

ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МЕЧЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

А. П. Блохин, В. А. Поводайло, Д. Л. Яковлев

Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск

E-mail: lsfm@imaph.bas-net.by

Исследована вращательная деполаризация флуоресценции двух олигонуклеотидов меченых флуоресцеином – одноцепочечного молекулярного комплекса I (с 25 нуклеотидами) и двухцепочечного II (с 25 и 50 нуклеотидами) (рис. 1). Необходимое пространственное расположение флуорофора относительно модифицированной биомолекулы обеспечивалось ковалентной связью посредством линкера. Возбуждение флуоресцеина осуществлялось вертикально и горизонтально поляризованным излучением непрерывного лазера на диоде с длиной волны излучения 532 нм и мощностью излу-

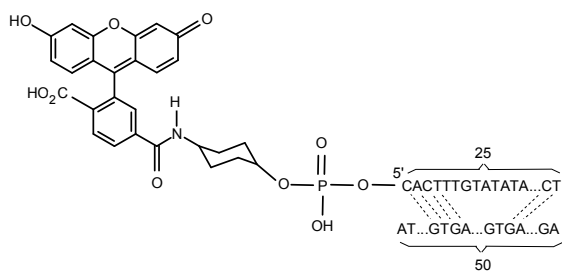


Рис. 1. Структура олигонуклеотида с линкером и флуоресцеином

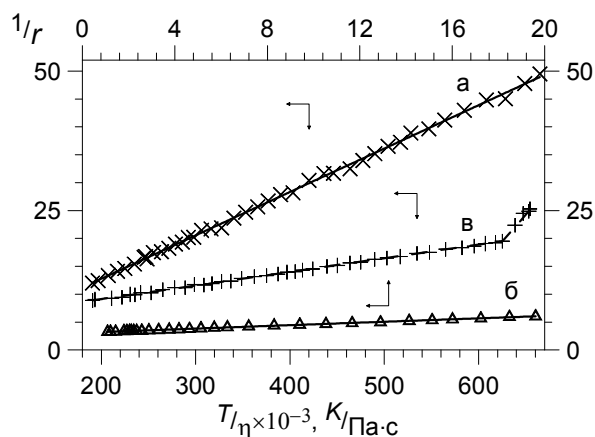


Рис. 2. Зависимость $1/r(T/\eta)$: а – водно-глицериновый; б, в – водный раствор

чения 10 мВт. Измерения анизотропии флуоресценции указанных олигонуклеотидов в зависимости от температуры производились в водном и водно-глицериновом растворах. Анизотропия флуоресценции r меченной макромолекулы зависит от времени жизни τ возбужденного состояния метки и времени ориентационной релаксации τ_2 в среде, которое определяется температурой T , вязкостью среды η и эффективным объемом молекулы V . Количественно эта зависимость выражается формулой Левшина-Перрена

$$1/r = (1 + \tau/\tau_2)/r_0 = (1 + \tau k T / 6 V \eta) / r_0, \quad (1)$$

где r_0 - предельное значение анизотропии в бесконечно вязкой среде. Зависимость $1/r$ от T/η обычно имеет вид прямой. Однако для макромолекул из-

за сложности вращательной динамики, включая внутреннюю, возможны процессы с различными временами ориентационной релаксации. В этом случае следует ожидать отклонений от линейной зависимости.

На рис. 2, а, б, в представлены экспериментальные зависимости r от T/η для двух молекулярных комплексов. Исследования проведены в температурном интервале от 5 до 55 °С. Зависимости (2а) и (2б) для комплекса I удовлетворительно описывается прямой, несмотря на то, что формула Левшина-Перрена (1) пригодна для молекул сферической формы. Первая зависимость получена для водного раствора, а вторая для водно-глицеринового (85 % глицерина, 15 % воды и буфера). Для комплекса I выполняется линейность $1/r$ от T/η во всем интервале изменения температуры. Иная картина наблюдается для водного раствора комплекса II (рис. 2, в). В интервале от 5 до 35 °С наблюдается линейный ход в зависимости. С дальнейшим ростом температуры происходит резкий подъем. Отклонение от прямой можно объяснить "плавлением" спаренной молекулы олигонуклеотида II. В растворе появляются комплексы I с укороченной (до 25) последовательностью оснований. Эти укороченные комплексы дают более низкие значения r и соответственно более высокие значения $1/r$. Из эксперимента определены значения τ , равные 4.12, 4.1, 4.07 нс соответственно для а, б, в зависимостей. В расчетах r_0 принималось равным 0.371. Из наклона $1/r(T/\eta)$ рис.2, а, б, в с использованием (1) определены времена ориентационной релаксации. Для температуры 22 °С они равны 0.46, 31 и 1.5 нс, соответственно, для а, б, в. Как известно из литературы, в водном растворе для двойной спирали ДНК время ориентационной релаксации составляет 11.5 нс для ДНК с 25 парами нуклеотидов и приблизительно 23.5 нс с 50 парами. Пересчет на увеличение вязкости в водно-глицериновом растворе для ДНК с 25 парами дает значение времени ориентационной релаксации, равное 2945 нс.

Исследования вращательной деполяризации флуоресценции показывают наличие быстрых ориентационных релаксаций внутри изучаемого комплекса. Помимо вращения макромолекулы как целого, присутствуют также сегментальная гибкость и внутримолекулярная подвижность флуоресцеина, линкера и олигонуклеотида. В этом случае в уравнение Левшина-Перрена следует включить все типы движения со своим весом.