

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Switzer R. S., Merril C. R., Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1979. — 98, N 1. — P. 231—237.
2. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in PAAG // *Ibid.* — 1980. — 105, N 2. — P. 361—363.
3. *Ultrasensitive stain for proteins in PAAG shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins* / C. R. Merril, D. Goldman, S. A. Sedman, M. N. Ebert // *Science.* — 1981. — 211, N 4489. — P. 1437—1438.
4. Ohsawa K., Ebata N. Silver stain for detection 10 femtogram quantities of protein after PAAG // *Anal. Biochem.* — 1983. — 135, N 2. — P. 409—415.
5. Heukeshoven J., Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining // *Electrophoresis.* — 1985. — 6, N 1. — P. 103—112.
6. Blum H., Beier H., Gross H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1987. — 8, N 1. — P. 93—99.
7. Wedrychowski A., Olinski R., Hnilica L. S. Modified method of silver staining of proteins in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1986. — 159, N 2. — P. 323—328.
8. Beidler J. L., Hilliard P. R., Rill R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver // *Ibid.* — 1982. — 126, N 2. — P. 374—380.
9. Brown M., Petric M., Middleton P. J. Silver staining of DNA restriction fragments for the rapid identification of adenovirus isolated // *J. Virol. Meth.* — 1984. — 9, N 1. — P. 87—98.
10. Peats S. Quantitation of protein and DNA in silver stained agarose gels // *Anal. Biochem.* — 1984. — 140, N 1. — P. 178—182.
11. Berry M. J., Samuel C. E. Detection of subnanogram amounts of RNA in polyacrylamide gels in the presence and absence of proteins by staining with silver // *Ibid.* — 1982. — 124, N 1. — P. 180—184.
12. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels / W. Wray, T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancoc // *Ibid.* — 1981. — 118, N 1. — P. 197—203.
13. Friedman R. D. Comparison of four different silver staining techniques for salivary proteins detection in alaline polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1982. — 126, N 2. — P. 346—349.
14. Nielsen B. L., Brown L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1984. — 141, N 2. — P. 311—315.
15. *Molecular probes for human genetics diseases by two-dimensional electrophoresis and silver staining* / C. R. Merril, D. Goldman, M. L. van Keuren, M. H. Ebert // *Electrophoresis-82. Adv. Meth. Biochem. and Clin. Appl. Proc.* / Ed. D. Stathkos. — Berlin; New York: Walter de Gruyted and Co., 1983. — P. 327—342.

Новосиб. гос. ун-т им. Ленинского комсомола
ВНИИ молекуляр. биологии, пос. Кольцово Новосибир. обл.

Получено 02.01.90

УДК 535.3:543.423:577.1

© Д. Н. Говорун, Я. Р. Мищук, Н. В. Желтовский, 1990

К ВОПРОСУ О ПРИРОДЕ НИЗКОЧАСТОТНЫХ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА БИОПОЛИМЕРОВ

Работа посвящена анализу некоторых особенностей низкочастотного КР света в биополимерах. Авторы уделяют внимание проблеме идентификации низкочастотных колебательных мод биополимеров на внутренние и внешние, показывают, к каким неконтролируемым погрешностям приводит неучет фактора Бозе — Эйнштейна, приходят к выводу о перспективности низкочастотного КР света для определения фрактальных свойств биополимеров.

В последнее время возрос интерес к экспериментальному исследованию низкоэнергетических ($\nu < 200 \text{ см}^{-1}$) колебательных состояний биополимеров (см., например, работы [1—8]), а также приведенную в них библиографию) методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света. Это объясняется, по-видимому, тем, что низкочастотным (НЧ) коллективным модам биополимеров, в частности ДНК, приписываются важные биологические функции [9, 10].

В этом сообщении обсуждаются некоторые особенности НЧ спектров КР биополимеров.

Существует мнение [1], что НЧ моды, поскольку они имеют коллективную природу, являются характерным спектральным свойством высокомолекулярного, а также кристаллического состояния вещества, а низкомолекулярные соединения, в том числе многоатомные молекулы, этими особенностями не обладают.

На наш взгляд, наличие НЧ оптических колебаний не является исключительным характерным свойством высокомолекулярного или конденсированного состояния — аналогичные по частоте моды наблюдаются также и в спектрах КР низкомолекулярных структур.

Проиллюстрируем это на конкретных примерах. Так, пятиатомная тетраэдрическая молекула SnBr_4 имеет НЧ фундаментальные колебания на частотах 64 и 88 см^{-1} [11], два из фундаментальных колебаний тетраэдрического аниона CdI_4^{2-} лежат по частоте еще ниже — на 37 и 45 см^{-1} [12]. Список классических (жестких) многоатомных молекул, обладающих такими свойствами, может быть продолжен. Еще более низкими частотами обладают нежесткие, в частности Ван-дер-Ваальсовские молекулы [13]. Так, фундаментальная частота в колебательном спектре молекулы ArH^{79}Br составляет всего лишь 22,1 см^{-1} , а молекулы NeD^{35}Cl и того меньше — 21,8 см^{-1} [13, 14].

Отметим также, что НЧ колебания (фононы) наблюдаются в спектрах КР как упорядоченных (кристаллов) [15, 16], так и неупорядоченных (аморфных) сред [16], в частности жидкостей [17, 18], причем в неупорядоченных средах они могут быть охарактеризованы плохо определенным волновым вектором.

Одной из наиболее сложных задач интерпретации НЧ спектров КР биополимеров является разделение наблюдающихся колебаний на внутри- и межмолекулярные [14, 19]. Традиционно с этой целью применяют разбавление твердофазного биополимера «инертным» растворителем [1] — при этом в спектре исчезают межмолекулярные (внешние) колебания, а частоты внутримолекулярных колебаний испытывают при этом небольшое возмущение. Однако в связи с тем, что используемый растворитель, например вода, далеко не всегда удовлетворяет требованию инертности, приходится привлекать также другие независимые физические данные. Так, иногда используют аналогию со спектрами конденсированных низкомолекулярных соединений с близкими по характеру межмолекулярными связями. При этом полагают, что НЧ спектр КР биополимера сдвигается по сравнению со спектром низкомолекулярного соединения в область малых частот пропорционально относительному увеличению массы макромолекулы [1].

На наш взгляд, такой подход может быть использован в качестве нулевого приближения, так как он не учитывает того обстоятельства, что силы межмолекулярных взаимодействий в изоструктурных органических кристаллах прямо пропорциональны площадям контуров взаимодействующих молекул [20]. Именно по этой причине частоты оптических колебаний решетки, например в классическом случае насыщенных углеводородов и полиэтилена, лежат в типичном диапазоне 60—150 см^{-1} [21], а не 25 см^{-1} , как предсказывает вышеупомянутый способ оценки [1].

Эффективным, как нам представляется, способом идентификации НЧ колебаний в спектрах КР биополимеров являются температурные исследования, так как по аналогии с молекулярными кристаллами можно ожидать, что частоты межмолекулярных колебаний испытывают более значительный температурный сдвиг, нежели внутримолекулярных [15]. При этом особо перспективной в плане обсуждения физики полученных температурных эффектов может оказаться применительно, в частности, к ДНК концепция мягкой моды [22]. Следует также использовать влияние других внешних факторов, которые могут регулироваться в процессе эксперимента, — влажности, давления и т. п. В том случае, если биополимер находится в упорядоченном состоянии, очень ценную информацию о природе НЧ мод в спектрах КР могут дать поляризационные измерения.

Именно такие подходы используются в последнее время для выяснения природы низкоэнергетических колебательных состояний ДНК [4, 19]. Однако ДНК как объект исследования является настолько сложной, что во многих аспектах эта проблема еще остается открытой и однозначные окончательные выводы делать еще рано. Так, например, если ранее считалось, что самые низколежащие колебания в НЧ спектре КР ДНК являются межмолекулярными [4], то сейчас они рассматриваются как внутримолекулярные колебания, связанные с внешними

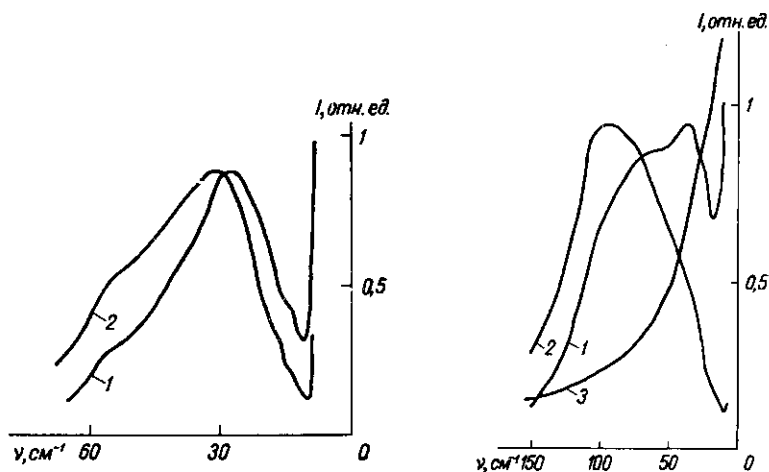


Рис. 1. Влияние фактора Бозе — Эйнштейна на НЧ спектр КР ДНК: 1 — НЧ спектр КР ДНК при 100 %-ной влажности, приведенный в работе [3]; 2 — тот же спектр, нормированный на фактор Бозе — Эйнштейна

Fig. 1. The influence of the Bose-Einstein factor on the low-frequency Raman spectrum of DNA: 1 — the low-frequency Raman spectrum of DNA at 100 % r. h., given in paper [3]; 2 — the same spectrum, normalized by the Bose-Einstein factor

Рис. 2. Влияние фактора Бозе — Эйнштейна на НЧ спектр КР монокристалла α -химотрипсина: 1 — спектр КР монокристалла α -химотрипсина, полученный в работе [2]; 2 — тот же спектр, нормированный на фактор Бозе — Эйнштейна; 3 — частотный ход фактора Бозе — Эйнштейна при комнатной температуре

Fig. 2. The influence of the Bose-Einstein factor on the low-frequency Raman spectrum of monocrystalline α -chymotrypsin: 1 — a spectrum of monocrystalline α -chymotrypsin, given in [2]; 2 — the same spectrum, normalized by the Bose-Einstein factor; 3 — the frequency behavior of the Bose-Einstein factor at room temperature

сверхзатухающими релаксационными модами [19]. Следует заметить при этом, что наличие сильной ангармонической связи колебаний делает разделение их на внутренние и внешние во многом условным.

Обратим внимание еще на одну особенность НЧ КР света в биополимерах.

В соответствии с флуктуационно-диссипативной теоремой интенсивность КР света описывается выражением [23]

$$I(\nu) = C\chi''(\nu)[n(\nu, T) + 1],$$

где C — константа; $\chi''(\nu)$ — мнимая часть комплексной восприимчивости системы; $n(\nu, T) + 1$ — фактор Бозе — Эйнштейна, причем $n(\nu, T) = [\exp(h\nu c/kT) - 1]^{-1}$. Остальные обозначения общепринятые. При комнатной температуре на высоких частотах фактор Бозе — Эйнштейна практически равен единице. Неучет же искажающего его влияния на низких частотах ($\nu < 200 \text{ см}^{-1}$), как нетрудно видеть, может привести к некорректным выводам, сделанным на основе экспериментальной информации, так как в конечном итоге физический смысл имеет функция отклика системы. Таким образом, чтобы сохранить единый физический смысл получаемых результатов и делать на их основе адекватные выводы, спектр КР биополимера (особенно это касается НЧ его области) должен быть представлен в формате $I(\nu)/[n(\nu, T) + 1]$, т. е. нормирован на фактор Бозе — Эйнштейна [17, 18, 24].

Обычно это обстоятельство при изучении НЧ спектров КР биополимеров во внимание не принимается, что является источником неконтролируемых погрешностей. Так, в качестве наглядного примера на рис. 1 и 2 приведены экспериментально записанные [2, 3] и корректно обработанные КР-спектрограммы некоторых биополимеров. Нетрудно видеть, что влияние фактора Бозе — Эйнштейна проявляется в существенной трансформации формы НЧ полос, а также в изменении частотных положений их пиков. Так, в спектре КР ДНК (рис. 1) истинное положение пика НЧ полосы ($33,5 \text{ см}^{-1}$) отличается от наблюдаемого (30 см^{-1}) на $3,5 \text{ см}^{-1}$, т. е. более чем на 10 %. Если при этом функцию отклика ДНК моделировать затухающим осциллятором [17, 18] или системой связанных затухающих осцилляторов [24], то разница возрастает еще больше, не говоря уже о физической корректности получаемых результатов.

В заключение остановимся еще на одном интересном вопросе — использовании НЧ КР света для определения фрактальной (спектральной) размерности биополимерных систем (более подробно о фракталах см. монографию [25]). Методика таких измерений в принципе не сложна, отработана на аморфных органических полимерах (см., например, [26]) и сводится к исследованию спектральной зависимости интенсивности НЧ КР света в области частот, прилегающей к возбуждающей линии ($0 < \nu < 150 \text{ см}^{-1}$). Учитывая, однако, что биополимеры являются системами, сильно рассеивающими свет (в настоящее время пока еще очень трудно получать качественные монокристаллы широкого класса биополимеров с размерами, достаточными для оптических исследований), к спектральной аппаратуре, предназначенной для такого рода измерений, должны предъявляться высокие метрологические требования и в первую очередь — к уровню рассеянного света. Приемлемым можно считать уровень паразитного света в спектральном приборе не хуже 10^{-14} на расстоянии 50 см^{-1} от возбуждающей. Хорошие результаты получаются при использовании йодных фильтров для подавления лазерного излучения ($\lambda = 514,5 \text{ нм}$) [27] с набором дополнительных приспособлений, позволяющих автоматически компенсировать их селективность на длинах волн, отличных от лазерной [28].

Представляется очень заманчивым наблюдение при помощи НЧ спектроскопии КР света за изменением фрактальной размерности биомолекулярных систем при комплексообразовании, например, при актах белково-нуклеинового узнавания.

CONCERNING THE PROBLEM ON THE NATURE OF LOW-FREQUENCY RAMAN SPECTRA OF BIOPOLYMERS

D. N. Govorun, Ya. R. Mishchuk, N. V. Zheltovsky

Institute of Molecular Biology and Genetics
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The paper is devoted to analysis of some peculiarities of low-frequency Raman scattering in biopolymers. An attention is paid to the problem on identification of low-frequency vibrational modes of biopolymers to internal and external ones, and it is shown, that neglect of the Bose-Einstein factor leads to uncontrolled errors. It is concluded that low-frequency Raman scattering is promising to determine fractal properties of biopolymers.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peticolas W. L.* Low frequency vibrations and the dynamics of proteins and polypeptides // *Meth. Enzymol.* — 1979. — **61**. — P. 425—458.
2. *Conformationally dependent low-frequency motions of proteins by laser Raman spectroscopy (α -chymotrypsin/protein conformation) / K. G. Brown, S. C. Erfurth, E. W. Small, W. L. Peticolas // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1972.—**60**.— N 2.— P. 1467—1469.*

3. *Painter P. C., Mosher L., Rhoads C.* Low frequency modes in the Raman spectrum of DNA // *Biopolymers*. — 1981. — 20, N 1. — P. 243—247.
4. *Low-lying collective vibrational modes in DNA double helix/H. Urabe, Y. Tomimaga, K. Kubota et al.* // *Proc. 9 Int. conf. Raman Spectroscopy*. — Tokyo, 1984. — P. 158—159.
5. *Weidlich T., Lindsay S. M.* Raman study of the low-frequency vibrations of polynucleotides // *J. Phys. Chem.* — 1988. — 92, N 23. — P. 6479—6482.
6. *Low-frequency Raman spectra of DNA: a comparison between two oligonucleotide crystals and highly crystalline films of calf thymus DNA/T. Weidlich, S. M. Lindsay, S. A. Lee et al.* // *J. Phys. Chem.* — 1988. — 92, N 12. — P. 3315—3317.
7. *Aspects of low frequency vibrations (20—350 cm⁻¹) from Watson-Crick base pairing in an aqueous solution of tRNA/O. F. Nielsen, P.-A. Lund, L. S. Nielsen, E. Praestgaard* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1983. — 111, N 1. — P. 120—126.
8. *Webb S. J.* Laser-Raman spectroscopy of living cells // *Phys. Rep.* — 1980. — 60, N 4. — P. 201—224.
9. *Chou K.-C.* Low-frequency collective motion in biomacromolecules and its biological functions // *Biophys. Chem.* — 1988. — 30, N 1. — P. 3—48.
10. *Chou K.-C., Mao B.* Collective motion in DNA and its role in drug interaction // *Biopolymers*. — 1988. — 27, N 11. — P. 1795—1815.
11. *Кольрауш К.* Спектры комбинационного рассеяния. — М.: Изд-во иностр. лит., 1952. — 466 с.
12. *Тобиас Р. С.* Применение спектроскопии комбинационного рассеяния в неорганической химии / Применение спектров комбинационного рассеяния. — М.: Мир, 1977. — С. 13—120.
13. *Hydrogen bonds* // Ed. P. Schuster. — Berlin: Springer, 1984. — 117 p.
14. *Van-der-Waals systems*. — Berlin: Springer, 1981. — 125 p.
15. *Сущинский М. М.* Спектры комбинационного рассеяния молекул и кристаллов. — М.: Наука, 1969. — 576 с.
16. *Рассеяние света в твердых телах* / Под ред. М. Кардоны. — М.: Мир, 1979. — 392 с.
17. *Говорун Д. Н., Желтовский Н. В., Мищук Я. Р.* Комбинационное рассеяние света на квазилибрионах в жидких O₂, N₂ и CO вблизи тройной точки // *Тез. докл. 4-й Всесоюз. конф. по спектроскопии КР света*. — Красноярск, 1989. — Ч. 1. — С. 30—31.
18. *Говорун Д. Н., Клименко В. А., Коротков П. А.* Применение спектроскопии КР для исследования квазифононных состояний в неупорядоченных средах // *Тез. докл. 11-го Всесоюз. науч. совещ. по применению колебательных спектров к исследованию неорганических и координационных соединений*. — Красноярск, 1987. — С. 28—29.
19. *Coupled dynamics between DNA double helix and hydrated water by low frequency Raman spectroscopy/Y. Tomimaga, M., Shida, K. Kubota et al.* // *J. Chem. Phys.* — 1985. — 83, № 11. — P. 5972—5975.
20. *Коршунов А. В., Тустановская Е. К.* О потенциалах межмолекулярных взаимодействий в кристаллах некоторых органических соединений // *Вопр. молекуляр. спектроскопии*. — Новосибирск: Наука, 1974. — С. 108—110.
21. *Лейнтер П., Коулмен М., Кениг Дж.* Теория колебательной спектроскопии. Приложение к полимерным материалам. — М.: Мир, 1986. — 580 с.
22. *Devi Prasad K. V., Prohofsky E. W.* Conformational changes in DNA and soft modes // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* — 1985. — 3, N 3. — P. 551—558.
23. *Burker A. S., Loudon R.* Response function in the theory of Raman scattering by vibrational and polariton modes in dielectric crystals // *Rev. Mod. Phys.* — 1972. — 44, N 1. — P. 18—47.
24. *Говорун Д. Н., Клименко В. А., Коротков П. А.* Взаимодействие низкочастотных оптических колебаний в кристалле дигидрофосфата калия // *Оптика и спектроскопия*. — 1986. — 60, № 5. — С. 993—997.
25. *Mandelbrot B. B.* The fractal geometry of nature. — New York: W. H. Freeman and Co., 1983. — 468 p.
26. *Неупругое рассеяние света на фрактальных колебательных модах в полимерах/ В. А. Багрянский, В. К. Малиновский, В. Н. Новиков и др.* // *Физика твердого тела*. — 1988. — 30, № 8. — С. 2360—2366.
27. *Raman scattering from low frequency phonons in macromolecules/J. L. Lippert, G. W. Hibler, E. W. Small, W. L. Peticolas* // *Proc. 2 Int. conf. light scattering in solids*. — Paris, 1971. — P. 342—345.
28. *Scherer J. P.* Removal of I₂ absorption lines from 514 nm excited Raman spectra // *Appl. Optics*. — 1978. — 17, N 10. — P. 1621—1623.

Инт. молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 16.11.89