

Структурные конфигурации и флуоресцентные свойства бифлуорофоров 5- и 6- карбоксифлуоресцеинов

В. А. Поводайло¹, И. Л. Лысенко², Фань Фань², С. А. Тихомиров¹, Д. Л. Яковлев¹,
А. Д. Широканов¹, В. В. Шманай²

¹*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск;
e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by*

²*Институт Физико-Органической химии НАН Беларуси, Минск*

В работе с использованием методов стационарной и сверхбыстрой спектроскопии и теоретических расчетов выяснен механизм тушения флуоресценции двух стереоизомеров бифлуорофоров 5- и 6-карбоксифлуоресцеинов (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂, с существенно различными квантовыми выходами. У хромофорной молекулы (6-FAM)₂ в отличие от (5-FAM)₂ при конформационных переходах с богатым набором степеней свободы возможны сближения двух мономеров с образованием столкновительных комплексов Н-типа как в основном, так и в возбужденном состояниях. Формирование столкновительного комплекса у (6-FAM)₂ в возбужденном состоянии приводит к тушению флуоресценции бифлуорофора.

Ключевые слова: бифлуорофор, интенсивность флуоресценции, тушение, карбоксифлуоресцеин

Введение

Оксазиновые красители, такие как флуоресцеин и его многочисленные производные, давно используются в качестве флуоресцентных меток. Фундаментальное понимание фотохимических свойств флуоресцеинов ограничено, что обуславливает ключевую трудность в разделении и способности различать множество конкурирующих механизмов гашения флуоресценции.

В работе [1] изучены флуоресцентные свойства двух стереоизомеров бифлуорофоров 5- и 6-карбоксифлуоресцеинов (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂, квантовые выходы флуоресценции которых отличаются в 2.4 раза. В данной работе для выяснения отличия механизмов тушения флуоресценции (6-FAM)₂ и (5-FAM)₂ использованы методы стационарной и сверхбыстрой спектроскопии, а также теоретические расчеты. Синтез красителей 5-, 6-FAM и 5-, (6-FAM)₂ был также описан в [1].

Расчет равновесных конфигураций молекул

Для выяснения механизмов тушения флуоресценции бифлуорофоров выполнены квантово-химические расчеты равновесных конфигураций молекул (6-FAM)₂ и (5-FAM)₂ в основном состоянии программой Gaussian 09 с использованием полуэмпирического метода PM6. Расчет проводился для дианионной формы в воде с использованием метода IEFPCM. Рассчитанные равновесные конфигурации (5-FAM)₂ представляют собой развернутые структуры (рис. 1, а). Расстояние между центрами масс ксантеновых фрагментов при вращениях вокруг связей находится в пределах 17–20 Å, из чего становится ясным, что при конформационных переходах у (5-FAM)₂ не могут формироваться столкновительные комплексы двух флуорофоров.

Другая картина наблюдается при оптимизации равновесных конфигураций (6-FAM)₂. Для определенных конформаций наблюдается сближение флуорофоров молекулы (6-FAM)₂ до расстояний ~4.6 Å в основном состоянии. Это связано со стереометрией мономерной молекулы 6-FAM, у которой, в отличие от 5-FAM, ковалентная связь к линкеру у фенильного фрагмента карбоксифлуоресцеина смещена на 60°. Этот стерический фактор и служит причиной столь разительных флуоресцентных свойств обоих бифлуорофоров.

Теоретические расчеты показывают наличие ряда конформационных состояний благодаря возможности вращательных поворотов в линкерной группе, соединяющей две моно-

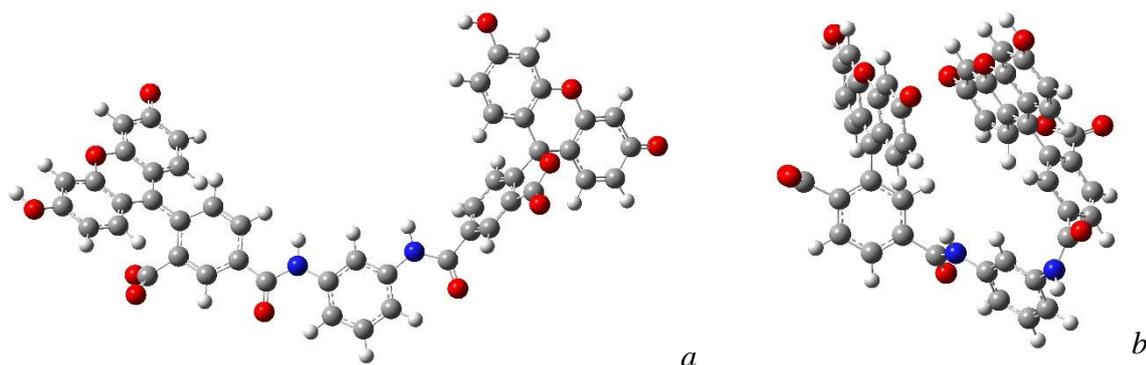


Рис. 1. – Рассчитанные равновесные конфигурации конформеров бифлуорофоров (5-FAM)₂ (а) и (6-FAM)₂ (б) в воде.

мерные молекулы. Поскольку геометрические конформации имеют различные межхромофорные расстояния, для объяснения тушения флуоресценции (6-FAM)₂ можно выделить два предельных случая взаимодействия в системе с идентичными составляющими:

1) Для больших расстояний слабое взаимодействие между хромофорными единицами не меняет спектр поглощения и флуоресценции. Этот процесс передачи энергии обычно описывается с помощью теории Ферстера.

2) Для коротких межхромофорных расстояний сильное кулоновское взаимодействие между хромофорными единицами приводит к расщеплению каждого возбужденного электронного состояния мономера на два новых возбужденных экситонных состояния с новым нерасщепленным основным.

У хромофорной молекулы (6-FAM)₂ при конформационных переходах с богатым набором степеней свободы возможны сближения двух мономеров с образованием столкновительных комплексов Н-типа как в основном, так и в возбужденном состояниях. Формирование столкновительного комплекса (6-FAM)₂ в возбужденном состоянии приводит к тушению флуоресценции бифлуорофора. Изложенное приводит к различию люминесцентных свойств бифлуорофоров в буферном растворе и соответствующему снижению квантового выхода флуоресценции в 2.4 раза у (6-FAM)₂ по сравнению с (5-FAM)₂.

Измерение спектров флуоресценции с временным разрешением

Для более полного понимания флуоресцентных свойств бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ проведены исследования динамики дезактивации возбужденных состояний с применением метода нестационарной флуоресценции. Использование УФ излучения с $\lambda = 260$ нм для возбуждения флуоресценции обусловлено необходимостью обеспечить заселение возможно большего числа колебательных и конформационных состояний излучательного S₁ уровня. Высокоэнергетическое электронное возбуждение приводит изначально к локализации колебательной энергии преимущественно в оптически активных состояниях (модах) с последующей внутримолекулярной релаксацией энергии на другие колебательные моды в течение сотен фемтосекунд и дальнейшим переносом энергии на растворитель.

На рис. 2, а представлены результаты измерения кинетики флуоресценции бифлуорофора (6-FAM)₂ в буферном растворе. Спектральное положение максимума полосы флуоресценции после возбуждающего импульса смещается на 2 нм в длинноволновую область и за время 10 нс успевает приблизиться к стационарному. Наблюдаемое спектральное смещение полосы флуоресценции обусловлено тем, что непосредственно после возбуждающего импульса излучение обусловлено оптическими переходами из неравновесных состояний уровня S₁ с последующим переходом к стационарному

состоянию, что представлено на рис. 2, *a* (вставка). Аналогичная по форме картина наблюдается также у $(5\text{-FAM})_2$ в буферном растворе и водно-глицериновой смеси у $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$.

Измеренные из кривых затухания (рис. 2, *b*) значения времени жизни возбужденных состояний $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$ составляют в буферном растворе 3.75 нс и 1.92 нс, а в смеси с глицерином 3.73 нс и 3.06 нс, соответственно. Полученные на спектрофотометре Fluorolog 3 времена жизни при возбуждении излучением в 281 нм составляют в буферном растворе в одноэкспоненциальном приближении величины 3.84 нс и 1.87 нс, а в смеси с глицерином 3.88 и 3.21 нс. Сравнимые значения величин τ для $(5\text{-FAM})_2$ в буферном и водно-глицериновом растворах подтверждают развернутую структуру соединения. Другая ситуация наблюдается для $(6\text{-FAM})_2$. Почти двукратное сокращение времени жизни S_1 состояния в буферном растворе указывает на преимущественное образование тушащих комплексов Н-типа в возбужденном состоянии, хотя не исключается факт образования таких димеров и в основном состоянии.

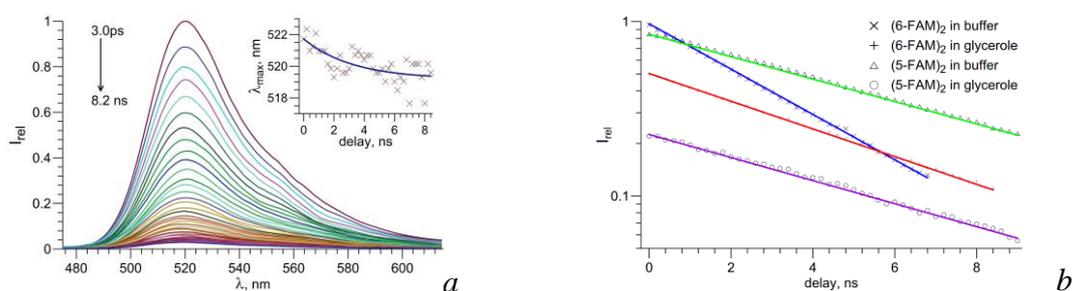


Рис. 2. – Спектры флуоресценции $(6\text{-FAM})_2$ в буферном растворе, измеренные с разной задержкой после возбуждающего импульса (на вставке – зависимость спектрального положения полосы флуоресценции от времени задержки) (*a*); кинетики нормированной интегральной интенсивности флуоресценции $(5\text{-FAM})_2$ и $(6\text{-FAM})_2$ в буферном растворе и в смеси с глицерином в соотношении 1: 0.33 (*b*).

Влияние температуры на излучение флуоресценции и спектральный сдвиг

Для понимания температурной зависимости излучения флуоресценции нами были приготовлены растворы как монофлуорофорных соединений, так и соответствующих бифлуорофоров. Результаты исследований показывают (рис. 3), что с увеличением температуры интенсивность флуоресценции (интегральная по спектру) понижается, а максимумы спектров флуоресценции смещаются в область более длинных волн. В приведенном интервале температур понижение интенсивности составляет 17 % для 6-FAM, 26 % для

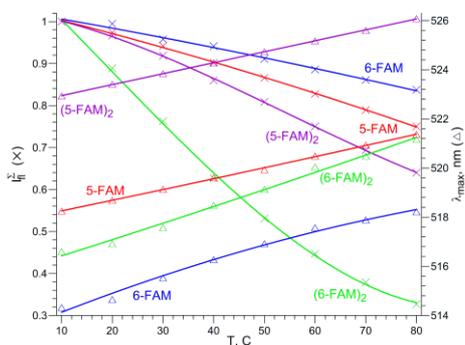


Рис. 3. – Температурная зависимость суммарной по спектру интенсивности флуоресценции и смещение максимумов спектров флуоресценции молекул 5-FAM, 6-FAM, 5-FAM-azide и 6-FAM azide в буферном растворе.

5-FAM, 36 % для (5-FAM)₂ и 68 % для (6-FAM)₂. Более того, для первых трех соединений падение интенсивности линейное, тогда как у (6-FAM)₂ очевидно сильное отклонение от линейности. Подобная картина наблюдается и в температурной зависимости смещения максимумов полос флуоресценции. Для мономерных соединений и (5-FAM)₂ сдвиг составляет 4.1 нм, а у (6-FAM)₂ – 4.9 нм. Понижение интенсивности при росте температуры для растворенного вещества является показателем увеличения безызлучательной дезактивации возбужденного S₁ состояния. Отклонение от линейности температурной зависимости интенсивности флуоресценции у (6-FAM)₂ свидетельствует о наличии дополнительных проявлений безызлучательных переходов в бифлуорофоре. Согласно вышеприведенным исследованиям, это связано с механизмами тушения флуоресценции в димерах Н-типа.

Заклучение

В работе проведены исследования по выяснению различия квантовых выходов флуоресценции стереоизомеров бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂.

Выполненные с помощью программы Gaussian 09 квантово-химические расчеты равновесных конфигураций молекул (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в основном состоянии с использованием полуэмпирического метода PM6 в воде показали, что равновесные конфигурации (5-FAM)₂ представляют собой развернутые структуры. Расстояние между центрами масс ксантеновых фрагментов при вращениях вокруг одинарных связей соответствует расстояниям 17–20 Å.

Оптимизация структуры (6-FAM)₂ обнаруживает для определенных конформаций сближение флуорофоров до расстояний 4.6 Å в основном состоянии. Это связано со стереометрией мономерной молекулы 6-FAM, у которой, в отличие от 5-FAM, ковалентная связь к линкеру смещена на 60°. Этот стерический фактор и служит причиной столь разительных флуоресцентных свойств обоих бифлуорофоров. Скрученные структуры в процессе конформационных переходов могут образовывать димеры Н-типа с последующим тушением энергии возбужденных состояний.

Литература

1. Povedailo V. A, Lysenko I. L, Tikhomirov S. A, Yakovlev D. L, Tsybulsky D. A, Kruhlik A. S, Fan F, Martynenko-Makaev Y. V, Sharko O. L, Duong P. V, Minh P. H, Shmanai V. V. Fluorescent properties of carboxyfluorescein bifluorophores. *J. Fluoresc.* 2020. Vol. 30, No. 3. P. 629–635.

Structural configurations and fluorescent properties of bifluorophores of 5- and 6- carboxyfluoresceins

V. A. Povedailo¹, I. L. Lysenko², Fan Fan², S. A. Tikhomirov¹, D. L. Yakovlev¹,
A. D. Shirokanov¹, V. V. Shmanay²

¹*B.I. Stepanov Institute of Physics of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk;*
e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

²*Institute of Physical and Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,*
Minsk

In this work, using the methods of stationary and ultrafast spectroscopy and theoretical calculations, the mechanism of fluorescence quenching of two stereoisomers of bifluorophores of 5- and 6-carboxyfluoresceins, (5-FAM)₂ and (6-FAM)₂, with significantly different quantum yields was elucidated. In the chromophore molecule (6-FAM)₂, in contrast to (5-FAM)₂, during conformational transitions with a rich set of degrees of freedom, two monomers can approach each other with the formation of collisional H-type complexes both in the ground and in excited states. The formation of a collisional complex for (6-FAM)₂ in an excited state leads to quenching of the fluorescence of the bifluorophore.

Key words: bifluorophore, fluorescence intensity, quenching, carboxyfluorescein