

УДК 577.342;577.344

ЭМИССИОННАЯ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

© 2020 г. Е.Л. Терпугов

Институт биофизики клетки РАН— обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: el_terpugov@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 11.12.2019 г.

Инфракрасная спектроскопия является мощным аналитическим методом, который еще полностью не разработан применительно к биологическим системам. Ранее этот метод успешно применялся для анализа вторичной структуры. Этот миниобзор показывает последние достижения в изучении белков с применением ИК-Фурье-техники. Обсуждается применение эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии к исследованию фотофизических и фотохимических реакций в фоторецепторных белках.

Ключевые слова: ИК-Фурье-спектроскопия, стимулированная инфракрасная эмиссия, видимый свет, инфракрасный свет, белок, пигмент-белковый комплекс, аминокислоты.

DOI: 10.31857/S0006302920010019

Колебательная спектроскопия представляет собой мощный инструмент для изучения биологических образцов [1–5]. Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) и спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия) являются двумя взаимодополняющими методами колебательной спектроскопии, которые основаны на двух принципиально разных физических процессах. Однако в обоих случаях наблюдают возбуждение молекулы до более высоких энергетических колебательных состояний. ИК-спектроскопия связана с поглощением ИК-квантов, в результате которого происходит усиление колебательных и вращательных движений молекул, обусловленных химическим составом образца [3, 5]. Химические связи претерпевают различные формы колебаний, такие как растяжения, изгибы и вращения. Энергия большинства молекулярных колебаний соответствует энергии квантов с длиной волны 25–2,5 мкм или волновыми числами 4000–400 см⁻¹. Полосы в спектре ИК-поглощения появляются в результате переходов между колебательными подуровнями основного электронного состояния и связаны с изменением дипольного момента, правилами отбора, симметрией молекул и степенью ангармоничности колебаний. Информация,

представленная в ИК-спектре, уникальна, ее невозможно получить с помощью спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление пленок исследуемых образцов. В работе использовали L-лизина моногидрохлорид (Aldrich-Sigma, США) без предварительной очистки. Пленку получали путем высаживания образца из 1 М водного раствора на подложку из кристаллического кремния. Толщина слоя пленки составляла приблизительно 1 мкм. Материал подложки имеет область прозрачности в ИК-диапазоне.

Равномерно распределенный по гладкой поверхности подложки образец в объеме 200–300 мкл высушивали на воздухе при комнатной температуре и относительной влажности воздуха около 60% в течение нескольких часов.

Для приготовления раствора использовали деионизованную воду при pH 7.0. Деионизованная вода, используемая в этих экспериментах, была получена на системе Nanopure Diamond ultrapure (Barnstead International, США). Чистота воды подтверждается величиной проводимости в 18 МОм.

Спектроскопические исследования. Основные спектроскопические исследования проводили с использованием ряда спектроскопических мето-

Сокращения: ИК – инфракрасный, НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение, ИКЭС – эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия.

дов — дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, низкотемпературной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии.

При дифференциальных и низкотемпературных измерениях сначала записывали спектр светоадаптированной формы основной формы бактериородопсина BR₅₆₈, который сохраняли в памяти компьютера. Затем записывали спектр исследуемого интермедиата. Разностный спектр получали путем вычитания из полученного спектра исследуемого интермедиата спектра основной формы. В частности, спектр M₄₁₂-интермедиата получали при температуре 190 К.

Эмиссионные измерения были выполнены на базе отечественного ИК-Фурье-спектрометра ФС-02 путем модификации его оптической схемы. Для этого источник ИК-излучения был удален из прибора. Вместо него был установлен образец, который непрерывно облучался видимым светом умеренной мощности и, по сути, являлся непосредственным источником ИК-излучения, которое направлялось на собирающее зеркало и далее в интерферометр. Геометрия освещения образца видимым светом была такова, что возбуждающий свет падал практически нормально к поверхности образца и фокусировался в пятно диаметром 2–4 мм с помощью короткофокусной линзы. Регистрацию вторичного ИК-излучения осуществляли в геометрии отражения. При этом возбуждающий (паразитный) свет не попадал на приемник. Случайное проникновение видимого света отсекалось пластиной из германия, установленной на входном окошке приемника. Германий, как известно, пропускает ИК-свет и не пропускает свет видимого диапазона.

Варьирование мощности возбуждающего излучения от ксеноновой лампы при исследовании интенсивностной зависимости спектра ИК-эмиссии осуществлялось при помощи поглощающих светофильтров (ЛОМО, Россия). Калибровку светофильтров проводили с помощью измерителя мощности. Также использовали полосовые инфракрасные фильтры.

Записывали эмиссионные спектры в одноканальном режиме со спектральным разрешением 4 см⁻¹, которое было выбрано для лучшей воспроизводимости спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИК-спектроскопия в исследовании глобулярных белков. В структурных исследованиях белков ИК-спектроскопия начала применяться с 50-х годов прошлого столетия [6–8] и до сих пор является блестящим инструментом при изучении конформации и динамики белковых структур [2, 9–11]. Полезность инфракрасной спектроскопии проистекает из

ее способности обнаруживать изменения в относительной ориентации и водородных связях пептидных групп С=О, которые являются основными осцилляторами, связанными со структурой. Одним из основных его применений является анализ вторичной структуры белка, основанный на том, что существует тесная корреляция между положением специфических ИК-полос в спектре и вторичной структурой [12–15]. Эти корреляции были определены посредством связи частот структурно-чувствительных амидных полос со специфическими типами структуры, такими как α -спирали, β -сшивки или петли [12, 13, 16]. При большом числе степеней свободы молекулы белка ее ИК-спектр, тем не менее, имеет немного полос. Это обусловлено тем, что в ИК-спектрах белковых полимеров активны только те нормальные колебания, для которых атомы в повторяющихся единицах полимерной цепи колеблются в фазе [2, 7].

Наиболее изучено белковое колебание, связанное с полосой Амид I, локализованной в спектральной области 1700–1620 см⁻¹. Полоса Амид I почти полностью состоит из С=О-валентных колебаний, связанных с растяжением пептидной связи, и обладает высокой чувствительностью к вторичной структуре. В зависимости от типа вторичной структуры, в которой участвуют пептидные С=О-группы, нормальные моды имеют тенденцию локализоваться в пределах определенных спектральных областей, создавая полосы частот, каждая из которых имеет свои собственные спектральные параметры (положение, ширина полосы и коэффициент ослабления).

Полоса Амид II, напротив, происходит от плоских колебаний, связанных с изгибом N–H-связи, и от валентных колебаний, связанных с растяжением C–N-связи. Колебание Амид II демонстрирует гораздо меньшую чувствительность к конформации белка [2]. Другие амидные полосы являются очень сложными и сильно зависят от величины силовых полей, природы боковых цепей и водородных связей и практически не используются в анализе конформационных исследований.

Одним из наиболее значительных практических преимуществ детального структурного анализа является то, что полоса «Амид I» содержит больше информации, чем просто сведения о конформации глобулярных белков. Точное положение этой полосы колебаний зависит от характера водородных связей с участием С=О- и N–H-групп [14]. В свою очередь, это определяется упаковкой полипептидной цепи, отражающей конформацию основной цепи и паттерн водородных связей. Таким образом, наблюдаемые контуры амидных полос белков состоят из перекрывающихся полос различных компонентов, представляющих α -спирали, β -сшивки, изгибы и неупо-

рядоченные элементы структуры [2, 7, 17]. Полоса «Амид I» часто показывает сложную, неразрешенную форму линии с большим числом широких полос с неясными максимумами. Ее форма может изменяться под воздействием растворителя [16, 18, 19], из-за локальных деформаций [9], размера [9] и структурной организации локальных элементов во вторичной структуре [20]. Эти явления увеличивают внутреннее информационное содержание, но усложняют интерпретацию. Таким образом, основным аспектом в изучении белков с помощью инфракрасной спектроскопии становится расшифровка ИК-спектров, включающая в себя идентификацию и характеристики полос основных компонентов определяющих профиль полосы «Амид I» [21–24].

Появление в 1980-х годах новой техники — ИК-Фурье-спектрометров — открыло новую эру в исследовании белков. Принципиально новая конструкция ИК-спектрометров в сочетании с разработкой метода преобразования Фурье для сбора ИК-данных и надежного цифрового вычитания позволила быстро и эффективно обрабатывать и преобразовывать интерферограммы с помощью алгоритма преобразования Фурье, в результате чего быстро получать зависимости коэффициента пропускания от энергии в волновых числах [25]. Полученный в результате математической обработки спектр указывает на наличие химических связей и, следовательно, дает представление о составе и строении вещества. В настоящее время ИК-Фурье-спектроскопия признана ценным инструментом для изучения конформации белка в растворе на основе обычной воды, а также ее дейтерированных форм; она также используется для изучения структурной стабильности, сворачивания и агрегации белков [26–32].

Однако поначалу практическое использование этой техники было сильно ограничено такими факторами, как низкая чувствительность приборов, отсутствие понимания корреляции между конкретными типами упаковки основной цепи и полосами отдельных компонентов [22]. Тогда считалось, что ИК-спектр белка в водном растворе трудно, если не невозможно, получить, если только в качестве растворителя не использовать тяжелую воду, поскольку вода сильно поглощает в наиболее важной области спектра примерно при 1640 см^{-1} и может полностью маскировать белковые полосы. Даже в растворе D_2O обычно получали только качественную информацию, потому что компоненты полос поглощения, связанные с конкретными субструктурами, такими как α -спираль и β -сшивки, не могли быть разрешены [11].

В настоящее время высокая чувствительность современных ИК-приемников, стабильность ла-

зеров и компьютеризованный инструментарий современных ИК-Фурье-спектрометров улучшил отношение «сигнал/шум» и позволил проводить обширные манипуляции с данными. Спектры могут быть получены в широком диапазоне сред с меньшими затратами времени и вещества, что стало исключительным преимуществом метода. При этом могут быть обнаружены прямые корреляции между частотами полосы «Амид I» и компонентами вторичной структуры на основе установленных экспериментальных методик анализа вторичной структуры полипептидов и белков [33–36]. Такие возможности в последние годы значительно расширили применение ИК-Фурье-спектроскопии в исследованиях вторичной структуры и динамики белка [32].

В настоящее время ИК-Фурье-спектроскопия используется не только для изучения вторичной структуры, но и при исследованиях структурной динамики, конформационных изменений (отражает связывание лигандов [37], зависимость от температуры, рН и давления [38–40]), она также используется для изучения структурной стабильности, сворачивания и агрегации белков [26, 27].

Дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия. Хотя ИК-спектроскопия позволяет изучать конформацию и динамику белка, на практике трудно определить локальные структурные изменения в белковом остове. Эта проблема происходит от существования сильного перекрытия между колебательными модами множества одинаковых групп в белке. Например, в ИК-спектре в области 1700 см^{-1} и 1500 см^{-1} вносят вклад полосы «Амид I» ($1620\text{--}1690\text{ см}^{-1}$) и «Амид II» (около 1550 см^{-1}) (точная частота которых зависит от вторичной структуры белка), но также вносит вклад и поглощение боковых аминокислотных остатков, таких как аспарат, глутамат, тирозин, триптофан, лизин и аргинин (поглощающих в области локализации полос «Амид I» и «Амид II» [28–31]). В эту область могут также попадать колебания хромофора. При этом в типичном спектре ИК-поглощения пигментно-белкового комплекса в среднем инфракрасном диапазоне будет доминировать поглощение белка, в то время как поглощение молекул хромофора обычно составляет только очень незначительный вклад ($\sim 10^{-3}\text{--}10^{-4}$, в зависимости от размера белка). Поэтому чтобы получить информацию о хромофоре или других составляющих биологической системы (белки, мембраны и так далее), участвующих в течение заданной фотореакции, в 1980-х годах прошлого столетия был разработан новый метод — дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия. Впервые он был применен к бактериородопсину [41–43]. В последнее время этот метод особенно широко используется для исследований ранней фотофизики, процессов переноса энергии и мо-

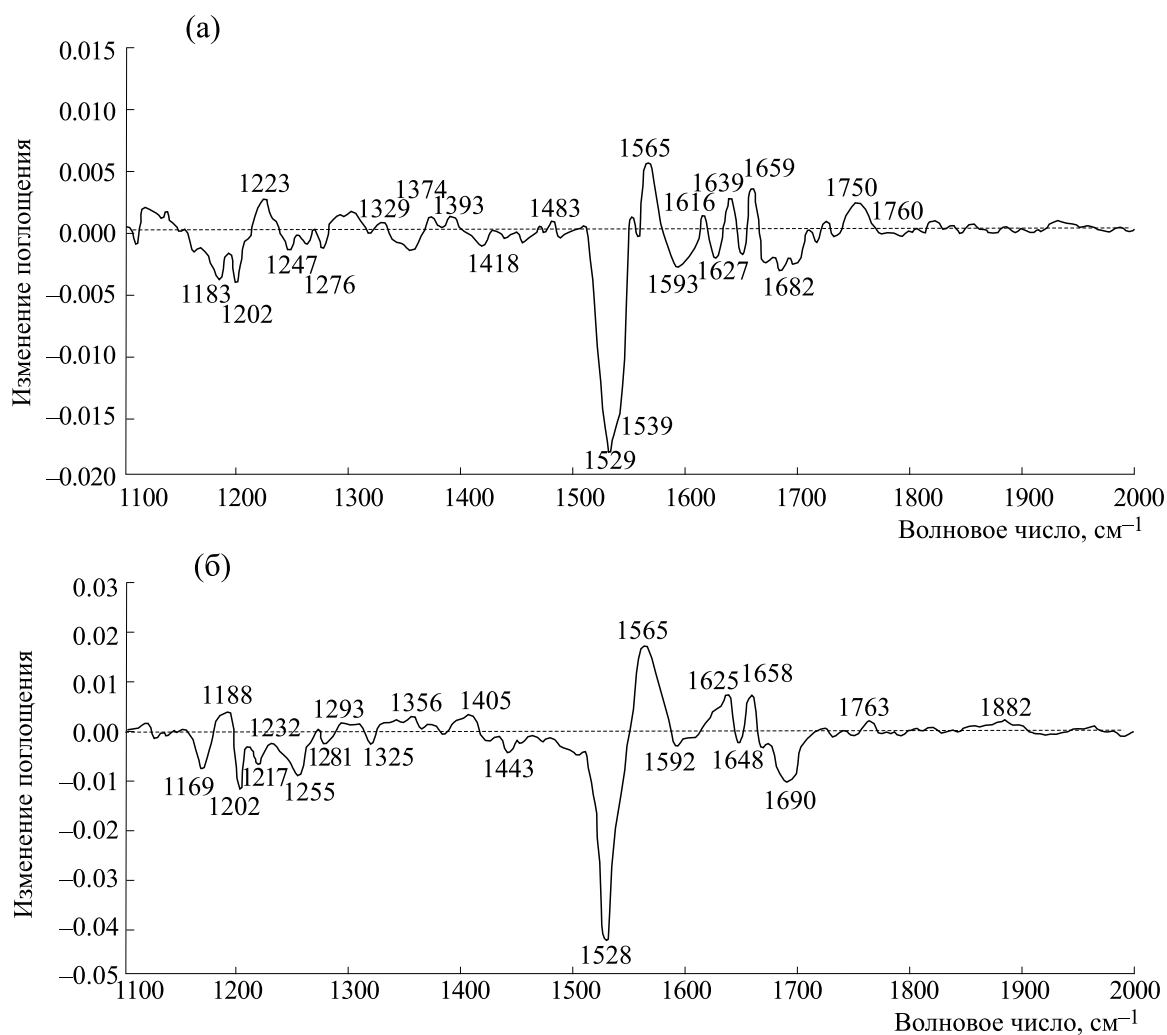


Рис. 1. Дифференциальные спектры между исходной формой бактериородопсина BR₅₆₈ и формой M₄₁₂, записанные при температуре 190 К и относительной влажности пленок 0% (а) и 93% (б). Спектры записаны в одноканальном режиме с использованием охлаждаемых жидким азотом ртуть-кадмий-теллуровых (в английской аббревиатуре – МСТ) приемников, накоплением 600 сканов и спектральным разрешением 4 см⁻¹.

лекулярных механизмов функционирования фотосистем разной сложности (см., например, обзоры [44, 45] и ссылки в них).

Основной эксперимент заключается в сравнении двух ИК-спектров, зарегистрированных до и после данной реакции (см. рис. 1). Все колебательные полосы, принадлежащие молекулярным группам, участвующим в реакции, появятся в разностном спектре, тогда как все остальные колебания будут подавлены. В результате чувствительность метода проявляется на уровне отдельных молекулярных групп и даже химических связей. Получаемая в дифференциальном спектре информация касается таких важных событий, как протонирование/депротонирование боковой цепи одной аминокислоты, окисление/восстановление пигмента или кофактора, смещение молекулы воды, конформационные изменения хромо-

фора или белка и так далее. Эта информация носит также структурный характер: например, в спектрах можно наблюдать не только образование водородной связи, но и получить качественную оценку прочности связи [44, 45].

С появлением ИК-Фурье-спектрометров с технологией «степ-скан» за состоянием биологической системы можно следить с временным разрешением от нано- до фемтосекунд [46–48].

Как было сказано выше, исторически первые исследования с помощью дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии были проведены на бактериородопсине. Они позволили определить вовлеченность индивидуальных групп на разных стадиях фотоцикла [49, 50]. Во многом успешному практическому применению этого метода способствовало разработка новых методик, связанных с подготовкой образца. Кроме мечения изо-

топами и водородно-дейтериевого обмена были разработаны специальные методики, такие как метод генетических замен или сайт-направленный мутагенез [51], избирательное прокрашивание изотопами боковых аминокислотных остатков или молекул внутренней воды [52–54]. Таким способом были идентифицированы каталитически важные аминокислоты в родопсинах [55–58]. В связи с этим особенностью подготовки образцов для дифференциальной ИК-Фурье спектроскопии заслуживает отдельного рассмотрения.

Прежде всего, следует учитывать тот факт, что молярные коэффициенты экстинкции колебательных мод значительно меньше, чем у электронных переходов. Это влечет за собой необходимость использования очень концентрированных образцов. Кроме того, учитывая, что огибающая полосы поглощения воды в значительной степени маскирует важные полосы компонентов белка, необходимо уменьшить содержание воды при условии сохранности нативности белка или мембраны и его биохимических реакций при изменении гидратного состояния образца. Более серьезные проблемы возникают при исследовании водорастворимых белков. Для того чтобы решить эту проблему, было предложено использовать образцы в виде прессованных таблеток с использованием порошка бромида калия, прозрачного в ИК-области спектра. Этот метод прессования таблеток с помощью бромида калия был введен в 1952 г. и широко используется до сих пор. Он заключается в тщательном перемешивании тонко измельченной пробы с порошком бромида калия, ее прессовании и формировании полупрозрачной таблетки. Несмотря на преимущество, заключающееся в отсутствии большинства мешающих полос поглощения, к недостаткам этого метода относят возможность изменения кристаллической структуры полиморфных веществ в процессе растирания и прессования таблеток. Также из-за высокой гигроскопичности бромида калия не удастся полностью избежать присутствия в ИК-спектрах полос адсорбированной воды возле 1640 см^{-1} и 3450 см^{-1} . Возможно химическое взаимодействие вещества пробы с материалом таблетки.

Метод нарушенного полного внутреннего отражения. Начиная с 1963 г., в качестве альтернативы ИК-поглощению для анализа водных растворов биологических образцов стали использовать метод ИК-отражения, известный как метод нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, в английской аббревиатуре — ATR (Attenuated total reflection)) [59]. Метод нарушенного полного внутреннего отражения требует минимальных усилий в приготовлении образца, он также позволяет исследовать поверхности самых различных материалов.

В основе метода НПВО лежит поглощение поверхностным слоем исследуемой пробы падающего излучения световой волны, выходящей из призмы полного внутреннего отражения, находящейся в оптическом контакте с изучаемой поверхностью. Детально метод описан в работе [59]. Для регистрации спектров НПВО необходимы специальные приставки в ИК-Фурье-спектрометрах. В этом случае получаемые методом НПВО инфракрасные спектры практически идентичны поглощению, а определение вторичной структуры белков по спектрам НПВО показало схожие результаты. В то же время метод также не лишен недостатков. Один из них связан с серьезными ошибками при интерпретации спектров. В последнее время метод НПВО чаще всего используется для определения ориентации белков в мембране.

Эмиссионная ИК-Фурье-спектроскопия. Если рассмотренные методы в ИК-Фурье-спектроскопии — пропускание (поглощение) и отражение (нарушенное полное внутреннее отражение) — наиболее прочно и широко применяются в биологических исследованиях, то этого нельзя сказать об эмиссии, которая не используется в биологии.

Современные исследования с помощью эмиссионной ИК-Фурье-спектроскопии (ИКЭС) в большинстве случаев касаются изучения спектров естественных и искусственных источников света или лабораторных образцов, возбужденных термальными способами [60–63]. Помимо спектроскопии небесных тел, изучаемых в области астрофизики, существуют два основных направления эмиссионной спектроскопии, используемых в лабораторных условиях, — атомная эмиссионная спектроскопия, как один из наиболее широко используемых методов элементного анализа вещества, и ИКЭС, сконцентрированная главным образом на термоэмиссии молекулярных систем. ИКЭС может быть применима к анализу широкого спектра веществ органической и неорганической природы в твердом, жидком и газообразном состоянии, а также к анализу таких веществ, как сыпучие материалы, поверхности, катализаторы и тонкие пленки и минералы [62, 63].

Хотя ИКЭС имеет потенциал стать очень чувствительной, универсальной молекулярно-специфической техникой анализа молекулярного состава и структуры вещества, в настоящее время она все еще редко используется на практике. Одной из основных причин является отсутствие специализированной техники, позволяющей проводить рутинные измерения. Все измерения проводятся на базе ИК-Фурье-спектрофотометров, которые имеют специализированные приставки, или проводится модификация оптической схемы, позволяющая адаптировать прибор

для эмиссионных экспериментов. Эти эксперименты зачастую происходят на грани искусства [61]. Между тем в настоящее время метод ИКЭС достаточно востребован из-за безальтернативности его применения в таких научных областях, как астрофизика, химический катализ или минералогия [63]. Поэтому метод ИКЭС продолжает совершенствоваться и развиваться. Одним из таких достижений является возможность его использования применительно к биологическим образцам, когда исключается прямой контактный нагрев, а эмиссия возбуждается с помощью видимого света с энергией, не вызывающей нагрева образца.

Спектр ИК-эмиссии, как и спектры комбинационного рассеяния света или ИК-поглощения, содержит подробную информацию о присутствующих химических связях, следовательно, он дает представление о химическом составе образца. Преимущество метода состоит в том, что он не имеет ограничений для водных растворов, поскольку молекулы воды не дают ИК-сигнала, способного маскировать важные белковые полосы. Следовательно, измерения могут проводиться в водных растворах или непосредственно на невысушенных образцах. Образец не требует специальной подготовки, что позволяет исследовать целостные клетки и даже ткани [64]. В спектральной области «Амид I» ($1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и «Амид II» ($1480\text{--}1575\text{ см}^{-1}$) содержатся не единичные широкие полосы, а множество хорошо разрешенных полос, что позволяет получать более подробную информацию об исследуемых процессах. При этом анализ эмиссионных спектров включает в себя пока что редко исследуемые спектральные области ($>1800\text{ см}^{-1}$ и $<1000\text{ см}^{-1}$). Их исследование в фоточувствительных белках становятся все более популярными (см., например, работы [65–67]) (рис. 2). Как правило, в спектрах ИК-поглощения или дифференциальных спектрах спектральное окно между 1800 см^{-1} и 1900 см^{-1} лишено какого-либо спектрального вклада, в то время как в этой области в спектрах ИК-эмиссии проявляются хорошо разрешенные пики (рис. 2). Их идентификацию проводили в экспериментах с использованием модельных соединений ретиналя и аминокислот.

Рис. 2 иллюстрирует возможности метода в получении информации о хромофорном ретинале и белковых компонентах бактериородопсина в водном растворе и влажных пленках. Идентификация полос, относящихся к ретиналю, проводилась на основе сравнения с данными комбинационного рассеяния света и ИК-поглощения модельных соединений ретиналя. Идентификацию белковых полос проводили на основе анализа спектров аминокислот, используемых в качестве моделей. Оказалось, что в нерезонансных

условиях под действием видимого света аминокислоты, так же как и ретиналь, способны генерировать ИК-излучение в среднем ИК-диапазоне. Это может иметь важное значение при решении вопроса о происхождении колебательного возбуждения в опсине в первичной фотофизике бактериородопсина.

Подробное описание ИК-эмиссионных экспериментов на базе ИК-Фурье-спектрометра ФС-02 было представлено ранее [68]. ИКЭС сочетает использование источника видимого света и адсорбционную ИК-Фурье-технику для записи спектров ИК-эмиссии в широком ИК-диапазоне. В этом случае стандартный источник ИК-излучения заменяется на непосредственно образец, как это схематически показано на рис. 3.

Как видно, спектр состоит из двух компонент — широкой гладкой фоновой кривой и расположенных на ее фоне отдельных резких пиков. Реальный спектр ИК-эмиссии образца получали вычитанием широкой компоненты фонового излучения с использованием процедур сглаживания и фитизации полиномом 25-й степени с помощью компьютерной программы Origin 6. Регистрацию спектров проводили с максимальным уровнем полезного ИК-сигнала и минимальным влиянием фонового излучения от нагретых поверхностей. Оптимальные условия регистрации спектров задавали программно. Видимый свет в виде паразитных засветок отсекали оптическими фильтрами и германиевым фильтром, установленным на входном окошке ИК-приемника.

То, что в этих условиях резонансного поглощения ретинальным хромофором бактериородопсин может излучать ИК-радиацию в среднем ИК-диапазоне ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$) [68–70], подтвердили также другие авторы [71–74].

В процессе исследования нами было показано, что многочастотный (широкополосный) видимый свет помимо собственной флуоресценции может возбуждать в пигментах стимулированное ИК-излучение по механизму комбинационного типа [70, 75, 76]. В этом случае, как и при вынужденном комбинационном рассеянии, ИК-эмиссия наблюдается с теми же самыми резонансными условиями, которые имеют место при смешивании оптических волн в нелинейной среде [77–80]. Возможность процесса нелинейного оптического смешивания при использовании некогерентного источника была показана еще в 1965 г. [81]. Хотя вероятность такого процесса не столь велика, особенно при использовании низкоинтенсивных источников света, чувствительность современных ИК-Фурье-спектрометров вполне достаточна, чтобы надежно регистрировать спектры ИК-эмиссии в этих условиях. Спектры стимулированной ИК-эмиссии могут быть получены в нерезонансных и резонансных условиях. В последнем случае можно получить значительное

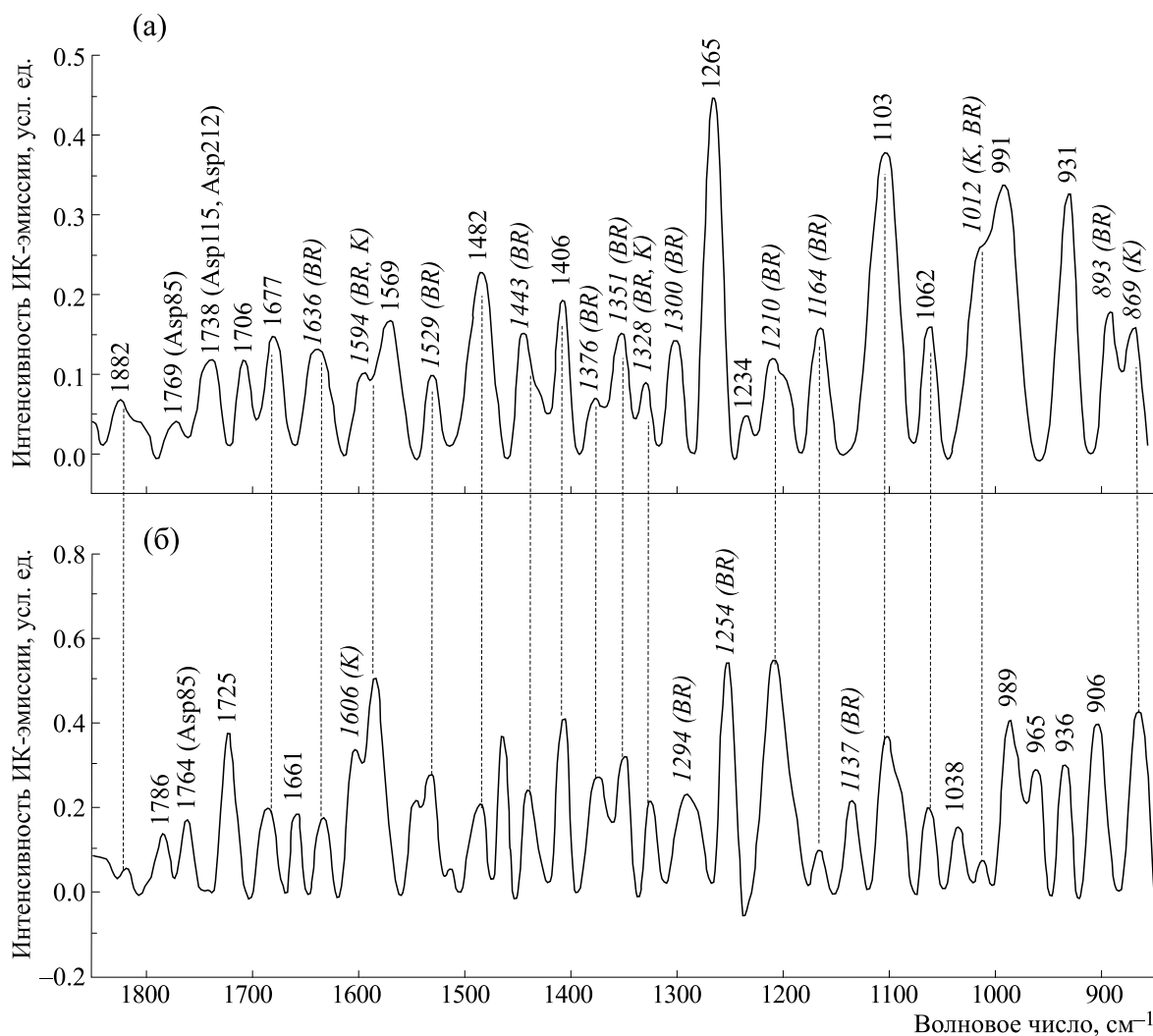


Рис. 2. Спектр ИК-эмиссии бактериородопсина в пленке (а) и водном растворе (б). Спектры записаны с использованием видимого света, попадающего в резонанс с полосой электронного поглощения хромофорного ретиналя ($\lambda_{\max} = 568$ нм), тем самым обеспечивающего избирательность процесса по отношению к ретинальному хромофору. Спектры записаны при комнатной температуре с накоплением 400 сканов и спектральным разрешением 4 см^{-1} . Курсивом отмечены колебания хромофорного ретиналя (см^{-1}), обычным шрифтом – колебания белка.

усиление сигнала (более чем в десять раз) [82]. Извлекаемая из спектров ИК-эмиссии структурная информация аналогична той, что извлекается из спектров ИК-поглощения и комбинационного рассеяния, поскольку и в том и другом случае наблюдаются те же самые колебательные моды [61, 83].

В данной работе представлены результаты экспериментов по селективному возбуждению отдельных репортерных групп в лизине с целью демонстрации возможностей метода в получении информации об энергетических состояниях и механизмах диссипации поглощенной энергии.

В этих экспериментах в качестве внешнего источника света использовали глобар, излучение которого пропускали через инфракрасные узко-

полосные фильтры (рис. 4). Образцы лизина были использованы в виде пленок.

Линейная структура молекулы лизина проявляла заметную чувствительность к частотам возбуждающего света. Получаемый избыток колебательной энергии в лизине напрямую не переизлучался акцептирующей модой, а перераспределялся между модами. Характер перераспределения полученного избытка колебательной энергии и величина сигнала ИК-эмиссии зависели не столько от величины получаемого избытка энергии, сколько от специфики самой акцептирующей моды (см., например, рис. 5), что, по-видимому, определяется характером внутримолекулярного взаимодействия между модами.

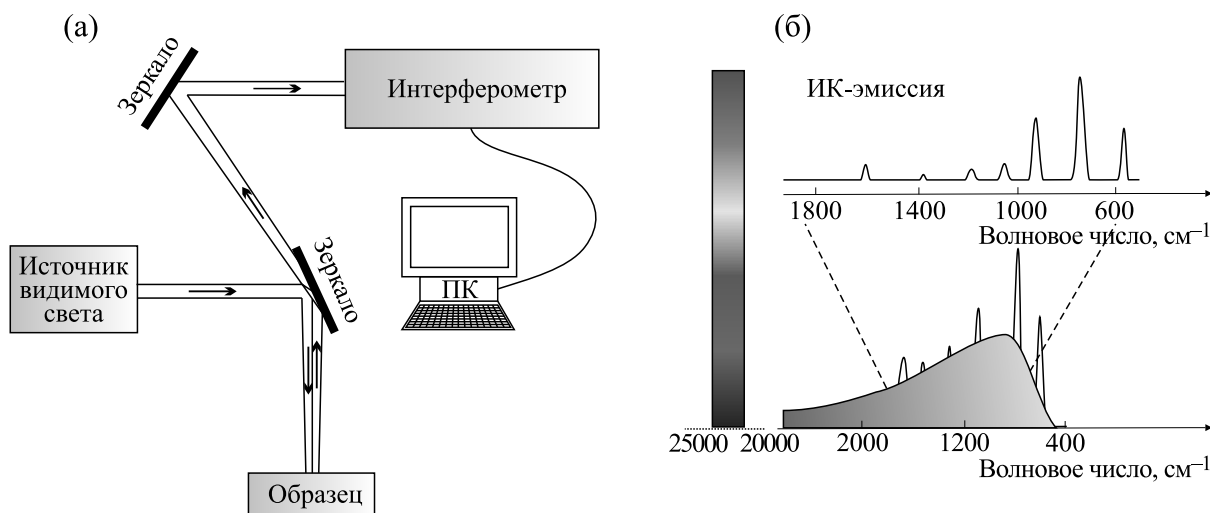


Рис. 3. (а) — Схема установки, используемой для возбуждения эмиссии; (б) — схематическое изображение регистрируемых спектров. Регистрация ИК-спектров эмиссии проводится с помощью охлаждаемых жидким азотом низкотемпературных ртуть-кадмий-теллурических приемников.

Так, при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего при 936 см^{-1} в спектральном интервале шириной 134 см^{-1} в ИК-спектре излучения (рис. 5а), наблюдается целый ряд полос, наиболее сильные из которых — возле 669 см^{-1} (COO^-)деф., 794 см^{-1} (COO^-)деф., 1221 см^{-1} (C-OH)деф., 1336 см^{-1} (CH_2)деф. и 2826 см^{-1} (валентные CH) CH -колебания). В то же время при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего при 1007 см^{-1} в спектральном интервале шириной 32 см^{-1} , где акцептирующей модой являются валентные колебания C-C -группы, в ИК-спектре излучения (рис. 5б) наблюдаются полосы, наиболее сильные из которых находятся возле 674 см^{-1} (COO^-)деф., 1600 см^{-1} (NH_3^+) $_{\text{ас}}$ деф., 1884 , 2280 и 2882 см^{-1} . Высоочастотные полосы 1884 , 2280 и 2882 см^{-1} попадают в область составных частот и обертонов валентных колебаний C-N -групп. Хотя во втором случае мощность падающего света была почти в три раза ниже, интенсивность ИК-спектров (рис. 5а и 5б) была практически одинаковой.

В то же время при использовании полосового фильтра, максимально пропускающего излучение при 1240 см^{-1} , в спектральном интервале шириной 162 см^{-1} интенсивность ИК-спектра (рис. 5в) была ниже при более высокой мощности падающего света. В этом случае зондирующий луч попадал в область крутильных CH_2 -групп. В спектре ИК-излучения наблюдались полосы,

имеющие другое относительное распределение интенсивности по сравнению со спектрами (рис. 5а и 5б). Среди них наиболее сильными являются полосы возле 674 см^{-1} (COO^-)деф., 821 см^{-1} (не отнесена) см^{-1} , 911 см^{-1} (не отнесена), 1186 см^{-1} (CH_2)деф., 1401 см^{-1} (COO^-), широкая полоса с максимумом возле 1860 см^{-1} и узкая полоса 2123 см^{-1} . Эти две высокочастотные полосы попадают в область составных частот и обертонов валентных колебаний C-N -групп. Аналогично, спектры на рис. 5г и 5д демонстрируют большой набор полос, относительное распределение интенсивности между которыми отличалось от того, что наблюдали выше. Интересно, что во всех рассмотренных случаях рассеивание колебательной энергии происходило преимущественно с участием CH - и COO^- -групп, а не NH_3^+ . При этом в спектрах можно видеть, что перенос энергии происходит не только в направлении от высокочастотных высоких колебаний на более низкие по энергии низкочастотные колебания, но и, наоборот, с низкочастотных колебаний происходит перенос энергии на большие по энергии высокочастотные колебания. Фактически в этих экспериментах в молекуле лизина наблюдалось движение энергии не только вниз, как при механизме ступенчатого размена энергии, но и вверх, что возможно только при наличии в молекуле тесного ангармонического взаимодействия между модами [87–89]. За счет этого возбуждение какого-либо локального колебания было способно «активировать» достаточно большое число колебательных мод, частоты которых

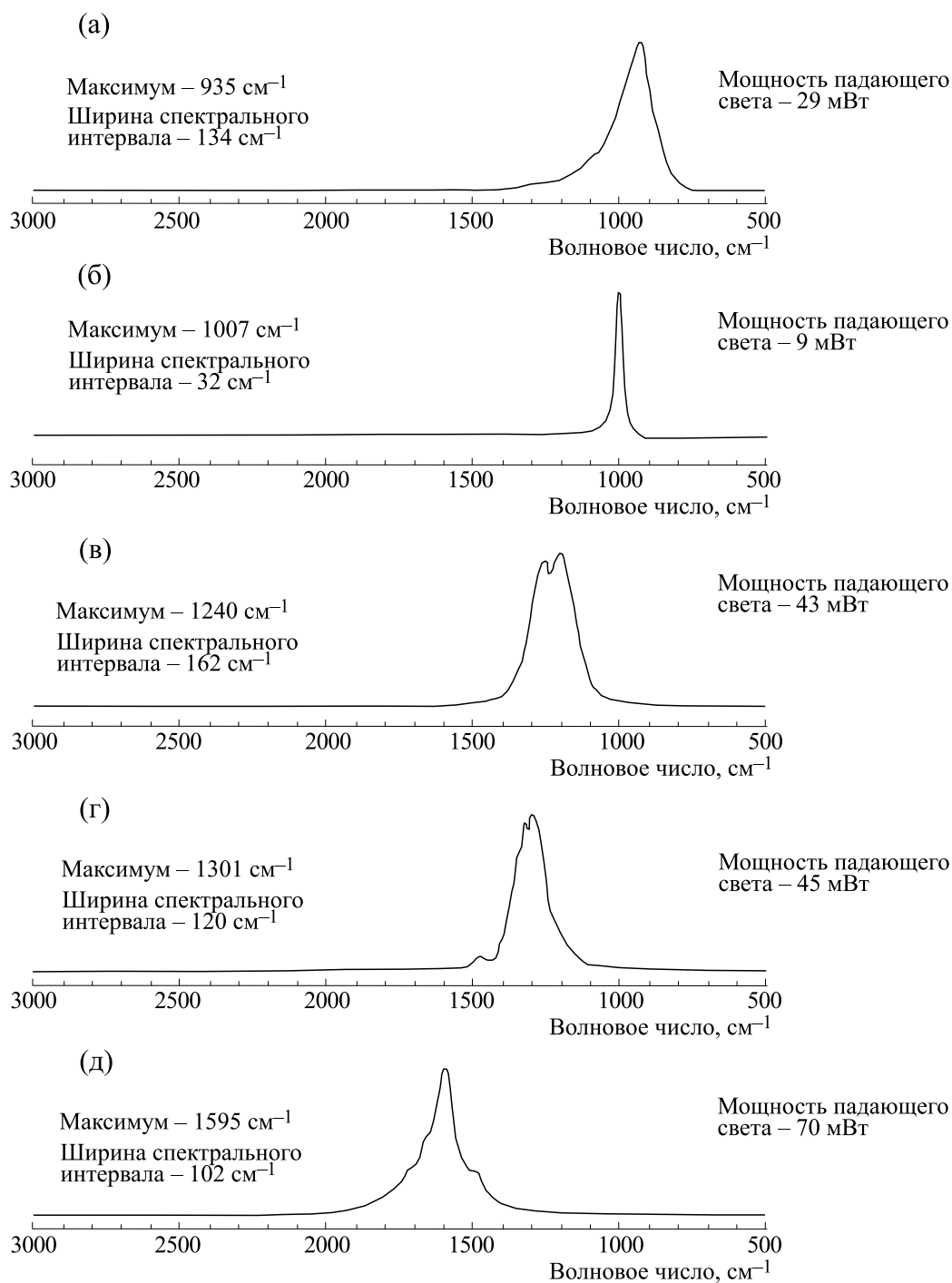


Рис. 4. Характеристики ИК-фильтров, используемых для возбуждения молекулы лизина разными участками ИК-спектра.

локализованы в широком спектральном диапазоне, включая область «отпечатков пальцев», низких частот и область обертонов. Этот результат представляется особенно важным, поскольку он показывает, что небольшое по энергии колебательное возбуждение равновесной структуры молекулы вполне достаточно для того, чтобы изменить подвижную геометрию лизина, вовлекая ее

во множество разнообразных колебательных движений, многие из которых могли совершаться с большой амплитудой. Участие большого числа колебаний в релаксационном процессе является отображением легкого преодоления энергетических барьеров в распространении энергии и высокой подвижности структуры молекулы лизина в колебательно-возбужденном состоянии. Лизин,

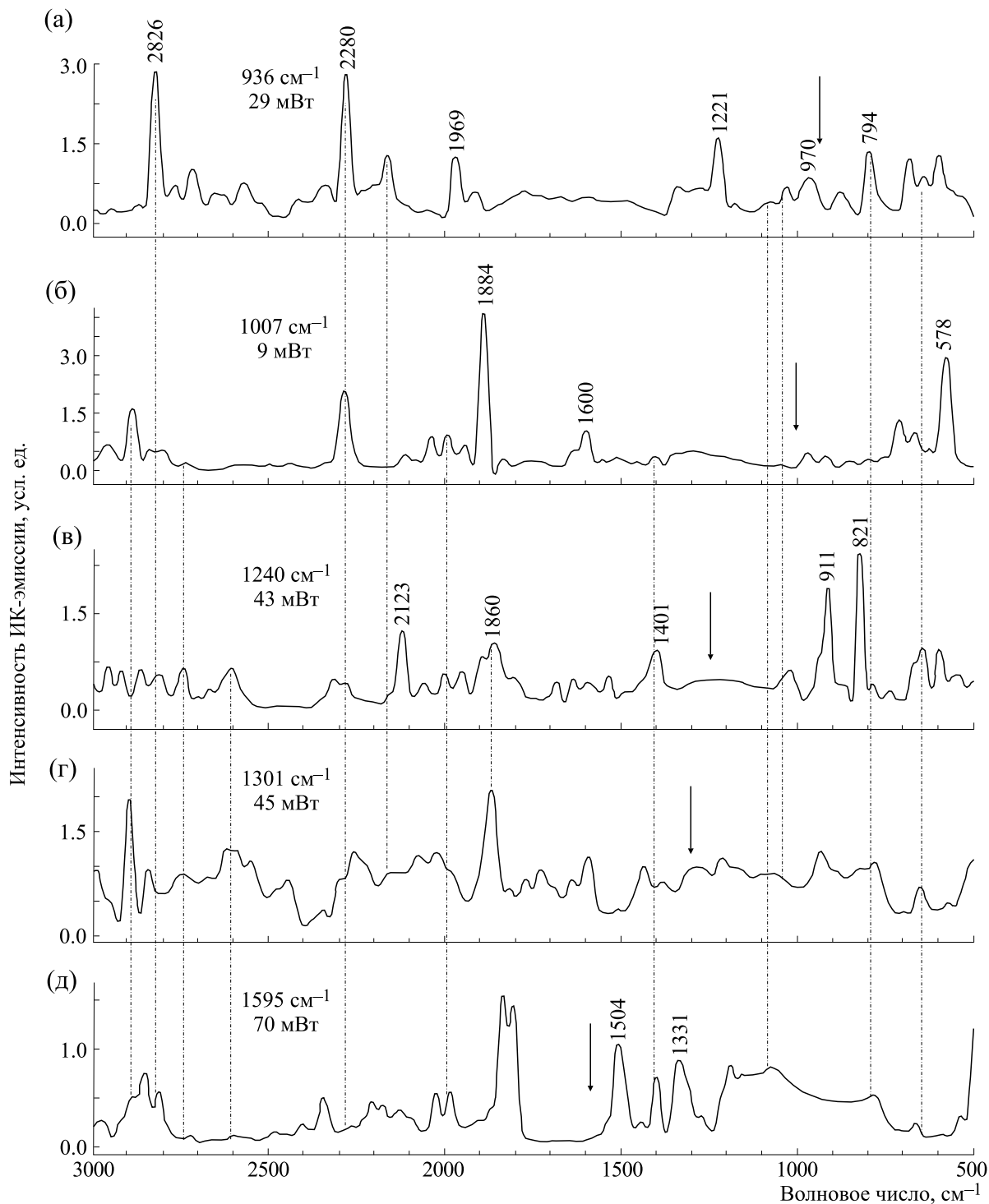


Рис. 5. Спектр ИК-эмиссии L-лизина гидрохлорида в диапазоне 2000–700 см^{-1} , записанный при освещении узкими участками среднего ИК-диапазона. Отнесение полос в спектре проводили на основе данных работ [5, 31, 84–86].

как известно, присутствует практически во всех активных центрах белков и ферментов, и такая лабильность его структуры имеет большое значение для проявления биологической активности лизина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что возможность регистрации с помощью ИК-Фурье-техники слабой ИК-эмиссии представляет собой простое и в то же время чувствительное средство

получения химической и структурной информации о биологических молекулах. Инфракрасная эмиссионная спектроскопия с преобразованием Фурье как биофизический метод может быть особенно полезен при изучении механизма фотофизических и биохимических реакций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach* (John Wiley & Sons, 2005).
2. S. Krimm and J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* **38**, 181 (1986).
3. E. B. Wilson, Jr., J. C. Decius, and P. C. Cross, *Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra* (Dover Publications, N.-Y., 1980).
4. H. Callender and B. Honig, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 33 (1977).
5. L. J. Bellamy, *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, 3rd ed. (Halsted Press, J. Wiley & Sons, Inc., N.-Y., 1975).
6. Р. Збинцен, *Инфракрасная спектроскопия высокополимеров*, под ред. Л. А. Блюменфельда (Мир, М., 1966).
7. A. Elliott and E. J. Ambrose, *Nature* **165**, 921 (1950).
8. T. Miyazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 712 (1961).
9. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta* **1767** (9), 1073 (2007).
10. W. Mäntele, *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.* **138**, 964 (2015).
11. J. K. Koenig and Sh. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **39** (8), 549 (2007).
12. А. Эллиот, *Инфракрасные спектры и структура полимеров* (Мир, М., 1972).
13. A. Barth and C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.* **35** (4), 369 (2002).
14. S. Krimm and J. Bandekar, *Biopolymers* **19**, 1 (1980).
15. M. C. Manning, *Expert. Rev. Proteom.* **2** (5), 731 (2005).
16. Ю. Н. Чиргадзе, *Структура и стабильность биологических макромолекул* (Наука, М., 1973).
17. T. Miyazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 712 (1961).
18. W. K. Surewicz and H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 115 (1988).
19. R. Gilmanishin, S. Williams, R. H. Callender, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3709 (1997).
20. E. L. Karjalainen and A. Barth, *J. Phys. Chem. B* **116**, 4448 (2012).
21. H. Susi and D. M. Byler, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115** (1), 391 (1983).
22. D. M. Byler and H. Susi, *Biopolymer* **25**, 469 (1986).
23. W. K. Surewicz and H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 115 (1988).
24. A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141 (2000).
25. P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Wiley Interscience, N.-Y., 1986).
26. P. I. Haris and D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **943** (2), 375 (1988).
27. M. C. Manning, *Expert. Rev. Proteom.* **2** (5), 731 (2005).
28. S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, *Biopolymers* **30**, 1243 (1990).
29. S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, *Biopolymers* **30**, 1259 (1990).
30. N. N. Kalnin, I. A. Baikalov, and S. Y. Venyaminov, *Biopolymer* **30**, 1273 (1990).
31. Y. N. Chirgadze, O. V. Fedorov, and N. P. Trushina, *Biopolymers* **14**, 679 (1975).
32. A. Dong, P. Huang, and W. S. Caughey, *Biochemistry* **29**, 3303 (1990).
33. B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (CRC Press, Boca Raton, 1996).
34. J. K. Kauppinen, D. J. Moffatt, H. H. Mantsch, et al., *Appl. Spectrosc.* **35**, 271 (1986).
35. D. C. Lee, P. I. Haris, D. Chapman, et al., *Biochemistry* **29**, 9185 (1990).
36. R. W. Sarver and W. C. Krueger, *Anal. Biochem.* **194**, 89 (1991).
37. A. Barth and C. Zscherp, *FEBS Lett.* **477**, 151 (2000).
38. M. van de Weert, P. I. Haris, W. E. Hennink, et al., *Anal. Biochem.* **297** (2), 160 (2001).
39. R. Chehín, I. Iloro, M. J. Marcos, et al., *Biochemistry* **38**, 1525 (1999).
40. P. Herman, M. Staiano, A. Marabotti, et al., *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **63**, 754 (2006).
41. K. J. Rothschild, M. Zagaeski, and A. Cantore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103** (2), 483 (1981).
42. K. J. Rothschild, H. Marrero, M. Braiman, et al., *Photochem. Photobiol.* **40**, 675 (1984).
43. K. J. Rothschild, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 147 (1992).
44. K. J. Rothschild, *Biomed. Spectroscopy and Imaging* **5** (3), 231 (2016).
45. W. Mantele, *Trends Biosci. J.* **18**, 197 (1993).
46. F. Siebert, W. Mäntele, and W. Kreutz, *FEBS Lett.* **141**, 82 (1982).
47. F. Siebert and W. Mäntele, *Eur. J. Biochem.* **130** (3), 565 (1983).
48. F. Siebert, *Methods Enzymol.* **246**, 501 (1995).
49. R. A. Mathies, C. H. Cruz Brito, W. T. Pollard, et al., *Science* **240** (4853), 777 (1988).
50. R. A. Mathies, S. W. Lin, J. B. Ames, et al., *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 491 (1991).
51. H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (10), 5046 (1979).
52. A. Maeda, *Isr. J. Chem.* **35**, 387 (1995).
53. A. Maeda, J. E. Morgan, R. B. Gennis, et al., *Photochem. Photobiol.* **82** (6), 1398 (2006).

54. A. Maeda, R. B. Gennis, S. P. Balashov, et al., *Biochemistry* **44** (16), 5960 (2005).
55. M. S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, et al., *Biochemistry* **27**, 8516 (1988).
56. M. S. Braiman, T. Mogi, L. J. Stern, et al., *Proteins: Structure, Function and Bioinformatic* **3** (4), 219 (1988).
57. K. Gerwert and F. Siebert, *EMBO J.* **5** (4), 805 (1986).
58. K. Gerwert, B. Hess, and M. Engelhard, *FEBS Lett.* **261**, 449 (1990).
59. Н. Харрик, *Спектроскопия внутреннего отражения* (Мир, М., 1970).
60. J. M. Chalmers and M. W. Mackenzie, in *Advances in Applied Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, ed. by M. W. Mackenzie (Wiley & Sons. Ltd., Chichester and N.-Y., 1988), pp. 170–188.
61. P. R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.* **26**, 73 (1972).
62. F. J. De Blase and S. Compton, *Appl. Spectrosc.* **45** (4), 611 (1991).
63. J. Mink and G. Keresztury, *Appl. Spectrosc.* **47** (9), 1446 (1993).
64. E. L. Terpugov, O. V. Degtyareva, and V. V. Savransky, *J. Rus. Laser Research* **37** (5), 401 (2016).
65. J. Breton, E. Nabedryk, and A. Clerici, *Vib. Spectrosc.* **19**, 71 (1999).
66. F. Garczarek, J. Wang, M. A. El-Sayed, et al., *Biophys. J.* **87** (4), 2676 (2004).
67. J. Wang and M. A. El-Sayed, *Biophys. J.* **90**, 961 (2001).
68. E. L. Terpugov and O. V. Degtyareva, *Biochemistry (Moscow)* **66**, 1315 (2001).
69. E. L. Terpugov and O. V. Degtyareva, *J. Mol. Struct.* **565–566**, 287 (2001).
70. A. G. Gagarinov, O. V. Degtyareva, A. A. Khodonov, et al., *Vibrat. Spectrosc.* **42**, 231 (2006).
71. J. Wang and M. A. El-Sayed, *Biophys. J.* **83** (3), 1589 (2002).
72. G. I. Groma, J. Hebling, I. Z. Kozma, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (6), 1706 (2008).
73. G. I. Groma, A. Colonna, J. Lambry, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (19), 6888 (2004).
74. I. G. Groma, A. Colonna, J.-L. Martin, et al., *Biophys. J.* **100** (6), 1578 (2011).
75. Е. Л. Терпугов и О. В. Дегтярева, *Письма ЖЭТФ* **73** (6), 320 (2001).
76. Е. Л. Терпугов, О. В. Дегтярева, А. Г. Гагаринов и др., *Краткие сообщения по физике ФИАН* **12**, 13 (2004).
77. Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics* (John-Wiley & Sons, N.-Y., 1984).
78. S. A. Akhmanov and R. V. Khokhlov, *Problems of Nonlinear Optics* (Nauka Publ., Moscow, 1964).
79. В. С. Горелик, В. А. Зубов, М. М. Сущинский и др., *Письма ЖЭТФ* **4**, 52 (1966).
80. F. De Martini, *Appl. Phys.* **37**, 4503 (1966).
81. D. H. McMahon and A. R. Franklin, *J. Appl. Phys.* **36**, 2073 (1965).
82. S. E. Terpugova, O. V. Degtyareva, V. V. Savransky, et al., *Am. J. Anal. Chem.* **6**, 731 (2015). DOI: 10.4236/ajac.2015.69070
83. A. Tsuge, Y. Uwamino, and T. Ishizuka, *Appl. Spectrosc.* **43** (7), 1145 (1989).
84. M. Wolpert and P. Hellwig, *Spectrochim. Acta Part A* **64**, 987 (2006).
85. A. M. Petrosyan and V. V. Ghazaryan, *J. Mol. Struct.* **917**, 56 (2009).
86. *Handbook of vibrational spectroscopy*, Ed. by J. M. Chalmers and P. R. Griffiths (Wiley & Sons Ltd, 2002).
87. М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич и Б. И. Степанов, *Колебания молекул* (Гос. изд-во науч.-теор. лит-ры, М.–Л., 1949).
88. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей* (Наука, Л., 1967).
89. D. D. Dlott, *Chem. Physics* **266**, 149 (2001).

Fourier Transform Infrared Emission Spectroscopy in the Studying of Biological Molecules

E.L. Terpugov

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Infrared spectroscopy is a powerful analytical tool that is yet to be fully developed in relation to biological systems. Previously, this method has been successfully used to analyze the secondary structure. This mini-review shows the latest advances in the study of proteins using the Fourier transform infrared technique. The application of Fourier transform infrared emission spectroscopy to the study of photophysical and photochemical reactions in photoreceptor proteins is discussed.

Keywords: FT-IR spectroscopy, stimulated infrared emission, visible/infrared light, protein, protein-pigment complex, aminoacids