

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ БИФЛУОРОФОРОВ

Поведайло В.А.¹, Тихомиров С.А.¹, Широканов А.Д.¹, Шманай В.В.², Яковлев Д.Л.¹

¹*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Флуорофоры на основе флуоресцеина нашли широкое применение в биоаналитических исследованиях. При биоанализе в качестве флуоресцентных маркеров часто используются 5- и 6-карбоксифлуоресцеины (5-FAM, 6-FAM). Для увеличения чувствительности флуоресцентной регистрации анализируемого вещества нами синтезированы бифлуорофоры (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на основе 5-FAM и 6-FAM, соединенных между собой линкером, что позволяет присоединять фактически два флуорофора на одну точку связывания мишени за счет ковалентной связи линкерной группы. Анализируемое вещество присоединяется к линкеру посредством [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Измерения энергетических характеристик синтезированных бифлуорофоров в растворе показали, что интенсивность флуоресценции (6-FAM)₂ в 2,4 раза ниже интенсивности (5-FAM)₂ при прочих равных условиях. В работе проведены детальные исследования спектрально-кинетических и поляризационных характеристик синтезированных бифлуорофоров.

Спектры поглощения в буферном растворе первой электронной полосы обоих бифлуорофоров совпадают, а максимум спектра флуоресценции (5-FAM)₂ смещен в низкочастотную область на 6 нм по отношению к спектру (6-FAM)₂. Для мономерных форм в буферном растворе значения времен жизни сравнимы, а квантовые выходы для 6-FAM и 5-FAM равны соответственно 0,915 и 0,834. Времена жизни в возбужденном состоянии (5-FAM)₂ и его мономера составляют 4,17 нс, тогда как почти двукратное снижение значения τ , равное 2,18 нс, обнаружено у (6-FAM)₂.

Сходство спектральных характеристик в области перекрытия и существенные различия времен жизни возбужденных состояний бифлуорофоров могут быть связаны с конформационной структурой молекул в возбужденном состоянии, которая в значительной степени контролируется вязкостью среды. Для снижения конформационной подвижности проведены исследования (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в водно-глицериновых растворах и в водных в присутствии поверхностно активного соединения Тритон X-100. Показано, что увеличение вязкости раствора сопровождается существенным ростом времени жизни возбужденных состояний, степени поляризации и интенсивности флуоресценции только у (6-FAM)₂. Полученный результат можно объяснить наличием большего числа доступных конформационных состояний для данного бифлуорофора в возбужденном состоянии по сравнению с (5-FAM)₂, что связано с наличием или отсутствием стерических препятствий для конформационной перестройки.

Проведены измерения относительных квантовых выходов флуоресценции (η^{rel}) комплексов 5-, 6-FAM и 5-, (6-FAM)₂, ковалентно связанных линкером с одноцепочечными олигонуклеотидами, и комплексов с моноклональным антителом во втором случае. Отношения квантовых выходов комплексов с участием мономерных флуорофоров практически совпадают, не зависят от типа линкера и близки к значению для мономерных меток. Иная картина наблюдается для комплексов с бифлуорофорными метками. Комплексы с меткой (6-FAM)₂ не снижают, а увеличивают η^{rel} по отношению к флуорофору, тогда как комплексы с меткой (5-FAM)₂ снижают η^{rel} .

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Ф20В-003).