

Четырехфотонная спектроскопия крыла Рэлея водного раствора белка α -химотрипсин

А.Ф.Бункин, С.И.Лебеденко, А.А.Нурматов, С.М.Першин

Впервые с помощью нелинейной лазерной спектроскопии четырехфотонного рассеяния в водных растворах белка α -химотрипсин и перекиси водорода, а также в деионизованной воде Milli-Q в диапазоне частот 0–100 см⁻¹ обнаружены спектры когерентных либраций молекул H₂O, совпадающие по частотам с вращательными спектрами H₂O в газовой фазе. Резонансный вклад молекулярных либраций в сигнал четырехфотонного рассеяния существенно возрастает при переходе от воды к водным растворам и увеличивается при дальнейшем разбавлении. В спектрах четырехфотонного рассеяния зарегистрированы резонансы, относящиеся к линиям газовой фазы орто- и парамодификаций основного изотопа молекулы H₂O. Обнаружено, что молекула белка в растворе селективно взаимодействует с парамодификацией молекулы H₂O, что дает возможность интерпретировать некоторые особенности воздействия микроволнового излучения на биологические объекты и разработать новый класс лазерных биотехнологий.

Ключевые слова: нелинейная лазерная спектроскопия, четырехфотонное рассеяние, низкочастотная спектроскопия белков.

1. Введение

Низкочастотные резонансы, существующие в молекулах белков, аминокислот и полимеров, вызывают в настоящее время повышенный интерес, поскольку несут информацию о геометрических характеристиках этих макромолекул, а также о процессах их взаимодействия с молекулами растворителя, когда речь идет об исследованиях в нативной среде. В большинстве случаев получить такую информацию можно лишь методами оптической спектроскопии. Однако в рамках традиционных методов спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) получение полезного сигнала в области частот менее 100 см⁻¹ становится затруднительным вследствие высокого уровня оптических шумов.

Эффективно решить данную задачу можно с использованием четырехфотонной спектроскопии крыла Рэлея [1–3], которая позволяет существенно повысить отношение сигнал/шум в низкочастотных спектрах за счет фазирования в макроскопическом объеме ориентационных и трансляционных движений молекул с помощью двух лазерных волн с частотами ω_1 и ω_2 , разность которых сканируется в области крыла Рэлея. Измеряемым параметром является состояние поляризации излучения на частоте $\omega_s = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$, нелинейный источник которого [4, 5]

$$P_i^{(3)} = 6\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) E_j^{(1)} E_k^{(2)} E_l^{(1)}. \quad (1)$$

Здесь $\chi^{(3)}$ – кубическая восприимчивость среды, пропорциональная корреляционной функции флуктуаций оптической анизотропии; $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ – амплитуды взаимодействующих полей; $I_s \propto |\chi^{(3)}|^2 I_1^2 I_2$ – интенсивность регистрируемого сигнала. Подчеркнем, что лазерное поле, взаимодействуя с ансамблем молекул, задает фазу их колебательных и вращательных мод во всем объеме среды, занятом одновременно излучением с частотами ω_1 и ω_2 .

Недавно [6] с помощью такого подхода в жидкой воде был обнаружен спектр когерентных вращений молекул H₂O, идентичный спектру этих молекул в газовой фазе. Позднее спектр вращений молекул воды наблюдался также и в водном растворе белка α -химотрипсин в области крыла Рэлея при отстройках частоты в диапазоне 0–5 см⁻¹ [7]. Естественно было предположить, что если наблюдаемые линии отвечают вращательным движениям молекул воды, то вращательные резонансы должны быть зарегистрированы и при больших частотных отстройках.

В данной работе была поставлена задача получения спектров четырехфотонного рассеяния в области 0–100 см⁻¹ в макроскопическом объеме водных растворов белка α -химотрипсин. Исследованный диапазон включает в себя резонансы Бриллюэна, узкую и широкую части крыла Рэлея, возможные КР-резонансы, относящиеся к колебательным и ориентационным движениям молекулярных фрагментов белка, а также собственные низкочастотные спектры молекулы воды.

2. Эксперимент

Эксперименты проводились на установке, описанной в [3]. Две встречные волны $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ с частотами ω_1 и ω_2 распространялись в кювете с образцом. Входное и выходное окна кюветы, изготовленные из плавленого кварца, обеспечивали низкий уровень деполяризации проходящего лазерного излучения. Волна $E^{(1)}$ (излучение вто-

А.Ф.Бункин, А.А.Нурматов, С.М.Першин. Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: abunkin@orc.ru

С.И.Лебеденко. Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 3 апреля 2006 г., после доработки – 25 мая 2006 г.

рой гармоники Nd : YAG-лазера, работающего на одной продольной моде) имела круговую поляризацию, а перестраиваемая по частоте волна $E^{(2)}$ была линейно поляризована. При такой поляризации взаимодействующих волн [5, 6] в сигнале, определяемом нелинейностью (1), отсутствует нерезонансный вклад от электронной подсистемы среды.

Поскольку орты поляризации волны сигнала на частоте ω_s и волны $E^{(2)}$ неколлинеарны, а их направления распространения совпадают, сигнал селектировался призмой Глана. Ширина аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.2 \text{ см}^{-1}$) и спектральный диапазон (от -1200 до 300 см^{-1}) определялись выходными характеристиками лазера на красителе, который накачивался излучением третьей гармоники Nd : YAG-лазера и обеспечивал перестройку по частоте волны $E^{(2)}$ по программе, задаваемой компьютером. Для каждого значения частоты ω_2 производилось усреднение сигнала по 10–30 отсчетам, затем частота лазера перестраивалась автоматически с шагом $\sim 0.05 \text{ см}^{-1}$.

Измерения проводились в воде Milli-Q (H_2O), водном растворе белка α -химотрипсин и в 5%-ном растворе перекиси водорода (H_2O_2) в спектральном диапазоне $0 - 100 \text{ см}^{-1}$.

3. Результаты эксперимента

На рис.1 в увеличенном масштабе приведен фрагмент спектра воды Milli-Q (H_2O) в диапазоне $\pm 10 \text{ см}^{-1}$. Хорошо видны резонансы на частотах 2.26 ($4_{14} - 3_{21}$), 4.47 ($14_{69} - 15_{312}$), 7.76 ($5_{50} - 6_{43}$), 8.78 ($7_{70} - 8_{63}$) и $10.7 (10_{29} - 9_{36}) \text{ см}^{-1}$ (ортомодификация) и на частотах 3.21 ($5_{33} - 4_{40}$), 6.11 ($3_{13} - 2_{20}$) и $8.25 (14_{410} - 15_{313}) \text{ см}^{-1}$ (парамодификация), которые с точностью до аппаратной функции (0.2 см^{-1}) могут быть отнесены к вращательным переходам основного колебательного состояния орто- и пара-спин-изомеров молекул воды соответственно [8]. В скобках указаны вращательные квантовые числа J, K_a, K_c начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекулы воды, взятые из базы данных HITRAN [8]. Кроме того, отчетливо видны резонансы

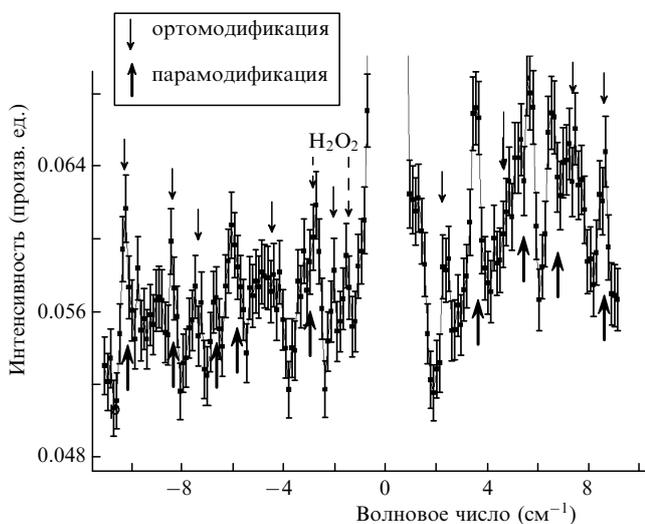


Рис.1. Фрагмент спектра воды Milli-Q (H_2O) в диапазоне частот от -10 до $+10 \text{ см}^{-1}$. Тонкими стрелками отмечены вращательные резонансы, относящиеся к ортомодификации молекулы H_2O , толстыми – к ее парамодификации.

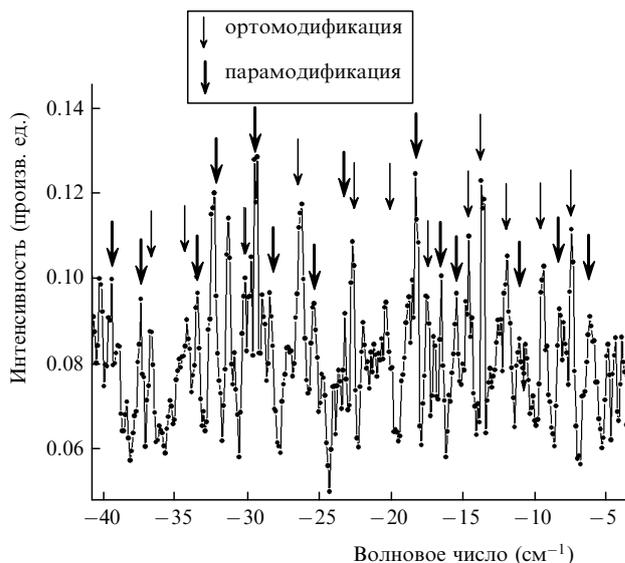


Рис.2. Спектр четырехфотонного рассеяния в воде в диапазоне частотных отстроек от -4 до -40 см^{-1} . Тонкими стрелками отмечены вращательные резонансы, относящиеся к ортомодификации молекулы H_2O , толстыми – к ее парамодификации.

нансы перекиси водорода (H_2O_2) на частотах ~ 1.8 и $\sim 2.8 \text{ см}^{-1}$, также приведенные в [8]. Указанные резонансы хорошо воспроизводились во всех измерениях.

На рис.2 представлен спектр воды в диапазоне частотных отстроек от -4 до -40 см^{-1} . С помощью данных базы HITRAN [8] все наблюдаемые в спектре резонансы могут быть отнесены к различным вращательным переходам нижнего колебательного состояния орто- и парамодификаций основного изотопа молекулы H_2O , аналогично тому, как это было сделано с резонансами, изображенными на рис.1. Резонансы орто- и парамолекул воды (как и на рис.1) отмечены стрелками разного вида.

На рис.3 приведены спектры воды и 5%-ного водного раствора перекиси водорода в диапазоне частот от -35 до -65 см^{-1} . Здесь также обнаруживаются резонансы, относящиеся к орто- и парамодификациям молекулы воды, причем эти резонансы присутствуют в спектрах обе-

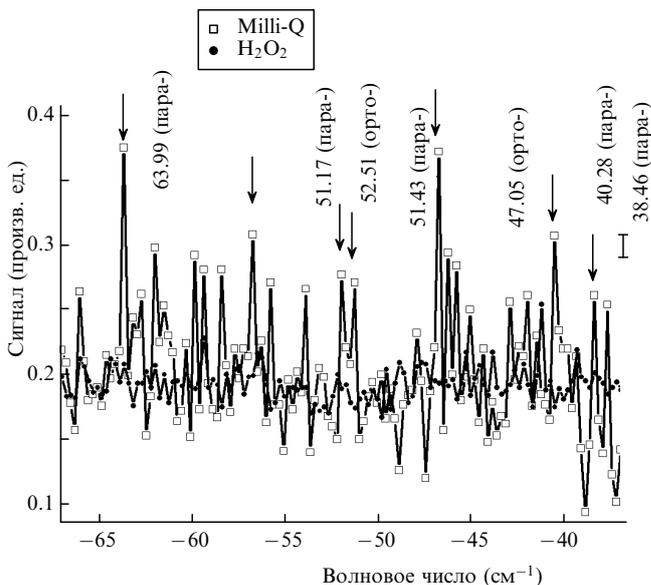


Рис.3. Фрагменты спектров 5%-ного водного раствора H_2O_2 и воды Milli-Q в диапазоне частот от -35 до -65 см^{-1} .

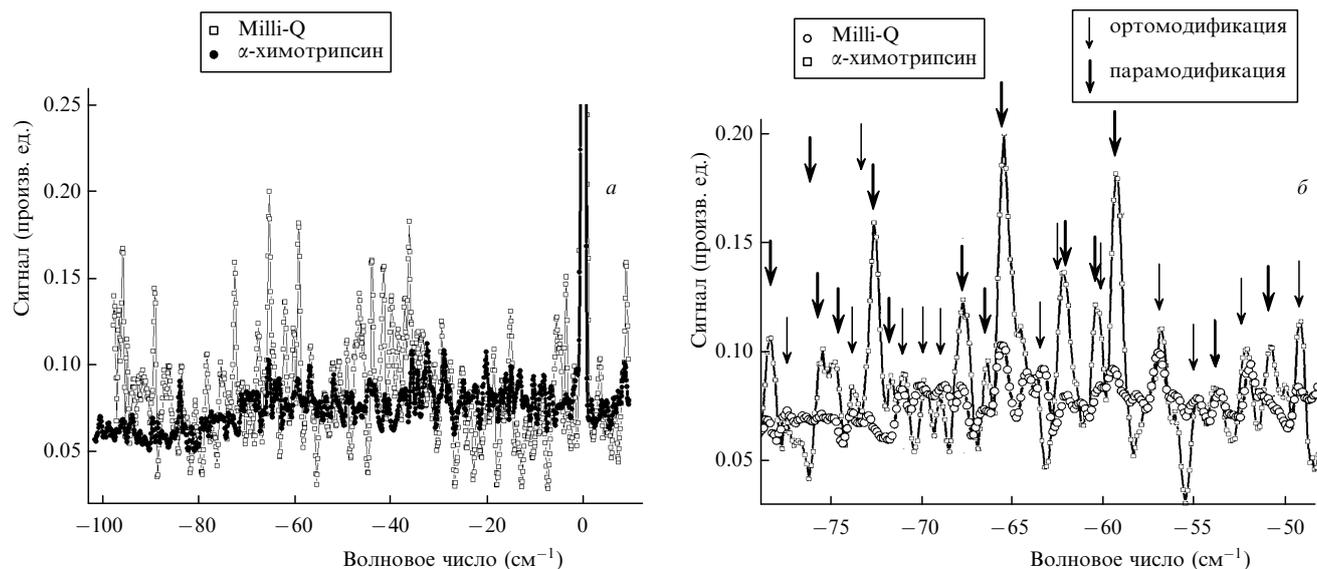


Рис.4. Панорамные спектры четырехфотонного рассеяния в диапазоне частот от 10 до -100 см^{-1} в воде Milli-Q и водном растворе белка α -химотрипсин в концентрации 10 мг/мл (а) и спектры тех же жидкостей в диапазоне частот от -48 до -78 см^{-1} (б). Тонкими стрелками отмечены вращательные резонансы, относящиеся к ортомодификации молекулы H_2O , толстыми – к ее парамодификации.

их жидкостей. Заметим, что в растворе H_2O_2 , так же как и в растворе белка (рис.4), вращательные резонансы проявляются более отчетливо, чем в воде.

На рис.4,а приведены панорамные спектры воды Milli-Q и водного раствора белка α -химотрипсин в концентрации 17 мг/мл в диапазоне частот от 10 до -100 см^{-1} . Видно, как и в случае раствора H_2O_2 , что в спектре раствора белка вращательные резонансы проявляются более отчетливо, чем в спектре воды. На рис.4,б приведен более детальный спектр тех же жидкостей в диапазоне от -48 до -78 см^{-1} . Стрелками отмечены вращательные резонансы, относящиеся к орто- и парамодификациям молекулы H_2O , которые были идентифицированы путем сравнения с данными [8]. В спектре на частотах 77.3 ($9_{45} - 9_{36}$), 74.1 ($5_{14} - 5_{05}$), 70.6 ($3_{30} - 3_{21}$), 70.3 ($7_{34} - 7_{25}$), 68.4 ($10_{56} - 11_{29}$), 63.5 ($12_{310} - 13_{211}$), 62.3 ($5_{32} - 5_{23}$), 56.5 ($10_{47} - 11_{110}$), 54.8 ($3_{03} - 2_{12}$), 53.8 ($2_{21} - 2_{10}$) и 52.5 ($6_{43} - 7_{16}$) см^{-1} наблюдаются резонансы ортомолекул H_2O и на частотах 78.3 ($10_{46} - 10_{37}$), 75.3 ($4_{04} - 3_{13}$), 74.5 ($3_{13} - 2_{02}$), 72.6 ($7_{35} - 8_{08}$), 71.4 ($6_{33} - 6_{24}$), 68.0 ($4_{31} - 4_{22}$), 66.5 ($10_{55} - 9_{64}$), 65.3 ($6_{24} - 5_{33}$), 61.9 ($2_{20} - 2_{11}$), 59.9 ($6_{24} - 6_{15}$), 58.9 ($7_{35} - 6_{42}$) и 51.0 ($4_{13} - 3_{22}$) см^{-1} – резонансы парамодификаций молекул воды. В скобках указаны вращательные квантовые числа J , K_a , K_c начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекулы воды, взятые из базы данных HITRAN [8]. Отметим, что в растворе белка происходит преимущественное подчеркивание вращательных резонансов, относящихся к парамодификации молекулы воды.

4. Обсуждение

Проведенные эксперименты показывают, что в спектрах четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в воде возникают узкие резонансы, частоты которых с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра совпадают с частотами вращательных переходов основного электронного и колебательного состояний молекулы H_2O . При этом в спектре отдельно идентифицируются линии, относящиеся как к орто-, так и к парамодификации основного изотопа молекулы H_2O . Эти же

линии наблюдаются в спектрах водных растворов перекиси водорода (5 % H_2O_2) и белка α -химотрипсин в концентрации 17 мг/мл. Последнее обстоятельство свидетельствует об увеличении доли свободных молекул воды в растворах белка и перекиси водорода.

Увеличение вклада вращательного спектра в сигнал четырехфотонного рассеяния в растворе H_2O_2 по сравнению с H_2O можно объяснить ослаблением межмолекулярного взаимодействия в перекиси водорода по сравнению с водой, т.к. молекулы H_2O_2 образуют две водородные связи с H_2O , а молекулы воды – четыре [9, 10]. Можно предположить, что и с молекулой белка α -химотрипсин молекула воды устанавливает более слабую водородную связь, чем с другими молекулами воды. Наблюдаемое в эксперименте преимущественное подчеркивание в белковом растворе вращательных линий параконформы молекулы воды свидетельствует о селективном взаимодействии парамодификации молекулы воды с биологическими макромолекулами. Физическая природа такой селективности пока до конца не ясна и требует отдельного изучения.

5. Выводы

Таким образом, впервые с помощью спектроскопии когерентного четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в водных растворах белка α -химотрипсин и перекиси водорода, а также в деионизованной воде Milli-Q в диапазоне частот 0.2 – 100 см^{-1} обнаружен спектр когерентных либраций молекул H_2O , резонансы которого совпадают по частоте с вращательным спектром H_2O в газовой фазе. Резонансный вклад когерентных либраций молекул H_2O в сигнал четырехфотонного рассеяния существенно возрастает при переходе от воды к водным растворам и растет с увеличением разбавления. В спектрах четырехфотонного рассеяния регистрируются резонансы, относящиеся к линиям газовой фазы орто- и парамодификаций основного изотопа молекулы H_2O . Обнаружено, что молекула белка в растворе селективно взаимодействует с парамодификацией молекулы H_2O . Данное явление дает возможность интерпретировать се-

лективность воздействия микроволнового излучения на биологические объекты и в перспективе разработать новый класс лазерных биотехнологий.

Работа выполнялась при частичной поддержке Программы РАН «Спектроскопия и стандарты частоты» (гранты № 05-02-16020, 05-02-08311) и гранта Президента РФ поддержки ведущих научных школ № НШ 1553.2003.

1. Bunkin A.F., Lyakhov G.A., Nurmatov A. A., Rezov A.V. *Phys. Rev. B*, **52**, 9360 (1995).
2. Bunkin A.F., Lyakhov G.A., Nurmatov A.A., Suyazov N.V. *Appl. Phys. B*, **66**, 91 (1998).
3. Bunkin A.F., Nurmatov A.A. *Laser Phys.*, **13**, 328 (2003).
4. Shen Y.R. *The Principles of Nonlinear Optics* (New York: Wiley, 1984).
5. Ахманов С.А., Коротеев Н.И. *Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света* (М.: Наука, 1981).
6. Bunkin A.F., Nurmatov A.A., Pershin S.M., Vigin A.A. *J. Raman Spectrosc.*, **36**, 145 (2005).
7. Bunkin A.F., Chikishev A.Yu., Gorchakov A.P., Nurmatov A.A., Pershin S.M. *Laser Phys.*, **15**, 707 (2005).
8. Rothman L. et. al. *J. Quantum Spectr. Radiant. Transfer*, **96**, 139 (2005); www.elsevier.com/locate/jqsrt.
9. Eisenberg D., Kauzmann W. *The Structure and Properties of Water* (Oxford: Oxford University Press, 1969).
10. Walley E., in: *The Hydrogen Bond*. P.Schuster, G.Zudel (Eds.) (Amsterdam: North-Holland, 1976, Ch.29).