

лось мощное вынужденное ИК излучение. Например, при перестройке  $\omega_L$  вблизи резонанса  $3^2P_{3/2}-4^2D_{5/2}$  были зарегистрированы ИК линии с длинами волн: 2,338 мкм ( $4^2P_{3/2}-4^2D_{5/2}$ ), 2,335 мкм ( $4^2P_{1/2}-4^2D_{3/2}$ ), 2,209 мкм ( $4^2S_{1/2}-4^2P_{1/2}$ ), 2,206 мкм ( $4^2S_{1/2}-4^2P_{3/2}$ ), 1,138 мкм ( $3^2P_{1/2}-4^2S_{1/2}$ ), 1,140 мкм ( $3^2P_{3/2}-4^2S_{1/2}$ ), 0,819 мкм ( $3^2P_{3/2}-3^2D_{3/2}$ )\*. Максимум их энергии и минимум порога возбуждения, так же как и в экспериментах с Rb, наблюдались при точном резонансе. В этих условиях порог возбуждения наиболее мощной ИК линии 2,338 мкм составлял не более 1 кВт, а ее энергия достигала значений, соответствующих 30%-ному преобразованию по числу квантов. Аналогичная картина имела место и при перестройке частоты накачки  $\omega_L$  в окрестностях других верхних переходов атома Na.

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют сделать вывод о том, что в условиях изолированных резонансов с переходами между верхними уровнями атомов щелочных металлов имеет место эффективная генерация вынужденного ИК излучения.

В заключение отметим, что обнаруженный в настоящей работе эффект возбуждения вынужденного ИК излучения в условиях изолированных верхних резонансов может быть с успехом использован для преобразования видимого лазерного излучения в далекий ИК диапазон.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Королев Ф. А., Знаменский Н. В., Одинцов В. И. Письма в ЖЭТФ, 1978, 28, с. 453. [2] Дорофеев С. Н. и др. Журн. прикл. спектр., 1984, 40, с. 686. [3] Sorokin P. P., Lanford J. R. J. Chem. Phys., 1971, 54, p. 2184.

Поступила в редакцию  
22.02.85

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1986, т. 27, № 2

УДК 577.32

## АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ КР-СПЕКТРОВ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

В. Г. Пирогов, В. А. Соколова, М. В. Федоров, Ю. И. Хургин,  
Н. Г. Церевитникова, А. Ю. Чикишев

(НИИЯФ)

Среди множества спектроскопических методов исследования биомолекул важное место занимает спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС). Прогресс в этой области экспериментальной физики обусловлен широким распространением лазерных источников света, специализированных спектрометров, малошумящих чувствительных детекторов, а также доступностью миниЭВМ. Спектроскопия КРС обладает рядом принципиальных преимуществ перед другими методиками, позволяя при использовании стеклянной оптики получать подробные панорамные колебательные спектры молекул, работать в низкочастотной области спектра и, что особенно важно, легко изучать водные растворы и благодаря высокой чувствительности современных КР-спектрометров работать с микроколичествами исследуемых веществ (до мкг) [1, 2].

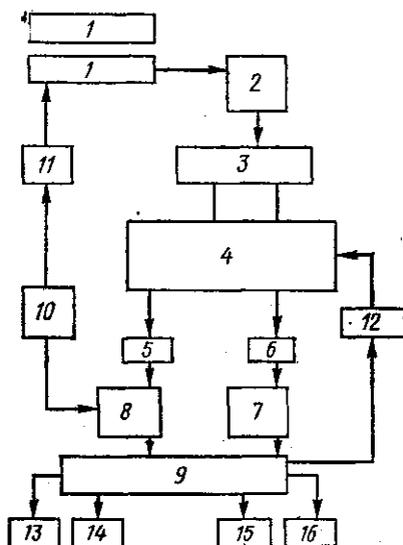
При получении КР-спектров белков возникают специфические экспериментальные трудности, связанные главным образом с крайне низким уровнем сигнала при КРС и с наличием, как правило, сильной фоновой люминесценции. Из-за низкого отношения сигнал/шум для слабых КР-сигналов не всегда удается получить информацию о функционально важных участках биологически активных молекул. В связи с этим необходимо создание приборов и методик, способных реализовать широкие потенциальные возможности спектроскопии КРС для исследования биополимеров.

Нами была создана автоматизированная установка для регистрации КР-спектров, технические параметры которой позволили работать со столь сложными объектами, как биологические. Принципиальная схема установки изображена на рис. 1. В качестве источников излучения использовались импульсный лазер на АИГ:  $Nd^{3+}$  ЛТИ-701 (532 нм) и непрерывный аргоновый лазер ЛГ-106М (488 и 514,5 нм) с дисперсионным резонатором. Кюветное отделение строилось по схеме 180°. Для детектирования излучения применялся ФЭУ-136 либо видикон. Импульсы работающего в режиме счета

\* Линии ИК переходов  $3^2D_{5/2}-4^2P_{3/2}$  (9,09 мкм) и  $3^2D_{3/2}-4^2P_{3/2}$  (9,14 мкм) не могли быть обнаружены вследствие их поглощения сапфировыми окнами кюветы.

фотонов ФЭУ поступали на предусилитель и собранный на той же плате дискриминатор, дающий возможность реализовать указанный режим работы. Для увеличения отношения сигнал/шум нами было применено стробирование дискриминатора ФЭУ импульсом, синхронизованным с моментом открытия акустооптического затвора ЛТИ-701 (т. е. регистрация велась только в момент лазерной вспышки). При этом отношение сигнал/шум было увеличено в среднем на два порядка. Для дальнейшего увеличения чувствительности установки нами использовался мультискалярный режим работы анализатора, при котором за счет многократных ( $N$ ) накоплений в  $\sqrt{N}$  раз увеличивалось отношение сигнал/шум. Наличие микропроцессора в составе используемого анализатора позволило не только автоматизировать эксперимент, но и производить некоторую обработку спектральной информации, в том числе и в режиме реального времени. Так, большой положительный эффект дало введение в программу обслуживания работы мультискалярного блока подпрограммы сглаживания с целью

Рис. 1. Схема установки: 1 — лазеры; 2 — кюветное отделение; 3 — двойной предмонохроматор (решетка 600 штрих/мм, база 0,25 м, подавление  $10^{-9}$ , окно 6,0—8,0 нм); 4 — монохроматор (решетка 1200 штрих/мм, база 1 м, дисперсия 0,83 нм/мм); 5 — ФЭУ; 6 — видикон; 7 — блок управления видиконом; 8 — предусилитель ФЭУ; 9 — многоканальный анализатор *Nokia LP-4900*; 10 — генератор Г5-54; 11 — блок питания лазера; 12 — блок питания шагового двигателя; 13 — цифровой магнитофон; 14 — графопостроитель; 15 — телетайп; 16 — перфоратор и считыватель с перфоленты



ослабления влияния статистических флуктуаций мощности лазера и усиления ФЭУ. При этом время накопления спектра достаточной контрастности уменьшается почти на порядок.

Регистрация спектров возможна и с помощью видикона (параллельный режим регистрации). Разработан ряд программ для вычитания темновых шумов в режиме реального времени, а также для корректировки формы спектра с учетом канальной чувствительности видикона.

В качестве первого объекта исследования использовался препарат белка — протеолитического фермента  $\alpha$ -химотрипсина ( $\alpha$ -ХТ). Конечная цель проведенной серии экспериментов состояла в изучении влияния гидратации на вторичную структуру  $\alpha$ -ХТ. Известно, что сильно высушенные препараты ферментов лишены каталитической активности, которая проявляется и в твердой фазе при условии, если степень гидратации белка превышает некоторое пороговое значение [3]. Хотя это явление — давно известный экспериментальный факт, молекулярный механизм включения ферментативной активности  $\alpha$ -ХТ не установлен. Одна из возможных гипотез — изменение конформации белковых молекул при постепенном насыщении их поверхности водой из газовой фазы. Однако подобные предположения остаются до сих пор экспериментально не подтвержденными.

Нами впервые было прослежено влияние степени гидратации на КР-спектры белка  $\alpha$ -ХТ. Были получены спектры линии амид-I ( $1620$ — $1670$  см $^{-1}$ )  $\alpha$ -ХТ в водном растворе и в порошкообразном состоянии с различной влажностью, которую устанавливали в атмосфере паров воды с относительной влажностью ( $p/p_s$ ) 0,02 и 0,95. Исследуемые препараты помещали в герметизированную кювету с кварцевым окном; поддержание в ней постоянной влажности осуществляли с помощью твердой щелочи NaOH ( $p/p_s=0,02$ ) или соответствующего водного раствора  $H_2SO_4$  ( $p/p_s=0,95$ ).

Полученные спектры представлены на рис. 2. Математическая обработка [4] спектра водного раствора  $\alpha$ -ХТ ( $\Delta\nu_{\max}=1675$  см $^{-1}$ ) показала, что преобладающим типом вторичной структуры, как это и следовало ожидать на основании данных рентгеноструктурного анализа [5], является  $\beta$ -структура. Полученные форма и положение полосы амид-I в КР-спектре водного раствора  $\alpha$ -ХТ соответствуют имеющимся литературным данным [4].

Интенсивная дегидратация белка не приводит к существенным изменениям формы и положения полосы амид-I в КР-спектрах порошкообразных препаратов  $\alpha$ -ХТ

(см. рис. 2, а, б). На данном этапе возможно лишь качественное сопоставление спектров  $\alpha$ -ХТ, полученных в разных условиях. Первое, что следует отметить, — это увеличение интенсивности линии амид-I при дегидратации  $\alpha$ -ХТ. Положение максимума амидной линии позволяет утверждать, что преобладающей структурной формой в твердых препаратах  $\alpha$ -ХТ ( $p/p_s=0,95$ ) также является  $\beta$ -структура (см. рис. 2, а). При глубокой осушке ( $p/p_s=0,02$ ) спектр качественно не изменялся (см. рис. 2, б), хотя некоторые эффекты дегидратации имеют место. При этом наиболее существенным является то, что даже при столь различных степенях гидратации  $\alpha$ -ХТ положение  $\Delta\nu_{\text{макс}}$  линии амид-I сохраняется, однако обращает на себя внимание исчезновение небольшого спутанного пика на частоте  $1740\text{ см}^{-1}$  (см. рис. 2). Далее, при  $p/p_s=0,02$  заметно увеличение крутизны высокочастотного склона амидной полосы, что

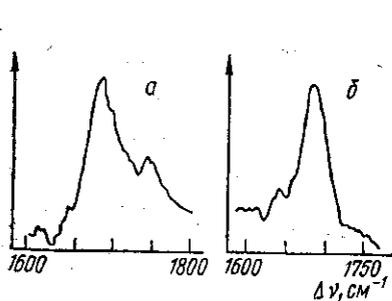


Рис. 2. Спектры линии амид-I  $\alpha$ -химотрипсина (таблетка) при  $p/p_s=0,95$  (а) и  $0,02$  (б)

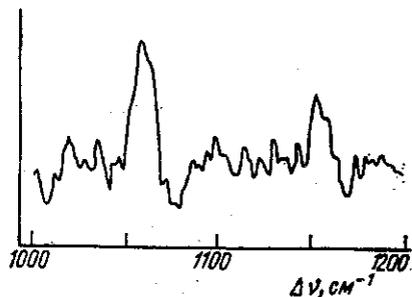


Рис. 3. Панорамный спектр водного раствора  $\alpha$ -химотрипсина (200 мг/мл, рН=3)

может указывать на переход части пептидных групп из  $\alpha$ -спиральной в  $\beta$ -структурную конфигурацию при сильной дегидратации. Обнаруженные при высушивании спектральные изменения сравнительно невелики. Судя по ним, при дегидратации фермент в основном сохраняет тип пространственной организации своих пептидных цепей, характерный для  $\alpha$ -ХТ в водном растворе.

Нами также были получены КР-спектры водного раствора  $\alpha$ -ХТ в области  $1000\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ . В этом диапазоне лежат частоты колебаний ряда атомных групп белка (ароматических и др.), в том числе групп, входящих в состав активного центра фермента [6], и изменение спектров в зависимости от изменения внешних условий (гидратации, рН) может давать информацию о процессах, происходящих в активном центре. В качестве примера на рис. 3 изображены полученные нами панорамные КР-спектры водного раствора  $\alpha$ -ХТ (рН=3,0) в диапазоне  $940\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ . Впервые на белке  $\alpha$ -ХТ оказалось возможным наблюдать за деформационными колебаниями связи N—H ( $1164\text{ см}^{-1}$ ) имидазольной группы, входящей в состав активного центра  $\alpha$ -ХТ, которые ранее в КР-спектрах регистрировать не удавалось. Полученные данные согласуются со спектрами модельных имидазолсодержащих систем, полученных методом АСКР [7]. Результаты настоящей работы показывают возможность использования разработанной схемы измерений для решения широкого круга задач, связанных с изучением химических и физических механизмов каталитической активности белков-ферментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Грассели Д., Снейвилл М., Балкин Б. Применение спектроскопии КР в химии. М.: Наука, 1984.
- [2] Волькенштейн М. В. Биофизика. М.: Наука, 1981.
- [3] Хургин Ю. И. Журн. Всесоюз. хим. о-ва, 1976, № 6, с. 684.
- [4] Williams R. W., Dunker A. K. J. Mol. Biol., 1972, 68, p. 167.
- [5] Birktoft J. J., Blow D. M. Ibid., 1981, 152, p. 783.
- [6] Salama D. J., Spigo K. M. J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, p. 275.
- [7] Бункин А. Ф., Хургин Ю. И., Чикишев А. Ю. Журн. прикл. спектр., 1984, 40, с. 480.

Поступила в редакцию  
05.05.85