

Деполяризация люминесценции нежестких молекулярных комплексов

А. П. Блохин

*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск;
e-mail: lsfm@imaph.bas-net.by*

Кинетика анизотропии флуоресценции меченных карбофлуоресцеином олигонуклеотидов в растворах в свободном состоянии и в комплексах с наночастицами оксида графена рассчитана в разработанной обобщенной модели вращательной диффузии молекул с внутренними ротаторами. Выполнен анализ зависимости скорости ориентационной релаксации анизотропии от соотношения моментов инерции подвижных частей молекулы и наночастицы и ориентации моментов переходов для поглощения и испускания. Найдены условия повышения анизотропии флуоресценции необходимые для разработки биохимических сенсоров на основе иммобилизации молекул на поверхности наночастиц.

Ключевые слова: поляризация флуоресценции, нежесткие молекулы, наночастицы графена.

Введение

Исследование процесса вращательной деполяризации люминесценции многоатомных молекул простой и эффективный способ получения информации об особенностях динамики их движения и взаимодействий с окружающей средой. Для описания вращательного движения наиболее распространены модели ударного приближения, в которых реориентация молекул представляется последовательностью поворотов, прерываемых мгновенными столкновениями. В этих моделях коэффициенты вращательной диффузии приобретают молекулярно-кинетическое определение через моменты инерции и вероятность сбоя углового момента молекул [1]. Для нежестких молекул с внутренними ротаторами необходимо учитывать, что статистика столкновений ротаторов в сильной степени зависит от внутренних ограничений и потенциалов взаимодействия. Поэтому стандартная модель обобщена в предположении независимых статистик для столкновений при поворотах нежестких молекул в целом и внутренних столкновений [2]. В рамках такой модели для молекул с внутренними ротаторами получены интегральные кинетические уравнения, которые использованы для расчета релаксации анизотропии флуоресценции меченных фрагментов ДНК- олигонуклеотидов, находящимися в растворах в свободном состоянии и в комплексах при их иммобилизации на поверхности наночастиц оксида графена.

1. Теория.

Анизотропия флуоресценции с учетом ориентационной релаксации

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

определяется тензорными корреляционными функциями

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

усредненными по переменным вращательного фазового пространства молекулярного комплекса $\Gamma^{(o)}$ и переменным для внутреннего вращения $\Gamma^{(i)}$. Здесь $D_{km}^j(\Omega)$ – функции Вигнера, $\Omega_{\mu_{a,e}} \{ \Psi_{\mu_{a,e}}, \Theta_{\mu_{a,e}}, 0 \}$ – углы ориентации векторов дипольных моментов переходов для поглощения и испускания μ_a, μ_e .

Для независимых статистик внешних и внутренних столкновений для ориентационных корреляционных функций получена система управляющих кинетических

уравнений. В предположении о хаотизации векторов угловых моментов молекул и внутренних ротаторов для молекул с моментами инерции $I_x = I_y \neq I_z$ показано, что она приобретает следующий вид

$$G_k^{2(o)}(t) = e^{-z_c t} F_k^{2(o)}(t) + z_c \int_0^t dt' e^{-z_c(t-t')} G_k^{2(o)}(t') F_k^{2(o)}(t-t'), \quad (3)$$

$$G_a^{2(i)}(t) = e^{-z_c^{(i)} t} F_a^{2(i)}(t) + z_c^{(i)} \int_0^t dt' e^{-z_c^{(i)}(t-t')} G_a^{2(i)}(t') F_a^{2(i)}(t-t'), \quad (4)$$

$$G_a^{2(o)}(t) = \sum_{k=-2}^2 G_k^{2(o)}(t) (d_{ka}^2(\eta))^2 G_a^{2(i)}(t), \quad G_k^{2(o)}(t) = \langle G_k^{2(o)}(\Gamma^{(o)}, t) \rangle_{\Gamma^{(o)}}, \quad G_a^{2(i)}(t) = \langle G_a^{2(i)}(\Gamma, t) \rangle_{j_a} \quad (5)$$

Здесь, η – угол оси вращения внутреннего ротатора к оси молекулы z , известные функции $F_k^{2(o)}(t), F_a^{2(i)}(t)$ для вращения свободных молекул [1, 2]. Интегральные уравнения Вольтера (3, 4) в диффузионном пределе дают

$$G_k^{2(o)}(t) = e^{-t z_c [(6-k^2) + k^2 I_x / I_z]}, \quad G_a^{2(i)}(t) = e^{-t a^2 z_c^{(i)} \chi I_x / I_z}, \quad (6)$$

где $\chi = (I_z - I_\alpha) / I_\alpha$ – соотношение момента инерции $I_z - I_\alpha$ части молекулы, которая считается неподвижной, к моменту инерции I_α подвижной части.

2. Сравнение с экспериментом

Поляризационные эксперименты [2] для фрагментов ДНК - олигонуклеотидов с 25 и 50 основаниями связанных ковалентно через линкер с карбоксифлуоресцеином продемонстрировали определяющее влияние внутренних вращений на процесс деполяризации флуоресценции в растворах. Причем резкое изменение зависимостей обратной величины анизотропии флуоресценции от температуры и вязкости с ростом температуры для более длинного олигонуклеотида с 50 основаниями свидетельствовало о возникновении быстрых компонент в ориентационной релаксации и изменениях в структуре. Олигонуклеотиды можно моделировать вытянутыми молекулярными волчками с двумя примерно равными моментами инерции и внутренним ротатором. На рис. 1 для молекулы с параметрами меченного олигонуклеотида ($I_x / I_z = 9.1, \Theta_{\mu_{a,e}} = \Theta = 71,5^\circ, \eta = 73,6^\circ$, [3]) приведены кинетические зависимости анизотропии, рассчитанные на основе развитой модели для различных χ – соотношений моментов инерции подвижной и неподвижной частей молекулы. Время в единицах среднего поворота на радиан $t \rightarrow (kT / I_x)^{1/2} t$.

Поскольку время в условных единицах, не зависящих от температуры, рассмат-

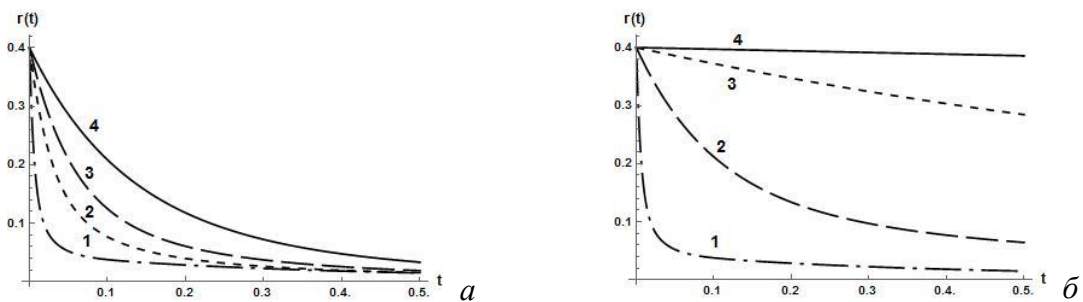


Рис. 1.– Анизотропия флуоресценции $r(t)$; a – для олигонуклеотида в свободном состоянии при $\chi = 1(1), 5(2), 10(3), 50(4)$, b – для свободного олигонуклеотида (1) и после иммобилизации на оксиде графена $k_{im} = 1(2), 10(3), 100(4)$ при $\chi = 50$.

риваемые поляризационные эффекты определяются только соотношением моментов инерции и ориентацией моментов переходов. Как видно из рис. 1, *a*, анизотропия наиболее значительно изменяется на начальных стадиях релаксационного процесса, причем чем с меньшей частью молекулы связаны флуорофоры, тем круче начальный наклон кривых процесса релаксации анизотропии флуоресценции. Поэтому можно предположить, что обнаруженный в [2] сильный деполаризующий эффект может быть связан с мобильностью локальной структуры олигонуклеотида вблизи места присоединения флуоресцентной метки, т. е. с мобильностью меньшего меченного фрагмента молекулы. Поскольку внутренняя диффузия определяется локальными ограничениями и полями и в меньшей степени зависит от влияния внешней среды, таким способом можно определять соотношения коэффициентов общей и внутренней вращательной диффузии и получать важную информацию о структурной подвижности фрагментов нуклеиновых кислот.

Для анализа изменений структуры биомолекул с относительно малыми массами в биохимических реакциях широко используются способы химической привязки их к различным объектам больших размеров [3], с целью увеличения анизотропии флуоресценции и повышения чувствительности поляризационно-флуоресцентного метода. При иммобилизации молекул на поверхности таких объектов и резкого снижения скоростей вращательного движения молекулярного комплекса существенно повышается анизотропия флуоресценции. Разработанная модель может быть использована для анализа эффективности регистрации поляризационными методами биохимических реакций с участием олигонуклеотидов при их иммобилизации на поверхности наночастиц оксида графена [3]. Наночастицы оксида графена можно моделировать плоскими осесимметричными объектами с моментами инерции $I_x \approx I_y \approx 2I_z$ и предположить, что после иммобилизации олигонуклеотиды совершают внутренние вращения вокруг оси, ориентированной под углом η относительно перпендикуляра к плоскости наночастицы. На рис. 2 изображены рассчитанные зависимости анизотропии флуоресценции для различных соотношений моментов инерции наночастицы $I_{x(nano)}$ и олигонуклеотида $I_{x(mol)}$ ($k_{im} = I_{x(nano)} / I_{x(mol)}$). Кривая 1 рис. 1, *б* соответствует свободного олигонуклеотиду с быстрым внутренним вращением при $\chi = 50$.

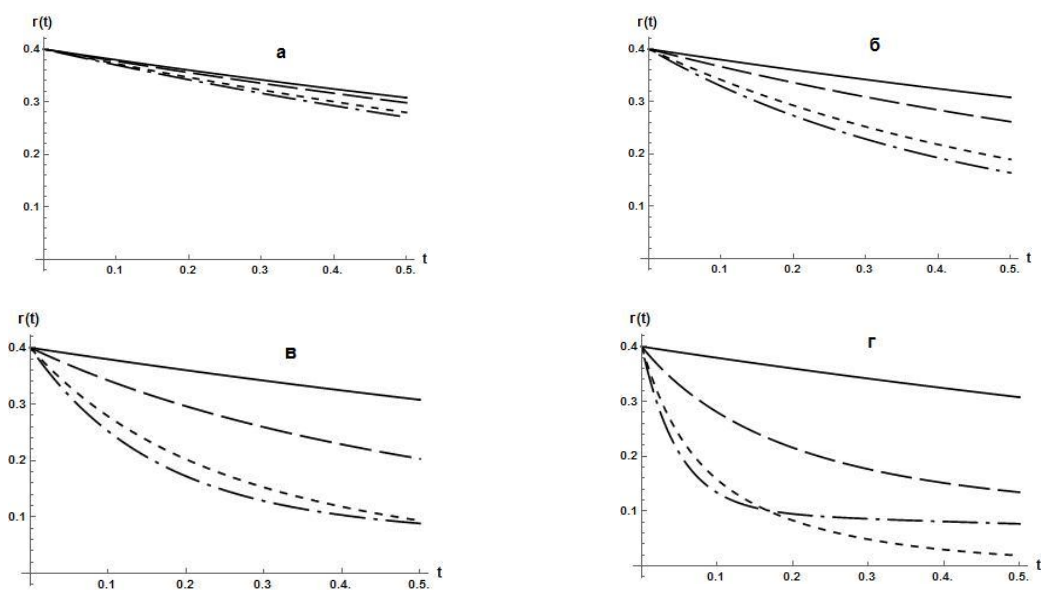


Рис. 2. – Анизотропия флуоресценции после иммобилизации молекулы – $\eta = 45^\circ$, $\chi = 3(a), 10(б), 30(в), 100(г)$. Кривые сверху вниз для углов $\Theta = 0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, 90^\circ$.

После иммобилизации на поверхности наночастицы с увеличением инерции наноплатформы $k_{im} = 1, 10, 100$ кривые становятся более пологими, и анизотропия флуоресценции практически не падает по сравнению с анизотропией свободных молекул. Кинетика релаксации слабо зависит от угла ориентации оси внутреннего ротатора η , как для свободных молекул, так и их комплексов с наночастицами. Поскольку скорость релаксации в основном задаётся азимутальной диффузией вокруг оси внутреннего ротора, существует сильная зависимость кинетики анизотропии от Θ -полярного угла ориентации дипольных моментов переходов к этой оси. Как видно из рис. 2, различие верхних и нижних кривых, соответственно, для малых и больших углов Θ особенно заметно с увеличением размеров наночастиц. Поэтому важное значение в методе иммобилизации имеет ориентация моментов переходов относительно перпендикуляра к поверхности наночастиц, определяющая быстрые компоненты азимутальной диффузии. Причем даже при сравнимых размерах наночастицы и молекулы ($k_{im} \sim 1$) вращательная диффузия существенно замедляется. Поэтому иммобилизация олигонуклеотидов наночастицами графена является эффективным вариантом повышения анизотропии флуоресценции.

Заклучение

В предложенной диффузионной модели процесс деполяризации люминесценции молекул с внутренними вращениями определяется соотношением моментов инерции подвижных частей и ориентацией моментов переходов. Такой теоретический метод актуален для расчета скоростей деполяризации флуоресценции меток, внедренных в жесткие биологические структуры при контроле биохимических реакций и разработки поляризационно-флуоресцентных сенсоров, основанных на усилении анизотропии при иммобилизации на поверхности наночастиц.

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

Литература

1. Blokhin A. P., Gelin M. F. Rotation of nonspherical molecules in dense fluids. *J. Phys. Chem. B*. 1997. Vol. 101, No. 2. P. 236–243.
2. Блохин А.П. Столкновительная деполяризация люминесценции многоатомных молекул с внутренними вращениями. *ЖПС*. 2021. Т. 88, № 5. С. 714–723.
3. Perrier S., Guieu V., Cheovelon B., Ravelet C., Peyrin E. A panoply of fluorescence anisotropy signaling mechanism for functional nucleic acid-based sensing platforms. *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, No. 7. P. 4236–4248

Depolarization of luminescence of non-rigid molecular complexes

A. P. Blokhin

B.I. Stepanov Institute of Physics of National Academy of Science of Belarus, Minsk

The fluorescence anisotropy kinetics of oligonucleotides labeled with carbofluorescein in solutions in a free state and in complexes with graphene oxide nanoparticles is calculated using the developed generalized model of rotational diffusion of molecules with internal rotators. The dependence of the rate of orientational relaxation of anisotropy on the ratio of the moments of inertia of the moving parts of a molecule and a nanoparticle and the orientation of the transition moments for absorption and emission is analyzed. The conditions for increasing the fluorescence anisotropy are found, which are necessary for the development of biochemical sensors based on the immobilization of molecules on the surface of nanoparticles.

Keywords: fluorescence polarization, non-rigid molecules, graphene nanoparticles.