

Владимирский государственный университет

Ю. Н. КУРБАТОВ

**СТРУКТУРА БИОПОЛИМЕРОВ
И МЕТОДЫ ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учебное пособие

Владимир 2022

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

Ю. Н. КУРБАТОВ

СТРУКТУРА БИОПОЛИМЕРОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учебное пособие

Электронное издание



Владимир 2022

ISBN 978-5-9984-1576-0

© Курбатов Ю. Н., 2022

УДК 577.11
ББК 28.072

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор
профессор кафедры химии
Владимирского государственного университета
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевич Столетовых
Б. А. Кухтин

Кандидат биологических наук
инженер-эколог ООО «Ферма делает»
А. С. Злышко

Курбатов, Ю. Н.

Структура биополимеров и методы ее исследования [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Ю. Н. Курбатов ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2022. – 205 с. – ISBN 978-5-9984-1576-0. – Электрон. дан. (7,07 Мб). – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Систем. требования: Intel от 1,3 ГГц; Windows XP/7/8/10; Adobe Acrobat Reader; дисковод CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

Подробно рассмотрены вопросы, касающиеся структуры важнейших биополимеров, приведены теоретические основы, практическая реализация и применение наиболее актуальных на сегодняшний день методов исследования конформаций биополимеров.

Предназначено для студентов-бакалавров, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология», а также может быть полезно аспирантам, магистрантам, научным работникам, химикам и специалистам, занимающимся биологическими исследованиями.

Рекомендовано для формирования профессиональных компетенций в соответствии с ФГОС ВО.

Ил. 92. Табл. 10. Библиогр.: 54 назв.

УДК 577.11
ББК 28.072

ISBN 978-5-9984-1576-0

© Курбатов Ю. Н., 2022

ПРЕДИСЛОВИЕ

Курс «Физико-химические методы исследования в биологии», изучаемый студентами бакалавриата по направлению 06.03.01 «Биология», носит междисциплинарный характер и предназначен для ознакомления обучающихся с современным уровнем развития экспериментальных методов в биологических и смежных науках. Природа исследуемых объектов и особенности решаемых задач требуют от биолога владения не только классическими, но и специальными методами исследования. Это в полной мере относится к проблемам, связанным с определением структуры нерегулярно построенных биологических полимеров – белков и нуклеиновых кислот, которые являются более высокой формой организации материи, чем биологически активные низкомолекулярные соединения и регулярно построенные гомополимеры – полисахариды.

Предлагаемое учебное пособие состоит из двух глав.

В первой главе систематизированы сведения о структуре биополимеров на основе современных представлений биоорганической химии, молекулярной биологии и биофизики. Здесь же рассматриваются принципы и методы определения первичной структуры белков и нуклеиновых кислот, знание которой необходимо для исследования и построения моделей их пространственного строения. Физическим и физико-химическим методам определения пространственной структуры посвящена вторая глава пособия, в которой основное внимание уделено специальным методам, получившим значительное развитие для решения задач структурной биохимии, – рентгеноструктурному анализу, ЯМР-спектроскопии, электронной микроскопии. Методы, широко используемые в химии, рассматриваются менее подробно, но с акцентом на отдельных явлениях и модификациях методов (гипохромный эффект, инфракрасный дихроизм, метод спиновых меток и др.), определяющих возможность их использования для структурных исследований биологических макромолекул.

ВВЕДЕНИЕ

Высокий уровень структурной и функциональной организации живой материи обеспечивается, прежде всего, участием особых биополимеров – белков и нуклеиновых кислот. Каждый индивидуальный биополимер характеризуется определенным порядком чередования разнотипных мономерных звеньев, образованных в случае белков двадцатью каноническими аминокислотами, а в случае нуклеиновых кислот – четырьмя различными нуклеотидами. Это создает основу неисчерпаемого многообразия биополимеров.

Структура полимерных молекул, построенных из повторяющихся единиц и содержащих простые (одинарные) ковалентные связи в пределах основной цепи, является гибкой в силу возможности внутреннего вращения вокруг большинства таких связей. При этом каждый поворот может радикально изменить взаимное расположение двух соединенных простой связью фрагментов полимерной молекулы. Это происходит без каких-либо химических изменений, и эти состояния рассматриваются как различные *конформации*, а сами структуры – как различные *конформеры*. При достаточно высоких температурах или изменениях рН среды в результате процесса *денатурации* может реализовываться огромное число различных конформеров, находящихся в состоянии непрерывного взаимопревращения. В химии высокомолекулярных соединений такое состояние полимерной молекулы называют *статистическим клубком*. Однако в нативном состоянии, в условиях существования живых организмов, в результате многочисленных нековалентных взаимодействий с участием как фрагментов основной цепи (остова) полимеров, так и различных боковых групп (радикалов) предпочтительным оказывается лишь ограниченное число конформаций, поэтому каждый биополимер обладает не только уникальной последовательностью чередования мономерных звеньев, но и уникальной *пространственной структурой* или небольшим набором таких структур.

Пространственная структура обеспечивает взаимное расположение функциональных групп, предназначенных для высокоспецифичного нековалентного взаимодействия со строго определенными партнерами – другими биополимерами или молекулами низкомолекулярных соединений (лигандами) – с образованием комплексов или больших ансамблей. Классическим примером являются комплексы ферментов с субстратами – веществами, химическое превращение которых они катализируют, или ингибиторами – веществами, блокирующими активность ферментов. Такие взаимодействия сопровождаются изменениями конформации и переходом в новую структуру, резко отличающуюся от исходной. Денатурация, разрушая упорядоченную поверхность и ориентацию функциональных групп относительно друг друга, уничтожает способность биополимеров к «узнаванию» других компонентов, что в свою очередь приводит к утрате биополимерами способности выполнять свои функции. Таким образом, пространственная структура белков и нуклеиновых кислот, как и способность к направленным конформационным переходам, является *основой их функциональности*, а установление пространственной организации макромолекул позволяет выяснить зависимость между их структурными характеристиками и функциональными свойствами. Эти знания имеют важное практическое значение, например, представления о комплексах ферментов с субстратами во многих случаях оказываются решающим фактором при создании лекарственных препаратов.

В биохимии принято выделять четыре уровня структурной организации биологических макромолекул – первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.

Под *первичной структурой* понимают порядок расположения мономерных звеньев (аминокислотных остатков или нуклеотидов), соединенных ковалентными связями в линейную цепь (или цепи) биополимера. Для описания первичной структуры необходимо указание конфигурации всех асимметричных центров основной цепи биополимера и боковых групп каждого мономерного звена, а также перекрестных связей-сшивок между частями одной и той же или разных цепей, образующих макромолекулу (например, дисульфидных связей в белках). Направление цепей биополимеров строго определено, так как аминокислотные остатки или нуклеотиды всегда соединяются по принципу «голова к хвосту».

При определении первичной структуры биополимеров необходимо расщепление исходных макромолекул на фрагменты меньшего размера, причем для получения гомогенных фрагментов расщепление проводится по строго определенным точкам. Это достигается химическими и ферментативными методами, возможности которых значительно расширились после начала применения ферментов матричного биосинтеза, в первую очередь ДНК-полимераз. Развитие и автоматизация методов определения первичной структуры (секвенирования) ДНК позволили расшифровать геномы различных организмов, в том числе геном человека, полная последовательность которого содержит около 3 млрд пар нуклеотидов. Основная его часть (92 %) была расшифрована к 2003 г. в рамках международного проекта «Геном человека», а в апреле 2022 г. международная команда исследователей сообщила о завершении работы по секвенированию оставшихся 8 % человеческого генома.

Первичная структура определяет все последующие структуры в иерархии, поэтому некоторые характеристики секвенированных, но пока не изученных биополимеров, могут быть предсказаны теоретически.

Вторичная структура – это пространственное (конформационное) расположение отдельных участков главной цепи макромолекулы, независимо от конформации боковых цепей. Если молекула укладывается в рамки одной совершенной вторичной структуры, например представляет собой α -спираль, то описание вторичной структуры определяет точную конформацию основной цепи, а в случае периодической последовательности, вероятно, также и боковых цепей. Для молекул, разные части которых имеют разную вторичную структуру, термин «конформация» применяется также в смысле всех имеющихся сведений об их общей структуре.

Информацию о характере вторичной структуры, количестве различных ее форм можно получить по данным поглощения в ультрафиолетовой и инфракрасной областях, кривым дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма. Чтобы узнать, какие мономерные звенья входят в те или иные участки вторичной структуры, пользуются ядерным магнитным резонансом (ЯМР) и другими методами.

Третичная структура белка или нуклеиновой кислоты – это полная трехмерная структура единицы, которая не может быть разде-

лена без нарушения ковалентных связей. Для белка такая единица может быть одним полипептидом или состоять из нескольких полипептидных цепей, связанных ковалентно. Для нуклеиновой кислоты это либо одна ковалентная цепь, как в случае большинства молекул РНК, либо две комплементарные цепи, как в случае большинства молекул ДНК. Важнейшими методами, позволяющими установить полную третичную структуру биологических макромолекул, являются рентгеновская кристаллография (рентгеноструктурный анализ), двумерная ЯМР-спектроскопия и электронная микроскопия высокого разрешения, прежде всего криоэлектронная микроскопия.

Высшим уровнем структурной организации является *четвертичная структура*. Она образуется путем ассоциации (за счет нековалентных взаимодействий) независимых единиц третичной структуры. Субъединицы четвертичной структуры могут быть как одинаковыми, так и различными, а их расположение в четвертичной структуре – как симметричным, так и несимметричным. В случае четвертичной структуры имеется много различных подходов, которые позволяют определить число и типы субъединиц. Обычно они сводятся к аккуратному количественному исследованию интактной системы и измерению молекулярной массы всех субъединиц. Геометрию расположения субъединиц можно установить с помощью электронного микроскопа.

Все известные к настоящему времени структуры хранятся в свободном доступе в Международной базе данных *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). По состоянию на середину мая 2022 года база содержит данные о структуре более чем 190 тыс. биополимеров, в том числе о 165,9 тыс. белков, 3,9 тыс. нуклеиновых кислот, а также 10,3 тыс. комплексов белков с нуклеиновыми кислотами и 9,9 тыс. комплексов белков с олигосахаридами. Методом рентгеновской кристаллографии установлено 88 % белковых структур и 62 % структур нуклеиновых кислот, методом ЯМР – соответственно 7 и 36 %, а с помощью электронной микроскопии – 4 и 1,5 % структур.

Глава I. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ

1. БЕЛКИ

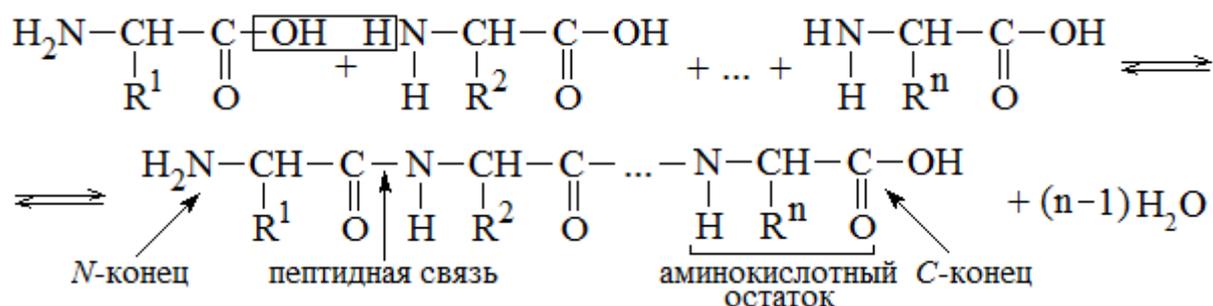
Белки, или протеины (от греч. πρῶτεϊος – «первый», «первичный»), – это биополимеры, построенные из остатков α-аминокислот, соединенных пептидной (амидной) связью. Условно считают, что белки содержат в молекуле свыше 100 аминокислотных остатков (что соответствует молекулярной массе от 10 000 до нескольких миллионов)¹, а аналогичные по структуре соединения с меньшей молекулярной массой относят к пептидам. Белок, как биологически значимая структура, может представлять собой как один полипептид, так и комплекс из нескольких полипептидных цепей. Помимо аминокислотных остатков, в состав белков могут входить соединения иной природы (простетические группы): углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Такие белки называют сложными и подразделяют соответственно на гликопротеины, нуклеопротеины, липопротеины и др.

Важнейшей особенностью белков является способность самопроизвольно формировать определенную пространственную структуру, так называемую «нативную конформацию». Аналогичная способность замечается и у некоторых пептидов, например, гормонов, что облегчает их взаимодействие с клеточными рецепторами, однако стабилизация пространственной структуры требует хорошо развитой системы нековалентных взаимодействий, которая может быть достигнута лишь начиная с определенной длины полипептидной цепи. Пространственная структура является основой всех физико-химических свойств белков и их биологических функций [38, с. 60].

Согласно теории немецкого химика Эмиля Фишера, созданной в 1902 г., пептидную (белковую) молекулу формально можно представить как продукт поликонденсации α-аминокислот $RCH(NH_2)COOH$, протекающий с образованием пептидной связи между мономерными звеньями. Образующаяся цепь состоит из чередующихся пептидных ($-CO-NH-$) и метиновых ($-CH-$) групп; метиновые группы связаны с боковыми радикалами аминокислот (R). Аминокислотный остаток со

¹ Относительная молекулярная масса аминокислотных остатков при pH 7 варьирует от 57 а. е. м. (глицин) до 186 а. е. м. (триптофан), среднее значение – 108,7 а. е. м.

свободной аминогруппой ($-\text{NH}_2$) на одном конце цепи называют *N*-концевым, а остаток аминокислоты со свободной карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) на другом конце цепи – *C*-концевым. Пептидные и белковые цепи принято записывать с *N*-конца.



В водной среде равновесие такого типа реакций сдвинуто в сторону образования свободных аминокислот, и поэтому биосинтез белков в клетках не сводится к простому отщеплению воды, а протекает по сложному энергозатратному механизму с участием специфических внутриклеточных частиц (рибосом) и макроэргических соединений [16, с. 23].

В 1951 г. датский биохимик Кай Ульрик Линнерстрём-Ланг ввел понятия о четырех уровнях структурной организации белковой макромолекулы: *первичной*, *вторичной*, *третичной* и *четвертичной структурах*. В 1982 г. немецкие биохимики Георг Шульц и Рольф Ширмер предложили выделять еще два уровня организации: *сверхвторичные структуры* и *структурные домены* [51, с. 127–128].

Определяющее значение в формировании более высоких уровней организации белковых макромолекул имеет их первичная структура, поскольку природа аминокислотных остатков и порядок их соединения обуславливают характер стабилизации более высокоорганизованных структур.

1.1. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И МЕТОДЫ ЕЕ УСТАНОВЛЕНИЯ

Первичной структурой называют последовательность (порядок чередования) аминокислотных остатков в полипептидной цепи (или цепях) белка. Первичная структура, достаточно жестко запрограммированная в нуклеотидной последовательности соответствующих структурных генов ДНК, транскрибируется в комплементарные нуклеотидные последовательности мРНК, которые служат матрицами для биосинтеза полипептидных цепей в процессе трансляции генети-

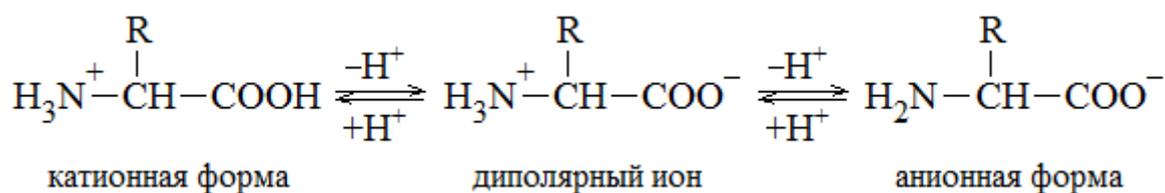
ческой информации в рибосомной системе клетки. Однако первичная структура зрелой белковой молекулы далеко не всегда полностью совпадает с непосредственным продуктом трансляции, что связано с возможностями репрограммирования в ходе трансляции, а также с процессами посттрансляционной модификации синтезированных на рибосомах полипептидных цепей [38, с. 60].

1.1.1. Аминокислоты – структурные элементы белков

Известно около 100 природных аминокислот, однако в белках постоянно встречаются только 20 из них, называемых протеиногенными, или каноническими¹. Все аминокислоты, обнаруженные в белках, за исключением пролина (который является α -иминокислотой), содержат первичную аминогруппу и свободную карбоксильную группу у одного и того же α -атома углерода. Поэтому они относятся к α -аминокислотам. Сходные с ними и также встречающиеся в природе β -аминокислоты, тем не менее, обычно не входят в состав пептидов и белков, очевидно, в силу того, что полипептидная цепь, содержащая β -аминокислотные остатки, имела бы ковалентные связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$, а значит и возможность дополнительного вращения вокруг них, что затрудняло бы самопроизвольное свертывание цепи в регулярные пространственные структуры, которые свойственны природным белкам [16, с. 24].

Общая формула α -аминокислот $RCH(NH_2)COOH$ не отражает полностью их истинного строения – незаряженная форма не может существовать ни при каких значениях рН ввиду способности функциональных групп к ионизации. В кристаллическом состоянии и в средах, близких к нейтральным, в том числе в водных средах живых клеток, аминокислоты существуют в виде внутренних солей – диполярных ионов (цвиттер-ионов, от нем. *Zwitterion* – «гибридный ион»). В сильноокислой среде (рН 1–2) в аминокислотах полностью протонирована аминогруппа и не диссоциирована карбоксильная группа, а в сильнощелочной (рН > 12), напротив, свободна аминогруппа и полностью ионизирована карбоксильная:

¹ В это число входят 17 собственно аминокислот, два амида (аспарагин и глутамин) и не имеющая свободную аминогруппу иминокислота пролин, у которой атом азота и α -атом углерода жестко соединены в пирролидиновый цикл.



Значение рН, при котором концентрация цвиттер-ионов максимальна, а минимальные концентрации катионных и анионных форм равны между собой, называется *изоэлектрической точкой* (pI). В pI суммарный заряд молекулы α-аминокислоты равен нулю.

Протеиногенные α-аминокислоты для удобства дальнейшего рассмотрения пространственной структуры можно разделить на следующие группы (табл. 1):

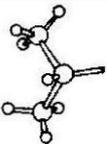
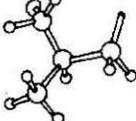
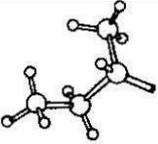
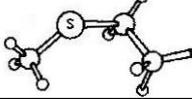
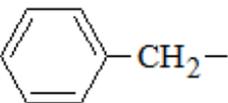
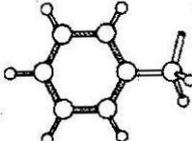
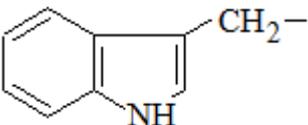
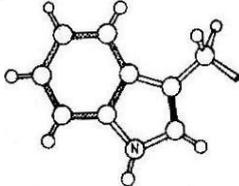
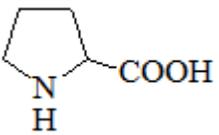
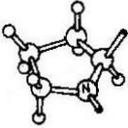
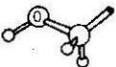
1) *аминокислоты с неполярными (гидрофобными) радикалами*. К ним относятся аминокислоты с алифатическими (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин) или ароматическими (фенилаланин и триптофан) радикалами, а также пролин. Гидрофобные радикалы позволяют формировать белкам внутреннее ядро, стабилизирующее пространственную структуру. Пролин образует пептидную связь замыканием радикала на иминогруппу (–NH–), лишаясь атома водорода, способного участвовать в образовании водородных связей, и ограничивая осевое вращение вокруг пептидной группы, что приводит к изгибам полипептидной цепи в местах нахождения остатков пролина;

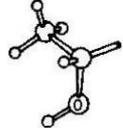
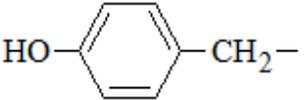
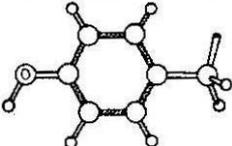
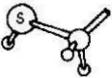
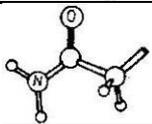
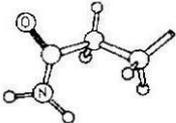
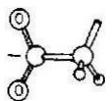
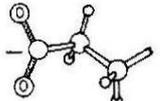
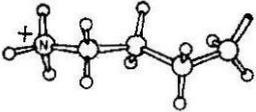
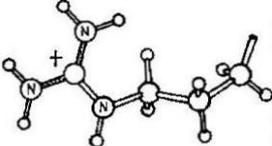
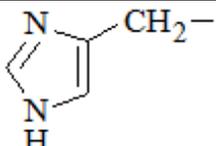
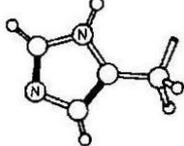
2) *аминокислоты с незаряженными полярными (гидрофильными) радикалами*. Они могут содержать гидроксильную (серин, треонин и тирозин), тиольную (цистеин) или амидную (глутамин, аспарагин) функциональную группу. Полярные радикалы участвуют в образовании водородных связей. К этой группе можно также отнести не имеющий бокового радикала глицин, который вследствие своего строения увеличивает подвижность полипептидной цепи в белках и одновременно способствует ее плотной упаковке;

3) *заряженные аминокислоты: кислые* (аспарагиновая и глутаминовая, содержащие по две карбоксильные и по одной аминокислотной группе) и *основные* (лизин, аргинин и приближающийся к этой группе вследствие протонирования вблизи рН 7 гистидин). В физиологических условиях все функциональные группы этих аминокислот находятся в ионизированном состоянии. Радикалы заряженных аминокислот, помимо образования водородных связей, участвуют в ионных взаимодействиях как внутри белка, так и с другими молекулами.

Таблица 1

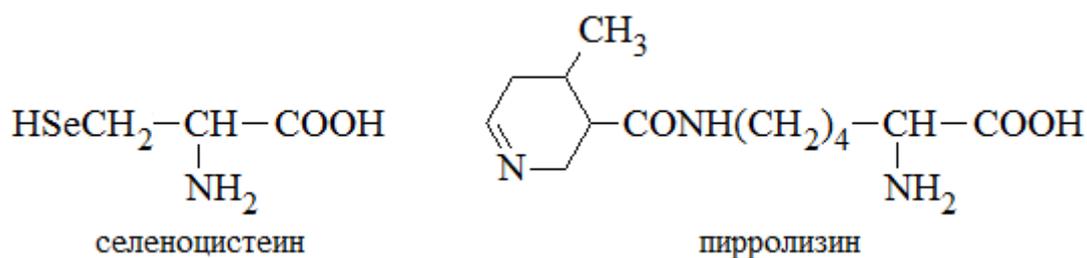
Протеиногенные аминокислоты $RCH(NH_2)COOH$ [12, с. 20–22; 24, с. 116]

Название	Структурная формула радикала	Пространственное строение радикала	pI	Содержание в белках, %
<i>Аминокислоты с неполярными радикалами</i>				
Аланин (Ала, Ala, A)	CH_3-		6,01	7,8
Валин (Вал, Val, V)	$(CH_3)_2CH-$		5,97	6,6
Лейцин (Лей, Leu, L)	$(CH_3)_2CH(CH_2)-$		5,98	9,1
Изолейцин (Иле, Ile, I)	$CH_3CH_2CH(CH_3)-$		6,02	5,3
Метионин (Мет, Met, M)	$CH_3SCH_2CH_2-$		5,74	2,3
Фенилаланин (Фен, Phe, F)			5,48	3,9
Триптофан (Три, Trp, W)			5,89	1,4
Пролин (Про, Pro, P)	 (формула приведена полностью)		6,48	5,2
<i>Аминокислоты с незаряженными полярными радикалами</i>				
Глицин (гликокол, Гли, Gly, G)	$H-$		5,97	7,2
Серин (Сер, Ser, S)	$HOCH_2-$		5,68	6,8

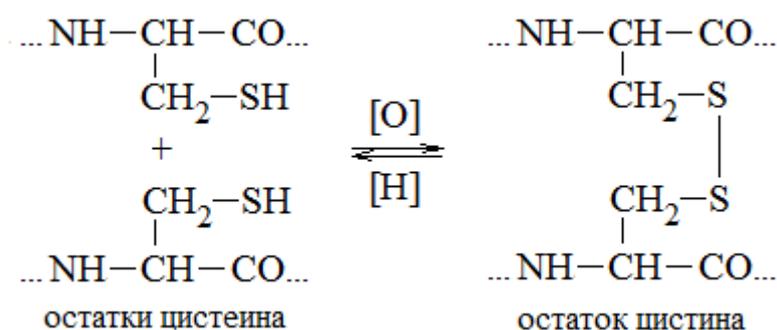
Название	Структурная формула радикала	Пространственное строение радикала	pI	Содержание в белках, %
Треонин (Тре, Thr, T)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$		5,87	5,9
Тирозин (Тир, Tyr, Y)			5,66	3,2
Цистеин (Цис, Cys, C)	HSCH_2-		5,07	1,9
Аспарагин (Асп, Asn, N)	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2-$		5,41	4,3
Глутамин (Глн, Gln, Q)	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}_2-$		5,65	4,2
<i>Аминокислоты с отрицательно заряженной полярной группой (кислые)</i>				
Аспарагиновая кислота (Асп, Asp, D)	$-\text{OOCCH}_2-$		2,77	5,3
Глутаминовая кислота (Глу, Glu, E)	$-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2-$		3,22	6,3
<i>Аминокислоты с положительно заряженной полярной группой (основные)</i>				
Лизин (Лиз, Lys, K)	$\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_4-$		9,74	5,9
Аргинин (Арг, Arg, R)	$\begin{array}{l} \text{H}_2\text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{NH}(\text{CH}_2)_3-$		10,76	5,1
Гистидин (Гис, His, H)			7,59	2,3

К числу протеиногенных аминокислот иногда причисляют еще две генетически кодируемые аминокислоты – селеноцистеин (Sec, U) и пирролизин (Pyl, O). Остаток селеноцистеина обнаружен в более

чем десяти каталитически активных белках бактерий и млекопитающих, а пирролизин найден у архебактерий в составе белка, играющего важную роль в процессе метаногенеза [29, с. 187].



Некоторые аминокислоты, уже находясь в составе белков, могут вступать в реакции (как правило, окислительно-восстановительные) с образованием модифицированных аминокислот. Например, цистеин легко окисляется до дисульфида – цистина (Cys–S–S–Cys). Это превращение приводит к образованию в белках дисульфидных связей («мостиков») внутри одной полипептидной цепи, либо между двумя различными цепями.



В качестве примера пептида, имеющего две полипептидные цепи, скрепленные дисульфидными мостиками, а также сшивки внутри отдельных цепей, можно привести молекулу инсулина – гормона, вырабатываемого поджелудочной железой и ответственного за усвоение углеводов, в первую очередь глюкозы (рис. 1). Инсулин был первым пептидом, для которого благодаря работам британского биохимика Фредерика Сенгера и его коллег в 1951–1952 г. удалось расшифровать первичную структуру.

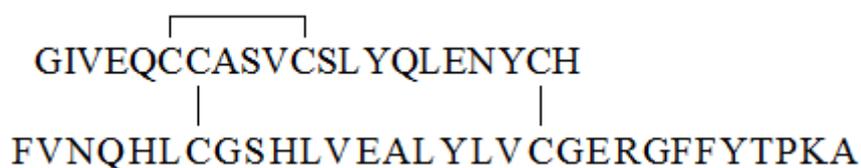
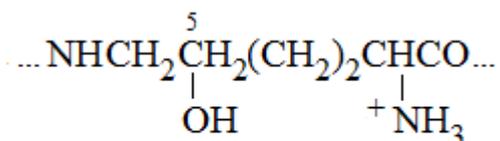
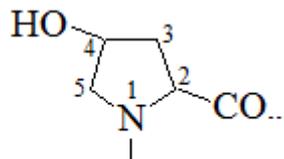


Рис. 1. Схема строения молекулы инсулина человека в однобуквенной символике [14, с. 34]. Скобкой обозначен внутрицепочечный дисульфидный мостик, а вертикальными линиями – межцепочечные дисульфидные мостики

Другим значимым примером модификации аминокислотных остатков белков является С-гидроксилирование – превращение остатков пролина в остатки 4-гидроксипролина (HyPro) в результате введения гидроксильной группы в пирролидиновое кольцо и превращение остатков лизина в остатки 5-гидроксилизина (HyLys) при гидроксилировании в боковой радикал. Эти превращения происходят, причем в значительном масштабе, при образовании важного белкового компонента соединительной ткани – коллагена.



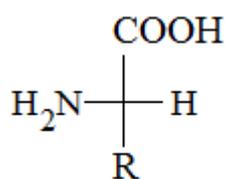
остаток 5-гидроксилизина



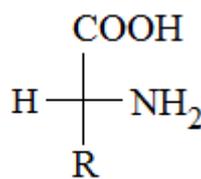
остаток 4-гидроксипролина

Гидроксилирование остатков лизина и пролина осуществляется ферментативно с участием витамина С – аскорбиновой кислоты, играющей роль кофермента. При недостатке или отсутствии витамина С образуются неполноценные коллагеновые волокна, в существенной степени лишенные гидроксильных групп, что сказывается на их прочности и приводит к хрупкости и ломкости стенок кровеносных сосудов. Известным следствием этого является цинга.

С_α-атом всех аминокислот, кроме глицина, и по два атома углерода у треонина, изолейцина и 4-гидроксипролина являются асимметрическими (связанными с четырьмя различными заместителями) и, следовательно, аминокислоты могут существовать в виде стереоизомеров (в простейшем случае – двух оптических активных энантиомеров и одного оптически неактивного рацемата). Большинство природных α-аминокислот и все аминокислоты, входящие в состав белков животного происхождения, относятся к L-стереохимическому ряду.



L-аминокислота



D-аминокислота

Аминокислоты D-ряда встречаются в составе белков микроорганизмов, причем некоторые из них проявляют антибиотическое действие (D-фенилаланин является составной частью антибиотика грамицидина С, D-изолейцин – актиномицина D и т. д.). Направление

вращения плоскости поляризованного света энантиомерами не связано с принадлежностью к D- или L-ряду: в водном растворе часть L-аминокислот вращает плоскополяризованный свет влево, а часть – вправо; в кислой среде большинство L-аминокислот являются правовращающими, т. е. некоторые аминокислоты при переходе в область кислых значений рН из левовращающих становятся правовращающими.

Ни одна из обычно встречающихся аминокислот не обнаруживает поглощения видимого света (иными словами, они не окрашены). Три аминокислоты – триптофан, тирозин и фенилаланин – сильно поглощают в ультрафиолетовой части спектра (в диапазоне 250–290 нм) [12, с. 23]. При наличии таких аминокислот в составе белков последние тоже поглощают УФ-излучение в этой же области спектра. Пептидная связь поглощает в области 190–230 нм безотносительно к природе образующих ее аминокислотных остатков.

Триптофан способен к флуоресценции с максимумом возбуждения при $\lambda_{ex} = 295$ нм, максимумом испускания при $\lambda_{em} = 353$ нм и квантовым выходом 0,14. Спектральные характеристики флуоресценции остатков триптофана в составе белков чувствительны к их окружению, и измерение флуоресценции белков дает представление об их пространственной структуре. Довольно интенсивной флуоресценцией также обладает тирозин ($\lambda_{ex} = 275$ нм, $\lambda_{em} = 304$ нм) [15, с. 130].

1.1.2. Этапы определения первичной структуры белков и значение данных исследований

Определение первичной структуры белка складывается из следующих этапов:

1) установление суммарного аминокислотного состава путем гидролиза белка и определения продуктов гидролиза,

2) денатурация белка, фрагментация полипептидных цепей несколькими различными способами и разделение полученных фрагментов (пептидов и небольших белков),

3) установление структуры N- и C-концевых аминокислот каждого из фрагментов,

4) *секвенирование* (от лат. *sequentum* – «последовательность») – определение аминокислотных последовательностей фрагментов,

5) сравнение полученных последовательностей и воссоздание первичной структуры белка.

Первичную структуру белка также можно определить по первичной структуре его мРНК, используя таблицу генетического кода, однако этот метод не позволяет получить сведения о строении белков, в состав которых входят модифицированные α -аминокислоты, поскольку процесс модификации аминокислотных остатков происходит уже после синтеза белка. Наиболее достоверные данные получаются при сопоставлении результатов, полученных обоими методами – считыванием генетического кода (*косвенным секвенированием*) и физико-химическим анализом аминокислотной последовательности (*прямым секвенированием*). Помимо полного анализа первичной структуры те же методы в том или ином объеме применяют для первичной характеристики вновь выделяемых белков, сравнения белков между собой, анализа их функционально важных фрагментов.

Знание первичной структуры белков необходимо для выяснения и предсказания их функциональных свойств, в частности при исследовании роли отдельных аминокислотных остатков в ферментативной активности. Выявление структурного подобия белков, выполняющих одинаковую функцию, но происходящих от разных видов, имеет большое значение при изучении эволюционных процессов, а дендрограммы, построенные на основе изучения первичных структур, широко применяются для выявления филогенетических связей различных групп организмов. Обнаружение замен в чередовании аминокислотных остатков, вызванных как естественными, так и индуцированными мутациями, может быть важно для раскрытия причин наследственных заболеваний. Информацией о первичной структуре пользуются при исследовании и моделировании вторичной структуры и других более высоких уровней структурной организации белков [12, с. 15–16; 16, с. 34–35].

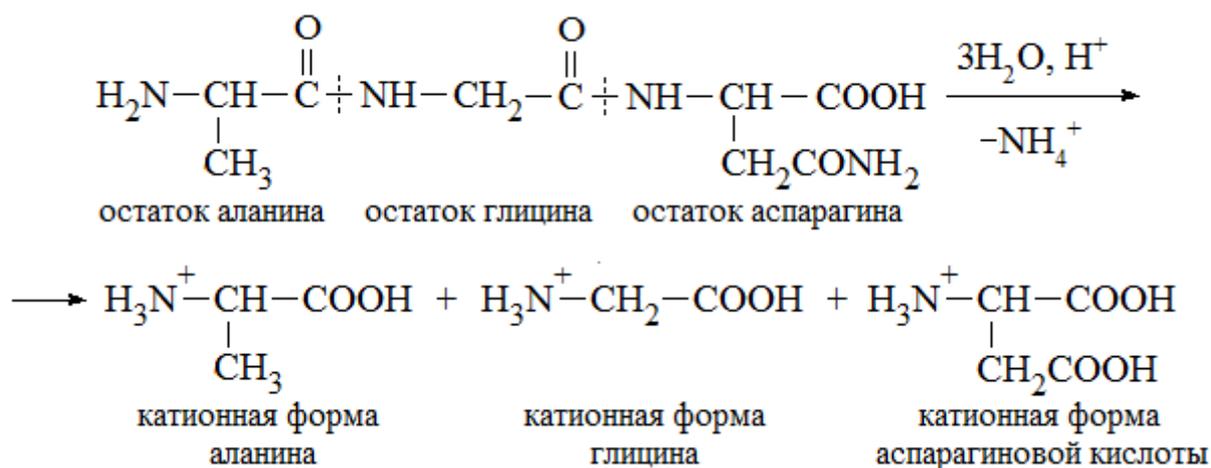
1.1.3. Установление аминокислотного состава белков

Анализ аминокислотного состава складывается из процессов гидролиза белка до индивидуальных аминокислот, деления и количественного определения продуктов гидролиза. Поскольку растворы аминокислот бесцветны, то перед количественным анализом ами-

нокислоты подвергаются модификации (дериватизации), в результате которой образуются окрашенные производные.

Полный гидролиз белков до отдельных аминокислот можно осуществить действием сильных кислот или сильных оснований, а *неполный*, в том числе селективный (по отдельным пептидным связям) – под действием протеолитических ферментов или на ионообменных смолах. Гидролиз в щелочной среде идет более быстро и глубоко по сравнению с кислотным, но сопровождается частичным разрушением цистеина, серина и треонина и рацемизацией аминокислот.

Чаще всего гидролиз осуществляют 5,7 М (~20%-ной) соляной кислотой в запаянных стеклянных ампулах (в вакууме или атмосфере азота) и нагревании при температуре 105–110°C в течение 24 ч¹. Соляная кислота должна быть тщательно перегнана над SnCl₂ и взята в 200–10 000 кратном избытке. В этих условиях аминокислоты находятся в катионной форме, а аспарагин и глутамин превращаются соответственно в аспарагиновую и глутаминовую кислоты, амидами которых они являются (такое превращение учитывают, измеряя количество образовавшегося аммиака):



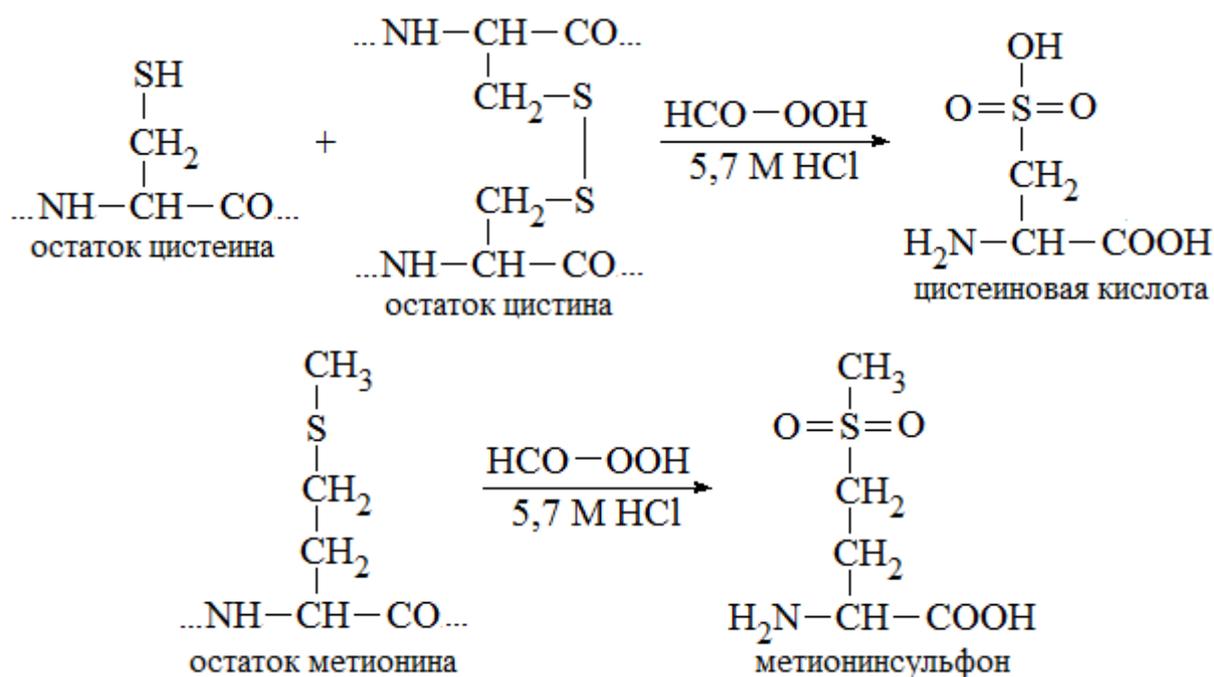
Пептидные связи остатков лейцина, изолейцина и валина (аминокислот с разветвленными радикалами, создающими стерические

¹ В других методах кислотного гидролиза используют смесь пропионовой кислоты с 12 М HCl (время реакции при 160°C 15 мин, при 130°C 2 ч), либо сульфоновые кислоты: 3 М 4-толуолсульфо кислоту или 3 М меркаптоэтансульфовую кислоту (время реакции при 110°C 24 ч). При применении последнего метода триптофан сохраняется на 95% [54, с. 38].

Более легкому гидролизу пептидных связей, образованных гидрофобными аминокислотами, способствует проведение гидролиза в смеси концентрированной HCl и сильной органической кислоты, например трифторуксусной [32, с. 123].

препятствия) оказываются наиболее устойчивыми к распаду, поэтому проводят также 48- и 72-часовой гидролиз. Однако уже в течение 24 ч кислотный гидролиз приводит к почти полному разрушению триптофана и заметной (до 10%) потере оксиаминокислот – тирозина, серина и треонина, поэтому содержание валина, лейцина и изолейцина оценивают, экстраполируя найденные значения к «бесконечному» времени, а содержание серина и треонина определяют экстраполяцией к «нулевому» времени гидролиза. Реакцию галогенирования тирозина предупреждают добавлением в ампулу фенола [32, с. 123].

Для определения триптофана гидролиз чаще всего проводят с метансульфоновой кислотой $\text{CH}_3\text{--SO}_3\text{H}$ в присутствии алкалоида триптамина, защищающего ацидофобное индольное кольцо триптофана от деструкции. Чтобы избежать превращения серосодержащих аминокислот в продукты различной степени окисления, образцы белка, содержащие цистеин, цистин и метионин, перед гидролизом обрабатывают надмуравьиной кислотой HCO--OOH . При этом образуются устойчивые к воздействию гидролитических агентов производные – цистеиновая кислота и метионинсульфон, которые и определяют в гидролизатах, пересчитывая далее результаты на соответствующие аминокислоты¹.



¹ Определение цистеиновой кислоты не позволяет судить о содержании отдельно остатков цистеина и цистина, поэтому данные аминокислотного анализа выражают в остатках «полуцистина».

Количественное разделение и определение аминокислот в гидролизатах белков обычно осуществляют методом *колоночной ионообменной хроматографии*, используя *автоматические анализаторы* (рис. 2). Неподвижной фазой (катионитом) служит сульфированная полистирольная смола, сшитая с дивинилбензолом (амберлит IR-120 и др.), а подвижной фазой – буферные растворы цитрата натрия с постепенным повышением концентрации и рН [35, с. 272–273]. Сульфогруппы носителя (SO_3^-) притягивают и связывают ионы Na^+ , содержащиеся в буфере. В начале процесса при рН ~ 3 аминокислоты переходят в катионную форму и связываются с заряженными сульфогруппами носителя, вытесняя ионы Na^+ . При промывании колонки растворами с постоянно возрастающими рН и ионной силой положительный заряд аминокислот постепенно нейтрализуется, а следовательно их связи с ионитом ослабевают и они постепенно замещаются ионами Na^+ , концентрация которых в среде постоянно возрастает. Тем самым достигается последовательное вымывание аминокислот из колонки и возможность их иден-

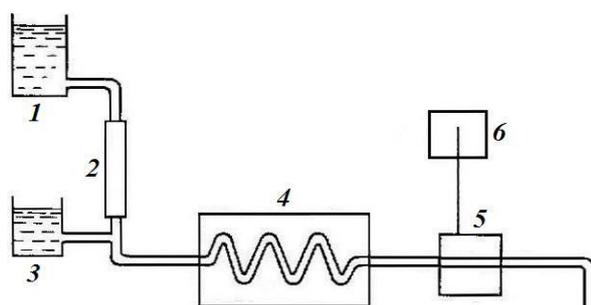
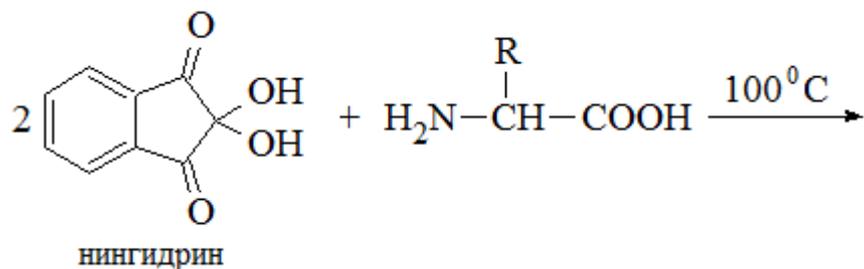
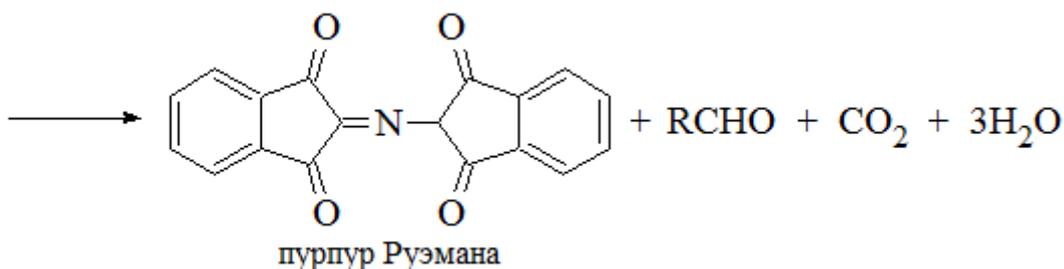


Рис. 2. Принципиальная схема аминокислотного анализатора [25, с. 16]:
 1 – элюент (буфер с переменным рН),
 2 – хроматографическая колонка,
 3 – раствор нингидрина,
 4 – термостат, 5 – детектор,
 6 – самописец (компьютер)

тификации: сначала элюируются аминокислоты, содержащие группы кислотного характера, а последними из колонки выходят основные аминокислоты – гистидин, лизин и аргинин (рис. 3).

К собранным фракциям примешивается нингидрин и смесь пропускается через термостат, в котором созданы условия (время прохождения и температура) для полного протекания реакции, схема которой упрощенно представляется следующим образом:





Аминокислоты образуют продукт сине-фиолетового цвета (так называемый пурпур Руэмана), имеющий максимум поглощения при 570 нм. Пролин и 4-гидроксипролин образуют соединение желтого цвета с максимумом поглощения при 440 нм. Эти продукты детектируются фотометрически с автоматической записью поглощения. Количество аминокислоты в элюате также автоматически рассчитывается по площади под соответствующим ей пиком на хроматограмме. Предел обнаружения аминокислот данным методом в испытуемом образце белка массой 5–10 мкг составляет 10 пмоль (для пролина – 50 пмоль).

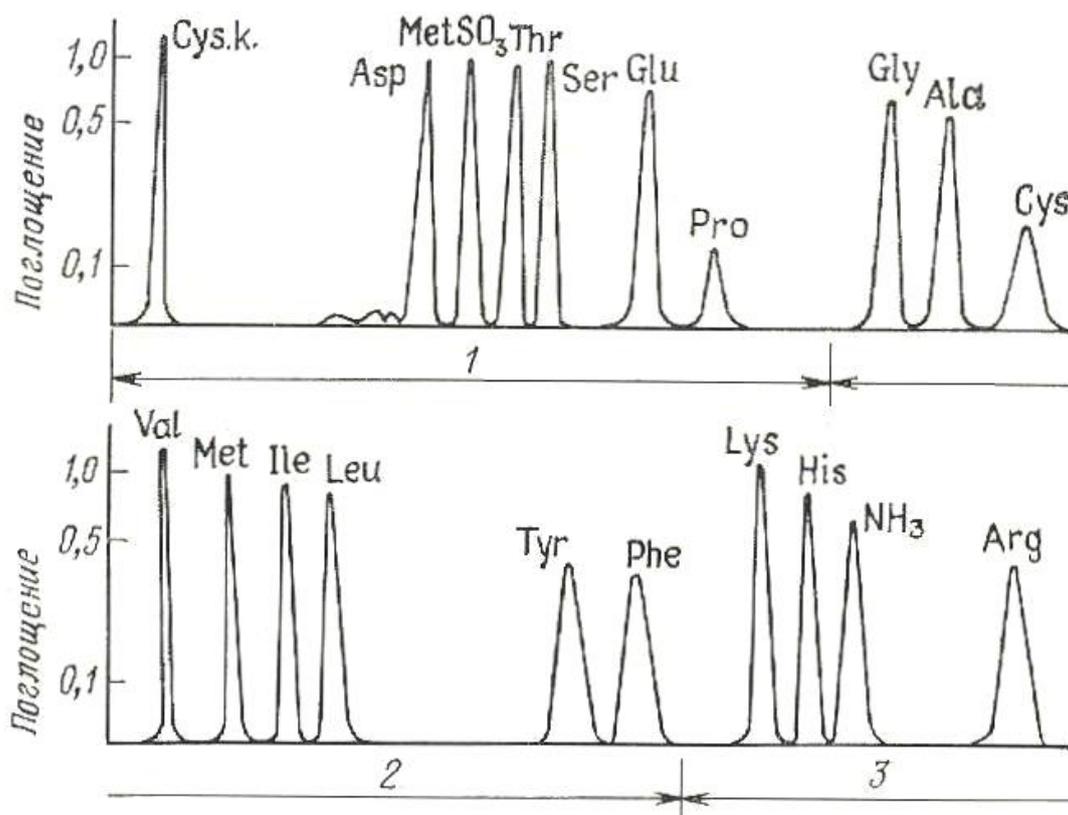
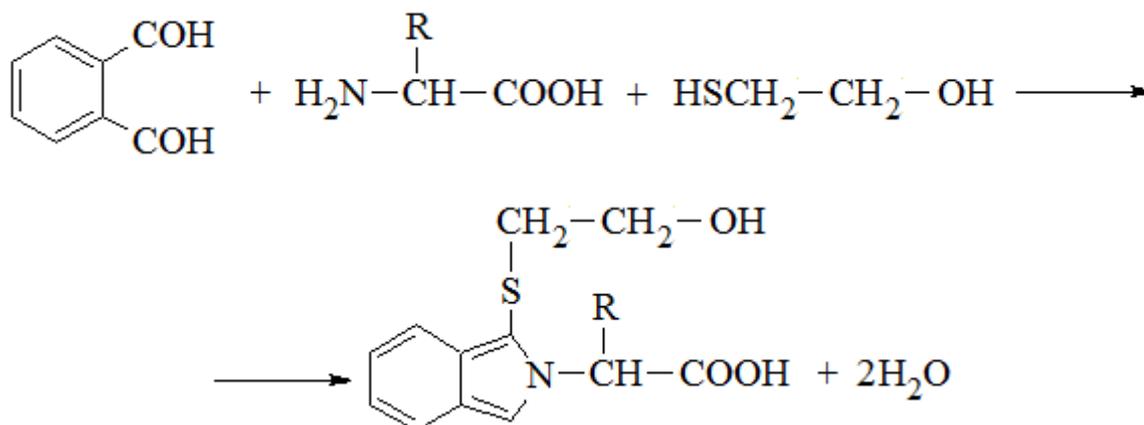


Рис. 3. Хроматограмма смеси аминокислот, полученная на автоматическом анализаторе с использованием сульфополистирольного катионита [12, с. 27]. Натрийцитратный буфер: 1) рН 3,25; 0,2 М раствор, 2) рН 4,25; 0,2 М раствор, 3) рН 5,28; 0,35 М раствор.

Примечание: Cys.k. – цистеиновая кислота, MetSO₃ – метионинсульфон

Большей чувствительностью обладает метод определения, основанный на измерении флуоресценции продукта реакции аминокислот с о-фталевым альдегидом (ОФА) в присутствии 2-меркаптоэтанола:



Интенсивность флуоресценции образующихся замещенных изоиндолов измеряют при длине волны возбуждающего света 360 нм и длине волны излучаемого света 455 нм. Метод позволяет определять аминокислоты в количестве менее 1 пмоль [35, с. 278; 38, с. 64].

Рассмотренная *постколоночная модификация* (derivatization) связана с необходимостью отдельного смешивания каждой выходящей из колонки аминокислоты с раствором реагента. Технически более простой выглядит *предколоночная дериватизация*, когда все аминокислоты обрабатываются соответствующим реагентом (о-фталевым альдегидом, фенилизотиоцианатом и др.) непосредственно после проведения гидролиза. Для разделения и анализа получаемых производных аминокислот используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на обращенно-фазных сорбентах в сочетании с различными способами детектирования – фотометрическим, флуориметрическим или масс-спектроскопическим. В ряде случаев предколоночная дериватизация уступает по воспроизводимости результатов постколоночному методу, но требует для анализа очень небольших образцов (0,5–1,0 мкг), характеризуется высокой скоростью, а предел обнаружения аминокислот при использовании специальных реактивов может быть сокращен до 10–50 фмоль [35, с. 278; 38, с. 65].

Наиболее доступным по технике выполнения для разделения аминокислот, но менее пригодным для их количественного анализа является метод *хроматографии на бумаге*, в котором используют растворитель, состоящий из водной (неподвижной) и органической (подвижной) фаз. Аминокислоты с неполярными радикалами, лучше рас-

творимые в органической фазе, чем в водной (Leu, Ile, Phe, Trp, Val, Met, Pro, Ala), перемещаются быстрее, чем аминокислоты с полярными радикалами, лучше растворимые в воде (Thr, Glu, Ser, Arg, Asp, His, Lys, Cys) [34, с. 29–31]. Для более полного разделения аминокислот можно использовать так называемую *двумерную хроматографию* (рис. 4). В этом методе разделение сначала проводят одной системой растворителей, а затем хроматограмму высушивают, поворачивают ее на 90° и хроматографируют в другой системе растворителей. Пятна отдельных аминокислот проявляют раствором нингидрина.

Для разделения аминокислот также пригоден *электрофорез*, либо комбинация методов, когда смесь в одном направлении делят электрофоретически, а затем в другом – хроматографически. Разделение аминокислот электрофорезом протекает в соответствии с их относительными зарядами (при pH 7 глутаминовая и аспарагиновая кислоты движутся к аноду, а гистидин, лизин и аргинин – к катоду).

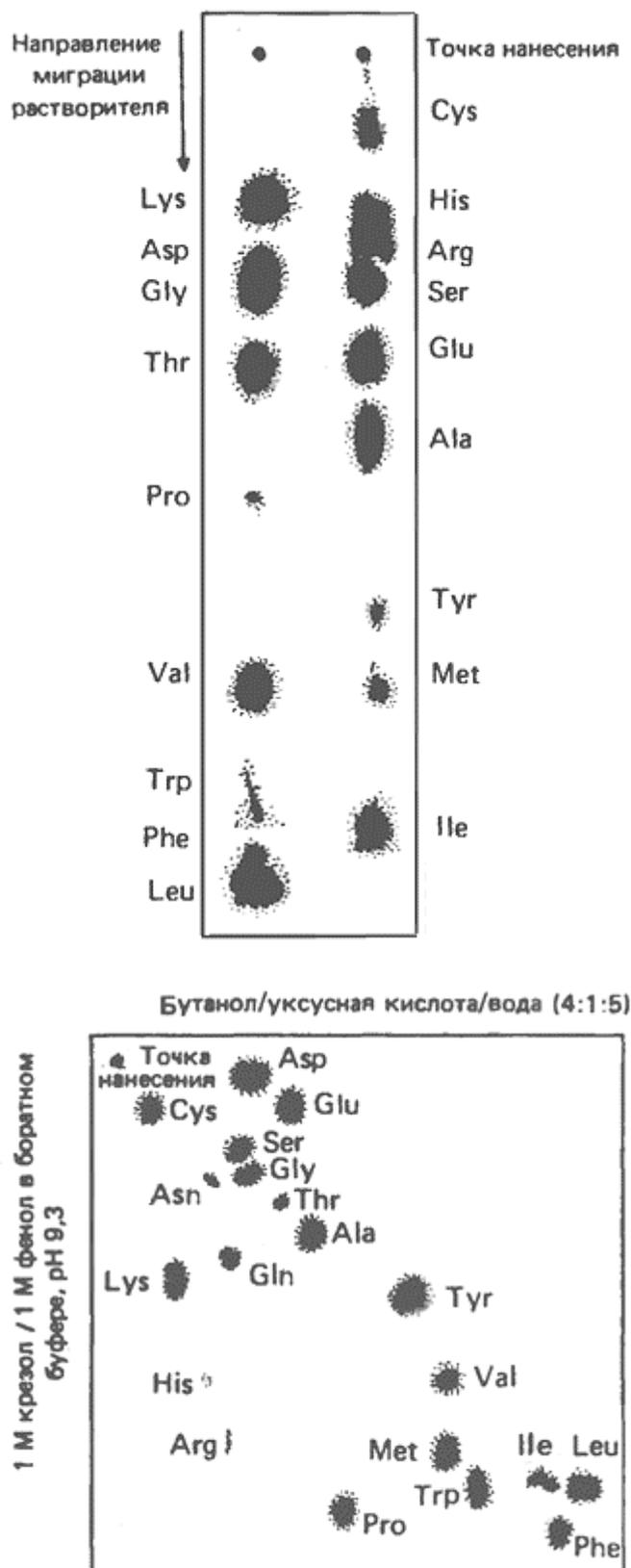
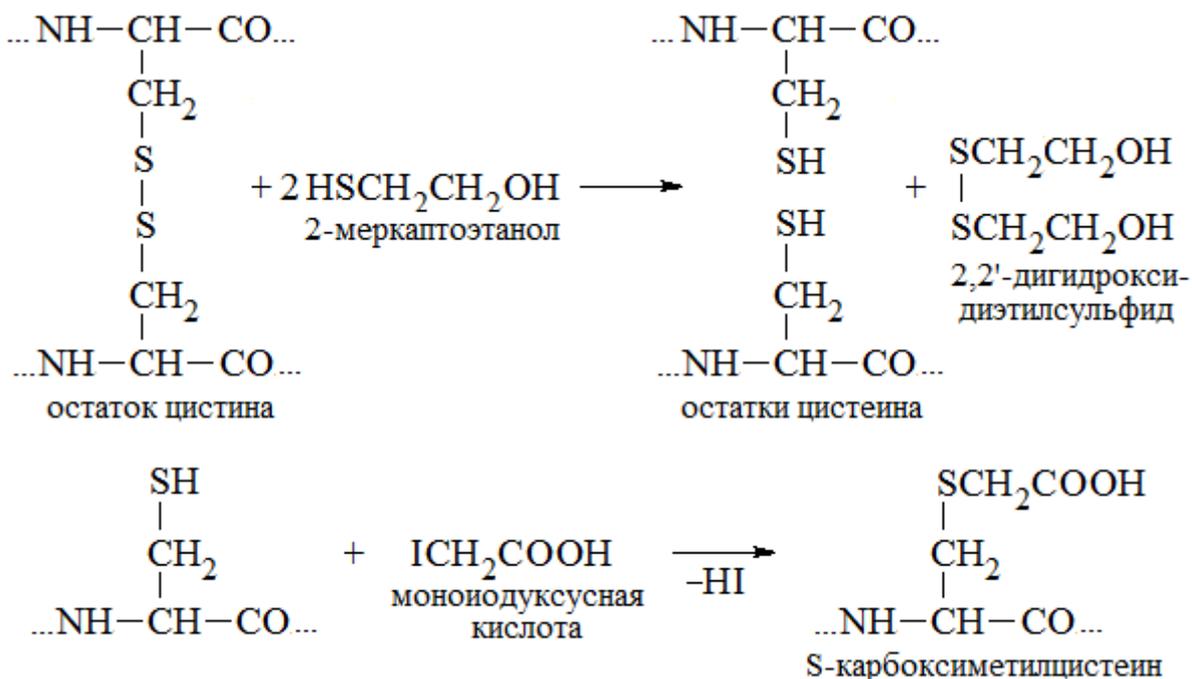


Рис. 4. Одномерная и двумерная хроматограммы смеси аминокислот [4, с. 30–31]

1.1.4. Подготовка белка к секвенированию

Решение задачи по анализу первичной структуры предваряется минимизацией влияния других, более высоких уровней организации белковой макромолекулы. Для этого белок должен быть подвергнут глубокой денатурации с разрушением четвертичной, третичной и по возможности вторичной структуры.

Расщепление дисульфидных связей можно осуществить восстановлением их меркаптосоединениями и последующим алкилированием с образованием устойчивого S-карбоксиметилцистеина. Реакцию проводят в условиях, обеспечивающих денатурацию белка (в 8 М растворе мочевины или в 6 М гидрохлориде гуанидина при pH 8–9):



Несмотря на совершенствование автоматических методов определения первичной структуры, даже в благоприятных случаях редко удается в одной цепи за один прием определить последовательность более чем 50 аминокислотных остатков. Этого достаточно для исследования небольших белков, в остальных же случаях необходимо прибегать к *фрагментации полипептидной цепи* до пептидов или небольших белков. Определение их строения и сопоставление полученных данных на заключительном этапе исследования приводят к установлению последовательности аминокислот всей полипептидной цепи белка. Для специфического расщепления полипептидной цепи используют ферментативные и химические методы.

Наиболее специфичные ферменты (протеазы) преимущественно гидролизуют пептидные связи, образованные остатками основных (Lys, Arg) или кислых (Glu) аминокислот. Одной из доступных и широко используемых протеаз является фермент поджелудочной железы *трипсин*. Гидролиз трипсином проводят при pH~8, температуре 37°C и соотношении фермент – субстрат 1:100 в течение 1–4 ч [35, с. 148]. Все большее применение также находят высокоспецифичные эндопротеазы Glu–C из *Staphylococcus aureus*, Lys–C из *Lysobacter enzymogenes* и Arg–C из подчелюстной железы мыши (табл. 2).

Меньшей специфичностью характеризуются гомологичный трипсину фермент *химотрипсин* и металлопротеаза *термолизин*, секретируемая клетками термофильной бактерии *Vacillus amyloliquefaciens*. Химотрипсин гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот, а также лейцина. Термолизин важен тем, что сохраняет активность при 60–80°C и преимущественно гидролизует пептидные связи, образованные с участием аминокислот гидрофобных аминокислот [38, с. 69].

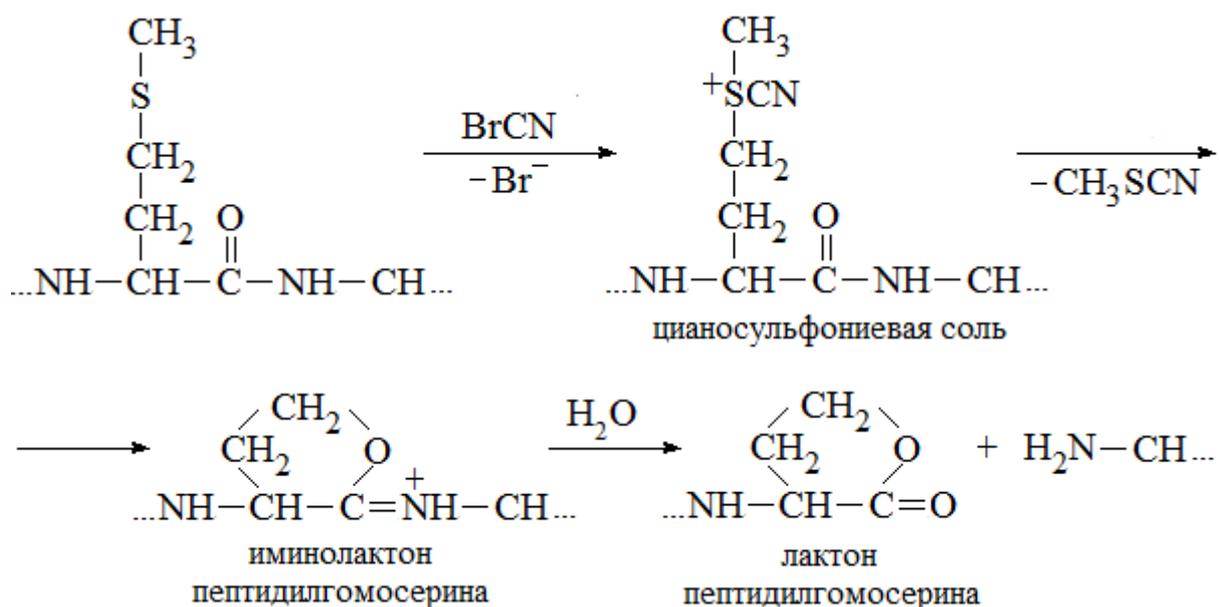
Таблица 2

Специфическая активность некоторых ферментов при расщеплении полипептидных цепей [35, с. 136–138]

Фермент	Оптимум pH	Преимущественно гидролизуемые связи (↓)	Незатрагиваемые связи (↕)
Трипсин	8,0	–Arg↓X–, –Lys↓X–	–Lys↕Pro–
Эндопротеазы Glu–C	4,0 и 7,8	–Glu↓X–, –Asp↓X–	–Glu↕Pro–, –Glu↕Glu–
Эндопротеазы Lys–C	8,5–8,8	–X↓Lys–	–
Эндопротеазы Arg–C	7,5–8,0	–Arg↓X–	–
Химотрипсин	8,0	–H↓X–, X = Phe, Tyr, Trp, Leu	–H↕Pro–
Термолизин	7,0–8,0	–X↓H–, X = Leu, Phe, Tyr, Val, Ile, Trp	–X↕H–Pro–

Наибольшее распространение среди химических методов фрагментации полипептидных цепей получило расщепление бромацианом

BrCN пептидных связей, образованных с участием карбоксильной группы остатков метионина. Реакция идет через стадию образования промежуточной цианосульфониевой соли, от которой путем отщепления метилтиоцианата CH_3SCN образуется фрагмент, содержащий остаток иминолактона гомосерина¹. При его гидролизе образуется пептид с лактоном гомосерина на С-конце и остаток аминокислоты, следующей за метионином:



Лактон можно гидролизовать в течение 1 ч 0,1 М NaOH в гомосерин. Метод расщепления бромцианом характеризуется высокой избирательностью; затруднения встречаются лишь, когда за остатком метионина следуют серин или треонин [35, с. 98–99].

Ограниченное применение находят и другие химические методы фрагментации белковых цепей, например расщепление пептидных связей триптофана N-бромсукцинимидом и расщепление связей Asp–Pro при выдерживании белка в кислых растворах в довольно мягких условиях (10% CH_3COOH + пиридин, pH 2,5, 40°C, 4 сут).

Выделение образовавшихся фрагментов и их очистка традиционно считалась одной из самых сложных стадий анализа первичной структуры. Она основывалась на комбинации различных способов: ионообменной хроматографии на сульфополистирольных катионитах, гель-фильтрации, высоковольтного электрофореза на бумаге, тонко-слойной хроматографии. Современные методы – ионообменная хро-

¹ Гомосерин $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ – непотеиногенная аминокислота, гомолог серина (имеет дополнительную группу $-\text{CH}_2-$) и структурный изомер треонина.

матография на мелкозернистых ионитах при давлениях ~20 атм и ВЭЖХ на обращенно-фазных сорбентах (частицах кремнезема) с использованием давления ~100 атм и градиента концентрации органических растворителей – обладают высокой разрешающей способностью, позволяют резко сократить число стадий выделения индивидуальных пептидов, снизить их потери и перейти к анализу первичной структуры очень малых (порядка сотен наномоль) количеств белка.

1.1.5. Определение концевых групп

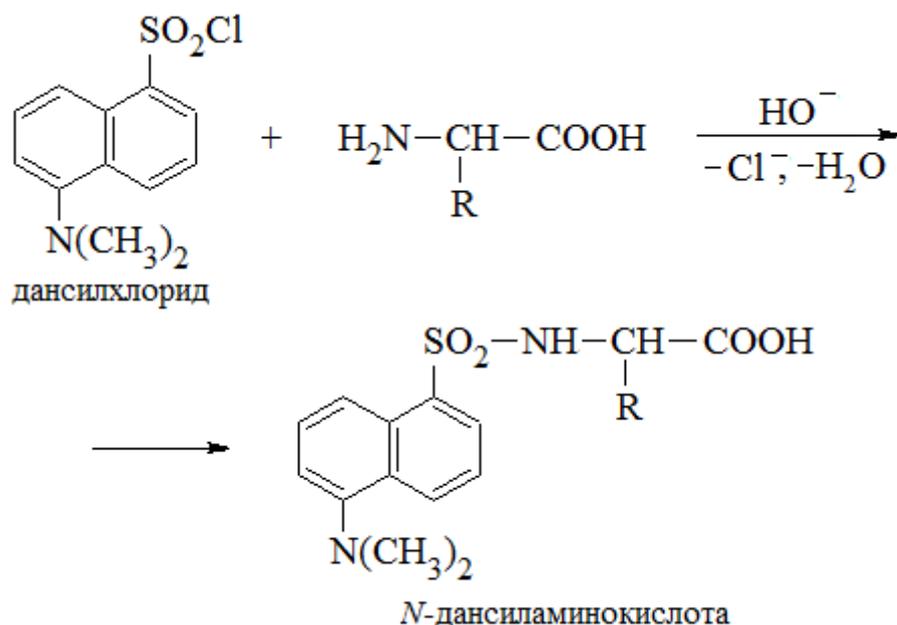
Непосредственный анализ первичной структуры начинается с установления структуры аминокислотного остатка со свободной аминогруппой (*N*-конца полипептидной цепи) и остатка со свободной карбоксильной группы (*C*-конца).

Классическим методом определения *N*-концевых групп является введение динитрофенильного (ДНФ) остатка в аминогруппу – *реакция Сенгера*:



Следует отметить, что с динитрофторобензолом реагируют обе аминогруппы лизина, а также ОН-группы гидроксиаминокислот и SH-группы цистеина [28, с. 594]. Окрашенные в желтый цвет ДНФ-производные анализируют хроматографическими методами. Количественное определение можно провести фотометрически при 360 нм (для ДНФ-пролина при 385 нм, $\epsilon \sim 15\,000$).

В настоящее время чаще используется *метод Грея и Хартли* – получение дансильных производных, которые образуются при действии на аминокислоты дансилхлорида (5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорида):



Дансиламинокислоты обладают интенсивной флуоресценцией в УФ-области спектра (при 254 или 365 нм), что позволяет обнаруживать их в количестве до 10^{-11} моль (порядка 0,001 мкг) [28, с. 593].

C-концевые группы определяют химическим путем (гидразинолизом) или ферментативным методом.

Гидразинолиз (метод Акабори) осуществляется кипячением пептида или белка с безводным гидразином (100°C , 5 ч), в результате чего аминокислотные остатки превращаются в гидразиды, а незатронутой остается только карбоксильная группа концевой аминокислоты. Для идентификации C-концевую аминокислоту можно извлечь из смеси гидразидов ионообменной хроматографией [35, с. 493–494].



Этим методом не могут быть определены *C*-концевые цистеин, глутамин, аспарагин и триптофан [54, с. 368].

Ферментативный метод основан на последовательном отщеплении *C*-концевой аминокислоты под действием карбоксипептидаз и позволяет не только идентифицировать *C*-концевой остаток, но и определить *C*-концевую последовательность небольшой длины (из 5–10 аминокислотных остатков). Для реализации метода можно использовать *карбоксипептидазы А* и *В* – ферменты поджелудочной железы животных, а также *карбоксипептидазу У* (от англ. *yeasts* – «дрожжи»), содержащуюся в клетках дрожжей. Карбоксипептидаза *У* обладает наиболее широкой специфичностью среди данной группы, отщепляя почти любые аминокислотные остатки (в том числе и остатки пролина) от карбоксильного конца полипептидной цепи. Карбоксипептидазы *А* и *В* активны в слабощелочной и нейтральной средах, наиболее легко отщепляют гидрофобные аминокислоты, но вовсе не отщепляют пролин. Карбоксипептидаза *А*, в отличие от карбоксипептидазы *В*, также не отщепляет остатки аргинина и лизина [38, с. 73–74].

Поскольку ферменты отщепляют все концевые аминокислоты (не только те, что имеются в исходном белке, но и вновь образующиеся после отщепления), то определить структуру *C*-концевой аминокислоты в исходной полипептидной цепи можно по скорости ее накопления или по количеству образовавшейся аминокислоты в начальный момент времени. В идеальном случае с максимальной скоростью будет накапливаться аминокислота, являющаяся *C*-концевой в исходном белке, с меньшими скоростями – вторая со стороны *C*-конца, третья и т. д. аминокислоты, но в то же время анализ результатов процесса осложняется различиями в скорости отщепления аминокислот. Поскольку гидрофобные аминокислоты легко отщепляются карбоксипептидазой *А*, то их количество нередко оказывается почти таким же, как и содержание ранее отщепившихся гидрофильных остатков, пептидные связи которых гидролизуются гораздо медленнее.

1.1.6. Определение последовательности аминокислот

Основным химическим методом определения аминокислотной последовательности является разработанный в 1950–1956 г.г. швед-

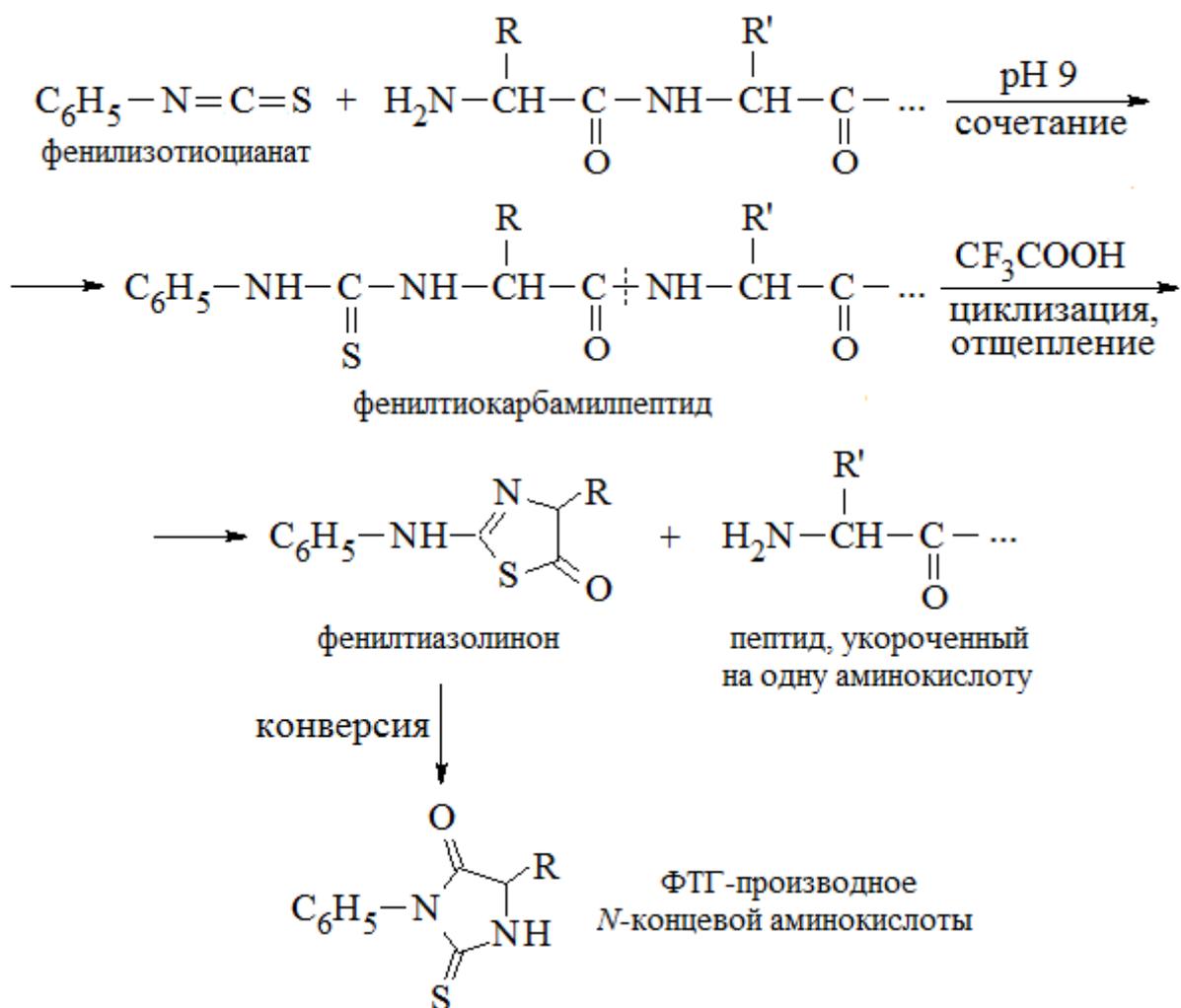
ским биохимиком Пэром Виктором Эдманом метод деградации цепи с помощью фенилизотиоцианата (ФИТЦ) с образованием фенилтиогидантоиновых производных α -аминокислот (ФТГ-производных).

Процесс секвенирования включает в себя несколько реакций:

1) сочетание – при взаимодействии пептида с ФИТЦ в щелочной среде образуется фенилтиокарбамилпептид (ФТК-производное);

2) циклизация и отщепление – ФТК-производное при воздействии безводной трифторуксусной кислоты расщепляется на циклический фенилтиазаолинон (производное *N*-концевого остатка) и пептид, укороченный на одну аминокислоту;

3) конверсия – отделенный от остаточного пептида неустойчивый фенилтиазаолинон в условиях более жесткой кислотной обработки переходит в стабильное ФТГ-производное:



Образовавшийся после отщепления *N*-концевого остатка укороченный пептид вновь обрабатывают фенилизотиоцианатом и подвергают далее такому же циклу превращений, отщепляя на этом шаге

вторую аминокислоту, считая с аминного конца. Повторение циклов приводит к ступенчатому отщеплению последующих аминокислотных остатков. ФТГ-производные идентифицируются методами тонкослойной хроматографии или ВЭЖХ. Детектирование этих производных основывается на их способности к поглощению в УФ-области спектра ($\lambda_{\max} = 268\text{--}270$ нм, $\epsilon \sim 16\ 000$) [29, с. 211].

Достаточная воспроизводимость метода позволяет использовать его в автоматическом *секвенаторе* (рис. 5), с помощью которого можно за один опыт осуществить около 50 стадий расщепления.

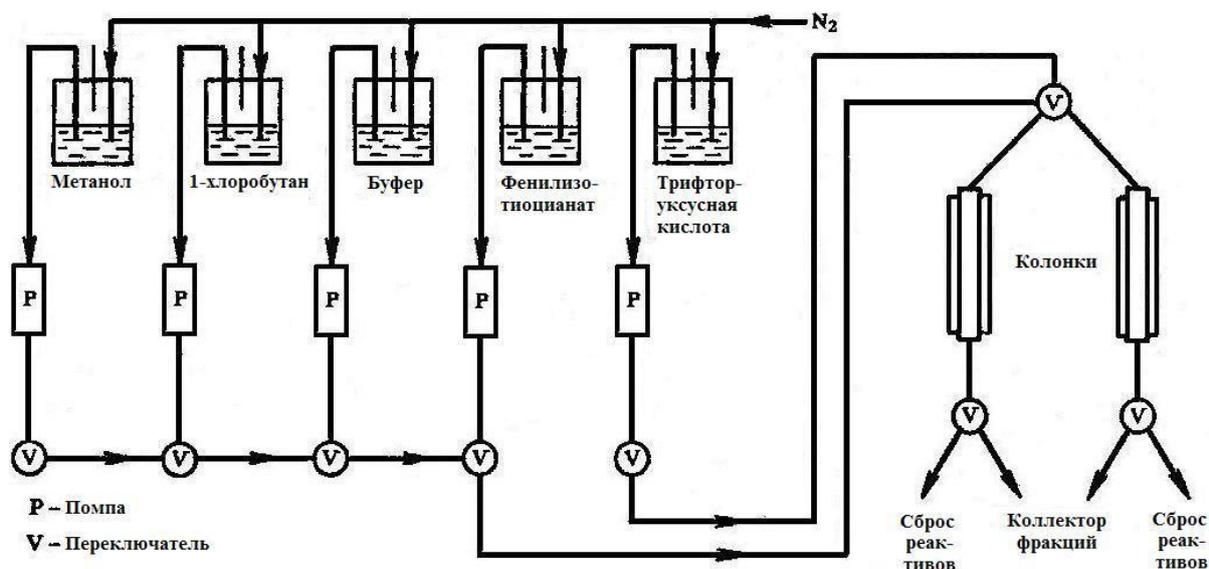


Рис. 5. Принципиальная схема секвенатора [44, с. 57]

Процесс проводят во вращающемся реакционном сосуде, внутреннее пространство которого заполняют инертным газом. Вращение обеспечивает распределение пептида на внутренних стенках сосуда в виде тонкого слоя. Требуемые реактивы (фенилизотиоцианат, трифторуксусную или аналогичную по свойствам, но более высококипящую гептафтормасляную кислоту) подводят по трубкам на дно реактора; под действием вращения они поднимаются вверх по слою пептида. Затем внутрь сосуда подают растворители (метанол, хлоробутан) для вымывания избытка реагентов и экстракции отщепившегося фенилтиазолинона. Экстракт отводят из реакционного сосуда и в отдельной операции превращают фенилтиазолинон в фенилтиогидантоин. Укороченный пептид остается в виде пленки на стенке сосуда, подготовленный к дальнейшему отщеплению. Все операции, включая

подачу реагентов и промывание осадка пептида, осуществляются в автоматическом режиме.

В современных секвенаторах процессы ступенчатого отщепления могут осуществляться в твердой или газовой фазе, что позволяет снизить потери остаточного пептида за счет его растворения в используемых реагентах. В первом случае пептиды посредством своих карбоксильных групп закрепляются на инертном носителе (например, на содержащем аминогруппы стекле), к которому в нужной последовательности подводят требуемые реактивы; во втором пептид сорбируют на пористой подложке и обрабатывают его парами реагентов.

1.1.7. Сравнение последовательностей перекрывающихся пептидов

Как уже отмечалось, заключительным этапом исследования первичной структуры является воссоздание последовательности, в которой просеквенированные пептиды располагались в исходном белке. Для этого применяют *метод перекрывающихся блоков*, схема которого показана на рис. 6. Если сравнить последовательности пептидов, полученные в результате разрыва белковой цепи в различных местах, например, с использованием трипсина (X и Y) и химотрипсина (Z), то в случае перекрывания последовательности пептида Z с последовательностями пептидов X и Y можно сделать вывод, что в исходном белке они располагались в порядке X → Y, но не Y → X. Вероятность того, что один из перекрываемых пептидом Z концевых фрагментов встречается у двух или нескольких пептидов, как правило, невелика, но если это происходит, приходится прибегать к еще одному варианту расщепления.

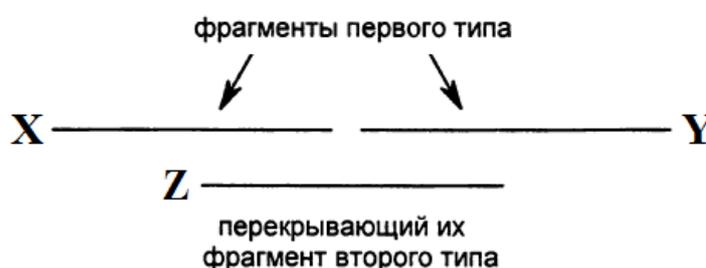


Рис. 6. Перекрывающиеся пептиды [15, с. 78]

В табл. 3 приведены определенные методом Эдмана структуры пептидов, полученных расщеплением рибосомального белка L32 двумя методами (А и В). Нумерация пептидов каждой группы осуществлена условно, в порядке уменьшения длины.

**Структуры фрагментов, полученных при расщеплении
рибосомального белка L32 [14, с. 337]**

Фрагменты, полученные методом А (А-пептиды)	
1	CAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVW
2	LVHNVKELEVLLMCNKSY
3	MAALRPLVKPKIVKKPW
4	RKPRGIDNRVRRRF
5	NPNARLRSEENE
6	KGQILMPNIGY
7	KHMLPSGF
8	IRHQSDRY
9	VKIKRNV
10	GSNKKV
11	RKF
12	KKF
Фрагменты, полученные методом В (В-пептиды)	
1	MAALRPLVKPKIVKKPWKKFIRHQSDRYVKIKRNVKPRGIDNRVRRRF KGQILM
2	CNKSYCAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVWNPANARLRSEENE
3	LPSGFRKFLVHNVKELEVLLM
4	PNIGYGSNKKVKHM

N-концевые группы всех А-пептидов отличаются от *N*-концевых групп В-пептидов, поскольку использованные для расщепления ферменты действовали по разным аминокислотным остаткам. Исключение составляют пептиды, полученные из *N*-конца исходной цепи, которые должны иметь одинаковое начало. Таковыми в табл. 3 являются пептиды А-3 и В-1. При этом в состав В-1 полностью входят пептиды А-3, А-12, А-8, А-9 и А-4. В дополнение к этому пептид В-1 содержит остаток KGQILM, из чего следует, что пептид серии А, прилегающий с *C*-конца к В-1, должен начинаться с этой же последовательности. Таковым в приведенной серии является пептид А-6. Вторая часть этого пептида (PNIGY) является *N*-концевой частью пептида В-4, а его остаток GSNKKVKHM включает в себя пептид А-10 и часть пептида А-7, которая перекрывается с пептидом В-3. В свою очередь В-3 содержит целиком А-11 и начало А-2; В-2 содержит конец А-2, а также А-1 и А-5.

Таким образом, последовательность аминокислот в исходной полипептидной цепи имеет вид:

MAALRPLVKPKIVKKPWKKFIRHQSDRYVKIKRNVRKPRGIDNRV
RRRFKGGQILMPNIGYGSNKKVKHMLPSGFRKFLVHNVKELEVLLM
CNKSYCAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVWNPARNLRSEENE

(A-3, A-12, A-8, A-9, A-4, A-6, A-10, A-7, A-11, A-2, A-1, A-5,
или B-1, B-4, B-3, B-2).

Контрольные вопросы

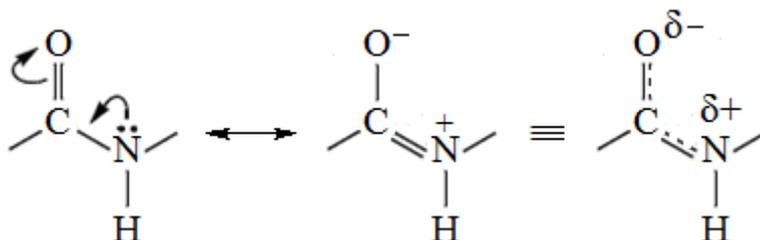
1. Дайте определение пептидам и белкам. Как образуются пептидные связи? Что называется первичной структурой белка?
2. Какова общая формула аминокислот? В каком виде они существуют в условиях организма? Что такое изоэлектрическая точка?
3. На какие группы можно разделить аминокислоты в зависимости от физико-химических свойств их радикалов?
4. Приведите примеры модифицированных аминокислот.
5. В чем заключается косвенное секвенирование белков и каковы ограничения этого метода?
6. Из каких стадий складывается определение первичной структуры белка физико-химическими методами?
7. В каких условиях проводится полный гидролиз белка?
8. Как осуществляется разделение и количественное определение аминокислот в белковых гидролизатах с помощью автоматических анализаторов?
9. С какой целью проводится химическая модификация (дериватизация) аминокислот? В чем состоят преимущества и недостатки методов постколоночной и предколоночной дериватизации?
10. Какими методами осуществляется фрагментация полипептидных цепей?
11. Какие методы используются для определения *N*-концевых групп полипептидной цепи?
12. Какие методы используются для определения *C*-концевых групп полипептидной цепи?
13. На каких реакциях основан метод Эдмана?
14. Каково устройство секвенаторов?
15. В чем заключается метод перекрывающихся блоков?

1.2. ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Вторичная структура – это пространственное (конформационное) расположение отдельных участков главной цепи молекулы белка, без учета расположения боковых цепей (радикалов аминокислотных остатков). Формирование вторичной структуры во многом определяется особенностями электронного и пространственного строения важнейшего звена первичной структуры – пептидной группы.

1.2.1. Строение пептидной группы. Стерические ограничения

В пептидной группе $-\text{CONH}-$ атомы углерода, азота и кислорода находятся в состоянии sp^2 -гибридизации и лежат в одной плоскости. Неподеленная пара электронов атома азота вступает в сопряжение с π -электронами двойной связи $\text{C}=\text{O}$, за счет чего атом азота становится частично двоевязанным. Это проявляется в некотором выравнивании длин связей: связь $\text{C}=\text{O}$ удлиняется до 0,124 нм против обычной длины 0,121 нм в альдегидах и кетонах, а связь $\text{C}-\text{N}$ становится короче – 0,132 нм по сравнению с 0,147 нм в обычном случае [29, с. 218–219].



Поскольку связь $\text{C}-\text{N}$ в пептидной группе имеет характер частично двойной, вращение заместителей вокруг нее сильно ограничено (барьер вращения составляет 63–84 кДж/моль) и она задает достаточно жесткую плоскую структуру пептидной группы.

Плоскостная геометрия пептидной группы и затрудненность вращения вокруг связи $\text{C}-\text{N}$ делают возможным существование *цис*- и *транс*-изомеров (рис. 7). Более предпочтительной является *транс*-конфигурация, в которой реализована наибольшая пространственная удаленность радикалов аминокислотных остатков. Появление *цис*-конфигурации в белках вероятно лишь в местах локализации пролина и 4-гидроксипролина, у которых оба изомера оказываются примерно одинаково энергетически выгодными [38, с. 82].

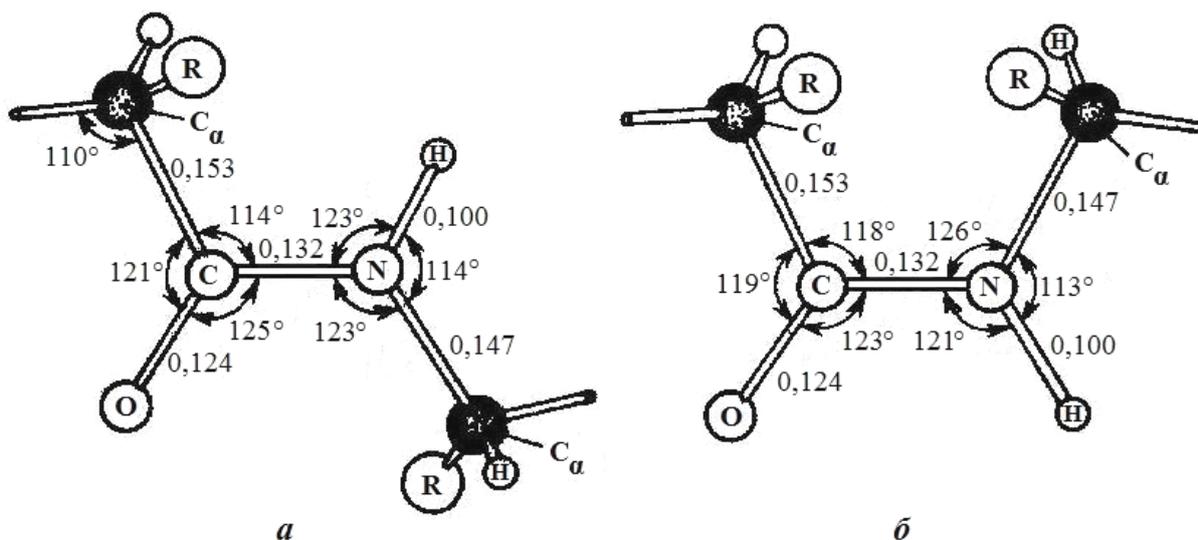


Рис. 7. Структура пептидной связи [38, с. 81]:

a – типичная *транс*-конфигурация (C_{α} -атомы расположены по разные стороны пептидной связи $C-N$), *б* – редко встречающаяся *цис*-конфигурация (C_{α} -атомы расположены по одну сторону связи $C-N$). Длины связей указаны в нанометрах

Плоскости пептидных групп в полипептидной цепи расположены под углом друг к другу, соединяясь между собой через C_{α} -атомы (рис. 8). Вращение вокруг связей C_{α} -атома с азотом ($N-C_{\alpha}$) и углеродом карбонильной группы ($C_{\alpha}-C$) не запрещено, т. е. C_{α} служат своего рода шарнирами, обеспечивающими лабильность полипептидной цепи.

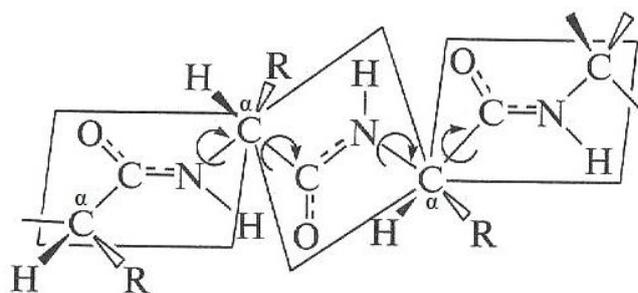


Рис. 8. Пространственное расположение плоскостей пептидных групп в полипептидной цепи [11, с. 288]

Чередование жестких плоскостей с подвижными «шарнирными» участками в конечном счете и позволяет полипептидной цепи образовывать вторичные структуры.

Взаимное расположение плоскостей пептидных групп, как и всякое взаимное расположение двух плоскостей,

можно определить двумя углами. Двугранный (торсионный) угол вращения вокруг связи $N-C_{\alpha}$ обозначается через ϕ , а угол вращения вокруг связи $C_{\alpha}-C$ – через ψ . Несмотря на то, что принципиально возможны любые значения этих углов, не все конформации, образующиеся в результате вращения вокруг связей $N-C_{\alpha}$ и $C_{\alpha}-C$ одинаково устойчивы, поскольку сближение в пространстве атомов, особенно

объемистых (кислорода, углерода, азота) приводит к их взаимному отталкиванию, на преодоление которого требуются значительные затраты энергии. Значения углов ϕ и ψ для какого-либо аминокислотного остатка характеризует его положение во вторичной структуре, а значения для всей аминокислотной последовательности определяют свертывание белка в пространстве.

Для отсчета угла ϕ наблюдатель смотрит вдоль связи $N-C_\alpha$ (рис. 9). При $\phi = 0^\circ$ примыкающие к ней связи $C_\alpha-C$ и $N-C_{(-1)}$ будут закрывать одна другую, а при $\phi = \pm 180^\circ$ находиться в наиболее удаленных друг от друга положениях. Первый случай соответствует *заслоненной (цисоидной) конформации*, а второй – наиболее энергетически выгодной *заторможенной (трансоидной) конформации*. Перейти от трансоидной к цисоидной конформации можно вращением связи $N-C_{(-1)}$ вокруг связи $N-C_\alpha$. При вращении по часовой стрелке угол ϕ считается положительным, а при вращении против часовой стрелки – отрицательным. Аналогично ψ определяется поворотом связи $C_\alpha-N$ вокруг связи $C_\alpha-C$. Когда примыкающие к последней связи $C_\alpha-N$ и $C-N_{(+1)}$ закрывают одна другую, то $\psi = 0^\circ$ и имеет место заслоненная конформация, а трансоидной конформации соответствует $\psi = \pm 180^\circ$.

Способом описания стереохимии аминокислотных остатков являются *конформационные (стерические) карты*, предложенные в 1963 г. индийским биофизиком Г. Н. Рамачандраном и его коллегами на основе расчета потенциальной энергии как функции углов ϕ и ψ . Карта Рамачандрана изображается в виде квадрата, по одной стороне которого отложены значения ϕ , а по другой – значения ψ (от -180° до $+180^\circ$), горизонталы представляют собой изоэнергетические линии (рис. 10). Долины и впадины (затемненные области) соответствуют

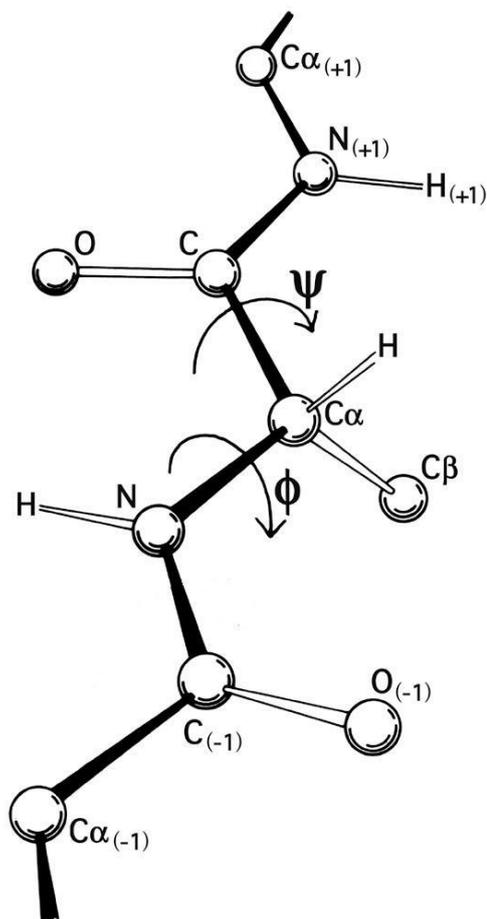


Рис. 9. Двугранные углы полипептидной цепи [38, с. 83]

наиболее выгодным конформациям аминокислотных остатков, характеризующимся минимальными значениями потенциальной энергии, а гребни, хребты отвечают наименее выгодным конформациям.

На карте Рамачандрана для пары пептидных звеньев с остатком глицина между ними (рис. 10, а) можно видеть крестообразную возвышенность вдоль значений ϕ и ψ , близких к 0° , что соответствует неблагоприятной заслоненной конформации и обширные понижения, охватывающие не менее половины общей поверхности, которые соответствуют разрешенным областям.

Карта Рамачандрана для аланина (рис. 10, б) демонстрирует, что появление даже небольшого заместителя у C_α -атома накладывает значительные ограничения на конформационную свободу аминокислотных остатков. В достаточном приближении эта карта верна и для других аминокислот, поскольку дальнейшие усложнения боковых радикалов происходят сравнительно далеко от главной цепи и мало влияют на выбор ею оптимальной конформации. На карте можно выделить две впадины, отвечающие оптимальным сочетаниям ϕ и ψ , т. е. стабильным конформациям: правой – закрученной против часовой стрелки – α -спирали (α_R), β -структурам – параллельной ($\beta\uparrow\uparrow$) и антипараллельной ($\beta\uparrow\downarrow$) и полипролиновой спирали (PolyPro). Небольшое понижение в правой верхней части карты соответствует крайне редкой левой α -спирали (α_L). Другие практически не встречающиеся конформации (3_{10} -, π -спирали) лежат на краях разрешенных областей, где уже возрастают стерические напряжения [38, с. 85; 45, с. 38–39].

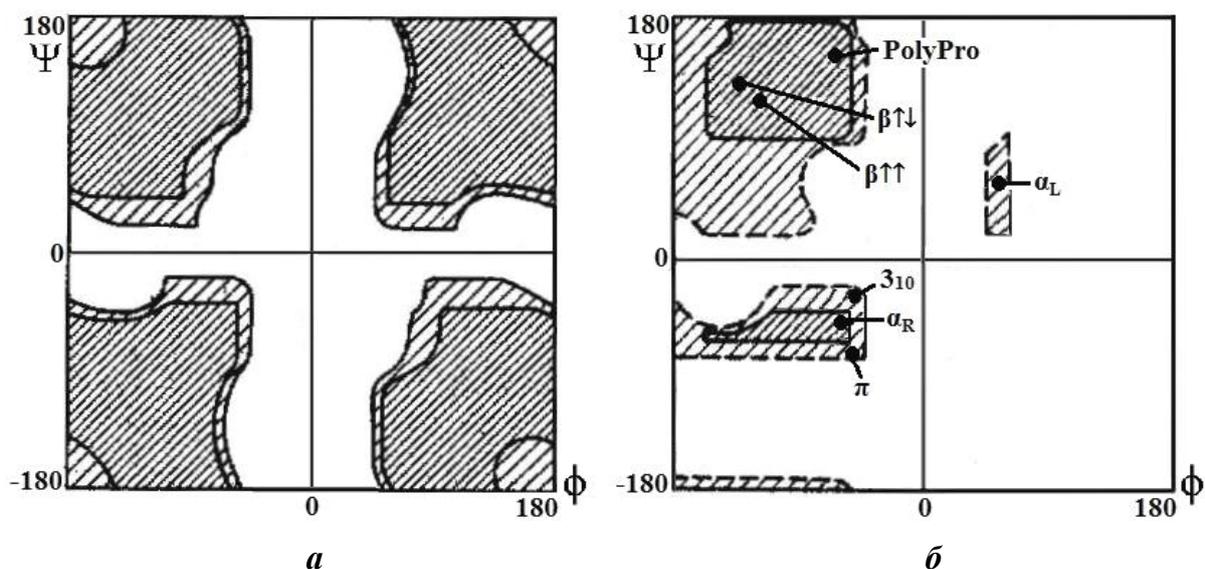


Рис. 10. Карты Рамачандрана для глицина и L-аланина [38, с. 85; 21, с. 90]

1.2.2. α -Спираль

В 1951 г. американские химики Лайнус Полинг, Роберт Кори и Герман Брэнсон, опираясь на данные рентгеноструктурного анализа, теоретически рассчитали структуру, названную ими α -спиралью (рис. 11). Она имеет радиус 0,23 нм, на один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, что соответствует шагу (расстоянию между витками) 0,54 нм и означает полную периодичность на пяти витках (2,7 нм) через каждые 18 остатков. В природных белках существуют только правозакрученные α -спирали, что связано с наличием в них аминокислот L-ряда. Для идеальной α_R -спирали $\varphi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$.

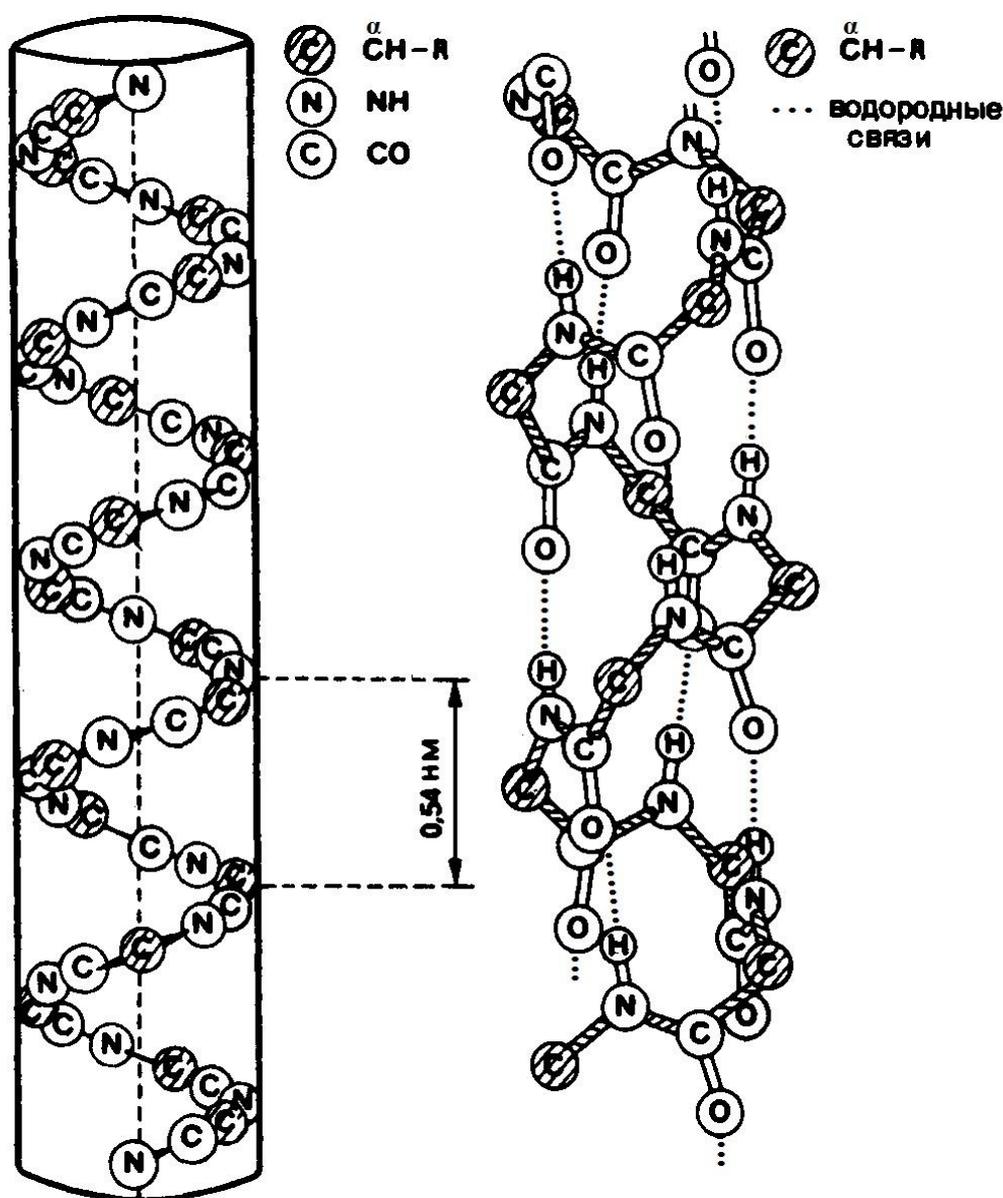
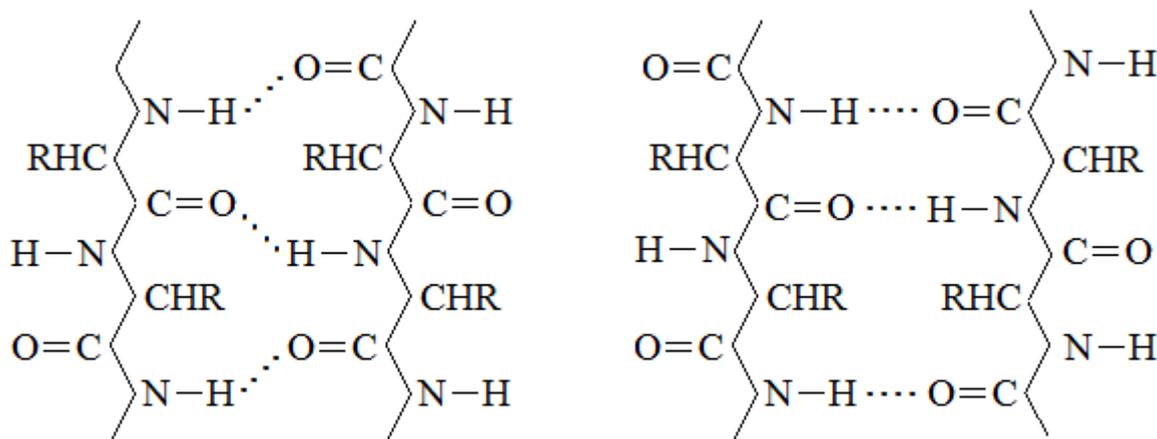


Рис. 11. Структура α -спирали [54, с. 379]

спирали стабилизация β -структур осуществляется путем образования водородных связей между соседними отрезками полипептидной цепи или между несколькими полипептидными цепями.

Существуют два варианта β -структур: параллельные и антипараллельные. Соединение водородными связями отрезков параллельной β -структуры приводит к формированию циклов из 12 атомов, а если водородные связи образуются между противоположно направленными (антипараллельными) пептидными группами соседних отрезков, то возникает чередование 8- и 14-членных циклов.



параллельная β -структура

антипараллельная β -структура

Если α -спираль насыщена водородными связями и поэтому не способна взаимодействовать с другими участками белка на уровне вторичной структуры, то каждый отрезок полипептидной цепи в β -структуре открыт для формирования более протяженной системы водородных связей. Протяженная β -структура названа β -слоем, или *складчатым листом* (рис. 14). Чаще всего она состоит из 2–6 цепей, хотя их число может достигать и десяти. Поверхность β -слоя редко является абсолютно плоской, а чаще всего имеет левую закрученность, что сказывается на величине углов ϕ и ψ . Если в плоской, растянутой структуре они должны были бы составлять $\pm 180^\circ$, то в реальных β -структурах они имеют значения $\phi = -119^\circ$, $\psi = 113^\circ$ для параллельной β -структуры и $\phi = -139^\circ$, $\psi = 135^\circ$ для антипараллельной.

Боковые заместители располагаются по разные стороны поверхности β -слоя. Гидрофобные поверхности β -слоя, взаимодействуя между собой или с гидрофобными гребнями α -спиралей, могут участвовать в построении внутримолекулярных гидрофобных ядер, стабилизирующих пространственную структуру белка.

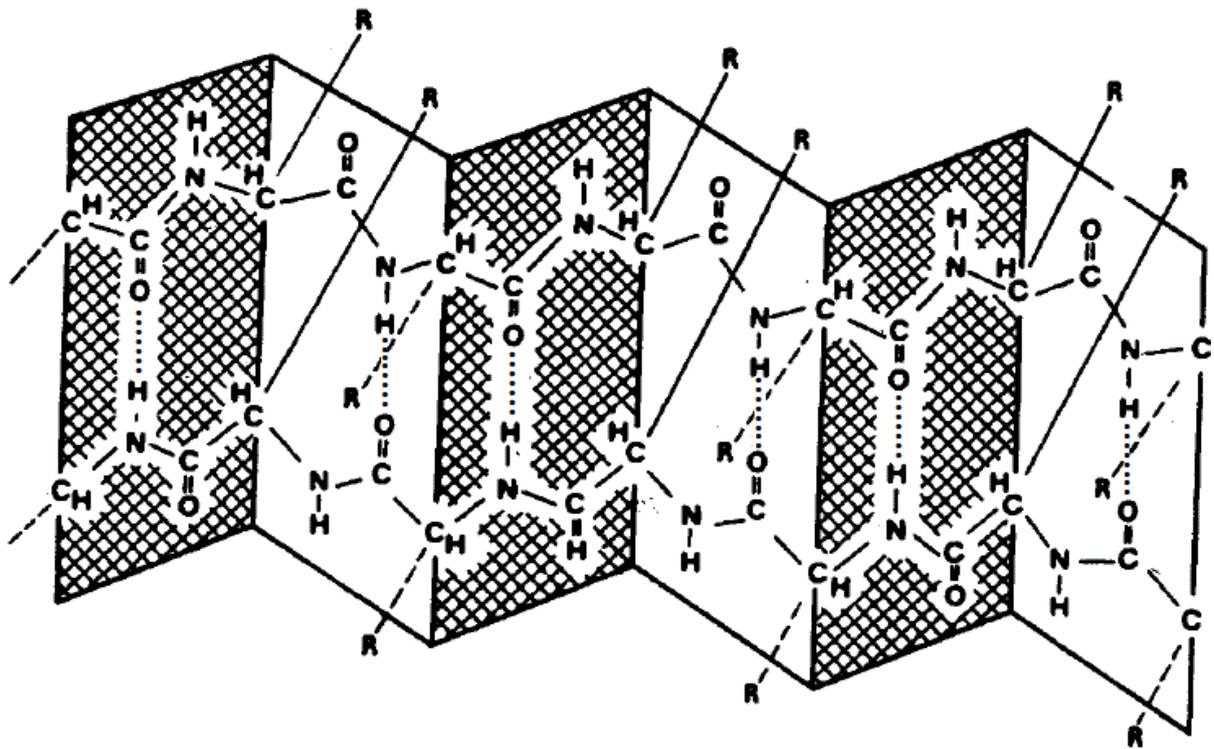


Рис. 14. Антипараллельная структура складчатого листа [54, с. 380]

1.2.5. Нерегулярные вторичные структуры

Значительную часть полипептидной цепи, кроме α -спирали и β -структуры составляют нерегулярные участки, аминокислотные остатки которых имеют разную конформацию главной цепи (углы ϕ и ψ). К ним относятся различные петли и изгибы,

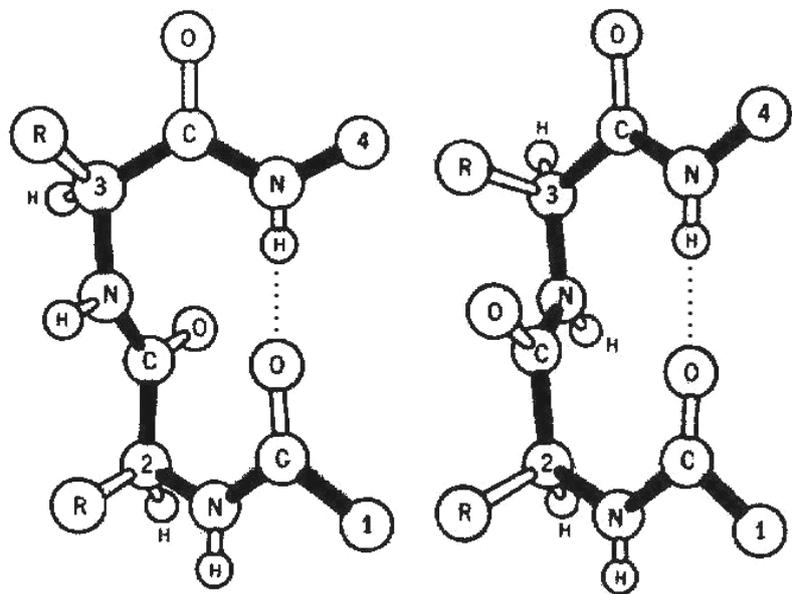


Рис. 15. β -Изгибы [38, с. 96]

позволяющие изменить направление цепи. Наиболее экономный структурный элемент, позволяющий повернуть пептидную цепь на 180° , назван β -изгибом, или β -поворотом (рис. 15).

β -Изгибы образуются четырьмя последовательно расположенными аминокислотными остатками с водородной связью между i -м и $(i + 3)$ -м остатками (цикл из 10 атомов). Изгибы обычно находятся близко к поверхности белка, где две средние аминокислоты из тех четырех, что образуют изгиб, могут участвовать в образовании водородных связей с водой. Формированию β -изгиба могут мешать объемистые радикалы аминокислот, поэтому предпочтительно включение в него остатка глицина.

Реже можно встретить состоящие из трех аминокислотных остатков γ -изгибы, в которых водородная связь возникает между первым и третьим остатками.

1.2.6. Соотношение между первичной и вторичной структурами

Каждый аминокислотный остаток в полипептидной цепи обладает более или менее выраженной склонностью к образованию α -спирали или β -структуры (табл. 4), либо встречаться на участках, лишенных периодической структуры, что связано со свойствами бокового радикала и способностью соседних атомов основной цепи создавать необходимые значения углов ϕ и ψ .

Таблица 4

Склонность аминокислот к образованию α -спиралей и β -структур
[2, с. 102; 21, с. 100]

Склонность	α -Спирали	β -Структуры
Активно образуют	Glu, Ala, Leu	Val, Ile, Met
Склонны к образованию	His, Gln, Val, Phe, Trp, Met	Thr, Tyr, Cys, Gln, Leu, Trp, Phe
Слабо образуют	Lys, Ile	Ala
Безразличны к данной структуре	Asp, Arg, Ser, Thr, Cys	Asp, Arg, Gly
Противодействуют образованию	Asn, Tyr	His, Lys, Ser, Asn, Pro
Разрушают	Gly, Pro	Glu

Из табл. 4 видно, что остатки пролина и глицина крайне редко встречаются в последовательностях, организованных в виде α -спирали. Пролин, как уже отмечалось, не имеет атома водорода, который мог бы участвовать в образовании водородной связи с другим аминокислотным остатком, а атом азота пролина входит в состав пирролидинового цикла, что исключает возможность вращения вокруг связи N–C $_{\alpha}$. Глицин редко встречается в α -спиралях потому, что для него допустима очень широкая область углов φ и ψ на карте Рамачандрана (рис. 10, *a*), т. е. он имеет наибольшие конформационные возможности и может принимать разнообразные конформации, лежащие вне регулярной вторичной структуры.

Большинство неполярных аминокислотных остатков, предпочитают, как правило, β -структуру. При ее образовании меньшую роль, чем для α -спирали, играют размеры радикалов [45, с. 136].

Протяженный участок, содержащий несколько остатков глутаминовой кислоты при рН 7 не может укладываться в α -спираль из-за отталкивания отрицательно заряженных карбоксильных групп. Аналогично препятствуют образованию α -спирали участки с близко расположенными остатками таких аминокислот, как лизин и аргинин, боковые группы которых при рН 7 несут положительный заряд и взаимно отталкиваются [24, с. 180–181].

Из-за полярности атомов каждая пептидная связь имеет небольшой электрический диполь и α -спираль в целом представляет собой диполь, частичный положительный и частичный отрицательный заряды которого обычно локализованы вблизи N- и C-концов соответственно. Вследствие этого на N-конце спирального участка (и вблизи него) часто обнаруживаются отрицательно заряженные аминокислоты, способные нейтрализовать положительный заряд диполя, а на C-конце – отрицательно заряженные. Аминокислоты с короткими заряженными боковыми группами часто встречаются и в нерегулярных структурах, где они могут образовывать дополнительные водородные связи как с полипептидной цепью, так и с водой [45, с. 136].

Однозначное предсказание вторичной структуры на основе первичной структуры все же затруднено тем, что после образования какого-либо ее элемента он должен включиться в третичную структуру, т. е. войти в систему дальних взаимодействий. Последние могут как стабилизировать вторичную структуру, так и нарушить ее.

Контрольные вопросы

1. Что обозначается понятием «вторичная структура белка»?
2. Охарактеризуйте электронное строение пептидной группы.
3. Каковы особенности пространственного строения пептидной группы?
4. Как отсчитываются двугранные углы, характеризующие вращение вокруг связей N–C_α и C_α–C?
5. Что представляют собой конформационные карты Рамачандрана?
6. Как построена α-спираль?
7. В чем заключаются отличия полипролиновой спирали от α-спирали?
8. Что представляют собой β-структуры?
9. Что такое β-изгибы?
10. Как можно предсказать конформацию участка молекулы белка, анализируя его первичную структуру?

1.3. ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

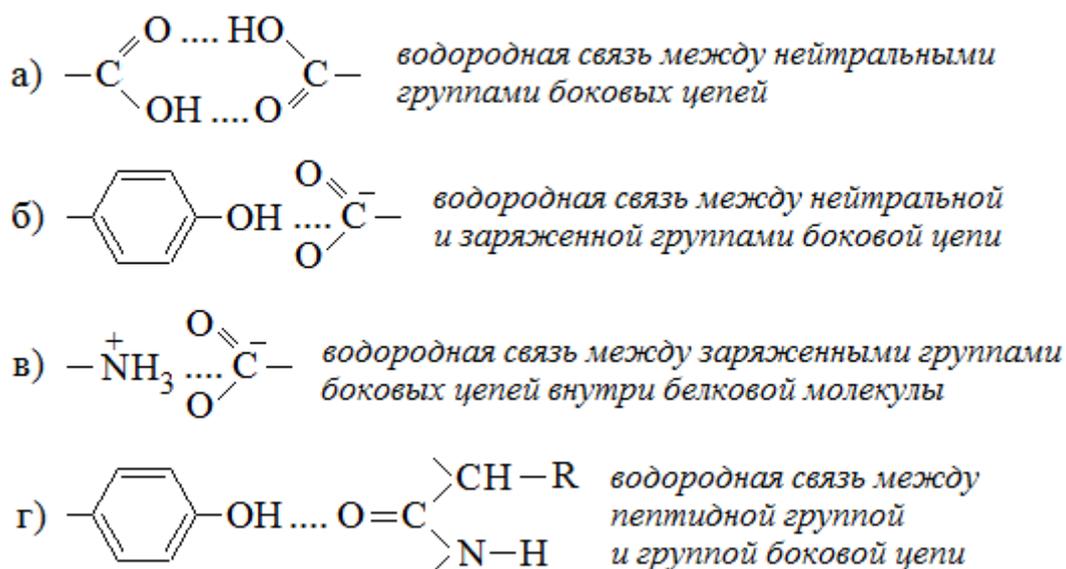
Третичная структура – это расположение в пространстве всех атомов белковой молекулы или, иными словами, трехмерная структура белка, характеризующаяся определенной укладкой в пространстве всех звеньев полипептидной цепи. В отличие от вторичной структуры, которая характеризует относительно небольшой участок белка и определяется локальными нековалентными взаимодействиями (водородными связями), третичная структура зависит от всей суммы взаимодействий – нековалентных и ковалентных – с участием радикалов аминокислотных остатков, находящихся в линейной полипептидной цепи на значительном удалении друг от друга, но сближенных в пространстве за счет изгибов цепи.

Глобулярные белки (сферопротейны) характеризуются более или менее сферической или эллипсоидной формой макромолекул. К этой группе относятся ферменты, иммуноглобулины, гормоны и другие белки, выполняющие каталитические, транспортные, регуляторные функции. Глобулярные белки характеризуются растворимостью в воде или в растворах солей с образованием коллоидных систем.

1.3.1. Взаимодействия, стабилизирующие конформацию белковой макромолекулы

Для формирования третичной структуры важнейшее значение имеют различные виды связей, возникающие между радикалами определенным образом расположенных аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Эти связи реализуются в основном за счет *нековалентных взаимодействий*: водородных связей, ионных и гидрофобных взаимодействий. В ряде случаев третичная структура дополнительно поддерживается наиболее прочными *ковалентными (дисульфидными) связями* между остатками цистеина внутри цепи.

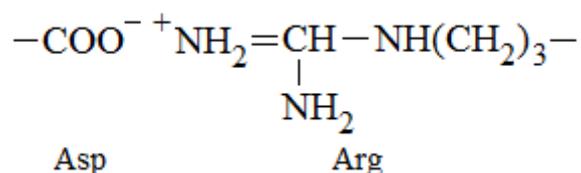
Водородные связи, которым принадлежит решающая роль в формировании вторичной структуры (в особенности периодических ее элементов – α -спиралей и β -структур), в дополнение к этому могут возникать между функциональными группами боковых радикалов, а также между ними и пептидными группами:



Энергия водородных связей составляет от 4 до 29 кДж/моль. Они достаточно прочны, чтобы стабилизировать ту или иную конформацию полипептидных цепей, но достаточно слабы, чтобы допустить в некоторых условиях конформационные переходы.

Ионные взаимодействия могут возникать между ионогенными радикалами аминокислотных звеньев. К их числу прежде всего принадлежат аминокислоты, имеющие в радикале дополнительные карбоксильные группы (аспарагиновая, глутаминовая кислоты) и аминогруппы (лизин, аргинин). Энергия ионного взаимодействия может до-

стигать 42 кДж/моль, однако общее число таких связей в белковой молекуле невелико.



Гидрофобное взаимодействие обусловлено слабыми ван-дер-ваальсовыми силами притяжения между неполярными радикалами аминокислотных остатков, соединяющихся вместе для уменьшения степени взаимодействия с окружающими молекулами воды. Такое взаимодействие характерно для боковых цепей, содержащих остатки валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, а в некоторых случаях – пролина, аланина, триптофана, метионина и цистина. Энергия гидрофобного взаимодействия составляет 6,5 кДж/моль.

Дисульфидные связи являются единственным типом ковалентных взаимодействий, которые могут вносить вклад в стабилизацию третичной структуры. Они образуются при окислении сближенных в пространственной структуре остатков цистеина в остатки цистина (см. стр. 14). Энергия дисульфидных связей достигает 293 кДж/моль.

1.3.2. Белковые глобулы

Отдельные участки полипептидной цепи (или несколько цепей) в глобулярных белках свернуты между собой, образуя компактную *глобулу* (рис. 16) – структуру в форме эллипса с отношением полуосей, как правило, не превышающем 2:1. При этом поверхность глобулярных белков содержит впадины и щели, что существенно для функционирования белка. Например, сорбция субстрата в достаточно хорошо сформированной щели в глобуле фермента приводит к изоляции субстрата от воды и дегидратации его функциональных групп. В итоге процесс взаимодействия фермента и субстрата протекает в среде с диэлектрической постоянной около 4–5, тогда как диэлектрическая постоянная воды составляет 80 [38, с. 38].

Движущей силой, свертывающей полипептидную цепь белка в строго определенное, только ему присущее, трехмерное образование, является взаимодействие аминокислотных радикалов с молекулами окружающего растворителя. Белки, находящиеся в растворимой

фракции клеток или секретируемые из клеток, построены так, что значительная часть гидрофобных радикалов аминокислот сконцентрирована во внутренней части молекул, образуя *гидрофобное ядро*, а гидрофильные радикалы ориентированы наружу.

Плотность упаковки атомов в глобуле (доля пространства, занимаемая атомами) лежит в пределах 0,72–0,77, что сравнимо с плотностью упаковки в кристаллах органических соединений (0,68–0,80) и выше, чем в органических жидкостях (0,60–0,65). В таком тесном контакте слабые ван-дер-ваальсовы взаимодействия вносят заметный вклад в стабилизацию структуры [38, с. 114].

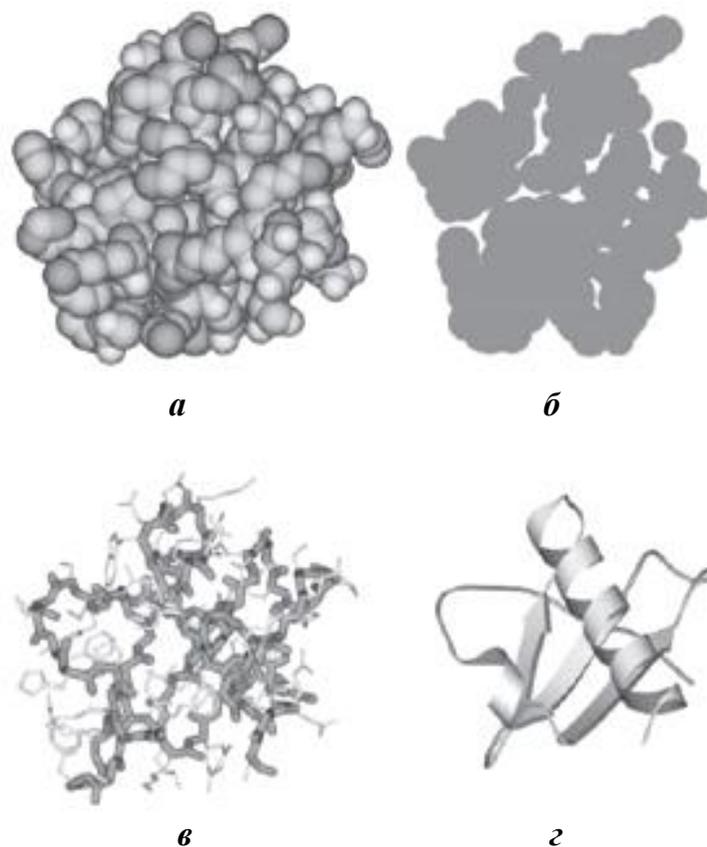


Рис. 16. Способы изображения третичной структуры глобулярного белка на примере субъединицы интерлейкина 8 [45, с. 164]: *а*) атомная модель, *б*) срез атомной модели (подчеркивает плотность упаковки), *в*) скелетная модель (главная цепь показана темной линией, боковые радикалы – светлыми), *г*) схема, показывающая ход главной цепи (участки α -спиралей изображены в виде спиральных лент, а участки β -структур – в виде стрелок)

1.3.3. Домены и структурные мотивы

Увеличение объема глобулы приводит к уменьшению доли в ней гидрофобного ядра, но этот фактор затрагивает лишь размеры организованной таким образом третичной структуры, но не макромолекулы белка в целом. Для белков с молекулярной массой более 14–16 тыс. характерна тенденция к формированию двух или более в той или иной степени независимых глобул, каждая из которых имеет свое гидрофобное ядро. Такие глобулы получили название *доменов* – об-

ластей в третичной структуре, обладающих некоторой структурной и функциональной автономией. Домены могут соединяться между собой короткими полипептидными цепями, которые выполняют роль шарниров, обеспечивающих определенную подвижность участков молекулы белка относительно друг друга. Во многих случаях домены большого белка сохраняют свою нативную конформацию даже при отделении от другой части белка, например, в результате гидролиза.

Разработка представлений о третичной структуре белка привела также к появлению понятия о *структурных мотивах*, или *супервторичной структуре*, которая определяет устойчивое взаиморасположение определенных элементов вторичной структуры и связующих их последовательностей. Например, среди структурных мотивов, представленных β -слоями, распространены *β -шпилька*, в которой две антипараллельные β -структуры связаны петлей из 2–5 остатков, и мотив *греческий ключ*¹ из четырех антипараллельных β -структур и соединяющих их петель. Типичны *$\alpha\alpha'$ -структуры* из двух антипараллельно упакованных α -спиралей и мотивы, образованные сочетанием разных типов вторичных структур – *β - α - β' -петли* (рис. 17). Эти образования, вероятно, предпочтительны для свертывания полипептидной цепи в пространстве (фолдинга) по мере синтеза белка и для придания стабильности уже сформированной третичной структуре [16, с. 41].

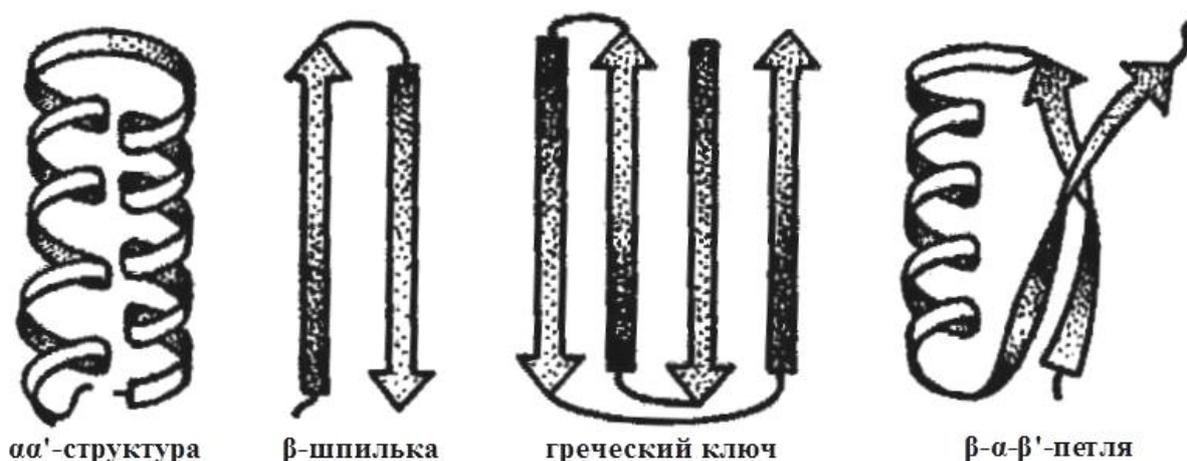


Рис. 17. Супервторичные структуры [44, с. 75]

Таким образом, современные представления о самоорганизации белковых глобул связаны с идеей существования элементов однотип-

¹ Название связано с характерным геометрическим узором, традиционным для греческого орнаментального искусства.

ности, блочности, ограниченности набора пространственных упаковок полипептидных цепей: для построения тысяч третичных структур используется несколько сотен структурных мотивов.

Сворачивание полипептидной цепи в глобулу осуществляется так, чтобы гребни, образуемые гидрофобными группами на поверхности α -спирального участка или β -слоя (рис. 18), включали в промежутки между собой гидрофобные группы других участков, создавая тем самым плотное гидрофобное ядро белка. Обычно гребни образуются остатками, занимающими в боковой цепи положения 1–5 или 1–4 на поверхности α -спирали и положение 1–3 для β -структур [37, с. 153; 38, с. 121].

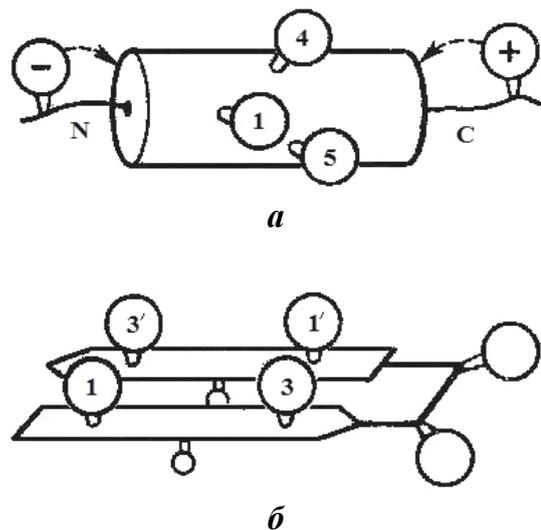


Рис. 18. Распределение аминокислотных остатков в α -спирали и β -шпильке [37, с. 152]. Кружки с номерами означают гидрофобные группы, кружками с «+» и «-» – заряженные группы. На концах спирали стрелками указаны водородные связи, которые могут возникать между полярными боковыми группами и открытыми NH- и CO-группами

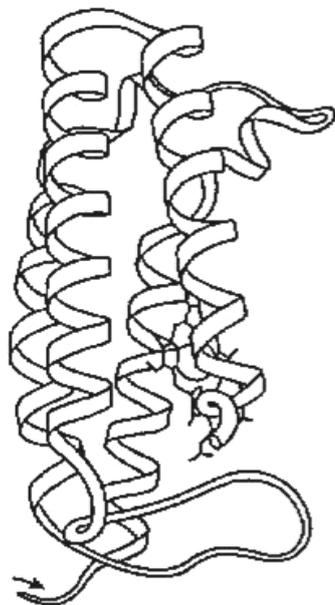
1.3.4. Классификация пространственных структур

В 1976 г. британские биохимики Майкл Левитт и Сайрус Чотиа предложили выделять четыре типа пространственной структуры глобулярных белков (рис. 19):

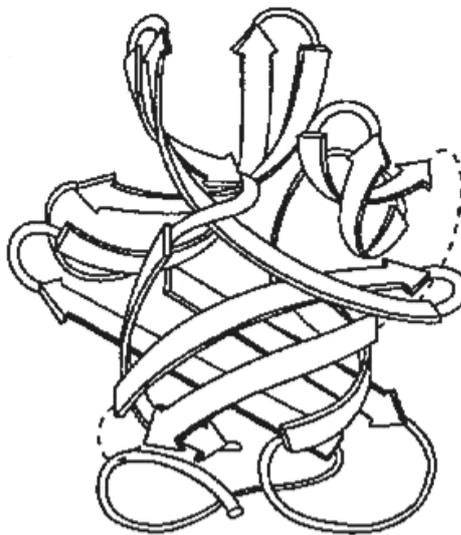
- 1) α -белки, трехмерные структуры которых содержат только α -спирали (глобины, цитохром *c*, белок вируса табачной мозаики);
- 2) β -белки, образованные преимущественно β -складчатыми слоями (пепсин, химотрипсин, нейраминидаза вируса гриппа);
- 3) α/β -белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры чередуются (лактатдегидрогеназа, карбоксипептидаза). Чередование обычно приводит к появлению центрального β -складчатого листа, окруженного с обеих сторон α -спиралями, экранирующими его от воды;
- 4) $(\alpha+\beta)$ -белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры не чередуются, а скорее группируются с себе подобными так, что часть

молекулы приобретает пространственную укладку α -спирального типа, другая – β -типа, нередко с элементами α/β -структуры (рибонуклеаза, карбоангидраза, лизоцим куриного яйца) [36, с. 305].

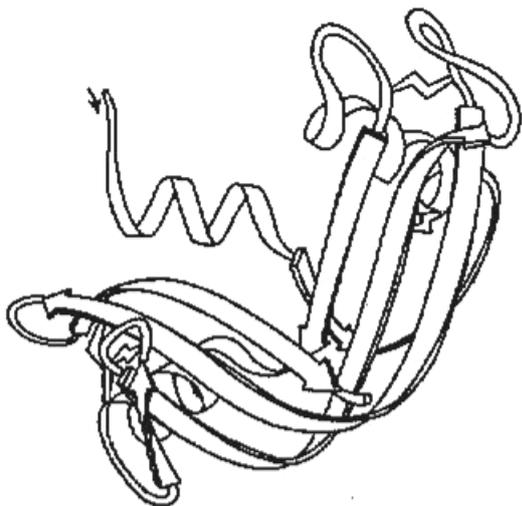
Большинство изученных белков относится к α/β -типу, которому по численности лишь немного уступает β -тип [44, с. 82].



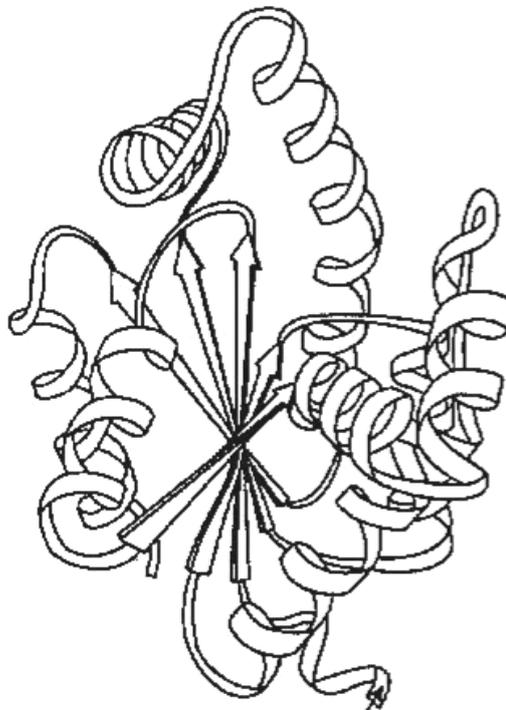
α -белок (цитохром *c*)



β -белок (ингибитор трипсина)



$(\alpha+\beta)$ -белок (рибонуклеаза)



α/β -белок (аденилаткиназа)

Рис. 19. Белки с различными типами пространственной структуры [16, с. 41]

1.3.5. Особенности структуры мембранных белков

Белки, пронизывающие мембрану, обеспечивают транспорт молекул и передачу внешних сигналов внутрь клетки, образование ионных каналов, межклеточные взаимодействия. Мембранные белки функционируют не в водном, а в липидном (неполярном) окружении, поэтому отличаются от глобулярных белков расположением гидрофильных радикалов внутри макромолекулы, а гидрофобных боковых групп, контактирующих с липидами, – снаружи. Из-за ограниченной возможности образовывать дополнительные водородные связи в неводной среде остов внутримембранной полипептидной цепи характеризуется высокой регулярностью укладки, т. е. попадающая в мембрану белковая цепь вынуждена принимать структуры с полностью завязанными водородными связями – либо α -спираль, либо β -структуру.

В качестве примера можно рассмотреть *бактериородопсин* – белок галобактерий и других архей, обеспечивающий преобразование энергии солнечного света в энергию химических связей путем переноса протонов с цитоплазмы на внешнюю сторону клеточной мембраны (рис. 20). Внутримембранная часть этого белка сложена из 7 регулярных α -спиралей, идущих от одного до другого края мембраны и образующих слегка наклоненный к ее плоскости пучок, а одинокая β -шпилька и все нерегулярные участки цепи выходят из мембраны. Гидрофобные боковые группы α -спиралей обращены наружу к липидам мембраны, а полярные группы – внутрь узкого канала, по которому идет протон, в переносе которого участвует молекула кофактора – ретиналя, прикрепленная внутри пучка спиралей. При поглощении фотона ретиналь переходит из *транс*- в *цис*-форму, изгибается, переносит протон с одного конца

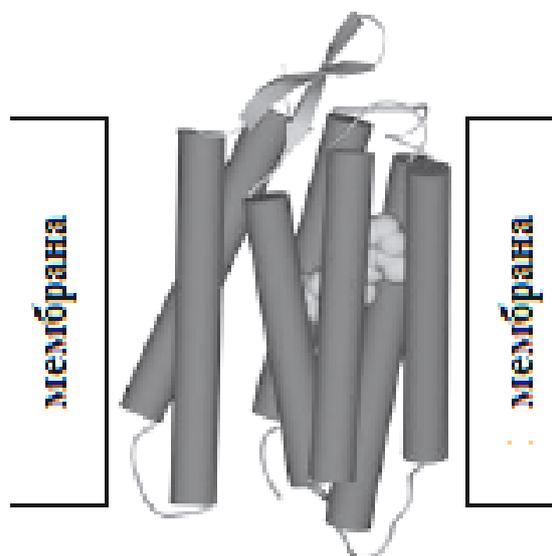


Рис. 20. Бактериородопсин в мембране [45, с. 151].

α -Спирали изображены в виде цилиндров, а прикрепленный к пучку спиралей ретиналь в виде светлых шариков

пучка на другой, а затем разгибается и возвращается назад, но уже без протона [45, с. 151–152].

Контрольные вопросы

1. Что обозначается понятием «третичная структура белка»?
2. Какие виды взаимодействий стабилизируют третичную структуру?
3. Как формируются белковые глобулы?
4. Что такое белковые домены?
5. Что понимают под супервторичной структурой?
6. Как классифицируют глобулярные белки по типу пространственной структуры?
7. Каковы особенности пространственного строения мембранных белков?

1.4. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Четвертичная структура – это способ взаимного пространственного расположения взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями белка.

Белки, состоящие из нескольких субъединиц, называются *олигомерными*, их молекулы – *эпимолекулами*, или *мультимерами*. *Субъединицы* представляют собой глобулы, образуемые каждой из отдельных полипептидных цепей (*протомеров*). Четвертичную структуру можно рассматривать как ансамбль глобул, составляющий единую молекулу, в которой, однако, каждая из глобул сохраняет значительную автономию, как правило, выраженную гораздо ярче, чем автономия домена в рамках третичной структуры.

Четвертичная структура – последний уровень в организации белковой молекулы, но не обязательный, ею обладают в основном белки с молекулярной массой выше 50 000–60 000. Нельзя относить к мультимерам белки, у которых образовавшая глобулу изначально единая полипептидная цепь в результате ограниченного протеолиза расщепилась на несколько отдельных отрезков (например, инсулин) или мультиферментные комплексы, оболочки фагов и другие надмолекулярные структуры.

1.4.1. Стехиометрия и геометрия четвертичной структуры

Число субъединиц в эпимолекулах колеблется в очень широких пределах – от 2 до 162. Как правило, белки-мультимеры содержат четное число субъединиц и в большинстве случаев представляют собой димеры, тетрамеры и гексамеры. В тетрамерных белках субъединицы могут размещаться в вершинах квадрата или тетраэдра. Для гексамерных белков характерна октаэдрическая упаковка, гораздо реже встречаются плоские гексагональные структуры. Среди белков с нечетным количеством субъединиц чаще других распространены тримеры, которые могут играть существенную роль при образовании трансмембранных каналов, поскольку своего рода пучок из трех субъединиц сам по себе образует внутренний канал [38, с. 151].

Различают *гомомерные* и *гетеромерные* белки. К гомомерным относятся белки, у которых все субъединицы имеют одинаковое строение. В качестве примера можно привести каталазу, состоящую из четырех абсолютно равноценных субъединиц. У гетеромерных белков субъединицы не только отличаются по строению, но и могут выполнять различные функции. К гетеромерам относится, например, протеинкиназа, в которой одна из субъединиц ответственна за собственно ферментную активность, а другая является регуляторной.

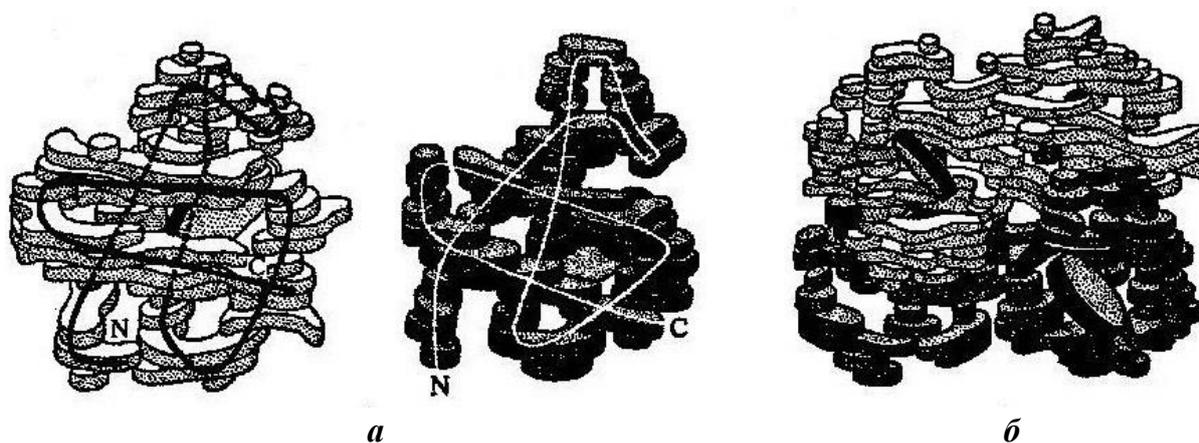


Рис. 21. Четвертичная структура гемоглобина [44, с. 77]:
а) модели субъединиц α (слева) и β (справа). Блоки, из которых составлены модели, характеризуют распределение электронных плотностей в разных частях молекулы; черная (слева) и белая (справа) линии показывают ход полипептидной цепи; б) трехмерная модель молекулы гемоглобина; субъединицы типа α (светлые) и β (темные) расположены по углам почти правильного тетраэдра, темные диски – группы гема

Для записи четвертичных структур было принято обозначать субъединицы буквами греческого алфавита и указывать их количество подстрочными индексами. Так, молекулу гемоглобина, состоящую из двух попарно идентичных субъединиц, можно обозначить в виде $\alpha_2\beta_2$. Субъединица типа α представлена полипептидной цепью из 141 аминокислотного остатка, β – из 146. Две субъединицы типа α и две типа β соединяются в единую эпимолекулу, располагаясь в углах почти правильного тетраэдра. Таким образом, возникает почти шаровидная молекула с параметрами 0,50·0,55·0,64 нм (рис. 21) [44, с. 77].

1.4.2. Взаимодействия, стабилизирующие четвертичную структуру

Субъединицы в олигомерных белках объединяются после формирования третичной структуры с помощью тех же видов взаимодействий, которые стабилизируют третичную структуру. Есть основания считать, что белковые субъединицы располагают контактными площадками, обеспечивающими их взаимодействие друг с другом в процессе формирования эпимолекулы. Контактным площадкам субъединиц присуща комплементарность структуры, что значительно облегчает как взаимное «узнавание» субъединиц, так и их взаимодействие.

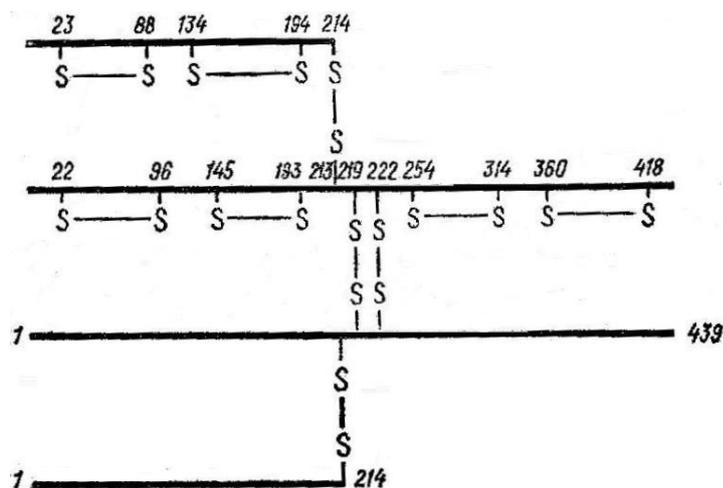


Рис. 22. Четвертичная структура иммуноглобулина G человека [43, с. 80].

Цифры в двух верхних пептидных цепях указывают номера остатков цистеина, за счет тиольных групп которых возникли внутри- и межцепочечные дисульфидные связи. Цифры в двух нижних цепях указывают число аминокислотных звеньев в них

Ковалентные связи

весьма редко используются для стабилизации четвертичной структуры и играют подчиненную роль, дополняя нековалентные контакты.

Примером может служить четвертичная структура иммуноглобулина, в составе молекулы которого присутствуют две легкие и две тяжелые цепи, соединенные четырьмя дисульфидными связями (рис. 22).

Большое значение имеют *гидрофобные взаимодействия* между отдельными группами и целыми участками на поверхности взаимодействующих субъединиц. Подсчет соотношения объемов гидрофобных ($V_{\text{гфб}}$) и гидрофильных ($V_{\text{гфл}}$) радикалов в белковых молекулах показал, что те из них, где это соотношение выше единицы, легко образуют четвертичную структуру. Так, например, у панкреатической рибонуклеазы $V_{\text{гфб}}/V_{\text{гфл}}$ равно 0,62, у миоглобина быка – 0,87; и эти белки характеризуются мономерной структурой. Наоборот, у гемоглобина быка $V_{\text{гфб}}/V_{\text{гфл}}$ составляет 1,12, у лактатдегидрогеназы из сердца крысы – 1,26, у каталазы из печени быка – 1,10; эти белки существуют в виде мультимеров. Это еще раз подчеркивает важную роль гидрофобных взаимодействий в становлении и поддержании четвертичной структуры белков [43, с. 81].

В организации сети межсубъединичных контактов важная роль также принадлежит *водородным связям*. Если на поверхность субъединицы выходит крайний отрезок β -складчатого листа, то такой же отрезок будет занимать соответствующее положение в другой субъединице. Поворот последней на 180° позволит сблизить упомянутые отрезки так, что между ними установится характерная для антипараллельной β -структуры система водородных связей.

Межсубъединичные контакты нередко содержат ионные пары, в которых устанавливаются *электростатические взаимодействия* между противоположно заряженными функциональными группами субъединиц, например между карбоксилат-ионами остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот и катионными группами боковых цепей лизина или аргинина. При этом вовсе не обязательно образование только ионных пар – нередко возникают целые системы, кластеры пространственно сближенных разноименных зарядов. Исключение воды из межсубъединичного контакта делает такие взаимодействия, не слишком устойчивые на поверхности белка, весьма значимыми.

Прочность четвертичной структуры может колебаться в широких пределах, но, как правило, третичная структура значительно прочнее четвертичной, поэтому при воздействии факторов, нарушающих отмеченные связи, четвертичная структура обычно утрачивает-

ся первой, диссоциируя на сохранившие нативность субъединицы. Относительно меньшая стабильность четвертичной структуры дает большие преимущества при использовании ее изменений как факторов регуляции функциональных свойств белков.

1.4.3. Кооперативные эффекты в олигомерных белках

Стабильность системы нековалентных взаимодействий в зоне контакта между субъединицами существенно зависит от внешних условий и, что особенно важно, даже от небольших изменений в пространственной структуре каждой из взаимодействующих субъединиц. Здесь кроется молекулярный базис одной из наиболее специфичных функций четвертичной структуры – ее *кооперативности*, приводящей к сильному влиянию субъединиц на функциональные свойства друг друга. Вследствие кооперативных явлений четвертичная структура усиливает регуляторные возможности глобулярных белков, повышая их роль в регуляции биохимических процессов и физиологических функций.

Одним из кооперативных эффектов, распространенных у олигомерных белков, особенно у ферментов, является *аллостерический эффект* – изменение конформации одной из субъединиц под влиянием молекул субстрата и передача этих структурных перестроек на другие субъединицы, в результате чего они становятся более или менее восприимчивыми к присоединению субстрата или катализу.

В качестве примера можно рассмотреть связь между структурой и функциями двух родственных белков – миоглобина, содержащегося в мышцах, и гемоглобина, сосредоточенного в эритроцитах. Они принадлежат к так называемым сложным белкам и содержат характерную простетическую группу – гем, представляющий собой комплекс двухвалентного железа и порфирина. Структура гема такова, что присоединение кислорода не вызывает окисления ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} , иначе это привело бы к расходованию кислорода и сделало бы невозможным выполнение белками своих функций: миоглобин, не имеющий четвертичной структуры, обеспечивает хранение кислорода, а гемоглобин ответственен за его связывание, перенос и отдачу тканям.

На рис. 23 показаны кривые, характеризующие степень насыщения этих белков кислородом в зависимости от парциального давления

газа $p(O_2)$, находящегося в равновесии с раствором белка. Кривая насыщения миоглобина кислородом имеет вид простой гиперболы: этот белок характеризуется очень высоким сродством к кислороду и низкой чувствительностью к изменению $p(O_2)$, что и позволяет ему выполнять запасающую функцию. Понижение $p(O_2)$ от 100 мм рт. ст. в легких до 26 мм рт. ст. в мышечных капиллярах приводит к высвобождению миоглобином лишь 1–2% связанного кислорода, в то время как гемоглобин, почти полностью (на 96%) насыщаясь кислородом в легких, при прохождении крови через капилляры мышц, высвобождает примерно треть связанного кислорода. Когда кровь снова поступает в легкие, гемоглобин быстро связывает дополнительное количество кислорода и опять насыщается до 96% [18, с. 208]. Причина этого явления заключается в том, что у гемоглобина и связывание кислорода, и его высвобождение сопровождается конформационными изменениями одной из цепей, что отражается на конформационном состоянии других субъединиц. В итоге присоединение первой молекулы кислорода увеличивает сродство остальных субъединиц в 500 раз, и наоборот, потеря одной молекулы кислорода при снижении $p(O_2)$ сильно облегчает отдачу последующих. Данный кооперативный эффект иллюстрируется S-образной кривой насыщения гемоглобина.

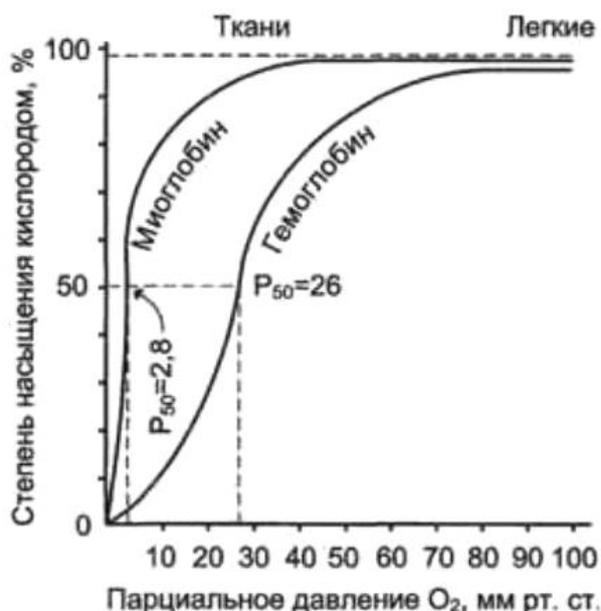


Рис. 23. Кривые насыщения кислородом для миоглобина и гемоглобина [18, с. 207]

Таким образом, обладание четвертичной структурой позволяет гемоглобину выполнять функции, которые не могут выполнять ни его субъединицы, взятые порознь, ни сходный с ними по строению миоглобин. Кроме того, благодаря аллостерическому эффекту олигомерный белок оказывается намного более чувствительным к внешним влияниям и способен эффективно реагировать на них. В частности, даже небольшое, но не выходящее за физиологические пределы, сни-

жение рН или увеличение концентрации кислорода сдвигает S-образную кривую насыщения гемоглобина вправо, т. е. уменьшает сродство к кислороду и облегчает тем самым его отдачу тканям.

Другим проявлением кооперативности в олигомерных белках является возникновения *полиморфизма* у так называемых изоферментов (изозимов). Изоферменты – это группа ферментов одного и того же рода и, следовательно, подобного действия, которые, однако, отличаются друг от друга полиморфной молекулярной формой. Примером может служить лактатдегидрогеназа, встречающаяся в пяти разных формах. Эти изоферменты катализируют одну и ту же реакцию (окисление молочной кислоты в пировиноградную и обратный процесс), но с различной скоростью. Все пять изоферментов имеют одинаковую молекулярную массу (140 000), и составлены из четырех субъединиц, которые условно обозначают Н и М (от англ. *heart* – «сердце» и *muscle* – «мышцы»). Изофермент М₄, встречающийся в мышцах, содержит четыре одинаковые цепи М; изофермент Н₄, обнаруженный главным образом в сердечной мышце, содержит четыре цепи Н. Три других изофермента содержат три возможные комбинации цепей М и Н, т. е. М₃Н, М₂Н₂ и МН₃. В зависимости от возраста, физиологического состояния и других причин в организме устанавливается то или иное соотношение изоферментов, которому соответствует определенный уровень активности лактатдегидрогеназы в целом. Изменение соотношения изоферментов во всем организме или в отдельных тканях и органах представляет, таким образом, один из способов регуляции действия ферментов [12, с. 96–97; 44, с. 101].

Контрольные вопросы

1. Что понимают под четвертичной структурой белка?
2. Сколько субъединиц может входить в состав эпимолекулы?
3. Чем различаются гомомерные и гетеромерные белки?
4. Какие виды взаимодействий стабилизируют четвертичную структуру?
5. Как организована четвертичная структура гемоглобина?
6. Как проявляется аллостерический эффект в олигомерных белках на примере гемоглобина?
7. В чем заключается явление полиморфизма?

1.5. ВЫСШИЕ СТРУКТУРЫ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Фибриллярные белки (склеропротеины) характеризуются вытянутой, нитевидной структурой. Благодаря своей волокнистой форме эти белки, с одной стороны, служат основой структурного скелета высших организмов (кератин, коллаген), а с другой – несут ответственность за динамические функции, например сокращение мышц (миозин) или свертывание крови (фибриноген). Фибриллярные белки не растворяются в воде, что связано с высокой концентрацией гидрофобных аминокислотных остатков как внутри белка, так и на его поверхности.

Для первичной структуры фибриллярных белков характерно наличие повторяющихся или однотипных аминокислотных последовательностей, которые обеспечивают формирование весьма протяженной регулярной вторичной структуры. Регулярность строения белковой молекулы, т. е. систематически повторяющиеся группировки при соответствующем расположении молекул, может быть определена через периоды идентичности (табл. 5).

Таблица 5

Структура и свойства фибриллярных белков [24, с. 185]

Структура	Период идентичности, нм	Характеристики	Примеры
α -Спирали, сшитые дисульфидными связями	0,51–0,54	Прочные, нерастворимые в воде защитные структуры различной жесткости	α -Кератин волос, перьев и ногтей
β -Слои	0,65–0,78	Мягкие, гибкие волокна	Фиброин шелка
Тройная полипролиновая спираль	0,28–0,29	Прочные, эластичные при растяжении волокна	Коллаген в сухожилиях и в костной ткани

Из больших блоков вторичной структуры сложена пространственная структура, которая из-за своей сильной растянутости, очевидно, не может поддерживаться за счет связей внутри полипептидной цепи, а в значительной степени держится на взаимодействии

между несколькими идентичными цепями, т. е. за счет четвертичной структуры. Фибриллярные белки являются объединениями протяженных α -спиралей, β -слоев или полипролиновых спиралей (табл. 5).

1.5.1. α -Кератин

К α -структурным фибриллярным белкам относится α -кератин, являющийся основным компонентом волос, шерсти, ногтей, когтей, перьев, рогов, копыт, панцирей и других поверхностных образований кожи у млекопитающих.

Молекула α -кератина организована в виде двухспиральной катушки (рис. 24). Две одинаково направленные нити α -кератина закручиваются одна вокруг другой, образуя суперспираль (протофибриллу), что придает всей структуре дополнительную проч-

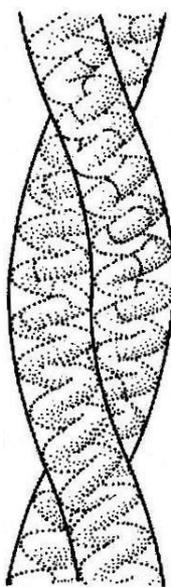


Рис. 24.
Двойная
спираль
кератина
[38, с. 312]

ность – подобно тому, как скрученные веревки придают прочность канату. Стабилизация суперспирали осуществляется за счет взаимодействия между своеобразными гидрофобными гребнями, образование которых связано с тем, что в α -спиральных участках кератина многократно повторяется одинаковый структурный мотив, в котором через каждые 2–3 аминокислотных остатка имеются гидрофобные боковые цепи. Однадцать протофибрилл, соединяясь в пучок, образуют микрофибриллу, сотни микрофибрилл собираются в фибриллы.

При образовании волос и шерсти фибриллы кератина погружены в неспиральный белок матрикса, богатый остатками цистеина, которые, окисляясь, образуют многочисленные дисульфидные связи, упрочняющие структуру фибрилл кератина и делающие их практически нерастворимыми. При разрушении дисульфидных связей действием меркаптосоединений волокна кератина становятся гибкими и поддающимися формованию, а новое окисление вызывает образование уже иного набора дисульфидных связей и фиксирует новую форму волокна. Такую обработку применяют при «химической» завивке волос, а также для придания шерстяным тканям, построенным из кератина, несминаемых складок. Механическое растяжение

увлажненного кератинового волокна, сложенного из α -спиралей, может заставить их совершить переход в β -структурную форму, а при снятии нагрузки и понижении влажности α -спиральная структура восстанавливается. Это свойство используется при устройстве психрометров – приборов, регистрирующих влажность воздуха.

1.5.2. Фиброин

К β -структурным фибриллярным белкам относится белок шелка *фиброин*, который синтезируется насекомыми и пауками. Полипептидные цепи фиброина богаты остатками аланина и глицина, что способствует плотной упаковке β -слоев и взаимному проникновению их боковых групп. Вся структура в целом стабилизируется за счет протяженных водородных связей, образующихся между пептидными группами всех полипептидов в каждом β -слое, а также за счет оптимизации ван-дер-ваальсовых взаимодействий между слоями.

Шелк не тянется, поскольку полипептидные цепи в β -слоях и так максимально растянуты. Однако подобная структура является довольно гибкой, поскольку слои удерживаются вместе не ковалентными связями, такими как дисульфидные мостики в α -кератинах (цистеин в аминокислотном составе фиброина отсутствует), а множеством слабых взаимодействий. В волокне шелка фиброин погружен в менее упорядоченный матрикс, образованный нерегулярными частями фиброина и специальным матриксным белком серицином [38, с. 314].

1.5.3. Коллаген

Коллаген – структурный белок, наиболее часто встречающийся в животных организмах (на его долю приходится около одной трети всей массы белков). Он входит в состав сухожилий, хрящей, кожи, стенок сосудов и обеспечивает их прочность.

В основе коллагена лежит полипептид *тропоколлаген*, состоящих из трех полипептидных цепей, в которых каждое третье положение обязательно занято остатками глицина, т. е. в первичной структуре многократно повторяется мотив Gly–X–Y, где X и Y – остаток любой аминокислоты, кроме глицина, причем часто в роли X и Y выступают остатки пролина и 4-гидроксипролина. Как уже отмечалось, вы-

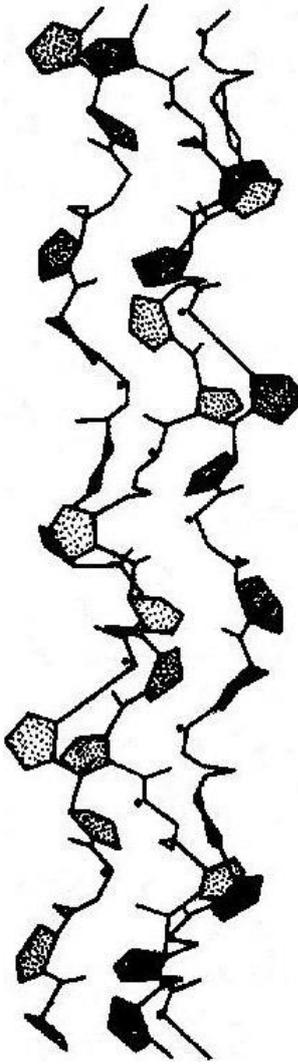


Рис. 25. Тройная спираль тропоколлагена. Точками отмечены NH-группы остатков глицина [38, с. 304]

сокое содержание пролина является причиной формирования особой левозакрученной полипролиновой спирали (рис. 13). Этот вариант вторичной структуры удерживается за счет взаимодействий со смежными цепями аналогичного строения: глицин, не имеющий боковой группы, позволяет трем параллельно направленным цепям тропоколлагена сблизиться и образовать правую суперспираль, которая стабилизируется межцепочечными водородными связями между NH-группами глициновых остатков и СО-группами пролиновых и гидроксипролиновых остатков (рис. 25). Расстояние между витками тройной суперспирали составляет 10 нм, а ее толщина – всего 1,5 нм. В тесном пространстве внутри суперспирали располагаются глициновые атомы водорода, а объемистые пирролидиновые кольца и радикалы других аминокислот направляются наружу. Ступенчато уложенные в длину тропоколлагеновые единицы образуют коллагеновое волокно [40, с. 361–363].

Таким образом, во всех фибриллярных белках четвертичная структура обеспечивает саму возможность формирования третичной структуры своих субъединиц, а иногда необходима и для фиксации их вторичной структуры (полипролиновая спираль) [52, с. 34].

Контрольные вопросы

1. Какие белки называют фибриллярными?
2. Из каких вторичных структур формируются трехмерные структуры фибриллярных белков?
3. Как связаны структура и функции фибриллярных белков на примере α -кератина, фиброина шелка и коллагена?
4. Как стабилизируются пространственные структуры фибриллярных белков?

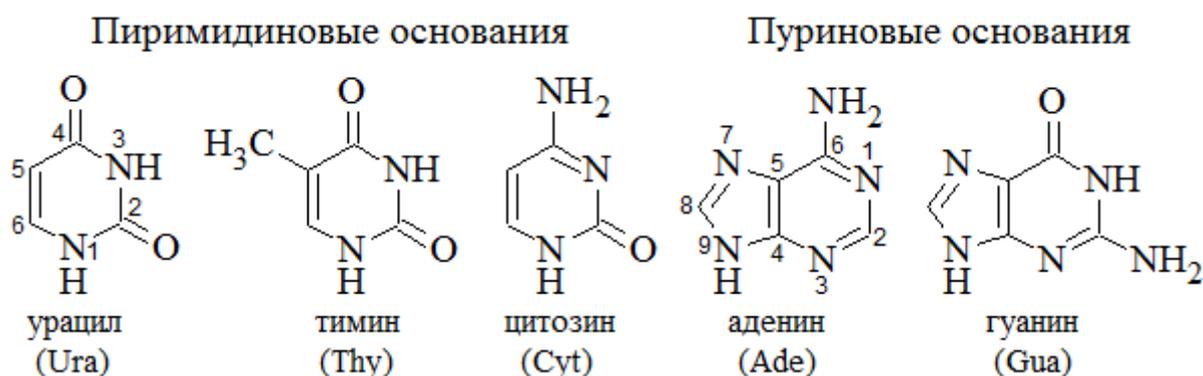
2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты (от лат. *nucleus* – «ядро») – это биополимеры, построенные из мономерных единиц – *нуклеотидов*, структура которых включает в себя остаток углевода (пентозы), этерифицированный по одной из гидроксильных групп остатком фосфорной кислоты и связанный *N*-гликозидной связью с гетероциклическим основанием. Углеводными компонентами служат D-рибоза и 2-дезоксид-рибоза. Отсюда нуклеиновые кислоты делятся на *рибонуклеиновые* (РНК) и *дезоксирибонуклеиновые* (ДНК). Клеточные РНК в зависимости от местоположения в клетке, состава и функций подразделяются на транспортные (тРНК), матричные, или информационные (мРНК) и рибосомные (рРНК); отдельно выделяют РНК неклеточных организмов – вирусов и фагов. Молекулярная масса нуклеиновых кислот колеблется в пределах от 17 тыс. до 1 млн и более.

2.1. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И МЕТОДЫ ЕЕ УСТАНОВЛЕНИЯ

2.1.1. Нуклеозиды и нуклеотиды

Входящие в состав нуклеиновых кислот гетероциклические соединения обычно называют *нуклеиновыми основаниями*. К их числу относятся производные пириимидина – урацил, тимин, цитозин и пурина – аденин и гуанин. Нуклеотиды, содержащие урацил, входят только в состав РНК, а содержащие тимин – в ДНК.



Нуклеиновые основания способны к таутомерии, но в физиологических условиях существуют только в лактамной (оксо-) и аминной формах. Молекулы пириимидинов плоские, молекулы пуринов – почти плоские, слегка вогнутые. Атомы азота, входящие в их ароматические

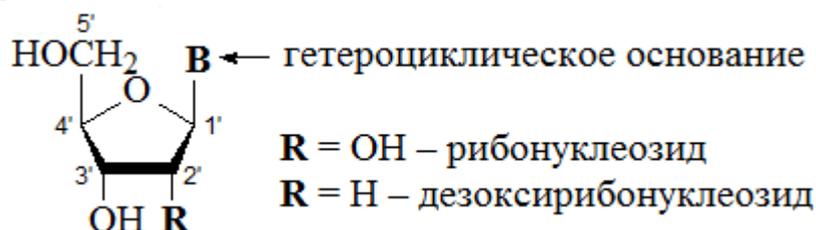
циклы, имеют слабоосновный характер. Все пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот обуславливают сильное поглощение в ультрафиолетовой области 260–280 нм, причем максимум поглощения находится вблизи 260 нм. Этим свойством пользуются при обнаружении и количественном определении не только самих этих оснований, но и нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Реже в составе нуклеиновых кислот встречаются некоторые другие гетероциклические основания, называемые *минорными основаниями*. Так, в молекулах РНК присутствуют гипоксантин и дигидроурацил (UH₂), а редкими компонентами ДНК являются метилированные основания, например 5-метилцитозин (m⁵Cyt) [29, с. 158].



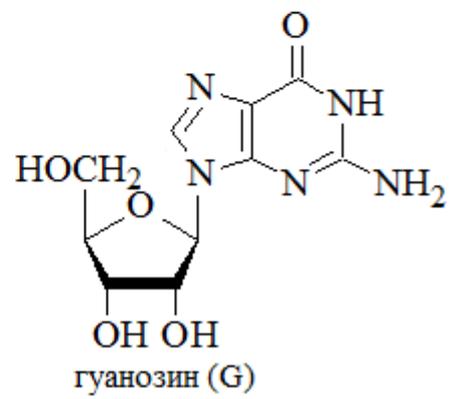
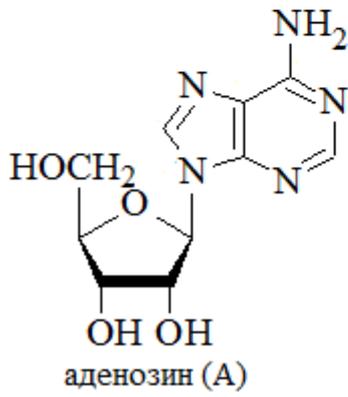
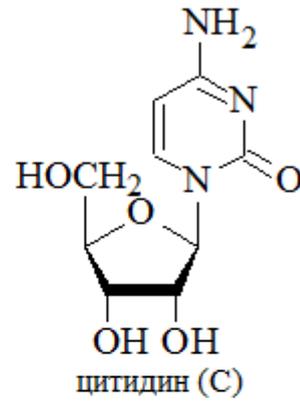
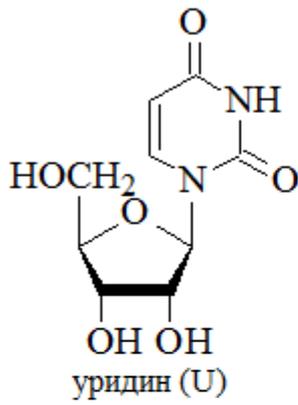
Углеводные фрагменты входят в состав нуклеиновых кислот в β-D-рибофуранозной форме (атомы углерода в них нумеруют цифрами со штрихами).

Гетероциклические основания образуют с углеводом (D-рибозой и 2-дезоксид-рибозой) *N*-гликозиды, которые в химии нуклеиновых кислот принято называть *нуклеозидами* (рибонуклеозидами и дезоксирибонуклеозидами). *N*-гликозидная связь в подавляющем большинстве нуклеозидов осуществляется между аномерным атомом углерода C-1' рибозы или дезоксирибозы и атомом азота N-1 пиримидинового или N-9 пуринового основания.

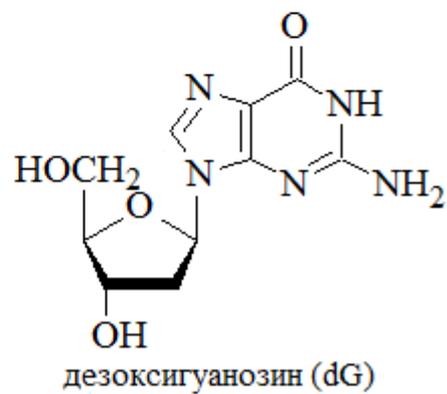
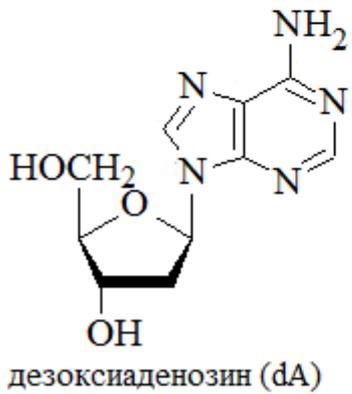
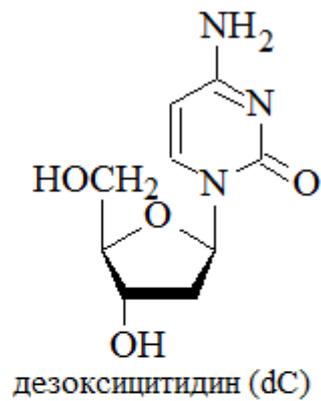
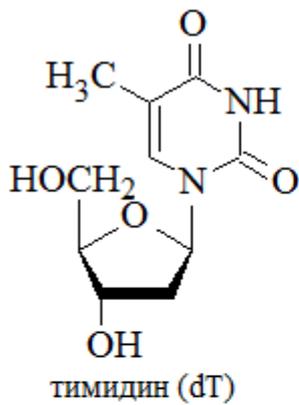


Наиболее употребительными являются названия нуклеозидов, производимые от тривиального названия соответствующих нуклеиновых оснований с суффиксами *-идин* у пиримидиновых и *-озин* у пуриновых нуклеозидов: аденин + рибоза → аденозин (A), аденин + дезоксирибоза → дезоксиаденозин (dA) и т. д. Исключением из этого правила является название дезоксирибозида тимина – тимидин (dT).

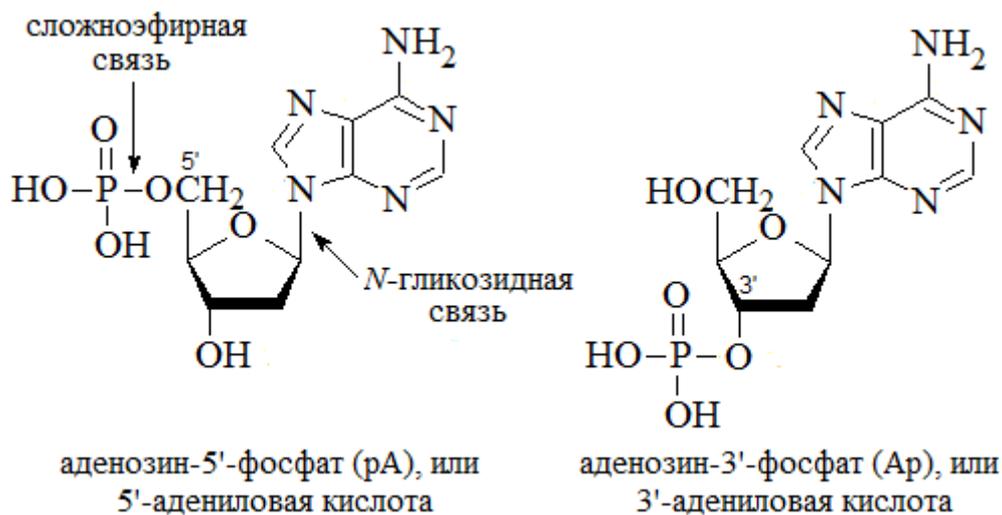
Рибонуклеозиды



Дезоксирибонуклеозиды



Фосфаты нуклеозидов называют *нуклеотидами*. Фосфорная кислота обычно этерифицирует спиртовой гидроксил при атоме С-5' или С-3' в остатке рибозы (рибонуклеотиды) или дезоксирибозы (дезоксирибонуклеотиды). При дальнейшем фосфорилировании могут образовываться ди- и трифосфаты.



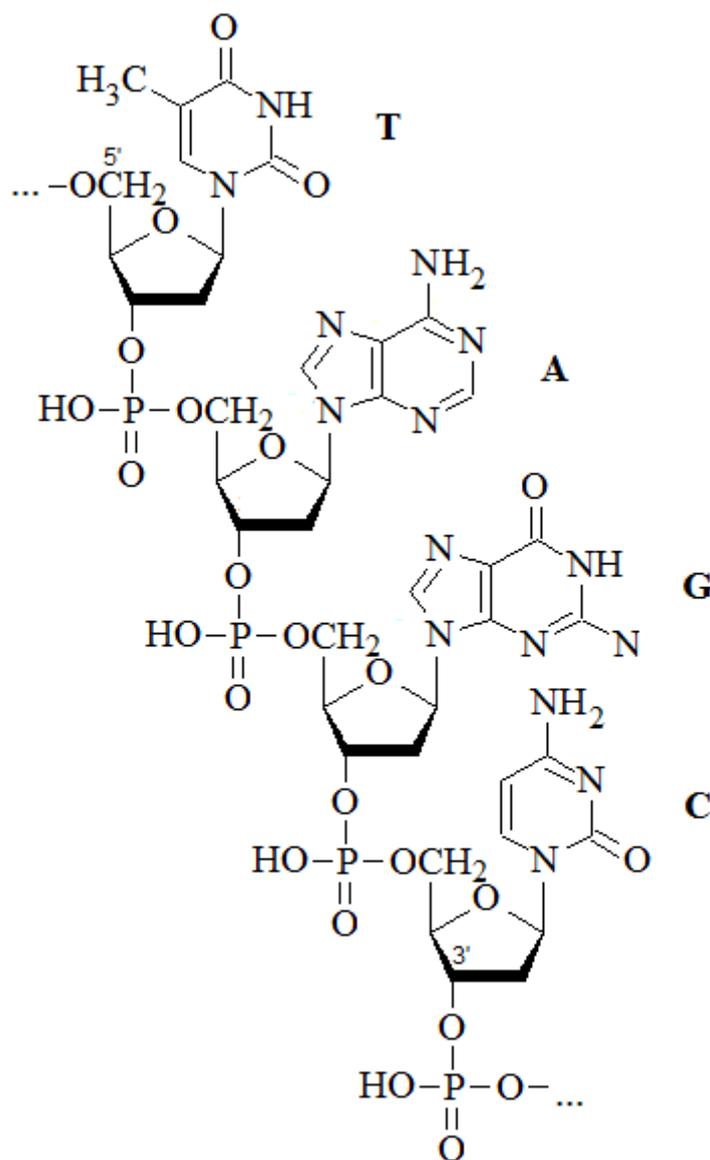
Нуклеотиды можно рассматривать не только как эфиры нуклеозидов, но и как кислоты (в связи с наличием остатка фосфорной кислоты). Соответственно для них используют два вида названий. Одно название включает наименование нуклеозида с указанием положения фосфатного остатка, например аденозин-3'-фосфат, уридин-5'-фосфат; другое строится с добавлением суффикса *-иловая кислота* к названию остатка нуклеинового основания, например 3'-адениловая кислота, 5'-уридиловая кислота. Используя однобуквенный код, 5'-фосфаты записываются с добавлением латинской буквы «р» *перед* символом нуклеозида, а 3'-фосфаты – *после* символа нуклеозида, например аденозин-5'-фосфат – pA, аденозин-3'-фосфат – Ap и т. д. Эти сокращенные обозначения применяются, как правило, для записи последовательности нуклеотидных остатков в нуклеиновых кислотах. По отношению к свободным нуклеотидам, т. е. не находящимся в составе полинуклеотидной цепи, используются их названия как монофосфатов с отражением этого признака в сокращенном коде, например аденозин-5'-фосфат – AMP (или АМФ – аденозинмонофосфат).

За счет фосфатного остатка нуклеотиды проявляют свойства двухосновной кислоты и в физиологических условиях при рН ~ 7 находятся в полностью ионизированном состоянии, представляя собой полианионы.

2.1.2. Структура полинуклеотидной цепи

В полинуклеотидных цепях нуклеотидные звенья связываются через фосфатную группу. Она образует две сложноэфирные связи: с С-3' одного нуклеотидного остатка и С-5' другого. Такую межнуклеотидную связь называют *3',5'-фосфодиэфирной*. Каркас цепи состоит из чередующихся пентозных и фосфатных остатков; гетероциклические основания присоединены к пентозным остаткам. Нуклеотид со свободной 5'-ОН группой называется 5'-концевым, а нуклеотид со свободной 3'-ОН группой – 3'-концевым.

Ниже приведена формула произвольного участка цепи ДНК. Данный фрагмент можно записать как d(TrApGpCp...) или d(T-A-G-C...). Часто букву d опускают, если очевидно, что речь идет о ДНК.



Принцип построения цепи РНК тот же, что и у ДНК, с двумя исключениями: пентозным остатком в РНК служит D-рибоза, а в наборе гетероциклических оснований используется не тимин, а урацил.

Хотя нуклеиновые кислоты содержат всего четыре типа мономерных звеньев, множество мыслимых нуклеотидных последовательностей превосходит таковое для белков вследствие существенно большей длины полинуклеотидных цепей [14, с. 35].

2.1.3. Особенности первичной структуры нуклеиновых кислот

РНК обычно состоят из одной полимерной цепи, а ДНК, напротив, в большинстве случаев представляют собой структуру из двух нековалентно связанных цепей. Эти цепи антипараллельны, т. е. направления образования фосфодиэфирных связей в них противоположны и 5'-конец одной цепи соседствует с 3'-концом другой.

Для двухцепочечных ДНК выполняются закономерности, сформулированные в 1950–1953 гг. американским биохимиком Эрвином Чаргаффом (*правила Чаргаффа*):

- 1) содержание пуриновых нуклеотидов (А+G) всегда равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (Т+С);
- 2) количество остатков аденина всегда равно количеству остатков тимина, количество остатков гуанина – количеству остатков цитозина.

При подсчете количества (или доли) остатков каждого главного нуклеинового основания учитываются все его производные минорные основания. Правила Чаргаффа для двухцепочечных РНК выполняются с учетом того, что вместо тимина надо брать урацил и его производные.

Выполнение правил Чаргаффа для двухцепочечных структур ДНК и РНК позволили позднее объяснить модель вторичной структурой нуклеиновых кислот схемой, основанной на *комплементарном взаимодействии* аденина с тимином (или урацилом) и гуанина с цитозином за счет образования водородных связей между аминогруппой одного основания и карбонильной группой другого, а также между амидным и иминным атомами азота. Пара АТ соединена двумя водородными связями, а пара GC – тремя. Расстояния между С-1'-атомами пентоз разных цепей равны 1,085 нм (рис. 26).

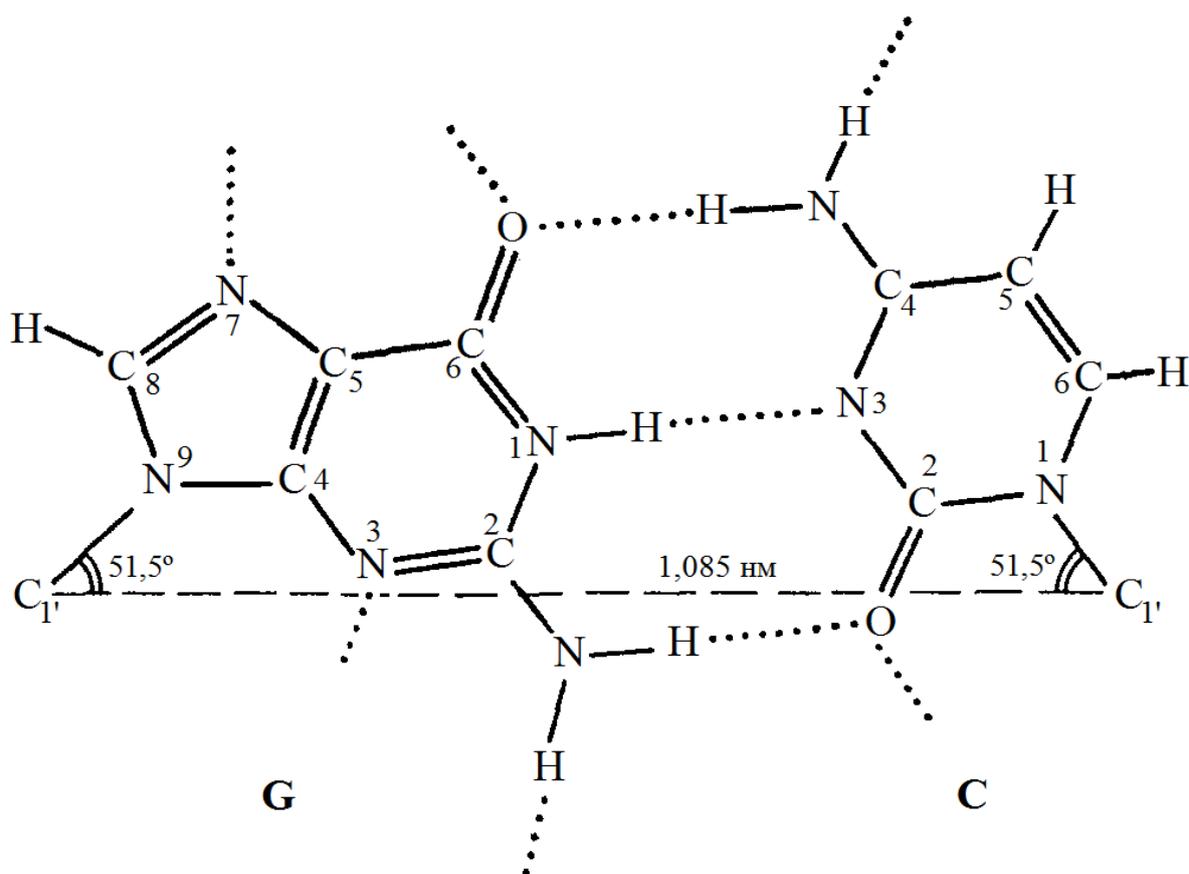
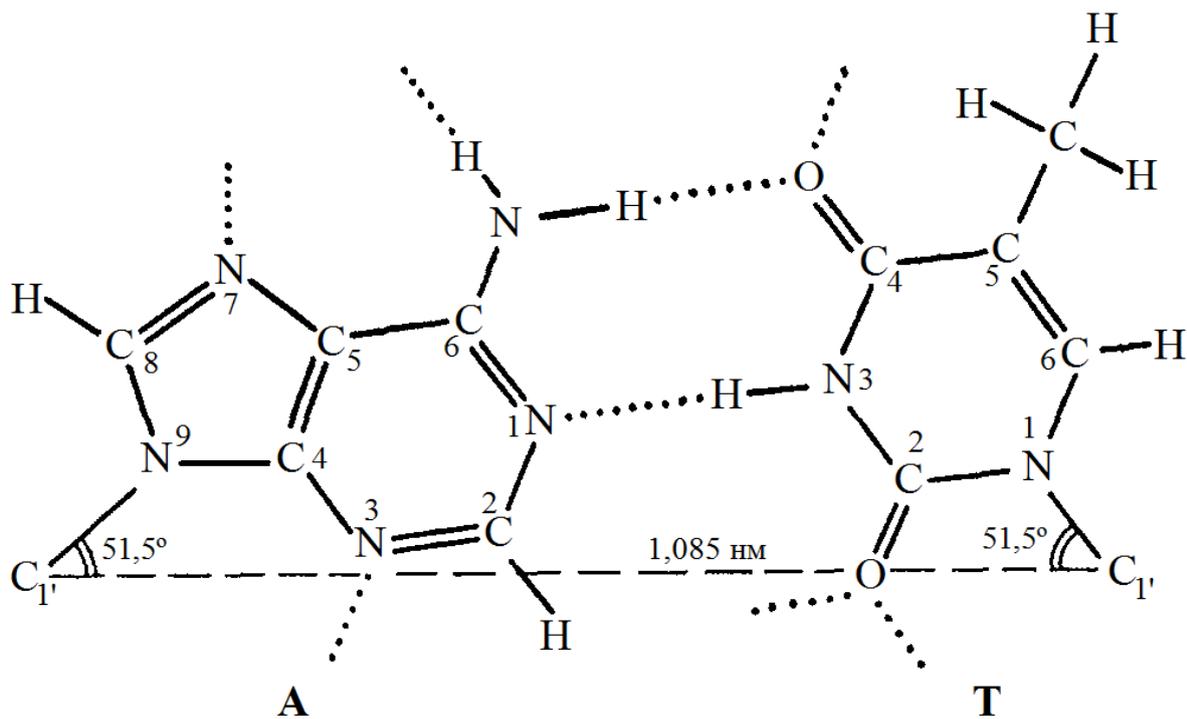


Рис. 26. Образование водородных связей между комплементарными нуклеиновыми основаниями [2, с. 228].

Ковалентные цепи природных полинуклеотидов могут быть строго линейными, разветвляться или замыкаться в кольцо, причем кольца могут быть сцепленными (продетыми друг в друга). Некоторые одноцепочечные нуклеиновые кислоты (или искусственно полученные полинуклеотиды) могут в некоторых местах замыкаться на себя, образуя, таким образом, двухцепочечные участки в виде «шпилек с петлями» (подробнее см. в разд. 2.3.2) [2, с. 226–227].

2.1.4. Этапы определения первичной структуры нуклеиновых кислот и значение данных исследований

Общая схема определения *первичной структуры* нуклеиновых кислот, т. е. последовательности нуклеотидных звеньев, связанных ковалентными связями в непрерывную цепь полинуклеотида, в целом аналогична схеме определения первичной структуры белков.

Современные методы установления нуклеотидной последовательности ДНК и РНК позволяют в одном эксперименте просеквенировать их фрагменты длиной в 150–300 нуклеотидных остатков (н. о.), поэтому молекулы нуклеиновых кислот предварительно фрагментируют. Для этого чаще всего ДНК гидролизуют в присутствии ферментов, причем проводят независимое расщепление двумя или более типами ферментов, в результате чего образуются перекрывающиеся фрагменты. Это позволяет после определения нуклеотидной последовательности соответствующих фрагментов реконструировать первичную структуру всей нуклеиновой кислоты.

Знание нуклеотидной последовательности важно для выяснения структуры, функций, происхождения, возможностей рекомбинации и клонирования молекул нуклеиновых кислот или их фрагментов.

2.1.5. Установление нуклеотидного состава

Установление нуклеотидного состава осуществляется, как правило, путем исследования продуктов гидролитического расщепления нуклеиновых кислот.

Из-за наличия 2'-ОН группы у рибозы межнуклеотидные связи в РНК значительно лабильнее, чем в ДНК и гидролизуются в мягких условиях в щелочной среде до нуклеотидов, которые, в свою очередь,

способны в щелочной среде отщеплять остаток фосфорной кислоты с образованием нуклеозидов. Нуклеозиды в кислой среде гидролизуются до гетероциклических оснований и углеводов [40, с. 430–431].

Химический гидролиз ДНК почти не применяют из-за осложнения его побочными процессами. Более предпочтителен ферментативный гидролиз под действием *эксонуклеаз*, катализирующих отщепление концевых звеньев ДНК путем гидролиза фосфодиэфирных связей. Обычно для этой цели используют фосфодиэстеразу из яда змей или эксонуклеазу III из *E. coli*, отщепляющие 3'-концевые нуклеотиды.

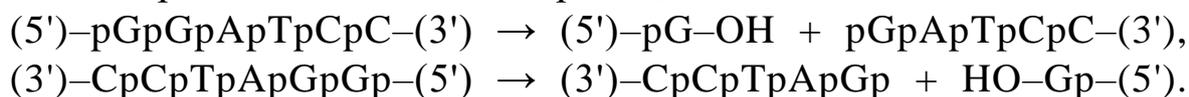
2.1.6. Подготовка ДНК и РНК к секвенированию

Методы фрагментации первичной структуры РНК изначально были основаны на применении специфических ферментов, расщепляющих макромолекулы в местах расположения определенных нуклеотидов (аналогично протеазам, использующимся для фрагментации полипептидных цепей). Так, пиримидиновые нуклеотиды распознаются панкреатической рибонуклеазой (РНКазой А), гуаниловые – РНКазой T₁, пуриновые – РНКазой U₂ и т. д. С помощью этого метода, в значительной мере разработанного в СССР в 1960–1970-е гг. академиком Александром Баевым и коллегами, расшифрованы нуклеотидные последовательности разных тРНК, 5S и 16S рРНК *E. coli*, РНК фагов R-17, MS2 и др. В то же время метод характеризуется высокой трудоемкостью и имеет ограниченное применение из-за очень малого размера получаемых фрагментов [16, с. 373; 14, с. 275].

Для фрагментации молекул ДНК в начале 1970-х гг. были найдены бактериальные ферменты, гидролизующие двунитевую ДНК не по отдельным нуклеотидным остаткам, а по нуклеотидным последовательностям из 4–6 остатков, благодаря чему образуется сравнительно небольшое число строго определенных фрагментов¹. Ферменты, катализирующие расщепление нуклеиновой кислоты по внутренним фосфодиэфирным связям, называются *эндонуклеазами рестрикции*, или *рестриктазами* (от лат. *restrictio* – «ограничение»).

¹ Последовательности расположения четырех или шести отдельных оснований могут реализоваться соответственно $4^4 = 256$ или $4^6 = 4096$ способами, т. е. воздействуя такими ферментами на геномную ДНК, можно получить фрагменты, содержащие цепи длиной в среднем по 260 или 4100 пар нуклеотидов (п. н.).

В качестве примера можно привести фермент из свободноживущей почвенной бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*, называемый сокращенно *Bam*III¹, который катализирует процесс гидролиза по участкам с последовательностью нуклеотидов G–G–A–T–C–C, причем расщепление в обеих цепях происходит между двумя остатками G. Схема расщепления, таким образом, может быть записана в виде



В табл. 6 приведены некоторые из рестриктаз, наиболее широко используемых при изучении структуры ДНК. В таблице для краткости представлена только одна цепь в направлении 5'→3', расщепления показаны стрелками.

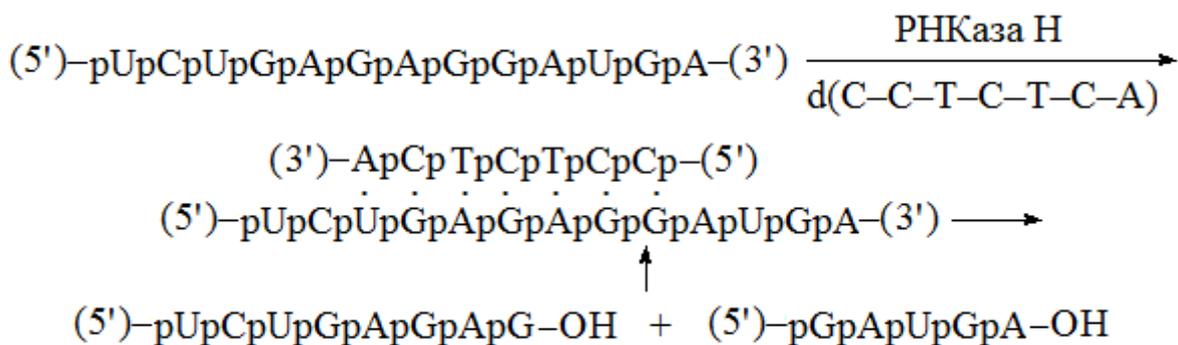
Таблица 6

Некоторые рестриктазы [3, с. 284]

Бактерия	Фермент	Последовательность 5'→3'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bam</i> III	G↓GATCC
<i>Escherichia coli</i> RY 13	<i>Eco</i> RI	G↓AATTC
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Ha</i> III	GG↓CC
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	C↓CGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK 8	<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C
<i>Providencia stuartii</i> 164	<i>Pst</i> I	CTGCA↓G
<i>Streptomyces albus</i> G	<i>Sal</i> I	G↓TCGAC
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>Alu</i> I	AG↓CT

Возвращаясь к проблеме специфической фрагментации молекул РНК, необходимо отметить применение открытой в 1972 г. рибонуклеазы H (РНКазы H), которая гидролизует полирибонуклеотиды в ДНК-РНК-гибридах [23, с. 15]. При использовании этого фермента с участком РНК, предназначенным для расщепления, предварительно связывают комплементарный ему олигодезоксирибонуклеотид и обрабатывают образовавшийся комплекс РНКазой H:

¹ Первая заглавная буква указывает на принадлежность к определенному роду бактериальной культуры, следующие две буквы характеризуют биологический вид. Далее, если необходимо, обозначается штамм. При наличии нескольких разновидностей ферментов внутри одного вида бактерий используются римские цифры (I, II, III).



Полученные с использованием рестриктаз фрагменты ДНК и РНК могут быть разделены электрофорезом.

Для фрагментации ДНК также применяется расщепление с помощью ультразвука. В этом случае разрывы происходят по случайным точкам. Получаемую смесь фрагментов подвергают эмульгированию, так, чтобы в каждой капле эмульсии оказывался в среднем один фрагмент. Для достижения достаточной чувствительности проводится размножение фрагментов, каждого в своей капле, с помощью полимеразной цепной реакции [15, с. 72].

2.1.7. Определение нуклеотидной последовательности

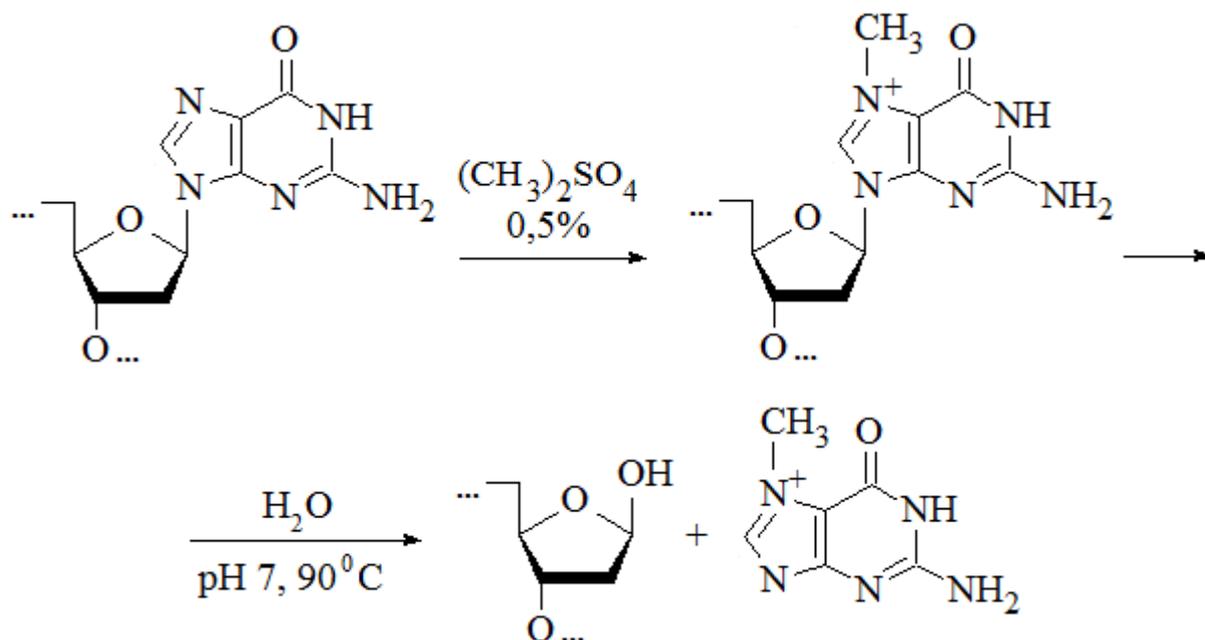
Существуют два разработанных примерно в одно время, но принципиально различных подходы к определению нуклеотидной последовательности в полинуклеотидах – химическое и ферментативное секвенирование (*метод Максама – Гилберта* и *метод Сенгера*).

Метод *химического секвенирования* предложен в 1977 г. американскими биохимиками Аланом Максамом и Уолтером Гилбертом и основан на ограниченной химической модификации гетероциклических оснований, расщеплении полинуклеотидной цепи по местам модифицированных оснований и анализе образовавшихся продуктов методом гель-электрофореза (рис. 27).

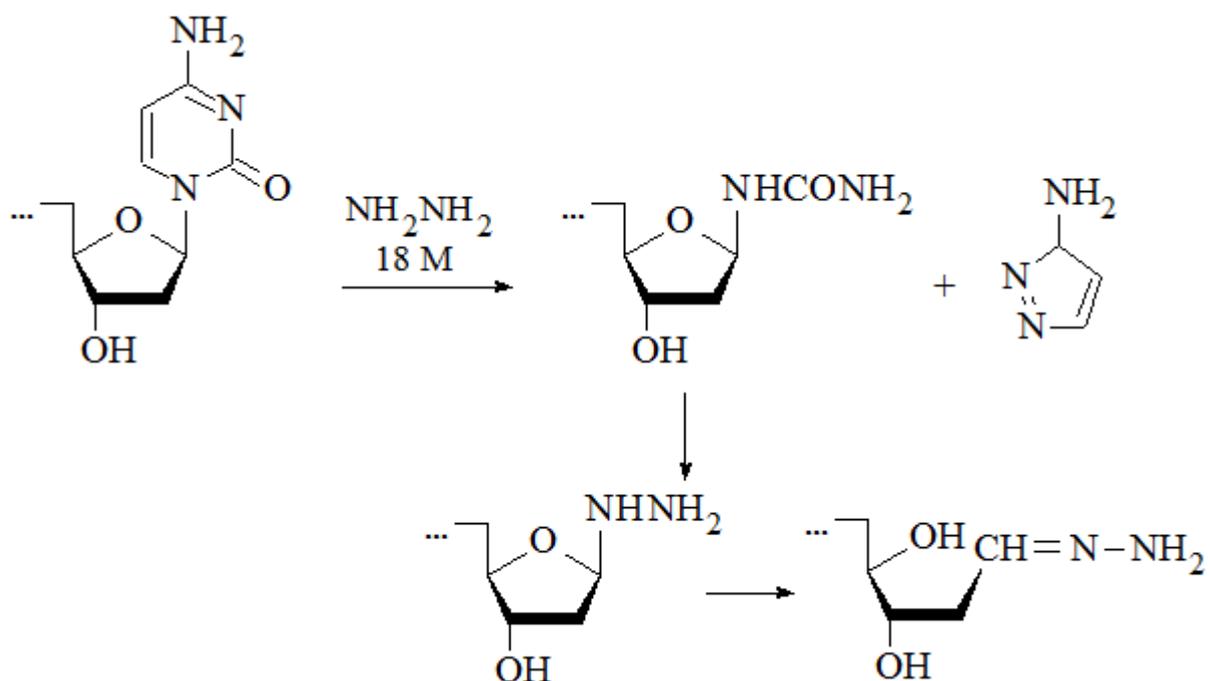
На первом этапе метода Максама – Гилберта в 5'-конец анализируемого участка полинуклеотида с помощью фермента полинуклеотидкиназы из фага T₄ вводят остаток фосфорной кислоты, меченный радиоактивным изотопом ³²P (период полураспада τ_{1/2} = 14,3 сут).

На втором этапе анализируемый образец разделяют на четыре равных порции, каждую из которых обрабатывают таким образом, чтобы в реакции участвовало либо только одно, либо преимущественно одно из двух пуриновых или пиримидиновых оснований.

Для модификации пуриновых оснований используют диметилсульфат или муравьиную кислоту. В 66%-ной муравьиной кислоте протонируются остатки как гуанина, так и аденина. Диметилсульфат преимущественно метилирует по атому N-7 остатки гуанина, которые, приобретая положительный заряд, облегчают атаку водой гликозидного атома C-1':

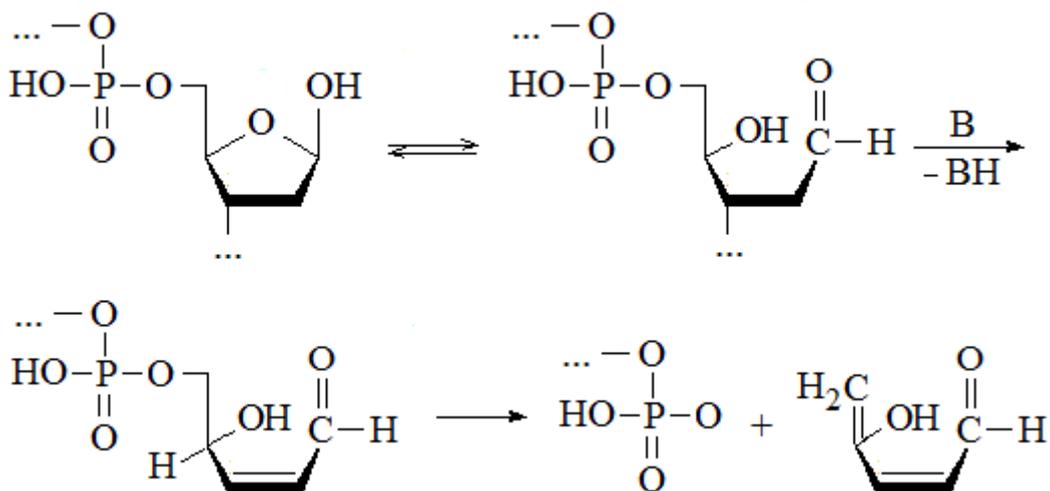


Пиримидиновые основания модифицируют гидразином. При этом пиримидиновые кольца раскрываются, а затем остаток мочевины замещается на остаток гидразина и изомеризуется в гидразон:



Реакция проходит как по остаткам цитозина, так и по остаткам тимина. Однако при использовании раствора гидразина вместе с 2 М NaCl реакция по тимидиновым фрагментам подавляется. Это позволяет получить картину распределения остатков обоих пиримидиновых нуклеотидов и отдельно – дезоксицитидиновых звеньев.

В результате описанных выше реакций в полинуклеотидной цепи появляется модифицированное (лишенное гетероцикла) мономерное звено, которое можно выщепить из цепи обработкой пиперидином (на приведенной ниже схеме это органическое основание обозначено символом В). Разрыв является процессом β -элиминирования – отщепления радикала, находящегося в β -положении к полярной связи C=O или к системе сопряженных связей C=C–C=O. Процесс в равной степени может проходить, если вместо карбонильной группы находится гидразонная –CH=N–NH₂ [14, с. 279; 50, с. 36].



Таким образом, для каждой из четырех анализируемых проб получают набор небольших по размеру фрагментов ДНК, часть из которых несет радиоактивную метку. На заключительном, третьем, этапе все эти фрагменты (как меченые, так и немеченые) разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле. Вязкая среда (гель), в которой проводится электрофорез, оказывает сопротивление перемещению фрагментов, пересиливающее действие поля: чем длиннее фрагмент, тем медленнее он движется, но все фрагменты располагаются в порядке, соответствующем их длинам, т. е. метод позволяет разделять фрагменты, отличающиеся по длине на один нуклеотид. Электрофорез проводится при повышенной температуре в трис-боратной буферной системе, содержащей 7 М мочевины, что способствует разрушению вторичной структуры фрагментов [50, с. 40]. По-

лученные электрофореграммы проявляют с помощью рентгеновской пленки (радиоавтографически). В результате на электрофореграммах выявляются в виде темных пятен только радиоактивные фрагменты, по которым и определяют нуклеотидную последовательность исследуемой ДНК.

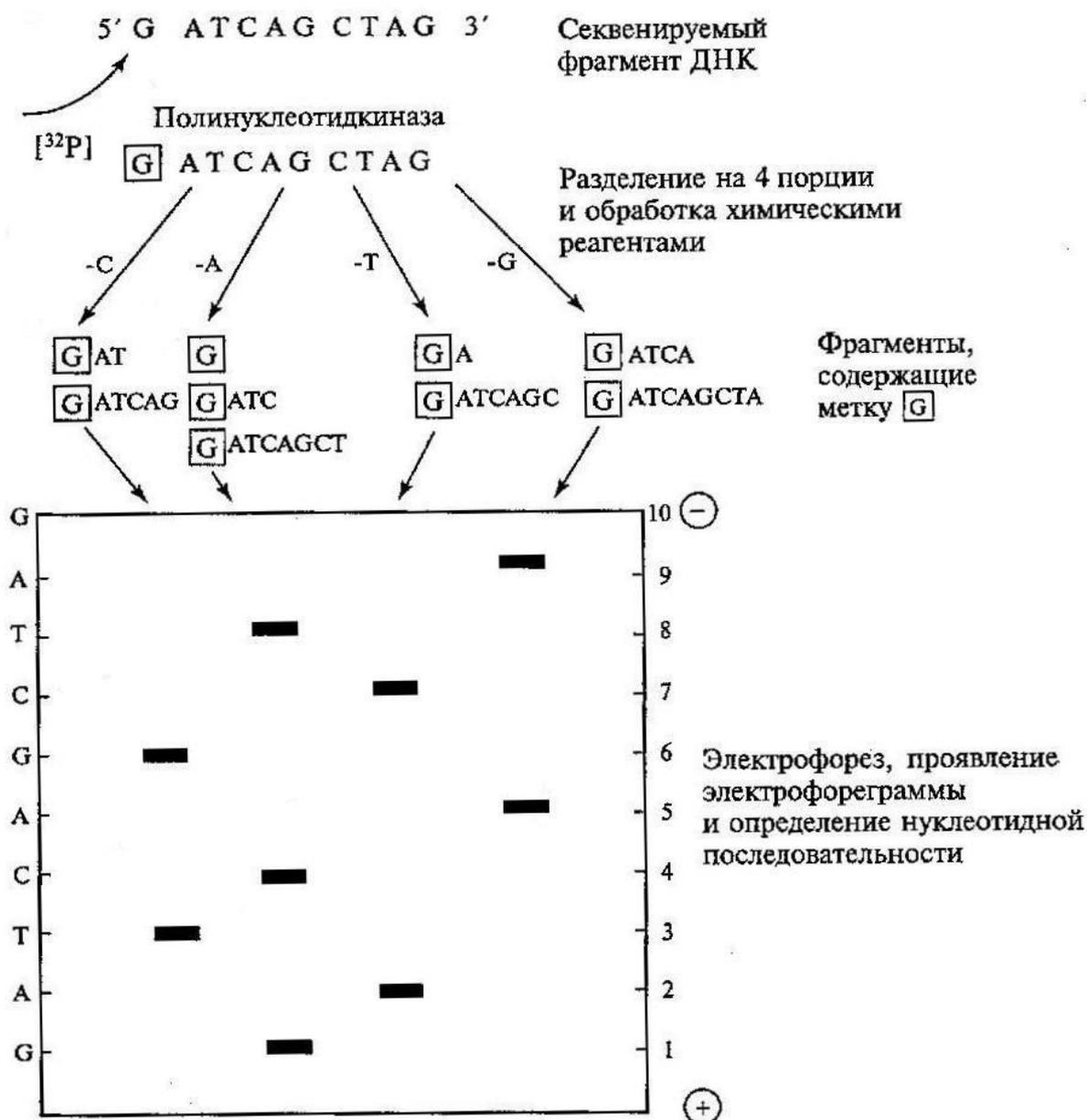


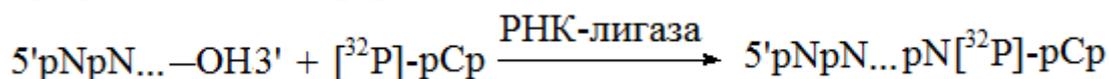
Рис. 27. Схема определения нуклеотидных последовательностей по Максому – Гилберту [16, с. 374]:

1–10 – длина (число нуклеотидов) фракционируемых методом электрофореза радиоактивно меченных фрагментов

Например, если в пробе, где было проведено выщепление цитозина (–С), радиоактивность была выявлена во фрагментах химического расщепления длиной 3 и 6 нуклеотидов, то это означает, что в се-

квенируемом участке ДНК цитозин находится в позициях 4 и 7 соответственно (рис. 27). Аналогично если в пробе, где проводилось выщепление гуанина (–G), методом электрофореза были выявлены радиоактивные фрагменты размером 5 и 9 нуклеотидов, то это значит, что гуанин в секвенируемом участке располагается в положениях 6 и 10. Таким образом, фракционируя на одной гелевой пластине фрагменты, образовавшиеся после специфического выщепления каждого из четырех нуклеотидов, можно непосредственно читать нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК по проявленной электрофореграмме.

Полная нуклеотидная последовательность многих классов РНК (длиной до 250–300 нуклеотидных остатков) может быть прямо определена с помощью одного из вариантов метода Максама – Гилберта. Как и в случае фрагментов ДНК, на один из концов РНК вводится радиоактивная метка. Наряду с фосфорилированием 5'-конца полинуклеотидной цепи здесь применяется введение радиоактивной метки на 3'-конец молекулы. Для этого к 3'-концевой ОН-группе РНК пришивают меченый по 5'-фосфатной группе цитидин-3',5'-дифосфат (5'-[³²P]-pCp) с помощью фермента РНК-лигазы [23, с. 19–20]:



Наряду с химическим расщеплением секвенирование РНК можно проводить путем гидролиза ее цепи специфическими РНК-азами.

Метод *ферментативного секвенирования* предложен в 1975 г. группой ученых под руководством Фредерика Сенгера и считается наиболее перспективным для исследования первичной структуры больших молекул нуклеиновых кислот, вплоть до ДНК хромосом человека. Метод Сенгера основан на анализе структуры не самой нуклеиновой кислоты или, точнее, ее достаточно длинного фрагмента, а продукта, получаемого путем ферментативного построения комплементарной цепи на исследуемой одноцепочечной ДНК как на матрице при происходящем в разных местах ингибировании роста новосинтезируемой цепи. Аналогичным образом с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы можно анализировать структуру молекул РНК, осуществляя обратную транскрипцию.

В своем оригинальном варианте метод Сенгера получил также название *плюс-минус-метода*, поскольку реакция полимеразного ко-

пирования изначально проводилась либо в отсутствие одного из четырех типов нуклеотидов (минус-система), либо в присутствии нуклеотида только одного типа (плюс-система), что ограничивало возможность наращивания полинуклеотидной цепи, останавливая (терминируя) ее синтез из-за недостатка того или иного нуклеотида. В качестве фермента использовалась ДНК-полимераза I из *E. coli*, или, точнее, фрагмент Кленова, который получают из ДНК-полимеразы I после протеолитического отщепления домена, ответственного за 5'→3'-экзонуклеазную активность. Позднее для остановки синтеза стали использовать специальные молекулы-терминаторы, представляющие собой 2',3'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (ddNTP), т. е. аналоги нуклеотидов, которые лишены гидроксильной группы у 3'-атома углерода.

Для секвенирования по Сенгеру используют одноцепочечную молекулу ДНК (матрицу), а также короткий затравочный олигодезоксинуклеотид (праймер), комплементарный некоторому участку матрицы (рис. 28). Структура этого участка должна быть заранее установлена, например, анализом последовательности нуклеотидов небольшого фрагмента исследуемой ДНК методом Максама – Гилберта.

В системе происходит удлинение праймера, т. е. наращивание новой цепи ДНК, комплементарной анализируемой матрице. Молекулы ddNTP являются близкими структурными аналогами природных субстратов ДНК-полимеразы и поэтому с определенной вероятностью опознаются ферментом и матрицей и включаются в строящуюся полинуклеотидную цепь. Если такое включение произошло, то дальнейший рост цепи прекращается, т. к. присоединившийся фрагмент молекулы-терминатора лишен 3'-гидроксигруппы, необходимой для присоединения следующего звена цепи. Поскольку терминация синтеза происходит в разных местах, то образуется набор фрагментов различной длины, начиная с 5'-конца праймера до места расположения соответствующего присоединенного ddNTP. Вводя в праймер радиоактивную метку (^{32}P) и инкубируя комплекс «матрица – праймер» в присутствии всех четырех обычных 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP и dCTP, в общем виде – dNTP) и какого-либо одного ddNTP, можно, как и в методе Максама – Гилберта, разделить полученную смесь фрагментов электрофорезом в полиакриламидном геле и определить по длинам радиоактивных фрагментов

расположение комплементарных нуклеотидов в анализируемом фрагменте ДНК. Если, например, на радиоавтографе пробы, полученной путем копирования в присутствии ddATP, выявлены фрагменты длиной 1 и 7 нуклеотидов, то в анализируемом фрагменте ДНК в соответствующих позициях расположен тимин. Далее проводят три аналогичных эксперимента с использованием трех других дидезокси-терминаторов и тем самым определяют полную последовательность синтезированной ДНК и, следовательно, последовательность анализируемой ДНК, которая комплементарна полученному продукту репликации. После этого можно синтезировать олигонуклеотид, комплементарный участку секвенированной последовательности, и использовать его в качестве праймера для следующего цикла секвенирования [14, с. 281–282].

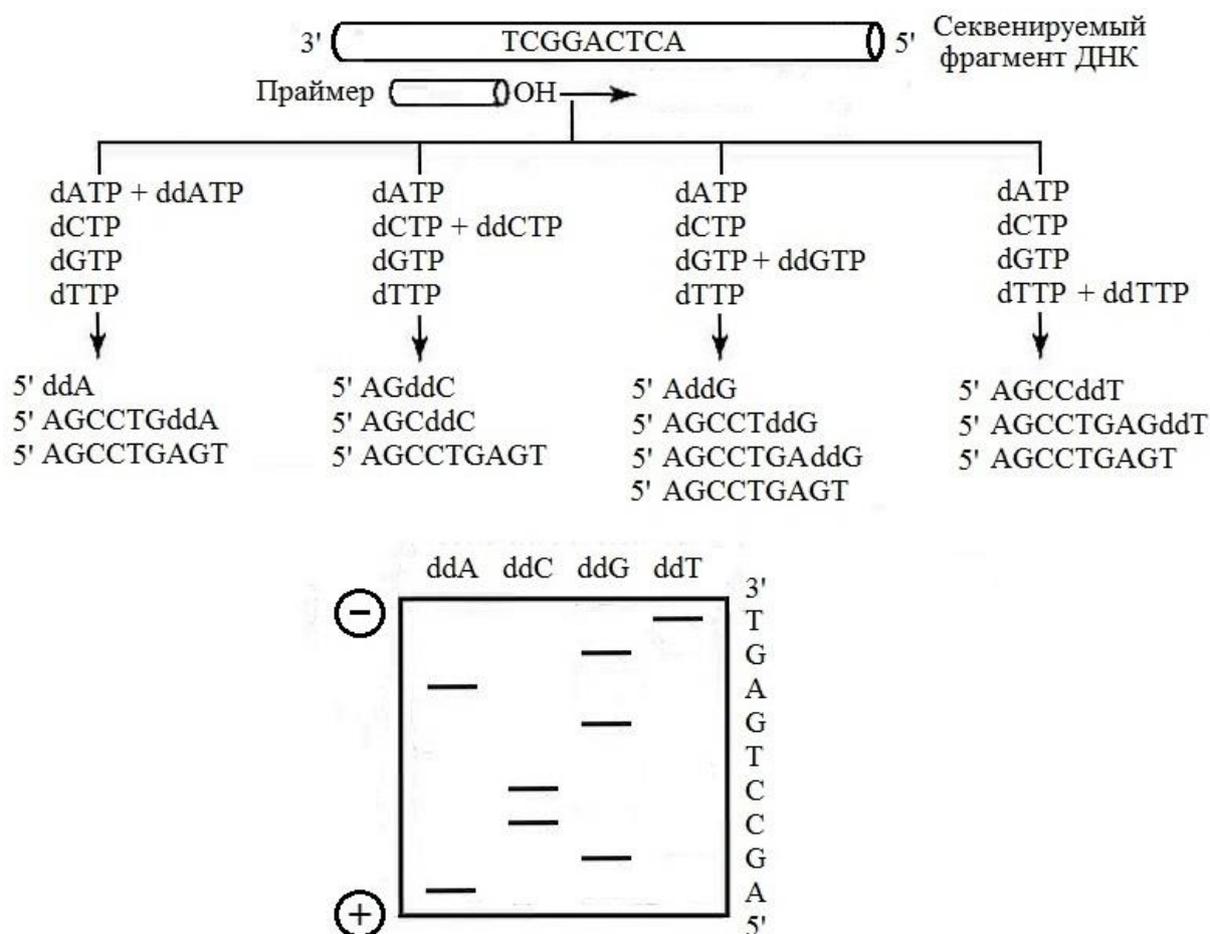


Рис. 28. Схема определения нуклеотидных последовательностей по Сенгеру с дидезокситерминаторами [16, с. 376]

В настоящее время для секвенирования ДНК по Сенгеру созданы универсальные конструкции (векторы) на базе генома фага M13

для встраивания в них изучаемого фрагмента (рис. 29). В таких конструкциях любая встроенная последовательность всегда ограничена одними и теми же последовательностями фаговой ДНК, что позволяет применять универсальный праймер, который может быть синтезирован химическими методами. Радиоактивную метку вводят в праймер или по α -фосфатной группе dNTP. В последнем случае это может быть не только меченый атом фосфора (^{32}P), но и атом серы (^{35}S), заменяющий атом кислорода [16, с. 377]. Для детектирования применяется менее чувствительный, по сравнению с радиоавтографией, но

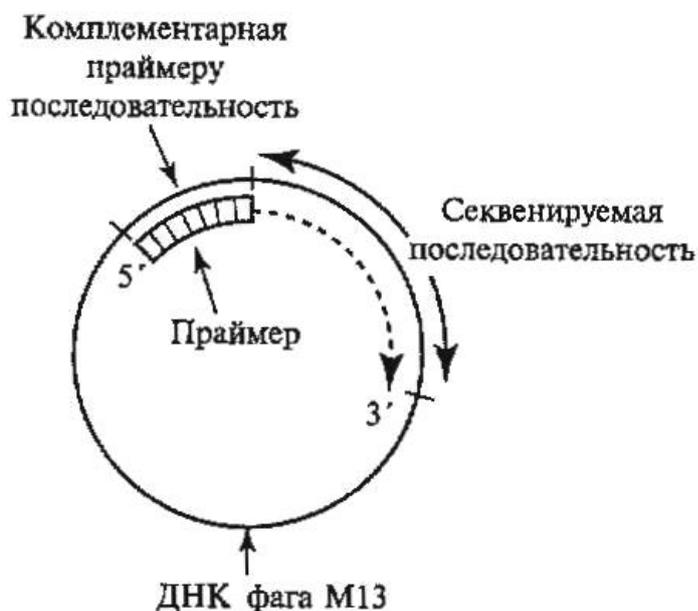


Рис. 29. Схема универсальной конструкции на основе генома фага М13 с использованием универсального праймера [16, с. 376]

легко поддающийся автоматизации флуоресцентный метод. С этой целью на 5'-конец праймера вводят флуоресцентные метки, причем для каждого из четырех анализируемых нуклеотидов используют четыре различных по своим спектральным характеристикам флуоресцирующих агента (красителя). После электрофоретического разделения гель сканируется при четырех различных длинах волн, и полученная информация сразу обрабатывается на компьютере. Этот подход положен в основу создания *автоматических секвенаторов*, обеспечивающих скорость секвенирования в сотни тысяч нуклеотидов в сутки. Столь высокие темпы позволяют определять полную нуклеотидную последовательность ДНК, составляющей геном любого организма, включая геном человека [23, с. 19].

К современным методам скоростного секвенирования геномов относится *пиросеквенирование*, разработанное в 1988 г. шведским биохимиком Полом Ниреном. Принцип метода основан на уже упоминавшемся плюс-минус-секвенировании. Процесс присоединения 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата (dNTP) к анализируемой мат-

рице сопровождается отщеплением остатка пиродифосфорной кислоты $H_4P_2O_7$ (пиродифосфата), а если dNTP не соответствует считываемому на данном шаге нуклеотиду ДНК-матрицы, то пиродифосфат не образуется. Детекция пиродифосфата обычно осуществляется на основе его превращения в аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) с помощью фермента сульфорилазы:



АТФ вводят в реакцию с люциферин¹ с образованием люцифериладенилата, способного при участии фермента люциферазы взаимодействовать с кислородом с испусканием кванта света. Регистрируя фотоумножителем или цифровой камерой свечение в системе, содержащей люциферин и люциферазу, определяют природу нуклеотидов секвенируемой ДНК [15, с. 76–77].

Контрольные вопросы

1. Какие компоненты входят в состав нуклеотидов и какие связи образуются между ними в молекулах нуклеиновых кислот?
2. Перечислите гетероциклические основания, входящие в состав нуклеиновых кислот. Какие основания называют минорными?
3. Как строятся названия нуклеозидов и нуклеотидов?
4. Для чего применяются экзо- и эндонуклеазы (рестриктазы)? Приведите примеры рестриктаз и поясните принцип их действия.
5. Перечислите этапы секвенирования нуклеиновых кислот методом Максама – Гилберта.
6. Какие реакции используются для химической модификации гетероциклических оснований в методе Максама – Гилберта?
7. Как проводится разделение фрагментов ДНК и установление нуклеотидной последовательности в методе Максама – Гилберта?
8. На чем основан метод секвенирования ДНК по Сенгеру?
9. Опишите метод ферментативного секвенирования с использованием универсальных конструкций на базе генома фага M13.
10. В чем заключается метод пиродифосфатного секвенирования?
11. Каковы особенности применения методов Максама – Гилберта и Сенгера для секвенирования РНК?

¹ Люциферины (от лат. *lucifer* – «несущий свет») – класс светоизлучающих веществ, обнаруженных в организмах, способных к биолюминесценции.

2.2. ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Вторичная структура нуклеиновых кислот создается за счет взаимодействия соседних по полинуклеотидной цепи мономерных звеньев, а в случае двуспиральных молекул (или участков молекул) также взаимодействием нуклеотидных остатков, находящихся напротив друг друга в двойной спирали.

2.2.1. Конформации компонентов нуклеиновых кислот

Как и для белков, конформации нуклеиновых кислот и их компонентов, можно описать с помощью торсионных (двугранных) углов. Выделив повторяющуюся единицу основной полинуклеотидной цепи (последовательность атомов C-3' – O – P – O – C-5' – C-4' – C-3' на рис. 30), конформацию остова полинуклеотида можно описать шестью торсионными углами: ω , ϕ , ψ , θ , ξ и σ . Кроме того, надо принимать

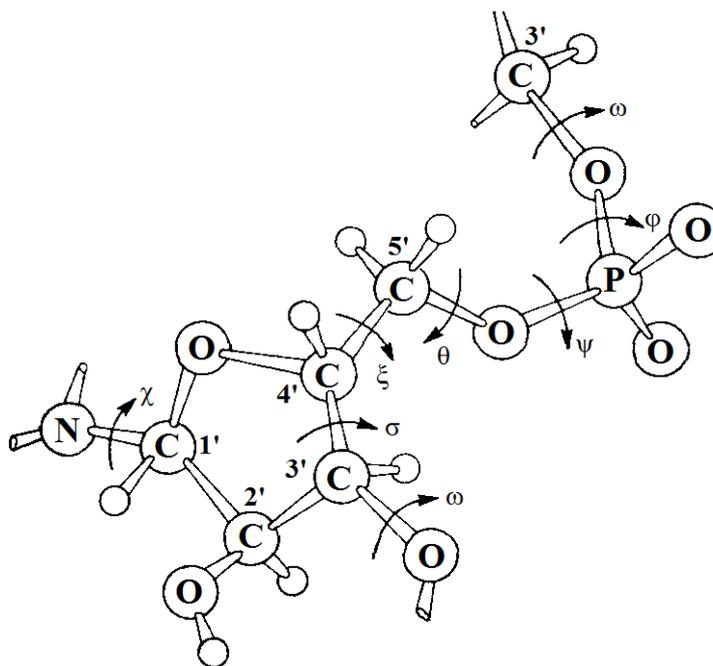


Рис. 30. Двугранные углы пентозофосфатной цепи [21, с. 129]

во внимание конформационные изменения фуранозного цикла и положение основания относительно углеводной части, которое определяется вращением вокруг N-гликозидной связи и задается значением угла χ (рис. 30) [26, с. 331].

Учитывая практически плоское строение нуклеиновых оснований (их атомы выходят из плоскости не более чем на 0,01 нм), определяющую роль в конформации нуклеотидной единицы играет фуранозное кольцо. В подавляющем большинстве случаев оно может принимать одну из двух изогнутых твист-конформаций (от англ. *twist* – «изгиб»): C2'-эндо- или C3'-эндо-конформацию, в которых атом C-2' или C-3' находится над плоско-

стью атомов С-1', О и С-4', выступая из нее примерно на 0,05 нм (рис. 31)¹. В РНК углеводный фрагмент чаще всего находится в С3'-эндо-конформации, а в ДНК встречаются обе конформации, что приводит к большому разнообразию пространственных структур ДНК.

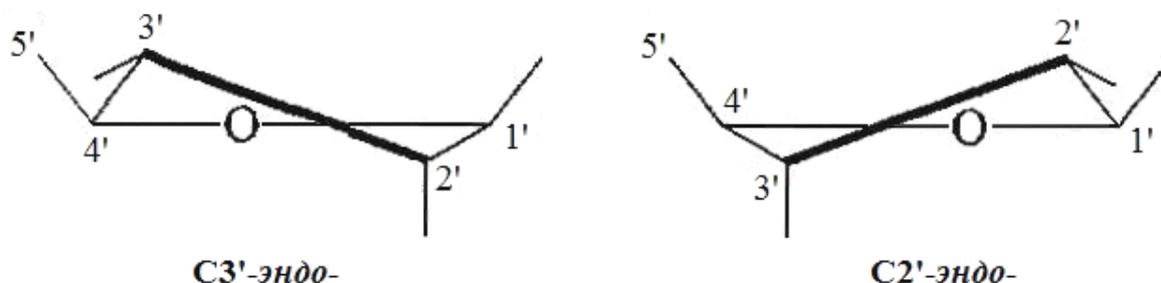
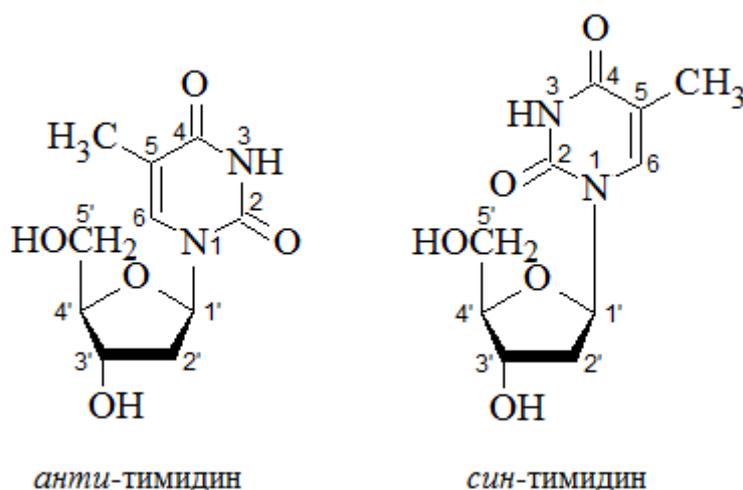


Рис. 31. Конформации углеводных остатков в ДНК и РНК [16, с. 81]

Важной характеристикой в определении конформаций нуклеиновых кислот является взаимное расположение гетероциклического основания и пентозы, которое определяется углом вращения вокруг *N*-гликозидной связи χ . Считается, что если атомы С-2 и С-3 пиримидинового кольца или атомы С-1 и С-2 пуринового кольца находятся по одну сторону относительно гликозидной связи С-1'–N-1, а пентозное кольцо – по другую, то мы имеем дело с *анти*-конформером, а если указанные атомы оснований и пентозное кольцо находятся по одну сторону от гликозидной связи (основание располагается над сахаром), то это *син*-конформер.



¹ С2'-эндо- и С3'-эндо-конформации также называют S- и N-конформациями или ${}_3T^2$ и ${}_2T^3$ (верхний индекс показывает номер углеродного атома, расположенного над плоскостью атомов С-1', О и С-4', а нижний индекс – номер углеродного атома, расположенного под этой плоскостью) [1, с. 226–227].

Моно- и олигонуклеотиды существуют предпочтительно в *анти*-конформации ($\chi = 0-90^\circ$), но могут довольно легко переходить в *син*-конформацию. В обычных же формах двуспиральных ДНК и РНК мономерные звенья имеют исключительно *анти*-конформацию.

2.2.2. Двойная спираль ДНК

В 1953 г. на основании данных о структуре мономерных остатков нуклеиновых кислот и характерной для них парности гетероциклических оснований американский биолог Джеймс Уотсон и его британский коллега Фрэнсис Крик предложили модель пространственной структуры ДНК (рис. 32).

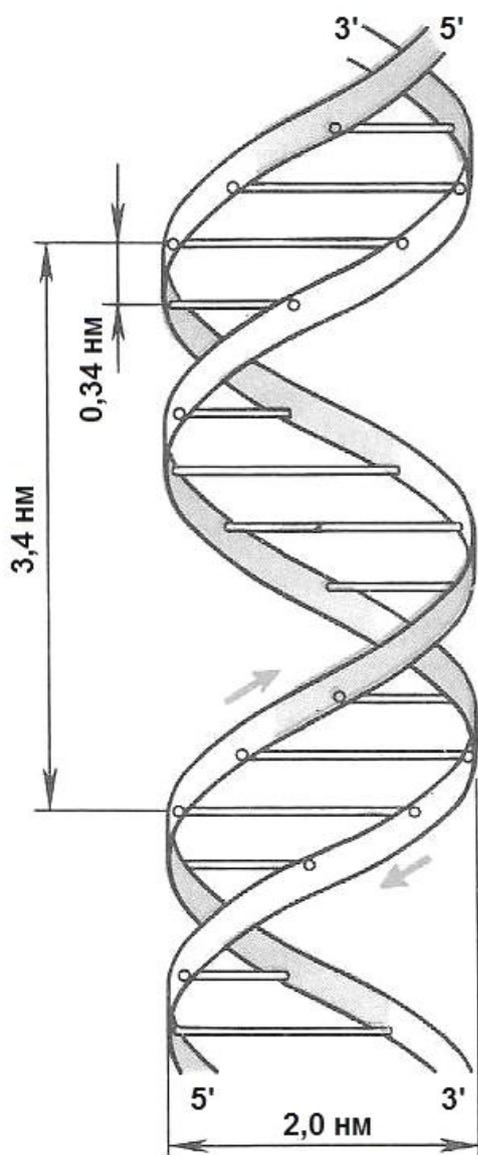


Рис. 32. Схематическое изображение двойной спирали ДНК [37, с. 162]

Согласно этой модели молекула ДНК представляет собой правильную правовинтовую спираль диаметром 2,0 нм, образованную двумя антипараллельными полинуклеотидными цепями, закрученными друг относительно друга и вокруг общей оси. Нуклеотиды находятся в *анти*-конформации и поэтому комплементарные пары гидрофобных нуклеиновых оснований располагаются одна над другой внутри спирали (тем самым в водном растворе уменьшается площадь их контакта с молекулами воды), а гидрофильные пентозофосфатные цепи обвивают эту стопку оснований снаружи. Образно говоря, двойная спираль похожа на винтовую лестницу: две «стойки» этой лестницы («тяжи» ДНК) образованы основными цепями, а пары гетероциклических оснований образуют как бы «ступеньки» лестницы. Плоскость, в

которой лежат кольца оснований, практически перпендикулярна главной оси спирали, проходящей, по существу, через центр каждой пары. Соседние пары оснований в ДНК повернуты друг относительно друга на 36° .

Длина витка спирали (ее шаг, или период идентичности) составляет 3,40 нм. На один виток спирали приходится 10 дезоксирибонуклеотидов в одной цепи, а межнуклеотидное расстояние вдоль оси составляет соответственно 0,34 нм. Спираль закручена таким образом, что на ее поверхности можно выделить две бороздки: большую шириной около 2,20 нм и малую шириной около 1,20 нм (их называют также главным и минорным желобками).

Двойная спираль стабилизируется, прежде всего, за счет *водородных связей* между пуриновыми основаниями одной цепи и пиримидиновыми основаниями другой цепи, т. е. между парами аденин – тимин и гуанин – цитозин (рис. 26). Наряду с водородными связями фиксации двойной спирали ДНК способствуют так называемые *вертикальные*, или *стэкинг-взаимодействия* между основаниями, расположенными друг над другом (от англ. *stacking* – «укладываться в стопку»). Эти взаимодействия происходят между функциональными группами ($C=O$ и $C-NH_2$) одного основания и π -электронами основания, соседнего с ним по вертикали. На существование стэкинг-взаимодействий в растворах ДНК указывает *гипохромный эффект* – отклонение оптической плотности и других физико-химических характеристик растворов ДНК от значений, наблюдаемых для смеси мономерных компонентов, состав которых идентичен нуклеотидному составу ДНК (см. разд. 1 главы II) [26, с. 335].

Более поздними исследованиями было установлено, что модель Уотсона – Крика описывает структуру только одной, но основной формы двуспиральной ДНК, существование которой предполагается *in vitro* и в водных растворах. Эта структура была названа *B-формой*. Помимо нее существуют и могут переходить друг в друга в зависимости от внешних условий другие формы, которые при соблюдении общего плана строения молекулы ДНК в виде биспирального полидезоксирибонуклеотида, различаются по числу нуклеотидов, приходящихся на один виток, отклонению плоскости оснований от направления, перпендикулярного оси двойной спирали, и углу между плоскостями комплементарных оснований (табл. 7).

Характеристика некоторых конформационных состояний ДНК [16, с. 89]

Параметр	А-форма	В-форма	С-форма	Д-форма	Z-форма
Число пар нуклеотидных остатков на виток	11	10	9,3	8	12
Угол наклона плоскостей оснований к оси спирали, град	20	-2	-6	-6	-7
Угол поворота оснований вокруг оси спирали, град	32,7	36	38,6	45,0	-30
Расстояние комплементарных пар от оси спирали, нм	0,425	0,063	0,213	0,143	-
Расстояние между нуклеотидными остатками по высоте спирали, нм	0,256	0,338	0,332	0,304	0,340
Угол между плоскостями комплементарных оснований, град	8	5	5	-	-
Конформация дезоксирибозы	C3'-эндо-	C2'-эндо-	C2'-эндо-	C2'-эндо-	C2'-эндо-, C3'-эндо-

А-форма ДНК может быть получена из водных растворов при добавлении в них растворителей с меньшей диэлектрической проницаемостью, например, спирта. Остаток дезоксирибозы при переходе в *А-форму* принимает *C3'-эндо-*конформацию, что приводит к уменьшению расстояния между фосфатными группами и, следовательно, к уменьшению расстояний между нуклеотидными парами вдоль оси спирали (до 0,256 нм при 11 нуклеотидных остатках на виток спирали). Диаметр спирали увеличивается, изменяется ширина и глубина бороздок (большая бороздка становится шире и глубже), пары оснований образуют с осью спирали угол около 20° и смещаются от оси к периферии спирали на 0,4–0,5 нм, т. е. почти на половину радиуса. Винтовая лестница, с которой сравнивают двойную спираль, вследствие этих факторов у *А-формы* становится более полой. Внутри спирали возникает полость диаметром 0,40 нм (рис. 33, 34).

Впоследствии были описаны и другие конфигурации правозакрученных спиральных ДНК, более «рыхлые», чем *А-* и *В-* формы. Так, под действием солей лития образуется *С-форма*, а из фага Т2

выделена *D-форма*, в которых на один виток спирали приходится лишь 9,3 и 8 нуклеотидов соответственно (рис. 34).

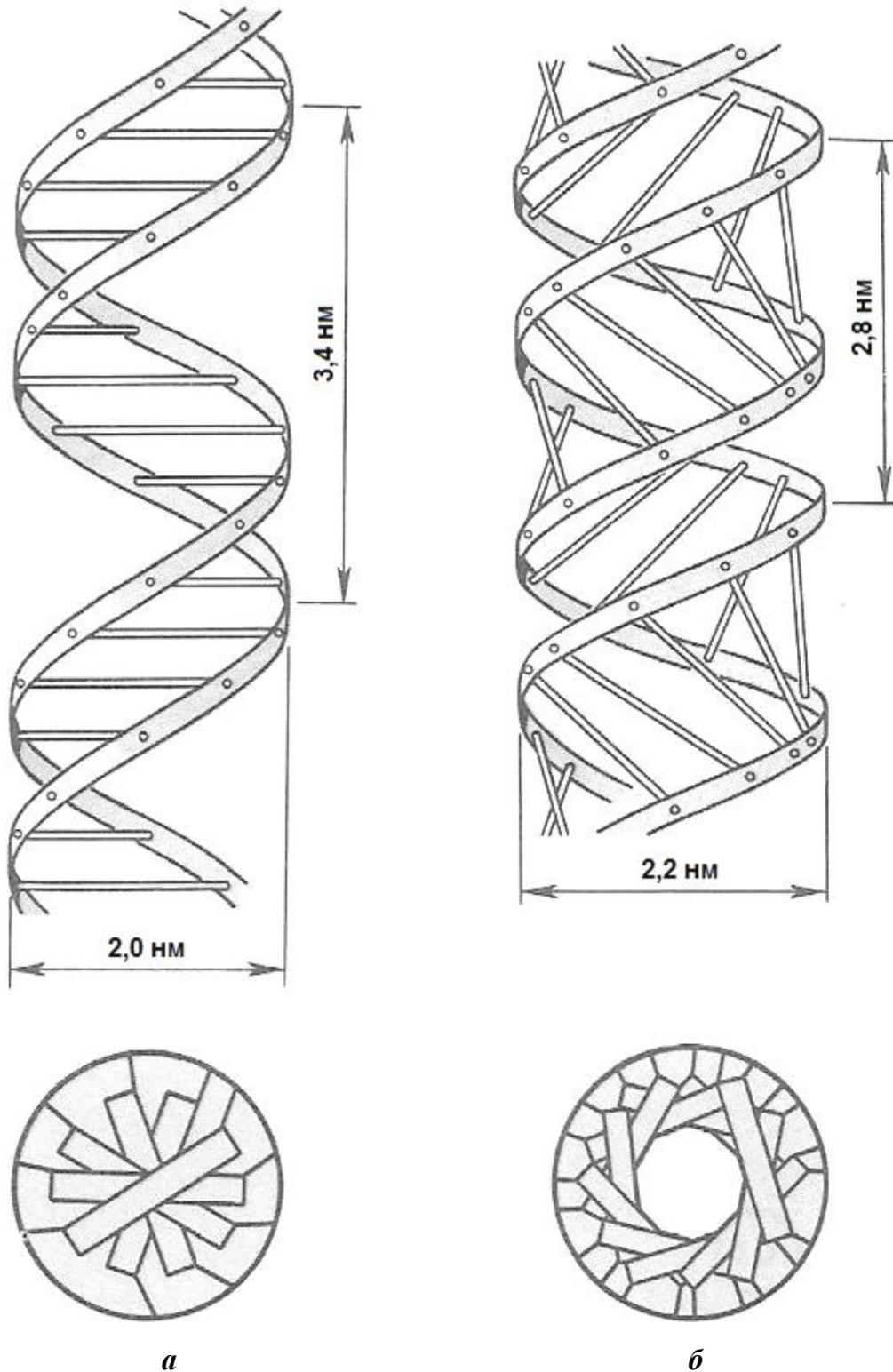
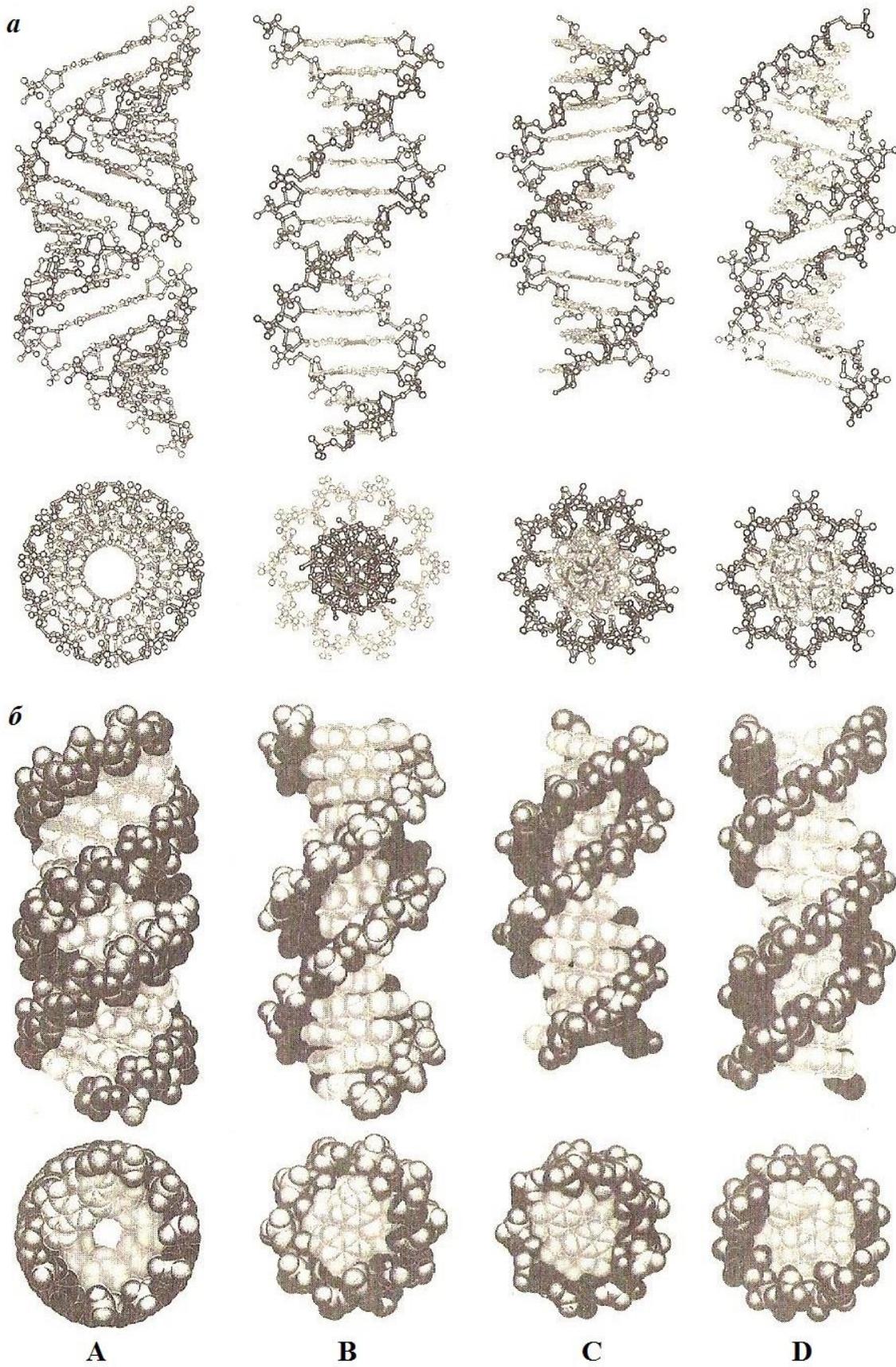


Рис. 33. Формы двойной спирали ДНК (вид сбоку и сверху) [37, с. 165]:
а – В-форма (ось спирали проходит через пары оснований вблизи их центра тяжести), *б* – А-форма (пары оснований оттеснены к периферии молекулы и в центре остается отверстие)



*Рис. 34. Формы двойной спирали ДНК (вид сбоку и сверху) [9, с. 277–298]:
 а – скелетные модели, б – объемные модели*

В биологическом смысле В-форма наиболее адекватна для репликации, А-форма – для транскрипции, С-форма – для хранения информации, упаковки ДНК в составе надмолекулярных структур хроматина и некоторых вирусов [44, с. 206].

Существенно отличается от остальных *Z-форма* ДНК, две цепи которой закручены в *левую спираль* с 12 парами оснований на виток (рис. 35). Впервые она была обнаружена в 1978 г. у кристаллов синтетического олигонуклеотида $d(CGCGCG)/d(GCGCGC)$.

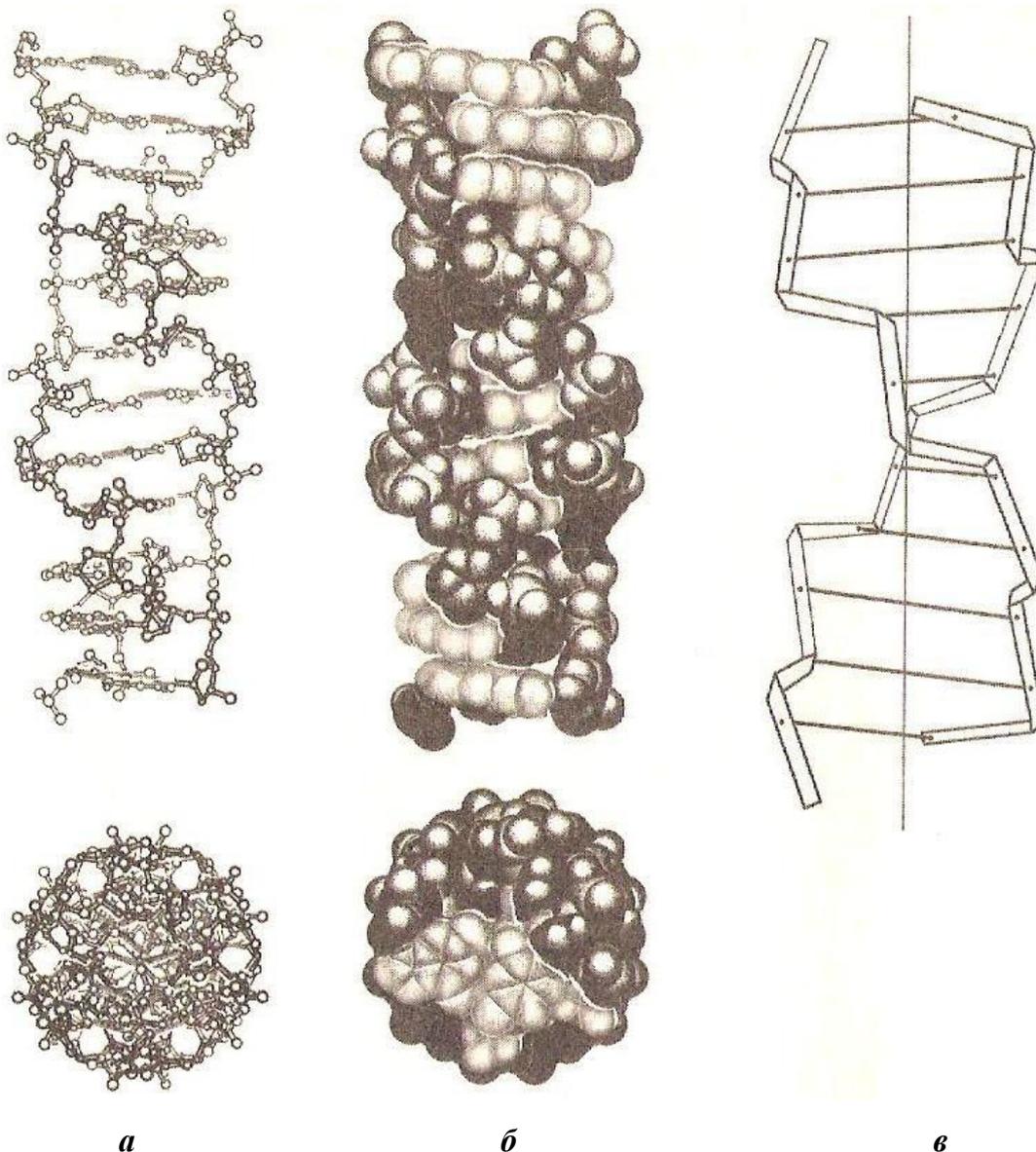


Рис. 35. Z-форма ДНК [9, с. 306, 311]:

а – скелетная модель (вид сбоку и сверху), *б* – объемная модель (вид сбоку и сверху), *в* – зигзагообразная линия, соединяющая фосфатные группы в Z-ДНК. После остатков гуанина зигзагообразная линия идет вертикально, после остатков цитозина – горизонтально

Особенностью Z-формы является чередование конформаций нуклеотидных остатков: в dC-звеньях остатки углевода имеют C2'-эндо-конформацию, а основание – анти-конформацию; в dG-звеньях остатки дезоксирибозы находятся в C3'-эндо-, а основание – в син-конформации. Таким образом, повторяющаяся единица в Z-форме ДНК состоит из двух пар нуклеотидов, а не из одной, как в В- и А-формах; в результате линия, соединяющая фосфатные группы, через каждые две пары имеет излом и принимает зигзагообразный (Z) вид (рис. 35, в). При этом пары нуклеиновых оснований сильно отодвинуты от оси, но в сторону, противоположную А-форме. Стэкинг оснований имеет место между остатками цитозина противоположных цепей, а остатки гуанина вообще не взаимодействуют друг с другом, контактируя с атомами соседних дезоксицитидинов. Диаметр молекулы ДНК в Z-форме равен 1,8 нм, имеется лишь одна бороздка. Кроме d(GC)_n-последовательности Z-форму могут принимать и другие двутяжевые полинуклеотиды или участки ДНК с чередующимися последовательностями. В-форма и Z-форма переходят друг в друга при изменении ионной силы раствора или концентрации катионов, нейтрализующих отрицательный заряд на фосфодиэфирном каркасе. Z-форма ДНК имеет особое значение для суперспирализации (см. раздел 2.3.2); переход В → Z даже на небольшом участке молекулы ДНК оказывает очень сильное влияние на топологию суперспиральной ДНК, и это используется клеткой в процессе экспрессии генов.

2.2.3. Вторичная структура РНК

Как уже отмечалось, макромолекулы большинства природных РНК (за исключением РНК некоторых вирусов) построены из одной линейной полирибонуклеотидной цепи, но и в одנותяжевых структурах могут встречаться комплементарные последовательности. Если эти последовательности антипараллельны, то это может привести к образованию так называемых «шпилек», состоящих из *двухспирального стебля*, образованного этими последовательностями, и соединяющей их *одנותяжевой петли* из нескольких нуклеотидных остатков.

Наряду с классическими уотсон-криковскими парами (AU и GC) в стеблях РНК часто встречается пара GU. Остаток рибозы из-за наличия гидроксильной группы в 2'-положении, которая тесно кон-

тактирует с другими атомами, может принимать только одну СЗ'-эндо-конформацию, поэтому двойные спирали РНК существуют только в правой А-форме, подобной А-форме ДНК. При этом в них часто имеются дефекты в виде неспаренных нуклеотидных остатков, выступающих из стебля и приводящих к уменьшению его стабильности.

Вопрос о вторичной структуре одноцепочечных РНК наиболее подробно изучен для транспортных РНК. В 1965 г. американский биохимик Роберт Холли установил первичную структуру тРНК^{Ala} из дрожжей и, исходя из представления, что наиболее стабильное состояние тРНК соответствует образованию максимально возможного количества водородно-связанных пар оснований, а также основываясь на экспериментальных данных по неравномерному гидролизу молекулы рибонуклеазами, предложил модель вторичной структуры тРНК, назвав ее *клеверным листом* (рис. 36). Согласно этой модели, в молекулах тРНК имеется три пары комплементарных фрагментов, разделенных каждая участком в несколько нуклеотидных остатков, не имеющих партнеров для образования сколь-нибудь протяженных комплементарных участков. В результате в пространственной структуре тРНК имеются три шпильки. Для *D-шпильки* и *T-шпильки* в большинстве случаев характерно наличие минорных нуклеозидов – дигидроуридина (hU) и псевдоуридина (5-метилуридина, ψ) соответственно; в петле T-шпильки содержится общая для всех тРНК последовательность T ψ C. *Антикодоновая шпилька* (*АС-шпилька*) содержит тринуклеотид (*антикодон*), с помощью которого тРНК в процессе биосинтеза белка на рибосомах связывается с соответствующим триплетом (*кодоном*) мРНК. Начало полинуклеотидной цепи (5'-концевая часть) комплементарно последовательности, непосредственно прилегающей к противоположному концу, на котором находится универсальный для всех тРНК тринуклеотид рСрСрА (*акцепторный, или аминоацильный стебель*). Концевой аденозин через 2'-ОН или 3'-ОН-группы способен к образованию сложноэфирной связи с аминокислотой, отвечающей последовательности антикодонового триплета в антикодоновой шпильке [15, с. 94].

Принципы организации вторичной структуры РНК, сформулированные в 1959–1961 гг. коллективами ученых под руководством Пола Доти (США) и Александра Спирина (СССР), в общих чертах

справедливы и для других видов однотяжевых РНК. Вторичная структура мРНК и рРНК также характеризуется спирализацией самой на себя полирибонуклеотидной цепи, которая идет за счет взаимодействия комплементарных оснований, в результате чего в молекулах возникает то или иное количество коротких биспиральных участков.

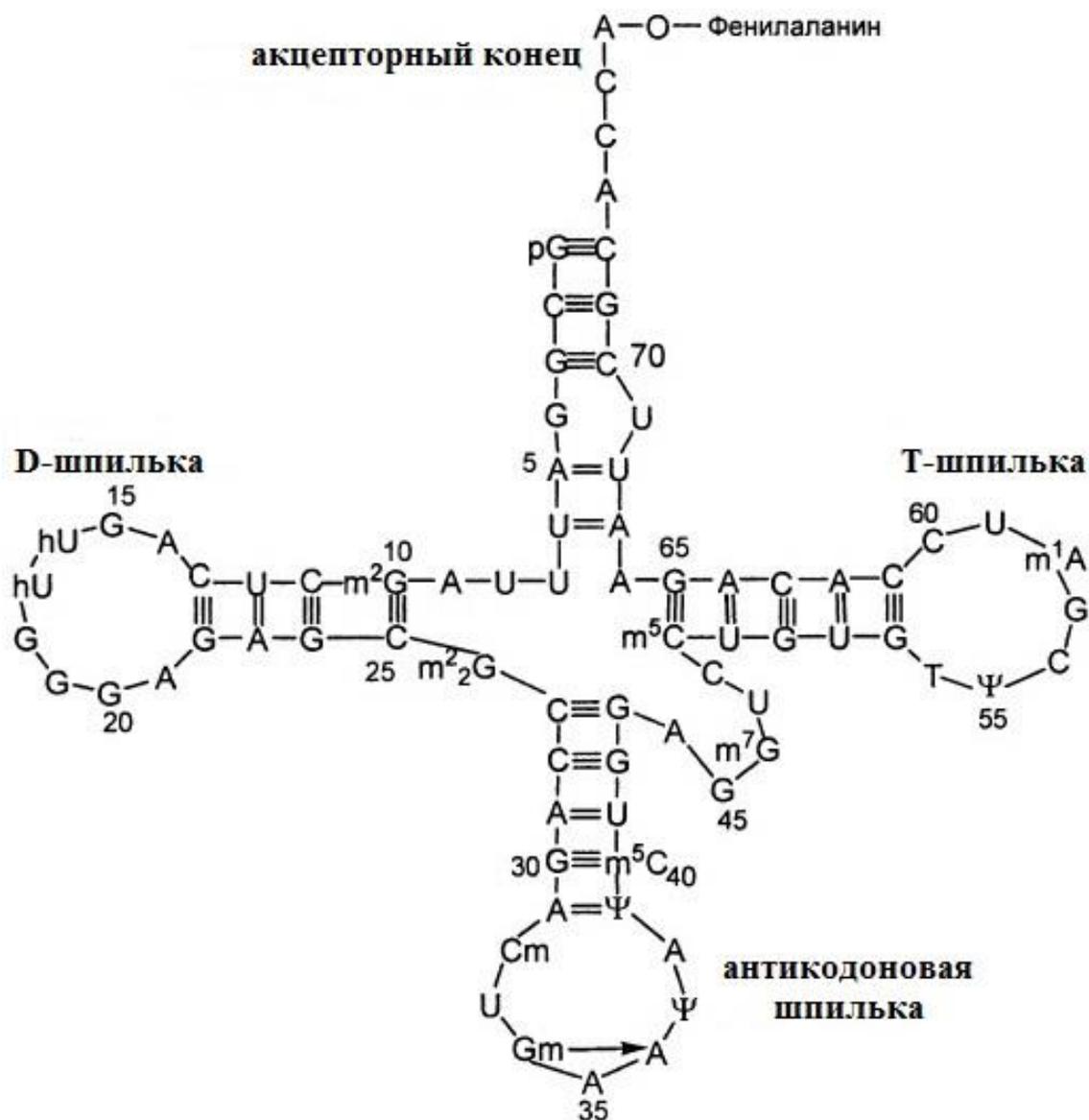


Рис. 36. «Клеверный лист» тРНК [15, с. 95]

При анализе вторичных структур вирусных и рРНК было обнаружено, что однотяжевые участки в вершине шпилек в принципе могут давать двуспиральные комплексы с межшпилечными однотяжевыми сегментами. Если это действительно так, то в молекулах РНК должны существовать так называемые *псевдоузлы*, определяющие наряду со шпильками пространственную структуру РНК (рис. 37).

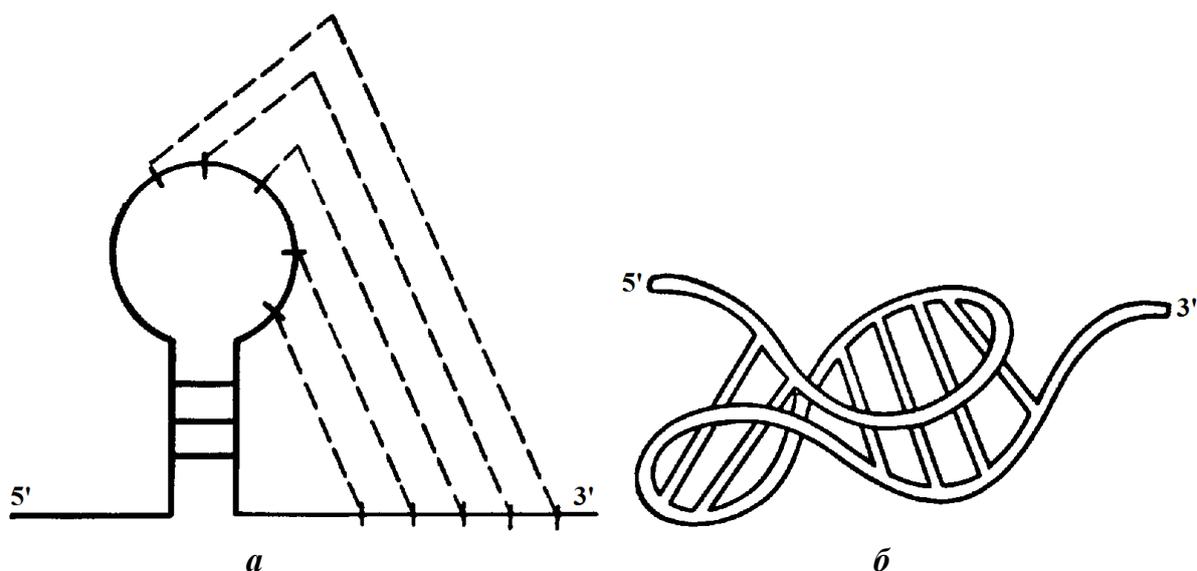


Рис. 37. Псевдоузел: схема образования (а) и пространственная модель (б)
[23, с. 42]

Вторичная структура *двухцепочечных вирусных РНК* по данным рентгеноструктурного анализа может быть описана двумя формами *двойной правой спирали*: *РНК-11* (11 пар оснований на виток с наклоном пар оснований под углом 13–14° к плоскости, перпендикулярной продольной оси спирали) и *РНК-10* (10 пар оснований на виток и угол наклона 10°). Таким образом, *РНК-11* весьма похожа на А-форму ДНК, а *РНК-10* представляет собой нечто промежуточное между А- и В-формами ДНК, но более близкое к А-форме [2, с. 233].

Контрольные вопросы

1. Какие конформации может принимать фуранозное кольцо в нуклеозидах и нуклеотидах?
2. Чем различаются *син*- и *анти*-конформеры нуклеозидов?
3. Опишите модель двойной спирали ДНК (В-форму).
4. Какие виды взаимодействий стабилизируют вторичную структуру ДНК?
5. В чем состоят отличия А-, С- и D-форм от В-формы ДНК?
6. Какие особенности имеет Z-форма ДНК?
7. Опишите модель вторичной структуры одноцепочечной тРНК. Что понимается под шпильками и псевдоузлами?
8. Какие формы принимает вторичная структура двухцепочечных вирусных РНК?

2.3. ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Третичную структуру нуклеиновых кислот можно рассматривать на примере тРНК и суперспирализации кольцевых двухцепочечных ДНК.

2.3.1. Пространственное строение тРНК

Исследования структуры специфичной к фенилаланину дрожжевой тРНК, проводившиеся группами ученых в США (Александр Рич) и Великобритании (Аарон Круг), подтвердили существование описанных выше шпилек и стеблей, а также показали, что благодаря дополнительным взаимодействиям между основаниями молекула тРНК сворачивается в трехмерную Г-образную структуру, которая состоит из двух почти перпендикулярных друг другу спиралей А-РНК длиной около 7 нм и толщиной 2 нм [16, с. 104]. Одна спираль образуется уложенными друг за другом антикодоновым и D-стеблем, другая – акцепторным и Т-стеблем (рис. 38). Однотипная пространственная структура была позднее найдена и для других тРНК.

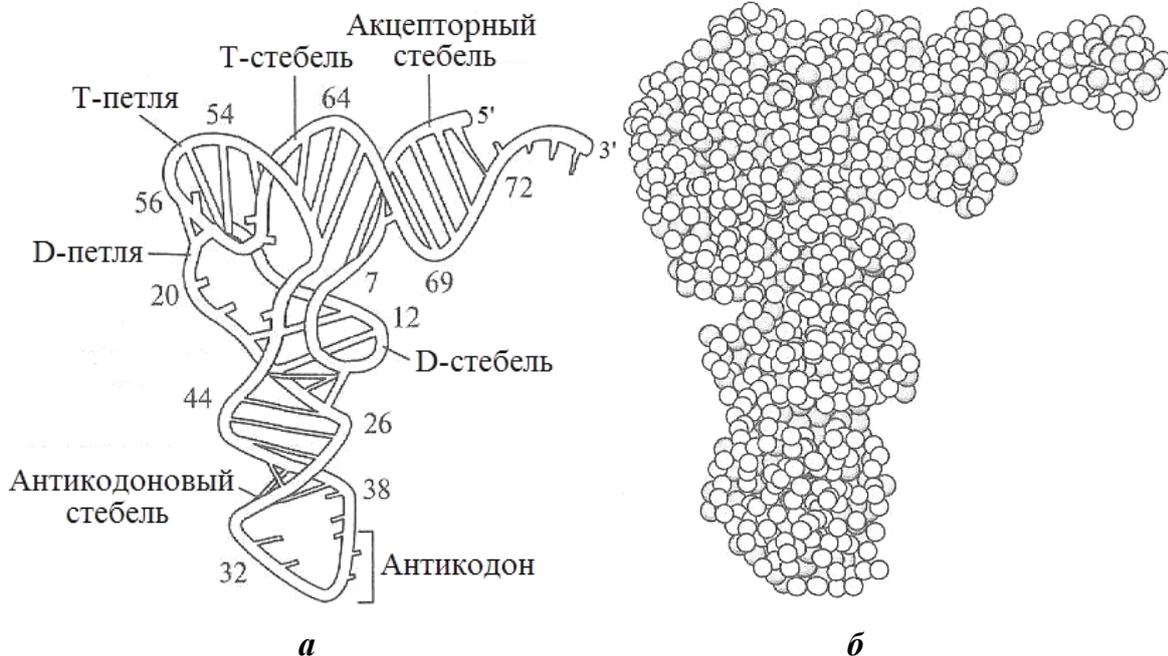
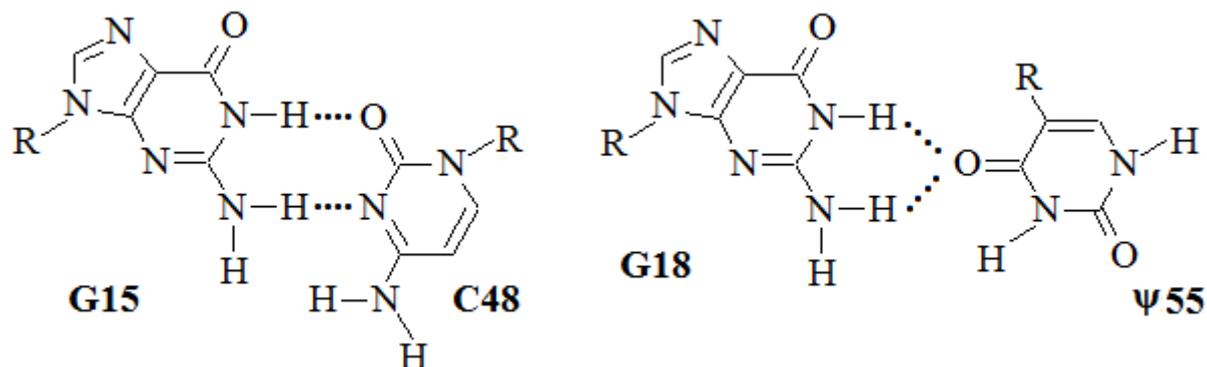
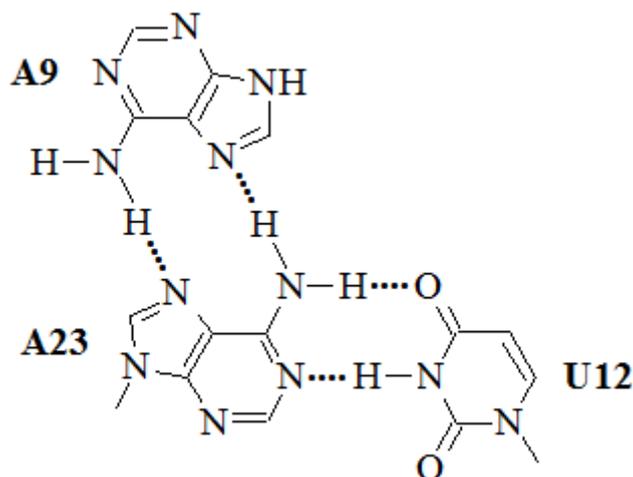


Рис. 38. Пространственная структура дрожжевой тРНК^{Phe} [16, с. 103; 21, с. 132]
а) схематичное изображение третичной структуры. Рибозофосфатный остов изображен в виде протяженной непрерывной ленты; пары оснований – в виде длинных полосок, непаренные основания – в виде коротких полосок;
б) пространственная модель третичной структуры

Важнейшим среди взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру тРНК, является стэкинг оснований, в результате чего четыре коротких двуспиральных фрагмента складываются в два более протяженных (рукава буквы Г), каждый из которых имеет в одной из цепей разрыв. Кроме того, существенную роль играет образование водородных связей между основаниями нуклеотидов, находящихся в местах клеверного листа, удаленных друг от друга, например, в Т- и D-шпильках. При этом уотсон-криковское взаимодействие не имеет явных преимуществ по сравнению с другими возможными взаимодействиями, т. к. для формирования третичной структуры тРНК не требуется образования периодической структуры остова. В качестве примера можно привести неутсон-криковские взаимодействия между гуанином в положении 15 D-петли и цитозином 48 в основании Т-стебля, гуанином 18 D-петли и урацилом псевдоуридина 55 Т-петли:



Между нуклеотидными остатками однотяжевых и двутяжевых элементов также возможно формирование триплетов оснований. В этом случае в образовании водородных связей участвуют атомы N-7 пуринов и функциональные группы при их C-6-атомах, уже занятые в образовании одной водородной связи в уотсон-криковской паре.



Дополнительные водородные связи могут образовываться между 2'-ОН-группами остатков рибозы и основаниями, а также другими группами пентозофосфатного остова.

Аналогичные принципы лежат в основе организации структуры всех однотожевых РНК. Однако строить конкретные пространственные модели макромолекул однотожевых РНК крайне затруднительно из-за множества возможных вариантов укладки в них элементов вторичной структуры [23, с. 42].

2.3.2. Суперспирализация кольцевых двухцепочечных ДНК

В середине 1960-х годов американский биохимик Джером Виноград и его коллеги обнаружили, что ДНК некоторых бактериофагов и митохондрий может существовать в виде циклических молекул. Позже было установлено, что молекулы ДНК многих вирусов, бактерий, а также хлоропластов, центриолей и бактериальных плазмид также имеют кольцевую форму, образуемую в результате закручивания двойной спирали самой на себя. Если концы полинуклеотидных цепей ковалентно соединяются друг с другом, то они уже не могут быть разделены в пространстве.

Важнейшим и постоянным (инвариантным) параметром каждой кольцевой молекулы ДНК является порядок зацепления α , равный числу пересечений одной полинуклеотидной цепи с другой в двуспиральном кольце (рис. 39). В релаксированной циклической ДНК, т. е. молекуле, которая без всякого напряжения может быть расположена в одной плоскости, $\alpha = \beta^0$, где β^0 – число витков в двойной спирали данной ДНК. Увеличение или уменьшение β^0 при сохранении ковалентной непрерывности обеих цепей будет компенсироваться образованием *супервитков*, число которых называется *райзингом* (от англ. *writhe* – «скручиваться») и определяется как $\tau = \alpha - \beta^0$. Величина β^0 всегда положительна, но τ может принимать как положительные, так и отрицательные значения.

Плотность супервитков (степень суперспирализации) молекулы ДНК выражают величиной σ , которая равна τ/β^0 . Для многих встречающихся в природе кольцевых молекул ДНК $\sigma \approx -0,05$ (5 супервитков на 1000 пар оснований). Присутствие супервитков в кольцевых молекулах ДНК можно установить по изменению константы

седimentации, вязкости растворов ДНК и электрофоретической подвижности молекул. Степень суперспирализации определяется по взаимодействию ДНК с определенными химическими веществами, способными связываться с ней и раскручивать двойную спираль.

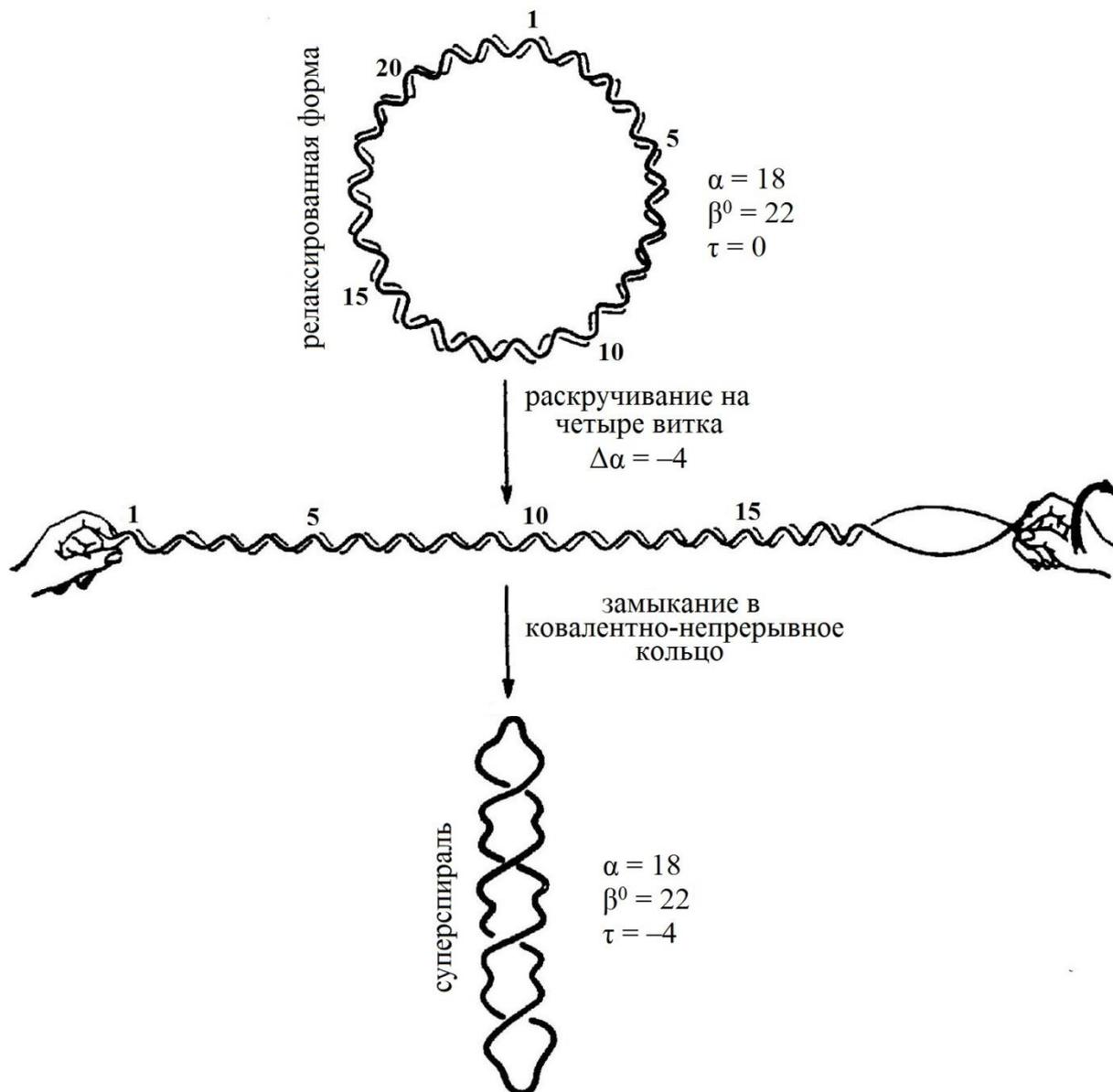


Рис. 39. Схема образования отрицательно суперспирализованной кольцевой ковалентно замкнутой ДНК [23, с. 32]

К таким веществам относятся, например, интеркалирующие красители. *Интеркаляцией* называется встраивание плоских ароматических колец между парами оснований ДНК. Этому явлению способствует перестройка пентозофосфатного остова путем изменения конформации пентозы С3'-эндо- → С2'-эндо-, в результате чего увеличивается расстояние между фосфатами (от 0,59 нм до 0,70 нм). Каждое

интеркалирующее кольцо вызывает раскручивание спирали на $\sim 26^\circ$. Когда интеркаляция достигнет уровня, при котором τ повысится до 0, будет наблюдаться минимальная скорость седиментации. Дальнейшее добавление интеркалирующего агента приведет к положительной суперспирализации. На плотность супервитков также влияют температура, рН и ионный состав. В общем случае σ становится менее отрицательной на $\sim 3,3 \cdot 10^{-4}$ при повышении температуры на 1° [21, с. 141].

ДНК в хроматине и хромосомах также находится в суперспирализованном состоянии, причем здесь реализуется несколько уровней суперспирализации. Первый уровень сверхскрученного состояния ДНК в хроматине поддерживается гистонами, оккупирующими отрезки ДНК протяженностью около 200 пар нуклеотидов (п. н.) и образующими элементарную единицу структуры хроматина – нуклеосому. Цепочка нуклеосом образует, в свою очередь, спираль второго и последующих порядков, вплоть до конденсации в хромосому. При этом на один оборот спирали в нуклеосоме приходится уже 80 п. н. (уплотнение ДНК в 6–7 раз), в каждой петле хроматина – 60000 п. н. (уплотнение в 680 раз) и в хромосоме – $1,1 \cdot 10^6$ п. н. (уплотнение в $1,2 \cdot 10^4$ раз) [44, с. 211]. Ферменты, посредством которых осуществляется суперспирализация, называются ДНК-гиразами, или топоизомеразами II. Другие ферменты – топоизомеразы I – могут уменьшать число супервитков в кольцевых молекулах, давая набор изомеров с различным числом витков.

Суперспирализованная ДНК имеет значительный запас энергии по сравнению с релаксированной формой. Благодаря этому некоторые ферменты, вызывающие локальное расплетание двойной спирали ДНК (например, РНК-полимеразы), связываются с отрицательно суперспирализованной ДНК более эффективно. Другим следствием суперспирализации является реальная возможность образования участков вторичной структуры, которые термодинамически невыгодны и практически не существуют в линейной или релаксированной циклической ДНК. Так, уже при обычных физиологических условиях участки с последовательностями $d(CG)_n/d(CG)_n$ и $d(AC)_n/d(GT)_n$, встроенными в ДНК с $\sigma = -0,06$, переходят в левоспиральную Z-форму. Есть свидетельства тому, что отрицательная суперспирализация ДНК способствует существованию некоторых ее участков в Z-форме *in vivo* [23, с. 32–33; 26, с. 342].

Контрольные вопросы

1. Опишите пространственную структуру тРНК.
2. Какие виды взаимодействий стабилизируют третичную структуру тРНК?
3. Какими параметрами характеризуются кольцевые молекулы ДНК?
4. Как определяется наличие супервитков в молекуле ДНК и степень суперспирализации? Какие параметры оказывают влияние на степень суперспирализации?
5. Какие особенности имеет суперспирализованная ДНК по сравнению с релаксированной формой?

2.4. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Примеры четвертичной структуры в системах, состоящих исключительно из нуклеиновых кислот, очень немногочисленны. Имеются данные, что РНК некоторых опухолеродных вирусов, например RD-114 – эндогенного кошачьего вируса типа С, состоит из двух одинаковых субъединиц, связь между которыми обеспечивается, вероятно, комплементарным взаимодействием оснований, однако вопрос, чем межцепочечное уотсон-криковское спаривание выгоднее внутрицепочечного, остается открытым [2, с. 237; 13, с. 192–193].

Легче дать объяснение образованию комплексов между неидентичными молекулами РНК. Например, молекулы тРНК с комплементарными антикодонами образуют очень прочный межмолекулярный комплекс *in vitro*, что может указывать на то, что в РНК существуют какие-то пока не известные взаимодействия на уровне четвертичной структуры.

Некоторая комплементарность существует между участками 16S- и 23S-рРНК из *E. coli*. Четвертичное спаривание оснований между этими участками может происходить, например, при образовании 70S-рибосомы из 30S- и 50S-субчастиц [13, с. 192].

Глава II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНФОРМАЦИЙ БИОПОЛИМЕРОВ

1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Спектрофотометрией (молекулярно-абсорбционной спектроскопией) называется метод анализа, основанный на избирательном поглощении электромагнитного излучения (света) молекулами определяемого вещества. Возможность использования спектрофотометрии для изучения структуры белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров связана с тем, что получаемые спектры поглощения отражают изменения конформации биополимеров. Эти изменения в подавляющем большинстве случаев приводят к специфическим эффектам – *гипохромному*, вызывающему уменьшение интенсивности поглощения, и *гиперхромному*, когда вследствие конформационных изменений интенсивность поглощения, напротив, увеличивается.

1.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Световая волна при столкновении с молекулой вещества может либо рассеиваться (изменять направление своего распространения), либо поглощаться (передавать энергию молекуле). Относительная вероятность протекания того или иного процесса является свойством той молекулы, с которой произошло столкновение. Если произошло поглощение энергии света, то о молекуле говорят, что она перешла в возбужденное состояние.

Возбужденная молекула обладает набором дискретных квантованных энергетических состояний – *энергетических уровней*. Главные энергетические уровни определяются возможным пространственным распределением электронов и называются *электронными уровнями*; на них накладываются *колебательные уровни*, которые указывают на различные типы колебаний молекулы (например, растягивание и изменение углов различных ковалентных связей). Имеются и еще более близко расположенные уровни, называемые *вращательными*, но они не имеют большого значения в абсорбционной спектроскопии. Самый низкий электронный уровень называется *основным состоянием*, а все другие – *возбужденными*.

Поглощение квантов света происходит с наибольшей вероятностью только в том случае, если их энергия $h\nu$ равна разности энергий двух энергетических уровней молекулы. Таким образом, свет с длиной волны λ поглощается только тогда, когда

$$h\nu = \frac{hc}{\lambda} = E_2 - E_1, \quad (1)$$

где h – постоянная Планка ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·с); c – скорость света ($2,998 \cdot 10^8$ м/с); ν – частота излучения, Гц; E_1 и E_2 – энергетические уровни молекулы до поглощения и в результате поглощения, Дж.

Изменение энергетического состояния при испускании или поглощении кванта называется *переходом*. Упрощенно переход между электронными энергетическими уровнями соответствует энергии, необходимой для перемещения электрона с одной орбитали на другую. Зависимость вероятности поглощения от длины волны называется *спектром поглощения*.

Для большинства молекул длины волн, соответствующие переходам между основным состоянием и любым колебательным уровнем первого возбужденного состояния, лежат в ультрафиолетовой и видимой области спектра. Возможны также низкие по энергии переходы между колебательными уровнями в пределах одного электронного уровня. Эти переходы происходят в результате поглощения излучения в инфракрасной области.

Количественный анализ в спектрофотометрической практике основан на использовании *закона Бугера – Ламберта – Бера* (основного закона светопоглощения):

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon lc, \quad (2)$$

где I_0 – интенсивность падающего света; I – интенсивность света, прошедшего через раствор или пленку образца; A – оптическая плотность (экстинкция); l – толщина поглощающего слоя, см; c – концентрация, моль/л; ϵ – молярный коэффициент поглощения, л/(моль·см). Молярный коэффициент поглощения является постоянной величиной для данного соединения при данной длине волны.

В некоторых случаях, если концентрация велика, ϵ становится функцией c и тогда можно сказать, что закон Бугера – Ламберта – Бера нарушается. Это может быть результатом рассеяния света или структурных изменений [46, с. 387].

1.2. АППАРАТУРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ В ВИДИМОМ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ СВЕТЕ

Спектры растворов биополимеров обычно измеряются в воде или в органических растворителях. Для измерений, как правило, достаточно иметь прибор, работающий в ближней ультрафиолетовой области, однако в некоторых случаях (например, при измерении поглощения пептидной связи) необходимо работать в далекой ультрафиолетовой области.

На рис. 40 представлена блок-схема двухлучевого спектрофотометра. Луч света от источника L проходит через монохроматор и системой зеркал разделяется на два луча, один из которых проходит через чистый растворитель, а другой – через исследуемый раствор. Затем лучи вновь соединяются и регистрируются детектором (фотоэлементом или фотоумножителем). Специальное устройство (изображенное на рис. 40 в виде двух зеркал, связанных пунктирной линией) попеременно пропускает луч то через одну, то через другую кювету, поэтому на детектор попадает свет переменной интенсивности. Стоящее за детектором устройство позволяет отделить сигнал, прошедший через раствор, от сигнала, прошедшего через растворитель. Далее сигналы усиливаются и измеряется их отношение.

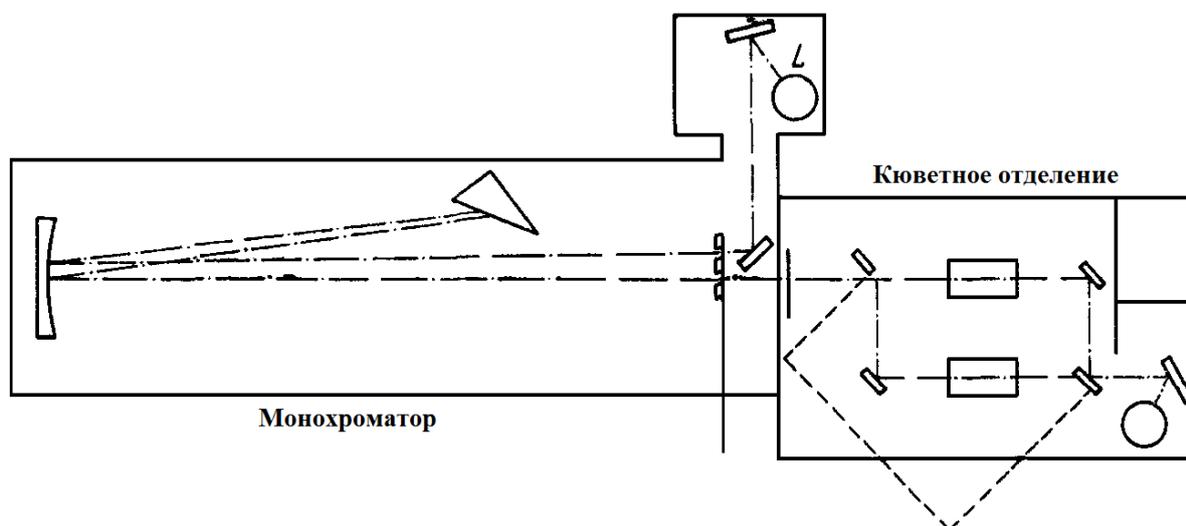


Рис. 40. Блок-схема оптического устройства спектрофотометра [42, с. 119]

При исследовании биополимеров большое значение имеет измерение спектров при различных температурах. Для такого рода измерений кварцевую кювету необходимо снабдить термостатирующим

устройством, позволяющим быстро менять температуру и надежно ее поддерживать. Особые трудности возникают при измерении спектра в далекой ультрафиолетовой области, т. е. при длинах волн, меньших 200 нм. В этой области кварц, пары воды в воздухе, кислород воздуха и сама вода начинают в заметной степени поглощать свет. Возникает также необходимость использования специальных источников света. При измерении спектров в далекой ультрафиолетовой области все элементы оптической системы изготавливаются из специального кварца, который имеет значительно лучшее пропускание, чем природный кварц. Из него же изготавливают тонкие кюветы. Весь оптический тракт продувают азотом. Чтобы продвинуться несколько дальше в коротковолновую область, исследуемое вещество растворяют не в обычной воде, а в тяжелой воде D₂O [42, с. 120].

1.3. ГИПОХРОМНЫЙ ЭФФЕКТ. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

В ультрафиолетовой области спектра все белки, кроме протаминов¹, поглощают в области около 280 нм. Это поглощение обусловлено триптофановыми и тирозиновыми остатками в молекулах белков. Фенилаланин поглощает при более короткой длине волны – 255 нм (рис. 41). На поглотительную способность хромофоров, т. е. групп атомов, поглощающих электромагнитное излучение, оказывает значительное влияние их окружение. При этом может происходить сдвиг длины волны максимума поглощения или изменение величины площади, ограниченной абсорбционной кривой. Одним из наиболее значительных изменений подобного рода является измене-

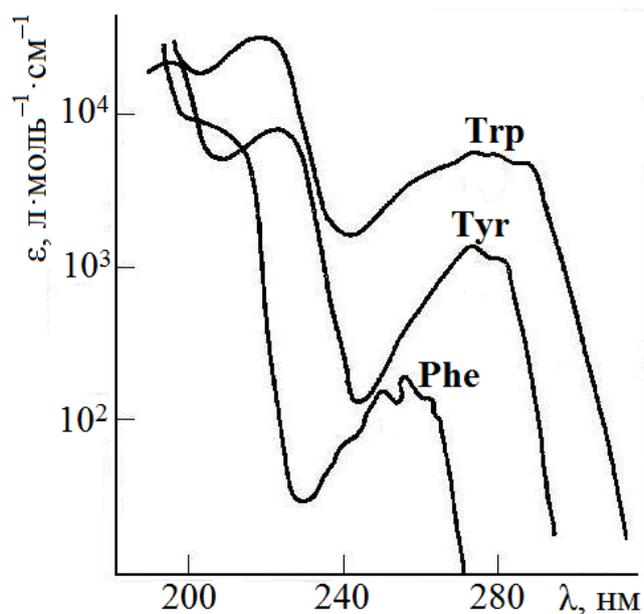


Рис. 41. УФ-спектры поглощения фенилаланина, тирозина и триптофана [49, с.

¹ Протамины – белки небольшой молекулярной массы (4000–12 000), содержащиеся в ядрах сперматозоидов большинства групп животных.

ние спектра тирозина в результате ионизации фенольной группы. Этим пользуются для количественного определения тирозина и для спектрофотометрического титрования тирозильных групп в белках.

Если изменения в поглощении хромофора, обусловливаемые его окружением, выражаются лишь в сдвиге максимума на несколько нанометров, их лучше всего обнаружить с помощью *дифференциальной спектрофотометрии*. При этом способе снимают непосредственно спектр исследуемого белка, используя в качестве эталона раствор этого же белка в его обычном состоянии в той же концентрации. В результате получают так называемый дифференциальный спектр, могущий, например, свидетельствовать о переходе в процессе денатурации белка спирали в неупорядоченную конформацию – статистический клубок [12, с. 47].

Рассмотрим теперь ультрафиолетовое поглощение в области малых длин волн. Особое значение имеет область поглощения пептидной связи, центр которой находится около 190 нм. В 1959 г. японские ученые Кадзутомо Имахори и Дзиро Танака установили, что переход

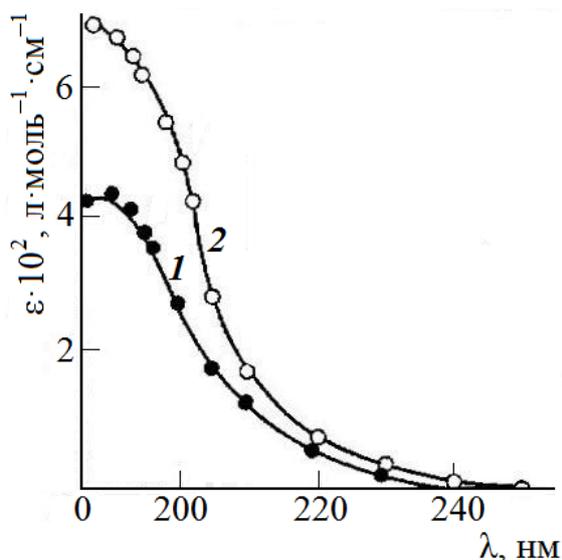


Рис. 42. УФ-спектры поглощения полиглутаминовой кислоты в форме α-спирали (1) и статистического клубка (2) [12, с. 48]

поли-L-глутаминовой кислоты (синтетического полипептида) из конформации статистического клубка в α-спираль при изменении pH водного раствора сопровождается при длине волны 190 нм уменьшением интенсивности поглощения на 40%, при том, что положение максимума практически не изменяется (рис. 42). Это явление, как уже отмечалось выше, получило название *гипохромного эффекта*. Позднее был обнаружен гипохромный сдвиг на 40% при переходе из статистического клубка в α-спираль не только для поли-L-глутаминовой кислоты,

но и для поли-L-лизина, а при переходе из статистического клубка в β-структуру наблюдается гиперхромный сдвиг, т. е. увеличение интенсивности поглощения, на 10% [3, с. 43].

Физическая сущность гипохромного эффекта связана с тем, что интенсивность поглощения зависит от так называемого *переходного дипольного момента*. Если полипептид или белок не обладает упорядоченной вторичной структурой, переходные дипольные моменты, ориентация которых тесно связана с пространственной ориентацией самих пептидных групп, взаимно компенсируются. Если же полипептидная цепочка образует α -спираль или β -структуру, переходные дипольные моменты ориентированы приблизительно параллельно, поскольку и пептидные группы в соседних витках почти параллельны. При подобной пространственной ориентации переходных дипольных моментов возникают электростатические силы, вызывающие ослабление поглощения света [12, с. 48].

Измерение гипохромного эффекта пептидных связей имеет то преимущество, что белок исследуют в растворе. Некоторым препятствием для расчета может явиться наблюдаемое в области 190 нм поглощение, обусловленное боковыми группами аминокислот. Для нахождения коэффициента поглощения пептидных связей следует ввести поправку в кривые поглощения на величину поглощения боковых групп.

Мономерные нуклеотиды и нуклеозиды обнаруживают поглощение в близкой ультрафиолетовой области вследствие наличия пуриновых и пиримидиновых оснований. Центр области поглощения для всех нуклеозидов, кроме цитидина, находится около 260 нм, а для цитидина он лежит около 270 нм. Для высокомолекулярных ДНК и РНК середина области поглощения также находится близ 260 нм. Поглощение полимерной нуклеиновой кислоты при 260 нм на 40% ниже, чем полное поглощение всех мономерных единиц в смеси (рис. 43). Такой гипохромный эффект тоже обусловлен параллельным расположением хромофорных групп (в данном случае гетероциклических оснований, между которыми реализуются стэкинг-взаимодействия). На основании измерения поглощения при длине волны 250–260 нм по величине гипохромного эффекта можно рассчитать степень упорядоченности или долю двуспирального расположения в образце ДНК.

Простое измерение поглощения ультрафиолетового излучения нуклеиновыми кислотами позволяет извлечь и дальнейшую важную информацию. Если из раствора полинуклеотида получить на кварцевой подложке тонкую пленку и после высушивания подвергнуть ее

осторожному растяжению, макромолекулы ДНК расположатся вдоль направления растяжения. Полученный таким способом образец обнаруживает высокий *дихроизм*, т. е. поглощает поляризованный свет в разной степени в направлении ориентации пленки и в перпендикулярном направлении (см. разд. 2). Из рассмотрения дихроизма следует, например, сделать вывод, что плоскости пуриновых и пиримидиновых оснований расположены в ДНК перпендикулярно оси двойной спирали [12, с. 125].

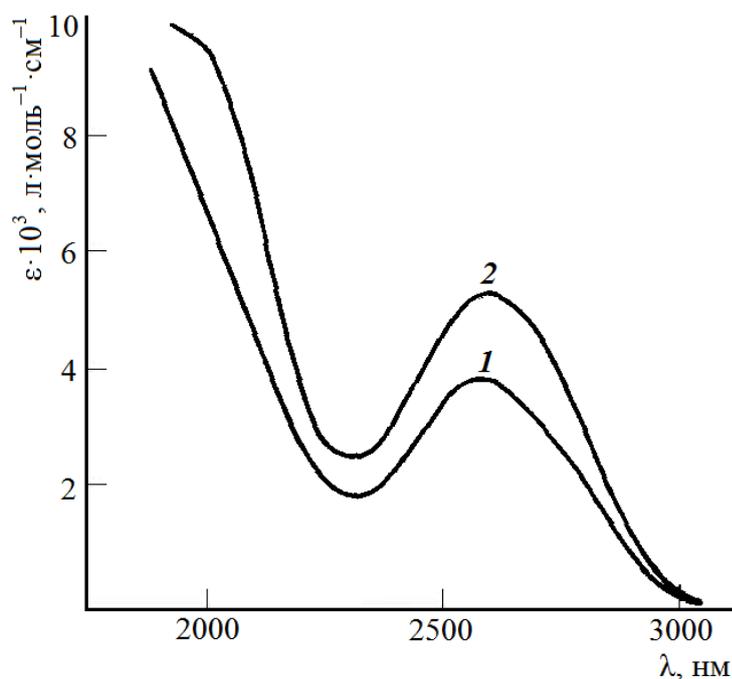


Рис. 43. УФ-спектры поглощения спиральной (1) и клубкообразной (2) ДНК тимуса теленка в D_2O [42, с. 127]

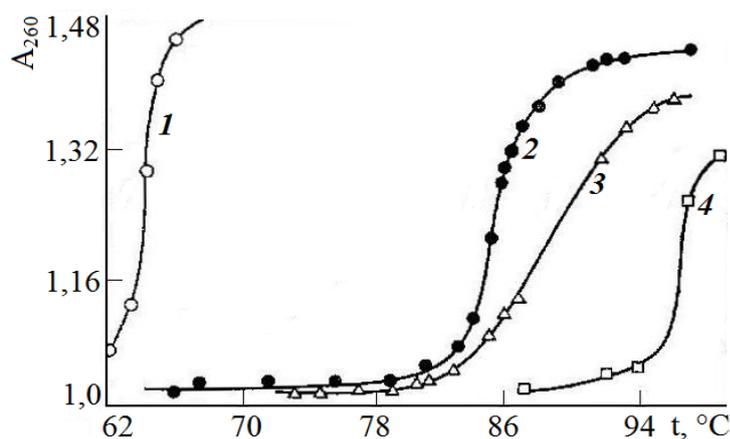


Рис. 44. Плавление вторичной структуры ДНК из различных организмов, исследованное спектрофотометрически при 260 нм [12, с. 125]. 1 — полиАТ; 2 — *Pneumococcus*; 3 — *Escherichia coli*; 4 — *Micrococcus phlei*

Величина гипохромного эффекта пропорциональна количеству нуклеотидов, находящихся в спиральных участках молекулы, поэтому для выявления зависимости степени спиральности от того или иного параметра (температуры, рН среды и т. д.) достаточно измерить зависимость от этого параметра величины гипохромного эффекта при определенной длине волны (обычно при 260 нм, когда гипохромный эффект максимален). S-образная кривая зависимости гипохромного эффекта от температуры называется *кривой плавления*.

Величина гипохромного эффекта пропорциональна количеству нуклеотидов, находящихся в спиральных участках молекулы, поэтому для выявления зависимости степени спиральности от того или иного параметра (температуры, рН среды и т. д.) достаточно измерить зависимость от этого параметра величины гипохромного эффекта при определенной длине волны (обычно при 260 нм, когда гипохромный эффект максимален). S-образная кривая зависимости гипохромного эффекта от температуры называется *кривой плавления*.

ления (рис. 44). Точка перегиба на ней показывает температуру плавления, называемую также температурой перехода первого рода. Эта температура находится в зависимости от содержания пар оснований типа G–C, которые определяют пространственное строение нуклеиновых кислот. Форма кривой плавления определяется как размерами молекулы ДНК, так и более высокими уровнями ее структурной организации. Когда образуются олигомеры, состоящие всего из 2–3 структурных единиц, интенсивность поглощения уменьшается, т. е. наблюдается гипохромный сдвиг. Олигомеры из 7–8 мономеров ведут себя практически так же, как и полимеры, т. е. число нуклеиновых оснований, окружающих мономер и оказывающих влияние на его электронную структуру, равно семи. Таким образом, изучение оптических свойств олигомеров показывает, что упорядоченная структура образуется из олигомеров, содержащих не менее семи нуклеиновых оснований [3, с. 48].

Измерением ультрафиолетового поглощения очень часто пользуются для исследования денатурации – ренатурации нуклеиновых кислот. При охлаждении образцов после нагревания происходит ренатурация спиральной структуры и величина гипохромного эффекта в той или иной степени восстанавливается. При нагревании до температуры, меньшей температуры конца плавления, при последующем охлаждении происходит практически полное восстановление. Если образцы нагревать выше температуры конца плавления, то гипохромный эффект восстанавливается не полностью при охлаждении ДНК, но почти всегда восстанавливается при охлаждении РНК [42, с. 130].

Контрольные вопросы

1. Объясните механизм перехода молекул веществ в возбужденное состояние. Что такое спектр поглощения?
3. Сформулируйте основной закон светопоглощения. Что называют молярным коэффициентом поглощения?
4. Назовите основные узлы спектрофотометра. Какие дополнительные приемы используются при исследовании структуры биополимеров спектрофотометрическим методом?
5. В чем заключается гипохромный эффект и какова причина его возникновения в растворах биополимеров?

6. Как используются УФ-спектры поглощения для анализа вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот?

7. Какую информацию можно получить с помощью кривых плавления нуклеиновых кислот?

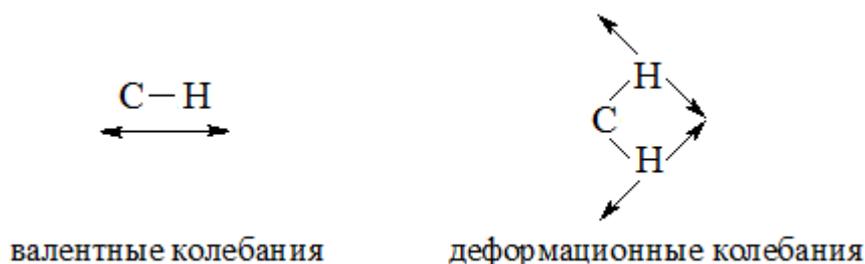
2. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Инфракрасные спектры отличаются по своей природе от спектров поглощения в видимом и ультрафиолетовом диапазонах. Обладая относительно небольшой энергией, инфракрасные лучи не вызывают переходов между электронными энергетическими уровнями, но их энергия достаточна для возбуждения колебаний атомов в пределах одного электронного уровня. Колебания атомов каждой функциональной группы (метильной, карбонильной, амидной и др.) очень чувствительны к изменениям химической структуры, конформации и окружения.

Колебательные спектры можно наблюдать не только в поглощении в инфракрасной области, но и в рассеянии. Спектры комбинационного рассеяния, или рамановские спектры, могут дать дополнительную информацию о структуре веществ.

2.1. ПОЛУЧЕНИЕ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ

В результате поглощения света в инфракрасной области происходят переходы между *колебательными уровнями* основного состояния молекулы. Колебания связанных атомов в молекуле подразделяются на два основных типа – валентные и деформационные. При валентных колебаниях происходит попеременное ритмичное растягивание и укорочение ковалентной связи. При деформационных колебаниях происходит изменение валентного угла между связями одного атома:



Энергия валентных колебаний больше, чем энергия деформационных. Каждому типу колебаний соответствует собственная частота, которая зависит от массы связанных между собой атомов и прочности связей. Чем больше масса атомов, т. е. чем менее они подвижны, тем ниже частота их колебаний. Вещества поглощают инфракрасное излучение, частота которого совпадает с собственной частотой колебаний атомов молекулы. Хотя поглощение энергии квантовано, инфракрасный спектр состоит не из узких пиков, а из полос. Это обусловлено тем, что каждое изменение колебательной энергии сопровождается изменениями вращательной энергии и к колебательному переходу примешиваются вращательные переходы.

Инфракрасные спектры, как правило, состоят из большого числа полос, при этом часть полос может быть приписана колебаниям отдельных групп атомов, более или менее сохраняющих свойства в разных молекулах. Такие полосы называют *характеристическими*. Характеристические полосы поглощения дают все связи, в которых принимает участие подвижный атом водорода (О–Н, N–H, C–H и др.), а также группы, содержащие кратные связи (C=O, C=C и др.) [40, с. 517–518].

При изображении инфракрасных спектров традиционно используются *волновые числа* $1/\lambda$ (см^{-1}) или *частоты* ν (с^{-1}), а не длины волн. Волновое число – величина, обратно пропорциональная длине волны и прямо пропорциональная ее частоте, – определяется выражением

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}, \quad (3)$$

где c – скорость света в вакууме. Полосы поглощения, отвечающие колебательным переходам, обычно лежат в диапазоне волновых чисел от 5000 до 200 см^{-1} , т. е. в диапазоне длин волн от 2000 до 50 000 нм.

Поглощение инфракрасного излучения фиксируется как ослабление интенсивности I прошедшего через образец света по отношению к исходной интенсивности I_0 :

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100\%. \quad (4)$$

Как правило, интенсивность полосы поглощения в инфракрасной спектроскопии указывается лишь приближенно (сильная, средняя или слабая).

Инфракрасные спектры низкомолекулярных соединений отличаются от спектров в видимом и ультрафиолетовом свете тем, что они обычно состоят из довольно узких полос. В случае макромолекул из-за огромного числа типов связей и различных конформаций каждая полоса смещается в той или иной степени в зависимости от положения соответствующей группы в молекуле, вследствие чего в спектре содержится несколько относительно широких полос [46, с. 410].

Инфракрасные спектрофотометры принципиально не отличаются от спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовом и видимом свете. Источником излучения является тело, нагреваемое до 1500–1800 К, для выделения длин волн используется монохроматор, но в качестве детектора применяется термопара (вместо фотоэлемента). Главные различия состоят в методах приготовления образцов, поскольку практически любой растворитель в инфракрасной области не является прозрачным и записать спектр удастся только в тех относительно небольших участках, где данный растворитель или не поглощает, или поглощает очень мало. Эту трудность можно обойти, используя тяжелую воду D₂O или смеси H₂O–D₂O, в которых поглощение растворителя сдвигается в область 2500–1200 см⁻¹.

Наиболее общим приемом, позволяющим изучать макромолекулы, является использование тонких, достаточно сухих пленок. Их готовят растворением вещества в летучем растворителе, затем раствор помещают на плоскую пластинку и дают возможность растворителю испариться; образовавшуюся пленку снимают с пластинки. Если необходимо приготовить пленки, в которых все молекулы ориентированы в одном и том же направлении, их растягивают. Такие пленки пригодны для работ в поляризованном свете методом инфракрасного дихроизма (см. следующий раздел). При этом необходимо принимать во внимание, что структура макромолекулы в сухой пленке отличается от таковой в растворе [46, с. 408–409].

2.2. ПРИМЕНЕНИЕ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ. ИНФРАКРАСНЫЙ ДИХРОИЗМ

Колебательные полосы поглощения обычно порождаются переходами, которые можно довольно точно отнести к определенным химическим связям. Положение и число полос поглощения, наблюдае-

мых в инфракрасной области, являются функциями вторичной структуры биополимеров.

В случае белков наиболее интересными являются три полосы поглощения, соответствующие колебательным переходам в пептидном остове. Эти полосы обусловлены валентными колебаниями группы $>N-H$ (3290 см^{-1}), валентными колебаниями группы $>C=O$ (1650 см^{-1} – полоса *амид I*) и деформационными колебаниями группы $>N-H$ (1535 см^{-1} – полоса *амид II*).

Образование водородных связей при формировании вторичной структуры белка приводит к сдвигу энергии этих трех пептидных колебаний. Первые две полосы, отвечающие валентным колебаниям, смещаются в область более низких энергий, поскольку наличие водородной связи облегчает смещение атома азота амидной группы и атома кислорода карбонильной группы в направлении акцептора или донора протона соответственно. Полоса *амид II* смещается в сторону более высоких энергий, так как водородная связь препятствует изгибанию связи $>N-H$. Влияние водородных связей на амидные полосы I и II в случае α -спирали и β -структуры оказывается различным, что дает возможность использовать инфракрасные спектры для определения вторичной структуры белков. Волновые числа, наблюдаемые для амидных полос I и II полипептидов различной вторичной структуры, приведены в табл. 8.

Таблица 8

Волновые числа и интенсивности амидных полос I и II полипептидов в различных конформациях [12, с. 50]

Тип вторичной структуры	Амид I		Амид II	
	$\nu_0, \text{ см}^{-1}$	интенсивность	$\nu_0, \text{ см}^{-1}$	интенсивность
α -Спираль	1650	сильная	1516	слабая
	1652	средняя	1546	сильная
Параллельная β -структура	1645	слабая	1530	сильная
	1630	сильная	1550	слабая
Антипараллельная β -структура	1685	слабая	1530	сильная
	1632	сильная		
Неупорядоченная структура	1656	сильная	1535	сильная

Как видно из данных таблицы, в упорядоченных структурах в результате взаимодействия между пептидными группами каждой из амидных полос соответствуют два максимума. Из найденных положений этих полос можно сделать предварительные выводы о строении молекулы, учитывая, однако, что область полосы амид II менее чувствительна к изменениям во вторичной структуре белка, чем область амид I, но и в последней имеет место сильное перекрывание по-

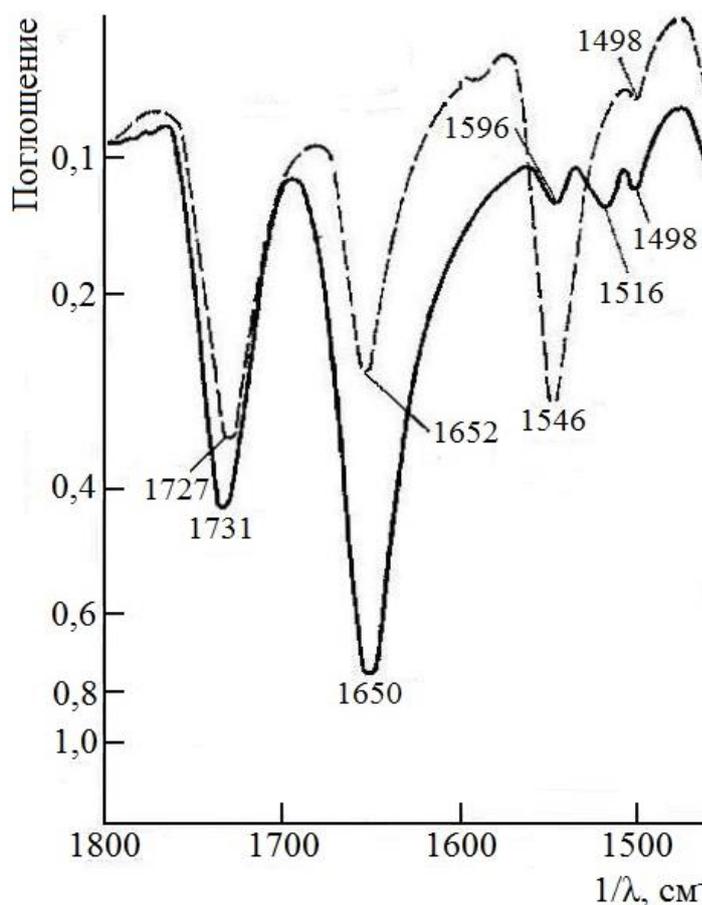


Рис. 45. Поляризованный ИК-спектр пленки поли- γ -бензил-L-глутамата, полученной из раствора в хлороформе и ориентированной в одном направлении [49, с. 594].

Сплошная линия – направление электрических колебаний излучения параллельно направлению ориентации; штриховая линия – колебания перпендикулярны направлению ориентации. Пик при 1650 см^{-1} обусловлен валентным колебанием групп $>\text{C}=\text{O}$, а пик при 1546 см^{-1} – деформационными колебаниями групп $>\text{N}-\text{H}$

лос, принадлежащих неупорядоченному клубку и α -спирали.

Некоторые специфические сведения о конформации белка можно получить, применяя метод инфракрасного дихроизма, основанный на взаимодействии поляризованного инфракрасного излучения с тонкими пленками ориентированного белка. Используя препарат белка с ориентированными макромолекулами, т. е. приготовленными в форме ориентированных волокон или слоев, и поляризованный инфракрасный свет, измеряют разность частот максимумов поглощения в направлении ориентации и в перпендикулярном направлении. Максимум поглощения падающего излучения наблюдается тогда, когда вектор электрического дипольного момента хромофора оказыва-

ется параллельным электрической составляющей потока электромагнитного излучения. Если эти векторы не параллельны, то поглощение излучения уменьшается, а если направление колебаний перпендикулярно электрической составляющей потока излучения, поглощения не происходит.

Рассмотрим, как эти рассуждения можно применить, чтобы различить спиральную и складчатую структуры белков. Как уже говорилось (см. стр. 40), α -спиральная структура содержит водородные связи, которые почти параллельны продольной оси макромолекулы. Поэтому и переходные дипольные моменты валентных колебаний групп $>N-H$ и $>C=O$ параллельны продольной оси, а моменты деформационных колебаний группы $>N-H$ перпендикулярны этой оси. В этом случае, когда молекулы полипептида ориентированы так, что все продольные оси параллельны, поглощение валентных колебаний происходит наиболее интенсивно, если плоскость поляризации света параллельна главной оси (*параллельный дихроизм*). Поглощение деформационных колебаний наиболее интенсивно в том случае, когда плоскость поляризации излучения перпендикулярна главной оси (*перпендикулярный дихроизм*).

На рис. 45 изображен спектр поли- γ -бензил-L-глутамата – синтетического полипептида, для которого установлена α -спиральная структура. Как видно из рис. 45, исследованный образец обнаруживает параллельный дихроизм для амидной полосы I и перпендикулярный – для амидной полосы II в согласии с вышеприведенными соотношениями. Полоса при 1731 см^{-1} соответствует валентному колебанию группы $>C=O$ бензилового эфира. Как видно из рисунка, интенсивность этой полосы невелика, что свидетельствует о случайном расположении карбоксильных групп по отношению к продольной оси. Поведение при дихроизме, совершенно противоположное найденному для спиральных структур, было предсказано и обнаружено для складчатых структур, у которых межмолекулярные водородные связи ориентированы приблизительно перпендикулярно главной оси молекулы [12, с. 50–51].

Инфракрасный дихроизм был исследован для большого числа биологических объектов, содержащих ориентированные нити фибриллярных белков, и в частности шелковые нити, иглы дикобраза, шерсть слона и сухожилия из мышечных хвостов. Во всех случаях

картина инфракрасных спектров зависела от того, параллелен или перпендикулярен оси волокна электрический вектор. У шелковой нити интенсивность полос поглощения при частотах, соответствующих валентным колебаниям групп $>C=O$ и $>N-H$, была существенно выше

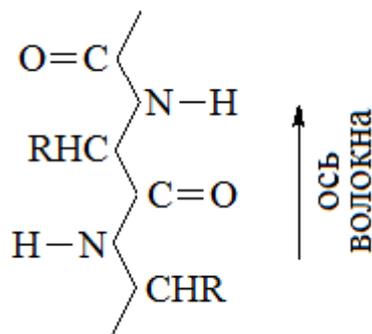


Рис. 46. Предпочтительная ориентация полипептидной цепи в шелке, определенная методом инфракрасного дихроизма [41, с. 513]

в тех случаях, когда электрический вектор был ориентирован перпендикулярно оси нити. Следовательно, связи пептидного остова должны быть преимущественно ориентированы перпендикулярно оси нити, как схематически показано на рис. 46. Эти данные согласуются с существующими представлениями о структуре шелка.

Инфракрасный дихроизм наблюдали также на ориентированных образцах ДНК. Полосы при $1600-1750\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям ароматических колец, проявляют перпендикулярный дихроизм; т. е. их интенсивности больше в случае перпендикулярной ориентации электрического вектора относительно молекулярной оси и меньше в случае продольной. Согласно этому наблюдению, основания в молекуле ДНК ориентированы перпендикулярно оси молекулы. Этот результат был предсказан уотсон-криковской моделью двойной спирали ДНК [41, с. 513].

При исследовании взаимодействия пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеиновых кислотах было показано, что спектр зависит от молярного отношения этих двух соединений. Полученный результат соответствовал уотсон-криковской схеме спаривания, объясняющей образование комплементарных пар гетероциклических оснований, которые связаны друг с другом водородными связями [41, с. 515].

2.3. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

В настоящее время для исследования полинуклеотидов, природных нуклеиновых кислот и глобулярных белков наряду с инфракрасной спектроскопией часто используется *спектроскопия комбинационного рассеяния*, или *рамановская спектроскопия*.

Рассмотрим природу эффекта Рамана, названного в честь одного из его первооткрывателей – индийского физика Ч. В. Рамана. При столкновении световой частицы (фотона) с молекулой может иметь место упругое соударение, при котором фотон не теряет энергию, но меняет направления своего движения. Такое рассеяние известно под названием *рэлеевского* и лежит в основе одного из методов определения молекулярных масс соединений. Соударения могут быть также неупругими, в результате которых энергия молекулы и фотона изменяются. Рассеяние, при котором фотон принимает или отдает часть своей энергии исследуемым молекулам в кювете, называется *рамановским* [22, с. 13].

Если фотон заимствует у молекулы часть ее колебательной и вращательной энергии, возникает энергетически более богатый фотон, т. е. излучение с меньшей длиной волны. Если же, напротив, фотон отдает часть своей энергии молекуле, возникает излучение более длинноволновое, нежели возбуждающее. Разность волновых чисел наблюдаемого максимума и максимума возбуждающего излучения носит название *рамановского смещения*.

Поскольку рамановские линии определяются колебательно-вращательными состояниями стандартной молекулы, они являются характерными для нее и дают ее структурные параметры. В то время как в инфракрасной спектроскопии условием возникновения спектра является наличие дипольного момента, в рамановской спектроскопии, напротив, необходимо изменение *поляризуемости* молекулы, т. е. способности к наведению диполя под действием электромагнитного поля фотона, попадающего в молекулу, при этом молекула не обязательно должна быть диполем. Следовательно, частоты, наблюдаемые в инфракрасном спектре, могут не проявиться в рамановском спектре, и наоборот, а значит те и другие спектры отличаются друг от друга и нередко взаимно дополняют друг друга. В то время как в инфракрасных спектрах играют роль преимущественно полярные группы, неполярные связи проявляются в сравнительно большом рамановском эффекте [12, с. 130]. На рис. 47 приведен пример рамановского спектра рРНК, выделенной из *E. coli*.

Спектроскопию комбинационного рассеяния начали применять для исследования биополимеров после введения лазеров как источников монохроматического излучения, полностью вытеснивших ранее

использовавшиеся ртутные лампы. Обычно рамановский спектр исследовали в спектральной области, где нет заметного поглощения

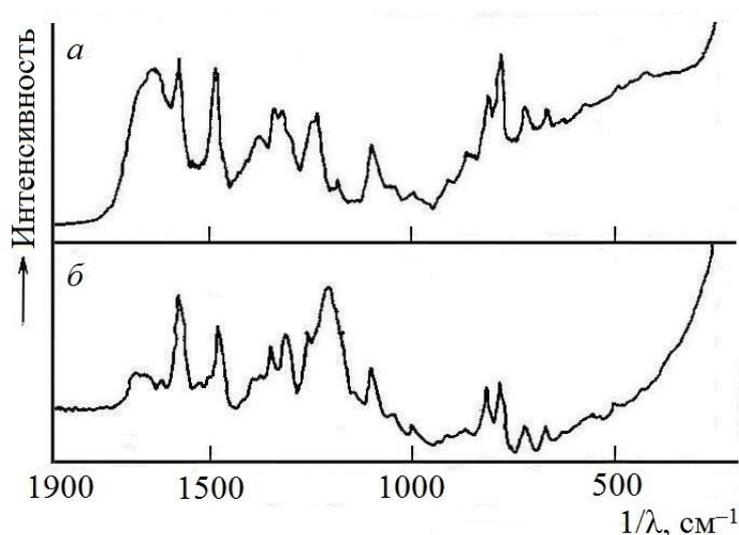


Рис. 47. Спектр комбинационного рассеяния образца рРНК при 32 °С, полученный в водном растворе (а) и в D₂O (б). Сравнение спектров в H₂O и D₂O позволяет следить за обменом протонов, участвующих в образовании водородных связей [12, с. 129]

комбинационным рассеянием (РКР), позволяет изучать структурные особенности конкретных участков макромолекулы. Методом РКР были исследованы гемсодержащие белки, фермент-субстратные комплексы, хлорофилл и другие биомолекулы [8, с. 166].

пробой, потому что иначе детектор не смог бы уловить слабое рамановское излучение. Однако при использовании лазера на красителе с перестраиваемой частотой, близкой по величине, но не совсем совпадающей с частотой максимума поглощения, чувствительность возрастает во много раз. Это явление, названное резонансным

Контрольные вопросы

1. Какова природа инфракрасных спектров поглощения? Назовите величины, которыми характеризуют инфракрасные спектры.
3. Каковы особенности приготовления образцов для инфракрасной спектроскопии?
4. Чем обусловлены амидные полосы в инфракрасных спектрах белков и сдвиг этих полос при формировании вторичной структуры?
5. В чем заключается метод инфракрасного дихроизма?
6. Какие сведения о конформации белка можно получить, применяя метод инфракрасного дихроизма?
7. Приведите примеры применения инфракрасной спектроскопии для изучения вторичной структуры нуклеиновых кислот.

8. В чем заключается эффект Рамана? Что понимается под рамановским смещением?

9. Какие различия существуют между инфракрасными и рамановскими спектрами и в чем состоит причина этих различий?

3. ДИСПЕРСИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ И КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ

Методы дисперсии оптического вращения (ДОВ, или спектрополяриметрии) и кругового дихроизма (КД), объединяемые под общим названием *хирально-оптических методов*, представляют собой два разных способа изучения взаимодействия поляризованного света с оптически активными молекулами. В отличие от классической поляриметрии, в методе ДОВ измеряют вращение плоскополяризованного света не при одной длине волны, а в широком спектральном интервале, а в методе КД измеряют в зависимости от длины волны способность по-разному поглощать свет, поляризованный по кругу вправо и влево.

Хирально-оптические методы применимы для структурных исследований белков и нуклеиновых кислот вследствие, в первую очередь, пространственной асимметрии составляющих остов этих макромолекул аминокислот и нуклеотидов. Широкое применение этих методов для изучения вторичной структуры биополимеров объясняется сравнительной простотой измерений, отсутствием необходимости специального препарирования образцов, возможности исследования очень небольших количеств веществ [42, с. 149].

3.1. ТЕОРИЯ МЕТОДОВ ДОВ И КД

Свет представляет собой волну, состоящую из осциллирующих электрического и магнитного полей. Световая волна является поперечной, т. е. векторы напряженности электрического поля (E), напряженности магнитного поля (H) и скорости распространения света (c) взаимно перпендикулярны. Естественный свет обладает набором волн со всеми возможными ориентациями вектора E , направления его колебаний в пространстве (как и колебаний вектора H) меняются быстро и хаотически. Свет, в котором направления колебаний каким-либо

образом упорядочены, называется *поляризованным*. Если вектор E колеблется только в одной плоскости относительно направления распространения луча, то свет считается *плоскополяризованным* (рис. 48).

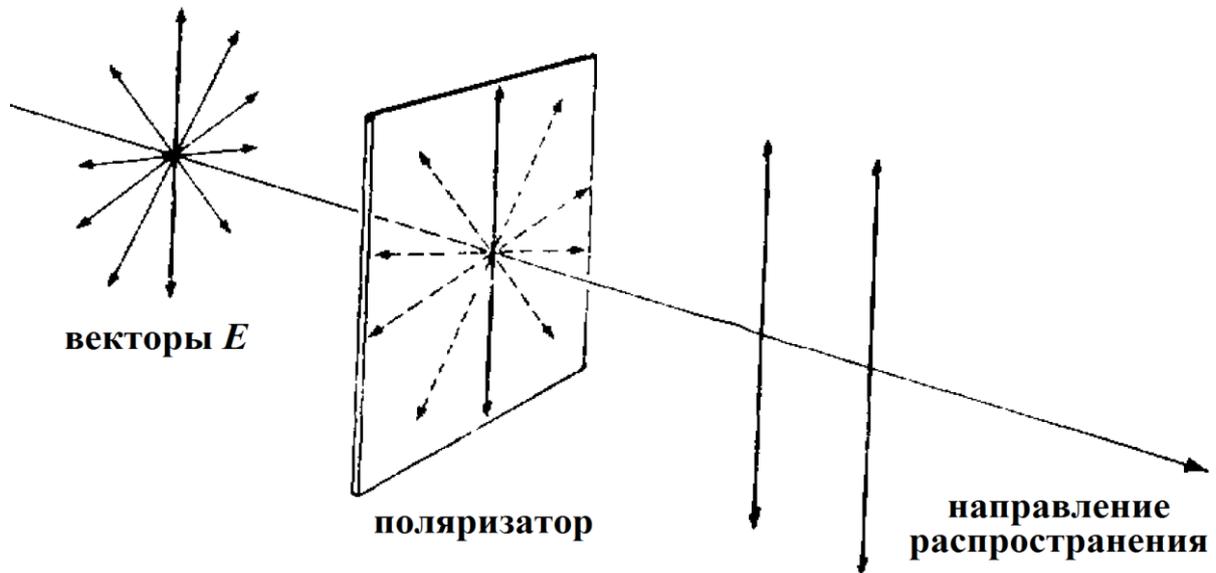


Рис. 48. Схема образования плоскополяризованного света [46, с. 451]. Поток света падает на поляризатор, который пропускает только те волны, векторы E которых параллельны оси поляризатора

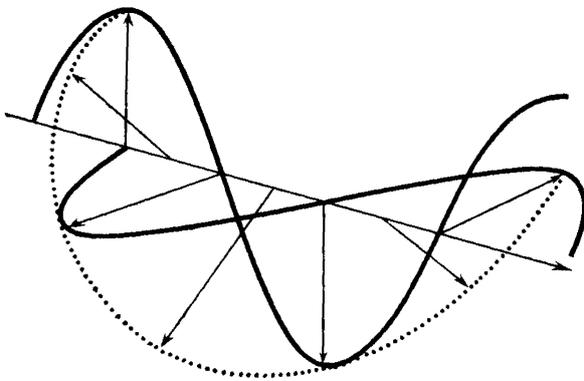


Рис. 49. Схематические представления циркулярно поляризованного света [46, с. 452]. Векторы E двух волн отличаются по фазе на $\frac{1}{4}$ длину волны и взаимно перпендикулярны. Результирующий вектор вращается так, что его конец описывает спираль (обозначена точками)

Для получения плоскополяризованного света используют специальные *поляризаторы*, изготавливаемые из кристаллов исландского шпата CaCO_3 (призмы Николя), турмалина или полимеров, например йодированного поливинилового спирта (поляроиды).

Пучок плоскополяризованного света можно представить затем в виде суммы двух составляющих векторов E_L и E_R , которые соответствуют левому и правому лучам *поляризованного по кругу (циркулярно поляризованного) света*. Его можно получить наложением двух плоскополяризованных волн, отличающихся по фазе на $\frac{1}{4}$ длины волны и имеющих взаимно перпендику-

лярные векторы напряженности электрического поля. В этом случае при пересечении оси распространения волны одной из синусоидальных кривых на другой наблюдается максимум или минимум, а результирующий вектор E вращается таким образом, что его конец описывает спираль (рис. 49).

При прохождении луча света через любое вещество наблюдается уменьшение скорости распространения (замедление) света, связанное с его преломлением, и уменьшение амплитуды вектора E , связанное с поглощением света. Дан-

ные процессы описываются соответственно показателем преломления n и молярным коэффициентом светопоглощения ϵ . Оптически активные вещества дополнительно к способности замедлять и поглощать свет обнаруживают чувствительность к плоскости поляризации падающего света вследствие различающихся значений показателей преломления n_L и n_R для соответственно левого и правого лучей циркулярно поляризованного света. Причина этого явления показана на рис. 50. В обычной среде, где векторы E_L и E_R передвигаются по кругу вправо и влево с одинаковой скоростью, результирующий вектор всегда будет лежать в вертикальной плоскости (рис. 50, *а*). В оптически активной среде векторы E_L и E_R вращаются с разными скоростями и результирующий вектор оказывается в плоскости, повернутой по отношению к вертикальной на некоторый угол α , т. е. происходит вращение плоскости поляризации плоскополяризованного света (рис. 50, *б*). Иными словами говорят, что

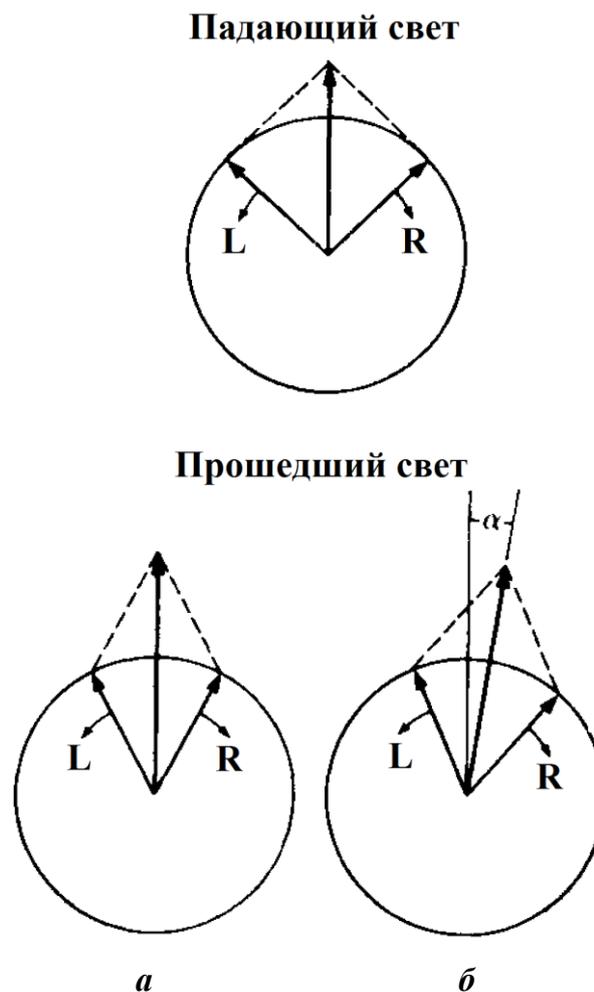


Рис. 50. Вращение плоскости поляризации света [46, с. 455]: *а* – обычная среда, *б* – оптически активная среда

оптически активная среда обладает свойством *двойного циркулярного лучепреломления*. Если среда поворачивает плоскость поляризации вправо (по часовой стрелке, когда смотрят навстречу лучу), то она называется правовращающей и обозначается (+); если же плоскость поляризации поворачивается влево, то среда левовращающая (–).

Величина угла вращения α зависит от природы вещества и растворителя, длины волны света и температуры. Угол α может быть описан следующим уравнением:

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_R), \quad (5)$$

где λ – длина волны падающего света, n_L и n_R – показатели преломления левого и правого циркулярно поляризованных лучей. Размерность угла α дается в радианах, для перевода ее в градусы необходимо умножить выражение (5) на $1800/\pi$:

$$\alpha = \frac{1800}{\lambda}(n_L - n_R). \quad (6)$$

При работе с растворами более удобна величина *удельного вращения* $[\alpha]$, определяемая как

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100\alpha}{lc}, \quad (7)$$

где α – угол вращения, измеряемый при температуре t и длине волны падающего монохроматического света λ ; l – толщина слоя раствора, дм; c – концентрация оптически активного вещества в г на 100 мл раствора. Обычно измерения проводятся на поляриметре при облучении монохроматическим светом в длинной волне D-линии натрия ($\lambda = 589$ нм) при 20°C . Удельное вращение выражается в град·см²/г.

Часто вместо удельного вращения используется *молярное вращение* $[\Phi]$, определяемое выражением

$$[\Phi]_{\lambda}^t = \frac{[\alpha]_{\lambda}^t M}{100}, \quad (8)$$

где M – молекулярная масса оптически активного вещества. Молярное вращение измеряется в град·см²/дмоль.

Для полимерных молекул вводят величину вращения на 1 моль мономерных звеньев:

$$[R]_{\lambda}^t = \frac{[\alpha]_{\lambda}^t R}{100}, \quad (9)$$

где R — средняя молекулярная масса мономерного звена.

Так, в случае белков рассчитывают вращение плоскости поляризации на 1 моль аминокислотных остатков. Поскольку эта величина зависит от показателя преломления растворителя n_λ , то экспериментально определенную величину $[R]_\lambda^t$ умножают на так называемый лоренцев множитель $3/(n_\lambda^2+2)$ для получения *приведенного молярного вращения* $[R']_\lambda^t$ – величины вращения плоскости поляризации, которую имела бы молекула, помещенная в растворитель с показателем преломления, равным единице (т. е. в вакуум):

$$[R']_\lambda^t = \frac{3}{n_\lambda^2 + 2} [R]_\lambda^t. \quad (10)$$

При измерениях ДОВ в видимой части спектра длина оптического пути (толщина слоя раствора) обычно составляет ~ 1 дм, концентрация оптически активного вещества 0,5–1%. В области коротких длин волн ниже 300 нм при более низких концентрациях (0,03–0,3%) длина оптического пути соответствует примерно 0,01–1,0 см. Для того чтобы избежать поглощения света растворителем, длину оптического пути стараются уменьшить, а концентрацию вещества повысить, но при этом могут возникнуть ограничения, связанные с растворимостью и поглощением растворенного вещества. На практике ячейку с растворителем проверяют на отсутствие двойного преломления из-за возможных дефектов формы ячейки либо поглощения материалом ячейки и определяют разность показания, полученного для раствора, и показания для растворителя [3, с. 147].

Другой особенностью оптически активных веществ является различие в поглощении левого и правого лучей циркулярно поляризованного света, которое выражается разницей молярных коэффициентов поглощения ϵ_L и ϵ_R :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R, \quad (11)$$

где $\Delta\epsilon$ называется *круговым дихроизмом* (КД)¹, или *двойным циркулярным поглощением*. КД положителен, если $(\epsilon_L - \epsilon_R) > 0$, и отрицателен, если $(\epsilon_L - \epsilon_R) < 0$. Важно отметить, что, если данная оптически активная молекула характеризуется положительным КД, то ее энантио-

¹ Не следует путать с дихроизмом, упоминавшимся в разделах 1 и 2 данной главы, который проявляется в случаях, когда молекулы образца (не обязательно обладающие оптической активностью) частично или полностью ориентированы в каком-либо одном направлении. Круговой дихроизм для оптически активных молекул проявляется даже при их беспорядочном расположении в растворе.

мер будет иметь отрицательный КД примерно такой же величины. Различное поглощение L- и R-волн означает, что результирующий вектор E уже не будет колебаться вдоль одного направления, а будет описывать эллипс (рис. 51), т. е. если при выходе из обычной среды свет остается плоскополяризованным, то при выходе из оптически активной среды он становится *эллиптически поляризованным*.

Разность величин ϵ измеряется по уравнению

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon l c, \quad (12)$$

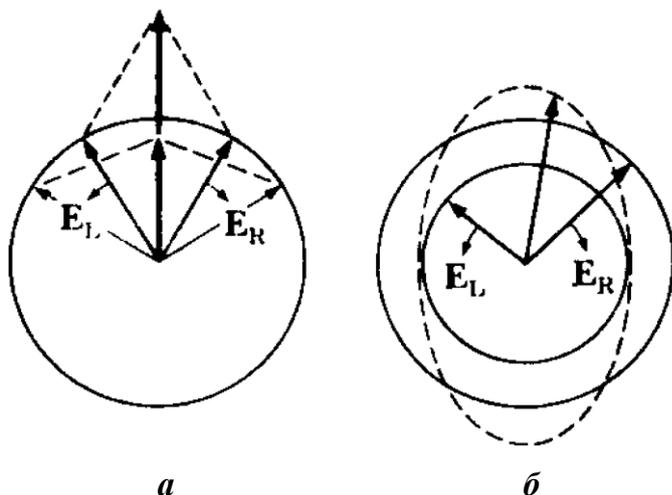


Рис. 51. Плоскополяризованный свет (а), прошедший через обычную среду, и эллиптически поляризованный свет (б), прошедший через оптически активную среду [46, с. 453]

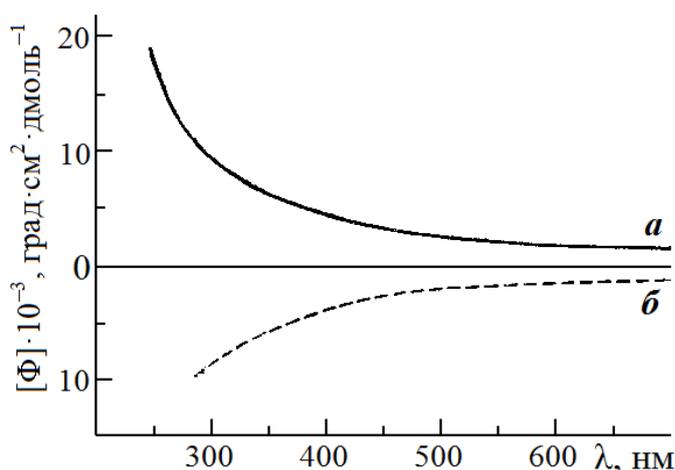


Рис. 52. Плавная положительная (а) и плавная отрицательная (б) кривые ДОВ [49, с. 248]

монотонно поднимающиеся или опускающиеся кривые называют *плавными*. Они могут быть положительными или отрицательными в зави-

где $[\Theta]$ – *молярная эллиптичность*, выражаемая в град·см²/дмоль. Эллиптичность представляет собой угол, тангенс которого равен отношению меньшей и большей полуосей выходящего эллиптически поляризованного света.

График зависимости величины удельного или молярного вращения от длины волны называется *кривой ДОВ*, а кривая, показывающая зависимость молярной эллиптичности от длины волны, называется *кривой КД*.

Характер кривых ДОВ зависит от конфигурации и конформации оптически активных соединений, природы имеющихся хромофоров и их положения относительно асимметрического центра. Мо-

симости от наклона к оси абсцисс, т. е. от того, поднимаются ли они или опускаются с уменьшением длины волны (рис. 52).

В оптически активных полосах поглощения, которые в свою очередь являются результатом влияния асимметрического центра на характерное для определенного хромофора поглощение, наблюдается аномальный ход кривой ДОВ – эффект Коттона (открыт в 1895 г. французским физиком Эме Коттоном). Кривые с эффектом Коттона имеют два экстремума,

для обозначения положения которых принято использовать термины *пик* и *впадина*. На кривой с положительным эффектом Коттона пик расположен при большей длине волны, чем впадина; на отрицательной кривой ДОВ при большей длине волны расположена впадина (рис. 53). Точка пересечения кривой с осью нулевого вращения в идеальном случае совпадает с положением полосы поглощения хромофора

λ_0 . Расстояние по вертикали между положительным и отрицательным экстремумами называется амплитудой эффекта Коттона, а расстояние по горизонтали между этими точками – шириной кривой.

К этому можно добавить два замечания: 1) как плавная кривая, так и кривая эффекта Коттона могут пересекать ось нулевого вращения или оставаться по одну сторону этой оси, т. е. действительный знак вращения в любой точке кривой не играет роли; 2) энантиомеры дают кривые, представляющие собой зеркальные отражения относительно нулевой оси.

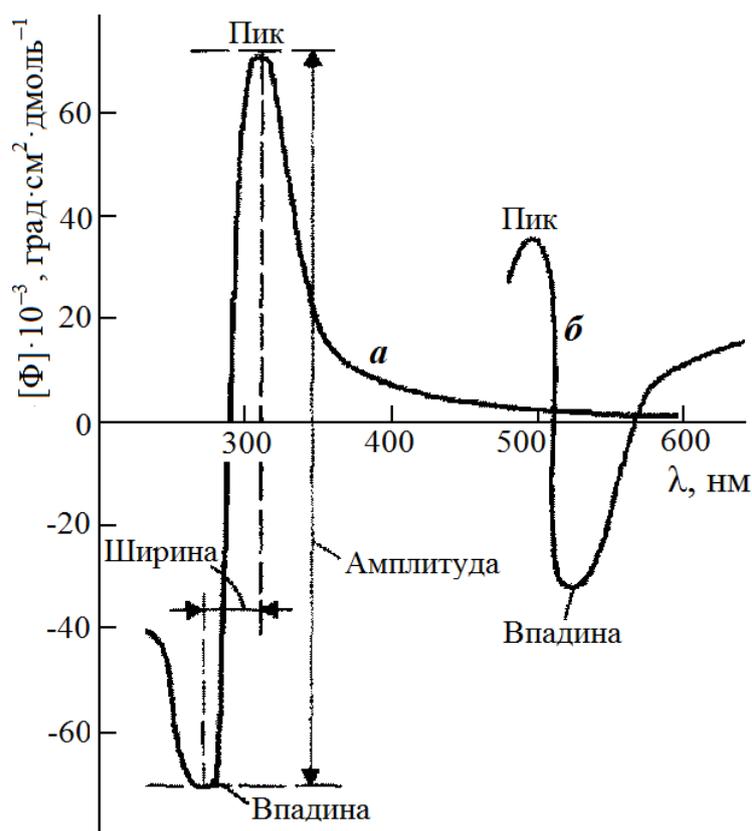


Рис. 53. Кривые ДОВ с положительным (а) и отрицательным (б) эффектом Коттона [31, с. 144]

Кривые КД дают, в общем, ту же информацию, что и кривые ДОВ, но часто оказываются более удобными для расшифровки и обработки.

Большинство оптически активных веществ не имеет полос поглощения в видимой части спектра: они расположены в ближней, а

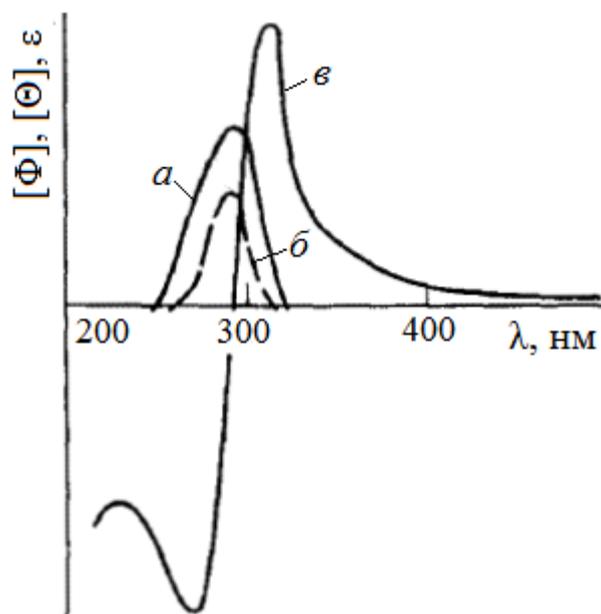


Рис. 54. Связь УФ-спектров (а), спектров КД (б) и кривых ДОВ (в) камфоры [31, с. 145]

чаще всего – в далекой ультрафиолетовой области спектра. Связь поглощения в ультрафиолетовой области, ДОВ и КД показана на рис. 54 на примере камфоры. Полоса поглощения хромофора камфоры (карбонильной группы) является примером оптически активной полосы поглощения. При длине волны, отвечающей максимуму поглощения, в спектрах КД также наблюдается максимум, а кривая ДОВ в области этой полосы поглощения имеет характерную S-образную форму (эффект Коттона).

Эффект Коттона для белков и полипептидов наблюдается в далекой ультрафиолетовой области (от 190 до 250 нм); хромофорной единицей в данном случае является пептидная связь. Для нуклеиновых кислот эффект Коттона наблюдается в интервале от 250 до 275 нм и определяется электронными переходами в гетероциклических основаниях нуклеотидов.

3.2. АППАРАТУРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДОВ И КД

Измерения ДОВ и КД обычно проводят в растворах, хотя изредка используют пленки и твердые вещества. Основное техническое оснащение состоит из источника света с набором длин волн, системы для поляризации света, системы для измерения поляризации после того, как свет пройдет через кювету с раствором, и детектора, с помощью которого может быть измерен световой поток.

На рис. 55 показана принципиальная схема *спектрополяриметра* – прибора для измерения ДОВ. Источник света 1 и монохроматор 2 (обычно двойной для сведения к минимуму рассеянного света в приборе) позволяют получать излучение с определенной длиной волны. Источниками света в спектральной области 180–700 нм служат мощные ксеноновые или криптоновые лампы с непрерывным спектром излучения. Водородные лампы позволяют работать в области спектра 180–400 нм, а дейтериевые – в более далекой ультрафиолетовой области (~160 нм). Свет

проходит через поляризатор 3 и преобразуется в плоскополяризованный. Модулятор 9 служит для преобразования света с постоянной плоскостью поляризации в свет с плоскостью

поляризации, совершающей малые колебания около своего положения равновесия. В качестве модулятора используется механическое устройство, качающее поляризатор то в одном, то в другом направлении на небольшой угол (порядка 1–2°). Модуляции также можно добиться помещением в пучок света попеременно пластинок из лево- и правовращающего кварца, либо установлением ячейки Фарадея. Она представляет собой стержень из невращающего кварца, окруженный соленоидом. Под действием переменного тока, пропускаемого через соленоид, кварц становится то лево-, то правовращающим.

Свет с модулированной поляризацией попадает на кювету с образцом 4, а затем на анализатор 5 (который фактически является еще одним поляризатором). В качестве поляризатора и анализатора используются призмы различных типов и из различных материалов. В видимой и ближней ультрафиолетовой области спектра (до ~240 нм) используются призмы из исландского шпата. В более коротковолновой области спектра исландский шпат сильно поглощает и призмы изготавливаются из кристаллического кварца. Анализатор находится в скрещенном положении к поляризатору, т. е. пропускает лишь свет с поляризацией, перпендикулярной поляризации света, вышедшего из поляризатора.

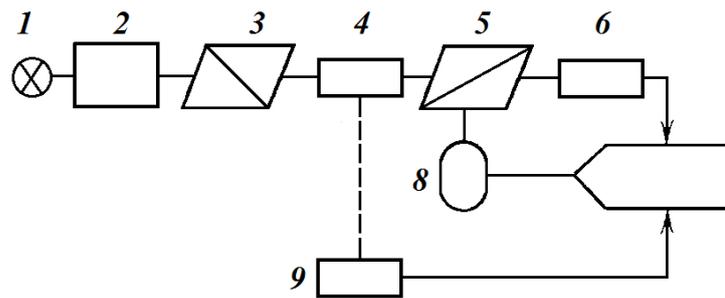


Рис. 55. Блок-схема спектрополяриметра [53, с. 217]

Наконец, свет падает на фотоэлемент или фотоумножитель 6 и усиливается резонансными усилителями 7. Усиленный сигнал подается на мотор 8, который вращает анализатор 5 для максимального прохождения света. Угол, при котором достигается прохождение максимальной интенсивности света, определяется как вращение α .

Для измерения КД применяются *дихрографы* (рис. 56). Свет от источника 1 и двойного монохроматора 2 преобразуется поляризатором 3 в плоскополяризованный. За поляризатором 3 расположен блок с кристаллом дигидрофосфата калия или аммония 4, на переднюю и

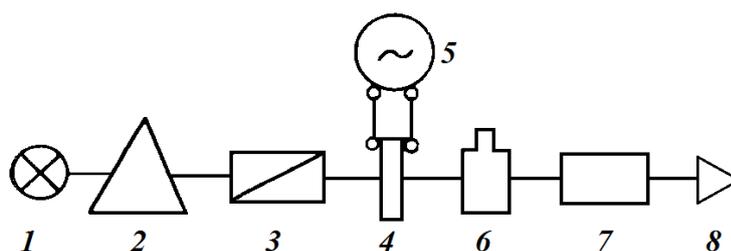


Рис. 56. Блок-схема дихрографа [12, с. 56]

заднюю плоскость которого подается переменное напряжение от источника 5, причем амплитуда этого напряжения должна быть синхронизована с измеряемой длиной волны. Этот

кристалл (называемый электрооптическим модулятором, или модулятором Покеельса) способен пропускать в зависимости от полярности поля L- или R-компонент света. Также распространены фотоупругие модуляторы, в работе которых используется принцип двойного лучепреломления под действием механического напряжения. Такие модуляторы изготавливают из плавленного кварца, фторида кальция и сульфида цинка, причем два последних пригодны для работы в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях.

Свет с модулированной поляризацией затем проходит через кювету с образцом 6 и падает на фотоэлемент или фотоумножитель 7. Выходной сигнал преобразуется довольно сложным путем с помощью электронного оборудования 8, давая напряжение, пропорциональное эллиптичности, которое автоматически вычерчивается в виде функции длины волны. Так получают спектр КД.

3.3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ДОВ И КД

При установлении структуры белков в качестве модельных соединений используют синтетические полипептиды (полиглутаминовую кислоту, полилизин и др.). В нативных белках полипептидная

цепь на отдельных участках принимает конформацию, характерную для α -спирали и β -структуры. В денатурированных белках и синтетических полипептидах в растворенном состоянии имеются области с неупорядоченной структурой (статистический клубок).

В области длинных волн в отсутствие поглощения и, следовательно, эффекта Коттона для количественной оценки данных ДОВ используют эмпирическое уравнение Моффита – Янга, показывающее связь между приведенным удельным вращением и длиной волны:

$$[R']_{\lambda} = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}, \quad (13)$$

в котором a_0 и b_0 являются параметрами, связанными с вторичной структурой, λ_0 – константа (в большинстве случаев она равна 212 нм).

Первое слагаемое уравнения Моффита – Янга характеризует нормальную ДОВ, определяемую наличием в полимере асимметрических атомов; второе слагаемое появляется при наличии каких-либо упорядоченных внутримолекулярных структур, например α -спиралей, и отражает их вклад в оптическое вращение. Поскольку спираль представляет собой в основном асимметричную структуру, то вполне естественно, что наличие спирализованных участков усиливает способность полипептидов вращать плоскость поляризации.

В координатах $[R']_{\lambda} \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2} = f\left(\frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}\right)$ имеем прямую (рис.

56), отсекающую отрезок ординаты, равный a_0 , а тангенс угла прямой определяет значение b_0 . Коэффициент a_0 зависит от аминокислотного состава полипептида и от характера среды, тогда как b_0 является функцией только степени упорядоченности макромолекулы. На моделях полиаминокислот было найдено, что b_0 имеет отрицательное значение для правой спирали и положительное для левой. Если молекула содержит 100% α -спирали, то $b_0 = -630^\circ$ для правой спирали и $+630^\circ$ для левой, а для β -структуры и статистического клубка $b_0 \approx 0$.

На рис. 57 приведена диаграмма Моффита для поли-L-тирозин-L-глутаминовой кислоты при различных значениях рН, т. е. при различном содержании α -спирали. При рН 4 этот полипептид сложен из α -спиралей, чему соответствуют значения $a_0 = 0^\circ$ и $b_0 = -630^\circ$, отсчитанные на графике. Для поли-L-тирозин-L-глутаминовой кислоты в форме статистического клубка (рН 7) находим $a_0 = -630^\circ$, $b_0 = 0^\circ$.

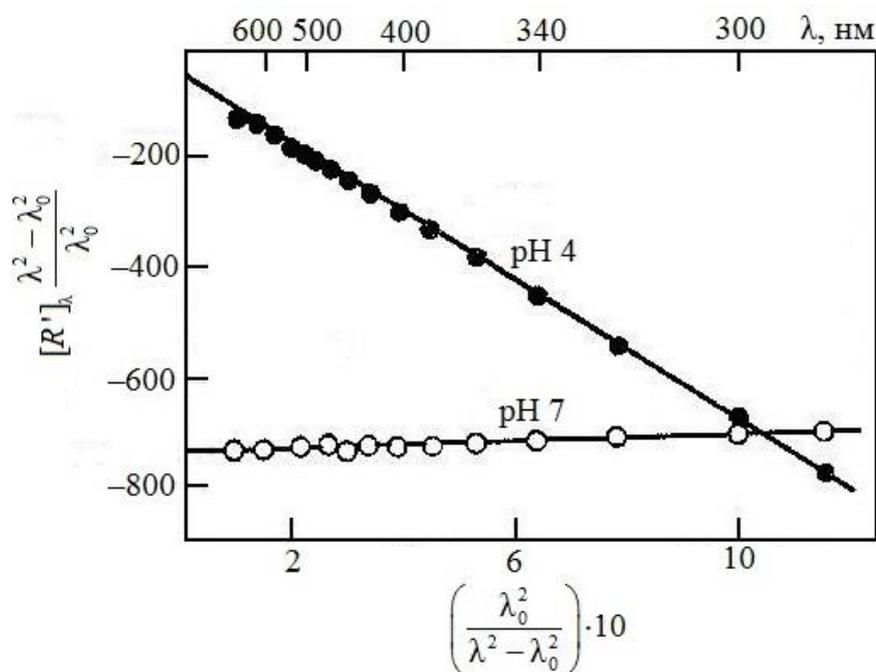


Рис. 57. Диаграмма Моффита для ДОВ полипептида, синтезированного из L-глутаминовой кислоты и 5% L-тирозина. Полипептид при pH 4,0 в фосфатном буферном растворе существует в форме спирали, а при pH 7,0 — в форме статистического клубка [12, с. 54]

Константа b_0 для парамиозина, который из всех известных белков обладает наиболее развитой спиральной структурой (в нее вовлечено более 90% аминокислотных остатков), равна -630° . Для расчета степени образования α -спирали других белков можно измерить ДОВ, найти коэффициент b_0 Моффита и поделить его на 630° . В табл. 9 приведены некоторые найденные таким способом данные.

Таблица 9

Степень упорядоченности белковых молекул в водном растворе [12, с. 54]

Белок	b_0 , град	Содержание спиральных структур, %
Сывороточный альбумин	-290	46
Инсулин	-240	38
Овальбумин	-195	31
Лизоцим	-100	29
Рибонуклеаза	-100	16
Химотрипсин	-95	15
β -Лактоглобулин	-70	11

Кривые ДОВ и КД в области эффекта Коттона (далекая ультрафиолетовая область), где поглощение обусловлено основной цепью, тонко отражают вторичную структуру. Так, для α -спиральных структур значения, определяющие положение впадин и пиков, служат мерой содержания этих структур в белках. Кривые ДОВ и КД для поли-L-лизина приведены на рис. 58.

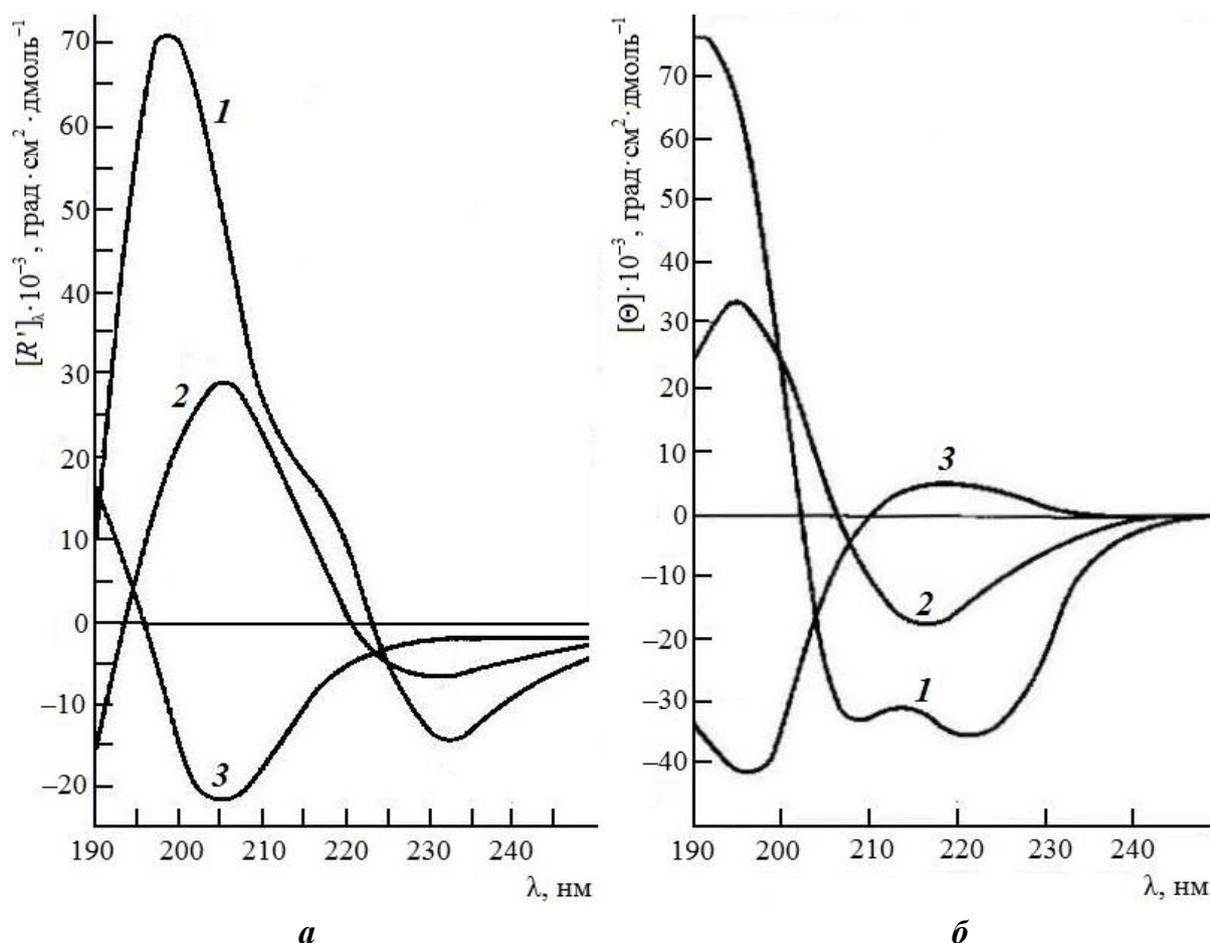


Рис. 58. Кривые ДОВ (а) и КД (б) поли-L-лизина в трех конформациях: 1 – α -спираль, 2 – β -структура, 3 – неупорядоченный клубок [Оои, с. 148]

Кривая ДОВ для α -спиральной конформации обнаруживает впадину при 233 нм, имеет плечо при 215 нм и острый пик при 198 нм; кривая КД содержит раздвоенный минимум (222 нм и 208 нм) с почти равными амплитудами и положительный пик при 191 нм.

Кривая ДОВ для поли-L-лизина с β -структурой содержит впадину при 229–230 нм, имеет положительный пик при 205 нм. По сравнению с кривой ДОВ для α -спирали в данном случае глубина минимума почти в 2 раза меньше, пик сдвинут на 6–7 нм в сторону бо-

лее длинных волн, а плечо отсутствует. На кривой КД имеются пик при 195 нм и впадина при 216 нм; при сравнении с аналогичной кривой для α -спирали так же, как и в случае кривых ДОВ, наблюдаются почти в два раза меньшая глубина и высота экстремумов. Эти отличия характерны для β -структур.

В качестве стандартных образцов полипептидов с полностью неупорядоченной структурой используются щелочные и нейтральные растворы полиглутаминовой кислоты и нейтральный раствор полилизина. Кривые ДОВ и КД полипептидов в неупорядоченной конформации существенно отличаются от аналогичных кривых для α -спирали и β -структуры [3, с. 149].

В тех случаях, когда белок либо полипептид состоит только из α -спиральных либо нерегулярных участков, содержание спиралей f_h (степень спиральности) определяют по эмпирическим уравнениям

$$f_h = \frac{[R'_\lambda] - [R'_c]}{[R'_h] - [R'_c]}, \quad (14)$$

$$f_h = \frac{[\Theta_\lambda] - [\Theta_c]}{[\Theta_h] - [\Theta_c]},$$

где $[R'_h]$, $[\Theta_h]$, $[R'_c]$, $[\Theta_c]$ – стандартные (полученные исследованием модельного синтетического полипептида) значения молярного вращения и эллиптичности для α -спирали и неупорядоченного клубка соответственно, $[R'_\lambda]$ и $[\Theta_\lambda]$ – значения молярного вращения и молярной эллиптичности при заданной длине волны для исследуемого белка.

Например, из кривых КД разных конформаций поли-L-лизина (рис. 58, б), видно, что при 208 нм $[\Theta_c]$ для неупорядоченной структуры составляет -4000 , а $[\Theta_h]$ для α -спирали равна $-33\ 000$. Тогда для расчета степени спиральности (в процентах) можно использовать уравнение

$$f_h = \frac{[\Theta_{208}] - (-4000)}{-33000 - (-4000)} = -\frac{[\Theta_{208}] + 4000}{29000}. \quad (15)$$

Аналогичным образом можно получить уравнение для второго аналитически важного экстремума кривой КД поли-L-лизина – впадины при 222 нм:

$$f_h = \frac{[\Theta_{222}] - (-3000)}{-36000 - (-3000)} = -\frac{[\Theta_{222}] + 3000}{33000}. \quad (16)$$

Определение степени спиральности данным способом быстрее и проще, чем на основании параметра b_0 , и поэтому в настоящее время более употребительно. Как правило, содержание α -спиралей, обладающих наиболее выраженными особенностями спектра КД, предсказывается легче, чем содержание β -структур и β -изгибов. Разработаны компьютерные программы, которые на основе базисных спектров, полученных для модельных белков, рассчитывают содержание различных видов вторичных структур в исследуемом белке.

Особую ценность методы ДОВ и КД имеют для наблюдения за тем, как изменения условий сказываются на вторичной, а значит, и на третичной структуре белков. Эти методы незаменимы при исследовании денатурации белков путем определения изменения вращения в зависимости от температуры, рН среды и других условий [38, с. 102]. Пример такого исследования для миоглобина приведен на рис. 59.

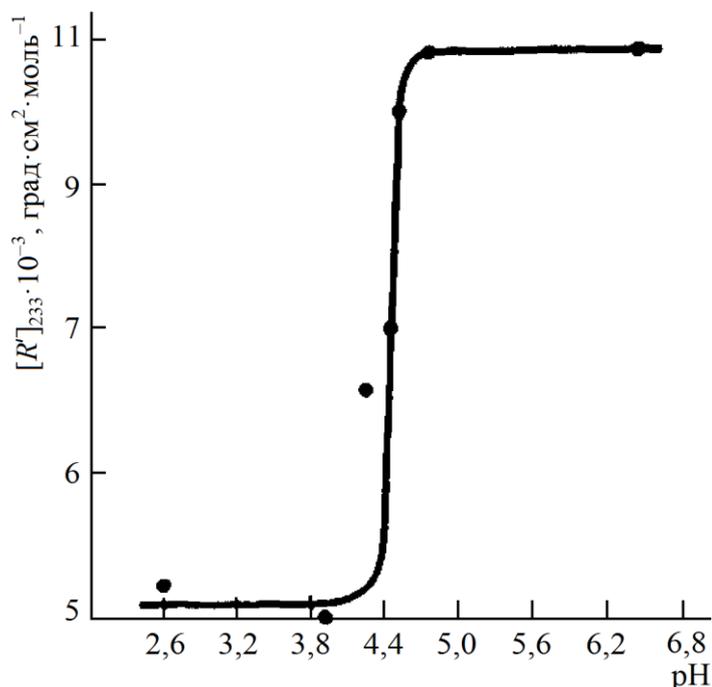


Рис. 59. Обнаружение денатурации миоглобина при титровании кислотой путем измерения молярного вращения при 233 нм [46, с. 472]

Методы ДОВ и КД могут применяться и для исследования вторичной структуры нуклеиновых кислот. Пуриновые и пиримидиновые основания, содержащиеся в синтетических полинуклеотидах и нуклеиновых кислотах, оптически неактивны, однако, если они соединяются посредством *N*-гликозидной связи с оптически активными пентозами, то в области поглощения их обнаруживается эффект Коттона (рис. 60). Спектры КД полинуклеотидов можно использовать для исследования разрушения спиральной структуры под действием температуры или экстремальных значений рН, перехода одноцепочечных полинуклеотидов в двухцепочечные и наоборот, структурных изменений полинук-

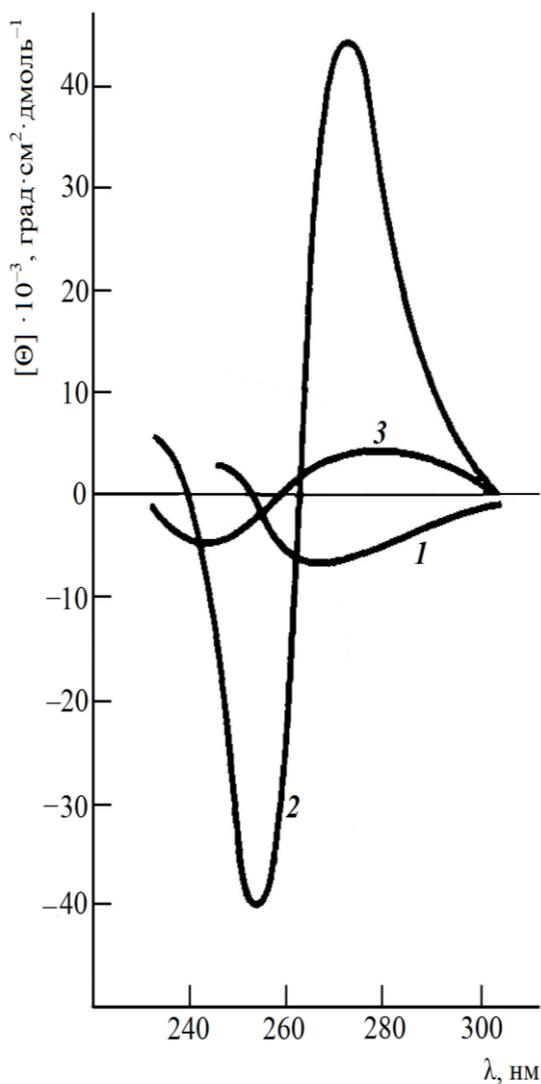


Рис. 60. Спектры КД адениловой кислоты (1), полиадениловой кислоты (2) и денатурированной полиадениловой кислоты (3) [46, с. 473]

леотидных цепей под влиянием связывания катионов, пептидов, белков и др.

Результаты изучения ДОВ и КД у полирибонуклеотидов и полидезоксирибонуклеотидов послужили фундаментом для подобного же изучения ДНК и РНК. В спектрах ДОВ – КД нуклеиновых кислот было обнаружено как определенное сходство, так и достоверные специфические различия. Наибольшее различие в спектрах ДОВ РНК и ДНК наблюдается в отношении высот пиков при 290–295 и 225–235 нм. У ДНК более длинноволновый пик существенно ниже пика при 225 нм, тогда как у РНК наблюдается обратное. Причина этих различий еще недостаточно изучена. Укажем, однако, что гидроксильные группы оказывают на кон-

формацию вторичное влияние, особенно на расположение оснований. Различная обнаженность последних в первую очередь ответственна за величину эффекта Коттона [12, с. 126].

Контрольные вопросы

1. Что представляет собой плоскополяризованный свет? Как его получают?
2. Что является причиной вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света оптически активными веществами?

3. Дайте определение величинам «угол вращения», «удельное вращение», «молярное вращение», «приведенное молярное вращение».

4. Что понимают под круговым дихроизмом? Раскройте причину этого явления.

5. Что такое эффект Коттона? Опишите характер плавных кривых ДОВ и кривых ДОВ с эффектом Коттона.

6. Опишите схему и принцип работы спектрополяриметра.

7. Опишите схему и принцип работы дихрографа.

8. Как используются спектры ДОВ в длинноволновой области в анализе вторичной структуры белков?

9. Какую информацию о вторичной структуре белков и структурных переходах можно получить из спектров ДОВ и КД в области эффекта Коттона?

10. Каковы особенности спектров ДОВ и КД нуклеиновых кислот?

4. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

Рентгеноструктурный анализ, заключающийся в изучении картины дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке, является наиболее универсальным методом определения пространственной структуры биополимеров, который позволяет определить расположение атомов, входящих в состав макромолекул. Зная пространственные координаты каждого атома, можно вычислить межатомные расстояния, валентные углы, углы вращения вокруг связей, распределение поверхностного заряда, что в итоге позволяет построить пространственные модели макромолекул. Следовательно, с помощью рентгеноструктурного анализа можно наблюдать с достаточной точностью первичную, вторичную и третичную структуры.

Явление дифракции рентгеновских лучей на кристаллах открыто в 1912 г. немецким физиком Максом фон Лауэ. Первые рентгенограммы монокристаллов пепсина и инсулина были получены в 1934 г. британским физиком Джоном Берналом и его ученицей Дороти Кроуфут-Ходжкин. Важным импульсом в развитии рентгеноструктурного анализа стала разработка метода изоморфного замещения, с помощью которого их соотечественники Макс Перуц и Джон Кендрю в 1954—

1959 г. установили пространственную структуру миоглобина и гемоглобина. В нашей стране изучение структуры белков методом рентгеновской кристаллографии было начато академиком Борисом Вайнштейном с сотрудниками в 1959–1960 гг. в лаборатории структуры белка, созданной в Институте кристаллографии АН СССР.

4.1. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ КРИСТАЛЛОВ БИОПОЛИМЕРОВ

4.1.1. Общие принципы метода

Процесс дифракции рентгеновских лучей можно сравнить с получением изображения в световом микроскопе. Свет от точечного источника фокусируют на изучаемом объекте. Волны света рассеиваются объектом, а затем с помощью линз собираются (фокусируются) вновь, создавая его увеличенное изображение. Поскольку размеры молекул биополимеров значительно меньше длины волны видимого света, для их изучения нужно использовать рентгеновские лучи с длиной волны 0,07–0,15 нм. Когда на объект падают рентгеновские лучи, то также происходит их рассеяние, однако невозможно создать линзы, способные собирать рентгеновские лучи для получения изображения. Интерференция волн, рассеянных на электронных оболочках атомов исследуемого вещества, приводит к возникновению дифракционной картины, которая представляет собой регулярный и симметричный набор *рефлексов* (точек или пятен на рентгеновской пленке). По дифракционной картине с помощью математических методов можно рассчитать карту электронной плотности и на ее основе создать модель пространственной структуры.

Выбор кристаллов как объектов исследования обусловлен тем, что для регистрации дифракционной картины рассеяния рентгеновских лучей необходимо иметь достаточное количество рассеивающих электронов, что возможно, когда исследуемый образец содержит большое количество одинаково ориентированных молекул. Таким образом, метод рентгеноструктурного анализа применим к тем биополимерам, которые могут быть получены в кристаллическом состоянии, причем размеры кристаллов должны составлять не менее нескольких десятых долей миллиметра.

Для описания упорядоченности атомов в кристаллах разработана специальная система условных наименований и обозначений. За основу принимается элементарная ячейка – параллелепипед (см. рис. 62 и табл. 10), который задается шестью параметрами: длинами ребер (a, b, c) и углами между ними (α, β, γ). В зависимости от соотношения длин ребер и значений углов различают семь систем (сингоний) кристаллов. Расположение атомов внутри ячеек описывается в терминах симметрии на основе 230 типов пространственных групп.

Дифракцию рентгеновских лучей на кристалле можно представить в виде их зеркального отражения от ряда плоскостей, мысленно построенных в кристаллической решетке. Пусть лучи падают на системы плоскостей с межплоскостным расстоянием d под углом θ , как показано на рис. 61. Можно видеть разницу в путях между лучом, отраженным вдоль AC' и лучом, прошедшим ко второй плоскости атомов по пути AB и после этого отраженным от BC . Если разница в путях равна целому числу длин волн ($n\lambda$), то две волны придут в точку наблюдения с одинаковыми фазами, испытав интерференцию:

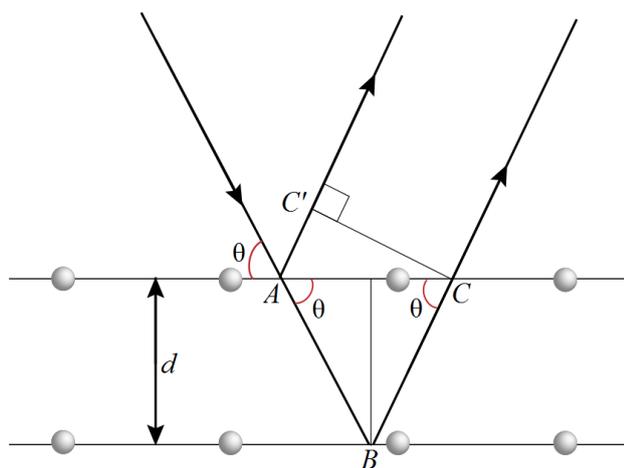


Рис. 61. Дифракция рентгеновских лучей [5, с. 15]

Если разница в путях равна целому числу длин волн ($n\lambda$), то две волны придут в точку наблюдения с одинаковыми фазами, испытав интерференцию:

$$(AB + BC) - AC' = n\lambda, \quad (17)$$

Применяя теорему Пифагора, можно показать, что

$$AB = BC = \frac{d}{\sin \theta}; AC = \frac{2d}{\operatorname{tg} \theta}; AC' = AC \cos \theta = \frac{2d}{\operatorname{tg} \theta} \cos \theta. \quad (18)$$

Из уравнений (17) и (18) получаем

$$\frac{2d}{\sin \theta} - \frac{2d}{\operatorname{tg} \theta} \cos \theta = \frac{2d}{\sin \theta} (1 - \cos^2 \theta) = \frac{2d}{\sin \theta} \sin^2 \theta = n\lambda. \quad (19)$$

Упрощением уравнения (19) получаем

$$2d \sin \theta = n\lambda. \quad (20)$$

Выражение (20) называется *условием Брэгга – Вульфа*. Отраженный луч будет регистрироваться в виде рефлекса на рентгенограмме только в случаях, определенных этим условием. Отметим

также, что рентгенограмма дает фактически обращенную картину кристалла: рефлексы, расположенные ближе к центру рентгенограммы, соответствуют

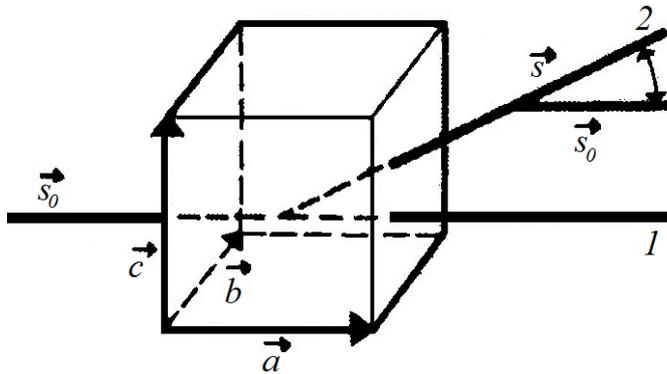


Рис. 62. Схема рассеяния рентгеновского излучения от элементарной ячейки кристаллической решетки с векторами сторон \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} [14, с. 310]:

1 – направление падающего пучка, 2 – направление рассеянного пучка, \vec{s}_0 и \vec{s} – волновые векторы падающего и рассеянного пучков

большим межплоскостным расстояниям, а рефлексы, расположенные ближе к периферии, – малым.

Уравнение (20) определяет зависимость между скалярными величинами, в то время как отраженные кристаллом рентгеновские лучи ориентированы определенным образом по отношению к системе координат, связанной с кристаллом, и могут быть представлены векторами.

Направления, в которых происходит интерференция рассеянных лучей, определяются уравнением Лауэ:

$$\vec{S}\vec{a} = 2\pi h, \quad \vec{S}\vec{b} = 2\pi k, \quad \vec{S}\vec{c} = 2\pi l, \quad (21)$$

где $\vec{S} = (\vec{s}_0 - \vec{s})$ – разность волновых векторов падающего на кристалл и рассеянного лучей; \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} – векторы элементарной ячейки кристалла (рис. 61); h , k , l – целые числа. Модуль волнового вектора равен $2\pi/\lambda$ и, следовательно, модуль вектора \vec{S} может принимать любые значения, не превышающие $4\pi/\lambda$. Расположение рефлексов на дифракционной картине дает возможность с помощью уравнения (21) определить векторы \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} , т. е. тип и параметры кристаллической решетки. Поворачивая кристалл вокруг его осей симметрии и меняя тем самым направление падающего излучения (величину угла θ), можно получить сведения о рассеянных пучках рентгеновского излучения для всевозможных векторов \vec{S} . Измеряемой величиной для каждого пучка является интенсивность рассеянного излучения, определяемая по почернению рентгеновской пленки, либо измеряемая счетчиком. В результате таких измерений интенсивность получается в виде функции в пространстве вектора \vec{S} .

Основное рассеяние рентгеновских лучей происходит в результате их взаимодействия с внутренними невалентными электронами атомов вещества, поэтому интенсивность рассеяния от каждого участка элементарной ячейки определяется величиной электронной плотности в этом участке элементарной ячейки кристалла, которая может быть записана как $\rho(\vec{r})$, где \vec{r} – радиус-вектор точки, задаваемый ее декартовыми координатами x, y, z . В этом случае интенсивность рассеяния в направлении, задаваемом вектором \vec{r} , оказывается величиной, пропорциональной квадрату модуля фактора рассеяния, который в комплексной форме определяется как

$$F(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{i\vec{S}\vec{r}} dV. \quad (22)$$

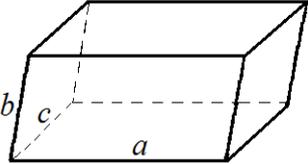
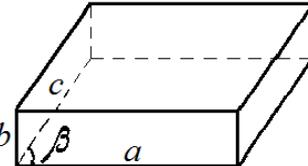
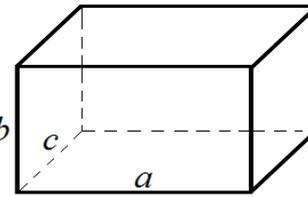
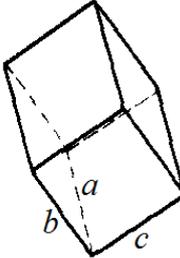
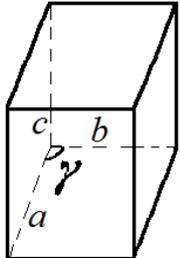
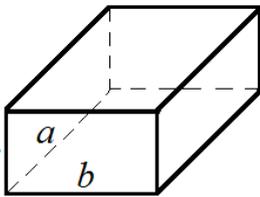
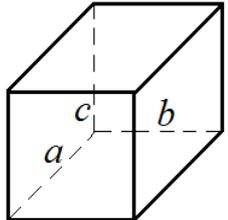
Это соотношение связывает функцию $F(\vec{S})$, модуль которой находят экспериментально из картины дифракции рентгеновских лучей на кристалле, с искомой функцией $\rho(\vec{r})$, дающей положение сгустков электронной плотности в элементарной ячейке кристалла, а тем самым каждого атома, кроме атомов водорода, не имеющих внутренних электронов.

4.1.2. Кристаллы биополимеров

Белки кристаллизуются во всех известных сингониях (табл. 10), рентгенограммы свидетельствуют о достаточной правильности их кристаллической решетки (рис. 63). Параметры элементарных ячеек белковых кристаллов заключены в пределах от нескольких сотен до нескольких тысяч нанометров. При этом, имея определенную оптическую конфигурацию, определяемую строением L-аминокислот, белки не могут кристаллизоваться в пространственных группах, имеющих зеркальные элементы симметрии – центр и плоскости симметрии.

Важная отличительная особенность кристаллов белков состоит в том, что их элементарная ячейка содержит воду, которая может достигать 50–60% от объема ячейки. Часть молекул воды прочно связана с поверхностью белковой молекулы, образуя своего рода «рубашку», а другая – разупорядочена [7, с. 532]. Кроме воды, в ячейке белковых кристаллов могут также находиться ионы солей или молекулы органических растворителей, содержащиеся в маточном растворе.

Сингонии кристаллических структур [42, с. 19]

Сингония	Примеры
Триклинная $a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$ 	Вирус некроза табака $M = 1\,600\,000$; $a = 15,7$ нм; $b = 15,4$ нм; $c = 14,7$ нм; $\alpha = 100^\circ$; $\beta = 110^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Моноклинная $a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta \neq 90^\circ$ 	Карбоксипептидаза А $M = 34\,300$; $a = 5,15$ нм; $b = 5,99$ нм, $c = 4,72$ нм; $\beta = 97^\circ 30'$
Ромбическая $a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 	Вирус полиомиелита $M = 6\,000\,000$; $a = 35,3$ нм; $b = 37,8$ нм; $c = 32,0$ нм
Ромбоэдрическая $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$ 	Цинкинсулин $M = 12\,500$; $a = 4,90$ нм; $\alpha = 114,8^\circ$
Гексагональная $a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$ 	Пепсин $M = 35\,000$; $a = 6,8$ нм; $c = 29,2$ нм
Тетрагональная $a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 	Лизоцим $M = 14\,600$; $a = 7,91$ нм; $c = 3,79$ нм
Кубическая $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 	Вирус желтой мозаики репы $M = 5\,000\,000$; $a = 72$ нм

Все эти дополнительные ингредиенты могут образовывать целые слои между молекулами белка и располагаться в многочисленных пустотах элементарных ячеек, возникающих за счет того, что поверхность макромолекул чрезвычайно нерегулярна и имеет много выступов и впадин. Эффективное заполнение пространства фигурами такой сложной формы невозможно, поэтому в сухом состоянии белковый кристалл энергетически не стабилен и по мере высыхания становится все более и более дефектным.

Выращивание белковых кристаллов размером в несколько десятых долей миллиметра, годных для рентгеноструктурных исследований, – задача достаточно сложная. Одним из наиболее распространенных методов кристаллизации и одновременно очистки препаратов является высаливание. Уменьшение растворимости белков при добавлении к их растворам таких солей, как $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , NaCl и т. д., обусловлено нарушением гидратной оболочки белковых молекул и соответственно увеличением их взаимодействия. Понизить растворимость белков можно также при помощи органических растворителей (спиртов, ацетона и др.).

Наличие дефектов в кристаллах обычно выявляют с помощью поляризационных микроскопов. Одной из причин возникновения дефектов являются конвекционные токи жидкости, поэтому определенные надежды на улучшение процедур кристаллизации возлагаются на выращивание кристаллов на орбитальных космических станциях в условиях невесомости [14, с. 309].

Взаимодействия между белковыми глобулами, обязательно возникающие при кристаллизации, казалось бы, способны сильно иска-

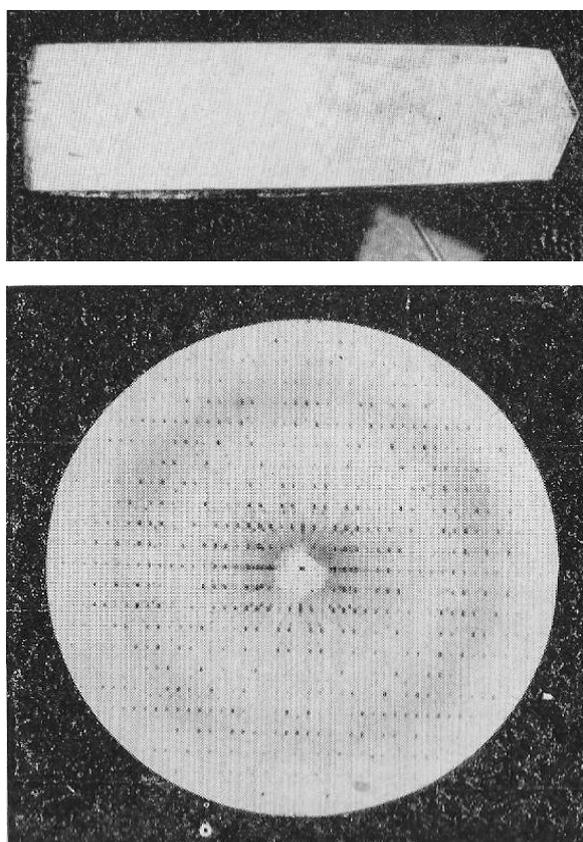


Рис. 63. Моноклинный кристалл пепсина в поляризованном свете и его рентгенограмма [42, с. 20]

зять строение белка, однако как показали многочисленные наблюдения, этого не происходит. Во-первых, результаты рентгеноструктурного анализа согласуются с данными о пространственной структуре белков в растворе, полученные методом ядерного магнитного резонанса. Во-вторых, в кристаллах некоторых ферментов удалось наблюдать каталитическую активность, что указывает на сохранение в кристалле конформации, присущей нативному белку. В-третьих, для белков, в кристаллах которых содержатся по-разному ориентированные молекулы, последние, несмотря на различие в контактах с «соседями», имеют практически идентичные пространственные структуры, если пренебречь некоторыми, обычно небольшими, отличиями в положении функциональных групп на поверхности контакта.

Сохранение конформации при кристаллизации белков обусловлено особенностями строения белковых кристаллов, которые как уже было сказано, содержат большой объем воды и солей. Белковая молекула в кристалле, хотя и имеет целый ряд нековалентных контактов с соседними, остается как бы погруженной в ту же среду, где она находилась до кристаллизации. В частности, удается выявить слой из нескольких сотен молекул воды, непосредственно связанных с поверхностью белка и составляющих его гидратную оболочку. Таким образом, в силу своеобразия белковых кристаллов их образование не вызывает значительных структурных изменений в белке и метод рентгеноструктурного анализа дает, как правило, картину, корректно отражающую строение белковой молекулы в растворе [38, с. 117–118].

Из растворов можно кристаллизовать не только глобулярные белки, но и тРНК. Такие кристаллы также содержат большое количество растворителя (от 30 до 80%) и могут рассматриваться как концентрированный раствор. Из-за слабости межмолекулярных контактов, стабилизирующих кристаллы, они очень чувствительны к изменению окружения, поэтому их хранят при строго определенных условиях [9, с. 54].

4.1.3. Аппаратура рентгеноструктурного анализа

Для измерения дифракции рентгеновских лучей на кристаллах применяются *дифрактометры* (рис. 64). Источником излучения может служить рентгеновская трубка и вращающийся анод, дающие

мощный пучок излучения фиксированной длины волны 0,15 нм, или синхротрон, позволяющий выбрать необходимую для эксперимента длину волны. На рис. 64 в качестве источника рентгеновских лучей приведен вращающийся медный анод, охлаждаемый изнутри водой и помещенный в вакуум вместе с электронной пушкой, которая служит источником пучка электронов.

В результате взаимодействия электронов с металлом происходит выделение электромагнитных квантов. Синхротрон представляет собой ускоритель элементарных частиц, в котором электроны движутся по круговой орбите со скоростью, близкой к скорости света, и становятся источниками интенсивного электромагнитного излучения. Оно характеризуется сплошным спектром,

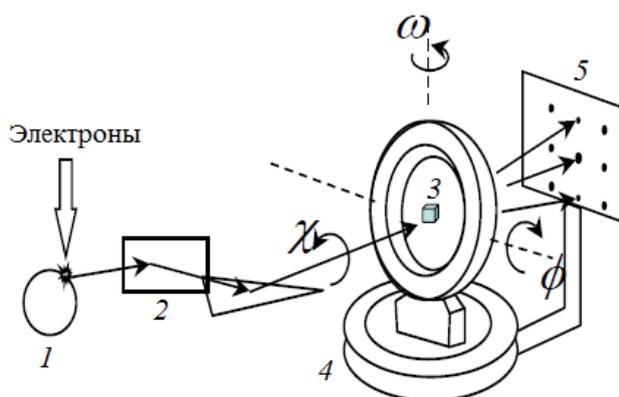


Рис. 64. Схема рентгеновского дифрактометра [5, с. 38]:

1 – вращающийся анод, 2 – рентгеновский монохроматор, 3 – кристалл белка, 4 – гониометр, 5 – детектор

из которого с помощью монохроматоров можно вырезать излучение желаемой длины волны. Интенсивности синхротронного излучения, достигаемые в мощных ускорителях, существенно превышают величины, достижимые во вращающихся анодах и рентгеновских трубках.

Для фокусировки и одновременно монохроматизации пучка излучения используются графитовые пластинки. Монохроматический рентгеновский луч попадает на кристалл белка, помещенный в капилляр с маточным раствором. Дифракция лучей и появление рефлексов на экране детектора происходят при определенных ориентациях кристалла относительно направления падающего рентгеновского луча. Чтобы правильно ориентировать кристалл, его помещают в *гониометр* – прибор, позволяющий вращать кристалл вокруг трех осей: горизонтальной, по направлению рентгеновского луча (ось χ), горизонтальной, нормальной к направлению луча (ось ϕ) и вертикальной (ось ω). Дифракционная картина регистрируется детекторами. На рис. 64 изображен один из распространенных детекторов – пластинка, состоящая из фосфоресцирующего экрана и светочувствительных ячеек, фотоэлектрический сигнал с которых считывается компьютером.

4.1.4. Решение фазовой проблемы и построение моделей пространственной структуры

Как известно, всякая комплексная величина, к каковым относится и фактор рассеяния $F(\vec{S})$, характеризуется модулем и фазой. Из эксперимента можно получить только модули, но без знания фаз невозможно рассчитать искомую функцию распределения электронной плотности $\rho(\vec{r})$. С учетом фазового множителя $e^{i\varphi}$ выражение для расчета $\rho(\vec{r})$, полученное преобразованием уравнения (22), запишется в виде

$$\rho(\vec{r}) = \sum_h \sum_k \sum_l |F(\vec{S})| e^{i\varphi} e^{-2\pi i(hx/a+ky/b+lz/c)}. \quad (23)$$

Главным подходом к решению описанной фазовой проблемы является *метод изоморфного замещения*, разработанный Максом Перуцем и его коллегами. Наличие значительного числа молекул растворителя в элементарной ячейке любого белкового кристалла позволяет заменить несколько молекул растворителя на вещества, содержащие ионы тяжелых металлов, например $\text{Hg}(\text{NH}_3)_2^+$, AuCl_4^- и т. п. При этом необходимо, чтобы соединение белка с ионом тяжелого металла было изоморфно исходному белку, т. е. имело ту же кристаллическую структуру (отсюда и название метода). Тяжелый атом, имеющий большое количество электронов и сильно рассеивающий рентгеновские лучи, вызывает заметные изменения интенсивности рефлексов, при этом расположение рассеянных пучков рентгеновских лучей для такого изоморфно замещенного кристалла будет совпадать с расположением рефлексов от незамещенных кристаллов, т. к. параметры ячейки, характеризуемые векторами \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} , не изменяются. Проведя рентгеновский эксперимент с модифицированным соединением и определив изменения интенсивностей рефлексов по сравнению с нативным белком, можно получить информацию о значениях фаз.

Рассчитанную по уравнению (23) функцию распределения электронной плотности $\rho(\vec{r})$ можно наглядно представить в виде серии карт распределения электронной плотности для различных срезов через элементарную ячейку, на которой изображены кривые (изолинии), соединяющие точки с одинаковым значением электронной плотности. Эти кривые подобны горизонталям на географических картах, а сам

способ построения кривых для ряда плоских срезов молекулы напоминает систему гистологических срезов сложных тканей; накладывая срезы друг на друга, можно восстановить пространственное строение ткани. Обычно каждое ребро элементарной ячейки делится на 30, 60 или 120 частей и, таким образом, проводится 60^3 и даже больше вычислений функции распределения [42, с. 39].

С помощью специальных компьютерных программ в карту распределения электронной плотности вписываются атомы или функциональные группы белковой структуры, которые располагаются в местах сгущения изолиний, соответствующих максимальной электронной плотности. Так на участке карты для цитохрома C_{551} (рис. 65) просматриваются максимумы, соответствующие атому железа и пиррольным кольцам. В большинстве случаев отдельные атомы на таких картах не прорисовываются, однако поскольку геометрия фрагментов хорошо известна из данных по рентгеноструктурному анализу низкомолекулярных соединений, детальное изображение отдельных атомов обычно удается вписать в полученное изображение макромолекулы.

Процесс вписывания координат атомов в карту электронной плотности чередуется с процедурой уточнения получаемой модели, которая заключается в минимизации функции, являющейся мерой близости наборов модулей факторов рассеяния, полученных экспериментально и рассчитанных теоретически. Такие циклические повторения осуществляются до тех пор, пока вносимые изменения улучшают структуру (т. е. увеличивается ее соответствие карте электронной плотности, становятся энергетически более выгодными взаимные расположения атомных групп). Обычно на это уходит от нескольких месяцев до года.

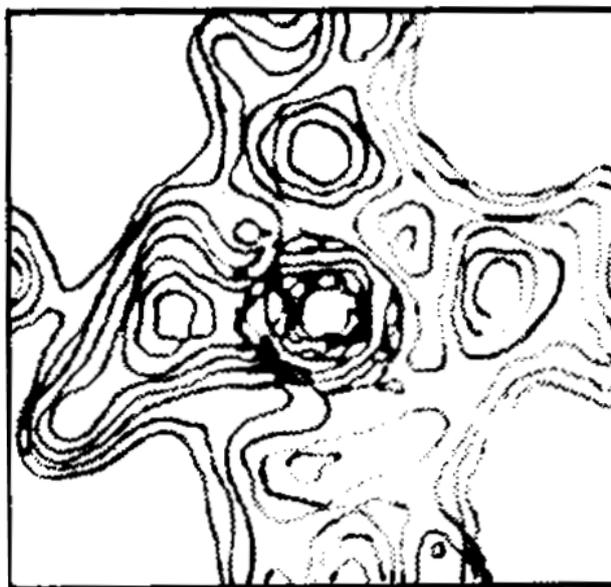


Рис. 65. Участок карты электронной плотности цитохрома C_{551} из синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) в плоскости, содержащей гем [14, с. 313]

4.1.5. Значение метода

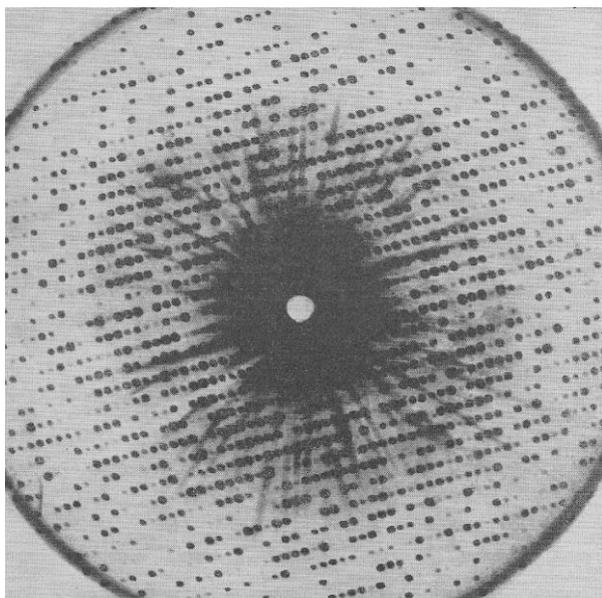


Рис. 66. Рентгенограмма кристаллов миоглобина из мышечной ткани кашалота [19, с. 105]

Рентгеновский структурный анализ белков впервые был применен к миоглобину (рис. 66) и гемоглобину. Первоначально функцию распределения электронной плотности для миоглобина рассчитали лишь по 400 рефлексам при слабом разрешении 0,6 нм. Однако это уже позволило определить положение 2500 атомов в макромолекуле миоглобина и характер свертывания полипептидной цепи, т. е. третичную структуру. Как оказалось, прежние теории, в которых белковая глобула

представлялась как совокупность связанных коротких параллельных α -спиральных сегментов, оказались несостоятельными. Было показано, что полипептидная цепь в молекуле белка может изгибаться весьма сложным образом, обеспечивая образование компактной глобулы.

Результаты, полученные при анализе структуры гемоглобина, показали, что несмотря на существенную разницу в химическом строении этих белков, третичная структура α - и β -субъединиц гемоглобина и глобулы миоглобина практически одинакова. Также было показано, что изменение функциональных свойств гемоглобина, наблюдаемое при переходе из обычной в восстановленную форму, является следствием увеличения расстояния между его β -субъединицами при неизменности их третичной структуры.

В дальнейшем при помощи рентгеноструктурного анализа молекул миоглобина и гемоглобина с разрешающей способностью 0,2 нм (10 000 рефлексов) вторичная и третичная структуры этих белков были выяснены во всех подробностях. При этом разрешении в глобуле миоглобина четко выявились α -спирали (рис. 67, 68), существование которых в глобулярных белках являлось предметом спора.

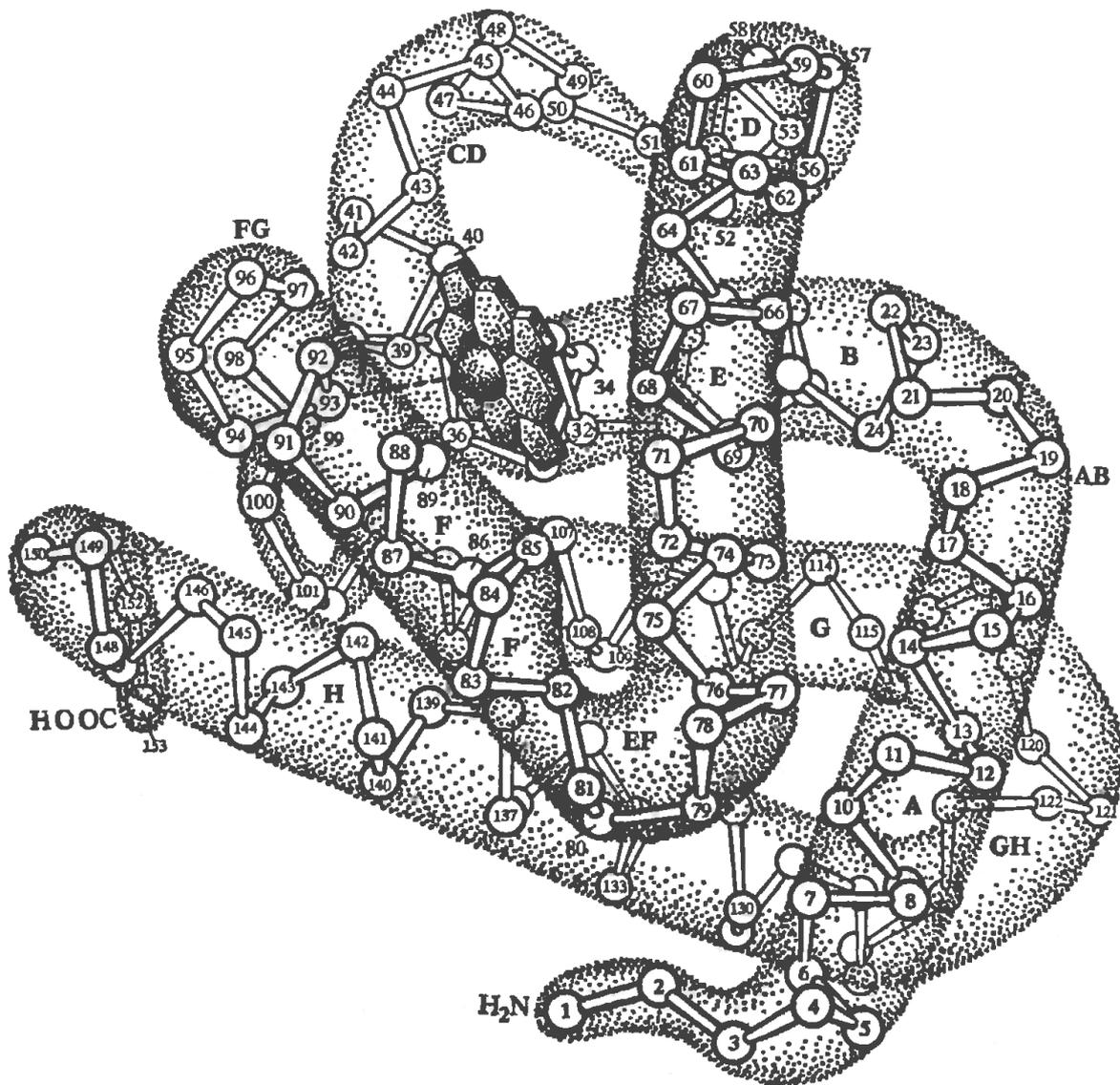


Рис. 67. Структура миоглобина, выведенная на основе рентгеноструктурного анализа (разрешающая способность 0,2 нм). Восемь α -спиральных участков (обозначенных буквами латинского алфавита) резко преобладают над изгибами полипептидной цепи (обозначены сочетаниями АВ, ВС и т. д.) по протяженности и пересекаются под различными углами. Черный диск в левой части молекулы – группа гема [44, с. 71]

При анализе пространственной ориентации боковых цепей миоглобина и гемоглобина впервые было обнаружено, что почти все гидрофобные боковые группы находятся внутри молекул, образуя компактное гидрофобное ядро. В то же время полярные боковые группы расположены на поверхности глобулы и образуют водородные или ионные связи с молекулами воды и ионами солей, находящимися в элементарных ячейках кристалла.

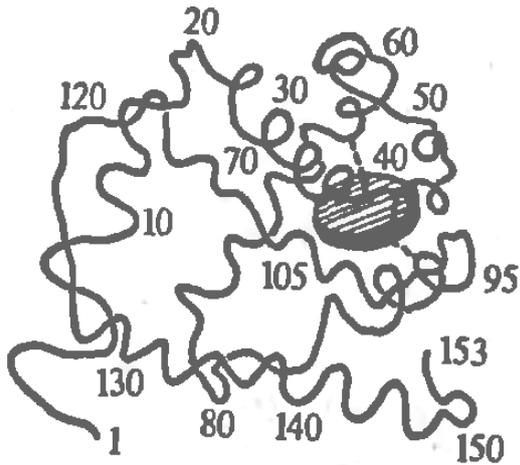


Рис. 68. Конфигурация цепи миоглобина [44, с. 72]. Заштрихованный диск – гем; пунктир – место прикрепления его к хребту полипептидной цепи посредством радикала гистидина; хорошо заметны α -спирали, составляющие 75% полипептидной цепи

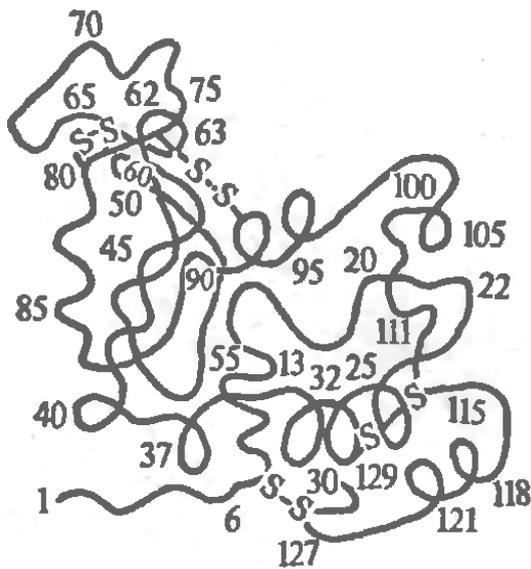


Рис. 69. Конфигурация цепи лизоцима [44, с. 72]. Символами –S–S– обозначены дисульфидные связи; заметно, что α -спиральная конфигурация присутствует не более чем $1/3$ полипептидной цепи; в верхней части молекулы видно углубление (щель), предназначенное для размещения субстрата, расщепляемого лизоцимом

На основе метода, разработанного для миоглобина и гемоглобина, была изучена молекула фермента лизоцима при разрешающей способности 0,2 нм (рис. 69), а также построена модель комплекса фермент – субстрат и определены боковые группы, включающие активный центр.

Современный рентгеноструктурный анализ характеризуется разрешающей способностью до 0,14 нм (более 20 000 рефлексов), уступая в этом только методу ядерного магнитного резонанса (0,03–0,09 нм) [44, с. 68–69]. Поскольку межатомные расстояния в молекулах органических веществ составляют 0,1–0,2 нм, столь высокая разрешающая способность дает возможность построить полную пространственную модель макромолекулы. Рентгенография высокого разрешения проведена примерно для 300 глобулярных белков, а также для тРНК. К современным направлениям относится *рентгенодинамический анализ*, позволяющий изучить температурную зависимость дифракции рентгеновских лучей на кристаллах белков и определить связанную с ней конформационную подвижность аминокислотных остатков. Эти данные имеют большое значение в физике ферментов [8, с. 134].

4.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ ФИБРИЛЛЯРНЫХ СТРУКТУР

4.2.1. Дифракция рентгеновских лучей на волокнах

Белки, молекулы которых имеют нитевидную форму, образуют фибриллярные (волоконистые) структуры. Двухцепочечные молекулы ДНК и некоторых видов РНК также имеют определенную тенденцию к образованию волокон. Исследование строения волокон биополимеров привели к двум фундаментальным открытиям – к определению структуры α -спирали и установлению вторичной структуры ДНК.

При формировании волокон нитевидные молекулы стремятся расположиться параллельно одна другой. Возможны регулярный и нерегулярный способы укладки (рис. 70).

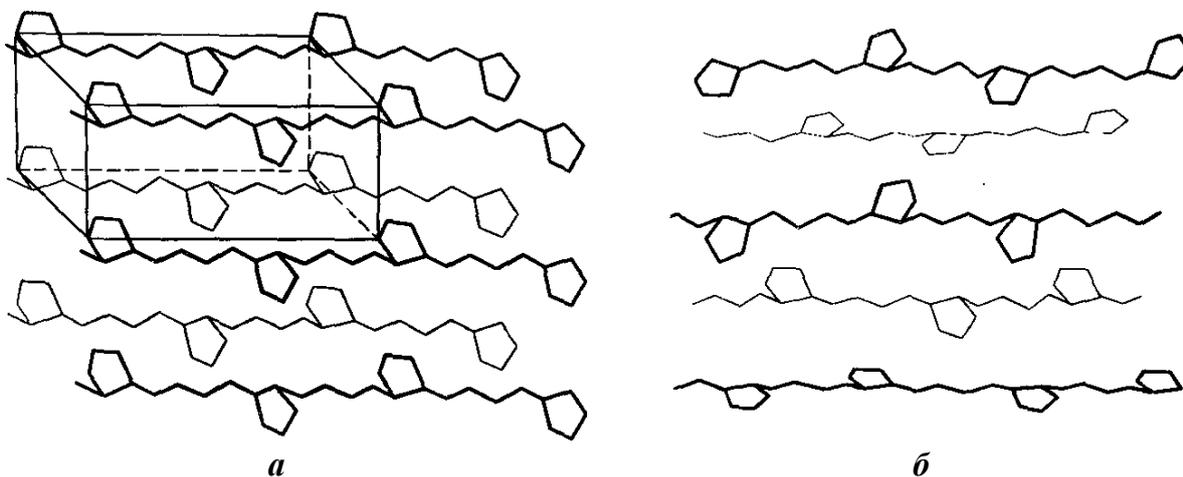


Рис. 70. Схема упаковки цепей в волокнах биополимеров:
а – правильная кристаллическая упаковка, *б* – неупорядоченная упаковка
[42, с. 48]

В первом случае (рис. 70, *а*) в полимерных структурах возникают *кристаллиты*, имеющие трехмерную периодическую решетку, состоящую из идентичных элементов. В силу сравнительно легкой деформируемости длинных цепных молекул, строгая регулярность расположения сегментов различных цепей не может выдерживаться в больших объемах, поэтому кристаллиты сравнительно малы по размерам. Одно из направлений элементарной ячейки кристаллитов всегда параллельно направлению молекулярной цепи, а два других направления, лежащих в плоскости, перпендикулярной длине цепи, могут быть ориентированы любым образом. Поскольку волокна со-

стоят из множества мелких кристаллитов, приходится иметь дело с непрерывным набором ориентации кристаллитов вокруг оси волокна, и волокно в целом имеет *осевую (аксиальную) симметрию*, или *аксиальную текстуру*. Второй тип упаковки (рис. 70, б) более естественен для цепных молекул с разнородными, не регулярно чередующимися боковыми группами. Образующиеся структуры, в которых взаимное расположение молекул по длинам не является регулярным, получили название *паракристаллов*. Они также имеют аксиальную симметрию.

Правильная кристаллическая структура для фибриллярных белков и нуклеиновых кислот в общем случае невозможна. Так, в кристаллических препаратах ДНК правильную пространственную решетку образуют лишь пентозофосфатные остовы цепей, а пары оснований, чередующиеся нерегулярно, хотя и имеют одинаковые размеры, не могут быть частью правильной кристаллической структуры.

Для фибриллярных структур характерно растяжение дифракционных пятен в дугообразные *слоевые линии* и преимущественное их расположение вблизи меридиана или экватора рентгенограммы. Меридианом называется воображаемая линия, проходящая через центр рентгенограммы параллельно направлению ориентации образца. Экватором является линия, перпендикулярная меридиану и проходящая через центр рентгенограммы. Слоевые линии, проходят через рефлексы параллельно экватору, который можно считать нулевой слоевой линией. Разрешение рентгенографии волокон обычно не превышает 0,3 нм. Рефлексы перекрываются, поэтому количество данных, получаемых по рентгенограммам волокон, довольно ограничено: для определения соответствующей элементарной ячейки может быть использовано от 10 до 100 рефлексов. Все это, а также нарушение кристаллического порядка не позволяют рассчитать распределение электронной плотности на основании одних лишь экспериментальных данных. Тем не менее дифракционная картина содержит достаточно информации для того, чтобы получить грубое представление о структурных особенностях молекулы [9, с. 57].

Типичная рентгенограмма волокна показана на рис. 71 на примере В-формы ДНК. Отметим, что на рентгенограммах текстуры биополимеров, имеющих спиральные молекулы, наблюдается преимущественное расположение дифракционных пятен вдоль двух прямых, образующих крест (андреевский) крест.

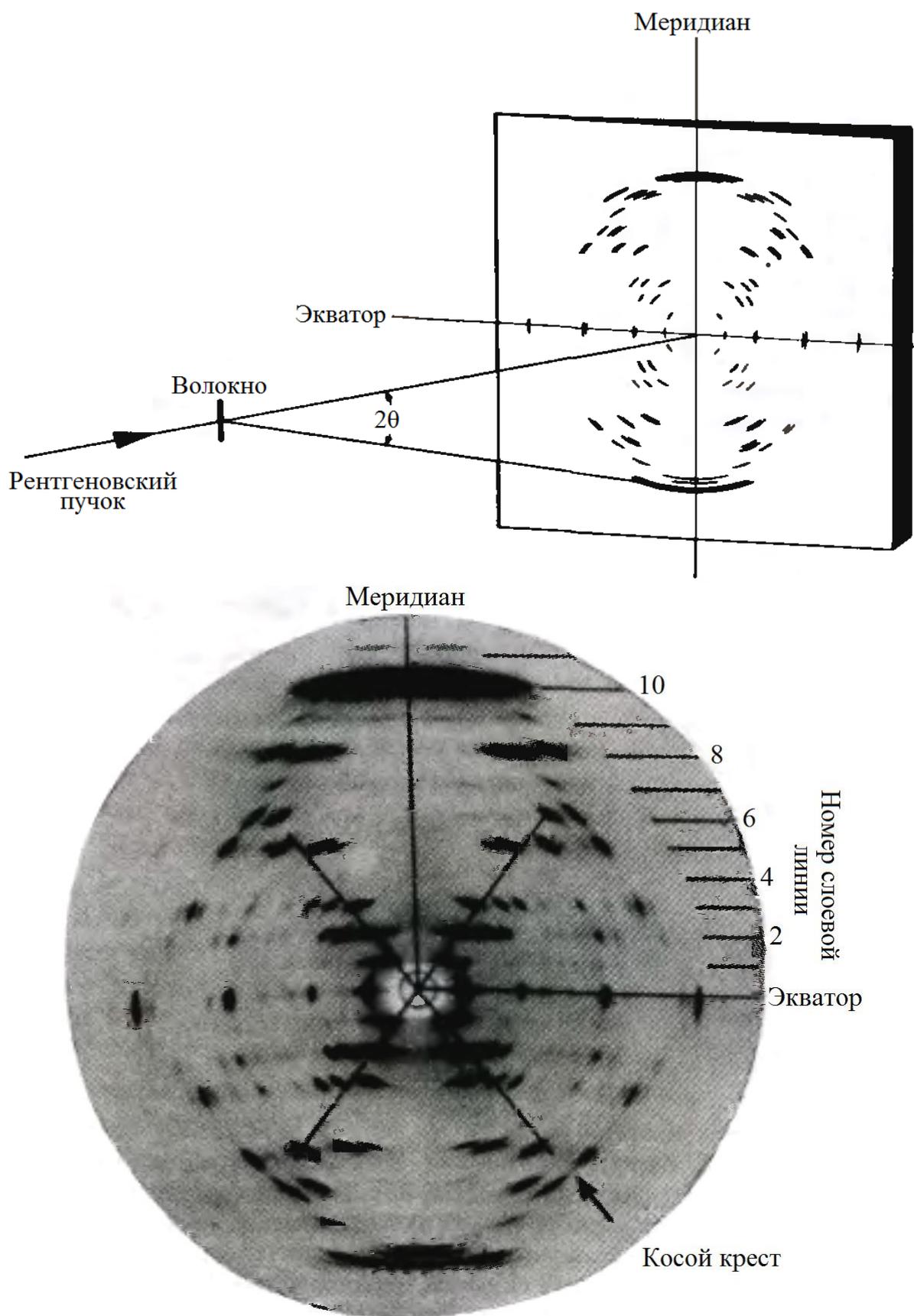


Рис. 71. Схема рентгеноструктурного анализа на волокнах и рентгенограмма ДНК из тимуса теленка в В-форме [9, с. 59]

На рентгенограммах волокон биополимеров могут наблюдаться дифракционные эффекты, отражающие нерегулярность чередования разнородных боковых групп и обусловленные ею дефекты в упаковке макромолекул. В первую очередь, дефекты в структуре кристаллитов приводят к усилению спада интенсивности отраженных лучей с ростом угла отражения. С уменьшением размеров кристаллитов увеличивается размытие дифракционных максимумов, они становятся более «диффузными». К особым дифракционным эффектам приводит неупорядоченный сдвиг цепей по длине. В этом случае на всех слоевых линиях, кроме экваториальной, исчезают дискретные максимумы и наблюдается лишь непрерывное размытие дифрагированного излучения с образованием штрихов вдоль слоевых линий. Несогласованный изгиб цепей приводит к увеличению размытия интенсивности с ростом угла отражения как вдоль слоевых линий, так и в поперечном направлении. Дополнительная аморфная набивка ячеек вызывает увеличение фона на рентгенограммах. Кроме того, обычно волокна биополимеров содержат и такие области, где сегменты цепей не являются параллельными один другому и упаковка их неупорядочена. Наличие таких областей приводит к появлению диффузных колец.

4.2.2. Особенности получения рентгенограмм волокон

При проведении рентгенографических исследований волокон биополимеров очень часто основной трудностью оказывается получение высокоориентированных препаратов. Вытяжка нитей из концентрированных растворов препарата или растяжение пленок не всегда приводят к нужным результатам. Необходимо, чтобы в самом растворе при его концентрировании возникла определенная упорядоченность. Довольно часто кристалличность препаратов биополимеров сохраняется лишь при высокой степени влажности, т. к. они большей частью являются кристаллогидратами. Поэтому весь рентгеновский эксперимент приходится проводить в герметических камерах, поддерживая постоянную влажность. Рассеяние рентгеновского луча в воздухе приводит к появлению дополнительной вуали на снимке в той области, где часто сосредоточены наиболее важные отражения от волокон, поэтому камеры наполняют легким газом, слабо рассеивающим рентгеновские лучи (водородом или гелием).

При исследовании малоупорядоченных объектов возникают дополнительные сложности, связанные с фоном на рентгенограммах, обусловленным аморфными областями препарата. Фон может оказаться настолько сильным, что будет перебивать слабое рассеяние кристаллической фазой. Интенсивность фона будет тем больше, чем более гетерогенным (по длинам волн) является используемое излучение. Особенно это относится к коротковолновым компонентам спектра. В таких случаях рекомендуется использовать излучение, полученное отражением первичного луча от монокристалла. Хорошими монохроматорами служат кристаллы пентаэритрита. Разработаны камеры для съемки волокон, в которых применяется особая система фокусировки первичного луча за счет его полного внутреннего отражения от тороидальной металлической поверхности. При этом достигается большой выигрыш в интенсивности, что дает возможность фиксировать очень слабое рассеяние рентгеновских лучей.

4.2.3. Обработка результатов рентгенографии волокон

Ввиду малого количества рефлексов на рентгенограммах волокон и возможности наложения отражений от разных групп атомов, анализ структуры волокнистых соединений заключается не в прямом определении расположения атомов в молекуле, а в построении такой модели конфигурации молекулярных цепей и в подборе такой их упаковки, которые согласуются с рентгенографическими данными.

В качестве примера остановимся на работе по моделированию структуры нуклеиновых кислот (рис. 72). Чтобы построить модель, по которой определяются координаты атомов, достаточно знать параметры спирали, параметры элементарной ячейки, которые получают из рентгенограммы, и стереохимию мономерных единиц и их ассоциатов, образующихся с помощью водородных связей и стэкинг-взаимодействий (сведения об ориентации водородных связей дают поляризованные спектры поглощения в инфракрасной области). Координаты атомов используются для расчета интенсивности дифракции для каждой слоевой линии. Для проверки правильности построенной модели ее сопоставляют с рентгеновской дифракционной картиной. Если соответствия нет, модель модифицируют путем изменения торсионных углов остова, конформации пентозного кольца, а также путем минимизации потенциальной энергии.

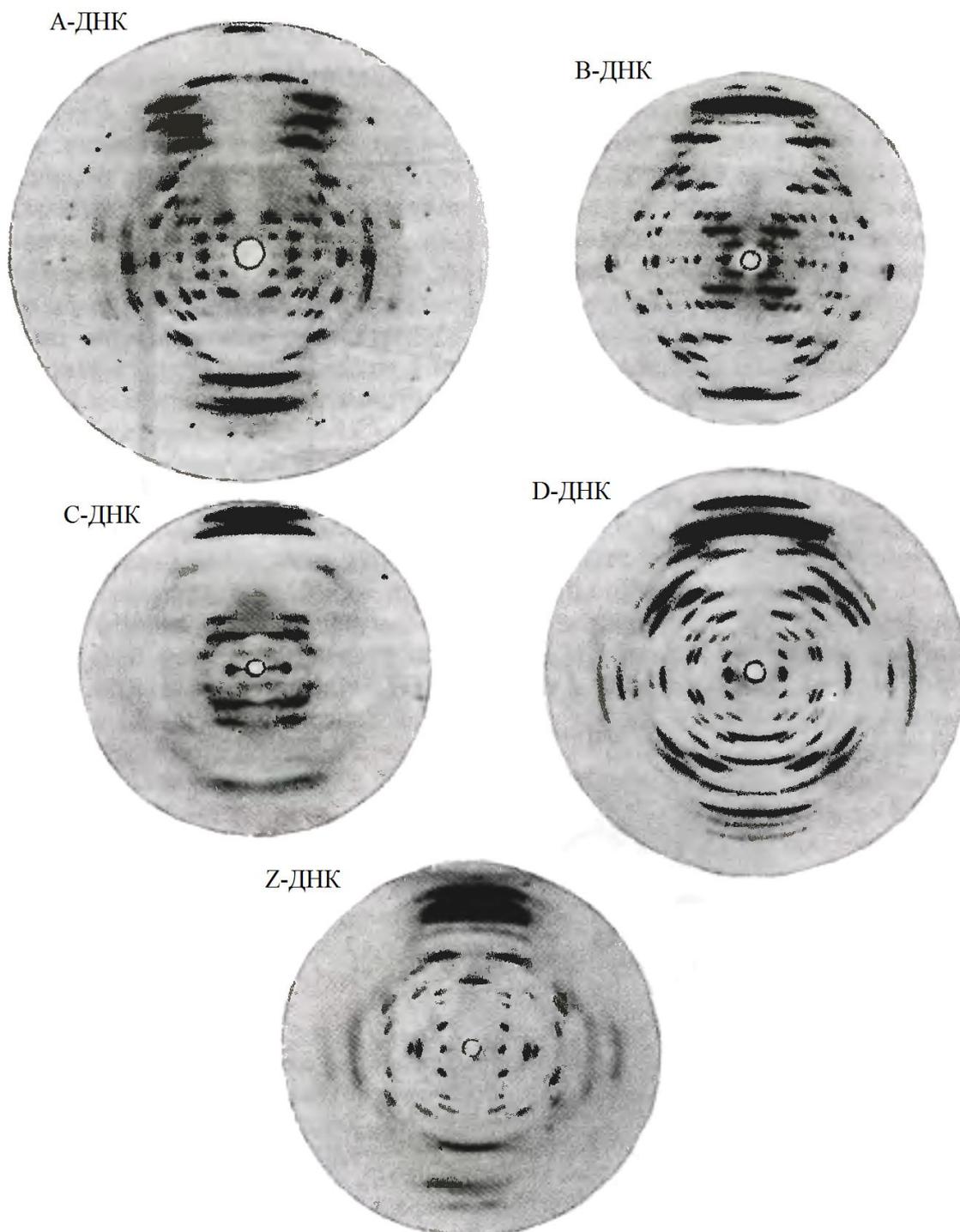


Рис. 72. Сравнение рентгенограмм разных форм ДНК [9, с. 60]

Для спиралей с целым числом нуклеотидов на виток, каковыми являются все природные и синтетические ДНК и РНК, кроме ДНК в С-форме, расстояние между слоевыми линиями рентгенограмм соответствует шагу спирали. Расположение первого меридионального рефлекса в области 0,26–0,38 нм предполагает, что именно таким долж-

но быть расстояние между нуклеотидами по вертикали, а номер слоевой линии, на которой находится рефлекс, дает число нуклеотидов и на виток. Так, для нативной В-формы ДНК сильный меридиональный рефлекс наблюдается на десятой слоевой линии, соответствующей расстоянию 0,34 нм. Это означает, что на один виток спирали приходится 10 нуклеотидов, расположенных на расстоянии 0,34 нм друг от друга. У А-формы сильный меридиональный рефлекс расположен на 11-й слоевой линии, у С-формы – на 9-й, а у D-формы – на 8-й. В случае Z-ДНК меридиональный рефлекс появляется в середине «косоугольного креста» на шестой слоевой линии, поскольку повторяющейся единицей здесь является динуклеотид (pCpG), а не моонуклеотид, как у всех других форм ДНК. Предположение о гексагональном характере упаковки, которая довольно часто реализуется для спиральных молекул, привело к выводу о том, что каждая молекула ДНК должна состоять из двух цепей.

Если волокно обладает высокой степенью кристалличности и его рентгенограммы содержат соответственно сравнительно много дифракционных максимумов, можно, используя изоморфные производные, попытаться построить усредненную, в соответствии с цилиндрической симметрией объекта, функцию распределения электронной плотности. В частности были получены препараты литиевой соли ДНК с очень высокой степенью кристалличности, которые дали рентгенограммы, содержащие более сотни отражений. Анализ этих рентгенограмм подтвердил правоту Уотсона и Крика, создавших знаменитую пространственную модель структуры ДНК в виде двойной спирали.

При исследовании структуры волокон также широко применяется прием, который состоит в получении дифракционной картины от системы светящихся центров при использовании обычных световых лучей. Расположение светящихся центров в таких опытах соответствует расположению атомов в предполагаемой модели. Достигается это использованием так называемых масок – специальных непрозрачных экранов, на которые наносятся отверстия разного диаметра в соответствии с расположением различных атомов в структуре и их рассеивающей способностью. На экран направляется параллельный пучок лучей света. Такой экран с отверстиями эквивалентен плоской проекции структуры. Дифракцию получают для разных проекций и

далее картины суммируют. Если модель правильная, то оптическая дифракционная картина будет тождественна рентгенограмме. При таких проверках для белков с нерегулярно чередующимися боковыми группами используют модели, в которых каждая боковая группа представлена некоторым усредненным распределением рассеивающих центров для разных аминокислот [42, с. 60].

Контрольные вопросы

1. Сформулируйте общие принципы метода рентгеноструктурного анализа и перечислите этапы проведения эксперимента.
2. Раскройте физический смысл явления дифракции рентгеновских лучей на кристаллах. В чем состоит условие Брэгга – Вульфа?
3. Как определяются фактор рассеяния и функция распределения электронной плотности?
4. В чем выражаются особенности кристаллов глобулярных белков и тРНК?
5. Какие методы используют при выращивании белковых кристаллов?
6. Чем обусловлено сохранение конформации белков при кристаллизации?
7. Перечислите и охарактеризуйте основные узлы рентгеновского дифрактометра.
8. Что представляет собой фазовая проблема? Какой метод применяется для ее решения?
9. Каким образом по данным рентгеноструктурного анализа кристаллов биополимеров строится модель пространственной структуры?
10. Охарактеризуйте разрешающую способность метода рентгеноструктурного анализа кристаллов и области его применения.
11. Назовите способы укладки макромолекул при формировании волокон.
12. Каковы особенности имеют рентгенограммы фибриллярных структур? Какие дифракционные эффекты могут наблюдаться на них?
13. Каковы особенности получения рентгенограмм волокон?
14. Каким образом по данным рентгеноструктурного анализа волокон строится модель пространственной структуры?

5. ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Интенсивное применение в физико-химических исследованиях наиболее длинноволновой части электромагнитного спектра – микроволн и радиоволн – началось сразу после открытия явлений электронного и ядерного магнитного резонанса. Эти явления отражают взаимодействие молекулы с электромагнитным полем. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) характеризует взаимодействие с магнитным полем магнитного момента электрона. Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) отражает избирательное взаимодействие с полем магнитного момента ядра. Оба явления основаны на эффекте Зеемана, заключающемся в расщеплении спектральных линий или уровней энергии в магнитном поле на отдельные компоненты.

Явление ЯМР – резонансного поглощения энергии радиочастотного излучения ядрами атомов вещества, помещенного в постоянное магнитное поле – было открыто в 1938 г. американским физиком Исидором Раби. В 1946 г. Феликс Блох и Эдуард Миллс Пёрселл получили ЯМР в жидкостях и твердых телах. На сегодняшний день спектроскопия ЯМР является наиболее мощным и информативным методом физико-химического исследования органических соединений, в частности биополимеров, позволяющим получить информацию о структуре биополимеров, взаимодействиях между молекулами и молекулярном движении. Важное преимущество ЯМР перед рентгеноструктурным анализом состоит в возможности определять число и положение атомов водорода, локализация которых с помощью рентгеноструктурного анализа представляет собой сложную и трудоемкую процедуру, а также в возможности отдельного исследования различных атомов, например, водорода, азота, углерода и фосфора.

5.1. ТЕОРИЯ МЕТОДА

5.1.1. Квантомеханическое рассмотрение ЯМР

Известно, что атомы состоят из атомных ядер и электронных оболочек. Каждое ядро несет положительный заряд, кратный заряду ядра водорода (протона). Ядра многих изотопов имеют, кроме того, собственный момент количества движения, называемый *спином* и ха-

характеризуемый *спиновым квантовым числом* I . В отличие от спина электрона, который может принимать значения $\pm 1/2$, спин ядра может быть равным нулю, целому или полуцелому числу. Вращение заряженного ядра, спин которого отличается от нуля, создает магнитное поле, направленное по оси вращения. Напряженность этого магнитного поля выражается как магнитный момент μ .

К ядрам, имеющим спин, отличный от нуля, относятся ядра элементов с нечетным порядковым номером или изотопов каких-либо (даже четных) элементов, имеющих нечетное массовое число, например ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P (всего 135 естественных изотопов). Ядра элементов с четным массовым числом и четным атомным номером, такие как ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , не имеют спина ($I = 0$) и не обладают магнитными свойствами [Пап., с. 112].

Магнитный момент и спин ядра взаимосвязаны:

$$\mu = \gamma \frac{h}{2\pi} I, \quad (24)$$

где γ – константа пропорциональности, характеризующая данный тип ядра (гиромагнитное отношение); h – постоянная Планка.

При наложении внешнего однородного постоянного магнитного поля H_0 ядро может занимать относительно него любую из $(2I+1)$ -ориентаций, определяемых магнитным квантовым числом m . Последнее может принимать значения $I, (I-1), \dots, 0, \dots, (-I+1), -I$. Наибольший интерес для исследователей представляют ядра с $I = 1/2$, прежде всего ядро атома водорода ^1H , состоящее из единственного протона. В отсутствие внешнего магнитного поля спины протонов ориентированы беспорядочно (рис. 73, а), но в магнитном поле они могут находиться только в двух разрешенных энергетических состояниях ($2 \cdot 1/2 + 1$), ориентируясь, подобно магниту, имеющему северный и южный полюс, «по полю» (α -состояние с энергией $E_1 = \mu H_0$) либо «против поля» (β -состояние, $E_2 = -\mu H_0$) (рис. 73, б). Разность между этими энергетическими уровнями составляет

$$\Delta E = 2\mu H_0. \quad (25)$$

Как уже обсуждалось, при поглощении электромагнитного излучения (в ультрафиолетовой и инфракрасной областях), энергия которого равняется разности энергий ΔE двух энергетических состояний, могут происходить переходы между электронными и колебательными уровнями. Поглощение излучения, лежащего в области ра-

диочастот (10–500 МГц), приводит при определенной частоте ν (принцип квантования $\Delta E = h\nu$) к переходу между энергетическими уровнями ядер, или, иными словами, к переориентации спина (рис. 73, в) из несколько более выгодного состояния «по полю» в положение «против поля». Исходя из принципа квантования и выражения (25) можно выразить частоту, при которой происходит поглощение:

$$\nu = \frac{2\mu H_0}{h}. \quad (26)$$

Эта частота называется *резонансной*, а само явление – *ядерным магнитным резонансом*. Энергетические уровни ядер в отличие от электронных и колебательных уровней находятся на равном расстоянии друг от друга и в обычных условиях переходы могут происходить только между соседними уровнями. Это означает, что для данного ядра для каждого значения H_0 имеется только одна частота перехода.

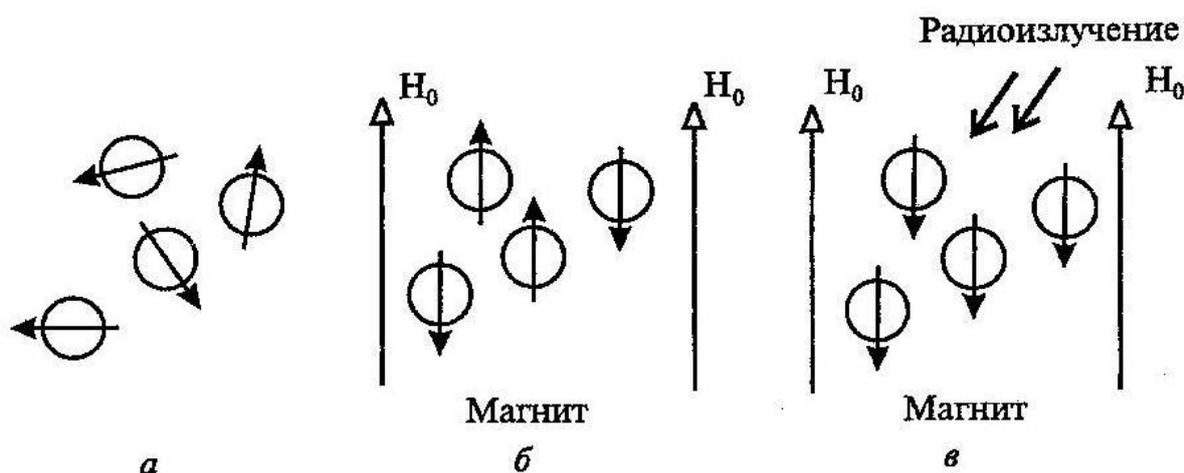


Рис. 73. Спиновые состояния протонов (магнитный момент указан стрелкой): а – в отсутствие магнитного поля; б – во внешнем магнитном поле; в – во внешнем магнитном поле после поглощения радиочастотного излучения (спины под воздействием энергии волнового облучения занимают более высокий энергетический уровень) [10, с. 235]

На описанном явлении основан метод исследования веществ по спектрам ЯМР, под которыми понимают графическое выражение зависимости величины поглощаемой энергии радиочастотного поля от напряженности внешнего магнитного поля H_0 при постоянной частоте поля ν (или от частоты ν при постоянной H_0). Наиболее часто применяется ЯМР ^1H , или протонный магнитный резонанс (ПМР), поскольку протоны входят в состав многих соединений, а природное содержание ^1H среди других изотопов водорода составляет 99,985%.

5.1.2. Химический сдвиг

Из рассмотренной теории следовало бы ожидать, что спектр ЯМР должен состоять из одной резонансной линии. Однако это не так, как видно из приведенного на рис. 74 спектра этанола. На нем

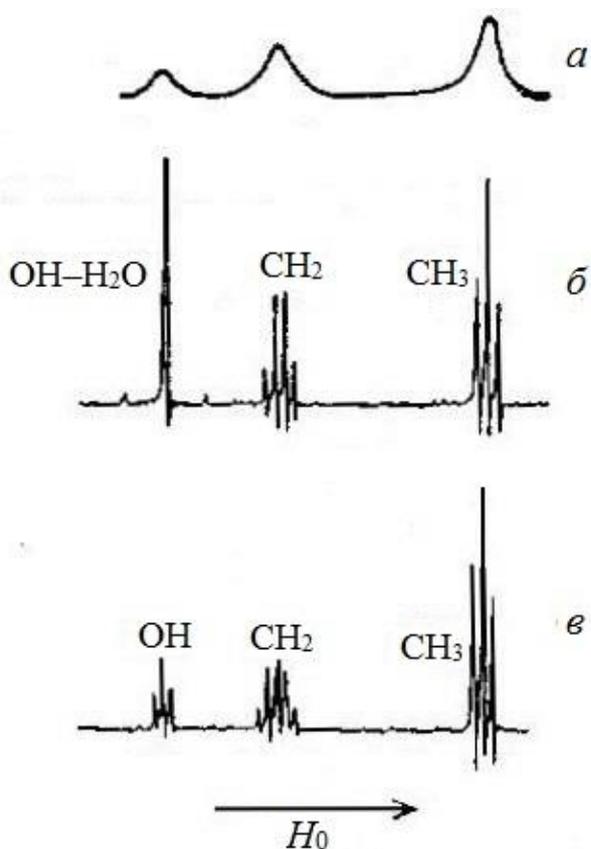


Рис. 74. Спектры ЯМР ^1H этанола: низкого разрешения (а), высокого разрешения (б), высокого разрешения для особо чистого вещества (в) [49, с. 202]

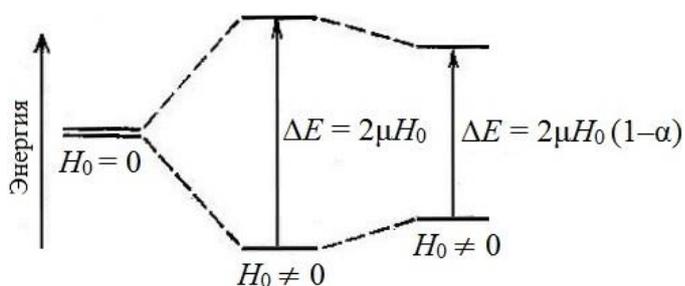


Рис. 75. Влияние электронного экранирования на условия ЯМР [49, с. 202]

наблюдаются три линии с отношением площадей под максимумами 1:2:3, что соответствует протонам групп $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$ и $-\text{CH}_3$.

Причина этого заключается в том, что ядра окружены (экранированы) электронами, и приложенное магнитное поле H_0 индуцирует также циркуляцию этих электронов. Движущиеся электроны в свою очередь создают дополнительное магнитное поле противоположного знака с напряженностью $H = -\alpha H_0$, где α – константа экранирования, значения которой изменяются от 10^{-6} (для тяжелых ядер) до 10^{-2} (для протонов). В зависимости от положения конкретного ядра в молекуле оно может в большей или меньшей степени экранироваться электронами внешних оболочек других атомов. Чем сильнее оттянуты электроны от ядра, тем в более слабых полях (т. е. тем левее в спектре) будет наблюдаться его резонанс-

ная частота в виде пика поглощения, и наоборот, чем больше экранирование, тем правее в спектре (т. е. в более сильных полях) находится пик поглощения.

Благодаря электронному экранированию на ядро каждого типа действует эффективное поле, несколько отличающееся от внешнего магнитного поля H_0 :

$$H_{\text{эфф}} = H_0 - \alpha H_0 = (1 - \alpha)H_0. \quad (27)$$

Экранирование ядер приводит к сближению уровней энергии (рис. 75), поэтому для наблюдения резонанса при неизменной частоте напряженность приложенного поля должна быть больше, чем в случае неэкранированного ядра.

На величину $H_{\text{эфф}}$ также оказывают влияние межмолекулярные эффекты. Например, если ядро находится в молекуле биополимера, то проявляется взаимное влияние различных участков или остатков, которые отдалены в цепи полимера, но находятся по соседству в трехмерном пространстве. Иначе говоря, при свертывании молекулы и формировании третичной структуры биополимера могут оказаться сближенными удаленные химические группы, в результате чего создается новое окружение ядер.

Таким образом, наблюдаемая резонансная частота каждого ядра одинакового типа зависит от химической группы, которой оно принадлежит, и данный фактор лежит в основе всех структурных исследований методом спектроскопии ЯМР. Смещение резонансной частоты в зависимости от химического окружения, обусловленное различием в константах экранирования, называется *химическим сдвигом*.

Для изучения спектров ЯМР удобно иметь соединение, относительно которого проводится отсчет химических сдвигов. В качестве международного стандарта выбран тетраметилсилан $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (ТМС), который отличается химической инертностью и способностью давать единственный узкий сигнал. Для водных растворов биополимеров в качестве стандартного вещества часто применяется ДСС (2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоная кислота) [8, с. 169].

Величину химического сдвига можно выражать в единицах частоты (герцах), но тогда она будет возрастать с увеличением магнитного поля. Чтобы этот параметр не зависел от типа прибора, вводится величина δ , измеряемая в миллионных долях (м. д.) приложенного поля или частоты от сигнала эталонного вещества по формулам

$$\delta = \frac{H_{\text{обр}} - H_{\text{эт}}}{H_0} \cdot 10^6, \quad \delta = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{эт}}}{\nu_0} \cdot 10^6, \quad (28)$$

где $H_{\text{обр}} - H_{\text{эт}}$, $\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{эт}}$ – разности резонансных значений напряженности поля и частоты для исследуемого и эталонного образцов; ν_0 – частота генератора. У величины δ остается зависимость от эталонного соединения, поэтому, приводя ее значение, указывают, относительно какого соединения оно определялось.

Химический сдвиг δ двенадцати эквивалентных протонов ТМС принят равным нулю, поскольку резонансные сигналы большинства органических и природных соединений расположены в более слабых полях (рис. 76). Реже в спектрометрии ЯМР используется τ -шкала, в которой сигнал ТМС принят равным 10. Пересчет химических сдвигов из одной шкалы в другую производится по формуле

$$\tau = 10 - \delta. \quad (29)$$

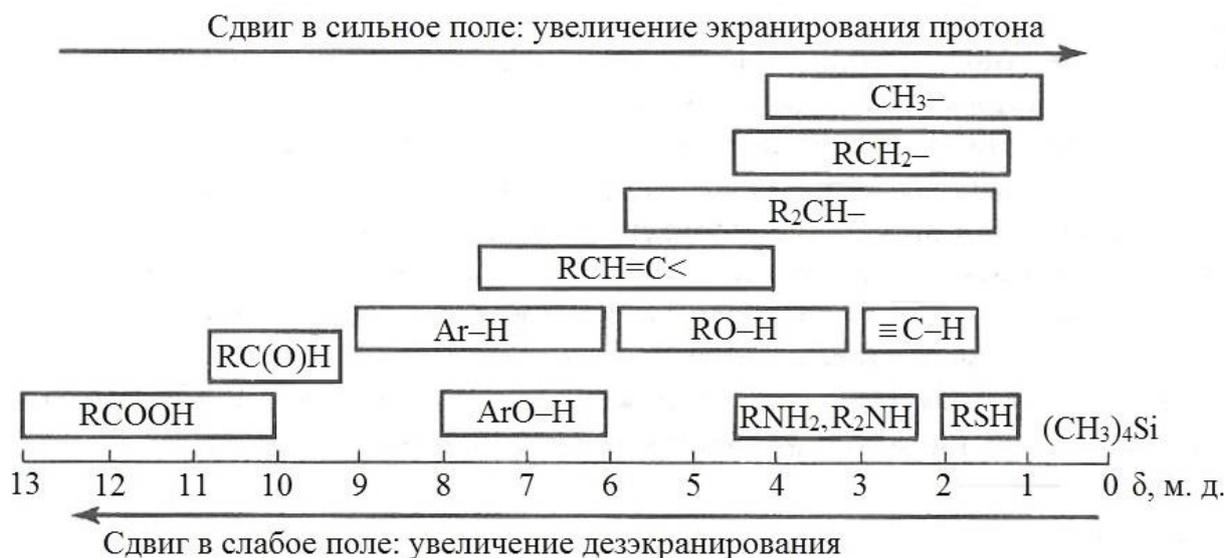


Рис. 76. Усредненные значения химических сдвигов протонов различного типа [40, с. 520]

В большинстве случаев химические сдвиги протонов органических веществ находятся в области $\delta = 0-10$ м. д.; исключение составляют протоны, связанные водородными связями, для которых $\delta > 10$ м. д. Как видно из рис. 75, чем более кислым является протон, тем, как правило, больше его химический сдвиг. Особое положение занимают протоны в бензольных кольцах, дающие сигнал в более слабом поле, чем можно было бы ожидать, исходя из электроотрицательности sp^2 -гибридизированного атома углерода. Такое сильное дезэкра-

нирование объясняется возникновением «кольцевого тока» за счет циркуляции электронов бензольного кольца под действием внешнего магнитного поля. Кольцевой ток индуцирует магнитное поле, которое совпадает с направлением внешнего магнитного поля в области нахождения протонов и дезэкранирует их.

На рис. 77 показан протонный спектр лизина, на котором видно влияние химической группы, к которой принадлежит протон, на положение сигнала. Так, сдвиг сигнала 1, соответствующего протону при атоме углерода, который непосредственно связан с электроноакцепторной карбоксильной группой лежит в области наиболее слабого поля. В то же время в области самого сильного поля лежит сдвиг сигнала 3, соответствующий протонам метиновой ($-\text{CH}$) группы, наиболее удаленной от функциональных групп.

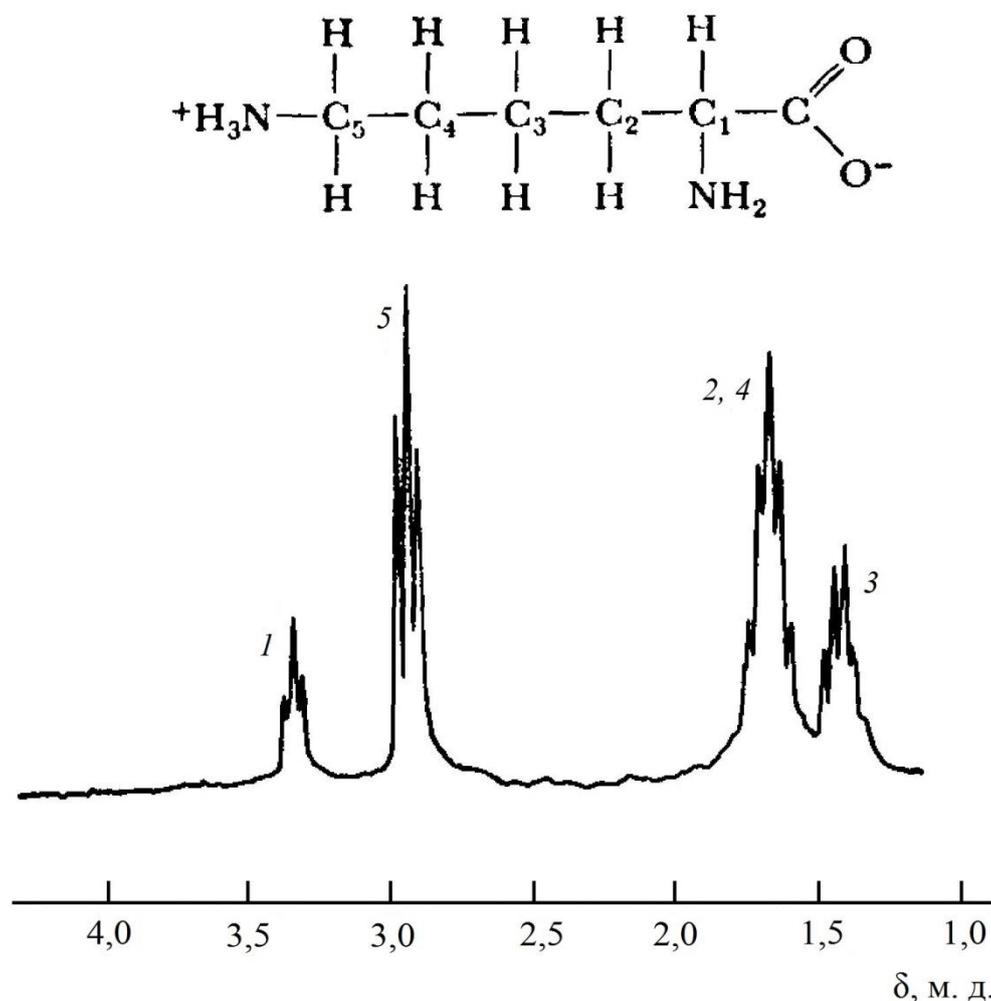


Рис. 77. Спектр ЯМР ^1H лизина, находящегося в форме цвиттер-иона в D_2O [46, с. 486]. Номера пиков указывают атомы углерода, у которых находятся протоны, дающие данную группу линий

5.1.3. Спин-спиновое взаимодействие

Во всех предыдущих рассуждениях допускалось, что один протон в определенном электронном окружении дает единственную резонансную линию, однако при высоком разрешении метода пик обычно состоит из группы линий, как видно из рис. 73, б, в. Такое расщепление или, иными словами, *сверхтонкая (мультиплетная) структура* линий ЯМР, возникает в результате *спин-спинового взаимодействия* структурно неэквивалентных ядер через электронные облака атомных связей.

В спектре ЯМР ^1H этанола $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ сигнал группы -CH_2 состоит из четырех линий с отношением интенсивностей 1:3:3:1, а сигналы группы -CH_3 – из трех линий с отношением интенсивностей 1:2:1 (см. рис. 74, б). Это объясняется тем, что протоны внутри каждой группы взаимодействуют с

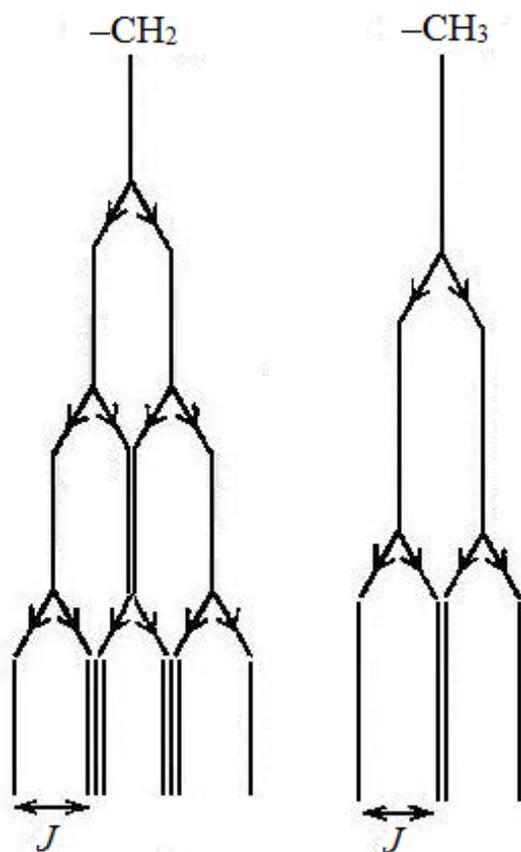


Рис. 78. Спин-спиновое расщепление между группами -CH_2 и -CH_3 в этаноле [49, с. 205]. Константа взаимодействия (J) в обоих случаях одинакова

внешним магнитным полем и, кроме того, на каждый из них действует локальное поле, создаваемое протонами соседней группы. Благодаря двум возможным ориентациям каждого ядерного спина сигнал метильной группы (-CH_3) расщепляется на две линии одним из протонов метиленовой группы (-CH_2). Каждый из этих сигналов снова расщепляется на две линии вторым протоном метиленовой группы, так что всего должно наблюдаться четыре линии. Но регистрируются только три линии (триплет), поскольку две линии из четырех совпадают по своему положению. Аналогично получают четыре линии (квадруплет) для метиленовой группы (рис. 78). Сигнал гидроксильная группа чистого этанола испытывает

триплетное расщепление протонами метиленовой группы с отношением интенсивностей 1:2:1, а каждая из четырех линий метиленовой группы расщепляется в дублет линий равной интенсивности гидроксильным протоном (см. рис. 74, в). Однако при наличии в этаноле даже небольших примесей кислоты или основания имеет место быстрый обмен протонов или гидроксильных ионов между группами –ОН и водой, который подавляет спин-спиновое взаимодействие.

Расстояния между соседними линиями в мультиплетах строго одинаковы и равны константе спин-спинового взаимодействия J протонов соседних групп. Число пиков в мультиплете (M), обусловленном спин-спиновым взаимодействием, для чистых веществ можно рассчитать по следующей формуле¹:

$$M = nI + 1, \quad (30)$$

где I – спиновое квантовое число; n – число соседствующих магнитоэквивалентных ядер. Если взаимодействуют ядра с $I = 1/2$, то

$$M = n + 1. \quad (31)$$

т. е., например, для ядра ^1H (или группы эквивалентных протонов) число пиков в мультиплете всегда на один больше числа атомов водорода у соседнего углеродного атома. Наличие в спектре ЯМР ^1H нерасщепленного (синглетного) сигнала означает, что исследуемая молекула включает группу атомов водорода, рядом с которой нет других водородных атомов [30, с. 120].

Химические сдвиги протонов при наличии спин-спинового расщепления определяются расстоянием от центра мультиплета до сигнала эталона. Величина J не зависит от напряженности приложенного магнитного поля H_0 ; она определяется природой взаимодействующих ядер, числом и характером связей между ними и геометрией молекул. Значения J обычно лежат в области 1–20 Гц. Важно отметить, что спин-спиновое взаимодействие осуществляется только в том случае, если ядра соединены ковалентными связями; оно не является результатом простого сближения, имеющего место при связывании, адсорбции или свертывании макромолекулы.

Мультиплетность сигнала дает информацию о характере химического окружения той или иной группы атомов. С другой стороны, мультиплеты могут осложнять анализ из-за присутствия неразрешен-

¹ Формула справедлива, если разность химических сдвигов взаимодействующих ядер во много раз превышает константу спин-спинового взаимодействия.

ных компонентов, сигнал которых имеет вид широкой линии, или перекрытия компонентов одного мультиплета с другим. Это особенно справедливо в случае макромолекул. К счастью, преобладающие в природе изотопы ^{12}C и ^{16}O обладают нулевым ядерным спином. Если бы не это обстоятельство, то спин-спиновые взаимодействия ограничили бы область применения спектроскопии ЯМР ^1H только исследованием простейших молекул [49, с. 206].

5.1.4. Процессы релаксации. Ядерный эффект Оверхаузера

При резонансной частоте происходит переориентация магнитных моментов ядер. Переходы с более высокого на более низкий энергетический уровень происходят с той же вероятностью, что и с более низкого на более высокий, но из-за очень малой разницы между энергетическими уровнями распределение ядер на них сильно зависит от температуры. При абсолютном нуле все ядра находятся на более низком уровне. В интервале температур, обычно используемых для измерения ($0\text{--}25^\circ\text{C}$), в результате теплового движения многие ядра переходят на более высокий уровень, но и на более низком уровне остается небольшой избыток ядер (~ 1 на 10^5). При наложении радиочастотного излучения, имеющего резонансную частоту, энергия поглощается, и населенности обоих энергетических состояний выравниваются. Когда они станут равными, дальнейшее поглощение энергии прекратится, и сигнал ЯМР регистрироваться не будет.

Чтобы поглощение было непрерывным (как и происходит на самом деле), ядра должны достаточно быстро передавать избыточную энергию для восстановления изначально неравного распределения на энергетических уровнях. Избыточную энергию они могут отдавать и без излучения окружающей среде – «решетке», под которой в данном случае понимаются электроны или ядра другого сорта, чем исследуемые. Происходит релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Этот процесс называют *спин-решеточной (продольной) релаксацией*. Изменение населенностей уровней после выключения внешнего магнитного поля описывается уравнением

$$\Delta n_{(t)} = \Delta n_{(0)} e^{-\frac{t}{T_1}}, \quad (32)$$

где $\Delta n_{(\tau)}$ – избыток ядер в момент времени τ на более высоком энергетическом уровне по сравнению с равновесной населенностью; $\Delta n_{(0)}$ – то же в момент выключения поля; T_1 – время спин-решеточной релаксации. Время T_1 зависит от концентрации магнитных ядер в веществе, подвижности молекул и температуры. Ширина спектральной линии ЯМР тем больше, чем меньше время жизни ядра на данном энергетическом уровне.

Возбужденные ядра могут также передавать энергию ядрам такого же сорта, находящимся в низшем энергетическом состоянии. Этот процесс называют *спин-спиновой (поперечной) релаксацией* и характеризуют величиной T_2 – временем спин-спиновой релаксации. Время T_2 также связано со строением молекул и характером теплового движения. В твердых телах $T_2 \leq 10^{-5}$ с, $T_1 \geq 10^2$ с, и ширина линии в спектре определяется только T_2 ; в вязких жидкостях T_2 имеет тот же порядок, что и T_1 (~1 с), ширина линии составляет доли герца.

Если выделить в исследуемой молекуле разные пары ядер a и b с $I = 1/2$, пространственно сближенные до расстояния не более 0,5 нм и связанные друг с другом диполь-дипольным взаимодействием, то при насыщающем облучении на резонансной частоте ядер b произойдет изменение равновесной населенности энергетических уровней не только ядер b , но и ядер a , в результате чего в ЯМР-спектре помимо подавления сигнала спинов b будет наблюдаться изменение интенсивности сигнала спинов a . Если оба ядра – протоны, то сигнал может быть усилен в 1,5 раза, в то время как при наблюдении резонанса ^{13}C по мере облучения соседнего протона сигнал может возрасти почти в 3 раза. Такое изменение спектральной интенсивности сигнала ядер одного типа в условиях насыщающего селективного облучения на резонансной частоте ядер другого типа называется *ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО, или NOE)*. Данный эффект связан с процессами переноса избыточной энергии от спинов b к спинам a по механизму *диполь-дипольной кросс-релаксации*: если одно из вращающихся ядер насыщено энергией, другому ядру становится труднее отдавать свою избыточную энергию, и это проявляется в усилении сигнала ЯМР.

Величина ЯЭО, наблюдаемая между спинами a и b , определяется значением скорости кросс-релаксации σ_{ab} между ними и длительностью времени облучения τ :

$$NOE_{ab} = \sigma_{ab}\tau. \quad (33)$$

В свою очередь скорость кросс-релаксации обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами a и b ($\sigma_{ab} \sim r_{ab}^{-6}$), поэтому величина NOE_{ab} , измеряемая в ЯМР-эксперименте, позволяет идентифицировать пики ядер, находящихся на близком расстоянии друг от друга и определить эти расстояния. Таким образом, определяя ЯЭО для различных пар ядер исследуемой молекулы, можно получить количественную информацию о геометрии молекулы [14, с. 316].

5.2. АППАРАТУРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ЯМР

Для работы ЯМР-спектрометра необходимы два магнитных поля – одно постоянное, а другое радиочастотное, держатель образца и детектор того или иного вида. Схема типичного прибора показана на рис. 79.

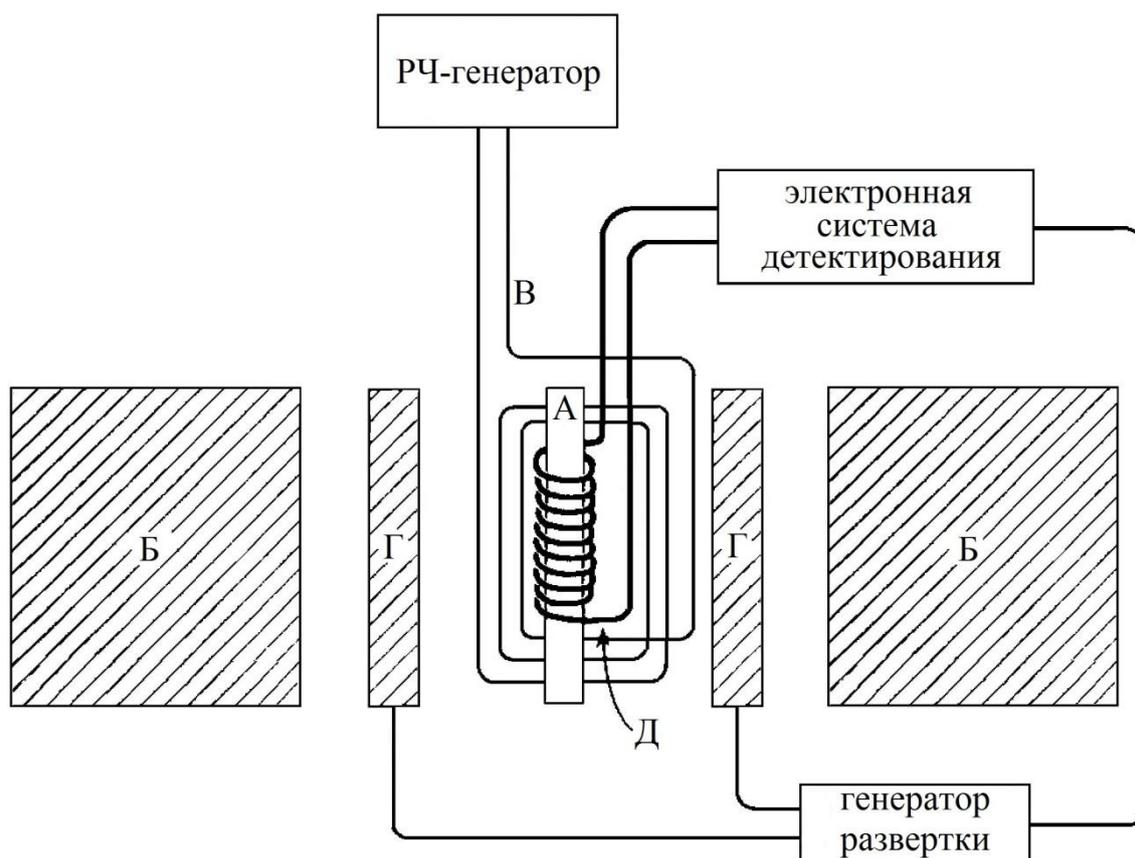


Рис. 79. Принципиальная схема ЯМР-спектрометра [46, с. 493]

Ампула с образцом A помещается в зазор между полюсами B мощного электромагнита, который дает однородное постоянное поле H_0 . Наиболее сильные поля в современных ЯМР-спектрометрах до-

стигаются с помощью магнитов, использующих сверхпроводящие соленоиды; с целью поддержания сверхпроводящих свойств материала используется охлаждение до 5 К с помощью жидкого гелия. Для уменьшения неоднородности поля ампула быстро вращается. Ампула окружена высокочастотной катушкой B , расположенной в плоскости, перпендикулярной полю H_0 электромагнита. Радиочастотный (РЧ) генератор создает в катушке осциллирующее магнитное поле H_1 постоянной частоты. Для достижения резонанса медленно увеличивают магнитное поле небольшого вспомогательного магнита G . (В некоторых приборах вспомогательный магнит отсутствует, и H_1 изменяется путем изменения частоты.) В момент резонанса ядерные магнитные моменты изменяют свою ориентацию, а связанное с этим поглощение энергии вызывает падение напряжения в небольшой катушке D , которая находится под прямым углом как к H_0 , так и H_1 . Это падение напряжения детектируется, усиливается и регистрируется на осциллографе или самопишущем потенциометре.

Разрешающая способность метода увеличивается с ростом силы магнитного поля, а следовательно, и частоты. В наиболее эффективных современных спектрометрах используются поля с H_0 до 14,4 Тл, что в случае протонов соответствует резонансным частотам 600 МГц.

5.3. ПРИМЕНЕНИЕ ЯМР

Метод ЯМР позволяет извлекать большое количество информации о структуре биополимеров, т. к. параметры спектров чувствительны к изменениям как последовательности, так и конформации. Рассмотрим некоторые приложения спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , которая остается наиболее часто используемым вариантом метода, к исследованию биологических молекул.

ЯМР позволяет определить химическую структуру сложных молекул (аминокислот, гетероциклических соединений, углеводов, входящих в состав биополимеров), что обусловлено возможностью идентификации отдельных химических групп и установления их относительного содержания по положениям и интенсивностям резонансных линий в шкале химических сдвигов, характеризующих электронное окружение ядер. При этом, как правило, в водных растворах не удается наблюдать характеристических пиков карбоксильной,

сульфгидрильной, амино-, имино-, амидогруппы из-за быстрого обмена протонов этих групп с протонами воды и заслонение значительной части спектра интенсивным пиком воды. Поэтому обычно биологически важные соединения исследуют в растворах «тяжелой» воды D_2O и наблюдают при этом необмениваемые с растворителем протоны¹. В то же время использование D_2O затрудняет наблюдение протонов, связанных с азотом или кислородом, т. к. эти протоны способны быстро обмениваться с ядрами дейтерия растворителя и не давать сигналов в спектре. К настоящему времени разработаны специальные методики Фурье-спектроскопии ЯМР, позволяющие подавить резонанс H_2O и работать в водном растворе. Кроме того, воду можно использовать как растворитель при работе с другими ядрами, например ^{13}C , т. к. диапазон используемых в этих случаях частот лежит далеко от резонансной частоты воды (см. стр. 174–176).

Большое значение может иметь информация о распределении заряда в молекуле, полученная из сдвигов резонансных пиков функциональными группами и ароматическими кольцами (за счет особых «кольцевых токов»). Особенно это касается пуриновых и пиримидиновых оснований, которые обладают высокой специфичностью в ферментативных реакциях, а различные их производные выполняют функцию метаболитов или антиметаболитов. Получение данных о распределении заряда и конформации этих молекул в различных биологических соединениях весьма существенно для понимания их функционирования.

Спин-спиновое расщепление, появление разных сигналов для химически эквивалентных ядер, избирательное изменение ширины линии и другие характеристики спектров ЯМР могут дать ценную информацию о конформации макромолекул. Начало применения ЯМР для изучения структуры биополимеров относится к 1957 г., когда были сняты первые спектры ЯМР 1H для рибонуклеазы А. Интересным оказался тот факт, что после тепловой денатурации этого фермента (до $72,5^\circ C$) многие сигналы спектра, снятого при высоком разрешении (220 МГц), оказывались более узкими (рис. 80). Это означало, что в результате денатурации все однотипные боковые группы белка попадали в примерно эквивалентное окружение. Кроме того, было пока-

¹ При снятии спектра ЯМР в D_2O часто бывает необходимо знать значение «pD» среды. Обычно в этом случае к показаниям pH-метра прибавляют 0,40 [21, с. 185].

зано, что спектры ЯМР для белков, находящихся в конформации статистического клубка, хорошо соответствуют спектрам, которые можно получить, исходя из стандартных химических сдвигов отдельных аминокислот, однако в упорядоченной конформации спектр белка не является суммой спектров составляющих аминокислот [Мец., с. 187].

Большие химические сдвиги у белков наблюдаются, как правило, если протон находится в *N*- или *C*-концевой аминокислоте, либо по соседству с атомом азота пептидной связи, а маленькие сдвиги имеют место, если протон расположен по соседству с атомом углерода пептидной связи, либо с углеродом или азотом ближайшей соседней аминокислоты. Кроме того, если белок находится в нативной конформации, имеются характерные химические сдвиги некоторых протонов аминокислот, вызванные расположением аминокислот в α -спирали. Однако величина изменений химических сдвигов, ширины полосы и интенсивности, обусловленных третичной структурой и близостью удаленных аминокислот (например, из-за сдвига, связанного с эффектом кольцевых токов или с водородными связями), неодинакова для разных белков и отсутствуют общие принципы, которые могли бы быть сформулированы в виде эмпирических правил.

Для синтетических полипептидов методом ЯМР были исследованы переходы спи-

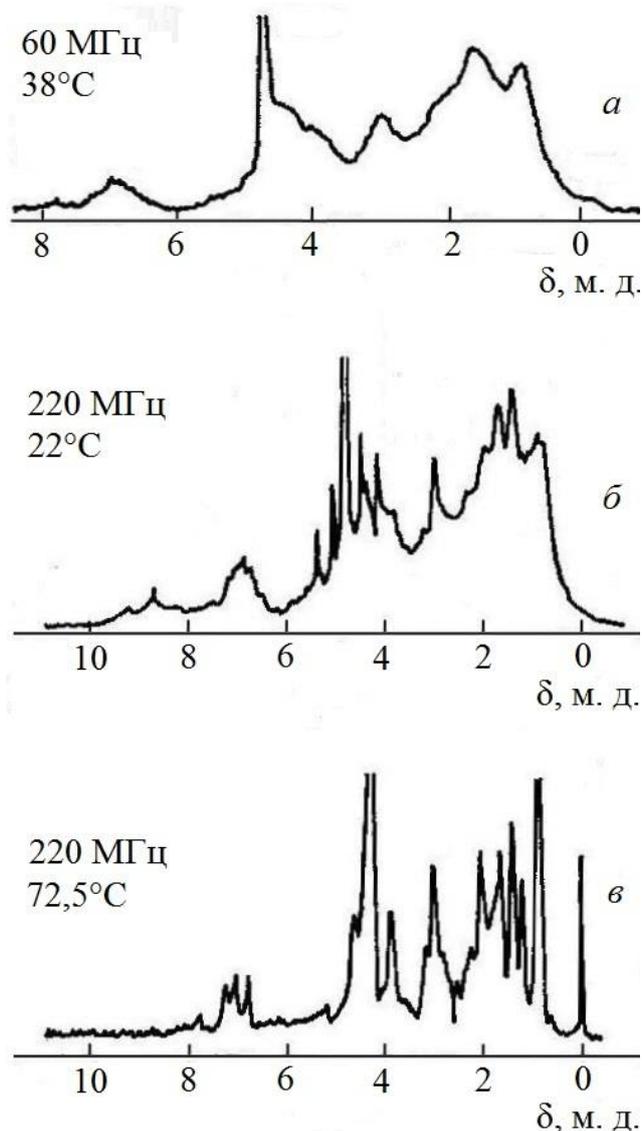


Рис. 80. Спектр ПМР для нативной рибонуклеазы, снятый при 60 МГц (а) и 220 МГц (б) и для денатурированного фермента, снятый при 220 МГц (в) [21, с. 187]

раль – клубок в зависимости от вида растворителя и температуры. Метод позволяет определить процент спирализации и его изменение в зависимости от условий среды.

Исследование методом ЯМР компонентов нуклеиновых кислот (пуринов и пиримидинов, нуклеозидов и нуклеотидов) позволило получить существенные данные об их конформации в растворе. Например, было установлено, что кольца рибозы и дезоксирибозы не являются плоскими, причем конформация кольца рибозы зависит от вида нуклеотида, а конформация нуклеотида – от наличия рибозы или дезоксирибозы. Аналогично белкам и полипептидам характер спектров полинуклеотидов и нуклеиновых кислот и изменения спектров с изменением температуры позволяют установить наличие упорядоченной структуры и ее плавление.

В протонных спектрах ЯМР молекул тРНК удалось идентифицировать резонансные линии, соответствующие протонам, участвующим в образовании водородных связей между парами оснований. Один набор линий состоит из сигналов гуаниновых N-1-протонов в гуанин-цитозиновых парах, а другой – из сигналов урациловых N-3-протонов аденил-урациловых пар. Поскольку интенсивность линии пропорциональна числу присутствующих протонов, площади пиков в двух наборах указывают на число водородных связей в молекуле, а отношение площадей двух наборов линий – на отношение GC- и AU-пар. При ферментативном расщеплении тРНК можно получить непрерывающийся набор фрагментов, каждый из которых, очевидно, поддерживается первоначальными водородными связями, и зная последовательность оснований в отдельных фрагментах, возможно конструирование пространственной модели тРНК, по крайней мере с учетом только водородных связей. Один из наиболее важных выводов, который может быть сделан на основании этих исследований, состоит в том, что модель клеверного листа правильно описывает структуру тРНК в растворе [42, с. 313].

Непосредственное исследование пространственной структуры других нуклеиновых кислот и белков методом ЯМР на протяжении долгого время сдерживалось из-за сложности анализа. Пригодные для обработки спектры получались только для молекул с молекулярной массой меньше 25 000. Для более крупных белков и ДНК спектры имели более 1000 линий, многие из которых перекрывались, и значи-

тельное число линий оставалось неидентифицированным. Множество внутримолекулярных связей, а следовательно, ограниченная сегментарная подвижность цепей, приводила к тому, что для ряда биополимеров в нативном состоянии спектры ЯМР вовсе не наблюдались.

Возможности ЯМР-спектроскопии в конформационном анализе биополимеров существенно расширились после разработки в конце 1970-х гг. новых методов двумерной (2D) ЯМР-спектроскопии – 2D-корреляционной спектроскопии (COSY – *Correlated Spectroscopy*) и 2D-спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

Двумерный спектр ЯМР представляет собой диаграмму, построенную в системе координат резонансных частот вдоль вертикальной и горизонтальной осей (рис. 81). В спектре есть *диагональные сигналы*, представляющие собой обычный ЯМР-спектр, и *кросс-пики*, которые располагаются вне диагонали. Наличие кросс-пика между любыми двумя ядрами свидетельствует о спин-спиновом взаимодействии между этими ядрами (в случае COSY-спектра) или о ядерном эффекте Оверхаузера (в случае NOESY-спектра). В двумерных спектрах ЯМР сигналы макромолекул идентифицируют, используя методологию последовательного отнесения сигналов, разработанную для определенных типов макромолекул. С использованием кросс-пиков COSY-спектра ядра, связанные скалярным спин-спиновым взаимодействием, объединяют в соответствующие спиновые системы. Далее из NOESY-спектров путем анализа кросс-релаксационных взаимодействий ядер соседних остатков биополимера, получают информацию об относительном расположении данной спиновой системы в последовательности биополимера. Эта информация с учетом известной последовательности мономерных звеньев обеспечивает практически полное отнесение сигналов макромолекулы [14, с. 316].

Для воспроизведения трехмерной структуры биополимера в компьютерную программу закладывают значения межатомных расстояний, а также такие известные геометрические параметры, как хиральность, ван-дер-ваальсовы радиусы, длины и углы связей. На основании этих данных компьютер создает серию структур, отражающих возможный диапазон конформационных состояний молекулы с учетом ограничений межатомных расстояний, полученных из NOESY-спектров.

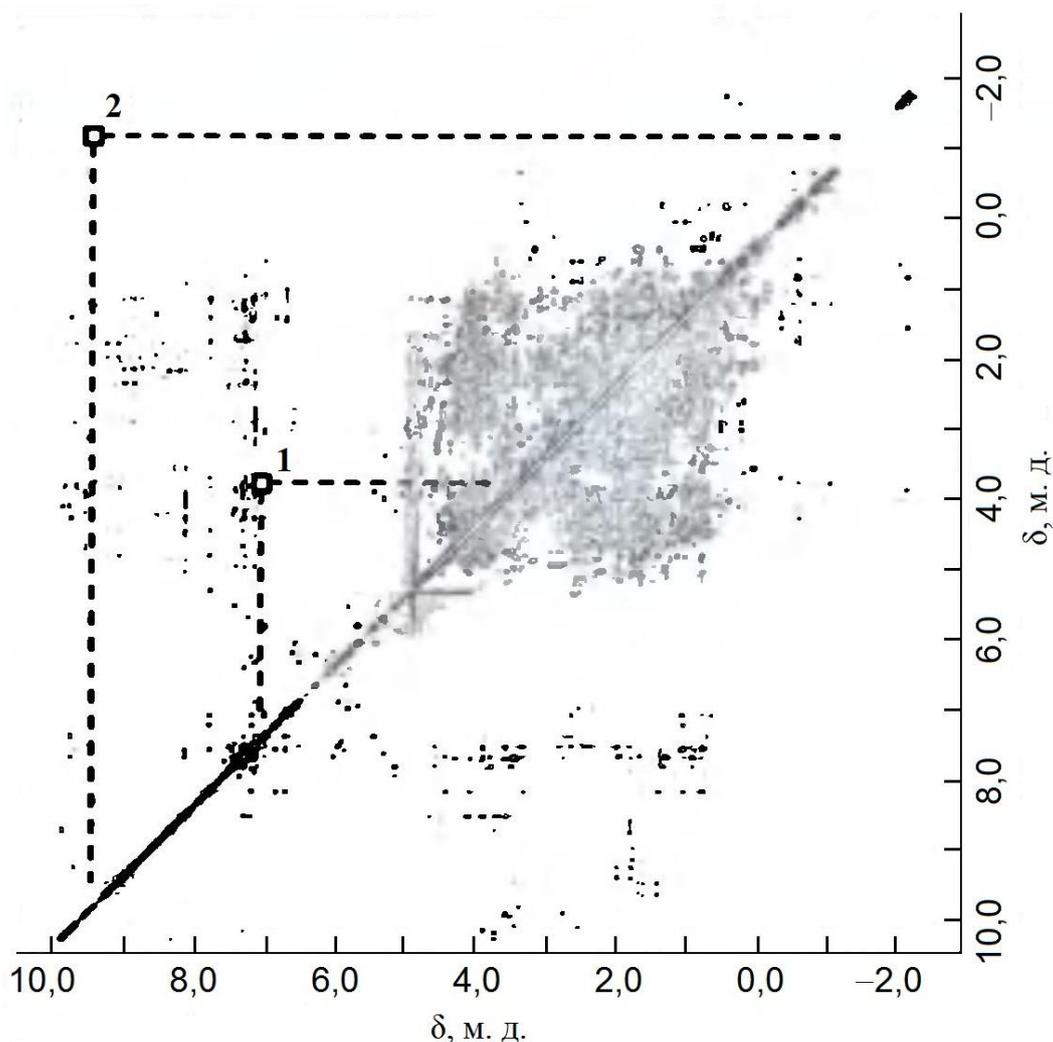


Рис. 81. Метод двумерной спектроскопии ЯМР для получения трехмерной структуры глина морского червя. Диагональ двумерного спектра ЯМР эквивалентна одномерному спектру. Пики, лежащие вне диагонали, соответствуют сигналам ЯЭО, возникшим в результате взаимодействия расположенных близко друг от друга атомов ^1H , сигналы которых в одномерном спектре могут быть достаточно удалены друг от друга. На данном спектре идентифицированы два таких взаимодействия (обозначены цифрами) [24, с. 198]

Помимо ЯМР на ядрах ^1H находят применение методы исследования на ядрах ^{13}C , ^{19}F и ^{31}P , спин которых также равен $\frac{1}{2}$. Они представляют интерес, т. к. ввиду большой поляризуемости электронных облаков химические сдвиги этих ядер составляют 400, 400 и 600 м. д. соответственно. Эти сдвиги примерно в 50 раз больше сдвигов протонов, что намного увеличивает разрешающую способность ЯМР и дает возможность увидеть более тонкие различия в окружении.

С помощью изотопа ^{13}C получают информацию об окружении атомов углерода, дополняя сведения по протонам. Из-за низкого есте-

ственного содержания изотопа ^{13}C (1,1%) он редко соседствует с другим аналогичным нуклидом, а следовательно, спин-спиновые взаимодействия $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ не вносят никаких осложнений в расщепления линий в спектре и каждый атом углерода дает одиночный пик. При использовании ядер ^{13}C исчезает необходимость в D_2O , которая иногда может оказывать влияние на структуру. Широкое применение метод ЯМР ^{13}C получил с появлением импульсных спектрометров, основанных на использовании Фурье-преобразования. В таких приборах образец облучают сильным радиочастотным импульсом длительностью в несколько микросекунд. Каждый следующий импульс поступает через 1–2 с, так что за 1–2 с снимается эквивалент обычного спектра ЯМР. Данные поступают на компьютер, где накапливаются спектры, многократно зарегистрированные в течение нескольких минут, часов или даже дней. Это позволяет получать спектры ЯМР ^{13}C с большой точностью. В качестве примера на рис. 82 показана часть ^{13}C -ЯМР-спектра цитохрома *c*, в котором обращают на себя внимание изменения при восстановлении железа из ферри- в ферро-состояние [21, с. 188–190; 53, с. 292].

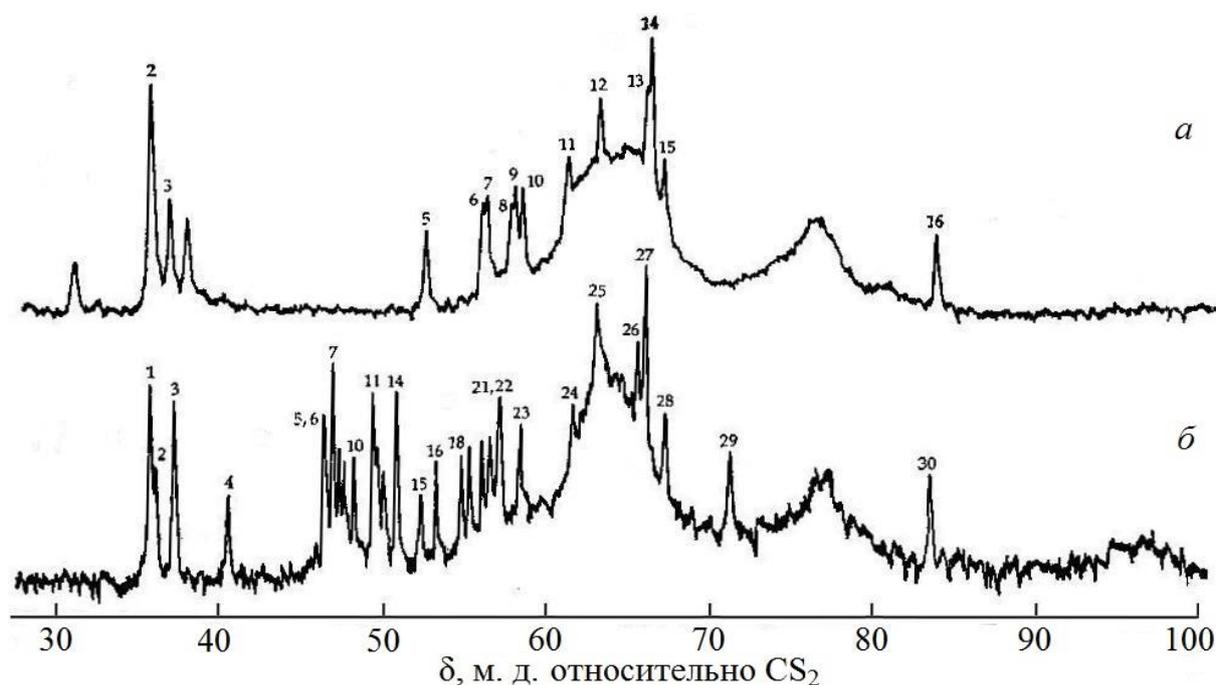


Рис. 82. Часть ^{13}C -ЯМР-спектра цитохрома *c* из сердца лошади, где расположены) полосы резонансного поглощения ароматических углеродов и атомов аргинина. Спектр снят при pH 6,7; 41 °С, 15,18 МГц. *a*) Феррицитохром *c*, 14,4 мМ (результат усреднения 46 000 спектров, снятых в течение 14 ч); *б*) Ферроцитохром *c*, 11,5 мМ (результат усреднения 16 384 спектров) [21, с. 190]

Изотоп ^{19}F обычно отсутствует в биологических объектах, но его можно ввести в определенные места молекулы в качестве внешней метки. Если число таких мест невелико, спектр будет состоять из небольшого количества линий. Изотоп ^{19}F можно ввести в участок связывания белка для изучения резонанса в зависимости от действия различных агентов (рН, температуры, лигандов и т. д.) или использовать фторированные лиганды и наблюдать сигнал от связанного и несвязанного лиганда. Таким образом можно определить различные параметры связывания и получить данные о структуре места связывания.

ЯМР ^{31}P находит применение при исследовании нуклеотидов, мембран и фосфолипидов, позволяет следить за ходом химических реакций с участием фосфорилированных субстратов, протекающих внутри клеток.

Контрольные вопросы

1. Что представляют собой ядерный спин и магнитный момент атомного ядра? Какие значения может принимать спиновое квантовое число атомных ядер?
2. Как ориентируются ядра во внешнем магнитном поле? Когда наблюдается ядерный магнитный резонанс? Какая частота называется резонансной?
3. Что называется химическим сдвигом и какими причинами он вызывается? В каких единицах измеряется химический сдвиг?
4. Приведите примеры влияния структуры соединений на величину химического сдвига.
5. Чем обусловлено спин-спиновое взаимодействие? Как рассчитывается число пиков в мультиплетах?
6. В чем заключается сущность процессов спин-решеточной и спин-спиновой релаксации?
7. Что называется ядерным эффектом Оверхаузера? Как определяется величина этого эффекта?
8. Опишите принципиальную схему устройства спектрометра ЯМР.
9. Какую информацию о строении белков можно получить из спектров ЯМР ^1H ?

10. Приведите примеры использования метода ЯМР ^1H для изучения структуры нуклеиновых кислот.

11. Назовите наиболее распространенные методы двумерной спектроскопии ЯМР. Как строятся двумерные спектры ЯМР и в чем их преимущество перед одномерными спектрами?

12. Приведите примеры использования методов ЯМР на ядрах ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . В чем заключаются преимущества и недостатки этих методов по сравнению с протонным магнитным резонансом?

6. ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Явление электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было открыто в 1944 г. советским физиком Евгением Завойским в Казанском университете. Метод спектроскопии ЭПР основан на присутствии в атомах неспаренных электронов, орбитали которых в сильном магнитном поле могут выполнять движения с определенной частотой. Если к веществу подводить микроволновое излучение этой же частоты, происходит резонансное поглощение излучения.

До начала 1950-х гг. метод ЭПР использовался для решения некоторых чисто физических задач, а впоследствии стал мощным средством изучения механизмов разнообразных химических и биохимических процессов и получения информации о структуре биополимеров с помощью специальных спиновых меток.

6.1. ТЕОРИЯ МЕТОДА

Теория электронного парамагнитного резонанса в основных чертах сходна с теорией ЯМР. Электрон, как и магнитные ядра, обладает спином, ориентация которого во внешнем магнитном поле характеризуется спиновым квантовым числом $M_S = \pm 1/2$. Условия резонанса (рис. 83) выражаются в виде

$$\Delta E = h\nu = g\beta H, \quad (34)$$

где g – безразмерная постоянная, называемая g -фактором (фактором Ланде) и равная для свободного электрона 2,0023 (для свободных радикалов, ионов переходных металлов и других носителей неспаренных электронов g -фактор на несколько процентов отклоняется от этого значения); β – универсальная постоянная, называемая *магнетон*

Бора и равная $eh/2\pi mc = 9,274 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл, где e и m – заряд и масса электрона, c – скорость света.

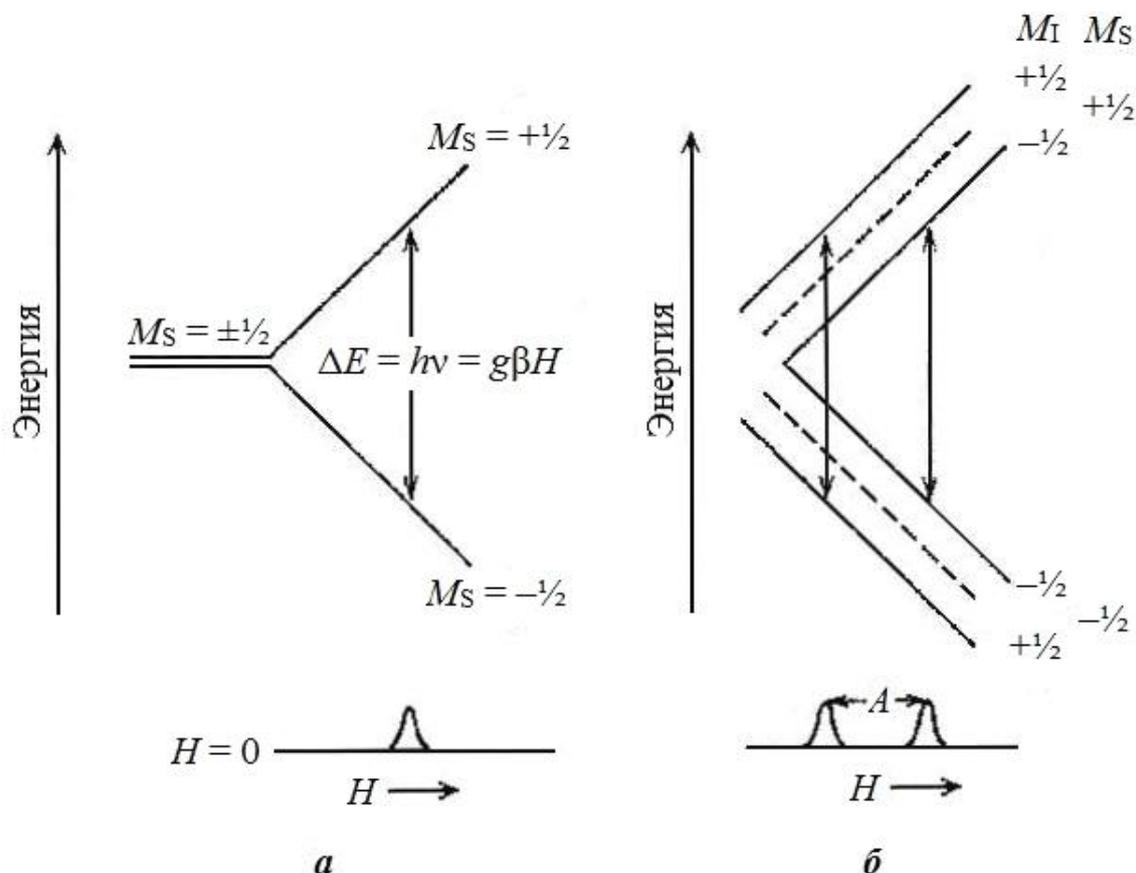


Рис. 83. Условия резонанса:
 а – для электрона, б – для электрона в атоме водорода [49, с. 209]

В подавляющем большинстве органических соединений спины электронов скомпенсированы и ЭПР отсутствует. Спектры ЭПР можно наблюдать для свободных радикалов и молекул, содержащих в своем основном состоянии один или несколько неспаренных электронов, например O_2 , NO , NO_2 , CO_2 . Неспаренные d -электроны имеются также в ионах многих переходных металлов¹, например Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} . Данный факт играет важную роль в биохимических исследованиях, т. к. эти парамагнитные ионы являются кофакторами многих ферментов, и метод ЭПР может дать важную информацию об их электронном строении [8, с. 171–172].

¹ Неспаренные электроны имеются у всех ионов переходных металлов, однако не во всех случаях удается получить спектр ЭПР. Согласно теореме Крамерса, для исследования методом ЭПР больше всего подходят ионы с *нечетным* числом неспаренных электронов [Чанг, с. 208].

Обычно, кроме неспаренных электронов, исследуемые системы содержат ядра, обладающие собственными магнитными моментами. За счет взаимодействия электронных и ядерных магнитных моментов электронные уровни подвергаются дополнительному расщеплению и возникает *сверхтонкая структура* спектров ЭПР. При взаимодействии неспаренного электрона с одним протоном в спектре будут наблюдаться две линии равной интенсивности (рис. 82, б). Если неспаренный электрон взаимодействует с двумя структурно эквивалентными протонами, то возникает триплет с соотношением интенсивностей 1:2:1. В общем случае число линий сверхтонкой структуры можно получить из выражения $(2nI + 1)$, где n – число однотипных или эквивалентных протонов, а I – ядерный спин. Расстояние между линиями сверхтонкой структуры дает *константу сверхтонкого взаимодействия* (A).

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Время спин-спиновой релаксации T_2 зависит от подвижности частиц с ненулевыми спинами и почти не зависит от температуры. Время спин-решеточной релаксации T_1 связано с подвижностью окружающих молекул и возрастает при понижении температуры [8, с. 172].

6.2. АППАРАТУРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ЭПР

Поскольку магнитный момент электрона примерно в 600 раз больше, чем магнитный момент протона, техника ЭПР и ЯМР весьма различна. Большинство исследований в области ЭПР выполнено при силе поля около 340 мТл и постоянной частоте вблизи 9,5 ГГц, попадающей в микроволновый диапазон. Некоторые приборы работают на частотах до 35 ГГц.

На рис. 84 приведена блок-схема простого видеоспектрометра ЭПР. Источником микроволнового излучения служит клистронный осциллятор 1, уровень излучения регулируется аттенуатором 2. Генератор 1 согласуется с резонатором 6, в который помещается образец, при помощи фазовращателя 3. Магнитное поле, создаваемое электромагнитом 4, модулируется сетевой частотой при помощи модуляционных катушек 5. Сигнал ЭПР детектируется полупроводниковым диодом 7, усиливается широкополосным усилителем 8 и поступает на

вертикальные пластины осциллографа 9. Горизонтальная развертка осциллографа синхронизована с питанием модуляционных катушек. Постоянное поле магнита 4 устанавливается вблизи резонансного значения. Модуляция поля, осуществляемая катушками 5, должна перекрывать линию ЭПР. В момент прохождения поля через резонансное значение часть микроволнового излучения поглощается образцом, и уровень мощности, поступающей на детектор, уменьшается. При такой схеме прибора на экране осциллографа появляется линия поглощения в координатах интенсивность поглощения I – напряженность магнитного поля H (рис. 84) [42, с. 292].

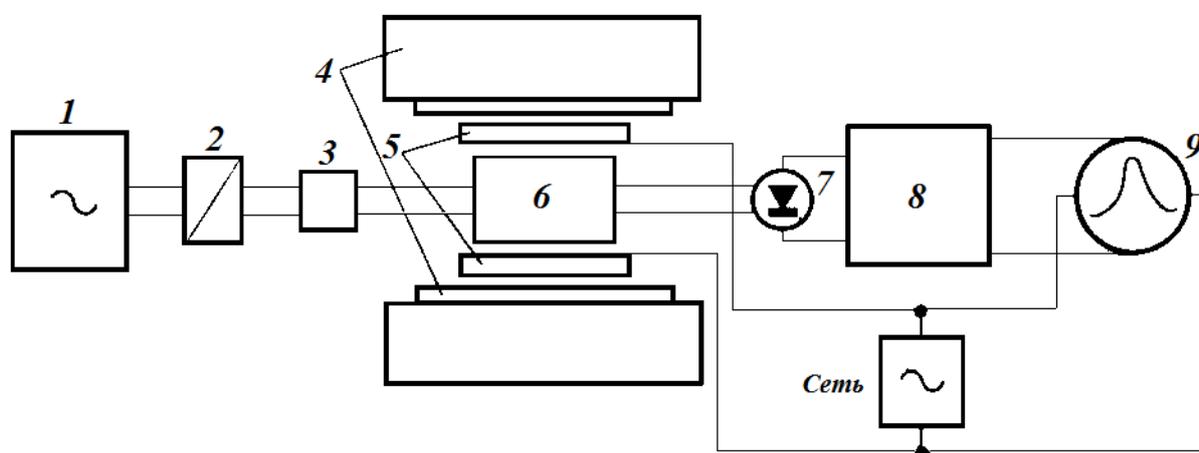


Рис. 84. Блок-схема спектрометра ЭПР [42, с. 292]

Для получения лучшего разрешения выгодно записывать спектр ЭПР в дифференциальной форме, регистрируя первую или вторую производную I по H . Для получения таких спектров (рис. 85) на постоянное магнитное поле накладывается переменное поле.

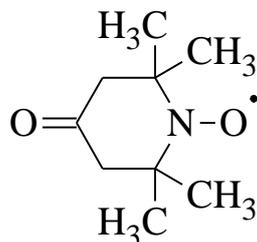


Рис. 85. ЭПР-спектр [12, с. 89]

6.3. ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР. МЕТОД СПИНОВЫХ МЕТОК

ЭПР-спектроскопия находит широкое применение в биологических и биохимических исследованиях, в частности в изучении механизмов окислительно-восстановительных ферментативных реакций, радиохимических и фотохимических процессов, которые сопровождаются образованием свободных радикалов. ЭПР очень важен для изучения гемопротеинов, содержащих в качестве кофакторов атомы металла с некомпенсированным спином.

Широкое распространение для исследования конформационных превращений биополимеров получил *метод спиновых меток*. Его суть заключается в том, что к определенным группам макромолекул химическим путем «пришивают» молекулы метки, а затем по форме спектра ЭПР наблюдают за изменениями ее молекулярной подвижности, обусловленными структурными перестройками в макромолекуле. Особенно удобны в качестве спиновых меток вещества, фрагментом которых является химически стабильный нитроксильный радикал $>N-O\cdot$, например 1,1,4,4-тетраметилпиперидиноксил:



С помощью спиновых меток удалось обнаружить слабые структурные изменения гемоглобина, происходящие при связывании им кислорода, которые не удавалось обнаружить при рентгеноструктурном исследовании [12, с. 89]. В 1970-е гг. опыты с использованием спиновых меток, проведенные в СССР и США, наглядно доказали существование конформационных перестроек молекулы миозина задолго до того, как было выяснено ее детальное строение и изучена динамика структурных изменений в мышечном волокне [39, с. 13].

Спиновые метки широко используются для изучения динамики биополимеров в растворах и составе сложных макромолекулярных комплексов, то есть в условиях, наиболее близких к естественным. Тем самым метод спиновых меток удачно дополняет другие физические методы исследования биополимеров, такие, как рентгеноструктурный анализ и ядерный магнитный резонанс.

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса? Для каких веществ или частиц можно наблюдать спектры ЭПР?
2. Как выражаются условия электронного парамагнитного резонанса?
3. Чем обусловлено возникновение сверхтонкой структуры спектров ЭПР? Как определяется число пиков в мультиплетах?
4. Опишите принципиальную схему устройства спектрометра ЭПР.
5. В чем заключается метод спиновых меток и какова область его применения?

7. МЁССБАУЭРОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Специфическим методом структурных исследований биополимеров является γ -резонансная спектроскопия, которая основана на явлении, открытом в 1957 г. немецким физиком Рудольфом Людвигом Мёссбауэром. *Эффект Мёссбауэра* состоит в испускании и поглощении γ -квантов атомными ядрами без потери энергии на отдачу (движение ядра как свободной частицы).

Известно более 90 изотопов, на которых наблюдается эффект Мёссбауэра [20, с. 87]. Наиболее часто используется нуклид ^{57}Fe , позволяющий изучать структуру железосодержащих белков.

7.1. ТЕОРИЯ МЕТОДА

Ядра атомов способны переходить с одного энергетического уровня на другой, если они поглощают или испускают электромагнитное излучение, в данном случае γ -излучение. Испускание γ -лучей ядром обычно сопровождается появлением энергии отдачи ядра E_R , которую можно выразить как

$$E_R = \frac{E_\gamma^2}{2mc^2}, \quad (35)$$

где E_γ – энергия излученного фотона; m – масса ядра; c – скорость света.

В этом случае γ -квант имеет энергию, отличную от энергии изомерного перехода на величину E_γ :

$$\Delta E = E_\gamma - E_R. \quad (36)$$

Обычно энергия отдачи равна приблизительно 10^{-2} эВ. В результате такой потери энергии испускаемое излучение уже оказывается не в состоянии возбудить другое ядро такого же рода, и дальнейшего поглощения этого излучения не происходит.

Мёссбауэр открыл, что некоторые атомы способны испускать γ -лучи с низкой энергией без отдачи, т. к. их энергия, которая могла бы привести к отдаче, столь мала, что не вызывает движения ядра как свободной частицы. Вместо этого момент отдачи переносится на молекулу, в которой содержится данное ядро. Ввиду того, что вся эта область имеет большую массу, убыль энергии в результате отдачи оказывается ничтожно малой, энергия испускаемых лучей становится примерно равной энергии перехода, и эти γ -лучи могут поглощаться другими атомами. Следовательно, если измерить зависимость поглощения γ -лучей от энергии падающего излучения, у необлученных атомов обнаружатся резкие резонансные линии [12, с. 90].

7.2. ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Мёссбауэровский спектрометр состоит из трех основных узлов – излучателя, поглотителя и детектора γ -квантов (рис. 86). Образование γ -квантов происходит в результате следующей схемы радиоактивных превращений:



Захват дейтрона и потеря нейтрона атомом ${}^{56}\text{Fe}$ осуществляется в циклотроне при образовании изотопа ${}^{57}\text{Co}$. Атомы ${}^{57}\text{Co}$ диффундируют в поверхностный слой металлической фольги, которую применяют как «источник» в мёссбауэровском спектрометре. В результате распада ${}^{57}\text{Co}$ ($\tau_{1/2} = 267$ сут) по механизму электронного захвата образуется возбужденное ядро ${}^{57}\text{Fe}^*$, которое мгновенно теряет избыток энергии, испуская γ -квант (14,4 кэВ). Этот квант может резонансно поглощаться невозбужденным ядром ${}^{57}\text{Fe}$. Отметим, что время существования ${}^{57}\text{Fe}^*$ составляет 140 нс, что значительно меньше периода полураспада ${}^{57}\text{Co}$, поэтому фактически при каждом распаде ядер ${}^{57}\text{Co}$ испускается γ -квант. Поглотителем (исследуемым образцом) может

быть железо в любом химическом состоянии, поскольку распространенность ^{57}Fe в любых железосодержащих соединениях составляет около 2,2%, что достаточно для получения приемлемой чувствительности [53, с. 522].

Часть γ -квантов, энергия которых совпадает с разностью энергий возбужденного и основного состояний ядер изотопа в поглотителе,

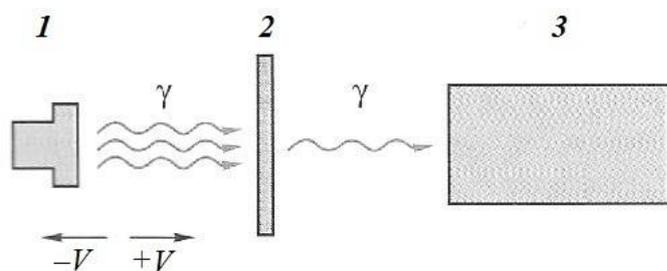


Рис. 86. Схема измерения мёссбауэровских спектров: 1 – излучатель, 2 – поглотитель, 3 – детектор γ -квантов [20, с. 83]

возбуждают ядро, поглощаясь при этом, и не попадают на детектор. Кванты же других частот проходят через поглотитель свободно и регистрируются детектором. Следовательно, для получения спектральной линии (зависимости поглощаемых γ -квантов от энергии), необходимо изменять энергию γ -квантов излучателя.

Поскольку мёссбауэровские линии очень узкие, изменение частоты γ -квантов излучателя должна быть небольшой. Для этого используют эффект Доплера – зависимость частоты излучения электромагнитной энергии от скорости движения источника излучения, перемещая излучатель относительно поглотителя со скоростью $\pm V$, составляющей несколько миллиметров в секунду. Энергия испускаемых излучателем γ -квантов за счет эффекта Доплера будет меняться в пределах

$$\Delta E = \pm E_0 \frac{V}{c}, \quad (37)$$

где E_0 – разность энергий между возбужденным и основным состояниями ядра; c – скорость света. Следовательно, часть γ -квантов, испускаемых излучателем, энергия которых отличается от E_0 , будет свободно проходить через поглотитель.

Методом γ -резонансной спектроскопии эффективно изучаются гемсодержащие и железосерные белки (гемоглобин, цитохромы, ферредоксин, рубредоксин и т. д.), а также механизмы химических реакций с участием железосодержащих биополимеров. Резонансная частота ядра ^{57}Fe в геме и в других железосодержащих группах весьма чувствительна к воздействию окружения (аналогично химическому

сдвигу, вызываемому влиянием химического окружения атома на ядерные уровни). Мёссбауэровские спектры, обычно изображаемые как зависимость поглощения от скорости перемещения излучения источника (рис. 87), позволяют получать информацию об электронной структуре железосодержащих атомных групп в различных их состояниях в белках.

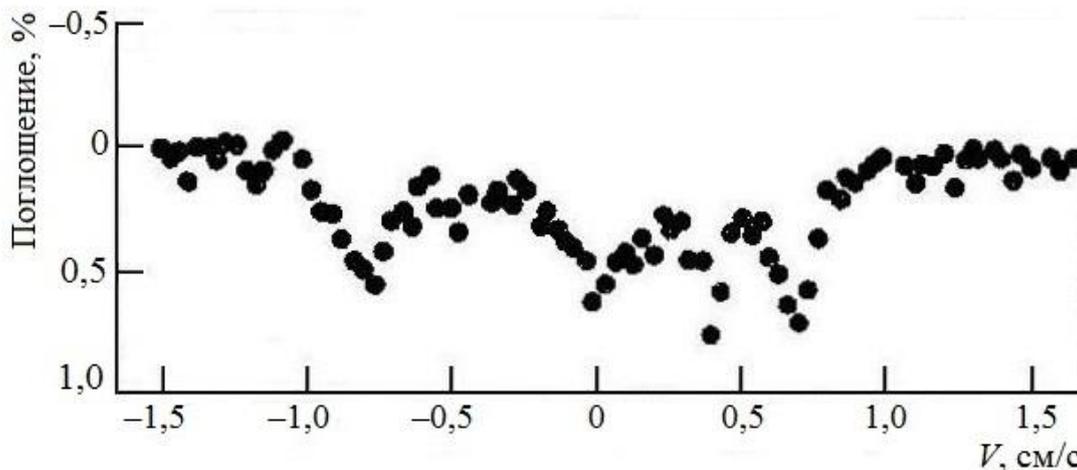


Рис. 87. Мёссбауэровский спектр метгемоглобинцианида человека при 4,2 К [12, с. 91]

Наряду с абсорбционными γ -резонансными спектрами изучаются и эмиссионные. В этом случае источник содержит атомные ядра, материнские по отношению к мёссбауэровским. Чувствительность эмиссионного метода очень велика и с его помощью удастся следить за быстротекущими биологическими процессами. Изучение белков, меченных ^{57}Fe , посредством этого метода показало, что подвижность их составных частей отлична от подвижности молекул в обычных кристаллах и жидкостях. Конформационная подвижность в белках сохраняется и при низких температурах [8, с. 140].

Дальнейшие перспективы в исследовании биологических материалов, включая и белки, основываются на применении других мёссбауэровских нуклидов, например ^{127}I , ^{129}I и ^{25}Te .

Контрольные вопросы

1. В чём заключается эффект Мёссбауэра?
2. Назовите основные узлы мёссбауэровского спектрометра. Как происходит образование γ -квантов?

3. С какой целью при измерении мёссбауэровских спектров используется эффект Доплера?

4. В каких координатах изображаются мёссбауэровские спектры?

5. Структуру каких биополимеров можно исследовать с помощью мёссбауэровской спектроскопии?

8. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Электронная микроскопия благодаря высокой разрешающей способности современных приборов, в более чем 1000 раз превосходящей разрешение традиционных оптических микроскопов, относится к важнейшим методам исследования структуры вирусов, внутриклеточных органелл, белково-нуклеиновых комплексов и отдельных биополимеров.

Первый электронный микроскоп был сконструирован Эрнстом Руской и Максом Кноллем в 1931 г. в Берлине. На протяжении XX века метод интенсивно развивался, а возможности изучения с его помощью пространственной структуры биополимеров появились после разработки методик негативного контрастирования и криоэлектронной микроскопии.

8.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ И РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

В соответствии с теорией де Бройля, двойственная природа света позволяет рассматривать движение не только фотонов, но и любых других микрочастиц как волновой процесс. Это дало возможность использовать катодные лучи (поток электронов) в качестве источника излучения в электронном микроскопе.

По способу исследования объектов электронные микроскопы разделяют на несколько видов, из которых наибольшее распространение получили *просвечивающие* (трансмиссионные, ТЭМ) и *отражательные* (сканирующие, или растровые, РЭМ) электронные микроскопы. В ТЭМ исследуемый объект просвечивается пучком электронов, создающим затем на экране или на фотопластинке соответствующее двумерное изображение. В РЭМ электронами, отраженными

исследуемой поверхностью, создается трехмерное изображение, причем пучок электронов сканирует поверхность подобно лучу в телевизионном кинескопе.

В общем виде устройство электронного микроскопа аналогично схеме светового микроскопа, но отличается использованием в качестве источника излучения пучка электронов и заменой стеклянных линз электромагнитными или электростатическими линзами (рис. 88).

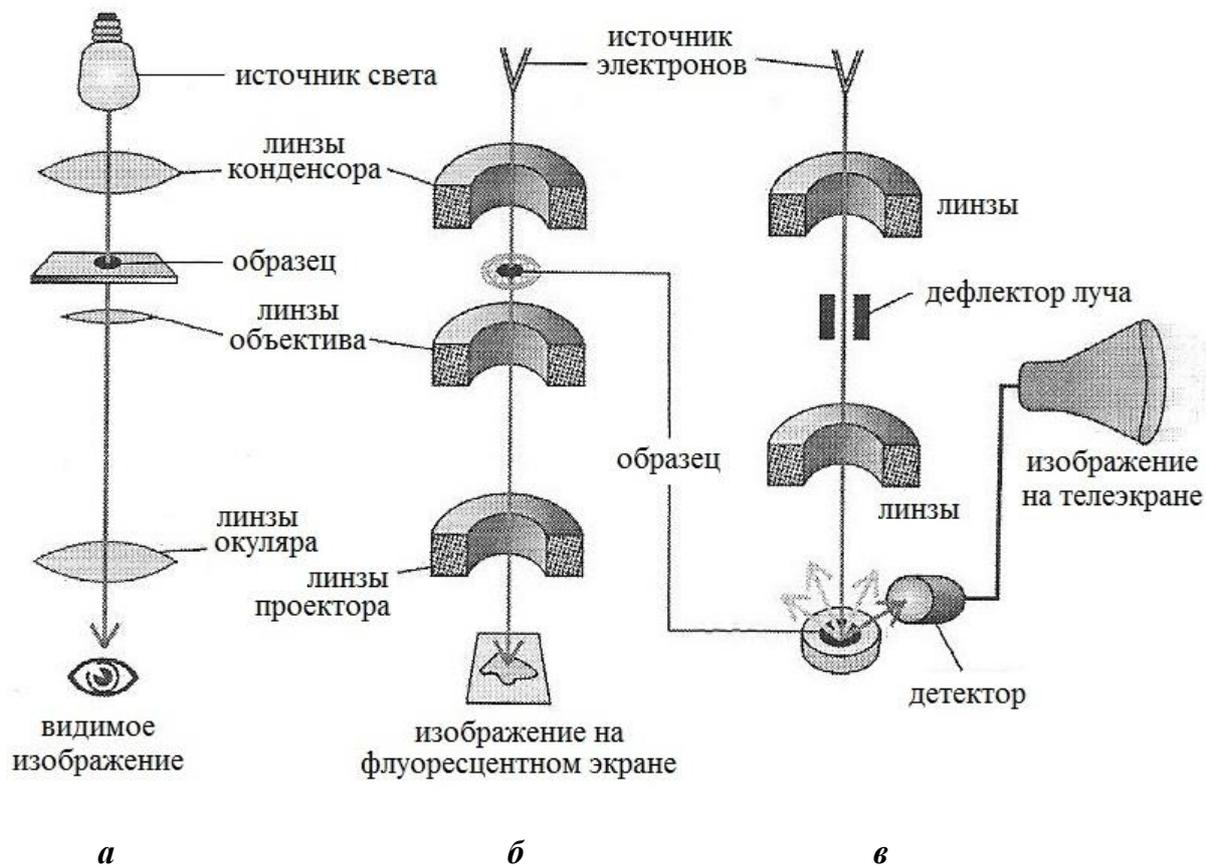


Рис. 88. Схемы оптического (а), просвечивающего электронного (б) и сканирующего электронного (в) микроскопов [6, с. 9]

Источником излучения в электронном микроскопе чаще всего служит *катод из вольфрама*, однако для достижения лучшего качества изображения используются и другие материалы, например монокристаллы из гексаборида лантана LaB_6 , обладающие высокой интенсивностью потока электронов. Для формирования когерентного пучка электронов между катодом и анодом прикладывается ускоряющее напряжение (порядка 100 кВ) в условиях высокого вакуума. Испускаемые электроны движутся к аноду, который вместе с катодом состав-

ляет *электронную пушку*. Анод имеет небольшой канал, через который проходят наиболее быстрые электроны, используемые в дальнейшем для образования изображения. Канал вместе с маленькой апертурной диафрагмой сжимает поток электронов, давая на выходе узкий электронный пучок. Этот пучок несколько расходится, поскольку электроны на выходе из канала отклоняются за счет положительного потенциала анода. Расходящийся пучок фокусируется на исследуемом образце с помощью *конденсорной линзы*. Образец обычно размещается на прозрачной для электронов нитроцеллюлозной, кварцевой, углеродной или другой пленке-подложке толщиной 10–20 нм (аналог предметного стекла в световой микроскопии), которая в свою очередь наносится на поддерживающую металлическую сетку с размером ячеек не более 0,1 мм. При проходе через образец электроны в результате упругих столкновений с положительными ядрами атомов претерпевают рассеяние. Распределение этой потери электронов приводит к получению изображения (таким же образом понижается поглощающим образцом интенсивность светового потока в оптическом микроскопе). Пройдя через объект, электронные лучи попадают в поле *линзы объектива*, которая вновь фокусирует пучок и создает промежуточное изображение, а затем в *проекционную линзу*, направляющую электронные лучи на флуоресцентный экран. Он покрыт веществом, способным светиться под действием ударов электронов (ZnS, CdS). Благодаря этому электронное изображение превращается в световое и становится видимым. Это изображение может быть зафиксировано на фотопластинке.

Особенность *сканирующих (растровых) электронных микроскопов* состоит в использовании предварительно сформированного узкого электронного пучка (*зонда*), положением которого управляют с помощью электромагнитных полей. Зонд освещает не сразу весь препарат, а проходит его постепенно, участок за участком, и изображение пробы создается подобно телевизионному изображению на экране катодной трубки. Исследуемый образец должен быть слоем металла (золота, платины, палладия или их сплавами) толщиной 20 нм. Когда пучок падает электронов на металл и проходит в нем короткое расстояние, металл начинает испускать электроны вследствие вторичной эмиссии и обратного рассеяния. Поскольку угловое соотношение между числом испускаемых электронов и углом между по-

верхностью и падающим лучом очень близко, но не идентично тому, которое существует для отражения света от поверхности объекта, изображение, полученное при регистрации электронов, дает картины исследуемых поверхностей.

Идея сканирующего микроскопа сформулирована в 1935 г. Максом Кноллем, но еще ранее (в 1924 г.) была высказана и реализована одним из создателей современного телевидения Владимиром Зворыкиным. Развитие электронной микроскопии привело к созданию в начале 1980-х гг. различных сканирующих зондовых микроскопов, к основным типам которых относятся сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), сканирующий силовой микроскоп (ССМ или АСМ) и сканирующий оптический микроскоп ближнего поля (СОМБП). Зондовые микроскопы являются уникальными приборами, сочетающими свойства микроскопа атомарного разрешения (около 0,2 нм в плоскости исследуемого объекта) и технологического устройства, с помощью которого могут создаваться наноразмерные элементы с программируемыми свойствами, например, микрочипы.

Рассмотрим подробнее важнейший параметр, определяющий применение электронных микроскопов – *разрешающую способность*, или *предельное разрешение*, т. е. способность давать отдельное изображение точек объекта, расположенных близко друг к другу.

Потоку электронов, движущемуся под действием ускоряющего напряжения микроскопа, соответствуют колебания с длиной волны, определяемой по эмпирическому соотношению

$$\lambda \approx \sqrt{\frac{1,5}{U}}, \quad (38)$$

где длина волны λ измеряется в нанометрах, а ускоряющее напряжение U – в вольтах. Оптимальные ускоряющие напряжения для исследования биологических макромолекул лежат в диапазоне 70–100 кВ. При напряжении ниже 70 кВ образец быстрее разрушается под воздействием электронов, а при напряжении выше 100 кВ уменьшается рассеяние электронов, и детали исследуемых структур выявляются хуже [42, с. 71]. По формуле (38) можно рассчитать, что для $U = 100\,000$ В длина волны принимает значение $\lambda \approx 3,87 \cdot 10^{-3}$ нм.

Теоретический предел разрешающей способности микроскопов и других оптических приборов определяется дифракцией лучей. Светящаяся точка в результате дифракции видна в микроскопе в виде

светлого кружка, окруженного темными и светлыми кольцами. При уменьшении расстояния между двумя точками дифракционные кольца сближаются, яркость пространства между ними постепенно увеличивается и, наконец, при некотором расстоянии они сливаются в одно. Наименьшее расстояние, при котором две точки еще наблюдаются в микроскопе раздельно (разрешаемое расстояние), связано с длиной волны соотношением

$$d = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0,61\lambda}{A}, \quad (39)$$

где d – разрешающая способность, n – показатель преломления среды, λ – длина волны, α – апертурный угол (угол между крайним лучом

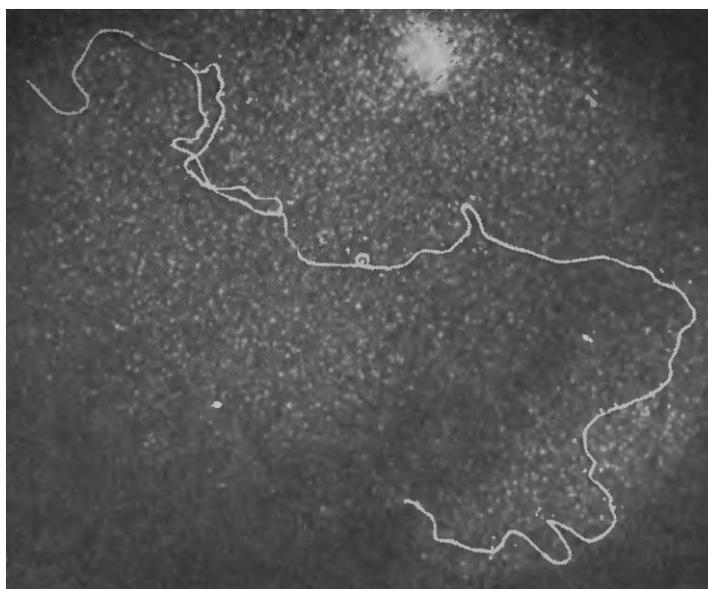


Рис. 89. Электронная микрофотография молекулы ДНК бактериофага Т7 в момент репликации (негативное контрастирование уранилацетатом). Вирусная ДНК представляет собой длинный (~14 мкм) дуплексный стержень, содержащий около 40 000 пар оснований. Виден небольшой репликативный «глаз» – участок, где происходит удвоение ДНК. Синтез ДНК начинается в точке инициации, расположенной на расстоянии, равном 17% длины молекулы, от одного из концов дуплекса [21, с. 131]

пучка электронов на входе или выходе из оптической системы и ее оптической осью). Величину A , равную произведению показателя преломления среды на синус апертурного угла называют *числовой апертурой*.

Оптимальное значение апертурного угла для электромагнитных линз просвечивающего электронного микроскопа составляет 10^{-2} рад. Подставляя также в формулу (39) рассчитанное выше значение λ и принимая для вакуума $n = 1$, получим $d \sim 0,24$ нм. Для большинства сканирующих микроскопов, исключая наиболее современ-

ные, эта величина на порядок меньше. Таким образом, электронный микроскоп позволяет «увидеть» молекулы биополимеров, субъединицы олигомерных белков и детали строения органелл клеток (рис. 89).

Для сравнения, разрешаемое расстояние современных световых микроскопов составляет 200–300 нм, а невооруженный человеческий глаз в среднем обладает способностью разделять две точки, находящиеся на расстоянии 0,25 мм друг от друга.

Разделив значение разрешаемого расстояния человеческого глаза на разрешение электронного микроскопа, можно получить полезное увеличение: $M = 0,25 \cdot 10^{-3} / 0,24 \cdot 10^{-9} \approx 10^6$.

8.2. ПРЕПАРИРОВАНИЕ И КОНТРАСТИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ

В сканирующем электронном микроскопе толщина исследуемого образца не имеет значения, поскольку в этом случае проводится исследование только его поверхностного слоя, однако образец обязательно должен быть токопроводящим, поэтому его напыляют тонким слоем металла. В современных сканирующих электронных микроскопах, работающих на автоэмиссионных катодах, существует возможность работать в условиях невысокого вакуума и даже в парах. В этом случае напыление проводящего слоя на образец не требуется.

На разрешающую способность просвечивающего электронного микроскопа толщина образца оказывает существенное влияние, поскольку проникающая способность электронов в диапазоне ускоряемых напряжений 70–100 кВ невелика и, кроме того, сильное поглощение электронов образцом большой толщины может привести к его разогреву и разрушению. На практике максимально допустимая толщина составляет около 100 нм для получения разрешения порядка 10 нм и от 50 до 100 нм для разрешения в 1 нм, а достигается она созданием ультратонких срезов и различного рода реплик [46, с. 64].

Ультратонкие срезы толщиной 20–200 нм получают с помощью специальных устройств – ультрамикротомов. Для получения *реплик* образец покрывают тонким слоем платины, а затем для придания жесткости – поддерживающим слоем углерода. Полученный двойной слой затем помещают на поверхность воды и переносят на сетку. Реплика представляет собой прозрачный отпечаток поверхности объекта, т. е. ее контур совпадает с контуром объекта. Метод реплик находит применение для изучения поверхностей вирусов, мембран и некоторых кристаллов белков, которые сразу же разрушаются под действием пучка электронов.

Чтобы наиболее полно использовать разрешающую способность просвечивающего микроскопа и получить качественные изображения, пользуются специальными приемами, позволяющими усилить контрастность образца. Процесс *контрастирования* осуществляют либо физическим методом (экранированием, или оттением), либо химически.

Метод *экранирования* состоит в том, что исследуемый образец или его отпечаток напыляется (оттеняется) в вакууме слоем высокоочищенного тяжелого металла (золота, платины, палладия, хрома или их сплавами) под определенным углом. При этом металлический осадок образуется только на плоскостях, обращенных к металлизующей проволоке, остальные же плоскости остаются обнаженными, представляя собой «тень», более прозрачную для электронов. При наблюдении подготовленных таким образом проб в электронном микроскопе электронный пучок на участках, покрытых металлом, претерпевает значительно более сильное рассеяние, чем на свободных, что на фотопластинке проявляется в виде темных и светлых пятен. Экранирование можно применять при определении формы и размера молекул биополимеров, однако пленки металлов под микроскопом оказываются зернистыми, что делает невозможным наблюдение тонкой пространственной структуры [12, с. 100].

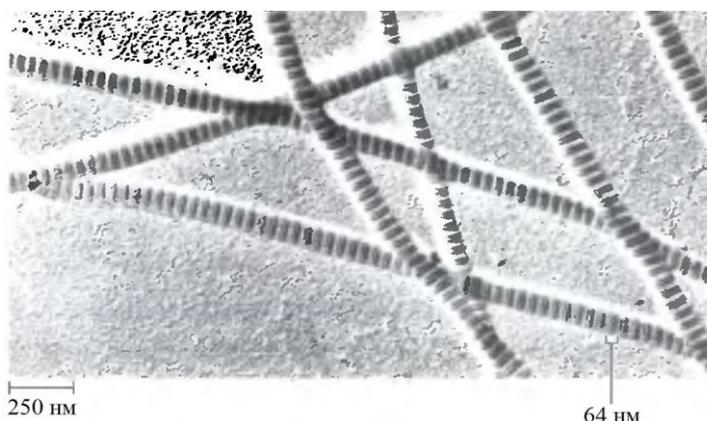


Рис. 90. Микрофотография фибрилл коллагена. Характерные поперечные полосы повторяются через каждые 64 нм [24, с. 131]

К химическим методам контрастирования относится позитивное и негативное контрастирование.

Позитивное контрастирование заключается во введении некоторых ионов тяжелых металлов в отдельные элементы структуры образца, например для связывания этих ионов с электрически

заряженными группами макромолекул. Метод позитивного контрастирования особенно употребителен для изучения агрегатов молекул, в которых участки, связывающие электронный краситель, распо-

ложены близко друг к другу. Примером применения такого метода служит изучение коллагена (рис. 90).

Наиболее часто при исследовании биологических макромолекул применяется *негативное контрастирование*, представляющее собой обработку образца растворами солей тяжелых металлов, которые подбирают так, чтобы они не присоединялись к исследуемым элементам структуры, а создавали темный фон. Изображение изучаемого объекта на этом фоне получается более светлым. Для негативного контрастирования используются растворы натриевой или калиевой солей фосфорновольфрамовой кислоты $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$, уранилацетата $UO_2(CH_3COO)_2$, молибденацетата $(CH_3COO)_2Mo$ и некоторых других солей.

Примером применения этого метода может служить подготовка образца белка для изучения его четвертичной (субъединичной) структуры. Пробу подходящей концентрации смешивают с 1%-ной фосфорновольфрамовой кислотой, нейтрализованной гидроксидом натрия. Смесь наносят на тонкую угольную пленку на медной подложке (сетке). Избыток раствора удаляют фильтровальной бумагой так, чтобы на пленке оставался лишь тонкий слой раствора пробы. Этот слой постепенно высыхает, а остающийся фосфовольфрамат натрия затвердевает, приобретая стекловидную консистенцию. Поверхностное натяжение молекулы белка способствует тому, что краситель собирается преимущественно вокруг этой молекулы и проникает также в промежутки между субъединицами исследуемого белка. Если затвердевание красителя предшествует полной дегидратации белка, негативное контрастирование содействует сохранению исходной структуры белка, весьма чувствительного к осушению [12, с. 100].

Негативное контрастирование используют при исследовании формы макромолекул биополимеров и при изучении их агрегатов. Для уточнения трехмерной структуры объекта, можно изменять угол, под которым на образец направляется поток электронов в просвечивающем микроскопе, а затем сопоставить полученные с различных сторон двумерные проекции.

Помимо сложного процесса получения тонких образцов и опасности повреждения биомолекул электронным пучком, для чего его энергия не должна была быть очень высокой, метод электронной микроскопии имел и другие ограничения при работе с биополимера-

ми. Так, испарение воды из биологического образца в рабочей камере электронного микроскопа могло способствовать изменению структуры белков и нуклеиновых кислот, а для записи изображений были необходимы быстрые детекторы, поскольку биомолекулы способны менять форму или даже перемещаться из-за незначительного изменения температуры или взаимодействия с бомбардирующими их электронами. Решение описанных проблем и возможность более широкого применения электронной микроскопии к изучению пространственной структуры молекул биополимеров были найдены при разработке метода криоэлектронной микроскопии.

8.3. КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Криоэлектронная микроскопия – это разновидность просвечивающей электронной микроскопии, в которой образец исследуется при низких температурах (обычно в жидком азоте). Главным преимуществом этого метода является возможность наблюдения за образцами биологического происхождения непосредственно в растворах.

Основная идея криоэлектронной микроскопии заключается в том, что охлаждение исследуемого объекта способно защитить его от повреждения электронным пучком и одновременно понизить скорость испарения воды. При этом в результате замерзания воды важно добиться не кристаллической, а аморфной (витрифицированной) структуры, поскольку на кристалликах льда происходит дифракция электронов, что сильно искажает сигналы, не говоря уже о том, что кристаллики могут изменить строение объекта. Для снижения негативного влияния холода на биологические образцы была предложена ускоренная заморозка (до 10 тыс. градусов в секунду), а также добавление в образец антифризов (сахарозы или глицерина). В 1980 г. исследователям удалось заморозить микрометровые капли воды, переводя ее в стеклообразное состояние, а годом позже была получена тонкая пленка твердой некристаллической воды. Замороженные в такой пленке биологические объекты можно изучать с помощью электронной микроскопии [17, с. 9].

Методика приготовления образцов показана на рис. 91. Она позволяет получать достаточно тонкие слои воды для быстрого превра-

щения в стеклообразное состояние, но при этом и достаточно толстые, чтобы в них могли поместиться монослои биологически активных молекул или молекулярных комплексов в их естественной конформации. Для процедуры используется специальная сетка, отверстия которой заполнены ячеистой углеродной пленкой. Суспензия частиц наносится на такую сетку, а затем сетка погружается в жидкий этан или пропан при температуре около -190°C , поддерживаемой за счет охлаждения жидким азотом. Образцы, помещенные в подобную ледяную матрицу, при просмотре в электронном микроскопе контрастно выделяются в виде темных объектов на сером фоне. Разрешение изображений, получаемых с помощью криоэлектронной микроскопии, может составлять менее $0,2\text{ нм}$ (рис. 92).

В 2017 г., спустя почти 60 лет после того, как с помощью рентгеноструктурного анализа была установлена пространственная структура миоглобина и гемоглобина, криоэлектронная микроскопия позволила исследовать молекулу гемоглобина в растворе. В том же году Жаку Дюбоше из Швейцарии, создавшему методику приготовления образцов для криоэлектронной микроскопии, Йоахиму Франку из США, разработавшему математические методы обработки сигналов от ансамблей частиц в растворе, и Ричарду Хендерсону из Великобритании, впервые продемонстрировавшему возможность применения криоэлектронной микроскопии



Рис. 91. Методика приготовления образца для криоэлектронной микроскопии [17, с. 9]

для определения структур биомолекул с высоким разрешением, была вручена Нобелевская премия по химии [17, с. 9].

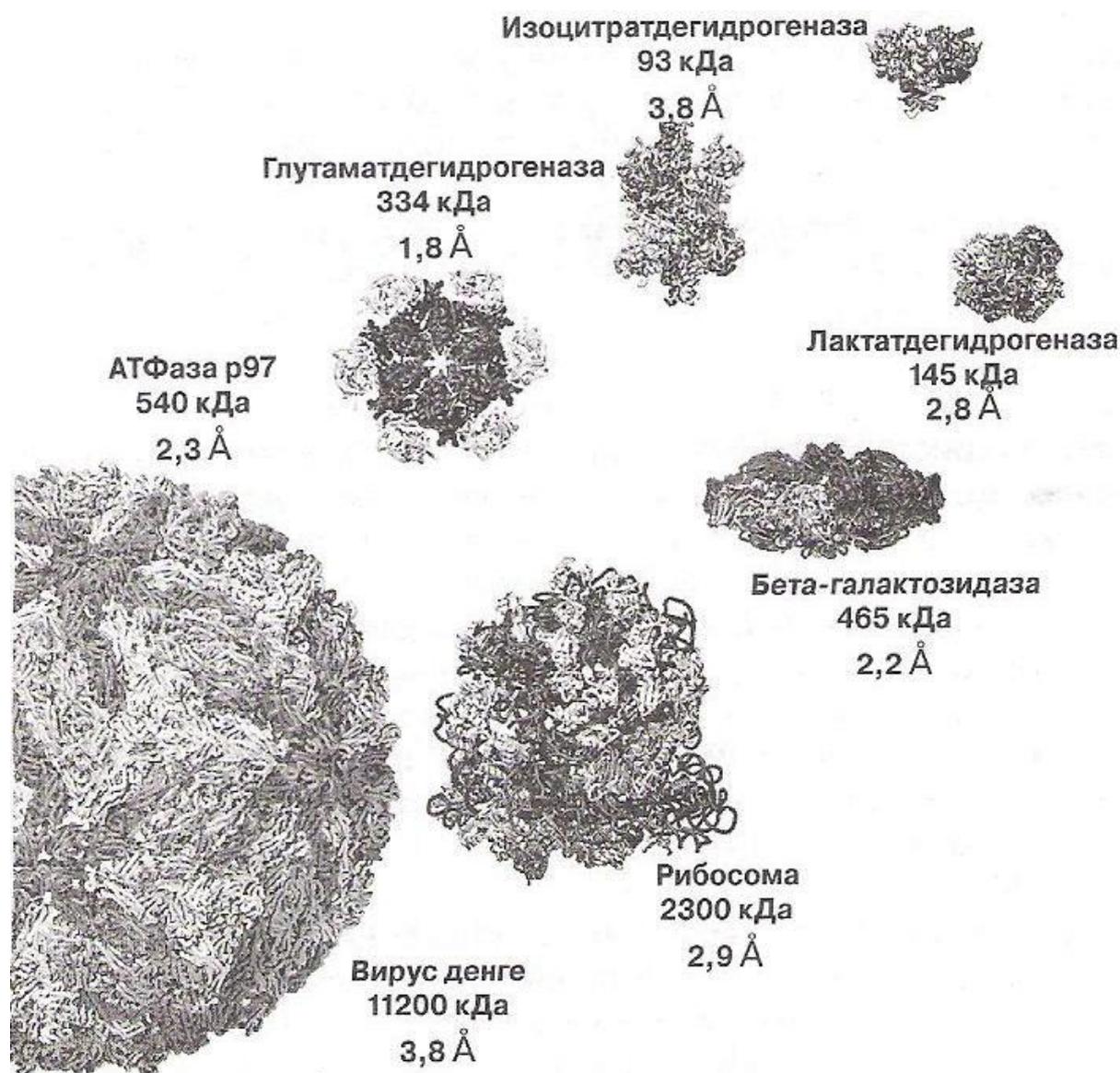


Рис. 92. Примеры структур биологически активных соединений, изученных с помощью криоэлектронной микроскопии к маю 2016 года [17, с. 8]

Криоэлектронная микроскопия находит применение не только для изучения статичных структур, но также дает возможность определять структуру биологических макромолекул в окружении, максимально близком к естественному, поскольку рН охлаждаемого для анализа раствора и концентрацию низкомолекулярных веществ и можно систематически изменять. Важным преимуществом метода является отсутствие необходимости приготовления кристаллического

образца макромолекулы, а значит, анализ требует очень небольшого количества вещества и в целом электронная микроскопия методически проще ЯМР-спектроскопии и колоссально трудоемкого рентгеноструктурного анализа [7, с. 560].

Контрольные вопросы

1. Опишите устройство просвечивающего электронного микроскопа.
2. Каковы особенности сканирующего электронного микроскопа и области его применения?
3. От чего зависит разрешающая способность просвечивающего электронного микроскопа?
4. Как проводится подготовка образцов для просвечивающей электронной микроскопии?
5. Охарактеризуйте методы контрастирования образцов для электронной микроскопии.
6. В чем заключается метод криоэлектронной микроскопии?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование пространственной структуры биологических макромолекул остается одной из наиболее интересных и важных научных задач, поэтому неслучайно целый ряд ученых в XX – XXI вв. были удостоены самой престижной награды в мире науки – Нобелевской премии.

Лауреатами по физике стали Макс фон Лауэ, Уильям Генри Брэгг и Уильям Лоренс Брэгг, открывшие дифракцию рентгеновских лучей на кристаллах и заложившие основы рентгеноструктурного анализа; Рудольф Людвиг Мёссбауэр и Чандрасекхара Венката Раман, имена которых носят эффекты, используемые в спектроскопии, а также Эрнст Руска, создавший первый электронный микроскоп.

Премий по химии за вклад в развитие методов были удостоены Аарон Клуэг, Жак Дюбоше, Йоахим Франк и Ричард Хендерсон (электронная микроскопия), Рихард Эрнст и Курт Вютрих (ядерный магнитный резонанс). Единственный дважды лауреат Нобелевской премии по химии – Фредерик Сенгер – получил награды за установление первичной структуры инсулина и совместно с Уолтером Гилбертом за исследование нуклеиновых кислот. Огромное значение для науки имели работы Макса Перуца и Джона Кендрю, создавших модели структуры глобулярных белков и, конечно, Джеймса Уотсона, Фрэнсиса Крика и Мориса Уилкинса, получивших Нобелевскую премию по физиологии и медицине за создание модели вторичной структуры ДНК и установление роли этой молекулы в передаче наследственной информации. Непрерывное развитие биохимии, биофизики и молекулярной биологии не оставляет сомнений, что этот славный список будет продолжен и человечество получит еще больше информации об устройстве молекул жизни.

Автор надеется, что книга вызвала у студентов научный интерес, способствовала пробуждению творческого подхода к самостоятельному освоению новых биологических знаний, и будет благодарен читателям за замечания и предложения как по улучшению содержания издания, так и по форме изложения материала.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бакстон, Ш. Введение в стереохимию органических соединений / Ш. Бакстон, С. Робертс. – М.: Мир, 2012. – 311 с. – ISBN 978-5-03-003734-9.
2. Березин, И. В. Основы биохимии: учеб. пособие / И. В. Березин, Ю. В. Савин. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 254 с. – ISBN 5-211-0047-8.
3. Биополимеры / Т. Оои [и др.]; под ред. Ю. Иманиси. – М.: Мир, 1988. – 544 с. – ISBN 5-03-000740-7.
4. Биохимия человека: в 2 т. / Р. Марри [и др.]; под ред. Л. М. Гинопмана. – Т. 1. – М.: Мир, 1993. – 384 с. – ISBN 5-03-001774-7.
5. Богдан, Т. В. Основы рентгеновской дифрактометрии: учеб. пособие к общему курсу «Кристаллохимия»: / Т. В. Богдан. – М.: Изд-во МГУ, 2012. – 64 с.
6. Большакова, А. В. Спецпрактикум по высокомолекулярным соединениям «Исследование структуры полимеров электронно-микроскопическими методами»: метод. пособие / А. В. Большакова, Е. С. Трофимчук. – М.: Изд-во МГУ, 2022. – 36 с.
7. Вайнштейн, Б. К. Рентгеноструктурный анализ глобулярных белков / Б. К. Вайнштейн // Успехи физических наук. – 1966. – Т. 8. – Вып. 3. – С. 527–565.
8. Волькенштейн, М. В. Биофизика: учеб. руководство / М. В. Волькенштейн. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Наука, 1988. – 592 с. – ISBN 5-02-013835-5.
9. Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / В. Зенгер. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
10. Иванов, В. Г. Практикум по органической химии: учеб. пособие для студ. высш. пед. учебн. заведений / В. Г. Иванов, О. Н. Гева, Ю. Г. Гаверова. – М.: Академия, 2000. – 208 с. – ISBN 5-7695-0586-9.
11. Иванов, В. Г. Органическая химия: учеб. пособие для студ. учреждений высш. проф. образования / В. Г. Иванов, В. А. Горленко, О. Н. Гева. – 6-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 624 с. – ISBN 978-5-7695-7068-1.
12. Калоус, В. Биофизическая химия / В. Калоус, З. Павличек. – М.: Мир, 1985. – 446 с.

13. Кантор, Ч. Биофизическая химия: в 3 т. / Ч. Кантор, П. Шиммел. – Т. 1. – М.: Мир, 1984. – 336 с.
14. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия: учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2003. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7.
15. Кнорре, Д. Г. Биоорганическая химия: учеб. пособие / Д. Г. Кнорре [и др.]. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2011. – 480 с. – ISBN 978-5-94356-996-8.
16. Коничев, А. С. Молекулярная биология: учеб. для студ. пед. вузов / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 400 с. – ISBN 5-7695-0783-7.
17. Курамшин, А. И. Электронный микроскоп, точный расчет и холодный образец / А. И. Курамшин // Химия и жизнь. – 2017. – № 11. – С. 6–9.
18. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер. – Т. 1. – М.: Мир, 1985. – 367 с.
19. Малер, Г. Основы биологической химии / Г. Малер, Ю. Кордес. – М.: Мир, 1970. – 568 с.
20. Мастеров, В. Ф. Мёссбауэровская спектроскопия / В. Ф. Мастеров // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 8. – С. 82–87.
21. Мецлер, Д. Биохимия: Химические реакции в живой клетке: в 3 т. / Д. Мецлер. – Т. 1. – М.: Мир, 1980. – 408 с.
22. Мецлер, Д. Биохимия: Химические реакции в живой клетке: в 3 т. / Д. Мецлер. – Т. 3. – М.: Мир, 1980. – 488 с.
23. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: учеб. для биол. спец. вузов / В. И. Агол [и др.]; под ред. А. С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с. – ISBN 5-06-000086-9.
24. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. / Д. Нельсон, М. Кокс. – Т. 1. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с. – ISBN 978-5-94774-365-4.
25. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учеб. для мед. спец. вузов / А. Я. Николаев. – М.: Высшая школа, 1989. – 495 с. – ISBN 5-06-001400-2.
26. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.

27. Ольшанова, К. М. Практикум по хроматографическому анализу: учеб. пособие / К. М. Ольшанова, М. А. Потапова, Н. М. Морозова; под ред. К. М. Ольшановой. – М.: Высшая школа, 1970. – 312 с.
28. Органическая химия: учеб. для вузов: в 2 кн. / В. Л. Белобородов [и др.]; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – 3-е изд., стер. – Кн. 1: Основной курс. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-8724-8.
29. Органическая химия: учеб. для вузов: в 2 кн. / Н. А. Тюкавкина [и др.]; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – Кн. 2: Специальный курс. – М.: Дрофа, 2008. – 592 с. – ISBN 978-5-358-01369-8.
30. Паперно, Т. Я. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии: учеб. пособие для студ. пед. ин-тов / Т. Я. Паперно [и др.]. – М.: Просвещение, 1977. – 176 с.
31. Потапов, В. М. Стереохимия: учеб. пособие для вузов / В. М. Потапов. – М.: Химия, 1988. – 464 с. – ISBN 5-7245-0376-X.
32. Практикум по биохимии: учеб. пособие / Г. А. Соловьева [и др.]; под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с. – ISBN 5-211-00406-X.
33. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии / Р. М. Панич [и др.]; под ред. С. С. Воюцкого и Р. М. Панич. – М.: Химия, 1974. – 224 с.
34. Практикум по физико-химическим методам исследования в биологии / авт.-сост. Ю. Н. Курбатов. – Владимир: Изд-во ВлГУ, 2021. – 164 с. – ISBN 978-5-9984-1339-1.
35. Практическая химия белка / Р. Маршелл [и др.]; ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с. – ISBN 5-03-001031-9.
36. Проблема белка. Том 2: Пространственное строение белка / Е. М. Попов, В. В. Демин, Е. Д. Шибанова. – М.: Наука, 1996. – 480 с. – ISBN 5-02-001697-7.
37. Рубин, А. Б. Биофизика: учеб. для биол. спец. вузов: в 2 кн. / А. Б. Рубин. – Кн. 1: Теоретическая биофизика. – М.: Высшая школа, 1987. – 319 с.
38. Степанов, В. М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: учеб. пособие для биол. спец. вузов / В. М. Степанов; под ред. А. С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с. – ISBN 5-06-002573-X.
39. Тихонов, А. К. Спиновые метки / А. К. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 1. – С. 8–15.

40. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия: учеб. для вузов / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 544 с. – ISBN 5-7107-7420-0.

41. Уильямс, В. Физическая химия для биологов / В. Уильямс, Х. Уильямс. – М.: Мир, 1976. – 600 с.

42. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Под. ред. Ю. С. Лазуркина. – М.: Наука, 1967. – 323 с.

43. Филиппович, Ю. Б. Биохимия белка и нуклеиновых кислот: учеб. пособие для студ. пед. ин-тов по хим. и биол. спец. / Ю. Б. Филиппович. – М.: Просвещение, 1978. – 192 с.

44. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии: учеб. для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и ин-тов / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агар, 1999. – 512 с. – ISBN 5-89218-046-8.

45. Финкельштейн, А. В. Физика белка: курс лекций / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. – М.: КДУ, 2012. – 456 с.

46. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия: применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфелдер; ред. З. А. Шабарова. – М.: Мир, 1980. – 582 с.

47. Франк-Каменецкий М. Д. Самая главная молекула / М. Д. Франк-Каменецкий. – М.: Наука, 1983. – 160 с.

48. Хауссер, К. Х. ЯМР в медицине и биологии: структура молекул, томография, спектроскопия in-vivo / К. Х. Хауссер, Х. Р. Кальбитцер. – Киев: Наукова думка, 1993. – 259 с. – ISBN 5-12-003769-0.

49. Чанг, Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам / Р. Чанг. – М.: Мир, 1980. – 664 с.

50. Чемерис, А. В. Секвенирование ДНК / А. В. Чемерис, Э. Д. Ахунов, В. А. Вахитов. – М.: Наука, 1999. – 428 с. – ISBN 5-02-004412-1.

51. Шульц, Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер. – М.: Мир, 1982. – 354 с.

52. Щербак, И. Г. Биологическая химия: учебник / И. Г. Щербак. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2005. – 480 с. – ISBN 5-88999-052-7.

53. Юинг, Г. Инструментальные методы химического анализа / Г. Юинг. – М.: Мир, 1989. – 608 с. – ISBN 5-03-000194-8.

54. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты. Пептиды. Белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт; под ред. Ю. В. Митина. – М.: Мир, 1985. – 456 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава I. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ	8
1. БЕЛКИ.....	8
1.1. Первичная структура и методы ее установления	9
1.2. Вторичная структура белков.....	35
1.3. Третичная структура глобулярных белков	46
1.4. Четвертичная структура глобулярных белков.....	54
1.5. Высшие структуры фибриллярных белков	61
2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.....	65
2.1. Первичная структура и методы ее установления	65
2.2. Вторичная структура	84
2.3. Третичная структура.....	96
2.4. Четвертичная структура	101
Глава II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНФОРМАЦИЙ БИОПОЛИМЕРОВ	102
1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ	102
1.1. Теоретические основы метода.....	102
1.2. Аппаратура для измерения поглощения в видимом и ультрафиолетовом свете	104
1.3. Гипохромный эффект. Применение метода.....	105
2. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ	110
2.1. Получение инфракрасных спектров	110
2.2. Применение инфракрасной спектроскопии. Инфракрасный дихроизм	112
2.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния	116
3. ДИСПЕРСИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ И КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ	119
3.1. Теория методов ДОВ и КД	119
3.2. Аппаратура для измерения ДОВ и КД	126
3.3. Применение методов ДОВ и КД	128

4. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ.....	135
4.1. Рентгеноструктурный анализ кристаллов биополимеров ...	136
4.2. Исследование строения фибриллярных структур	149
5. ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС.....	157
5.1. Теория метода.....	157
5.2. Аппаратура для измерения ЯМР	168
5.3. Применение ЯМР	169
6. ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС	177
6.1. Теория метода.....	177
6.2. Аппаратура для измерения ЭПР.....	179
6.3. Применение ЭПР. Метод спиновых меток	181
7. МЁССБАУЭРОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	182
7.1. Теория метода.....	182
7.2. Практическая реализация и применение метода.....	183
8. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ	186
8.1. Принцип действия и разрешающая способность электронного микроскопа	186
8.2. Препарирование и контрастирование образцов	191
8.3. Криоэлектронная микроскопия	194
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	198
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	199

Учебное электронное издание

КУРБАТОВ Юрий Николаевич

СТРУКТУРА БИОПОЛИМЕРОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учебное пособие

Издается в авторской редакции

Системные требования: Intel от 1,3 ГГц; Windows XP/7/8/10; Adobe Reader; дисковод CD-ROM.

Тираж 25 экз.

Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
Изд-во ВлГУ
rio.vlgu@yandex.ru

Кафедра биологии и экологии
iur.curbatov@gmail.com