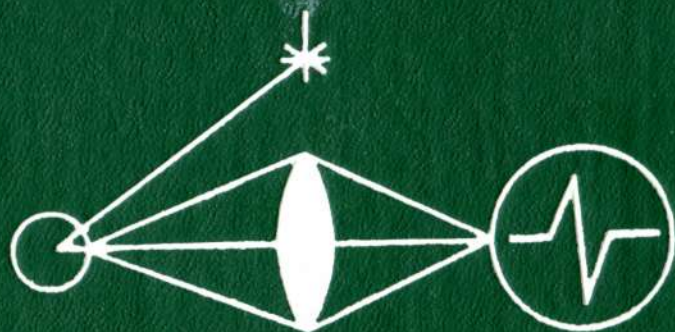
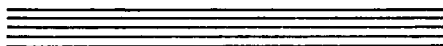


ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ



ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ



Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии / Лебедев А. Д., Левчук Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. — Киев : Наук. думка, 1987. — 256 с.

В монографии приведены данные исследований методами корреляционной спектроскопии широкого класса биологических объектов: белков, везикулярных мембран, ДНК, вирусов, клеток, рибосом и других надмолекулярных структур. Изложены физические основы метода, аппаратное обеспечение, математический аппарат анализа результатов спектральных и корреляционных измерений. Обсуждаются возможности нетрадиционных методов лазерной спектроскопии, позволяющие изучать внутреннюю релаксационную динамику биологических структур.

Для биологов, биохимиков, биофизиков, физиков, работающих в области биологии, а также преподавателей и студентов биологических и физических факультетов вузов.

Ил. 74. Табл. 16. Библиогр.: 267 назв.

Авторы :

А. Д. ЛЕБЕДЕВ, Ю. Н. ЛЕВЧУК, А. В. ЛОМАКИН, В. А. НОСКИН

Ответственный редактор А. П. ДЕМЧЕНКО

Рецензенты А. К. ДОРОШ, В. Л. ЗИМА, В. Я. АНТОНЧЕНКО

Редакция физиологической, биохимической и медицинской литературы

Монография

**АНДРЕЙ ДМИТРИЕВИЧ ЛЕБЕДЕВ, ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ ЛЕВЧУК,
АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ ЛОМАКИН, ВАЛЕНТИН АЛЕКСЕЕВИЧ НОСКИН**

ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ

Утверждено к печати ученым советом Института биохимии им. А. В. Палладина АН УССР

Редактор Т. Д. Станишевская. Оформление художника Г. М. Балюна. Художественный редактор Б. И. Прищепя. Технические редакторы В. А. Краснова, И. А. Ратнер. Корректоры Е. А. Дубарь, Л. Н. Бузиашвили

ИБ № 8805

Сдано в набор 18.03.87. Подп. в печ. 21.08.87. БФ 26104. Формат 60×90/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 16,0. Усл. кр.-отт. 16,0. Уч.-изд. л. 19,39. Тираж 1000 экз. Заказ 7—765. Цена 3 р. 20 к.

Издательство «Наукова думка». 252601 Киев 4, ул. Репина, 3.

Отпечатано с матриц Головного предприятия республиканского производственного объединения «Полиграфкнига». 252057, Киев, ул. Довженко, 3, в Нестеровской городской типографии. 292310, Нестеров, Львовской обл., ул. Горького, 8. Зак. 4546.

Необходимость полного и четкого изложения основных результатов исследований в наиболее актуальных и быстро развивающихся областях биофизики в наши дни особенно очевидна. Обилие научной информации часто может скрыть подлинную суть той или иной проблемы и увести исследователя (в особенности начинающего) в лабиринт трудоемких и в то же время бессмысленных поисков. Эту ситуацию в значительной степени могут облегчить работы, содержащие последовательное изложение какой-то одной проблемы с определенной точки зрения. Именно такой хотелось бы видеть авторам данную монографию.

Из названия книги следует, что она посвящена спектроскопии, т. е. анализу так или иначе преобразованного объектом светового поля. Однако корреляционная спектроскопия мало напоминает привычную традиционную спектроскопию. Ее основой служит статистический анализ светового поля, проводимый в реальном масштабе времени. Отсюда и принципиально новая концепция построения оптической схемы эксперимента, и новая техника детектирования, и особые требования к чистоте анализируемых объектов. В результате удается достичь разрешающей способности $\lambda/\Delta\lambda = \nu/\Delta\nu = 10^{15}$, кажущейся фантастической по сравнению с разрешающей способностью лучших спектральных приборов (10^7). Пожалуй, нет необходимости перечислять те возможности, которые открываются перед экспериментатором, получившим в свое распоряжение столь прецизионный метод. Результаты, правда, не так наглядны, как привычные для биологов кривые спектрального поглощения, и практически всегда требуют дальнейшей математической обработки на ЭВМ, но их уникальность и ценность оправдывают дополнительные усилия.

Корреляционная спектроскопия квазиупругого рассеянного света — это тот редкий случай физической методики, осознание возможностей которой в области биофизики, молекулярной биологии и физики полимеров пришло практически сразу же вслед за основополагающими исследованиями, приведшими к ее созданию. Соответствие этой методики задачам изучения растворов биологических систем отмечено практически во всех имеющихся в настоящее время обзорах, сборниках и монографиях, ей посвященных. Таким образом, с точки зрения исследователей, специализирующихся в области корреляционной спектроскопии, ситуация полностью ясна: нет более благоприятного объекта исследования, чем биологический. Но в той же ли степени для специалиста-биолога (биофизика, цитолога, иммунолога и т. д.) очевидна полезность обсуждаемой методики? Утвердительный ответ на этот вопрос после знакомства читателя с данной книгой был бы наиболее ценным ее результатом.

Корреляционная спектроскопия и биологические системы — два трудно сочетаемые понятия. Перед авторами стояла непростая задача: изложить материал доста-

точно просто и наглядно и в то же время без нарушения требуемой математической строгости. Словом, так, чтобы не очень разочаровать читателей-физиков и не слишком затруднить чтение книги биологам.

Начиная писать эту книгу, мы поставили перед собой двоякую цель. С одной стороны, продемонстрировать возможности корреляционной спектроскопии в биологии лицам, которые не собираются вникать в теоретические и методические проблемы, но хотят иметь возможность критического осмысления результатов такого рода исследований других авторов и целесообразности использования этого подхода в своей области. С другой стороны, учитывая, что в настоящее время развитие электроники сделало корреляционную спектроскопию вполне доступной, мы хотели, чтобы наша книга оказалась полезным руководством для тех, кто захочет освоить эту методику. В связи с этим мы сочли необходимым уделить большое внимание направлениям корреляционной спектроскопии, которые пока мало используются в повседневных исследованиях или даже находятся на стадии методических разработок, но представляются очень перспективными. Разумеется, мы идем на определенный риск, связанный с необходимостью сделать изложение достаточно популярным и в то же время не упустить важные детали, обсуждение которых требует от читателя довольно серьезной математической подготовки и знания физики. Мы сознательно пошли на это, поскольку считаем, что систематическое описание методов корреляционной спектроскопии и их приложений до сих пор отсутствует.

Исходя из описанной выше цели, мы разделили книгу на две части. В первой обсуждается собственно корреляционная спектроскопия в тех аспектах, которые необходимы для ее использования в биофизических исследованиях. В эту часть входит описание статистических свойств квазиупруго рассеянного света и информации, которая в них «зашифрована», различных методов извлечения этой информации и, наконец, очень важного в практическом отношении вопроса математической обработки результатов измерения. Читателю, интересующемуся только применением корреляционной спектроскопии к изучению биологических систем, готовому принять на веру все, что касается общих вопросов рассеяния и регистрации света, достаточно будет лишь беглого ознакомления с этой частью.

Во второй части обсуждаются динамические процессы, параметры которых могут быть определены с помощью корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света. Это трансляционное случайное блуждание, дающее нам информацию о размере частиц или подвижности микроорганизмов; движение частиц во внешнем поле, и в первую очередь электрофорез, позволяющий судить о заряде поверхности биологического объекта, что находит применение и как способ определения состава системы, и как очень чувствительный индикатор модификации поверхности. Наконец, это конформационная динамика макромолекул, изучение которой представляет в настоящее время большой интерес с биологической точки зрения. Мы старались сделать эту часть книги доступной для тех, кто знаком с физикой лишь в самых общих чертах, а когда это оказывалось невозможным, как, например, при описании внутренней динамики, давать подробное качественное описание обсуждаемых явлений.

Авторы признательны д-ру физ.-мат. наук В. Г. Флейшеру за ценные советы при написании книги. Мы благодарны Т. А. Лобко за помощь в оформлении рукописи.

В широком смысле оптический метод исследования состоит в изучении свойств света, исходящего от интересующего нас объекта. Свет может поглощаться, излучаться и рассеиваться, а мы можем измерять его интенсивность, поляризацию и спектр. Безусловно, наиболее сложными, но и наиболее информативными являются измерения спектра, хотя бы потому, что интенсивность и поляризация — только числа, а спектр — функциональная зависимость.

Первый патент на изобретение спектрометра принадлежит природе. В своей конструкции глаза она использовала молекулы, которые по-разному возбуждаются при облучении светом с различными длинами волн. Разрешающая способность глаза невелика, но совершенствуя принцип, лежащий в основе цветного зрения, можно прийти до разрешения, которое определяется естественной шириной атомных уровней, т. е. до величины порядка 10^6 . При этом, чтобы перекрыть весь видимый диапазон, нам понадобились бы сотни тысяч разных молекул, «настроенных» на свои длины волн, и целый комплекс мер, направленных на ликвидацию всевозможных механизмов дополнительного уширения их энергетических уровней. Человек нашел значительно более простой путь, тоже подсказанный природой.

Тонкие пленки бензина на воде, радуга, мыльные пузыри — все это примеры анализаторов спектров света. Во всех этих случаях происходит пространственное разделение исходного белого света на монохроматические световые волны. Приборы, основанные на этом принципе, особенно удобны тем, что могут работать и как монохроматоры, и как спектрометры: зная, куда попало данное монохроматическое излучение, можно определить его длину волны, и наоборот — из полихромного излучения мы можем с помощью узкой щели отобрать излучения нужной длины волны. Простейший такой прибор — это обыкновенная призма, которая широко используется в различных конструкциях призмных спектрометров — очень простых, надежных и удобных во всех случаях, когда не требуется разрешающая способность выше 10^4 . Если же этого не достаточно, то на помощь приходит явление, хорошо известное еще со времен Ньютона и 180 лет назад объясненное Юнгом и Френелем — явление интерференции.

На рис. 1 показана простейшая схема интерферометра, демонстрирующая принцип построения таких приборов. Реальные конструкции

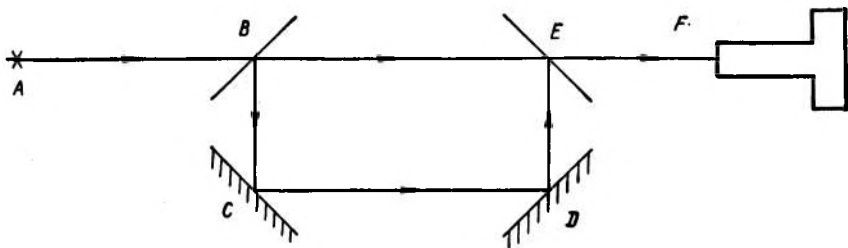


Рис. 1. Схема интерферометра Майкельсона

отличаются более целесообразным размещением элементов. Пусть источник излучения A испускает монохроматическую волну. Излучение в точке наблюдения F складывается из волны, прошедшей путь $ABEF$, и волны, прошедшей путь $ABCDEF$. Длины этих путей отличаются разностью хода $\Delta l = BC + DE$. Если эта разность хода кратна длине волны, то обе волны придут в точку F в фазе и усилят друг друга. Когда Δl равно полуцелому числу длин волн, волны, прошедшие двумя разными путями, придут в точку F в противофазе и погасят друг друга. Таким образом, меняя Δl , можно периодически гасить в точке F излучение данной длины волны. Аналогичная картина периодического гашения света будет наблюдаться, если менять длину волны при постоянной разности хода. В первом случае схема работает как спектрометр, во втором — как монохроматор. Нетрудно убедиться, что спектральное разрешение растет пропорционально разности хода. В современных многопроходных интерферометрах Фабри — Перро эффективная разность хода достигает сотен метров, а разрешение — соответственно около 10^8 . Эта цифра предельная для практических интерферометров. Несколько по-другому используется явление интерференции в спектрометрах на дифракционной решетке. Такие приборы проще интерферометров, но имеют меньшую разрешающую способность. Интерферометрические методы позволяют изучать спектр излучения примерно в 100 раз более узкий, чем естественная ширина атомных уровней. Этого разрешения, однако, не достаточно для широкого класса задач, связанных с измерениями спектра квазиупругого рассеянного света.

Свет рассеивается при прохождении через неоднородную среду. Именно поэтому мы хорошо видим через толстый слой чистой воды, но плохо — в тумане, состоящем из капелек той же воды. Качественно рассеяние удобно интерпретировать, исходя из принципа Гюйгенса, суть которого в следующем. В поле электромагнитной волны каждая частица материи становится источником вторичной сферической волны. Если вещество однородно, сферические волны от каждой точки имеют одинаковую интенсивность и интерферируют таким образом, что гасят друг друга во всех направлениях, кроме направления распространения падающей волны. Но если среда неоднородна, например один участок является источником более сильной сферической волны, чем соседние, эта волна останется нескомпенсированной. Произойдет рассеяние света.

Изучая зависимость интенсивности рассеянного света от направле-

ния (индикатрису рассеяния), можно получить информацию о взаимном расположении рассеивающих центров. Если рассеиватели расположены случайно, нет причин для того, чтобы волны от разных рассеивателей в каких-то направлениях складывались эффективнее, чем в других, и индикатриса рассеяния будет изотропной. Это действительно так, если рассеиватели точечные. В противном случае возникнет интерференция волн от разных частей одного и того же рассеивателя, и мы можем получить информацию о его структуре. Таким способом можно исследовать объекты, размер которых больше или порядка длины волны излучения; иначе волны от разных участков объекта будут приходить в фазе для всех направлений, и его нельзя будет отличить от точечного. К счастью, у нас в руках достаточно широкий арсенал излучений с разными длинами волн, и с помощью рентгеновского, нейтронного или светорассеяния возможно изучение частиц от молекулярных до видимых в обычный микроскоп размеров.

Принцип Гюйгенса опирается на тот факт, что свет представляет собой распространяющуюся волну электромагнитного поля, периодическую не только в пространстве, но и во времени. Итак, частица, на которую падает свет, находится в периодическом электромагнитном поле. Под действием этого поля заряды в частице колеблются, в свою очередь излучая электромагнитные волны. Частота этих вторичных волн равна частоте колебания зарядов, а значит, совпадает с частотой падающего света, но только если рассеивающая частица неподвижна. Пусть рассеиватель движется со скоростью V в поле электромагнитной волны с длиной волны λ , распространяющейся в направлении единичного вектора e . В какой-то момент он находится в максимуме электрического поля, тогда в следующем максимуме он окажется через время $\tau = \lambda / (c - Ve)$ (Ve — это проекция V на направление e). За время τ частица сместится на вектор $V\tau$, а рассеянный свет пройдет расстояние ct . Пусть мы наблюдаем рассеяние в направлении, задаваемом единичным вектором e' . В этом направлении расстояние между максимумами поля, т. е. длина волны, окажется равной $(c - Ve')\tau$ и, следовательно, если скорость частицы много меньше скорости света (а наши рассуждения справедливы только в этом пределе, пока не вступает в силу теория относительности), изменение частоты света, так называемое доплеровское смещение, равно $qV/2\pi$, где $q = \frac{2\pi}{\lambda} (e' - e)$, называют вектором рассеяния.

Поскольку все молекулы находятся в состоянии хаотического теплового движения, спектр рассеянного света на первый взгляд должен соответствовать максвелловскому распределению частиц по скоростям. Это верно, но только при рассеянии на разряженных газах, когда молекулы между столкновениями успевают пролететь расстояние намного больше длины волны света, и поэтому справедливы наши рассуждения, неявно предполагающие равномерность движения рассеивателя. Если скорость зависит от времени, частота рассеянной волны тоже зависит от времени, т. е. волна не является монохроматической, и ее следует разложить на составляющие монохроматические волны. Мы не будем пока обсуждать эту математическую

процедуру. Приведем лишь ответ в случае рассеяния на частице, совершающей хаотическое броуновское движение: спектр рассеянного света $I(\nu)$ имеет вид куполообразной кривой Лоренца с полушириной на полувысоте $\Gamma = Dq^2/2\pi$, где D — коэффициент диффузии частицы.

Полезно обратить внимание на то, что за время $1/\Gamma$ броуновская частица с коэффициентом диффузии D смещается в среднем на расстояние $1/q$, поэтому изменение частоты света — порядка обратного времени перемещения рассеивателя на расстояние $1/q$, точно так же, как и в случае движения с постоянной скоростью. И это не случайно, q^{-1} — это почти (с точностью до множителя, определяемого геометрией рассеяния) длина волны λ , а свет «не замечает» перемещений на расстояния меньше λ . Именно поэтому незначительные колебания атомов в твердых веществах вокруг их средних положений в основном не меняют частоту рассеянного света, хотя и приводят к появлению слабых дополнительных волн с частотой, смещенной на частоту колебания атомов. Но такое рассеяние (его в различных случаях называют комбинационным, бриллюэновским и Мандельштама-Рамана) правильнее интерпретировать как виртуальное поглощение кванта света и последующее испускание кванта другой частоты, с передачей дефицита энергии рассеивающему объекту. Мы же будем обсуждать так называемое рэлеевское рассеяние за счет крупномасштабных и медленных флуктуаций поляризуемости среды: связанных, в частности, и с перемещениями отдельных молекул среды на расстояния порядка длины волны света.

Каково же численно изменение частоты при рэлеевском рассеянии? Легко подсчитать, что для сферических броуновских частиц радиусом 10 нм в воде полуширина спектра при рассеянии на угол 90° $\Gamma \sim 10^4$ Гц, т. е. относительное изменение частоты 10^{-10} . Для более крупных частиц это изменение еще меньше — коэффициент диффузии обратно пропорционален размеру частицы. И если молекулярное рассеяние в жидкостях и газах еще находится в пределах возможностей классических спектрометрических методов, то для изучения движения макромолекул и надмолекулярных комплексов необходимо на несколько порядков большее разрешение. Другими словами, ситуацию можно сформулировать так: классическая интерферометрическая спектроскопия не позволяет измерять изменения частоты света меньше чем 10^7 — 10^8 Гц, т. е. не позволяет изучать процессы, протекающие медленнее, чем за 10^{-7} — 10^{-8} с. Как же перекрыть диапазон от секунд до долей микросекунд, чрезвычайно важный в биофизике, физике жидких кристаллов, медицине? Это можно сделать и делается с помощью корреляционной спектроскопии.

Еще несколько десятилетий назад при постановке эксперимента по квазиупругому рассеянию света в первую очередь возникла задача создания светового луча с шириной спектра меньшей, чем ожидаемое изменение частоты в процессе рассеяния. Для этого использовались монохроматоры разного типа. Но ясно, что любой монохроматор может быть использован и в качестве спектрометра: надо только настраивать его на разные частоты и измерять интенсивность прошедшего света. А так как при рассеянии ширина спектра может лишь увеличиваться,

разрешающая способность такого спектрометра автоматически оказывается на достаточном уровне.

С изобретением лазера ситуация в корне изменилась. В руках ученых оказался источник излучения с шириной спектра менее одного герца — на 7—8 порядков меньше, чем у лучших монохроматоров. Но ведь в качестве спектрометра лазер не приспособишь! Зато теперь отпала необходимость строить спектрометр-монохроматор, т. е. прибор, основанный на пространственном разделении света с разными длинами волн. И новые идеи не заставили себя ждать.

Обратимся вновь к схеме интерферометра на рис. 1. Но теперь предположим, что вместо полупрозрачного зеркала *B* стоит образец и луч *BCDEF* — это рассеянный свет с измененной частотой. Что мы увидим в точке *F*? Пусть в какой-то момент времени оба луча *ABEF* и *ABCDEF* пришли в точку *F* в фазе и сложились. Но если их частоты отличаются на величину $\Delta\nu$, через время $\tau \sim 1/\Delta\nu$ они окажутся в противофазе и вычтутся. Поэтому, если мы поставим в точку *F* фоторегистрирующий прибор, например фотоумножитель, сигнал на его выходе будет периодически меняться с частотой, равной изменению частоты света при рассеянии $\Delta\nu$.

Знакомый с радиотехникой читатель наверняка обратил внимание, что здесь использован тот же принцип, что и в обычном гетеродинном радиоприемнике. В нашей схеме промодулированный высокочастотный сигнал — это рассеянный луч *BCDEF*, сигнал гетеродина — нерассеянный луч лазера *ABEF*, а нелинейный элемент — фотоумножитель, сигнал на выходе которого пропорционален интенсивности света, т. е. квадрату амплитуды электрического поля. Этот способ измерения спектра света так и называется: метод оптического гетеродинирования. Любопытно, что эта аналогия, имеет, возможно, более глубокие исторические корни, чем это кажется на первый взгляд. Как свидетельствует Г. Камминс [101], в 1883 г. А. Ричи опубликовал статью «Об изменении длин волн с помощью вращательного поляриметра и явление получения биений с помощью светового вибратора». В этой статье он пишет: «...если получить интерференцию между двумя лучами, частоты которых немного отличаются, возникнет однородное движение полос... так что через точечную диафрагму будет ежесекундно проходить число полос, равное разности частот световых лучей. Таким образом, будет наблюдаться явление, аналогичное биениям звуковых волн в воздухе». Автор подчеркнул, что в его опытах оба луча происходили от одного и того же источника света, а разность частот возникала из-за прохождения одного из них через поляризационную призму Николя. Если учесть, что Ричи был учителем Маркони, то есть основания считать, что гетеродинное детектирование пришло в радио из оптики, а не наоборот.

Попробуем рассуждать дальше. Вспомним, что рассеянный луч обычно немонохроматичен. В нем присутствуют гармоники с разными значениями $\Delta\nu$, биения между которыми также будут зарегистрированы фотоприемником. Если гетеродинный луч достаточно силен, в спектре фототока будут преобладать биения между гетеродинной и рассеянной волнами. Перекрыв гетеродинный луч, мы будем изучать

спектр флуктуаций интенсивности рассеянного света, или, как часто говорят, гомодинный спектр. Этот спектр может «рассказать» о свойствах рассеивающей системы не хуже гетеродинного. Более того, очень часто эти спектры однозначно связаны. Например, гомодинный спектр света, рассеянного на броуновских частицах, будет иметь такой же лоренцевский вид, только с большей в два раза шириной. Однако доплеровское смещение при гомодинной схеме измерений нельзя определить — общий сдвиг частоты не влияет на интенсивность излучения.

Итак, идея корреляционной спектроскопии состоит в том, чтобы измерять не саму частоту света, а разность частот гармоник, входящих в состав регистрируемого излучения, «смешивая» эти гармоники на фотоприемнике, который одновременно является квадратирующим элементом. Отсюда и еще одно из названий — метод оптического смешения. Вообще, по числу различных названий этот метод может быть достойным претендентом в книгу рекордов Гиннеса. Его еще называют: метод корреляции фотонов, метод светобийений, спектроскопия флуктуаций интенсивности, метод корреляций интенсивности, лазерная корреляционная фотометрия, доплеровская спектроскопия, рэлеевская спектроскопия сверхвысокого разрешения, а в применении к конкретным исследованиям — метод квазиупругого светорассеяния, метод динамического светорассеяния или даже просто — метод лазерного светорассеяния. Все эти названия, хотя и отражают иногда определенные методические нюансы, обозначают, по существу, один и тот же тип эксперимента, а именно изучение квазиупругого рассеянного света с помощью корреляционной спектроскопии. Еще раз подчеркнем, что речь идет об измерении не интенсивности спектра света, а спектра интенсивности света. Этой перестановке слов соответствует перестановка приборов. Раньше свет сначала проходил через спектральный прибор, а затем регистрировался фотоприемником, а теперь свет сначала регистрируется фотоприемником, а затем уже фототок анализируется спектральным прибором.

Очень полезно взглянуть на корреляционную спектроскопию с несколько другой точки зрения. Если рассеивающие частицы неподвижны, на поверхности фотоприемника имеется сложная картина интерференции волн от различных частиц и гетеродинного луча (если он есть). Когда рассеиватели движутся, интерференционная картина меняется, т. е. интенсивность излучения в каждой точке фотоприемника флуктуирует. Ясно, что заметные изменения происходят, когда фазы интерферирующих волн меняются на величину порядка единицы.

Легко проверить, что изменение оптического пути при перемещении рассеивателя на расстояние r равно qr . Поэтому интерференционная картина «живет» время, необходимое для того, чтобы частица переместилась на расстояние $1/q$, что, как мы видели, есть как раз обратное изменение частоты света при рассеянии — $1/\Delta\nu$. При гетеродинировании интерферируют гетеродинная волна и волны, рассеянные каждой отдельной частицей. При гомодинировании мы наблюдаем результат интерференции волн, рассеянных разными частицами, поэтому флуктуации фототока определяются относительным движением рассеивателей. А если рассеиватель всего один? Тогда фототок не будет меняться

из-за его перемещения и гомодинный спектр не будет иметь ничего общего с гетеродинным. В нем проявятся только флуктуации яркости рассеянного частицей света, связанные с изменениями ее состояния, если таковые имеются.

Наконец, еще одно любопытное обстоятельство. Мы знаем, что интерференционную картину прекрасно можно получить в немонохроматическом свете. Если в корреляционной спектроскопии анализируются флуктуации интерференционной картины во времени, как это 100 лет назад делал А. Ричи, то естественно задать вопрос: а так ли уж необходим лазер? Конечно, лазер очень удобный и мощный источник излучения, но в принципе без него действительно можно обойтись. Но если метод так хорош, идея так проста и лазер не нужен, то почему же к этому не пришли раньше? Во-первых, как мы видели, кое-что было понято еще в прошлом веке. Во-вторых, идеи, лежащие в основе корреляционной спектроскопии, были сформулированы Г. С. Гореликом в 40-х годах [15]. В-третьих, первый эксперимент такого рода был выполнен А. Форрестером в 1955 г. без всякого лазера: он наблюдал биения между двумя зеемановски расщепленными линиями атома ртути [109]. В-четвертых, идеи не так уж просты. Регистрация света — эффект квантовый, свет поглощается только «штучно». И с этой точки зрения совершенно не понятно, как квант рассеянного света «узнает», что до или после него поглощается квант гетеродинного луча. Впрочем, на квантовом языке трудно понять любые интерференционные явления. Этот кажущийся парадокс корпускулярно-волнового дуализма в очередной раз вызвал довольно бурную дискуссию в связи со знаменитым экспериментом Хэнбери-Брауна и Твисса [140], идея которого близка корреляционной спектроскопии. Итог этой дискуссии, подведенный квантовой электродинамикой, состоит в том, что все приведенные выше рассуждения справедливы, за исключением некоторых специальных случаев, обсуждение которых увело бы нас далеко в сторону. И наконец, в-пятых, анализ спектра флуктуаций фототока — дело сложное, ведь информацию приходится извлекать в буквальном смысле слова из шума, анализируя случайные флуктуации фототока. Для того чтобы определить спектр детерминированного периодического сигнала с разрешением $\Delta\nu$, необходимо, как известно, проводить измерения в течение времени не меньше чем $1/\Delta\nu$. Но если наши измерения точны, то мы точно узнаем и спектр сигнала. Совсем другое дело «вытаскивать» этот спектр из шумовых флуктуаций фототока. Оказывается, что как бы точно мы не измеряли фототок, погрешность определения спектра шума с разрешением $\Delta\nu$ за минимально необходимое время $1/\Delta\nu$ равна 100 %, а процентная точность достигается только в том случае, если время измерений в 10^4 раз больше. Теперь вспомним, что речь идет о низких частотах. В типичных биофизических исследованиях ширина спектра варьирует от десятков килогерц до десятков герц, а иногда и меньше. И если мы говорим о процентной точности, то и разрешение должно быть по крайней мере в несколько десятков раз меньше ширины. Легко подсчитать, что время измерения только одной гармоники спектра с такой точностью и таким разрешением лежит в интервале от десятков секунд до часа. И мы обнаруживаем, что время

всего эксперимента растягивается от едва допустимого до совершенно неприемлемого.

Единственный выход — это измерять спектр на всех частотах одновременно. Это значит — перерабатывать всю информацию в темпе ее поступления, или, как говорят, в реальном масштабе времени. Сделать это не просто. Конечно, можно было бы одновременно использовать много спектрометров, настроенных на разные частоты. Современная радиоэлектроника решает задачу иначе. По существу, спектрометр реального масштаба времени представляет собой цифро-аналоговую или полностью цифровую быстродействующую специализированную ЭВМ. Сигнал на входе такого прибора превращается в последовательность чисел, а дальше... Дальше дело техники, но техники, о которой 20 лет назад можно было только мечтать.

Появление лазера и достижения электроники — вот два фактора, которые обусловили переход корреляционной спектроскопии из категории уникальных физических экспериментов в мощную и очень продуктивную методику изучения динамики рассеивающих систем. Сейчас в научной периодике ежегодно публикуются сотни работ, в основном посвященных исследованию макромолекул и надмолекулярных комплексов, выполненных этим методом. Каковы же возможности лазерной корреляционной спектроскопии? Мы надеемся, что наша книга даст на этот вопрос достаточно полный ответ.

ГЛАВА

1

КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КВАЗИУПРУГО РАССЕЯННОГО СВЕТА

Общим понятием корреляционного анализа обозначаются методы изучения статистических свойств случайной величины, или (как часто говорят о случайной величине, зависящей от времени) случайного сигнала. Оптическая корреляционная спектроскопия призвана изучать статистические свойства электромагнитного поля в оптическом диапазоне частот, т. е. света. Эта задача обладает рядом специфических особенностей и не сводится только к вопросам корреляционного анализа случайного сигнала. Дело в том, что электромагнитное поле света не может быть непосредственно измерено ввиду его квантовой природы. Измеримой величиной является сигнал на выходе фотоприемника, мгновенное значение которого пропорционально числу поглощенных в этот момент фотонов. Поэтому основное содержание корреляционной спектроскопии света составляет не столько корреляционный анализ свойств фототока, который практически ничем не отличается от анализа сигнала любой другой природы, сколько соотнесение этих свойств со свойствами регистрируемого излучения.

Связь между статистикой фотоотсчетов и регистрируемым электромагнитным полем может быть строго установлена только в рамках квантовой электродинамики. Но практически во всех приложениях корреляционной спектроскопии оказываются справедливыми простейшие представления о свете как о классических электромагнитных волнах и о регистрации света как о последовательности случайных фотоотсчетов, вероятность каждого из которых пропорциональна квадрату напряженности электрического поля в точке наблюдения, т. е. интенсивности света. Эта картина верна в тех же пределах, в которых справедливы классическое описание электромагнитного поля и одноквантовый характер его регистрации, для чего, в частности, необходимо, чтобы энергия кванта была намного больше энергии тепловых флуктуаций в фотоприемнике. Полуклассические представления о процессе регистрации света рассматриваются нами как постулат и обсуждаться не будут.

В этой главе рассмотрены узловые вопросы корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света: статистические свойства света и его пространственно-временная когерентность; связь статистических свойств сигнала на выходе фотодетектора с корреляциями в регистрируемом излучении; проблема анализа случайного сигнала в

реальном масштабе времени, т. е. без потерь информации; наконец, теория квазиупругого рассеяния света. Разумеется, сколько-нибудь полное и последовательное обсуждение всех этих вопросов в рамках одной книги, а тем более одной главы невозможно. Да это и вряд ли нужно читателю, интересующемуся приложениями корреляционной спектроскопии в биологии. Поэтому мы ограничились конспективным изложением определений и сведений, которые необходимы для понимания того, что такое корреляционная спектроскопия и почему тот или иной эксперимент делается именно так, а не иначе. В то же время, поскольку систематическое описание физических основ корреляционной спектроскопии в их взаимосвязи отсутствует, мы сочли необходимым вести наше изложение с достаточно общих позиций, прослеживая генезис утверждений, используемых в последующих главах книги, и подкрепляя эти утверждения если не строгими доказательствами, то по крайней мере разъяснением их физического смысла и ссылками на соответствующие учебники и монографии.

§ 1.1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

Электромагнитное поле как случайная величина. В корреляционной спектроскопии напряженность электромагнитного поля оптического излучения необходимо рассматривать как случайную величину. Во-первых, нас обычно интересует перерассеянное излучение, которое несет отпечаток стохастичности рассеивающей среды, подразумеваемой самим термином «рассеяние» (взаимодействие излучения с детерминированной системой чаще называют дифракцией). Во-вторых, процесс испускания света не является детерминированным в классическом смысле. И хотя самое важное в практическом отношении лазерное излучение можно считать детерминированным, интересующее нас электромагнитное поле или уже изначально, или в результате взаимодействия с рассеивающей средой оказывается случайным. Это означает, что каждая конкретная реализация поля в некоторой области пространства и в течение определенного времени уникальна и внешне непохожа на другую реализацию. Отсюда не следует, что они не имеют ничего общего. Стохастическое излучение может быть охарактеризовано с помощью величин, которые являются основополагающими в корреляционной спектроскопии света. Простейшие из них — интенсивность и поляризация, характеризующие амплитуду и направление поля; более общие — спектр и связанная с ним преобразованием Фурье корреляционная функция поля, описывающие изменения амплитуды во времени, и наконец, функция пространственно-временной когерентности, включающая в рассмотрение не только временные, но и пространственные корреляции электромагнитного поля. В большинстве практически важных случаев функция когерентности полностью определяет свойства излучения. Исключение составляют поля с негауссовой статистикой, более сложные характеристики которых, такие, например, как спектр флуктуаций интенсивности, не могут быть выражены через функцию когерентности. В таких случаях, как мы увидим, спектр

флуктуаций интенсивности может нести важную дополнительную информацию о рассеивающей системе.

Прежде чем перейти к определению перечисленных выше понятий, что является основной целью этого параграфа, полезно выяснить, какие вообще реализации электромагнитного поля возможны. Ведь поле должно удовлетворять уравнениям Максвелла, а значит, его временные и пространственные свойства тесно связаны друг с другом и не могут быть произвольными. Вдали от рассеивающего объема в однородной среде эта связь находит свое наиболее простое выражение в возможности представить электрическое поле электромагнитного излучения в виде суммы поперечных плоских волн:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_{\mathbf{k}} \mathbf{e}_{\mathbf{k}} e^{i\omega_{\mathbf{k}}t - i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}. \quad (1.1)$$

Согласно уравнениям Максвелла $\mathbf{e}_{\mathbf{k}} \cdot \mathbf{k} = 0$, т. е. векторы $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ и $\mathbf{k}$ перпендикулярны, а частота $\omega_{\mathbf{k}}$ волны с волновым вектором $\mathbf{k}$ определяется соотношением $\omega_{\mathbf{k}} = ck$, где $c = c_0/n$ — скорость света в среде; n — показатель преломления, а $c_0 = 3 \cdot 10^8$ м/с — скорость света в вакууме. Формула (1.1) представляет поле в комплексном, или, как часто говорят, аналитическом, виде, что диктуется соображениями математического удобства. Физическому полю соответствует действительная часть этого выражения.

Итак, поле излучения полностью характеризуется набором комплексных векторов $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$. Именно их и следует рассматривать как случайные величины. На первый взгляд эта концепция представляется внутренне противоречивой. Действительно, для того чтобы выражение (1.1) удовлетворяло уравнениям Максвелла, $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ должны быть постоянны и, следовательно, никак не могут быть случайными величинами. Тем не менее если $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ меняются достаточно медленно, так что не успевают существенно измениться за время порядка $\omega_{\mathbf{k}}^{-1}$, (1.1) оказывается очень хорошим приближенным выражением для поля. Его относительная точность порядка $(\omega_{\mathbf{k}}\tau)^{-1}$, где τ — характерное время изменения $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$. Поскольку самые малые τ , которые встречаются в задачах, решаемых с помощью корреляционной спектроскопии, не меньше 10^{-8} с, а частота оптического излучения $\sim 10^{15}$ Гц, относительная величина поправок к (1.1) не превышает 10^{-7} . Можно рассуждать и несколько по-другому. Пусть $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ медленно меняются не только во времени, но и в пространстве, так, чтобы (1.1) точно удовлетворяло уравнениям Максвелла. Тогда характерный пространственный масштаб изменения $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ должен быть порядка $c\tau$. Таким образом, при $\tau > 10^{-8}$ с $\mathbf{e}_{\mathbf{k}}$ практически не меняются на расстоянии в несколько метров, и мы можем просто игнорировать их пространственную зависимость.

В дальнейшем мы почти всегда будем иметь дело с еще более простым случаем квазимонохроматического излучения: $\omega_{\mathbf{k}} - \omega_{\mathbf{k}'} \ll \omega_{\mathbf{k}}$. При этом зависимость от времени электрического поля света в какой-либо точке $\mathbf{r}$ вдали от источника излучения принимает совсем простой

вид:

$$E(t) = \varepsilon(t) e^{i\omega_0 t - ik_0 s}, \quad (1.2)$$

где ω_0 — средняя частота; $\varepsilon(t)$ — случайная комплексная векторная величина, мало изменяющаяся за время ω_0^{-1} .

Мы качественно обосновали возможность описания света совокупностью промодулированных волн. Поскольку векторы ε_k комплексны, модуляция может быть как амплитудной, если меняется модуль ε_k , так и фазовой, если меняется фаза ε_k . В интересующих нас задачах модулирующие функции ε_k являются случайными величинами. Теперь мы должны связать свойства этих случайных величин со свойствами рассеивающей системы, с одной стороны, и со свойствами сигнала на выходе фотодетектора, регистрирующего такой свет, — с другой. Но чтобы эта программа стала содержательной, необходимо в первую очередь выяснить, каким образом вообще могут быть количественно охарактеризованы случайные величины.

Свойства случайной величины. Объектом эксперимента могут быть лишь воспроизводимые величины. Хотя с философской точки зрения это утверждение, возможно, слишком категорично, у практического исследователя оно вряд ли вызовет возражения. В чем же тогда смысл введения в физику математического понятия «случайная величина»? Конечно, сама по себе реализация случайной величины не может быть объектом непосредственного экспериментального исследования. Но то, что она невоспроизводима, не означает, что у нее нет вполне воспроизводимых, а значит, и экспериментально измеримых свойств. Именно эти свойства и имеют физический смысл. Появление в физике случайных величин не случайно. Они используются в основном для описания флуктуационных явлений и позволяют избавиться от необходимости микроскопического описания там, где нас интересуют лишь макроскопические, усредненные свойства системы. В конечном счете случайность физической величины есть результат неумения или нежелания полностью описывать состояние системы, поведение которой в противном случае оказалось бы детерминированным по крайней мере в квантово-механическом смысле. Другими словами, флуктуации невоспроизводимы, потому что невозможно добиться полной идентичности условий их наблюдения.

Пусть величина φ есть функция обобщенных координат $\{x\}$, которые полностью определяют состояние системы. Задав исходное состояние $\{x(0)\}$ и решив соответствующие динамические уравнения, мы можем найти $\{x(t)\}$ и, следовательно, узнать, как φ меняется со временем. Предположим теперь, что мы можем измерять $\varphi(t)$, но ничего или очень мало знаем о микроскопическом состоянии. Тогда, даже определив φ в конечном числе моментов времени, мы не сможем с уверенностью судить о дальнейшем ее поведении; $\varphi(t)$ окажется случайной величиной.

Не зная микроскопического состояния системы, невозможно предсказать значение φ . Зато можно узнать вероятность того, что φ имеет какое-то определенное значение φ_0 . Для этого надо рассмотреть ан-

самбля, т. е. бесконечно большое число тождественных систем со всевозможными микроскопическими состояниями $\{x\}$, и определить, какова доля систем, для которых $\varphi\{x\} = \varphi_0$.

Математически эта процедура выполняется путем усреднения δ -функции от $\varphi\{x\} - \varphi_0$ по ансамблю систем. Аналогично, вероятность того, что $\varphi(t_0) = \varphi_0$, а $\varphi(t_1) = \varphi_1$ есть среднее по всем возможным начальным значениям координат от $\delta(\varphi\{x(t_0)\} - \varphi_0) \delta(\varphi\{x(t_1)\} - \varphi_1)$. И вообще вероятность найти в M моментов времени t_i ($i = 0, 1, 2, 3, \dots, M-1$) значения $\varphi(t_i)$, равные φ_i , есть

$$P(\{\varphi\}) = \left\langle \prod_{i=0}^{M-1} \delta(\varphi\{x(t_i)\} - \varphi_i) \right\rangle, \quad (1.3)$$

где угловые скобки означают усреднение по ансамблю тождественных систем. Разумеется, такой подход осмыслен только до тех пор, пока M намного меньше числа обобщенных координат.

Итак, определенное, воспроизводимое значение имеет не сама случайная величина, а вероятность обнаружить ту или иную ее реализацию. Если эта вероятность не зависит от выбора начального времени t_0 , случайная величина называется стационарной. В частности, флуктуации в системе, находящейся в термодинамическом равновесии, стационарны. Вероятность (1.3) реализации случайной величины получена как результат сложения вероятностей этой реализации для каждой системы из ансамбля со всеми наборами начальных значений координат $\{x(t_0)\}$. На практике мы, как правило, имеем дело лишь с одной системой. Поэтому огромное значение для описания флуктуаций имеет гипотеза об эргодичности, устанавливающая для термодинамически равновесных систем эквивалентность процедур усреднения по ансамблю и усреднения по начальному времени t_0 для одной системы. Эргодичность означает, что в течение времени координаты равновесной системы принимают все возможные наборы значений, что лежит в основе всей физики флуктуационных явлений [38].

Вероятность реализации — это самое общее описание случайной величины. Однако прямое экспериментальное измерение $P(\{\varphi\})$ совершенно неэффективно, так как необходимо проанализировать слишком много реализаций, чтобы получить сколько-нибудь достоверный результат. На самом деле измеряются те или иные средние по времени характеристики случайной величины, совпадающие в силу эргодичности со средними по ансамблю. Поскольку во многих случаях вероятность реализации представляет собой известного вида функционал, зависящий от нескольких параметров, обычно достаточно знать не очень большое число средних характеристик, чтобы полностью описать случайный процесс.

Корреляционная функция и спектр. Простейшая характеристика случайной величины — это ее среднее значение. В теории случайных процессов это среднее значение удобно принять равным нулю, изучая свойства величины $\varphi - \langle \varphi \rangle$ и рассматривая $\langle \varphi \rangle$ как самостоятельную, детерминированную характеристику системы. Именно такой смысл имеет подавляющее большинство физических величин, характеризующих макроскопическую систему: давление, ток, намагниченность и т. д.

В нашем случае среднее значение комплексной амплитуды рассеянного электромагнитного поля равно нулю и вообще не содержит никакой информации.

Следующая по сложности и заведомо отличная от нуля характеристика случайного процесса носит название «парная корреляционная функция», или просто «корреляционная функция». Парная корреляционная функция $G(t_1, t_2)$ — это среднее произведение значений случайной величины в два разных момента времени:

$$G(t_1, t_2) = \langle \varphi(t_1) \varphi(t_2) \rangle. \quad (1.4)$$

В случае стационарного процесса корреляционная функция зависит только от одной переменной $\tau = t_2 - t_1$, причем по самому определению (1.4) — только от $|\tau|$. $G(\tau)$ при $\tau = 0$, т. е. $\langle \varphi^2 \rangle$, называется мощностью, или интенсивностью, случайной величины и характеризует размах флуктуаций φ . Корреляционная функция является важнейшей характеристикой случайного процесса. Дело в том, что в очень многих практически важных случаях случайная величина приближенно имеет гауссову статистику. Вероятность той или иной реализации гауссовой случайной величины может быть явно (как именно, читатель увидит ниже) выражена через парную корреляционную функцию, которая тем самым исчерпывающим образом описывает случайный процесс.

Специальное название имеет и фурье-образ парной корреляционной функции:

$$I(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \quad (1.5)$$

называется спектром мощности случайной величины. Как видно по названию, корреляционная функция и ее фурье-образ (спектр мощности) являются основными понятиями корреляционной спектроскопии. Поэтому нам важно выяснить их физический смысл, и в первую очередь их связь с обычным линейным спектром, который представляет собой фурье-образ самой временной реализации. Совершенно очевидно, что переходя от периодического сигнала к случайному, мы теряем возможность такого прямого определения спектра. Можно, конечно, вычислить результат $\tilde{\varphi}(\omega)$ преобразования Фурье какой-либо реализации случайной величины $\varphi(t)$, но другая реализация $\varphi'(t)$ не совпадает с $\varphi(t)$ и, следовательно, $\tilde{\varphi}(\omega) \neq \tilde{\varphi}'(\omega)$. На первый взгляд $\tilde{\varphi}(\omega)$ тоже может быть произвольной случайной величиной. Это верно только наполовину. Сейчас мы увидим, что произвольными могут быть лишь фазы комплексных величин $\tilde{\varphi}(\omega)$, но не их амплитуды.

В отличие от самой случайной величины, ее парная корреляционная функция имеет вполне определенное значение. Пользуясь эргодичностью, эту функцию в случае стационарного сигнала можно записать в виде

$$G(\tau) = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T \varphi(t) \varphi(t + \tau) dt, \quad T \rightarrow \infty. \quad (1.6)$$

Делая преобразование Фурье по переменной τ и учитывая, что вследствие действительности $\varphi(t)$ $\tilde{\varphi}(\omega)^* = \tilde{\varphi}(-\omega)$, получим

$$I(\omega) = |\tilde{\varphi}(\omega)|^2. \quad (1.7)$$

Итак, амплитуда $\varphi(\omega)$ имеет вполне определенное значение: ее квадрат равен значению спектра мощности случайной величины на данной частоте ω . Это утверждение составляет, по существу, содержание так называемой теоремы Винера — Хинчина [5].

Заметим, что процесс измерения спектра как случайного, так и детерминированного сигнала фактически один и тот же. И в том, и другом случае сигнал пропускается через частотный фильтр, который выделяет гармонику $\tilde{\varphi}(\omega)$ на частоте ω , после чего определяется именно амплитуда этой гармоники обычно просто детектированием, т. е. с помощью нелинейной, квадратирующей операции. Это приходится делать всегда, поскольку у детерминированного сигнала фаза гармоники зависит от выбора начала отсчета. Единственное отличие детерминированного сигнала заключается в том, что при выборе начала отсчета фиксируются фазы сразу всех гармоник, но при измерении данной конкретной гармоники это несущественно. Разница между случайным и детерминированным сигналом проявляется только в том случае, если мы заинтересуемся статистической ошибкой измерения $G(\tau)$. В дальнейшем этот вопрос будет подробно рассмотрен.

Корреляционная функция случайного сигнала показывает, насколько взаимозависимы значения φ , разделенные отрезком времени τ . Она обычно убывает с ростом τ , хотя и не обязательно монотонно. Во всяком случае при $\tau \rightarrow \infty$ $G(\tau)$ стремится к нулю, конечно, если $\langle \varphi \rangle = 0$. Характерное время заметного убывания $G(\tau)$ называют временем корреляции τ_c . Это время, за которое случайная величина «забывает» свое начальное значение, т. е. фактически время релаксации $\varphi(t)$. Нетрудно убедиться, что характерная ширина спектра $\Gamma \sim \tau_c^{-1}$. Определяя время корреляции или обратную ему величину — ширину спектра мощности, мы можем судить о релаксации в системе, характеризующей рассматриваемой случайной величиной.

Поскольку $G(\tau) = G(-\tau)$, спектр мощности симметричен относительно нуля и действителен, если, разумеется, действительна сама случайная величина. На практике часто приходится иметь дело с комплексными случайными величинами, например при описании электромагнитного поля. В этом случае сделанные выше утверждения относятся к парной корреляционной функции, определенной следующим образом:

$$G(\tau) = \langle \varphi(0) \varphi^*(\tau) \rangle. \quad (1.8)$$

Тогда $G(\tau) = G^*(-\tau)$ и спектр мощности действителен, как этого требует выражение (1.7), но не обязательно симметричен. Дальнейшим обобщением парной корреляционной функции, которая описывает поведение одной случайной величины и поэтому часто называется также автокорреляционной функцией, является функция взаимной

корреляции $G^{ss}(\tau)$, характеризующая взаимозависимость *двух* случайных величин в разные моменты времени:

$$G^{ss}(\tau) = \langle \varphi_1(0) \varphi_2^*(\tau) \rangle. \quad (1.9)$$

$G^{ss}(\tau)$ равна нулю, если φ_1 и φ_2 независимы. Функция взаимной корреляции уже не обладает в общем случае симметрией по отношению к замене знака τ . Соответственно фурье-образ $G^{ss}(\tau)$ — комплексная функция и не имеет простого физического смысла.

Высшие корреляторы. Всем хорошо известно распределение Гаусса — вероятность обнаружить значение φ случайной величины с гауссовой статистикой в какой-либо момент времени:

$$P(\varphi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \langle \varphi^2 \rangle}} e^{-\frac{\varphi^2}{2\langle \varphi^2 \rangle}}. \quad (1.10)$$

Обобщением этого распределения, описывающим вероятность (1.3) реализации набора значений, является выражение

$$P(\{\varphi_i\}) = \frac{1}{(2\pi)^{M/2} \sqrt{\|G\|}} e^{-\frac{1}{2} \sigma_{ij}^{-1} \varphi_i \varphi_j}, \quad (1.11)$$

где матрица $G_{ij} \equiv G(t_i - t_j)$, $\|G\|$ — ее определитель. Выражая с помощью (1.5) G_{ij} через спектр мощности, можно найти распределение вероятностей фурье-гармоник реализации гауссового случайного процесса.

$$P(\{\tilde{\varphi}\}) = \prod_i \frac{1}{\sqrt{2\pi I(\omega_i)}} e^{-\frac{|\tilde{\varphi}(\omega_i)|^2}{2I(\omega_i)}}. \quad (1.12)$$

Вероятность $P(\{\tilde{\varphi}\})$ представляет собой произведение гауссовых распределений вероятностей реализации каждой отдельной гармоники, что объясняет, почему именно спектр случайной величины является такой удобной и часто эксплуатируемой характеристикой: потому, что все спектральные гармоники статистически независимы.

Формула (1.12) позволяет легко вычислять высшие корреляционные функции $\tilde{\varphi}(\omega)$, а значит, и $\varphi(t)$. В частности

$$\langle \varphi(t_1) \varphi(t_2) \varphi(t_3) \varphi(t_4) \rangle = C_{21} G_{43} + G_{31} G_{42} + G_{41} G_{32}. \quad (1.13)$$

Формула (1.13) указывает способ выражения корреляционной функции гауссовой случайной величины любого порядка через парные корреляционные функции: нужно сложить произведения парных корреляторов, соответствующих всем возможным разбиениям сомножителей исходного высшего коррелятора на пары. Можно доказать справедливость и обратного утверждения: если высшие корреляторы выражаются через парные указанным способом, случайная величина подчиняется гауссовой статистике. Это позволяет объяснить, почему гауссовыми являются величины, представляющие собой сумму большого числа статистически независимых вкладов.

Пусть $\Phi = \sum_{n=1}^n \alpha_n$. Если все α_n независимы, т. е. равны нулю все функ-

ции взаимной корреляции $\langle \alpha_n(0) \alpha_m^*(\tau) \rangle$ при $n \neq m$, ненулевой вклад в высший коррелятор дадут только произведения, в которых индексы сомножителей попарно совпадают, что соответствует приведенной выше схеме разбиения на парные корреляционные функции. Некоторые отличия возникают из-за произведений, в которых более двух сомножителей α имеют один и тот же индекс. Но, как нетрудно убедиться, число таких членов мало по параметру $1/N$ по сравнению с числом членов, в которых индексы совпадают только попарно. Поскольку в реальной ситуации мы очень часто имеем дело с системами, которые можно разбить на значительное число независимых подсистем, дающих аддитивный вклад в наблюдаемую величину, гауссова статистика представляет собой хорошее и широко применяемое приближение при описании статистических свойств физических случайных величин.

Если статистика негауссова, соотношения типа (1.13) неприменимы. В общем случае для исчерпывающего описания случайной величины необходимо знание корреляционных функций всех порядков, что эквивалентно знанию вероятности реализаций. Однако с методической точки зрения измерение корреляторов удобнее, чем определение вероятности, а теоретическое вычисление их проще. Поэтому на практике обычно ограничиваются изучением нескольких простейших корреляционных функций. Ведь в конечном счете целью изучения случайного процесса является получение информации о системе, в которой этот процесс происходит. И хотя в случае негауссовой статистики информация, которую несут корреляторы разного порядка, не тождественна, она обычно и не независима, и вопрос состоит лишь в том, из какой корреляционной функции проще извлечь интересующие нас сведения об исследуемой системе.

Корреляционные свойства электромагнитного излучения. В корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света мы сталкиваемся с двумя разными случайными процессами, для описания которых нам понадобятся приведенные выше сведения. Первый — это флуктуирующий ток на выходе фоторегистрирующего устройства, статистические свойства (а именно парная корреляционная функция или спектр мощности) которого и определяются в процессе эксперимента. Второй случайной величиной является само электромагнитное поле, корреляционные свойства которого мы должны связать со свойствами фототока и рассеивающей системы. Однако для полного описания корреляционных свойств электромагнитного излучения необходимо учесть, что в отличие от фототока поле — это комплексная векторная случайная величина, меняющаяся не только во времени, но и в пространстве. Поэтому корреляционная функция электромагнитного поля имеет более сложную структуру и является тензором:

$$G(r_1, r_2, \tau) = \langle E(r_1, 0) \otimes E^*(r_2, \tau) \rangle. \quad (1.14)$$

Напомним, что вследствие поперечности электромагнитной волны отличны от нуля только декартовы компоненты тензора G в плоскости,

перпендикулярной к направлению распространения излучения. Коррелятор (1.14) часто называют еще функцией когерентности [7]. Последняя полностью описывает статистические свойства гауссова электромагнитного поля. Большинство понятий волновой оптики являются частными случаями этой функции.

Простейшая характеристика электромагнитной волны — это ее интенсивность J , которая пропорциональна среднему квадрату поля, т. е. сумме диагональных элементов тензора (1.14):

$$J(\mathbf{r}) \equiv \langle |\mathbf{E}(\mathbf{r})|^2 \rangle = Sp \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}, 0). \quad (1.15)$$

Более сложной, но также локальной во времени и в пространстве характеристикой является поляризационная матрица $\frac{1}{J} \mathbf{G}(\mathbf{r}, \mathbf{r}, 0)$, элементы которой определяют поляризацию излучения [37]. В дальнейшем мы почти не будем обсуждать поляризацию регистрируемого излучения, считая его или изначально поляризованным, или пропущенным через линейный поляризатор и рассматривая соответствующую компоненту вектора $\mathbf{E}$ как скаляр.

Очень широко используемым в волновой оптике понятием является функция пространственной когерентности:

$$G(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{1}{\sqrt{J(\mathbf{r}_1)J(\mathbf{r}_2)}} \langle \mathbf{E}(\mathbf{r}_1) \mathbf{E}^*(\mathbf{r}_2) \rangle, \quad (1.16)$$

т. е. функция когерентности (1.14) в совпадающие моменты времени. Пространственная когерентность характеризует способность излучения образовывать интерференционную картину и лежит в основе количественной теории интерференции и дифракции света. $G(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ спадает по мере увеличения расстояний между точками $\mathbf{r}_1$ и $\mathbf{r}_2$, а точнее, по мере увеличения угла между направлениями от источника излучения в эти точки. Поэтому очень часто используют понятия угол когерентности θ_c и телесный угол когерентности Ω_c , длина l_c , площадь S_c и объем W_c когерентности для того, чтобы охарактеризовать область, в которой функция пространственной когерентности существенно отлична от нуля. Возможность введения этих понятий обусловлена тем, что на расстояниях $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| \gg l_c$ $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ экспоненциально убывает.

Наконец, последний рассматриваемый нами частный случай общего понятия когерентности — это функция (1.14) в совпадающих точках пространства, но в разные моменты времени:

$$G(\tau) = \langle \mathbf{E}(0) \mathbf{E}^*(\tau) \rangle. \quad (1.17)$$

Эту величину можно было бы назвать функцией временной когерентности, но в корреляционной спектроскопии за ней утвердилось общее в теории случайных величин название — парная корреляционная функция. В классической оптике обычно имеют дело с фурье-образом $G(\tau)$, который и является спектром света.

§ 1.2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Спектр флуктуаций интенсивности. В основе классических интерферометрических схем измерения спектра лежит в конечном счете прямое определение парной корреляционной функции (1.17). Действительно,

во всех этих схемах исследуемое излучение попадает на фоторегистрирующий прибор, пройдя по крайней мере двумя путями с разными оптическими длинами. Средняя регистрируемая интенсивность представляет собой сумму интенсивностей обоих лучей и интерференционного члена, который можно представить в виде (1.17) с $\tau = \Delta l/c$, где Δl — разность хода. Сдвиг по времени τ достигается за счет того, что свету необходимо разное время, чтобы попасть из источника в фотоприемник по различным путям. Разрешающая способность $\Delta\omega$, которой можно достигнуть, применяя этот принцип, — порядка $c/\Delta l$, что при разности хода 100 м составляет $3 \cdot 10^6$ Гц. Ясно, что эта цифра предельная для практически осуществимых спектрометров. Для повышения разрешения необходимо искать другие способы, позволяющие увеличить время задержки τ .

Можно было бы реализовать любое разрешение, просто многократно измеряя $E(t)$ и $E(t + \tau)$ и усредняя произведение их значений. Но, к сожалению, у нас нет способа узнать мгновенное значение поля электромагнитной волны. Доступной напрямую измерению является мгновенная интенсивность излучения, а точнее, мгновенное значение фототока на выходе фоторегистрирующего прибора. Корреляционную функцию фототока при больших τ определить несложно. Остается лишь выяснить, можно ли таким способом получить информацию о парной корреляционной функции поля регистрируемого излучения.

Во всех приложениях корреляционной спектроскопии оказывается достаточной самая простая связь между фототоком и полем регистрируемого излучения, а именно: вероятность появления фотоэлектрона в течение единичного интервала времени на единичной площади в окрестности точки r активной поверхности фотодетектора:

$$p(r, t) = \beta |E(r, t)|^2, \quad (1.18)$$

где β — квантовая эффективность фотоприемника (с точностью до множителя $\frac{8\pi}{c}$). Применимость этого соотношения требует ряда оговорок, которые могут оказаться весьма существенными, если речь идет об исследовании тонких статистических свойств излучения [12, 13]. Но рассмотрение этого вопроса увело бы нас слишком далеко в сторону.

Для полного описания статистических свойств фототока необходимо знать вероятность реализации совокупности фотоотсчетов в моменты времени $0, t_1, t_2, \dots$. Выражение этой вероятности через поле регистрируемого излучения также требует последовательного квантово-электродинамического рассмотрения. Мы вновь отсылаем читателя к соответствующей литературе. Для задач, рассматриваемых в этой книге, достаточным опять оказывается самое простое приближение, которое состоит в том, что вероятность реализации совокупности фотоотсчетов равна произведению вероятностей фотоотсчетов в соответствующие моменты времени, т. е. акты регистрации фотонов независимы. Тогда парная корреляционная функция фототока

$$G(\tau) \equiv \langle i(0) i(\tau) \rangle = \langle \bar{i}(0) \bar{i}(\tau) \rangle + Q \bar{i}(0) \delta(\tau), \quad (1.19)$$

где Q — заряд, протекающий через фотоприемник за один фотоотсчет, а

$$\bar{i}(t) = Q \int_S p(r, t) dS \quad (1.20)$$

аналоговый фототок, имеющий смысл среднего по ансамблю мгновенного значения фототока. Интегрирование в выражении (1.20) производится по всей поверхности фотокатода. Последний член в формуле (1.19) возникает вследствие того, что и в $i(0)$, и в $i(\tau)$ при $\tau = 0$ дает вклад один и тот же фотоотсчет. Подставляя выражения (1.18) и (1.20) в (1.19), считая пока фотоприемник точечным и учитывая, что $\langle \bar{i} \rangle = \langle i \rangle$, получим:

$$G(\tau) = \langle i \rangle^2 + \langle i \rangle^2 G^{(2)}(\tau) + Q \langle i \rangle \delta(\tau), \quad (1.21)$$

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{1}{j^2} \langle |E(0)|^2 |E(\tau)|^2 \rangle - 1 \quad (1.22)$$

нормированная корреляционная функция флуктуаций интенсивности регистрируемого поля. Последний член в выражениях (1.19) и (1.21) носит название дробового шума.

Итак, парная корреляционная функция фототока содержит три вклада (рис. 2, а): постоянную составляющую, член, пропорциональный корреляционной функции флуктуаций интенсивности регистрируемого поля, и дробовой шум. Соответственно спектр мощности фототока $I(\omega)$ (рис. 2, б) есть сумма δ -образного вклада постоянной составляющей, спектра флуктуаций интенсивности регистрируемого поля $I^{(2)}(\omega)$ и дробового шума, имеющего постоянную спектральную плотность

$$I(\omega) = \langle i \rangle^2 \delta(\omega) + \langle i \rangle^2 I^{(2)}(\omega) + Q \langle i \rangle. \quad (1.23)$$

Гомодинирование и гетеродинирование. В отличие от парной корреляционной функции электромагнитного поля (1.17), которая осциллирует с частотой света ω_0 , корреляционная функция флуктуаций интенсивности меняется в случае

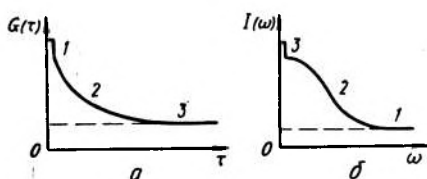


Рис. 2. Корреляционная функция (а) и спектр (б) фототока:

1 — дробовой шум, 2 — полезный сигнал, 3 — постоянная составляющая

квaziмонохроматического света несравненно медленнее. Пользуясь введенным в предыдущем разделе описанием квазимонохроматического излучения как случайного процесса, т. е. для точечного фотоприемника формулой (1.2), можно заменить в выражении (1.22) для $G^{(2)}(\tau)$ поле

$E(t)$ его амплитудой $\varepsilon(t)$. Мы видели, что $\varepsilon(t)$ меняется за время порядка обратной ширины спектра излучения $\Delta\omega$. Этот же масштаб времен характерен и для $G^{(2)}(\tau)$. Таким образом, можно получать информацию о корреляционных свойствах излучения, измеряя корреляционную функцию фототока в низкочастотной, шириной порядка $\Delta\omega$, области. Ясно, что при этом легко перекрывается не доступный классическим интерферометрическим методам диапазон $\Delta\omega < 10^7$ Гц.

Хотелось бы сопоставить информацию, содержащуюся в корреляционной функции или спектре флуктуаций интенсивности, с информацией содержащейся в парной корреляционной функции полей или обычном спектре света. В подавляющем большинстве случаев они оказываются тождественными. Как уже отмечалось, регистрируемое излучение обычно представляет собой сумму вкладов большого числа независимых источников и поэтому подчиняется гауссовой статистике. Это значит, что четверной коррелятор в выражении (1.22) выражается через парные в соответствии с формулой (1.13):

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{1}{j^2} |G^{(1)}(\tau)|^2, \quad (1.24)$$

где

$$G^{(1)}(\tau) = \langle \varepsilon(0) \varepsilon^*(\tau) \rangle — \quad (1.25)$$

парная корреляционная функция амплитуды регистрируемого поля. Заметим, что в (1.24) входит только модуль $G^{(1)}(\tau)$, равной модулю корреляционной функции самого поля (1.17). Выражение (1.24) называется в корреляционной спектроскопии соотношением Зигерта и позволяет, зная корреляционную функцию флуктуаций интенсивности, определить модуль парной корреляционной функции регистрируемого поля. Важно подчеркнуть, что для монохроматического излучения, квазиупругого рассеянного на термодинамически равновесной системе, модулирующая случайная функция $E(t)$ может быть вследствие обратимости времени выбрана так, что $G^{(1)}(\tau) = G^{(1)}(-\tau)$. А поскольку всегда $G^{(1)}(\tau) = (G^{(1)}(-\tau))^*$, мы заключаем, что $G^{(1)}(\tau)$ — действительна. Таким образом, для изучения равновесных систем, т. е. при отсутствии внешних сил, вызывающих детерминированное движение рассеивателей, знания модуля $G^{(1)}(\tau)$ вполне достаточно.

Помимо только что описанного способа определения парной корреляционной функции по $G^{(2)}(\tau)$, часто именуемого оптическим гомодинированием, существует методический прием так называемого оптического гетеродинирования, который позволяет непосредственно по корреляционной функции фототока определять $G^{(1)}(\tau)$ независимо от статистики излучения. Этот прием совершенно необходим при изучении стационарных, но неравновесных систем, например при электрофоретическом светорассеянии, которое подробно обсуждается во второй части книги. Суть оптического гетеродинирования заключается в смешении на фотоприемнике исследуемого излучения с опорным детерминированным излучением намного большей интенсивности. В качестве такового обычно берется исходное нерассеянное монохроматическое излучение, так что

$$E(t) = \varepsilon_0 e^{i\omega_0 t} + \varepsilon(t) e^{i\omega_0 t}, \quad (1.26)$$

где $\varepsilon_0 \gg \varepsilon(t)$. Подставляя (1.26) в выражение (1.22) и пренебрегая малыми по параметру $(\varepsilon(t)/\varepsilon_0)^2$ членами, получим

$$G_{\text{гет}}^{(2)}(\tau) = \frac{2}{\varepsilon_0^2} \text{Re} G^{(1)}(\tau). \quad (1.27)$$

Итак, гетеродинная схема измерений позволяет определить действительную часть парной корреляционной функции полей. В случае гауссовой статистики при исследовании равновесных систем как гомодинный, так и гетеродинный методы дают совершенно одинаковую информацию, причем каждый — всю информацию, которая может быть получена в данном оптическом эксперименте. При гауссовой статистике, но для неравновесных систем полная информация о парной корреляционной функции, а значит, и вообще о всех свойствах регистрируемого излучения может быть получена из совокупности результатов измерений в гомодинной и гетеродинной схемах. Однако необходимость в двух таких экспериментах возникает редко, поскольку обычно интерпретация результатов проводится путем их сопоставления с теоретически вычисленной корреляционной функцией рассеянного света, и несложно выяснить — модуль или действительная часть $G^{(1)}$ (τ) больше подходит для такого сопоставления. Наконец, если статистика регистрируемого излучения негауссова, гетеродинный и гомодинный методы могут давать принципиально разную информацию.

Для того чтобы пояснить физический смысл описанных выше методов корреляционной спектроскопии, удобно перейти к спектральному представлению, т. е. выразить спектр флуктуаций интенсивности излучения $I^{(2)}(\omega)$, являющийся фурье-образом $G^{(2)}(\tau)$, через спектр излучения $I^{(1)}(\omega)$ — фурье-образ $G^{(1)}(\tau)$. Делая преобразование Фурье в формулах (1.24) и (1.27), получим для гомодинной схемы измерений

$$I^{(2)}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} I^{(1)}(\omega') I^{(1)}(\omega + \omega') \frac{d\omega'}{2\pi}. \quad (1.28)$$

В гетеродинной схеме

$$I^{(2)}(\omega) = \frac{1}{E_0^2} [I^{(1)}(\omega - \omega_0) + I^{(1)}(\omega_0 - \omega)] - \quad (1.29)$$

симметричная относительно частоты гетеродинного луча часть спектра. Проще всего интерпретировать гетеродинный спектр (1.29). Пусть исследуемое излучение монохроматично. Тогда на фотодетектор падают два монохроматических луча: исследуемый и гетеродинный, что приводит к осцилляциям интенсивности падающего излучения на разностной частоте. Другими словами, поскольку фототок пропорционален квадрату поля, фотодетектор является нелинейным квадратизирующим элементом; на его выходе мы будем наблюдать спектр биений между опорной монохроматической волной и исследуемым излучением, который и имеет вид (1.29). Несколько более сложная ситуация возникает в гомодинном случае, когда регистрируются биения между гармониками самого исследуемого излучения. Значение $I^2(\omega)$ в этом случае есть суммарный вклад биений между всеми, отличающимися на ω , гармониками падающего в детектор излучения. На первый взгляд, формула (1.28) верно отражает эту картину независимо от статистики. Но на самом деле различные гармоники могут быть определенным образом сфазированы друг с другом, так что вклады биений двух пар гармоник, отличающихся на ω , могут иметь даже разный знак. Лишь

в случае излучения с гауссовой статистикой фазы различных гармоник, как было показано, совершенно не скоррелированы, и (1.28) действительно имеет место.

Итак, во многих практических приложениях гомодинный и гетеродинный методы эквивалентны с точки зрения получаемой информации об исследуемой системе. Какой же из них предпочтительнее? Однозначно ответить на этот вопрос невозможно: каждый из способов имеет свои достоинства и недостатки, которые будут подробно рассмотрены в следующей главе, посвященной методическим вопросам корреляционной спектроскопии. Мы пока перейдем к обсуждению других слагаемых в формуле (1.21) для корреляционной функции фототока: постоянной составляющей фототока и дробового шума, которые не содержат полезной информации и интересны лишь потому, что затрудняют точное определение информативной части корреляционной функции или спектра фототока.

Дробовой шум. Казалось бы, учет постоянной составляющей и дробового шума не представляет никаких принципиальных трудностей, поскольку их вид точно известен. Систематическую часть этих вкладов, действительно, нетрудно вычестить из корреляционной функции или спектра. Что касается постоянной составляющей, то при аналоговом способе измерений фототока она просто «отфильтровывается» усилителем, а в технике счета фотонов ее легко измерить. Конечно, и то, и другое связано с небольшими осложнениями из-за «завала» амплитудно-частотной характеристики усилителя на низких частотах в первом случае и из-за систематических ошибок при дальнейшей обработке результатов, возникающих вследствие неизбежной погрешности определения постоянной составляющей, — во втором. В отношении дробового шума дело обстоит несколько иначе. Он оказывается важен, но не сам по себе, а в связи с его вкладом в статистическую ошибку измерения корреляционной функции или спектра фототока.

В корреляционной спектроскопии анализируется не детерминированный, а случайный сигнал. Поэтому измеренное значение корреляционной функции или спектра обязательно имеет случайную статистическую ошибку, связанную не с погрешностью процесса измерения фототока и не с шумами регистрирующего тракта, а именно со стохастической природой самого сигнала. Величину этой ошибки проще всего вычислить в случае аналогового способа регистрации, считая, что в каждый момент времени происходит много независимых фотоотсчетов, так что статистика фототока гауссова. Тогда согласно выражению (1.12) вероятность измерить значение спектра мощности $\tilde{I}(\omega)$ на частоте ω для каждой реализации фототока

$$P(\tilde{I}(\omega)) = \frac{1}{I(\omega)} e^{-\tilde{I}(\omega)/I(\omega)} \quad (1.30)$$

и, следовательно,

$$\langle \Delta I(\omega)^2 \rangle \equiv \langle (\tilde{I}(\omega) - I(\omega))^2 \rangle = \langle \tilde{I}(\omega) \rangle^2, \quad (1.31)$$

т. е., относительная погрешность определения спектра мощности гауссова случайного сигнала по одной реализации составляет 100 %. Для

повышения точности необходимо провести измерения по многим независимым реализациям и усреднить их результаты. Тогда погрешность будет равна $1/\sqrt{M}$, где M — число независимых реализаций. Здесь необходимо сделать некоторые пояснения, поскольку читателю, не знакомому с вопросами спектрального анализа случайных сигналов, эти рассуждения могут показаться парадоксальными. Ведь, казалось бы, ничто не мешает рассматривать несколько последовательных «независимых» реализаций как одну. Что же тогда считать независимыми реализациями и почему погрешность спектра мощности, определенного по одной реализации, не зависит от ее длительности? Разрешение этого парадокса заключается в следующем. Как видно из (1.12), экспериментальные значения спектра мощности на разных частотах статистически независимы. Это верно, однако только для сколь угодно длинной реализации. При конечной длительности реализации T_0 мы можем различать спектральные гармоники, отличающиеся по частоте не менее чем на $\Delta\omega \sim T_0^{-1}$. Другими словами, по одной реализации длительностью T_0 со 100 %-ной ошибкой определяется значение $\bar{I}(\omega)$, усредненное по интервалу частот $\Delta\omega$. Если разбить эту реализацию на M частей длительностью T_0/M каждая, мы получим разрешение $\Delta\omega \cdot M$, т. е., по существу, просуммируем M независимых, отличающихся на $\Delta\omega$ гармоник спектра мощности. Таким образом, понятие независимости реализаций означает не статистическую независимость самих реализаций, а независимость спектральных гармоник, отличающихся на заранее заданное разрешение $\Delta\omega$ и определяемых по этим реализациям, и сводится к тому, что длительность реализаций должна быть велика по сравнению с $1/\Delta\omega$. Эти рассуждения показывают, что оптимальная длительность реализации при разрешении $\Delta\omega$, которая, как совершенно очевидно, не должна быть меньше $2\pi/\Delta\omega$, не должна быть и существенно больше этой величины, а погрешность измерения спектра мощности при этом определяется формулой

$$\frac{\langle \Delta I(\omega)^2 \rangle^{1/2}}{I(\omega)} \sim \frac{1}{\sqrt{\Delta\omega T}}, \quad (1.32)$$

где T — полное время измерений. В таком виде эта оценка погрешности применима и при аналоговом способе спектрального анализа с помощью частотного фильтра с шириной $\Delta\omega$. Хотя в этом случае измерение ведется непрерывно и никаких отдельных реализаций нет, за время $T_0 \sim 2\pi/\Delta\omega$ случайный сигнал, прошедший такой фильтр, «забывает» о своем начальном значении. Действительно, если два гармонических сигнала, отличающихся по частоте на малую величину $\Delta\omega$, в какой-то момент находятся в фазе, то через время $2\pi/\Delta\omega$ они будут в противофазе. Следовательно, за время T_0 теряется информация о распределении фаз гармоник, проходящих через фильтр с шириной $\Delta\omega$. Другими словами, термин «независимость» относится в этом случае не к значениям исходного сигнала в моменты времени, разделенные интервалом T_0 , а к соответствующим значениям сигнала на выходе анализатора с заданным спектральным разрешением.

Соотношение (1.32) показывает, что относительная ошибка измерения спектра мощности постоянна и зависит только от разрешения и времени накопления. Поэтому чрезвычайно важно, какую долю в спектре мощности фототока составляет информативный сигнал, а какую — шумы, даже с точно известным спектром. И в первую очередь здесь идет речь о дробовом шуме, хотя при очень низких интенсивностях регистрируемого излучения могут проявиться и темновой шум фотоприемника, и шумы измерительного тракта. Дробовой шум, связанный с квантовым характером регистрации света, органически присущ корреляционной спектроскопии, и увеличение отношения Δ полезного сигнала к дробовому шуму является основной задачей оптимизации экспериментальной установки.

На первый взгляд может показаться, что при корреляционном способе анализа можно избежать вредного влияния импульсной природы фототока, если не интересоваться поведением корреляционной функции на очень малых временах. Мы не будем подробно анализировать различные способы определения корреляционной функции фототока. Такой анализ связан с простыми, но громоздкими выкладками. Достаточно указать, что измеренные значения корреляционной функции при разных τ не являются статистически независимыми. Это следует из независимости фурье-гармоник корреляционной функции, т. е. значений спектра мощности. Чтобы убедиться в принципиальной важности учета дробового шума и при регистрации $G(\tau)$, нам вполне достаточно выяснить физический смысл отношения Δ .

Пусть корреляционная функция $G^{(2)}(\tau)$ спадает за характерное время корреляции τ_c . Это означает, что спектр флуктуаций интенсивности регистрируемого излучения сосредоточен в полосе $1/\tau_c$. В то же время интеграл от спектра по всем частотам — это, как известно, значение корреляционной функции при $\tau = 0$. Учитывая, что (при гауссовой статистике поля) согласно определению (1.22) $G^{(2)}(0) = 1$, найдем, что спектральная интенсивность $I^{(2)}(\omega)$ порядка τ_c ; пользуясь (1.23), получим

$$\Delta = \frac{\langle i \rangle \tau_c}{Q}. \quad (1.33)$$

Поскольку Q — это заряд, приходящийся на один фотоимпульс, отношение Δ спектральных плотностей информативной составляющей спектра и дробового шума есть просто число фотоотсчетов за время корреляции регистрируемого поля. Совершенно очевидно, что каким бы способом ни анализировался фототок, определить время корреляции, если среднее число фотоотсчетов за это время намного меньше единицы, практически невозможно. Однако стоит еще раз подчеркнуть, что согласно (1.32) при $\Delta \gg 1$ дальнейшее увеличение отношения сигнал — дробовой шум не приводит к уменьшению статистической ошибки измерений. Таким образом, соотношение $\langle i \rangle \sim Q/\tau_c$ дает минимальную интенсивность регистрируемого излучения, начиная с которой его спектр может быть определен с наименьшей теоретической погрешностью (1.32). В экспериментах по измерению спектра света, рассеянного

частицами в растворе, это в конечном счете определяет предельную концентрационную чувствительность метода.

Приведенные выше оценки относились к гомодинному способу измерений. Выражая $\langle i \rangle$ через напряженность электромагнитного поля и пользуясь формулой (1.32), нетрудно убедиться, что при прочих равных условиях отношение интегральных интенсивностей полезного сигнала и дробового шума при гетеродинном способе измерений в два раза больше, чем при гомодинном, из-за множителя 2 в выражении (1.27). Если учесть при этом, что гетеродинный спектр в два раза уже, чем гомодинный, реальный выигрыш в отношении Δ составляет 4, т. е. при $\Delta \ll 1$ гетеродинирование теоретически позволяет достичь той же точности, что и гомодинирование, в два раза быстрее. Если же интенсивность регистрируемого излучения достаточно велика, так что дробовой шум мал ($\Delta \geq 1$), статистическая точность определения спектра этими двумя способами одинакова.

Площадь когерентности. До сих пор мы считали размеры фотоприемника бесконечно малыми. При увеличении размеров фотоприемника фототок, разумеется, растет. Может показаться, что при этом улучшаются условия регистрации излучения. Но на самом деле увеличение площади фотоприемника, или, говоря более точно, апертуры фотосбора, не приводит к увеличению отношения полезного сигнала к дробовому шуму, если эта площадь (апертура) больше площади (телесного угла) когерентности.

Обобщая приведенные в начале этого параграфа рассуждения на случай фотоприемника конечных размеров, нетрудно прийти к выводу, что

$$G(\tau) = \beta^2 \iint_S \langle |E(\mathbf{r}, 0)|^2 \cdot |E(\mathbf{r}', \tau)|^2 \rangle d^2r d^2r' + Q \langle i \rangle \delta(\tau). \quad (1.34)$$

При гауссовой статистике регистрируемого излучения (1.34) легко переписать через функцию пространственно-временной когерентности (1.14):

$$G(\tau) = \langle i \rangle^2 + \beta^2 \iint_S |G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)|^2 d^2r d^2r' + Q \langle i \rangle \delta(\tau). \quad (1.35)$$

В случае квазимонохроматического излучения поля в области $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| \ll \lambda^2/\Delta\lambda$ меняются во времени синхронно, и функцию пространственно-временной когерентности можно приближенно разбить на произведение функции пространственной когерентности (1.16) и парной корреляционной функции полей (1.17) $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) \approx G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') G^{(1)}(\tau)$. Поскольку $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ заметно отличается от нуля только в пределах площади когерентности, ясно, что хотя $\langle i \rangle$ пропорционален площади поверхности фотоприемника, информативная часть корреляционной функции пропорциональна при $S \gg S_c$ не S^2 , а только SS_c :

$$G(\tau) = \beta^2 J^2 S^2 + \beta^2 J^2 SS_c G^{(2)}(\tau) + Q \beta J S \delta(\tau), \quad (1.36)$$

где численное значение площади когерентности для данной конкрет-

ной задачи определяется формулой

$$S_c = \frac{1}{S} \iint_S |G(r, r')|^2 d^2 r d^2 r'. \quad (1.37)$$

Физический смысл полученного результата заключается в следующем. Регистрируемое излучение создает на поверхности фотоприемника интерференционную картину, меняющуюся во времени из-за немонохроматичности излучения. Эти изменения проявляются в виде флуктуаций фототока. Для того чтобы выяснить амплитуду этих флуктуаций, рассмотрим мгновенную фотографию интерференционной картины на фотодетекторе. Пусть в какой-то точке имеет место отклонение интенсивности от среднего значения, например максимум. Это значит, что волны от различных частей источника случайно оказались преимущественно сфазированными в этой точке. «Сфазированность» сохраняется и в окрестности рассматриваемой точки, площадь этой окрестности — S_c . Таким образом, интерференционная картина представляет собой случайную мозаику более и менее ярко освещенных областей, каждая площадью S_c . Число таких областей S/S_c . Следовательно, отклонение фототока от среднего значения — порядка $\langle i \rangle \sqrt{S/S_c}$, а значит, информативная часть корреляционной функции фототока — порядка $\langle i \rangle^2 S S_c$.

В реальных экспериментах, как правило, не нужно рассчитывать точное значение S_c , пользуясь (1.37). Вполне достаточно ограничиться оценкой, которую легко получить, зная угловые размеры источника излучения. Прежде чем привести эту оценку, заметим, что S_c — не самая удобная величина, характеризующая геометрию фотосбора. Дело в том, что на практике обычно применяются различные оптические устройства, фокусирующие регистрируемое излучение. При этом могут меняться размеры как освещенной области на активной поверхности фотоприемника, так и площадки когерентности. Поэтому значительно удобнее использовать вместо величины S апертуру фотосбора, т. е. телесный угол Ω — такой, что излучение, распространяющееся в его пределах, попадает в фотоприемник, а вместо S_c — телесный угол когерентности Ω_c . В этих переменных, не зависящих от того, как преобразуется регистрируемое излучение элементами оптической схемы, (1.52) можно переписать в виде

$$G(\tau) = \langle i \rangle^2 + \langle i \rangle^2 \frac{\Omega_c}{\Omega} G^{(2)}(\tau) + Q \langle i \rangle \delta(\tau). \quad (1.38)$$

Чтобы оценить Ω_c , подставим (1.1) в (1.16). В случае квазимонохроматического излучения и небольших апертур все волновые векторы в регистрируемом излучении примерно одинаковы, и амплитуду $\vec{\epsilon}_{\vec{k}}$ можно считать независимой от $\vec{k}$.

Нас интересует, при каком максимальном угле $\theta = \theta_c$ еще можно утверждать, что волны от произвольных точек источника x и x' , распространяющиеся в фазе в направлении единичного вектора $\mathbf{e}$, будут в фазе и в направлении $\mathbf{e}'$. Считая, что расстояния r и r' намного больше

размеров источника, легко получить, что

$$|G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')| \sim \int_W e^{ik(\mathbf{e}\mathbf{x} - \mathbf{e}'\mathbf{x}')} d^3x d^3x', \quad (1.39)$$

где W — объем источника излучения (рис. 3). Но $\mathbf{e}\mathbf{x} - \mathbf{e}'\mathbf{x}' = (\mathbf{e} - \mathbf{e}') \frac{\mathbf{x} + \mathbf{x}'}{2} + \frac{\mathbf{e} + \mathbf{e}'}{2} (\mathbf{x} - \mathbf{x}')$ и поскольку $k|\mathbf{x} - \mathbf{x}'| \gg 1$, если размеры источника гораздо больше длины волны света, вклад в выражение (1.39) дают только близко расположенные точки источника: $|\mathbf{x} - \mathbf{x}'| \ll \lambda$. Так как угол θ мал, $|\Delta\mathbf{e}| = |\mathbf{e} - \mathbf{e}'| = \theta \ll 1$, и

$$|G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')| \sim \int_W e^{ik\Delta\mathbf{e}\mathbf{x}} d^3x. \quad (1.40)$$

Поскольку $|\Delta\mathbf{e}| \approx \theta$, мы приходим к выводу, что $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ заметно отличается от нуля только в том случае, если $k\theta L \ll 1$, т. е.

$$\theta_c \sim \frac{1}{kL}, \quad (1.41)$$

где L — характерный размер источника. Соответственно телесный угол когерентности

$$\Omega_c \sim \frac{1}{(kL)^2}. \quad (1.42)$$

Во избежание недоразумений отметим, что если источник имеет неправильную форму, например сильно вытянут, L^2 в (1.42) надо заменить площадью проекции объема источника на плоскость, перпендикулярную к направлению наблюдения.

Анализ формулы (1.38) показывает, что при $\Omega \gg \Omega_c$ отношение спектральных интенсивностей информативной части спектра мощности фототока и дробового шума не зависит от апертуры фотосбора. Достаточно

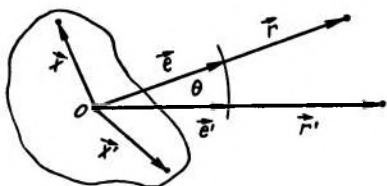


Рис. 3. К определению угла когерентности

иметь апертуру Ω_c , чтобы обеспечить предельно малое значение статистической ошибки. Такой вывод особенно важен при использовании техники счета фотонов, поскольку в этом случае желательно избегать высоких скоростей счета. Ясно, что для этого надо выбирать $\Omega \sim \Omega_c$. При аналоговом способе анализа темп счета не важен, и можно пользоваться большими по сравнению с Ω_c апертурами. Другое

следствие приведенных соотношений касается фокусировки зондирующего излучения. При фокусировке общая интенсивность рассеянного света не меняется, но поскольку уменьшается размер рассеивающего объема, растет угол когерентности, а значит, и отношение сигнал — дробовой шум. Поэтому желательно как можно лучше сфокусировать зондирующий пучок.

Мы обсудили здесь роль когерентности регистрируемого излучения при гомодинной схеме измерений. Практически точно так же она проявляется и в оптическом гетеродинамировании. Разница состоит лишь в том,

что вместо квадрата модуля функции когерентности в (1.35) появляется действительная часть произведения функций когерентности исследуемого и опорного излучения, что дает некоторые численные отличия от S_c при гомодинировании, но параметрически остается справедливой оценка (1.42). В гетеродинной схеме измерений существенную роль играет также то обстоятельство, что трудно добиться идеального совмещения фронтов исследуемого и опорного излучения по всей поверхности фотоприемника, т. е. обеспечить повсеместную параллельность электрического поля опорной и исследуемой волн. В результате полезный сигнал оказывается несколько меньше, чем в идеальном случае. Это уменьшение характеризует эффективность гетеродинирования, которая несколько варьирует в зависимости от способа создания опорного пучка, но при высоком качестве юстировки может быть доведена до 70—90 %.

§ 1.3. КВАЗИУПРУГОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ

Рассеяние на частицах в растворе. Мы познакомили читателя с основами корреляционной спектроскопии — метода, позволяющего измерять спектр квазимонохроматического света с практически неограниченным разрешением. Что же можно узнать об объекте, измеряя спектр квазиупругого, т. е. с малым изменением частоты, рассеянного света? Ответ на этот вопрос дает теория квазиупругого светорассеяния. Но прежде чем перейти к строгим формулировкам, напомним простую качественную модель рассеяния на отдельной точечной частице, уже использованную нами во Введении.

Пусть у нас имеется единственная точечная частица, положение которой в пространстве в момент времени t задается радиус-вектором $\mathbf{r}(t)$. Под действием электрического поля падающей волны заряды в этой частице колеблются, вследствие чего она оказывается источником вторичной, рассеянной электромагнитной волны. Пусть нас интересует поле этой волны в точке $\mathbf{s}$. В рамках обсуждаемой модели мы, разумеется, не можем сказать об амплитуде рассеянной волны ничего, кроме того, что она не зависит от положения рассеивателя и пропорциональна полю зондирующего излучения E_0 . Зато фазу этой волны нетрудно подсчитать. Фаза падающей плоской волны с волновым вектором $\mathbf{k}_0$ в месте расположения частицы равна $-\mathbf{k}_0 \mathbf{r}(t) + \omega_0 t$. Фазу рассеянной сферической волны в непосредственной близости от частицы можно принять равной этой же величине, поскольку даже если допустить, что при рассеянии имеется какой-то сдвиг фаз, он не зависит от положения рассеивателя и может привести лишь к появлению общего дополнительного фазового множителя. Обычно нас интересует излучение в волновой зоне, т. е. на больших по сравнению с λ расстояниях от частицы, а также вдали от рассеивающего объема: $|\mathbf{s}| \gg |\mathbf{r}|$. Тогда рассеянную волну в точке $\mathbf{s}$ можно считать плоской с волновым вектором $\mathbf{k}$, направленным вдоль вектора $\mathbf{s}$. Следовательно, фаза рассеянной волны в точке $\mathbf{s}$ есть $-\mathbf{k}_0 \mathbf{r}(t) + \omega_0 t - \mathbf{k}(\mathbf{s} - \mathbf{r})$, и ее (волну) можно представить в виде

$$E(\mathbf{s}, t) \sim e^{-i\mathbf{q}\mathbf{r}(t)} \cdot e^{i(\omega_0 t - \mathbf{k}\mathbf{s})}, \quad (1.43)$$

т. е. в форме (1.2) с модулирующей функцией $E(t) \sim e^{-iqr(t)}$, где $q = k_0 - k$ называется переданным волновым вектором, или вектором рассеяния. При квазиупругом светорассеянии относительное изменение частоты мало и $k_0 \approx k$. Поэтому

$$q = 2k_0 \sin \theta/2, \quad (1.44)$$

где θ — угол рассеяния. Формула (1.43) отражает тот простой факт, что длина пути, который приходится пройти свету от источника до точки наблюдения, рассеявшись «по дороге», зависит от положения рассеивателя r , и разность фаз волн, рассеянных в точках r и r' , равна $q(r - r') \equiv q\Delta r$ (рис. 4).

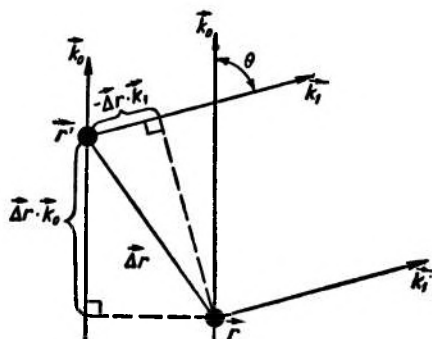


Рис. 4. К определению переданного волнового вектора;

k_0 и k_1 — волновые векторы соответственно падающего и рассеянного света

Поэтому мы сразу воспользуемся ею, чтобы вычислить спектр квазиупругого рассеянного света. По определению (1.25)

$$G^{(1)}(\tau) \sim \langle e^{-iqr(0)} e^{iqr(\tau)} \rangle. \quad (1.45)$$

Чтобы узнать явный вид $G^{(1)}(\tau)$, надо вычислить среднее значение $e^{iq\Delta r(\tau)}$, где $\Delta r(\tau)$ — смещение частицы за время τ ; а для этого надо знать вероятность $P(\Delta r, \tau)$ того, что частица сместится на Δr за время τ . Тогда

$$G^{(1)}(\tau) \sim \int P(\Delta r, \tau) e^{iq\Delta r} d^3\Delta r, \quad (1.46)$$

т. е. парная корреляционная функция поля, рассеянного одной частицей, представляет собой пространственный фурье-образ вероятности $P(\Delta r, \tau)$. В жидкости эта вероятность обычно удовлетворяет уравнению диффузии:

$$\dot{P} = D\nabla^2 P - \nabla V P, \quad (1.47)$$

где D — коэффициент диффузии; V — скорость дрейфа частиц под действием внешних сил; $\nabla \equiv \frac{\partial}{\partial r}$ — оператор градиента. Если V не зависит от r и τ , то, делая в формуле (1.47) преобразование Фурье, получим

$$G^{(1)}(\tau) = A e^{-Dq^2|\tau| - iqV\tau}. \quad (1.48)$$

Абсолютная величина $|\tau|$ появилась в этой формуле вследствие того, что $P(\Delta r, \tau)$ определена только при $\tau \geq 0$ и $G^{(1)}(\tau)$ должна быть определена при отрицательных значениях τ , но так, чтобы соблюдалось общее свойство симметрии $G^{(1)}(\tau) = (G^{(1)}(-\tau))^*$. Как это и должно быть, в равновесии, т. е. в отсутствие сторонних сил, а значит, при $V = 0$ $G^{(1)}(\tau)$ действительна. После преобразования Фурье из выражения (1.48) получается гетеродинный спектр — симметричная относительно частоты зондирующего излучения часть спектра рассеянного излучения:

$$I^{(1)}(\omega) = \frac{1}{\pi} A \frac{Dq^2}{(\omega - qV)^2 + (Dq^2)^2}. \quad (1.49)$$

Итак, гетеродинный спектр представляет собой кривую Лоренца, центрированную на частоте qV и с полушириной на полувывоте Dq^2 . Величину Dq^2 называют диффузионным уширением, а qV — доплеровским смещением.

Рассматриваемая нами модель допускает естественное обобщение на случай рассеивателей конечных размеров. Разбивая такой рассеиватель на бесконечно малые элементы и считая каждый из них источником вторичной волны (1.43) с соответствующей амплитудой α_n , и наконец, выделяя координаты «центра» рассеивателя r^0 , мы получаем следующее выражение для поля, рассеянного частицей конечных размеров:

$$E(t) \sim \alpha(\{r_n\}) e^{-iqr^0(t)}, \quad (1.50)$$

где

$$\alpha(\{r_n\}) = \sum_n \alpha_n e^{iq(r^0 - r_n)} \quad (1.51)$$

называется форм-фактором. Важно подчеркнуть, что форм-фактор зависит от выбора центра частицы r^0 . Лучшее всего было бы выбрать центром такую точку рассеивателя, движение которой чисто диффузионно, т. е. вероятность ее смещения описывается уравнением типа (1.47). К сожалению, это далеко не всегда возможно, и мы отложим подробное обсуждение этого вопроса до последней главы книги.

Приведенные рассуждения имеют небольшой недостаток, связанный с тем, что мы не учитывали поляризацию зондирующего и регистрируемого излучения и возможную оптическую анизотропию рассеивателей. Чтобы ликвидировать этот недостаток, необходима последовательная полумикроскопическая теория квазиупругого светорассеяния. В этой теории рассеяние на углы, отличные от нулевого, связано с неоднородностью поляризуемости, или, что то же самое, с неоднородностью показателя преломления в рассеивающем объеме. Флуктуации поляризуемости могут иметь различное происхождение. Относительно высокочастотные флуктуации, связанные с колебательными и вращательными модами молекул, входящих в раствор, приводят к так называемому рассеянию Мандельштама — Рамана. Рассеяние на флуктуациях показателя преломления, связанных с термодинамическими флуктуациями таких параметров, как плотность, энтропия, концентрация, именуется обычно рассеянием Рэлея. К рэлеевскому рассеянию относят и

рассеяние в разбавленных растворах относительно крупных частиц, когда число частиц в объеме λ^3 мало. В этом случае неоднородность показателя преломления связана с отличием поляризуемости растворенных частиц от средней поляризуемости раствора.

Примем, что отклонение тензора поляризуемости частицы $\chi(r, t)$ в точке r и в момент времени t от поляризуемости растворителя (растворитель считается оптически изотропным) мало, так что интенсивность рассеянного света мала по сравнению с интенсивностью падающего пучка, т. е. пренебрежем многократным рассеянием. Это позволяет найти поле рассеянной световой волны по теории возмущений из уравнений Максвелла. В результате получается следующее обобщение формул (1.50) и (1.51) на случай рассеяния на N оптически анизотропных частицах [73]:

$$\epsilon(t) = - \sum_{n=1}^N [k^2 \alpha^{(n)}(t) \epsilon_0 - k(k \alpha^{(n)}(t) \epsilon_0)] \frac{e^{-i q r^{(n)}(t)}}{4 \pi s}, \quad (1.52)$$

где тензорный форм-фактор

$$\alpha^{(n)}(t) = 4 \pi \int_{\omega^{(n)}} \chi(r, t) e^{-i q r} d^3 r. \quad (1.53)$$

Интегрирование в выражении (1.53) производится по объему рассеивателя.

Вычисляя с помощью (1.52) гомодинную корреляционную функцию, получим в случае оптически изотропных независимых тождественных рассеивателей

$$G^{(1)}(\tau) = \frac{J_0 \omega_0^4 N \sin^2 \psi}{(4 \pi s c^2)^2} \langle \alpha(0) \alpha^*(\tau) e^{i q[r(\tau) - r(0)]} \rangle, \quad (1.54)$$

где ψ — угол между направлением наблюдения и вектором поляризации зондирующего света.

Чтобы еще более упростить формулу (1.54), часто считают, что изменение форм-фактора частицы α статистически независимо от ее поступательного движения. Вообще говоря, это неверно. Причиной изменения форм-фактора могут быть внутримолекулярные движения, которые меняют гидродинамическую форму частицы и тем самым ее диффузию. Другой причиной модуляции форм-фактора может быть вращательное движение частицы, точнее, изменение ее ориентации относительно вектора рассеяния q . Но для несферической частицы вращательная и поступательная диффузии не являются статистически независимыми, так как подвижность такой частицы в некотором направлении зависит от ее ориентации относительно этого направления. По существу, «расщепление» флуктуаций форм-фактора и трансляционного движения оправдано только для сферических в гидродинамическом отношении частиц.

Для достаточно малых частиц форм-фактор перестает зависеть от ориентации частицы относительно вектора рассеяния и от внутренних движений в ней. Последнее полностью справедливо лишь в случае, когда поляризуемость отдельных частей исследуемого объекта не флуктуирует сама по себе и, разумеется, в отсутствие оптической ани-

зотропии. В этом случае выражение (1.53) сводится к (1.51), и при $qR \ll 1$ флуктуациями α можно пренебречь. При этом мы вернемся к формуле (1.48) для парной корреляционной функции $G^{(1)}(\tau)$, установив в ней коэффициент пропорциональности A :

$$A = \frac{\omega_0^4 \sin^2 \psi}{(4\pi sc^2)^2} N J_0 |\alpha|^2 \equiv B_0 N J_0 |\alpha|^2. \quad (1.55)$$

Теперь мы готовы сформулировать ответ на поставленный в начале этого параграфа вопрос: «Какая информация о рассеивающей системе может быть получена из спектра квазиупруго рассеянного света?» В принципе, это информация о всех динамических процессах в системе: трансляционном движении рассеивателей, их ориентационной и конформационной динамике. Фактически же просто и надежно может изучаться только трансляционная динамика, т. е. коэффициент трансляционной диффузии D и скорость дрейфа V . Если рассеиватели малы ($qR \ll 1$), оптически изотропны и поляризуемость их не меняется во времени, эти параметры могут быть непосредственно определены по доплеровскому смещению и диффузионному уширению спектра рассеянного света. В большинстве приложений корреляционной спектроскопии используется именно эта возможность, и для такого типа экспериментов флуктуации форм-фактора являются нежелательной помехой, осложняющей интерпретацию результатов при исследовании крупных или оптически анизотропных рассеивателей.

Измерение как D , так и V является стандартной задачей для лазерной корреляционной спектроскопии (см. гл. 4 и 5). Но гораздо интереснее научиться изучать флуктуации форм-фактора рассеивающих частиц. Ведь и D , и V отражают, по существу, статические характеристики, давая информацию о размере, заряде, плотности рассеивателя и т. п. Возникает такая ситуация, что динамический, по сути, метод квазиупругого светорассеяния используется для получения косвенных сведений о статических характеристиках объекта. К сожалению, исследовать внутреннюю динамику, измеряя флуктуации форм-фактора, чрезвычайно трудно, поскольку эти флуктуации, как правило, малы. А изучать их приходится на фоне диффузионного уширения, так как частицы в растворе не стоят на одном месте. Приходится констатировать, что применение лазерной корреляционной спектроскопии для изучения внутренней динамики макрочастиц в растворе ни в какой мере нельзя отнести к разряду стандартных методик. Однако в настоящее время в этой области наметились определенные перспективы как в связи с появлением новых, нетрадиционных вариантов корреляционной спектроскопии, и в первую очередь метода взаимной корреляции, так и благодаря совершенствованию математических методов анализа спектров квазиупруго рассеянного света. Мы считаем, что это пока еще не давшее значительных результатов в биологии направление корреляционной спектроскопии будет прогрессивно развиваться, и ниже уделим ему значительное внимание.

Множественное рассеяние. Множественное рассеяние обсуждается в связи с квазиупругим светорассеянием в двух аспектах: теоретическом

и методическом. И хотя оба они едины с точки зрения исходной математической формулировки, первый из них весьма сложен и, по существу, до сих пор последовательно не проанализирован, второй — вполне ясен вплоть до конкретных практических рекомендаций.

В теоретическом плане проблема многократного рассеяния неразрывно связана с электродинамикой сплошных сред. С точки зрения полумикроскопической теории распространение электромагнитной волны в среде представляет собой непрерывный процесс интерференции вторичных перерассеянных волн, которые в однородной среде гасят друг друга во всех направлениях, кроме направления распространения волны. В этом смысле сам процесс распространения волны связан с ее многократным рассеянием, без рассмотрения которого невозможно придать точный микроскопический смысл «поляризуемости» рассеивателя, фигурирующей в качестве феноменологического параметра в изложенной теории квазиупругого светорассеяния. Эта проблема микроскопического описания рассеяния света в сплошной среде не имеет непосредственного отношения к практическим приложениям корреляционной спектроскопии, и мы завершаем ее обсуждение ссылкой на литературу [35].

Итак, мы вводим поляризуемость частицы как феноменологическую величину. Тогда рассеяние света происходит только на неоднородностях поляризуемости и кратность рассеяния математически возникает при решении уравнений Максвелла с помощью теории возмущений в высших порядках по отклонению поляризуемости от среднего значения. Однократно рассеянная волна (1.52) появляется в первом порядке теории возмущений, рассеяние этой волны — во втором и т.д. Условие справедливости (1.52) — это условие малости амплитуды рассеянной волны по сравнению с исходной. Но эта малость должна выполняться повсеместно внутри рассеивающего объема, и поэтому слабость рассеяния — это необходимое, но не достаточное условие его однократности. Разбавляя исследуемый раствор, можно в конце концов полностью избежать рассеяния света сначала одной частицей, а затем другой. Но избежать перерассеяния внутри каждой отдельной частицы таким способом невозможно. Ясно, что для однократности рассеяния на одной частице кроме малости отклонения ее поляризуемости от средней требуется также, чтобы ее размеры были не слишком велики. И действительно, для применимости формулы (1.52) кроме условия $\Delta n \ll 1$ необходимо выполнение так называемого критерия Рэлея — Ганса

$$\frac{\Delta n R}{\lambda} \ll 1, \quad (1.56)$$

где Δn — характерная разность показателей преломления рассеивателя и растворителя. А что будет, если условие (1.56) нарушается? В этом случае мы не сможем описать интенсивность рассеянной частицей волны с помощью простого выражения для форм-фактора (1.53), но все фазовые соотношения останутся. И вообще, какими бы ни были рассеивающие частицы, если рассматривать форм-фактор как их феноменологическую характеристику, в приведенных выше формулах ничего не придется менять. Конечно, связать форм-фактор со структурой

рассеивателя при невыполнении (1.56) непросто. Однако для многих простых моделей рассеивателей имеются результаты численных расчетов [58, 59].

Итак, как ни трудна проблема многократного рассеяния, она мало существенна в практическом отношении. Ведь осложнения возникают только при попытке вычислить абсолютную величину форм-фактора и его флуктуаций, в то время как эксперимент нацелен на измерение характерных времен этих флуктуаций, а чаще всего — просто на измерение времени смещения рассеивателя на расстояние порядка $1/q$. Поэтому точное определение абсолютной интенсивности рассеяния в корреляционной спектроскопии не играет такой роли, как, скажем, в индикатрисном светорассеянии.

В практическом отношении многократное рассеяние приходится учитывать, только если оно происходит на разных частицах. А этот эффект уже однозначно связан с заметным ослаблением прошедшего образца пучка и, следовательно, легко контролируется экспериментально. Однако необходимо иметь в виду, что даже небольшая примесь двукратно рассеянного света может существенно снизить точность результатов. Двукратное рассеяние приводит к появлению в спектре

света компонент с шириной $D (q_1^2 + q_2^2)$, где q_1 и q_2 — переданные волновые векторы для первого и второго рассеяния. Но эти векторы не фиксируются заданием геометрии рассеяния (рис. 5), и как спектр, так и интенсивность двукратно рассеянного света зависят от формы используемой кюветы и с трудом поддаются количественному расчету.

Отметим также, что статистика двукратно рассеянного света негауссова. Действительно, если после первого рассеяния излучение является гауссовой случайной величиной, то после второго рассеяния, которое также может произойти на большом числе независимых частиц, излучение будет представлять собой произведение двух гауссовых случайных величин. А статистика такого произведения негауссова. Поэтому следует с особой осторожностью подходить к учету вклада многократного рассеяния при гомодинной схеме измерения.

Статистика рассеянного излучения. Воспользуемся формулой (1.53) для поля рассеянной электромагнитной волны, чтобы вычислить корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света $G^{(2)}(\tau)$, измеряемую в гомодинном эксперименте. Пусть все рассеивающие частицы одинаковы. Если их движение независимо, то, повторяя рассуждения, приведенные после формулы (1.13), получим

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{1}{J^2} [N(N-1) |g^{(1)}(\tau)|^2 + Ng^{(2)}(\tau)], \quad (1.57)$$

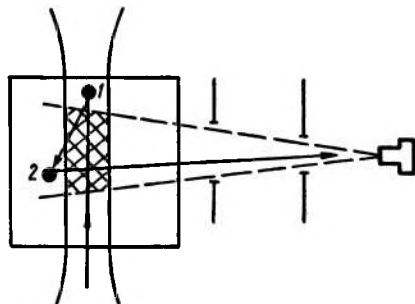


Рис. 5. Двукратное рассеяние.

Заштрихована область иллиминированного объема в апертуре фотосбора. Возможная траектория двукратно рассеянного света частицами 1 и 2 указана стрелками

где $g^{(1)}(\tau)$ — парная корреляционная функция, а $g^{(2)}(\tau)$ — корреляционная функция флуктуаций интенсивности излучения, рассеянного одной частицей. Для точечных частиц $g^{(2)}(\tau) = 0$, поскольку интенсивность света, рассеянного одной частицей, не зависит от ее положения, а больше в этом случае вообще нечему меняться, и при $N = 1$ $G^{(2)}(\tau) = 0$. Тут нет никакого противоречия: просто статистика излучения, рассеянного одним рассеивателем, негауссова. Все станет на свои места, если мы вспомним, что рассеивающих частиц обычно много. Тогда-то и появятся флуктуации интенсивности регистрируемого излучения, связанные с тем, что разность фаз волн, пришедших от разных рассеивателей, зависит от относительного расположения последних, и учитываемые первым слагаемым в выражении (1.57). При $N \gg 1$ это слагаемое дает основной вклад, и поскольку $G^{(1)}(\tau) = Ng^{(1)}(\tau)$, соотношение Зигерта (1.24) выполняется с точностью до поправок $1/N$, т. е. в полном соответствии с центральной предельной теоремой статистика суммарного излучения становится гауссовой. Пользуясь для точечных частиц формулой (1.48), получим при $N \rightarrow \infty$

$$G^{(2)}(\tau) = e^{-2Dq^2|\tau|}. \quad (1.58)$$

Соответственно спектр флуктуаций интенсивности рассеянного света представляет собой центрированный в нуле лоренциан с удвоенной диффузионной шириной. Нетрудно понять физические причины как отсутствия доплеровского смещения, так и удвоения ширины спектра в гомодинной схеме измерений. Первое объясняется тем, что общий дрейф всех частиц не меняет их относительного расположения и не приводит к флуктуациям интенсивности рассеянного света; второе — тем, что корреляция фаз волн, рассеянных двумя разными частицами, теряется в два раза быстрее, чем корреляция фаз рассеянной и опорной волн при гетеродинировании, потому что в одном случае важно смещение двух частиц относительно друг друга, а в другом — абсолютное смещение одной частицы. Для частиц конечного размера или оптически анизотропных подстановка каждого слагаемого из выражения (1.52), описывающего поле, рассеянное n -й частицей, в формулу (1.22) дает отличный от нуля результат. В частности, для оптически изотропных рассеивателей

$$g^{(2)}(\tau) = \langle |\alpha(0)|^2 |\alpha(\tau)|^2 \rangle / \langle |\alpha|^2 \rangle^2 - 1. \quad (1.59)$$

Итак, малые по параметру $1/N$ поправки к соотношению Зигерта, т. е. второе слагаемое в формуле (1.57), интересны тем, что не содержат диффузионного уширения и вообще никак не связаны с трансляционным движением рассеивателя. Это слагаемое несет информацию только о внутренней динамике. В следующей главе мы увидим, что существуют методические возможности подавлять вклад в гомодинный спектр первого, гауссового слагаемого в (1.57) и наблюдать только малый «негауссов» вклад. Это направление, которое мы будем называть негауссовой корреляционной спектроскопией, в настоящее время мы считаем одним из наиболее перспективных подходов к использованию метода квазиупругого светорассеяния для изучения внутренней динамики частиц в растворе.

Формула (1.57) справедлива только в том случае, когда рассеиватели статистически независимы. Если это не так, статистика рассеянного излучения существенно негауссова и $G^{(2)}(\tau)$ может сильно отличаться от $|G^{(1)}(\tau)|^2$. Такая ситуация возникает, например, в турбулентном потоке [189], где скорость движения рассеивателей хотя и хаотична, но скоррелирована в пределах рассеивающего объема. Особого обсуждения требует и вопрос статистики излучения, рассеянного на сильно взаимодействующих частицах. В этой связи важную роль играет дальнодействующее гидродинамическое взаимодействие, связанное с возникновением потоков несжимаемого растворителя при движении в нем рассеивающей частицы. До конца этот вопрос не ясен, хотя и известно, что одно только гидродинамическое взаимодействие не нарушает соотношения Зигерта. Мы вернемся к этой проблеме в последней главе при обсуждении концентрационных зависимостей спектральных характеристик рассеянного света.

В заключение нам бы хотелось обратить внимание на важные в практическом отношении общие закономерности квазиупругого рассеяния света, вытекающие из соотношения (1.54):

1) интенсивность рассеяния, как это было установлено еще Рэлеем, пропорциональна ω_0^4 , т. е. обратно пропорциональна λ^4 ;

2) интенсивность рассеяния оптически изотропными частицами пропорциональна $\sin^2 \psi$; в частности, рассеяние в направлении поляризации вообще не происходит;

3) интенсивность рассеяния на малых по сравнению с $1/q$ частицах пропорциональна квадрату их объема или массы.

Это связано с тем, что волны, рассеянные разными частями малого рассеивателя, всегда сфазированы друг с другом и согласно выражению (1.53) $\alpha \sim \chi\omega$. В частности, при равных весовых концентрациях однотипных частиц в растворе интенсивность пропорциональна их молекулярной массе.

§ 1.4. ИЗМЕРЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФОТОТОКА

Приборная реализация корреляционного анализа. Реальный масштаб времени. Для того чтобы корреляционная спектроскопия квазиупругого рассеянного света действительно была эффективным инструментом изучения рассеивающей системы, в первую очередь необходимо, чтобы точность измерения спектра или корреляционной функции была достаточно высока. Пусть нас удовлетворит статистическая точность $\sim 1\%$. Это значит, что время накопления информации должно составлять согласно формуле (1.32) примерно $10^4/\Delta\omega$, где $\Delta\omega$ — спектральное разрешение. С другой стороны, ширина Dq^2 спектра света, рассеянного типичным для такого рода экспериментов объектом, составляет величину порядка 10^2 — 10^3 Гц. Чтобы систематические искажения спектра не превышали 1% , необходимы разрешение $\Delta\omega \sim 1 \div 10$ Гц и соответственно измерение спектра примерно на 100 частотах. Итак, время измерения спектра мощности на одной частоте составляет при таких значениях точности и разрешения 10^3 — 10^4 с, и совершенно очевидно,

что последовательное измерение спектра на разных частотах неприемлемо с точки зрения продолжительности эксперимента. Именно после появления технических возможностей одновременного анализа спектра во всей спектральной полосе, или, как говорят, в реальном масштабе времени, корреляционная спектроскопия получила массовое распространение. Широко используемый термин «анализ в реальном масштабе времени» означает, что вся интересующая нас информация обрабатывается в том темпе, в каком она поступает. Широкополосность анализаторов реального масштаба времени (максимальная частота, на которой спектр может еще быть измерен без потери информации, т. е. с погрешностью, определяемой соотношением (1.32)) лимитируется быстродействием этих приборов. В настоящее время прогресс в электронике и вычислительной технике привел к появлению разнообразных спектроанализаторов и коррелометров, работающих в реальном масштабе времени, вплоть до десятков мегагерц. Для более высоких частот актуальность такого режима работы пропадает. Например, измерение гармоник спектра в полосе 1 МГц с относительным разрешением $1/_{100}$ и 1 %-ной точностью занимает 1 с. Поэтому реальный масштаб времени нужен в диапазоне выше 1 МГц только в том случае, если стоит задача очень быстрого измерения спектра или если необходимо очень высокое разрешение.

Мы не будем подробно обсуждать технические аспекты анализа сигналов в реальном масштабе времени, а ограничимся лишь кратким описанием наиболее распространенных алгоритмов работы существующих спектроанализаторов и коррелометров. Простейшее с теоретической, но отнюдь не с технической точки зрения решение этой задачи заключается в параллельном включении требуемого числа узкополосных фильтров, каждый из которых настроен на свою частоту. Однако такого рода системы оказываются малоэффективными, в первую очередь из-за трудности настройки и калибровки. Поэтому современные приборы построены по другому принципу и являются либо цифроаналоговыми, либо полностью цифровыми вычислительными устройствами. Обработка информации в таких анализаторах начинается с одного и того же — с запоминания реализации сигнала в цифровом виде. При анализе аналогового фототока это достигается путем аналого-цифрового преобразования входного сигнала; в технике счета фотонов поступающий сигнал уже имеет цифровой характер. Дальнейшая задача состоит в том, чтобы успеть определить спектр мощности или корреляционную функцию этой реализации за то время, пока на вход поступает и запоминается следующая реализация.

Пусть выборка содержит M значений входного сигнала, следующего через время Δt . Тогда максимальная частота спектра, которая может быть определена по такой выборке, порядка $1/\Delta t$ (точнее, чуть меньше $\pi/\Delta t$, так как, по теореме Котельникова [5], можно определить интенсивность такой гармоники, на период которой попадает не менее двух точек выборки), а $\pi/M\Delta t$ — спектральное разрешение. Если прибор работает в реальном масштабе времени, время анализа реализации равно $M\Delta t$. Но прямое последовательное определение M значений корреляционной функции или спектра требует времени, пропорционального

M^2 , поэтому $M\Delta t \sim M^2$ и $\Delta t \sim M$. Другими словами, при фиксированной скорости анализа широкополосность анализатора и его относительное разрешение обратно пропорциональны друг другу. Их произведение может быть увеличено только за счет увеличения времени анализа реализации по сравнению с ее длительностью, т. е. за счет потери части поступающей информации и, следовательно, снижения статистической точности измерений. Поэтому ясно, что решающими факторами в создании материальной базы корреляционной спектроскопии были повышение быстродействия вычислительных средств и, что может быть не менее важно, совершенствование алгоритмов вычисления спектра или корреляционной функции.

Исторически одними из первых высокочастотных корреляторов реального масштаба времени были одноканальные корреляторы, или корреляторы с одноуровневым клиппированием. Быстродействие этих приборов обеспечивалось за счет того, что вместо реального сигнала анализировался так называемый клиппированный сигнал, т. е. последовательность, состоящая из нулей в тех точках выборки, где значение входного сигнала ниже определенного, наперед заданного уровня клиппирования (отрезания), и единиц — там, где сигнал превышал этот уровень. Поскольку операция перемножения 0 и 1 может выполняться на очень быстродействующих логических элементах, клиппирующие коррелометры и по сей день остаются наиболее высокочастотными анализаторами реального масштаба времени. Их полоса достигает 100 МГц. Использование таких корреляторов полностью оправданно, если регистрация излучения ведется с помощью техники счета фотонов, причем вероятность зарегистрировать фотон за интервал времени Δt намного меньше единицы. В этом случае фототок, усредненный за время Δt , действительно, представляет собой последовательность нулей и единиц. При этом имеются дополнительные преимущества полностью цифровой обработки сигнала: отсутствуют шумы усилителя и не важен разброс фотоимпульсов по амплитуде. Однако при увеличении скорости счета возможно появление нескольких фотоотсчетов в течение времени Δt , которые будут приняты за один. Это приводит к искажению корреляционной функции. Особой осторожности требует использование клиппирующих корреляторов для анализа аналогового сигнала.

Корреляционную функцию клиппированного аналогового сигнала нетрудно вычислить в случае гауссовой статистики фототока.

Пусть в качестве уровня клиппирования выбран средний фототок: $[i] = 1$, если $i \geq \langle i \rangle$, и $[i] = -1$, если $i < \langle i \rangle$. Тогда с точностью до константы корреляционная функция клиппированного сигнала

$$G^{кл}(\tau) = \iint di_1 di_2 [i_1] [i_2] P(i_1, i_2), \quad (1.60)$$

где вероятность реализации фототока i_1 в момент времени 0 и i_2 — в момент τ — $P(i_1, i_2)$ дается формулой (1.11). Интеграл в выражении (1.60) нетрудно вычислить

$$G^{кл}(\tau) = \frac{2}{\pi} \arcsin \frac{G(\tau)}{G(0)}. \quad (1.61)$$

Таким образом, корреляционная функция клиппированного сигнала повторяет формулу истинной, только когда $G(\tau) \ll G(0)$, т. е. $G^{\text{кл}}(\tau) \ll 1$. В $G(0)$ дает вклад дробовой шум, и поскольку отношение сигнал—дробовой шум Δ равно среднему числу фотоотсчетов за время τ_c , мы вполне подтверждаем сделанный ранее вывод о том, что $G^{\text{кл}}(\tau)$ соответствует истинной корреляционной функции только при малых значениях числа фотоотсчетов, т. е. $\Delta \ll M$. В противном случае, когда $\Delta \gg M$ (т. е. дробовой шум мал), статистика фототока гауссова, и с помощью выражения (1.61) можно по корреляционной функции клиппированного сигнала восстановить истинную. В промежуточной ситуации $\Delta \sim M$ к использованию соотношения (1.61) следует относиться с осторожностью. Заканчивая обсуждение однобитовых корреляторов, заметим, что клиппирование сопровождается потерей информации и точность определения $G(\tau)$ таким способом несколько ниже, чем при прямом определении корреляционной функции.

Одновременно с полностью цифровым корреляционным способом анализа развивался аналоговый. Объединение принципов параллельного анализа спектра и цифровой обработки сигнала привело к созданию спектрометров реального масштаба времени, использующих временное сжатие. Этот способ заключается в следующем: «запомненная» в цифровом виде реализация входного сигнала считывается цифроаналоговым преобразователем, но не в том темпе, в каком происходила запись, а в M раз быстрее. Фурье-образ полученного «сжатого» во времени аналогового сигнала отличается от фурье-образа исходного сигнала масштабным преобразованием шкалы частот с коэффициентом подобия M , т. е. сигнал оказывается в M раз более высокочастотным. Спектральный анализ такого сигнала может быть проведен в M раз быстрее, чем исходного, и, следовательно, режим реального времени может быть достигнут путем последовательного определения интенсивности спектральных гармоник «сжатой» во времени копии с помощью обычного перестраиваемого узкополосного фильтра.

В последнее время благодаря непрерывному росту быстродействия вычислительной техники и совершенствованию алгоритмов ее работы появились коррелометры и спектроанализаторы реального масштаба времени с полностью цифровой обработкой сигнала. На входе таких устройств стоит многоразрядный аналого-цифровой преобразователь (АЦП), и «запомненная» в цифровом виде реализация обрабатывается чисто вычислительными методами. При этом используются специальные алгоритмы, существенно ускоряющие обработку информации. При определении корреляционной функции эти алгоритмы основаны на группировке суммируемых произведений $i(t) i(t + \tau)$ по равным значениям $i(t)$ с суммированием соответствующих значений $i(t + \tau)$ так, что вместо M^2 операций умножения, значительно более длительных, чем операция сложения, остается только 2^n умножений, где n — разрядность АЦП. Используется группировка как по $i(t)$, так и по $i(t + \tau)$. Такой алгоритм означает, по существу, «запоминание» в вычислительном устройстве таблицы умножения всех 2^n возможных значений фототока друг на друга так, что операция умножения заменяется

адресацией к соответствующему элементу этой таблицы, т. е. цифровые значения на выходе АЦП попарно кодируют адрес регистра, в котором хранится результат их произведения. Цифровые спектрометры реального масштаба времени используют различные варианты алгоритма быстрого преобразования Фурье, требующего $M \ln M$ операций умножения для вычисления амплитуды M спектральных гармоник реализации.

Широкополосность цифровых анализаторов во многом зависит от разрядности входного АЦП. Однако слишком малая разрядность, как это ясно видно на примере одноуровневого клиппирования, может привести к заметным искажениям корреляционной функции или спектра сигнала. Какую же разрядность следует признать достаточной? В случае известной, например гауссовой, статистики фототока на этот вопрос может быть получен точный ответ тем же путем, что и при вычислении корреляционной функции клиппированного сигнала. Мы не будем приводить здесь этих выкладок, результат которых сводится к тому, что отклонение корреляционной функции дискретной цифровой реализации от истинной экспоненциально убывает с ростом параметра $[(\langle i^2 \rangle - \langle i \rangle^2) / \Delta i]^2$, где Δi — шаг квантования сигнала. На практике это означает, что процентная точность определения корреляционной функции гарантируется уже при 4—5-разрядном АЦП.

Современные специализированные коррелометры и спектрометры удовлетворяют всем требованиям стандартного эксперимента в лазерной корреляционной спектроскопии. Более того, такие анализаторы относительно просто могут быть созданы на базе средних, а в последнее время — даже малых ЭВМ.

Сопоставление аналогового способа фоторегистрации с техникой счета фотонов. В теоретическом плане никакой разницы между этими двумя способами анализа фототока нет. Вопрос, следовательно, состоит лишь в том, насколько можно приблизиться к идеалу, используя тот или другой технический прием. В наиболее распространенном варианте техника счета фотонов заключается в подсчете числа фотоимпульсов в интервале времени Δt и построении цифровой реализации, состоящей из ряда таких чисел для набора следующих друг за другом интервалов времени. Этот способ анализа полностью эквивалентен аналоговому, если в последнем входной АЦП дает на выходе численное значение среднего за время Δt фототока. Правда, при регистрации отдельных фотоимпульсов есть и другие возможности анализа фототока, например определение корреляционных свойств интервалов между фотоотсчетами.

Разумеется, никакой способ анализа не может дать больше информации, чем содержится в зарегистрированной последовательности фотоотсчетов, и любой способ определения корреляционной функции флуктуаций интенсивности регистрируемого излучения не имеет принципиальных преимуществ перед стандартным счетом фотонов. Вопрос снова касается только технического удобства, и поэтому мы будем обсуждать лишь описанный нами выше наиболее распространенный вариант обработки последовательности фотоимпульсов.

Главным преимуществом техники счета фотонов, как и вообще любой полностью цифровой системы передачи информации, является

отсутствие амплитудно-частотных искажений измеряемого спектра. При аналоговом анализе такие искажения неизбежны. Во-первых, необходима фильтрация высоких, лежащих за пределами полосы анализатора частот с целью сглаживания фототока на временах порядка Δt . Эту фильтрацию может осуществлять сам АЦП, усредняя ток за это время. Во-вторых, необходима фильтрация низких частот для «отрезания» постоянной составляющей и тем самым сокращения требуемого динамического диапазона АЦП. В технике счета фотонов такая фильтрация, по существу, тоже имеет место, но подсчет количества фотоимпульсов за время Δt и вычитание среднего их числа, т. е. постоянной составляющей, соответствуют математически точно определенной амплитудно-частотной характеристике, которая легко может быть учтена в последующей обработке результатов. При аналоговом способе регистрации сама эта характеристика является предметом экспериментального измерения, причем в прецизионных экспериментах она не может считаться раз и навсегда заданной из-за временной и тепловой нестабильности элементов усилительно-измерительного тракта. Необходимость измерения наряду со спектром также амплитудно-частотной характеристики, причем с той же точностью, в два раза замедляет работу.

Основным недостатком счета фотонов является сложность его использования при больших скоростях счета из-за перекрывания отдельных фотоимпульсов. В результате этот метод практически невозможно применять в гетеродинной схеме измерений в связи с наличием огромной по сравнению с информативной частью постоянной составляющей.

Практически важный вывод в отношении обсуждаемой техники прост: не вызывают сомнения преимущества счета фотонов при малой интенсивности регистрируемого излучения, и регистрация фотоимпульсов широко применяется в стандартных зарубежных установках квазиупругого светорассеяния, работающих по гомодинной схеме. Точно так же в условиях высоких интенсивностей излучения и прежде всего в гетеродинном варианте оптического смещения технические удобства аналогового способа анализа фототока очевидны. Хотя в первую очередь экспериментатор в вопросе выбора между счетом фотонов и аналоговой регистрацией руководствуется задачами исследования, техническая оснащенность играет не последнюю роль.

ГЛАВА 2

МЕТОДЫ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В этой главе показано, как с помощью средств анализа, входящих в арсенал методов корреляционной спектроскопии, наиболее точно и достоверно получить всю имеющуюся в рассеянном свете информацию об изучаемой системе. Причина описанного ниже методического разнообразия состоит в том, что каждый отдельно взятый метод корреляционной спектроскопии обладает некоторой дополнительной информативностью.

Простейшей характеристикой рассеянного света является его интегральная интенсивность в заданном угле рассеяния. Ее измерение в рамках известной методики — индикатрисного светорассеяния — вплоть до настоящего времени являлось одним из наиболее распространенных способов изучения макромолекул в растворах [54, 59]. Но интенсивность, как и поляризация, содержит информацию только о статических свойствах рассеивающих объектов. Гораздо более широкие перспективы открывает возможность измерения корреляционных характеристик излучения, отражающих динамическое поведение рассеивающей системы. Да и сами эти характеристики могут изучаться все более детально, с привлечением и поляризационного анализа, и измерения высших корреляторов как в одной, так и в разных точках пространства.

Многообразны применения корреляционной спектроскопии и с точки зрения условий проведения эксперимента. Диффузометрия, доплеровская анемометрия, корреляционная спектроскопия полного внутреннего отражения, негауссова корреляционная спектроскопия — все эти методы, являясь, по сути, корреляционными, нацелены на изучение разных динамических свойств рассеивающей системы. И хотя сам по себе спектральный анализ фототока остается прежним, меняются качественно и количественно получаемая информация.

Не вся доступная анализу информация равноценна. Всегда возникает вопрос — оправданы ли усилия по получению дополнительной информации? Отвечая на него, мы должны разделить все описываемые в этой главе методы на традиционные, т. е. такие, для которых ответ безоговорочно утвердителен, и перспективные, для которых теоретически ясна возможная ценность получаемых с их помощью сведений, хотя экспериментальных доказательств этому в настоящий момент еще недостаточно. К последним следует отнести корреляционную спектро-

скопию полного внутреннего отражения, в меньшей степени — метод взаимной корреляции и негауссову корреляционную спектроскопию. Соответственно все остальные рассмотренные здесь методики относятся к традиционным. Читателям, которые, как и авторы, интересуются данной проблемой не только с позиции сегодняшних возможностей корреляционной спектроскопии, но хотят оценить ее будущее, обсуждение перспективных методов будет, вероятно, наиболее интересно.

§ 2.1. АВТОКОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ. ГОМО- И ГЕТЕРОДИНИРОВАНИЕ

Гетеродинная схема измерений. Непосредственно измеряемой в корреляционном эксперименте величиной является не сам спектр рассеянного изучаемой системой света, а спектр (либо корреляционная функция) флуктуаций фототока на выходе фоторегистрирующего прибора. Этот спектр представляет собой результат биений гармоник электромагнитных полей друг с другом и сосредоточен в низкочастотной области, т. е. там, где его очень удобно анализировать современными мощными радиотехническими методами. Уже на этом уровне, а именно на уровне классификации регистрируемых фотодетектором гармоник электромагнитных полей, возникают два варианта измерения:

а) на фотодетектор попадает лишь свет, рассеянный изучаемой системой. В этом варианте реализуется гомодинный метод измерения;

б) вместе с рассеянным на фотодетектор попадает и часть нерассеянного (опорного) излучения. Этот вариант получил название гетеродинирования.

Начнем с рассмотрения метода гетеродинирования. В этом случае регистрируется спектр флуктуаций интенсивности излучения, состоящего из интересующего нас излучения $E(t)$ и «опорного» монохроматического пучка $E_0(t)$ намного большей интенсивности (см. § 1.2). При этом согласно выражению (1.29) наблюдается симметричная относительно частоты опорного луча часть оптического спектра, сдвинутая на частоту ω_0 — $\omega_{\text{рег}}$. Аналогия этого метода известному из радиотехники гетеродинированию была отмечена еще А. Форрестером [52, 110], назвавшим его «супергетеродинным детектированием». Напомним, что спектр мощности фототока при гетеродинировании повторяет оптический спектр независимо от статистики оптического поля.

Получаемый при гетеродинировании выигрыш в величине полезного сигнала, пропорционального интенсивности опорного пучка, частично компенсируется проигрышем, связанным с трудностями согласования волновых фронтов рассеянного и опорного излучения. Для детального понимания этой и других проблем, возникающих при гетеродинировании, необходимо рассмотреть вопросы соотношения сигнал — шум при таком виде детектирования, варианты оптических схемных решений и ряд других методических вопросов.

В экспериментах по квазиупругому рассеянию света в качестве опорного пучка обычно используется то же лазерное излучение, которым облучается исследуемая система. Это достигается двумя способами: либо с помощью зеркал, направляющих часть лазерного излу-

чения в ФЭУ «в обход» рассеивающей кюветы, либо помещением внутрь рассеивающего объема такого объекта, который сильно, но без изменения частоты, рассеивает свет (рис. 6, б).

В тех случаях, когда частота рассеянного света значительно отличается от частоты падающего излучения, в качестве опорного пучка может использоваться и излучение отдельного «гетеродинного» лазера, частота которого близка к частоте рассеянного света [20]. Такая схема эксперимента позволяет и в этом случае сместить спектр биений в удобную для анализа область частот. Однако в практике биофизических

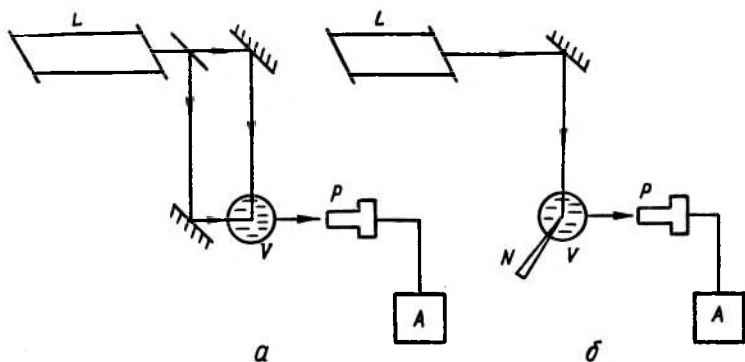


Рис. 6. Схемы гетеродинного детектирования рассеянного света:

а — гетеродинирование отщепленным лучом, *б* — помещенным в образец рассеивателем; *L* — лазер, *V* — рассеивающий объем, *N* — острие либо тонкая нить, *P* — ФЭУ, *A* — анализатор

исследований изменение частоты света при рассеянии относительно невелико, и подобная «супергетеродинная» схема не находит применения.

Остановимся вкратце на различных вариантах практической реализации гетеродинной схемы. В работе [99] авторы расщепляли луч гелий-неонового лазера на два, один из которых использовался в качестве гетеродина (рис. 6, *а*). Гетеродинный луч модулировался акустооптической ячейкой, а сигнал биений рассеянного света и гетеродинного луча регистрировался приемником. Авторы работы [8] создавали гетеродинный свет, рассеивая возбуждающий пучок тefлоновой иглой, введенной в рассеивающий объем (см. рис. 6, *б*). В других исследованиях [102, 155] гетеродином служило паразитное рассеяние от стенок кювет, в которые помещались исследуемые суспензии. Наконец, Ужгирсом получена высокая эффективность гетеродинирования путем рассеяния опорного пучка на частицах латекса диаметром 91 нм, осажденных на стеклянную подложку, расположенную непосредственно за линзой, собирающей рассеянный свет [240]. Во всех вариантах схем оптическое гетеродинирование будет иметь высокую эффективность при достаточно высокой точности совмещения волновых фронтов рассеянного света и гетеродинного луча. При использовании в качестве гетеродина части света возбуждающего лазера фронт гетеродинной волны будет близок к плоскому. В то же время рассеянный свет представляет собой почти сферическую волну, и только на больших расстояниях от

рассеивающего объема его фронт можно считать плоским в пределах поверхности фотокатода. В таком варианте оптической схемы трудно добиться высокой эффективности гетеродинирования. Наиболее оптимальной с этой точки зрения является схема с использованием упругого рассеяния от иглы или нити, введенной в рассеивающий объем, поскольку в этом случае рассеянное и гетеродинное излучение идут практически из одной точки и имеют наиболее близкие волновые фронты. В этой схеме можно получить высокую эффективность оптического гетеродинирования. Однако изготовление как острия, приближающегося к параметрам «точечного» источника, так и достаточно тонкой нити является довольно трудной технической задачей. Поэтому чаще всего в практике используют отдельный гетеродинный луч.

Эффективность гетеродинирования (т. е. отношение реального $\Delta = \text{сигнал/дробовой шум}$ к теоретическому) — важный параметр, определяющий, в частности, выбор оптимального соотношения между интенсивностями опорного и рассеянного света. Ее исследованию в реальных экспериментальных схемах был посвящен ряд работ [8, 188, 240]. Показано, что легче всего достичь высокой эффективности гетеродинирования для света, рассеянного под углом 90° ; всегда рекомендуется тщательно подгонять длины путей рассеянного и гетеродинного лучей при максимальном их сокращении.

Гомодинирование или гетеродинирование? В случае, когда на фотодетектор попадают лишь рассеянные в образце электромагнитные волны, непосредственно измеряемая величина — корреляционная функция фототока на выходе фотодетектора — определяется выражением (1.21). Вообще говоря, парный коррелятор (1.25) — гетеродинный спектр и четверной коррелятор (1.22) — гомодинный спектр содержат разную информацию о рассеянном свете. Однако в подавляющем большинстве приложений эта информация оказывается сопоставимой. В самом деле, если свет рассеивается большим числом независимых источников, то поле рассеянного излучения, как отмечалось в гл. 1, представляет собой гауссову случайную величину, и гомодинная корреляционная функция связана с гетеродинной соотношением Зигерта (1.24). При этом спектр флуктуаций интенсивности оказывается автосверткой спектра излучения, чем и обусловлено распространенное название гомодинного метода — «метод самобиений».

При гомодинировании мы узнаем лишь модуль корреляционной функции, но не ее фазу. Поэтому в гомодинной схеме измерений невозможно определить доплеровское смещение частоты света, рассеянного равномерным и однородным потоком частиц. Это не значит, что указанный метод менее информативен, чем оптическое гетеродинирование. В гл. 5 мы встретимся и с обратной ситуацией.

Что же лучше — гомодинирование или гетеродинирование? Этот вопрос носит чисто риторический характер, когда интересующая нас информация может быть получена только одним из названных методов. Тут выбирать не приходится. Но во многих приложениях корреляционной спектроскопии исследуются равновесные системы, а статистика регистрируемого излучения гауссова, так что в гомодинном и гетеродинном спектрах теоретически содержится одна и та же информация.

В этом случае поставленный вопрос имеет важное практическое значение и требует подробного анализа. Как выяснить, что лучше? По сравнительной концентрационной чувствительности? Но тут анализ литературных источников не отдает приоритета ни одному из методов. По удобству математической обработки результатов? С этой точки зрения, как мы увидим в следующей главе, гетеродинирование несколько предпочтительнее. По помехоустойчивости методики? При гомодинировании исчезает информация о фазе корреляционной функции, но за счет этого оно более устойчиво к помехам при работе в условиях вибрации и паразитных конвекций в изучаемых системах. С другой стороны, наряду с интересующим нас рассеянием всегда (вопрос лишь — на каком уровне) присутствует и упругое — паразитное, которое приводит к гетеродинированию [8]. Кроме гомодинного спектра появится в два раза более узкая гетеродинная компонента. Спектр из однолоренцевого станет дуолоренцевым (а корреляционная функция из одноэкспоненциальной — двухэкспоненциальной). Это всегда возможное и плохо контролируемое явление значительно усложняет анализ экспериментальных данных. Столь же искажающей может быть примесь гомодинирования в гетеродинировании, но от нее легко избавиться путем простой и легко осуществимой процедуры — можно увеличивать мощность опорного пучка до тех пор, пока вид спектра не перестанет меняться. Итак, решительно сделать выбор между гетеродинированием и гомодинированием, полностью предпочтя одно из них, невозможно. Остается лишь описать сложившуюся ситуацию в практическом использовании этих методов.

Существенным преимуществом гомодинной регистрации является возможность применения техники счета фотонов, которую трудно использовать при гетеродинировании. При аналоговой же обработке сигнала возникает необходимость учета АЧХ всего приемно-усилительного тракта. Этот фактор особенно важен при низких соотношениях сигнал/дробовой шум (Δ). Действительно, на выходе спектрометра спектральная кривая дробового шума повторяет форму АЧХ, и если эта характеристика известна с точностью до 10^{-4} , то при $\Delta \ll 10^{-4}$ наблюдать интересующий нас сигнал невозможно.

При корреляционном способе анализа дробовой шум, имеющий δ -образную корреляционную функцию, не искажает $G(\tau)$ полезного сигнала. Однако в этом случае отрицательную роль, аналогичную роли дробового шума в спектрометрическом методе, играет постоянная составляющая фототока, отношение которой к полезному сигналу порядка единицы в гомодинном методе и намного больше единицы — в гетеродинном. Если же постоянную составляющую фототока «отрезать» фильтром низких частот, завал АЧХ усилителя приведет к искажению формы спектра дробового шума, т. е. к появлению конечного времени корреляции в этом шуме. Чтобы не внести искажений в корреляционную функцию сигнала, завал АЧХ усилителя можно делать только на частотах, малых по сравнению с шириной исследуемого спектра, поэтому характерное время корреляции в дробовом шуме будет велико по сравнению с временем корреляции в полезном сигнале и дробовой шум проявится в наблюдаемой корреляционной функции в виде

постоянной добавки. Это лишний раз показывает эквивалентность корреляционных и спектральных методов.

Ни гомо-, ни гетеродинирование полностью не свободны от возможных систематических ошибок анализа: паразитные засветки фотоприемника, недостаточная эффективность гетеродинирования, наконец (по-видимому, главное), невозможность изготовления полностью обеспыленной изучаемой системы. Это не позволяет использовать все возможности статистического усреднения, когда точность возрастает как корень квадратный из времени анализа. Реально достижимая точность в значительной степени определяется искусством экспериментатора и свойствами изучаемой системы. И все же на основании анализа известных литературных данных и собственного опыта можно сделать общие выводы по этому вопросу:

1. Идеальное в теоретическом плане гетеродинирование позволяет при прочих равных условиях и одинаковом времени анализа получить в два раза большую статистическую точность, чем идеальное гомодинирование.

2. Математическая обработка результатов измерений при гетеродинировании проще, поскольку она обычно заключается в разложении спектра или корреляционной функции на аддитивные вклады различного происхождения. Эта процедура, естественно, облегчается, если измеряется сама корреляционная функция, а не ее квадрат, и тем более при спектральном анализе, когда измеряется сам спектр, а не его авто-свертка.

3. Техническая реализация гомодинирования существенно проще: отпадает необходимость тщательной юстировки и виброзащиты установки.

4. В гомодинном режиме легче использовать технику счета фотонов со всеми преимуществами, вытекающими из полностью цифровой обработки сигнала.

Итак, гетеродинирование в два раза точнее, однако гомодинирование гораздо проще в эксперименте. Большинство коммерческих зарубежных фирм выпускают системы, использующие корреляционный анализ, счет фотонов и гомодинный прием. В тех же случаях, когда установки ориентированы и на задачи, связанные с гетеродинированием, поставляется специальное оборудование. В нашей стране подобная техника до сих пор серийно не производится. Но если возможен выбор между этими методиками, то экспериментатор должен решить для себя вопрос: готов ли он к преодолению определенных технических трудностей на пути к реализации предельных возможностей корреляционной спектроскопии.

Примеры конкретных схем оптического гетеродинирования. Мы решили остановиться отдельно на этом вопросе, так как в техническом отношении он более сложен, чем гомодинирование; создав спектрометр оптического гетеродинирования и перекрыв путь опорного пучка, мы с легкостью переходим к гомодинной схеме.

В спектрометрах оптического гетеродинирования особое внимание следует уделять подавлению связанного с механическими вибрациями микрофонного эффекта. Для этого оптическая часть спектрометров

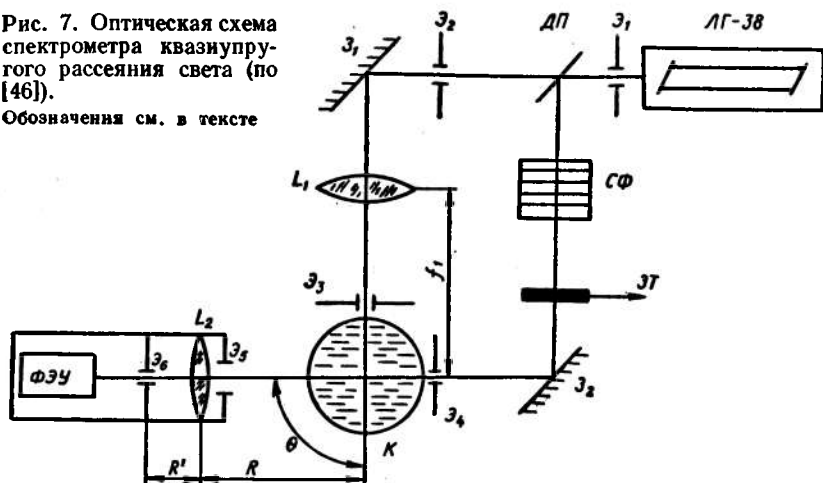
размещается на специально изготовленном виброразвязанном столе. Такой стол для голографических измерений описан в работе [22].

Этот способ виброзащиты не единственный. Еще лучше использовать фундамент, врезанный в основание корпуса здания, отдельно от самого здания, который представляет собой цельнобетонный куб, свободно лежащий на подушке из просушенного формовочного песка, засыпанного в гидроизоляционной траншее. Правда, устройство таких фундаментов возможно лишь в подвальных помещениях лабораторных корпусов.

Остановимся на стандартной гетеродинной схеме, изображенной на рис. 7. Для возбуждения рассеянного света использовался лазер

Рис. 7. Оптическая схема спектрометра квазиупругого рассеяния света (по [46]).

Обозначения см. в тексте



ЛГ-38, работающий в режиме TEM_{00q} . Лазер имел в составе своего излучения около 18 типов колебаний, отстоящих друг от друга примерно на 80 МГц. Мощность выходного излучения лазера составляла ~ 40 мВт. Лазерный луч делится на два луча делительной пластиной (ДП). Прошедший через пластину свет использовался для возбуждения рассеяния, а отраженный — служил гетеродинным лучом. В качестве ДП использовались плоскопараллельные пластины из оптического стекла без отражающего покрытия. Коэффициент отражения их составляет примерно 4 %, что более чем достаточно для гетеродинного луча. На пути луча помещали нейтральные светофильтры (СФ), уменьшающие при необходимости мощность гетеродина, и затвор (ЗТ), перекрывающий гетеродинный луч в тех случаях, когда измеряются гомодинные спектры. Гетеродинные спектры обычно снимались для углов рассеяния 90° , но при желании можно было изменять направление гетеродинного луча перемещением зеркала (3_2). Диафрагмы ($3_1 - 3_4$) очищали регистрируемый свет от паразитных отраженных лучей.

Возбуждающий свет фокусировался линзой (L_1) в центр рассеивающего объема. Если пренебречь расходимостью лазерного луча, то диаметр возбуждающего пучка в фокусе идеальной линзы [7]

$$d = 1,22\lambda f/d_0, \quad (2.1)$$

где d_0 — диаметр лазерного луча на входе в линзу L_1 ; f — фокусное расстояние линзы; λ — длина волны возбуждающего света в среде. Для воздуха $\lambda = \lambda_0 = 6,328 \cdot 10^{-5}$ см. В нашей установке $f = 40$ см; $d_0 = 0,3$ см. Следовательно, в разбавленном водном растворе $\lambda = \lambda_0/1,33$, и диаметр луча в фокусе линзы уменьшится до $\sim 0,08$ мм. Область, где изменение интенсивности света на оси линзы меньше 20 %

$$\Delta z = \pm 2\lambda (f/d_0)^2. \quad (2.2)$$

Из этой формулы получаем, что «протяженность» фокуса в воздухе равна 4,5 см, а в воде $\sim 3,4$ см.

Рассеянный свет принимался фотоумножителем, который имел возможность поворачиваться вокруг кюветы с исследуемым раствором и устанавливаться в нужном положении с точностью $\pm 30''$. В установке использовался фотоумножитель типа ФЭУ-79. Темновой ток этого фотоумножителя находился на уровне 10^{-9} А при напряжении питания 1800 В. Анодный ток при этом напряжении равнялся 10^3 А/лм, что составляло $2,2 \cdot 10^5$ А/Вт для света с длиной волны 632,8 нм. Перед фотокатодом умножителя располагалась ирисовая диафрагма ($\mathcal{E}_5$), диаметр которой (d_5) мог плавно меняться от 1 до 10 мм. Эта диафрагма определяла апертуру фотосбора. Непосредственно за ней помещался объектив (L_2), проецирующий изображение иллиминируемого объема на плоскость диафрагмы $\mathcal{E}_6$, диаметр которой (d_6) определяет длину рассеивающего объема;

$$L = \frac{1}{\sin \theta} d_6 \frac{R}{R'}, \quad (2.3)$$

где R, R' — расстояния от объектива до рассеивающего объема и диафрагмы $\mathcal{E}_6$ соответственно. Поскольку проекция рассеивающего объема на направление наблюдения не зависит от угла рассеяния, телесный угол когерентности постоянен. Учтывая, что апертура фотосбора $\Omega \simeq (d_6/R)^2$, число площадок когерентности на площади фотокатода согласно формуле (1.42)

$$\frac{\Omega}{\Omega_c} \sim \frac{k^2 d_6 d_5^2}{RR'}. \quad (2.4)$$

Общие требования к элементам оптического тракта. Источник излучения, устройство формирования пучка, кювета с исследуемым образцом, система фотосбора, приемник излучения — все это элементы оптического тракта. Каковы же требования к этим элементам, обеспечивающие наиболее благоприятный режим работы всей системы?

Нет сомнений, что источник излучения — лазер — заслуживает наиболее подробного обсуждения. Сформулируем требования к нему. Во-первых, лазер должен быть непрерывного действия, с мало расходящимся световым пучком. Это условие ограничивает выбор подходящих для задач корреляционной спектроскопии источников лишь газовыми лазерами (гелий-неоновый, аргоновый). Во-вторых, поскольку интенсивность рассеянного света прямо пропорциональна интенсивности зондирующего луча, мы, естественно, заинтересованы в

увеличении интенсивности лазера. Однако в отличие от многих других областей оптики в данной ситуации существует ряд нюансов. Не вдаваясь в подробности описания принципа действия газовых лазеров и отсылая читателей к специальной литературе [31], напомним лишь, что спектр лазерного излучения определяется как свойствами активной среды, так и конструкцией резонатора, в котором происходит генерация излучения, и имеет богатую «тонкую» структуру, которую принято называть «модовым составом». Моды лазерного излучения подразделяются на продольные и поперечные, обозначаемые TEM_{mnq} . Числа m и n обозначают поперечные типы колебаний, а q — продольные.

Число генерируемых лазером продольных мод определяется шириной спектральной линии активной среды. Частотные расстояния между продольными модами $\omega_i = c/2l$, где l — длина резонатора; c — скорость света. Число поперечных мод зависит от настройки резонатора. Принята следующая терминология: многомодовый режим — когда лазерное излучение содержит как продольные, так и поперечные моды; одномодовый — различные продольные моды при фиксированных m и n ; одночастотный — одна мода с фиксированными m , n и q .

Вообще говоря, наиболее удобным было бы использование одночастотного лазера, но такие лазеры сложны в настройке и имеют малую интенсивность излучения. Увеличение же интенсивности излучения только за счет обогащения модового состава не приводит к выигрышу в чувствительности. Ввиду важности этого утверждения остановимся на нем подробнее. Если зондирующее излучение содержит несколько мод с очень различающимися частотами ω_i , то рассеянное излучение будет представлять собой совокупность лоренцевских линий, центрированных на ω_i . При гомодинном режиме регистрации центрирования в нуле часть спектра самобиений будет при этом, очевидно, пропорциональна числу мод; дробовой шум пропорционален полной интенсивности, т. е. тому же числу мод. Таким образом, отношение Δ определяется интенсивностью, приходящейся на одну моду. При гетеродинировании полезный низкочастотный сигнал возникает только от биения рассеянного излучения данной моды с той же модой опорного пучка, т. е. опять-таки пропорционален числу мод.

Это относится к одномодовому режиму генерации, когда расстояния между модами велики (как минимум 80 МГц, что соответствует $l = 2$ м). В многомодовом режиме ситуация усугубляется тем, что расстояние между поперечными модами сравнимо с типичным изменением частоты света, рассеянного раствором или суспензией биологических объектов. Это может привести к серьезным ошибкам при анализе результатов. Таким образом, в корреляционной спектроскопии можно использовать только одномодовые лазеры, а их сравнение следует проводить по интенсивности, приходящейся на одну моду.

Большое значение имеет и частота ω_0 , на которой генерирует лазер. Согласно выражению (1.55) интенсивность расстояния пропорциональна ω_0^4 . Поэтому, на первый взгляд, чем больше ω_0 , тем лучше. Это действительно так, но совсем по другим причинам. Отношение сигнала к дробовому шуму (1.33) при апертурах фотосбора больше или порядка

Ω_c должно быть согласно выражению (1.38) видоизменено следующим образом:

$$\Delta \sim \frac{\langle i \rangle \tau_c \Omega_c}{Q\Omega}. \quad (2.5)$$

В этом соотношении $\langle i \rangle \sim \omega_0^4$. Как следует из формулы (1.42) $\Omega_c \sim 1/\omega_0^2$, время корреляции $\tau_c = (Dq^2)^{-1} \sim \omega_0^{-2}$. Мы убеждаемся, что отношение спектральных интенсивностей сигнала и дробового шума от частоты зондирующего излучения не зависит. Почему же выгодней иметь более коротковолновой лазер? Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, чем больше диффузионное уширение, тем меньшее требуется разрешение $\Delta\omega$ для определения формы линии. Необходимое разрешение $\Delta\omega \sim Dq^2 \sim \omega_0^2$, и соответственно для достижения той же статистической точности требуется в ω_0^2 меньшее время. Кстати, если $\Delta \gg 1$, по этой же причине труднее измерять спектр при малых углах рассеяния, хотя с уменьшением q спектральная интенсивность сигнала возрастает. Во-вторых, если цель эксперимента — исследование внутренней или ориентационной динамики, то, как мы видим из выражения (1.53), флуктуации форм-фактора — порядка qR или даже $(qR)^2$, следовательно, их вклад растет с ростом ω_0^2 .

Наконец, следует обсудить вопрос о стабильности лазера. Очень часто именно она является решающим фактором подбора конкретного лазера, поскольку наблюдаемый спектр (корреляционная функция) представляет свертку спектров (произведение корреляционных функций) флуктуаций интенсивности лазера и интересующего нас рассеянного излучения.

Эффективным способом преодоления влияния нестабильностей лазера является введение еще одного измерительного канала, на фотоприемник которого попадала бы часть зондирующего излучения (мониторный канал). При этом учет амплитудной нестабильности идеально было бы вести с помощью анализа в так называемом режиме передаточной функции. Смысл этого режима заключается в том, что анализируется не сама выборка измеряемого сигнала, а результат ее деления на временную последовательность мониторингового канала.

Организация подобного режима измерения — достаточно сложная техническая задача, и поэтому, как правило, стараются избежать необходимости учета нестабильности за счет улучшения качества самих лазеров либо применения специальных систем стабилизации интенсивности путем ввода в пучок управляемых сигналом мониторингового канала амплитудных модуляторов. Завершая рассмотрение проблемы источника излучения, отметим, что из отечественных газовых лазеров наиболее приемлемым, по нашему опыту, является гелий-неоновый лазер ЛГ-38.

К устройствам формирования пучка — зеркалам, светоделительным пластинкам, диафрагмам, фокусирующей линзе (объективу) — особых требований, как правило, нет. Исключение составляют лишь случаи совмещения спектральных и индикатрисных измерений, а также измерений в очень малых углах. При этом оптические элементы должны

отвечать стандартам индикатрисных установок, анализу которых посвящена специальная литература.

Основное требование к кюветному узлу достаточно ясно — необходимо конструктивно обеспечить условия, при которых вклад различного рода паразитного рассеяния был бы минимальным. Дополнительными являются условия удобства заполнения и герметизации кюветы, ее термостатирования и возможности измерений в широком диапазоне углов. В литературе имеются описания конкретных конструкций [90], в то же время мы считаем возможным поделиться и собственным опытом. Толстостенная цилиндрическая кювета из кварца (внутренний диаметр 6 мм, наружный — 30, высота — 20 мм) достаточно удобна для большинства обычных исследований в области биофизики и физики полимеров. При работе в 90-градусной геометрии удобно использование прямоугольных кювет. Гораздо более сложны и в изготовлении, и в эксплуатации кюветы для доплеровского электрофореза. В гл. 6 этот вопрос будет обсуждаться подробнее.

Что касается выбора фотодетектора, то в актуальном для большинства биологических приложений корреляционной спектроскопии рабочем диапазоне частот может с успехом использоваться целый ряд как отечественных, так и зарубежных разработок. Можно рекомендовать ФЭУ-79 для спектрометров с аналоговым режимом анализа фототока и ФЭУ-130 для работы в режиме счета фотонов. В случае, когда возникает необходимость детектирования сигнала относительно большой яркости или с большой апертурой фотосбора, удобен ФЭУ-84.

Анализ требований к элементам оптического тракта корреляционных спектрометров хотелось бы завершить следующим комментарием: их уровень не превышает, а для большинства элементов и существенно ниже, чем аналогичные требования к элементам установок индикатрисного светорассеяния, давно и прочно вошедших в практику биологических исследований как в виде серийных отечественных и зарубежных приборов, так и в многочисленных вариантах отдельных экспериментальных разработок. Любая из них может быть использована как база оптической части корреляционного спектрометра после незначительной модификации схемы фотоприема.

§ 2.2. ЭФФЕКТЫ НЕГАУССОВОСТИ В КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Флуктуации интенсивности света, рассеянного одной частицей. Мы не случайно подробно обсуждали в гл. 1 роль статистики излучения при анализе спектров квазиупругого рассеянного света. Если эта статистика негауссова, то спектр флуктуаций интенсивности (СФИ) фототока не может быть выражен через спектр рассеянного света и, следовательно, несет дополнительную информацию об источниках излучения. Какая же это информация, в чем ее ценность? Как и при каких условиях ее можно получить? Пока нам ясно лишь, что при негауссовой статистике сведения, получаемые с помощью гомодинного и гетеродинного способов измерения, не совпадают, а дополняют друг друга, увеличивая тем самым наши познавательные возможности.

Преимущества, которые может дать регистрация СФИ (гомодинного спектра) по сравнению с регистрацией спектра излучения (гетеродинного) в случае негауссовой статистики излучения, проще всего проиллюстрировать на предельном случае негауссовости, когда регистрируется излучение одного источника. В § 1.3 мы видели, что СФИ определяется лишь флуктуациями амплитуды поля излучения, но не флуктуациями фазы. Гетеродинный же спектр, связанный с корреляционной функцией $g^{(1)}(\tau)$, определяется флуктуациями как амплитуды, так и фазы излучения. Таким образом, при регистрации излучения отдельного источника имеется возможность разделить эффекты, связанные с флуктуациями фазы и интенсивности. В частности, $g^{(2)}(\tau)$ не содержит диффузионного уширения (см. 1.59) и определяется только флуктуациями форм-фактора, никак не замаскированными трансляционной диффузией. Эффекты, связанные с внутренними динамическими процессами, предстают в «чистом» виде (точнее, внутренние движения в этом случае маскируются лишь модуляцией форм-фактора за счет вращательной диффузии). Таким образом, наблюдение эффектов негауссовости позволяет изучать внутренние процессы в исследуемом объекте и измерять коэффициенты вращательной диффузии, что также представляет определенный интерес.

Отсутствие диффузионного уширения в СФИ света, рассеянного на отдельной частице, легко понять, если заметить, что в гетеродинном спектре это уширение является следствием доплеровского смещения частоты света, рассеянного на диффузионно движущейся частице. Когда рассеяние происходит на отдельной частице, сдвиг частоты, вызванный ее поступательным движением, никак не влияет на СФИ ее излучения.

Если рассеяние происходит на нескольких частицах, в гомодинном спектре появляется вклад биений между гармониками излучения, исходящего от разных частиц. Так как спектры света, рассеянного на них, сдвинуты друг относительно друга за счет относительного движения частиц, в СФИ появляется вклад их трансляционной диффузии. При достаточно большом числе рассеивающих объектов этот вклад становится преобладающим, и СФИ приобретает дополнительное уширение, равное удвоенной диффузионной ширине. Действительно, при числе частиц $N \gg 1$ статистика излучения становится гауссовой.

Совершенно ясно, что ограниченность числа источников излучения является решающим фактором проявления последнего члена в правой части выражения (1.57), который мы будем называть негауссовым, или негауссовой составляющей СФИ, на фоне в N раз большего по интенсивности первого — гауссового члена. Так как с экспериментальной точки зрения желательно иметь как можно большую интенсивность излучения, нас будет интересовать вопрос о том, какое максимальное число источников излучения позволяет регистрировать эффекты негауссовости. Мы будем обсуждать эффекты негауссовости, связанные только с конечностью числа рассеивателей. Отклонение статистики от гауссовой может быть также следствием корреляции в относительном движении рассеивающих частиц, т. е. нарушения их статистической

независимости. Явления такого рода могут возникать, например, в турбулентном потоке [78, 189].

Условия наблюдения эффектов негауссовости. На первый взгляд, наблюдение эффектов негауссовости возможно лишь при $N \sim 1$. Однако это не так, в чем легко убедиться путем следующих качественных рассуждений. В области наблюдения мы имеем флуктуационную интерференционную картину от полей всех источников. Имеются два типа флуктуаций: первый связан с биениями волн от разных источников и определяет гауссову составляющую СФИ; второй, связанный с флуктуациями интенсивности излучения от каждого отдельного рассеивателя, определяет негауссову составляющую СФИ. Задача, таким образом, состоит в том, чтобы отделить один тип флуктуаций от другого. В тех случаях, когда их характерные времена резко различны, это не составляет труда. Если характерное время флуктуаций первого типа τ_c гораздо больше характерного времени флуктуаций второго типа τ_0 , то задача вообще тривиальна: выбрав длительность реализации (см. § 1.2) $T_0 \sim \tau_0 \ll \tau_c$, мы сможем исключить влияние на выходные характеристики гауссовой составляющей поля. При $\tau_c \ll \tau_0$ за время наблюдения происходит усреднение по флуктуации, связанным с биением, в результате чего гауссова составляющая света оказывается подавленной в τ_c/τ_0 раз по отношению к негауссовой. Все это наиболее понятно на спектральном языке. Гауссова и негауссова составляющие СФИ легко разделяются, если имеют существенно различные спектральные ширины.

Наиболее трудный случай для выделения эффектов негауссовости — промежуточный, когда $\tau_c \sim \tau_0$, который часто реализуется при рассеянии света на частицах в растворах. Правда, иногда можно искусственно изменить τ_c , делая его резко отличным от времени амплитудных флуктуаций. Один из таких вариантов обсуждается в [163]. Но и при $\tau_0 \sim \tau_c$ N может быть велико. Поскольку гауссова составляющая возникает в результате интерференции излучения различных источников, ее интенсивность существенно зависит от степени когерентности этого излучения; напротив, СФИ отдельных источников не связан с когерентностью излучения. Понятно, что уменьшение степени когерентности улучшает условия наблюдения эффектов негауссовости. В § 1.2 мы видели, что при $\Omega \gg \Omega_c$ и гауссовой статистике информативная составляющая спектра фототока пропорциональна первой степени Ω . Но интенсивность негауссовой составляющей $\sim \Omega^2$, поскольку флуктуации второго типа происходят синхронно на всей поверхности фотоприемника, в отличие от флуктуаций первого типа, коррелированных только в пределах одной площадки когерентности. Более того, можно измерять функцию взаимной корреляции фототока в двух фотоумножителях, разнесенных на угол, значительно больший угла когерентности. Тогда флуктуации, связанные с биениями волн от различных источников, совсем не дадут вклад в эту функцию.

Приведенные соображения показывают, что самые благоприятные условия для выделения негауссовой составляющей поля на фоне гауссовой возникают при наиболее низкой степени пространственно-временной когерентности поля. Однако при этом не следует забывать, что

негауссова компонента должна быть выделена не только на фоне гауссовой, но еще и на фоне дробовых шумов фотоприемника, которые при малых N являются доминирующими.

Есть еще одно обстоятельство, способствующее наблюдению эффектов негауссовости. Очевидно, что флуктуации интенсивности света, рассеянного отдельной частицей, пропорциональны полной интенсивности зондирующего излучения. Но, как мы видели, спектральная интенсивность гауссовой компоненты пропорциональна интенсивности, приходящейся на одну моду лазерного излучения. Поэтому чем больше мод (продольных) генерирует лазер, тем легче наблюдать негауссовую составляющую СФИ.

Нетрудно оценить все три компоненты СФИ [3]: отношение негауссовой составляющей к дробовой определяется величиной

$$\Delta_1 = \frac{\mu^2 \langle i \rangle \tau_0}{QN M_0}, \quad (2.6)$$

а отношение негауссовой составляющей к гауссовой — величиной

$$\Delta_2 = \frac{\mu^2 M_0 \Omega \tau_0}{N \Omega_c \tau_c}, \quad (2.7)$$

где M_0 — число продольных мод; $\mu = \Delta J_1 / J_1$; J_1 — средняя интенсивность излучения отдельного источника; ΔJ_1 — амплитуда флуктуаций этой интенсивности. Эти формулы показывают, что для наблюдения эффектов негауссовости не обязательно стремиться к малому числу участвующих в рассеянии частиц, хотя оно и не должно быть чересчур велико. Заметим, что сами по себе средние значения уровня дробовых и гауссовых шумов не являются помехой, так как всегда могут быть тем или иным способом вычтены из суммарного сигнала. Однако согласно выражению (1.32) статистическая точность измерения спектра пропорциональна его полной интенсивности, и для успешного наблюдения эффектов негауссовости параметры Δ_1 и Δ_2 не должны быть слишком малы.

Методические проблемы. Поскольку относительный вклад негауссовой составляющей пропорционален Ω , последнюю естественно было бы выбирать возможно большей, вплоть до 4π . Однако увеличение апертуры фотосбора сопровождается пропорциональным уменьшением углового разрешения. Флуктуации интенсивности, обусловленные ориентационным движением анизотропных рассеивателей и тем более флуктуациями форм-фактора, бывают разной симметрии: как изотропными, так и осциллирующими с изменением направления. Поэтому с точки зрения наибольшей информативности метода следует уменьшать апертуру фотосбора, но только до тех пор, пока сохраняется возможность выделения эффектов негауссовости.

Чрезвычайно важным фактором в негауссовой корреляционной спектроскопии является правильный выбор рассеивающего объема W . С одной стороны, при уменьшении рассеивающего объема за счет фокусировки зондирующего излучения мы, сохраняя полную интенсивность рассеяния, уменьшаем число рассеивающих частиц и, следовательно, увеличиваем относительный вклад негауссовой составляющей

СФИ пропорционально W^{-1} . Казалось бы, есть полный смысл максимально уменьшать W , стремясь в идеале к N порядка 1. На самом же деле этот выигрыш не так велик, поскольку при уменьшении рассеивающего объема увеличивается телесный угол когерентности, $\Omega_c \sim (k^2 \times Ld)^{-1}$, а число рассеивающих частиц $N \sim Ld^2$.

Согласно формуле (2.7) $\Delta_2 \sim d^{-1}$. Итак, увеличение Δ_2 за счет фокусировки обратно пропорционально только первой степени диаметра пучка, а уменьшение числа рассеивающих частиц за счет длины наблюдаемого объема вообще не дает никакого выигрыша. Что касается отношения негауссовой составляющей к дробовому шуму, то поскольку они пропорциональны N и не зависят от Ω_c , Δ_2 постоянна.

С другой стороны, при фокусировке уменьшается характерное время корреляции флуктуаций числа частиц в рассеивающем объеме: $\tau \sim D^{-1}d^2$, если $d \ll L$. Но движение частицы через иллюминированный объем приводит к флуктуациям интенсивности рассеянного ею света. Смысл такого эффекта негауссовости очень прост. Интенсивность рассеянного света пропорциональна числу N частиц в рассеивающем объеме и меняется при флуктуации этого числа. Поскольку среднеквадратичная флуктуация порядка $\sqrt{N}$, относительный вклад этого процесса в СФИ пропорционален $1/\sqrt{N}$, как и должно быть для негауссовой составляющей. Глубина модуляции интенсивности рассеяния при прохождении частицы через наблюдаемый объем 100 %-ная и существенно превышает глубину форм-факторных модуляций μ , а спектр флуктуаций числа частиц целиком определяется трансляционной диффузией. Мы вновь сталкиваемся с ситуацией, когда наблюдению флуктуаций форм-фактора мешает в μ^{-2} раз больший вклад трансляционного движения, точно так же, как и в гауссовой корреляционной спектроскопии. Разница заключается в том, что ширина этого вклада в гауссову компоненту спектра равна Dq^2 , а в негауссову — Dd^{-2} . Поэтому единственным фактором, определяющим перспективность применения негауссовой корреляционной спектроскопии для изучения индивидуальной динамики рассеивателей, является свобода в выборе параметра d , а точнее, возможность сделать $d \gg q^{-1}$, т. е. резко уменьшить чисто диффузионное время корреляции. Очевидно, нет смысла стремиться к предельной фокусировке, когда d составляет всего несколько длин волн.

Итак, не существует четких критериев выбора апертуры фотосбора и степени сфокусированности луча. С точки зрения удобства наблюдения флуктуаций числа частиц в рассеивающем объеме желательно увеличивать апертуру фотосбора и уменьшать диаметр пучка. Но, к сожалению, это приводит к потере ценной информации. Наоборот, чтобы реализовать нетривиальные информационные возможности негауссовой спектроскопии, надо уменьшать Ω и увеличивать d , но соответственно возрастают и трудности выделения эффектов негауссовости.

Вплоть до настоящего времени негауссова корреляционная спектроскопия не применялась для изучения свойств реальных систем. В ведущихся в настоящее время методических исследованиях в основном решается вопрос, для каких классов объектов все же существует возможность получения нестандартного ответа без возникновения непреодолимых методических трудностей.

Рассеяние некогерентного света. В литературе часто можно встретить утверждение, что для экспериментов, выполняемых по гомодинной схеме, использование монохроматического излучения не обязательно. При этом рассуждения проводятся следующим образом. Так как поле света, рассеянного n -й частицей, пропорционально полю падающего света $\epsilon_n \sim \xi_n E_0$ и рассеивающая способность никак не скоррелирована с падающим излучением, гомодинная корреляционная функция может быть записана в виде

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{1}{J^2} \sum_{n,m,k,l} \langle \xi_n(0) \xi_m^*(0) \xi_k(\tau) \xi_l^*(\tau) \rangle \cdot (|E_0(0)|^2 |E_0(\tau)|^2)^{-1}. \quad (2.8)$$

При рассеянии монохроматического излучения последний сомножитель, представляющий собой коррелятор интенсивности падающего излучения, есть не зависящая от τ константа J^2 , и мы измеряем непосредственно интересующий нас первый сомножитель в (2.8). Но и в случае некогерентного излучения фактически наблюдается та же величина. Действительно, если мы, например, пользуемся тепловым источником, т. е. источником с гауссовой статистикой, коррелятор интенсивности падающего излучения может быть расцеплен:

$$\langle |E_0(0)|^2 |E_0(\tau)|^2 \rangle = \langle J \rangle^2 + \langle |E_0(0) E_0^*(\tau)|^2 \rangle, \quad (2.9)$$

и если спектр излучения достаточно широк, последнее слагаемое затухает за время, малое по сравнению с интересующими нас характерными временами исследуемой системы. В СФИ это слагаемое проявляется в виде подставки с шириной, равной удвоенной ширине спектра падающего излучения, и, следовательно, с малой спектральной интенсивностью. Таким образом, коррелятор интенсивности в интересующем нас частотном диапазоне сводится к постоянной, из чего делается вывод о возможности получить обычный гомодинный спектр при рассеянии некогерентного излучения.

Приведенное рассуждение в общем случае неверно. Оно неявно подразумевает, что фаза падающего излучения имеет детерминированный характер во всем рассеивающем объеме. Но если рассеивающий объем велик по сравнению с объемом когерентности, поля в местах локализации разных частиц различны. Иными словами, E_0 зависит от положения частицы, и коррелятор интенсивности падающего излучения не может быть вынесен в виде общего множителя из-под суммы по всем частицам, как это было сделано в выражении (2.8). На самом деле в СФИ отсутствует вклад биений волн, рассеянных разными частицами, если расстояние между последними больше длины когерентности зондирующего излучения. Поэтому вклад в спектр биений дает только NN_c пар частиц, где N_c — число частиц в объеме когерентности. Вклад же флуктуаций интенсивности рассеяния на каждой частице по-прежнему пропорционален числу частиц N . Таким образом, при рассеянии некогерентного света все определяется величиной N_c . Если $N_c \gg 1$, действительно будет наблюдаться обычный гомодинный «гауссовский» спектр, правда, в N_c/N раз ослабленный по сравнению со спектром квазиупруго рассеянного монохроматического света той же интегральной интенсивности. Если же $N_c < 1$, будет наблюдаться

спектр флуктуаций интенсивности света, рассеянного отдельными частицами. Последнее утверждение станет совсем очевидно, если выразить N_c через среднее расстояние между рассеивателями l и длину когерентности $N_c \sim (l_c/l)^3$.

Термин «гауссовский» заключен здесь в кавычки, поскольку соответствующая компонента спектра имеет то же физическое происхождение и тот же физический смысл, что и при рассеянии монохроматического излучения. Но при любых $N > 1$ рассеянное немонахроматическое излучение заведомо негауссово. Действительно, так как статистика произведения двух гауссовых случайных величин негауссова, излучение, рассеянное на системе с гауссовыми статистическими свойствами, будет иметь гауссову статистику только при детерминированном, т. е. полностью когерентном, зондирующем излучении.

§ 2.3. МЕТОД ВЗАИМНЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ

Взаимная корреляция как способ наблюдения эффектов негауссовости. Суть метода взаимных корреляций (МВК) состоит в том, что анализируются корреляции фототоков i_1 и i_2 двух разных фотоприемников, а не автокорреляции фототока одного из них, как во всех рассмотренных выше случаях.

Гауссова составляющая СФИ является следствием интерференции полей от разных источников, существующей только в пределах угла когерентности, и если угол между направлениями из рассеивающего объема на оба фотоприемника больше, она должна исчезнуть. Поскольку $\theta_c \sim \frac{\lambda}{L}$, в типичных оптических экспериментах подавление гауссовой составляющей обеспечивается практически при любом взаимном положении фотоприемника. При регистрации двумя фотоприемниками исчезают дробовой шум и все другие статистически независимые шумы двух трактов регистрации [43].

Любопытно отметить тесную связь между МВК и известным эффектом Хенбери-Брауна — Твисса [140]. Смысл этого эффекта заключается в исчезновении корреляции в отсчетах двух приемников, регистрирующих излучение далекого источника (звезды) при разведении их на расстояние, большее длины когерентности l_c , или, пользуясь нашей терминологией, в исчезновении гауссовой составляющей СФИ. Поскольку $l_c = \theta_c s$, где s — расстояние до источника, а $\theta_c \sim 1/kL$, $l_c = 1/k\varphi$, где φ — угловой размер источника. Этот эффект привел к революции в астрономии, позволив определять угловые размеры удаленных звезд. Ведь могут быть измерены $l_c \sim 1000$ км, что по угловому разрешению эквивалентно построению телескопа с таким диаметром объектива. В МВК фотоумножители заведомо разведены на расстояние больше l_c , так что все корреляции фотоотсчетов определяются лишь флуктуациями яркости источника. Хотя в обоих этих случаях измеряемая величина — функция взаимной корреляции интенсивности света, рассеянного (исходящего) от одного источника, вплоть до недавнего времени эти вопросы обсуждались совершенно независимо [3].

Вид гауссовой составляющей СФИ реально неизвестен. И если времена корреляции фазовых и амплитудных флуктуаций регистрируемого поля близки, отделить ее вклад в автокорреляционную функцию невозможно. Поэтому сам факт отсутствия гауссовой составляющей в функции взаимной корреляции очень существен. Это и есть основное преимущество данного метода. Но статистическая ошибка измерения $G^{B3}(\tau)$ по-прежнему определяется всеми флуктуациями фототока и того же порядка, что и ошибка измерения автокорреляционной функции.

Таким образом, МВК — это, по существу, способ идеального вычитания гауссовой и дробовой составляющих из полного СФИ, что позволяет, в принципе, путем усреднения по многим независимым реализациям фототоков определить негауссову компоненту, сколь бы мала она ни была. Естественное развитие этой идеи состоит в использовании двух независимых лазеров, излучающих свет с разными длинами волн, и узкополосных светофильтров, расположенных так, чтобы каждый фотодетектор регистрировал рассеянный свет только одной длины волны. В этом случае флуктуации фототоков, связанные с нестабильностью лазеров, также окажутся независимыми, и их вклад в $G^{B3}(\tau)$ пропадет.

Угловая зависимость функции взаимной корреляции. В отличие от автокорреляционной методики в МВК регистрируется излучение, рассеянное под двумя разными углами, соответственно с двумя переданными волновыми векторами q_1 и q_2 . Из общих соображений ясно, что зависимость $G^{B3}(\tau)$ от q_1 и q_2 значительно более информативна, чем угловая зависимость автокорреляционной функции. Последняя даже в случае анизотропных рассеивателей вследствие изотропии всей рассеивающей системы в целом (т. е. вследствие произвольности ориентации рассеивателей) зависит только от абсолютной величины q . В МВК анизотропия отдельных рассеивателей проявляется явно, что находит свое отражение в таком, например, любопытном явлении, как антикорреляция.

Смысл антикорреляции заключается в том, что, в отличие от привычного вида — уменьшения $G(\tau)$ с ростом τ , $G^{B3}(\tau)$ возрастает. В чем физическая причина такого эффекта? Рассмотрим функцию взаимной корреляции интенсивности света, рассеянного сильно анизотропным объектом. Пусть угол между направлениями на фотоприемники велик. Тогда, если излучение попало в первый из них ($i_1(0) \neq 0$), оно в этот момент времени не попадает во второй ($i_2(0) = 0$) и, следовательно, $G^{B3}(0) = 0$. Ясно, что спустя время τ , необходимое для того, чтобы частица повернулась на угол, равный углу между направлениями фотоприемника, возникает отличная от нуля вероятность того, что $i_2(\tau) \neq 0$ и $G^{B3}(\tau) > 0$. Другими словами, $G^{B3}(\tau) > G^{B3}(0)$, т. е. возрастает. Эффекты такого рода возникают при рассеянии света на анизотропных частицах и реально наблюдались [39, 116].

Используя выражения для поля рассеянного света, приведенные в § 1.3, легко вычислить $G^{B3}(\tau)$ в случае, когда рассеивающий объем велик и флуктуации числа частиц в нем имеют очень большое время

корреляции. Тогда $G^{B3}(\tau)$ определяется только флуктуациями форм-фактора:

$$G^{B3}(\tau) = N J_0^2 B_0^2 (|\alpha(q_1, 0)|^2 |\alpha(q_2, \tau)|^2), \quad (2.10)$$

что при $q_1 = q_2$, естественно, соответствует выражению (1.59), т. е. негауссовой компоненте гомодинной корреляционной функции. Вследствие изотропности растворителя все типы флуктуаций форм-фактора можно классифицировать по их угловой симметрии, или, говоря математическим языком, по неприводимым представлениям группы вращения. При этом оказывается возможным предсказать зависимость вкладов разной симметрии от угла φ между векторами q_1 и q_2 [146]. Мы отложим подробное обсуждение этого вопроса до последней главы. Отметим только, что в отличие от негауссовой составляющей автокорреляционной функции, все вклады в которую обязательно положительны, вклады разной симметрии в функцию взаимной корреляции для оптически изотропных частиц, т. е. в отсутствие поляризационных эффектов, пропорциональны $\cos n\varphi$, где $n = 0, 2, 4, \dots$ нумерует типы симметрии. В частности, изотропные флуктуации форм-фактора ($n = 0$) дают всегда положительный вклад, а при $\varphi = 90^\circ$ (фотоприемники расположены навстречу друг другу) флуктуации с $n = 2, 6, 10, \dots$ дают максимальный отрицательный, т. е. антикорреляционный, вклад.

Оптические схемы. Обсуждение оптических схем в МВК удобнее вести, используя термины интенсивности регистрируемого света, не вспоминая о его волновой природе. Действительно, основная идея этого метода состоит в подавлении вклада интерференции волн, рассеянных разными частицами, о существовании которой надо помнить только при оценке статистической точности измерений. В зависимости от целей эксперимента могут использоваться два типа схем, отличающихся способом формирования рассеивающего объема. Первый тип (рис. 8, а) используется для изучения трансляционного движения объекта, для чего измеряется функция взаимной корреляции света, рассеянного в двух пространственно разделенных областях. Для удобства юстировки и определения параметров схемы эти области следует визуализировать, используя два пучка зондирующего излучения от одного или двух источников. Применение двух независимых источников пред-

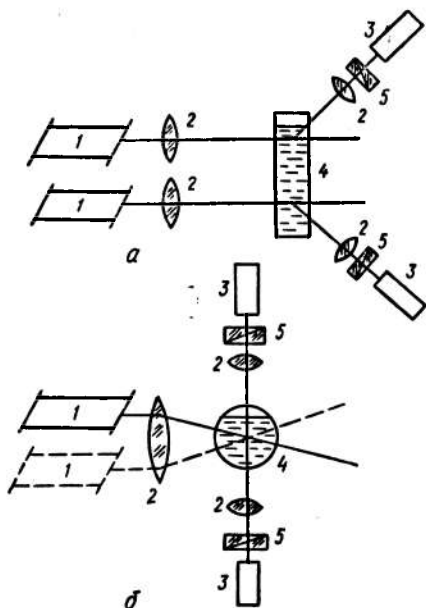


Рис. 8. Схемы экспериментов по взаимной корреляции:

а — пространственно разделенные рассеивающие объемы, б — совмещенные рассеивающие объемы; 1 — лазер, 2 — линза, 3 — ФЭУ, 4 — образец, 5 — поляризатор

почтительнее, так как это позволяет решить проблему нестабильности зондирующего излучения. Избежать влияния перекрестного рассеяния можно, используя источники с разной длиной волны и светофильтры или скрестив поляризации зондирующих пучков и снабдив фотоприемники поляризаторами. По существу, такая схема относится к типичным времяпролетным методикам. Она может быть эффективной альтернативой лазерным доплеровским анемометрам (ЛДА) (см. § 2.4), поскольку в этом случае точность определения скорости обусловлена только отношением расстояния l между иллюминированными областями к их протяженности d . Скорость легко может быть определена непосредственно по виду $G^{bs}(\tau)$, содержащей пик при $\tau = l/V$, ширина которого порядка d/V . Уширение $\Delta\tau$ за счет диффузионного движения рассеивателей обусловлено их броуновским перемещением за время τ и оценивается выражением $\Delta\tau \sim \sqrt{D\tau}/V$. Отсюда относительное разрешение $\Delta\tau/\tau \sim \sqrt{D/Vl}$, и за счет увеличения l оно может быть сделано как угодно малым.

Использование двух фотоприемников желательно, но необязательно. Флуктуации интенсивности рассеянного излучения, связанные с переходом рассеивающей частицы из одного иллюминированного объема в другой, имеют характерное время τ , значительно большее времени корреляции τ_c ; в соответствующем временном либо частотном диапазоне вклад гауссовой составляющей будет мал и при измерении автокорреляционной функции. Поэтому даже при регистрации одним фотоумножителем света, рассеянного в разных областях, фактически можно измерять функцию взаимной корреляции. Такая схема для определения коэффициента диффузии использована в работе [253]. В отличие от ЛДА применение МВК для измерения скорости движения рассеивающих частиц не сопряжено со сложностями, типичными для гетеродинамирования. Но необходимо помнить, что речь идет об эффекте, пропорциональном только первой степени N , и его статистическая точность при больших N , характерных для экспериментов с малыми объектами, может заметно уступать точности ЛДА.

Второй тип схем (рис. 8, б), используемых в МВК, применяется для изучения внутренней и ориентационной динамики рассеивающих объектов, т. е. для измерения коррелятора (2.10). В этом случае регистрируется излучение, рассеянное в одной области, хотя по-прежнему возможно и полезно использование двух сведенных в одно место пучков от независимых источников, скрещенных по поляризации или разной длины волны. Если фотоприемники будут регистрировать рассеянное излучение только «своих» источников, нестабильность последних не скажется на $G^{bs}(\tau)$.

На первый взгляд, складывается ощущение сравнительной простоты данной методики хотя бы потому, что отсутствуют жесткие требования к системе фотосбора. Наоборот, чем больше апертура этой системы, тем лучше отношение сигнал — шум. Правда, если стоит задача измерения угловой зависимости $G^{bs}(\tau)$, апертура не должна быть слишком большой. Но не это обстоятельство является главной причиной того, что использование МВК для изучения внутренней динамики до

сих пор ограничивается демонстрационными экспериментами. Еще в большей степени, чем в автокорреляционной негауссовой спектроскопии, здесь возникают трудности, связанные с трансляционным движением частиц через рассеивающий объем.

Рассеивающий объем. Понятие *рассеивающий объем* при обсуждении эффектов, связанных с флуктуациями интенсивности рассеянного света, нуждается в уточнении. В конечном счете нас интересует, как зависит фототок i на выходе фотоприемника от положения рассеивателя r . Пусть эта зависимость описывается функцией $W(r)$. Тогда с учетом трансляционного движения рассеивателей вместо выражения (2.10) получим

$$G^{ss}(\tau) \sim \langle W_1(r(0)) W_2(r(\tau)) \rangle \langle |\alpha(q_1, 0)|^2 |\alpha(q_2, \tau)|^2 \rangle. \quad (2.11)$$

В этой формуле мы посчитали трансляционное движение рассеивателей независимым от флуктуаций форм-фактора. На самом деле это неверно, но для частиц, которые в гидродинамическом отношении близки к шару, оправдано. Первый сомножитель в выражении (2.11), который мы обозначим $G_{\text{тр}}^{ss}(\tau)$, можно аналогично выкладкам (1.45) — (1.48) выразить через фурье-образ рассеивающего объема $W(x)$:

$$G_{\text{тр}}^{ss}(\tau) = \int \bar{W}_1(x) \bar{W}_2^*(x) e^{-Dx^2|\tau| - i\kappa V\tau} d^3x. \quad (2.12)$$

Прежде чем перейти к анализу этой формулы, уместно выяснить факторы, определяющие $W(r)$. Их три: неоднородность зондирующего пучка, зависимость эффективности фотосбора от положения рассеивателя и неоднородность чувствительности активной поверхности фотоприемника.

Неоднородность зондирующего пучка — наиболее просто учитываемый фактор. Как уже говорилось выше, в корреляционной спектроскопии необходимо использовать лазер, работающий в одномодовом режиме. При этом, как правило, генерируется мода TEM_{00q} , имеющая гауссово распределение интенсивности по сечению пучка. Поперечные моды имеют немонотонный профиль интенсивности, и их появление легко обнаружить визуально.

Второй фактор связан с тем, что на фотоприемник попадает излучение, распространяющееся в пределах определенного телесного угла, который меняется в зависимости от положения рассеивателя. Эти изменения могут быть либо резкими (рис. 9, а), либо плавными (рис. 9, б) — в зависимости от применяемой системы фотосбора, но в любом случае с трудом поддаются количественному расчету ввиду сильной зависимости от юстировки.

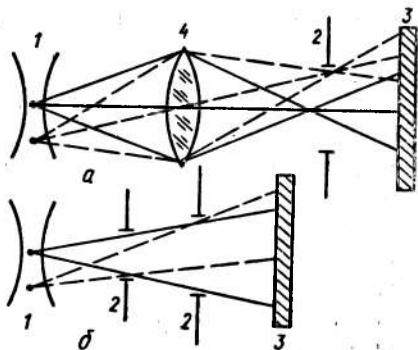


Рис. 9. Рассеивающий объем при различных способах фотосбора:

а — с переносом изображения, б — без переноса изображения; 1 — рассеивающий объем, 2 — диафрагма, 3 — поверхность фотоприемника

Пространственная неоднородность чувствительности фотоприемника вообще не поддается количественному учету, но, к счастью, невелика. Тем не менее лучше не применять систем фотосбора, в которых изображение рассеивающего объема оказывается непосредственно в плоскости поверхности фотоприемника, так что движению частицы соответствует перемещение точки, на которую попадает рассеянный ею свет. Тем более что, как мы увидим в § 2.4, если рассеянный свет, идущий в разных направлениях, попадает в одну точку фотоприемника, может возникнуть имитация диффузионного уширения.

Выше мы рассмотрели два типа применяемых в МВК оптических схем, отличающихся тем, что в одном случае рассеивающие объемы, из которых свет попадает в соответствующие приемники, либо не пересекаются, либо совпадают. Но если первую схему нетрудно приблизить к идеалу, то добиться совпадения рассеивающих областей во второй схеме не так просто. Рассмотрим роль формы рассеивающего объема в каждой из схем более подробно.

Схемы первого типа предназначены для измерения скорости частиц, и мы для простоты допустим, что $D = 0$, т. е. пренебрежем диффузионным движением частиц. Будем считать, что рассеивающие объемы идентичны, но сдвинуты друг относительно друга на вектор l . Тогда

$$\bar{W}_1(x) = e^{-ixl} \bar{W}_2(x) \equiv \bar{W}(x), \quad (2.13)$$

$$G_{\text{тр}}^{\text{вв}}(\tau) = \int |\bar{W}(x)|^2 e^{-ix(V\tau - l)} d^3x. \quad (2.14)$$

Таким образом, при $V \parallel l$ $G_{\text{тр}}^{\text{вв}}(\tau)$ имеет максимум (пик) на времени корреляции $\tau = l/V$, форма которого (в приближении $D = 0$) не зависит от l .

В схемах второго типа, предназначенных для изучения флуктуаций форм-фактора, флуктуации числа рассеивателей являются серьезной помехой. Учесть влияние $G_{\text{тр}}^{\text{вв}}(\tau)$ количественно невозможно. Более того, если рассеивающие объемы разведены достаточно сильно, возможен рост $G_{\text{тр}}^{\text{вв}}(\tau)$ при малых τ , который легко может быть спутан с описанным выше антикорреляционным вкладом анизотропных флуктуаций форм-фактора. Анализ выражения (2.12) при $V = 0$ показывает, что рост $G_{\text{тр}}^{\text{вв}}(\tau)$ возможен, только когда рассеивающие объемы перекрываются меньше, чем наполовину. Но независимо от того, приводит диффузионное движение частиц к антикорреляционному эффекту или нет, проблема рассеивающего объема является основной при использовании МВК в качестве инструмента изучения внутренней динамики рассеивателей. Точно так же, как и в автокорреляционной не-гауссовой спектроскопии, рассеивающий объем должен быть достаточно большим, чтобы характерное время нахождения в нем рассеивателя было велико по сравнению с временами корреляции флуктуаций форм-фактора. Для этого надо увеличивать рассеивающий объем, а значит, уменьшать степень сфокусированности зондирующего излучения, что в свою очередь ухудшает точность измерений. Универсального решения этой дилеммы, по-видимому, не существует.

§ 2.4. АНЕМОМЕТРИЯ И ДРУГИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ МЕТОДИКИ

Допплеровская анемометрия. В отличие от всех остальных методик, изложенных в данной главе, доплеровская анемометрия первоначально не применялась в биологии, а развивалась в связи с задачами других наук — аэродинамики, гидродинамики, астрономии. Именно эти задачи стимулировали разработку подходов, часть которых стала использоваться в корреляционной спектроскопии биологических систем. Методическим вопросам лазерной анемометрии посвящены специальные монографии [18]; основанием же специального рассмотрения этой методики в данной книге является то, что биологический (биофизический) аспект ее в этих монографиях игнорируется, несмотря на растущий в последние годы интерес к данной сфере исследований.

Изменение частоты рассеянного или излученного движущимся объектом света в системе координат наблюдателя называется эффектом Доплера. По этой причине традиционно относят к доплеровской спектроскопии изучение спектральными методами скоростей перемещения астрономических объектов, потоков в жидких (гидродинамика) и газообразных (аэродинамика) средах и, наконец, направленных движений микрочастиц под влиянием различного рода внешних и внутренних факторов. Поскольку речь почти всегда идет об измерении скорости, эта техника получила название лазерной доплеровской анемометрии (ЛДА). Напомним (формула (1.49)), что в гетеродинном спектре рассеянного на движущихся со скоростью V частицах появляется смещение частоты на величину

$$\nu_D = \frac{qV}{2\pi} = \frac{2n}{\lambda} V \sin \theta/2 \cos \varphi, \quad (2.15)$$

где φ — угол между векторами q и V ; значение скорости V определяют через известные параметры схемы измерения: угол рассеяния, длину волны света, показатель преломления среды. Из формулы (2.15) видно, что максимальный доплеровский сдвиг наблюдается при угле рассеяния $\sim 180^\circ$ и скорости, направленной точно по вектору рассеянной волны. На практике приходится иметь дело с измерением как очень малых скоростей (порядка 1 мкм/с), так и очень больших (~ 10 км/с), что соответствует доплеровским сдвигам от 0,3 Гц до 30 ГГц при $\lambda = 0,63$ мкм и $\theta = 180^\circ$. Естественно, возникает многообразие методов измерения этих сдвигов, разделяющихся на два больших класса: интерферометрия и рассматриваемая в этой книге корреляционная спектроскопия. Очевидно, что при скоростях меньше 1 м/с ($\nu_D \leq \leq 3$ МГц), характерных для экспериментов с биологическими объектами, применим только второй способ анализа спектра.

Корреляционные схемы ЛДА можно разделить на два типа: гетеродинные и дифференциальные.

Гетеродинная схема. Это стандартная схема оптического гетеродинирования, организованная таким образом, чтобы переданный волновой вектор q был параллелен скорости частиц V . В схеме, приведенной на рис. 10, а, опорный пучок не проходит через исследуемую

среду. К недостаткам таких схем следует отнести большое число оптических элементов, что усложняет юстировку системы. В схемах, организованных по принципу, показанному на рис. 10, б и в, опорный пучок формируется из падающего, проходя через рассеивающую среду. Выделенный рассеянный и опорный пучки пространственно совмещаются и направляются на фотоприемник. Особенностью этих схем является возможное влияние рассеивающей среды на структуру опорного пучка.

Схема на рис. 10, в отличается от приведенной на рис. 10, б инверсией направлений световых пучков, при которой источник и приемник меняются местами. Она несколько менее удобна, чем схема типа 10, б, где имеется возможность визуального контроля за локализацией рассеивающего объема.

Дифференциальная схема (рис. 10, г). В исследуемую среду направляются два лазерных пучка одинаковой интенсивности. Рассеянный свет собирается объективом и посылается на фотоприемник. Работу дифференциальной схемы можно пояснить с помощью простых качественных рассуждений. На пересечении двух когерентных оптических пучков образуется интерференционная картина с периодическим пространственным распределением яркости; поэтому излучение, рассеянное движущейся частицей, модулировано по интенсивности с частотой, равной обратному времени пересечения частицей одной интерференционной полосы, ширину которой трудно подсчитать. Достоинством таких схем является регистрация сигнала в режиме анализа флуктуаций

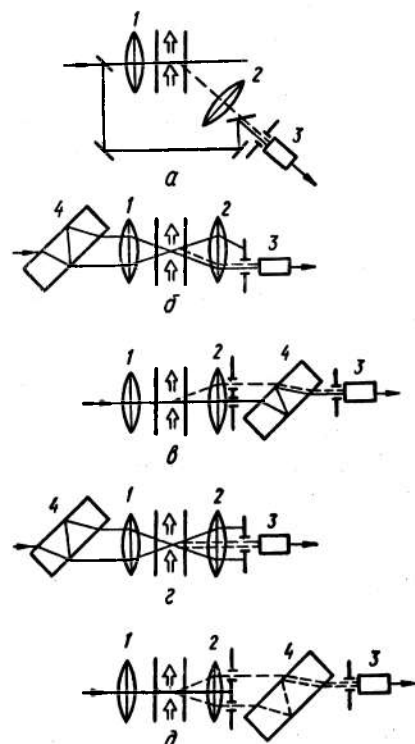


Рис. 10. Различные принципиальные схемы (а — д) ЛДА (см. текст) (по [18]): 1 — линза, 2 — объектив, 3 — фотоприемник, 4 — плоско-параллельная пластина

интенсивности рассеянного света (т. е. избегаются трудности гетеродинамирования). Однако рассмотренная упрощенная картина работы дифференциальной схемы ЛДА [18], основанная на интерференционной модели, как бы «обходит» гетеродинный характер приема излучения и игнорирует интерференцию волн, рассеянных на разных частицах. Мы лишены возможности объяснить здесь характер возникающих недоразумений, поскольку для этого необходимо обсудить проблемы статистики излучения, что будет сделано в следующем параграфе. Там мы вернемся к этому вопросу, поскольку использование качественных рассуждений может привести к ошибкам при оценке экспериментальных фактов, полученных в дифференциальных схемах ЛДА.

Если в дифференциальной схеме поменять местами источник света и приемник (рис. 10, д), получится инверсно-дифференциальная схема. Она полностью идентична дифференциальной, но несколько менее удобна, так как рассеивающий объем визуально не наблюдается.

В биологии ЛДА применяется в основном как способ определения электрофоретической подвижности. Наибольшее распространение получили схемы, изображенные на рис. 10, а и 10, б, однако в коммерческих приборах, выпускаемых за рубежом, используется и дифференциальная схема.

Рассмотрим некоторые практические факторы, обуславливающие особенности электрофоретической ЛДА. Поскольку доплеровское смещение растет пропорционально q , а диффузионное уширение $\sim q^2$, для оптимального определения скоростей рассеивающих частиц лучше всего, казалось бы, измерять спектр в минимальных углах. Однако это справедливо лишь в отсутствие приборного уширения γ . Причины этого уширения мы подробно обсудим в гл. 6, а здесь достаточно отметить, что существующие методы не позволяют сделать $\gamma < 1$ Гц [243]. Поскольку ширина отщепленной линии $\Delta\nu_D$ не может быть меньше γ , уменьшение угла наблюдения увеличивает $\nu_D/\Delta\nu_D$ только до тех пор, пока $Dq^2 > \gamma$, откуда оптимальный угол определяется из соотношения $q \sim \sqrt{\gamma/D}$. Принимая $\gamma = 1$ Гц, мы видим, что для частиц размером ~ 10 мкм при $\lambda = 632,8$ нм оптимальный угол составляет 40° и далее, по мере уменьшения частиц уменьшается пропорционально корню квадратному из их размера. На практике $\nu_D/\Delta\nu_D$, по данным [243], для крупных частиц может достигать величины ~ 15 . Таким образом, можно сделать практически важный вывод: в наиболее интересном для биологии диапазоне размеров углы рассеяния должны быть менее 40° , что является исходным моментом при конструировании реальных экспериментальных установок. Переход к малым углам, т. е. к малым доплеровским сдвигам, сопряжен с необходимостью увеличения спектрального разрешения, что при заданном полном времени измерения приводит к снижению статистической точности. Однако не имеет смысла делать ширину канала спектроанализатора $\Delta\omega$ существенно меньше приборного уширения: в оптимальных условиях $\Delta\omega \approx Dq^2$, т. е. намного больше, чем $\Delta\omega$, требуемое для анализа ширины самой диффузионной линии при тех же q . Поэтому скорость направленного движения объектов может быть определена значительно быстрее, чем их коэффициент диффузии.

Малоугловые анеометрические измерения позволяют, например, различить электрофоретическую подвижность мономера и димера белка [250], но, вообще, макромолекулярные исследования требуют дальнейшего повышения разрешения. Принципиальная возможность этого имеется и заключается в создании времяпролетных оптических анеометров, в которых измеряется не спектр рассеянного света, а функция взаимной корреляции интенсивности излучения, рассеянного в пространственно разделенных областях образца [256]. Хотя этот метод предназначен для измерения скорости направленного движения частиц, его вряд ли стоит относить к ЛДА: эффект Доплера тут совершенно ни при чем.

Эффекты негауссовости в дифференциальных схемах. Название этого подпараграфа точнее было бы начать словами «эффекты гауссовости...», поскольку стандартные представления о принципах работы дифференциальных схем относятся как раз к негауссовой компоненте СФИ рассеянного света и полностью игнорируют присутствие гауссовой составляющей. Если в рассеивающем объеме находится одновременно много частиц и основной вклад в СФИ дают биения волн, рассеянных разными частицами (т. е. гауссова составляющая), интерпретация этого явления на основе представления о частице, движущейся через последовательность интерференционных полос, оказывается неверной. Не пригодно это представление и для описания инверсно-дифференциальной схемы, поскольку никаких интерференционных полос в этом случае вообще нет, а весь эффект связан с тем, что волны, рассеянные одной частицей в разных направлениях и сведенные линзой в фотоприемник, приходят туда либо в фазе, либо в противофазе в зависимости от положения рассеивателя. Но если нужно учитывать интерференцию волн, рассеянных разными частицами, рассуждение снова неприемлемо.

На самом деле в рамках используемого нами подхода описание работы как дифференциальной, так и инверсно-дифференциальной схем одинаково и очень просто. В обоих случаях поле на фотоприемнике представляет собой сумму двух волн равной интенсивности, рассеянных с разными переданными волновыми векторами q_1 и q_2 . Отметим, что разность $q_1 - q_2$ определяется только углом между зондирующими пучками в дифференциальной схеме (причем период интерференционной картины равен $2\pi/|q_1 - q_2|$) и углом между регистрируемыми лучами в инверсно-дифференциальной. Согласно выражению (1.43) поле, рассеянное одной частицей, с точностью до общего фазового множителя можно записать в виде

$$e(t) \sim e^{-i q_1 r(t)} + e^{-i q_2 r(t)}. \quad (2.16)$$

Его парная корреляционная функция после усреднения по рассеивающему объему имеет вид

$$g^{(1)}(\tau) \sim e^{-Dq_1^2|\tau| - i q_1 V \tau} + e^{-Dq_2^2|\tau| - i q_2 V \tau}, \quad (2.17)$$

а корреляционная функция флуктуаций интенсивности

$$g^{(2)}(\tau) \sim e^{-D(q_1 - q_2)^2|\tau| - i(q_1 - q_2)V\tau}. \quad (2.18)$$

Пользуясь формулой (1.57) и учитывая, что гауссова составляющая $\sim \Omega\Omega_c$, а негауссова $\sim \Omega^2$, для наблюдаемого спектра $I(\omega)$ с точностью до коэффициента получаем:

$$I(\omega) \sim \frac{N(N-1)\Omega_c}{\Omega} \left[\frac{2Dq_1^2}{\omega^2 + (2Dq_1^2)^2} + \frac{2Dq_2^2}{\omega^2 + (2Dq_2^2)^2} + \frac{Dq_1^2 + Dq_2^2}{(\omega - q_1V + q_2V)^2 + (Dq_1^2 + Dq_2^2)^2} \right] + N \frac{D(q_1 - q_2)^2}{(\omega - q_1V + q_2V)^2 + D(q_1 - q_2)^2}. \quad (2.19)$$

Итак, только последний негауссов член целиком отвечает «интерференционной» интерпретации дифференциальной анемометрии.

На самом деле, если $N\Omega_c/\Omega \gg 1$, что часто бывает при изучении мелких частиц, спектр, во-первых, содержит два центрированных в нуле лоренциана, а во-вторых, хотя в спектре и присутствует смещенная на $(q_1 - q_2)V$ линия, ее ширина равна не $D(q_1 - q_2)^2$, а $D(q_1^2 + q_2^2)$, как это и должно быть для двух независимо диффундирующих частиц.

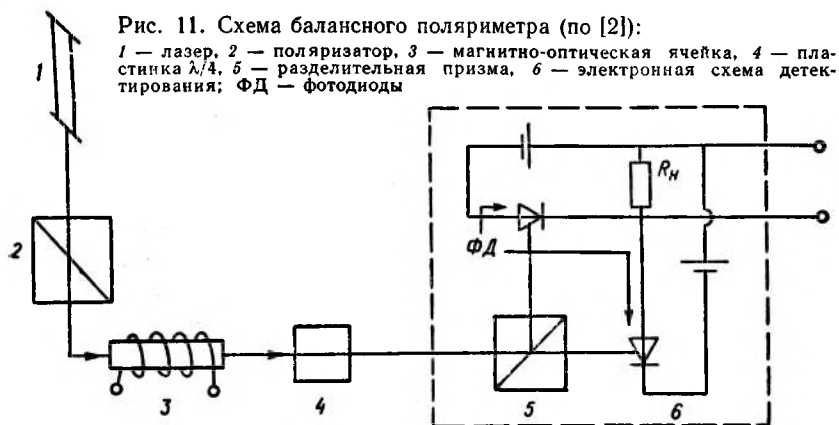
Приведенные результаты поучительны еще и в том отношении, что демонстрируют возможность появления «диффузионного» уширения негауссовой компоненты за счет конечности апертуры фотосбора. Это уширение порядка $Dq^2\Omega$ (при $\Omega \ll 1$). Правда, чтобы избавиться от него, специальных мер принимать не нужно. Если, как обычно и делается, система фотосбора переносит изображение рассеивающего объема не непосредственно на фотокатод, а на диафрагму на некотором расстоянии от него, излучение, рассеянное под разными углами, попадает в различные точки фотокатода и не будет интерферировать. Наоборот, в инверсно-дифференциальной схеме необходимо, чтобы изображение освещенной зондирующим пучком области попадало на фотокатод.

Анализ поляризации в корреляционной спектроскопии. Поскольку трансляционная диффузия оптически анизотропных частиц не меняет поляризацию рассеянного излучения, направляется вопрос об изучении анизотропной компоненты рассеяния. Какие же процессы происходят с изменением поляризации? Это прежде всего ориентационная и внутренняя динамика оптически анизотропных частиц, что обуславливает актуальность разработки соответствующей корреляционной методики. Однако относительная малость деполяризационной компоненты рассеянной световой волны для большинства объектов биологии резко сужает возможности этой методики. Особый интерес к ней появился в середине 70-х годов, но в последнее время спектроскопия флуктуаций поляризации сравнительно редко становится темой оригинальных работ [113, 167, 186, 215].

Стандартный корреляционный спектрометр с помощью поляризатора, размещенного на пути рассеянного пучка, легко модифицировался в деполяризационный коррелометр, позволяющий существенно продвинуться в область очень малых углов рассеяния, обычно представляющих наибольший интерес, поскольку при $q \rightarrow 0$ трансляционная диффузия не влияет на спектр рассеянного света. Однако при проведении самих экспериментов появляется ряд сложностей, приводящих к неоднозначности в интерпретации полученных результатов, о чем свидетельствует возникающая в литературе дискуссия [211, 214, 247]. Основная экспериментальная трудность связана со следующими обстоятельствами. Стандартная схема измерения базируется на принципе скрещивания поляризации зондирующего света с анализирующим поляризатором; вклад деполяризации оценивается по появлению тока в ФЭУ (либо в фотодиоде) при наличии исследуемого образца. Флуктуации этого тока и определяют искомый спектр. В таком спектрометре предъявляются высокие требования к качеству поляризующих и анализирующих устройств, так как попадание на фотокатод даже очень малой некомпенсированной части зондирующего света приводит к неконтролируемому «паразитному» гетеродинированию и соответственно к искажению всей спектральной информации (§ 2.1) (чего не избежать

в очень малых углах и в прямом пучке). Такого же рода искажения связаны с качеством изучаемых образцов; даже малая примесь пыли приводит в этом случае к паразитному гетеродинированию, что, как показал Вада [247], явилось источником ошибок в ряде экспериментов [211, 214]. Чтобы избежать этого, необходимо осуществить гетеродинирование деполаризованной компоненты рассеянного вперед света. Таковую возможность представляет балансный поляриметр [2].

Главным препятствием в реализации предельной чувствительности к флуктуациям поляризации при использовании лазера являются флуктуации его интенсивности, на порядки превышающие дробовой шум и сосредоточенные в спектральном диапазоне от 0 до 10^6 Гц. Наиболее простым и эффективным путем подавления флуктуаций интенсивности



источника является использование балансных схем регистрации. Сочетание высокой спектральной интенсивности и эффективного подавления шумов в регистрационном тракте обуславливает высокие метрологические характеристики предложенного в [2] поляриметра. Добавим также, что конструктивно он исключительно прост и не требует уникальных оптических элементов.

Схема поляриметра изображена на рис. 11. Линейно поляризованный световой пучок лазера делится призмой Волластона (5) и попадает на два фотодиода (ФД), фототоки которых вычитаются на нагрузке. Призма Волластона установлена приблизительно под углом 45° к направлению плоскости поляризации лазерного излучения (к вертикали). Поляризатор (2) (призма Глана) установлен в блок с тонкой подвижкой, и баланс схемы осуществляется его вращением до полной компенсации сигнала в нагрузке. При этом снижаются шумы на входе анализатора, и в условиях наилучшего баланса удается довести их уровень до величины, лишь в несколько раз превышающей рассчитанный дробовой шум в заданной спектральной полосе. Калибровка чувствительности осуществлялась по эффекту Фарадея (ячейка 3) в образце стекла при приложении переменного магнитного поля. Калибровочные эксперименты показали, что реально достижима чувствительность на уровне 10^{-9} (10^{-4} угловой с) [2]. К достоинствам описанного поляриметра

относится и то, что в качестве фотодетектора можно применять фотодиоды, а не ФЭУ, как в компенсационных схемах. У фотодетекторов квантовый выход на порядок выше, чем у ФЭУ, что сразу же (при прочих равных условиях) обеспечивает пропорциональный ему выигрыш в соотношении сигнал/дробовой шум. Результаты изучения раствора вируса табачной мозаики [46] иллюстрируют практические возможности балансной схемы. Время накопления в приведенной работе — порядка 5 мин. При этом точность не только оказалась достаточной для определения среднего коэффициента вращательной диффузии, но и позволила с помощью процедуры регуляризации (гл. 3) восстановить функцию распределения вирусов по размерам.

СФИ флуоресценции. Спектроскопия флуктуаций интенсивности флуоресценции, в которой следят не за рассеянным светом, а за свечением флуоресцентных меток, представляет пример, в котором трудность разделения гауссовой и негауссовой компонент спектра отсутствует. Есть два механизма низкочастотных флуктуаций интенсивности флуоресценции: дрейф частиц через объем возбуждения (или объем наблюдения) и ориентационное движение. Второй механизм существен при неизотропной диаграмме направленности излучения и (или) возбуждения флуоресцентного центра. Таким образом, измеряя СФИ флуоресценции, можно получить информацию как о диффузионном движении объектов, имеющих флуоресцентный центр, так и об их внутренней динамике. Описанные механизмы приводят к флуктуациям интенсивности с большими по сравнению с обратной шириной спектра флуоресценции характерными временами. При этом спектральная ширина гауссовой компоненты настолько велика, что ее спектральная плотность мала по сравнению с дробовым шумом. Ситуация оказывается такой же, как в СФИ спонтанного излучения возбуждаемых атомов [1].

Важное методическое преимущество регистрации СФИ флуоресценции по сравнению с СФИ рассеянного света заключается в возможности избирательного наблюдения объектов, «меченных» флуоресцирующей меткой. В частности, измерение спектра флуктуаций числа меток в объеме наблюдения позволяет определить коэффициент диффузии меченых объектов в сложных многокомпонентных системах. Эксперименты такого рода с успехом осуществлены рядом авторов [252, 253]. Яркость флуоресцентной метки может меняться и в результате химической реакции, что позволяет использовать измерение СФИ флуоресценции для изучения скоростей этих реакций в равновесных условиях [166].

В работе [105] сообщается о попытке изучения внутренней динамики макрочастиц по СФИ флуоресценции. Однако наряду с важным преимуществом — большой спектральной шириной, т. е. низкой когерентностью регистрируемого излучения, обсуждаемая методика имеет и существенный недостаток — малую интенсивность излучения отдельного источника. Легкость выделения эффектов негауссовости на фоне гауссовой составляющей влечет за собой сложность выделения этих эффектов на фоне дробового шума. На первый взгляд кажется, что точная регистрация флуктуаций числа макрочастиц в упомянутых выше экспериментах свидетельствует о достаточной интенсивности излучения

отдельного центра. Однако в этих опытах роль играла не яркость отдельной метки, а полная яркость макрочастицы, на которой в реальных условиях таких меток много. При изучении ориентационного движения усиление эффектов негауссовости отсутствует из-за случайной ориентации различных меток в исследуемом объекте. Трудность, связанная с недостаточной яркостью отдельного центра, не преодолена, и, насколько нам известно, получить информацию о внутренней динамике макрочастиц по СФИ флуоресценции до сих пор не удалось.

Мы не обсуждаем здесь эксперименты по затуханию поляризации флуоресценции после импульсного возбуждения, а также по деполяризации флуоресценции. В них регистрируется не флуктуирующий, а детерминированный сигнал, поэтому они не входят в круг обсуждаемых нами проблем. Отметим лишь, что в отличие от этих методов, позволяющих изучать релаксационные процессы с характерными временами, сравнимыми с временем жизни возбужденного состояния флуоресцентной метки, спектроскопия флуктуаций интенсивности флуоресценции не требует «долгоживущих» меток. Наоборот, за время корреляции исследуемого процесса метка должна успеть многократно возбудиться и высветиться.

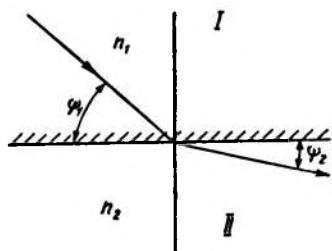


Рис. 12. Преломление света на границе двух сред:

среда I — оптически более плотная, чем среда II; n_1 , n_2 — показатели преломления сред

Корреляционная спектроскопия полного внутреннего отражения. По замыслу авторов эта книга должна охватывать наиболее широкий круг представляющих интерес для биологии задач, которые могут решаться методом корреляционной спектроскопии. Поэтому мы сочли необходимым описать еще один способ применения этого метода, хотя, насколько нам известно, он еще никем не использовался. Исследования в этом направлении носят пока исключительно методический характер.

Речь идет об изучении спектра квазиупругого рассеянного света при полном внутреннем отражении зондирующего пучка. Свет, распространяющийся в среде с показателем преломления n_1 , при падении на границу с менее оптически плотной средой $n_2 < n_1$ под углом, меньше определенного, отражается полностью и в среду с показателем n_2 не попадает (рис. 12). Критический угол Ψ_0 нетрудно найти, пользуясь известной формулой, описывающей преломление света

$$n_1 \cos \Psi_1 = n_2 \cos \Psi_2, \quad (2.20)$$

из условия $\Psi_2 = 0$. Отсюда угол полного внутреннего отражения $\Psi_0 = \arccos \frac{n_2}{n_1}$.

Из выражения (2.20) следует, что если источник излучения находится в оптически менее плотной среде II, свет от него распространяется в оптически более плотной среде I только под большими, чем Ψ_0 , углами к поверхности.

На самом деле оба эти утверждения нуждаются в уточнении. Плоская волна, падающая на поверхность раздела под углом меньше Ψ_0 ,

проникает в среду II, но не в виде распространяющейся волны, а в виде поля, экспоненциально затухающего по мере удаления от поверхности. И наоборот, часть излучения источника, расположенного в среде I, проникает в область тени в среде II, но эта часть экспоненциально падает по мере удаления источника от поверхности [57].

Чтобы убедиться в этом, нет необходимости полностью рассматривать поведение электромагнитного поля вблизи поверхности раздела. Достаточно учесть, что на этой поверхности должны выполняться граничные условия непрерывности магнитного поля и электрической индукции. Для выполнения этих условий по всей поверхности необходимо, чтобы проекции волновых векторов, падающей k_0 , отраженной k'_0 и прошедшей k_1 волн на поверхность раздела совпадали: $k_{0\parallel} = k'_{0\parallel} = k_{1\parallel} \equiv k$. Первое из этих равенств приводит к известному закону: «Угол падения равен углу отражения». Второе приводит к выражению (2.20), если $\Psi_1 > \Psi_0$. Если угол падения меньше угла полного внутреннего отражения, оказывается, что $k_1 = \frac{\omega_0 n_1}{c_0} \cdot \cos \Psi_1 > \frac{\omega_0}{c_0} n_2$, т. е. проекция k_1 на поверхность раздела должна быть больше, чем k_1 . Но ведь граничные условия должны быть выполнены. Решение этого парадокса элементарно. Вектор k_1 должен быть комплексным, так как волновое уравнение требует только, чтобы $\omega_0^2 = \frac{c_0^2}{n_2^2} k_1^2$. И если перпендикулярная к границе компонента вектора k_1 мнимая: $k_{1\perp} = i\kappa$, условие $k_{0\parallel} = k_{1\parallel}$ может быть выполнено. При этом $(\kappa^2 + k^2) = \frac{\omega_0^2 n_2^2}{c_0^2}$, откуда

$$\left. \begin{aligned} \kappa &= \frac{\omega_0}{c_0} n_1 \sqrt{\cos^2 \Psi_1 - \cos^2 \Psi_0}; \\ k &= \frac{\omega_0}{c_0} n_1 \cos \Psi_1. \end{aligned} \right\} \quad (2.21)$$

Соответственно, проникшее в среду II поле имеет вид

$$E_{II} \sim e^{i\omega_0 t - i\kappa x - \kappa z}, \quad (2.22)$$

где в качестве κ надо брать положительное значение корня. Эти формулы уже правильно описывают поле в области II, независимо от угла падения исходного излучения. Мы видим, что излучение, падающее под углом, меньше угла полного внутреннего отражения, проникает в область II на глубину κ^{-1} порядка нескольких длин волн. Эта глубина растет по мере приближения Ψ к Ψ_0 и формально становится бесконечной при $\Psi = \Psi_0$, что соответствует появлению распространяющейся прошедшей волны. На самом деле пользоваться этими формулами при $\Psi \rightarrow \Psi_0$ нельзя, так как падающий пучок, строго говоря, не является плоской волной уже потому, что имеет конечное сечение и, значит, его формируют плоские волны со слегка отличающимися волновыми векторами.

Аналогично решается вопрос о выходе в среду I излучения источника, расположенного вблизи поверхности раздела в среде II. Если расстояние от источника до границы — порядка нескольких длин волн, его излучение нельзя аппроксимировать плоскими волнами, и поэтому формулы геометрической оптики теряют свою силу. Оказывается, что формулы (2.21), (2.22) правильно описывают и зависимость поля волны, вышедшей в оптически более плотную среду под углом Ψ_1 от координат x, z рассеивателя в менее плотной среде.

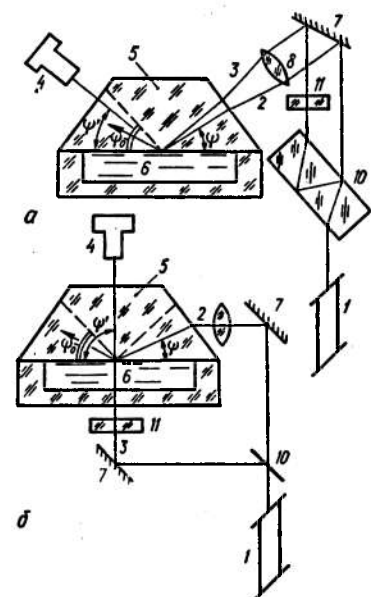


Рис. 13. Оптические схемы (а, б) корреляционной спектроскопии в условиях полного внутреннего отражения:

1 — лазер, 2 — зондирующий луч, 3 — гетеродинный луч, 4 — ФЭУ, 5 — призма, 6 — образец, 7 — зеркало, 8 — линза, 9 — полупрозрачное зеркало, 10 — делительная пластинка, 11 — ослабитель

но вследствие комплексности переданного волнового вектора вместо (1.45) имеем

$$G^{(1)}(\tau) = \langle e^{ik(x(0)-x(\tau)) - \kappa(z(0)+z(\tau))} \rangle. \quad (2.23)$$

Вклад в $G^{(1)}(\tau)$ дают только рассеиватели, расположенные не далее чем на расстоянии $1/\kappa$ от поверхности. Сразу возникают несколько возможных направлений использования такого метода.

1. Изучение динамики осажденных на прозрачную подложку или межфазную границу частиц. В первом случае исчезают все проблемы, связанные с диффузным движением рассеивателей, мешающим изучению их внутренней динамики. Во втором возможно исследование лагранжевой диффузии.

2. Изучение химических и биохимических реакций на поверхности. Осадив фермент или катализатор на поверхности, мы создадим направленные потоки реагентов к поверхности и продуктов от нее. Скорость этих потоков и другие кинетические характеристики реакции могут быть, в принципе, определены по корреляционной функции (2.23).

3. Диффузометрия в мутных средах. Такая задача существует в научных и прикладных исследованиях. Преимущество обсуждаемой методики состоит в том, что зондирующий луч в исследуемую среду не входит, и вклад многократного рассеяния резко подавляется.

Мы не будем продолжать этот список, хотя это возможно, и обсуждать, как проявляются в корреляционной функции перечисленные выше динамические процессы. Нам кажется это преждевременным, поскольку до сих пор не выяснены все методические трудности, возникающие в таких опытах. Ограничимся лишь описанием оптических схем, использованных в наших предварительных экспериментах и показавших возможность определения таким способом по крайней мере коэффициента диффузии. Использовалась кювета, одна из стенок которой представляла собой в сечении трехгранную призму, изготовленную из тяжелого флинта ($n_1 = 1,51$ для $\lambda 633$ нм), со срезанной вершиной и высококачественной поверхностью, обращенной к раствору грани (рис. 13).

Угол полного внутреннего отражения Ψ_0 на границе с водой ($n_2 = 1,33$) составлял 28° . Измерения проводились только в гетеродинной схеме, ввиду неизбежности паразитного гетеродинирования из-за рассеивания света на шероховатостях и микротрещинах поверхности. В схеме, изображенной на рис. 13, а, как падающий, так и гетеродинный лучи шли под углом немного меньше угла полного внутреннего отражения и близко друг к другу, что соответствовало чисто мнимому q_z и $|q_x| \ll |q_z|$. В схеме, приведенной на рис. 13, б, гетеродинный луч пропусклся через кювету, а зондирующий пучок падал под углом, близким к Ψ_0 , так что мнимая часть q_z была мала по сравнению с его действительной частью. В обоих случаях было получено хорошее совпадение формы спектральных кривых с рассчитанными и найденного из этих кривых значения коэффициента диффузии рассеивающих частиц (латекс $\varnothing 130$ нм) с определенным стандартным методом гетеродинирования.

ГЛАВА 3

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Редкий физический эксперимент дает информацию непосредственно об интересующих нас свойствах исследуемого объекта. Почти всегда требуется та или иная математическая обработка экспериментальных данных, использующая теоретическую связь между ожидаемым результатом эксперимента и свойствами объекта. Поскольку данные каждого опыта неизбежно содержат определенную (в идеале — чисто случайную) погрешность, речь всегда идет о статистической обработке этих данных. Часто такая обработка элементарна и настолько привычна, что о ней не упоминают. Но бывают случаи, когда без достаточно строгого математического анализа не обойтись, поскольку основанные на интуитивных соображениях приемы у разных исследователей сугубо индивидуальны. Изучение макромолекул и надмолекулярных структур в растворе методом квазиупругого светорассеяния относится именно к таким случаям, в связи с чем мы посвящаем вопросу обработки экспериментальных данных отдельную главу.

Необходимость использования сложных методов анализа спектра квазиупруго рассеянного света — обратная сторона большой информативности этого спектра, отражающего все динамические процессы, происходящие в рассеивающей системе. Поскольку нас, естественно, интересуют характеристики каждого такого процесса в отдельности, возникает задача разложения гладкой спектральной кривой на вклады различного происхождения. Такая проблема существует часто и в других методах, но важная особенность корреляционной спектроскопии квазиупруго рассеянного света состоит в том, что точность измерений очень высока и математическая связь между видом спектра и параметрами рассеивающей системы точно известна. Благодаря этому корреляционную спектроскопию можно отнести к классу методов, где попытка разложить экспериментальную кривую на отдельные однотипные компоненты имеет шансы на успех.

Основная причина затруднений при интерпретации спектра рассеянного света — это полидисперсность рассеивателей. Полидисперсность в той или иной степени всегда имеет место. Она может быть органически присуща исследуемой системе при изучении полимеров, агрегатов, частиц, везикул, клеток и т. п. или возникать в таких монодисперсных системах, как белки, вирусы, нативная ДНК, рибосомы и т. п. в результате невозможности идеальной подготовки образца.

В первом случае она может представлять самостоятельный интерес, во втором — является основной помехой. В обоих вариантах определять полидисперсность необходимо.

Спектр света, рассеянного монодисперсными точечными частицами, представляет собой кривую Лоренца, с полушириной, равной диффузионному уширению. Для полидисперсной системы спектр является суммой, а для непрерывных распределений — интегралом лоренцианов с разными полуширинами. Соответственно корреляционная функция представляет собой сумму или интеграл экспонент с разными временами корреляции. Определение распределения частиц по коэффициентам диффузии заключается, таким образом, в решении интегрального уравнения с лоренцевским или экспоненциальным ядром и называется обратной спектральной задачей. Точно такая же с математической точки зрения задача возникает и при выделении вкладов в спектр динамических процессов, не связанных с трансляционной диффузией частиц, например ориентационной динамики, или внутренней релаксации рассеивателей. Эти процессы также приводят к появлению в корреляционной функции экспоненциальных компонент с соответствующими временами релаксации, а в спектре — лоренцианов с соответствующими полуширинами. Главная трудность заключается в математической некорректности обратной спектральной задачи. Это означает, что хотя существует единственное решение, оно неустойчиво по отношению к сколь угодно малым вариациям спектра (или корреляционной функции). Физический смысл неустойчивости заключается в том, что вклад в спектр лоренциана с наперед заданной полушириной определить нельзя, поскольку этот вклад можно целиком отнести на счет лоренциана с другой, очень близкой полушириной без заметного изменения вида суммарного спектра. На первый взгляд, это не слишком большое осложнение, поскольку естественно интересоваться суммарным вкладом группы лоренцианов с близкими полуширинами, понимая, что разделить два слишком близких по полуширине лоренциана невозможно. Это совершенно правильное с физической точки зрения заключение ничуть не облегчает математическую ситуацию. Некорректность означает отсутствие алгоритма, сходящегося к точному решению; и мы не можем найти точное решение, а затем, помня о его неустойчивости, усреднить вклады лоренцианов с близкими полуширинами. Приходится использовать обходные пути, которые описаны в этой главе.

§ 3.1. АНАЛИЗ ДАННЫХ В КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Цель математической обработки экспериментальных данных. В простейшем случае раствора малых по сравнению с длиной волны света оптически изотропных тождественных частиц в отсутствие внешних полей спектр квазиупругого рассеянного света согласно формуле (1.49) имеет вид

$$I^{(1)}(\omega) = \frac{1}{\pi} \frac{A\Gamma}{\omega^2 + \Gamma^2}, \quad (3.1)$$

где диффузионное уширение

$$\Gamma = Dq^2. \quad (3.2)$$

Коэффициент диффузии D связан соотношением Стокса — Эйнштейна с гидродинамическим радиусом рассеивателя, и определив полуширину спектра, можно найти его размер. То же диффузионное уширение Γ может быть определено и по корреляционной функции

$$G^{(1)}(\tau) = Ae^{-\Gamma|\tau|}. \quad (3.3)$$

Мы будем пользоваться словом спектр рассеянного света потому, что оно короче выражения «корреляционная функция». В дальнейшем, если это не будет оговорено особо, можно заменять термины «спектр», «лоренциан», «полуширина» соответственно на «корреляционная функция», «экспонента», «обратное время релаксации».

Если заранее известно, что спектр имеет вид (3.1), определение Γ не составляет труда. Но, как правило, известно как раз обратное: спектр не имеет вида (3.1). Даже если исследуемые частицы по своей природе совершенно тождественны, в кювете обязательно будет примесь посторонних частиц: пыли, агрегатов и пр., которые рассеивают свет. В результате окажется, что спектр имеет вид

$$I^{(1)}(\omega) = \sum_i \frac{1}{\pi} \frac{A_i \Gamma_i}{\omega^2 + \Gamma_i^2}, \quad (3.4)$$

где A_i — интенсивность рассеяния на частицах i -го сорта; $\Gamma_i = D_i q^2$ (D_i — их коэффициент диффузии). Распространяя выражение (3.4) на случай непрерывных распределений частиц по размерам, можно записать:

$$I^{(1)}(\omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^\infty \frac{A(\Gamma) \Gamma d\Gamma}{\omega^2 + \Gamma^2}. \quad (3.5)$$

Здесь $A(\Gamma)$ — функция распределения интенсивности рассеяния частиц по характерным для них диффузионным уширениям. Зная зависимость интенсивности рассеяния и коэффициента диффузии от размера, $A(\Gamma)$ нетрудно пересчитать в распределении частиц по размерам.

Спектр вида (3.5) возникает не только при рассеянии на системе разных частиц. Если размеры частицы сравнимы с $1/q$ и в спектре имеется вклад, связанный с флуктуациями форм-фактора, этот вклад тоже имеет вид (3.5). Общность этого выражения связана с тем, что в термодинамическом равновесии малые флуктуации обычно затухают экспоненциально и поэтому корреляционная функция любого параметра представляет собой набор экспонент, а ее фурье-образ — сумму лоренцианов. Во всяком случае, для биологических суспензий и растворов макромолекул это утверждение справедливо. В общем случае параметр Γ соответствует обратному времени, а $A(\Gamma)$ — вкладу в рассеяние определенного типа релаксации.

Цель обработки экспериментальных данных заключается в нахождении функции $A(\Gamma)$ по измеренным значениям $\tilde{I}(\omega)$, т. е. в обращении интегрального уравнения (3.5). Задача восстановления $A(\Gamma)$ по $\tilde{I}(\omega)$ называется обратной спектральной задачей. Однако решать уравнение

(3.5) бессмысленно, потому что экспериментально измеренные значения $\tilde{I}(\omega)$ — это не просто правая часть (3.5), но еще и случайный статистический разброс. И как бы этот разброс ни был мал, забывать о нем нельзя. Действительно, по своему физическому смыслу $A(\Gamma) > 0$, и интеграл в (3.5) монотонно убывает с ростом ω , стремясь к нулю. Случайная погрешность измерений приводит к немонотонности экспериментально измеренного спектра, и $A(\Gamma)$, удовлетворяющая выражению (3.5) с $\tilde{I}(\omega)$ в левой части, обязательно знакопеременна. Следовательно, такой способ обработки эксперимента не годится. Ясно, что теоретическая кривая спектра не может и не должна проходить через все экспериментальные точки. Она должна проходить как можно ближе к этим точкам, оставаясь при этом гладкой.

Правильная постановка задачи состоит в формулировании экстремального принципа: отклонение теоретической кривой (3.5) от экспериментальных значений, или, как говорят, невязка, должно быть минимальным. Но в каком смысле минимальным? Мы ответим на этот вопрос в следующем подпараграфе.

Подчеркнем сразу же одно чрезвычайно важное обстоятельство, которое является причиной нетривиальности проблемы анализа результатов измерений в методе квазиупругого светорассеяния. Обратная спектральная задача относится к классу некорректно поставленных задач. Это математическое утверждение означает, что решение уравнения (3.5) не устойчиво по отношению к вариациям левой части. Добавим к $A(\Gamma)$ быстро осциллирующую функцию, в среднем равную нулю. Подстановка такой осциллирующей добавки в интеграл (3.5) меняет $I^{(1)}(\omega)$ на величину, стремящуюся к нулю при уменьшении периода осцилляций. Это показывает, что малым изменениям $I^{(1)}(\omega)$ могут соответствовать сколь угодно большие изменения $A(\Gamma)$ при каждом фиксированном значении Γ . Изменения эти носят характер быстро осциллирующих с изменением Γ добавок, и мы приходим к выводу, что независимо от того, какой является истинная функция распределения $A(\Gamma)$, восстановить можно лишь ее сглаженный вид. Причем нельзя найти точную $A(\Gamma)$, а потом ее сгладить. Некорректность обратной спектральной задачи означает невозможность построить ее решение с помощью какой-либо вычислительной процедуры, имеющей конечную точность. Алгоритм обработки результатов измерений должен с самого начала быть нацелен на поиск сглаженного, а не истинного распределения лоренцианов по полуширинам.

Принцип максимального правдоподобия. Читателю наверняка приходилось так или иначе сталкиваться с методом наименьших квадратов, в том числе и тому, кто впервые слышит о существовании такого метода. Ведь усредняя результаты M -независимых измерений одной и той же величины x , мы на самом деле минимизируем сумму квадратов отклонения результатов измерения от теоретического значения x^0 , или, говоря математическим языком, минимизируем функционал невязки:

$$W(x^0) = \sum_{i=1}^M (x_i - x^0)^2. \quad (3.6)$$

Положение минимума этого функционала находится из условия равенства нулю производной $\frac{\partial W}{\partial x^0} = 0$, откуда $\sum_{i=1}^M (x_i - x^0) = 0$ или $x^0 = 1/M \sum_{i=1}^M x_i \equiv \bar{x}_i$.

Но полученная таким образом оценка истинного значения x правильна только в том случае, если результаты измерений имеют одинаковую точность. Ясно, что если одно измерение получено более точным методом, чем другое, истинное значение, скорее всего, ближе к первому. О том, насколько ближе, свидетельствует более общая запись функционала невязки:

$$W(x^0) = \sum_{i=1}^M (x_i - x^0)^2 / \sigma_i, \quad (3.7)$$

где σ_i — теоретическая дисперсия i -го измерения. Следующий этап — это распространение метода наименьших квадратов на случай не независимых измерений. При этом функционал невязки принимает вид

$$W(x^0) = \sum_{i,j=1}^M (x_i - x^0)(x_j - x^0) \sigma_{ij}^{-1}, \quad (3.8)$$

где σ_{ij} — корреляционная матрица ошибок измерений.

Смысл использования невязки (3.7) можно понять: чем точнее i -измерение, тем меньше σ_i и больше вклад соответствующего отклонения в невязку. Поэтому для минимизации невязки приходится приближать x^0 именно к этому наиболее точному значению. Использование в случае скоррелированных измерений именно выражения (3.8) является прямым следствием основополагающего принципа обработки результатов измерений — принципа максимального правдоподобия, а для конкретных выражений ((3.6) — (3.8)) — еще и априорного предположения о нормальном законе распределения ошибок измерений. Принцип максимального правдоподобия формулируется следующим образом: наилучшей оценкой истинных значений искомых параметров являются такие значения, которые максимизируют вероятность реализации имеющихся результатов измерений. Если ошибки измерений истинной величины x , т. е. величины $x - x_i$, имеют нормальный, или гауссов, закон распределения, вероятность реализации набора значений x_i имеет согласно формуле (1.11) вид

$$P(\{x_i\}) = \frac{\|\sigma\|^{-1/2}}{\pi^{M/2}} e^{-\frac{1}{2} W(x^0)}, \quad (3.9)$$

где $W(x^0)$ описывается выражением (3.8). Поэтому значение, при котором вероятность максимальна, соответствует минимуму $W(x^0)$, т. е. должно определяться обобщенным методом наименьших квадратов (3.8). Функционалы невязок (3.7) и (3.6) — это частные случаи выражения (3.8) при диагональной и единичной корреляционной матрице ошибок.

Принцип максимального правдоподобия позволяет распространить экстремальный способ оценки искомых параметров на те нередкие случаи, когда непосредственно измеряемыми величинами являются не сами эти параметры, а какие-то их функции. Обычный способ обработки результатов, используемый в таких случаях многими экспериментаторами, заключается в выражении искомых параметров через измеряемые величины с последующим усреднением найденных таким образом значений. Такой способ не является математически строгим и может давать смещенные оценки истинных значений.

Поясним смысл терминов *смещенная оценка* и *эффективная оценка*. Оценкой искомой величины называется значение, стремящееся к этой величине при погрешности измерений, стремящейся к нулю. Несмещенной оценкой называется такая оценка, математическое ожидание которой равно истинному значению. Другими словами, среднее от несмещенных оценок, полученных в большом числе независимых экспериментов, совпадает с истинным значением. Математическое ожидание смещенной оценки, хотя и стремится к истинному, не совпадает с ним. Получается в результате обработки результатов одной серии измерений смещенная оценка или нет, не очень существенно, поскольку неважно, случайно или систематично отклонение результата от истины, лишь бы это отклонение было мало. Но при многократном повторении или проведении ряда однотипных серий экспериментов смещенность оценки истинного значения может легко создать ложное впечатление законности.

Зная вероятность реализаций набора экспериментальных значений и способ получения оценки по этому набору, можно вычислить среднеквадратичное отклонение оценки от истинного значения (а если искомых параметров несколько — корреляционную матрицу отклонений оценок от теоретических значений параметров). Эффективной называется оценка, отклонение которой минимально.

Правильный способ обработки, основанный на принципе максимального правдоподобия, заключается в вычислении вероятности реализации результатов всех измерений и нахождении набора параметров, максимизирующих эту вероятность.

Вернемся к анализу спектров квазиупругого рассеянного света. Нам необходимо найти, при какой функции распределения лоренцианов по полуширинам $A(\Gamma)$ максимальна вероятность обнаружить в эксперименте реализацию спектра $\tilde{I}(\omega)$. Эта вероятность была нами выписана (см. выражение (1.30)). Таким образом, $A(\Gamma)$ следует находить из условия минимума функционала невязки:

$$W(A(\Gamma)) = \sum_i \left(\frac{\tilde{I}(\omega_i)}{I(\omega_i)} + \ln I(\omega_i) \right) \equiv -\ln P(\{\tilde{I}(\omega_i)\}), \quad (3.10)$$

где $\tilde{I}(\omega_i)$ — экспериментальное значение спектра на частоте ω_i , а $I(\omega_i)$ — теоретическое, в идеале даваемое интегралом (3.5). Если погрешности измерений малы, $\tilde{I}(\omega_i) \approx I(\omega_i)$ и, разлагая (3.10) в ряд по отклонению истинных значений от экспериментальных с точностью

до членов второго порядка, получим

$$W(A(\Gamma)) = \sum_i [I(\omega_i) - \bar{I}(\omega_i)]^2 / \bar{I}^2(\omega_i) + \text{const}, \quad (3.11)$$

т. е. обычный функционал метода наименьших квадратов вида (3.7) для измерений спектральных гармоник с постоянной относительной погрешностью.

Совершенно аналогично, используя формулу (1.11), можно построить правильный функционал невязки для обработки результатов измерения корреляционной функции. Мы не будем приводить этих довольно громоздких выкладок, еще раз напомним, что в отличие от спектральных гармоник отклонения от среднего экспериментальных значений $\bar{G}(\tau)$ при разных τ скоррелированы и игнорирование этого обстоятельства может привести к неэффективной оценке $A(\Gamma)$.

Функционал (3.11) еще не пригоден для практической обработки спектральных данных. Мы уже убедились, что бессмысленно стремиться к определению точного вида $A(\Gamma)$. Необходимы какие-то априорные предположения о виде $A(\Gamma)$, обеспечивающие устойчивость решения обратной спектральной задачи. А для этого надо понять, как вообще априорная информация об искомых параметрах может быть включена в процедуру обработки экспериментальных данных.

Ответ дает теорема Байеса, практический вывод из которой заключается в том, что следует искать набор параметров, максимизирующий произведение вероятности реализации экспериментальных значений на априорную вероятность иметь данный набор параметров. Мы не будем обсуждать здесь эту теорему, ограничившись ссылкой на литературу по математической статистике [10, 53]. Отметим лишь, что, как и сам принцип максимального правдоподобия, она обязана своим появлением теории вероятности, результаты которой справедливы часто лишь асимптотически, для бесконечно повторяющихся одинаковых опытов на бесконечном числе одинаковых систем. Их применимость для одного опыта на одной системе легко поставить под сомнение. Например, один из наиболее ярких парадоксов, связанных с теоремой Байеса: отсутствие априорной вероятности значений параметров само по себе уже содержит информацию о том, что любые значения равновероятны. Получается, что использование принципа максимального правдоподобия даже без умножения на априорную вероятность искомых параметров совсем не означает, что мы не сделали никаких предположений. Наоборот, мы постулировали, что эта априорная вероятность равна единице.

Все способы обработки результатов измерений отличаются лишь типом используемой априорной информации об искомых параметрах. Но прежде чем перейти к обсуждению этих конкретных способов, нам необходимо уточнить, что представляет теоретическое значение спектра I_i в i -м канале анализатора. На самом деле оно дается формулой (3.5) лишь в идеале, а на практике мы имеем дискретный спектр, фон, амплитудно-частотную характеристику и т. д. Все эти факторы должны быть учтены при математической обработке результатов.

Экспериментальный спектр. В эксперименте измеряется не непрерывная спектральная кривая, а набор дискретных значений.

Математическое ожидание этой величины I_i можно связать с теоретической спектральной кривой, только зная технические характеристики используемого спектроанализатора:

$$I_i = \int_{\omega_i - \Delta/2}^{\omega_i + \Delta/2} I(\omega) Z(\omega) d\omega, \quad (3.12)$$

где $Z(\omega)$ — амплитудно-частотная характеристика (квадрат модуля импеданса) приемно-анализирующей системы; Δ — спектральное разрешение анализатора. Формула (3.12) предполагает, что i -й канал анализатора соответствует симметричному относительно ω_i частотному фильтру прямоугольной формы с шириной Δ . На практике такого приближения вполне достаточно. Часто довольствуются и более грубой аппроксимацией, считая, что $I_i = I(\omega_i) Z(\omega_i)$, т. е. заменяя среднее по интервалу значением в его центре. Это приводит к систематическим искажениям спектра порядка $(\Delta/\Gamma)^2$, что в реальном эксперименте может составлять несколько процентов.

При обработке спектральных кривых ни в коем случае нельзя забывать о том, что реально измеряемый спектр кроме информативной части (3.5) содержит согласно (1.23) постоянную добавку $\Phi = Q(i)$, связанную с дробовым шумом. В принципе, эту добавку можно, измерив средний фототок, узнать и вычесть из спектра, но такая процедура не безупречна. Если быть до конца последовательным, фон нужно рассматривать как еще один неизвестный параметр Φ , а измерение среднего фототока — как еще один независимый эксперимент и искать максимум вероятности измерения $\tilde{I}_i$ и $\langle i \rangle$ относительно параметров $A(\Gamma)$ и Φ .

То же относится и к амплитудно-частотной характеристике $Z_i = Z(\omega_i)$, которая при аналоговом способе регистрации должна рассматриваться как неизвестная экспериментально определяемая величина. Она может легко быть измерена, если осветить фотоприемник монохроматическим светом, что при гетеродинировании сводится к перекрытию зондирующего пучка. Спектр флуктуаций интенсивности в этом случае представляет собой δ -функцию в нуле (конечно, если лазер стабилен) и наблюдается только дробовой шум, который теоретически не зависит от частоты, а практически повторяет амплитудно-частотную характеристику. Обычный учет этой характеристики сводится к делению на нее экспериментального спектра. И эта процедура не последовательна. Правильно рассматривать Z_i как неизвестные параметры и максимизировать произведения сразу всех вероятностей: априорной для Z_i , про которую может быть, например, известно, что она гладкая; априорной для $A(\Gamma)$ и вероятностей наблюдать $\tilde{I}_i$, $\tilde{Z}_i$ и $\langle i \rangle$, рассматривая $A(\Gamma)$, Z_i и Φ как параметры. Можно легко продолжить эти рассуждения, чтобы понять, как следует учитывать результаты других измерений. Например, очень широкие распределения $A(\Gamma)$ приходится измерять на нескольких спектральных полосах

анализатора, так как у реальных приборов отношение полосы к спектральному разрешению (т. е. число каналов) обычно не более нескольких сотен. Можно пытаться одновременно анализировать гомодинный и гетеродинный спектры. Во всех случаях правильный способ «сшивки» результатов всех измерений — это максимизация вероятности реализации всего комплекса измеренных значений относительно всех неизвестных параметров.

В заключение остановимся на вопросе обработки результатов измерений в гомодинной схеме. Принципиальной разницы по сравнению с гетеродинированием, разумеется, нет. Но очень важное с практической точки зрения преимущество гетеродинирования заключается в том, что искомая функция распределения $A(\Gamma)$ входит в теоретический спектр линейно, а в функционал невязки, соответственно, квадратично. Свойства таких функционалов известны, а алгоритмы их минимизации хорошо отработаны. Гомодинный спектр, информативная часть которого является автосверткой спектра (3.5):

$$I^{(2)}(\omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} d\Gamma d\Gamma' \frac{A(\Gamma) A(\Gamma') (\Gamma + \Gamma')}{\omega^2 + (\Gamma + \Gamma')^2}, \quad (3.13)$$

билинеен по $A(\Gamma)$, и прямая минимизация соответствующего биквадратичного функционала невязки — дело более сложное. Можно, конечно, с помощью преобразования Фурье восстановить по $I^{(2)}(\omega)$ гетеродинный спектр или, если измеряется корреляционная функция, просто извлечь из нее квадратный корень. На эти процедуры не отвечают требованиям принципа максимального правдоподобия. Корень из корреляционной функции извлечь можно, но какую матрицу ошибок приписать полученным значениям?

Оказывается, что эта матрица зависит от того, каким будет решение $A(\Gamma)$, и весь процесс выбора «правильных» ошибок сводится к линеаризации гомодинного спектра или корреляционной функции вблизи истинного решения, что является одним из способов минимизации исходного биквадратичного функционала. Если оценить ошибки на глаз, по разбросу экспериментальных точек, будет получена неэффективная оценка истинной функции распределения. Поэтому при анализе полидисперсности или внутренней динамики метод гетеродинирования несколько предпочтительнее. Но если целям исследования отвечают простейшие, не связанные с решением обратной спектральной задачи способы, о которых речь пойдет в следующем параграфе, различия между обработкой результатов гетеродинного и гомодинного экспериментов исчезают.

§ 3.2. СТАНДАРТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Априорная информация. Выбор априорной информации — это чрезвычайно ответственный, можно сказать, центральный момент всей процедуры статистической обработки экспериментальных данных. Этой информации должно быть достаточно, чтобы обеспечить устойчивость решения, но не слишком много, чтобы избежать риска получить в ре-

зультате всей обработки то, что было предположено в самом начале. Тем более, что встречаются исследователи, которым трудно избежать искушения рассматривать такой результат как подтверждение своих предположений.

У нас есть по крайней мере одна совершенно определенная информация об $A(\Gamma)$: $A(\Gamma) \geq 0$. Эта информация очень важна. Мы видели, что добавка к $A(\Gamma)$ быстро осциллирующей функции с нулевым средним значением мало меняет теоретический вид спектра, а значит, и невязку. Требование знакоположительности ограничивает возможный размах таких осцилляций и тем самым заметно повышает устойчивость решения. К сожалению, одной знакоположительности мало, а кроме нее ничего определенного об $A(\Gamma)$ сказать в общем случае нельзя. Приходится мириться с тем, что точно $A(\Gamma)$ нельзя восстановить, и выбирать один из трех имеющихся в настоящее время способов оценки вида $A(\Gamma)$.

Первый — наиболее известный и наиболее простой способ называется прямой подгонкой. В этом методе предполагается конкретный вид $A(\Gamma)$, а именно то, что она является функцией $A^0(\Gamma, x_1^0, x_2^0, \dots, x_n^0)$ известного вида, зависящей от Γ и n параметров $x_1^0, x_2^0, \dots, x_n^0$. Такое предположение соответствует априорной вероятности вида $\delta(A(\Gamma) - A^0(\Gamma, \{x^0\}))$. Минимизация невязки сводится тогда к минимизации относительно параметров x_i^0 , и если число параметров невелико и они достаточно независимы, найденные оптимальные x_i^0 оказываются устойчивыми. Недостаток такого способа очевиден. Мы можем допустить грубые ошибки, если неправильно предположим, как выглядит $A(\Gamma)$. Например, если мы выберем $A^0(\Gamma, \bar{\Gamma}, \Delta\Gamma^2)$ в виде кривой Гаусса, в которой параметрами являются положения максимума и дисперсия, а на самом деле $A(\Gamma)$ бимодально, мы получим гауссиан со средним значением и дисперсией, близкими к истинным, но совершенно упустим из виду бимодальный характер распределения. Наоборот, предположив бимодальность, мы получим ее, даже если реально она отсутствует. В принципе, не сложно отказаться от жесткого задания вида распределения, добавив в невязку член σW_a , который увеличивается с ростом отклонения $A(\Gamma)$ от $A^0(\Gamma, \{x\})$. Поскольку мы ищем минимум невязки, σ определяет, насколько сильно мы «штрафуем» решение за отклонения от априорно заданного. Такой подход, если его довести до логического конца, приводит к обсуждаемым ниже регулярным методам обработки, но в приведенном виде имеет малое принципиальное отличие от прямой подгонки. Все равно, если мы заранее не знаем примерного вида распределения $A(\Gamma)$, не понятно, ни как выбрать $A^0(\Gamma, \{x^0\})$, ни какие отклонения от него считать допустимыми.

Можно пойти на другую крайность, вообще отказавшись от всяких априорных предположений, а заодно и от попытки определить вид $A(\Gamma)$. Неустойчивость решения относительно быстро осциллирующих добавок не означает, что у него нет устойчивых характеристик. Таки-ми устойчивыми характеристиками являются, например, параметры x_i в методе прямой подгонки. Любой интеграл от произведения $\bar{I}(\omega)$ на гладкую функцию частоты является устойчивой характеристикой

$A(\Gamma)$, поскольку не чувствителен к погрешности измерения спектра. Но нас, естественно, интересуют не устойчивые характеристики вообще, а только те из них, которые имеют ясный физический смысл и полезны при интерпретации распределения $A(\Gamma)$. Среди них наиболее удобны моменты искомого распределения, т. е. среднее значение полуширины $\bar{\Gamma}$, дисперсия распределения $\Delta\Gamma^2$, асимметрия и т. д. Определение этих величин часто вполне отвечает цели исследования. Способ прямого определения моментов $A(\Gamma)$ называется в корреляционной спектроскопии методом кумулянтов.

Наконец, наиболее интересной представляется возможность использования не количественной, а качественной априорной информации. Чтобы избежать появления осцилляций в решении, можно потребовать, чтобы решение было гладким. Математическая формулировка требования гладкости составляет суть так называемых регулярных методов статистической обработки результатов.

Замечательное достоинство такого подхода состоит в том, что он физически оправдан, так как истинное решение нас редко интересует. Пусть у нас в растворе 100, 1000 или сколько угодно разных частиц. Истинное их распределение по коэффициентам диффузии — это 100, 1000, или очень много δ -функций, т. е. быстро осциллирующая функция. Но нам обычно нужно знать лишь, сколько частиц имеет коэффициент диффузии от D_0 до $D_0 + \delta D$. Мы все равно сглаживаем истинное распределение. Другое дело, что для обеспечения устойчивости решения его приходится сглаживать куда сильнее, чем хотелось бы, теряя тонкие детали. Только повышая точность измерений, можно приблизить полученный результат к истинному.

Метод прямой подгонки. Этот метод оправдан, если у нас действительно есть сведения о виде функции распределения частиц по коэффициентам диффузии. Например, если есть веские основания считать, что исследуемая система монодисперсна, пробную функцию $A^0(\Gamma, \{x^0\})$ можно выбрать в виде $\delta(\Gamma - \Gamma_0)$, т. е. найти полуширину Γ_0 лоренциана, аппроксимирующего экспериментальный спектр наилучшим в смысле минимума невязки образом.

Бессмысленно обсуждать, какие пробные функции удобнее. Существуют стандартные программы минимизации функционалов, и исследователь, владеющий элементарными навыками программирования, может легко составить алгоритм вычисления функционала невязки для пробной функции любого вида и определить оптимальные значения ее параметров. На практике помимо однолоренцевской часто используются двухлоренцевская подгонка (например, [166]), позволяющая, в частности, учитывать присутствие пыли в образце, подгонка нормальным распределением, распределениями Пирсона различного вида [118, 201] и т. п. — все эти модели хороши лишь настолько, насколько удачно они отражают действительный вид распределения.

На этом можно было бы закончить обсуждение метода прямой подгонки, но мы считаем необходимым обратить внимание на некоторые практически важные вопросы его применения. Во-первых, если постулируется, что функция распределения лоренцианов по ширинам в гетеродинном спектре (3.5) имеет вид $A^0(\Gamma, \{x^0\})$, то аналогичная функция

для гомодинного спектра является согласно уравнению (3.13) авто-сверткой этого распределения. Число неизвестных параметров при этом сохраняется, а вид пробной функции, конечно, меняется. Так, вместо двухлоренцевской подгонки гетеродинного спектра гомодинный спектр часто подгоняется суммой трех лоренцианов с полуширинами $2\Gamma_1$, $2\Gamma_2$, $\Gamma_1 + \Gamma_2$ и амплитудами A_1^2 , A_2^2 и $2A_1A_2$ соответственно [139].

Во-вторых, искомые параметры пробной функции входят в функционал невязки существенно нелинейно. Поэтому нельзя утверждать, что минимум функционала только один. Это серьезная неприятность, поскольку найденные значения параметров могут отвечать ложному минимуму функционала. Обнаружить это, как правило, можно по систематическому отлнчию I_t от $\bar{I}_t$, но бороться с этим трудно. По-существу, есть только один путь: начать минимизацию снова при других начальных значениях параметров. Конечно, если начальные значения сразу выбраны достаточно близко к оптимальным, мы почти наверняка попадаем в главный минимум. Но игнорировать указанную возможность нельзя.

И наконец, третье важное обстоятельство касается числа независимых параметров в пробной функции. Их не должно быть слишком много. Практика показывает, что при процентной точности измерений спектра анализатором, имеющим несколько сотен каналов, допустимое число параметров, если не считать фона и общего нормировочного множителя, не больше трех-четырех. В противном случае оказывается возможным согласованное изменение всех параметров, при котором I_t практически не меняются, и они перестают быть устойчивыми характеристиками. Другими словами, если параметров слишком много, их оптимальные значения сильно коррелированы. Чтобы понять, имеют ли найденные значения смысл, обязательно следует обратить внимание на корреляционную матрицу ошибок их определения, вычисляемую подавляющим большинством стандартных программ. Лишь в том случае, если не только ошибка каждого параметра в отдельности, но и корреляции между ними малы, можно быть уверенным в правильности полученного ответа.

Метод кумулянтов. В исходном виде этот метод применяется для анализа корреляционной функции квазиупруго рассеянного излучения, которая в нашем случае имеет вид

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} A(\Gamma) e^{-\Gamma|\tau|} d\Gamma. \quad (3.14)$$

Разлагая в этом выражении $e^{-\Gamma|\tau|}$ в ряд при $\tau \rightarrow 0$, легко выразить коэффициенты ряда Тейлора по степеням τ функции $G(\tau)$ через моменты распределения $A(\Gamma)$. Но поскольку для узких распределений $\Gamma^n \approx \bar{\Gamma}^n$, предпочтительнее определять сразу $M_1 \equiv \bar{\Gamma}$ и центральные моменты распределения, т. е. $M_2 \equiv \overline{\Delta\Gamma^2} = \overline{(\Gamma - \bar{\Gamma})^2}$, $M_3 = \overline{\Delta\Gamma^3}$ и т. д. Для этого в ряд надо разложить не саму корреляционную функцию,

а ее логарифм, т. е. представить $G(\tau)$ в виде

$$G(\tau) = G(0) e^{-\sum_{n=1}^{\infty} K_n |\tau|^n \frac{1}{n!}}. \quad (3.15)$$

Коэффициенты K_n называются кумулянтами. Легко видеть, что в случае монодисперсной системы все кумулянты, кроме первого, равны нулю. В этом и заключается большое преимущество именно такого представления $G(\tau)$. Сравнивая коэффициенты разложения правой и левой частей выражения (3.15) в ряд по степеням τ , можно выразить кумулянты через центральные моменты M_i [152]. Заметим, что первые три кумулянта равны соответственно M_1 , M_2 и M_3 . Для того чтобы практически определить значения кумулянтов, необходимо оборвать ряд в (3.15), т. е. считать отличными от нуля только несколько первых кумулянтов и минимизировать относительно параметров K_i соответствующий функционал невязки. Таким образом, от метода прямой подгонки метод кумулянтов отличается тем, что постулируется вид не искомой функции $A(\Gamma)$, а непосредственно корреляционной функции.

В принципе, не обязательно задавать корреляционную функцию в виде (3.15). Оптимизовав параметры любого априорного представления $G(\tau)$, моменты можно найти простым вычислением коэффициентов ряда Тейлора. Однако кумулянты — это распространенное и удобное математическое понятие. В частности, все кумулянты гомодинной функции в два раза больше «гетеродинных» кумулянтов. Наконец, естественнее анализировать отклонение от одноэкспоненциальности, раскладывая в ряд именно $\ln G(\tau)$. Мы упомянули о возможности альтернативных вариантов, чтобы показать, что хотя в методе кумулянтов и постулируется вид $G(\tau)$, эта информация используется только на промежуточном этапе, а найденные значения моментов, будучи устойчивыми характеристиками, от нее не зависят. Более того, моменты распределения, найденного методом прямой подгонки, тоже близки к истинным, хотя и представляют собой смещенную оценку вследствие неполного соответствия использованной пробной функции действительному виду распределения.

Предложение использовать метод кумулянтов в корреляционной спектроскопии квазиупругого рассеянного света было сделано Л. Коппелем [152], и в настоящее время это самый распространенный способ анализа экспериментальных данных. Мы остановимся на примерах его использования в следующей главе, заметив лишь, что этот метод заведомо плох для очень широких распределений, когда центральные моменты велики, а также когда неизвестно, является ли анализируемое распределение одномодальным. Как и в методе прямой подгонки, реальная точность экспериментов гарантирует восстановление в лучшем случае трех-четырех параметров (моментов), причем если точность определения $\bar{\Gamma}$ может составлять доли процента, дисперсия восстанавливается не лучше, чем с 5—10 %-ной ошибкой, третий момент — с ошибкой порядка 100 %, а четвертый фактически недостоверен.

§ 3.3. МЕТОД РЕГУЛЯРИЗАЦИИ

Некорректность обратной спектральной задачи. Достоинство регулярных методов решения обратной спектральной задачи заключается в том, что они требуют введения только качественных априорных предположений об искомом распределении $A(\Gamma)$ — предположений о его гладкости. Но прежде чем обсуждать, как эту априорную информацию следует вводить в процедуру минимизации функционала невязки, полезно понять, чем конкретно мешает нам некорректность рассматриваемой задачи. Забудем пока о всех практических осложнениях (амплитудно-частотной характеристике, фоне и т. п.) и попытаемся минимизировать невязку (3.11). Подставляя в нее выражение для теоретического спектра и выполняя суммирование по частотам, получим с точностью до независимой от $A(\Gamma)$ части:

$$W(A) = \int_0^\infty \int_0^\infty A(\Gamma') L(\Gamma, \Gamma') A(\Gamma) d\Gamma d\Gamma' - \int_0^\infty A(\Gamma) F(\Gamma) d\Gamma, \quad (3.16)$$

где

$$L(\Gamma, \Gamma') = \sum_i \frac{1}{\pi^2} \frac{\Gamma}{\omega_i^2 + \Gamma^2} \frac{\Gamma'}{\omega_i^2 + \Gamma'^2} \tilde{l}_i^2, \quad (3.17)$$

а

$$F(\Gamma) = \sum_i \frac{2}{\pi} \frac{\Gamma}{\omega_i^2 + \Gamma^2} \tilde{l}_i. \quad (3.18)$$

Условие минимума невязки определяется из равенства нулю вариационной производной $\delta W / \delta A = 0$, откуда легко получить уравнение для $A(\Gamma)$:

$$\int_0^\infty L(\Gamma, \Gamma') A(\Gamma') d\Gamma' = F(\Gamma). \quad (3.19)$$

Выражение (3.19) так же, как и (3.5), является интегральным уравнением Фредгольма 1-го рода. Но в отличие от уравнения (3.5), которое не может выполняться точно из-за случайной погрешности результатов измерений, (3.19), напротив, должно быть выполнено. Это уравнение можно и нужно решать, хотя к нему по-прежнему относятся все наши рассуждения, касающиеся неустойчивости $A(\Gamma)$ относительно малых вариаций $F(\Gamma)$. Теперь мы можем выяснить их математическую сущность. Обозначим для краткости интеграл в выражении (3.19) как результат действия на функцию $A(\Gamma)$ интегрального оператора $\hat{\mathcal{L}}$. Тогда символически наше уравнение запишется так:

$$\hat{\mathcal{L}}A = F. \quad (3.20)$$

Оператор $\hat{\mathcal{L}}$ — это симметричный линейный оператор. О нем известно, что его собственные функции, т. е. функции f_n такие, что

$$\hat{\mathcal{L}}f_n = \lambda_n f_n, \quad (3.21)$$

где λ_n — число, называемое собственным значением, образуют полный ортонормированный набор, т. е. обобщенное скалярное произведение

$$(f_n, f_m) \equiv \int_0^\infty f_n(\Gamma) f_m(\Gamma) d\Gamma = \delta_{nm}, \quad (3.22)$$

а любую функцию $X(\Gamma)$ можно представить в виде

$$X = \sum_{n=1}^{\infty} (X, f_n) f_n. \quad (3.23)$$

Тогда, разлагая функции A и F в ряд по собственным функциям оператора $\hat{\mathcal{Q}}$, т. е. представляя их в виде (3.23), подставляя эти выражения в (3.20) и пользуясь (3.21), получим

$$A = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(F, f_n)}{\lambda_n} f_n. \quad (3.24)$$

Конечно, (3.24) является решением только формально. Чтобы воспользоваться им, нужно узнать собственные функции и собственные значения оператора $\hat{\mathcal{Q}}$, что ничуть не легче, чем решить само уравнение (3.20). Но такое представление позволяет увидеть причины некорректности и подсказывает пути борьбы с ней.

Причина неустойчивости решения уравнения (3.20) заключается в том, что среди собственных значений оператора $\hat{\mathcal{Q}}$ встречаются сколь угодно близкие к нулю. Пусть собственной функции f отвечает очень малое собственное значение λ . Если изменить F , добавив к нему γf , где γ — малое число, решение согласно (3.24) изменится на $\frac{\gamma}{\lambda} f$, при $\lambda \ll \gamma$ это изменение велико. Убедимся теперь в существовании очень малых λ . Для этого заметим, что для любой функции X

$$(X, \hat{\mathcal{Q}}X) > \lambda_{\min}(X, X). \quad (3.25)$$

Пользуясь выражением для ядра интегрального оператора $\hat{\mathcal{Q}}$ (3.17), легко увидеть, что

$$(X, \hat{\mathcal{Q}}X) = \sum_i \left(\frac{1}{\pi \tilde{I}_i} \int_0^\infty \frac{\Gamma X(\Gamma)}{\omega_i^2 + \Gamma^2} d\Gamma \right)^2 = \sum_i H_i^2. \quad (3.26)$$

Так как $(X, \hat{\mathcal{Q}}X)$ для любых X , в том числе для собственных функций, строго положительно, все $\lambda_n > 0$. С другой стороны, если X быстро осциллирует, H_i мало. Взяв, например, $X = \sin \Gamma \nu$, получим, что $H_i = \frac{1}{2\tilde{I}_i} e^{-\omega_i |\nu|}$, т. е. $(X, \hat{\mathcal{Q}}X)$ экспоненциально быстро убывает с ростом частоты осцилляций ν . Тем самым мы доказали, что у оператора $\hat{\mathcal{Q}}$ действительно есть сколько угодно малые собственные значения и обратная спектральная задача некорректна.

Регулярные методы решения обратной спектральной задачи. Прежде чем перейти к описанию способов устранения неустойчивости решения $A(\Gamma)$, заметим, что для конкретных расчетов уравнение (3.19) необходимо дискретизировать, считая, например, что $A(\Gamma)$ постоянно в пределах каждого из следующих друг за другом интервалов с центрами в Γ_i или $A(\Gamma)$ отлично от нуля только в точках Γ_i , $i = 1, 2, \dots, M$. Тогда непрерывные функции $A(\Gamma)$ и $F(\Gamma)$ превратятся в M -мерные векторы A_i и F_i , интегральный оператор $\hat{\mathcal{L}}$ — в симметричную матрицу $M \times M$ $\mathcal{L}_{ij}$, а все формулы ((3.21) — (3.26)) — в стандартные соотношения линейной алгебры. У матрицы $M \times M$, как известно, всего M собственных значений. Все они больше нуля, в том числе наименьшее — $\lambda_{\min}$. И в строгом математическом смысле проблема некорректности исчезает: решение согласно уравнению (3.24) устойчиво к малым вариациям F_i , пока среднеквадратичная величина этих вариаций мала по сравнению с $\lambda_{\min}$. Ясно, что чем меньше M , тем больше $\lambda_{\min}$ и устойчивее решение, но тем меньше мы можем сказать о виде распределения $A(\Gamma)$. Нужно выбрать число и расположение точек Γ_i так, чтобы, не потеряв устойчивости решения к вариациям F порядка погрешности измерений, максимально подробно восстановить $A(\Gamma)$.

Если M велико, проблема некорректности исчезает только в теоретическом плане. Практическая же сторона дела не облегчается. Из-за того что среди собственных значений матрицы $\mathcal{L}_{ij}$ есть очень маленькие, детерминант этой матрицы близок к нулю, и вследствие конечной точности ЭВМ вычислить решение A_i невозможно. Система уравнений (3.20) оказывается слабо обусловленной.

Существуют несколько эквивалентных способов находить сглаженное решение таких систем уравнений. Они отличаются лишь содержанием понятия «сглаженность», которое, к сожалению, ни в одном случае не допускает простой интерпретации. Первый способ заключается в следующем: надо немного изменить матрицу $\mathcal{L}_{ik}$ или непосредственно оператор $\hat{\mathcal{L}}$ так, чтобы малые собственные значения существенно увеличились, а большие практически не изменились. Такой измененный оператор будет хорошо обусловлен, а решение нового уравнения будет соответствовать сглаженному точному решению в том смысле, что вклад в него быстро осциллирующих собственных функций окажется подавленным. Это метод регуляризации [49]. В другом способе, наоборот, сам оператор не меняется, но решение ищется среди множества таких функций X , у которых в разложении (3.23) вклады быстро осциллирующих собственных функций с малыми собственными значениями либо вовсе отсутствуют, либо малы, т. е. опять-таки — среди гладких функций. Это метод квазирешения. Приведенные методы могут применяться и в комбинации. Комбинированный способ в специальной литературе называют методом невязки [26].

Если бы мы знали собственные функции и собственные значения оператора $\hat{\mathcal{L}}$, можно было бы реализовать метод квазирешения, опустив в сумме (3.24) вклад всех членов с $\lambda_n < \gamma$. Это соответствует решению задачи условной минимизации функционала невязки на классе

функций ортогональных всем собственным функциям $\mathcal{L}$, для которых $\lambda_n < \gamma$, т. е. на классе гладких функций. При этом число γ выступало бы в качестве параметра сглаживания. Такую процедуру пытался осуществить Провинчер [193], в дальнейшем из-за трудностей определения f_n предпочтя ей метод регуляризации.

Метод регуляризации наиболее исследован с математической точки зрения. В процедуре регуляризации по Тихонову [26, 49] к функционалу невязки добавляется стабилизирующий функционал:

$$\Omega(A) = \int_0^\infty \sum_{n=0}^\infty (A^{(n)})^2 \gamma_n(\Gamma) d\Gamma, \quad (3.27)$$

где $A^{(n)}$ — производная n -го порядка $\partial^n A / \partial \Gamma^n$. Чаще всего $\gamma_n(\Gamma)$ выбирается постоянными, отличными от нуля только для нескольких небольших n . Физический смысл выражения (3.27) следующий: n -е слагаемое в стабилизирующем функционале «штрафует» за отклонение n -й производной от нуля. Например, если отлично от нуля только γ_1 , мы, добавляя в невязку (3.27), требуем, чтобы производная решения была не слишком велика.

Интересно, что стабилизирующее действие оказывает и нулевой член в сумме (3.27). Регуляризация со стабилизирующим функционалом нулевого порядка эквивалентна прямой подгонке экспериментальных точек теоретической кривой, но с условием, чтобы $A(\Gamma)$ было максимально близко не к какому-то наперед заданному распределению, а к нулю. Это не столь парадоксально, как кажется на первый взгляд. Если γ_0 не слишком велико, такой стабилизирующий функционал не «притянет» решение к нулю. Но на каждом небольшом интервале $\Delta\Gamma \bar{A}^2 = \bar{A}^2 + \Delta\bar{A}^2$, и поскольку быстрые осцилляции не меняют основную невязку (3.11), но дают большой вклад в отклонение A от среднего на $\Delta\Gamma$ значения $\bar{A}$, размах этих флуктуаций окажется ограниченным. С математической точки зрения добавление стабилизирующего функционала нулевого порядка с постоянной γ_0 сводится к добавлению γ_0 к диагональным элементам матрицы $\mathcal{L}_{ik}$, т. е. к увеличению всех собственных значений на γ_0 без изменения собственных функций. Если $\gamma_0 \gg \lambda_{\min}$, это оказывает стабилизирующее действие. В то же время вклад гладких собственных функций с $\lambda \gg \gamma_0$ изменится относительно мало.

Аналогичный, хотя и не столь очевидный анализ можно провести и в случае стабилизирующих добавок более высокого порядка. Обычно используются стабилизаторы первого и второго порядков, иногда в комбинации. Во всех случаях помимо вопроса о виде стабилизирующего функционала, что влияет на характер сглаживания, существует проблема выбора величины сглаживающих параметров γ или функций $\gamma(\Gamma)$, если степень сглаженности желательно менять в зависимости от значения аргумента $A(\Gamma)$. Эта проблема, которую мы обсудим в следующем разделе, — главная во всех регулярных методах решения обратной задачи. Если выбрать γ большими, решение окажется «переглаженным», и мы потеряем информацию в виде распределения; если

γ слишком малы, мы недостаточно сгладим решение, и в нем появятся ложные выбросы.

Возможность использования регуляризации по Тихонову в корреляционной спектроскопии квазиупругого рассеянного света убедительно продемонстрирована на уровне машинных и модельных экспериментов в ряде работ. Однако большее распространение получили методы, основанные на дискретизации искомого решения, по своему математическому содержанию примыкающие к методам квазирешения и невязки. Дискретизация сама по себе стабилизирует обратную задачу, меняя как сам оператор, так и пространство, в котором он действует. Если $A(\Gamma)$ ищется в виде гистограммы с шириной столбиков γ или в виде набора δ -функций, расстояния между которыми γ , или в каком-либо другом дискретном виде, шаг дискретизации γ выступает в роли параметра сглаживания. Действительно, в таком $A(\Gamma)$ не могут появиться осцилляции, период которых меньше γ . Тем самым, правильно определив шаг дискретизации, мы можем добиться устойчивости квазирешения. Такой способ анализа экспериментальных данных, как с гистограммным представлением $A(\Gamma)$ [92, 118, 173, 180], так и с представлением в виде набора δ -функций [79], используется сейчас несколькими лабораториями, в том числе нашей.

Может сложиться впечатление, что существует огромное количество разных регулярных методов решения обратной спектральной задачи. Это впечатление справедливо только с теоретической точки зрения. Практическое же их использование сводится, по-существу, к одному и тому же и состоит из следующих операций:

1. Как и в методе прямой подгонки, необходимо вычислить функционал невязки, учитывающий все экспериментальные результаты и их погрешности.

2. Как и в методе прямой подгонки, необходимо отнять от этой невязки логарифм априорной функции распределения $A(\Gamma)$ ($-W_a$), если, конечно, у нас есть достоверная информация об этой функции.

- 2а. В методе регуляризации необходимо добавить стабилизирующий функционал Ω , пропорциональный параметру сглаживания γ , что эквивалентно введению априорной информации о гладкости $A(\Gamma)$.

3. Следует дискретизировать задачу тем или иным способом, причем если устойчивость решения обеспечивается стабилизирующим функционалом, т. е. используется метод регуляризации, шаг дискретизации может быть сколь угодно мал, а если стабилизатора нет, этот шаг нужно выбирать из условия устойчивости решения, что соответствует выбору γ в пункте 2а.

4. Найти квазирешение и другие неизвестные параметры, минимизирующие суммарный функционал.

Если учесть, что при использовании метода регуляризации шаг дискретизации невыгодно делать существенно меньше интервала, на котором $A(\Gamma)$ мало меняется вследствие влияния стабилизирующего функционала, поскольку это ведет к увеличению ранга решаемой системы уравнений, легко прийти к выводу об эквивалентности всех методов. Этот вывод подкрепляется следующим философским рассуждением: все правильные с математической точки зрения методы одинаковы в

том смысле, что дают всю информацию о виде $A(\Gamma)$, которая вообще может быть извлечена из экспериментальных данных, правда, немного в разной форме. Из этого рассуждения, кстати, следует, что моменты найденного распределения $A(\Gamma)$ должны в пределах точности своего определения совпадать с моментами, определенными методом кумулянтов.

Распространение идей регулярной обработки при отсутствии систематического изложения их математических основ привело к появлению всевозможных «полулегальных» методов, в которых эти идеи провозглашаются, но используются не до конца последовательно. В частности, извлечение корня квадратного из гомодинной корреляционной функции совершенно не соответствует принципу максимального правдоподобия, требующему учета факта коррелированности ошибок измерения $G(\tau)$. В любом случае следует с известной осторожностью подходить к полученным таким образом результатам, если они не подкреплены описанием использованного алгоритма или по крайней мере ссылками на убедительные машинные эксперименты. Заметим, однако, что игнорирование многих из обсуждавшихся выше тонкостей не приводит к очень серьезным ошибкам. Например, учет статистики погрешностей необходим лишь для того, чтобы полученные оценки были эффективными. Гораздо важнее способ выбора параметра сглаживания и правильное использование имеющейся априорной информации, и в первую очередь — факта положительности решения. Эти вопросы затрагивают самую суть проблемы — устойчивость решения, и именно они во многом определяют полноту получаемой информации.

Параметр сглаживания и смысл квазирешения. По сравнению с методом прямой подгонки необходимое в регулярных методах требование гладкости решения носит довольно «мягкий» характер и не может привести к грубым искажениям распределения $A(\Gamma)$. Но и в этом случае правильный выбор априорной информации очень важен.

В регулярных методах используется информация двух разных типов. Первый тип априорной информации — это действительная информация об $A(\Gamma)$. Пользоваться ею надо с большой осторожностью. Естественно, у исследования есть более или менее обоснованное представление о виде искомого распределения, но сформулировать это качественное представление в математическом виде практически невозможно. Проблема состоит в количественном выражении степени уверенности в наших предположениях. Единственное исключение относится к априорной информации, достоверность которой не вызывает сомнений. Это неотрицательность $A(\Gamma)$. Минимизация с учетом положительности $A(\Gamma)$ уже не сводится к решению системы уравнений и должна производиться другими методами. Неотрицательность повышает обусловленность задачи и позволяет существенно уменьшить потребность в априорной информации второго типа — о гладкости решения. Заметим, кстати, что использование даже абсолютно достоверной априорной информации ведет к смещению оценки. Пусть, например, измеряется величина $x^0 > 0$. Результат каждого измерения x_i является несмещенной оценкой x^0 , т. е. $x_i = x^0$. Но с учетом положительности x^0

наилучшей оценкой в каждом отдельном опыте будет x_i , если $x_i > 0$, и 0, если $x_i < 0$. Очевидно, что среднее таких оценок больше x^0 . Таким образом, априорная информация позволяет уменьшить среднеквадратичное отклонение оценки от истинного значения, но ценой ее смещения. Это лишний раз показывает важность использования именно метода максимального правдоподобия, дающего эффективную оценку. В противном случае нет гарантии, что априорная информация улучшает точность определения искомых параметров.

Требование гладкости решения заведомо не соответствует действительности. Оно обеспечивает устойчивость решения, но только за счет его искажения — сглаживания. Степень сглаженности $A(\Gamma)$ в окрестности точки Γ регулируется параметром сглаживания $\gamma(\Gamma)$, который может быть либо коэффициентом при стабилизирующем функционале Ω , либо шагом дискретизации. Во всех случаях возникает вопрос: какой величины должен быть параметр сглаживания и как он должен зависеть от Γ , чтобы решение уже было устойчивым, но еще не было «переглаженным?» Очевидно, что степень сглаженности может быть тем меньше, чем точнее измерен спектр. Ведь параметр сглаживания обратно пропорционален количеству информации, содержащейся в квазирешении, что особенно наглядно проявляется в методе гистограмм. Результаты математических исследований, устанавливающие асимптотическую связь между γ и погрешностью измерений σ , при $\sigma \rightarrow 0$ мало помогают в реальной ситуации, когда ошибки конечны. Более того, если $\sigma = 0$, что можно сделать в машинном эксперименте, конечная точность вычислительной процедуры все равно не позволяет устремить γ к нулю. (Отметим, однако, что не следует смешивать вопрос об эффективности того или иного регулярного метода с вопросом об эффективности использованного для его реализации алгоритма.) Характер связи между γ и σ нетрудно установить из качественных соображений. Пусть проведено n независимых измерений. Поскольку каждое из них содержит одну и ту же информацию, на одно измерение приходится $1/n$ часть всей информации. Как уже отмечалось, параметр сглаживания должен быть обратно пропорционален количеству информации о виде распределения, и, следовательно, его изменение при увеличении n на 1 пропорционально $1/n$. Отсюда $\gamma \sim \ln n$ и, так как $\sigma \sim n^{-1/2}$, $\gamma \sim -\ln \sigma$. Таким образом, параметр сглаживания логарифмически убывает с ростом точности измерений.

Очень большое значение имеет правильный выбор зависимости $\gamma(\Gamma)$, редко обсуждаемый в сугубо математических работах. Между тем совершенно ясно, что $\Delta\Gamma$, при которой можно различить два лоренциана с полуширинами Γ и $\Gamma + \Delta\Gamma$, должно расти с увеличением Γ . Использование постоянного параметра сглаживания приводит, таким образом, либо к неустойчивости при больших Γ , либо к переглаженности — при малых. Но однозначно сказать, каким должен быть $\gamma(\Gamma)$, невозможно. Оптимальной зависимости $\gamma(\Gamma)$ — одной на все случаи — не может быть. Согласно выражению (3.17) экспериментальные значения I_i входят в оператор $\mathcal{L}$, который, следовательно, от случая к случаю меняется, а значит, меняется и оптимальный вид зависимости $\gamma(\Gamma)$. На практике помимо постоянной γ [79] с успехом использовались логарифми-

ческая [180, 195] и квадратичная [27] зависимости, а также алгоритмы, в которых γ (Γ) увязывалось с видом A (Γ) так, чтобы уменьшить степень сглаженности в той области, где A (Γ) велико [28, 195]. Последний способ, безусловно, наиболее хорош с теоретической точки зрения. Однако использование для выбора γ (Γ) приближенного вида A (Γ), найденного из тех же экспериментальных данных, нуждается в более строгом математическом обосновании.

Рис. 14. Восстановление функции распределения, состоящей из двух перекрывающихся гауссианов, при различных погрешностях измерения спектра:
1 — 1 %, 2 — 3 %, 3 — истинное распределение

Восстановления не использовался, моменты решения совпадают с истинными моментами с той же точностью, с какой их позволяет определить метод кумулянтов. И с количественной точки зрения информа-

Мы видим, что существует свобода в выборе способа сглаживания. Это не случайно. Решения, получаемые с разными γ (Γ), являются устойчивыми, но разными характеристиками истинного распределения. Смысл этой неоднозначности требует четкого понимания. Какой бы способ сглажи-

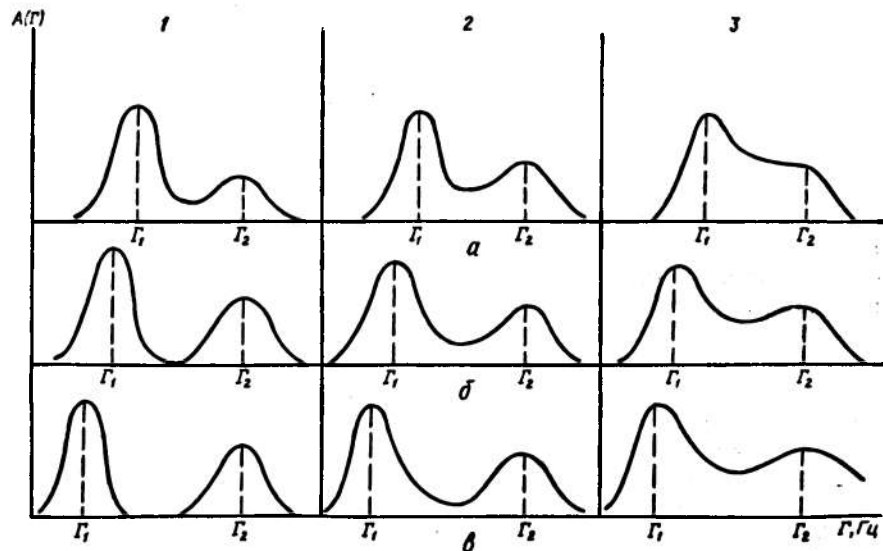


Рис. 15. Восстановление бимодального распределения при различных погрешностях измерения спектра и соотношениях полуширин:

а — $\Gamma_2/\Gamma_1 = 2$, б — $\Gamma_2/\Gamma_1 = 3$, в — $\Gamma_2/\Gamma_1 = 4$; 1 — погрешность 1 %, 2 — 2, 3 — 4

ция, которую дают любой регулярный метод и метод кумулянтов, да и метод прямой подгонки, одинакова. Но в отличие от последних, регулярные методы помимо количественной дают качественную информа-

цию о характере распределения $A(\Gamma)$, для оценки которой нет объективных критериев. На практике способ сглаживания лучше всего выбирать, опираясь не только на приведенные выше рассуждения, но и в не меньшей степени — на результаты машинных экспериментов, моделирующих возможные экспериментальные ситуации.

В заключение следует подчеркнуть, что для эффективности применения регулярных методов нужны определенные условия, которые имеют место в корреляционной спектроскопии квазиупругого рассеяния света и в ряде других задач, но не выполняются во многих на первый взгляд сходных ситуациях. Проблема решения некорректно поставленных обратных задач, пожалуй, самая сложная в обработке результатов физического эксперимента. С ней мы сталкиваемся всегда, когда измеряется суммарный вклад многих однотипных процессов, а мы хотим получить информацию о каждом из них в отдельности. Такая задача обычно либо элементарна, если вклады разных процессов очень отличаются по своему виду, либо безнадежна, если вклады сходны, а точность невелика. В первом случае регулярные методы не нужны, во втором — не помогут. Они хороши только в пограничной области, когда вид вклада каждого процесса в наблюдаемую зависимость, т. е. ядро соответствующего интегрального уравнения, точно известен, а погрешности измерений достаточно малы. Это объясняет, почему регулярные методы, несмотря на свои преимущества, не получили повсеместного распространения, хотя их математический аппарат разработан 40 лет тому назад. Но метод квазиупругого светорассеяния — именно тот пограничный случай. И регулярные методы обработки, несколько лет назад попав в поле зрения исследователей, работающих в этой области, начали стремительно внедряться в повседневную практику.

Машинные и модельные эксперименты. Машинные эксперименты необходимы как для выбора параметров сглаживания, так и для проверки всего алгоритма решения обратной спектральной задачи. Они проводятся следующим образом: задается произвольная функция распределения $A(\Gamma)$; вычисляется теоретический спектр по формуле (3.5) и добавляется фон: генерируется случайная последовательность чисел с нормальной функцией распределения, играющих роль ошибок измерения, и определяются «экспериментальные» значения $\bar{I}_i$; эти значения используются как исходный материал для алгоритма решения обрат-

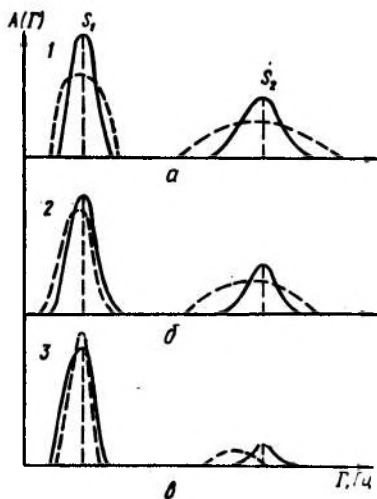


Рис. 16. Восстановление бимодального распределения с различными соотношениями вкладов в рассеяние крупных (S_1) и мелких (S_2) частиц: а — $(S_1/S_2)_{\text{ист}} = (S_1/S_2)_{\text{восст}} = 1$; б — $(S_1/S_2)_{\text{ист}} = 3$, $(S_1/S_2)_{\text{восст}} = 3,06$; в — $(S_1/S_2)_{\text{ист}} = 5$, $(S_1/S_2)_{\text{восст}} = 5,08$; ист — истинное (сплошные линии), восст — восстановленное (пунктирные линии) соотношение

ной спектральной задачи. Полученное решение сопоставляется с заданным.

Разумеется, используемые для анализа реальных данных алгоритмы испытаны в большом количестве машинных экспериментов. Это необходимо для того, чтобы понять, какой характер носит осуществляемое алгоритмом сглаживание. Мы здесь приведем только несколько примеров из нашей практики, совершенно аналогичных результатам других авторов.

На рис. 14 показано, как восстанавливается широкая функция распределения, состоящего из двух перекрывающихся гауссианов, при разных погрешностях. Картина восстановления бимодального распределения приведена на рис. 15. Видно, что, во-первых, в соот-

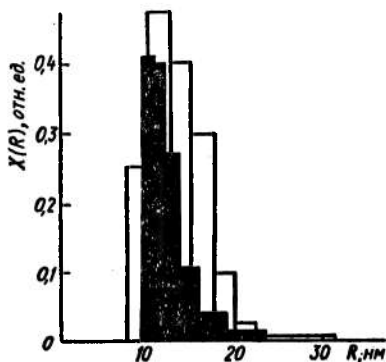


Рис. 17. Гистограмма распределения по размерам фосфолипидных везикул по данным квазиупругого светорассеяния (темные столбцы) и электронной микроскопии (метод замороженных сколов, светлые столбцы) (по [45]).

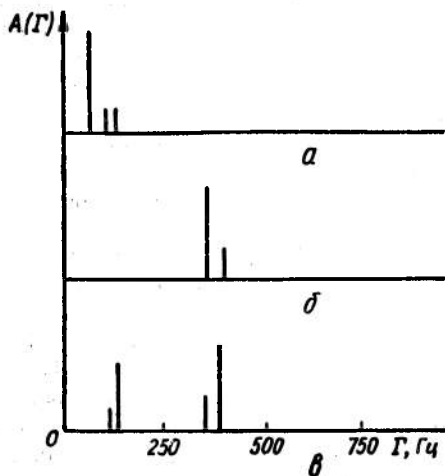


Рис. 18. Восстановление функции распределения модельных систем (по [46]):

a — монодисперсный латекс с $d = 315$ нм, *б* — $d = 75$ нм, *в* — смесь этих латексов

ветствии с рассуждениями в предыдущем подпараграфе детальность восстановления распределения медленно увеличивается с ростом точности. Во-вторых, реальная точность спектральных измерений (на уровне 1 %) позволяет разделить вклады узких распределений частиц, если диффузионное уширение рассеянного на них света различается более чем в два раза, а интегральные вклады в рассеяние — одного порядка. Как зависит восстановление бимодального распределения, если вклады двух фракций различны, иллюстрирует рис. 16.

Машинное тестирование позволяет проверить алгоритм решения обратной спектральной задачи. Но каждому исследователю, естественно, хочется убедиться, что реалии эксперимента не приводят к каким-то непредвиденным осложнениям. С этой целью, как и при отработке любой другой методики, проводятся модельные эксперименты, т. е. эксперименты на системах, свойства которых точно известны или могут быть надежно определены независимым методом. Результаты одного из таких экспериментов представлены на рис. 17. Это функция распре-

деления везикул — бислойных фосфолипидных пузырьков — по размерам.

Другой эксперимент был поставлен для демонстрации возможности восстановления бимодального распределения. С этой целью исследовались растворы двух достаточно монодисперсных латексов с диаметрами 75 и 315 нм и концентрациями, подобранными так, чтобы выровнять интенсивности рассеиваемого ими света, и смесь этих растворов. Результаты восстановления функции распределения по диффузионным уширениям всех трех систем приведены на рис. 18. Разумеется, и в конкретных исследованиях результаты восстановления функции распределения частиц по коэффициентам диффузии нередко можно сопоставить с данными других методов и лишней раз убедиться в правильности применяемой обработки. Примеры таких сопоставлений приведены в следующей главе.

ГЛАВА ТРАНСЛЯЦИОННАЯ 4 ДИФФУЗИЯ

Многие физические методы, связанные с задачами биологии, нацелены на определение таких параметров объекта, как его молекулярная масса, размер, форма. Среди этих методов корреляционная спектроскопия квазиупруго рассеянного света заняла к настоящему времени прочное место в качестве стандартного способа измерения коэффициента диффузии, а значит, и размера, в некоторых случаях — и формы рассеивающих частиц. Репутацию этому методу создали его высокая точность, экспрессность и не возмущающий исследуемую систему характер измерений. В табл. 1 (не претендующей на полноту) приведено сопоставление этого способа определения размеров с многочисленными другими.

Уширение спектра лазерного света, рассеянного на диффундирующих сферических частицах полистирольного латекса, впервые наблюдали Камминс и соавт. [99] в 1964 г. Началом использования метода для анализа биологических систем можно считать 1967 г., когда Дубин и соавт. [103] опубликовали данные по коэффициентам диффузии сывороточного альбумина, овальбумина, лизоцима, вируса табачной мозаики (ВТМ) и ДНК. В 1969 г. Камминс и соавт. [100] сообщили о новых, более точных определениях коэффициентов диффузии ВТМ.

К моменту открытия первой школы по корреляции фотонов в 1973 г. методом квазиупругого рассеяния света были определены диффузионные константы 45 биополимеров и вирусов [48]. В 1976 г. во время работы второй школы было сообщено, что в период с 1973 по 1976 г. по данному вопросу опубликовано 194 статьи, содержащих в основном результаты определения коэффициентов трансляционной диффузии отдельных белков, вирусов и полимеров [101]. А в последующее десятилетие квазиупругое рассеяние света стало основным методом определения гидродинамических размеров различных биологических объектов.

В табл. 1 не приводятся данные о концентрационной чувствительности различных методов. Между тем эта чувствительность очень важна, поскольку основной трудностью часто является не сам анализ, а наработка нужного количества биологического материала. Для корреляционной спектроскопии биологических объектов указать необходимое количество вещества трудно, поскольку сами объекты существенно различаются по рассеивающей способности. Ориентировочную оценку все-таки сделать можно. Как показывает опыт, белки низкой молекулярной массы (~ 10 кД) могут изучаться в концентрациях 2—5 мг/мл

при объеме образца $\sim 0,1$ мл. Для макромолекул большего размера и надмолекулярных структур необходимые массовые концентрации оказываются значительно меньшими.

В настоящей главе квазиупругое рассеяние света выступает в роли точного диффузиометрического метода, охватывающего широкий круг объектов. Ясный физический смысл, строгое теоретическое обоснование метода и простота измерительной процедуры слишком увлекли экспериментаторов, заставив их на какое-то время забыть о других потенциальных возможностях корреляционной спектроскопии. Поэтому

Т а б л и ц а 1. Сравнительная характеристика методов определения размеров частиц

Метод	Диапазон определяемых размеров, нм	Относительная точность, %	Время единичного эксперимента	Необходимость калибровки	Сохранение нативности образца
Хроматография (аналитическая)	$<10^2$	5	Десятки минут	Да	Не всегда
Электронная микроскопия	$>1,0$	5	Часы	»	Нет
Диффузометрия	$10-10^2$	5—10	Десятки минут	Нет	Да
Вискозиметрия	$10-10^3$	10	Минуты	Да	»
Седиментация	$10-10^2$	5	Часы	Нет	Не всегда
Индикатрисное светорассеяние	>10	10	Десятки минут	»	Да
Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей	$1,0-10^2$	1	Часы	»	»
Рассеяние тепловых нейтронов	$0,5-10$	1	Сутки	»	Не всегда
Квазиупругое рассеяние света	$>1,0$	1	Минуты	»	Да

в настоящее время именно измерению коэффициентов трансляционной диффузии посвящено большинство работ с использованием квазиупругого светорассеяния. В дальнейшем мы попытаемся показать гораздо более широкие возможности метода, но, следуя сложившейся традиции, изложение фактического материала начнем с анализа результатов определения диффузионных констант.

Простейший вариант такого эксперимента — это измерение коэффициента диффузии монодисперсных частиц. К счастью, многим биологическим объектам органически присуща монодисперсность, и в § 4.1 приведены многочисленные приложения корреляционной спектроскопии, не требующие сложной математической обработки результатов.

Однако точность определения коэффициента диффузии очень зависит от качества образца и редко бывает выше 1—3 %. Применение более сложных методов математического анализа спектров рассеянного света (см. гл. 3) помогает учесть наличие в образце посторонних рассеивателей. А во многих случаях сама исследуемая система полидисперсна, и ее состав или распределение частиц по размерам представляют основной интерес. Использование метода квазиупругого светорассеяния для

решения таких вопросов стало по-настоящему возможно с появлением регулярных процедур решения обратной спектральной задачи. Проблема анализа полидисперсности занимает одно из центральных мест в обсуждаемой методике, и мы рассмотрим ее практические аспекты в § 4.2. Очень эффективной оказывается спектроскопия квазиупруго рассеянного света в тех случаях, когда нас интересует не абсолютное значение коэффициента диффузии, а его изменение под действием внешних факторов. Если такая модификация возможна без изготовления нового образца, могут быть зарегистрированы изменения коэффициента диффузии на доли процента, что намного меньше погрешности измерения самого этого коэффициента. В § 4.3 мы приведем примеры исследований, в которых используется именно это полезное свойство метода.

Нам хотелось бы подчеркнуть, что обсуждаемые в этой главе работы приведены вовсе не по значимости их результатов, а только для иллюстрации возможностей и особенностей использования корреляционной спектроскопии в биологии. Поэтому мы, как правило, опускаем интерпретацию полученных результатов. Мы не пытаемся также дать полный обзор работ, выполненных этим методом. Цель настоящей главы — на конкретных примерах познакомить читателя с типичными исследованиями, которые могут быть осуществлены с помощью спектроскопии квазиупруго рассеянного света.

§ 4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОНОДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ

Гидродинамический размер. Начнем с анализа простейшей ситуации, которая представляет интерес и сама по себе, и как отправная точка для анализа более сложных систем. Пусть в рассеивающем объеме содержатся идентичные сферические рассеиватели. Корреляционная функция рассеянного на них света и ее фурье-образ — спектр определяются формулами (3.3) и (3.1). В выражении как для корреляционной функции, так и для спектра фигурирует параметр, характеризующий ширину спектрального контура — диффузионное уширение Γ ; этот параметр часто будет называться просто полушириной спектра. При обсуждении корреляционных функций чаще употребляют термин «время корреляции» Γ^{-1} .

Измеряя значение частоты, на которой амплитуда спектра уменьшается в два раза по сравнению с амплитудой на нулевой частоте, или время, за которое корреляционная функция уменьшается в e раз, мы получаем величину Γ , а затем, зная угол рассеяния θ , длину волны λ падающего на исследуемую систему света и показатель преломления n среды, находим коэффициент трансляционной диффузии D по формуле

$$D = \Gamma/q^2, \quad (4.1)$$

где $q = 4\pi \frac{n}{\lambda} \sin \theta/2$.

Если заранее известно, что рассеиватели находятся только в трансляционном движении, то достаточно измерить спектр в любом угле рассеяния, чтобы определить коэффициент диффузии D . Но если характер

динамического поведения изучаемых объектов не известен, необходимо определить угловую зависимость полуширины спектра Γ . Зависимость типа $\Gamma = Dq^2$ является решающим аргументом в пользу чисто диффузионного механизма спектрального уширения. Для иллюстрации приведем вид спектра, корреляционной функции и угловой зависимости Γ для сферических монодисперсных частиц (рис. 19).

Комбинируя выражение (4.1) с формулой Стокса — Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (4.2)$$

где η — вязкость раствора; k_B — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; R_h — радиус частицы, получим

$$\Gamma = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} q^2. \quad (4.3)$$

Например, для частиц, находящихся в воде при температуре 20°C , для $\lambda = 632,8$ нм (гелий-неоновый лазер) формула (4.3) принимает вид

$$\Gamma = \frac{49\pi \sin^2(\theta/2)}{R_h}, \quad (4.4)$$

где R_h выражен в микрометрах.

Под величиной R_h следует понимать «эффективный гидродинамический радиус», который, строго говоря, никогда точно не соответствует размерам рассеивающей частицы. Для сферических рассеивателей гидродинамический радиус обычно несколько больше, чем геометрический размер «сухой» частицы, вследствие возникновения оболочки из молекул растворителя, увлекаемых рассеивающей частицей. Это отличие было понято относительно давно и явилось основой для ряда экспериментов по определению степени сольватирования и гидратирования сферических частиц [33, 82, 196]. Если форма частицы не сферическая, соотношение (4.2) следует рассматривать как определение гидродинамического радиуса. При этом возникает необходимость связать последний с реальной формой частицы, т. е. фактически вычислить ее коэффициент трансляционной диффузии. Аналитически это удается сделать лишь для эллипсоида. В частности, для вытянутого эллипсоида вращения [54] с отношением осей $p = \frac{b}{a}$ (a и b — большая и малая полуоси эллипсоида соответственно)

$$\left. \begin{aligned} D &= \frac{k_B T}{6\pi\eta a} H(p) \\ H(p) &= (1 - p^2)^{-1/2} \ln \frac{1 + (1 - p^2)^{1/2}}{p} \end{aligned} \right\}. \quad (4.5)$$

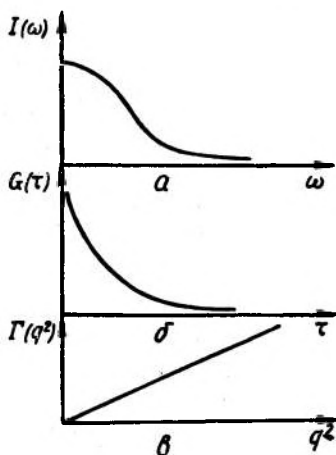


Рис. 19. Спектр (а), корреляционная функция (б) и угловая зависимость Γ (в) для монодисперсных сферических частиц

Из формулы (4.5) видно, что коэффициент диффузии для эллипсоида всегда меньше, чем для сферы того же объема; это дает дополнительные возможности определения формы несферических рассеивателей. Если модель эллипсоида неадекватна, приходится проводить численные расчеты. Методы и результаты расчетов гидродинамических радиусов частиц разной формы можно найти в литературе [230, 235]. В случае объектов очень сложной формы, когда невозможно рассчитать силу Стокса, можно провести измерения на масштабных моделях [128]. Когда же нас интересует не столько размер частиц, сколько изменения его под действием каких-то факторов, R_h — сам по себе вполне удобная характеристика объекта.

Важным преимуществом корреляционной лазерной спектроскопии является большой диапазон доступных измерению размеров. На основании имеющихся литературных источников можно утверждать, что размеры практически всех объектов молекулярной биологии охвачены этим диапазоном. Так, в работе [169] исследованы три компонента желчи из печени собаки, наименьший из которых 1α имел размер 0,85 нм; другие авторы [170] изучали сперматозоиды с $R_h \sim 30$ мкм. Верхний предел размеров обусловлен лишь соображениями целесообразности исследований такого типа по сравнению с прямым визуальным наблюдением. Минимальные же размеры приближаются к величинам, типичным для обычных молекулярных жидкостей, где применяются прекрасно разработанные интерферометрические методы спектроскопии: неудивительно поэтому, что интерферометрия обсуждается как пограничная физическая методика на одной из школ по квазиупругому светорассеянию [11].

Какова численно связь полуширины спектра или корреляционной функции с размером рассеивающего объекта? Приведем пример. Пусть источником излучения служит аргоновый лазер, генерирующий на наиболее интенсивной линии ($\lambda = 488$ нм), угол наблюдения рассеяния $\theta = 90^\circ$, образец — сферические частицы в воде при 20°C . Полуширина полученного гетеродинного спектра составляет 50 Гц. Входящие в выражение (4.3) величины: $\lambda = 488$ нм $= 4,88 \cdot 10^{-5}$ см; $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$ Дж $\cdot$ К $^{-1}$ — постоянная Больцмана; $n = 1,33$ — показатель преломления воды при 20°C ; $\eta = 1$ сП $= 10^{-3}$ кг $\cdot$ м $^{-1}$ $\cdot$ с $^{-1}$; $\sin \theta/2 = \sin 45^\circ = \sqrt{2}/2$; $20^\circ\text{C} = 293$ К; $q^2 = \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta/2 \right)^2$ см $^{-2} = 5,86 \cdot 10^{10}$ см $^{-2}$; $D = 5,36 \cdot 10^{-9}$ см ^{2} $\cdot$ с $^{-1} = 5,36 \cdot 10^{-13}$ м ^{2} $\cdot$ с $^{-1}$; $R_h = 4,005 \cdot 10^{-7}$ см $= 400,5$ нм. Если все названные выше условия эксперимента не меняются, связь между полушириной спектра в герцах (с $^{-1}$) и гидродинамическим радиусом в нанометрах такова:

$$R_h = \frac{40\,045}{\Gamma_{\text{гом}}} = \frac{20\,022}{\Gamma_{\text{гет}}}.$$

К настоящему времени количество измеренных методом квазиупругого рассеяния света диффузионных констант столь велико, а условия измерений столь разнообразны, что необходима унификация получаемых коэффициентов диффузии. Принято все измеренные коэф-

коэффициенты диффузии корректировать так, чтобы они соответствовали температуре 20 °C и вязкости воды при этой температуре. Тогда скорректированное значение любого коэффициента диффузии

$$D_{20,w} = \frac{\eta \cdot 293,15}{\eta_{20,w} T} D,$$

где $\eta_{20,w}$ — вязкость воды при 20 °C.

Таким образом, вне зависимости от условий эксперимента

$$R_h = \frac{2,12 \cdot 10^{-6}}{D_{20,w}},$$

где $D_{20,w}$ измеряется в единицах СГС ($\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), R_h — в нанометрах.

Точность определения размеров и влияющие на нее факторы. Ни одна измерительная процедура не может считаться корректно описанной, если не дан ответ на вопрос о погрешности измерений. Для количественной оценки точности определения размеров рассеивателей с помощью корреляционной спектроскопии прежде всего нужно выявить все источники возможных ошибок. Их несколько. Во-первых, существуют систематические ошибки, обусловленные спецификой самого корреляционного анализа фототока. К ним относятся конечность разрядности АЦП, конечность длительности реализации и объема выборки, ограничивающие полосу обзора и разрешение прибора, приближенность вычислительного алгоритма, амплитудно-частотные искажения сигнала. Во-вторых, статистическая погрешность (см. § 1.2), которая тем меньше, чем больше полное время измерений. Но основной вклад в погрешность методики обусловлен причинами, которые невозможно ни строго учесть, ни полностью устранить. Это — «неидеальность» образца и нестабильность условий проведения эксперимента. Ошибки, вносимые самим образцом, требуют особого внимания.

Для оптических экспериментов вопрос подготовки образца к исследованиям имеет первостепенное значение. Речь идет не только об очевидном, но исключительно важном вопросе обеспыливания (к нему придется еще не раз возвращаться), но и о полидисперсности, наличии межчастичного взаимодействия. Последняя трудность в значительной степени устраняется за счет разбавления, однако концентрационная чувствительность метода конечна, и, кроме того, с разбавлением возрастает влияние постороннего загрязнения системы.

Именно с перечисленными, плохо контролируруемыми источниками систематических ошибок связаны практические ограничения точности определения размеров биообъектов. В качестве своеобразного «рекорда» точности приведем результаты исследования [76] процесса разборки 30S-субъединиц рибосом в двух различных буферных растворах (табл. 2). Как видим, точность определения размеров субъединиц на уровне 0,5 %, а весь эффект — 20 %. Большинство же авторов склонны к менее оптимистичным оценкам. По-видимому, достаточно легко достижима точность определения размеров монодисперсных образцов на уровне 1 %.

Всякий экспериментатор не прочь лишний раз убедиться в возможностях метода, испробовав его на хорошо известной модели. Идеаль-

ной моделью для квазиупругого рассеяния света является суспензия идентичных сферических рассеивателей. Из реальных объектов наиболее близка к такому идеалу суспензия монодисперсного полистирольного латекса. Размер латексных частиц определяется технологией его получения и всегда может быть надежно проконтролирован с помощью электронной микроскопии, так как сплошные однородные сферические частицы полистирола устойчивы к артефактам подготовки образцов для электронно-микроскопического анализа.

Калибровочные измерения позволяют выявить и устранить систематические ошибки, вносимые измерительным трактом, подобрать опти-

Таблица 2. Изменение коэффициента трансляционной диффузии в процессе «разборки» 30S-субъединиц рибосом

Образец	$D_{20}, \omega, 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	
	LM-буфер	ТМК-буфер
16S RNA	$1,77 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,01$
30S RNA	$1,97 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,02$
S5 + 16S RNA	$1,77 \pm 0,03$	$1,96 \pm 0,01$
S4—16S RNA	$1,88 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,03$
S7—16S RNA	$1,83 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,01$
S8—16S RNA	$1,95 \pm 0,01$	$2,04 \pm 0,02$
S15—16S RNA	$1,83 \pm 0,01$	$2,09 \pm 0,03$
S4, S7—16S RNA	$1,94 \pm 0,01$	$2,07 \pm 0,03$
S4, S8—16S RNA	$1,84 \pm 0,01$	$2,16 \pm 0,01$
S4, S15—16S RNA	$1,92 \pm 0,01$	$2,10 \pm 0,02$
S8, S15—16S RNA	$1,90 \pm 0,01$	$2,04 \pm 0,03$
S4, S7, S8, RNA	$2,01 \pm 0,01$	$2,15 \pm 0,01$

мальное время накопления спектра или корреляционной функции. На рис. 20 показаны спектры света, рассеянного 0,01 %-ным раствором монодисперсного полистирольного латекса с диаметром частиц 152 нм, снятые с различным временем накопления. Если за 0,1 с накапливался спектр, имеющий ярко выраженный случайный характер, то за 51 с спектр регистрировался со среднеквадратичной относительной ошибкой примерно в 4 %. Полуширина спектра для времени накопления 409,6 с равна (301 ± 6) Гц, чему соответствует гидродинамический диаметр частиц (152 ± 3) нм. На всех рисунках сплошными линиями показаны кривые, полученные подгонкой экспериментальных значений к лоренцевской кривой.

В тех случаях, когда заранее известно, что система монодисперсна, однолоренцевское (одноэкспоненциальное) приближение дает верное значение коэффициента трансляционной диффузии. Возникает вопрос, какие одномодальные распределения могут быть признаны «достаточно монодисперсными»? Модельные эксперименты показывают, что если дисперсия распределения сферических частиц по размерам не превышает 5 % величины среднего гидродинамического радиуса, вычисление последнего в однолоренцевском приближении не приводит к замет-

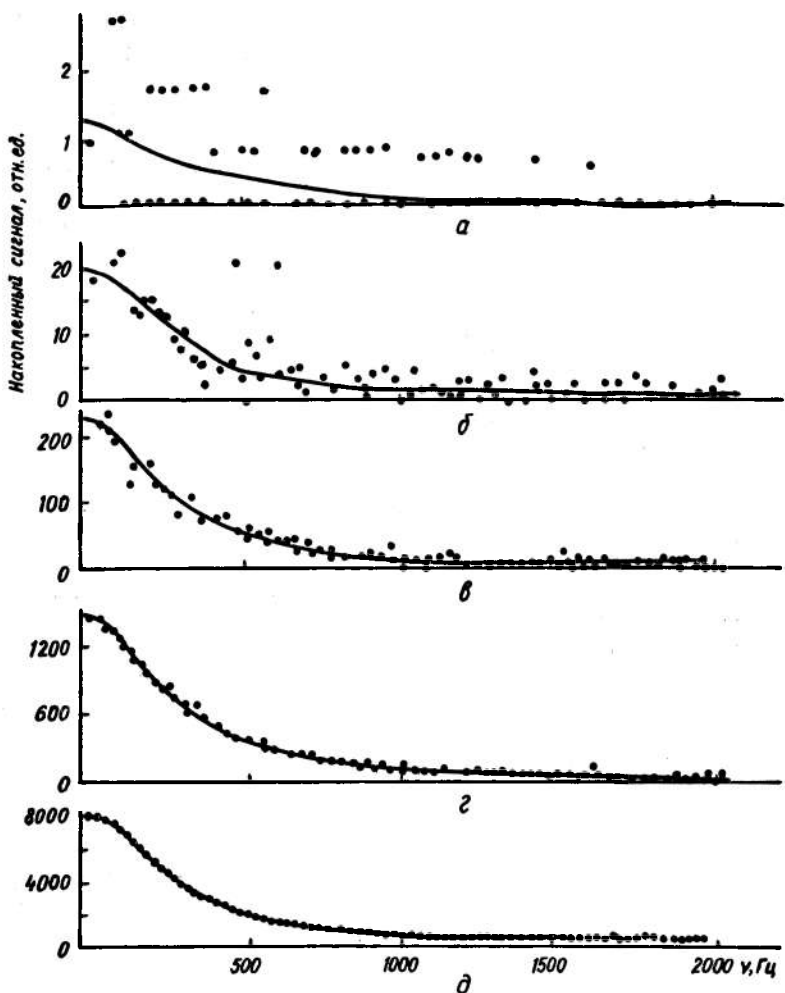


Рис. 20. Спектры света, рассеянного моносферным латексом ($d = 152$ нм), полученные при различном времени накопления:
 $a - t = 0,1$, $б - 0,7$, $в - 6,3$, $г - 51$, $д - 409,6$ с (по [33])

ному ухудшению результата. Разумеется, должны быть приняты меры по тщательной очистке образца от пыли и подбору концентрации, исключающей многократное рассеяние света. Сложнее обстоит дело для несферических частиц, размеры которых сравнимы с $1/q$. В этом случае в спектре или корреляционной функции появляется заметный вклад ориентационной (а для деформируемых частиц — и конформационной) динамики, и однолоренцевское или соответственно одноэкспоненциальное приближение перестает быть строго справедливым даже в абсолютно моносферной системе. Тем не менее оно оказывается достаточным при нахождении диффузионных констант таких биологи-

ческих объектов, как глобулярные белки, сферические вирусы, фаги, моноклональные антитела, транспортные РНК, некоторые клеточные суспензии.

Определение структуры объекта по сопоставлению гидродинамического радиуса и радиуса инерции. Сопоставление данных, полученных разными взаимодополняющими методами, дает возможность получить качественно новые сведения об объекте исследования. Это утверждение интересует нас в связи с возможностью сопоставления результатов спектроскопии квазиупругого рассеянного света и измерения угловой зависимости интенсивности светорассеяния — индикатрисы. Особенность сочетания именно этих методов заключается в том, что они могут быть использованы одновременно на одном и том же образце в одном эксперименте. Фактически речь идет о наиболее полном извлечении информации из эксперимента по квазиупругому светорассеянию. И хотя рассеянный свет не «чувствует» деталей внутренней структуры рассеивателей, если их размер мал по сравнению с длиной волны, сопоставление спектральных и индикатрисных измерений открывает возможность определения структурных параметров и в случае малых частиц [81].

Идея обсуждаемого подхода проста: по спектру квазиупругого рассеянного света можно найти гидродинамический размер R_h , а по индикатрисе — радиус инерции R_g (однородного) рассеивателя. И в R_h и в R_g некоторым конкретным образом, но по-разному, проявляется структура объекта, которая может быть охарактеризована отношением

$$\rho = R_g/R_h. \quad (4.6)$$

Естественно, зная ρ , однозначно восстановить структуру нельзя. Здесь возможен только модельный подход с его главным недостатком: одному и тому же ρ могут отвечать совершенно разные модели. И все же в ряде случаев, когда выбор модели может быть достаточно обоснован, обсуждаемый метод помогает определить ее параметры. Следует отметить, однако, что точность индикатрисных измерений быстро снижается с уменьшением размера частиц, так что в целом такое сопоставление может быть полезно лишь для объектов размером больше или порядка $\lambda/10$ [59]. До настоящего времени оно применялось в основном для изучения структуры полимеров [81, 134], в том числе — ДНК [143]. Добавочным осложняющим обстоятельством является полидисперсность образца, учет которой при таком сопоставлении совершенно необходим.

Безусловно, описанный подход к изучению структуры объекта не является чем-то универсальным. Даже в тех случаях, когда удастся получить соответствующую информацию, не следует переоценивать степень ее надежности, а тем более полноты. Но ясно, что такое сопоставление полезно и оправдано: ведь, как правило, спектрометры квазиупругого рассеянного света приспособлены к измерению угловых зависимостей, и, следовательно, индикатриса рассеяния может быть легко определена. Правда, для больших молекул приходится проводить измерения в очень малых углах, что сопряжено с определенными экспериментальными трудностями. Зато, измеряя интенсивность рассеяния вперед, можно определить и молекулярную массу рассеивателей [59].

Технические проблемы малоуглового рассеяния легко решаются. В настоящее время появились разработки [182], позволяющие полностью сочетать возможности спектральных и индикатрисных исследований в рамках единой оптической методики.

Белки. Первыми белками, попавшими в поле зрения корреляционной спектроскопии, были бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин и лизоцим. Работа Дубина и соавт. [103], в которой исследовались эти белки, не вызвала энтузиазма у биологов. Она вышла на заре развития метода (1967 г.), и для получения устойчивых спектральных характеристик потребовались концентрации в десятки миллиграммов на миллилитр. При таких концентрациях нельзя не учитывать межчастичное взаимодействие, и авторы не решились на оценку размеров макромолекул, а только привели полученные ими коэффициенты трансляционной диффузии. По мере совершенствования техники измерений концентрации, требуемые для анализа белковых растворов, снизились до вполне приемлемых, и корреляционная спектроскопия заняла ведущее место в диффузиометрии белков. Причем исследовались как глобулярные, так и фибриллярные белки, белковые фрагменты и белковые комплексы. Одновременно с накоплением новых данных изменялся и характер исследований — от работ, иллюстрирующих возможности метода, к работам с конкретно поставленными биологическими задачами. Общие вопросы квазиупругого рассеяния света белковыми растворами достаточно полно освещены в ряде обзоров [90, 91, 101].

Большинство оригинальных работ преследует, как правило, более высокие цели, чем простое определение коэффициента трансляционной диффузии. Однако для иллюстрации полезно привести значения коэффициентов трансляционной диффузии и соответствующих гидродинамических радиусов различных белков, найденных методом корреляционной спектроскопии. Табл. 3, в которой приведены эти данные, не претендует на полноту, однако, как нам кажется, отражает многообразие доступных методу белковых объектов.

Белковые объекты расположены в таблице в порядке возрастания коэффициента диффузии и соответственно — уменьшения гидродинамического радиуса. Для глобулярных белков гидродинамический размер близок к истинному размеру макромолекул. Для белков, форма которых сильно отличается от сферической, гидродинамический размер представляет весьма условную величину. В то же время коэффициент трансляционной диффузии является объективной физической характеристикой белковой частицы. Зависимость коэффициента диффузии от условий окружающей среды открывает возможности детектирования различных изменений микроструктуры частиц в растворе. К ним относятся агрегация, конформационные изменения, фермент-субстратные взаимодействия, термическая и химическая денатурация и пр.

Очень удобным оказалось использование метода при анализе белковых агрегатов. В частности, Лин и соавт. [157] определили размеры частиц более чем в десяти фракциях казеина из коровьего молока, полученных при различных условиях центрифугирования, а также вычислили ширину распределения частиц в каждой фракции. Эти же

Таблица 3. Коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический радиус белковых макромолекул

Объект	$D_T, 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$	Литературный источник
Гликопротеид Тамма — Хорсфала	$0,220 \pm 0,002$	$97,5 \pm 0,9$	[179]
Гликопротеид слизистой оболочки толстой кишки овцы	$0,238 \pm 0,006$	$90,1 \pm 0,23$	[48]
Эластин	0,51	42,0	[216]
Меромиозин (димер)	0,84	25,5	[83]
Гемоцианины (ГМЦ)			
<i>Archacatina marginata</i>	$1,00 \pm 0,01$	$21,4 \pm 0,2$	[48]
<i>Murex trunculus</i>	$1,03 \pm 0,01$	$20,8 \pm 0,2$	[216]
<i>Pila leopolduillensis</i>	$1,04 \pm 0,01$	$20,6 \pm 0,2$	[48]
α -ГМЦ виноградной улитки	$1,04 \pm 0,01$	$20,6 \pm 0,2$	[48]
β -ГМЦ виноградной улитки	$1,05 \pm 0,01$	$20,4 \pm 0,2$	[48]
моллюска фиссурелы	$1,03 \pm 0,01$	$20,8 \pm 0,2$	[48]
Меромиозин (мономер)	$1,24; 1,15; 1,11$	$17,6; 18,3; 19,3$	[83]
Меромиозин (мономер) *	$1,17; 1,19$	$18,3; 18,0$	[85]
LMM-меромиозин (стержень)	1,24	17,3	[83]
LMM-меромиозин (стержень) *	$1,41; 1,43$	$15,2; 15,0$	[234]
Легкий меромиозин (LMM)	1,89	11,4	[83]
Тяжелый меромиозин (НММ)	$1,90; 1,93$	$11,3; 11,1$	[111]
Фибриноген (человека)	$1,94; 1,98$	$11,2; 10,8$	[257]
Фибриноген (бычий)	$2,02; 2,40$	$10,6; 8,9$	[48]
α -Кристаллин	$2,20 \pm 0,02;$ $2,36 \pm 0,02$	$9,8 \pm 0,1;$ $9,1 \pm 0,1$	[48]
Большой фитохром Prf	$2,66 \pm 0,12$	8,1	[206]
РНК-полимераза	$2,70 \pm 0,15$	7,9	[48]
Фенилаланин-тРНК-синтетаза	$2,85 \pm 0,50$	7,5	[133]
Малый фитохром Pr **	$3,58 \pm 0,50$	5,0 (6,0)	[206]
Малый фитохром Prf **	$3,70 \pm 0,28$	4,9 (5,8)	[206]
Каталаза	$3,6 \pm 0,20$	$5,9 \pm 0,3$	[48]
Альдолаза	$3,8 \pm 0,20$	$5,6 \pm 0,3$	[48]
γ -Глобулин	$3,8 \pm 2,0$	$5,6 \pm 0,3$	[48]
I2S-глобулин	3,80	5,7	[217]
LMM-миозин, фрагмент S2	3,98	5,39	[83]
Лактоглобулин (октамер)	4,76	4,5	[216]
LMM-миозин, фрагмент S1	4,80	4,4	[83]
Бычий сывороточный альбумин (BCA) ***	$5,76 \pm 0,05$	3,7	[48]
G-Актин	$5,28; 6,10;$	$4,06; 3,52;$	[85]
α -Химотрипсин	6,11	3,5	[216]
Гемоглобин	$6,70 \pm 0,20;$ $6,90 \pm 0,30$	$3,2; 3,1$	[114]
Коллаген (мономер)	$7,20 \pm 0,16$	$3,0 \pm 0,2$	[141]
Лактоглобулин (димер)	7,38	2,9	[216]
α -Химотрипсиноген	$8,40 \pm 0,20$	2,55	[216]
Гистон (обогащенный лизином)	8,50	2,50	[86]
BCA (мономер)	$10,20 \pm 0,20$	2,09	[216]
Лизоцим	$10,60 \pm 0,10$	2,02	[216]
LMM-меромиозин, фрагмент S1	11,30	1,90	[216]
α -Лактоглобулин	13,40	1,6	[104]
α -Компонент желчи	25,20	0,85	[169]

* Рассчитано на основании моделей.

** В скобках — расчет по значению коэффициента диффузии.

*** В изoeлектрической точке (pH 5,0—2,0).

авторы, используя диффузиометрические измерения, исследовали влияние ионов кальция на структуру мицелл казеина [158]. Подробное исследование отдельных фракций мицелл из снятого молока было проведено Гриффином и Андерсоном [117]. В полученных разделением с помощью колоночной хроматографии 30 фракциях обнаружено плавное распределение размеров частиц (рис. 21). Так как электронно-микроскопическое исследование мицелл казеина не оставляет сомнений в том, что их форма очень близка к сферической, на основании данных по ква-

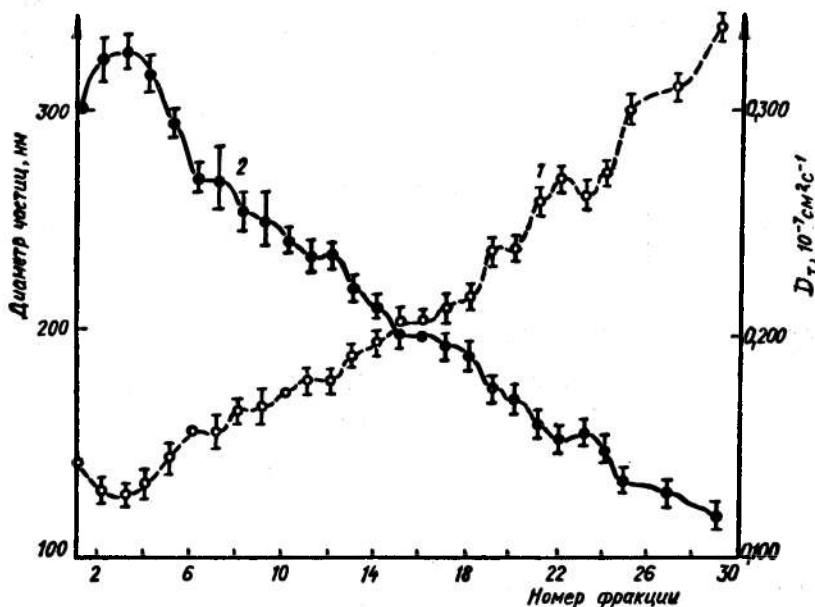


Рис. 21. Коэффициент трансляционной диффузии и размер мицелл казеина (по [117]).

зиупругому рассеянию света удастся построить точную функцию распределения мицелл по размерам.

Не менее успешно используется метод и в противоположной ситуации при анализе отдельных фрагментов крупных молекул. В качестве такого примера рассмотрим важнейший мышечный белок — миозин, в структуре которого выделяют субъединицы: тяжелый меромиозин (*HMM*), легкий меромиозин (*LMM*), фрагменты *S1* и *S2*. На эти субъединицы он расщепляется протеолитическими ферментами трипсином и папаином; каждый фрагмент может быть выделен и исследован в отдельности. При определенных условиях могут связываться две молекулы миозина, образуя устойчивый димер.

В табл. 4 приведены результаты измерения коэффициентов диффузии миозина, его фрагментов, димера и соответствующие гидродинамические радиусы [85, 132, 234]. Поскольку структура миозина хорошо известна, были проведены также численные расчеты коэффициента диффузии мономера и нескольких фрагментов.

Можно было бы привести еще множество примеров подобных исследований белковых систем. Однако вряд ли это добавит что-нибудь существенное к уже сказанному. Такие работы выполняются в настоящее время на стандартном оборудовании, их качество и научная или практическая значимость целиком определяются качеством приготовления и значимостью исследуемой системы. Подчеркнем, однако, что определение абсолютных значений D и попытки получения структурной информации на этой основе — занятие, видимо, не слишком благодарное, хотя подчас и необходимое. Проще и, главное, интереснее использовать обсуждаемый метод для детектирования и определения характера изменений белков под действием различных внешних факторов. Так, с

Т а б л и ц а 4. Коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический радиус мономера, димера и отдельных субъединиц миозина

Фрагмент	$D_T, 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$		$R_h, \text{ нм}$
	Экспериментальные данные	Теоретические работы	
Мономер	1,15; 1,24; 1,11	1,17; 1,19	17,6; 19,3; 18,3
Димер	0,84	—	25,5
<i>HMM</i>	1,90; 1,93	1,68	11,3; 11,1
<i>LMH</i>	1,89	—	11,35
<i>S1</i>	11,3; 4,8	5,76	1,9; 4,4
<i>S2</i>	3,98	—	5,4
Стержень	1,24	1,41; 1,43	17,3

помощью спектроскопии квазиупругого рассеяния света легко установить факт денатурации в биополимерах при различных внешних воздействиях. Например, при повышении концентрации гуанидин-хлорида в растворе лизоцима от 0,2 до 5 М коэффициент трансляционной диффузии уменьшается от $(10,6 \pm 0,1)$ до $(7,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \times \text{с}^{-1}$. Таким образом, эффективный гидродинамический радиус денатурированного белка оказывается на 45 % больше, чем нативного [104]. По нашим данным, применение того же химического денатуранта к бычьему α -лактальбумину в концентрации 6,4 М приводит к увеличению гидродинамического диаметра от $(3,23 \pm 0,1)$ до $(4,82 \pm 0,15)$ нм. Большим преимуществом метода является то, что с его помощью устанавливается не только сам факт денатурации, но и относительная величина происшедших в структуре изменений. В частности, при термической денатурации того же лизоцима (нагревание от 20 до 60 °C) его гидродинамический радиус изменяется от 1,85 до 2,18 нм, т. е. увеличивается всего на 18 % [177]. Метод квазиупругого светорассеяния позволяет наблюдать и более тонкие эффекты, например зависимость процесса термической денатурации от ионной силы (табл. 5).

Важно подчеркнуть, что хотя вследствие несовершенства образца точность определения абсолютного значения коэффициента диффузии

редко превышает несколько процентов, точность, с которой могут быть зафиксированы изменения этого коэффициента в одном и том же образце под действием внешних факторов, значительно выше и может составлять доли процента. Например, в работе [206] найдены коэффициенты трансляционной диффузии для растительных белков — большого и

Т а б л и ц а 5. Отношение K гидродинамических радиусов денатурированного и нативного белков при различных ионных силах (по [177])

Белок, мг/мл	Молярная концентрация [Cl ⁻]	K
Лизоцим, 5—10	0,20	1,18
	0,03—0,08	1,14
	0,01	1,10
Рибонуклеаза, 5	0,15	1,18
	0,01	1,07
Химотрипсиноген, 25	0,01	1,18

малого фитохрома, которые имеют ряд форм, превращающихся одна в другую при поглощении света определенной длины волны. И хотя отличие коэффициентов диффузии у различных форм порядка 1 %, авторы считают его достаточным для идентификации той или иной формы по значению коэффициента трансляционной диффузии (табл. 6). Конечно, наблюдать такие небольшие изменения достаточно трудно, однако в подобных случаях прецизионный диффузиометрический анализ с помощью спектроскопии квазиупругого светорассеяния может оказаться единственным прямым методом детектирования изменений в молекулярной структуре.

Нуклеиновые кислоты. В отличие от белков, которые, естественно, аппроксимируются моделью жестких глобулярных частиц, ДНК, как и синтетические полимеры, является сильно флуктуирующим объектом. С другой стороны, благодаря большой персистентной длине, двухцепочечные ДНК, даже не очень большой молекулярной массы, образуют в водно-солевом растворе клубки большого размера, сравнимого с длиной волны света. Эти два обстоятельства требуют от исследователя определенной осторожности при интерпретации спектра света, квазиуп-

Т а б л и ц а 6. Коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический размер большого и малого фитохромов (по [206])

Форма фито- хрома	$\lambda_{\text{погл.}}$ нм	$D, 10^{-7} \text{ см}^2 \times$ $\times \text{ с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$
Большой фитохром			
I Pr	660	$2,67 \pm 0,13$	8,0
$\downarrow$ Prf		$2,65 \pm 0,12$	8,1
II Prf	730	$2,66 \pm 0,12$	8,1
$\downarrow$ Pr		$2,65 \pm 0,05$	8,1
III Pr	660	$2,70 \pm 0,20$	7,9
$\downarrow$ Prf		$2,57 \pm 0,17$	8,3
$\downarrow$ Pr		$2,67 \pm 0,09$	8,0
Малый фитохром			
IV Pr	660	$3,58 \pm 0,50$	5,0 (6,0) *
$\downarrow$ Prf		$3,70 \pm 0,28$	4,9 (5,8) *

* В скобках — значения, рассчитанные нами по коэффициенту диффузии.

ругие ДНК, даже не очень большой молекулярной массы, образуют в водно-солевом растворе клубки большого размера, сравнимого с длиной волны света. Эти два обстоятельства требуют от исследователя определенной осторожности при интерпретации спектра света, квазиуп-

руго рассеянного раствором таких объектов. Причина заключается в том, что в этот спектр существенный вклад может внести внутренняя динамика и коэффициент трансляционной диффузии будет определен неправильно. Влияние флуктуаций в полимерном клубке на спектр рассеянного света последовательно рассматривается в гл. 7, где показано, что характерный для чисто трансляционного броуновского движения рассеивателей закон $\Gamma = Dq^2$ не выполняется. В § 1.3 мы убедились, что при $qR \ll 1$ вклад флуктуаций форм-фактора несуществен. Оказывается, что при таких q время $(Dq^2)^{-1}$ переноса центра тяжести частиц на расстояние порядка $1/q$ намного больше, чем все времена релак-

Т а б л и ц а 7. Коэффициент трансляционной диффузии и молекулярная масса ДНК различного происхождения

Происхождение ДНК	$D, 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Молекулярная масса, МД	Литературный источник
Тимус теленка	1,9	15	[211]
	2,23	3,75	[143]
<i>ColE1</i> (плазмидная)			
суперспирализованная	2,89	—	[246]
кольцевая линейная	2,45	4,6	[246]
	1,98	—	[222]
	2,16	—	[222]
Бактериофаг $\phi 29$	1,2—1,4	11,5	[232]
λ -фаг	0,64	32,5	[222]
Фаг T7	0,8	25	[27]
Бактериофаг fd	$0,663 \pm 0,18$	1,87	[176]

сации полимерного клубка. Таким образом, все флуктуации формы клубка успевают усредниться, и при $qR \ll 1$ следует ожидать чисто диффузионного характера спектрального уширения. Итак, определение коэффициента диффузии полимерного клубка большого размера возможно только при достаточно малых углах рассеяния. К ДНК, ввиду ее больших размеров, это относится в первую очередь. Надо сказать, что в последнее время ДНК привлекает исследователей именно как удобный объект изучения внутренней динамики. Тем не менее определение коэффициента диффузии ДНК может быть полезным и для исследования физических характеристик этой важнейшей молекулы, и как способ отслеживания структурных переходов в ДНК, ее плавления, денатурации и т. п. В настоящее время определены коэффициенты диффузии целого ряда ДНК различного происхождения. В табл. 7 приведены некоторые из этих значений.

На рис. 22 показана зависимость коэффициента диффузии ДНК от ее молекулярной массы. Теоретическая зависимость $D \sim M^{-0,5}$, характерная для гауссова клубка, наблюдается, как мы видим, в не слишком широком диапазоне молекулярных масс — от $4 \cdot 10^6$ до 40×10^6 Д. Определение коэффициента диффузии ДНК большого размера связано с необходимостью проведения измерений в очень малых углах. При молекулярной массе менее $4 \cdot 10^6$ Д число статистических сегмен-

тов в такой цепи оказывается меньше 20, и ее уже нельзя считать гауссовым клубком.

Все сказанное о трудностях определения коэффициентов диффузии высокомолекулярных ДНК в равной мере относится и к любым другим полимерам достаточно большой молекулярной массы. Поскольку этот вопрос, по-видимому, менее интересен для наших читателей, мы ограничимся лишь соответствующими ссылками [92, 173]. Говоря об изучении нуклеиновых кислот методом квазиупругого светорассеяния, нельзя также не упомянуть о довольно многочисленных работах, в которых исследовались конформационные изменения РНК и фрагментов ДНК [133, 204, 205, 211]. С методической точки зрения эти исследования никак не связаны со спецификой полимерных систем, и мы вернемся к ним в § 4.3 ограничившись здесь единственным, но типичным примером (табл. 8).

Надмолекулярные структуры и вирусы. Суспензии вирусных частиц представляют собой удобный объект для спектроскопии квазиупругого рассеяния света. Действительно, отсутствие конформационных изменений, практически полная идентичность рассеивателей, как правило, известная форма частиц — все это привело к тому, что именно вирусы оказались среди первых биологических объектов корреляционной спектроскопии. Естественно также, что ранние исследования проводились преимущественно с вирусами сферической формы, наиболее близкими к идеальной модели рассеивателей. Основными экспериментально определяемыми величинами почти во всех работах были, разумеется, коэффициент трансляционной диффузии и вычисленный в приближении Стокса — Эйнштейна гидродинамический радиус частиц. Поэтому, как и в разделе, посвященном белкам, мы вначале приве-

Таблица 8. Коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический радиус транспортной РНК (по [184])

Температура, °C	$D, 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$
17	$8,77 \pm 0,33$	$2,44 \pm 0,03$
40	$8,75 \pm 0,30$	$2,44 \pm 0,03$
58	$5,49 \pm 0,23$	$3,90 \pm 0,10$
70	$3,96 \pm 0,16$	$5,40 \pm 0,20$

дем наиболее характерные данные таких определений (табл. 9).

В табл. 9 приведены также электронно-микроскопические данные для радиуса частиц, хотя и не всех. Из этих данных видно существенное различие гидродинамических и электронно-микроскопических размеров у вирусов, несмотря на то, что многие из них имеют сферическую форму. Это свидетельствует о высокой степени гидратации вирусных

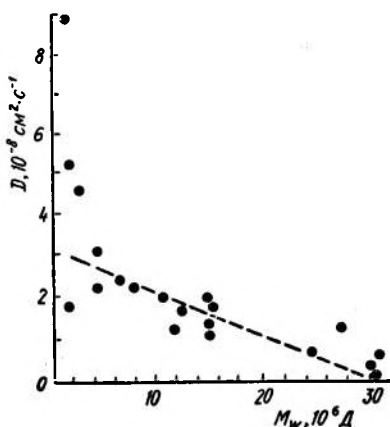


Рис. 22. Зависимость коэффициента диффузии ДНК от ее молекулярной массы (по [87])

преимущественно с вирусами сферической формы, наиболее близкими к идеальной модели рассеивателей. Основными экспериментально определяемыми величинами почти во всех работах были, разумеется, коэффициент трансляционной диффузии и вычисленный в приближении Стокса — Эйнштейна гидродинамический радиус частиц. Поэтому, как и в разделе, посвященном белкам, мы вначале приве-

частиц. Действительно, контрольные измерения латексных частиц (см. табл. 9) показали, что размеры электронно-микроскопического и гидродинамического радиусов практически совпадают. Следует отметить, что даже электронно-микроскопический размер вирусной частицы и близких ей по природе нуклеопротейдных конгломератов не дает

Т а б л и ц а 9. Коэффициент трансляционной диффузии, гидродинамический (R_h) и электронно-микроскопический (R_e) радиусы некоторых вирусов и сферических латексных частиц

Объект	$D_T, 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$	$R_e, \text{ нм}$	Литературный источник
Вирус RSV	0,285	75,0	40,0—50,0	[127]
BTM	$0,34 \pm 0,01$	62,9	—	[151]
Реовирус тип 3	0,445	49,0	37,5	[128]
PM2	$0,650 \pm 0,007$	32,9	—	[196]
T7	$0,644 \pm 0,007$	33,2	—	[82]
BSV	$1,246 \pm 0,013$	17,2	—	[196]
Q β	$1,423 \pm 0,014$	15,0	—	[82]
Вирус желтой мозаики репы (TUMV)	1,44	14,7	13,5	[127]
R17	$1,534 \pm 0,015$	14,0	—	[196]
Полистирольный латекс	0,181	118,0	117,0	[127]
	0,340	63,5	63,0	[127]
	0,475	45,0	45,5	[127]

полного представления о количестве «сухого» биологического вещества в ней, поскольку внутренние области этих структур также могут содержать воду. Однако опираясь на данные квазиупругого рассеяния света и электронной микроскопии и привлекая одновременно модельные представления, а иногда и эксперименты на крупномасштабных мо-

Т а б л и ц а 10. Коэффициент трансляционной диффузии, гидродинамический (R_h), электронно-микроскопический (R_e) и эквивалентный ($R_{\text{экв}}$) радиусы некоторых нуклеопротейдных частиц (по [128])

Объект	$D_T, 10^{-7} \text{ см}^2 \times \text{с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$	$R_e, \text{ нм}$	$R_{\text{экв}}, \text{ нм}$
Реовирус тип 3	0,44	48,2	38,0	32,8
Топ-компонент	0,44	48,2	38,0	31,5
Субвирусная частица	0,49	43,5	33,0	29,2
Ядерная нуклеопротейдная частица	0,61	35,0	26,0	23,1

делях, удастся определить подлинное содержание «сухого» вещества в частице [127, 128]. Данные одной из таких работ приведены в табл. 10. Обратим внимание на любопытный модельный эксперимент. Авторы изготовили 19-миллиметровую модель вирусной частицы, гидродинамические параметры которой они определили экспериментально, погру-

жая ее в глицерин. На основе этих измерений был рассчитан эквивалентный радиус «сухой» частицы.

Первоочередной задачей в экспериментах с биологическими структурами является, как правило, определение «молекулярной массы» частицы. Знание этой важной величины обычно укрепляет уверенность экспериментатора в том, что он работает именно с заданным объектом. Для определения молекулярной массы достаточно измерить гидродинамический размер и константу седиментации. Спектроскопия квазиупруго рассеянного света поменяла местами относительные трудности этих измерений. Теперь основное время затрачивается на измерение кон-

Таблица 11. Коэффициент трансляционной диффузии, гидродинамический радиус, константа седиментации и молекулярная масса некоторых биологических частиц

Объект	$D_T, 10^{-7} \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	$R_H, \text{нм}$	Константа седиментации S_0	Молекулярная масса, МД
Рибосомальные частицы (по [153])				
70S	$1,71 \pm 0,03$	$12,6 \pm 0,2$	$70,5 \pm 0,7$	$2,49 \pm 0,06$
50S	$1,90 \pm 0,03$	$11,3 \pm 0,2$	$50,2 \pm 0,5$	$1,55 \pm 0,04$
30S	$2,18 \pm 0,03$	$9,8 \pm 0,2$	$31,8 \pm 0,3$	$0,87 \pm 0,02$
Фрагменты хроматина — нуклеосомы (по [156])				
Фракция				
1	$0,598 \pm 0,05$	35,8	177 ± 5	$21,9 \pm 0,5$
2	$0,700 \pm 0,05$	30,5	145 ± 5	$15,3 \pm 0,5$
3	$0,783 \pm 0,05$	27,3	125 ± 5	$11,8 \pm 0,5$
Вирусы (по [196])				
R17	$1,534 \pm 0,015$	14,0	$78,9 \pm 1$	$4,02 \pm 0,17$
PM2	$0,650 \pm 0,007$	32,9	294 ± 3	$47,9 \pm 1,7$
T7	$0,644 \pm 0,007$	33,2	487 ± 5	$50,9 \pm 1,1$

станты седиментации, ибо при наличии корреляционной техники и лазера задача определения гидродинамического размера достаточно проста. В табл. 11 приводятся результаты измерений гидродинамического радиуса и константы седиментации ряда биологических частиц и вычисленные из этих измерений значения молекулярной массы.

По коэффициенту трансляционной диффузии часто можно судить о структуре комплексов биологических объектов. Например, было показано, что гистон F2A, связываясь с ДНК, образует плотную структуру, значительно компактизуя и саму ДНК [202]. В то же время гистон F1, связываясь с той же ДНК, образует разветвленную структуру. Это следует из сравнения коэффициентов трансляционной диффузии свободной ДНК ($0,16 \cdot 10^7 \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$) и комплексов гистон F1 — ДНК ($0,10 \cdot 10^7 \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$) и гистон F2A — ДНК ($0,26 \cdot 10^7 \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Уменьшение гидродинамических размеров при комплексообразовании не является для биологических макромолекул чем-то необычным. В качестве еще одного такого примера приведем данные [133], где методом квазиупругого рассеяния света анализировались комплексы

фенилаланин-тРНК-синтетазы с различными лигандами. В табл. 12 приведены коэффициенты трансляционной диффузии и гидродинамические размеры комплексов различного состава. Из этих данных следует, что ионы магния разрыхляют структуру фермента. Однако присоединение к этой разрыхленной структуре в качестве лиганда фенилаланиновой тРНК уплотняет ее до размера, меньшего, чем исходный.

Приведенные примеры достаточно убедительно показывают, какие возможности открывает корреляционная спектроскопия при исследо-

Т а б л и ц а 12. Коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический радиус комплексов фенилаланин-тРНК-синтетазы с различными лигандами (по [133])

Состав комплекса	$D_T \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	$R_h, \text{ нм}$
Чистый фермент	2,85	7,68
+10 мМ Mg^{2+}	2,40	9,13
+10 мМ Mg^{2+} + тРНКPhe	2,95	7,42
+20 мМ Mg^{2+} + тРНКTyr	2,49	8,59
+10 мМ Mg^{2+} + Phe	2,40	9,13
+10 мМ Mg^{2+} + тРНКPhe (дрожж.)	2,75	7,96

вании надмолекулярных биологических структур, даже если она используется в простейшем варианте — для измерения коэффициента трансляционной диффузии.

§ 4.2. АНАЛИЗ ПОЛИДИСПЕРСНОСТИ

Проблема полидисперсности в спектроскопии квазиупруго рассеянного света. Мы рассмотрели примеры изучения биологических систем, монодисперсных по своей природе, что очень упрощает процедуру обработки экспериментальных данных. Но многие важные объекты исследования полидисперсны. Во-первых, часто существуют взаимодействия в исходных монодисперсных системах, приводящие к появлению димеров, тримеров и т. д.; многие белковые системы вообще склонны к ассоциации или самосборке (как спонтанной, так и стимулированной). Во-вторых, естественные биологические жидкости (например, плазма крови) многокомпонентны. В-третьих, модельные системы, используемые в биологии, полидисперсны (например, суспензии везикул.) В-четвертых, интерес представляют продукты специфического взаимодействия исходных компонент при различного рода иммунологических реакциях. И наконец, огромный класс синтетических полимерных систем также требует анализа распределения по размерам.

Мы перечислили, конечно, далеко не все возможные причины полидисперсности. В результате многолетней совместной работы с биологами и многочисленных обсуждений задач, где спектроскопия квазиупругого светорассеяния может применяться, у нас сложилось четкое представление, что практически нет биологических систем, которым не была бы присуща полидисперсность. Зато есть большое их число, где этой

полидисперсностью можно пренебречь. Но какой ценой? К сожалению, заранее этого сказать нельзя, поскольку а priori никогда не известно, насколько действительно монодисперсен исследуемый образец. Ясно лишь, что лучше предполагать и учитывать полидисперсность, чем сразу ее игнорировать.

Большинство работ по определению размеров различных биологических объектов было выполнено до появления регулярных методов. В гл. 3 мы уже останавливались на корректной и относительно простой процедуре анализа полидисперсных систем — методе кумулянтов [152]. В настоящее время этот метод наиболее распространен; он оказывается достаточным для большинства исследований, в которых ставится задача определения средних характеристик. В принципе, определяя второй кумулянт, можно судить и о дисперсии распределения. Однако следует помнить, что и среднее, и дисперсия распределения $A(\Gamma)$ не соответствуют среднему и дисперсии функции распределения по размерам, которые можно восстановить только по заранее известной функции распределения. Лишь в случае узких распределений метод кумулянтов дает достаточно достоверные результаты. Если функция распределения достаточно хорошо известна, можно пользоваться методами прямой подгонки. Однако хорошо известной функция распределения бывает лишь у полимерных систем, для которых и выполнено большинство исследований с использованием подгоночных функций. Заметим, что при этом возникает лишь видимость большей по сравнению с регулярными методами точности анализа. Это доказывают примеры исследований, сопоставляющих разные методы обработки результатов измерений [28, 93].

Для сложных полидисперсных систем корректно угадать вид распределения, как правило, невозможно. Наибольшие успехи методов подгонки и кумулянтов относятся к анализу широкого класса монодисперсных систем в однолоренцевском приближении. По-видимому, одной из первых попыток подойти к анализу немонодисперсной системы явилась работа Герберта и Карлсона [132] по изучению самоассоциации миозина. В ней проводится анализ в двухлоренцевском приближении. Оправдание этому подходу авторы находят в том, что априорно предполагается наличие как мономерной, так и димерной формы миозина. Измеренные коэффициенты диффузии димера и мономера $1,24 \cdot 10^{-7}$ и $0,84 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Считая обе формы миозина палочками, авторы определили их длину — 148,1 и 212,7 нм. В этой же работе по угловой зависимости интенсивности рассеяния определены молекулярная масса и радиус инерции мономера миозина (46,0 нм), так что она является примером совместного изучения одного и того же объекта методом индикатрисного и динамического светорассеяния. Полученное соотношение R_g/L соответствует обсуждаемой в работе палочкообразной модели: $R_g/L = \frac{1}{\sqrt{12}}$.

Успешное применение двухлоренцевской аппроксимации при анализе спектров в цитированной работе является следствием правильного учета априорной информации. Но если анализ спектра не адекватен сложности изучаемой системы, полученные выводы могут оказаться

некорректными. При изучении растворов фибриллярного актина [112] с использованием однолоренцевского приближения обнаружено, что соответствующая полуширина спектров Γ линейно зависит от q^2 , но не стремится к нулю при $q \rightarrow 0$.

По мнению автора [112], угловая зависимость полуширины вида $\Gamma = Dq^2 + \tau^{-1}$ свидетельствует о наличии изгибных флуктуаций фибрилла актина, имеющих время релаксации τ . Однако вывод оказался артефактом однолоренцевского приближения. Анализ методом кумулянтов [84] не оставил сомнений в том, что источниками ошибочных выводов были полидисперсность фибриллярного актина и влияние вращательной диффузии фибрилла. В других исследованиях [17] с использованием регуляризации удалось продемонстрировать истинный вид функции распределения фибрилл по размерам.

Другим примером последовательного совершенствования результатов за счет улучшения процедуры анализа являются исследования казеина. В ранних работах, приведенных в § 4.1 [157, 158], авторы, располагая лишь возможностями однолоренцевского анализа, задались целью определить характер полидисперсности казеина в молоке. Для этого они расфракционировали с помощью гель-хроматографии всю систему на 30 фракций и, считая их монодисперсными, исследовали каждую в отдельности. Другие авторы [137], применив одну из разновидностей регулярных методов, сумели определить функцию распределения частиц по размерам и в нефракционированной суспензии мицелл казеина.

В той же степени, в которой появление многоканальной спектральной и корреляционной аппаратуры реального масштаба времени усовершенствовало измерительный процесс, появление регулярных методов призвано усовершенствовать анализ полученной информации. Но хотя объем работ с применением регулярных методов в последние годы существенно возрос, мы еще не можем констатировать их повсеместное использование. И все же для иллюстрации различных сторон проблемы анализа полидисперсности реальных биологических и синтетических систем основной упор сделан на те работы, которые выполнены с применением регуляризации. Это сделано сознательно, чтобы дать представление о современных возможностях метода.

Распределение числа частиц по размерам. Реально получаемой из эксперимента по квазиупругому светорассеянию информацией является распределение $A(\Gamma)$ интенсивности рассеяния объектов по диффузионным уширениям. Однако нас интересует не само это распределение, а связанное с ним распределение числа частиц по размерам $N(R_h)$ или молекулярно-массовое распределение (ММР) $C(M)$. Переход от $A(\Gamma)$ к этим привычным характеристикам полидисперсной системы требует, к сожалению, модельных предположений о структуре рассеивателей. Пусть, например, найденная из спектра функция $A(\Gamma)$ представляет собой две δ -функции. Мы заключаем (см., например, рис. 18), что в образце содержатся частицы с гидродинамическими радиусами R_{h1} и R_{h2} , которые можно вычислить по формуле (4.4). Известно и отношение вкладов этих фракций в рассеяние A_1/A_2 . Теперь мы хотели бы определить отношение концентраций частиц N_1/N_2 . (Вопрос об абсолютной

концентрации в спектроскопии вообще обсуждается крайне редко, так как требуются специальные калибровки.) Согласно выражению (1.55) $A_1 \sim N_1 \cdot |\alpha_1|^2$, $A_2 \sim N_2 \cdot |\alpha_2|^2$ и $N_1/N_2 = \frac{A_1 |\alpha_2|^2}{A_2 |\alpha_1|^2}$. Итак, чтобы определить относительное число частиц данного размера, нужно знать рассеивающую способность всех рассеивателей.

В случае непрерывного распределения вклад рассеивателей, диффузионные уширения для которых лежат в интервале от Γ до $\Gamma + d\Gamma$, будет

$$A(\Gamma) d\Gamma \sim N(R_h) / |\alpha(R_h)|^2 dR_h. \quad (4.7)$$

Отсюда, пользуясь формулой (4.4) и считая, что $qR_h \ll 1$, так что $\alpha(R_h) \sim M(R_h)$, где $M(R_h)$ — молекулярная масса частиц с гидродинамическим радиусом R_h , находим:

$$N(R_h) \sim \frac{A(\Gamma(R_h))}{R_h^{2n+2}}, \quad (4.8)$$

где $n = 3$ для глобулярных частиц, 2 — для сфер и гауссова клубка, 1 — для палочек. Аналогично

$$C(M) = \frac{A(\Gamma(M))}{M^2} \frac{\partial \Gamma(M)}{\partial M}. \quad (4.9)$$

Итак, чтобы, зная $A(\Gamma)$, определить $N(R_h)$, необходимо знать зависимость $\alpha(R_h)$ и $M(R_h)$, а для восстановления $C(M) = \alpha(M)$ и $\Gamma(M)$. Эти зависимости могут быть получены только из модельных представлений. Если частицы достаточно малы, форм-фактор постоянен и рассеивающая способность пропорциональна квадрату массы. В этом случае единственное, что нужно знать, это $R_h(M)$. Напомним, что R_h связано с Γ соотношением (4.4), и задав $R_h(M)$, мы автоматически находим $M(R_h)$ и $\Gamma(M)$.

Необходимо обратить внимание на два обстоятельства. Во-первых, в приведенных формулах подразумевается, что связь R_h с M однозначна, т. е. система представляет собой однопараметрический набор частиц. Переход к функции распределения частиц по размерам для истинно многокомпонентных систем, т. е. для систем разнотипных частиц, строго говоря, вообще невозможен. (Ведь в эксперименте по квазиупругому светорассеянию нельзя различить рассеиватели разной природы, если совпадают их коэффициенты диффузии.) Во-вторых, если размеры рассеивателей сравнимы с $1/q$, в спектре возможно появление вклада внутренней или ориентационной динамики рассеивателей. В этом случае $A(\Gamma)$ вообще не имеет смысла распределения вкладов в рассеяние частиц с разными коэффициентами диффузии, и формулы ((4.8) — (4.9)) теряют смысл. Поэтому, строго говоря, учитывать форм-фактор в этих формулах бессмысленно. Они применимы только, если $qR_h \ll 1$, когда $\alpha = \text{const}$. Исключение составляет лишь случай сферически-симметричных изотропных жестких рассеивателей, в котором вклад внутренней и ориентационной динамики отсутствует.

Однако с практической точки зрения делать поправку на форм-фактор при переходе от $A(\Gamma)$ к $N(R_h)$ целесообразно. Дело в том, что, с

одной стороны, последовательный учет вклада внутренней динамики в полидисперсной системе сопряжен со слишком сильными модельными предположениями и поэтому вряд ли оправдывает себя; с другой — если рассеиватели и нельзя считать сферическими и изотропными, то в первом приближении их часто можно считать достаточно симметричными. А как мы отмечали в гл. 1, для рассеивателей с центром симметрии интегральный вклад внутренней динамики при $qR_h \ll 1$ порядка $(qR_h)^4$. В то же время поправки к форм-фактору — порядка $(qR_h)^2$. Поэтому если рассеиватели достаточно малы, учет форм-фактора оправдан. Оправдан он и в случае, если $qR_h \sim 1$, но частицы жесткие и почти сферические. Таким образом, переходить от $A(\Gamma)$ к $N(R)$ можно почти всегда, хотя при этом не следует забывать о возможности ошибки.

В индикатрисном светорассеянии под форм-фактором понимают квадрат модуля интеграла (1.53), усредненный по всем ориентациям или конформациям рассеивателя. В нашем случае такое определение форм-фактора ввиду изложенного выше сохраняет свой строгий смысл только для сферически симметричных, жестких, оптически изотропных частиц, поскольку $\langle |\alpha|^2 \rangle$ отражает суммарный вклад не только трансляционных, но и всех других динамических процессов. Мы всесторонне обсудим этот вопрос в последней главе. Здесь же нам достаточно качественной оценки, согласно которой вклад трансляционных движений порядка $\langle |\alpha| \rangle^2$ и критерий применимости формул ((4.8) — (4.9)) имеет вид $\langle |\alpha| \rangle^2 - \langle \alpha \rangle^2 \equiv \langle |\Delta \alpha|^2 \rangle \ll \langle |\alpha|^2 \rangle$, т. е. флуктуации форм-фактора достаточно малы. Ясно, что если формулы ((4.8) — (4.9)) вообще применимы, в них можно использовать форм-фактор в общепринятом, индикатрисном смысле.

Завершая обсуждение проблемы форм-фактора, приведем рис. 23, на котором графически изображена зависимость рассеивающей способности от размера, а также несколько формул для наиболее употребительных в биологии моделей. В частности, нормированный форм-фактор $\frac{\langle |\alpha(q)|^2 \rangle}{\langle |\alpha(0)|^2 \rangle}$ равен:

для однородного шара радиуса R —

$$[3/x^3 (\sin x - x \cos x)]^2, \quad x = qR = \sqrt{\frac{5}{3}} qR_g; \quad (4.10)$$

для жесткого стержня длины L —

$$\frac{1}{x} \int_0^{2x} \left(\frac{\sin x}{x} \right) dx - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2, \quad x = \frac{qL}{2} = \sqrt{3} qR_g; \quad (4.11)$$

для гауссового клубка —

$$\frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x), \quad x = qR_g. \quad (4.12)$$

Для малых изотропных и однородных частиц при $qR \ll 1$, разлагая экспоненту в выражении (1.53) в ряд, получим

$$\langle |\alpha|^2 \rangle \sim M^2 (1 - q^2 R_g^2 / 3 + \dots). \quad (4.13)$$

Примеры изучения полидисперсных систем. У читателя могло сложиться впечатление, что авторы не верят в возможность восстановления

ния вида молекулярно-массового распределения (ММР) или распределения частиц по размерам по найденному A (Г), и всеми силами пытаются скомпрометировать эту процедуру. Это не так. Всегда, когда это относительно корректно, естественно представить результаты в виде функции распределения частиц по размерам. Все сказанное выше имеет

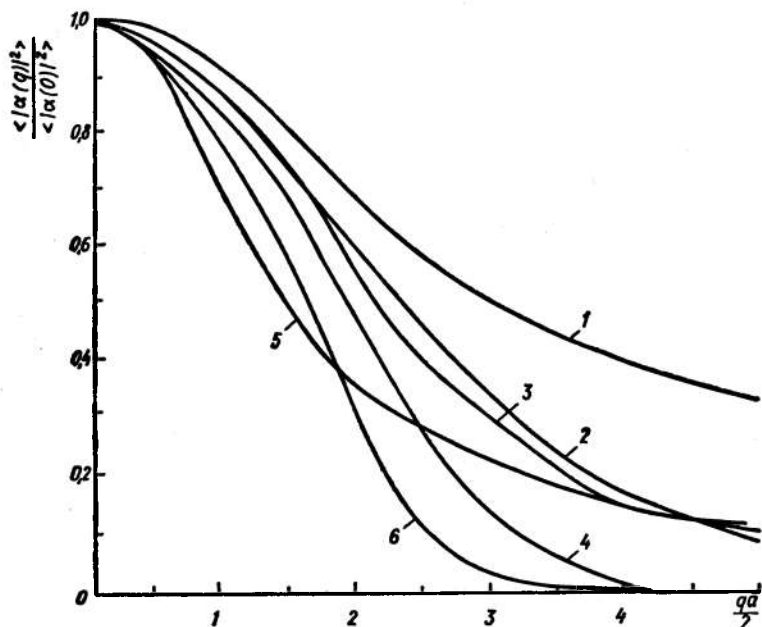


Рис. 23. Нормированный форм-фактор различных моделей как функции параметра $qa/2$ (a — максимальный линейный размер рассеивателя):

1 — стержни, 2 — эллипсоид (соотношение полуосей $1/1.6$), 3 — диски, 4 — сфера, 5 — гауссовы клубки, 6 — полая сфера

одну цель — объективно показать трудности такой интерпретации и попутно объяснить, почему не редки случаи представления результатов в непривычном для биолога виде.

Мы видели, что восстановление $N(R_h)$ по A (Г) наиболее обоснованно при изучении сферических частиц. К таковым относятся, например, латексы. На рис. 24 приведены функции распределения частиц по размерам для ряда серий полидисперсных латексных взвесей [55]. На отдельных гистограммах приведено сравнение с данными электронной микроскопии. Обращает на себя внимание, с одной стороны, достаточно хорошая согласованность этих результатов, с другой — систематическая недооценка фракции мелких частиц в методе квазиупругого светорассеяния. Это не случайно, ведь высокая чувствительность к крупным частицам ($\sim R_h^8$ согласно формуле (4.8)) в указанном методе приводит к тому, что в случае относительно высокой их концентрации фракция мелких частиц оказывается «незамеченной». Такого рода «обрезание» функции распределения со стороны малых размеров при

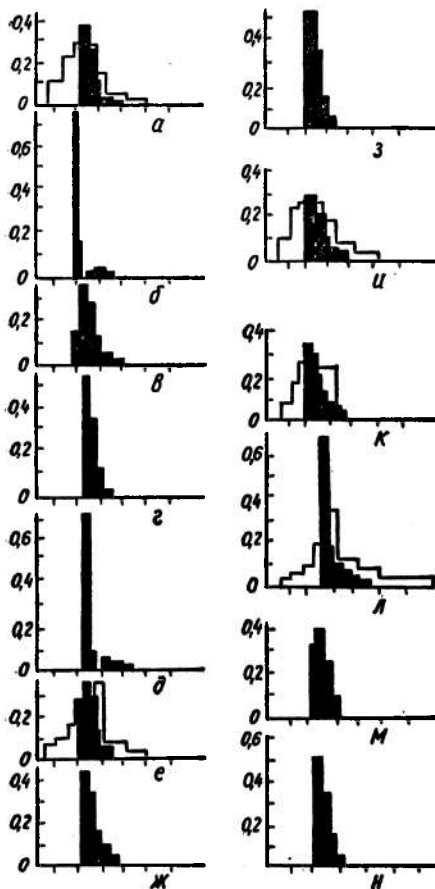


Рис. 24. Нормированные гистограммы распределений латексов по размерам, полученные из спектров рассеянного света с помощью регуляризации (темные столбцы) и из данных электронной микроскопии (светлые столбцы) (по [55]):

а — $R_{\text{сргист}} = 22,3$, $R_{\text{ср}_3} = 20,6$ нм; б — $R_{\text{сргист}} = 17,7$ нм; в — $R_{\text{сргист}} = 23,4$ нм; г — $R_{\text{сргист}} = 23,1$ нм; д — $R_{\text{сргист}} = 23,2$ нм; е — $R_{\text{сргист}} = 22,8$, $R_{\text{ср}_3} = 21,3$ нм; ж — $R_{\text{сргист}} = 23,8$ нм; з — $R_{\text{сргист}} = 23,1$ нм; и — $R_{\text{сргист}} = 21,8$, $R_{\text{ср}_3} = 20,8$ нм; к — $R_{\text{сргист}} = 21,1$, $R_{\text{ср}_3} = 21,4$ нм; л — $R_{\text{сргист}} = 25,8$, $R_{\text{ср}_3} = 27,9$ нм; м — $R_{\text{сргист}} = 24,2$ нм; н — $R_{\text{сргист}} = 25,9$ нм

ставляя данные ГПХ и квазиупругого светорассеяния. Результаты этой работы показаны на рис. 26. При хорошем согласии значений статистически средневзвешенных молекулярных масс M_w наблюдается небольшое,

восстановлении их из спектров квазиупругого светорассеяния встречается повсеместно.

Большинство работ по изучению молекулярно-массовых распределений методом квазиупругого светорассеяния с применением регуляризации выполнено на синтетических полимерах. И это не случайно. Конформация статистического полимерного клубка в растворе досконально изучена. В этом вопросе имеется не только теоретическая ясность, но и многочисленные экспериментальные подходы, позволяющие дать сравнительную картину определения сопоставимых параметров.

В первых же работах [119] при анализе относительно узких полимерных фракций была продемонстрирована возможность корректного перехода от А (Г) к молекулярно-массовому распределению. А в дальнейшем этот метод был применен и для анализа широкого, неодномодального распределения. На рис. 25 сопоставлены молекулярно-массовые распределения каучука, полученные методами квазиупругого светорассеяния и гель-проникающей хроматографии (ГПХ).

Обращает на себя внимание не только хорошее соответствие обоих результатов, но и возможность применения метода квазиупругого светорассеяния при анализе фракций с молекулярной массой $\sim 10^8$ Д, для которых методы ГПХ уже практически не применимы

К этому же заключению приходят и другие авторы [92], сопоставляя данные ГПХ и квазиупругого светорассеяния. Результаты этой работы показаны на рис. 26. При хорошем согласии значений статистически средневзвешенных молекулярных масс M_w наблюдается небольшое,

но систематическое расхождение среднечисленных оценок M_n . Причина этого — заметный на распределениях, полученных методом квазиупругого светорассеяния, спад в области малых молекулярных масс, связанный с тем, что рассеивающая способность частиц пропорциональна квадрату молекулярной массы, и этот метод мало чувствителен к низкомолекулярной компоненте широкого распределения. Вместе с тем он обладает важным преимуществом — позволяет не только обнаружить частицы надмолекулярных размеров, присутствующие в полимере, но также определить их массу и относительную долю. Как

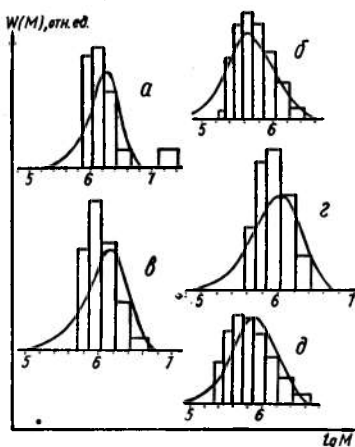
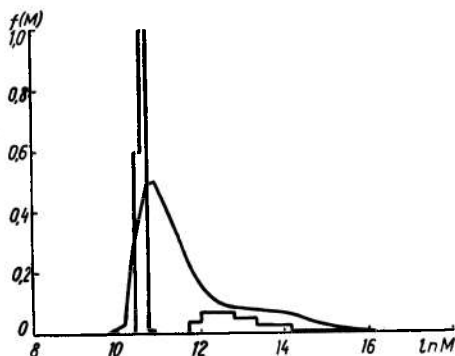


Рис. 25. Молекулярно-массовые распределения в пяти (а — д) различных фракциях каучука:

столбцы — данные квазиупругого рассеяния, сплошные кривые — данные гелипроникающей хроматографии (по [28])

Рис. 26. Результаты анализа молекулярно-массового распределения поли [бис (М-хлорфенокси)] фосфазена в хлороформе при 25 °С (по [92]):

гистограммы — данные квазиупругого светорассеяния, кривая — данные гелипроникающей хроматографии



в сторону молекулярных масс $M > 10^7$ Д и относящийся к присутствующим в небольшом количестве частицам микрогеля.

Определенные трудности возникают при исследовании систем, отличающихся очень широким распределением. Именно с этой ситуацией столкнулись авторы [173], изучая образцы полиакриламида. При анализе одного из таких образцов было получено бимодальное распределение — в явном противоречии с имеющимися данными. Из анализа угловой зависимости распределения был сделан вывод, что это — артефакт, связанный с невозможностью охватить вклады со всеми временами корреляции при измерении корреляционной функции в одном временном диапазоне. Для преодоления подобных ошибок было предложено измерять несколько коррелограмм в различных временных диапазонах. «Сшивка» полученных результатов и обработка общей коррелограммы с применением метода гистограмм позволили получить одномодальное широкое распределение. Эта процедура аналогична спектральной обработке из разных полос, описанной в [28].

Методы ГПХ и квазиупругого светорассеяния в своем сочетании компенсируют относительную потерю чувствительности к обоим краям широких ММР, таким образом появляется возможность анализа необычайно широких распределений, простирающихся от 10^4 до 10^8 Д [245]. Результаты такого сопоставления показаны на рис. 27.

Примером работы биологического содержания, в которой представляет интерес не просто определение функции $A(\Gamma)$, но и переход к функции распределения числа частиц по размерам, являются исследования [36], в которых тремя независимыми методами — скоростной

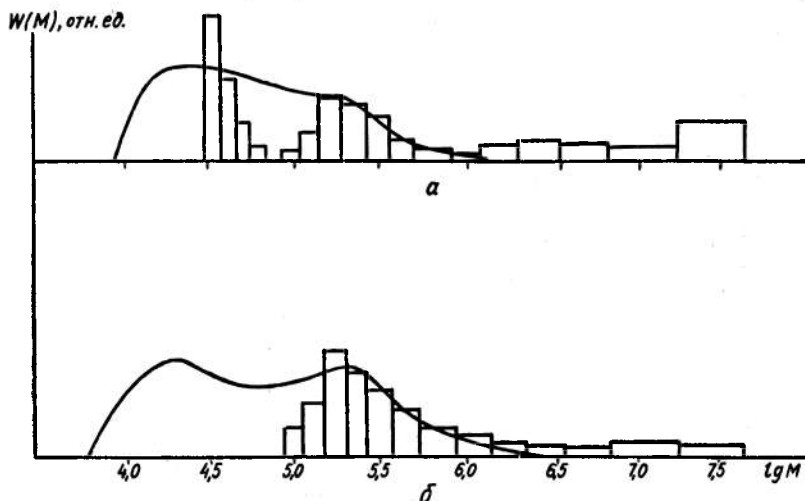


Рис. 27. Сопоставление ММР, полученных ГПХ (сплошная линия) и из анализа спектров квазиупругого светорассеяния (столбцы) для двух (а, б) нефракционированных образцов промышленного синтетического каучука (по [245])

флотации (СФ), флуоресцентного анализа (ФА) и спектроскопии квазиупругого светорассеяния (СКС) получены средневесовые оценки диаметров частиц — для липопротенидов очень низкой плотности (ЛПОНП), низкой плотности (ЛПНП), высокой плотности двух подклассов (ЛПВП₂) и (ЛПВП₃). Результаты двух из перечисленных методов позволяют сопоставить не только среднее по распределению, но и сам вид распределения (рис. 28). В табл. 13 дано сопоставление всех трех методов.

Полученные результаты позволили предложить новую структурную модель ЛПОНП в виде агрегационно связанных субъединиц, которая согласуется и с рядом других данных [145, 213]. Мы, не акцентируя внимание на биологической стороне исследования, подчеркнем, что обсуждаемый метод полезен при изучении гетерогенных объектов, даже после их фракционирования.

Необходимо упомянуть о медицинских приложениях корреляционной спектроскопии. В первую очередь это относится к возможной диагностической ценности изучения распределения частиц по размерам

Таблица 13. Сопоставление результатов анализа липопротеидных суспензий тремя независимыми методами (см. пояснения в тексте)

Фракция	Метод	Диаметр частиц, нм		
		минимальный	средний	максимальный
ЛПОНП	СФ	19,0	29,5	44,2
	СКС	24,0	36,3	128,0
	ФА	—	22,0	—
ЛПНП	СФ	15,2	18,4	20,6
	СКС	11,8	19,0	46,6
	ФА	—	22,0	—
ЛПВП ₂	СФ	6,6	8,5	11,0
	СКС	6,0	9,7	23
	ФА	—	15,0	—
ЛПВП ₃	СФ	5,6	7,3	8,9
	СКС	5,24	7,6	14,5
	ФА	—	14,4	—

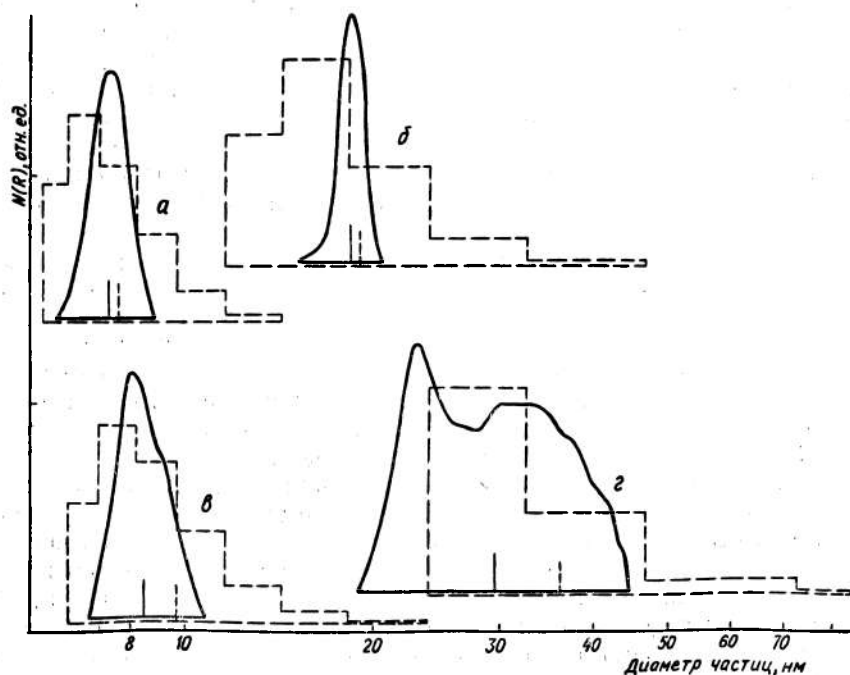


Рис. 28. Распределение частиц по размерам в суспензиях липопротеидов: кривые — седиментационный анализ, гистограммы — квазиупругое светорассеяние; а — ЛПВП₂, б — ЛПНП, в — ЛПВП₂, г — ЛПОНП

в биологических жидкостях: плазме крови, спинномозговой жидкости и др. Таким исследованиям особенно способствует тот факт, что условия эксперимента можно приблизить к условиям *in vivo*. Поскольку частицы в биологических жидкостях заведомо полидисперсны, их изучение в условиях, близких к естественным, может опираться только на регулярные методы анализа спектральных данных.

На рис. 29, а представлено распределение вкладов в спектр различных частиц, присутствующих в плазме крови здорового человека и больных гепатитом В. Можно предположить, что появление в сыворотке крови вирусных частиц не может остаться не обнаруженным. Это

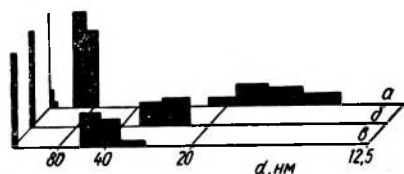


Рис. 29. Распределение рассеивающей способности частиц в плазме крови здорового человека (а) и больных гепатитом В (б, в)

предположение полностью подтвердилось при изучении сывороток крови больных гепатитом, содержащих верифицированный с помощью параллельных серологических реакций (иммунопреципитация, РПГА и иммуноферментный методы) HBsAg вируса гепатита В (рис. 29, б, в). Во всех сыворотках были выявлены фракции частиц со средним размером 44—45 или 27 нм, что соответствует размеру основных частиц вируса гепатита В: полной частице Дейна и HBsAg [23]. Благоприятным для всего исследования фактом оказалось то, что в сыворотке здоровых людей вообще не обнаруживаются частицы, близкие по размеру к вирусу гепатита. Факт вирусоносительства может быть определен, как показали наши исследования, и для ряда других вирусов (гриппа, кори, парагриппа и др.), не попадающих в обнаруженное «окно» размеров, если их концентрация достаточно высока, и их вклад заметно меняет относительную интенсивность рассеяния на частицах соответствующего размера.

Наконец, применение процедуры регуляризации за счет разделения вклада частиц разного размера в суммарную картину позволяет судить, что в этой картине относится к «грязи» и «пыли», а что — к изучаемой системе. При этом, естественно, точность определения параметров изучаемой системы уменьшается по мере роста относительного вклада посторонних примесей, но не искажается сам результат, как было бы при оценке среднего по распределению, например по методу кумулянтов. Заметим, что поскольку массовая концентрация пыли в образце обычно существенно меньше, чем концентрация исследуемых объектов, она может дать заметный вклад в рассеяние только за счет большой массы отдельных частиц (напомним, что рассеивающая способность пропорциональна квадрату массы). Поэтому наблюдаются лишь крупные по сравнению с объектом исследования частицы, коэффициент диффузии которых соответственно меньше, и вклад рассеяния на посторонних примесях присутствует обязательно в виде низкочастотной компоненты спектра.

В связи с изложенным в этом и следующем подпараграфах важно обсудить вопрос разрешающей способности метода, т. е. в какой степени

реально отличить многокомпонентность системы от полидисперсности. Ведь если мы хотим соотнести наблюдаемые при восстановлении A (Γ) отдельные компоненты с составом образца (низкочастотные — возможная пыль, высокочастотные — частицы исследуемого образца), то как минимум эти компоненты должны быть разрешены. Такого же рода требования возникают и при изучении реально многокомпонентной системы.

Вопрос разрешающей способности можно выяснить лишь в машинных экспериментах. В литературе он практически не обсуждается, и поэтому привести сколь-нибудь общепринятые оценки разрешающей способности мы не можем. Наш опыт, изложенный в гл. 3, показывает, что реально достижимо разрешение на уровне $\Gamma/\Delta\Gamma \approx R/\Delta R \approx 2$ при экспериментальном шуме 1 % и при наличии не более двух компонент. Увеличение числа компонент приводит к уменьшению разрешения. Повышение экспериментальной точности и расширение частотного диапазона (измерение из нескольких полос) улучшают разрешение и увеличивают степень достоверности анализа многокомпонентных систем.

Конкретные примеры анализа полидисперсности, приведенные в этом разделе, в совокупности должны дать представление о научной значимости обсуждаемого метода в различных областях: молекулярной биологии, физике полимеров, биофизике либо медицине. Однако нельзя не упомянуть и о возможности решения с ее помощью целого ряда прикладных задач. Именно в этом плане из всего рассматриваемого во второй части книги круга проблем анализ полидисперсности нам кажется наиболее перспективным.

По ходу изложения материала видно, что ряд особенностей метода оказывается готовым к внедрению. Например, многократно обсуждаемый вопрос высокой чувствительности к малейшим загрязнениям изучаемой системы — это готовая методика анализа чистоты медицинских препаратов. Или приведенный выше анализ дисперсности сыворотки крови — число его возможных приложений ограничено лишь фантазией экспериментатора. Индикация микрогелей в растворах полимеров — важный вопрос в контроле за технологическим циклом производства синтетического каучука. Однако этот вопрос, связанный с изучением процессов полимеризации, как и другой, связанный с контролем временной стабильности биологических взвесей (везикул, полимерных и эритроцитарных диагностикумов и т. д.), ближе к тематике следующего параграфа.

§ 4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДЛЕННОЙ КИНЕТИКИ И ИЗМЕНЕНИЙ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ

Постановка проблемы. Присутствие в образце агрегатов частиц, посторонних примесей (в частности, пыли), неточность модельных представлений о гидродинамической форме, вклад внутренней динамики — все это не позволяет определять размер, а тем более функцию распределения по размерам с точностью, близкой к статистической точности самой лазерной корреляционной спектроскопии. В результате, хотя в каждом отдельном эксперименте погрешность определения среднего гидро-

динамического размера рассеивателей может быть несколько десятых процента (и это значение воспроизводится при повторении опыта на том же образце), разброс результатов измерений на серии даже одинаково приготовленных образцов обычно на порядок больше.

Такая невоспроизводимость от образца к образцу, которая скорее — правило, чем исключение, для любого достаточно точного экспериментального метода не так страшна. Ведь очень часто нас интересует не столько конкретное состояние системы, сколько то, как это состояние меняется под действием различных внешних факторов. А эти изменения мало чувствительны к несовершенствам образца. Однако это и другие общеизвестные преимущества относительных измерений перед абсолютными могут быть использованы только в том случае, если в процессе измерений с образцом ничего не происходит. В этом отношении биология находится, пожалуй, в самом невыгодном положении. Кроме того, что ее объекты слишком «нежны» и легко портятся, основные методы — такие, как хроматография, седиментация, электрофорез в поддерживающих средах, не говоря уже о биохимических методах, — меняют состояние образца. Невозмущающий характер, экспрессность и точность оптических методов приобретают в связи с этим особое значение.

Простейший способ реализации обсуждаемых возможностей заключается в сравнении спектров света, рассеянного образцом до и после изменения условий. При этом оказывается возможным обнаружить весьма малые изменения гидродинамического радиуса рассеивателей и не только зарегистрировать, но и судить о характере происшедших в системе изменений. Более того, в этом параграфе мы также приведем примеры применения метода квазиупругого светорассеяния для изучения процессов, происходящих в системе, не находящейся в состоянии термодинамического равновесия. Эти процессы могут быть связаны как с неравновесностью исходной системы, так и с ее релаксацией после изменения температуры, ионных условий, химической модификации и т. д. Но во всех случаях речь идет об изучении медленных изменений системы, которая в каждый момент квазистационарна. Необходимо иметь в виду следующее: квазистационарными могут считаться процессы, времена релаксации которых велики по сравнению с обратным диффузионным уширением спектра рассеянного света или, если речь идет об эффектах, связанных с флуктуациями форм-фактора, — по сравнению с временами релаксации этих флуктуаций. Другими словами, свойства системы должны мало меняться за время, равное длительности каждой анализируемой реализации фототока. Это гарантирует от искажений спектра, связанных с неравновесностью системы. С практической точки зрения желательно выполнение еще более жесткого условия: свойства системы не должны меняться за все время эксперимента.

Процессы, которые могут изучаться таким способом, весьма разнообразны. Это агрегация, полимеризация и самосборка; деструкция надмолекулярных комплексов и конформационные изменения; денатурация белков и плавление ДНК; изменение конформации полимера при переходе клубок — глобула; наблюдения за изменениями, вызванными модификацией объектов и их химическими взаимодействиями, и

многое другое. В таких исследованиях, как правило, ставится цель выяснить механизм процесса путем изучения зависимости его кинетики и (или) конечного результата от различных внешних параметров: концентрации, температуры, pH, ионной силы и т. п., а лазерная корреляционная спектроскопия выступает в качестве основного методического инструмента. Поскольку во всех этих случаях определение размеров частиц не является конечной целью эксперимента, при обсуждении приложений корреляционной спектроскопии для таких самостоятельных исследований нам придется обратить внимание на биологический смысл получаемых результатов. При этом мы в значительной степени ограничиваемся рамками наших собственных интересов.

Агрегация (иммунологический аспект). Рассеивающая способность пропорциональна квадрату массы рассеивателя. Поэтому относительный вклад в рассеяние агрегатов усилен в число раз, равное агрегационному числу. Это обстоятельство, затрудняющее определение размеров исходных частиц, напротив, помогает исследователю, интересующемуся процессом агрегации. Мы рассмотрим лишь один, но чрезвычайно важный пример агрегации — иммунологическую реакцию агглютинации. Известно, что реакция агглютинации связана с агрегацией *in vitro* микроскопических частиц, на поверхности которых иммобилизованы молекулы антигена, в присутствии в растворе антител, специфичных к этим антигенам. Возможна и противоположная ситуация — агрегация покрытых антителами частиц в присутствии антигена в растворе. В качестве пробных частиц можно использовать клетки крови, бактерии либо полистирольные сферы (латексы). Частицы с иммобилизованными на их поверхности антигенами или антителами называются диагностикумом. Назначение диагностикумов — обеспечить наблюдение иммунологических реакций за счет регистрации агрегации. Для этого используются различные методы: турбидиметрия, радиоизотопный и флуоресцентный анализ и т. д. Ясно, что и метод квазиупругого светорассеяния тоже следует ввести в этот список.

В работе [95] была впервые исследована агглютинация латексов, покрытых бычьим сывороточным альбумином. На рис. 30 приведены изменения определенного по первому кумулянту среднего коэффициента диффузии $\bar{D}$ от концентрации антител в растворе и турбидиметрические данные для той же серии образцов. Сравнение результатов не оставляет сомнений в преимуществе корреляционной лазерной спектроскопии. В цитируемой работе приводятся данные по расчетной чувствительности метода (на уровне концентрации антител 20 нг/мл), однако утверждается, что он не оптимизирован ни по концентрации латексов, ни по их размеру. В этом отношении следующее сообщение этих авторов [212] дает больше количественной информации. В данной работе определялись концентрации иммуноглобулина A (Ig A) в плазме нескольких генетически чистых линий мышей. Авторы утверждают, что разработанный ими подход способен детектировать наличие в сыворотке $10 \text{ Пг Ig A (в } 1 \text{ мм}^3\text{)}$, т. е. $4 \cdot 10^7$ молекул Ig A, что превышает чувствительность любого другого метода. Полученные значения концентрации Ig A в плазме восьми линий мышей показывают прекрасную корреляцию с радиоизотопным методом. В работе обсуждаются оптимальные

концентрации и размер латексных сфер. Определяются равновесные константы связывания свободного антигена с активным сайтом латексной сферы, образования мостика между двумя латексными сферами и число мест связывания на поверхности латексной частицы. Строится математическая модель и выводится критерий концентрационной чувствительности метода. Однако данных по кинетике агглютинации нет, так как весь процесс изучается в стационарном режиме.

В более позднем исследовании [21] других авторов, выполненном на бактериальном препарате, изучается кинетика реакции агглютинации. Особенностью этой работы является применение регулярных методов обработки данных, проводится и сопоставление с методом кумулянтов.

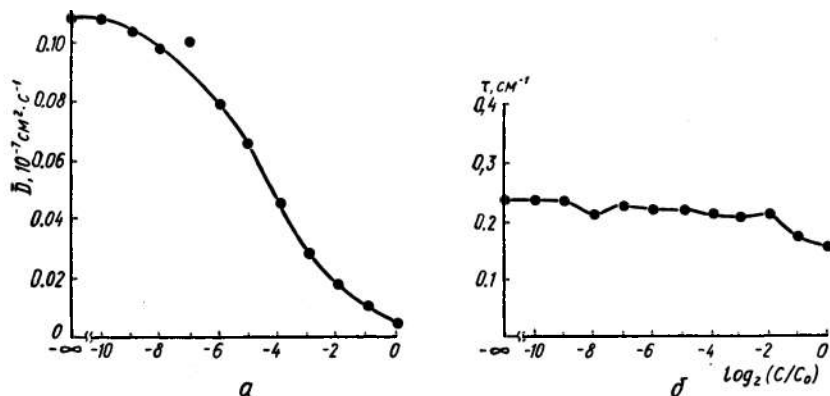


Рис. 30. Агглютинация латекса, покрытого ВСА (по [95]):

a — средний коэффициент диффузии (квазиупругое светорассеяние), b — оптическая плотность (турбидиметрия)

Типичная картина изменений распределения в процессе агглютинации приведена на серии гистограмм (рис. 31). Анализ полученных результатов позволил сделать заключение о характере образующихся агрегатов клеток при разных концентрациях как самих клеток, так и сыворотки. При высоких концентрациях сыворотки агрегация оказалась диффузионно-контролируемой, гидродинамический размер агрегатов рос как $t^{1/2}$, а агрегационное число — как t . При концентрации сыворотки ниже титра после быстрого диффузионно контролируемого начального участка реакция прекращается, и больших агрегатов не образуется вовсе. Авторы отмечают, что количество больших агрегатов критическим (в смысле теории фазовых переходов) образом зависит от концентрации сыворотки, причем феноменологическое понятие «титр сыворотки» соответствует критической концентрации.

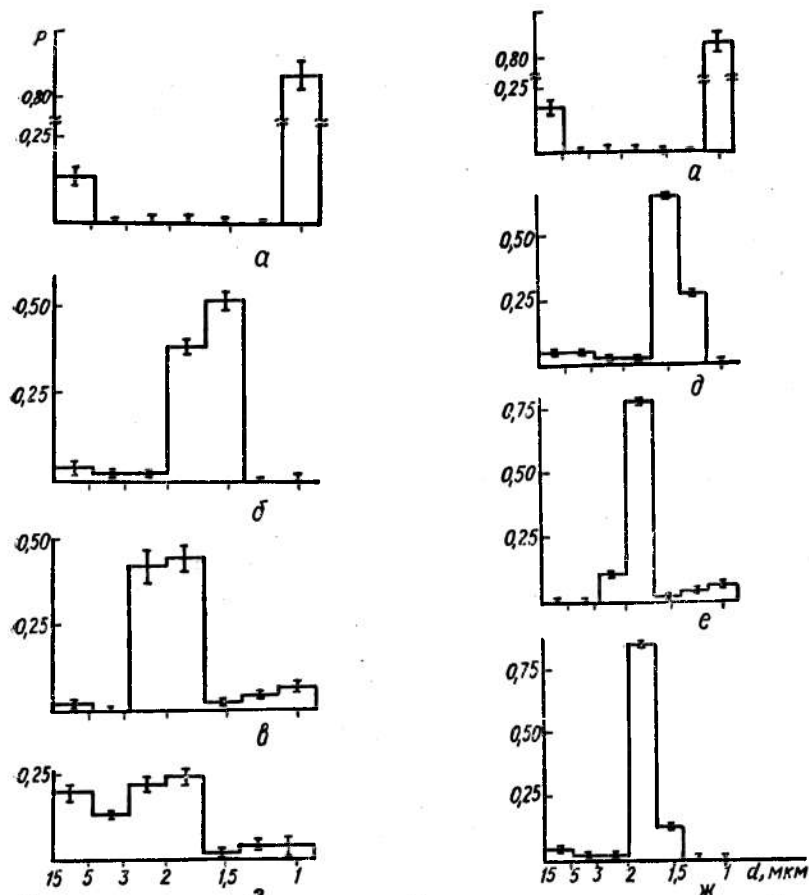
Таким образом, лазерная корреляционная спектроскопия является исключительно чувствительным методом регистрации самого факта агрегации. Эта чувствительность обусловлена тем, что при образовании агрегатов не только появляется избыточный вклад в рассеяние, но и диффузионное уширение этого вклада заметно меньше ширины спектра света, рассеянного исходными частицами. Более того, этот метод, несмотря на неизбежные трудности корректного учета рассеивающей

способности и внутренней динамики крупных агрегатов, структура которых а priori не известна, позволяет, изучая кинетику изменения размеров при агрегации, получать сведения и о механизмах этого распространенного и важного процесса.

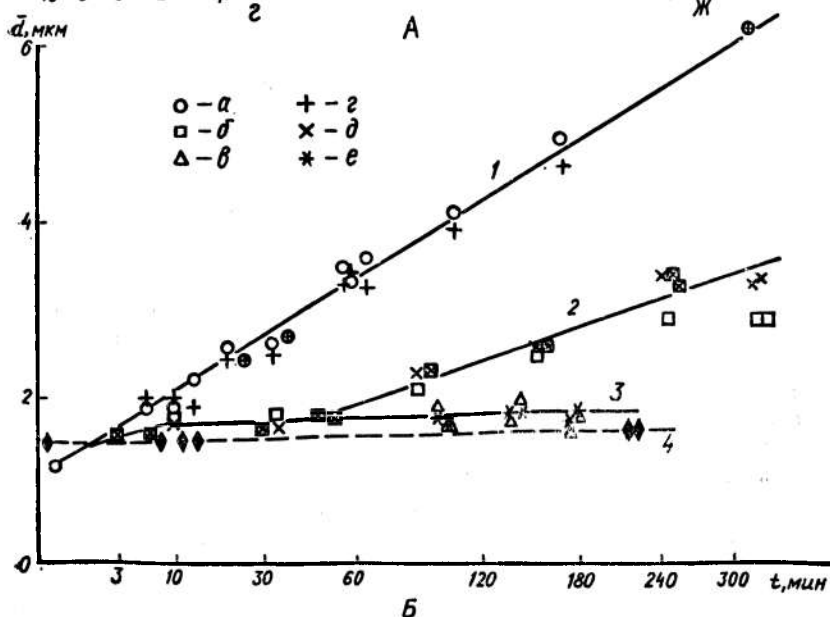
Конформационные изменения. Конформации молекулярных, субмолекулярных и надмолекулярных биологических структур уже давно служат областью повышенного внимания молекулярной биологии и биофизики. Этот естественный интерес постоянно поддерживается тем обстоятельством, что практически любое конформационное изменение объекта сопровождается, как правило, тем или иным изменением его биологических функций. С ранними исследованиями этого направления корреляционной спектроскопии можно познакомиться в соответствующих обзорах [48, 91, 216]. Ниже мы приведем несколько, на наш взгляд, характерных примеров использования корреляционной спектроскопии для изучения конформационных переходов в различных биологических системах.

Так, в работах [147, 183] показано, что конформации ДНК меняются в зависимости от концентрации в растворе соли NaCl. Изменения фиксировались по значению коэффициента трансляционной диффузии. Таким же способом обнаруживали структурные переходы в биологических частицах различной природы [172]. Методом квазиупругого светорассеяния изучены различные конформационные состояния H, K-АТФазы [171], а также влияние pH на конформацию ДНК бактериофага fd [176]. Эта ДНК в буфере SSC (0,15 M NaCl — 0,015 M лимоннокислый Na, pH 8) имеет коэффициент трансляционной диффузии $(6,63 \pm 0,18) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, а в буфере 1,891 M NaBr, pH 6,5— $7,07 \pm 0,24) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, т. е. уменьшение pH вызывает переход в более компактную конформацию. Холлер и соавт. [133] исследовали влияние ионов Mg^{2+} и фенилаланиновой т-РНК на конформации комплексов фенилаланин-т-РНК-синтетазы с различными лигандами (см. табл. 12).

Более сложные объекты исследованы Гансом и соавт. [125, 126]. В первой из этих работ изучались фрагменты хроматина. Увеличение концентрации NaCl от нуля до 0,6 M приводило к увеличению коэффициента трансляционной диффузии D от 1,9 до $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Конформационный переход начинался при концентрациях соли ниже $2 \times 10^{-3} \text{ M}$. Затем по мере повышения концентрации происходило быстрое увеличение D , и в интервале концентраций NaCl $10^{-2} — 0,6 \text{ M}$ коэффициент диффузии имел постоянное значение $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, что свидетельствовало о существенной компактизации структуры. Вторая цитируемая работа выполнена теми же авторами на тщательно приготовленных образцах фрагмента хроматина, представляющих собой комплекс октамера гистона и спирали ДНК, содержащей 146 комплементарных пар оснований и имеющей длину 50 нм при диаметре 3 нм. В общих чертах наблюдалось аналогичное изменение коэффициента диффузии: возрастание от 1,9 до $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ в области концентраций $10^{-3} — 10^{-2} \text{ M NaCl}$ и уменьшение до величины $1,8 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$



А



Б

Рис. 31. Динамика распределения частиц по размерам:

А: левая часть рисунка — разведение сыворотки 1:1000, правая — 1:2000. Время, прошедшее после добавления сыворотки (мин): $a - 0$, $б - 7$, $в - 34$, $г - 155$, $д - 5$, $е - 40$. $\bar{d}$ — статистическая ошибка гистограмм указана на уровне $\pm$ одного стандартного отклонения. Шкала по оси абсцисс линейна по $1/d$. Б — средний размер частиц $\bar{d}$ как функция времени, прошедшего после добавления сыворотки. Шкала абсцисс линейна по переменной $t^{1/2}$. $a, б, в$ — усреднение по методу гистограмм; $г, д, е$ — по методу кумулянтов. 1 — разведение 1:100, 2 — 1:1000, 3 — 1:2000, 4 — контроль (E. coli B) (по [21])

в области 0,6—2 М NaCl. Предложив ряд моделей формы частиц (рис. 32), наиболее компактная из которых отвечает максимальному коэффициенту диффузии D , авторы пришли к выводу, что существует последовательность конформационных состояний: 1) одно из состояний 2, 3, 4 ($0 \div 10^{-3}$ М NaCl); 2) состояние 1 (10^{-2} — 0,6 М NaCl); 3) состояние 5 или 6 ($1 \div 2$ М NaCl).

Из найденных значений D также следовало, что даже при концентрации NaCl 2 М ДНК-гистоновый комплекс не диссоциирует. Действительно, измеренные авторами коэффициенты трансляционной диффузии отдельных компонентов данного комплекса дали для белка и ДНК соответственно значения 3,6 и $3,0 \cdot 10^{-7}$ см² · с⁻¹, а наблюдаемое после второго конформационного перехода значение D составляло $1,8 \times 10^{-7}$ см² · с⁻¹, что доказывает существование белка и ДНК в виде связанной структуры.

Широко применяется метод квазиупругого светорассеяния и для исследования конформации полимеров в растворе. На рис. 33 приведена температурная зависимость радиусов инерции (R_g), определенного из данных по угловой зависимости интенсивности рассеяния, и гидродинамического (R_h), определенного из анализа корреляционной функции гомодинного сигнала рассеянного света при переходе клубок — глобула [227]. Ниже 29,6 °С соотношение $R_g/R_h \equiv \rho \approx 0,74 \div 0,04$ очень близко к теоретическому для шара — $(3/5)^{1/2} \sim 0,77$. Это показывает, что при низких температурах полимер переходит в глобулярную компактную форму. В точке (35,4 °С) $\rho \approx 1,35 \pm 0,05$, что следует сравнить с $\rho \sim 1,5$ для гауссова клубка. Экспериментальные значения ρ для гауссова клубка многократно обсуждались в литературе [229].

В заключение продемонстрируем результаты исследования [16], успех которого обусловлен применением процедуры регуляризации. Речь идет о сравнительном изучении 30S-субчастиц рибосом в нативных и инактивирующих условиях. Основной результат работы приведен на рис. 34. Из сравнения функции распределения 100 % активных рибосом и рибосом в инактивирующих условиях авторы делают вывод, что понижение активности препарата действительно связано с конформационными изменениями 30S-субчастиц, причем видно, что конформационный переход при снижении концентрации катиона NH_4^+ связан с компактизацией значительной их доли, вызывающей, по-видимому, снижение активности всего препарата в целом. В инактивирующих условиях исходно монодисперсный препарат становится гетерогенным, но средний размер практически не меняется, и лишь анализ с использованием регулярного метода позволил определить характер происходящих изменений.

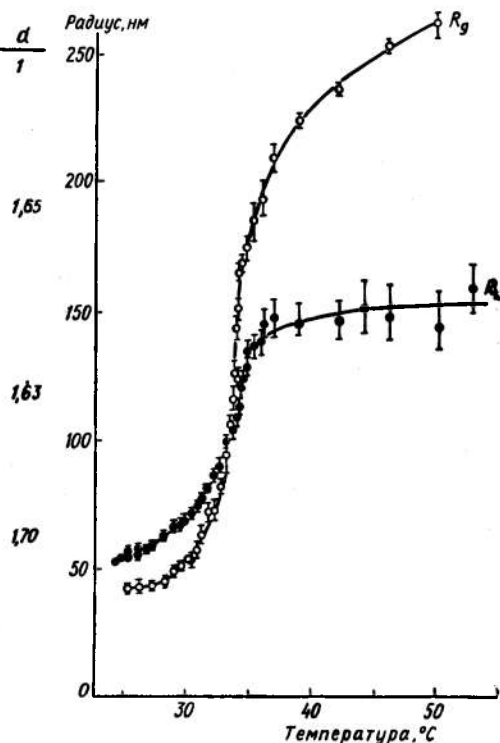
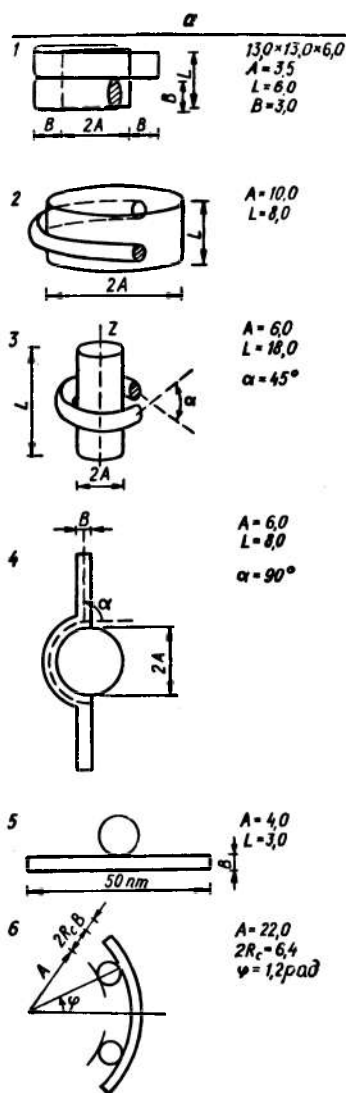


Рис. 32. Различные модели формы ДНК-гистонового комплекса (по [126])

Рис. 33. Температурная зависимость гидродинамического радиуса, найденного из индикатрисных (R_g) и корреляционных (R_h) измерений (по [247]) для полистирола в циклогексане. $M_w = 2,6 \cdot 10^7$ Д

Модификация. Если в исследуемую систему вводится низкомолекулярный агент, сам по себе не дающий вклад в рассеяние, однако при встраивании в изучаемый объект заметно меняющий его конформа-

цию, то характер возникающей модификации относительно легко поддается учету с помощью спектроскопии квазиупругого светорассеяния.

Мы остановимся лишь на цикле работ, посвященных исследованию механизма холестеринового обмена между липопротеидами и мембранами эритроцитов методами корреляционной лазерной спектроскопии [32, 47]. Известно, что липопротеиды — структуры, состоящие из белков и липидов (триглицеридов, фосфолипидов, эфиров холестерина, свободного холестерина и т. д.) и осуществляющие важную функцию транспорта сложных липидов. Напомним (см. рис. 28), что принято

разделение липопротеидов по гидратированной плотности на четыре основных класса: хиломикроны (ХМ), липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) и липопротеиды высокой плотности (ЛПВП). Все классы липопротеидов могут обмениваться структурными элементами с клеточными мембранами, в частности функцией ЛПВП в норме является удаление холестерина из клеточных мембран [94]. Ясно, что этот обмен может сопровождаться изменением R_h .

В первых же исследованиях [32] это предположение подверглось экспериментальной проверке. На рис. 35, а показано распределение ЛПВП до и после инкубации их с эритроцитами. После инкубации средний по распределению радиус возрос от 4,11 до 6,41 нм, а дисперсия — почти в два раза. Такие изменения позволяют предположить, что произошел перенос части холестерина с мембраны эритроцита на ЛПВП, а возможно, и частичная агрегация последних, инициированная этим поступлением холестерина. Иная картина наблюдалась для

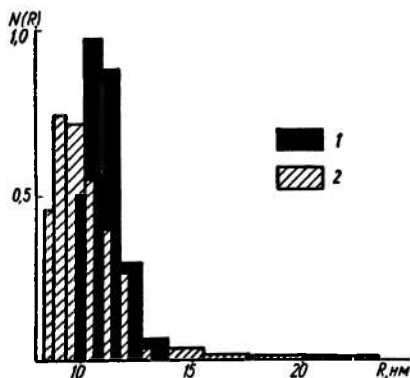


Рис. 34. Функции распределения по размерам 100 % активных (1) и инактивированных (2) 30S рибосом *E. coli* по ([16])

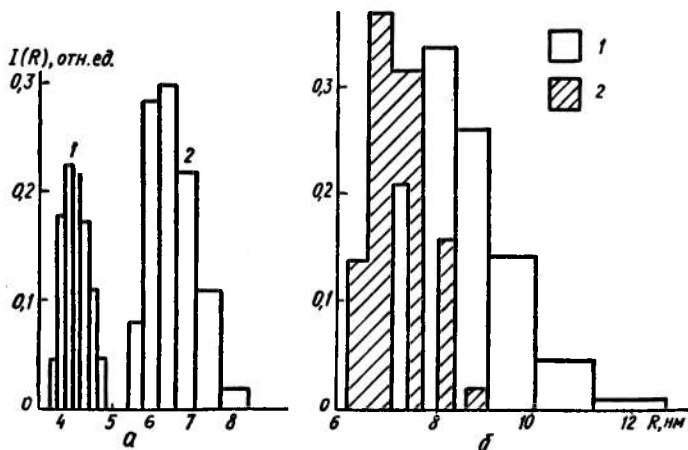


Рис. 35. Распределение размеров ЛПВП двух доноров до (1) и после (2) инкубации их с эритроцитами (по [31]):
а — уровень холестерина — 1,26 г/л, б — 2,70 г/л

ЛПВП, выделенных от другого донора (рис. 35, б). После инкубации их радиус уменьшился в среднем на 1,2 нм. По всей вероятности, это объясняется тем, что концентрация холестерина в крови второго донора была в два раза выше (2,70 г/л), чем у первого (1,26 г/л); ЛПВП в этом

случае были перенасыщены холестерином и не только не обладали способностью акцептировать холестерин, но сами отдавали часть холестерина эритроцитам. Поскольку оказалось, что при инкубации ЛПВП с эритроцитами наиболее заметное изменение размеров происходит во фракции ЛПВП₃, в дальнейшем [47] исследовалась именно эта фракция.

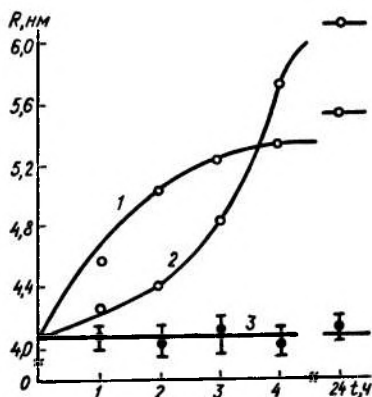
Роль ЛПВП₃ как акцептора холестерина обусловлена низким относительным содержанием неэтерифицированного холестерина в оболочке этого подкласса ЛПВП и наличием в нем лецитин-холестеринацилтрансферазы (ЛХАТ), этерифицирующей холестерин и обеспечивающей тем самым накопление эфиров холестерина в сердцевине частицы ЛПВП₃.

По этой причине представлялось интересным исследовать кинетику обмена холестерином и в присутствии DTNB (ингибитора ЛХАТ реакции), когда молекулы холестерина могут встраиваться только во внешний слой липопroteидов.

Изучение зависимости среднего размера ЛПВП₃ от времени инкубации их с эритроцитами в присутствии DTNB и без него, а также в буферном растворе в отсутствие эритроцитов (рис. 36) показало, что наблюдаемое увеличение размеров связано именно с переносом холестерина с мембран эритроцитов на ЛПВП₃, а не является следствием возможных агрегационных процессов.

Было проведено исследование температурных и концентрационных зависимостей этих кинетических кривых.

Рис. 36. Кинетика холестеринового обмена между ЛПВП₃ и мембранами эритроцитов в присутствии (1) и отсутствии (2) DTNB, 3 — контроль (по [47])



Оказалось, что в присутствии DTNB время установления конечных размеров липопroteидов активационным образом зависит от температуры. Найденное значение энергии активации переноса холестерина (6 ккал/моль) существенно превышает энергию гидрофобного взаимодействия холестерина (13 ккал/моль); это свидетельствует, что перенос происходит при непосредственном контакте ЛПВП и мембраны. Такой вывод подтверждается и пропорциональностью скорости переноса концентрации мембран.

В отсутствие DTNB кинетика изменения размеров ЛПВП носит более сложный характер. Скорость изменения размеров в определенном интервале времен даже нарастает. Такой нетипичный характер приближения к равновесию получает естественное объяснение, если предположить, что в исходном состоянии ЛПВП представляют собой сплюснутые дискообразные частицы, которые по мере накопления внутри эфиров холестерина становятся более шарообразными. Это позволяет понять, почему в отсутствие DTNB рост наблюдаемого размера замедлен. Согласно соотношению (4.5) увеличение объема эллипсоида при неизменной площади поверхности приводит к уменьшению

гидродинамического радиуса. Если поступающий в липопроteid холестерин быстро этерифицируется и переносится во внутреннюю область, объем частиц растет, а площадь поверхности, определяемая суммарной площадью гидрофильных участков липидов и других молекул, формирующих поверхностный слой ЛПВП, не меняется. Поэтому до тех пор, пока липопроteid не станет шарообразным, R_h может даже уменьшаться. На второй стадии наблюдается рост шарообразной частицы при согласованном увеличении объема за счет накопления эфира холестерина в центре и на поверхности — за счет гидрофобных головок свободного холестерина в поверхностном слое. Предположение об исходной сплюсненности липопротеидов вполне оправданно и с точки зрения установленной эволюции их в организме: ЛПВП выделяются печенью в кровяное русло в виде сплюснутых дисков, которые принимают все более сферическую форму по мере заполнения их объема эфирами холестерина. Таким образом, выделенная из организма фракция ЛПВП, должна представлять собой частицы с разным содержанием эфиров холестерина, в том числе, возможно, и эллипсоидные.

Полимеризация. Перспективы лазерной корреляционной спектроскопии в изучении кинетики полимеризации были очевидны с самого начала, а с появлением возможности объективно определять не только средний размер, но и вид функции распределения по размерам этот метод оказался уникальным для такого рода исследований. Конечно, если речь идет о полимеризации синтетических полимеров, химизм которых обычно хорошо известен, корреляционная спектроскопия приобретает в большей степени прикладной характер в качестве возможного средства контроля за ходом процесса. Но в случае биологических объектов механизмы полимеризации могут быть достаточно сложны, так что этот процесс часто называют по-другому: самосборка. И в этой ситуации спектроскопия квазиупругого светорассеяния является эффективным инструментом научного исследования

Процесс самосборки типа полимеризации — отнюдь не редкость для биологических макромолекул. Более того, часто этот процесс имеет большое физиологическое значение. Достаточно упомянуть такие белки, как коллаген, фибриноген, актин. Результаты изучения изменений первого кумулянта и интегральной интенсивности рассеяния на растворе фибриногена, полимеризующегося под действием рептилазы (рис. 37), а также данные по определению диффузионных констант мономеров фибриногена позволили [258] сделать вывод о том, что мономер представляет собой стержнеобразную частицу длиной около 80 нм. Полимеризация на начальных стадиях идет путем соединения концов мономеров и лишь на поздних происходит латеральная агрегация протофибрилл [259].

В качестве более подробного примера мы опишем исследование процесса самосборки фибрилл актина [17]. Значение этого процесса несомненно ввиду того, что актин в организме, как правило, встречается в фибриллярной форме, являясь основным компонентом мышечного волокна и цитоскелета. Кинетика полимеризации актина чрезвычайно чувствительна к ионным условиям, и в первую очередь к концентрации ионов Mg^{2+} . Самосборка актиновой фибриллы идет через образование

зародыша, содержащего, по-видимому, четыре мономера, причем константы скорости зародышеобразования, скорости дальнейшего роста фибрилл и скорости соединения разных фибрилл друг с другом резко меняются при изменении ионных условий [233]. Это разнообразие механизмов полимеризации, возможно, помогает актину «справляться» со своей биологической ролью, но сильно осложняет задачу исследователя, в первую очередь потому, что конечный результат полимеризации радикально зависит не только от ионных условий, но и от содер-

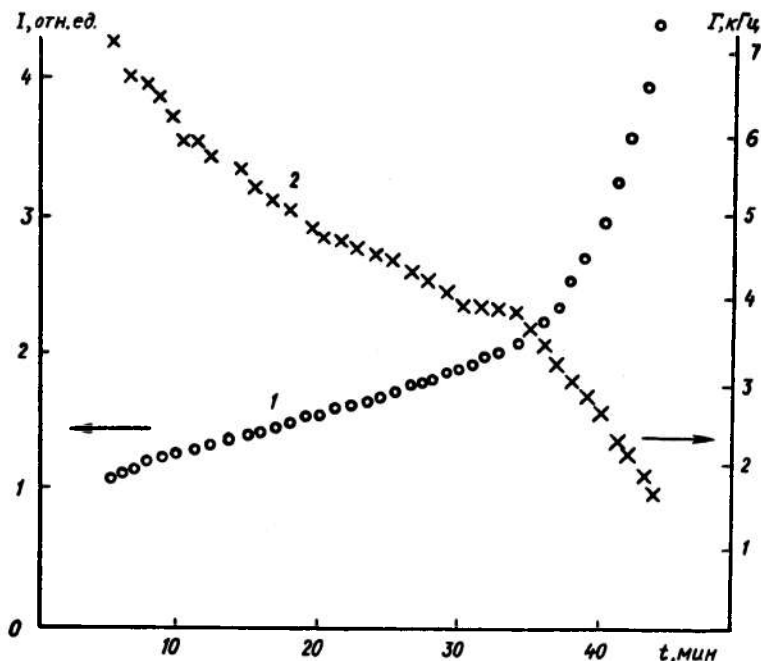


Рис. 37. Временная зависимость интенсивности рассеяния (1) и средней полуширины спектра (2) при полимеризации фибриногена под действием рептилазы (по [258])

жания фибрилл и зародышей в исходном образце до того, как полимеризация была инициирована добавлением Mg^{2+} или других ионов.

На рис. 38 показано изменение во времени функции распределения актина по коэффициентам диффузии при полимеризации (первые четыре гистограммы) и деполимеризации, вызванной удалением с помощью диализа ионов Mg^{2+} из раствора. Эти данные убедительно показывают обратимость самосборки актиновой фибриллы, что свидетельствует о преобладании процессов присоединения и отсоединения глобулярного актина к концам фибрилл при данных ионных условиях и концентрации белка. Мы видим также, что даже в отсутствие ионов магния при концентрации белка 2,7 мг/мл в растворе кроме мономеров (олигомеров) актина в заметном количестве присутствуют и фибриллы. Напомним, что поскольку относительный вклад в рассеяние пропорционален агре-

гационному числу, концентрация фибрилл на самом деле очень мала. Тем не менее, как было показано, их количество заметно влияет на процесс полимеризации, причем тем сильнее, чем больше затруднено образование зародышей по сравнению с элонгацией фибрилл, т. е. в сильной зависимости от ионных условий.

Мы не будем более подробно останавливаться собственно на кинетике полимеризации актина. С точки зрения применения метода квазиупругого светорассеяния для изучения процессов полимеризации важнее обсудить вопрос количественной интерпретации результатов подобных измерений, особенно остро возникающий вследствие замет-

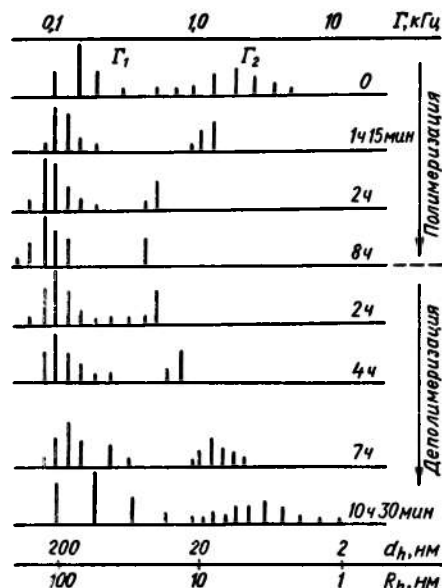
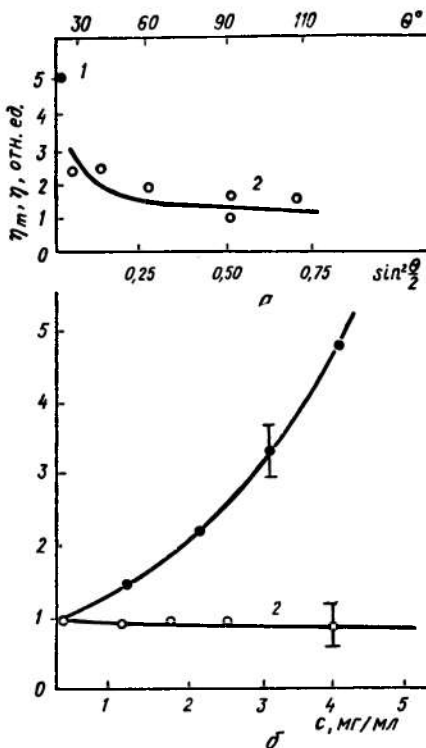


Рис. 38. Изменение во времени бимодальной (Γ_1 , Γ_2) функции распределения актина по коэффициентам диффузии при полимеризации и диссоциации составляющих его субъединиц (по [17])

Рис. 39. Угловая (а) и концентрационная (б) зависимости вязкостей η_m и η актина (по [17]):

а — $C = 4$ мг/мл, б — $\theta = 90^\circ$ (1 — вискозиметр, 2 — метод пробных шаров)



ного роста вязкости раствора при образовании длинных фибрилл. Этот вопрос в практическом отношении сводится к тому, что совершенно неясно, какую вязкость нужно использовать при пересчете измеренного коэффициента диффузии в гидродинамический размер исследуемых частиц. Строго говоря, если вязкость раствора существенно отличается от вязкости растворителя, пользоваться формулой Стокса (4.2) вообще нельзя. Необходимо учитывать межчастичное взаимодействие. Проблема диффузии взаимодействующих друг с другом частиц будет обсуждаться

в последней главе, однако, забегая вперед, отметим, что строгого решения она не имеет. Ясно лишь, что диффузионное уширение равно обратному времени диффузии рассеивателя на расстояние $1/q$. Поэтому если расстояние L между частицами, присутствие которых определяет макроскопическую вязкость, намного больше $1/q$ и размера R частиц интересующей нас фракции, наблюдаемый коэффициент диффузии будет определяться вязкостью чистого растворителя; в обратном предельном случае $L \ll R$, $1/q$ — макроскопической вязкостью раствора.

Вязкость η , измеренная в вискозиметре, учитывает все возможные взаимодействия при перемещении частицы на большие расстояния. Она определяется в основном количеством крупных фибрилл, их размерами и взаимодействиями. Это не отражает динамики макромолекул, мелких по сравнению с фибриллами, диффундирующих на расстояния порядка $1/q$. Поэтому вязкость η_m , измеренная по подвижности добавленных в раствор частиц, не совпадает с вискозиметрической. Результаты такого эксперимента с латексом диаметром 170 нм представлены на рис. 39, а, где приведена зависимость η_m в относительных единицах от $\sin^2 \frac{\theta}{2}$ в растворе F-актина (C_A — 4 мг/мл) в присутствии 1 мМ $MgCl_2$. Безразмерную величину η_m вычисляли как отношение коэффициентов диффузии латекса в воде и в растворе белка. Видно, как по мере роста масштаба перемещений частиц латекса (с уменьшением угла рассеяния) увеличивается η_m раствора белка. Сравнение вискозиметрической вязкости с вязкостью, определенной по коэффициенту диффузии латексных частиц, показано на рис. 39, б.

Таким образом, количественное восстановление функции распределения по размерам длинных фибрилл связано с серьезными трудностями даже при малых массовых концентрациях исходного вещества. Эта ситуация типична при образовании линейных структур, поскольку радиус межчастичного взаимодействия порядка длины фибриллы и может превышать расстояние между разными фибриллами, даже если параметр исключенного объема мал. Поэтому анализ кинетики полимеризации на основе данных по квазиупругому светорассеянию лучше основывать именно на распределении диффузионных констант образующихся частиц. Их размер может быть оценен лишь весьма условно — с помощью косвенных приемов, типа описанного выше измерения подвижности «пробных» частиц.

Расслоение. Мы закончим главу описанием работ, в которых ярко проявились положительные стороны лазерной корреляционной спектроскопии. Это — исследования везикулярных систем. Дело не только в том, что интересно и важно знать функцию распределения везикул, которые полидисперсны, даже будучи приготовленными из однородного материала [42, 178]. Оказывается, что при их хранении [180], изменении ионных условий [264], добавлении других липидных компонент [115] распределение везикул по размерам претерпевает самые разные изменения. Например, на рис. 40 показано, как может меняться размер везикул в течение одного дня при температуре ниже (а) и выше (б) фазового перехода в липиде.

Везикулы представляют собой бислойные фосфолипидные пузырьки и являются чрезвычайно широко используемой модельной системой, отражающей свойства биологических мембран. Но они, к сожалению, слишком легко деформируются (например, при попытке фракционирования на колонке [80]), и большинство физических методов определения размеров к ним применимы с существенными оговорками [136, 178]. Поэтому невозмущающий характер метода квазиупругого светорассеяния здесь особенно важен. Вид функции распределения везикул по раз-

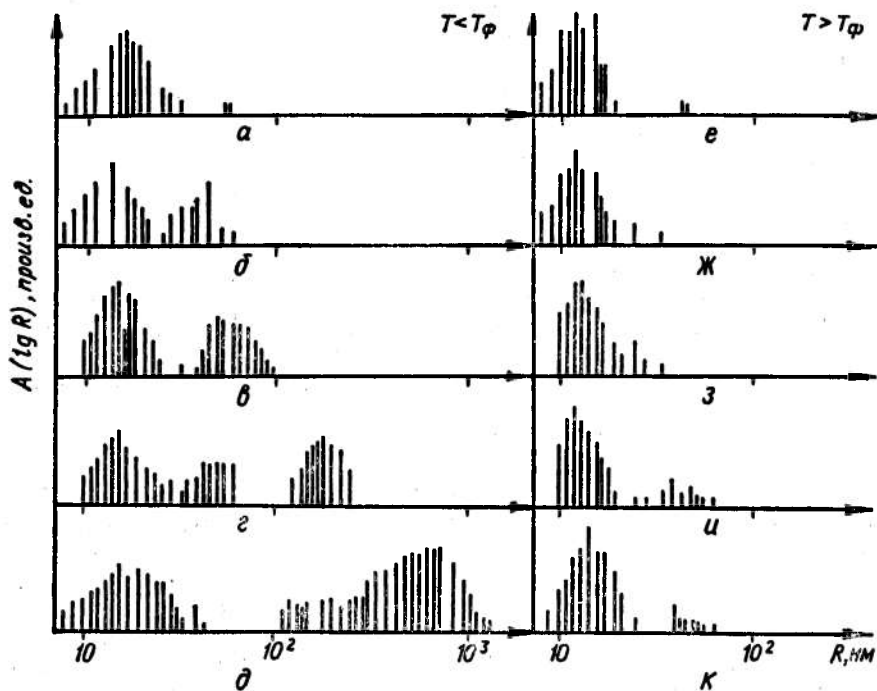


Рис. 40. Изменение функции распределения размеров везикул в течение одного дня. Время (мин): а — 7, б — 45, в — 145, г — 510, д — 1660, е — 5, ж — 50, з — 166, и — 410, к — 1570. T_ϕ — температура фазового перехода

мерам обычно не известен. Регулярные методы обработки спектральных данных позволяют справиться и с этой проблемой. Благодаря тому, что везикулы, как правило, сферически симметричны, переход от распределения по коэффициентам диффузии к распределению по размерам в этом случае лишен сложностей, обсуждающихся в § 4.2. Наконец, экспрессность метода дает возможность отслеживать изменения, происходящие в одной и той же везикулярной системе, и тем самым существенно снизить требования к чистоте образца.

Мы обсудим лишь одно любопытное явление: с течением времени функция распределения по размерам изначально относительно монодисперсной системы многокомпонентных (например, холестеринсодержащих) везикул становится бимодальной (рис. 41). На первый взгляд, это

довольно странный способ приближения к термодинамическому равновесию. Можно подумать, что большие и малые размеры везикул энергетически одинаково выгодны. Но тогда в конце концов остались бы частицы только одного сорта. Предположение же о случайном совпадении свободных энергий двух разных состояний кажется маловероятным.

На самом деле это явление связано, по-видимому, с тем, что, во-первых, обмен холестерином и фосфолипидами между везикулами протекает значительно быстрее, чем устанавливается равновесное число везикул в системе, во-вторых, существуют достаточно жесткие стерические ограничения. Эти ограничения обуславливают резкий рост свободной энергии везикулы при отклонении числа молекул в ней N от оп-

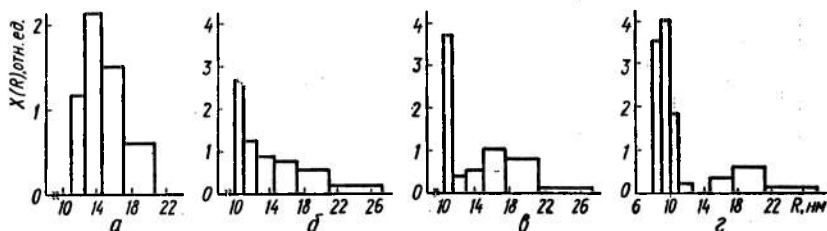


Рис. 41. Появление бимодального распределения в суспензии везикул, содержащих холестерин.

Время (ч): а — 0, б — 22, в — 40, г — 68

тимального числа $N_{\text{opt}}(C)$, где C — концентрация холестерина. Происхождение таких стерических ограничений в везикулах связано с необходимостью одновременно обеспечить заполнение внутренней части бислоя гидрофобными хвостами, а поверхности — гидрофильными головками молекул, образующих везикулу [142]. Поскольку при приготовлении образуются везикулы с одинаковой концентрацией холестерина C , но вовсе не обязательно с $N = N_{\text{opt}}(C)$, такой системе может оказаться выгодно «расслоиться», т. е. образовать частицы с неравными концентрациями C_1 и C_2 , если при этом число молекул в них окажется $N_{\text{opt}}(C_1)$ и $N_{\text{opt}}(C_2)$ соответственно. Рассмотрим две частицы с $N < N_{\text{opt}}(C)$. Так как число молекул каждой из компонент не меняется, должно быть

$$\begin{aligned} C_1 N_{\text{opt}}(C_1) + C_2 N_{\text{opt}}(C_2) &= 2CN; \\ N_{\text{opt}}(C_1) + N_{\text{opt}}(C_2) &= 2N, \end{aligned} \quad (4.14)$$

и условие возникновения расслоения $N < N_{\text{opt}}(C)$ при малых $\Delta C = C_1 - C_2$ принимает вид

$$2 \left(\frac{\partial N_{\text{opt}}(C)}{\partial C} \right)^2 > N_{\text{opt}}(C) \frac{\partial^2 N_{\text{opt}}(C)}{\partial C^2}. \quad (4.15)$$

Если же зависимость $N_{\text{opt}}(C)$ такова, что выполняется противоположное неравенство, расслоение произойдет при исходном $N > N_{\text{opt}}(C)$.

Разумеется, неравномерность распределения компонент по частицам приводит к увеличению энтропийного вклада в свободную энергию. Поэтому наличие обсуждаемого явления определяется в конечном счете жесткостью стерических ограничений, т. е. тем, насколько быстро растет свободная энергия по мере отклонения агрегационного числа от N_{opt} . Во всяком случае, приведенные рассуждения показывают, что в условиях замедленной релаксации расхождение может быть для многокомпонентных объектов достаточно универсальным кинетическим явлением. Этот вывод был подтвержден в ряде работ [32, 41, 45], причем не только для многокомпонентных везикул, но и для липопротеидов. Все эти исследования выполнены методом квазиупругого светорассеяния с использованием регулярных процедур обработки результатов.

ГЛАВА 5

ПОДВИЖНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Еще одним случаем, когда методы корреляционной спектроскопии могут оказать неоценимую помощь биологам и биофизикам, является движение живой материи на клеточном уровне. Здесь мы не будем касаться изучения мышечной активности, хотя попытки применения корреляционных методов для исследования молекулярных механизмов мускульного сокращения описаны в литературе [85]. Попытаемся осветить вопрос немusшечной подвижности прокариотов и эукариотических клеток *in vitro* и *in vivo*. Интерес к этой проблеме усилился в последние годы прежде всего в связи с новыми идеями в области клеточной биоэнергетики, например о механизме функционирования бактериальных жгутиков — клеточных органелл, с помощью которых осуществляется бактериальное движение [220]. Информация о клеточной подвижности интересует цитологов в связи с функциональным состоянием клетки, и в частности с вирулентностью. Изучение различных изменений движения в ответ на внешние воздействия также может способствовать выяснению функционирования клеточных рецепторов. Количественные оценки степени подвижности и доли подвижных сперматозоидов в связи с репродуктивной функцией крайне полезны для медицинских исследований и вопросов, связанных с искусственным осеменением и скрещиванием животных.

Существующие в настоящее время методы анализа клеточной подвижности основаны на микроскопическом наблюдении движения объекта и дают преимущественно полуколичественную либо чисто качественную информацию. Так, предложенный Шусмитом [219] метод состоит в наблюдении перемещения бактерий в тонком капилляре. Дальнейшее совершенствование микроскопических методов было связано с достижением некоторого уровня автоматизации наблюдений с помощью регистрации треков частиц на фото- или киноплёнку с последующим анализом. Подобные исследования дают целый ряд важных выводов относительно жизнедеятельности микроорганизмов [61, 164, 231]. Однако информацию, получаемую микроскопическим наблюдением, нельзя считать исчерпывающей, поскольку детали движения, такие, как ориентация частиц, характерные времена разных фаз движения, да и само их наличие, часто остаются вне поля зрения исследователей. Анализ результатов наблюдений весьма трудоемок и плохо поддается автоматизации; точность измерений,

как правило, невысока. Напомним к тому же, что не все микроорганизмы доступны прямому микроскопическому наблюдению — размеры большинства бактерий лежат на пределе разрешения оптических микроскопов.

После ознакомления с методическими аспектами корреляционной спектроскопии нетрудно догадаться, что преимущества применения этого мощного средства изучения микроскопической динамики не ускользнули от исследователей, работающих в данной области. Количество исследований немышечной подвижности непрерывно растет, и нам кажется важным проанализировать возможности корреляционной спектроскопии для изучения этой специфической формы движения.

Особенности движения микроорганизмов. Большинство исследований клеточной подвижности микрообъектов относится к изучению движения сперматозоидов животных и человека, а также бактерий, снабженных жгутилками-жгутиками. Природа позаботилась о специальном двигательном аппарате микроорганизмов, строение которого в этих двух случаях несколько отличается.

Форма и размеры сперматозоидов весьма разнообразны, но все они имеют общие морфологические черты, состоя из сравнительно массивной головки (размером 5—10 мкм), шейки (~ 10 мкм), средней части (~ 10 мкм) и длинного хвоста (30—50 мкм). Этот хвост, или жгутилка, состоит из аксиально расположенных микротрубочек, заключенных в цитоплазматической мембране, способных изгибаться, производя волнообразные движения, вследствие чего сперматозоид перемещается по траектории, близкой к спирали.

Бактерии, такие, как наиболее изученные *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, имеют несколько иначе устроенный двигательный аппарат. Собственно к клеточному телу размером порядка единиц микрометров прикреплены жгутики длиной до 10 мкм. На рис. 42 показано устройство бактериальной жгутиллы согласно современным представлениям. Сам жгутик имеет спиральную форму и с помощью крюка соединен с базальным телом, расположенным в цитоплазматической мембране. Базальное тело — в своем роде уникальное достижение биологической эволюции, возможно, отнимающее у человека приоритет в изобретении колеса. Биофизики в настоящее время более склонны к мнению, что движение жгутиковых бактерий происходит за счет чистого вращения спирального жесткого жгутика посредством поворота этого своеобразного «колеса» при транспорте ионов через мембрану.

Бактериальные жгутиллы могут свиваться в жгут и вращаться синхронно, что приводит к направленному перемещению всего организма. Если же эта синхронность нарушается и каждый жгут вращается независимо от других, наблюдаются хаотические вращательные движения бактерии — так называемый твидлинг, в процессе которого происходит переориентация клетки, как бы «выбор» нового направления линейного перемещения (рис. 43).

Что же заставляет микроорганизмы затрачивать часть (причем довольно значительную) своих энергетических ресурсов не на метаболизм, а на механическое движение? Как справедливо отмечает Бун [77], если есть вполне понятные физиологические причины движения

сперматозоидов, то целесообразность подвижности бактерий далеко не столь очевидна.

Разумеется, необходимость оптимального потребления питательных веществ и кислорода при метаболизме по аэробному типу — достаточно сильные стимулы. Очевидно, что естественным параметром, характеризующим добавку к потоку поступающих к клетке питательных веществ в результате ее движения, является соотношение $l/V/D$ [72], где l — характерный размер клетки; V — ее средняя скорость; D — коэффициент диффузии аминокислот или сахаров, потребляемых клеткой. Для клеток размером ~ 10 мкм и более и (или) высокой вязкости

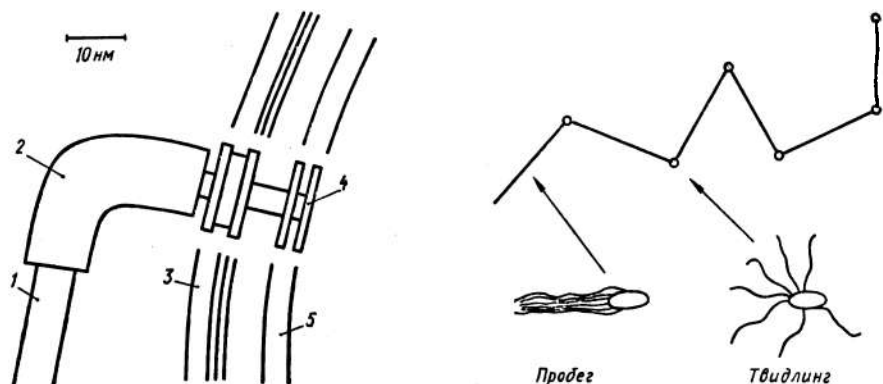


Рис. 42. Флагелла жгутиковых микроорганизмов (по [77]):

1 — флагеллит, 2 — крюк, 3 — внешняя мембрана, 4 — базальное тело, 5 — цитоплазматическая мембрана

Рис. 43. Движение бактерий в соответствии с моделью «пробег — твидлинг» (по [77])

среды, а также больших молекул субстрата величина этой добавки может превышать пассивный поток, и движение станет выгодным. Для бактерий в водной среде типичное значение $l/V/D$ порядка $3 \cdot 10^{-2}$; добавка, приобретаемая за счет движения, составляет 2—3 %, и подвижность бактерий с этой точки зрения отнюдь не выглядит необходимой для их нормальной жизнедеятельности. Неужели природа, гармонией и целесообразностью которой мы привыкли восхищаться, допускает столь расточительную избыточность?

Конечно, это не так. До сих пор мы говорили о движении отдельной частицы в гомогенной питательной среде. Ситуация в корне меняется при наличии градиента плотности субстрата или градиента любых других (благоприятных или неблагоприятных для живого организма) условий — температуры, освещенности, концентрации химических ядов. В этом случае бактерии, безусловно, выгодно переместиться в лучшие условия. Такое направленное коллективное перемещение микроорганизмов называется таксисом — к нему в этой главе мы еще вернемся. Явление это неоднократно исследовалось в средах с искусственно созданным градиентом. В реальных условиях градиент «привлекательных» для клетки веществ — аттрактантов — и «непривлекательных» — репеллентов — возникает в процессе роста бактериальной культуры.

Ведь количество клеток растет в геометрической прогрессии, субстрат в объеме расходуется неравномерно, среда обедняется кислородом, накапливаются продукты распада. С некоторого момента диффузионные механизмы уже не могут обеспечить снабжение растущей популяции всем необходимым и удаление вредных веществ, откуда и возникает необходимость собственного движения.

Теперь становится понятной, в частности, и смена фаз — твидлинга и линейного перемещения. Поскольку бактерии, конечно, не могут «знать», в какую сторону им выгоднее перемещаться, таксис осуществляется с помощью своеобразной модификации поведения. Если клеточные рецепторы на прямолинейном участке траектории фиксируют улучшение внешних условий, переход к твидлингу происходит позже, длина пробега без изменения направления увеличивается, и наблюдается общее перемещение клетки в выгодном направлении по ломаной траектории. В противном случае преобладает фаза хаотической переориентации, повышая вероятность изменения невыгодного направления движения.

Эти общие соображения о движении микроорганизмов опираются и на данные, полученные с помощью квазиупругого светорассеяния (в основном в традиционных вариантах), достаточно полно освещенные в обзорах [77, 89]. Мы же, рассмотрев применение корреляционной спектроскопии для изучения различных форм движения, попытаемся также сделать прогноз, касающийся новых методических подходов.

Рассеяние света при стохастическом движении с большим временем корреляции. Корреляционные характеристики рассеянного света при движении микроорганизмов и в случае пассивной диффузии принципиально различаются. Простейшей моделью бактериального движения является случайное блуждание частицы с постоянной на длине пробега скоростью. Однако поскольку длина пробега может быть большой по сравнению с величиной $1/q$, спектральное уширение носит доплеровский характер. Такое движение сходно с движением молекул разреженного газа. Если предположить изотропное максвелловское распределение скоростей движения V :

$$P(V) = 4\pi V^2 (2\pi V_0^2)^{-3/2} e^{-V^2/2V_0^2}, \quad (5.1)$$

где V_0 — средняя по распределению скорость, то корреляционная функция имеет вид гауссиана:

$$G^{(1)}(\tau) = e^{-1/2 q^2 V^2 \tau^2}. \quad (5.2)$$

В отличие от термодинамически равновесных условий, когда $G^{(1)}(\tau)$ представляет собой сумму экспонент, активное движение бактерий (даже чисто трансляционное) приводит к самым разнообразным формам парной корреляционной функции. Если, например, скорости линейных перемещений подчиняются гамма-распределению, соответствующая такому движению функция есть лоренциан.

На спектральном языке случай изотропного движения описанного типа приводит к соотношению

$$I^{(1)}(\omega) \sim \int_{\omega/q}^{\infty} P(V) \frac{dV}{V} \quad (5.3)$$

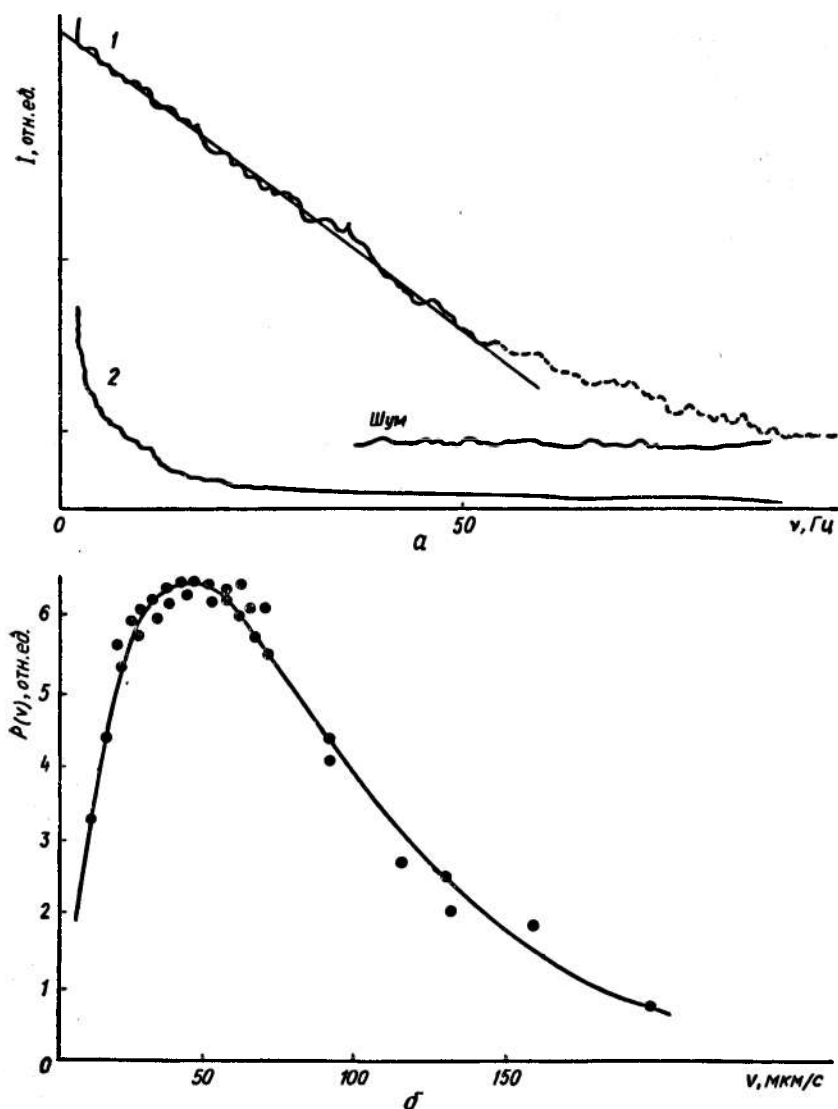


Рис. 44. Спектр квазиупругого светорассеяния на суспензии подвижных сперматозоидов (а) и результат его поточечного дифференцирования — функция распределения по скоростям (б) (по [144]):

1 — линейный, 2 — логарифмический масштаб

или дифференциальному

$$\frac{dI^{(1)}(\omega)}{d\omega} \sim -\frac{1}{\omega} P\left(\frac{\omega}{q}\right). \quad (5.4)$$

Формула (5.4) отражает тот факт, что информация о распределении скоростей подвижности (заметим, при существенно различающихся ско-

ростях диффузного и собственного движения) может быть получена поточечным дифференцированием гетеродинного спектра. Экспериментально это было показано для сперматозоидов человека (рис. 44).

Отметим, что при изотропном распределении скоростей движения функция $G^{(1)}(\tau)$ обладает свойством так называемого $q\tau$ -скэйлинга, т. е. в каких-то пределах зависит лишь от произведения $q\tau$ (рис. 45). Чтобы скэйлинг имел место, необходима изотропность не только движения рассеивателей, но и их форм-фактора. Это, как уже разъяснялось выше, выполняется при $qR \ll 1$ (где R — характерный размер рассеи-

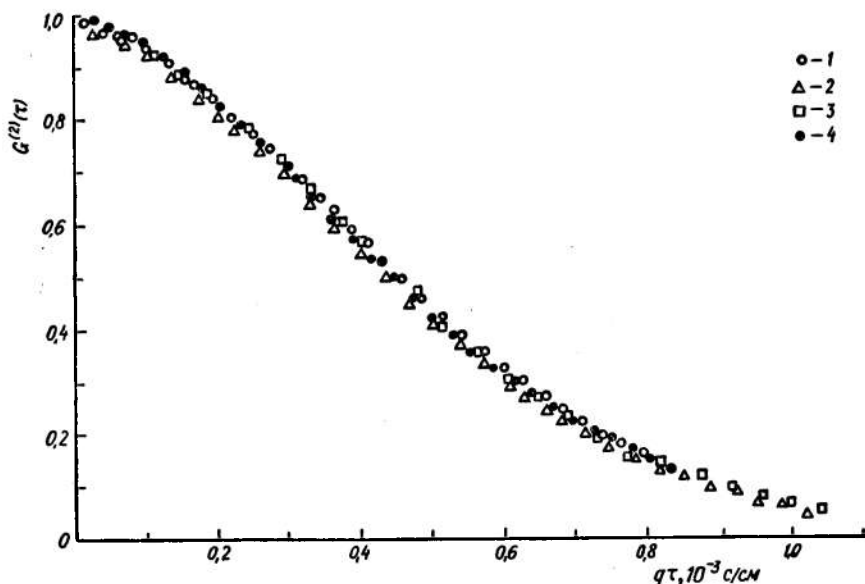


Рис. 45. Малоугловой $q\tau$ -скэйлинг. Автокорреляционная функция при углах $7,5$ (1), 6 (2), 5 (3) и 3° (4) при 30°C (по [97a])

вающих объектов). Для клеток, размеры которых всегда порядка или более длины волн света, этот вопрос приобретает особую важность.

Мы не останавливаемся на следствиях отклонения от условия $qR \ll 1$ в индикатрисном светорассеянии — эта проблема подробно освещена, например, в [261]. Для случая больших частиц основные результаты применения теории Рэлея — Ганса — Дебая (которая справедлива при условии гораздо более мягком, чем малость параметра qR) приведены выше. Здесь только важно напомнить, что форма светорассеивающей частицы обуславливает нетривиальные угловые зависимости уже при определении коэффициента диффузии (рис. 46).

Дело в том, что время, за которое частица перемещается на расстояние $1/q$ (меньшее, чем размер частицы) в направлении вектора q , как и интенсивность рассеяния, зависит от ориентации частицы. В результате увеличивается вклад в спектр частиц с определенными ориентациями (какими именно — зависит от q), что приводит к отклонению

наблюдаемого (кажущегося) коэффициента диффузии от его истинного значения.

Для броуновского движения микроорганизмов интерпретация экспериментально определяемых функций $G^{(1)}(\tau)$ или $I^{(1)}(\omega)$ представляет с учетом полидисперсности (как по размеру, так и по параметру формы) серьезную проблему именно вследствие того, что $qR > 1$. Различные виды самостоятельного движения с разной степенью и характерными временами корреляции, разумеется, лишь усложняют ситуацию. Поскольку имеются две причины отличия корреляционных характеристик светорассеяния от чисто диффузионного случая — детерминированные перемещения частицы на расстояния, большие по сравнению с длиной волны света, и ориентационные эффекты, — разумно предло-

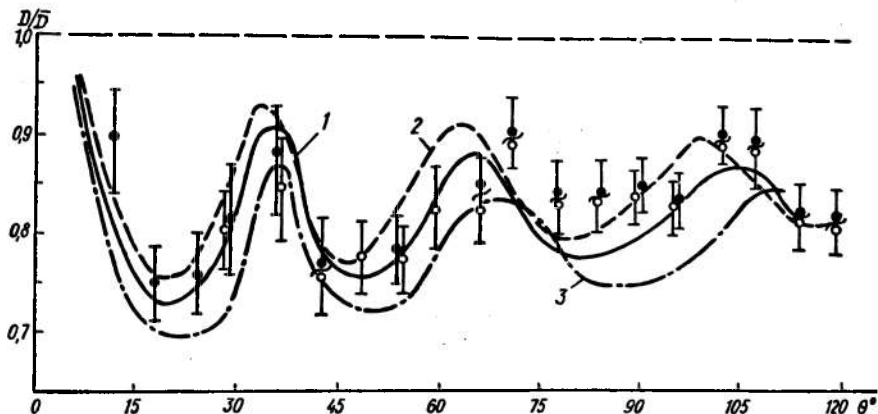


Рис. 46. Угловая зависимость отношения коэффициентов диффузии вытянутого эллипсоида и сферы того же объема (по [135]):

1—3 — эллипсоид с разным отношением полуосей

жить следующую классификацию возможных и наблюдаемых форм клеточной подвижности:

1. Упомянувшееся выше изотропное линейное перемещение. Возможны два случая прямолинейного движения с детерминированной скоростью: скорость частицы остается постоянной на длине $1/q$; скорость на расстояниях порядка $1/q$ изменяется по определенному закону. Линейное перемещение может быть охарактеризовано длиной пробега и средним значением скорости либо распределением скоростей. В случае изменяющейся, например по синусоидальному закону скорости, искомые параметры — частота и амплитуда изменения скорости.

2. Ориентационные эффекты:

2а) хаотические изменения ориентации. Фактически это случай вращательной диффузии с соответствующим эффективным коэффициентом;

2б) вращение анизотропной частицы с постоянной угловой скоростью;

2в) возможно покачивание частицы относительно какой-либо ее точки. Частица может быть как бы «подвешена» за один конец, другой при

этом совершает осцилляции вокруг оси прямолинейного движения. Такое движение (оно известно под названием виглинг) характеризуется частотой осцилляций и максимальным углом отклонения оси симметрии частицы от направления движения;

2г) определенная ориентация протяженной частицы относительно направления прямолинейного движения также может влиять на вид измеряемых $G^{(1)}(\tau)$ или $I^{(1)}(\omega)$. Такая ситуация отмечена, в частности, для движения бычьих сперматозоидов, головка которых представляет собой плоский диск [129].

3. Внеосевое движение (непрямолинейные траектории движения). Наиболее типичным является спиральное движение микроорганизмов. Описание этого вида движения может быть сведено к определению частоты вращения и параметров траектории: ρ -радиуса и h -шага спирали.

Полезно еще раз подчеркнуть, что факторы непрямолинейности траектории³ сказываются на виде корреляционной функции или спектра при условии сравнимости параметров ρ и h с величиной $1/q$. В случае чисто спирального движения можно, в частности, охарактеризовать траекторию, измеряя полуширину $\tau_{1/2}$ функции $G^{(1)}(\tau)$ при больших и малых q [97]:

$$\rho/h = \frac{1}{2\pi} [(q\tau_{1/2})^2|_{q \rightarrow 0} / (q\tau_{1/2})^2|_{q \rightarrow \infty} - 1]^{1/2}. \quad (5.5)$$

Реальное движение микроорганизмов, как правило, сочетает несколько перечисленных форм. С помощью адекватного моделирования в ряде случаев удастся получить достоверную информацию о параметрах движения. Основные результаты изучения немышечной подвижности, полученные преимущественно в рамках традиционных подходов корреляционной спектроскопии, мы приводим в виде следующей таблицы (табл. 14).

Описание реального движения объекта в перечисленных исследованиях связано с подгонкой часто весьма громоздкого функционала к наблюдаемой корреляционной функции. Этот функционал в случаях сложного движения может зависеть от пяти — семи параметров. Ясно, что хотя бы некоторые из них должны быть при подгонке зафиксированы либо с помощью независимых измерений другими методами, либо путем априорных предположений (например, о независимости вращательного и поступательного движения, оптических характеристиках объекта и т. д.). В большинстве случаев возникает необходимость подробного анализа угловых зависимостей корреляционной функции, а следовательно, тщательного ее измерения для разных углов, что соответственно увеличивает продолжительность эксперимента.

По-видимому, интересно рассмотреть в качестве возможной альтернативы все многообразие методических подходов корреляционной спектроскопии в применении к задаче анализа собственной подвижности.

Флуктуации числа частиц в объеме. Интересные возможности может дать применение различных вариантов негауссовой корреляционной спектроскопии (§ 2.2). Во-первых, сам размер объектов исследования благоприятствует регистрации излучения малого числа частиц, что

Т а б л и ц а 14. Исследование форм клеточной подвижности методами корреляционной спектроскопии

Тип движения	Исследуемый объект	Регистрируемые параметры	Литературный источник
1а. Прямолинейное с $v = \text{const}$ (обычно в предположении максвелловского распределения)	<i>E. coli</i> Сперматозоиды <i>S. typhimurium</i>	Средняя скорость, распределение скоростей (по методу сплайнов или поточечным дифференцированием спектра)	[77, 89, 248] [144] [226]
	<i>E. coli</i>	Средняя скорость и средняя длина пробега, продолжительность фаз твидлинга и пробега	[207, 208]
1б. Прямолинейное с детерминированной скоростью	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Сперматозоиды	Частота и амплитуда осцилляций в направлении линейного перемещения	[89, 98, 123, 200] [97, 98, 123]
2а. Вращательное стохастическое (по типу вращательной диффузии)	Анизотропные частицы различной формы с $gR \sim 1$, расчет для модельных частиц	Характерное время поворота (коэффициент ротационной диффузии)	[39, 77, 89, 129, 135]
2б. Вращение с $\omega = \text{const}$	Модель — вытянутый эллипсоид вращения	Частота вращения	[89, 135]
2в. Покачивание (виглинг) + + прямолинейное движение	Модель — два точечных связанных рассеивателя	Частота осцилляций, угол отклонения от направления перемещения	[77, 89]
2б, 2в, 3. Вращение, виглинг, спиральное движение	Результаты численных расчетов для вытянутого эллипсоида	Частота вращения или покачивания, угол отклонения	[89, 135]
1а и 3. Спиральное и поступательное движение	Вытянутый эллипсоид; <i>E. coli</i>	Частота вращения, прогрессивная скорость	[77, 89, 135]
1а и 3. То же (спиральная траектория)	Модели — сфера, сплюснутый эллипсоид, сперматозоиды	Параметры спиральной траектории (кривизна спирали и шаг)	[89, 97, 98, 129] [97, 98, 122, 123, 129]
1а и 3. То же (движение по спирали)	Модели — сфера, вытянутый и сплюснутый эллипсоиды вращения; <i>E. coli</i>	Параметры спиральной траектории, а также отношения полуосей эллипсоидов	[89, 98, 135]

облегчает наблюдение эффектов негауссовости. Во-вторых, сложный характер движения делает актуальным применение этих методов, так как они позволяют исключить вклад тех типов движения, которые приводят к фазовой модуляции рассеянного света. Простейшим применением негауссовой корреляционной спектроскопии является изучение флуктуаций числа частиц в рассеивающем объеме.

Этот метод предложен довольно давно [207] и с успехом использован для анализа подвижности четырех штаммов *E. coli*, точнее, для изучения наблюдающихся в бактериальном движении фаз — свободного пробега и твидлинга [208]. Напомним суть метода. Если в сильно разбавленной суспензии сформирован малый освещенный объем известных геометрии и размеров, то корреляционная функция фототока (а скорее, фотоотсчетов, так как обычно речь идет об очень малых световых потоках) содержит, как мы видели в § 2.2, член, пропорциональный $N\Omega^2 I^2 \langle W(r(0)) W(r(\tau)) \rangle$, описывающий прохождение частиц через объем.

Возможность надежной регистрации этого члена может быть достигнута, во-первых, уменьшением концентрации рассеивателей, однако этот путь связан с неизбежным увеличением времени эксперимента для набора статистики по объектам. Во-вторых, за счет увеличения апертуры фотосбора. Эта вторая возможность предпочтительнее, так как желательно в довольно широких пределах изменять параметры измерительного объема для разных объектов, кроме того, возникают дополнительные возможности наблюдения ориентационной динамики, о чем речь пойдет ниже.

Корреляционную функцию вероятности нахождения частицы в рассеивающем объеме можно выразить через ее среднеквадратичное смещение за время τ — $s^2(\tau)$:

$$\langle W(r(0)) W(r(\tau)) \rangle \sim \left(\frac{d^2}{d^2 + \frac{2}{3} s^2(\tau)} \right)^2 \left(\frac{L^2}{L^2 + \frac{2}{3} s^2(\tau)} \right), \quad (5.6)$$

где d — поперечный, а L — продольный размер измерительного объема. Далее возможны два предельных случая: 1) если длина свободного пробега $\Lambda \gg d$ (для определенности считаем $d \ll L$), среднеквадратичное смещение на временах, за которые спадает эта корреляционная функция, $s(\tau) \sim V\tau$; 2) при $\Lambda \ll d$ частица многократно меняет направление в пределах рассеивающего объема, и движение становится диффузионным: $s(\tau) \sim \sqrt{D_{\text{эфф}} \tau}$. Таким образом, изменяя параметры измерительного объема, мы можем определить скорость поступательного движения и величину $D_{\text{эфф}}$, которая, в свою очередь, связана со средней длиной свободного пробега и $\langle \cos \rangle$ — средним косинусом угла между последовательными прямолинейными участками траектории. Эти величины характеризуют соотношение фаз твидлинга и свободного пробега в бактериальном движении ($D_{\text{эфф}} = \Lambda V / (1 - \langle \cos \rangle)$).

Приведенные рассуждения справедливы в предположении независимости движения рассеивателей, их сферичности и справедливости модели случайных блужданий, подобно молекулам идеального газа.

Второе и третье предположения весьма сомнительны, однако результаты измерений хорошо согласуются со значениями параметров движения *E. coli*, полученных на основе малоугловых измерений квазиупругого светорассеяния в процессе хемотаксиса, на которых мы остановимся ниже.

Таким образом, спектроскопия флуктуаций числа частиц вполне оправдывает себя для решения подобных задач, хотя, к сожалению, опыт ее применения для изучения подвижности практически исчерпывается перечисленными работами.

Существует, впрочем, еще один экспериментальный подход, близкий к рассмотренному, на котором в методическом плане мы останавливались в § 2.3. Как и спектроскопия числа частиц, он связан с наблюдением эффектов негауссовости, но, в принципе, может обеспечить более богатую информацию о биологическом движении. Это — метод взаимной корреляции.

Применение метода взаимной корреляции. Идея использования функции взаимной корреляции выдвинута уже давно [44, 116], хотя экспериментальные подтверждения эффективности метода пока немногочисленны [39, 116, 148]. Последние две работы относятся к изучению других объектов, и в этой главе, по-видимому, не стоит их подробно рассматривать, а в работе [39] обездвиженные бактерии *E. coli* были использованы в качестве удобной модели анизотропной светорассеивающей частицы для демонстрации изучения вращательной диффузии, *E. coli* — почти идеальный вытянутый эллипсоид вращения. Результат этих исследований будет приведен ниже — в главе, посвященной внутренней динамике.

Для микроорганизмов временные масштабы диффузионных движений на расстоянии $1/q$ и разного рода ориентационных эффектов подвижности существенно различны. При оптимальном выборе параметров измерительного объема функция взаимной корреляции может нести информацию практически только о характере изменения ориентации микроорганизмов. Если вспомнить также о возможности наблюдения антикорреляции, то перспективность метода для анализа сложных форм движения не вызывает сомнений. К сожалению, опыты применения взаимной корреляции для изучения внеосевого движения нам пока неизвестны. По-видимому, это связано в первую очередь с экспериментальными трудностями метода.

Однако не так давно в другом своем варианте метод взаимной корреляции привлек внимание биофизиков. Речь идет об исследовании движения бычьих сперматозоидов, проведенном новозеландскими учеными, применившими времяпролетную схему измерения [256]. Если частица последовательно пересекает два освещенных объема, разнесенных на расстояние l , функция взаимной корреляции фототока двух регистрирующих приборов имеет максимум на времени $\tau = l/V$ и ширину, определяемую отношением диаметра светового пучка d к V . Функция и результат подгонки по методу наименьших квадратов показаны на рис. 47 (здесь параметры схемы регистрации и результатов расчета следующие: $d = 32,4$ мкм; $l = 90,1$ мкм; средняя скорость движения $\bar{V} = 157$ мкм/с; ширина распределения скоростей $V_0 = 33$ мкм/с).

Авторы работы [256] подробно проанализировали методическую сторону вопроса (схемные решения, оптимизация разрешения прибора и т. д.). Поскольку преследовалась цель изучения распределения скоростей линейного перемещения сперматозоидов, обсуждены возможности подавления как гауссовой составляющей, так и ориентационных эффектов ($G^{sz}(\tau)$) на рис. 47 — результат измерения для объемов, освещенных разными линиями аргонового лазера). В более ранних работах этой группы ученых имеется весьма полезное рассмотрение влияния ориентации, взаимодействия частиц и концентрационных эффектов

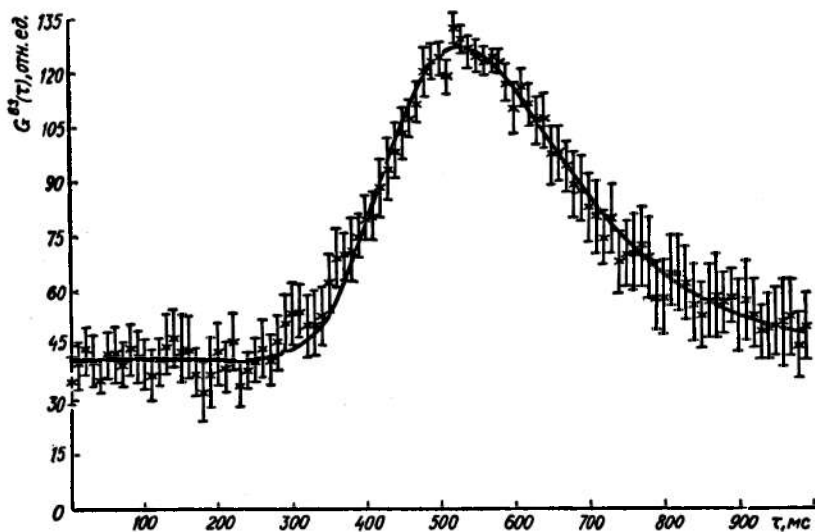


Рис. 47. Функция взаимной корреляции для времяпролетной схемы при рассеянии на сперматозоидах и результат подгонки (по [256])

на результаты применения квазиупругого светорассеяния в его традиционных вариантах. Так, при определении отношения числа подвижных сперматозоидов (ПС) к числу неподвижных (НС) обычно используется отношение амплитуд быстрой и медленной релаксационных мод в автокорреляционной функции, что может привести к серьезным ошибкам ввиду игнорирования следующих обстоятельств: 1) НС вследствие геотаксиса ориентированы преимущественно головкой вниз, что резко меняет интенсивность рассеяния на них; 2) концентрация ПС значительно возрастает вблизи стенок кюветы; 3) воздействие ПС на НС, которое растет по мере увеличения концентрации ПС, приводит, с одной стороны, к изотропизации распределения ПС, с другой — к резкому увеличению скорости перемещения НС. С увеличением фракции ПС быстрая и медленная моды становятся почти неразличимыми.

Применение времяпролетной техники измерений, позволяющее преодолеть ряд трудностей, возникающих в традиционных методах квазиупругого светорассеяния, имеет свои недостатки. Будучи чувствительным практически только к линейным перемещениям на расстоянии, большие по сравнению с $1/q$, метод, однако, требует, чтобы корре-

ляционная функция $G^{33}(\tau)$ определялась движением микроорганизмов перпендикулярно к лучам. Но, во-первых, поскольку сперматозоиды имеют тенденцию двигаться по направлению к стенкам кюветы, при ориентации лучей перпендикулярно к стенке это требование в значительной степени оказывается выполненным. Во-вторых, этот тип микроорганизмов демонстрирует преимущественную ориентацию частиц вдоль направления перемещения (см. пункт 2 нашей классификации типов движения), поэтому основной вклад в сигнал дают частицы, движущиеся именно в нужном направлении [129]. Однако применяя времяпролетную схему к изучению движения других объектов, это обстоятельство непременно следует учитывать.

Одно- и двухлучевые схемы наблюдения взаимной корреляции дают целый ряд дополнительных возможностей для исследования различных видов микроскопической динамики. Большинство современных коррелометров позволяет непосредственно измерять функцию взаимной корреляции, и дополнительные усилия экспериментаторов связаны лишь с преобразованием оптической схемы регистрации. Конечно, нельзя сказать, что метод взаимной корреляции остается в полном небрежении, но настоятельная необходимость привлечь к нему большее внимание исследователей побуждает авторов вновь возвращаться к этому вопросу. Относится это и к исследованию направленного перемещения микрообъектов.

Детерминированное движение микроорганизмов (таксис). В микробиологии известны три вида таксиса, играющего важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов: ответ на изменение температуры — термотаксис; для светочувствительных организмов — фототаксис и наиболее универсальный процесс — хемотаксис — движение по или против градиента концентрации веществ, существенно влияющих на биологическую клетку. Нам не известны исследования по термотаксису, связанные с созданием градиента температуры, хотя температурные условия, разумеется, сильно сказываются на характеристиках и самом типе движения [63, 165]. Для бычьих сперматозоидов, в частности, отмечены отклонения от $q\tau$ — скэйлинга при изменении температуры. Термоответ бактерий *E. coli* (увеличение частоты твидлинга при увеличении температуры от 20 до 30 °C) может ингибироваться *L*-серином. Сравнение этого эффекта для различных штаммов позволяет авторам [165] судить о строении терморцептора *E. coli*.

Что касается реакции микроорганизмов на световое воздействие, для жгутиковых одноклеточных подвижных водорослей отмечены три типа фотоответа [68]:

фотокинез (зависимость скорости движения от интенсивности света);
фототаксис (движение клетки по направлению к источнику света или от него);

фотофобная реакция (остановка клетки с последующим движением в случайном направлении, вызванная временными изменениями интенсивности света).

Авторы работы [68] изучали фотокинез *Euglena gracilis*, а также фототаксис *Naematococcus pluvialis*. Применяя гетеродинную и гомодинную схемы измерений различной геометрии, можно оценить ли-

нейную скорость, частоту биений жгутиков и вращения тела бактерии. По изменениям этих характеристик под действием светового излучения можно сделать определенные выводы о механизме преобразования энергии у микроорганизмов этого типа, функционировании фоторецептора и т. д. В методическом плане эти результаты мало прибавляют к изложенному выше, поэтому подробно останавливаться на этих работах мы не станем.

Хемотаксис — явление, играющее очень важную роль для выживания популяции микроорганизмов и известное более 100 лет [106]. Однако раньше проводились преимущественно исследования макроскопических проявлений хемотаксиса. Построение микроскопической картины хемотаксиса бактерий стало возможным лишь с развитием соответствующей техники наблюдений в последние два десятилетия [62, 71, 164]. Понимание того, почему движутся вдоль градиента аттрактантов или репеллентов микроорганизмы, неизбежно предполагает ответ на вопрос, как именно происходит такое движение. Микроскопическая модель хемотаксиса, в которой бактерии, как предполагается, регулируют макроскопическое перемещение посредством изменения соотношения фаз твидлинга и свободного пробега, была построена на основе наблюдения треков частиц и движения в капиллярах. Но для получения точной количественной информации корреляционные методы в настоящее время, на наш взгляд, остаются вне конкуренции. Макроскопическое проявление коллективного движения бактерий в искусственно созданном градиенте химических веществ состоит в формировании движущейся полосы хемотаксиса. Систематическое исследование хемотаксиса бактерий *E. coli* в градиенте кислорода и используемого в качестве аттрактанта *L*-серина было предпринято американскими исследователями [89, 248]. Движение микроорганизмов в соответствии с моделью пробег — твидлинг характеризуется четырьмя параметрами: средней продолжительностью фазы твидлинга; средней длительностью пробега; средней скоростью линейного перемещения и эффективным коэффициентом трансляционной диффузии в процессе твидлинга. Техника оптического гомодинирования в этих экспериментах была дополнена сканированием лазерного луча вдоль направления хемотаксического движения полосы с регистрацией интенсивности светорассеяния, что позволило определить профиль хемотаксиса и временную кинетику распространения полосы (рис. 48). На рисунке видно, что в процессе хемотаксиса формируются две полосы, одна из которых связана с лимитированием процесса кислородом, вторая — *L*-серином.

Авторы [248] применили интересный методический прием, заключающийся в одновременной регистрации корреляционных функций фототока в двух взаимно перпендикулярных плоскостях рассеяния — параллельно $G_{\parallel}^{(1)}(\tau)$ и перпендикулярно $G_{\perp}^{(1)}(\tau)$ к направлению хемотаксиса. Выражение $G_{\parallel}^{(1)}(\tau)$ в предположении максвелловского распределения скоростей частиц в фазе свободного пробега (что приближенно выполняется в этом случае) может быть записано следующим образом:

$$G_{\parallel}^{(1)}(\tau) = e^{-q^2 V^2 \tau^2 / 2} + 3i \frac{|\langle V \rangle|}{V_0} \langle J_1(qV\tau) \rangle, \quad (5.7)$$

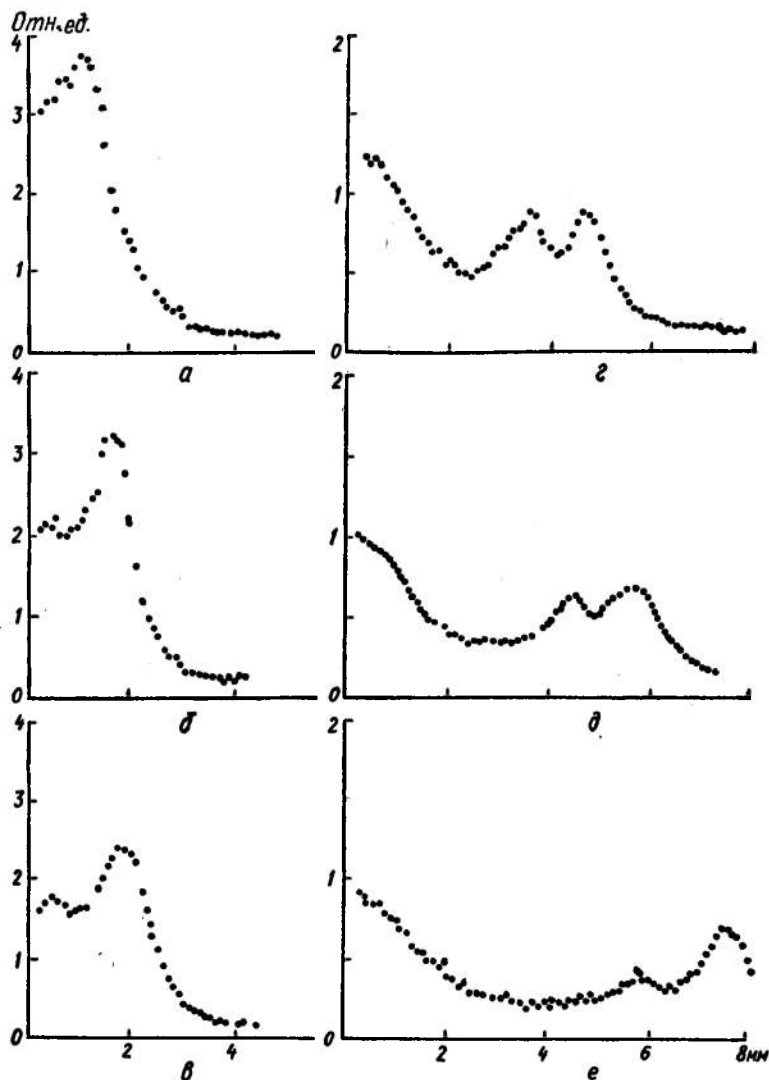


Рис. 48. Кинетика оптической плотности бактериального препарата вдоль градиента концентрации *L*-серина (по [248]).

Время миграции (мин): а — 2,3, б — 5,3, в — 7,4, г — 18,2, д — 23,0, е — 31,2

а $G_1^{(1)}(\tau)$ дается формулой (5.2). Здесь $J_1(qV\tau)$ — сферическая функция Бесселя I порядка; $|\langle V \rangle|$ — средняя скорость миграции полосы. Наблюдаемая в перпендикулярном направлении корреляционная функция не отличается от случая изотропного распределения скоростей. Интересно, что при гетеродинном режиме измерений $G_{||}^{\text{гет}} = \text{Re } G_{||}^{(1)} =$

$= G_1^{\text{гет}}$, в то время как гомодинная корреляционная функция

$$G_{\parallel}^{\text{гом}} = |G_{\parallel}^{(1)}|^2 = |G_1^{(1)}|^2 + 9 \frac{|\langle V \rangle|^2}{V_0^2} \langle J_1(qV\tau^2) \rangle. \quad (5.8)$$

Отметим некую непривычность ситуации: в гомодинной корреляционной функции имеется информация о дрейфе полосы, в то время как при гетеродинировании эта информация в корреляционной функции в явном виде не содержится. При описании броуновского движения с такой ситуацией мы не сталкивались (см. § 2.1). В этом особенность таксиса — в то время как средние квадраты скоростей пробега во всех направлениях равны, существует выделенное направление (по градиенту концентрации кислорода, субстрата и т. д.), в котором средняя длительность пробега больше, чем в других. На практике это вызывает необходимость учета этой малой поправки (типичное значение $|\langle V \rangle|/V_0$ порядка 0,3 — 0,6) при гомодинной регистрации.

Необходимо учитывать также корреляционную функцию, соответствующую твидлинговой фазе движения, это — экспонента с временем релаксации, пропорциональным q^2 . Ее относительный вклад равен отношению длительностей фаз твидлинга и свободного пробега.

Полное выражение для корреляционной функции довольно громоздко и представляет собой линейную комбинацию членов, соответствующих твидлинговому движению и свободному пробегу, вполне поддающуюся процедуре прямой подгонки с целью определения микроскопических параметров хемотаксиса. Результат регистрации корреляционных функций в продольном и поперечном направлениях представлен на рис. 49. Таким образом, гомодинная регистрация в двух ортогональных направлениях под малыми одинаковыми углами позволяет определить основные параметры хемотаксиса в рамках модели движения «твидлинг — свободный пробег» (частицы предполагаются точечными, но выбор малых углов наблюдения позволяет пренебречь ориентационными эффектами). Время твидлинга оказалось равным 0,43 с, а время свободного пробега, как и следовало ожидать, различно для движения вдоль градиента (0,60 с) и в поперечном направлении (0,17 с).

Интересно проведенное в работе сопоставление макро- и микроскопических параметров хемотаксиса. Последние нетрудно связать [150] со скоростью движения полосы и скоростью ее распывания, которые могут быть определены по результатам сканирования (см. рис. 48). Полное совпадение результатов свидетельствует о правильности микроскопического описания процесса.

За последние два десятилетия разработан ряд методических подходов корреляционной спектроскопии для анализа различных видов и форм движения микроорганизмов: малоугловые измерения гомодинной корреляционной функции и анализ угловых зависимостей полуширины корреляционной функции; применение доплеровской анемометрии; спектроскопия флуктуации числа частиц в измерительном объеме; метод взаимной корреляции для одно- и двухлучевой схем. Большой прогресс достигнут в теоретическом описании движения микроорганизмов — влияния больших времен корреляции и ориентационных

эффектов на вид корреляционной функции и спектра квазиупругого светорассеяния. Предложены в качестве альтернативы прямой подгонки способы восстановления распределений скоростей частиц — поточечное дифференцирование спектра оптического гетеродинамирования и метод сплайнов [226]. Стали применяться комбинации квазиупругого светорассеяния и других оптических методов (индикатрисное светорассеяние, одновременная регистрация в различных направлениях, деполяризационная корреляционная спектроскопия).

С помощью корреляционных методов в настоящее время удастся определить широкий спектр параметров микроскопического движения:

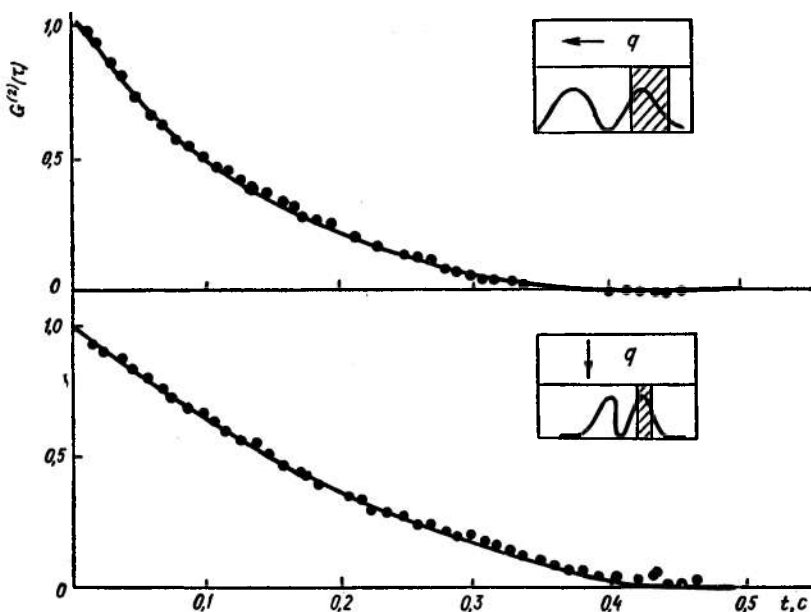


Рис. 49. Регистрируемые корреляционные функции при наблюдении параллельно и перпендикулярно направлению миграции полосы (по [248])

моменты распределения скоростей линейного перемещения (среднее значение, ширину, а в отдельных случаях — восстановить вид распределения);

параметры распределений непрямолинейного и ориентационного движения (вращения, покачивания, твидлинга, спирального движения и пр.);

процент подвижных клеток;

параметры движения клеточных органелл (частота биений жгутиков флагеллярных микроорганизмов, ресничек эпителиальных клеток и т. д.).

Вместе с тем возможности корреляционной спектроскопии используются далеко не полностью. Так, спектроскопия флуктуаций числа частиц пока не нашла широкого применения в исследовании подвижности; ее использование в настоящее время ограничивается упоминавшими-

ся нами демонстрационными экспериментами, хотя авторы литературных обзоров отмечают достоинства методики — простота реализации оптической схемы, устойчивость к погрешностям модели движения и пр. Регистрация взаимной корреляции лишь в последнее время стала использоваться для изучения движения микроорганизмов, однако только в варианте с времяпролетной схемой, т. е. возможности изучения ориентационной динамики пока остаются вне поля зрения исследователей. Может показаться, что для характеристики биологического образца, возможно, достаточно и интегральных параметров, получаемых без дополнительных усилий и традиционными методами, а тонкие ориентационные эффекты представляют лишь академический интерес. Но вот достаточно показательный, на наш взгляд, пример: зарегистрировано 13 различных форм движения сперматозоидов [122, 231], из которых только две характерны для нормальных клеток, а за остальные ответственна та или иная патология.

Современное развитие методической основы корреляционной спектроскопии опережает осознание ее связи с насущными задачами медицины, биофизики, микробиологии, ряда прикладных дисциплин. Авторы этой книги искренне надеются способствовать ликвидации такого разрыва.

ГЛАВА 6

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ

Употребив в названии этой главы слово «электрофоретическое», мы должны дать необходимые пояснения по крайней мере по двум пунктам. Во-первых, не вызывает сомнений, что корреляционные методы пригодны для изучения направленного движения в любых полях — как электрическом, так и магнитном, гравитационном. Почему именно электрофорез — явление движения в электростатическом поле — дал название отдельной методике корреляционной спектроскопии? Во-вторых, учитывая, что электрофорез — один из наиболее распространенных методов современного естествознания, используемых биологами, авторы чувствуют необходимость обосновать внедрение в практику биофизических исследований нового метода регистрации электрофоретической подвижности.

Что касается ответа на первый вопрос, достаточно вспомнить, что практически все упомянутые выше применения корреляционной спектроскопии относятся к исследованию биологических объектов в растворах (или суспензиях). Роль явлений, так или иначе связанных с электрическим зарядом макромолекул, клеток, полимеров и т. д. (сольватации, сорбции, межчастичного взаимодействия), огромна, и заряд микрообъекта часто является даже более важной его характеристикой, чем размер или молекулярно-массовое распределение.

Попытка ответить исчерпывающим образом, но кратко на второй вопрос выглядела бы голословной. Со времени открытия самого явления электрофореза методы измерения электрофоретической подвижности непрерывно совершенствовались, и сейчас количество их исчисляется сотнями. С другой стороны, ознакомившись с многочисленными экспериментальными трудностями описываемых в этой книге методов, легко понять, что предлагая приложить к исследуемому образцу электрическое поле, мы отнюдь не облегчаем задачу экспериментатора. Приходится иметь дело с целым комплексом трудно учитываемых, иногда принципиально неустранимых термических, гидродинамических и других явлений, связанных с протеканием электрического тока через электролит, таких, как конвекция, электроосмотическое скольжение жидкости, поляризация электродов, разогрев раствора. Итак, ответ на второй вопрос мы пока отложим. Прочитав данную главу, читатель сам сможет сделать вывод о целесообразности применения электрофоретического светорассеяния (ЭФС) в интересующей его области.

Классификация методов электрофореза. Чтобы дать представление о месте ЭФС среди современных методов, использующих явление электрофореза, следует перечислить основные разновидности электрофореза и указать существенные различия между ними.

Во-первых, существуют аналитические методы, цель которых состоит исключительно в определении электрофоретической подвижности объекта, и препаративные, с помощью которых осуществляется физическое, пространственное разделение фракций с разной электрофоретической подвижностью (ЭФП).

Далее по способу регистрации ЭФП различают макро- и микроскопический электрофорез. Макроскопические методы основаны на наблюдении коллективного перемещения микрочастиц в электрическом поле. Микроскопические методы предполагают либо визуальное наблюдение отдельных частиц, либо анализ других проявлений микроскопического движения (к этой группе относится и ЭФС, где регистрируются спектральные или корреляционные характеристики света, рассеянного движущимся объектом).

Наконец, можно проводить электрофорез в растворе и в поддерживающей среде. Роль последней состоит в обеспечении стабильности электрофоретических макроскопических зон, предотвращении конвекции и седиментационных эффектов. Однако в этом случае неизбежно приходится учитывать, что в процесс включается и взаимодействие заряженных частиц с компонентами поддерживающих сред, в качестве которых могут выступать целлюлоза, агар-агар, полиакриламид, другие непроводящие пористые материалы. В методиках с использованием поддерживающих сред ради достижения стабильности электрофоретических зон приходится жертвовать точностью описания процесса, необходимой для количественной интерпретации результатов. Учет адсорбции ионов, испарения растворителя, электроосмотического переноса в пористых средах крайне затруднен в связи со слабым развитием теоретических представлений и моделей электрофореза в пористой структуре. Случай электрофореза в градиенте pH (поддерживаемом, как правило, градиентом плотности растворителя) — изoeлектрическое фокусирование, несмотря на отсутствие пористого носителя, также должен быть отнесен к методам с поддерживающей средой.

Существует большое количество конкретных методик электрофореза с использованием поддерживающих сред (так называемый зональный электрофорез), о которых ввиду их широкого распространения нельзя не упомянуть: низковольтный электрофорез на бумаге; электрофорез на ацетатной целлюлозе; электрофорез в гелях — агаровом и полиакриламидном; тонкослойный электрофорез; иммуноэлектрофорез (вертикальный, двумерный, перекрестный, стереоиммуноэлектрофорез и др.); двумерный электрофорез и многие другие. Явления диффузиофореза (движение в градиенте концентрации электролита) и диэлектрофореза (движение нейтральных частиц в неоднородном электрическом поле) также дали название соответствующим методикам.

Огромное многообразие методов наблюдения движения в электрическом поле вынуждает нас четко определить место ЭФС, которому посвящена эта глава, среди других методов электрофореза. Электрофоретическое светорассеяние — это аналитический метод регистрации движения микроскопических частиц под действием электрического поля с помощью квазиупругого светорассеяния в гомогенном растворе.

Электрофоретическая подвижность частиц в электролите. Подробное рассмотрение существующих теоретических подходов к описанию электрокинетических явлений в рамках этой главы, разумеется, невозможно. Имеется целый ряд солидных монографий [19, 74, 75], где прослеживается развитие представлений о строении двойного заряженного слоя, играющего определяющую роль в электрофорезе и электроосмосе. Эти два процесса — движение взвешенных в электролите частиц и движение электролита относительно твердой стенки — две стороны одного явления, проявляющегося по-разному в зависимости от того, что неподвижно — жидкость или стенка. Электроосмос надо отличать от переноса растворителя при электролизе, который зависит только от состава электролита и нечувствителен к наличию и свойствам твердой стенки или перегородки. Электрокинетические же явления определяются наличием термодинамического потенциала, возникающего на поверхности твердой фазы при контакте с электролитом. Поскольку даже краткое изложение современных достижений теории электрофореза заняло бы слишком много места, в этой главе мы ограничимся тем, что приведем основные соотношения и введем те понятия, без которых нельзя обойтись, рассказывая о методе ЭФС.

На первый взгляд определить скорость движения частицы с зарядом Q в электрическом поле E нетрудно. Достаточно приравнять электрическую силу QE и силу стоковского трения $6\pi\eta RV$, чтобы получить

$$V_{ep} = \frac{e\zeta E}{6\pi\eta}, \quad (6.1)$$

где ζ — поверхностный потенциал частицы, $\zeta = \frac{Q}{Re}$; e — диэлектрическая проницаемость среды. На самом деле эта формула, называемая формулой Хюккеля, справедлива только, если «забыть» о существовании противоионов, экранирующих заряд частицы. Распределение противоионов при движении частицы изменяется, и кроме электрической силы, действующей на частицу, надо учитывать еще силы, действующие на противоионы и вызывающие движение жидкости вокруг частицы, а также взаимодействие деформированного слоя противоионов с частицей. Все это приводит к тому, что формула (6.1) верна только при $\kappa R \ll 1$, где κ^{-1} — радиус экранировки

$$\kappa = \sqrt{\frac{4\pi e}{k_B T} \sum_i C_i Q_i^2}, \quad (6.2)$$

где C_i — концентрация i -го иона; Q_i — его заряд.

Если условие $\kappa R \ll 1$ не выполняется, описание электрофоретического движения значительно усложняется. Однако в противоположном предельном случае при $\kappa R \gg 1$ оказывается возможным получить от-

вет из простых феноменологических рассуждений, опирающихся на симметрию явлений электроосмоса и электрофореза. Если закрепить частицу, то силы, действующие на находящиеся в жидкости противоионы, приведут жидкость в движение так, что вдали от частицы установится постоянная скорость течения. Из соображений относительности ясно, что эта скорость совпадает со скоростью движения частицы в неподвижной жидкости.

Рассмотрим капилляр с заряженными стенками произвольной формы, к концам которого приложено напряжение. Силы, действующие на жидкость, сосредоточены в слое толщиной порядка κ^{-1} вблизи стенок. В объеме же силы отсутствуют, и при постоянном давлении движение жидкости потенциально, т. е.

$$\left. \begin{aligned} V &= \nabla \Psi \\ \nabla^2 \Psi &= 0 \end{aligned} \right\} \quad (6.3)$$

Но точно таким же уравнениям удовлетворяет и электрическое поле, с заменой V на E , а Ψ — на электрический потенциал. Совпадают и граничные условия — равенство нулю нормальных к поверхности компонент V и E (последнее следует из отсутствия тока через стенки капилляра и верно только для непроводящих стенок). Мы приходим к выводу, что везде $V \sim E$. Где капилляр уже, там больше поле и пропорционально больше скорость. Это подобие имеет место вдали от электродов, но будет повсеместным, если жидкость втекает с соответствующей скоростью в один электрод и вытекает из другого. Итак, ЭФП при $\kappa R \gg 1$ не зависит от формы частицы. Нам остается установить лишь коэффициент пропорциональности, рассмотрев, например, движение жидкости вблизи плоской поверхности под действием тангенциального поля E . Уравнение такого движения

$$\eta \frac{\partial^2 V}{\partial z^2} = \rho(z) E, \quad (6.4)$$

где $\rho(z)$ — плотность заряда противоионов на расстоянии z от поверхности. Поскольку

$$\frac{4\pi\rho(z)}{\varepsilon} = \frac{\partial^2 \xi}{\partial z^2}, \quad (6.5)$$

где ξ — электрический потенциал, окончательно получаем формулу Смолуховского

$$V_{ep} = \frac{e\xi}{4\pi\eta} E, \quad (6.6)$$

отличающуюся лишь коэффициентом $3/2$ от формулы Хюккеля. Подчеркнем еще раз, что выражение (6.6) справедливо только при условии $\kappa R \gg 1$ (под R надо понимать характерный размер неровностей поверхности) и для непроводящих частиц.

Обобщение теории в случае промежуточных значений κR было сделано Генри [130], получившим выражение, справедливое для слабозаряженных сферических частиц, в пределе $\kappa R \gg 1$ приближающееся к

формуле Смолуховского, а при $\kappa R \ll 1$ — к формуле Хюккеля:

$$V_{ep} = \frac{e\zeta E}{6\pi\eta} H(\kappa R, \chi); \quad (6.7)$$

$$H(\kappa R, \chi) = 1 + \frac{\chi - 1}{\chi + 0,5} [h(\kappa R) - 1]. \quad (6.8)$$

В этом выражении учитывается не только влияние толщины двойного слоя, но и отношения проводимости окружающей среды к проводимости частицы χ . Выражение для фактора $h(\kappa R)$ довольно громоздко, поэтому мы лишь укажем асимптотические значения для предельных случаев:

$$h(\infty) = 3/2; \quad h(0) = 1. \quad (6.9)$$

При $\kappa R \ll 1$ мы приходим к формуле Хюккеля независимо от соотношения проводимостей частицы и среды. Влияние проводимости на ЭФП видно из рис. 50. При $\kappa R \gg 1$

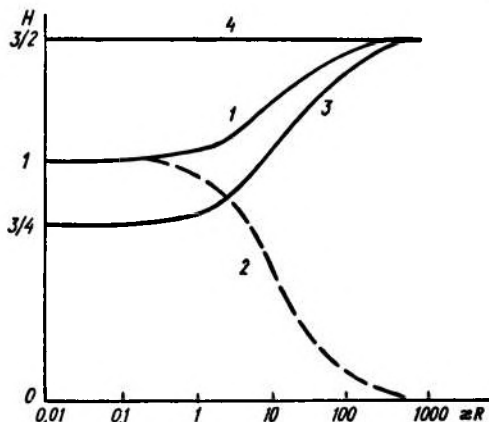


Рис. 50. Функция $H(\kappa R, \chi)$ для непроводящей (1) и проводящей (2) сферы, непроводящего цилиндра радиуса R , ориентированного перпендикулярно (3) и параллельно (4) внешнему полю (по [19])

$$V = \frac{e\zeta E}{4\pi\eta} \frac{\chi}{\chi + 0,5} \quad (6.10)$$

и скорость стремится к нулю для сильно проводящих частиц. В наиболее практически значимом случае непроводящих крупных частиц снова имеем формулу Смолуховского, а при равенстве проводимостей — формулу Хюккеля, что понятно, так как в этом случае облако противоионов не деформируется и торможение определяется гидродинамическим сопротивлением.

Поскольку все рассуждения проводились в зависимости от параметра κR , говорить отдельно о влиянии размера частиц и толщины двойного слоя не имеет смысла. Понятия крупных и мелких частиц для электрофореза определены только относительно величины κ^{-1} . Классическая теория Смолуховского — Хюккеля — Генри позволяет сделать ряд практически значимых выводов, намного упрощающих интерпретацию измеряемых значений ЭФП:

1. Условие $\kappa R \gg 1$, определяющее применимость формулы Смолуховского, выполняется для многих биологических частиц. Это относится к электрофорезу эукариотических и прокариотических клеток, большинству исследуемых субмикронных биологических и модельных структур (мембранных везикул, липосом, полимерных латексов и пр.). Независимость ЭФП от формы и размера обеспечивает возможность однозначной идентификации объектов, имеющих значи-

тельную гетерогенность по этим параметрам, по результатам электрофореза.

2. Случай отклонения от условия $\kappa R \gg 1$ значительно осложняет вопрос о влиянии формы частиц на ЭФП. В реальном электрофорезе макромолекул сравнительно часто можно рассматривать частицы в приближении непроводящих жестких сфер и пользоваться формулой 6.7 ($\kappa \rightarrow \infty$), например для глобулярных белков. Однако при более детальном рассмотрении выясняется, что именно величины, связанные с конформацией (форма, экспонирование функциональных групп на поверхности глобулы), определяют движение макромолекул в электрическом поле [50]. Ряд результатов по ЭФП эллипсоидальных частиц и цилиндров получен в последние годы, но, например, для $\kappa R \sim 1$ проблема строения двойного слоя практически не обсуждалась и на практике, как правило, используется формула Генри.

3. Теория Смолуховского — Хюккеля — Генри построена на основе представлений о равновесной структуре двойного слоя. Учет влияния поверхностной проводимости и поляризации двойного слоя [131] открыл возможность изучения электрокинетических явлений в поляризационном режиме. Однако теория поляризации двойного слоя развита в настоящее время лишь для некоторых частных случаев, поэтому классическая теория электрофореза остается основой исследования конкретных дисперсных систем.

Интерпретация электрокинетического потенциала. Входящая в выражения для скорости электрофоретического движения величина ζ -потенциала требует специального пояснения. Существующие представления о строении заряженного слоя у поверхности находящейся в электролите частицы предполагают определение нескольких величин, характеризующих ее потенциал (рис. 51, а): ϕ_0 — поверхностный потенциал; ϕ_d — штерновский потенциал (максимальное падение потенциала в диффузном слое ионов — следствие существования адсорбированного на заряженной поверхности двойного слоя ионов); ζ -потенциал — часть межфазного скачка потенциала, локализованная в той

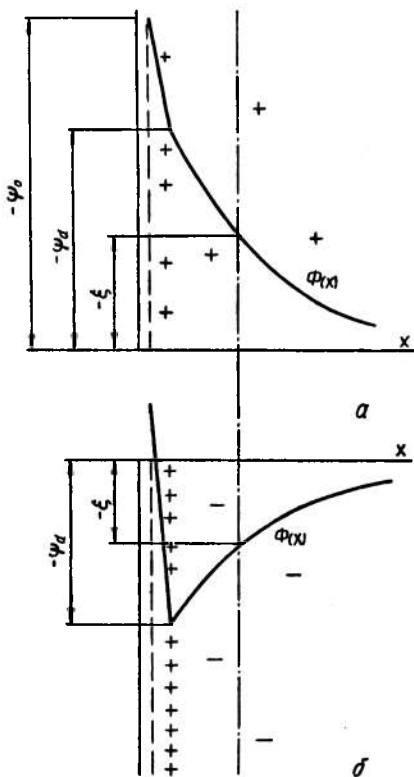


Рис. 51. Распределение зарядов и электростатический потенциал (Φ) в модели двойного слоя Штерна (по [19]):

а — без учета сорбции, б — при специфической сорбции противоионов; ϕ_d — потенциал Штерна, ϕ_0 — термодинамический потенциал, ζ — дзета-потенциал; штрихпунктирная линия — граница скольжения

части диффузного ионного слоя, которая вовлекается в движение при электрокинетических явлениях.

Величина φ_d учитывает как электростатическое взаимодействие ионов с заряженной поверхностью, так и их специфическую сорбцию, результатом которой может быть даже инверсия знака потенциала (рис. 51, б).

Особое понятие ζ -потенциала, проявляющегося только при электрофорезе либо электроосмосе, отражает (правда, лишь в первом приближении) величину, определяемую при измерении ЭФП. Выражение, связывающее поверхностный заряд σ и потенциал φ_0 , может быть получено при существенных упрощениях (симметричный электролит, отсутствие сорбции) из решения уравнения Пуассона:

$$\sigma = \left(\frac{2\epsilon k_B T C}{\pi} \right)^{1/2} \operatorname{sh} \frac{Q\varphi_0}{2k_B T}. \quad (6.11)$$

Отсюда следует монотонное убывание потенциала φ_0 с ростом C , но для φ_d и ζ -потенциала эта ситуация представляет скорее исключение, чем правило. Поскольку природа сил, вызывающих специфическую адсорбцию, не электростатическая, то в слое Штерна могут присутствовать ионы разного знака; количество противоионов может быть таким, что поверхность перезарядается, и зависимость как φ_d , так и ζ от концентрации становится немонотонной. Более того, как отмечено в [19], возможности количественной интерпретации ζ -потенциала ограничены неопределенностью локализации плоскости скольжения в диффузионном слое, и имеются по крайней мере три причины несовпадения φ_d и ζ .

Во-первых, тонкий слой растворителя как бы прилипает к поверхности, и ζ -потенциал отражает лишь часть полного падения потенциала во внешней части двойного слоя, где жидкость подвижна относительно твердой фазы; механические свойства жидкости в граничном слое могут быть аномальными, поэтому φ_d и ζ могут заметно различаться.

Во-вторых, даже если граница скольжения совпадает с плоскостью Штерна ($\varphi_d = \zeta$), то истинное значение ζ -потенциала может не совпадать с наблюдаемой в эксперименте величиной из-за возможности изменения вязкости и диэлектрической проницаемости вблизи поверхности.

Третье обстоятельство связано с уточнением определяющего параметра κR в описании электрокинетических явлений. Величина R , которая в простейшем случае есть радиус сферической частицы, на самом деле должна быть определена как минимальный радиус кривизны шероховатой поверхности. Соотношение κ^{-1} и характерного размера неровностей поверхности может быть таким, что сопоставление φ_d и ζ вообще невозможно.

Эти трудности интерпретации ζ -потенциала свидетельствуют о том, что вопрос об информативности его измеренного значения требует специального обсуждения в каждом конкретном случае. Связь между ζ и зарядовыми характеристиками исследуемой поверхности далеко не всегда однозначна. Так, выводы о механизмах адсорбции на ос-

новые измерений ЭФП требуют большой осторожности, особенно в отсутствие достоверных моделей взаимодействия.

Электроосмос. Рассмотрим вопрос о том, к чему приводит наличие заряда стенки. Пристеночный слой, обогащенный ионами определенного знака, а точнее, подвижная часть двойного слоя, под действием поля вовлекается в движение. В результате возникают перепад давления и, как следствие, встречный поток в средней части капилляра. Этот поток называется электроосмотическим.

Стационарное ламинарное течение жидкости при электроосмосе описывается параболическим профилем скоростей (рис. 52), а наблюдаемая скорость электрофореза V складывается из истинной скорости V_{ep} и скорости электроосмоса в данной точке плоского капилляра:

$$V = V_{ep} + \frac{V_{eo}}{2} (12y^2 - 1), \quad (6.12)$$

где y — отношение расстояния от середины капилляра к его толщине. V_{eo} так же, как и V_{ep} , подчиняется формуле Смолуховского (6.6) с заменой ζ частицы на ζ стенки. Нетрудно заметить существование так называемых стационарных уровней, где скорость электроосмотического течения равна нулю и V совпадает с V_{ep} . В плоской юквете эти уровни расположены на расстоянии 0,21 и 0,79 полной толщины капилляра от стенки. Скорость электрофореза в микроэлектрофоретических измерениях определяется, как правило, в точке, расположенной на стационарном уровне.

Наличие электроосмотического профиля скоростей осложняет проведение электрофоретических измерений. Так как электроосмос описывается теми же закономерностями, что и электрофорез, в том числе значением ζ -потенциала поверхности стенки, зависящем от трудно учитываемых факторов, необходимо или измерение V_{eo} , или локализация измерительного объема на стационарном уровне. Все это относится к стационарной картине течения жидкости, и запаздывание установления профиля относительно момента наложения поля должно быть оценено отдельно во избежание дополнительных ошибок определения ЭФП.

Время установления стационарного профиля скорости в измерительном капилляре определяется двумя факторами. Во-первых, при включении поля возникает сила, действующая на заряды в пристеночном слое, а следовательно, и на течение жидкости у стенки. Однако это изменение граничных условий становится «известно» вдали от стенки только через время τ_1 . Во-вторых, профиль скорости задается не только электроосмотическим течением у стенки, но и противоположным ему пуазейлевским потоком, возникающим под действием

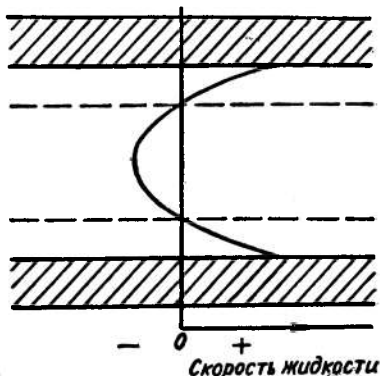


Рис. 52. Электроосмотический профиль скоростей по сечению капилляра

электроосмотической разности давлений, величина которой определяется из условия отсутствия общего переноса жидкости. Эта разность давления в электрофоретической ячейке закрытого типа устанавливается за счет разницы уровней жидкости по обе стороны капилляра, и после включения поля должно пройти некоторое время τ_2 , чтобы часть жидкости перетекла из одной электродной емкости в другую. Это время, очевидно, тем больше, чем больше горизонтальное сечение данных емкостей S_0 .

Определим время, за которое устанавливается поток в круглом капилляре после скачкообразного изменения граничных условий. Течение жидкости описывается, как известно, уравнением Навье — Стокса:

$$\rho \frac{\partial V}{\partial t} = \eta \nabla^2 V - \nabla P, \quad (6.13)$$

где ∇^2 — оператор Лапласа. Оценивая по порядку величины члены в левой и правой частях уравнения $\rho \frac{\partial V}{\partial t} \sim \rho V/\tau$ и $\eta \nabla^2 V \sim \eta V/S$, где S — сечение капилляра, получим:

$$\tau_1 \sim \frac{\rho S}{\eta}. \quad (6.14)$$

Для того чтобы определить τ_2 , необходимо сначала оценить электроосмотическое давление P . Скорость стационарного пуазейлевского потока пропорциональна, как ясно из оценок членов уравнения (6.13), величине $PS/l\eta$, где l — длина капилляра. Отсюда $P \sim l\eta V_{eo}/S$, где V_{eo} — скорость электроосмоса. Так как, с другой стороны, $P \sim \sim \rho gh$, где g — ускорение свободного падения; h — разность уровней в приэлектродных объемах,

$$h \sim \frac{l\eta V_{eo}}{\rho g S}. \quad (6.15)$$

Для установления потока необходимо, чтобы через капилляр протекал объем жидкости hS_0 . Это течение происходит со скоростью порядка V_{eo} и, таким образом,

$$V_{eo} S \tau_2 \sim h S_0. \quad (6.16)$$

Комбинируя выражения (6.15) и (6.16), окончательно получим

$$\tau_2 \sim \frac{l\eta S_0}{\rho g S^2}. \quad (6.17)$$

Разумеется, приведенные рассуждения носят качественный характер. На самом деле и установление давления, и распространение возмущения от границ происходят одновременно и не могут рассматриваться независимо. Однако факт установления электроосмотической разности давлений не меняет оценку τ_1 и даже мгновенное установление электроосмотического потока не влияет на оценку времени τ_2 . Поскольку нас интересует время установления потока в целом, можно утверждать, что оно определяется большим из времен τ_1 и τ_2 . Для каждой

конкретной конструкции кюветы оценка времени установления стационарного профиля может быть получена из соотношений (6.14) и (6.17).

§ 6.2. МЕТОД ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

Постановка задачи и связь с анемометрией. Электрофоретическое светорассеяние представляет собой распространение принципов лазерной доплеровской анемометрии на случай движения светорассеивающих частиц в электрическом поле. Однако практическое приложение анемометрических методов к определению ЭФП произошло сравнительно недавно [240, 249]. Объясняется это, по-видимому, тем, что совмещение двух довольно сложных, не связанных до некоторого времени общностью задач методик не казалось экспериментаторам достаточно оправданным.

Но за истекшие 15 лет со времени появления указанных первых работ метод ЭФС прошел путь от успешной демонстрации до серийного выпуска приборов. Широкие возможности ЭФС в определении ЭФП разнообразных объектов в большом диапазоне размеров (от макромолекул до больших эукариотических клеток) позволяют ему успешно конкурировать с существующими методами аналитического электрофореза, прежде всего с микроэлектрофорезом, так как последний предполагает визуальное наблюдение объекта и с трудом поддается автоматизации. Простота получения и обработки данных, возможность дополнительной классификации по оптическим параметрам (малоугловое светорассеяние, флуоресценция), малый измерительный объем, возможность изучения субмикронных частиц обусловили широкое применение ЭФС в электрофорезе биологических клеток. Правда, по сравнению с микроэлектрофорезом теряется возможность морфологической классификации клеток, часто желательной для биологов.

Что касается исследования макромолекул, ЭФС имеет свои экспериментальные ограничения, связанные с разрешающей способностью метода. Она снижается обратно пропорционально размеру частиц вследствие диффузионного уширения доплеровского пика, зато в определении абсолютного значения ЭФП методы подвижной границы, различные модификации зонального электрофореза, свободно-проточный электрофорез не выдерживают никакой конкуренции с ЭФС.

В связи с тем что схемы реализации доплеровских анемометров подробно обсуждались нами выше (§ 2.4), здесь мы практически не будем касаться оптической части эксперимента. Напомним лишь, что согласно выражению (1.49) частотный доплеровский сдвиг в случае электрофореза в поле напряженности E

$$\Delta\nu = \frac{2n\mu E}{\lambda} \sin \theta/2 \cos \varphi, \quad (6.18)$$

где $\mu = \frac{e\xi}{4\pi\eta}$ — электрофоретическая подвижность; φ — угол между q и V . Спектр фототока, смещенный относительно нуля частот на величину $\Delta\nu$, уширен за счет броуновского движения частиц, и его полу-

ширина Γ равна $Dq^2/2\pi$. Из того, что Δv пропорциональна q , а $\Gamma \sim q^2$, следует необходимость выбора оптимального угла наблюдения электрофореза в зависимости от размера объектов. Ужигрис [243] предложил характеризовать спектральное разрешение ЭФС отношением

$$\frac{\Delta v}{\Gamma_{об}} = \frac{qV}{Dq^2 + \gamma}, \quad (6.19)$$

где $\Gamma_{об}$ — ширина спектра на половине высоты; γ — аппаратное уширение, связанное с конечным разрешением спектроанализатора, конечным временем прохождения частицы через измерительный объем, неоднородностью поля, а также другими факторами, приведенными

ниже. Продифференцировав выражение (6.19) по q , легко убедиться, что максимальное разрешение достигается при равенстве диффузионной и аппаратной ширин доплеровской линии. Поскольку типичное аппаратное уширение $\gamma \sim$

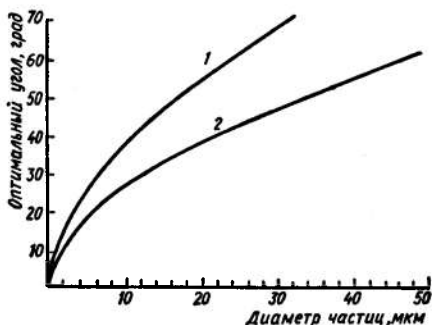
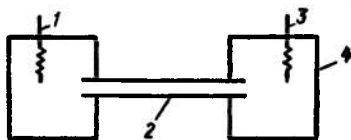


Рис. 53. Зависимость оптимального угла наблюдения от диаметра частиц при аппаратных уширениях 1 (1) и 0,5 (2) Гц. $\lambda = 633$ нм, $n = 1,33$

Рис. 54. Ячейка Тизелиуса:

1, 3 — электроды, 2 — капилляр, 4 — буферный объем



~ 1 Гц, расчет оптимальных углов наблюдения показывает, что электрофорез, например клеток крови, выгоднее изучать при углах наблюдения $25-45^\circ$. В случае движения макромолекул и мелких коллоидных частиц угол следует по возможности уменьшать (обычные значения при определении ЭФП белков — $1-4^\circ$) (рис. 53).

Конструкции электрофоретических кювет. В настоящее время описаны три основных типа ячеек, применяемых в установках ЭФС. Наиболее распространены кюветы типа ячейки Тизелиуса, представляющие два больших электродных объема, соединенных тонким измерительным капилляром (рис. 54). Кюветы этого типа применяются в микроэлектрофорезе и подробно описаны в литературе [14]. Такая конструкция обеспечивает как возможность наблюдений на стационарном уровне электроосмотического профиля, так и преимущественное падение потенциала на измерительной части. Правда, из-за того что свет собирается не микрообъективом, а сравнительно длиннофокусной линзой, системы светосбора ЭФС имеют большую «глубину резкости». Для тех, кто знаком с фотографией, ясно, что в этом случае на фотокатод переносится изображение участков измерительного объема как «дальше», так и «ближе» к наблюдателю, чем стационарный уровень электроосмотического профиля. Это влечет за собой дополнительное

(и несимметричное) уширение доплеровского пика, значительно ухудшающее разрешение прибора. Уменьшить это уширение можно путем увеличения сечения капилляра, что, однако, сводит на нет другие преимущества этой конструкции: труднее достичь высоких значений поля, увеличивается возможность возникновения конвективного движения жидкости. В таких кюветах применяются как круглые, так и прямоугольные плоские капилляры, ориентированные, как правило, перпендикулярно к световому лучу. Большой объем приэлектродных емкостей снижает влияние приэлектродных процессов и возможность попадания пузырьков газа и материала электродов в измерительный объем. С этой же целью, а также для уменьше-

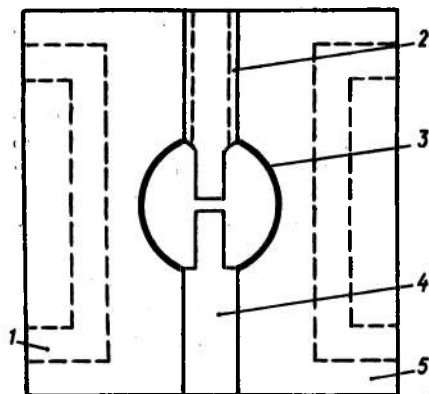


Рис. 55. Сборная кювета Уэйра и Гааза (по [120]):

1 — канал охлаждения, 2 — отверстие, 3 — электрод, 4 — окна, 5 — тефлон

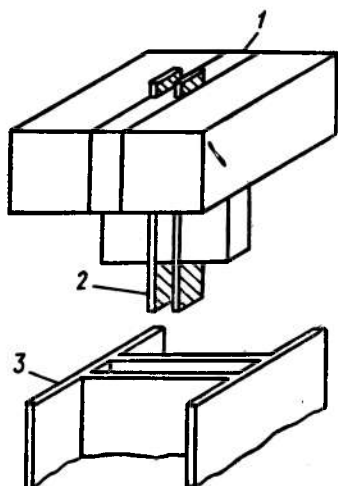


Рис. 56. Кювета с плоско-параллельными электродами:

1 — изолятор, 2 — электроды, 3 — кювета

ния используемого объема образца измерительный капилляр часто отделяют от электродного объема диализными мембранами.

Другой тип ячейки приведен на рис. 55. Это разборная конструкция, что облегчает промывку и очистку измерительной части и оптических элементов. Она состоит из двух массивных металлических блоков с высокой теплопроводностью (например, медных), разделенных непроводящими вкладышами из полимерного материала (тефлон, полиметилметакрилат и т. д.).

Здесь между электродными объемами также формируется канал прямоугольного сечения, образованный непроводящим материалом вкладышей, но этот плоский канал ориентирован вдоль светового пучка, что уменьшает электроосмотический градиент скоростей в пределах измерительного объема. Полуцилиндрическая форма электродов позволяет достичь высокой напряженности и однородности поля в зоре вкладышей при умеренных значениях поля вблизи электродов. Возможность более эффективного охлаждения, чем в ячейках Тизелиуса, позволяет снизить дрейф скорости электрофореза за счет нагрева

образца при протекании тока. Такого типа кювета использовалась и нами [40].

Третий тип применяемых ячеек предложен Ужгирисом [244]. В прямоугольную спектрофотометрическую ячейку вводятся близко расположенные параллельные плоские электроды (расстояние между электродами 1—2 мм) (рис. 56). Такая кювета практически свободна от электроосмоса в измерительном зазоре, влияние нагрева сравнительно легко может быть рассчитано; для значений разности потенциалов, при котором появляется опасность возникновения турбулентности, также получены соответствующие оценки [243]. Большие осложнения в этом случае ввиду близости электродов к объему наблюдения могут вызвать реакции на поверхности электродов, образование пузырьков, выброс коллоидных частиц материала электродов, изменение pH в результате поверхностных реакций. Эти проблемы приходится решать путем выбора материала электродов и их конструкции, а также использования знакопеременного поля.

Режим наложения поля и электроды. Приложение к электродам постоянной разности потенциалов не обеспечивает постоянства во времени напряженности поля вследствие изменения проводимости раствора вблизи электродов при протекании тока. Поэтому питание электрофоретических ячеек во всех случаях целесообразно осуществлять в режиме стабилизации тока.

Ясно, однако, что при небольшом объеме рабочей части или близко расположенных электродах через некоторое время будет происходить концентрация заряженных частиц у одного из электродов. К тому же длительная экспозиция поля одной полярности может привести к необратимым реакциям на поверхности электродов — образованию пузырьков газа, уменьшению эффективной площади электрода и пр. Униполярное питание поэтому в ЭФС не применяется.

Полярность электрического поля необходимо менять либо периодически, либо импульсно. Периодическое изменение полярности применяется, как правило, в форме меандра. Как следствие периодичности в спектре проявляются гармоники с частотами, кратными частоте переключения поля (рис. 57). Для гомогенной системы частиц, имеющих одинаковую подвижность, максимум электрофоретического доплеровского пика может быть найден из соотношения амплитуд гармоник [70]. Однако такая ситуация крайне редко реализуется на практике, ведь наибольший интерес представляет распределение по подвижностям, которое при наличии гетерогенности не поддается подобному анализу. Поэтому увеличение разрешения метода связано с максимально возможным снижением частоты переключения поля. При значениях частоты переключения, меньших диффузионной ширины пика, гармоническая структура спектра сглаживается. Для клеток крови при наблюдении под углом 30° диффузионная ширина порядка 1 Гц; такая частота переключения вполне допустима в применяемых конструкциях кювет.

Если ток протекает через раствор непрерывно, повышается температура раствора. Чтобы избежать влияния теплового действия тока, на котором мы остановимся ниже, было предложено применять им-

пульсное питание кювет [120, 221]. Длительность импульса тока, как и в случае периодического питания, определяет достигаемое разрешение. Так, для 200-канального анализатора в частотной полосе 50 Гц ширина частотного канала составляет 0,25 Гц, длина анализируемой реализации сигнала — 4 с, длительность импульса (или полупериод меандра) для достижения максимального разрешения также не должны быть меньше 4 с.

Чаще всего применяют платиновые или палладиевые электроды. Для увеличения рабочей поверхности их покрывают платиновой чернью (электролитическое осаждение тонкой дисперсии платины из

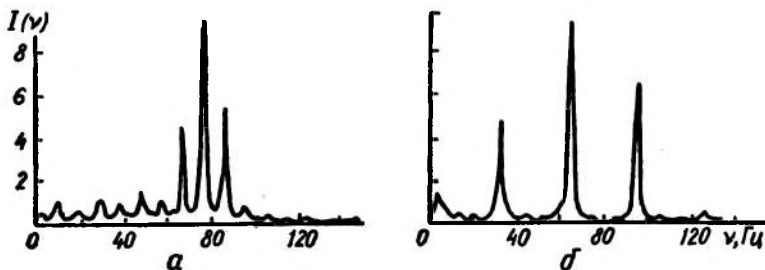


Рис. 57. Спектры ЭФС при разных частотах переключения поля (Гц) (по [70]):

а — 9,6, б — 31 Гц

раствора платинохлористоводородной кислоты). При протекании тока вблизи электродов может наблюдаться изменение рН раствора. Вследствие резкой зависимости от рН ЭФП это может вносить значительную ошибку. В приборах для микроэлектрофореза типа «Pharmacia» электроды отделены от измерительной камеры диализными мембранами и омываются буфером, что значительно снижает этот эффект, а заодно замедляет образование газовых пузырьков. Существует еще одна возможность оптимальной организации электродных процессов, пока не использованная в ЭФС — применение пористых электродов, между которыми совершается газообмен продуктами электролиза [56].

Надо помнить, что все нежелательные электродные эффекты существенно зависят от силы протекающего тока. При умеренных значениях ионной силы электролита (концентрации до десятков миллимолей) платиновые электроды устойчиво работают с частотой переключения 1 Гц и даже менее, что обычно обеспечивает достаточное разрешение. Когда же необходимы более высокие значения ионной силы (например, физиологические условия для биологических клеток — 0,15 М NaCl), применяют обратимые электроды.

Говоря об обратимых электродах, обычно подразумевают конструкции с использованием насыщенного раствора CuSO_4 или AgCl , в который погружены токоподводящие стержни, изготовленные соответственно из меди или серебра. Насыщенный раствор отделяется от рабочего буфера агаровыми пробками или пористыми сепараторами, что предотвращает диффузию материала электродов в измери-

тельный объем. Описан многослойный электрод (Cu — насыщенный CuSO_4 — пробка — насыщенный Na_2SO_4 — пробка), сохраняющийся неопределенно долго при периодической замене раствора Na_2SO_4 . Электроды такого типа выдерживают очень большие плотности тока и позволяют увеличить период переключения полярности до десятков секунд. Обратимые электроды, несмотря на это, практически не применялись еще в ЭФС. Очевидно, экспериментаторы опасаются нежелательного обмена ионами между рабочим буфером и раствором электрода. Возможность такого обмена, безусловно, существует, однако его влияние на характер ЭФС не так уж велико. Правда, при использовании обратимых электродов для точного измерения значений поля требуется прямое измерение тока. Но регистрация тока, как и падения потенциала непосредственно в измерительной части кюветы, легко выполняема.

Исключение представляют платинированные серебряные и платинированные хлорсеребряные гибридные электроды, используемые для кюветы с малым межэлектродным расстоянием и параллельными пластинами [242]. Указано, что газовыделение и выброс коллоидного AgCl не происходит до плотностей тока 500 mA/cm^2 при напряженности поля $\leq 50 \text{ В/см}$. Хотя механизм работы таких электродов подробно не рассматривался, измеренные значения ЭФП клеток крови в физиологическом растворе очень хорошо согласуются с другими данными. По-видимому, в течение полупериода один из электродов работает как хлорсеребряный, который устойчив в катодной области, а другой — как платиновый, который «лучше» в качестве анода, затем — наоборот. Газовыделение же предотвращается адсорбцией в пористом платиновом слое.

Конвекция и учет нагрева. Протекание электрического тока связано с разогревом раствора, иногда довольно значительным. В результате снижается вязкость растворителя и, следовательно, увеличивается подвижность частиц. Повышение температуры, однако, имеет и другое следствие — увеличение удельной проводимости раствора. Поскольку напряженность электрического поля связана с силой тока законом Ома, поддержание постоянного тока приводит к ослаблению поля. По счастливой случайности увеличение подвижности в первом приближении практически полностью компенсируется этим снижением напряженности поля, поэтому нагрев не приводит к существенному изменению скорости движения. В расчетах же достаточно использовать значения проводимости и вязкости для одной и той же температуры.

Гораздо более важным является вопрос о возможности возникновения конвективного движения жидкости, нарушающего стационарный профиль скоростей и делающего невозможным измерение скорости электрофореза. Конвекция является следствием гравитации и неравномерного нагрева жидкости, зависящего от конфигурации и теплопроводности стенок, образующих измерительную часть кюветы. Если имеется горизонтальный слой жидкости толщиной d ; α , K , ϵ и ρ — соответственно коэффициент теплового расширения, теплопроводность, удельная теплоемкость, плотность при средней температуре

раствора, то безразмерный параметр конвективной неустойчивости — число Рэлея — определяется выражением $crg\Delta Td^3/K\eta$, где ΔT — перепад температур. Известно, что устойчивость сохраняется, пока число Рэлея < 1700 [209]. Отсюда всегда можно оценить максимально допустимый нагрев и оптимизировать режим электрического питания. Применяя импульсное питание, мы до известной степени избегаем как электродных реакций и поляризации, так и температурных эффектов, но при этом время наблюдения увеличивается пропорционально скважности. Экспрессность является одним из главных преимуществ ЭФС, как и корреляционных методов вообще, поэтому увеличение времени эксперимента должно быть достаточно хорошо обосновано получаемым выигрышем в разрешении, точности и т. д.

Если за счет конструктивных особенностей и эффективного охлаждения опасность конвекции устранена, тепловое действие тока на практике не является главным препятствием для корректного измерения ЭФП. Повышение разрешения приборов ЭФС связано прежде всего с учетом электроосмоса и минимизацией эффектов, обусловленных вынужденным переключением направления тока.

Электроосмос. Измерение или устранение? Как указывалось выше, электроосмотический профиль скоростей может вносить ошибки порядка самой величины ЭФП. Существуют три принципиальные возможности снижения влияния электроосмоса на результаты измерений.

Первая, заимствованная из техники микроэлектрофоретических измерений, — настройка приемной оптики на стационарный уровень электроосмотического профиля. Как уже отмечалось, единственный способ уменьшить спектральное уширение, связанное с градиентом электроосмотической скорости в измерительном объеме, — уменьшение размеров измерительного объема. Этот путь, не говоря уже о требованиях к качеству оптики и сложности юстировки, влечет за собой неизбежное увеличение продолжительности эксперимента, связанное с набором необходимой статистики для анализа распределений ЭФП.

Другой способ состоит в устранении причин, вызывающих электроосмотическое скольжение, — поверхностного заряда стенок измерительного капилляра. Уменьшение поверхностного заряда может быть достигнуто с помощью специальных покрытий. Так, при покрытии измерительного канала гемоглобином [120] наблюдалось практически полное отсутствие профиля скоростей. Такое использование чистых белков, оправданное в демонстрационных целях (см. также [191]), разумеется, нельзя рекомендовать для широкого применения, к тому же могут иметься соображения чисто биологического плана. Покрытие может смываться со стенок и сорбироваться на поверхности исследуемых объектов, искажая истинную картину электрофореза. Значительно более оправданно применение покрытий из полимерных материалов, обеспечивающих минимальный заряд поверхности, например из метилцеллюлозы, и силиконизация поверхности стеклянных капилляров. Покрытие метилцеллюлозой используется в серийно выпускаемых приборах «Lazypher» [224] и лазерном цитоферометре фирмы «Malvern» [191]. Описана и процедура покрытия сорбцией на стен-

ки из водного раствора [221]. Такое покрытие можно использовать в течение нескольких дней, затем требуется его восстановление. Наши данные (рис. 58) показали эффективность нанесения метилцеллюлозы на тефлоновые стенки измерительного канала с последующим высушиванием и полимеризацией. Достигнуто уменьшение профиля скоростей до вполне приемлемой величины $\sim 2\%$ измеренного значения ЭФП (измерялась подвижность бактерий *E. coli* в 10 мМ трис-буфере). Отметим, что такое покрытие давало воспроизводимые результаты в течение по крайней мере трех месяцев.

Возможность существенно уменьшить градиент скорости связана с так называемыми ячейками открытого типа, также впервые примененными в микроэлектрофорезе. В частности, предложена двухтубная конструкция [19], в которой за счет подбора диаметра и длины второго межэлектродного капилляра обратный электроосмотический поток смещал стационарный уровень в центр измерительного канала, где градиент скорости в этом случае оказывался нулевым. К сожалению, подбор второго капилляра технически сложен, что ограничило распространение двухтубных ячеек.

Сама идея открытой ячейки связана с выравниванием разности

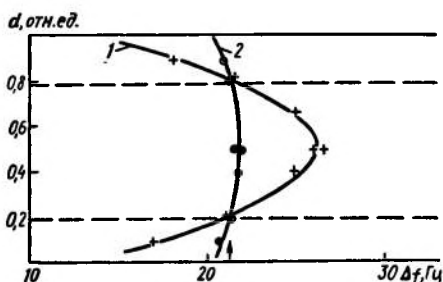


Рис. 58. Электроосмотический профиль скорости в измерительном зазоре между тефлоновыми вкладышами до (1) и после (2) покрытия стенок метилцеллюлозой

давлений, возникающей вследствие электроосмоса. Независимо от способа выравнивания давления оно приводит к образованию плоского профиля и, таким образом, устраняет уширение доплеровской линии. Преимущества ячеек открытого типа для микроэлектрофоретических измерений подробно разбираются в работе С. С. Духина и соавт. [14]. В их конструкции во втором капилляре находится воздушный пузырек, который движется в результате разности давлений и выравнивает их. Однако в конструкциях кювет для ЭФС принцип выравнивания давлений еще не использовался.

Наконец, при условии допустимого градиентного уширения пика прямое измерение электроосмотического профиля в буфере определенной ионной силы в конкретной измерительной кювете может быть использовано для коррекции наблюдаемых значений скорости. Однако на практике предпочтительнее конструкции, не требующие корректирующих измерений. В связи с этим нельзя не упомянуть о кюветах с плоскими, близко расположенными электродами, используемыми в некоторых работах [243, 244], но эти кюветы имеют свои указанные выше недостатки.

Аппаратурное уширение и дальнейшее развитие методики. Подведем краткий итог изложению методических вопросов ЭФС и попытаемся обсудить наиболее перспективные пути совершенствования техники измерений.

Если при конструировании электрофоретической кюветы учтены требования, предотвращающие возникновение конвекции, и обеспечивается корректный учет электроосмоса либо его устранение, то остаются два основных источника спектрального уширения, ограничивающие разрешение при определении абсолютной величины ЭФП. Кроме возможной неоднородности поля, вызванной конструктивными особенностями (форма электродов, их параллельность, точность изготовления деталей кюветы), это прежде всего эффекты, связанные с переключением полярности. При любом знакопеременном питании кюветы они приводят либо к появлению «мертвого» времени, затягивающего эксперимент, либо к трудно учитываемым искажениям формы спектра, крайне осложняющим восстановлением истинного распределения ЭФП.

Первая причина уширения может быть устранена применением постоянного поля, т. е. питания кюветы без переключения полярности за время измерения, составляющее в большинстве случаев 1—2 мин. Большой опыт использования разных типов электродов в других электрофоретических методиках позволяет считать приложение постоянного поля вполне возможным. Так, описанная в работе [223] кювета ЭФС допускает переключение полярности один раз в 150 с; такой режим питания можно считать режимом постоянного поля, и в случае регистрации ЭФП клеток крови время регистрации без переключения обеспечивает точность определения ЭФП $\sim 1\%$. Этот результат, заметим, получен с использованием палладиевых электродов — за счет применения больших приэлектродных буферных объемов, отделения рабочей части от электродов диализными мембранами; эффекты поляризации и дрейфа рН практически не сказываются на работе ячейки. Использование электродов обратимого типа также достаточно перспективно для приложения поля без изменения полярности. По-видимому, не стоит подробно обсуждать еще не реализованные на практике конструкции. Мы отметим только принципиальную возможность с помощью гидромеханического переключателя менять полярность питания на электродах без изменения полярности в измерительном объеме. В этом случае время использования электродов ограничено лишь диффузией приэлектродного электролита в рабочий объем и может составлять десятки часов. Такие системы могут с успехом применяться и в препаративных методиках электрофореза.

Так или иначе, проблема приложения поля, постоянного за время измерения направления, не является непреодолимой, и, исчерпав этот резерв повышения точности, мы сталкиваемся с диффузионной шириной доплеровской линии. С уменьшением размеров исследуемого объекта диффузионное уширение все более ограничивает разрешение ЭФС. До известной степени влияние диффузионного уширения может быть снижено уменьшением угла наблюдения светорассеяния. При этом, разумеется, начинают сказываться другие факторы, ограничивающие разрешение: увеличение «глубины» измерительного объема, влияние неоднородности поля, остаточный градиент скоростей за счет неполного устранения электроосмоса, качество оптических поверхностей. Несмотря на это, имеется ряд публикаций по исследо-

ванию везикул [40, 67, 251] и макромолекул [121, 203, 251, 265], где применялись малоугловые схемы.

Реальной альтернативой гетеродинным схемам, довольно трудно реализуемым в области малых углов, являются анемометрическая дифференциальная схема и вообще некогерентное детектирование рассеянного света. Описанная в § 2.4 дифференциальная схема лазерного анемометра очень удобна для наблюдения направленных перемещений светорассеивающих частиц и поэтому нашла применение в серийных приборах для измерения ЭФП [191]. Такой дифференциальный анемометр — пример применения спектроскопии флуктуаций интенсивности светорассеяния. Измерительный объем формируется с помощью световых пучков от одного лазера, но его существенным недостатком является влияние флуктуаций интенсивности лазера.

Формирование двух измерительных объемов пучками разных длин волн или различной поляризации и регистрация функции взаимной корреляции позволяют практически полностью исключить вклад собственных флуктуаций. В отличие от описанного в гл. 5 применения такой схемы для изучения подвижности микроорганизмов ситуация в случае ЭФС более благоприятна в плане увеличения разрешения. Ведь наложение электрического поля обеспечивает строго заданное направление движения в отличие от случая движения микроорганизмов. Ориентационные эффекты также должны существенно меньше влиять на ширину измеряемой линии, ввиду отсутствия спонтанной переориентации частиц. Уширение за счет конечных размеров иллюминированных объемов легко поддается учету. Определив точный вид аппаратной функции, можно, по-видимому, обеспечить построение гистограмм ЭФП с большим разрешением.

Дискуссионным является вопрос о влиянии размера частиц на разрешение предлагаемых, к сожалению, пока гипотетических, схем ЭФС с использованием регистрации взаимной корреляции. Для больших частиц сравнительно легко обеспечить соотношение сигнал/шум порядка единицы, если среднее число частиц в объеме $N \ll 1$. Но в этом случае не диффузионное, а аппаратное уширение определяет разрешение метода, и прямой необходимости регистрации эффектов негауссовости нет. Для малых частиц, когда N велико, а соотношение сигнал/шум мало, скоррелированность движения рассеивателей должна обеспечить надежную регистрацию негауссовых эффектов и отсутствие диффузионного уширения. Хотя этому до сих пор и нет экспериментальных подтверждений, обоснование методов негауссовой спектроскопии вполне убедительно (§ 2.2). Перспектива повышения разрешения, ограниченного только диффузионным пределом, существенно расширяет класс задач ЭФС, и прогресс экспериментальной техники в этом направлении крайне желателен. Что же касается аппаратного уширения, то обеспечение стационарной картины электрофо-реза за счет приложения постоянного за время наблюдения поля и подавление других источников спектрального шума дают основания для достаточно оптимистических прогнозов.

Нельзя не сказать еще об одном обстоятельстве, не носящем принципиального характера, но часто доставляющем большие хлопоты

экспериментаторам. Речь идет о требованиях к чистоте образца — отсутствию механических примесей в исследуемой суспензии. Эти требования тем выше, чем «мельче» изучаемые объекты, и гораздо строже, чем для диффузиометрии с помощью оптического смещения. Дело в том, что диапазон вариации ЭФП в природе невелик и частицы самой различной природы и размеров часто имеют близкие скорости электрофореза. Вследствие сильной зависимости рассеивающей способности от размера одна примесная, даже не слишком крупная по сравнению с интересующими нас объектами частица может «смазать» всю накопленную последовательность информативных реализаций сигнала и сильно исказить распределение ЭФП. Помимо традиционных видов очистки (фильтрация, центрифугирование и пр.) заслуживает внимания применение так называемого цифрового пылевого фильтра [194]. Это устройство, блокирующее вход анализатора или накопителя при превышении некоторого заданного оператором «квазистационарного» уровня доплеровского сигнала. Оно может быть реализовано как на основе очень простой логической схемы, так и с помощью специальной первичной обработки сигнала в реальном масштабе времени.

§ 6.3. ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Задачи электрофоретического светорассеяния. Подавляющее большинство существующих электрофоретических методик ориентировано прежде всего на препаративное разделение объектов исследования по зарядовым характеристикам. За этим, как правило, следует анализ полученных фракций по другим интересующим исследователей параметрам. Исключение представляют собой, пожалуй, лишь микроэлектрофорез и свободно-проточный электрофорез, где определяются абсолютные значения ЭФП, на основе которых и строятся гипотезы о строении и свойствах поверхности объекта.

Без преувеличения можно сказать, что техника ЭФС является в настоящее время наиболее эффективным аналитическим методом электрофореза, так как позволяет за 1—5 мин получить статистически достоверную картину распределений ЭФП всего ансамбля исследуемых частиц. Поэтому спектр задач ЭФС, представляющих как теоретический, так и прикладной интерес, необычайно широк, и осветить хотя бы важнейшие из них в этой главе необходимо.

Когда мы рассматривали проблемы интерпретации ζ -потенциала заряженных частиц, отмечалось, что вопрос о связи φ_d и ζ во многом остается неясным и развитие теории в значительной степени тормозится недостатком экспериментальных данных в комплексных электроповерхностных исследованиях. Появление надежного и экспрессного метода, каким является ЭФС, должно существенно ускорить накопление экспериментальных фактов и способствовать детальному изучению строения и свойств двойного слоя.

Распространенные электрофоретические методы выделения отдельных белков, липопротеидов и нуклеиновых кислот не дают ин-

формации о значении ЭФП между тем как заряд биологических микромолекул часто является ключевым параметром при анализе структуры и биохимических механизмов функционирования биологических объектов. Поэтому, несмотря на трудности измерения светорассеяния, которые растут с уменьшением рассеивающей способности частиц, исследования в этой области продолжают, и отмеченная в предыдущем параграфе возможность преодолеть диффузионный предел разрешения ЭФС должна, очевидно, ускорить прогресс в изучении зарядовых характеристик макромолекул. Это «пограничная» область ЭФС и метода подвижной границы, но первый имеет несомненные преимущества прежде всего в исследовании кинетических явлений: ассоциация — диссоциация белков, другие равновесные процессы.

При микроэлектрофорезе, как правило, говорят о среднем значении ЭФП, часто обходя вопрос о гетерогенности реальных биологических систем, что объясняется большим временем, требуемым для получения полной картины распределения. Между тем аналитическое выделение подклассов частиц с разной подвижностью весьма информативно, как показали последние исследования клеток, модельных систем и пр. [225, 244, 251].

Эти особенности метода раскрывают дополнительные возможности рассматриваемой техники электрофореза по сравнению с традиционными методами. Такое расширение круга задач аналитического электрофореза, а также большое разнообразие доступных измерению объектов обусловили быстрое внедрение ЭФС в практику биофизических и медицинских исследований во всем мире. Краткий обзор основных направлений этих исследований за последнее десятилетие представлен в этом и следующем параграфах.

Измерение заряда биологических объектов. Говорить о заряде в связи с ЭФП можно лишь в отдельных сравнительно просто интерпретируемых случаях, таких, как случай развернутых линейных молекул полиэлектролитов и денатурированных белков. Электрокинетический потенциал нативных глобулярных белков в значительной степени определяется формой глобулы, экспонированием функциональных групп на поверхности, характером взаимодействия с растворителем. В каждом конкретном случае вопрос о соответствии теоретического описания поведения реальных объектов в электрическом поле требует специального рассмотрения: связь ϕ_d и ζ , шероховатость поверхности и т. д.

Эти обстоятельства ставят на повестку дня вопрос о калибровке метода с помощью тестовых частиц с хорошо охарактеризованной поверхностью. Естественным побуждением экспериментаторов было желание использовать хорошо знакомые специалистам в области как индикатрисного, так и динамического светорассеяния монодисперсные латексные суспензии. Однако оказалось, что монодисперсные латексы существенно гетерогенны по поверхностному заряду, и использование их для калибровки электрофоретических методик нецелесообразно. Возможно, к такой гетерогенности приводит экспонирование различного числа сильных кислотных групп, применяемых для инициирования полимеризации соединений, например персульфатов.

Как бы то ни было, вопрос о калибровочных частицах для электрофореза оказался значительно сложнее, чем в случае квазиупругого светорассеяния. Специалисты в области электрофореза биологических клеток обычно рекомендуют пользоваться для калибровки суспензией эритроцитов крови барана или человека в стандартных ионных условиях. Правда, длительное хранение эритроцитов без изменения их характеристик, разумеется, затруднительно, но возобновление тестового материала не представляет серьезной проблемы. Примером искусственных систем с известными зарядовыми характеристиками (по литературным и нашим данным) могут служить дисперсии гомогенного липида. Стабильность таких суспензий достаточна для их длительного хранения, а зависимость подвижности от pH определяется хорошо известными свойствами полярной головки липидных молекул, образующих бислой сферической липидной частицы — везикулы. Так, широко распространенные в биофизических исследованиях фосфатидилхолиновые везикулы отличаются постоянством ЭФП в очень широком диапазоне pH (от 2 до 10) [29] и были бы крайне удобны для тестирования и калибровки электрофоретических методик, если бы они были заряжены. Действительно, поверхность этих везикул образована полярными головками в целом электронейтральных молекул фосфатидилхолина (цвиттерионов), и независимость близкой к нулю ЭФП таких частиц от pH объясняется компенсацией положительного заряда аминных групп отрицательными зарядами карбоксильных групп. Впрочем, это свойство лецитиновых липосом вполне может быть использовано для проверки отсутствия электроосмотического профиля в измерительной кювете. Водные же дисперсии заряженных фосфолипидов с ненулевой подвижностью, таких, как кардиолипин, фосфатидилсерин, могут быть использованы в калибровочных экспериментах.

Рассмотренный случай сферических липидных пузырьков-везикул с постоянной плотностью заряженных групп на поверхности и, следовательно, постоянной плотностью поверхностного заряда сравнительно просто описать в терминах классической теории электрокинетических явлений. На первый взгляд измерение ЭФП непосредственно дает нам информацию о заряде поверхности, причем простое строение везикул определяет независимость ЭФП от размера частиц. Однако последнее утверждение, часто трактуемое как очевидное, не совсем справедливо. Масштаб κR , применительно к которому интерпретируются электрокинетические явления, оказывается существенным и в данном случае с той разницей, что следует учитывать не только радиус частицы, но и толщину липидного бислоя.

Поскольку работы по измерению абсолютных значений ЭФП макромолекул немногочисленны, а ценность таких измерений не вызывает сомнений, следует вкратце изложить основные результаты. Исторически первая работа по применению метода ЭФС относится именно к белковым молекулам [249], однако она преследовала преимущественно демонстрационные цели. Эта же группа исследователей изучала ДНК в условиях конденсации под действием ионов двухвалентных металлов [203]. Уменьшение ЭФП при увеличении концентрации

ионов Mg^{2+} и Co^{2+} (рис. 59) хорошо согласуется с представлениями теории конденсации противоионов, причем отмечена слабая зависимость эффекта от концентрации полиэлектролита. Уменьшение подвижности определяется соотношением концентраций многовалентных и одновалентных (Na^+) противоионов. Кривая зависимости ЭФП от концентрации ионов Hg^{2+} указывает на иной механизм взаимодействия. Этот факт согласуется с известным утверждением [262], что ионы Hg^{2+} вызывают разделение спиралей ДНК при связывании с аминокислотными основаниями.

Еще одна работа, выполненная в той же лаборатории [251], относится к изучению синтетического полиэлектролита — поли-*L*-лизина

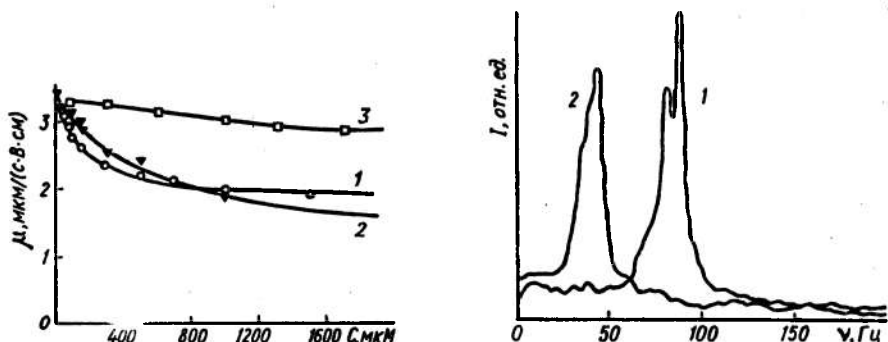


Рис. 59. Зависимость ЭФП (μ) ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} (1), Co^{2+} (2) и Hg^{2+} (3) (по [203])

Рис. 60. Спектры ЭФС поли-*L*-лизина (20 мг/мл) при низкой ионной силе (1) и в присутствии 20 мМ KCl (2) (по [251])

и способствует выяснению вопроса о так называемом экстраординарном состоянии этого соединения в растворе. Этот термин был предложен Лином и соавт. [159], которые наблюдали резкое (примерно на порядок) уменьшение эффективного коэффициента диффузии полимера, измеренного по данным квазиупругого светорассеяния, при уменьшении ионной силы раствора и (или) увеличении концентрации полиионов. Комбинируя ЭФС с методом фотовыцветания флуоресценции, авторы [251] пришли к заключению, что информация, получаемая ЭФС и с помощью традиционной корреляционной спектроскопии, существенно различна. Электрофоретическая подвижность полиэлектролита остается вполне «ординарной», а в квазиупругом светорассеянии проявляются эффекты, связанные с наличием долгоживущих концентрационных флуктуаций в растворе. Информация об этих флуктуациях, в принципе, содержится и в данных ЭФС (рис. 60): малая ширина электрофоретического спектра никак не согласуется со значением коэффициента трансляционной диффузии макромолекул.

Областью макромолекулярных исследований, где перспективность использования ЭФС не вызывает сомнений, является изучение быст-

рых процессов ассоциации и диссоциации белковых молекул. Но что значит «быстрых»? Ясно, что при гетеродинировании для надежной регистрации скорости электрофоретического движения она должна быть постоянной на длине порядка $1/q$. Таким образом, объект должен сохранять свое состояние в течение времени $1/qV$. Для реально наблюдаемых значений ЭФП $1-5 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} / \text{В} \cdot \text{см}^{-1}$ и типичных значений $q = 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ и $E = 20 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$ минимальное время «пробы» объекта в зоне наблюдения составит $50-10 \text{ мс}$ соответственно. При более высоких значениях напряженности поля нижний предел временного разрешения метода пропорционально смещается в область более коротких временных интервалов. Примером такого исследования может служить работа [121], где изучалась диссоциация гемоглобина — переход тетрамер — димер при высоких значениях рН.

Разумеется, решение исследовательских биофизических, а не только прикладных задач требует детальной информации о зависимости ЭФП от рН, положении изоэлектрической или изоточки (например, при решении вопроса о том, какие именно ионогенные группы экспонированы на поверхности объекта). Поясним, что значение рН, при котором ЭФП равна нулю, называют изоэлектрофоретической точкой, то же в отсутствие других ионов, кроме H^+ и OH^- , — изоэлектрической точкой. Иногда первую обозначают как изоэлектрическую точку, а вторую — как изоионную. Мы примем первый вариант терминологии и для краткости вместо «изоэлектрофоретическая точка» будем говорить «изоточка».

Следует помнить, что ЭФС представляет собой лишь способ (правда, обладающий весьма широкими возможностями) измерения подвижности частиц в электрическом поле. Следовательно, получение зависимости ЭФП от рН и ионной силы раствора органически вписывается в круг задач, решаемых этим методом. Если титрование кислотой или щелочью позволяет определить истинное количество ионогенных групп (по крайней мере так обычно считают, хотя в случае биологических макромолекул связывание заряженных лигандов и гидрофобные взаимодействия требуют соответствующей коррекции), ЭФП зависит прежде всего от распределения противоионов в адсорбционном и диффузном слоях. Поэтому электрофоретические измерения крайне чувствительны к ряду факторов: взаимодействию заряженных групп макромолекулы, химическому связыванию катионов и анионов буфера, степени гидратации функциональных групп во «внешних» и «внутренних» областях частицы. В частности, существует некое соглашение о применимости описания белковых молекул как гидрофобного коллоида с не слишком высокой степенью гидратации, умеренными значениями ζ -потенциала и малой асимметрией. Выяснению строгости расчетов на основе формулы Генри должно способствовать детальное исследование электрокинетических характеристик с помощью обсуждаемого метода.

Отличие ЭФС от способов определения изоточки, такие, как изоэлектрическое фокусирование, позволяющих «развернуть» рН-зависимость подвижности в пространстве, заключается в том, что распре-

деленные по длине колонки с градиентом рН белковые молекулы представляют собой вовсе не тождественные друг другу объекты в связи с возможными рН-зависимыми конформационными изменениями. Создание фиксированных условий (ионной силы, плотности растворителя, рН) в гомогенном растворе в технике электрофоретических измерений является уникальной особенностью ЭФС, если не считать мало используемого из-за экспериментальных трудностей метода подвижной границы и свободно-проточного электрофореза, аналитические применения которого весьма ограничены. Отсутствие воздействия на исследуемый объект в процессе электрофореза за счет постоянства физико-химических условий в растворе и определяет возможности ЭФС для изучения конформации, ассоциации и диссоциации биополимеров.

Что касается анализа зависимостей ЭФП от рН в случае собственных коллоидных частиц, здесь объект стабилен в широком диапазоне рН, и «электрофоретическое титрование» непосредственно дает информацию о характере поверхностных ионогенных групп. Это утверждение хорошо иллюстрируется рис. 61, где изображены зависимости подвижности от рН для капель масел с сорбированными ионогенными слоями. Кривая 1 (капли углеводорода) проявляет монотонный рост, связанный с сорбцией H^+ , кривая 2 (на капле адсорбирована сыворотка бычьего альбумина) имеет изоточку (рН 4,9), что свидетельствует о перезарядке белковой молекулы, причем изоэлектрической точке этого белка соответствует более высокое значение рН — 5,3, поскольку гидрофобная часть молекулы может связывать анионы раствора. Кривая 3 соответствует нейтральному полисахариду (декстрин), не имеющему ионогенных групп, кривая 4 (пектиновая кислота) отражает ионизацию карбоксильных групп на поверхности капли при рН от 2 до 5. Наконец, рост кривой 5 (адсорбированная тимусная ДНК) при низких значениях рН связан с ионизацией фосфатных групп.

Анализ состава системы. В приведенных в этом параграфе данных исследуемые объекты предполагаются гомогенными по заряду. Если с какой-то точностью это выполняется в случае чистых мономерных фракций белков или молекул нуклеиновых кислот, то для подавляющего большинства реальных биологических систем такое предположение неверно. Обычно, говоря о подвижности таких объектов, мысленно, или, как принято выражаться у программистов, «по умолчанию», подставляют слово «средняя». Связано это с тем, что специалисты хорошо понимают: попытка построения гистограмм ЭФП, например в микроэлектрофорезе, где вручную регистрируется каждая отдельная частица, потребовала бы слишком много времени.

В ЭФС все совершенно иначе. Если за счет выбора условий эксперимента достигнуто разрешение, достаточное, чтобы различить реально имеющиеся подвижности объектов, на получение информации о распределении ЭФП требуется такое же время, что и для анализа гомогенной по заряду системы.

Пример существенно гетерогенной по очень многим параметрам, в том числе и по заряду, системы — клеточная популяция. Электро-

форезу клеток будет посвящен следующий раздел, а здесь мы приведем результаты исследований [251, 263], посвященных везикулам. Авторы этих работ показали несколько неожиданную возможность электрофоретического анализа не только свойств поверхности эритроцитарной мембраны, но и ее внутренней, обращенной к цитоплазме стороны. С помощью специальной методики из мембран были получены и фракционированы везикулы двух типов: обычные, со свойствами поверхности, близкими к свойствам мембран intactных клеток, и инвертированные, где экспонированными на поверхности оказались группы, обращенные внутрь клетки. Суспензия везикул проявляла бимодальное распределение ЭФП: 80 % инвертированных и 20 % обычных везикул (с подвижностью примерно на 20—25 % выше, чем у инвертированных), что подтвер-

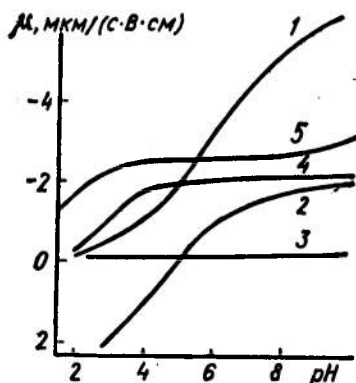


Рис. 61. pH-Зависимости ЭФП (μ) капель масла с адсорбированными на поверхности ионогенными слоями разной природы (1 — 5) (по [19])

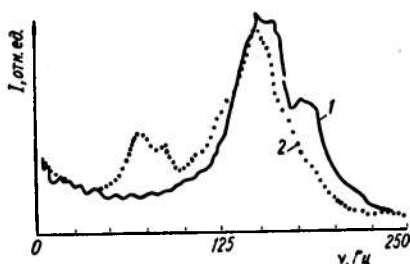


Рис. 62. Распределение ЭФП для смеси обычных и инвертированных везикул из эритроцитарных мембран до (1) и после (2) обработки нейраминидазой (по [251])

ждено и методами биохимического анализа — инкубацией с нейраминидазой — ферментом, взаимодействующим только с поверхностными карбоксильными группами мембраны эритроцитов. Практически не влияя на ЭФП инвертированных везикул, нейраминидаза снижает подвижность меньшей фракции на 60 % (рис. 62). Известно, что около 60 % поверхностного заряда эритроцитов человека обусловлено группами N-ацетилнейраминных кислот, которые и подвергаются ферментной атаке, так что получено не только качественное, но и количественное подтверждение аналитических возможностей ЭФС.

Кривая электрофоретического титрования для инвертированных везикул, приведенная на рис. 63, демонстрирует наличие перегибов при pH 4, 6, 3 и 9,2, соответствующих ионизации карбоксильных, фосфатных и аминогрупп. На основании этой кривой авторы приписывают примерно две трети отрицательного заряда частиц карбоксильным группам. Обработка фосфолипазой Д, гидролизующей одну из Р—О-связей фосфолипидов, позволяет объяснить наблюдающееся увеличение подвижности удалением положительно заряженных аминогрупп фосфатидилэтаноламина.

Вообще, анализ состава системы по данным ЭФС открывает большие возможности для изучения липидных дисперсий. В частности, сам механизм расслоения суспензии везикул, обсуждавшийся в § 4.3, может быть существенно прояснен с помощью такого анализа. Связано ли появление отдельных фракций везикул с липидным обменом

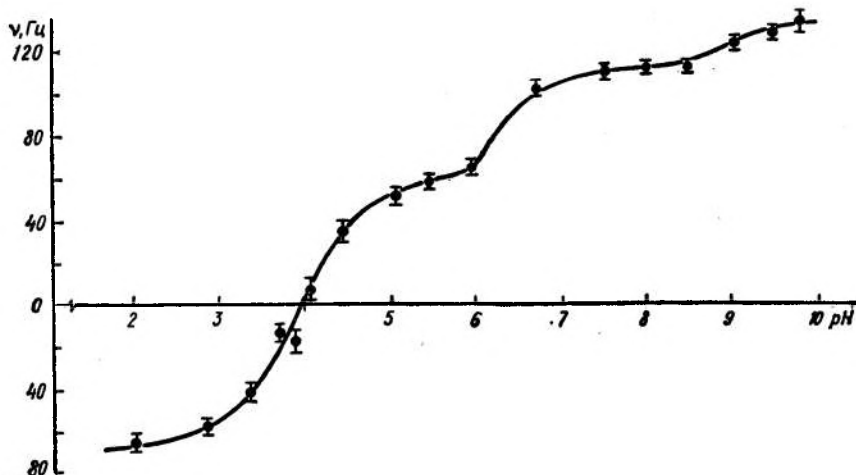


Рис. 63. Зависимость средней подвижности инвертированных везикул из мембран эритроцитов от pH (по [251])

либо с перераспределением разных липидов в бислое — ответ на этот вопрос могут подсказать исследования распределений ЭФП липидных суспензий.

§ 6.4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Структура клеточной поверхности. Исследование биологических клеток — самая благодарная и методически простая из задач ЭФС. Высокая рассеивающая способность микроорганизмов и эукариотических клеток обеспечивает высокое отношение сигнал/шум, снижая требования к чистоте образца. Довольно быстрая седиментация при горизонтальном расположении элементов оптической схемы несколько не мешает проведению эксперимента. Напротив, непрерывное замещение одних клеток другими в измерительном объеме лишь способствует более полному анализу ансамбля частиц за время эксперимента. Необходимо лишь с осторожностью подходить к вопросу о ширине доплеровской спектральной линии в случае использования дифференциальной оптической схемы в связи со статистикой рассеянного излучения (§ 2.4), т. е. тщательно контролировать концентрацию клеток.

В этой области традиционно используются микроэлектрофоретические измерения. Но сравнение методов, использующих оптическую микроскопию, с корреляционными подобно сравнению ручного труда с автоматизированным производством. Утрата единственного преиму-

щества микроэлектрофореза — возможности визуального наблюдения — полностью компенсируется высокой информативностью и быстротой ЭФС. В связи с большой распространенностью в последние годы клинических тестов на основе наблюдений электрофореза нельзя не сказать о том, что ЭФС и здесь открывает новые возможности: анализ распределений зарядовых характеристик позволяет совершенствовать эти тесты, повышая их корреляцию с наличием патологии и диагностическое значение. С выпуском серийных приборов наметилась тенденция к вытеснению микроэлектрофореза этим методом и в клинических исследованиях. Например, в сборнике [190] более половины работ посвящено применению ЭФС для диагностики опухолевых заболеваний.

Заметим, что, безусловно, выгоднее проводить электрофорез при низкой ионной силе (повышается напряженность поля при том же токе, снижается влияние электродных эффектов). Но возникающее осмотическое давление может привести к необратимым нарушениям функционального состояния клеток и их лизису. Поэтому приходится компенсировать осмотическое давление добавкой неэлектролитов (сахароза, фикол, сорбитол и пр.). Созданные таким образом условия все же отличаются от нативных, и распространять полученные результаты на функционирование клеток следует с осторожностью.

Поскольку во всех аналитических вариантах электрофореза с уверенностью мы можем утверждать, что измеряем лишь ЭФП, а не заряд и даже не ζ -потенциал, необходимо уточнить характер информации о структуре клеточной поверхности, полученной электрофоретическими методами.

Можно выделить различные уровни описания структуры поверхности биологических клеток в связи с регистрацией ЭФП. Первый уровень предполагает наличие определенных ионогенных групп (и их взаимодействие с ионами электролита) на поверхности — вопрос, обычно решаемый с помощью титрования (изменения рН при постоянной ионной силе).

Следующий уровень касается пространственного распределения поверхностных зарядов. Электростатическое экранирование не позволяет различить вклад зарядов, находящихся на расстоянии, меньшем κ^{-1} — дебаевского радиуса экранирования (κ^{-1} для физиологических ионных условий 0,145 М NaCl составляет величину порядка 0,8 нм, для 0,005 М электролита — примерно 4,4 нм). Поверхность реальных клеток, разумеется, не гладкая, масштаб шероховатости может быть порядка радиуса экранирования, и адсорбция ионов на «выпуклостях» и «впадинах» поверхности оказывает неодинаковое влияние на величину подвижности.

На третьем уровне ставится задача идентификации биологических соединений, в состав которых входят заряженные химические группы. В методическом плане — это комбинация измерения ЭФП с ферментной обработкой.

Анализ антигенной структуры клеточной поверхности допускает отвлечение от конкретного типа соединений, входящих в состав сложного антигенного комплекса. Это четвертый уровень, связанный как

с более простыми сорбционными взаимодействиями, так и с высокоспецифичными иммунными реакциями на поверхности клетки.

И наконец, возможность связать значение ЭФП с процессами жизнедеятельности клетки (наличием трансмембранного потенциала, клеточным метаболизмом и т. д.) позволяет выделить последний — пятый уровень. Разумеется, не все эти уровни интерпретации электрокинетических явлений равнозначны для биологических приложений ЭФС. Описание на первом и втором уровнях имеет, пожалуй, большее отношение к химии поверхности. Формулировка собственно биологических (и ряда медицинских) задач связана с последними тремя уровнями нашей условной классификации.

Известно [218], что большая часть отрицательного заряда эритроцитов и значительная — лимфоцитов и других клеток крови определяются карбоксильными группами нейраминных (или сиаловых) кислот. За остальной заряд ответственны α -карбоксильные и в меньшей степени β - и γ -карбоксильные группы белковых молекул для эритроцитов и неидентифицированные ионогенные группы у лимфоцитов. Обнаружено также присутствие аминогрупп, тиоловых и фосфатных групп у лимфоцитов. Эти данные получены с помощью анализа pH-зависимостей ЭФП и определения изоточек, а также обработки клеток ферментами, высвобождающими ионогенные группы определенного типа, или химическими соединениями, блокирующими их, и последующими электрофоретическими измерениями. Если оболочка эукариотических клеток — это цитоплазматическая мембрана с неким подобием скелета, то бактериальные клетки имеют еще и внешние слои: слой пептидогликанов, поверх которого располагаются полисахариды и теихоевые кислоты у грамположительных бактерий и липополисахариды, липиды и протеины — у грамотрицательных. Установлено, что заряд бактериальной поверхности складывается из зарядов карбоксильных групп, аминогрупп и некоторого количества тиоловых групп.

Наиболее распространенные способы обработки, цель которых состоит в выяснении природы ионогенных групп, основаны на действии следующих соединений: фермент нейраминидаза высвобождает заряженные группы сиаловых кислот, полиэтиленминин реагирует с карбоксильными группами, формальдегид блокирует заряды аминогрупп, карбоксипиридиндисульфид взаимодействует с тиоловыми поверхностными группами, увеличивая общий отрицательный заряд пропорционально их количеству на поверхности. Обработка протеолитическими ферментами, а затем одним из перечисленных агентов помогает выяснить, связаны ли тестируемые группы с белками или входят в состав других компонент поверхностной структуры.

У ряда бактерий наблюдаются устойчивые зависимости ЭФП от возраста культуры: в большинстве случаев в процессе культивирования она нарастает, достигая максимума в логарифмической фазе роста, затем выходит на стационарный уровень. Мутанты некоторых микроорганизмов, известные как «шероховатые» формы, которые в отличие от «гладких» не несут на поверхности определенных антигенов, имеют существенно большую подвижность. Не подвергается сомнению факт отличия подвижностей Т-(тимусзависимых) и В-лимфоцитов,

которые ответственны за выработку антител. Неоднократно высказывались предположения о связи гетерогенности ЭФП как Т-, так и В-лимфоцитов с наличием подклассов, выполняющих разные функции в организме (Т-киллеры, Т-хелперы, Т-супрессоры, В-клетки, несущие разные виды иммуноглобулинов). Они не подтверждены убедительными экспериментами, и интересно выяснить, что может дать повышение точности, обеспечиваемое ЭФС?

На ЭФП сказываются вирулентность бактерий и вирусная трансформация клеток эукариотов — факторы, тесно связанные с наличием определенных антигенных детерминант на поверхности. Антигенная структура клеточной поверхности является предметом пристального внимания исследователей, использующих методы электрофореза. Имеются сообщения об изменениях функции распределения подвижности В-лимфоцитов крови иммунизированных животных, т. е. делаются предположения о связи ЭФП и антигенной стимуляции лимфоцитов в процессе иммунного ответа. Исследование реакций антиген — антитело с помощью электрофоретических методик дает прямую информацию о ходе реакции, если заряд поверхности обусловлен преимущественно интересующим нас реагентом, как в случае искусственных диагностикумов. Если имеются дополнительные сведения об ионогенных группах, входящих в состав определяемых детерминант, то и для методик с использованием самих биологических клеток интерпретировать результаты электрофореза сравнительно легко.

Данные электрофоретических измерений широко используются для проверки различных гипотез относительно механизмов клеточной адгезии. Наиболее известные из них — это образование межклеточных мостиков двухвалентными катионами; наличие внеклеточных органических соединений, опосредующих адгезию, и наконец, представления на основе теории гидрофобных коллоидов.

Измерение электрофоретической подвижности клеток. Наиболее изучены электрокинетические свойства клеток крови человека и животных, прежде всего — эритроцитов. Видовое постоянство их ЭФП независимо от возраста, расы, пола, группы крови общеизвестно. Прис во вступительных замечаниях к сборнику [190] отмечает, что в большинстве случаев избежать недоразумений в согласовании результатов, полученных в разных лабораториях, можно с помощью простой процедуры: уколоть палец, перевести красные кровяные клетки в стандартный фосфатный буфер и прокалибровать по их подвижности собственный прибор. Это постоянство подвижности (подчеркнем — средней; в физиологических условиях $1,10 \pm 0,05$ мкм $\times$ $\times$ см/(В $\cdot$ с)) играет большую роль в различных электрофоретических тестах. Корреляции подвижности с возрастом культуры клеток не обнаружено [161].

Эритроциты крови представляют чрезвычайно монодисперсную по ЭФП систему (рис. 64). Этого нельзя сказать о других форменных элементах крови: тромбоцитах (тот же рисунок), лейкоцитах. На рис. 65 показано и распределение ЭФП для нефракционированного образца крови при хронической миелоцитарной лейкемии: число лейкоцитов столь велико, что позволяет определить их вклад

на фоне эритроцитов, которых в норме примерно на три порядка больше.

Растущие возможности ЭФС обусловили дальнейшее, более подробное изучение отдельных фракций клеток крови. Наибольшее внимание привлекли лимфоциты — клетки лейкоцитарной фракции, играющие важнейшую роль в функционировании иммунной системы. Примерно 15 лет назад были обнаружены «быстрая» и «медленная» фракции лимфоцитов, которые вскоре были отождествлены соответственно с Т- и В-лимфоцитами [218]. Наличие двух фракций подтверждено и методом ЭФС [243]. Далее предпринимались попытки проанализировать более быструю фракцию Т-лимфоцитов в связи с наличием в организме субпопуляций лимфоцитов, выполняющих

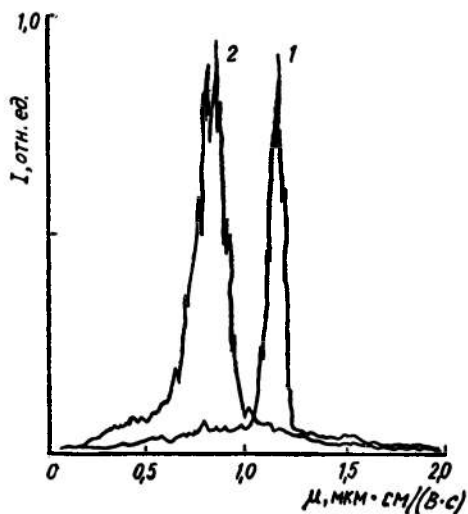
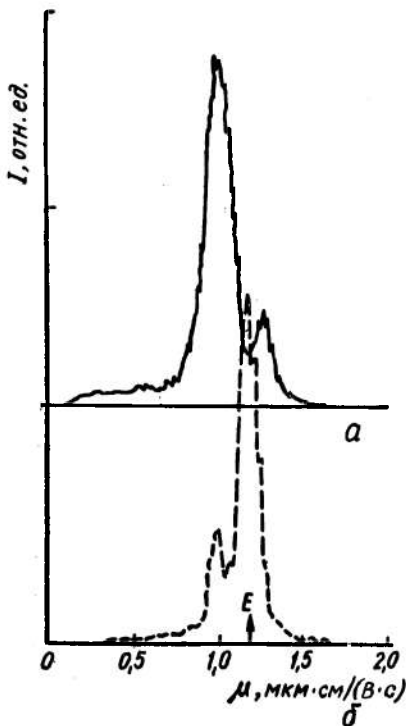


Рис. 64. Спектры ЭФП эритроцитов (1) и тромбоцитов (2) человека (по [225])

Рис. 65. Электрофоретический анализ крови пациента с хронической миелоцитарной лейкозией:

а — суммарные лейкоциты, б — форменные элементы цельной крови (по [225])



различные функции в клеточном иммунном ответе. Эти данные были получены (рис. 66) и сопоставлены с независимыми иммунологическими методами, но вызвали критику со стороны биологов из-за неправомерности такого сопоставления и сильного перекрытия разрешаемых пиков. Мы не можем принять чью-либо точку зрения по первому вопросу, и тех, кто заинтересуется этой дискуссией, отсылаем к работам [149, 191]. По поводу разрешения заметим следующее: свои измерения авторы [149] проводили в кювете с плоскопараллельными электродами, требующей быстрого переключения полярности и чувствительной к изменению параллельности электродов, что ограничивает возможности

повышения разрешения. По-видимому, только совершенствование ЭФС и, конечно, применение современных методов иммунологического анализа и фракционирования с использованием моноклональных антител могут обеспечить дальнейший прогресс анализа гетерогенности клеток иммунной системы.

Анализу состава системы с помощью ЭФС в применении к бактериальной культуре до сих пор не уделялось большого внимания. Тем не менее наши исследования [40] показали возможность изучения гетерогенности бактериальной популяции, определяющей неодинаковый ответ клеток на воздействие различных физико-химических факторов (обработка формальдегидом, условия хранения культуры, процедура замораживания — оттаивания при криоконсервации и т. д.) Есть все основания считать, что ЭФП очень чувствительна к изменениям функционального состояния живых клеток. Учитывая фактическое отсутствие тестов интерфазной гибели микроорганизмов, это обстоятельство не может не заинтересовать микробиологов.

Иммунологические реакции.

Так как наиболее распространенные методики, применяемые в иммунологии, предполагают наблюдение за реакцией агглютинации эритроцитов, индуцируемой связыванием антигенов с антителами на поверхности, то первые опыты использования квазиупругого светорассеяния в иммунологии и были связаны

с возможностью регистрации ранних стадий агглютинации микрочастиц по изменению их коэффициента диффузии (см. § 4.3). Но модификация поверхности при связывании антител с антигенами, естественно, приводит к изменению ЭФП частиц, причем если время агглютинации определяется коэффициентом диффузии эритроцитов или сравнительно крупных латексов, применяемых для создания диагностикумов, то изменения поверхностных свойств частиц при инкубации с исследуемыми антисыворотками и антигенами происходят значительно быстрее, так как для скоростей сорбции этих соединений на поверхности важен их собственный коэффициент диффузии. Таким образом, регистрация ЭФП тестовых микрообъектов должна при столь же высокой чувствительности обеспечить еще большую экспрессность анализа иммунологических реакций.

Общий принцип создания иммунологических диагностикумов состоит в приготовлении суспензии частиц и покрытии их специфич-

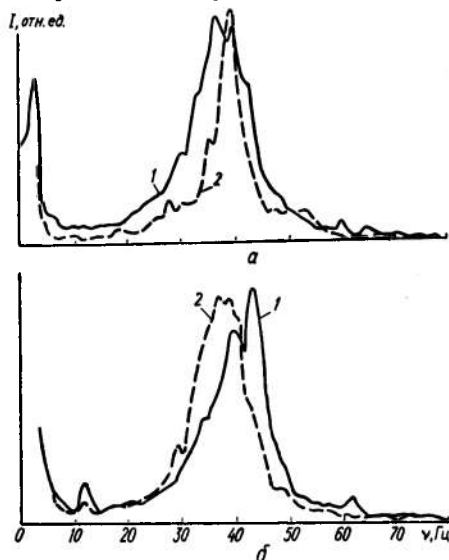


Рис. 66. Электрофоретические спектры лимфоцитов нормальных доноров до (1) и после (2) прохождения через колонку, покрытую IgG (а) и IgM (б) (по [244])

ческим антигеном или антителами. В качестве таких тестовых объектов наиболее распространены стандартизованные эритроциты, стабилизированные с целью длительного хранения (обычно танализованные клетки). С помощью ЭФС, проанализировав распределение по ЭФП, оказывается возможным оценить эффективность покрытия эритроцитов или латексов иммуноглобулинами либо антигеном [40].

Поскольку хранение даже стабилизированных клеток представляет отдельную проблему, неослабевающий интерес иммунологов вызывает возможность использования синтетических тестовых частиц: латексов на основе полистирола и других полимеров, формальдегид-резерциновых микросфер и пр. Кинетические и концентрационные зависимости подвижности для приготовленных таким образом искусственных диагностикумов на примере хорошо изученного белка (бычий сывороточный альбумин) при титровании специфической антисывороткой приведены в [241]. Там же, а также в [243] обсуждаются различные варианты проведения экспериментов с такими объектами с целью получения количественных оценок концентрации антител в исследуемых образцах (ингибирование эффекта изменения ЭФП предварительной инкубацией с антисывороткой точно известной концентрации, влияние процедуры отмывки при покрытии, влияние неспецифического связывания с поверхностью и т. д.).

Поскольку изучение реакций на поверхности осложнено рядом обстоятельств (вспомним проблемы интерпретации ζ -потенциала, отсутствие объектов с хорошо охарактеризованной поверхностью и пр.), возникает вопрос: не лучше ли в плане исследования иммунологических реакций прямое наблюдение комплексообразования антиген — антитело, обеспечиваемое возможностями как обычного квазиупругого светорассеяния, так и ЭФС? Однако многочисленные трудности макромолекулярных исследований (необходимость использования мощных источников света, тщательнейшей очистки образцов, трудности обработки спектров для сильно гетерогенных систем) делают такую постановку задачи мало пригодной для проведения больших серий измерений. Особую важность рассматриваемым задачам придает именно возможность диагностики различных заболеваний, требующей проведения большого объема клинических исследований, что заставляет сделать выбор в пользу изучения реакций на поверхности тестовых объектов. Хотя соображения удобства обычных измерений, безусловно, не отменяют актуальности применения ЭФС на уровне макромолекул, в ближайшее время такие трудоемкие эксперименты, по-видимому, будут проводиться сравнительно немногими исследователями.

В последние годы быстро растет число работ, посвященных применению разнообразных вариантов электрофоретических тестов для диагностики заболеваний, влияющих на общий иммунологический статус организма [190]. Прежде всего это относится к злокачественным опухолям и таким болезням, как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, иммунодефицитные состояния.

Применяемые в этих исследованиях тесты основаны на наблюдении изменений ЭФП тестовых частиц, обусловленных сенсibilизацией

лимфоцитов крови в присутствии антигенов или митогенов — чужеродных агентов, стимулирующих пролиферацию лимфоцитов и выработку антител. Например, уменьшение подвижности, зафиксированное для клеток перитонеального макрофага гвинейского голубя после инкубации с супернатантом суспензии сенсibilизированных лимфоцитов, дало название электрофоретическому тесту, широко используемому для диагностических исследований злокачественных опухолей, — МЕМ-тест. Трудности сохранения тестового биологического материала, дающего воспроизводимые результаты, стимулировали поиск других, более стабильных объектов для электрофоретических диагностик. Эти исследования, а также подбор подходящих антигенов, выяснение механизмов реакций, лежащих в основе электрофоретических методик, в настоящее время в значительной степени выполняются с помощью ЭФС. Так, альтернативой МЕМ-тесту диагностики новообразований стал так называемый ЕТ-тест, где измеряется изменение подвижности стандартизованных танизированных бараньих эритроцитов.

Измеряют также подвижность самих сенсibilизированных лимфоцитов, причем возможность анализа состава системы дает исследователям все более обширный экспериментальный материал. Обеспечиваемая ЭФС скорость измерений позволяет быстро сравнивать концентрационные зависимости эффекта для различных антигенов и на основе полученных значений ЭФП отличать неспецифическую адсорбцию от иммунологических реакций.

Обсуждение перспективных направлений применения излагаемого метода можно было бы продолжить, но нам кажется, что цитированного материала вполне достаточно, чтобы составить представление о его широких возможностях. Поэтому мы заканчиваем изложение вопросов, связанных с ЭФС — методом, уже завоевавшим себе место в биологических и медицинских исследованиях и, бесспорно, имеющим большое будущее.

ГЛАВА 7

ДИНАМИКА СИСТЕМ СО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ

В предыдущих главах мы обсудили наиболее распространенные из-за своей относительной методической простоты, но, возможно, далеко не самые интересные приложения корреляционной спектроскопии. Ведь в корреляционных свойствах квазиупруго рассеянного света «зашифрована» информация о всех динамических процессах в системе, а не только о трансляционном движении, которое определяется, по существу, статическими характеристиками объекта — коэффициентом диффузии или подвижностью. Поэтому наиболее принципиальным применением корреляционной спектроскопии должно быть именно исследование «всех остальных» динамических процессов. Но возможно ли обсуждение этих явно разнообразных процессов с каких-то общих позиций? Ответ на этот вопрос утвердительный. Все указанные процессы сходным образом влияют на светорассеяние, а их изучение связано с одними и теми же методическими проблемами.

Для описания трансляционных движений достаточно всего одной векторной координаты — положения центра рассеяния. Зная вероятность $P(\mathbf{r}^0, \mathbf{r}^{0'}, \tau)$ найти частицу, находившуюся в точке $\mathbf{r}^{0'}$, в точке $\mathbf{r}^0$ через время τ , можно вычислить корреляционную функцию рассеянного света. Но для полного описания системы необходим набор координат $\{\mathbf{r}\}$ всех рассеивающих центров и знание вероятности $P(\{\mathbf{r}\}, \{\mathbf{r}'\}, \tau)$, которая может быть разбита на произведение соответствующих вероятностей для отдельных координат только в отсутствие взаимодействия. Возможны всего две существенно различные ситуации в зависимости от того, могут ли рассеиватели расходиться настолько, что взаимодействие между ними исчезает. В первом случае речь идет о влиянии межчастичного взаимодействия на трансляционную диффузию. Во втором — рассеиватели являются частями одного объекта, и мы говорим о внутренней динамике. Промежуточное положение занимает химическое взаимодействие, которое, в принципе, относится к первому случаю, но часто его удобнее рассматривать с точки зрения изменения состояния частиц, т. е. как «внутреннюю динамику».

Ориентационную динамику анизотропных частиц можно считать частным случаем внутренней динамики. Четких границ между этими явлениями не существует. Рассматривая жесткие частицы, мы говорим об ориентационной динамике; для изотропных, но сильно деформируемых частиц это понятие лишено смысла. В промежуточном случае

деформируемых частиц со средней анизотропией ориентационная и внутренняя динамики тесно связаны друг с другом, и их не следует различать. По-существу, речь идет о наличии у рассеивающей частицы еще каких-то степеней свободы, кроме трансляционных. Число и характер этих степеней свободы на качественную картину явления не влияют.

С точки зрения биологических приложений наибольший интерес представляет, несомненно, изучение внутренней динамики, тем более что корреляционная спектроскопия квазиупругого рассеяния света — фактически единственный прямой способ изучения динамики крупномасштабных флуктуаций объекта в целом в диапазоне характерных времен от секунд до микросекунд.

Как же внутренняя динамика влияет на корреляционные свойства рассеянного света? Во-первых, изменения расположения частей объекта относительно друг друга и вектора q модулируют форм-фактор (1.53). Этот эффект в отсутствие оптической анизотропии значителен лишь при $qR \geq 1$. Во-вторых, флуктуации формы (и ориентации) частицы модулируют ее подвижность в направлении вектора q . Если характерное время этих флуктуаций τ_0 велико по сравнению с временем перемещения частиц на расстояние q^{-1} , подвижность не успевает измениться за время фазовой корреляции рассеянной световой волны, и мы воспримем систему как полидисперсную совокупность частиц. В обратном предельном случае $Dq^2\tau_0 \ll 1$ подвижность успеет усредниться за время фазовой корреляции, и информация о внутренней динамике окажется утерянной. Часто (ориентационная динамика, внутренняя релаксация полимерных клубков) τ_0 — порядка времени диффузии частицы на расстояние, равное ее размеру, $\tau_0 \approx D/R^2$. При этом условия проявления эффектов внутренней динамики за счет флуктуаций как форм-фактора, так и подвижности принимают универсальный вид $qR \geq 1$. Исключение составляют уже упомянутая ориентационная динамика оптически анизотропной частицы, а также конформационная динамика объекта, который может находиться в нескольких состояниях, разделенных выраженными энергетическими барьерами. В этом случае τ_0 не связано с размерами объекта, и условие $Dq^2\tau_0 \sim 1$ может выполняться при малых qR .

Разделение влияния внутренней динамики на модуляцию рассеивающей способности и модуляцию коэффициента диффузии носит качественный характер. Строгий подход заключается в описании состояния частицы функцией распределения, зависящей от всех ее координат. Изменение этой функции во времени определяется обобщенным уравнением диффузии, решения которого целиком описывают как трансляционную, так и внутреннюю динамику. Мы будем придерживаться именно такого подхода.

§ 7.1. ВНУТРЕННЯЯ ДИНАМИКА

Обобщенное уравнение диффузии. В этом параграфе будем считать, что раствор макромолекул достаточно разбавлен, так что межчастичным взаимодействием можно пренебречь. Разобьем частицу на M

участков, которые будем считать точечными и абсолютно жесткими. Тогда конформация макромолекулы и ее положение целиком определяются M радиус-векторами этих участков $\mathbf{r}^a$, $a = 0, 1, \dots, M - 1$. Совокупность координат мы будем обозначать символом $\{\mathbf{r}\}$ и называть конфигурацией.

Динамика в вязкой среде носит случайный характер. Зная конфигурацию в какой-то момент, нельзя предсказать ее конкретный вид через определенное время. Причина этого состоит в том, что помимо детерминированных сил внутреннего взаимодействия на каждый участок объекта действуют случайные силы со стороны растворителя. Следовательно, описание динамики объекта должно быть вероятностным и заключаться в отыскании вероятности $P(\{\mathbf{r}\}, t)$ обнаружить конфигурацию $\{\mathbf{r}\}$ в момент времени t , если в начальный момент времени конфигурация была $\{\mathbf{r}'\}$. Для краткости мы опустили аргумент, обозначающий начальную конфигурацию, имея в виду, что

$$P(\{\mathbf{r}\}, 0) = \prod_{a=0}^{M-1} \delta(\mathbf{r}^a - \mathbf{r}'^a). \quad (7.1)$$

Функция $P(\{\mathbf{r}\}, t)$ нормирована, так что интеграл от нее по всем конфигурациям $\{\mathbf{r}\}$ равен 1.

В термодинамически равновесном ансамбле тождественных частиц вероятность обнаружить какую-либо конфигурацию $\{\mathbf{r}\}$ имеет вполне определенное значение $P_0(\{\mathbf{r}\})$. Вследствие эргодичности то же значение имеет и вероятность обнаружить эту конфигурацию у каждой частицы в произвольный момент времени. Это, конечно, не означает отсутствия динамики. В любой заданный момент времени конфигурация частицы вполне определенная, и ее функция распределения имеет вид (7.1). Вероятность того, что начальная конфигурация описывается набором координат $\{\mathbf{r}'\}$, и есть $P_0(\{\mathbf{r}'\})$. С течением времени начальная конфигурация «забывается», и $P(\{\mathbf{r}\}; t) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} P_0(\{\mathbf{r}\})$. Как хорошо известно из статистической физики, $P_0(\{\mathbf{r}\})$ имеет вид распределения Больцмана:

$$P_0(\{\mathbf{r}\}) = \frac{1}{Z} e^{-\frac{U(\{\mathbf{r}\})}{k_B T}}, \quad (7.2)$$

где $U(\{\mathbf{r}\})$ — потенциальная энергия конфигурации $\{\mathbf{r}\}$, а нормировочный коэффициент Z называется статистической суммой.

Функция $P(\{\mathbf{r}\}, t)$ однозначно определяется начальной конфигурацией, если отсутствуют эффекты памяти. В общем случае, чтобы определить дальнейшую эволюцию системы, необходимо задать не только начальную конфигурацию, но и начальные скорости движения всех участков объекта. Однако в вязкой среде начальные скорости быстро релаксируют — быстрее, чем конфигурация. Это позволяет вывести замкнутое уравнение эволюции для функции $P(\{\mathbf{r}\}, t)$, которое мы будем называть обобщенным уравнением диффузии. Подробности обоснования такого подхода можно найти в руководствах по статистической физике [30]. Здесь мы ограничимся лишь феноменологическим выводом этого уравнения.

Введем понятие конфигурационного $3M$ -мерного пространства, каждая точка которого имеет набор координат $\mathbf{r}^a$ и изображает соответствующую конфигурацию частицы. Изменению конфигурации во времени соответствует движение точки в этом пространстве с $3M$ -мерной скоростью $I^a = \frac{\partial \mathbf{r}^a}{\partial t}$. Рассмотрим ансамбль тождественных частиц, изображаемый совокупностью точек в конфигурационном пространстве. Тогда плотность этих точек равна $P(\{\mathbf{r}\}, t)$, а изменение плотности — дивергенции $I^a P$, или

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -\nabla_a (I^a P). \quad (7.3)$$

Это уравнение носит название уравнения непрерывности и фактически является следствием сохранения нормировки функции распределения. Феноменологическое описание динамики основано на естественном предположении о пропорциональности скорости термодинамической силе:

$$I^a = \frac{1}{k_B T} D^{ab}(\{\mathbf{r}\}) F^b. \quad (7.4)$$

Введенный таким образом тензор $D^{ab}(\{\mathbf{r}\})$ называется тензором диффузии. Термодинамическая сила равна производной свободной энергии по соответствующей координате:

$$F^b = -\nabla_b [U + k_B T \ln P]. \quad (7.5)$$

(Напомним, что энтропия состояния равна логарифму его вероятности.) Подставляя (7.5) и (7.4) в (7.3), получим уравнение

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \nabla_a D^{ab} \left(\nabla_b + \frac{1}{k_B T} (\nabla_b U) \right) P, \quad (7.6)$$

которое обобщает обычное уравнение диффузии на случай частиц с внутренними степенями свободы.

Трансляционная инвариантность. Как и должно быть, равновесная функция распределения (7.2) удовлетворяет уравнению (7.6) с нулевой левой частью. Это позволяет записать (7.6) в более удобном виде, обозначив

$$P(\{\mathbf{r}\}, t) = p(\{\mathbf{r}\}, t) P_0(\{\mathbf{r}\}). \quad (7.7)$$

Тогда для $p(\{\mathbf{r}\}, t)$ имеем уравнение

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \frac{1}{P_0} \nabla_a D^{ab} P_0 \nabla_b p \equiv -\hat{\mathcal{D}} p. \quad (7.8)$$

Диффузионный оператор $\hat{\mathcal{D}}$ — это линейный дифференциальный оператор второго порядка, самосопряженный с весом P_0 . Последнее означает, что для любых $f(\{\mathbf{r}\})$ и $g(\{\mathbf{r}\})$

$$\langle f | \hat{\mathcal{D}} g^* \rangle = \langle \hat{\mathcal{D}}^* f | g^* \rangle, \quad (7.9)$$

где угловые скобки имеют смысл усреднения по равновесному распределению. В этом нетрудно убедиться, подставляя явный вид $\hat{\mathcal{D}}$ и

интегрируя по частям. Самосопряженный оператор обладает полным ортонормированным набором собственных функций p_μ , с собственными значениями λ_μ (см. § 3.3), с помощью которых можно записать формальное решение уравнения (7.8):

$$p(t) = \sum_{\mu} \langle p(0) | p_{\mu}^* \rangle p_{\mu} e^{-\lambda_{\mu} t}. \quad (7.10)$$

Постоянное во времени решение, отвечающее равновесной функции распределения, $p_0 = 1$ является собственной функцией с нулевым собственным значением $\lambda_0 = 0$. Поскольку функция распределения со временем стремится к равновесной, все остальные собственные значения должны быть положительны. Тогда при $t \rightarrow \infty$ в сумме (7.10) сохраняется только член с собственной функцией p_0 и $p(\infty) = \langle p(0) \rangle$. Вследствие нормированности $\langle p(0) \rangle = 1$, т. е. $p(\infty) = 1 = p_0$.

Очень важное свойство диффузионного уравнения — его трансляционная инвариантность. Она вытекает из независимости свойств частицы от ее положения (в отсутствие внешних полей). Пусть вектор r^0 задает положение частицы, а все остальные $M - 1$ радиус-векторы определяют местонахождение соответствующих участков относительно точки r^0 , т. е. $r^a \rightarrow r^a - r^0$. Тогда ни D^{ab} , ни P_0 и никакие другие конфигурационно зависящие характеристики частицы не должны зависеть от r^0 . Поскольку любое $f(\{r\})$ можно разложить по собственным функциям: $f = \sum_{\mu} \langle f | p_{\mu}^* \rangle p_{\mu}$, независимость от начала отсчета означает, что изменение r^0 меняет лишь фазу собственных функций, причем обязательно линейно. Поэтому

$$p_{\mu} \equiv p_{k,n} e^{i k r^0}. \quad (7.11)$$

Функция $p_{k,n}$ удовлетворяет согласно (7.8) уравнению

$$\lambda_{k,n} p_{k,n} = [\hat{\mathcal{D}}_0 - \frac{i}{P_0} (\nabla_a D^{a0} k P_0 + P_0 k D^{0a} \nabla_a) + k D^{00} k] p_{k,n} \equiv \hat{\mathcal{D}}_k p_{k,n}, \quad (7.12)$$

где $\hat{\mathcal{D}}_0$ имеет такой же вид, как и $\hat{\mathcal{D}}$, с той разницей, что теперь индексы $a, b \neq 0$ нумеруют относительные координаты, не зависящие от положения частицы. Относительные координаты меняются в конечных пределах. Поэтому собственные значения оператора $\hat{\mathcal{D}}_k$ образуют дискретную последовательность по аналогии с утверждением о дискретности уровней энергии связанных состояний квантовомеханической системы, которая описывается уравнением Шредингера, формально отличающимся от уравнения (7.8) заменой t на it .

В чем же смысл представления диффузионного оператора и его собственных функций в виде (7.12) и (7.11)? Такое представление отражает два типа релаксации в растворе частиц: выравнивание со временем пространственно неоднородной концентрации, т. е. вероятности обнаружить частицу в той или иной точке пространства, и релаксацию пространственно однородного, но конформационно (или ориентационно) неравновесного состояния частиц. Именно второй процесс, не связанный с трансляционным движением, представляет со-

бой внутреннюю релаксацию. Пространственная однородность распределения частиц означает, что $p(\{r\})$ не зависит от r^0 . В этом случае в выражение (7.10) входят только собственные функции с $k = 0$ и, следовательно, процессы внутренней релаксации описываются именно оператором $\hat{\mathcal{D}}_0$. Оператор $\hat{\mathcal{D}}_k$ описывает релаксацию при наличии периодической пространственной неоднородности, которая вследствие трансляционной инвариантности происходит без изменения этого периода. При этом последний член оператора $\hat{\mathcal{D}}_k$ учитывает трансляционную диффузию частиц, а два сопряженных в смысле (7.9) члена, пропорциональные ik , описывают деформацию частиц при их направленном движении, вызванном градиентом концентрации, и, наоборот, изменение положения при релаксации состояния частицы.

Как правило, раствор в целом не только однороден, но и изотропен, т. е. его свойства не зависят от ориентации относительно лабораторной системы координат. Ориентационная инвариантность не так принципиальна в данном контексте, поскольку в общем случае ориентация — это лишь три из многих внутренних степеней свободы. Но как мы увидим ниже, ее учет может существенно облегчить расчеты при анализе вращательной диффузии жестких анизотропных частиц и позволяет выяснить важные особенности угловой зависимости функции взаимной корреляции интенсивности рассеянного света в общем случае.

Мы будем называть собственные функции $p_{k,n}$ релаксационными модами, а соответствующие собственные значения — их обратными временами релаксации. Моду $p_{k,0}$, которая стремится к $p_0 = 1$ при $k \rightarrow 0$, будем называть трансляционной, остальные — внутренними. Внутренние релаксационные моды не очень просто наглядно интерпретировать, поскольку приготовить образец в состоянии, описываемом только такими модами, нельзя. Ведь тогда согласно (7.10) вероятность $p(\{r\}, t)$ при $t \rightarrow \infty$ стремилась бы к нулю. По условию нормировки $\langle p p_0 \rangle = \langle p \rangle = 1$, и любое p обязательно содержит в разложении по собственным функциям равновесную функцию p_0 . Более того, вклад релаксационных мод не может быть вполне произвольным, поскольку по своему физическому смыслу $p > 0$, а все собственные функции вследствие их ортогональности p_0 имеют нулевое среднее: $\langle p_{k,n} \rangle = \langle p_{k,n} p_0^* \rangle = 0$, т. е. знакопеременные. Таким образом, присутствие в разложении $p(\{r\})$ релаксационной моды $p_{k,n}$ означает, что вероятность найти частицу в конфигурации $\{r\}$ больше равновесной, если $p_{k,n}(\{r\}) > 0$, и меньше равновесной в противоположном случае.

Релаксационных мод бесконечно много, даже если имеется всего одна (но непрерывная) (см. § 7.2) внутренняя степень свободы. И каждая из них качественно мало отличается от соседних мод с чуть большими или меньшими собственными значениями. Однако поскольку все $\lambda_{k,n} > 0$ и при фиксированном k образуют дискретную последовательность, моды с наименьшими собственными значениями оказываются, естественно, наиболее интересными и с экспериментальной,

и с теоретической точки зрения. С экспериментальной — потому, что относительные различия между наименьшими $\lambda_{k,n}$ — порядка единицы и есть возможность наблюдать соответствующие моды в отдельности. С теоретической — потому, что, во-первых, эти моды обычно связаны не с локальными флуктуациями, а с крупномасштабными, плавными изменениями конформации частицы в целом и не чувствительны к мелким деталям ее строения. Во-вторых, по той же причине приближенные методы позволяют находить именно наименьшие собственные значения соответствующего дифференциального оператора. И как в квантовой механике интересуются обычно основным и первыми возбужденными состояниями, так и мы будем обсуждать главным образом нижайшие внутренние моды, т. е. моды с наибольшими временами релаксации.

Корреляционная функция света, рассеянного на флуктуирующей частице. Уравнение (7.8) определяет эволюцию вероятности конфигурации $\{r\}$. Это позволяет полностью описать любую конфигурационно зависимую случайную величину, т. е. найти вероятность любой ее реализации, а значит, и любую корреляционную функцию. Например, парная корреляционная функция

$$\langle f(\tau) g^*(\tau) \rangle = \int f(\{r'\}) g^*(\{r\}) P(\{r\}, \{r'\}, \tau) P_0(\{r'\}) d\{r\} d\{r'\}. \quad (7.13)$$

Подставляя сюда выражение (7.10) с учетом формул (7.7), (7.1) и (7.2), можно выразить корреляционную функцию через собственные функции и значения диффузионного оператора. В частности, пользуясь выражением (1.50) для поля рассеянного света и считая, что положение частицы определяется радиус-вектором r^0 ее «центра», фигурировавшего в определении форм-фактора $\alpha(\{r\})$, можно получить выражение для парной корреляционной функции рассеянного света:

$$G^{(1)}(\tau) = \sum_n |\langle \alpha p_{q,n}^* \rangle|^2 e^{-\lambda_{q,n}\tau} \equiv \sum_n A_n e^{-\Gamma_n \tau}. \quad (7.14)$$

Соответственно, спектр рассеянного света представляет собой сумму лоренцианов вида (3.4). Обратим внимание, что вследствие пропорциональности поля рассеянной волны фактору e^{iqr^0} вклад в рассеяние дают только моды $p_{k,n}$ с $k = q$.

$G^{(1)}(\tau)$ удобно представить в операторном виде:

$$G^{(1)}(\tau) = \langle \alpha^* e^{-\hat{\mathcal{D}}_q \tau} \alpha \rangle, \quad (7.15)$$

где под оператором $e^{-\hat{\mathcal{D}}_q \tau}$ понимают соответствующий ряд по степеням $\hat{\mathcal{D}}_q \tau$. В эквивалентности этого выражения и (7.14) легко убедиться, разлагая форм-фактор $\alpha(\{r\})$ в ряд по собственным функциям оператора $\hat{\mathcal{D}}_q$.

Формулами (7.14) или (7.15) заканчивается собственно теория квазиупругого светорассеяния на частицах с внутренними степенями свободы. Дальнейшая задача заключается в конкретизации вида диффузионного оператора для исследуемого объекта, нахождении его соб-

ственных функций и собственных значений. Но даже оставаясь на самом общем уровне описания динамики рассеивателей, можно сделать ряд полезных выводов. В частности,

$$\bar{\Gamma} \equiv \sum_n \Gamma_n A_n / \sum_n A_n = - \frac{1}{G^{(1)}(0)} \frac{\partial G^{(1)}(\tau)}{\partial \tau} \Big|_{\tau=0} = \frac{\langle \alpha^* \hat{\mathcal{D}}_q \alpha \rangle}{\langle |\alpha|^2 \rangle}; \quad (7.16)$$

$$\bar{\Gamma}^2 = \sum_n \Gamma_n^2 A_n / \sum_n A_n = \frac{1}{G^{(1)}(0)} \frac{\partial^2 G^{(1)}(\tau)}{\partial \tau^2} \Big|_{\tau=0} = \frac{\langle \alpha^* \hat{\mathcal{D}}_q \hat{\mathcal{D}}_q \alpha \rangle}{\langle |\alpha|^2 \rangle} \quad (7.17)$$

и так далее. Мы видим, что для вычисления средней полуширины и других моментов распределения $A(\Gamma)$ не нужно решать диффузионное уравнение, достаточно знать вид оператора $\hat{\mathcal{D}}_q$. Это особенно важно ввиду того, что моменты $A(\Gamma)$ легко определяются по результатам измерений спектра с помощью метода кумулянтов (§3.2). Правда, для их экспериментального определения необходимо, чтобы полоса измерений была намного больше обратных времен релаксации $\lambda_{q,n}$ всех мод, которые вносят заметный вклад в рассеяние. Но среди собственных значений оператора $\hat{\mathcal{D}}_q$ имеются и сколь угодно большие. Вопрос поэтому заключается в скорости убывания суммарного вклада лоренцианов с ростом их полуширины. Если вклады быстро релаксирующих мод убывают медленно, может оказаться, что, начиная с каких-то значений m , результат экспериментального определения $\bar{\Gamma}^m$ радикально зависит от полосы измерений, а результат его теоретического вычисления — от степени подробности описания локального строения рассеивателя (т. е. от размеров, а значит, и числа «недеформируемых» участков, положением которых задается конфигурация). Хорошо, если эти осложнения возникают при больших m . Но как мы увидим в §7.3, в случае полимерных клубков они имеют место уже для второго момента $\bar{\Gamma}^2$. Поэтому подход к изучению внутренней динамики, основанный на методе кумулянтов, следует применять с осторожностью.

При $q \rightarrow 0$ второй и третий члены в операторе $\hat{\mathcal{D}}_q$ являются малыми поправками, которые можно учесть по теории возмущений. Это позволяет описать угловую зависимость $\lambda_{q,n}$ при малых q выражением

$$\lambda_{q,n} = \lambda_n + D_n q^2 + O(q^4). \quad (7.18)$$

где $O(x)/x \xrightarrow{x \rightarrow 0} \text{const}$, а $\lambda_n \equiv \lambda_{0,n}$. В частности, для трансляционной моды ($n=0$) $\lambda_0 = 0$ и $\lambda_{q,0} = Dq^2$, где D — истинный коэффициент трансляционной диффузии. Для его вычисления, как и для вычисления остальных коэффициентов D_n , необходимо учесть член, пропорциональный q^2 в операторе (7.12) в первом порядке теории возмущений, а члены, пропорциональные iq , — во втором порядке. В результате

$$D = \frac{1}{q^2} \left[\langle q D^{00} q \rangle - \sum_{n \neq 0} \frac{|\langle q D^{0a} \nabla_a p_n \rangle|^2}{\lambda_n} \right], \quad (7.19)$$

где $p_n \equiv p_{0,n}$ — собственные функции оператора $\hat{\mathcal{D}}_0$. Разумеется, D от q не зависит вследствие изотропии раствора в целом. Вектор

q сохранен здесь лишь для того, чтобы не употреблять индексы, нумерующие декартовы компоненты тензоров D^{00} и $D^{0\alpha}$.

В методе квазиупругого светорассеяния часто определяют кажущийся коэффициент диффузии D_{app} , равный наклону зависимости первого кумулянта $\bar{\Gamma}$ от q^2 при $q^2 \rightarrow 0$. Подставляя в выражение (7.16) явный вид оператора $\hat{D}_q$, можно выяснить, что $D_{app} = \frac{1}{q^2} \langle q D^{00} q \rangle +$

+ члены, содержащие $\frac{\partial \alpha}{\partial q}$. Что же общего у D и D_{app} , кроме первого слагаемого, и близки ли эти величины? Возможны ли случаи, когда интерпретация D_{app} как истинного коэффициента диффузии ведет к серьезным ошибкам? Чтобы ответить на эти вопросы, нам придется вернуться к проблеме определения «центра» рассеивателя.

Пусть положение частицы определяется двумя разными способами с помощью векторов r^0 и $\bar{r}^0$. Ясно, что эти векторы отличаются на вектор-функцию $x(\{r\})$, зависящую только от внутренних координат: $\bar{r}^0 = r^0 + x$. При таком переопределении «центра» частицы и форм-фактор, и собственные функции приобретут согласно формулам (1.53) и (7.11) дополнительный множитель e^{iqx} . Как ясно из выражения (7.14), $G^{(1)}(\tau)$ при этом не изменится. Не изменятся также другие наблюдаемые величины, в частности D и D_{app} , но конкретный вид тензоров D^{00} и $D^{0\alpha}$ будет другим. Поэтому инвариантность D и D_{app} относительно переопределения «центра» не означает инвариантности отдельных слагаемых, входящих в выражения для этих величин. Точку r_s^0 , определенную так, чтобы $\frac{\partial \alpha}{\partial q} \rightarrow 0$ при $q \rightarrow 0$, назовем центром рассеяния. Центр r_D^0 такой, что $\langle D^{0\alpha} \nabla_{a p_n} \rangle = 0$, для всех n назовем центром диффузии (можно показать, что такая точка существует, хотя в общем случае ее положение является сложной функцией конфигурации). Для однородных частиц центр рассеяния совпадает с центром массы. Итак, если центр рассеяния и центр диффузии совпадают,

$$D = D_{app} = \frac{1}{q^2} \langle q D^{00} q \rangle. \quad (7.20)$$

В противном случае D_{app} отличается от D , но насколько — можно ответить только путем конкретных расчетов. Ввиду положительности всех слагаемых под знаком суммы в (7.19) можно лишь утверждать, что $D \leq D_{app}$.

На самом деле, как правило, r_s^0 и r_D^0 близки друг к другу. В частности, если частица в любой своей конфигурации обладает центром симметрии, он является одновременно и центром рассеяния, и центром диффузии. Поэтому $|r_s^0 - r_D^0| \equiv |R_{SD}| \ll R$ для глобулярных частиц и может быть порядка размера частицы только в случае ее резкой асимметрии. В частности, для гауссова клубка D меньше D_{app} примерно на 8 % [108].

Теперь мы готовы к тому, чтобы выяснить асимптотическое поведение вкладов A_n релаксационных мод в спектр квазиупругого рассеянного света при $q \rightarrow 0$. Для этого нужно выразить функцию $\rho_{q,n}$

через собственные функции оператора $\hat{\mathcal{D}}_0$ с помощью теории возмущений. Выберем начало отсчета в центре диффузии. Тогда в первом порядке теории возмущений

$$p_{q,0} = p_0 + \sum_m p_m \frac{\langle p_m^* q D^{00} q \rangle}{\lambda_m}; \quad (7.21a)$$

$$p_{q,n} = p_n - p_0 \frac{\langle q D^{00} q p_n \rangle}{\lambda_n} + \sum_{m \neq 0} p_m [iO(q) + O(q^2)]. \quad (7.21b)$$

Отсутствие в выражении (7.21a) и в коэффициенте при p_0 в (7.21b) линейных по q членов является следствием определения центра диффузии. По той же причине второй порядок теории возмущений добавляет члены $\sim q^2$ только в последнее слагаемое в формуле (7.21b). Разлагая форм-фактор (1.53) в ряд по степеням q

$$\alpha = \langle \alpha \rangle [1 + iqR_{SD} - q\Delta Jq] + O(q^3) \quad (7.22)$$

(где ΔJ — отклонение тензора инерции частицы, поляризуемость которой предполагается однородной, от своего среднего значения) и подставляя (7.21) и (7.22) в (7.14), получаем

$$A_0 = \langle \alpha \rangle^2 + O(q^4); \quad (7.23a)$$

$$A_n = \langle \alpha \rangle^2 \left| \left\langle p_n^* \left[iqR_{SD} + \frac{qD^{00}q}{\lambda_n} + q\Delta Jq + O(q^2R_{SD}) + iO(q^3) \right] \right\rangle \right|^2. \quad (7.23b)$$

На первый взгляд может показаться, что вследствие комплексности p_n (7.23b) неинвариантно относительно замены q на $-q$. На самом деле никакого противоречия нет. Симметрия относительно указанной замены означает, что каждому λ_n соответствуют по крайней мере две собственных функции оператора $\hat{\mathcal{D}}_0$: симметричная (т. е. не меняющая знак) и антисимметричная (т. е. меняющая знак) относительно инверсии направления вдоль q . Из соображений симметрии следует, что первое среднее в выражении (7.23b) отлично от нуля только для антисимметричных мод, а два последующих — только для симметричных. Поскольку обе моды отвечают одному и тому же собственному значению, их вклады можно объединить, и в результате типичный вклад внутренних релаксационных мод при малых q будет

$$A_n \sim \langle \alpha \rangle^2 [q^2 \langle R_{SD}^2 \rangle + q^4 \langle (\Delta D\tau_0 + \Delta R^2)^2 \rangle], \quad (7.24)$$

где ΔD — флуктуации подвижности; ΔR — флуктуации размера; τ_0 — характерное время релаксации. Полезно обратить внимание также на следующее качественное соотношение, которое нетрудно получить с помощью формул (7.23) и (7.16):

$$D_{app} - D \sim \langle R_{SD}^2 \rangle / \tau_0. \quad (7.25)$$

В частности, для жестких несимметричных частиц время ориентационной релаксации $\tau_0 \sim \frac{k_B T}{\eta R^3}$ и $D_{app} - D \sim D (R_{SD}/R)^2$. Во избежание недоразумений отметим: приведенные выше рассуждения предпола-

гают, что при изменении конфигурации поляризуемость участков рассеивателя не меняется. В противном случае, например при наличии оптической анизотропии, ни $\bar{G}$, ни A_n не стремятся к нулю при малых q вследствие того, что форм-фактор остается конфигурационно зависимым и при $q = 0$.

Методические аспекты изучения внутренней динамики. Формула (7.24) определяет условия, при которых вклад внутренней динамики в светорассеяние значителен. Необходимо, чтобы величина q^{-1} была по крайней мере сравнима с размером рассеивателя. Формально выражение (7.24) предсказывает большой вклад внутренней динамики и в случае $\Delta D q^2 \tau_0 \geq 1$. Но, как уже отмечалось, при $D q^2 \tau_0 \gg 1$ изменения конфигурации не успевают произойти за время потери фазовой корреляции рассеянного света и система кажется полидисперсной. Действительно, согласно формуле (7.18) при $\lambda_n \ll D_n q^2$ внутреннюю релаксационную моду невозможно отличить от трансляционной моды для частиц с коэффициентом диффузии D_n . Таким образом, исследовать внутреннюю динамику можно только при условии $D q^2 \tau_0 \leq 1$, а значит, $\Delta D q^2 \tau_0 \ll 1$, если относительные флуктуации коэффициента диффузии невелики. С другой стороны, если, как это обычно бывает, $\tau_0^{-1} \sim D/(\Delta R)^2$ (где ΔR — характерный пространственный масштаб флуктуаций конфигурации объекта), $\Delta D \tau_0 \sim \frac{\Delta D}{D} (\Delta R)^2$ и оба пропорциональных q^4 члена в выражении (7.24) в лучшем случае одного порядка. Приведенные рассуждения показывают, что при малых q основной вклад в рассеяние дают наиболее крупномасштабные моды с максимальными временами релаксации.

Мы приходим к выводу, что вклад внутренних мод не мал при $qR > 1$, но при таких $q \tau_0^{-1} \leq D q^2$, т. е. и времена релаксации, и вклады внутренних релаксационных и трансляционной мод одного порядка и их чрезвычайно трудно разделить. Наоборот, при $\tau_0^{-1} \gg D q^2$ времена релаксации очень различаются, но вклад внутренней динамики мал. Таким образом, определение времен внутренней релаксации возможно (если оно вообще возможно) в узком интервале переданных волновых векторов $q^{-1} \sim R$ и, безусловно, требует решения обратной спектральной задачи. Неудивительно поэтому, что постановка такого рода исследований для оптически изотропных частиц неразрывно связана с появлением регулярных методов анализа спектральных данных.

Совершенно новые возможности изучения внутренней динамики открывает негауссова корреляционная спектроскопия, и в первую очередь — метод взаимной корреляции. Если отвлечься от ограниченности рассеивающего объема и флуктуаций числа частиц в нем — проблемы, подробно обсужденной в гл. 2, функцию взаимной корреляции (2.10) можно с помощью (7.13) выразить через собственные функции и значения оператора $\hat{\mathcal{D}}_0$:

$$G^{BS}(\tau) = \sum_n \langle |\alpha(q_1)|^2 \rho_n \rangle \langle |\alpha(q_2)|^2 \rho_n^* \rangle e^{-\lambda_n \tau}. \quad (7.26)$$

Эта формула описывает в случае $q_1 = q_2$ и негауссову составляющую

автокорреляционной функции (1.59). Поскольку $\lambda_0 = 0$, трансляционная мода вносит вклад лишь в постоянную составляющую фототока, и весь наблюдаемый эффект целиком определяется внутренней динамикой. И хотя при $q_1 R, q_2 R \ll 1$ эффект согласно выражению (7.22) по-прежнему порядка $(q_1 \Delta R)^2 (q_2 \Delta R)^2$, а статистическая ошибка измерений, как мы видим в гл. 2, та же, что и в стандартном автокорреляционном методе, проблема разделения вкладов трансляционной и внутренних мод исчезает.

Заметно упрощается и расчет наблюдаемых этим методом зависимостей. Для них достаточно знания функций p_n и обратных времен релаксации соответствующих мод λ_n . Проблемы же, связанные с трансляционным движением (определение центра диффузии и флуктуации коэффициента диффузии), исчезают. Более богатая угловая зависимость $G^{B3}(\tau)$, характеризующая двумя векторами q_1 и q_2 , в значительной мере может быть выяснена из соображений, основывающихся на изотропии раствора в целом.

Выберем ось z перпендикулярно к плоскости, в которой лежат векторы q_1 и q_2 , а в качестве одной из внутренних координат — угол φ , на который необходимо повернуть частицу вокруг оси z для того, чтобы вектор $r^{ab} = r^a - r^b$, соединяющий два заранее выбранных участка рассеивателя a и b , оказался в плоскости (z, q_1) с положительной проекцией на вектор q_1 . Форм-фактор, зависящий от всех внутренних координат, периодически зависит и от φ . Разложим его в ряд Фурье по этой переменной. Тогда

$$|\alpha(q_i)|^2 = \sum_{m=-\infty}^{\infty} c_m(q_i) e^{im(\varphi - \varphi_i)}, \quad (7.27)$$

где φ_i — угол между q_i и q_1 ; $i = 1, 2$. Ведь поворот и частицы, и вектора q_i на один и тот же угол вокруг оси z форм-фактор не меняет. Вследствие действительности $|\alpha|^2 c_m = c_{-m}^*$. С другой стороны, свойства раствора не изменяются при повороте системы координат вокруг оси z , и поэтому может меняться лишь фаза собственных функций, причем вследствие периодичности это изменение кратно φ . Итак,

$$p_n = p_{(n,m)} e^{-im\varphi}. \quad (7.28)$$

Подставляя выражения (7.27) и (7.28) в (7.26), получим

$$G^{B3}(\tau) = \sum_{m=0}^{\infty} (2 - \delta_{m,0}) \langle c_m(q_1) p_{(n,m)} \rangle \langle c_m(q_2) p_{(n,m)} \rangle^* \cos m\varphi_0 e^{-\lambda_{(n,m)}\tau}, \quad (7.29)$$

где φ_0 — угол между векторами q_1 и q_2 . Поскольку $|\alpha(q)|^2 = |\alpha(-q)|^2$, т. е. не меняется при замене $\varphi \rightarrow \varphi + \pi$, отличны от нуля только c_m с четными m . Заметим, что все моды с $m \neq 0$ знакопеременны. Поскольку выбор угла φ_0 произволен, метод взаимной корреляции позволяет в принципе различать флуктуации рассеивателя с различной вращательной симметрией.

Приведенные рассуждения можно обобщить и на случай оптически анизотропных частиц, когда $G^{B3}(\tau)$ зависит не только от угла между

q_1 и q_2 , но и от ориентации этих векторов относительно направления поля в зондирующем и регистрируемом излучении [146]. Все необходимые для полного анализа вращательной симметрии математические сведения имеются в литературе [9].

Если поляризуемость рассеивателя неоднородна, зависимостью его форм-фактора от конфигурации можно управлять, меняя поляризуемость растворителя. Разложение форм-фактора по степеням q нетрудно обобщить на случай неоднородных частиц и выяснить, в частности, что при поляризуемости растворителя, равной средней поляризуемости неоднородной частицы, вклад трансляционной моды $\sim (qR)^2$, т. е. того же порядка, что и вклад внутренней динамики. В случае неоднородных рассеивателей несовпадение центров рассеяния и диффузии, а также связь этого обстоятельства с соотношением между D и D_{app} становятся особенно наглядными. Пусть, например, рассеиватель состоит из двух однородных частиц с коэффициентами диффузии $D_1 \gg D_2$ и показателями преломления n_1 и n_2 , связанных между собой длинной связью с очень малой жесткостью. Истинный коэффициент диффузии $D \approx D_2$, но D_{app} , определяемый по начальному наклону корреляционной функции, зависит от показателя преломления растворителя n . Если $n = n_1$, рассеивает только вторая частица и $D_{app} \approx D$, при этом r_{SD}^0 близко к r_D^0 . Если $n = n_2$, рассеивает только первая частица и $D_{app} \approx D_1 \gg D$. Поскольку в этом случае R_{SD} порядка расстояния между первой и второй частицами, время внутренней релаксации такой системы $\tau_0^{-1} \sim D_1/R_{SD}^2$, и поэтому $D_{app} - D \approx D_1 \sim \frac{R_{SD}^2}{\tau_0}$ в полном соответствии с (7.25).

Итак, контрастирование позволяет увеличить относительный вклад внутренней динамики в светорассеяние. Необходимую для этого неоднородность поляризуемости можно создать и искусственно, «пришив» к объекту достаточно малую, чтобы не изменить динамику, но заметно отличающуюся по поляризуемости частицу. Однако в настоящее время эта возможность за редким исключением [168] остается вне поля зрения исследователей, занимающихся проблемой использования лазерной корреляционной спектроскопии для изучения внутренней динамики.

§ 7.2. КОНФОРМАЦИОННАЯ И ОРИЕНТАЦИОННАЯ ДИНАМИКА. ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА

Конформационная динамика. Если рассеиватель может находиться в нескольких состояниях, отличающихся рассеивающей способностью и (или) коэффициентом диффузии, но флуктуации в каждом из состояний малы, а переходы между ними происходят быстро, такой тип внутренней динамики мы будем называть конформационной. Конформационные переходы можно рассматривать как химические превращения типа $X_a \rightleftharpoons X_b$, где индекс нумерует различные состояния. Наоборот, все вещества, участвующие в обратимой химической реакции, могут формально рассматриваться как состояния одной и той же псевдочас-

тицы. Поэтому математическое описание конформационной динамики и химической кинетики, по-существу, одинаково.

Начнем с конформационной динамики. Вероятность обнаружить частицу в состоянии a в точке $\mathbf{r}$ в момент времени t подчиняется уравнению

$$\frac{\partial}{\partial t} P_a(\mathbf{r}, t) = D_{(a)} \nabla^2 P_a - H_{ab} P_b, \quad (7.30)$$

в котором первый член описывает диффузию частиц, а второй — переходы между различными состояниями. Матрица H_{ab} несимметрична. Согласно принципу детального равновесия $H_{ab} P_b^0 = H_{ba} P_a^0$, т. е. симметрична матрица $\tilde{H}_{ab} \equiv H_{ab} P_b^0$, где P_b^0 — равновесная вероятность (концентрация) состояния b . Таким образом, точно так же, как и в общем случае, вводя обозначения $P_a = p_a P_a^0$ и делая преобразование Фурье по пространственным координатам, получим, что конформационная динамика описывается общим уравнением (7.12) с диффузионным оператором

$$\hat{\mathcal{D}}_q = \frac{1}{P_a^0} \tilde{H}_{ab} - \delta_{ab} D_{(a)} q^2, \quad (7.31)$$

действующим в пространстве векторов p_a , определяющих концентрации различных состояний. Поскольку равновесное состояние не релаксирует, вектор $P_a^0 = 1$ является собственным вектором оператора $\hat{\mathcal{D}}_0$ с нулевым собственным значением. Итак, конформационная динамика представляет собой чистый случай внутренней динамики с единственной дискретной внутренней переменной, так что более простой модели для феноменологического описания внутренней динамики нет. Чтобы рассчитать корреляционную функцию рассеянного света, надо найти собственные векторы и собственные значения симметричной с весом P_a^0 матрицы (7.31) и воспользоваться формулой (7.14), где в качестве форм-фактора надо взять вектор α_a , компоненты которого представляют собой рассеивающие способности соответствующих конформационных состояний.

Рассмотрим простейший пример конформационной динамики всего с двумя состояниями. Легко убедиться, что в этом случае

$$\hat{\mathcal{D}}_q = \begin{pmatrix} \lambda P_2^0 + D_1 q^2 & -\lambda P_2^0 \\ -\lambda P_1^0 & \lambda P_1^0 + D_2 q^2 \end{pmatrix}, \quad (7.32)$$

где $\lambda = 1/(\tau_{1,2} P_2^0) = 1/(\tau_{2,1} P_1^0)$; $\tau_{1,2}$ и $\tau_{2,1}$ — времена перехода из первой конформации во вторую и наоборот. Собственные значения этой матрицы

$$\{\lambda_{q,0}\} = \frac{\lambda}{2} \left[1 + \frac{D_+ q^2}{\lambda} \pm \sqrt{\left(P_1^0 - P_2^0 + \frac{D_- q^2}{\lambda} \right)^2 + 4 P_1^0 P_2^0} \right], \quad (7.33)$$

где индексу 0 соответствует знак минус; $D_+ = D_1 + D_2$, $D_- = D_1 - D_2$. Напомним, что из условий нормировки $P_1^0 + P_2^0 = 1$. Мы не

будем приводить здесь громоздких выражений для корреляционной функции. Значительно полезнее рассмотреть ряд предельных случаев, чтобы проиллюстрировать общие выводы предыдущего параграфа (предел $q \rightarrow 0$) и выяснить, как проявляются в корреляционных свойствах рассеянного света флуктуации только форм-фактора ($D_1 = D_2$) или только коэффициента диффузии ($\alpha_1 = \alpha_2$).

При $D_0 q^2 / \lambda \equiv \gamma \ll 1$ с точностью до поправок порядка γ^2

$$\lambda_{q,0} = (P_1^0 D_1 + P_2^0 D_2) q^2 = \langle D \rangle q^2; \quad (7.34a)$$

$$\lambda_{q,1} = \lambda + (P_2^0 D_1 + P_1^0 D_2) q^2 \quad (7.34b)$$

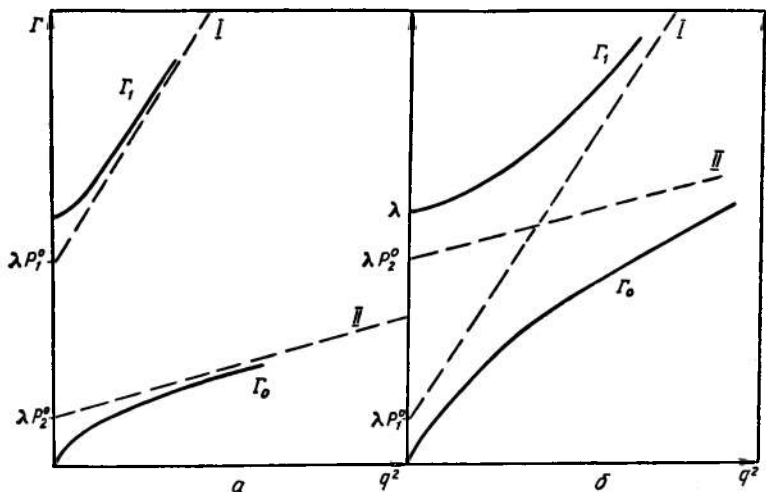


Рис. 67. Угловая зависимость трансляционной (Γ_0) и релаксационной (Γ_1) мод объекта с двумя конформационными состояниями.

Асимптотические наклоны I и II равны D_1 и D_2 соответственно; $a - P_1^0 > P_2^0$;

$b - P_1^0 < P_2^0$

в полном соответствии с выражением (7.18). Вычисляя с помощью (7.14) вклады этих мод, получим

$$A_0 = \langle \alpha \rangle^2 - 2 \langle \alpha \rangle \alpha_- P_1^0 P_2^0 \gamma; \quad (7.35a)$$

$$A_1 = \alpha_-^2 P_1^0 P_2^0 + 2 \langle \alpha \rangle \alpha_- P_1^0 P_2^0 \gamma. \quad (7.35b)$$

Как и должно быть, $A_0 + A_1 = \langle \alpha^2 \rangle$. Поскольку частица считается точечной, положение ее центра диффузии совпадает с центром рассеяния, и $A_1 \sim q^4$: ($\alpha_- \sim q^2$ и $\gamma \sim q^2$) в соответствии с выражением (7.24). Полезно обратить внимание также на то, что реальным параметром теории возмущений является именно γ , поэтому при малых флуктуациях коэффициента диффузии соотношения (7.34) и (7.35) могут быть справедливы далеко за пределами $qR \sim 1$.

При $\gamma \gg 1$

$$\lambda_{q,0} = D_2 q^2 + \tau_{2,1}^{-1}; \quad \lambda_{q,1} = D_1 q^2 + \tau_{1,2}^{-1} \quad (7.36)$$

(мы считаем $D_1 \geq D_2$), и переходами между разными состояниями за время перемещения частиц на расстояние q^{-1} можно пренебречь. Приблизительный вид зависимости $\lambda_{q,0}$ и $\lambda_{q,1}$ изображен на рис. 67.

Если при конформационном переходе меняется только коэффициент диффузии, $\alpha_- = 0$ и согласно уравнению (7.35б) $A_1 = 0$. Но удерживая члены порядка γ^2 вместо (7.35б), получим выражение

$$A_1 = (\alpha_- + \langle \alpha \rangle \gamma)^2 P_1^0 P_2^0, \quad (7.37)$$

учитывающее все члены, пропорциональные q^4 . Время перехода из одного состояния в другое может быть порядка времени диффузии частиц на расстояние порядка ее размера, $\gamma \sim \frac{D_-}{\langle D \rangle} (qR)^2 \sim \frac{\alpha_-}{\langle \alpha \rangle}$.

Это еще раз показывает, что вклад флуктуаций подвижности и форм-фактора рассеивателя часто одного порядка. Поэтому расщепление коррелятора в формуле (1.54) совершенно неоправданно, за исключением тех случаев, когда флуктуации форм-фактора конечны при $q = 0$, например в случае оптически анизотропных частиц.

Химическая кинетика. Химическая кинетика описывается системой нелинейных уравнений. Однако если мы интересуемся малыми флуктуациями в равновесных условиях, эти уравнения можно линеаризовать вблизи равновесной функции распределения и свести описание этих флуктуаций к уравнению вида (7.30), где индексы нумеруют все участвующие в реакции вещества. Поэтому за исключением нескольких подробностей, рассматриваемых ниже, реакция димеризации эквивалентна конформационной динамике с двумя состояниями, реакция $A + B \rightleftharpoons C$ — с тремя состояниями и т. п. Отличия заключаются в следующем. Во-первых, как известно, рассеивающая способность пропорциональна квадрату массы рассеивателя и в отличие от конформационных переходов может сильно различаться у разных компонент системы. При $q \rightarrow 0$ различия не стремятся к нулю. В этом отношении химические реакции соответствуют конформационным переходам, приводящим к изменению средней поляризуемости рассеивателей. Во-вторых, скорость химических реакций зависит от концентрации реагентов и может меняться в широких пределах. Наконец, третье и наиболее принципиальное отличие химической кинетики от конформационных переходов заключается в том, что в первом случае имеется несколько законов сохранения, число которых равно количеству независимых реагентов, а во втором — только один закон сохранения числа частиц. Это приводит к тому, что при химической кинетике существуют несколько чисто диффузионных мод. Остановимся на этом утверждении подробнее. Мы до сих пор в своих рассуждениях опирались на тот факт, что равновесная функция распределения не релаксирует и, следовательно, отвечает нулевому собственному значению диффузионного оператора. При этом мы просто констатировали, что последний получается самосопряженным с весом P_0 .

Это, в частности, означало, что все физические величины вычисляются как термодинамические средние. На самом деле самосопряженность диффузионного оператора с весом P_0 является математическим выражением принципа детального равновесия, а в общем случае —

принципа симметрии кинетических коэффициентов [38]. Существование нулевого собственного значения означает наличие сохраняющейся величины — собственной функции, отвечающей этому значению. В общем случае имеется только один закон сохранения числа частиц в системе, выражающийся соотношением $\langle p \rangle = 1$, но в случае химической кинетики таких законов несколько и соответственно — несколько мод, времена релаксации которых стремятся к нулю при $q \rightarrow 0$. Например, в реакции $A + B \rightleftharpoons C$ $[A] + [C] = \text{const}$ и $[B] + [C] = \text{const}$. Нумеруя A, B и C соответственно индексами 1, 2 и 3, можно сказать, что векторы $p_1 = (1, 0, 1)$ и $p_2 = (0, 1, 1)$ должны быть собственными векторами описывающей эту реакцию матрицы H_{ab} . Таким образом, в этой системе имеются две диффузионные моды и лишь одна релаксационная.

Мы не будем более детально останавливаться на химической кинетике, подробные расчеты многих примеров можно найти в литературе [73]. Экспериментальные исследования систем, рассмотренных в этом и в предыдущем подпараграфах, насколько нам известно, практически не проводились. И хотя метод квазиупругого светорассеяния вряд ли может составить конкуренцию стандартным способам изучения химической кинетики по скорости образования продукта в неравновесных условиях, о возможном вкладе флуктуаций состава системы ни в коем случае нельзя забывать в традиционных для лазерной корреляционной спектроскопии исследованиях.

Изучение же кинетики конформационных переходов путем отслеживания концентрации той или иной конформации после изменения внешних условий может потребовать чересчур быстрых измерений. В этой ситуации преимущества метода квазиупругого светорассеяния очевидны. Но методические возможности изучения внутренней динамики появились сравнительно недавно, и пока внимание исследователей сконцентрировано на случаях, когда вклад внутренней динамики в рассеяние заведомо велик.

Ориентационная динамика. С экспериментальной точки зрения наиболее простой вид нетрансляционной динамики, доступный изучению с помощью корреляционной спектроскопии квазиупругого рассеянного света, — это ориентационная динамика жестких частиц. Наиболее проста в теоретическом плане динамика сферических частиц. Однако для проявления этой динамики в спектре рассеянного света необходимо, чтобы поляризуемость частиц была либо анизотропна, либо неоднородна и, следовательно, интенсивность рассеянного света зависела от их ориентации. Обобщенное уравнение диффузии в этом случае имеет вид

$$\frac{\partial}{\partial t} P = DV^2 P + \Theta \hat{I} P, \quad (7.38)$$

где $\hat{I}$ — оператор поворота. Его явный вид приведен, например, в монографии [9]. Коэффициент вращательной диффузии сферы радиусом R

$$\Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3}. \quad (7.39)$$

Положение частицы определим координатами ее центра диффузии и тремя углами, задающими ее ориентацию. Фиксируем какую-то определенную ориентацию, а любую другую будем характеризовать углами $\varphi, \theta, \varphi'$, задающими величину поворотов вокруг осей z, x и снова z лабораторной системы координат, необходимых для ее совмещения с исходной. Общее решение уравнения (7.38) можно записать через так называемые d -функции Вигнера [9], однако в этом нет необходимости, так как форм-фактор зависит только от ориентации вектора q относительно частицы, а значит, не зависит от φ' . С другой стороны, изотропность раствора в целом, как мы видели в предыдущем разделе, означает, что собственные функции диффузионного оператора зависят от φ' только через множитель $e^{im'\varphi'}$, где $m' = 0, 1, 2, \dots$ Независимость форм-фактора от φ' означает, что вклад в рассеяние дают только моды с $m' = 0$. При этом оператор $\hat{l}\hat{l}$ превращается в сферическую часть оператора Лапласа $\hat{l}^2$ и

$$\left. \begin{aligned} p_{q,l} &= \mathcal{P}_l(\cos \theta) \\ \lambda_{q,l} &= Dq^2 + l(l+1)\Theta \end{aligned} \right\}, \quad (7.40)$$

где $\mathcal{P}_l$ — полиномы Лежандра. Подставляя выражения (7.40) в (7.14) и разлагая в ряд экспоненту в формуле для форм-фактора (1.53), можно получить, что вклад в рассеяние моды с индексом l при $qR \ll 1$

$$A_e \sim (qR)^{2l} c_l, \quad (7.41)$$

причем если центр рассеяния совпадает с центром диффузии $c_1 = 0$. В случае оптически анизотропных частиц интенсивность рассеяния на отдельной частице зависит от всех трех углов φ, θ и φ' . Но имея в виду, что в этом случае измерения проводятся, как правило, в очень малых углах, т. е. при $qR \ll 1$, форм-фактор согласно выражению (1.53) преобразуется при поворотах как тензор второго ранга. При этом оказывается [185], что отличен от нуля только вклад ориентационной моды с $l = 2$ и согласно (7.40) полуширина спектра деполяризованной компоненты рассеянного вперед света равна 6Θ .

Обобщение диффузионного оператора на случай жестких частиц произвольной формы имеет вид

$$\hat{\mathcal{D}}q = \hat{l}\Theta\hat{l} + qDq, \quad (7.42)$$

где D и Θ — тензоры трансляционной и вращательной диффузии; D в общем случае зависит от ориентации частицы, а Θ — постоянно, если под $\hat{l}$ понимается оператор поворота вокруг осей системы координат, жестко связанной с частицей. При этом начало отсчета выбрано в центре диффузии, так что в (7.42) отсутствуют линейные по q члены. Вряд ли есть смысл подробно анализировать это уравнение. Точность реальных экспериментов все равно недостаточна для определения значений компонент тензоров трансляционной и ориентационной диффузии. По существу, практическим целям достаточно отвечает модель сферических с гидродинамической точки зрения частиц. Мы, однако, рассмотрим также аксиально-симметричные частицы, во-первых, для

того, чтобы понять пределы применимости формул (7.40), а во-вторых, потому что в этой модели коэффициент диффузии в фиксированном направлении зависит от ориентации частиц и спектр рассеянного света определяется флуктуациями как форм-фактора, так и подвижности. Это позволяет считать ориентационную динамику аксиально-симметричной частицы полноценной моделью любой нетрансляционной динамики. Наконец, именно такие частицы являются, как правило, объектами экспериментов по измерению коэффициента вращательной диффузии.

Характеризуя ориентацию частицы двумя углами θ и φ , задающими направление ее оси в сферической системе координат (ось z направлена вдоль q), выражение (7.42) можно записать в виде

$$\hat{\mathcal{D}}q = \Theta l^2 + D_{\perp} q^2 + \Delta D q^2 \cos^2 \theta. \quad (7.43)$$

где $\Delta D = D_{\parallel} - D_{\perp}$; $D_{\perp}$ и $D_{\parallel}$ — коэффициенты диффузии в направлениях перпендикулярно и вдоль оси симметрии соответственно; Θ — коэффициент вращательной диффузии вокруг оси, перпендикулярной к оси симметрии. Поскольку форм-фактор не меняется при повороте частицы вокруг направления q , т. е. не зависит от φ , вклад в рассеяние дают только моды с нулевым «азимутальным квантовым числом» m точно так же, как и в случае сферически симметричных частиц. Поэтому все отличие от случая сферически-симметричных частиц заключается в наличии последнего, ориентационно-зависимого члена. Хотя в явном виде найти собственные функции и собственные значения оператора (7.43) не удастся, его асимптотики при $q \rightarrow 0$ можно выписать, поскольку об операторе $\hat{\mathcal{D}}_0$ известно все. При этом, как легко видеть, параметр теории возмущений $\gamma = \Delta D q^2 / \Theta$. Согласно выражениям для Θ (7.39) и D (4.2) этот параметр равен $\frac{\Delta D}{D} (qR)^2$, в соответствии с общими положениями предыдущего параграфа. Проведав необходимые выкладки, получим при $\gamma \ll 1$:

$$\lambda_{q,0} = \left[D_{\perp} + \frac{1}{3} \Delta D \right] q^2 = \langle D \rangle q^2; \quad (7.44)$$

$$\lambda_{q,l} = \Theta l(l+1) + D_{\perp} q^2 + \frac{1}{2} \Delta D q^2 \left[1 + \frac{1}{4l^2 + 4l - 3} \right].$$

Если к тому же $qR \ll 1$, вклад соответствующих мод описывается формулой (7.41), причем при наличии центра симметрии вклад всех мод с нечетными l равен нулю.

Модель аксиально-симметричных частиц допускает также точное вычисление функции взаимной корреляции. Собственные функции оператора (7.42) при $q = 0$ представляют собой так называемые сферические гармоники $p_{(l,m)} = Y_{lm}(\theta, \varphi)$ и соответствующие собственные значения $\lambda_{(l,m)} = \Theta l(l+1)$. Азимутальное квантовое число m пробегает целое значение от $-l$ до l , т. е. моды с индексом $l(2l+1)$ -кратно вырождены. Разлагая при $qR \ll 1$ форм-фактор в ряд, можно заметить, что

$$|\alpha(q)|^2 = \sum_i c_i (iqR)^i \cos^i \Psi, \quad (7.45)$$

где Ψ — угол между вектором q и осью частицы. Вводя систему координат так же, как и при выводе (7.29) (рис. 68) и делая необходимые вычисления, получим

$$\cos \Psi_1 = \sin \theta \cos \varphi, \quad \cos \Psi_2 = \sin \theta \cos (\varphi - \varphi_0) \text{ и}$$

$$G^{B3}(\tau) = \sum_{n,l=0}^{\infty} c_n^2 (qR)^{2n} e^{-l(l+1)\Theta|\tau|} \sum_{m=0}^l \langle \sin^n \theta \cos^n \varphi Y_{lm}(\theta, \varphi) \rangle^2 \cos m\varphi_0. \quad (7.46)$$

Если рассеиватель обладает центром симметрии, члены с нечетным n не дают вклада: $c_{2n+1} = 0$ и при $qR \ll 1$

$$G^{B3}(\tau) = \text{const} + c_2^2 (qR)^4 (1 + 3 \cos 2\varphi_0) e^{-6\Theta|\tau|}. \quad (7.47)$$

Отклонения от аксиальной симметрии приводят к снятию упомянутого выше $2l + 1$ -кратного выражения, и модам с разными m соответствуют обратные времена релаксации, отличающиеся на величину порядка $\Delta m \Delta \Theta$, где $\Delta \Theta$ — разность между собственными значениями тензора вращательной диффузии.

Изучение ориентационной релаксации. Для изучения ориентационной релаксации макромолекул применяются такие методы, как ЯМР, ЭПР, деполяризации флуоресценции [6, 69, 228]. Все они имеют один общий недостаток — позволяют определять время ориентационной релаксации лишь участка макромолекулы, где расположено соответственно ядро, парамагнитный или возбуждаемый электрон.

Поэтому часто возникает вопрос, насколько подвижен этот участок относительно молекулы в целом, особенно актуальный в последних двух случаях, связанных с применением специальных парамагнитных или флуоресцентных меток. Другим недостатком этих методов является их ограниченный временной диапазон. По-существу, эти методы оказываются неприменимыми для измерения коэффициентов вращательной диффузии меньше 10^6 с^{-1} . Метод корреляционной спектроскопии квазиупругого рассеяния света лишен этих недостатков.

Коэффициент вращательной диффузии обратно пропорционален третьей степени размера частиц. Поэтому при равной точности этот коэффициент в три раза «чувствительнее» к изменению размера по сравнению с коэффициентом трансляционной диффузии. Более того, одновременное определение этих двух коэффициентов позволяет судить о форме частицы. Поэтому разработке методики определения коэффициента вращательной диффузии методами лазерной корреляционной спектроскопии уделялось довольно большое внимание. Опыт таких работ весьма поучителен и в том отношении, что вращательная

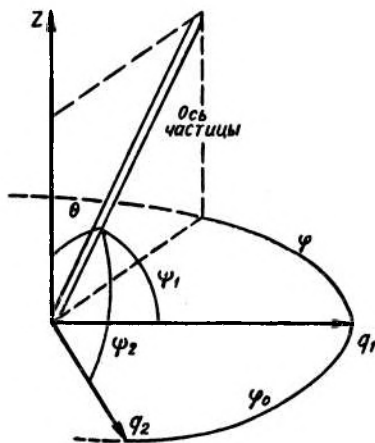


Рис. 68. К вычислению функции взаимной корреляции интенсивности света, рассеянного аксиально-симметричной частицей

диффузия является, как отмечалось выше, простейшим в экспериментальном и теоретическом отношении примером не чисто трансляционного релаксационного процесса.

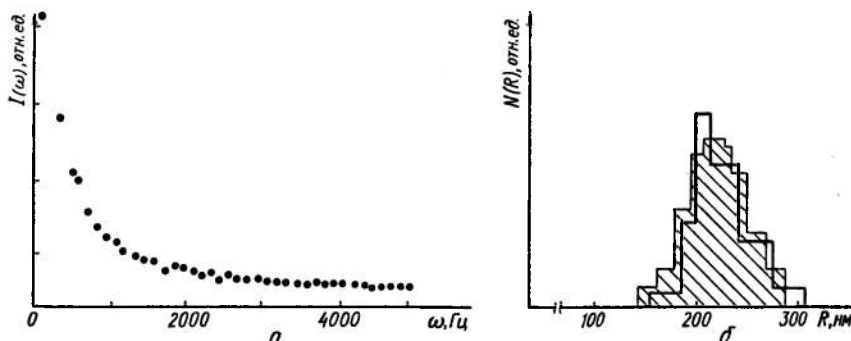


Рис. 69. Результат изучения спектра деполаризации в растворе ВТМ: а — измеренный спектр, б — сопоставление гистограммы, восстановленной с помощью регуляризации, с гистограммой, полученной из электронной микрофотографии (по [46]). Для обеих гистограмм вычислены следующие значения: $\bar{R}_{\text{рег}} = 240,0$, $\bar{R}_{\text{эм}} = 234$ нм

Наиболее просто коэффициент вращательной диффузии определяется в случае оптически анизотропных частиц методом деполаризационного квазиупругого светорассеяния. Подавляющее большинство работ, в которых были получены практически значимые результаты, выполнены именно этим способом.

Методические аспекты таких экспериментов рассмотрены в § 2.4, и мы ограничимся единственным примером, в котором использовалась описанная там же балансная схема измерений флуктуаций поляризации рассеянного вперед света. На рис. 69, а показан вид спектра флуктуаций поляризации света, рассеянного вперед раствором вируса табачной мозаики. Точность измерений оказалась достаточно высокой и позволила применить при анализе процедуру регуляризации. В результате была получена функция распределения рассеивающих частиц по размерам. Она сопоставлена с данными электронной микроскопии на рис. 69, б.

Значительная величина флуктуаций форм-фактора и возможность

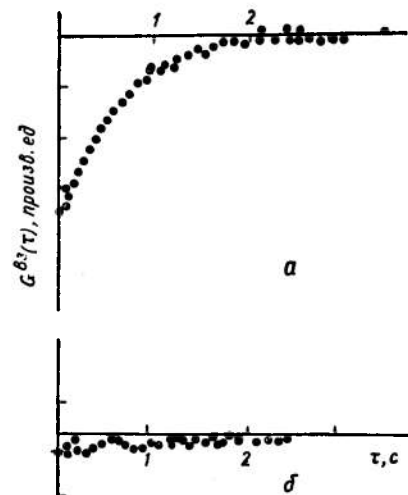


Рис. 70. Функция взаимной корреляции интенсивности света, рассеянного суспензией мертвых бактерий *E coli* (а) и латексом $d \sim 1$ мкм (б); $q_1 \perp q_2$ (по [39])

достаточно полного теоретического анализа делают ориентационную динамику несферических рассеивателей очень удобным модельным явлением для отработки новых методических подходов к изучению

внутренней динамики. Неудивительно поэтому, что в первых, пока немногочисленных, экспериментах, выполненных методом взаимной корреляции [39, 116], исследовалась именно вращательная диффузия. На рис. 70 показана функция взаимной корреляции флуктуаций интенсивности света, рассеянного суспензией обездвиженных бактерий *E. coli*. Регистрация излучения производилась в двух противоположных направлениях, перпендикулярных к зондирующему лучу. При этом угол φ_0 между переданными волновыми векторами q_1 и q_2 составил 90° , что согласно (7.46) соответствует максимально возможной антикорреляции. Характерное время релаксации $0,65$ с, и согласно выражению (7.47) $\Theta = 0,28$ с $^{-1}$, что хорошо соответствует коэффициенту вращательной диффузии эллипсоида, аппроксимирующего *E. coli* ($2 \times 0,8 \times 0,8$ мкм).

С появлением регулярных методов анализа спектров стало, по-видимому, возможным выделение вкладов вращательной динамики и в традиционной автокорреляционной схеме измерений, хотя попытки такого анализа предпринимались уже давно. Однако исследователей, использующих такой метод анализа, сразу привлекло гораздо более сложное и интересное явление, также сопровождающееся значительными флуктуациями форм-фактора и подвижности. Обсуждение этих работ будет приведено в следующем параграфе.

§ 7.3. ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ ДИНАМИКИ ПОЛИМЕРНЫХ КЛУБКОВ

Динамика полимерного клубка. Для описания динамического поведения полимерного клубка необходимо конкретизировать вид равновесной функции распределения и диффузионного тензора. Первая хорошо известна из статистической механики полимеров. В Θ -условиях, т. е. при таком растворителе, когда взаимодействие между удаленными звеньями не дает вклада в свободную энергию, конфигурация цепи имеет вид траектории случайного блуждания. Такой клубок называется гауссовым. Его удобнее всего описывать моделью Роуза — Зимма [267], представляющий полимер в виде последовательности точечных центров, связанных со своими соседями гармоническим потенциалом $b_0(r^a - r^{a+1})^2$. Тогда, вводя среднеквадратичную длину связи $l_0 = \left(\frac{3k_B T}{2b_0}\right)^{1/2}$, для цепи из M звеньев можно записать

$$P_0(\{r\}) = e^{-\frac{3}{2} \sum_{a=0}^M \frac{|r^a - r^{a+1}|^2}{l_0^2}}. \quad (7.48)$$

В более хорошем растворителе, чем при Θ -условиях, преобладает отталкивание между звеньями, и расстояние $r^{ab} \equiv |r^a - r^b| \sim l_0 |a - b|^\nu$, где $\nu \approx 0,6$ (в Θ -условиях $\nu = 0,5$) [51]. В более плохом, чем Θ , растворителе между звеньями существует эффективное притяжение и происходит переход клубок — глобула, а при достаточных концентрациях возможна агрегация.

Как выглядит тензор диффузии для системы взаимодействующих точечных частиц, и в том числе для модели Роуза — Зимма? Чтобы

ответить на этот вопрос, необходимо вспомнить, что согласно формуле (7.4) тензор $\frac{1}{k_B T} D^{ab}$ связывает силу f^b , действующую на b -ю частицу со скоростью V^a движения a -й частицы. Сила f^b приводит к двум эффектам: во-первых, само b -е звено движется со скоростью $f^b/\xi^{(b)}$, где $\xi^{(b)}$ — подвижность; во-вторых, возникает поток жидкости

$$V(r) = \frac{1}{8\pi\eta} \frac{r(rf^b) - f^b r^2}{r^3}, \quad (7.49)$$

приводящий к движению остальных звеньев. Этот эффект называется гидродинамическим взаимодействием. В результате

$$D^{ab} = \frac{k_B T}{\xi^{(b)}} \delta_{ab} - (1 - \delta_{ab}) \frac{k_B T}{8\pi\eta} \frac{r^{ab} \otimes r^{ab} - 1 (r^{ab})^2}{(r^{ab})^3}. \quad (7.50)$$

На самом деле звенья реального полимера имеют конечный размер и (7.50) является приближенным выражением. Но оказывается, что крупномасштабная динамика обусловлена в основном гидродинамическим взаимодействием удаленных звеньев и соответствующие поправки малы по параметру l_0/R_g . С диффузионным тензором (7.50) уравнение динамики (7.6) нельзя решить. Приближенный метод, основанный на замене D^{ab} его средним $\langle D^{ab} \rangle$, описан в работах [198, 267]. В результате получено, что

$$\lambda_{0,\{n\}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_g^3} \mu_{\{n\}}, \quad (7.51)$$

где $\mu_{\{n\}}$ — безразмерное число. В частности, наименьшее μ для мод, дающих вклад в рассеяние, равно примерно 6,5. Однако не следует переоценивать достоверность этого значения. Хотя результаты расчетов по теории возмущений [199] совпадают с собственными значениями, полученными при предварительном усреднении тензора диффузии с точностью до нескольких процентов, в теории Роуза — Зимма изначально имеется серьезный недостаток. В ней не учитывается невозможность самопересечения цепи, которая существует в реальности даже в Θ -условиях, когда при расчете статических характеристик эффектами исключенного объема можно пренебречь. Ясно, что запрет на самопересечение меняет собственные значения диффузионного оператора.

Поскольку современная теория не дает возможности вычислить спектр квазиупругого рассеянного света, особенную привлекательность приобретает упомянутый в § 7.1 подход, основанный на вычислении кумулянтов. Подставляя формулы (7.48) и (7.50) в (7.16), можно вычислить $\bar{\Gamma}$ в Θ -условиях. Оказывается, что гидродинамическое взаимодействие дает основной вклад и

$$\bar{\Gamma}(q) = Dq^2 \text{ при } qR_g \ll 1; \quad (7.52a)$$

$$\bar{\Gamma}(q) = \frac{k_B T}{\eta} Bq^3 \text{ при } qR_g \gg 1, \quad (7.52b)$$

где $B = 6,25 \cdot 10^{-2}$, а

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_g} \frac{3\sqrt{\pi}}{8}. \quad (7.53)$$

В области $qR_g \sim 1$ зависимость $\bar{\Gamma}(q)$ легко определить численно.

Поясним физический смысл асимптотических выражений (7.52). Затухание корреляционной функции происходит за время, при котором звенья цепи перемещаются на расстояние порядка q^{-1} . При $qR_g \ll 1$ это затухание определяется диффузией всего клубка на расстояния гораздо больше его размеров, в обратном предельном случае — диффузией фрагмента клубка размером q^{-1} на расстояние порядка q^{-1} . Согласно выражению (7.53) коэффициент диффузии такого фрагмента пропорционален q , и время релаксации оказывается пропорционально q^3 . В этих рассуждениях конкретный вид функции распределения (7.48) не используется, поэтому можно ожидать, что асимптотические формулы (7.52) справедливы и для набухшего клубка [24].

Для вычисления $\bar{\Gamma}(q)$ достаточно знать лишь парную равновесную функцию распределения. Более того, можно показать, что для определения константы B в асимптотике (7.52б) нет необходимости задаваться конкретным видом этой функции. Достаточно, чтобы она обладала при $r^{ab} \sim q^{-1}$ масштабной инвариантностью, т. е. зависела от r^{ab} только в комбинации $r^{ab}/|a-b|^\nu$. При этом

$$B = \frac{1}{4\pi} \frac{1+\gamma}{(2+\gamma)\gamma} \operatorname{tg} \frac{\pi\gamma}{2}, \quad (7.54)$$

где $\gamma = 2 - 1/\nu$. В Θ -условиях $\nu = 0,5$ и $B = 6,25 \cdot 10^{-2}$. В хорошем растворителе $\nu \approx 0,6$ и $B = 7,9 \cdot 10^{-2}$. Если условия близки к Θ , эффекты исключенного объема проявляются лишь для достаточно больших отрезков полимерной цепи. Оказывается, существует характерная длина Λ , зависящая от качества растворителя, такая, что закон $r^{ab} \sim |a-b|^\nu$ с $\nu \approx 0,6$ выполняется только при $r^{ab} \gg \Lambda$; при $l_0 \ll r^{ab} \ll \Lambda$ вероятностью «столкновений» не соседних звеньев можно пренебречь и $\nu = 0,5$. Таким образом, при подходящем $l \ll \Lambda \ll R_g$ в эксперименте может быть выполнено как условие $q\Lambda \gg 1$, так и обратное. В этом случае будут иметь место две асимптотики типа q^3 : с коэффициентом $B = 7,9 \cdot 10^{-2}$ при $q\Lambda \ll 1 \ll qR_g$ и с коэффициентом $6,25 \cdot 10^{-2}$ при $q\Lambda \gg 1 \gg ql_0$.

Изучение динамики полимерных клубков методом кумулянтов. К настоящему времени выполнен ряд работ, посвященных экспериментальному изучению угловой зависимости первого кумулянта света, квазиупругого рассеянного на статистических клубках различных полимеров [64, 124, 238, 260]. Зависимость $\bar{\Gamma}(q)$ должна носить универсальный характер, поэтому представляет интерес сопоставить эти данные как друг с другом, так и все их в совокупности с предсказаниями теории. При таком сопоставлении естественно воспользоваться безразмерными переменными: $\frac{\bar{\Gamma}\eta R_g^3}{k_B T (qR_g)^2}$ и qR_g . При этом каждый полимер характеризуется (помимо качества растворителя) единственной вели-

чиной — R_g . К сожалению, в различных работах эта величина определяется неодинаково: по угловой зависимости интенсивности светорассеяния; по данным динамического светорассеяния с использованием теоретической или различных эмпирических зависимостей, связывающих D и R_g ; по характеристической вязкости и т. п. Это приводит к небольшому, но нежелательному разбросу результатов из-за неточности определения R_g . В связи с этим мы воспользуемся значениями R_g , пересчитанными из угловой зависимости $\bar{\Gamma}$ в области $qR_g \ll \ll 1$ по формуле (7.53), что приводит к автоматическому совпадению

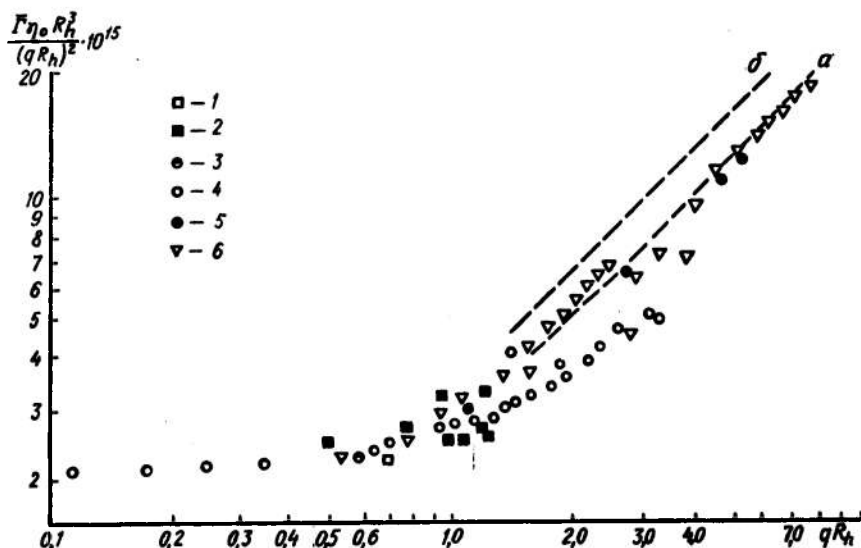


Рис. 71. Зависимость $\frac{\bar{\Gamma} \eta_0 R_h^3}{(qR_h)^2}$ от qR_h :

a — θ -растворитель; 1 — полнакриламид [4], 3 — полистирол [237], 4 — полистирол [238], 6 — ДНК [27]; б — хороший растворитель; 2 — полнакриламид, 5 — полистирол [254]

всех экспериментальных данных с теоретической кривой в этой области. Другими словами, мы будем характеризовать размер клубка его гидродинамическим радиусом R_h (см. § 4.1).

На рис. 71 представлены модифицированные указанным выше образом результаты ряда работ, в которых измерялось $\bar{\Gamma}(q)$. На этом же рисунке проведены асимптотики для гауссова клубка и для набухшего клубка в предположении $\nu = 0,6$. Обращает на себя внимание неплохое соответствие экспериментальных данных как друг другу, так и теории даже для столь разных макромолекул, как полистирол и ДНК. Этот факт убедительно подтверждает универсальность динамического поведения клубка.

Как отмечалось выше, совпадение теории с экспериментом при $qR_h \ll 1$ является точным по самому определению R_h . В переходной

же области $qR_h \sim 1$ и асимптотической области $qR_h \gg 1$ наблюдается небольшое, но систематическое расхождение, отмеченное в ряде работ [4, 124, 238]. Хотя это расхождение невелико (15—20 %), оно лежит далеко за пределами типичной погрешности измерения $\bar{\Gamma}$, составляющей обычно 1 %. Разброс данных по различным полимерам также больше этой погрешности, однако в области $qR_h \gg 1$ точки для клубков в хорошем растворителе систематически выше, чем в Θ -условиях, в соответствии с приведенными значениями коэффициентов B . Указанные закономерности еще лучше иллюстрирует табл. 15, где систематизированы известные нам результаты изучения асимптотического поведения $\bar{\Gamma}$ при $qR_h \gg 1$.

Коэффициент B в области $qR_h \gg 1 \gg ql_0$ должен быть вполне определенной величиной. Масштабная инвариантность парной функции распределения не вызывает сомнений, тем более что именно она и обеспечивает универсальность зависимости $\bar{\Gamma}(q)$. Поправки, связанные с конечностью длины цепи, малы по параметру $(qR_h)^{-1}$. Индивидуальная подвижность звеньев, их конечный размер и связанные с этим поправки к тензору диффузии дают вклад, малый по параметру ql_0 . Запрет на самопересечение, математически означающий наличие определенных граничных условий, не сказывается на $\bar{\Gamma}$. Действительно, $\bar{\Gamma}$ определяется согласно формуле (7.16) производной корреляционной функции на малых временах, за которые столкновения удаленных по цепи звеньев в типичной конфигурации произойти не успевают. Ясно также, что полидисперсность не влияет на корреляционные свойства рассеянного света при $qR_h \gg 1$, а присутствие в образце посторонних жестких частиц дает в $\bar{\Gamma}$ вклад $\sim q^2$ и не может изменить асимптотику типа q^3 . Таким образом, мы приходим к выводу, что указанное выше систематическое расхождение обусловлено самой измерительной процедурой.

Оценивая с помощью формулы (7.17) $\bar{\Gamma}^2$, можно выяснить, что при $qR_h \gg 1 \gg ql_0$ $\bar{\Gamma}^2 \sim \bar{\Gamma}^2/(ql_0)^2$, т. е. велико по сравнению с $\bar{\Gamma}^2$. Это означает, что распределение вкладов релаксационных мод по полуширинам очень широкое. Поскольку наиболее быстрые релаксационные процессы — это ориентационное движение отдельных сегментов цепи, независимость $\bar{\Gamma}(q)$ от l_0 в области масштабной инвариантности $ql_0 \ll \ll 1$ означает, что $A(\Gamma)$ при больших Γ убывает быстрее, чем Γ^{-2} . С другой стороны, так как $\bar{\Gamma}^2$ в этой области зависит от l_0 , $A(\Gamma)$ должна убывать медленнее, чем Γ^{-3} . Другими словами, при $l_0 \rightarrow 0$ $\bar{\Gamma}$ существует, а $\bar{\Gamma}^2 \rightarrow \infty$. Можно показать [4], что это приводит к систематической недооценке $\bar{\Gamma}$ при проведении измерений в конечной частотной полосе.

Экспериментальное изучение зависимости $\bar{\Gamma}(q)$ позволяет проверить адекватность вида диффузионного тензора и парной функции распределения. Результаты, приведенные в этом параграфе на наш взгляд, убедительно свидетельствуют о справедливости описания динамики полимерного клубка в Θ -условиях моделью Роуза — Зимма с

Т а б л и ц а 15. Коэффициент B в асимптотике $\bar{G} = \frac{kT}{\eta} B q^3$, полученный для различных полимеров в разных условиях

Полимер	Мол. масса, 10 ⁻⁶	Растворитель	$B, 10^3$	(qR_h)	Метод расчета	Литера- турный источник
Θ-условия						
Полистирол	4,1	Циклогексан, 35 °С	5,0±0,5	1,38	Кумулянты	[124]
	5,05			1,57		
	7,5			1,87		
	13,4			2,49		
	44,0			4,52		
	9,7	Трансдекалин, 20,4 °С	4,8	2,56	Регуляризация	[239]
	9,7		4,5	2,56		[238]
	0,78		—	0,72		
	2,42		5,7	1,23		
	5,53		4,7	1,93		
	9,7		4,5	2,56		
	3,8	Метилэтилкетон	5,57±0,06	1,39	Кумулянты	[260]
	7,2			1,82		
	26			3,57		
Полиакриламид	18,1	Вода + ацетон	5,2	2,34	Регуляризация	[4]
ДНК	24,7	Водно-солевой буфер	5,4	4,75	Кумулянты	[27]
	3,5		8,5	2,43		[87]
	4,3		7,4	2,43	Одноэкспоненциальная подгонка	[246]
	3,75		4,8	4,15		[143]
	10,3		5,4	2,10		[183]
	4,37		15,0	2,8		[222]
			6,1	2,46		
			6,1	7,37		
Хороший растворитель						
Полистирол	4,1	Толуол	6,5±1,5	—	Кумулянты	[124]
	5,05			—		
	7,5			—		
	13,4			—		
	44,0			10		
	1,8		5,57±0,06	1,25		[260]
	7,2			2,6		
	2,6			5,55		
	44,0			—		
	44,0	ТГФ 23,0 °С	6,5	—		[162]
	44,0		5,0	7,8		
	44,0		5,0	8,8		
	24	Бензин	3,4	7,8	Регуляризация	[60] [254]
	0,78		5,4±0,2	1,03		
	2,42			1,95		
	5,53			2,83		
	9,7			4,12		
	13,4			5,10		
Полиакриламид	3,6	Вода	6,0	1,22		[4]
	10,9		4,7	2,06		
	13,3		4,3	2,34		
	18,1		4,4	2,80		

тензором диффузии вида (7.50). На этом возможности метода кумулянтов в изучении динамики клубка в Θ -условиях, по существу, исчерпаны. Более того, в асимптотической области $qR_g \gg 1$ этот метод не дает никакой информации, кроме качества эксперимента.

Изучение зависимости $\bar{\Gamma}(q)$ в хорошем растворителе позволяет судить о виде парной функции распределения. Наиболее просто такая информация может быть извлечена из асимптотики при $qR_g \gg 1$. В этой области справедливо выражение (7.52б), причем B дается формулой (7.54) с $\nu = 0,5$ при $q\Lambda \gg 1$ и с $\nu \approx 0,6$ при $q\Lambda \ll 1 \ll qR_g$. Таким образом, имеется возможность изучения зависимости длины экранировки Λ от качества растворителя. Принципиально важной представляется нам возможность прецизионного измерения индекса ν набухшего клубка. Согласно выражению (7.54) процентное изменение ν меняет B примерно на 2 %. В то же время в измерениях $\bar{\Gamma}$ может быть достигнута точность в доли процента. То, что для измерения ν при таком подходе не требуются образцы различных молекулярных масс и не имеется жестких требований к монодисперсности и чистоте образца, выгодно отличает его от методов прямого измерения зависимости среднеквадратичного размера клубка от молекулярной массы.

Для реализации этих возможностей необходимо правильно учитывать систематическую ошибку измерения $\bar{\Gamma}$, возникающую из-за того, что вклад в $\bar{\Gamma}$ дают релаксационные моды с очень различающимися временами затухания. Таким образом, оказывается практически невозможно обеспечить наблюдение всех этих мод в одной полосе измерений. Для преодоления этой трудности необходим правильный учет поведения корреляционной функции при малых временах. В этой связи интересна работа [222], в которой несколько начальных точек корреляционной функции заменялись значениями, полученными экстраполяцией всех остальных точек с помощью зависимости $e^{-\Gamma t + \nu t^2}$ с последующей подгонкой полученной функции одной экспонентой. С помощью такой произвольной процедуры начальный наклон корреляционной функции был искусственно увеличен и получены значения $\bar{\Gamma}$, близкие к теоретическим. Разумеется, объективное определение $\bar{\Gamma}$ возможно только при использовании правильной начальной асимптотики $\bar{G}(\tau)$. Этот вопрос требует экспериментального исследования, например путем изучения зависимости $\bar{\Gamma}$ от ширины полосы. При этом одновременно будет определено и истинное значение $\bar{\Gamma}$. Однако такие исследования еще не проводились.

Нижайшая релаксационная мода полимерного клубка. Изучение внутренней динамики путем анализа модового состава спектра рассеянного света, несомненно, информативнее, но значительно сложнее, чем определение первого кумулянта. До недавнего времени надежного подхода к решению этой задачи не было. Предпринимались попытки аппроксимации гомодинной корреляционной функции автосверткой двух экспонент [87, 139, 143, 210]. Хотя в этих работах были получены вполне приемлемые результаты, такой способ анализа нельзя признать удовлетворительным, так как бимодальный характер корреля-

ционной функции закладывается а priori. Корректный подход состоит в решении обратной спектральной задачи с помощью процедуры регуляризации. Но возможности этого метода, к сожалению, не слишком велики. Лишь при $qR_g \sim 1$ удается достаточно хорошо выделить вклад нижайших релаксационных мод; при меньших q рассеяние определяется в основном чисто диффузионной модой, а при больших — слишком много релаксационных мод дают одинаковый вклад.

На рис. 72 показана угловая зависимость диффузионной Γ_0 и нижайшей внутренней Γ_1 мод, полученная путем решения обратной

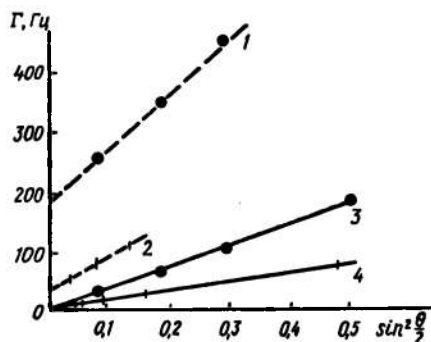


Рис. 72. Зависимость Γ_0 (3, 4) и Γ_1 (1, 2) от $\sin^2 \frac{\theta}{2}$ для водного раствора полиакриламида с молекулярной массой $3,5 \cdot 10^6$ Д (1, 3) и $9,8 \cdot 10^6$ Д (2, 4)

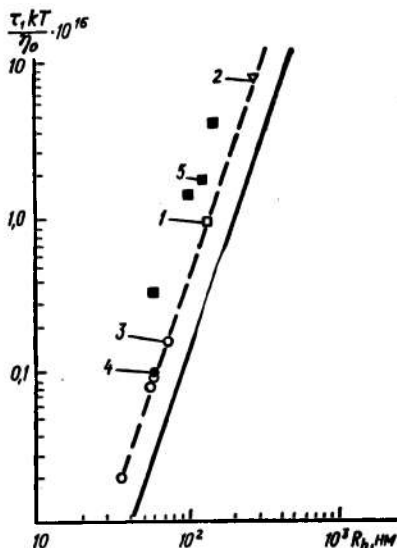


Рис. 73. Зависимость времени релаксации нижайшей моды от R_h (по данным табл. 15). Сплошная линия — теоретическая кривая, полученная для модели Роуза — Зимма с предварительным усреднением в θ -условиях. Экспериментальные точки: θ -условия: 1 — полиакриламид [4], 2 — ДНК фага Т7 [27], 3 — полистирол [238], 4 — полистирол [239]; хороший растворитель: δ — полиакриламид [4]

спектральной задачи. Время релаксации нижайшей моды λ_1^{-1} можно определить, экстраполируя $\Gamma_1^{-1}(q)$ к $q = 0$. На рис. 73 приведены зависимость λ_1 от гидродинамического радиуса клубка в θ -условиях, а также прямая, соответствующая теории Роуза — Зимма с предварительным усреднением гидродинамического взаимодействия. Обращает на себя внимание универсальность результатов, полученных разными авторами на совершенно различных объектах. Во всех случаях выполняется предсказываемый теорией закон (7.51), но с примерно в два раза большим коэффициентом μ_1 .

На рис. 73 показана также зависимость времени релаксации нижайшей моды набухшего клубка от R_h . Как видно, время релаксации нижайшей моды в θ -условиях примерно в 2,5 раза меньше, чем у клубка с таким же гидродинамическим радиусом в хорошем растворителе. (При этом сопоставляются клубки разной молекулярной массы, так как R_h зависит от качества растворителя.) Интересно отметить

существенно большее различие между временами релаксации нижайших мод гауссова и набухшего клубка с одинаковым R_h по сравнению с разницей их первых кумулянтов, составляющей только $\approx 20\%$. Это обстоятельство лишний раз подчеркивает невысокую информативность величины $\bar{G}$, которая характеризует внутреннюю динамику интегрально, нивелируя существенные различия в поведении исследуемых объектов.

Представляет интерес также наклон зависимости $\Gamma_1(q)$ (см. рис. 72), имеющий смысл коэффициента диффузии D_1 клубка в состоянии, описываемом нижайшей модой. Исходя из представлений об универсальности динамики статистического клубка, можно ожидать, что соотношение D_1/D не зависит ни от каких характеристик полимера, кроме качества растворителя. Однако D_1 так же, как и D , определяется в области $qR_h \ll 1$, где наблюдать нижайшую моду чрезвычайно трудно. Поэтому точность определения D_1/D низка, и вопрос об универсальности D_1/D и Θ -условиях, а тем более о поведении этого отношения в зависимости от качества растворителя остается открытым. В табл. 16 приведены значения безразмерных параметров μ_1 и D_1/D для ряда полимеров в разных условиях. Существующая теория не позволяет определить соотношение D_1/D , кроме тех случаев, когда тензор диффузии не зависит от конфигурации объекта (например, в пренебрежении или при предварительном усреднении гидродинамического взаимодействия). В этом случае $D_1/D = 1$ не зависит от существования запрета на самопересечения. Так как в эксперименте D_1/D больше 1, для объяснения угловой зависимости $\Gamma_1(q)$ необходим точный учет гидродинамического взаимодействия.

Центр диффузии однородного полимерного клубка, строго говоря, не совпадает с его центром рассеяния, но, по-видимому, достаточно близок к нему. Во всяком случае разница между D и D_{app} (см. § 7.1) находится в пределах экспериментальной точности. На рис. 74 показана угловая зависимость отношения вкладов релаксационной и диффузионной мод. Она не противоречит общей формуле (7.24), но поскольку далеко продвинуться в область $qR_g \ll 1$ не удастся из-за малости вклада релаксационных мод, сделать сколько-нибудь надежные выводы из этой зависимости, к сожалению, невозможно.

Наконец, остановимся кратко на других, описанных в § 1 этой главы, методах изучения внутренней динамики полимеров. Безусловно, наиболее заманчивым здесь является метод взаимной корреляции, однако методические трудности его еще до конца не преодолены. Нам известна лишь одна работа [148], выполненная этим методом на

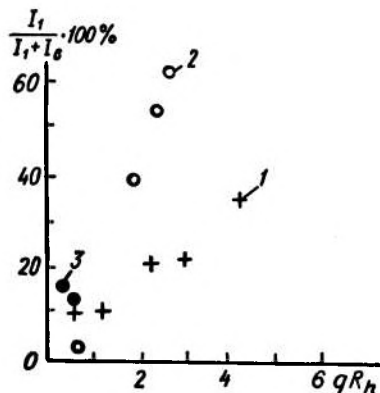


Рис. 74. Угловая зависимость относительного вклада нижайшей моды в светорассеяние:

1 — ДНК (по [27]), 2 — полистирол (по [238]), 3 — полиакриламид (по [41])

Т а б л и ц а 16. Коэффициент μ_1 в соотношении (7.51), отношение коэффициентов диффузии нижней релаксационной D_1 и чисто диффузионной D_0 мод, полученные для различных полимеров

Полимер	Мол. масса, 10 ⁻⁶	Растворитель	μ_1	D_1/D_0	Метод расчета	Литера- турный источник
Θ-условия						
Полиакрил- амид	13,3±0,7	Вода + + ацетон	1,94	—	Регуляри- зация	[4]
ДНК	24,7±1,5	Водно-соле- вой буфер	2,19	2,7		[27]
Полистирол	2,42	Транс-дека- лин, 20,4 °C	1,87	—		[238]
	5,53		2,01	—		
	9,7		2,21	2,42		
	27,3	Циклогек- сан, 35 °C	0,87—1,35	—	Бимодаль- ная под- гонка	[139]
ДНК	31,6	Водно-соле- вой буфер	1,88	3		[210]
	3,75		1,14	—		[143]
	3,5		0,44	—		[87]
Теоретический расчет						
			6,50	1	С предва- рительным усреднени- ем	
Хороший растворитель						
Полистирол	5,5	Транс- дека- лин, 25 °C	1,98	1,57	Регуляри- зация	[237]
Полиакрил- амид	3,6	Вода	0,85	2,3		[4]
			0,87	2,3		
			0,78	2,67		

полимерном образце, но в ней математическая обработка результатов не проводилась и была получена лишь грубая оценка времени релаксации внутренних мод.

Интересная возможность состоит в изучении динамики неоднородного полимера. Так как центр диффузии и центр рассеяния однородного на масштабе q^{-1} полимера близки друг к другу, в области, где возможно достаточно точное разделение диффузионной и внутренних мод клубка, вклад последних в рассеяние — порядка $(qR_g)^4$. Если основной вклад в рассеяние дает только часть полимера, то центр рассеяния совпадает с положением этой части и соответственно отстоит от центра диффузии на расстояние порядка R_g . Поэтому в такой ситуации вклад внутренних мод при $qR_g \ll 1$ может быть порядка $(qR_g)^2$, т. е. значительно больше, чем в случае однородного полимера. Таким объектом может быть полимер, один из концов которого связан с маленькой, но дающей большой вклад в рассеяние частицей. Крупномас-

штабная динамика этой системы мало отличается от динамики свободного полимера, но вклад внутренних мод в рассеяние меняется в зависимости от соотношения между интенсивностью рассеяния частицей и всем полимером.

Нельзя не упомянуть также об изучении мелкомасштабной ориентационной динамики полимерных звеньев методом деполяризационного светорассеяния. Время корреляции деполяризованной компоненты света, рассеянного на полимере из оптически анизотропных звеньев, определяется временем переориентации отдельных звеньев. В подавляющем большинстве синтетических полимеров длина статистического сегмента l_0 — 1—2 нм, и соответствующие времена ориентационной релаксации настолько велики, что попадают в область, где более эффективно использование таких методов, как деполяризация флуоресценции или ЭПР. Но для таких жестких биологических полимеров, как ДНК, корреляционная спектроскопия деполяризованной компоненты квазиупругого рассеянного света весьма удобна [215].

§ 7.4. МЕЖЧАСТИЧНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Концентрационная зависимость. Проблема определения спектра света, рассеянного раствором взаимодействующих частиц, внешне мало отличается от проблемы учета эффектов внутренней динамики. Эволюция системы описывается тем же уравнением диффузии (7.6). Если частицы можно считать точечными в гидродинамическом отношении, известен и тензор диффузии, который описывается выражением (7.50). Отличие имеется лишь в структуре потенциальной энергии: она конечна при бесконечном удалении частиц друг от друга, и, следовательно, обобщенное уравнение диффузии описывает инфинитное относительное движение рассеивателей. Это значит, что набор собственных значений оператора $\hat{D}_q$ становится непрерывным, понятие нижайших релаксационных мод перестает быть содержательным и цель вычислений радикально меняется: нас интересуют не собственные значения диффузионного оператора, а вид собственных функций этого оператора с заранее заданным собственным значением.

Принципиальное значение имеет не то, что относительные смещения рассеивателей не ограничены, а то, что они велики по сравнению с q^{-1} . Ведь образец находится в кювете конечных размеров, и собственные значения диффузионного оператора дискретны. Но рассматривая всю систему как один объект с размером $L \gg q^{-1}$ и опираясь на результаты § 7.1, мы приходим к выводу, что обратные времена «внутренней» релаксации такого объекта, а значит, и их отличия друг от друга — порядка $DL^{-2} \ll Dq^2$. Итак, обсуждая проблему внутренней динамики, мы анализировали в основном случай малых частиц, опираясь на теорию возмущений по параметру qR . Проблема концентрационных эффектов — это противоположный случай, когда, как мы знаем, вклады разных релаксационных мод — одного порядка, а относительные различия их времен релаксации малы.

Разумеется, нельзя рассчитывать на исчерпывающее описание концентрационной зависимости спектра рассеянного света. Такую зависимость даже для статических характеристик, например для угловой зависимости интенсивности светорассеяния, не удастся вычислить из-за непреодолимых пока трудностей решения многочастичной задачи. Речь поэтому может идти в лучшем случае о расчете концентрационных поправок в случае разбавленных растворов.

В этом параграфе выражений для таких поправок нет. Хотя такого рода вычисления проводились неоднократно [65, 107, 181, 197, 255, 266], довести их до конца удастся лишь путем настолько существенных допущений, что такие результаты, с нашей точки зрения, практической ценности не представляют. В связи с этим мы сочли излишним изложение теоретических аспектов проблемы межчастичного взаимодействия, которые вряд ли могут заинтересовать читателя. Тем не менее совсем не остановиться на таком важном вопросе нельзя. Мы не можем сказать, насколько меняются корреляционные характеристики рассеянного света из-за межчастичного взаимодействия, но как они меняются, можно попытаться обсудить.

Даже самый естественный, казалось бы, вопрос, как ширина спектра зависит от концентрации C , некорректен. Меняется не просто ширина спектра, а его форма: вклад в рассеяние дает набор релаксационных мод с непрерывным распределением времен релаксации. Однако если число частиц в объеме q^{-3} велико, их перемещения на расстояния порядка q^{-1} сопровождаются большим количеством случайных столкновений друг с другом и могут описываться обычным диффузионным уравнением, но с переопределенным коэффициентом диффузии. Но даже качественно охарактеризовать концентрационную зависимость этого коэффициента трудно. С одной стороны, с ростом C увеличивается вязкость раствора, и это должно замедлять диффузию. С другой — отталкивание между частицами приводит к ускорению «рассасывания» флуктуаций плотности, т. е. к ускорению диффузии. В эксперименте чаще наблюдается рост коэффициента диффузии с увеличением концентрации, хотя возможна и обратная ситуация [96, 154, 187, 254].

В другом предельном случае $Cg^{-3} \ll 1$ перемещение частицы на расстояние q^{-1} происходит, как правило, без столкновений с другими частицами, поэтому спектр света, рассеянного на таких частицах, остается без изменений. Если радиус взаимодействия $R \ll q^{-1}$, лишь малая, порядка Cq^{-3} , доля частиц участвует за время такого перемещения в процессах взаимодействия, и в спектре появляется нелоренцевская добавка с интегральной интенсивностью $\sim Cq^{-3}$. Таким образом, в разбавленном растворе при $CR^3 \ll 1$ с ростом концентрации сначала к имеющемуся лоренциану добавляется нелоренцевская часть, относительная величина которой растет, пока весь спектр не принимает вновь лоренцевский вид, но уже с измененной полушириной. В случае больших частиц ($qR \gg 1$) условие $Cq^{-3} \gg 1$ вообще невыполнимо (если только радиус взаимодействия не велик по сравнению с размером частиц), и спектр, став при $CR^3 \sim 1$ существенно нелоренцевским, так и не принимает больше лоренцевской формы.

Итак, кроме обычного параметра исключенного объема CR^3 важную роль в рассматриваемой проблеме играет параметр qR . Эти два параметра являются безразмерными комбинациями трех характерных для рассеяния света на системе взаимодействующих частиц длин: среднего расстояния между частицами $C^{-1/3}$, радиуса взаимодействия R и масштаба q^{-1} . Для обсуждения формы спектра или корреляционной функции в рассмотрение следует ввести еще одну длину — расстояние, на которое перемещается частица за время ω^{-1} ($\sqrt{D}/\omega$) или τ ($\sqrt{D}\tau$). Такое обилие характерных длин определяет многообразие проявлений эффектов межчастичного взаимодействия в корреляционных свойствах рассеянного света в зависимости от соотношений между этими четырьмя длинами, которые могут быть в одном из $4! = 24$ вариантов. Конечно, не все эти варианты приводят к принципиально разным ответам, но приведенная цифра показывает, насколько тщательно необходимо следить, к какой области относится тот или иной теоретический результат.

Далеко не все соотношения между указанными длинами интересны с точки зрения эксперимента. Ясно, например, что при $\sqrt{D}\tau \ll q^{-1}$ нормированная корреляционная функция близка к единице, а в обратном предельном случае — экспоненциально мала. Поэтому наиболее важна область $Dq^2\tau \sim 1$. Поскольку мы обсуждаем разбавленные растворы, $CR^3 \ll 1$. Наконец, случай очень крупных частиц ($qR \gg 1$) не представляет большого интереса, поскольку в разбавленном растворе таких частиц концентрационные эффекты малы по параметру $Cq^{-3} \ll CR^3 \ll 1$, т. е. практически отсутствуют. Итак, наиболее важны такие два варианта: $R \approx q^{-1} \approx \sqrt{D}\tau \ll C^{-1/3}$ и $R \ll C^{-1/3} \ll q^{-1} \sim \sqrt{D}\tau$. В первом случае (крупные частицы) следует ожидать появления нелоренцевской добавки $\sim Cq^{-3} \ll 1$ к спектру, во втором (мелкие частицы) при $C^{-1/3} \ll q^{-1}$ — изменения ширины спектра на величину порядка $CR^3 \ll 1$ с сохранением его лоренцевской формы, а при $C^{-1/3} \approx q^{-1}$ — к искажениям формы спектра пропорционально $CR^3 \approx (qR)^3$.

Этими качественными рассуждениями можно было бы закончить обсуждение проблемы межчастичного взаимодействия. Их вполне достаточно для правильной экстраполяции результатов измерений к нулевой концентрации. А базы для количественной интерпретации концентрационных зависимостей еще нет. Для этого необходимо описать движение частиц, когда расстояния между ними сравнимы с их размером, что требует решения соответствующей гидродинамической задачи. Но эта задача аналитического решения не имеет. Решение возможно лишь в случае частиц, гидродинамический радиус которых мал по сравнению с радиусом взаимодействия. Однако такая система при концентрациях, достаточных для оптических измерений, как правило, не может считаться разбавленным раствором.

Все же один вопрос заслуживает отдельного обсуждения. Это вопрос о гидродинамическом взаимодействии, которое на больших расстояниях согласно формуле (7.50) ведет себя как $1/r$, т. е. является

дальнодействующим. Как известно, дальнодействие радикально меняет свойства системы при сколько угодно малых концентрациях. (Например, плазма ни при какой концентрации не становится идеальным газом.) Это сразу ставит под сомнение все приведенные выше рассуждения. С другой стороны, эксперимент свидетельствует о том, что при малых концентрациях межчастичным взаимодействием можно пренебречь. Но эта возможность нетривиальна и существует только благодаря специфике гидродинамического взаимодействия.

Гидродинамическое взаимодействие. Нетрудно проверить, что тензор диффузии (7.50) обладает свойством

$$\nabla_a D^{ab} = 0. \quad (7.55)$$

Это свойство не случайно. По своему происхождению гидродинамический вклад в тензор диффузии представляет собой скорость жидкости V в точке r^a , возникающую под действием силы, приложенной в точке b , а вследствие несжимаемости жидкости $\nabla V = 0$. Именно этот факт приводит к слабому влиянию дальнодействующего гидродинамического взаимодействия на диффузию частиц, как это было подчеркнуто в [65]. На самом деле несжимаемость среды не имеет принципиального значения, свойство (7.55) универсально. Дело в том, что D^{ab} является коэффициентом пропорциональности между бесконечно малой обобщенной силой и соответствующим потоком (см. § 7.1) в стационарных условиях, и поэтому (7.55) является следствием уравнения непрерывности движения среды. Ясно, что именно непрерывность, т. е. отсутствие мгновенных перемещений участков среды на конечные расстояния, является первопричиной отсутствия радикального влияния гидродинамического взаимодействия на диффузию. Ведь это влияние есть следствие увлечения частиц движущейся средой.

Благодаря (7.55) диффузионное уравнение (7.8) в отсутствие потенциального взаимодействия ($P_0 = 1$) и при подвижности частиц, не зависящей от конфигурации системы $D^{ab}|_{a=b} = 1 \cdot D^a = \text{const}$, обладает замечательным свойством: функции e^{iqr^a} являются его собственными функциями, отвечающими собственным значениям $D^a q^2$. Таким образом, движение каждой отдельной частицы чисто диффузионное, и корреляционная функция $G^{(1)}(\tau)$ вообще не «чувствует» гидродинамического взаимодействия.

Подчеркнем, что это утверждение справедливо только при отсутствии потенциального взаимодействия и только для точечных частиц. Первое условие означает, что между рассеивателями нет отталкивания (или притяжения). Смысл второго состоит в следующем. Диффузионный тензор (7.50) представляет собой лишь приближенное выражение. Если размеры частиц конечны или между ними имеется взаимодействие, течение жидкости под действием внешних сил возмущается из-за относительного движения взаимодействующих частиц и (или) вращения частиц конечных размеров в потоке с градиентом скорости. Это тот же механизм, который ответствен за концентрационную зависимость вязкости. В результате элементы диффузионного тензора, в том числе подвижность, оказываются зависящими от координат всех

частиц и одночастичные собственные функции исчезают. Соответственно появляются поправки к парной корреляционной функции.

В отличие от $G^{(1)}(\tau)$ функции $G^{(2)}(\tau)$ и $G^{(3)}(\tau)$ характеризуют корреляционные свойства интенсивности рассеянного излучения. Но интенсивность является суммой членов, пропорциональных $e^{iq(r^a - r^b)}$, а эти зависящие от координат пары частиц функции не являются собственными функциями диффузионного оператора даже в случае чисто гидродинамического взаимодействия, и как в $G^{(3)}(\tau)$, так и в $G^{(2)}(\tau)$ возникают концентрационные поправки. Эти поправки особенно важны для функции взаимной корреляции, поскольку если флуктуации форм-фактора невелики, они могут оказаться основным наблюдаемым эффектом. В гл. 1 мы видели, что и отличие $G^{(3)}(\tau)$ от нуля, и нарушение соотношения Зигерта (1.24) означают негауссовость статистики регистрируемого излучения. Причина в данном случае очевидна: межчастичное взаимодействие приводит к скоррелированности движения рассеивателей, и условия центральной предельной теоремы не выполняются.

Вклад в гомодинную корреляционную функцию и в функцию взаимной корреляции чисто гидродинамического взаимодействия делает содержательной задачу о динамическом поведении точечных частиц без потенциального взаимодействия с диффузионным тензором (7.50). В этом случае свойство (7.55) оказывается чрезвычайно важным: оно позволяет получить замкнутое уравнение относительно парной функции распределения, что означает независимость движения каждой пары частиц от движения всех остальных. Для функции, зависящей только от $r^a - r^b = r$, диффузионный оператор (7.8) принимает вид

$$\hat{\mathcal{D}} = 2D\nabla^2 - \frac{k_B T}{8\pi\eta} \nabla \frac{r \otimes r - 1r^2}{r^3} \nabla. \quad (7.56)$$

Обозначим собственную функцию этого оператора, отвечающую собственному значению $2Dq^2$, символом $f_q(r)$. Тогда с помощью формул (7.10) и (7.13) нетрудно получить выражения для обсуждаемых корреляционных функций. Например,

$$G^{(3)}(\tau) \equiv \sum_{a \neq b} \langle e^{iq_1 r^{ab}(0)} e^{iq_2 r^{ab}(\tau)} \rangle = \frac{4N^2}{W} \int \text{Re} f_q(q_1) e^{-2Dq_1^2 \tau} \text{Re} f_q(q_2) \times \\ \times \frac{d^3 q}{(2\pi)^3}. \quad (7.57)$$

В этом выражении $\text{Re} f_q(x)$ — это действительная часть пространственного фурье-образа собственной функции $f_q(r)$; множитель N^2 — число пар частиц, а объем системы W возникает в знаменателе вследствие нормировки: $\langle \dots \rangle \equiv \frac{1}{W} \int \dots d^3 r$.

Согласно формуле Стокса отношение второго слагаемого в выражении (7.56) к первому — порядка $\frac{R_h}{r}$, и можно ожидать, что на больших расстояниях функция $f_q(r)$ мало отличается от собственной функ-

ции первого слагаемого e^{iqr} . Тогда при $\kappa R_h \ll 1$ $f_q(\kappa) = \delta(q - \kappa) + \Delta_q(\kappa)$, где $\Delta_q(\kappa)$ — малая поправка, и

$$G^{B3}(\tau) = \frac{4N^2}{W} [A(q_1, q_2) e^{-2Dq_1^2|\tau|} + A(q_2, q_1) e^{-2Dq_2^2|\tau|}]. \quad (7.58)$$

Коэффициент $A(q_1, q_2)$ легко выражается через поправки $\Delta_q(\kappa)$, которые можно вычислить по теории возмущений. В первом порядке

$$\Delta_q(r) = \frac{3\pi R_h}{2} \int \frac{\kappa^2 q^2 - (\kappa q)^2}{|q - \kappa|^4 (q^2 - \kappa^2 + i0)} e^{i\kappa r} \frac{d^3\kappa}{(2\pi)^3}. \quad (7.59)$$

Обезразмеривая интеграл в этом выражении, можно убедиться, что отношение поправки к нулевому приближению — порядка qR_h . Таким образом, основную роль действительно играет гидродинамическое взаимодействие на расстояниях порядка $1/q$. Из формулы (7.59) сразу получаем

$$A(q_1, q_2) = \frac{3\pi R_h}{2} \frac{q_1^2 q_2^2 - (q_1 q_2)^2}{q_2^2 - q_1^2} \left(\frac{1}{|q_1 - q_2|^2} + \frac{1}{|q_1 + q_2|^2} \right). \quad (7.60)$$

Отметим, что в первом порядке теории возмущений $A(q_1, q_2) = -A(q_2, q_1)$. Только так и могло быть, поскольку, как видно из формулы (7.57), $G^{B3}(0) = 0$. (Напомним, что мы игнорируем здесь вклад в $G^{B3}(\tau)$ флуктуаций форм-фактора и числа частиц в рассеивающем объеме, выбросив в (7.58) слагаемые с $a = b$.) Точное значение получается и для $\left. \frac{\partial G^{B3}(\tau)}{\partial \tau} \right|_{\tau=0}$. Действительно, эта величина может быть вычислена по формуле, аналогичной (7.16), куда диффузионный оператор, а значит, и его часть, отвечающая взаимодействию, входят линейно, и, следовательно, результат первого порядка теории возмущений точен.

Казалось бы, формулы (7.58) и (7.60) можно использовать и для вычисления поправок к гомодинной функции. Но просто подставить $q_1 = q_2$ в эти формулы невозможно. Необходимо учесть конечность апертуры фотосбора, т. е. разброс волновых векторов регистрируемого излучения, а также конечность рассеивающего объема. Мы не будем приводить соответствующих громоздких выкладок. Заметим лишь, что чисто гидродинамическое взаимодействие эффективно приводит к появлению концентрационной поправки к негауссовой составляющей СФИ. Ведь эта поправка, как видно из формулы (7.57) — порядка $\frac{N^2}{W} \sim NC$. Точно такой же природы и вычисленная нами функция взаимной корреляции. Но поскольку эта функция исходно имеет чисто негауссову природу, концентрационный эффект может оказаться основным. Комбинируя выражения (7.60) и (7.26), легко увидеть, что отношение вклада гидродинамического взаимодействия в $G^{B3}(\tau)$ к вкладу флуктуаций форм-фактора — порядка $\frac{CR_h}{q^2} \frac{\langle \Delta \alpha^2 \rangle}{\langle |\alpha|^2 \rangle}$. Если число частиц в объеме $R_h q^{-2}$ порядка единицы, скоррелированность движения рассеивателей обуславливает основной эффект.

Мы считаем целесообразным еще раз вернуться к особенностям нашей трактовки проблем корреляционной спектроскопии и в связи с этим к структуре изложения, принятой в нашей работе.

Прежде всего, утверждение, что ЛКС-метод, ориентированный на изучение динамики микрообъектов, почти всегда встречается в каждой посвященной ему работе. Между тем доля экспериментальных исследований, единственным результатом которых в итоге оказывается определение статистических параметров (размер, заряд), составляет, по-видимому, не менее $3/4$ общего их количества. Нам представляется наиболее естественным распространение методологии ЛКС на задачи изучения именно динамических свойств рассеивателя, поэтому так много внимания мы уделили новым экспериментальным подходам, разумеется, не без ущерба для традиционных. Многочисленные напоминания о важности эффектов негауссовости и возможностях метода взаимной корреляции, а также само включение в книгу отдельной главы о внутренней динамике, ставящей, пожалуй, больше проблем, чем все остальные, — все это обусловлено нашим убеждением, что именно эти направления исследований должны в ближайшем будущем дать наиболее интересные результаты. Хотя, повторяем, возможность их использования для конкретно биологических исследований в настоящее время проблематична.

Этим же обстоятельством объясняется и то, что достижения ЛКС в узкой методологической области, где сосредоточена основная масса полученных к настоящему времени экспериментальных фактов, — изучение трансляционной диффузии — мы старались изложить предельно лаконично: только чтобы дать представление об основных классах явлений, где применение ЛКС позволяет получить новые и интересные результаты для биологии. Так что некоторая фрагментарность проблематики гл. 4, где рассматриваются конкретные приложения метода и где мы ссылаемся в основном на типичные исследования, выполненные на стандартных приборах, сознательно заложена авторами. Несколько более полными по реферированному материалу получились гл. 5 и 6. В проблеме анализа клеточной подвижности сам характер движения требовал от исследователей применения практически всего многообразия методи-

ческих достижений корреляционной спектроскопии. Что же касается электрофоретического светорассеяния, то многочисленность работающих в этой области групп, позволила нам проиллюстрировать наиболее интересные, с нашей точки зрения, моменты работами большинства из них.

Такой принцип изложения иллюстративного материала отвечает одной из основных поставленных целей: привлечь внимание исследователей, работающих в биологии и медицине, к мощному современному методу как в нынешнем его виде, так и в перспективе.

Корреляционная спектроскопия может показаться чрезвычайно сложным и неоправданно дорогостоящим методом для определения размеров, заряда и даже динамических свойств объектов исследования. Однако, например, электронная микроскопия — широко используемый в биологических исследованиях метод — в общем и дороже, и не всегда проще. К тому же нередко ЛКС оказывается безальтернативным способом получения необходимой информации. Не будет, пожалуй, преувеличением сказать, что на современном уровне биофизических исследований наряду с седиментацией, хроматографией, индикатрисным светорассеянием, ЭПР, микроскопией, иммунологическим тестированием и т. д. практически невозможно обойтись без привлечения ЛКС в том или ином варианте.

Второй основной нашей задачей было последовательное изложение методических основ ЛКС: теоретических вопросов и технического оснащения эксперимента. Обсуждение уже готового текста поставило ряд вопросов, которые необходимо прокомментировать.

В настоящее время ЛКС является стандартным лабораторным методом определения коэффициента диффузии. В этом направлении дальнейшие технические и методические усовершенствования вряд ли возможны. На первый план выдвигаются проблемы математической обработки результатов. И в этом вопросе структура нашего изложения не вполне отражает сложившуюся практику, что выражается в акцентировании внимания на методе регуляризации. Этот метод настолько расширяет возможности корреляционной спектроскопии как в научном, так и в практическом приложении, что мы не только привели непропорционально большое число примеров исследований с его использованием, но и сочли необходимым посвятить ему отдельную главу.

В то же время некоторых вопросов мы коснулись лишь вскользь. В первую очередь это относится к методу деполяризационного светорассеяния, пора интенсивного подъема которого, по-видимому, уже прошла. Возможно, сказывается конкуренция со стороны других методов — ЭПР и деполяризации флуоресценции. А возможно, дело в малой оптической анизотропии большинства биологических объектов. Во всяком случае, мы, стараясь ориентироваться на ближайшее будущее ЛКС, рассказали о деполяризационном светорассеянии не так подробно, как о других, даже менее разработанных методах.

К кругу рассматриваемых нами проблем тесно примыкает спектроскопия флуктуаций интенсивности флуоресценции. Однако за

десятилетие своего существования этот метод так и не получил широкого распространения, скорее всего из-за недостаточной яркости флуоресцентных центров, приводящей к малости соотношения сигнал / дробовой шум. Мы ограничились лишь поверхностным описанием этого метода, тем более что он не связан с квазиупругим рассеянием света.

Еще одно замечание касается теоретических выкладок в книге. Поскольку нам пришлось обсуждать весьма разнородные физические проблемы, характер изложения сильно варьирует. Если в ключевых для ЛКС вопросах (теории квазиупругого светорассеяния, статистических свойств регистрируемого излучения, анализе случайных сигналов) мы подробно обсуждали даже элементарные детали, то, например, описание динамического поведения макромолекул в растворе в значительной мере формализовано. Во всех случаях мы старались придерживаться того минимального уровня математической строгости, при котором исключается возможность неверной трактовки вопроса. И только вполне очевидные, на наш взгляд, следствия используемых ссылок и рассуждений сформулированы иногда без привлечения строгих доказательств. Тем не менее слова «ясно», «очевидно», «легко показать» и т. д. означают то, что действительно ясно, очевидно, легко показать и т. д. авторам.

1. Александров Е. Б., Козлов В. П., Кулясов В. Н. Спектр шумов спонтанного излучения // Журн. эксперим. и теорет. физики — 1974.— 66, вып. 4.— С. 1269—1282.
2. Александров Е. Б., Запасский В. С. Миллисекундная чувствительность поляриметрических измерений // Оптика и спектроскопия.— 1976.— 41, № 5.— С. 855—858.
3. Александров Е. Б., Голубев Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. Спектроскопия флуктуаций шумов интенсивности электромагнитных полей с негауссовой статистикой излучения // Успехи физ. наук.— 1983.— 140, вып. 4.— С. 547—582.
4. Балабонов С. М., Иванова М. А., Клейнин С. И. и др. Изучение динамики линейных макромолекул методом квазиупругого светорассеяния // Биофизика.— 1987.
5. Бендат Дж., Пирсол А. Применение корреляционного спектрального анализа.— М.: Мир, 1983.— 312 с.
6. Берлинер Л., Нордио П. Л., Фрид Дж. и др. Метод спиновых меток: Теория и применение.— М.: Мир, 1979.— 639 с.
7. Борн М., Вольф Э. Основы оптики.— М.: Наука, 1970.— 855 с.
8. Брагинская Т. Г., Клюбин В. В., Носкин В. А., Рейнов Н. М. Исследование спектров оптического смешения при частичном гетеродинамировании света // Журн. теорет. физики.— 1980.— 50, № 4.— С. 785—791.
9. Варшалович Д. А., Москалев А. Н., Херсонский В. К. Квантовая теория углового момента.— Л.: Наука, 1975.— 439 с.
10. Власов А. А. Статистические функции распределения.— М.: Наука, 1966.— 356 с.
11. Воган Дж. М. Корреляционный анализ и интерферометрия в лазерной спектроскопии рассеяния // Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов / Под ред. Г. Камминса, Э. Пайка.— М.: Мир, 1978.— С. 432—458.
12. Вольф Э., Мандель Л. Когерентные свойства оптических полей // Успехи физ. наук.— 1965.— 87, вып. 3.— С. 491—520; 1966.— 88, вып. 2.— С. 347—366; вып. 4.— С. 619—673.
13. Глаубер Р. Оптическая когерентность и статистика фотонов // Квантовая оптика и квантовая радиофизика.— М.: Мир, 1966.— С. 91—279.
14. Горбачук И. Т., Духин С. С., Дущенко В. П. Новый метод и прибор для микропического электрофореза // Физика твердого тела.— Киев: Киев. пед. ин-т, 1972.— С. 124—129.
15. Горелик Г. С. Колебания и волны. Введение в акустику, радиофизику и оптику.— М.: Физматгиз, 1959.— 572 с.
16. Добычин П. Д., Кириллов С. В., Носкин В. А., Пешин Н. Н. Корреляция между конформационным изменением, наблюдаемым методом спектроскопии оптического смешения, и биологической активностью 30 S-субчастиц рибосом *Echerichia coli* // Молекуляр. биология.— 1982.— 16, вып. 3.— С. 535—540.
17. Добычин П. Д., Ломакин А. В., Мевх Н. Г. и др. Исследование полидисперсных растворов актина методами квазиупругого светорассеяния // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 1.— С. 23—29.
18. Дубнищев Ю. Н., Ринкевичус Б. С. Методы лазерной доплеровской анемометрии.— М.: Наука, 1982.— 304 с.
19. Духин С. С., Дерягин Б. В. Электрофорез.— М.: Наука, 1976.— 328 с.

20. Дьяконов А. М., Капшин Ю. С., Клубин В. В. и др. Оптический спектрометр высокого разрешения с отдельным гетеродином // Письма в Журн. эксперим. и теорет. физики.— 1977.— 3, № 19.— С. 1003—1006.
21. Ериш Н. Г., Муратов Л. С., Новожилов С. Ю. и др. Кинетика иммунологической реакции агглютинации и экспрессное определение бактерий с помощью автоматизированного лазерного фотон-корреляционного спектрометра // Докл. АН СССР.— 1986.— 287, № 5.— С. 1239—1244.
22. Ефимов С. К., Мерзояков Н. С. Виброзащитный голографический стол // Приборы и техника экспериментов.— 1972.— № 6.— С. 181—182.
23. Жданов В. М., Гайдамович С. Я. Вирусные гепатиты // Общая и частная вирусология. — М.: Медицина, 1982.— Т. 2.— С. 488—515.
24. Жен П.-Ж. Идеи скэйлинга в физике полимеров.— М.: Мир, 1982.— 368 с.
25. Жовинский В. Н., Арховский В. Ф. Корреляционные устройства.— М.: Энергия, 1974.— 248 с.
26. Иванов В. К., Васин В. В., Танана В. П. Теория линейных некорректных задач и ее приложения.— М.: Наука, 1978.— 205 с.
27. Иванова М. А., Ломакин А. В., Носкин В. А. Изучение динамики клубка ДНК методом оптического смещения // Молекуляр. биология.— 1983.— 13, № 3.— С. 653—666.
28. Иванова М. А. Оптимальные методы анализа спектра квазиупругого рассеянного света и их применение для изучения полимеров в растворе: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Л., 1985.— 35 с.
29. Исков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя.— М.: Наука, 1981.— 296 с.
30. Исихара А. Статистическая физика.— М.: Мир, 1973.— 471 с.
31. Качмарек Ф. Введение в физику лазеров.— М.: Мир, 1981.— 540 с.
32. Климов А. Н., Шмелев Г. Е., Носкин В. А. и др. Измерение распределения по размерам липопротеидов плазмы крови человека // Биофизика.— 1982.— 27, № 3.— С. 458.
33. Клубин В. В. Экспериментальные исследования диффузии заряженных сферических частиц методом оптического смещения: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Л., 1980.— 18 с.
34. Клубин В. В., Чечик О. С., Сахарова Н. А., Иванова М. А. Образование и рост частиц в процессе эмульсионной полимеризации при изучении латекса СКС-С.— Каучук и резина.— 1984.— № 1.— С. 18—21.
35. Кросиньяни Б., Ди Порто П., Бертолотти М. Статистические свойства рассеянного света.— М.: Наука, 1980.— 206 с.
36. Лазовский В. Т., Шмелев Г. Е., Носкин В. А. и др. Размеры плазменных липопротеидов по данным трех независимых методов // Биофизика.— 1987 — 32, № 2, — С. 285—291.
37. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. Т. 2. Теория поля.— М.: Наука, 1967.— 460 с.
38. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. Т. 5. Статистическая физика.— М.: Наука, 1976.— 584 с.
39. Лебедев А. Д., Ломакин А. В., Носкин В. А., Шаронов Б. П. Регистрация негауссовой составляющей спектра флуктуаций интенсивности рассеянного света методом взаимной корреляции // Оптика и спектроскопия.— 1982.— 52, № 2.— С. 195—197.
40. Лебедев А. Д., Ломакин А. В., Носкин В. А. и др. Применение лазерной корреляционной спектроскопии для изучения ЭФ биологических объектов в растворах // Инструментальные методы в физиологии и биофизике.— Л.: Наука, 1987.— С. 90—95.
41. Лебедев А. Д., Чернявский В. А., Шаронов Б. П. Изучение фракционно-дисперсного состава везикул из суммарных липидов *E. coli* при различных условиях инкубации методом спектроскопии оптического смещения // Биол. мембраны.— 1985.— 2, № 4.— С. 376—382.
42. Левчук Ю. Н., Воловик Э. Н. Размеры лецитиновых липосом, образующихся при воздействии ультразвука // Биофизика.— 1983.— 28, вып. 3.— С. 266—269.
43. Ломакин А. В., Носкин В. А. Эффекты негауссовости в спектроскопии оптического смещения.— Л., 1979.— 33 с.— (Препринт / АН СССР. Ленингр. ин-т ядер. физики; № 509).

44. Ломакин А. В., Носкин В. А. Эффекты негауссовости в спектроскопии оптического смещения // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по флуктуационным явлениям в физических системах.— Вильнюс, 1979.— С. 35.
45. Ломакин А. В., Носкин В. А., Розенберг О. А., Шмелев Г. Е. Термодинамическая неравновесность везикул, содержащих холестерин // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 2.— С. 249—257.
46. Носкин В. А. Изучение макромолекул и надмолекулярных структур методами квазиупругого светорассеяния : Автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук.— Л., 1983.— 38 с.
47. Носкин В. А., Шмелев Г. Е., Ломакин А. В. и др. Конформационные изменения липопротеинов высокой плотности в процессе насыщения холестерином // Биополимеры и клетка.— 1987.— 2, № 6.— С. 293—301.
48. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов / Под ред. Г. Камминса, Э. Пайка.— М. : Мир, 1978.— 584 с.
49. Тихонов А. Н., Арсенин В. Я. Методы решения некорректных задач.— М. : Наука, 1974.— 222 с.
50. Троицкий Г. В. Электрохимические основы анализа белков // Электрофоретические методы анализа белков.— Новосибирск, 1981.— С. 5—23.
51. Флори П. Статистическая механика ценных молекул.— М. : Мир, 1971.— 440 с.
52. Форрестер А. Фотодетектирование и фотосмещение сигналов лазеров // Лазеры.— М. : Изд-во иностр. лит., 1963.— С. 289—293.
53. Худсон Д. Статистика для физиков.— М. : Мир, 1967.— 244 с.
54. Цветков В. А., Эскин В. Е., Френкель С. И. Структура макромолекул в растворе.— М. : Наука, 1964.— 719 с.
55. Чечик О. С., Клубин В. В., Сахарова Н. А., Иванова М. А. Образование и рост частиц в процессе эмульсионной полимеризации при получении латекса СКС-С // Каучук и резина.— 1984.— № 1.— С. 18—21.
56. Шустов В. А., Ксенжек О. С. и др. Организация электродных процессов в системах электрофоретического разделения // Молекуляр. биология.— 1984.— Вып. 36.— С. 60—67.
57. Харрик Н. Спектроскопия внутреннего отражения.— М. : Мир, 1970.— 335 с.
58. Ван де Хюлт. Рассеяние света малыми частицами.— М. : Изд-во иностр. лит., 1961.— 536 с.
59. Эскин В. Е. Рассеяние света растворами полимеров.— М. : Наука, 1973.— 350 с.
60. Adams M., Delsanti M. Dynamical properties of polymer solutions in good solvent by rayleigh scattering experiments // Macromolecules.— 1977.— 10, N 6.— P. 1229—1236.
61. Adler J. Chemotaxis in bacteria // Science.— 1966.— 153, N 3737.— P. 708—716.
62. Adler J., Dahl M. M. A method for measuring the motility of bacteria // J. Gen. Microbiol.— 1967.— 46, N 2.— P. 161—173.
63. Adler J., Templeton B. The effect of environmental conditions on the motility of E. coli // Ibid.— P. 175—184.
64. Akcasu A. Z. Temperature and concentration dependence of diffusion coefficient in dilute solutions // Polymers.— 1981.— 22, N 9.— P. 1169—1180.
65. Altenberger A. R., Deutch J. M. Light scattering from dilute macromolecular solutions // J. Chem. Phys.— 1973.— 59, N 2.— P. 894—898.
66. Amis E. J., Jannrey P. A., Ferry J. D., Yu H. Quasi-elastic light scattering of gelatin solutions and gels // Macromolecules.— 1983.— 16, N 3.— P. 441—446.
67. Arrio B., Johannin G., Carrette A. et al. Electrokinetic and hydrodynamic properties of sarcoplasm reticulum vesicles — by LDE and QELS // Arch. Biochem.— 1984.— 228, N 1.— P. 220—229.
68. Ascoli C., Frediani C. The application of laser light scattering to the study of photoresponses of unicellular motile algae // Application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York : Plenum Press, 1983.— P. 667—673.
69. Belford G. C., Belford R. C., Weber G. Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1972.— 69, N 6.— P. 1392—1393.
70. Bennet A. J., Uzgiris E. E. Laser doppler spectroscopy in an oscillating electric field // Phys. Rev.— 1973.— A8, N 5.— P. 2662—2669.
71. Berg H. C., Brown D. A. Chemotaxis in E. coli analysed by threedimensional tracking // Nature.— 1972.— 239, N 5374.— P. 500—504.

72. *Berg H. C., Purcell E. M.* Physics of chemoreception // *Biophys. J.*— 1977.— 20, N 2.— P. 193—220.
73. *Berne B. I., Pecora R.* Dynamic light scattering.— New York : Willey and Son. inc., 1976.— 376 p.
74. *Bier M.* Electrophoresis.— London : Acad. Press, 1959.— Vol. 1.— 608 p.
75. *Bier M.* Electrophoresis.— New York : Acad. Press, 1967.— Vol. 2.— 672 p.
76. *Bogdanov A. A., Zimmerman R. A., Wang C. C., Ford N. C.* Conformational changes in 16S ribosomal RNA induced by 30S ribosomal subunit proteins from *E. coli* // *Science*.— 1978.— 202, N 4371.— P. 999—1001.
77. *Boon J. P.* Motility of living cells and micro-organisms // *Application of laser light scattering to the study of biological motion*.— New York : Plenum Press, 1983.— P. 561—696.
78. *Bouze P. J., Butterworth J., Drain L. F. et al.* Study of spatial structure of turbulent flow by intensity-fluctuation spectroscopy // *J. Phys. A : Gen. Phys.*— 1970.— 3, N 2.— P. 216—229.
79. *Braginskaya T. G., Dobichin P. D., Ivanova M. A. et al.* Analysis of the polydispersity by photon correlation spectroscopy // *Phys. scr.*— 1983.— 26, N 3.— P. 309—315.
80. *Bundzel A. M., Miller I. F.* Liposome filtration. Dependence of translation temperature // *BBA*.— 1980.— 596, N 1.— P. 129—136.
81. *Burchard W., Schmidt M., Stockmayer W. H.* Information on polydispersity and branching from combined quasi-elastic and integrated scattering // *Macromolecules*.— 1980.— 13, N 5.— P. 1265—1272.
82. *Camerini-Otero R. D., Pusey P. N., Koppel D. E. et al.* Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses, R17, Q beta, BSV, PM2 and T7. II Diffusion coefficients, molecular weights, solvation and particle dimensions // *Biochemistry*.— 1974.— 13, N 5.— P. 960—970.
83. *Carlson F. D., Fraser A. B.* Intensity fluctuation autocorrelation studies of the dynamics of muscular contraction // *Photon correlation and light beating spectroscopy* / Eds H. Z. Cummins, E. R. Pike.— New York : Plenum Press, 1974.— P. 519—532.
84. *Carlson F. D., Fraser A. B.* Dynamics of F-actin and F-actin complexes // *J. Mol. Biol.*— 1974.— 89, N 2.— P. 273—281.
85. *Carlson F. D.* The application of quasi-elastic light scattering to the study of muscular contraction // *Application of laser light scattering to the study of biological motion*.— New York : Plenum Press, 1983.— P. 405—458.
86. *Chen F. C., Yen A., Chu B.* Diffusion coefficient of histone (lysine rich) by quasi-elastic laser scattering // *J. Chem. Phys.*— 1976.— 65, N 11.— P. 4508—4511.
87. *Chen F. C., Yen A., Chu B.* Dynamics of calf-thymus DNA by single-clipped photon correlation // *Ibid.*— 1977.— 66, N 3.— P. 1290—1305.
88. *Chen S. H., Veldcamp W. B., Lai C. C.* Simple digital clipped correlator for photon correlation spectroscopy // *Rev. sci. Instrum.*— 1975.— 46, N 10.— P. 1356—1369.
89. *Chen S. H., Hallet F. R.* Determination of motile behavior of prokaryotic and eukaryotic cell by quasi-elastic light scattering // *Quart. Revs. Biophys.*— 1982.— 15, N 1.— P. 131—222.
90. *Chu B.* Laser light scattering.— New York : Acad. Press, 1974.— 317 p.
91. *Chu B.* Dynamics of macromolecular solutions // *Phys. scr.*— 1979.— 19, N 4.— P. 458—470.
92. *Chu B., Gulari E.* Polymer diffusion in a dilute solution. 2. Poly (bic(*m*-chlorophenoxy)-phosphazene) in chloroform // *Macromolecules*.— 1979.— 12, N 3.— P. 445—450.
93. *Chu B.* Correlation function profile analysis in laser light scattering // *The Application of laser light scattering to the study of biological motion*.— New York : Plenum Press, 1983.— P. 53—76.
94. *Clomset J. A.* Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase // *Blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition, and metabolism* / Ed. G. J. Nelson.— New York : Wiley—Interscience, 1972.— P. 745—788.
95. *Cohen R. J., Benedek G. B.* Immunoassay by light scattering spectroscopy // *Immunochimistry*.— 1975.— 12, N 4.— P. 349—351.

96. Corti M., Degiorgio V. Quasielastic light scattering study of intermicellar interactions in aqueous sodium dodecyl sulfate solutions // J. Phys. Chem.— 1981.— 85, N 6.— P. 711—717.
97. Craig T., Hallett F. R., Nickel B. Motility analysis of circularly swimming bull sperm by QELS and cinematography // Biophys. J.— 1982.— 38, N 1.— P. 63—70.
- 97a. Graig T., Hallett F. R. Half-width scaling of electrical field autocorrelation function of light scattered from bull spermatozoa // Biophys. J.— 1982.— 38, N 1, p. 71—78.
98. Craig T., Racey T. J., Hallett F. R. A comparison of models in the analysis of quasi-elastic light scattering from two systems: spermatozoa and *C. reinhardtii* // Application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York: Plenum Press, 1983.— P. 631—636.
99. Cummins H. Z., Knable N., Yeh Y. Observation of diffusion broadening Rayleigh scattering light // Phys. Rev. Lett.— 1964.— 12, N 6.— P. 150—153.
100. Cummins H. Z., Carlson F. D., Herbert T. J., Wood S. G. Translational and rotational diffusion constants of tobacco mosaic virus from Rayleigh linewidths // Biophys. J.— 1969.— 9, N 4.— P. 518—546.
101. Cummins H. Z. Analysis of diffusion of biological materials by quasi-elastic light scattering // Application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York: Plenum Press, 1983.— P. 171—208.
102. Driford M., Menez R., Tivant P. et al. Diffusion quasielastique de la lumiere sous champ electrique: mobilite electrophoretique et charge apparente des macromolecules // Rev. phys. appl.— 1981.— 16, N 2.— P. 19—33.
103. Dubin S. B., Lunacek J. H., Benedek G. B. Observation of the spectrum of light scattering by solutions of biological macromolecules // Proc. Nat. Acad. Sci.— 1967.— 57, N 5.— P. 1164—1172.
104. Dubin S. B., Feher G., Benedek G. B. Study of the chemical denaturation of lysozyme by optical mixing spectroscopy // Biochemistry.— 1973.— 12, N 4.— P. 714—720.
105. Ehrenberg M., Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules // Quart. Revs Biophys.— 1976.— 9, N 1.— P. 69—81.
106. Engelmann T. W. Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen // Pflügers Arch. Ges. Physiol.— 1881.— 25.— S. 285—292.
107. Federhof B. U., Jones R. B. Diffusion in hard sphere suspension // Physica A.— 1983.— 122.— P. 89—104.
108. Fixman M. Translation diffusion of chain polymers. I. Improved variational bounds // J. Chem. Phys.— 1986.— 84, N 7.— P. 4080—4084.
109. Forrester A. T., Gudmundsen R. A., Johnson P. O. Photoelectric mixing of incoherent light // Phys. Rev.— 1955.— 99, N 6.— P. 1691—1700.
110. Forrester A. T. Photoelectric mixing as a spectroscopic tool // J. Opt. Soc. Amer.— 1961.— 51, N 3.— P. 253—259.
111. Fraser A. B., Eisenberg E., Kielley W. W., Carlson F. D. The interaction of heavy meromyosin and subfragment 1 with actin. Physical measurement in the presence and absence of adenosine triphosphate // Biochemistry.— 1975.— 14, N 10.— P. 2207—2214.
112. Fujime S. Quasi-elastic light scattering from solutions of macromolecules. II. Doppler broadening of light scattered from solutions of semi-flexible polymers, F-actin // J. Phys. Soc.— 1970.— 29, N 3.— P. 751—759.
113. Fytas G., Meier G., Ratkowsky A., Dorfmueller Th. Effect of pressure and temperature on the dynamic of bulk polyethylacrylate and polyethylmethacrylate polymers studied by photon correlation spectroscopy // Colloid and Polym. Sci.— 1982.— 260, N 10.— P. 949—955.
114. Gattuta K. J. la, Sharma V. S., Nicoli D. F., Kothari B. K. Diffusion coefficients of hemoglobin by intensity fluctuation spectroscopy. Effect of varying pH and ionic strength // Biophys. J.— 1981.— 33, N 1.— P. 63—79.
115. Goll J., Carlson F. D. Photon correlation spectroscopy of the size distribution of phospholipid vesicles // Ibid.— 1982.— 38, N 1.— P. 7—13.
116. Griffin W. G., Pusey R. N. Anticorrelations in light scattered by nonspherical particles // Phys. Rev. Lett.— 1979.— 43, N 15.— P. 1100—1104.

117. *Griffin M. C. A., Anderson M.* Laser light scattering study of casein micelles in skin milk by controlled pore glass chromatography // The application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York : Plenum Press, 1983.— P. 347—352.
118. *Gulari E., Gulari E., Tsunashima Y., Chu B.* Photon correlation spectroscopy of particles distributions // J. Chem. Phys.— 1979.— 70, N 8.— P. 3965—3972.
119. *Gulari E., Gulari E., Tsunashima Y., Chu B.* Polymer diffusion in a dilute theta solution. I. Polystyrene in cyclohexane // Polymer.— 1979.— 20, March.— P. 347—355.
120. *Haas D. D., Ware B. R.* Design and construction of a new electrophoretic light scattering chamber and applications to solutions of hemoglobin // Anal. Biochem.— 1976.— 74, N 1.— P. 75—88.
121. *Haas D. D., Ware B. R.* Electrophoretic mobilities and diffusion coefficients of hemoglobin at high pH // Biochemistry.— 1978.— 17, N 23.— P. 4946—4950.
122. *Hallett F. R.* Motility studies of large cells // Scattering technique application to supramolecular and nonequilibrium systems. Proc. NATO adv. study Inst., Wellesley, Mass., 3—12 Aug. 1980.— New York; London, 1981.— P. 657—669.
123. *Hallet F. R.* Laser light scattering studies of spermatozoa and Chlamydomonas // Biomedical applications of laser light scattering / Ed. D. B. Sattelle.— Elsevier; New Holland, 1982.— P. 112—116.
124. *Han C. C., Akcasu A. Z.* Dynamic light scattering of dilute polymer solutions in the nonasymptotic region. // Macromolecules.— 1981.— 14, N 4.— P. 1080—1084.
125. *Hantz E., Cao A., Taillandier E. et al.* Conformational change of core particles studied by quasi-elastic light scattering // Biochimie.— 1981.— 63, N 11/12.— P. 891—894.
126. *Hantz E., Cao A., Taillandier E. et al.* Quasi-elastic light scattering study of salt induced conformational transitions of chromatin subunit // Int. J. Biol. Macromol.— 1983.— 5, N 3.— P. 130—134.
127. *Harvey J. D.* Diffusion coefficients and hydrodynamic radii of three spherical RNA viruses by laser light scattering // Virology.— 1973.— 56, N 1.— P. 365—368.
128. *Harvey J. D., Farrell J. A., Bellamy A. R.* Biophysical studies of reovirus type 3. II Properties of the hydrated particle // Ibid.— 1974.— 62, N 1.— P. 154—160.
129. *Harvey J. D., Woolford M. W.* Laser light scattering studies of bull spermatozoa. I. Orientational effects // Biophys. J.— 1980.— 31, N 1.— P. 147—156.
130. *Henry D. C.* The cataphoresis of suspended particles. I. The equation of cataphoresis // Proc. Roy. Soc. A.— 1931.— 133, N 821.— P. 106—129.
131. *Henry D. C.* The electrophoresis of suspended particles. IV. The surface conductivity effect // Trans. Faraday Soc.— 1948.— 44, N 312, P. 1021—1026.
132. *Herbert T. J., Carlson F. D.* Spectroscopic study of the self-association of myosin // Biopolymers.— 1971.— 10, N 11.— P. 2231—2252.
133. *Holler E., Wang Chun-Chen, Ford N. C. Jr.* Detection of ligand-induced conformational changes in phenylalanyl-tRNA synthetase of Escherichia coli K10 by laser light scattering // Biochemistry.— 1981.— 20, N 4.— P. 861—867.
134. *Holt C., Parker T. G., Dalgleish D. G.* Measurement of particle size by elastic and quasi-elastic light scattering // BBA.— 1975.— 400, N 2.— P. 283—292.
135. *Holz M., Chen S.-H.* Structural effects in quasi-elastic light scattering from motile bacteria of E. coli // Appl. Opt.— 1978.— 12, N 17.— P. 1930—1937.
136. *Hope M. J., Walker D. C., Cullis P. R.* Ca²⁺ and pH-induced fusion of small unilamellar vesicles: a freeze fracture study // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1983.— 110, N 1.— P. 15—22.
137. *Horn D. S., Dalgleish D. G.* A photon correlation spectroscopy study of size distributions of casein micell suspensions // Eur. Biophys. J.— 1985.— 11, N 4.— P. 249—258.
138. *Huang W. N., Frederick J. E.* Rayleigh line spectrometry of very large macromolecules in dilute solution // J. Chem. Phys.— 1973.— 58, N 9.— P. 4022—4023.
139. *Huang W. N., Frederick J. E.* Determination of intramolecular motion in a random-coil polymer by means of quasielastic light scattering // Macromolecules.— 1974.— 1, N 7.— P. 34—39.

140. *Hunbury-Brown R., Twiss R. Q.* Correlation between photons in two coherent beams of light // *Nature*.— 1956.— 177, N 4497.— P. 27—29.
141. *Hwang J. S., Cummins H. Z.* Dynamic light scattering of collagen // *J. Chem. Phys.*— 1982.— 77, N 2.— P. 616—627.
142. *Israelachvili J. N., Mitchell J., Hinham B. W.* Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles // *BBA*.— 1977.— 470, N 2.— P. 185—201.
143. *Jolly D., Eisenberg H.* Photon correlation spectroscopy, total intensity light scattering with laser radiation and hydrodynamics studies of a well fractionated DNA sample // *Biopolymers*.— 1976.— 15, N 1.— P. 61—95.
144. *Jonannet P., Volochin B., Degwent P., Duvid O.* Study of human spermatozoa motility parameters by scattered light // *Progr. Reprod. Biol.*— 1976.— 1, N 1.— P. 28—35.
145. *Kahlon T. S., Adamson T. L., Chen M. S., Lindgren S. T.* Sedimentation equilibrium of human low-density lipoprotein subfractions // *Lipids*.— 1982.— 17, N 5.— P. 323.
146. *Kam Z.* Determination of macromolecular structures in solution by spatial correlation of scattering fluctuations // *Macromolecules*.— 1977.— 10, N 5.— P. 927—934.
147. *Kam Z., Borochoy N., Eisenberg H.* Dependence of laser scattering of DNA on NaCl concentration // *Biopolymers*.— 1981.— 20, N 12.— P. 2671—2690.
148. *Kam Z., Rigler R.* Cross-correlation laser scattering // *Biophys. J.*— 1982.— 39, N 1.— P. 7—13.
149. *Kaplan J. H., Uzgiris E. E.* Comment on the use of laser doppler techniques in cell electrophoresis: Reply to Pretlow and Pretlow's review // *Int. Rev. Cytol.*— 1981.— 71, N 3.— P. 365—372.
150. *Keller E. F., Segal L. A.* Travelling bands of chemotactic bacteria: a theoretical analysis // *J. Theor. Biol.*— 1971.— 30, N 2.— P. 235—248.
151. *King T. A., Knox A., McAdam D. G.* Translational and rotational diffusion of Tobacco mosaic virus from polarized and depolarized light scattering // *Biopolymers*.— 1973.— 12, N 8.— P. 1917—1926.
152. *Koppel D. E.* Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants // *J. Chem. Phys.*— 1972.— 57, N 11.— P. 4814—4820.
153. *Koppel D. E.* Study of *Escherichia coli* ribosomes by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light // *Biochemistry*.— 1974.— 13, N 13.— P. 2712—2719.
154. *Kops-Werhho ven M. M., Fijnant H. M.* Dynamic behaviour of silica dispersions studies near the optical matching point // *J. Chem. Phys.*— 1982.— 77, N 5.— P. 2242—2253.
155. *Lastovka J. B., Benedek G. B.* Spectrum of light scattered quasi-elastically from a normal liquid // *Phys. Rev. Lett.*— 1966.— 17, N 20.— P. 1039—1043.
156. *Lee K. S., Mandelkern M., Crother D. M.* Solution structure of chromatin fibers // *Biochemistry*.— 1981.— 20, N 6.— P. 1438—1445.
157. *Lin S. H. C., Dewan R. K., Bloomfield V. A., Morr C. V.* Inelastic light scattering study of the size distribution of bovine milk casein micelles // *Ibid.*— 1971.— 10, N 25.— P. 4788—4793.
158. *Lin S. H. C., Leong S. L., Dewan R. K. et al.* Effect of calcium ion on the structure of native bovine casein // *Ibid.*— 1972.— 11, N 10.— P. 1818—1821.
159. *Lin S. H. C., Lee W. I., Schurr J. M.* Brownian motion of highly charged poly(L-lysine). Effects of salt and polyanion concentration // *Biopolymers*.— 1978.— 17, N 4.— P. 1041—1064.
160. *Lin Y.-H., Chu B.* Static and dynamical properties of polystyrene in carbon tetrachloride. 1. Characteristic frequency in the dilute, intermediate and semidilute regions // *Macromolecules*.— 1981.— 14, N 2.— P. 385—392.
161. *Luner S. J., Szklarek D., Knox R. J. et al.* Red cell charge is not a function of cell age // *Nature*.— 1977.— 269, N 5690.— P. 719—721.
162. *Lodge T. P., Han C. C., Akcasu A. Z.* Temperature dependence of dynamic light scattering in the intermediate momentum transfer region. // *Macromolecules*.— 1983.— 16, N 7.— P. 1180—1183.
163. *Lomakin A. V., Noskin V. A.* Dynamic light scattering in a flow — a new method of particle anisotropy investigation // *Biopolymers*.— 1980.— 19, N 2.— P. 231—240.

164. Maeda K., Imae Y., Scai J.-I., Oosawa F. Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1976.—127.—P. 1039—1046.
165. Maeda K., Imae Y. Thermosensory transduction in *E. coli*: Inhibition of the t° -response by L-serine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 1.—P. 91—95.
166. Magde D. Concentration correlation analysis and chemical kinetics // Molecular biology, biochemistry and biophysics.—Heidelberg: Springer, 1977.—Vol. 24.—P. 43—83.
167. Maguire J. F. Rotational dynamics of rigid rods. A dynamic light scattering study // Soc. Faraday Trans.—1981.—77, N 3.—P. 513—518.
168. Martin J. A. Polymer self-diffusion: Dynamic light scattering studies of isorefractive ternary solutions // Macromolecules.—1984.—17, N 6.—P. 1279—1283.
169. Maser N. A., Schurtenberger P., Carey M. C. et al. Quasi-elastic light scattering studies of native hepatic bile from the dog: comparison with aggregative behavior of model biliary lipid systems // Biochemistry.—1984.—23, N 9.—P. 1994—2005.
170. Matsumoto G., Shimizu H., Shimada J., Wada A. Depolarized laser light scattered by motile spermatozoa // Opt. Commun.—1977.—22, N 3.—P. 369—373.
171. Morii M., Ishimura N., Takeguchi N. Quasi-elastic light scattering studies of conformational states of the H, K-ATPase. Intervesicular aggregation of gastric vesicles by disulfide cross-linking // Biochemistry.—1984.—23, N 26.—P. 6816—6822.
172. Morris S. J., Shultens H. A., Hellweg M. A. et al. Dynamic of structural changes in biological particles from rapid light scattering measurements // Appl. Opt.—1979.—18, N 3.—P. 303—311.
173. Napoli A. di, Chu B., Cha Ch. Molecular weight distribution of polyacrylamide by photon correlation spectroscopy // Macromolecules.—1982.—15, N 4.—P. 1174—1180.
174. Nemoto N., Tsunashima J., Kurata M. Dynamic light scattering instrument with time interval digitizer // Polym. J.—1981.—13, N 9.—P. 827—836.
175. Nemoto N., Makita Y., Tsunashima Y., Kurata M. Dynamic light scattering studies of polymer solutions. 3. Translation diffusion and internal motion of high molecular weight polystyrenes in benzene at infinite dilution // Macromolecules.—1983.—7, N 3.—P. 425—430.
176. Newman J., Swinney H. L., Berkowith S. A., Day L. A. Hydrodynamic properties and molecular weight of fd bacteriophage DNA // Biochemistry.—1974.—13, N 23.—P. 4832—4838.
177. Nicoli D. F., Benedek G. B. Study of thermal denaturation of lysozyme and other globular proteins by light-scattering spectroscopy // Biopolymers.—1976.—15, N 12, p. 2421—2437.
178. Nir S., Bents J., Wilschut J., Duzgunes N. Aggregation and fusion of phospholipid vesicles // Progr. Surface Sci.—1983.—3, N 1.—P. 1—24.
179. Oliver C. J., Pike E. R., Cleave A. J., Peacocke A. R. Determination of the diffusion coefficient and molecular weight of Tamm-Horsfall glycoprotein by intensity fluctuation spectroscopy // Biopolymers.—1971.—10, N 9.—P. 1731—1733.
180. Ostrowsky N., Sornette D., Parker R., Pike E. R. Stability and fusion of vesicles // Opt. acta.—1981.—28, N 8.—P. 1059—1069.
181. Ottinger H. C. Consistently averaged hydrodynamic interaction for Rouse dumbbells. The rheological equation of state // J. Chem. Phys.—1986.—85, N 3.—P. 1669—1671.
182. Ozdemir E., Richards R. W. Low-angle laser light scattering from polystyrene solutions: intensity measurement and photon correlation spectroscopy // Polymer.—1983.—24, N 9.—P. 1097—1102.
183. Parthasarathy N., Schmitz K. S. Dependence of the internal relaxation time for DNA on salt type as inferred by quasielastic light scattering // Biopolymers.—1980.—19, N 9.—P. 1655—1666.
184. Patkowski A., Jen S., Chu B. Intensity fluctuation spectroscopy and t-RNA conformation. II. Change of size and shape of t-RNA in melting process // Ibid.—1978, 17, N 11.—P. 2643—2662.
185. Pecora R. Spectrum of light scattering from optically anisotropic macromolecules // J. Chem. Phys.—1968.—49, N 3.—P. 1036—1040.
186. Pecora R., Berne B. I. Dynamic light scattering.—New York: Wiley and soc. inc., 1976.—376 p.

187. *Phillips C. D. J.* Contribution of nonhydrodynamic interactions to the concentration dependence of the friction factor of the mutual diffusion coefficient // *J. Chem. Phys.*—1981.—**74**, N 4.—P. 2436—2440.
188. *Pike E. R.* Light scattering in the study of dynamical properties // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. A.*—1979.—**293**, N 1402.—P. 349—358.
189. *Porto di, Crosignani B., Bertolotti M.* Statistical properties of light scattered by particles suspended in a turbulent fluid // *J. Appl. Phys.*—1969.—**40**, N 13.—P. 5083—5087.
190. *Preece A. W., Light P.* Cell electrophoresis in cancer and other clinical research.—Amsterdam; New York; Oxford, 1981.—314 p.
191. *Preece A. W., Luckman N. P.* A laser doppler cytopherometer for measurement of electrophoretic mobility of bioparticles // *Phys. Med. and Biol.*—1981.—**26**, N 1.—P. 11—18.
192. *Pretlow T. G., Pretlow T. P.* Comment on the use of laser doppler techniques as represented by Kaplan and Uzgiris: Reply to Kaplan and Uzgiris // *Int. Rev. Cytol.*—1981.—**71**.—P. 373—380.
193. *Provencher S. W.* An eigenfunction expansion method for the analysis of exponential decay curves // *J. Chem. Phys.*—1976.—**64**, N 7.—P. 2772—2777.
194. *Provencher S. W., Hendrix J., De Mouyer L., Paulussen N.* Direct determination of molecular weight distributions of polystyrene in cyclohexane with photon correlation spectroscopy // *Ibid.*—1978.—**69**, N 9.—P. 4273—4276.
195. *Provencher S. W.* A general purpose constrained regularization method for inverting photon correlation data // *Proceedings of the 5-th International. Conf. Kiel-Damp, FRG, May 23—26 1982.*—Kiel-Damp, 1982.—P. 322—328.
196. *Pusey P. N., Koppel D. E., Schaefer D. W. et al.* Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses R17, Q-beta, BSV, PM2, and T7. I. Light scattering technique // *Biochemistry.*—1974.—**13**, N 5.—P. 952—960.
197. *Pusey P. N.* Intensity fluctuation spectroscopy of charged Brownian particles: the coherent scattering function // *J. Phys. A.: Math. and Gen.*—1978.—**11**, N 1.—P. 119—135.
198. *Pyun C. W., Fixman M.* Frictional coefficient of polymer molecules in solution // *J. Chem. Phys.*—1964.—**41**, N 4.—P. 937—944.
199. *Pyun C. W., Fixman M.* Perturbation theory of the intrinsic viscosity of polymer chains // *Ibid.*—1966.—**44**, N 5.—P. 2107—2114.
200. *Racey T. J., Hallett F. R.* A low angle quasi-elastic light scattering investigation of *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Musc. Res. Cell. Mot.*—1983.—**4**, N 2.—P. 321—331.
201. *Raczek J.* Examples of the determination of molecular weight distributions by dynamic light scattering // *Eur. Polym. J.*—1982.—**18**, N 10.—P. 863—873.
202. *Ramsay-Shaw B., Schmitz K. S.* Quasielastic light scattering by biopolymers conformation of chromatin multimers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1976.—**73**, N 2.—P. 224—232.
203. *Rhee K. W., Ware B. R.* DNA-divalent metal cation interaction measuring by electrophoretic light scattering // *J. Chem. Phys.*—1983.—**78**, N 6.—P. 3349—3353.
204. *Salmeen I., Rimai L., Liebes L. et al.* Hydrodynamic diameters of RNA tumor viruses. Studies by laser beat frequency light scattering spectroscopy of avian myeloblastosis and Rauscher murine leukemia viruses // *Biochemistry.*—1975.—**14**, N 1.—P. 134—141.
205. *Salmeen I., Rimai L., Luftig R. B. et al.* Hydrodynamic diameters of murine mammary. Rous sarcoma and feline leukemia RNA tumor viruses: studies by laser beat frequency light scattering spectroscopy and electron microscopy // *Virology.*—1976.—**17**, N 3.—P. 584—590.
206. *Sarkar H. K., Moon D. K., Song P. S. et al.* Tertiary structure of phytochrome probed by quasi-elastic light scattering and rotational relaxation time measurements // *Biochemistry.*—1984.—**23**, N 8.—P. 1882—1888.
207. *Schaefer D. W.* Dynamics of number fluctuation: Motile microorganisms // *Science.*—1973.—**180**, N 4092.—P. 1293—1295.
208. *Schaefer D. W., Berne B. J.* Number fluctuation spectroscopy of motile microorganisms // *Biophys. J.*—1975.—**15**, N 8.—P. 785—794.

209. *Schmidt R. J., Saunders O. A.* On the motion of a fluid heated from below.—*Proc. Roy. Soc. London A.*—1938.—**165**, N 921.—P. 216—228.
210. *Schmidt R. L.* Observation of the internal motion in N1 = DNA // *Biopolymers.*—1973.—**12**, N 6.—P. 1427—1430.
211. *Schmitz K. S., Schurr J. M.* Rotational relaxation of macromolecules determined by dynamic light scattering. II. Temperature dependence for DNA // *Ibid.*—1973.—**12**, N 4.—P. 1543—1564.
212. *Schulthess G. K. von, Cohen R. J., Sacato N., Benedek G. B.* Laser light scattering spectroscopic immunoassay for mouse IgA // *Immunochemistry.*—1976.—**13**, N 9.—P. 955—962.
213. *Schumacher B. N.* Hydrodynamic analysis of human low density lipoproteins // *Acc. Chem. Res.*—1973.—**6**, N 12.—P. 398—403.
214. *Schurr J. M., Schmitz K. S.* Rotational relaxation of macromolecules determined by dynamic light scattering. I. Tobacco mosaic virus // *Biopolymers.*—1973.—**12**, N 5.—P. 1021—1045.
215. *Schurr J. M.* Relaxation of rotational and internal modes of macromolecules determined by dynamic scattering (Revue) // *Quart. Revs. Biophys.*—1976.—**9**, N 1.—P. 109—134.
216. *Schurr J. M.* Dynamic light scattering of biopolymers and biocolloids // *Crit. Revs. Biochem.*—1974.—**4**, N 4.—P. 371—431.
217. *Schwenke K. D., Shultz M., Linok K.-T. et al.* Hydrodynamic and light scattering studies of the 12S-globulin // *J. Peptid Protein Res.*—1980.—**16**, N 1.—P. 12—18.
218. *Sherbet G. V.* The biological characterization of the cell surface.—London; New York; San-Francisco: Acad. Press, 1978.—285 p.
219. *Shoesmith J. G.* The measurement of bacterial translation by photon motility // *J. Gen. Microbiol.*—1960.—**22**, N 2.—P. 528—535.
220. *Skulachev V. P.* Membrane electricity as a convertible energy current for the cell // *Can. J. Biochem.*—1980.—**58**.—P. 161—175.
221. *Smith B. A., Ware B. R.* Apparatus and methods for laser doppler electrophoresis // *Contemp. Top. Anal. Clin. Chem.* 1978.—**2**, N 4.—P. 29—54.
222. *Soda K., Wada A.* Dynamic light scattering studies on thermal motions of native DNAs in solution // *Biophys. Chem.*—1984.—**20**, N 3.—P. 185—200.
223. *Spendley D. G., Jones D. P., Smith A. T. et al.* A new laser Doppler electrophoresis system utilising a minicomponent and standard electrophysiological signal processing software // *Cell electrophoresis in cancer and other clinical research* / Eds A. W. Preece, P. A. Light.—Amsterdam; New York; Oxford, 1981.—P. 299—302.
224. *Steiner R., Kaufman R., Hoffmann W.* Technical aspects and new applications of automatic cell electrophoresis // *Ibid.*—P. 281—293.
225. *Steiner R., Ottmann O., Kaufmann R. et al.* Cell electrophoresis automatic measurements by laser light scattering with Lazypher // *Electrophoresis.*—1985.—**6**, N 2.—P. 82—89.
226. *Stock G. B.* The measurement of bacterial translation by photon correlation spectroscopy // *Biophys. J.*—1978.—**22**, N 1.—P. 79—96.
227. *Sun S. T., Nishio I., Swislow G., Tanaka T.* The coil-globule transition: radius of gyration of polystyrene in cyclohexane // *J. Chem. Phys.*—1980.—**73**, N 12.—P. 5971—5975.
228. *Sykes B. D., Scott M. D.* Nuclear magnetic resonance studies of the dynamic aspects of molecular structure and interaction in biological systems // *Ann. Rev. Biophys. and Bioeng.*—1972.—**1**.—P. 27—50.
229. *Tanaka T., Sun S. T., Nishio I., Swislow G.* The coil-globule transition: Radius of gyration of polystyrene in cyclohexane. // *J. Chem. Phys.*—1980.—**73**, N 12.—P. 5971—5976.
230. *Tanford C.* Physical chemistry of macromolecules.—New York: Wiley, 1961.—709 p.
231. *Tchacarof E. L., Toteb T. G., Kilouska M.'S.* Photokinesigraphic characterisation of the translationally mobile bull spermatozoa without helicoidal component // *C. r. Acad. bulg. sci.*—1982.—**35**, N 7.—P. 1013—1016.
232. *Thomas J. C., Allison S. A., Schurr J. M., Holder R. D.* Dynamic light scattering

- studies of internal motion in DNA. II. Clean viral DNAs // *Biopolymers*.— 1980.— 19, N 8.— P. 1451—1475.
233. *Tobacman L. S., Korn E. D.* The kinetics of actin nucleation and polymerization // *J. Biol. Chem.*— 1983.— 258, N 5.— P. 3207—3314.
- 233a. *Tompson N. L., Axelrod D.* Immunoglobulin surface-binding kinetics studied by total internal reflection with fluorescent correlation spectroscopy // *Biophys. J.*— 1983.— 43, N 1.— P. 103—104.
234. *Torre J. G. de la, Bloomfield V. A.* Conformation of miosin in dilute solution as estimated from hydrodynamic properties // *Biochemistry*.— 1980.— 19, N 22.— P. 5118—5123.
235. *Torre J. G. de la, Bloomfield V. A.* Hydrodynamic properties of complex rigid biological macromolecules; theory and applications. // *Quart. Revs. Biophys.*— 1981.— 14, N 1.— P. 81—139.
236. *Trotter C. M., Pinder D. N.* Laser light scattering from concentrated solutions of polystyrene latex spheres: A comparative study // *J. Chem. Phys.*— 1981.— 75, N 1.— P. 118—127.
237. *Tsunashima Y., Nemoto N., Kurata M.* Dynamic light scattering studies of polymer solutions. 1. Histogram analysis of internal motions // *Macromolecules*.— 1983.— 16, N 4.— P. 584—589.
238. *Tsunashima Y., Nemoto N., Kurata M.* Dynamic light scattering studies of polymer solutions. 2. Translational diffusion and intramolecular motions of polystyrene in dilute solutions at the Θ -temperature // *Ibid.*— N 7.— P. 1184—1188.
239. *Tsunashima Y., Nemoto N.* Experimental consistency of the first cumulants estimated by both shape function and histogram analysis in dynamic light scattering // *J. Polym. Sci. : Polym. Lett. Ed.*— 1983.— 21, N 7.— P. 531—537.
240. *Uzgis E. E.* Sensitive optical heterodyne method for light scattering studies // *Rev. Sci. Instrum.*— 1972.— 43, N 9.— P. 1383—1385.
241. *Uzgis E. E.* Probing of immune reactions by laser light scattering spectroscopy // *Meth. in Ensimol.*— 1978.— 74, pt C.— P. 177—197.
242. *Uzgis E. E.* High current-density electrodes suitable for laser doppler electrophoresis // *Rev. Sci. Instrum.*— 1980.— 51, N 7.— P. 1004—1006.
243. *Uzgis E. E.* Laser doppler spectroscopy: Application to cell and particles electrophoresis // *Adv. Colloid. and Interface Sci.*— 1981.— 14, N 2.— P. 75—171.
244. *Uzgis E. E.* Introduction to laser light scattering spectroscopy in electrophoresis // *Molecular electro-optics*.— New York: NATO Adv. Study Instr., 1981.— P. 485—504.
245. *Vilenchik L. Z., Belenkiy B. G., Chubarova E. V. et al.* Studies of distribution of wide-range of sizes and molecular masses of polymers and microparticles by combining IPC and FFF or correlative dispersion of laser beam (CDLB) // *J. Chromatogr.*— 1987.— 3.
246. *Voodouw G., Kam Z., Borochoy N., Eisenberg H.* Isolation and physical studies of the intact supercoiled, the open circular and the linear forms of Col. E-Plasmid DNA // *Biophys. Chem.*— 1978.— 8, N 2.— P. 171—189.
247. *Wada A.* Comment on Rotational relaxation of macromolecules determined by dynamic light scattering // *Biopolymers*.— 1974.— 13, N 1.— P. 237—238.
248. *Wang P. C., Chen S.-H.* Chemotaxis and band formation of *E. coli*. Studies by light scattering // Application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York: Plenum Press, 1983.— P. 609—630.
249. *Ware B. R., Flygare W. H.* The simultaneous measurement of the electrophoretic mobility and diffusion coefficient in bovine serum albumin solutions by light scattering // *Chem. Phys. Lett.*— 1971.— 12, N 1.— P. 81—85.
250. *Ware B. R., Flygare W. H.* Light scattering in mixtures of BSA, BSA dimers and fibrinogen under the influence of electric fields // *J. Colloid and Interface Sci.*— 1972.— 39, N 3.— P. 670—675.
251. *Ware B. R.* Electrophoretic light scattering: modern method and recent application to biological membranes and polyelectrolytes // Application of laser light scattering to the study of biological motion.— New York: Plenum Press, 1983.— P. 89—122.
252. *Webb W.* Application of fluorescence correlation spectroscopy.— *Quart. Revs. Biophys.*— 1976.— 9, N 1.— P. 49—68.

253. Weissman M., Schindler H., Feher G. Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy : Application of DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1976.—73, N 8.— P. 2776—2780.
254. Weissman M. B., Margue J. Small ion friction, hydrodynamic interaction and charge fluctuation effects in solutions of globular macroion // J. Chem. Phys.—1980.— 73, N 8.— P. 3999—4004.
255. Wills P. R. Wavevector dependence of the effective diffusion coefficient for solutions of macromolecules // J. Phys. A: Gen. Phys.—1981.— 14, N 11.— P. 3093—3099.
256. Wilson M. C., Harvey J. D. Twin— beam laser velocimeter for the investigation of spermatozoon motility // Biophys. J.—1983.— 41, N 1.— P. 13—21.
257. Wiltzius P., Hofmann V. Conformational identity of human fibrinogen and monomeric fibrin // Thromb. Res.—1980.— 19, N 16.— P. 783—798.
258. Wiltzius P., Kaenrig W., Hofmann V., Straub P. W. Early stages of fibrinogen to fibrin conversion studies by static and dynamic light scattering // Biopolymers.—1981.— 20, N 10.— P. 2035—2049.
259. Wiltzius P., Diether G., Kaenrig W. et al. Fibrin polymerization studies by static and dynamic light scattering as a function of fibrinopeptide A release // Ibid.—1982.— 21, N 11.— P. 2205—2223.
260. Wiltzius P., Haller H. R., Cannell D. C., Schaefer D. W. Universality for static properties of polystyrenes in good and marginal solvents // Phys. Rev. Lett.—1983.— 51, N 13.— P. 1183—1186.
261. Wyatt P. J. Differential light scattering techniques for microbiology // Meth. in Microbiol.—1977.— 8.— P. 183—262.
262. Yamane T., Davidson N. On the complexing of desoxyribonucleic acid by mercuric ion // J. Amer. Chem. Soc.—1961.— 83. — P. 2599—2607.
263. Yen W. S., Mercer R. W., Ware B. R., Dunham P. B. Electrophoretic light scattering of red cell membrane vesicles : A study of the electrical charges of the cytoplasmic membrane surface // Scattering techniques applied to supramolecular and nonequilibrium systems.—Proc. NATO Adv. study inst. Wellesley, Mass., 3—12 Aug. 1980 / Eds S.-H. Chen, B. Chu, R. Nossal.—New York; London : Plenum Press, 1981.— P. 861—864.
264. Yoshimura T., Aki K. Sodium-induced aggregation of phosphatidic acid and mixed phospholipid vesicles // BBA.—1985.— 813, N 1.— P. 167—173.
265. Yu H. Application of light scattering to polymers liquid crystals and biological system // J. Res. Nat. Eur. Stand.—1981.— 86, N 6.— P. 571—590.
266. Zero K. M., Pecora R. Rotational and translation diffusion in semi—dilute solutions of rigid rod macromolecules // Amer. Chem. Soc. Polym. Prepr.—1981.— 22, N 1.— P. 98—99.
267. Zimm B. H. Dynamics of polymer molecules in dilute solution: viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss // J. Chem. Phys.—1956.— 24, N 2.— P. 269—278.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

A — амплитуда Лоренциана	Q — заряд
c — скорость света	q — переданный волновой вектор
C — концентрация	R — радиус
D — коэффициент диффузии	R_g — радиус инерции
$\hat{D}$ — диффузионный оператор	R_h — гидродинамический радиус
d — диаметр	r — радиус-вектор
E — электрическое поле	S — площадь
e — амплитуда электромагнитной волны	S_c — площадь когерентности
e — единичный вектор	S — радиус-вектор точки наблюдения
G — корреляционная функция	t — время
$G^{(1)}$ — корреляционная функция поля излучения	T — время измерений
$G^{(2)}$ — корреляционная функция интенсивности излучения	U — рассеивающий объем
$G^{вз}$ — взаимная корреляционная функция	W — функционал невязки
g — корреляционная функция излучения отдельного источника	V — скорость
I — спектр	α — форм-фактор
$I^{(1)}$ — спектр излучения	β — кварновый выход
$I^{(2)}$ — спектр флуктуаций интенсивности излучения	Γ — полуширина лоренциана
$\bar{I}$ — измеренное значение спектра	δ — дельта-функция
i — фототок	Δ — сигнал/шум
J — интенсивность излучения	∇ — оператор градиента
k — волновой вектор	χ — поляризуемость
L — протяженность рассеивающего объема	ϵ — диэлектрическая проницаемость
N — число рассеивателей	κ — обратный радиус экранировки
n — показатель преломления	η — вязкость
P — вероятность, функция распределения	Δv — доплеровское смещение
P_0 — равновесная функция распределения	ω — частота
	τ — временной интервал
	τ_c — время корреляции
	Ω — апертура фотосбора
	Ω_c — угол когерентности
	θ — угол рассеяния
	φ — случайная величина
	ζ — дзета-потенциал
	λ — собственное значение, длина волны света

Предисловие	3
Введение	5

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

Глава 1. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КВАЗИУПРУГО РАССЕЯННОГО СВЕТА	13
---	----

§ 1.1. Корреляционные свойства электромагнитного поля	14
---	----

Электромагнитное поле как случайная величина (14); свойства случайной величины (16); корреляционная функция и спектр (17); высшие корреляторы (20); корреляционные свойства электромагнитного излучения (21)

§ 1.2. Корреляционная спектроскопия	22
-------------------------------------	----

Спектр флуктуаций интенсивности (22); гомодинирование и гетеродинирование (24); дробовой шум (27); площадь когерентности (30)

§ 1.3. Квaziупругое светорассеяние	33
------------------------------------	----

Рассеяние на частицах в растворе (33); многократное рассеяние (37); статистика рассеянного излучения (39)

§ 1.4. Измерение корреляционных характеристик фототока	41
--	----

Приборная реализация корреляционного анализа. Реальный масштаб времени (41); сопоставление аналогового способа фоторегистрации с техникой счета фотонов (45)

Глава 2. МЕТОДЫ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ	47
---	----

§ 2.1. Автокорреляционная спектроскопия. Гомо- и гетеродинирование	48
--	----

Гетеродинная схема измерений (48); гомодинирование или гетеродинирование (50); примеры конкретных схем оптического гетеродинирования (52); общие требования к элементам оптического тракта (54)

§ 2.2. Эффекты негауссовости в корреляционной спектроскопии	57
---	----

Флуктуации интенсивности света, рассеянного одной частицей (57); условия наблюдения эффектов негауссовости (59); методические проблемы (60); рассеяние неполихроматического света (62)

§ 2.3. Метод взаимных корреляций	63
----------------------------------	----

Взаимная корреляция как способ наблюдения эффектов негауссовости (63); угловая зависимость функции взаимной корреляции (64); оптические схемы (65); рассеивающий объем (67)

§ 2.4. Анемометрия и другие корреляционные методики	69
---	----

Допплеровская анемометрия (69); эффекты негауссовости в дифференциальных схемах (72); анализ поляризации в корреляционной спектроскопии (73); СФИ флуоресценции (75); корреляционная спектроскопия полного внутреннего отражения (76)

Глава 3. МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	80
--	----

§ 3.1. Анализ данных в корреляционной спектроскопии	81
---	----

Цель математической обработки экспериментальных данных (81); принцип максимального правдоподобия (83); экспериментальный спектр (87)

§ 3.2. Стандартные методы анализа	88
-----------------------------------	----

Априорная информация (88); метод прямой подгонки (90); метод кумулянтов (91)

§ 3.3. Метод регуляризации	93
----------------------------	----

Некорректность обратной спектральной задачи (93); регулярные методы решения обратной спектральной задачи (95); параметр сглаживания и смысл квазирешения (98); машинные и модельные эксперименты (101).

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

Глава 4. ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ДИФфуЗИЯ	104
§ 4.1. Исследование монодисперсных систем	106
Гидродинамический размер (106); точность определения размеров и влияющие на нее факторы (109); определение структуры объекта по сопоставлению гидродинамического радиуса и радиуса инерции (112); белки (113); нуклеиновые кислоты (117); надмолекулярные структуры и вирусы (119)	
§ 4.2. Анализ полидисперсности	122
Проблема полидисперсности в спектроскопии квазиупруго рассеянного света (122); распределение числа частиц по размерам (124); примеры изучения полидисперсных систем (126)	
§ 4.3. Исследование медленной кинетики и изменений состояния системы	133
Постановка проблемы (133); агрегация (иммунологический аспект) (135); конформационные изменения (137); модификация (140); полимеризация (143); расслоение (146)	
Глава 5. ПОДВИЖНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	150
Особенности движения микроорганизмов (151); рассеяние света при стохастическом движении с большим временем корреляции (153); флуктуации числа частиц в объеме (157); применение метода взаимной корреляции (160); детерминированное движение микроорганизмов (таксис) (162)	
Глава 6. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ	168
§ 6.1. Электрофорез без поддерживающей среды	169
Классификация методов электрофореза (169); электрофоретическая подвижность частиц в электролите (170); интерпретация электрокинетического потенциала (173); электроосмос (175)	
§ 6.2. Метод электрофоретического светорассеяния	177
Постановка задачи и связь с анемометрией (177); конструкции электрофоретических кувет (178); режим наложения поля и электроды (180); конвекция и учет нагрева (182); электроосмос. Измерение или устранение? (183); аппаратное уширение и дальнейшее развитие методики (184)	
§ 6.3. Применение электрофоретического светорассеяния для изучения биологических систем	187
Задачи электрофоретического светорассеяния (187); измерение заряда биологических объектов (188); анализ состава системы (192)	
§ 6.4. Электрофорез биологических клеток	194
Структура клеточной поверхности (194); измерение электрофоретической подвижности клеток (197); иммунологические реакции (199)	
Глава 7. ДИНАМИКА СИСТЕМ СО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ	202
§ 7.1. Внутренняя динамика	203
Обобщенное уравнение диффузии (203); трансляционная инвариантность (205); корреляционная функция света, рассеянного на флуктуирующей частице (208); методические аспекты изучения внутренней динамики (212)	
§ 7.2. Конформационная и ориентационная динамика. Химическая кинетика	214
Конформационная динамика (214); химическая кинетика (217); ориентационная динамика (218); изучение ориентационной релаксации (221)	
§ 7.3. Изучение внутренней динамики полимерных клубков	223
Динамика полимерного клубка (223); изучение динамики полимерных клубков методом кумулянтов (225); нижайшая релаксационная мода полимерного клубка (229)	
§ 7.4. Межчастичное взаимодействие	233
Концентрационная зависимость (233); гидродинамическое взаимодействие (236)	
Заключение	239
Список литературы	242
Список обозначений	254