

СТОЛКНОВИТЕЛЬНАЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МНОГОАТОМНЫХ МОЛЕКУЛ С ВНУТРЕННИМИ ВРАЩЕНИЯМИ

А. П. Блохин

УДК 535.37+535.338.42

Институт физики НАН Беларуси,
Минск, Беларусь; e-mail: lsfm@imaph.bas-net.by

(Поступила 20 июля 2021)

Развита обобщенная диффузионная модель вращательной деполаризации люминесценции многоатомных молекул с внутренними ротаторами в предположении независимых статистик столкновений для внутренних поворотов и вращения молекул в целом. Модель использована для расчета столкновительной деполаризации нежестких олигонуклеотидов с флуоресцентными метками, находящимися в свободном состоянии в растворах и в комплексе с наночастицами. Выполнен анализ изменений в процессе релаксации анизотропии флуоресценции в зависимости от соотношения моментов инерции подвижных частей молекулы и ориентации моментов переходов. Проведена оценка условий возможного усиления анизотропии и контроля изменений структуры биомолекул при их иммобилизации на поверхности наночастиц.

Ключевые слова: деполаризация люминесценции, ориентационная релаксация, молекулярные столкновения, динамика внутримолекулярного вращения.

A generalized diffusion model of rotational depolarization of luminescence of polyatomic molecules with internal rotators is developed under the assumption of independent collision statistics for internal rotations and rotation of the molecules as a whole. The model is used to calculate the collisional depolarization of non-rigid oligonucleotides with fluorescent labels that are in the free state in solutions and in complex with nanoparticles. The changes in the fluorescence anisotropy during relaxation are analyzed depending on the ratio of the inertia moments of the moving parts of the molecule and the transition moments orientation. The conditions for possible enhancement of anisotropy and control of changes in the structure of biomolecules during their immobilization on the surface of nanoparticles are evaluated.

Keywords: luminescence depolarization, orientational relaxation, molecular collisions, dynamic of intramolecular rotation.

Введение. Исследование процесса вращательной деполаризации люминесценции многоатомных молекул — простой и эффективный способ получения информации об особенностях динамики их движения и взаимодействий с окружающей средой [1, 2]. Для описания вращательного движения молекул, определяющего этот процесс, наиболее распространены так называемые модели ударного приближения, в которых реориентация молекул представляется последовательностью поворотов, прерываемых мгновенными столкновениями. В этих моделях времена ориентационной релаксации и коэффициенты вращательной диффузии приобретают молекулярно-кинетическое определение через моменты инерции и вероятность сбоя углового момента молекул [3—12]. Ранее была предложена модель для описания процесса деполаризации люминесценции многоатомных молекул в газах, основанная на интегральных кинетических уравнениях для ансамблей молекул произвольной симметрии с пуассоновской цепочкой бинарных столкновений [11, 12]. Она дает корректные результаты в широком диапазоне плотностей от разреженных газов до плотных конденсированных сред. В таком теоретическом подходе для молекул с внутренним ротатором показано, как можно учесть влияние динами-

COLLISIONAL DEPOLARIZATION OF LUMINESCENCE OF POLYATOMIC MOLECULES WITH INTERNAL ROTATIONS

A. P. Blokhin (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: lsfm@imaph.bas-net.by)

ки внутреннего вращения на анизотропию люминесценции [13]. Предполагалось, что частоты столкновений и эффективность сбоя угловых моментов для вращения молекул в целом и для внутренних поворотов одинаковы. Однако эти характеристики могут существенно различаться, поскольку внутренние повороты в сильной степени зависят от внутренних ограничений и потенциалов взаимодействия. В настоящей работе модель модернизирована и обобщена в предположении независимых статистик столкновений для вращения молекул в целом и внутренних поворотов. Модель использована для расчета ориентационной релаксации анизотропии нежестких олигонуклеотидов с флуоресцентными метками в растворах, находящимися в свободном состоянии и в комплексах с наночастицами.

Теория. Анизотропия флуоресценции с учетом ориентационной релаксации

$$r(t) = 0.4 \sum_{a,a'=-2}^2 D_{a0}^2(\Omega_{\mu_a}) G_{aa'}^2(t) D_{a'0}^{2*}(\Omega_{\mu_e}) \quad (1)$$

определяется тензорными корреляционными функциями [2, 11]

$$G_{aa'}^2(t) = \left\langle D_{aa'}^2(\Delta\Omega(\Gamma, t)) \right\rangle_{\Gamma} = \left\langle \sum_{m=-2}^2 D_{ma}^2(\Omega(\Gamma, t)) D_{ma'}^{2*}(\Omega(\Gamma, 0)) \right\rangle_{\Gamma}, \quad (2)$$

где $D_{km}^j(\Omega)$ — функции Вигнера [14]; углы $\Omega_{\mu_{a,e}} \{ \Psi_{\mu_{a,e}}, \Theta_{\mu_{a,e}}, 0 \}$ задают ориентацию векторов дипольных моментов переходов μ_a, μ_e для поглощения и испускания. Функции $G_{aa'}^2(t)$ представляют собой усредненные по переменным вращательного фазового пространства Γ матрицы поворотов молекулярной системы координат на угол $\Delta\Omega$ за промежуток времени t между поглощением и испусканием света. Если молекула имеет внутренний ротатор, на котором закреплена флуоресцентная метка, то моменты переходов привязаны к движущейся системе координат ротатора. Преобразование систем координат от лабораторной к системе главных осей инерции молекулы в целом и затем к осям внутреннего ротатора приводит к тому, что усреднение $\Gamma = \Gamma^{(o)}, \Gamma^{(i)}$ необходимо осуществлять по динамически связанным переменным вращательного фазового пространства молекулы $\Gamma^{(o)}$ и переменным для внутреннего вращения $\Gamma^{(i)}$:

$$G_{aa'}^2(t) = \left\langle \sum_{m,k,m',k'=-2}^2 D_{mk}^2(\Omega(\Gamma^{(o)}, t)) D_{ka}^2(\Omega(\Gamma^{(i)}, t)) D_{m'k'}^{2*}(\Omega(\Gamma^{(o)}, 0)) D_{k'a'}^{2*}(\Omega(\Gamma^{(i)}, 0)) \right\rangle_{\Gamma}. \quad (3)$$

Рассмотрим молекулы типа симметричного волчка с моментами инерции $I_x = I_y \neq I_z$ и внутренним ротатором с моментом I_α и вращением вокруг оси z [13]. Вращательный гамильтониан имеет вид

$$2H = \frac{J^2}{I_x} + \left(\frac{1}{I_z - I_\alpha} - \frac{1}{I_x} \right) J_z^2 + \frac{I_z j_\alpha^2}{(I_z - I_\alpha) I_\alpha} - \frac{2J_z j_\alpha}{I_z - I_\alpha}. \quad (4)$$

В качестве вращательных переменных используются полный угловой момент молекулы J , его проекция J_z на ось z системы главных осей инерции молекулы (x, y, z), угловой момент для внутреннего вращения j_α и канонически сопряженные им углы $\varphi_z, \varphi_J, \varphi_\alpha$ соответственно. Перекрестный член $\sim J_z j_\alpha$ задает взаимодействие полного и внутреннего вращений молекулы. Избавиться от него и разделить переменные в гамильтониане можно каноническим преобразованием переменных [13]:

$$j_\alpha = j'_\alpha + \frac{I_\alpha J'_z}{I_z}, \quad J_z = J'_z, \quad \alpha = \alpha', \quad \varphi_z = \varphi'_z - \frac{\alpha' I_\alpha}{I_z}. \quad (5)$$

После этого гамильтониан приобретает вид суммы двух членов $H^{(o)}$ и $H^{(i)}$, зависящих только от внешних и внутренних переменных:

$$H = H^{(o)} + H^{(i)}, \quad 2H^{(o)} = \frac{J^2}{I_x} + \left(\frac{1}{I_z} - \frac{1}{I_x} \right) J_z'^2, \quad 2H^{(i)} = \frac{I_z j_\alpha'^2}{(I_z - I_\alpha) I_\alpha}, \quad (6)$$

а уравнения движения

$$\dot{\varphi}'_z = \frac{\partial H}{\partial J'_z} = J'_z \left(\frac{1}{I_z} - \frac{1}{I_x} \right), \quad \dot{\alpha}' = \frac{\partial H}{\partial j'_\alpha} = \frac{I_z j'_\alpha}{(I_z - I_\alpha) I_\alpha}, \quad \dot{\varphi}'_J = \frac{\partial H}{\partial J} = \frac{J}{I_x} \quad (7)$$

задают повороты с постоянными скоростями $\varphi'_z(t) = \varphi'_z(0) + \dot{\varphi}'_z t$, $\alpha'(t) = \alpha'(0) + \dot{\alpha}' t$, $\varphi_J(t) = \varphi_J(0) + \dot{\varphi}_J t$. Преобразование (5) фактически задает переход к подвижной системе координат, в которой внутренний ротатор с моментом инерции I_α и оставшаяся часть молекулы с моментом $I_z - I_\alpha$ вращаются в противоположных направлениях относительно оси z . Выражения (6), (7) симметричны относительно выбора этих частей и описывают любую ситуацию независимо от того, какая часть молекулы име-

ет больший момент инерции вдоль оси z . Такой подход существенно упрощает последующие усреднения по вращательному фазовому пространству. В качестве переменных для $\Gamma^{(o)}$ используем $J, J_z, J_z', \varphi_J, \varphi_z, \varphi_z'$ (J_z — проекция углового момента на ось Z лабораторной системы координат (X, Y, Z), φ_z — канонически сопряженный угол), для внутренних переменных $\Gamma^{(i)}$ — j_α', α' , в дальнейшем опускающие штрихи. Тогда матрицу поворота от лабораторной системы координат к системе координат ротатора в момент времени t при свободном вращения рассматриваемого типа молекул можно записать в виде

$$D_{ma}^2(\Omega(\Gamma, t)) = \sum_{n,k=-2}^2 D_{mn}^2(\varphi_z, \beta_z, 0) D_{nk}^2(\varphi_J + Jt / I_x, \beta_z, \varphi_z + J_z t b / I_x) D_{ka}^2(0, \eta, \alpha + j_\alpha t / I_\alpha), \quad (8)$$

где $\cos \beta_z = J_z / J$, $\cos \beta_z = J_z / J$, $b = (I_x - I_z) / I_z$, η — угол между осью вращения ротатора и осью z молекулы.

В основе моделей реориентации молекул в результате столкновений с окружением лежит расчет усредненной последовательности матриц свободных поворотов, которые являются основным структурным элементом теории. После подстановки (8) в (2) свободный поворот молекулы за промежуток времени от 0 до t задается матрицей

$$D_{aa'}^2(\Delta\Omega(\Gamma, t)) = \sum_{n,k,k'=-2}^2 D_{a'k'}^2(-\alpha, -\eta, 0) D_{kn}^2(-\varphi_z, -\beta_z, 0) D_{nk}^2(Jt / I_x, \beta_z, \varphi_z + J_z t b / I_x) D_{ka}^2(0, \eta, \alpha + j_\alpha t / I_\alpha). \quad (9)$$

Поскольку за время столкновения может произойти переориентация молекулы, эффект столкновений в общем случае задается тензорной функцией $T^2(\Gamma' | \Gamma)$, представляющей собой условную плотность вероятности найти после столкновения набор вращательных переменных Γ , если до столкновения он Γ' . Однако если сделать обычное предположение ударной теории о мгновенности столкновений, эта функция будет скалярной $T(\Gamma' | \Gamma)$. Для многоатомных молекул вследствие их инерционности это допущение еще более оправданно. Вероятности изменения переменных для внутреннего вращения определяются в основном локальными взаимодействиями внутри молекулы. В этом случае полная условная вероятность факторизуется

$$T(\Gamma' | \Gamma) = T(\Gamma'^{(o)} | \Gamma^{(o)}) T(\Gamma'^{(i)} | \Gamma^{(i)}). \quad (10)$$

Здесь $T(\Gamma'^{(o)} | \Gamma^{(o)}) = T(J', J_z', \varphi_J' | J, J_z, \varphi_z)$, так как усредняемая матрица (9) не зависит от $J_z, \varphi_J, \varphi_z$, и $T(\Gamma'^{(i)} | \Gamma^{(i)}) = T(j_\alpha', \alpha' | j_\alpha, \alpha)$. Кроме того, если сделаем обычное в теориях обобщенной диффузии [4—9] предположение о стохастизации при столкновении азимутального угла φ_z и такое же для внутреннего угла α , то получим

$$T(\Gamma'^{(o)} | \Gamma^{(o)}) = T(\Gamma_z' | \Gamma_z), \quad T(\Gamma'^{(i)} | \Gamma^{(i)}) = T(j_\alpha' | j_\alpha), \quad (11)$$

где $\Gamma_z = J, J_z$. В сделанных предположениях эффект столкновений определяется скачкообразным изменением переменных Γ_z, j_α .

Равновесные распределения, по которым выполняется усреднение:

$$\rho_{\text{eq}}^{(o)}(\Gamma_z) = \frac{1}{Z^{(o)}} \exp\{-H^{(o)}(\Gamma_z) / kT\}, \quad \rho_{\text{eq}}^{(i)}(j_\alpha) = \frac{1}{Z^{(i)}} \exp\{-H^{(i)}(j_\alpha) / kT\}. \quad (12)$$

Здесь $Z^{(o)} = 8\pi^2 (2\pi kT)^{3/2} I_x I_z^{1/2}$, $Z^{(i)} = (2\pi)^{3/2} \left(\frac{I_\alpha (I_z - I_\alpha) kT}{I_z} \right)^{1/2}$ — статистические суммы для вращательных движений молекулы и ротатора. Поскольку гамильтониан для свободных поворотов и ядро интеграла столкновений не зависят от переменных $J_z, \varphi_z, \varphi_J, \varphi_z, \alpha$, используем усредненные матрицы

$$\begin{aligned} \bar{D}_{aa'[0]}^2(\Gamma_z, j_\alpha, t) &= \langle D_{aa'}^2(\Delta\Omega(\Gamma, t)) \rangle_{J_z, \varphi_z, \varphi_J, \varphi_z, \alpha} = \bar{D}_a^2(\Gamma_z, j_\alpha, t) \delta_{aa'} = \\ &= \sum_{n,k=-2}^2 D_{kn}^2(0, -\beta_z, 0) D_{nk}^2(Jt / I_x, \beta_z, J_z t b / I_x) D_{ak}^2(0, -\eta, 0) D_{ka}^2(0, \eta, j_\alpha t / I_\alpha) \end{aligned} \quad (13)$$

и представим их в виде произведения

$$\bar{D}_a^2(\Gamma_z, j_\alpha, t) = \sum_{k=-2}^2 \bar{D}_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) (d_{ka}^2(\eta))^2 \bar{D}_a^{2(i)}(j_\alpha, t), \quad (14)$$

где $\bar{D}_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) = \sum_{n=-2}^2 e^{-inJt/I_x} ((d_{nk}^2(\beta_z)))^2 e^{-ikJ_z t b / I_x}$, $\bar{D}_a^{2(i)}(j_\alpha, t) = e^{-iaj_\alpha t / I_\alpha}$. В результате процесс столкновений можно рассматривать отдельно для вращения молекул в целом и внутренних ротаторов.

Положим, что доля молекул, столкнувшихся p раз за время t , распределена по пуассоновскому закону с частотой z_c :

$$w_p(t) = \frac{(z_c t)^p}{p!} \exp\{-z_c t\}. \quad (15)$$

Тогда матрица поворота имеет вид

$$\bar{D}_{k[p]}^{2(o)}(\Gamma_z, t) = \frac{p!}{t^p} w_p(t) \int_0^t dt_p \dots \int_0^{t_1} dt_1 \left\langle \bar{D}_{k_1}^{2(o)}(\Gamma_{z1}, t_1) T(\Gamma_{z1} | \Gamma_{z2}) \dots \bar{D}_k^{2(o)}(\Gamma_z, t - t_p) T(\Gamma_{zp} | \Gamma_z) \right\rangle_{\Gamma_{z1} \dots \Gamma_{zp}}. \quad (16)$$

Если за это же время произошло l внутренних столкновений с частотой $z_c^{(i)}$ и вероятностью, распределенной по закону

$$w_l^\alpha(t) = \frac{(z_c^{(i)} t)^l}{l!} \exp\{-z_c^{(i)} t\}, \quad (17)$$

то матрица внутренних поворотов

$$\bar{D}_{a[l]}^{(i)}(j_\alpha, t) = \frac{l!}{t^l} w_l^\alpha(t) \int_0^t dt'_l \dots \int_0^{t'_1} dt'_1 \left\langle \bar{D}_{a_1}(j_{\alpha 1}, t'_1) T(j_{\alpha 1} | j_{\alpha 2}) \dots \bar{D}_{a_l}(j_\alpha, t - t'_l) T(j_\alpha | j_\alpha) \right\rangle_{j_{\alpha 1} \dots j_{\alpha l}}. \quad (18)$$

Статистики столкновений могут быть и не пуассоновскими. Важно лишь предположение об их независимости. Полная сумма матриц

$$G_a^2(\Gamma_z, j_\alpha, t) = \sum_{k=-2}^2 G_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) (d_{ka}^2(\eta))^2 G_a^{(i)}(j_\alpha, t), \quad (19)$$

где

$$G_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) = \sum_{p=0}^{\infty} \bar{D}_{k[p]}^{2(o)}(\Gamma_z, t), \quad G_a^{(i)}(j_\alpha, t) = \sum_{l=0}^{\infty} \bar{D}_{a[l]}^{(i)}(j_\alpha, t).$$

Методом суммирования статистических реализаций [4, 11] можно получить результирующие матрицы для обеих бесконечных сумм. Результат — два интегральных уравнения Вольтера для каждого вида движения:

$$G_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) = e^{-z_c t} \bar{D}_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) + z_c \int_0^t dt' e^{-z_c(t-t')} \left\langle G_k^{2(o)}(\Gamma'_z, t') T(\Gamma'_z | \Gamma_z) \right\rangle_{\Gamma'_z} \bar{D}_k^{2(o)}(\Gamma_z, t - t'), \quad (20)$$

$$G_a^{(i)}(j_\alpha, t) = e^{-z_c^{(i)} t} \bar{D}_a^{(i)}(j_\alpha, t) + z_c^{(i)} \int_0^t dt' e^{-z_c^{(i)}(t-t')} \left\langle G_a^{(i)}(j'_\alpha, t') T(j'_\alpha | j_\alpha) \right\rangle_{j'_\alpha} \bar{D}_a^{(i)}(j_\alpha, t - t'). \quad (21)$$

Полученные уравнения допускают дальнейшее усреднение

$$G_k^{2(o)}(t) = e^{-z_c t} F_k^{2(o)}(t) + z_c \int_0^t dt' e^{-z_c(t-t')} \left\langle \left\langle G_k^{2(o)}(\Gamma'_z, t') T(\Gamma'_z | \Gamma_z) \right\rangle_{\Gamma'_z} D_k^{2(o)}(\Gamma_z, t - t') \right\rangle_{\Gamma_z}, \quad (22)$$

$$G_a^{(i)}(t) = e^{-z_c^{(i)} t} F_a^{(i)}(t) + z_c^{(i)} \int_0^t dt' e^{-z_c^{(i)}(t-t')} \left\langle \left\langle G_a^{(i)}(j'_\alpha, t') T(j'_\alpha | j_\alpha) \right\rangle_{j'_\alpha} D_a^{(i)}(j_\alpha, t - t') \right\rangle_{j_\alpha}. \quad (23)$$

Здесь

$$G_k^{2(o)}(t) = \left\langle G_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) \right\rangle_{\Gamma_z}, \quad G_a^{(i)}(t) = \left\langle G_a^{(i)}(j_\alpha, t) \right\rangle_{j_\alpha}, \quad (24)$$

$$F_k^{2(o)}(t) = \left\langle D_k^{2(o)}(\Gamma_z, t) \right\rangle_{\Gamma_z} = \frac{1}{(1-\kappa)^{1/2}} \int_{-1}^1 du \sum_{n=-2}^2 (d_{nk}^2(\beta_z))^2 (1+bu^2)^{-3/2} \left(1 - \frac{(n+kb u)^2 t^2}{1+bu^2}\right) e^{-\frac{(n+kb u)^2 t^2}{2(1+bu^2)}}, \quad (25)$$

$$f_{nk}(t) = (1 - B^2 t^2) e^{-B^2 t^2/2}, \quad B^2 = \frac{(n+kb u)^2}{1+bu^2}, \quad u = \cos \beta_z$$

— корреляционные функции для вращения свободных молекул,

$$F_a^{(i)}(t) = \left\langle D_a^{(i)}(j_\alpha, t) \right\rangle_{j_\alpha} = e^{-\frac{a^2 \chi^2 t^2}{2(1-\kappa)}} \quad (26)$$

— корреляционные функции для внутренних ротаторов.

Параметр $\kappa = b/(1-b) = 1 - I_z/I_x$ задает тип молекулярного волчка для молекулы в целом, изменяясь от -1 ($-1 \div 0$ — сплюснутые волчки) до $+1$ ($0 \div 1$ — вытянутые); $\chi = (I_z - I_\alpha)/I_\alpha$ определяет соотношение момента инерции $I_z - I_\alpha$ части молекулы, которая считается неподвижной, к моменту инерции I_α подвижной части (здесь и далее время приводится в единицах среднего поворота на радиан $t \rightarrow (kT/I_x)^{1/2}t$). При подстановке усредненных функций $G_k^{2(o)}(t)$ и $G_a^{2(i)}(t)$ (24) в (3) получаем выражение для полной корреляционной функции

$$G_a^2(t) = \sum_{k=-2}^2 G_k^{2(o)}(t) (d_{ka}^2(\eta))^2 G_a^{2(i)}(t). \quad (27)$$

Уравнения (22), (25) при соответствующем выборе функций условной вероятности в интегралах столкновений позволяют рассмотреть различные модели ориентационной релаксации [7—11], например, в предположении о полной потере корреляции полного углового момента при столкновении в модели обобщенной J -диффузии Гордона $T(\Gamma_z' | \Gamma_z) = \rho_{eq}(\Gamma_z)$. После подстановки в (22) получим

$$G_k^{2(o)}(t) = e^{-z_c t} F_k^{2(o)}(t) + z_c \int_0^t dt' e^{-z_c(t-t')} G_k^{2(o)}(t') F_k^{2(o)}(t-t'). \quad (28)$$

Интегральное уравнение Вольтера (28) определяет корреляционные функции для вращения молекулы через известные функции свободного вращения (25). Преобразование Лапласа $\tilde{f}(s) = \int_0^\infty e^{-st} f(t) dt$ этого уравнения дает алгебраическое соотношение [3]:

$$\tilde{G}_k^{2(o)}(s) = \frac{\tilde{F}_k^{2(o)}(s + z_c)}{1 - z_c \tilde{F}_k^{2(o)}(s + z_c)}, \quad (29)$$

$$\tilde{F}_k^{2(o)}(s + z_c) = \frac{1}{(1-\kappa)^{1/2}} \int_{-1}^1 du \sum_{n=-2}^2 (d_{nk}^2(\beta_z))^2 (1 + bu^2)^{-3/2} \tilde{f}_{nk}(s + z_c), \quad (30)$$

$$\tilde{f}_{nk}^{(o)}(s + z_c) = \frac{s + z_c}{B^2} e^{\frac{(s+z_c)^2}{4B^2}} D_{-2}\left(\frac{s + z_c}{B}\right), \quad (31)$$

где $D_{-2}(z)$ — функция параболического цилиндра [15]. В пределе частых столкновений $z_c \gg 1$ можно использовать асимптотическое разложение этой функции в ряд по $(s + z_c)^{-1}$ [15]:

$$\tilde{f}_{nk}^{(o)}(s + z_c) \sim \frac{1}{s + z_c} - \frac{3B^2}{(s + z_c)^3} + \frac{15B^4}{(s + z_c)^5} \dots \quad (32)$$

Если оставить два первых члена разложения (32), то интегрирование можно провести аналитически

$$\tilde{F}_k^{2(o)}(s + z_c) \sim \frac{1}{s + z_c} - \frac{6 - k^2 + k^2 I_x / I_z}{(s + z_c)^3} + \dots \quad (33)$$

и получить после подстановки в (32) при $s \rightarrow 0$ известный результат [3] для времен ориентационной релаксации жестких молекул

$$\tau_k^{2(o)} = \int_0^\infty G_k^{2(o)}(t) dt = \tilde{G}_k^{2(o)}(0) = \frac{1}{z_c} (6 - k^2 + \frac{k^2 I_x}{I_z}). \quad (34)$$

При этом корреляционная функция

$$G_k^{2(o)}(t) = e^{-t/\tau_k^{2(o)}}, \quad (\tau_k^{2(o)})^{-1} = D_x(6 - k^2) + D_z k^2 \quad (35)$$

и коэффициенты вращательной диффузии $D_x = z_c^{-1}$, $D_z = D_x I_x / I_z$ выражаются через частоту столкновений и моменты инерции. (Здесь и далее времена релаксации и коэффициенты в редуцированных единицах ($D_x \rightarrow D_x kT / I_x$)). Следует отметить, что в рамках обобщенной модели J -диффузии эти коэффициенты выражаются через время корреляции углового момента τ_J , которое в данной модели представляет собой величину, обратную частоте столкновений ($\tau_J = z_c^{-1}$).

Если сделать предположение о хаотизации и внутреннего углового момента j_α , то ядро интеграла столкновений $T(j'_\alpha | j_\alpha) = \rho_{eq}^{(i)}(j_\alpha)$. В такой модели обобщенной j_α -диффузии для внутренних поворотов уравнение (23) полностью усредняется:

$$G_a^{(i)}(t) = e^{-z_c^{(i)}t} F_a^{(i)}(t) + z_c^{(i)} \int_0^t dt' e^{-z_c^{(i)}(t-t')} G_a^{(i)}(t') F_a^{(i)}(t-t'), \quad (36)$$

и так же, как и для вращения молекулы в целом, позволяет находить корреляционные функции $G_a^{(i)}(t)$ через известные $F_a^{(i)}(t)$. Преобразование Лапласа в (36) дает соотношение

$$\tilde{G}_a^{(i)}(s) = \frac{\tilde{F}_a^{(i)}(s + z_c^{(i)})}{1 - \tilde{F}_a^{(i)}(s + z_c^{(i)})}, \quad (37)$$

$$\tilde{F}_a^{(i)}(s + z_c^{(i)}) = \frac{1}{C} \exp\left(\frac{(s + z_c^{(i)})^2}{2C}\right) D_{-1}\left(\frac{C}{s + z_c^{(i)}}\right), C^2 = \frac{a^2 \chi}{(1 - \kappa)}.$$

В пределе частых столкновений внутреннего ротатора $z_c^{(i)} \gg 1$, используя асимптотическое разложение $D_{-1}(z)$ [15]

$$\tilde{F}_a^{(i)}(s + z_c^{(i)}) \sim (s + z_c^{(i)})^{-1} [1 - (s + z_c^{(i)})^{-2} C + 0(s + z_c^{(i)})^{-4} \dots], \quad (38)$$

после подстановки в (37) можно найти времена внутренней ориентационной релаксации

$$\tau_a^{(i)} = \int_0^\infty G_a^{(i)}(t) dt = \tilde{G}_a^{(i)}(0) = \frac{z_c^{(i)}(1 - \kappa)}{k^2 \chi} \quad (39)$$

и корреляционную функцию

$$G_a^{(i)}(t) = e^{-t/\tau_a^{(i)}}, \quad (\tau_a^{(i)})^{-1} = k^2 D_z^{(i)}, \quad (40)$$

где $D_z^{(i)} = \frac{\chi}{z_c^{(i)}(1 - \kappa)}$ — коэффициенты внутренней вращательной диффузии. Коэффициенты общей и

внутренней диффузий связаны соотношением моментов инерции подвижных частей молекулы χ , что является следствием строгого учета инерционности свободного вращения. Как и для вращения в целом, можно определить корреляционную функцию для углового момента ротатора j_α и его время корреляции τ_{j_α} , которое определяется частотой внутренних столкновений $\tau_{j_\alpha} = (z_c^{(i)})^{-1}$.

В результате общая формула для ориентационной корреляционной функции

$$G_a^2(t) = \sum_{k=-2}^2 e^{-t/\tau_k^{(o)}} (d_{ka}^2(\eta))^2 e^{-t/\tau_a^{(i)}}. \quad (41)$$

После подстановки в (1) получаем

$$r(t) = 0.4 \sum_{a,k=-2}^2 e^{-t/\tau_k^{(o)}} (d_{ka}^2(\eta))^2 e^{-t/\tau_a^{(i)}} e^{-ia(\Psi_{\mu_a} - \Psi_{\mu_e})} d_{a0}^2(\Theta_{\mu_a}) d_{a0}^2(\Theta_{\mu_e}). \quad (42)$$

Важно, что статистики внешних и внутренних движений независимы, а переменные разделены. Для сложных многоатомных фрагментов в отсутствие всякой симметрии вид ограничивающих препятствий имеет, вероятнее всего, случайный характер, поэтому такое предположение вполне допустимо. В результате для внутренних ротаторов соответствующим выбором ядра интеграла столкновений можно рассмотреть другие модели ориентационной релаксации, например, использовать наиболее общую модель Килсона—Сторера, которая позволяет учесть эффективность сбоя углового момента при столкновении [7—10]. В ядро интеграла столкновений для внутреннего вращения в этой модели

$$T^{KS}(j'_\alpha | j_\alpha) = T^{KS}(j_\alpha - j'_\alpha) = \frac{1}{[2\pi I_\alpha(1 - \gamma^2)]^{1/2}} \exp\left\{-\frac{j_\alpha - j'_\alpha}{2I_\alpha(1 - \gamma^2)}\right\} \quad (43)$$

входит параметр $-1 \leq \gamma \leq 1$, задающий эффективность столкновительного сбоя углового момента j_α . Время корреляции углового момента и частота столкновений связаны соотношением [7—10]

$$\tau_{j_\alpha}^{KS} = (z_c^{(i)KS}(1 - \gamma))^{-1}. \quad (44)$$

При $\gamma = 1$ угловой момент сохраняется, что соответствует свободному вращению. Если $\gamma = 0$, то внутримолекулярные столкновения приводят к хаотизации момента за одно столкновение (j_α — диффузионная модель). Затем при $\gamma = -1$ угловой момент меняет свое направление на противоположное, как после очень сильного столкновения с внутренним окружением. Диапазон $0 \geq \gamma \geq -1$ особенно актуален для описания внутренней ориентационной релаксации, так как соответствует условиям внутренних ограничений и барьеров.

Расчеты и их обсуждение. Ранее нами был исследован процесс вращательной деполяризации флуоресценции меченных флуоресцеином олигонуклеотидов с 25 и 50 основаниями, связанных ковалентно через линкер с флуоресцентной меткой карбоксифлуоресцеином в растворах [16]. Измеренные в стационарных условиях зависимости обратной величины анизотропии флуоресценции от температуры и вязкости представляли собой практически линейные зависимости. В диффузионной модели олигонуклеотидов с жесткой структурой, но с внутренним ротатором в виде линкера с флуоресцентной меткой осуществлен расчет этих зависимостей и продемонстрировано влияние внутренних вращений на процесс деполяризации их флуоресценции. Однако при повышении температуры для более длинного олигонуклеотида с определенного момента наклон экспериментальной зависимости резко увеличивается, что свидетельствует о возникновении быстрых компонент в ориентационной релаксации, связанных, вероятно, с лабильностью структуры олигонуклеотида. Действительно, длинные олигонуклеотиды с цепочкой более 20 оснований могут проявлять внутреннюю подвижность и сильно изменять структуру. Для описания вращательной диффузии они часто моделируются длинными твердыми стержнями, поскольку по форме являются очень вытянутыми молекулярными структурами и с точки зрения вращательной динамики — вытянутыми симметричными волчками. Для олигонуклеотида с 50 основаниями главные моменты инерции: $I_x = 16.584 \cdot 10^6$, $I_y = 16.813 \cdot 10^6$, $I_z = 1.815 \cdot 10^6$ а.е.м. $\cdot$ А². Поскольку моменты инерции, перпендикулярные длинной оси, равны $I_x \approx I_y$, олигонуклеотид представляет собой вытянутый симметричный волчок с инерционным параметром $\kappa = 9.1$. Флуоресцентная метка вместе с линкером в реальности совершает довольно сложные движения в результате столкновений с внутренними барьерами, создаваемыми близлежащими атомами олигонуклеотидной цепи. На основе полученных выше модельных соображений можно проанализировать влияние деполяризующих внутренних движений, если изменение структуры олигонуклеотида моделировать двумя стержнями с поворотами относительно друг друга. Дипольные моменты электронных переходов с поглощением и испусканием света у карбоксифлуоресцеина параллельны его длинной оси и направлены под углом $\Theta_{\mu,e} = \Theta = 71.5^\circ$ к оси внутреннего ротатора, $\eta = 73.6^\circ$ [16]. На рис. 1 для молекулы с параметрами олигонуклеотида приведены кинетические зависимости анизотропии, рассчитанные для различных χ (отношений момента инерции части молекулы, которая считается неподвижной, к моменту инерции подвижной части, на котором закреплена флуоресцентная метка). Поскольку время — в условных единицах, не зависящих от температуры (средних поворотах на радиан $(kT/I_x)^{1/2}t$), рассматриваемые поляризационные эффекты определяются только соотношением моментов инерции и ориентацией моментов переходов.

Как видно из рис. 1, кинетические зависимости наиболее существенно изменяются на начальных стадиях релаксационного процесса, причем чем с меньшей частью молекулы связаны флуорофоры, тем круче начальный наклон кривых процесса релаксации анизотропии флуоресценции. Поскольку в стационарном поляризационном эксперименте измеряется интегральная анизотропия, т. е. фактически площадь под кинетическими кривыми, можно предположить, что обнаруженный в [16] сильный деполяризующий эффект может быть связан с мобильностью локальной структуры олигонуклеотида вблизи места присоединения флуоресцентной метки, т. е. с мобильностью меньшего меченого фрагмента молекулы. Дополнительные исследования временной зависимости анизотропии флуоресценции могли бы обнаружить динамику деполяризующих движений, связанных с вращением внутреннего ротатора. Поскольку внутренняя диффузия определяется локальными ограничениями и полями и в меньшей степени зависит от влияния внешней среды, таким способом можно определять соотношения коэффициентов общей и внутренней вращательной диффузии и получать важную информацию о структурной подвижности фрагментов нуклеиновых кислот.

Чтобы увеличить анизотропию флуоресценции и повысить чувствительность поляризационно-флуоресцентного метода для анализа структуры биомолекул с относительно малыми массами и контроля реакций с их участием, используются способы химической привязки их к различным объектам больших размеров [17]. В результате иммобилизации исследуемых молекул на поверхности таких объектов и резкого снижения скоростей вращательного движения молекулярного комплекса в целом должна существенно повышаться анизотропия флуоресценции. Теория расчета анизотропии флуоресценции для таких спектроскопических методов фактически отсутствует. Вышеизложенная модель, по крайней мере на качественном уровне, вполне подходит для исследования их эффективности. Например, для регистрации поляризационными методами биохимических реакций с участием олигонуклеотидов при их иммобилизации в последнее время предлагаются наночастицы оксида графена [18—20]. В инерционном отношении наночастицы оксида графена можно приближенно моде-

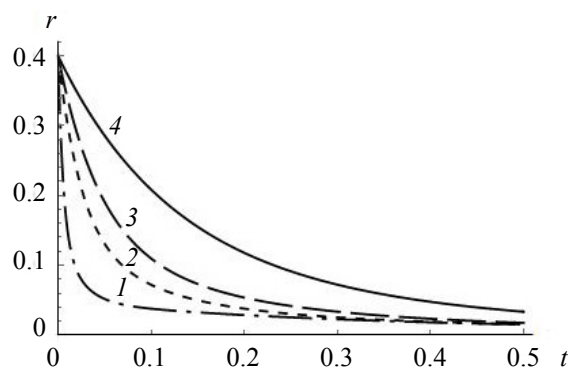


Рис. 1. Кинетика анизотропии флуоресценции $r(t)$ для структурных параметров олигонуклеотида $\kappa = 9.1$, $\Theta = 71.5^\circ$, $\eta = 73.6^\circ$ для соотношения моментов инерции $\chi = 1$ (1), 5 (2), 10 (3), 50 (4); время в единицах $t \rightarrow (kT/I_x)^{1/2}t$

лизовать плоскими осесимметричными объектами с моментами инерции $I_x \approx I_y \approx 2I_z$ с отрицательным инерционным параметром $\kappa = -1$. Положим, что после образования комплекса с наночастицей олигонуклеотид с флуоресцентной меткой совершает внутреннее вращение $\alpha(t)$ вокруг оси z , направленной под углом η относительно перпендикуляра к плоскости наночастицы. Иммобилизация означает резкое увеличение моментов инерции одной из частей исследуемой молекулы. При этом вращение вытянутого молекулярного волчка — олигонуклеотида — заменяется динамикой плоского, что отражается и во вращательной диффузии комплекса наночастица—молекула. На рис. 2 изображены релаксационные кривые анизотропии флуоресценции для различных соотношений $k_{im} = I_{x(nano)}/I_{x(mol)}$ моментов инерции наночастицы $I_{x(nano)}$ и олигонуклеотида $I_{x(mol)}$. Кривая 1 рис. 2 соответствует кривой 1 рис. 1 для свободного олигонуклеотида с быстрым внутренним вращением при $\chi = 50$, остальные кривые — для комплексов наночастицы с молекулой при увеличении моментов инерции наночастицы ($k_{im} = 1, 10, 100$).

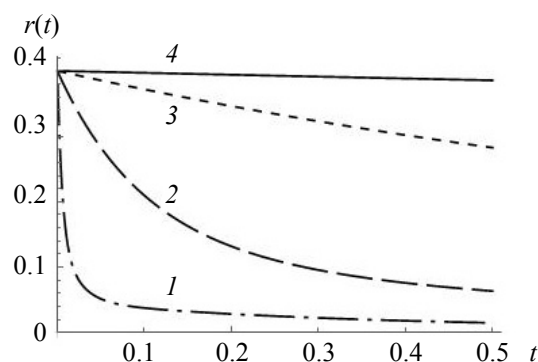


Рис. 2. Анизотропия флуоресценции $r(t)$ для $\chi = 50$, $\eta = 73.6^\circ$, $\Theta = 71.5^\circ$, $\kappa = 9.1$ (1); $\kappa = -1$ для $k_{im} = 1$ (2), 10 (3), 100 (4)

Как видно из рис. 2, по мере увеличения инерции наноплатформы и уменьшения скоростей диффузии кривые становятся более пологими и анизотропия флуоресценции практически не падает по сравнению с анизотропией свободных молекул. Эффект ее существенного увеличения в таком случае может легко контролироваться и в стационарном эксперименте. Даже при сравнимых размерах наночастицы и молекулы ($k_{im} \sim 1$) ориентационная релаксация существенно замедляется. Это происходит из-за смены быстрого вращения вокруг длинной оси олигонуклеотида на более медленное вращение вокруг оси, перпендикулярной плоскости наночастицы. Поэтому иммобилизация олигонуклеотидов наночастицами графена является эффективным вариантом повышения анизотропии флуоресценции.

Анизотропия также зависит от углов η и Θ , но в разной степени. На рис. 3 приведена анизотропия флуоресценции свободных молекул и в комплексе с наночастицей графена для быстрого внутреннего вращения $\chi = 10$. Кинетика релаксации слабо зависит от угла ориентации оси внутреннего ротатора η как для свободных молекул (кривые 1, 2), так и для комплексов с наночастицами (кривые 3, 4). При изменении η от 0° до 90° кинетические зависимости практически не изменяются. Такая тенденция сохраняется и для других χ . Это объясняется тем, что скорость релаксации в основном задается азимутальной диффузией вокруг оси внутреннего ротатора, т. е. полярным углом векторов дипольных моментов переходов к этой оси Θ .

На рис. 4 приведена анизотропия для различных углов Θ и соотношений моментов инерции наноплатформы и молекулы. Как видно, существует сильная зависимость кинетики анизотропии от этого угла. Причем различие кривых 1, 2 и 3, 4, соответственно, для малых и больших углов особенно заметно с увеличением размеров наночастиц. Как и следовало ожидать, кривые 1, 2 при $\Theta \approx 0^\circ$

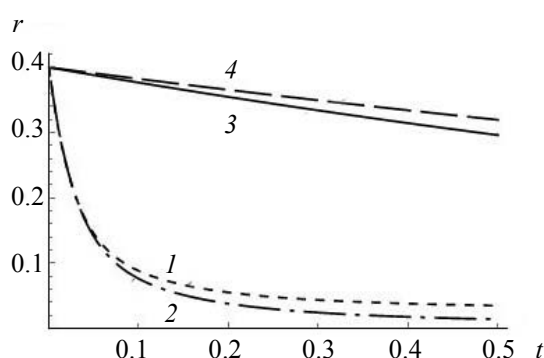


Рис. 3. Анизотропия флуоресценции $r(t)$ при $\chi = 10$ для свободных ($\kappa = 9.1$, $\eta = 0^\circ$ (1) и 90° (2)) и для иммобилизованных олигонуклеотидов ($\kappa = -1$, $\eta = 0^\circ$ (3) и 90° (4))

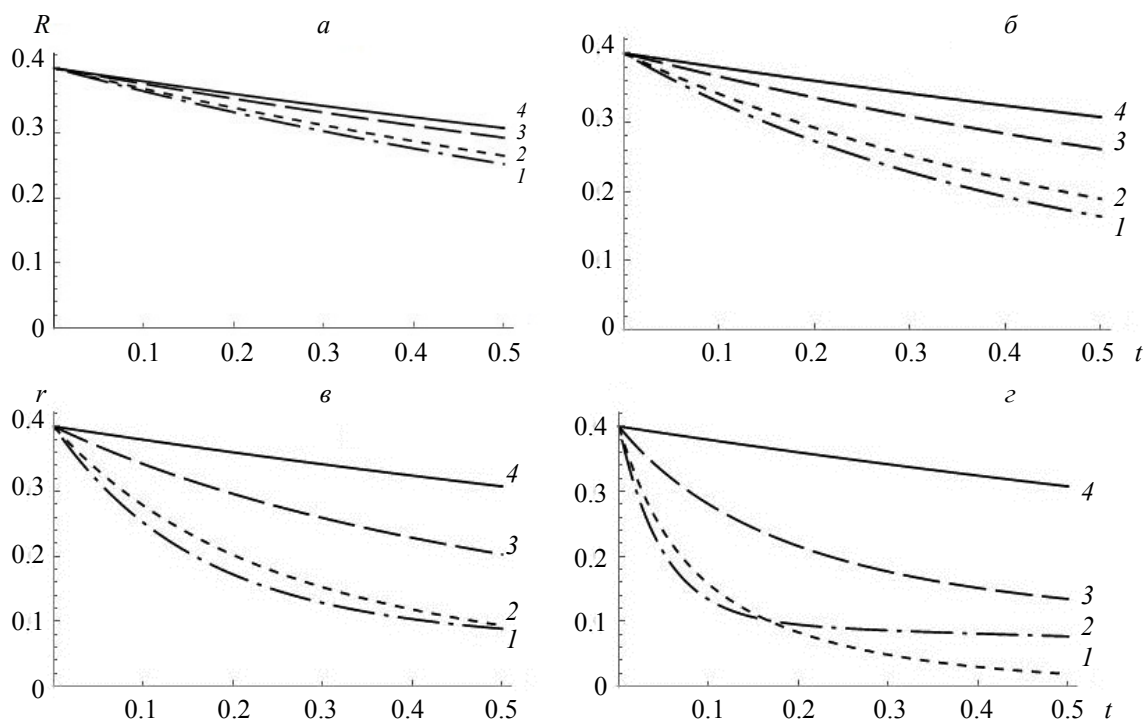


Рис. 4. Анизотропия флуоресценции при иммобилизации молекулы на поверхности наночастицы при $\eta = 45^\circ$; $\chi = 3$ (а), 10 (б), 30 (в), 100 (г); $\Theta = 0^\circ$ (1), 30° (2), 60° (3), 90° (4)

практически не изменяются для различных χ , поскольку при этом фактически исчезает азимутальная диффузия. Поэтому важное значение в методе иммобилизации имеет угол ориентации дипольных моментов переходов относительно перпендикуляра к поверхности наночастиц, который определяет быстрые компоненты ориентационной релаксации.

Заключение. В предложенной диффузионной модели деполяризации люминесценции многоатомных молекул с внутренними вращениями релаксационный процесс определяется реальными молекулярными параметрами — соотношением моментов инерции и частотами столкновений. Предположение независимых статистик столкновений для внутренних поворотов и вращения молекул в целом обобщает теорию ударного приближения и повышает возможности ее практического применения. Полученные выражения актуальны для оценки скоростей процесса деполяризации флуоресценции меток, внедренных в нежесткие биологические структуры. Они дают возможность находить условия, при которых в наибольшей степени могут проявляться различия в анизотропии флуоресценции свободных и связанных с наночастицами молекул, что актуально для контроля биохимических реакций и создания поляризационно-флуоресцентных сенсоров.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф20В-003).

- [1] **J. R. Lakowicz.** Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer (2006)
- [2] **В. А. Гайсенок, А. М. Саржевский.** Анизотропия поглощения и люминесценции многоатомных молекул, Минск, Университетское (1986)
- [3] **R. E. D. McClung.** Adv. Mol. Rel. Int. Proc., **10**, N 2 (1977) 83—169
- [4] **A. I. Burstein, S. I. Temkin.** Spectroscopy of Molecular Rotations in Gases, Cambridge University Press, Cambridge (1994)
- [5] **T. E. Bull.** J. Chem. Phys., **65** (1976) 4802—4815
- [6] **T. E. Bull.** Chem. Phys., **121** (1988) 1—19
- [7] **А. П. Блохин, М. Ф. Гелин.** Хим. физика, **13**, № 1 (1994) 14—20
- [8] **A. P. Blokhin, M. F. Gelin.** Mol. Phys., **87** (1996) 455—468
- [9] **A. P. Blokhin, M. F. Gelin.** J. Phys. Chem. B, **101** (1997) 236—243
- [10] **A. P. Blokhin, M. F. Gelin.** Physica A, **251** (1998) 469—484
- [11] **А. П. Блохин, М. Ф. Гелин.** Журн. прикл. спектр., **70**, № 2 (2003) 196—202 [**A. P. Blokhin, M. F. Gelin.** J. Appl. Spectr., **70**, N 2 (2003) 216—223]
- [12] **А. П. Блохин, М. Ф. Гелин, О. В. Буганов, В. А. Дубовский, С. А. Тихомиров, Г. Б. Толсторов-жев.** Журн. прикл. спектр., **70**, № 3 (2003) 340—345 [**A. P. Blokhin, M. F. Gelin, O. V. Buganov, V. A. Dubovskii, S. A. Tikhomirov, G. B. Tolstorozhev.** J. Appl. Spectr., **70**, N 3 (2003) 378—384]
- [13] **А. П. Блохин, В. А. Толкачев.** Журн. прикл. спектр., **81**, № 6 (2014) 843—849 [**A. P. Blokhin, V. A. Tolkachev.** J. Appl. Spectr., **81**, N 6 (2014) 930—937]
- [14] **Д. А. Варшалович, А. Н. Москалев, В. К. Херсонский.** Квантовая теория углового момента, Ленинград, Наука (1975)
- [15] **М. Абрамовиц, И. Стиган.** Справочник по специальным функциям, Москва, Наука (1979)
- [16] **А. П. Блохин, М. В. Квач, В. А. Поводайло, В. В. Шманай, Д. Л. Яковлев.** Журн. прикл. спектр., **84**, № 1 (2017) 26—32 [**A. P. Blokhin, M. V. Kvach, V. A. Povedailo, V. V. Shmanai, D. L. Yakovlev.** J. Appl. Spectr., **84**, N 1 (2017) 19—24]
- [17] **S. Perrier, V. Guieu, B. Chevelon, C. Ravelet, E. Peyrin.** Anal. Chem., **90** (2018) 4236—4248
- [18] **Y. Yu, Y. Liu, S. J. Zhen, C. Z. Huang.** Chem. Commun., **49** (2013) 1942—1944
- [19] **X. Xiao, Y. F. Li, C. Z. Huang, S. J. Zhen.** Chem. Commun., **51** (2015) 16080—16083
- [20] **S. J. Zhen, Y. Yu, C. M. Li, C. Z. Huang.** Analyst, **140** (2015) 353—357