и полярности среды, от протонизации соседних групп. В нативных белках γ для Тир значительно меньше 0,21; напротив, γ для Три может увеличиваться до 0,32. Денатурация мочевиной делает равными значения γ Тир и Три — их квантовые выходы конформационно чувствительны. Дело в том, что тушение люминесценции Тир и Три зависит от окружения, в частности, от его гидрофобности. Свечение остатков, переходящих при конформационных изменениях из ядра глобулы на ее поверхность, легче тушится и посторонними тушителями. Изучение люминесценции белков (ароматических остатков) дало ценные сведения об их конформационных свойствах и взаимодействиях с другими молекулами и ионами.

Не менее ценные результаты дает применение люминесцентных меток. Конформационная структура и динамика комплексов нуклеиновых кислот с люминофорами — с акридиновыми красителями — успешно изучаются с помощью поляризованной люминесценции.

С люминесценцией прямо или косвенно связаны три направления биофизических исследований, о которых необходимо сделать критические замечания.

1. Представления о миграции энергии, возникшие в результате изучения люминесценции, легли в основу попыток объяснения ряда биологических процессов. Многие из этих процессов протекают быстро, по принципу «все или ничего». Истинное объясне-

ние таких явлений должно, по-видимому, исходить из их кооперативной природы. Применительно ко многим задачам такое объяснение получено. Однако в литературе фигурируют соображения о миграции энергии в биополимере или в окружающей его якобы «структурированной» воде. На этой основе пытались, например, истолковать мышечное сокращение. «Миграционные» представления в «темновой» биологии не имеют оснований.

2. В 1923 г. Гурвич сообщил об открытии *митогенетических лучей*, испускаемых клетками при их митотическом делении и, в свою очередь, стимулирующих митозы. Продолжавшиеся в течение ряда лет попытки обнаружить это излучение точными физическими методами не привели к успеху. Существование митогенетических лучей не подтвердилось, их изучение поэтому давно оставлено. Равным образом ложны сообщения об ультрафиолетовых излучениях при гибели клеток и при иных биологических процессах.

3. Клетки и ткани растений и животных обладают зачастую на воздухе слабым свечением, которому приписывалось биологическое значение. Однако это свечение — *хемиллюминесценция*, определяемая, в основном, окислением липидов. Многие органические соединения светятся при окислении. Биологического значения это свечение, по-видимому, не имеет. Оно может использоваться как индикатор окислительных процессов.

§ 5.6. Естественная оптическая активность

Как уже говорилось, биополимеры хиральны и, следовательно, обладают естественной оптической активностью, т. е. вращают плоскость поляризации света, и *круговым дихроизмом* (см. далее).

Оптическая активность — способность хиральной среды поворачивать плоскость поляризации проходящего света — была от-

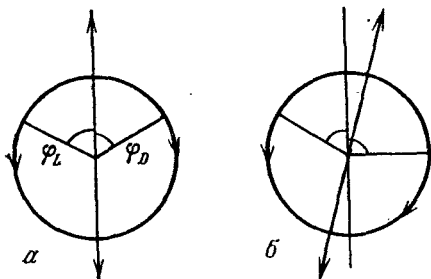


Рис. 5.14. Разложение плоскополяризованной волны на волны, поляризованные по кругу вправо и влево (а), и поворот плоскости поляризации в результате кругового двулучепреломления (б)

крыта Араго в 1811 г. Как показал Френель (1820 г.), оптическая активность есть результат *кругового двулучепреломления*, т. е. разных скоростей распространения в среде света, поляризованного по кругу вправо и влево. В правой волне вектор напря-