

Е. В. АНУФРИЕВА, член-корреспондент АН СССР М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН,
В. А. САМОКИШ

СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОДВИЖНОСТИ МАКРОМОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ

Внутримолекулярная подвижность макромолекул является важной характеристикой их состояния в растворе, ее изучение представляет особый интерес в связи с конформационными превращениями макромолекул ферментов. Для исследования внутримолекулярной подвижности, релаксационных свойств макромолекул в растворах используется поляризация флуоресценции люминесцентных «меток», ковалентно присоединенных к макромолекулам (^{1, 2}). При изучении внутримолекулярной подвижности макромолекул может быть использован и другой параметр флуоресценции — положение максимума спектра флуоресценции (с. ф.).

Известно, что положения максимумов с. ф. полярных молекул в конденсированных полярных средах зависят от релаксационных свойств их микроокружения. Определяющим фактором этой зависимости является соотношение между временем жизни возбужденного состояния флуоресцирующей молекулы (τ_f) и временем вращательной релаксации молекул среды (τ_R) (³). В теории (⁴) получено выражение, связывающее положение центра тяжести с. ф. ($\nu_{ц.т.}$) в шкале частот с величинами τ_f и τ_R :

$$\nu_{ц.т.} = \nu_{\infty} + (\nu_0 - \nu_{\infty}) \frac{\tau_R}{\tau_R + \tau_f}, \quad (1)$$

где ν_{∞} — значение $\nu_{ц.т.}$ при $\tau_R \ll \tau_f$, ν_0 — при $\tau_R \gg \tau_f$. Эта теория основывается на представлении о зависимости положений электронных энергетических уровней молекул от величины «реактивного» поля, возникающего при ориентации полярных молекул среды в поле дипольного момента флуоресцирующей молекулы (⁵). Если дипольный момент молекулы изменяется при ее возбуждении, то после акта возбуждения начинается процесс изменения состояния ориентации молекул среды в окружении возбужденной молекулы. Скорость этого процесса определяется величиной τ_R , а степень достижения к моменту испускания кванта новой равновесной ориентации и нового равновесного значения «реактивного» поля — соотношением τ_R и τ_f . При изменении «реактивного» поля энергия основного и возбужденного состояний молекулы изменяются в разной мере (вследствие различия их дипольных моментов), что и вызывает смещения с. ф.

Связь между положениями с. ф. молекул и релаксационными свойствами можно использовать для изучения этих свойств микроокружения флуоресцирующих молекул в различных системах.

Задачей настоящей работы было исследование релаксационных свойств микроокружения молекул, сорбированных на макромолекулах в растворах. С этой целью были изучены с. ф. красителей акридинового оранжевого (АО) и профлавина (ПФ), сорбированных на макромолекулах полиакриловой (ПАК) и полиметакриловой (ПМАК) кислот. Выбор этих полимеров обусловлен тем, что их свойства в растворах хорошо изучены. Макромолекулы ПАК в водных растворах имеют свойства обычных гибких полиэлектролитов (⁶). Макромолекулы ПМАК в водных растворах при степени ионизации $\alpha < 0,2$ обладают внутримолекулярной компактной структурой,

стабилизированной гидрофобным взаимодействием метильных групп. Эта структура может быть разрушена ионизацией ПМАК до $\alpha > 0,4$ (образованием ионизованной — И-ПМАК) (⁶⁻⁸). Методом поляризованной люминесценции показано, что внутримолекулярная подвижность структурированных макромолекул ПМАК значительно меньше, чем ПАК и И-ПМАК (¹).

С. ф. измеряли на спектрографе ИСП-51 с приставкой ФЭП-1 при возбуждении флуоресценции ртутными линиями 436; 365 и 313 мμ, выделен-

Таблица 1

Длины волн максимумов спектров флуоресценции АО и ПФ, сорбированных макромолекулами и свободных

	$\lambda_{\max}$ АО, мμ		$\lambda_{\max}$ ПФ, мμ	
	20° С	77° К	20° С	77° К
Комплекс с ПАК	525	515	515	482
» » И-ПМАК ($\alpha > 0,5$)	535	515	515	482
Комплекс с ПМАК ($\alpha < 0,05$)	516	515	490	482
Свободный	530	514	515	490

ными из спектра лампы ДРШ-250 при помощи соответствующих фильтров. С. ф. жидких растворов измеряли в кварцевых кюветках, а с. ф. замороженных растворов на образцах, помещенных на металлической подложке в прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом. Спектры поглощения (с. п.) при 20° С измеряли на спектрофотометре СФ-4А.

Факт сорбции молекул красителей на макромолеку-

лах в растворах устанавливали на основании измерений поляризации флуоресценции красителей в растворах, содержащих макромолекулы исследуемых полимеров. При сорбции красителей на макромолекулах поляризация изменяется от 0 до 22% (ПМАК) в зависимости от концентрации полимера. Измерения с. ф. сорбированных молекул красителей проводили в таких условиях, когда их количество было больше 95% от общего количества молекул красителей в растворе. Эти условия были определены на основании измерений зависимости поляризации, интенсивности и тушения флуоресценции, а также с. п. от концентрации макромолекул в растворах. Соответствующие концентрации в растворах были для красителей $\sim 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6} M$; для макромолекул $\sim 10^{-2} - 5 \cdot 10^{-2} g-M$.

Оценки соотношения τ_R и τ_I в исследуемых системах мы производили на основании соотношения (1) путем сравнения с. ф. жидких (20° С) и замороженных (77° К) растворов. Замораживание растворов приводит к такому состоянию системы, которое характеризуется соотношением $\tau_R \gg \tau_I$ (³). Характеристичной особенностью с. ф. была выбрана величина длины волны максимума с. ф. ($\lambda_{\max}$).

Величины $\lambda_{\max}$ для с. ф. жидких и замороженных растворов исследованных систем приведены в табл. 1. Из нее следует, что замораживание растворов свободных красителей вызывает коротковолновые смещения их с. ф. Подобный же коротковолновый сдвиг с. ф. вызывает замораживание растворов красителей, сорбированных на макромолекулах ПАК и И-ПМАК. Такой сдвиг не наблюдается при замораживании растворов красителей, сорбированных на ПМАК. В этом случае с. ф. красителей смещаются в коротковолновую сторону уже при сорбции их макромолекулами ПМАК при 20° С до тех же значений $\lambda_{\max}$, которые в других системах достигаются лишь при замораживании растворов. Важно, что раз-

Таблица 2

Длины волн максимумов спектров поглощения АО и ПФ, свободных и сорбированных макромолекулами

	АО	ПФ
Комплекс с ПАК	500	457
» » И-ПМАК ($\alpha > 0,5$)	500	460
» » ПМАК ($\alpha < 0,05$)	500	460
Свободный	490	444

личия в величине $\lambda_{\max}$ с.ф. АО и ПФ, сорбированных ПМАК и И-ПМАК, определяются не самой степенью ионизации макромолекул, а наличием внутримолекулярной структуры у ПМАК. Подтверждающие это положение результаты приведены на рис. 1, в виде зависимости величины $\lambda_{\max}$ для красителя АО, сорбированного на ПМАК, от степени ионизации макромолекул. Как видно из рис. 1, изменение величины $\lambda_{\max}$ имеет место в интервале $0,2 < \alpha < 0,4$, в котором, как известно (^{7,8}), разрушается внутримолекулярная структура ПМАК.

Влияние увеличения жесткости среды при замораживании растворов свободных красителей и их комплексов с ПАК и И-ПМАК можно объяснить в рамках изложенных выше физических представлений на основании предположения о том, что в этих системах при 20° С время релаксации $\tau_R \leq \tau_f$. Известно, что такое соотношение имеет место для жидких растворов низкомолекулярных веществ (⁴). Вероятно, сдвиг с.ф. растворов свободных красителей и их комплексов с ПАК и И-ПМАК вызван увеличением τ_R до значений $\tau_R > \tau_f$. Для комплексов красителей с ПМАК состояние $\tau_R > \tau_f$ реализуется, по-видимому, уже при 20° С.

Величина τ_f в исследованных растворах имеет порядок 10^{-8} — 10^{-9} сек. Следовательно, подвижность окружения молекул красителей, сорбированных на ПАК и И-ПМАК, характеризуется величиной $\tau_R < 10^{-9}$ сек., а для молекул красителей, сорбированных на ПМАК, $\tau_R > 10^{-8}$ сек.

Микроокружение молекул красителей, сорбированных макромолекулами, отличается от их окружения в растворе. Это положение следует из данных о различиях с.п. (табл. 2) и с.ф. (табл. 1) свободных и сорбированных макромолекулами красителей. Вероятно, окружение сорбированной макромолекулой малой молекулы состоит из близко расположенных частей макромолекулы. Подвижность такого «макромолекулярного» окружения определяется, очевидно, внутримолекулярной подвижностью макромолекул. Характеризуемая величиной τ_R подвижность «макромолекулярного» окружения и, следовательно, внутримолекулярная подвижность макромолекул для красителей, сорбированных на ПАК и И-ПМАК, значительно больше, чем для ПМАК. Такой качественный вывод о внутримолекулярной подвижности этих макромолекул совпадает с выводами, сделанными на основании данных, полученных методом поляризованной люминесценции (¹). Количественные оценки, полученные методом поляризованной люминесценции, имеют другой порядок величины ($\tau_R \sim 10^{-8}$ — $5 \cdot 10^{-8}$ сек.). Различия количественных оценок связаны, по-видимому, с различиями механизмов проявления внутримолекулярной подвижности макромолекул в физических эффектах, на которых основаны эти оценки.

Из приведенного рассмотрения следует, что с.ф. сорбированных макромолекулами малых молекул могут применяться для изучения внутримолекулярной подвижности макромолекул. В качестве объектов таких исследований особый интерес представляют комплексы красителей с макромолекулами биополимеров, и в частности ферментов (⁹⁻¹¹). В этих системах при образовании комплексов часто наблюдаются изменения с.ф. красите-

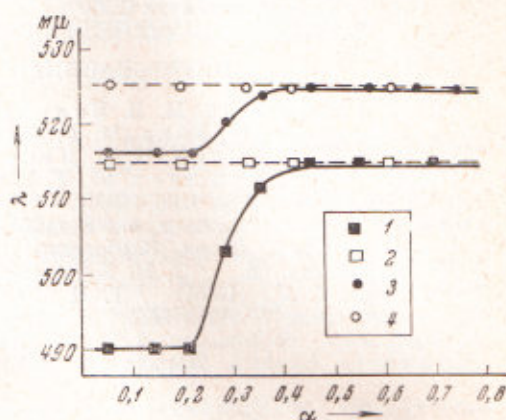


Рис. 1. Зависимость $\lambda_{\max}$ с.ф. сорбированных красителей от степени ионизации макромолекул. 1 — ПФ + ПМАК; 2 — ПФ + ПАК; 3 — АО + ПМАК; 4 — АО + ПАК

лей, которые принято объяснять низкой полярностью окружения молекулы красителя в комплексе. По-видимому, при учете подвижности, релаксационных свойств окружения молекул красителей в комплексах с макромолекулами интерпретация этих данных может быть изменена и расширена.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР

Поступило
11 III 1970

Институт высокомолекулярных соединений
Академии наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн и др., ДАН, 182, № 2, 361 (1968). ² Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн и др., ДАН, 186, 854 (1969). ³ Н. Г. Бахшиев, Б. С. Непорент, Оптика и спектроскопия, 8, 6, 777 (1960). ⁴ Н. Г. Бахшиев, Ю. Т. Мазуренко, И. В. Питерская, Изв. АН СССР, сер. физ., 32, 8, 1360 (1969). ⁵ В. Н. Цветков, С. Я. Любина, Т. В. Барская, Высокомолек. соед., 6, 806 (1964). ⁶ В. Н. Цветков, С. Я. Любина, К. Л. Болевский, Сборн. Карбоценовые высокомолекулярные соединения, Изд. АН СССР, 1963, стр. 26. ⁷ Т. М. Бирштейн, Е. В. Ануфриева и др., Высокомолек. соед., 7, 372 (1965). ⁸ Т. Н. Некрасова, Е. В. Ануфриева и др., Высокомолек. соед., 7, 913 (1965). ⁹ D. Striner, J. Mol. Biol., 13, 2, 482 (1965). ¹⁰ M. De Luca, Biochemistry, 8, 1, 161 (1969). ¹¹ M. Kasai, J. P. Changeux, L. Monnerie, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 9, 420 (1969).