

волновой, а при выполнении дополнительного частного условия $n^2 = n_1 n_2$ — меньше четвертьволновой;

4) варьирование соотношением толщин слоев и их числа при заданных n_1 , n_2 , n и λ можно реализовать тонкослойные фильтры практически с любыми наперед заданными значениями толщин слоев.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Козарь А. В. // Тез. докл. Всесоюз. науч.-техн. конф. «Проектирование и применение радиоэлектронных устройств на диэлектрических волноводах и резонаторах». Саратов, 27—29 сент. 1983 г. С. 136. [2] Козарь А. В. // Тез. докл. Всесоюз. науч. семинара «Методы синтеза и применение многослойных интерференционных систем». Москва, 18—19 апр. 1984 г. С. 118. [3] Козарь А. В. // Опт. и спектр. 1985. 59, № 5. С. 1132. [4] Козарь А. В. // Тез. докл. Всесоюз. науч. семинара «Методы синтеза и применение многослойных интерференционных систем». Москва, 18—19 апр. 1984 г. С. 116.

Поступила в редакцию
22.01.88

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1989. Т. 30, № 3

УДК 535.37

НАНОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА МЕЛИТТИНА: ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

П. Гершман (ЧССР), А. С. Ладохин, Н. В. Лебедева, А. Ю. Чикишев

(Межфакультетская проблемная лаборатория им. А. Н. Белозерского)

Исследованы спектральные зависимости кинетики затухания собственной триптофановой флуоресценции водных растворов белка мелиттина при различных температурах. Для тетрамерной формы белка определена температурная зависимость времени внутримолекулярной релаксации окружения триптофанила.

Введение. Известно, что флуоресцентная спектроскопия является одним из наиболее распространенных методов изучения структуры биологических объектов [1, 2]. Применение лазерной пикосекундной техники позволяет исследовать подвижность окружения как искусственных, так и естественных хромофоров [3, 4].

В тех случаях, когда при поглощении кванта света происходит существенное изменение дипольного момента молекулы-хромофора, непосредственно вслед за этим начинается релаксация дипольного окружения этой молекулы к новому равновесному состоянию. Если время жизни флуоресценции сравнимо с временем релаксации, становится возможной регистрация этого процесса. Во флуоресцентной спектроскопии проявлениями релаксационных процессов является смещение со временем после возбуждения «мгновенных» спектров флуоресценции в длинноволновую сторону и возрастание времени жизни флуоресценции на длинноволновом краю полосы флуоресценции [1].

Целью настоящей работы является анализ спектральных зависимостей кинетики затухания собственной триптофановой флуоресценции водных растворов белка мелиттина при различных температурах и определение времени релаксации окружения хромофора и его зависимости от температуры.

Объект исследования. Молекула мелиттина — основного компонента пчелиного яда — состоит из 26 аминокислотных остатков. Биологическое действие белка основано на его способности встраиваться

в липидные мембраны, вызывая в них существенные изменения, характер которых зависит от соотношения белок — липид: «разжижение» бислоя, образование ионного канала, лизис мембраны [5]. Мелиттин удобен для спектроскопических исследований, так как имеет единственный остаток ароматической аминокислоты — триптофан (*Trp-19*), являющийся хорошо изученным естественным хромофором.

В растворе в зависимости от условий среды мелиттин может существовать в мономерной и тетрамерной формах; структура этих форм хорошо изучена. При низкой концентрации, низкой ионной силе раствора и нейтральных значениях pH молекула белка является мономером и представляет собой статистический клубок [6]. Спектр флуоресценции *Trp-19* в этом случае имеет максимум на длине волны 352 нм [7, 8], как и спектр триптофана в водном растворе. При высокой ионной силе раствора мелиттин самоагрегирует в тетрамер. В этом случае его молекула представляет собой высокоупорядоченную пространственную структуру с высоким (65—70%) содержанием α -спиральных участков [7], причем отдельные субъединицы в тетрамере спектроскопически эквивалентны [9]. Спектр флуоресценции в тетрамере смещен в более коротковолновую область с максимумом на 333 нм [7, 8]. Как было показано ранее [4], для тетрамерной формы белка характерные времена процессов релаксации дипольного окружения молекулы хромофора лежат в наносекундном диапазоне. Для мономерной формы эти времена существенно меньше 1 нс.

В наших измерениях использовались растворы мелиттина с концентрацией $\sim 10^{-5}$ М в 50 мкМ трис-буфере (pH 7,4). Тетрамерную форму получали в таком же растворе при добавлении 2 М NaCl. Мелиттин выделяли из пчелиного яда при помощи методов гельфильтрации и ионообменной хроматографии [8].

Техника эксперимента. Эксперименты проводились на оригинальном субнаносекундном лазерном спектрофлуориметре (подробное описание приведено в [10]). В качестве источника возбуждения использовалось линейно поляризованное излучение второй гармоники ($\lambda = 290$ нм) лазера на красителе (родамин 6Ж), синхронно накачиваемого второй гармоникой излучения лазера на АИГ: Nd с акустооптической модулирующей добротности и синхронизацией мод. Длительность возбуждающих импульсов $t \leq 100$ пс, частота повторения ~ 3 кГц. При освещении термостатируемой кюветы и сборе излучения флуоресценции использовалась геометрия «на отражение». Перед фокусировкой на входную щель монохроматора МДР-6 (спектральное разрешение в наших экспериментах ~ 2 нм) излучение флуоресценции пропусклось через поляризатор, установленный под магическим углом. В системе регистрации применялась техника счета одиночных фотонов с временным разрешением. Применение ФЭУ на микроканальных пластинах с малой дисперсией времени пролета фотоэлектронов позволило получить аппаратную функцию с шириной на полувысоте ~ 250 пс. Запись и обработка данных были автоматизированы на базе микроЭВМ «Электроника-80».

Температурная стабилизация образцов осуществлялась с точностью $\pm 2^\circ\text{C}$. В каждом опыте (т. е. для каждого значения температуры) измерялись кинетики затухания интенсивности флуоресценции на девяти длинах волн в диапазоне 310—390 нм. Кинетики аппроксимировались по методу «обратной свертки» с учетом конечной ширины аппаратной функции в двухэкспоненциальном приближении:

$$I(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2).$$

Результатом аппроксимации являлись значения τ_1 , τ_2 и a_1/a_2 . По этим данным определялось среднее время жизни флуоресценции:

$$\langle \tau \rangle = [(a_1/a_2)\tau_1^2 + \tau_2^2] / [(a_1/a_2)\tau_1 + \tau_2]^{-1}.$$

Стационарные спектры флуоресценции измерялись на спектрофлуориметре *Hitachi MPF-4*.

Параметры кинетики затухания флуоресценции мелиттина при различных температурах

Параметры	$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$								
	310	315	330	340	350	360	370	380	390
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Мономер									
$t = 15^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	3,6	3,8	3,8	3,9	3,8	3,6	4,3	4,0	3,4
$\tau_2, \text{нс}$	0,6	0,7	0,7	1,0	0,8	0,8	1,2	1,1	0,5
a_1/a_2	0,5	0,6	0,8	1,0	1,1	1,4	0,7	1,0	1,0
$t = 35^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	3,0	2,8	2,7	2,6	2,5	2,7	2,8	2,8	2,9
$\tau_2, \text{нс}$	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,7	0,4	0,4
a_1/a_2	0,4	0,5	0,7	0,7	1,0	1,0	1,0	0,8	0,7
Тетрамер									
$t = 5^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	3,0	3,3	3,9	4,2	4,4	4,6	4,4	4,7	4,5
$\tau_2, \text{нс}$	0,6	0,7	1,0	1,3	1,2	1,5	1,0	1,2	1,2
a_1/a_2 ($\tau_F = 3,5 \text{ нс}$)	0,9	1,0	1,0	1,2	1,2	1,4	1,7	1,5	2,3
$t = 15^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	3,0	3,3	3,3	3,6	3,6	3,8	4,2	4,4	4,2
$\tau_2, \text{нс}$	0,8	1,0	0,8	1,0	0,9	1,1	1,2	1,1	1,0
a_1/a_2 ($\tau_F = 3,0 \text{ нс}$)	0,7	0,7	1,0	1,0	1,4	1,2	1,1	1,0	1,4
$t = 25^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	2,7	2,8	2,9	3,3	3,4	3,8	3,4	3,8	3,9
$\tau_2, \text{нс}$	0,7	0,8	0,6	0,8	0,9	1,2	0,9	1,1	1,2
a_1/a_2 ($\tau_F = 2,6 \text{ нс}$)	0,6	0,6	0,8	0,8	0,9	0,8	1,3	1,0	1,0
$t = 45^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	2,0	2,0	2,2	2,2	2,5	2,8	2,9	2,8	2,9
$\tau_2, \text{нс}$	0,7	0,6	0,6	0,6	0,8	0,9	1,0	0,7	0,7
a_1/a_2 ($\tau_F = 1,9 \text{ нс}$)	0,7	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7
$t = 55^\circ\text{C}$									
$\tau_1, \text{нс}$	2,0	2,0	2,1	3,0	3,0	2,8	2,7	2,7	2,7
$\tau_2, \text{нс}$	0,6	0,6	0,5	1,1	0,9	0,9	0,8	0,9	0,6
a_1/a_2 ($\tau_F = 1,8 \text{ нс}$)	0,4	0,5	0,6	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8

Результаты и обсуждение. Значения τ_1 , τ_2 , a_1/a_2 для мономерной и тетрамерной форм мелиттина при различных температурах и для разных длин волн флуоресценции приведены в таблице. На рис. 1 представлены соответствующие зависимости среднего времени жизни

флуоресценции от длины волны. Полученные нами данные коррелируют с результатами Беддарда и Трана [11], измерявших кинетику затухания флуоресценции мономерного и тетрамерного мелиттина (при комнатной температуре) интегрально в полосе флуоресценции триптофана, а также Георгиу с соавт. [12], наблюдавших изменение времени жизни флуоресценции по спектру для тетрамерного мелиттина при комнатной температуре.

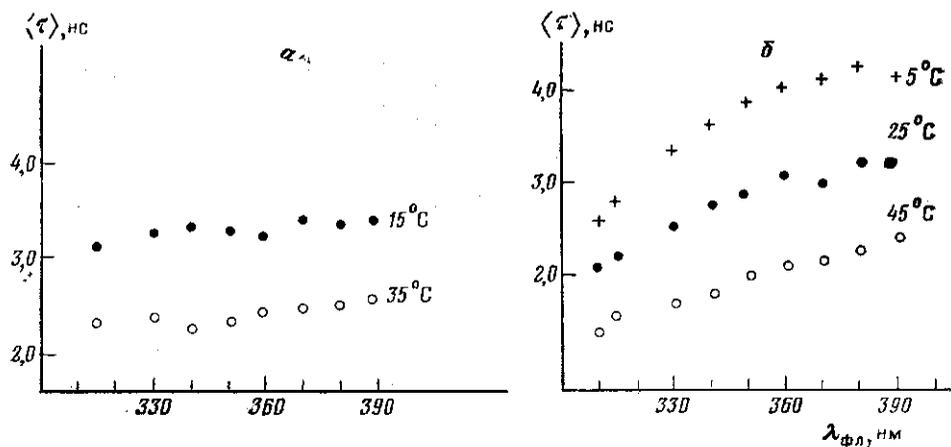


Рис. 1. Зависимость среднего времени жизни флуоресценции для мономерного (а) и тетрамерного (б) мелиттина от длины волны флуоресценции при различных значениях температуры

Из приведенных в таблице и на рис. 1 данных видно, что время жизни флуоресценции мономера при данной температуре практически не изменяется при изменении длины волны. Это соответствует имеющимся представлениям об очень быстрой релаксации водного окружения триптофанового остатка в молекуле мономера. Из представленных результатов видно наличие температурного тушения флуоресценции как для мономерной, так и для тетрамерной форм. В случае тетрамера имеет место монотонное возрастание $\langle \tau \rangle$ с увеличением длины волны флуоресценции; характер этого возрастания меняется при изменении температуры. Такое поведение $\langle \tau \rangle$ полностью соответствует предположению о наличии релаксационной динамики окружения триптофанила в наносекундном временном диапазоне для молекулы тетрамерного мелиттина.

В пользу последнего свидетельствуют и полученные нами результаты по динамике спектров флуоресценции. Определив при достаточно хорошем качестве аппроксимации значения τ_1 , τ_2 , a_1/a_2 для различных длин волн флуоресценции и измерив стационарный спектр флуоресценции, можно по стандартной методике [1] получить значения интенсивности флуоресценции в произвольный момент времени для данного набора длин волн, т. е. фактически построить «мгновенный» спектр флуоресценции. Выбранных нами девять значений длины волны оказались вполне достаточно для восстановления спектра, так как в нем отсутствуют «особенности» и тонкая структура, описание которых потребовало бы, несомненно, большего числа точек. На рис. 2 приведены «мгновенные» спектры флуоресценции тетрамера мелиттина при $t=25^\circ\text{C}$. Видно, что спектры со временем смещаются в длинноволновую сторону. Ограниченная точность наших измерений не поз-

волила извлекать количественную информацию о времени релаксации (τ_R) из анализа зависимости положения спектров флуоресценции от времени. Поэтому для определения τ_R нами применялся другой подход.

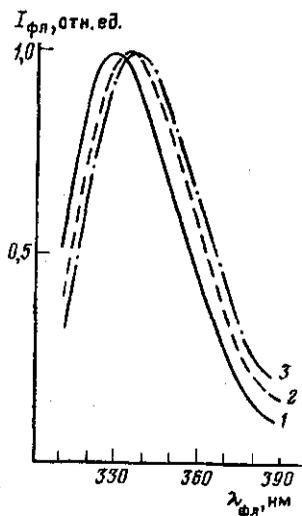


Рис. 2

Рис. 2. Расчетные спектры флуоресценции тетрамерного мелитина ($t=25^\circ\text{C}$) в различные моменты времени после импульса возбуждения: $\Delta t=0$ (1), 3 (2) 7 нс (3)

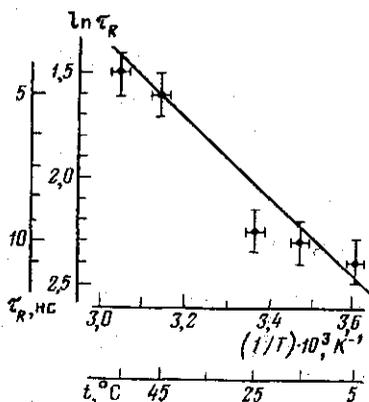


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость времени ориентационной релаксации τ_R окружения триптофанила в тетрамерном мелиттине от температуры

Восстанавливали спектр в начальный момент времени. Считая, что время жизни флуоресценции (τ_F) в отсутствие релаксационных процессов не зависит от длины волны, задавали движение начального спектра по экспоненциальному закону с характерным временем τ_R . Таким образом, можно рассчитать зависимость интенсивности флуоресценции от времени для данной длины волны и определить

$$\langle \tau \rangle = \left(\int_0^{\infty} t I(t) dt \right) / \left(\int_0^{\infty} I(t) dt \right).$$

Варьируя τ_F и τ_R , можно добиться максимального соответствия полученных значений $\langle \tau \rangle$ с определенными при обработке кинетик флуоресценции (см. таблицу и рис. 1). Соответствующие значения τ_F также приведены в таблице.

Таким способом мы получили для пяти значений температуры пять значений времени релаксации (рис. 3). В предположении активационного характера процесса $\tau_R \sim \exp(E_a/kT)$, где E_a — энергия активации. Видно, что, зная зависимость τ_R от T , можно определить эффективную энергию активации процесса ориентационной релаксации. По данным наших измерений (см. рис. 3) эта величина составила $E_a = 3,6 \pm 1,5$ ккал/моль.

Заключение. Основными результатами проведенной работы являются следующие: определены параметры кинетик затухания триптофановой флуоресценции (в частности, среднее время жизни) для белка мелиттина в тетрамерной и мономерной формах при нескольких значениях температуры; для тетрамера мелиттина при каждом значении температуры определено время релаксации окружения хромофора и в предположении об активационном характере этой релаксации оценена эффективная энергия активации.

В дальнейших экспериментах мы предполагаем использование полученных данных при изучении взаимодействия мелиттина с модельными фосфолипидными мембранами.

Авторы выражают благодарность В. Ф. Камалову, Е. Г. Костржевской, Б. Н. Толеутаеву и А. П. Шкуринову за помощь в выполнении данной работы; Н. И. Коротееву и А. П. Демченко за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986. [2] Бурштейн Э. А.//Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М., 1976. Т. 6. [3] Левшин Л. В., Струганова И. А., Толеутаев Б. Н.//Опт. и спектр. 1988. 64, № 2. С. 314. [4] Камалов В. Ф., Ладохин А. С., Толеутаев Б. Н.//ДАН СССР. 1987. 296, № 3. С. 742. [5] Демченко А. П., Костржевская Е. Г.//Укр. биохим. журн. 1986. 53, № 5. С. 92. [6] Навертман Е.//Science. 1972. 177, № 4046. P. 314. [7] Vogel H.//FEBS Lett. 1981. 134, N 1. P. 37. [8] Демченко А. П., Ладохин А. С., Костржевская Е. Г., Диброва Т. И.//Молекулярная биология. 1987. 21, № 3. С. 663. [9] Brown L. R., Lauterwein J., Wüthrich K.//Biochim. et Biophys. Acta. 1980. 622, N 2. P. 231. [10] Камалов В. Ф., Разживин А. П., Толеутаев Б. Н. и др.//Квант. электроника. 1987. 14, № 6. С. 1303. [11] Tran C. D., Beddard G. S.//Eur. Biophys. J. 1985. 13. P. 59. [12] Georghiu S., Thompson M., Mukhopadhyay A. K.//Biochim. et Biophys. Acta. 1982. 688. P. 441.

Поступила в редакцию
22.02.88

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1989. Т. 30, № 3

ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 539.26:535.312

КИНЕМАТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СКОЛЬЗЯЩЕЙ РЕНТГЕНОВСКОЙ ДИФРАКЦИИ

М. А. Андреева

(кафедра физики твердого тела)

Для случая мозаичных кристаллов дано матричное решение задачи скользящей рентгеновской дифракции в условиях полного отражения, позволяющее корректно учесть эффекты преломления для проходящей и дифрагированной волн в слоистой неоднородной среде.

Быстрое развитие нового метода — скользящей рентгеновской дифракции в условиях полного внешнего отражения (РДПВО) — определяется в настоящее время интенсификацией экспериментальных работ, проводимых на кристаллах различной степени совершенства [1—6]. Для случая совершенных кристаллов с поверхностными нарушениями типа аморфизации теория РДПВО хорошо развита в динамиче-