

## Тушение флуоресценции бифлуорофора 6-FAM-D в буферном растворе

В.А. Поводайло, А.А. Романенко, С.А. Тихомиров,  
А.Д. Широканов, Д.Л. Яковлев

Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск  
E-mail: poved@dragon.bas-net.by

Флуоресцеин и аналоги флуоресцеина являются одними из наиболее часто используемых флуоресцентных зондов в биоаналитических исследованиях. Флуоресцеиновые производные ковалентно присоединяются к белкам, нуклеиновым кислотам, аминокислотам, углеводам и широко применяются в экспериментах. При биоанализе обычно приходится работать с малыми концентрациями исследуемого объекта. Для увеличения чувствительности регистрации анализируемого вещества с ковалентно присоединенной флуоресцирующей меткой были специально синтезированы бифлуорофоры на основе соединенных линкером пар флуоресцеиновых красителей 5-FAM и 6-FAM, что даёт принципиальную возможность посадки фактически двух одинаковых флуорофоров на одну позицию биомолекулы. Измерения люминесценции бифлуорофоров в растворе показали, что квантовый выход флуоресценции 6-FAM-D оказался существенно ниже, чем для 5-FAM-D при прочих равных условиях. Для выяснения причин этого в работе проведены детальные исследования спектрально-кинетических и поляризационных характеристик синтезированных бифлуорофоров.

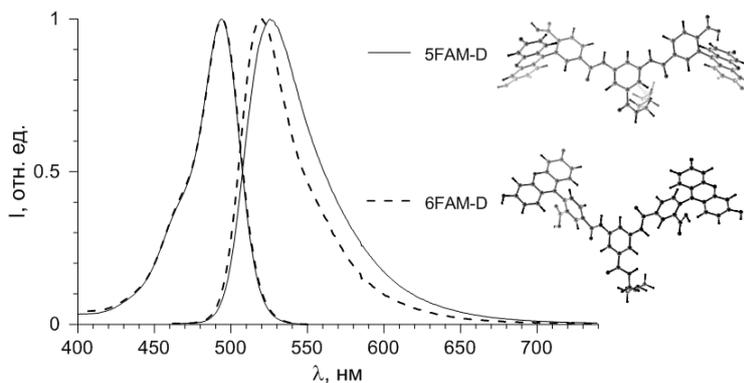


Рис. 1. Спектры поглощения и флуоресценции 5-FAM-D и 6-FAM-D в буферном растворе, pH = 8.5

Исследования соединений проводили в растворе трис-ацетатного буфера с pH = 8.5 при температуре 20 °С. Спектры поглощения первой электронной полосы обоих соединений совпадают (рис. 1), что указывает на слабое влияние фталевого фрагмента, линкера и азидной группы на ксантеновый хромофор. С другой стороны, максимум спектра флуоресценции бифлуорофора 5-FAM-D находится на 525 нм и смещен в

низкочастотную область на 6 нм по отношению к 6-FAM-D.

Для мономерных форм красителей в буферном растворе с  $\text{pH} = 8.5$  значения времен жизни ( $\tau$ ) сравнимы и составляют величины 4.28 нс для 5-FAM и 4.22 нс для 6-FAM. Спектры поглощения обоих соединений совпадают с максимумом 492 нм, а спектры флуоресценции одинаковы по форме, но слегка смещены по частоте, максимум 5-FAM соответствует 519 нм, а 6-FAM – 515 нм. Относительные квантовые выходы мономеров в натрий-фосфатном буфере ( $\text{pH} = 7.4$ ) равны 0.915 и 0.834 для 6-FAM и 5-FAM, соответственно [1]. Оказалось, что квантовый выход флуоресценции 5-FAM-D в буферном растворе с  $\text{pH} = 8.5$  в 2.3 раза выше, чем у 6-FAM-D. Время жизни в возбужденном состоянии 5-FAM-D немного ниже значения мономера и равно 4.17 нс, тогда как почти двукратное снижение значения  $\tau$ , равное 2.18 нс, обнаружено у 6-FAM-D. Следует отметить, что кривые затухания 5- и 6-FAM, а также 5-FAM-D хорошо описываются одноэкспоненциальной кривой затухания, тогда как 6-FAM-D лучше описывается двухэкспоненциальной кривой.

Для снижения конформационной подвижности молекул проведены исследования по взаимодействию бифлуорофоров 5- и 6-FAM-D с широко распространенным поверхностно активным амфифильным соединением (ПАВ) Тритон X-100 (TX-100). Результаты измерений интенсивности флуоресценции 6-FAM-D и 5-FAM-D от концентрации TX-100 показывают, что когда концентрация TX-100 превышает пороговую концентрацию мицеллообразования, наблюдается резкий, линейный рост интенсивности флуоресценции у 6-FAM-D, который достигает переломной точки в концентрации TX-100  $C = 6.03 \text{ mM}$  с последующим выходом на стационарное значение. У 5-FAM-D наблюдается небольшое снижение интенсивности флуоресценции с увеличением концентрации ПАВ.

Исследование бифлуорофоров в мицелярной среде приводит к дискретному изменению микровязкости при расположении бифлуорофора внутри, около, или же на поверхности мицеллы. Для более полного доказательства влияния вязкости раствора на фотофизику 6-FAM-D проведены измерения относительного квантового выхода и времени жизни возбужденного состояния 6-FAM-D в водно-глицериновой смеси. С добавлением небольшого количества глицерина наблюдается резкий рост квантового выхода с выходом на плато. Аналогичная картина имеет место и для степени поляризации флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния  $\tau$ .

Полученный результат можно объяснить наличием большого числа конформационных состояний бифлуорофора. При электронном возбуждении молекула красителя переходит в неравновесное состояние с последующей термализацией вдоль диссипативных координат. Эти координаты связаны с взаимодействием ядерных фрагментов. На рисунке 2 (вставка)

представлена зависимость отношения квантовых выходов флуоресценции  $(F/F_0)/(\tau/\tau_0)$  от вязкости  $\eta$  молекулы 6-FAM-D в водно-глицериновой смеси на участке, соответствующем быстрому росту интенсивности рисунка 2 ( $F_0$  и  $\tau_0$  – значения в буферном растворе). Результаты показывают, что изменения в интенсивности флуоресценции пропорциональны изменению времени жизни возбужденного состояния ( $\tau/\tau_0$ ). Увеличение вязкости среды приводит к затруднению переходов между конформациями, которые вынуждены пребывать большее время во флуоресцентном состоянии, что и приводит к росту квантового выхода флуоресценции в мицелярной и водно-глицериновой смесях. Аналогичным способом объясняется и многоэкспоненциальность затухания флуоресценции. В вязкой среде конформационные изменения заторможены, и каждый конформер будет релаксировать в равновесное состояние со своей характеристической скоростью, приводящей к многоэкспоненциальности.

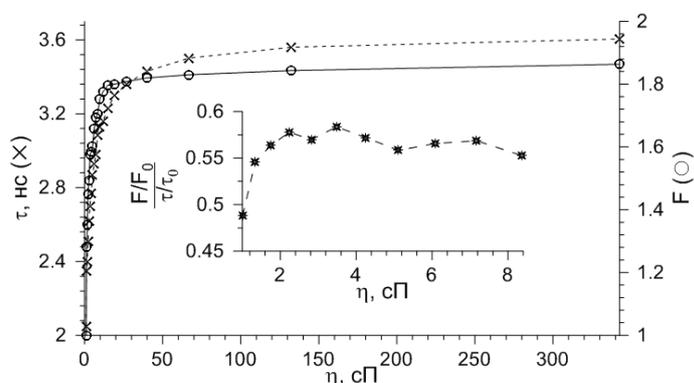


Рис. 2. Зависимость относительного квантового выхода флуоресценции  $F$  и времени жизни возбужденного состояния  $\tau$  6-FAM-D от вязкости водно-глицериновой смеси, во вставке зависимость отношения квантового выхода  $F$  к  $\tau/\tau_0$  от вязкости в области резкого подъема

Флуктуационная динамика конформационных состояний остова 6-FAM-D приводит к тушению флуоресценции, чего не наблюдается у родственного соединения 5-FAM-D. Подтверждением отсутствия тушащего взаимодействия у 5-FAM-D может служить моноэкспоненциальная зависимость затухания флуоресценции, тогда как биэкспоненциальная кривая наблюдается у тушащего 6-FAM-D. В этом случае тушение является контролируемым процессом и строго зависит от вязкости раствора. Полученные результаты могут быть использованы в биологии при исследованиях полимеразной цепной реакции с детектированием в режиме реального времени (ПЦР-РВ) как чувствительный индикатор (сенсор) вязкости.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф18В-010).

1. Mineno T, Ueno T, Urano Y. et al. // Org. Lett. 2006. V. 8, No. 26. P. 5963–5966.