

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 - Физика

Изучение времен жизни флуоресценции свободного целентерамида методом
флуоресценции с временным разрешением

Руководитель _____

д.ф-м.н Кудряшева Н.С.

Выпускник _____

Чмурин А.Ю.

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Изучение времен жизни флуоресценции свободного целентерамида методом флуоресценции с временным разрешением» содержит 38 страниц текстового документа, 66 использованных источников, 8 рисунков, 1 таблицу, 5 формул.

ЦЕЛЕНТЕРАМИД, РАЗРЯЖЕННЫЙ ФОТОПРОТЕИН, ЦЕЛЕНТЕРАМИД-СОДЕРЖАЩИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК, ВРЕМЯ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, КОМПОНЕНТЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ВКЛАДЫ СПЕКТРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТ, ПЕРЕНОС ПРОТОНА.

Объект исследования – целентерамид.

Работа посвящена анализу спектральных характеристик флуоресценции целентерамида при постоянном и импульсном возбуждении с временным разрешением. Целентерамид-содержащие белки являются продуктом билюминесцентных реакций кишечнорастворимых, которые в последнее время находят широкое применение в медицинских и биологических исследованиях. Известно, что эти белки способны изменять цвет флуоресценции под действием различных факторов благодаря их фотохимической активности и способности образовывать несколько флуоресцентных эмиттеров. Для выявления физико-химических механизмов, лежащих в основе изменения цвета этих белков необходимо изучение флуоресцентных характеристик их флуорофора – целентерамида. Впервые исследована флуоресценция свободного целентерамида в метаноле с временным разрешением. Выявлены две экспоненциальные компоненты в спаде флуоресценции целентерамида с временами жизни 3,25 нс и 1,68 нс, которые приписаны депротонированной и протонированной формам целентерамида соответственно.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Люминесцентная спектроскопия.....	7
1.2 Метод флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением.....	10
1.3 Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки (разряженные фотопротеины).....	12
1.4 Спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротеинов.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	22
2.1. Реактивы.....	22
2.2 Приборы и установки.....	22
2.3. Регистрация спектров.....	23
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждения.....	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	30
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЦЛМ – целентерамид,

ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь,

НВМО – низшая вакантная молекулярная орбиталь,

GFP (Green Fluorescent Protein) – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки широко применяются для решения большого круга практических задач медицины и биологии. Они используются для имиджинга клеточных структур и визуализации физиологических процессов в клетках. В настоящее время известно достаточно много флуоресцентных белков (например, зеленый флуоресцентный белок – GFP и его аналоги), характеризующихся различными флуоресцентными свойствами. Кроме GFP-подобных, к группе флуоресцентных белков относятся целентерамид-содержащие белки (разряженные фотопротеины), которые присутствуют в светящихся морских кишечнополостных (медузах *Aequorea* [1] и *Phialidium* (*Clytia*) [2], гидроидном полипе *Obelia longissima* [3] и др.). Их флуорофором является молекула целентерамида (ЦЛМ), связанная нековалентно с белком внутри его гидрофобной полости.

Известно, что спектры фотолюминесценции фотопротеинов широкие, ассиметричные и включают несколько компонент (эммитеров), соответствующих различным формам ЦЛМ [4]. Под действием различных факторов соотношение компонент может меняться [5], а, следовательно, изменяться цвет флуоресценции. Для выявления физико-химических механизмов, лежащих в основе изменения цвета этих белков необходимо изучение флуоресцентных характеристик их флуорофора – ЦЛМ. В настоящее время, ведутся теоретические работы [6-10] по изучению электронных переходов в молекуле ЦЛМ с помощью квантово-химических методов. Проведены эксперименты с использованием спектроскопии с временным разрешением по изучению флуоресцентных свойств спектральных компонент фотолюминесценции разряженных фотопротеинов: обелина [11], акворина [11] и клитина [12]. Однако, в литературе нет экспериментальных данных по исследованию флуоресценции различных форм свободного ЦЛМ с помощью спектроскопии с временным разрешением.

Цель работы – проанализировать спектральные характеристики флуоресценции целентерамида при постоянном и импульсном возбуждении с временным разрешением.

Были поставлены следующие задачи:

1. Зарегистрировать спектры поглощения и флуоресценции целентерамида в метаноле при постоянном фотовозбуждении.
2. Зарегистрировать спад флуоресценции целентерамида с помощью метода флуоресцентной спектроскопии с наносекундным разрешением при различных длинах волн регистрации.
3. Проанализировать спад флуоресценции целентерамида. Определить: количество экспоненциальных компонент, их времена жизни и вклады при различных длинах волн регистрации.
4. Соотнести компоненты спада флуоресценции различным формам целентерамида.

Сочетание теоретических и экспериментальных данных обеспечит лучшее понимание природы фотофизических процессов, лежащих в основе изменения цвета флуоресценции как самих белков, так и их флуорофора - ЦЛМ. В дальнейшем это обеспечит возможность прогнозирования результатов токсического воздействия на ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Люминесцентная спектроскопия

Спектроскопия – область физики, посвящённая исследованию распределения интенсивности электромагнитного излучения по длинам волн или частотам. Методами спектроскопии исследуют уровни энергии и структуру атомов, молекул и образованных из них макроскопических систем, изучают квантовые переходы между уровнями энергии, взаимодействия атомов и молекул [13].

Среди всех физических процессов дезактивации возбужденных состояний проще всего поддается измерению испускание света (флуоресценция и фосфоресценция). Флуоресценция – излучательный переход между состояниями одинаковой мультиплетности [14]. Мультиплетность – характеристика электронных состояний молекул, определяемая по формуле: $M = 2S + 1$, где S – суммарный спин всех электронов молекулы [15]. Помимо испускания света флуоресценции возбужденное состояние может дезактивироваться и другими путями. Возможен безызлучательный переход на основной уровень, когда вся энергия электронного возбуждения переходит в теплоту. О безызлучательных процессах судят, как правило, по разности между поглощаемой и излучаемой энергиями.

Для измерения спектров испускания применяют флуориметры.

Различают спектры испускания и спектры возбуждения. Для съемки спектра испускания при постоянной длине волны возбуждающего света монохроматор возбуждения настраивают на длину волны в полосе поглощения вещества. Свет, испускаемый веществом, диспергируется монохроматором флуоресценции, образуя спектр. Регистрируется относительная интенсивность испускания как функция длины волны или волнового числа испускаемого света. Спектр возбуждения получают, когда

при фиксированной длине волны монохроматора флуоресценции изменяют длину волны возбуждения соответствующим монохроматором и регистрируют интенсивность испускания. Спектр возбуждения соответствует спектру поглощения, так как интенсивность испускания пропорциональна молярному коэффициенту экстинкции. Поглощение – это переход (при попадании фотона на молекулу) из основного состояния в возбужденное синглетное состояние. Как правило, такой процесс имеет длительность $\sim 10^{-15}$ с.

Положение максимума в спектре флуоресценции дает энергию наиболее вероятного синглетного перехода. Эти переходы можно идентифицировать, если спектры поглощения и флуоресценции построить на общей шкале длин волн. В идеальном случае полосы поглощения и флуоресценции, относящиеся к этому переходу, перекрываются. Обычно можно наблюдать различие между волновыми числами максимумов полос поглощения и флуоресценции – стоксов сдвиг:

$$\Delta E = h\nu_{\text{п}} - h\nu_{\text{ф}} = hc(1/\lambda_{\text{п}} - 1/\lambda_{\text{ф}}),$$

где h – постоянная Планка, $\nu_{\text{п}}$ – волновое число поглощения, $\nu_{\text{ф}}$ – волновое число флуоресценции, c – скорость света, $\lambda_{\text{п}}$ – длина волны поглощения, $\lambda_{\text{ф}}$ – длина волны флуоресценции.

По зависимости этой разницы от растворителя можно оценить изменение дипольного момента при переходе из основного состояния в возбужденное [14].

Для успешного применения флуоресцентных методов необходимо хорошее знание аппаратуры и умение обращать внимание на детали эксперимента. Для этого существуют две причины. Во-первых, флуоресценция – очень чувствительный метод. Почти всегда можно получать наблюдаемые сигналы, увеличив коэффициент усиления приборов. Однако, эти сигналы могут быть обусловлены не только используемым флуорофором:

наблюдаются сигналы фоновой флуоресценции растворителей, просачивающегося в прибор света, побочное рассеяние света от мутных растворов и т.д. Во-вторых, идеальных спектрофлуориметров не существует. Из-за неоднородного спектрального состава источников света и зависимости чувствительности монохроматоров и фотоумножителей от длины волны на приборах нельзя получить истинных спектров возбуждения и испускания. На измерения интенсивностей флуоресценции могут влиять также поляризация и анизотропия испускаемого света. Поэтому для получения надежных спектральных данных надо постоянно осуществлять контроль за многочисленными факторами [14].

Помимо флуоресцентных методов, в спектроскопии широко используются методы, основанные на поглощении света веществом. Основным законом в спектроскопии поглощения – закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon Cl},$$

где I – интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной l (см), I_0 – интенсивность света на входе в вещество, ε – коэффициент, характеризующий взаимодействие молекулы поглощающего растворенного вещества со светом ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), C – концентрация растворенного вещества (М).

Коэффициентом пропускания образца (T) называют отношение интенсивности света, прошедшего через образец, к интенсивности падающего на него света:

$$T = I/I_0.$$

Оптической плотностью образца называют десятичный логарифм величины, обратной коэффициенту пропускания T :

$$D = \lg(1/T) = -\lg T.$$

Подставляя определение оптической плотности в закон Бугера-Ламберта-Бера, получим зависимости коэффициента оптической плотности от толщины l поглощающего слоя и концентрации C растворенного поглощающего вещества:

$$D = \varepsilon Cl.$$

Оптическая плотность растворов прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Поэтому, измерив оптическую плотность раствора на определенной длине волны (например, вблизи максимума поглощения), можно определить концентрацию поглощающего вещества.

1.2 Метод флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением

Время затухания флуоресценции вещества обычно представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекула остается в возбужденном состоянии. Точное знание закона затухания флуоресценции может дать детальную информацию о взаимодействии флуорофора с его окружением. Например, многоэкспоненциальный закон затухания может быть результатом того, что молекулы флуорофора находятся в нескольких различных окружениях, либо в результате процессов, протекающих в возбужденных состояниях.

Существует два широко используемых метода измерения времен затухания флуоресценции: импульсный и фазово-модуляционный [14]. В импульсном методе возбуждающий свет – импульсный и имеет длительность импульса меньше, чем время жизни люминесценции. Излучение образца

определяется по ряду повторяющихся импульсов, при этом время получения данных фотонов распределяется по каналам. Люминесценция, вызванная рядом возбуждающих импульсов, дает кривую спада, по которой рассчитывается время жизни всех компонентов образца.

Рассмотрим подробнее импульсный метод, в котором возбуждение флуорофора бесконечно коротким импульсом света приводит к первоначальной заселенности возбужденного состояния флуорофоров (N_0). Скорость гибели первоначального возбужденных молекул равна:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + k)N(t) \quad , \quad (1)$$

где $N(t)$ – число возбужденных молекул спустя время t после возбуждения; γ – скорость испускания; k – константа скорости безызлучательной гибели. Подставляя начальное условие $N(t) = N_0$ при $t = 0$ и интегрируя уравнение (1), получаем:

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad , \quad (2)$$

где $\tau = (\gamma + k)^{-1}$ – время жизни возбужденного состояния.

Следовательно, интенсивность флуоресценции $I(t)$, которая пропорциональна заселенности возбужденного состояния $I(t) = \gamma N(t)$, затухает экспоненциально (рисунок 1а). Время затухания флуоресценции обычно приравнивают к времени, необходимому для уменьшения интенсивности в e раз по отношению к первоначальной величине, и оно равно $(\gamma + k)^{-1}$. Иначе говоря, время жизни можно определить по наклону зависимости $\ln(I(t))$ от t (рисунок 1б) [14].

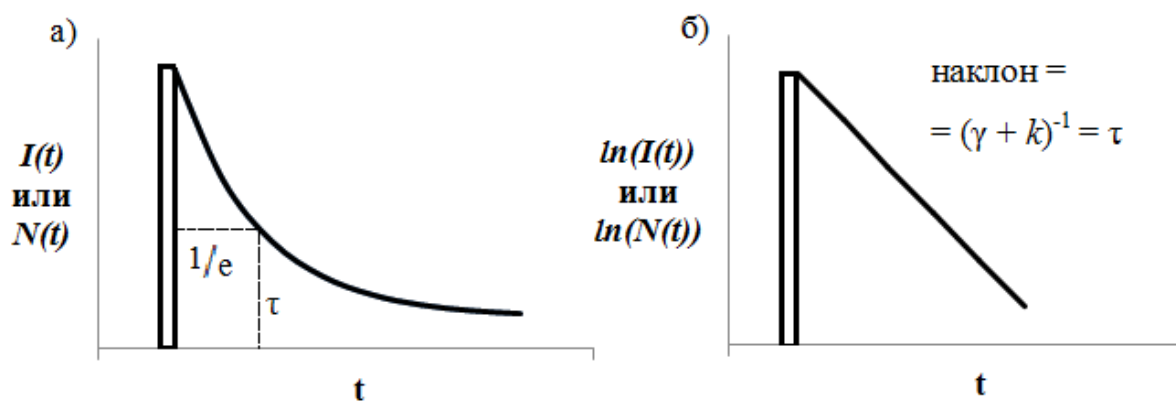


Рисунок 1 – Графическое изображение зависимостей в импульсных методах измерения времен жизни флуоресценции: а) зависимость интенсивности или числа возбужденных флуорофоров от времени; б) логарифмическая зависимость интенсивности (I) или числа возбужденных флуорофоров (N) от времени (t) [14]

1.3 Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки (разряженные фотопротеины)

Целентерамид-содержащие белки относятся к группе флуоресцентных белков, присутствуют в светящихся морских кишечнополостных (медузах *Aequorea* [1] и *Phialidium* (*Clytia*) [2], гидроидном полипе *Obelia longissima* [3] и др.). Их флуорофором является молекула целентерамида (ЦЛМ), связанная нековалентно с белком внутри его гидрофобной полости.

Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки являются продуктами биoluminesцентных реакций кишечнополостных. Из рисунка 2 видно, что в присутствии ионов кальция происходит реакция внутримолекулярного окислительного декарбоксилирования, продуктами которой являются CO_2 и целентерамид в возбужденном состоянии, релаксация которого сопровождается излучением кванта видимого света [16]. Поэтому ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки принято называть «разряженными фотопротеинами» [14].

Разряженные фотопротеины, в отличие от фотопротеинов, являются флуоресцентными белками и характеризуются эффективной сине-зеленой флуоресценцией. Известно, что в отсутствие Ca^{2+} для фотопротеинов характерен очень низкий уровень свечения – так называемая Ca^{2+} -независимая люминесценция [17], но при добавлении кальция интенсивность свечения возрастает в миллионы раз. Присоединение ионов кальция осуществляется за счет трех кальций-связывающих сайтов EF-hand типа [18]; существует также четвертая неактивная «EF-hand» последовательность, не способная связывать ионы кальция, так как она не содержит необходимых для выполнения этой функции аминокислотных остатков – аспарагиновую и глутаминовую кислоты [19].

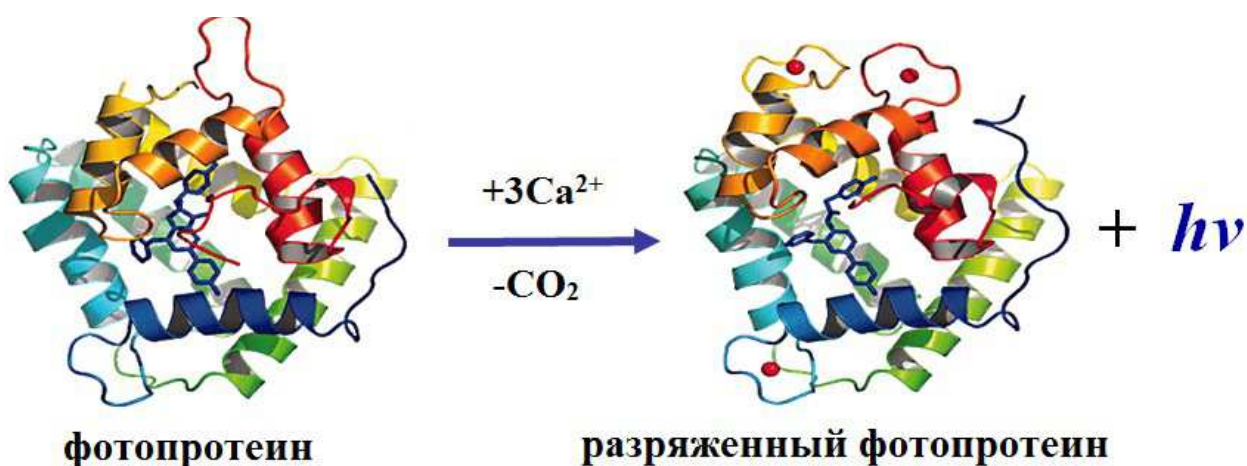


Рисунок 2– Схема билюминесцентной реакции кишечнополостных [5]. В центре структуры разряженного фотопротеина - молекула целентерамида. Красные кружки в структуре разряженного фотопротеина – ионы кальция

Использование билюминесценции фотопротеинов (обелина, акворина и др.) одно из важнейших направлений в билюминесцентном анализе, который является в настоящее время широко используемым экспрессным

методом биологического мониторинга окружающей среды [20-25].
Расширение использования в биомедицинских исследованиях фотопротеина обелина связано с наличием бактериального штамма-суперпродуцента и разработкой эффективной технологии получения рекомбинантного обелина [26]. Благодаря способности люминесцировать в присутствии ионов кальция, фотопротейн обелин успешно используется для мониторинга внутриклеточного кальция [16, 27, 28]. Фотопротеины позволяют измерять концентрацию ионов кальция в диапазоне примерно от 0,5 до 100 мкМ в случае обелина и от 0,3 до 20 мкМ в случае акворина [26, 29]. Поскольку в некоторых клеточных структурах, например, в митохондриях, концентрация Ca^{2+} значительно выше (~ 500 мкМ), то для мониторинга ионов кальция специально получены мутанты акворина с пониженной чувствительностью к кальцию [30]. Достоинствами обелина как индикатора кальция являются простота регистрации люминесцентного сигнала, устойчивость к внутриклеточному окружению и отсутствие токсичности. Обелин можно использовать не только в качестве биолюминесцентного [29], но и флуоресцентного (фотолюминесцентного) [31, 32] индикаторов ионов кальция, однако, диапазон измеряемых концентраций кальция в этом случае ниже. Помимо использования фотопротеина обелина в качестве индикатора внутриклеточного кальция, в целом ряде работ показана перспективность его применения в качестве меток в различных аналитических системах, прежде всего, в молекулярной диагностике – иммуноферментном [33, 34] и гибридном анализе [16, 35].

Разработан эффективный способ синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами и показана возможность использования полученных конъюгатов для иммуноанализа тиреотропного гормона, стимулирующего биосинтез тиреоидных гормонов щитовидной железой [33]. Показана возможность замены изотопной метки на безопасную биолюминесцентную обелиновую без потери качества анализа. Конъюгат обелина с авидином или стрептавидином может успешно использоваться в качестве репортерного

белка для выявления ДНК-фрагментов методом молекулярной гибридизации. При этом обелиновая биолюминесцентная метка обладает рядом преимуществ по сравнению с колориметрической [35]. Установлено, что репортерные молекулы на основе фотопротейна обелина могут быть получены генетическим слиянием с биоспецифическими полипептидами по его С-концу [36]. В работе [37] показано, что использование биолюминесцентных меток на основе фотопротейна обелина и целентеразин-зависимой люцефиразы *Renilla muelleri* для детекции продуктов реакции генотипирования.

На данный момент известны работы [38-40], в которых используются генетически слитые белковые пары «флуоресцентный белок – фотопротейн», например, GFP-акворин или GFP-обелин [41]. Такие белки имеют преимущества: улучшается общая стабильность фотопротейна, увеличивается квантовый выход свечения, спектр флуоресценции смещается в длинноволновую область на 40 нм в случае пары GFP-акворин [41], что актуально для практического применения таких белков в биомедицинских исследованиях.

В работе [5] предложено ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки использовать в качестве биологических маркеров с цветовой дифференциацией на токсическое воздействие различных соединений.

1.4 Спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротейнов

В данном разделе описаны известные теоретические и экспериментальные исследования флуоресцентных свойств ЦЛМ, которые были проведены как для свободного ЦЛМ и его аналогов, так и для комплекса ЦЛМ с белком (биолюминесценция и фотолюминесценция разряженных фотопротейнов).

В водных растворах ЦЛМ флуоресцирует слабо (465 нм), но в

органических растворителях – гораздо эффективнее; максимум его флуоресценции при переходе к органическому растворителю смещается в коротковолновую область до 380 нм [42], что логично приписать присутствию в неполярной среде неионизированной формы ЦЛМ.

Изучение свечения ЦЛМ и его аналогов в четырех различных растворителях (ДМСО, ацетонитриле, бензоле и н-бутаноле) показало, что ЦЛМ может образовывать четыре различные флуоресцентные формы (рисунок 3): неионизированную форму (или протонированную) и три ионизированные формы (амид анион, комплекс с частичным переносом протона, резонансная структура фенолят-пиразин-N(4) анион) [4, 43].

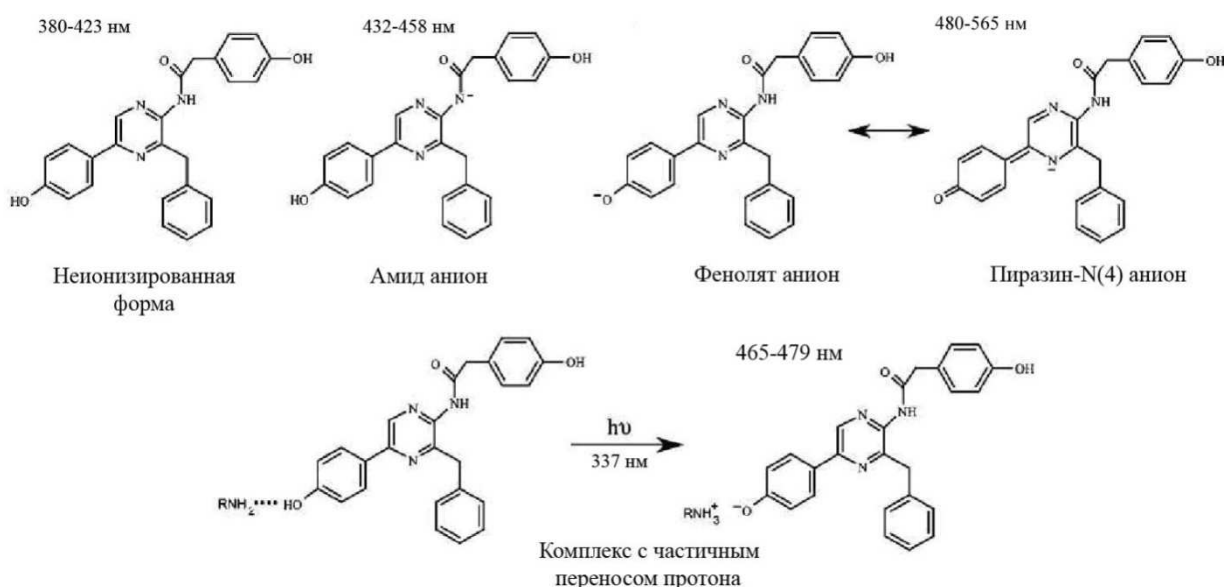


Рисунок 3 – Флуоресцентные эмиттеры целентерамида [4]

Ионизированная (депротонированная) форма ЦЛМ образуется из неионизированной (протонированной) в результате фотохимического процесса переноса протона во флуоресцентном состоянии. На рисунке 4 схематично показаны различные флуоресцентные состояния энергий протонированной и депротонированной форм ЦЛМ [44]. Флуоресцентные формы ЦЛМ различаются энергий флуоресцентных состояний, а,

следовательно, и цветом люминесценции.

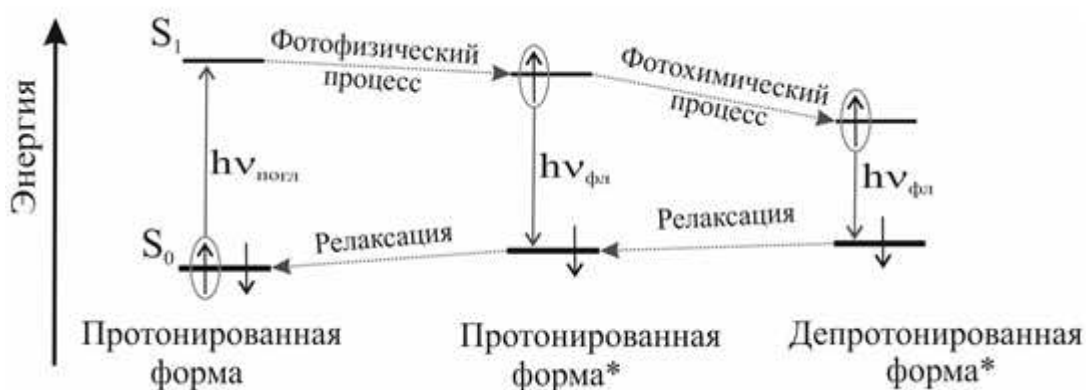


Рисунок 4 – Схема фотофизических и фотохимических процессов, инициирующих образование флуоресцентных состояния целентерамида в разряженном обелине [44]

В разряженных фотопротеинах ЦЛМ связан с полипептидом (апобелком), что усложняет понимание механизма образования эмиттеров биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов.

При изучении модельных хемилюминесцентных реакций в растворах амид анион был идентифицирован как первичное возбужденное состояние [45]. Далее Хори с коллегами [46] провели исследования хемилюминесцентных свойств ряда аналогов целентеразина. На основании спектрального сходства флуоресценции амид аниона и биолюминесценции акворина сделан вывод о том, что амид анион является эмиттером биолюминесценции акворина. В работе профессора Шимомура [4] также предполагалось, что эмиттером флуоресценции акворина, помимо протонированной формы ЦЛМ, может быть амид анион, максимум флуоресценции которого наблюдается при 435-458 нм.

Однако следует отметить, что в случае биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов, в отличие от модельных экспериментов с ЦЛМ и его аналогами, флуорофор находится в окружении аминокислотных остатков и взаимодействует с ними через систему водородных связей. В этих

условиях весьма вероятен перенос протона, который будет менять структуру молекулы излучателя. Известно, что биоломинесценция обелина, в отличие от акворина (465 нм [47]), имеет более длинноволновый максимум 485 нм и коротковолновое плечо около 400 нм [29], которое, вероятно, соответствует излучению протонированной формы ЦЛМ. Это согласуется с работами, в которых при замене аминокислоты Trp92 на Phe в обелине [48, 49] и Trp86 в акворине [50] было подтверждено, что часть возбужденных молекул ЦЛМ находится в протонированном состоянии.

В дальнейших работах в качестве эмиттеров люминесценции фотопротеинов были предложены протонированная форма ЦЛМ и фенолят анион. Хирано и его коллеги, изучая флуоресценцию аналогов целентерамида [43] предположили, что, эмиттером биоломинесценции акворина является фенолят анион, а не амид анион, как считалось ранее. В других работах [7, 51] также подтверждается, что амид анион не может претендовать на роль эмиттера люминесценции фотопротеинов.

В работе Томилина [52] показано, что спектр биоломинесценции обелина определяется положением протона между атомом кислорода фенольного фрагмента ЦЛМ и атомом азота His22. Затем, в работе Антипиной [53] с помощью квантово-химических методов показано, что спектр фотолюминесценции обелина зависит от положения протона между ЦЛМ и His22, в связи с этим на роль эмиттера предложено ион-парное состояние фенолят аниона ЦЛМ (комплекс с переносом протона).

Квантово-химические расчеты, показывают, что в белке вероятность полного отрыва протона от фенольной группы ЦЛМ (переход протона к гистидину) очень мала [52, 53]. Это согласуется с тем, что фенольная группа характеризуется более выраженными кислотными свойствами в первом синглетном возбужденном состоянии, чем в основном состоянии [54]. В возбужденном состоянии значение pK^* фенольной группы ЦЛМ падает по сравнению с основным состоянием [4] и может быть даже ниже, чем pK гистидина (6,5) [51]. Поэтому быстрый перенос протона с образованием

возбужденной фенольной ионной пары (комплекса с частичным переносом протона) вполне вероятен. Это подтверждается данными по влиянию рН и D₂O на бимодальный спектр [51], а также наблюдаемыми изменениями в спектрах биолюминесценции, происходящими в результате замен аминокислот в окружении 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина [55, 56].

Также известно, что фенолят анион ЦЛМ может существовать в различных резонансных формах в зависимости от полярности растворителя. Максимумы флуоресценции различных ионных форм фенолят аниона в растворе варьируются в диапазоне от 452 до 615 нм [57], что включает в себя диапазон люминесценции (биолюминесценции и фотолюминесценции) различных фотопротеинов.

Позднее были проведены эксперименты с использованием спектроскопии с временным разрешением по изучению флуоресцентных свойств спектральных компонент фотолюминесценции разряженных фотопротеинов: обелина и акворина [11]. На рисунке 5 представлены кривые затухания флуоресценции разряженных фотопротеинов, зарегистрированные на различных длинах волн. Из рисунка 5 видно, что спады флуоресценции описываются несколькими экспонентами и зависят от регистрации длины волны регистрации. В случае обелина видно, что данный белок более стабильный и спад его флуоресценции меньше, по сравнению с акворином. В этой работе установлено, что при пикосекундном разрешении во флуоресценции разряженных фотопротеинов акворина и обелина наблюдаются две компоненты: одна с более высокой энергией ($\sim 25000 \text{ см}^{-1}$), соответствующая протонированной форме ЦЛМ, и вторая с более низкой энергией – 19400 см^{-1} для обелина и 21300 см^{-1} для акворина. Время жизни ($t_{1/2}$) флуоресцентных форм для второй компоненты составляет 4 нс в обоих случаях, а для первой компоненты ~ 2 пс для разряженного обелина и 30 пс для разряженного акворина.

В работе [9] были изучены конформационные состояния

протонированной формы ЦЛМ и фенолят аниона. Сделан вывод, что наиболее вероятным первичным возбужденным состоянием продукта хемилюминесценции и биолюминесценции является протонированная форма ЦЛМ.

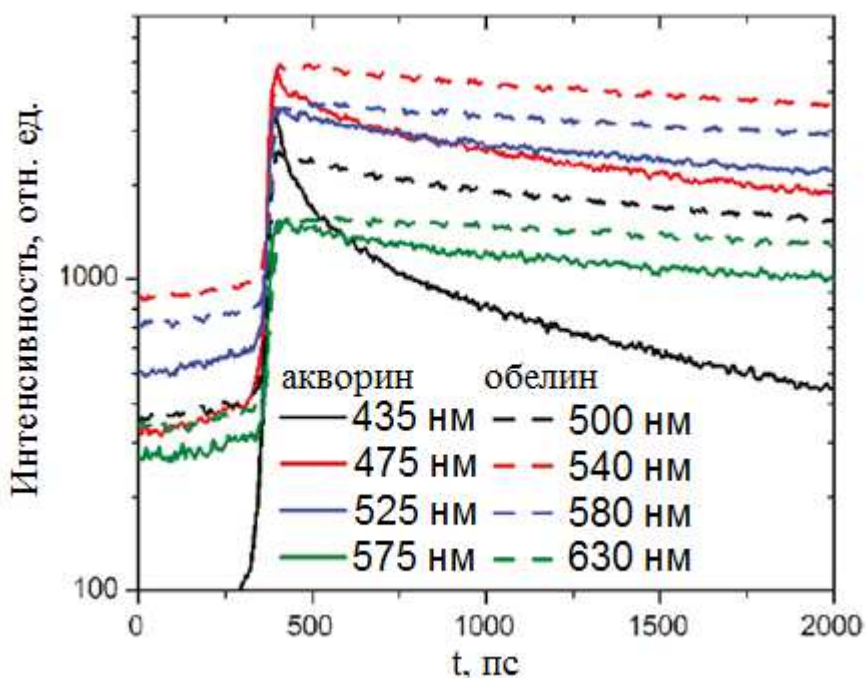


Рисунок 5 – Кривые затухания флуоресценции разряженных фотопротеинов: акворина (сплошная линия) и обелина (пунктирная линия), зарегистрированные на различных длинах волн [11]

В работе [58] проведен квантово-химический расчет структур, участвующих в процессе протонирования ЦЛМ в белке. Для расчетов были использованы параметры кристаллической структуры 2F8P, соответствующей обелину, разряженному кальцием. Было установлено, что протонированная и депротонированная (фенолят анион) формы ЦЛМ формируются с участием ВЗМО и НВМО, ВЗМО+1, причем переход ВЗМО → НВМО для протонированной формы более эффективен [58].

В работе [44] продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина) и свободного

ЦЛМ (в метаноле) зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм) возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области с максимумами 330-350 нм. Квантово-химические расчеты показывают, что данное излучение формируется с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов молекулы ЦЛМ. В этот процесс вовлечены электронные переходы с участием вакантных и занятых молекулярных орбиталей разных энергий (НВМО+1, ВЗМО, ВЗМО-2, ВЗМО-3). Эти данные дополняют исследования других ученых [9, 59, 60], в работах которых говорилось только о длинноволновой полосе во флуоресценции целентерамида. В работе [44] также было сделано предположение, что, целентерамид может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния. Квантовый выход флуоресценции ЦЛМ в метаноле при фотовозбуждении 270-340 нм равен $0,028 \pm 0,005$ [42, 44], что ниже квантового выхода разряженного обелина (0,17 [48]) и акворина (0,12 [60, 61]).

Таким образом, образование эмиттеров люминесценции (биолюминесценции и фотолюминесценции) фотопротеинов сопровождается переносом протона в возбужденном состоянии ЦЛМ и контролируется аминокислотными остатками активного центра белка. Эмиттерами люминесценции являются протонированная и депротонированная формы ЦЛМ. Вклад этих форм в спектрах флуоресценции разряженных фотопротеинов зависит от эффективности фотохимического процесса (переноса протона) (рисунок 4) и регулируется микроокружением.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

Для приготовления рабочих растворов использовали следующие реактивы:

- целентерамид (NanoLight, США),
- метанол (х.ч., Химреактивснаб, РФ).

2.2 Приборы и установки

Для записи спектров поглощения использовали двулучевой регистрирующий спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, США). Для регистрации спектров применяли кварцевую кювету с прямоугольным сечением (2x10 мм). Концентрацию целентерамида в метаноле определяли спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента экстинкции при длине волны 332 нм $15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [62], которая составила $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Для регистрации флуоресценции при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3–22 (HoribaJobinYvon, США), оснащенный приставкой для измерения спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Стационарные спектры регистрировали при возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 295 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции регистрировали при возбуждении импульсным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса 1,2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 390–470 нм с шагом 5 нм, разрешение составляло 7 пс/канал. Времена жизни выделяли с помощью метода деконволюции [63], для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox

(коллоидная окись кремния).

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Fluorolog3 (HORIBA Jobin Yvon, США). В качестве источника возбуждения использована широкополосная ксеноновая лампа (450 Вт), которая излучает свет длиной волны от 240 нм до 850 нм для возбуждения образца. Размер щели – 3,3 нм. Для регистрации люминесценции использовали кварцевую кювету с прямоугольным сечением 2x10 мм.

2.3. Регистрация спектров

Спектры поглощения целентерамида в метаноле регистрировали в интервале длин волн 200-700 нм, испускания – в интервале длин волн 200-700 нм при фотовозбуждении 296 нм.

Все эксперименты проводили при фиксированной температуре 25°C.

Спектры флуоресценции были скорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя. Наборы кривых спада флуоресценции каждого образца при регистрации в диапазоне 390– 470 нм были проанализированы методами глобального анализа [64]. Качество описания оценивалось по статистическим критериям – χ^2 .

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (3)$$

где τ_i – время жизни, α_i – амплитудный коэффициент i -й компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в общее время жизни определяли с помощью следующего выражения:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (4)$$

Спектры, ассоциированные с временами жизни, $I(\lambda, \tau_i)$, рассчитывали по следующей формуле:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (5)$$

где $I_{ss}(\lambda)$ – стационарный спектр флуоресценции, $f_i(\lambda)$ – вклад i -й компоненты времени жизни на длине волны λ .

Анализ и обработку результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal OriginPro 8.1.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением впервые применен для изучения характеристик свободного целентерамида в метаноле. Выявлены две экспоненциальные компоненты в спаде флуоресценции целентерамида с временами жизни 3,25 нс и 1,68 нс. Восстановленные спектры флуоресценции этих двух форм характеризуются максимумами в интервалах 410-430 нм и 435-455 нм соответственно.

Две компоненты в спаде флуоресценции целентерамида приписаны двум эмиттерам, которые соответствуют протонированной (1,68 нс) и депротонированной (3,25 нс) формам целентерамида.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shimomura, O. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates / O. Shimomura, F.H. Johnson // PNAS USA. – 1975. – V. 72 (4). – P. 1546-1549. 121.
2. Levine, L. D. Isolation and characterization of a photoprotein “phialidin” and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium* / L. D. Levine, W. W. Ward // Comp. Biochem. Physiol. – 1982. – V. 72. – P. 77-85.
3. Высоцкий, Е. С. Выделение и очистка Ca^{2+} -зависимого фотопротеина – обелина из гидроидных полипов *Obelia longissima* / Е. С. Высоцкий, В. С. Бондарь, В. Н. Летунов // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 965-973. 7
4. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence. – 2000. – V. 15. – P. 51-58
5. Алиева, Р. Р. Влияние внешних физико-химических факторов на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротеина обелина: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.02 / Алиева Роза Ришатовна. – Красноярск, 2016. – 120 с.
6. Liu, Z.J. Structure of the Ca^{2+} - regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z.J. Liu, E.S. Vysotski, C.J. Chen, J.P. Rose, J. Lee, B.C. Wang // J. Protein Science, 2000. - V. 9, N 11. - P. 2085-2093.
7. Liu, Z. J. Crystal structure of obelin after Ca^{2+} -triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state / Z. J. Liu, G. A. Stepanyuk, E. S. Vysotski, J. Lee, S. V. Markova, N. P. Malikova, B. C. Wang // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103. – P. 2570-2575.
8. Chen, R. F. Fluorescence quantum yield of tryptophan and tyrosine / R. F. Chen // Analytical Letters. – 1967. – V.1 – P. 35-42.

9. Chen, S.-F. Chemiluminescence of coelenterazine and fluorescence of coelenteramide: a systematic theoretical study / S.-F. Chen, I. Navizet, D. RocaSanjua, R. Lindh, Y.-J. Liu, N. Ferre // *J. Chem. Theory Comput.* – 2012. – V. 8. – P. 2796-2807.
10. Alieva, R. R. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramide containing fluorescent proteins. Experimental and theoretical study / R. R. Alieva, F. N. Tomilin, A. A. Kuzubov, S. G. Ovchinnikov, N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* – 2016. – V. 162. – P. 318-323.
11. Laptенок, S. P. Disentangling picosecond events that complicate the quantitative use of the calcium sensor YC3. 60 / S. P Laptенок., I.H. van Stokkum, J.W. Borst, B. van Oort, A.J. Visser, H. van Amerongen // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2012. – T. 116. – №. 9. – С. 3013-3020.
12. Malikova, N. P. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria* is an obligate dimer and does not form a stable complex with the Ca²⁺-discharged photoprotein clytin / [N. P. Malikova](#), [N. V. Visser](#), [A. van Hoek](#), [V. V. Skakun](#), [E. S. Vysotski](#), [J. Lee](#), [A. J. W. G. Visser](#) // *Biochemistry.* – 2011. – T. 50. – №. 20. – С. 4232-4241.
13. Юков, Е. А. Спектроскопия // *Физическая энциклопедия* / Гл. ред. А. М. Прохоров. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1994. — Т. 4. — С. 625.
14. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович; пер. с англ. под редакцией М. Г. Кузьмина. – Москва: Мир, 1986. – 496 с.
15. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолуминесцентного анализа: учеб. пос. / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск: КГУ, 2002. – 154 с.
16. Высоцкий, Е. С. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных / Е. С. Высоцкий, С. В. Маркова, Л. А. Франк // *Молекулярная биология.* – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 404-417.
17. Allen, D. G. Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium

concentration - a calcium independent component / D. G. Allen, J. R. Blinks, F. G. Prendergast // *Science*. – 15. – V. 195. – P. 996-998.

18. Deng, L. All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin / L. Deng, E. S. Vysotski, S. V. Markova, Z. J. Liu, J. Lee, J. Rose, B. C. Wang // *J. Protein Science*. – 2005. – V. 14. – P. 663-675.

19. Strynadka, N. C. J. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins / N. C. J. Strynadka, M. N. G. James // *Annu. Rev. Biochem.* – 1989. – V. 58. – P. 951-998.

20. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – V. 608 (1). – P. 2-29. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.008.

21. Ugarova, N. N. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH / N. N. Ugarova, L. G. Maloshenok, I. V. Uporov, M. I. Koksharov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – V. 70. – I. 11. – P. 1262-1267.

22. Исмаилов, А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80, № 6. – С. 867-881.

23. Ломакина, Г. Ю. Биолюминесцентная детекция жизнеспособности клеток / Г. Ю. Ломакина, Ю. А. Модестова, Н. Н. Угарова // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80, № 6. – С. 829-844.

24. Efremenko, E. N. Biosensitive element in the form of immobilized luminescent photobacteria for detecting ecotoxicants in aqueous flow-through systems / E. N. Efremenko, O. V. Maslova, A. V. Kholstov, O. V. Senko, A. D. Ismailov // *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. – 2016. – V. 31, № 6. – P. 1283-1289.

25. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. – 2015. – V. 18 (10). – P. 952-959.

26. Illarionov, B. A. Recombinant obelin: Cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator / B. A. Illarionov, L. A. Frank, V. A. Illarionova, V. S. Bondar, E. S. Vysotski, J. R. Blinks // *Methods of enzymology*. – 2000. – V. 305. – P. 223-249.
27. Campbell, A. K. Coelenterate photoproteins as indicators of cytoplasmic free Ca²⁺ in small cells / A. K. Campbell, R. L. Dormer, M. B. Hallet // *Cell Calcium*. – 1985. – V. 6. – P. 69-82.
28. Бондарь, В. С. Получение, свойства и применение кальций-чувствительного фотопротейна из гидроида *Obelia longissima* / В. С. Бондарь, Е. С. Высоцкий, И. А. Гамалей, А. Б. Каулин // *Цитология*. – 1990. – Т. 33. – С. 57-66.
29. Markova, S. V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-regulated photoproteins / S. V. Markova, E. S. Vysotski, J. R. Blinks, L. P. Burakova, B.-C. Wang, J. Lee // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 2227-2236.
30. Kendall, J.M. Engineering the Ca²⁺-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium / J. M. Kendall, G. Sala-Newby, V. Ghalaut, R. L. Dormer, A. K. Campbell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – V. 187. – P. 1091-1097.
31. Zhao, Y. CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation / Y. Zhao, Y. Shi, W. Zhao, X. Huang, D. Wang, N. Brown, J. Brand, J. Zhao // *PNAS USA*. – 2005. – V. 102. – P. 5744-5748.
32. Belogurova, N. V. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities / N. V. Belogurova, N. S. Kudryasheva // *Journal of photochemistry and photobiology*. B. – 2010. – V. 101. – P. 103-108.
33. Франк, Л. А. Синтез конъюгантов Ca²⁺-регулируемого фотопротейна обелина с иммуноглобулинами и их использование в качестве меток в иммуноанализе / Л. А. Франк, А. И. Петунин, Е. С.

- Высоцкий // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30, № 4. – С. 364-368.
34. Frank, L. A. Ca^{2+} -Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters / L. A. Frank // *Sensors*. – 2010. – V. 10. – P. 11287-1130.
35. Борисова, В. В. Высокочувствительный и быстрый метод выявления ДНК фрагментов с использованием фотопротейна обелина как репортера / В. В. Борисова, И. А. Пышная, Д. В. Пышный, Л. А. Франк // *Биоорганическая химия*. – 2008. – Т. 34, № 6. – С. 792-798.
36. Eremeeva, E. V. Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin as N-terminal partner in the fusion proteins / E. V. Eremeeva, L. A. Frank, S. V. Markova, E. Vysotski // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2010. – V. 4. – P. 372-383.
37. Красицкая, В. В. Выявление аллельных вариантов гена с помощью биолюминесцентных репортеров / В. В. Красицкая, Л. П. Буракова, И. А. Пышная, Л. А. Франк // *Биоорганическая химия*. – 2012. – Т. 38, №3. – С. 342350.
38. Gorokhovatsky, A.Y. Fusion of *Aequorea victoria* GFP and aequorin provides their $\text{Ca}(2^+)$ -induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer / A.Y. Gorokhovatsky, V.V. Marchenkov, N.V. Rudenko, T.V. Ivashina, V.N. Ksenzenko, N. Burkhardt, G.V. Semisotnov, L.M. Vinokurov, Y.B. Alakhov // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – Т. 320. – №. 3. – С. 703-711.
39. Rodriguez-Garcia, A. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca^{2+} in organelles / Rodriguez-Garcia, J. Rojo-Ruiz, P. Navas-Navarro, F.J. Aulestia, S. Gallego-Sandin, J. Garcia-Sancho, M. T. Alonso // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Т. 111. – №. 7. – С. 2584-2589.
40. Bakayan, A. Fluorescent protein-photoprotein fusions and their applications in calcium imaging / A. Bakayan, B. Domingo, C.F. Vaquero, N. Peyrieras, J. Llopis // *Photochemistry and Photobiology*. – 2016. – Т. 93. – №. 2. – С. 448-465.
41. Baubet, V. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca^{2+} reporters at the single-cell level / V. Baubet, M.H. Le, A.K. Campbell, E.

Lucas-Meunier, P. Fossier, P. Brule // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – T. 97. – №. 13. – C. 7260-7265.

42. Saito, R. Solvent and substituent effects on the fluorescent properties of coelenteramide analogues / R. Saito, T. Hirano, H. Niwa, M. Ohashi // Journal of the chemical society, Perkin transactions 2. – 1997. – P. 1711-1716.

43. Imai, Y. Fluorescence properties of phenolate anions of coelenteramide analogues: the light-emitter structure in aequorin bioluminescence / Y. Imai, T. Shibata, S. Maki, S. Niwa, M. Ohashi, T. Hirano // Photochem. Photobiol. A. – 2001. – V. 146. – P. 95-107.

44. Alieva, R. R. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramidecontaining fluorescent proteins. Experimental and theoretical study / R. R. Alieva, F. N. Tomilin, A. A. Kuzubov, S. G. Ovchinnikov, N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – V. 162. – P. 318-323.

45. McCapra, F. The chemiluminescence of Cypridina analogue / F. McCapra, Y. C. Chang // Chem. Commun. – 1967. – P. 1011-1012.

46. Hori, K. Chemiluminescence of Renilla (sea pansy) luciferin and its analogues / K. Hori, J. E. Wampler, M. J. Cormier // J. Chem. Commun. – 1973. – P. 492-494.

47. Shimomura, O. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems / O. Shimomura // J. Symp. Soc. Exp. Biol. – 1985. – V. 39. – P. 351-422.

48. Deng, L. Structural basis for the emission of violet bioluminescence from a W92F obelin mutant / L. Deng, E. S. Vysotski, Z. J. Liu, S. V. Markova, N. P. Malikova, J. Lee, J. Rose, B. C. Wang // J. FEBS Letters. – 2001. – V. 506. – P. 281-285.

49. Vysotski, E. S. Violet bioluminescence and fast kinetics from W92F obelin: structure-based proposals for the bioluminescence triggering and the identification of the emitting species / E. S. Vysotski, Z. J. Liu, S. V. Markova, J. R. Blinks, L. Deng, L. A. Frank, M. Herko, N. P. Malikova, J. P. Rose, B. C. Wang, J. Lee // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 6013-6024.

50. Ohmiya, Y. Two excited states in aequorin bioluminescence induced by tryptophan modification / Y. Ohmiya, M. Ohashi, F. I. Tsuji // *FEBS Lett.* – 1992. – V. 301. – P. 197-201.
51. Vysotski, E. S. Ca²⁺-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E. S. Vysotski, J. Lee // *Acc. Chem. Res.* – 2004. – V. 37. – P. 405-415.
52. Tomilin, F. N. Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation / F. N. Tomilin, L. U. Antipina, E. S. Vysotski, S. G. Ovchinnikov, I. I. Gitelzon // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 422. – P. 279-284
53. Антипина, Л. Ю. Теоретическое моделирование процесса флуоресценции и формирование излучающего субстрата белка обелина / Л. Ю. Антипина, С. Г. Овчинников // *В мире научных открытий, Физико-математические науки.* – 2010. – № 5 (11). – С. 35-37.
54. Turro, N. J. *Modern molecular photochemistry* / N. J. Turro. – California: University science book, 1991. – 620 p.
55. Malikova, N. P. Spectral tuning of obelin bioluminescence by mutations of Trp92 / N. P. Malikova, G. A. Stepanyuk, L. A. Frank, S. V. Markova, E. S. Vysotski, J. Lee // *FEBS Letters.* – 2003. – № 554. – P. 184-188.
56. Stepanyuk, G. A. Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein / G. A. Stepanyuk, S. Golz, S. V. Markova, L. A. Frank, J. Lee, E. S. Vysotski E.S. // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 1008-1014
57. Mori, K. Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair / K. Mori, S. Maki, H. Niwa, H. Ikeda, T. Hirano // *Tetrahedron.* – 2006. – V. 62. – P. 6272-6288.
58. Li, Z.-S. The dynamics simulation and quantum calculation investigation about luminescence mechanism of coelenteramide / Z.-S. Li, X. Zhao, L.-Y. Zou, A.-M. Ren // *Photochemistry and photobiology.* – 2013. – V. 89. – P. 849-855.

59. Min, C. The fluorescent properties of coelenteramide, a substrate of aequorin and obelin/ C. Min, Z. Li, A. Ren, L. Zou, J. Guo, J.D. Goddard // *Journal of photochemistry and photobiology. A-Chemistry*. – 2013. – V. 251. – P. 182-188.
60. Morise, H. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*/ H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson, J. Winant // *Biochemistry*. – 1974. – V. 13. – P. 2656-2662.
61. Chalfie, M. *Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols* / M. Chalfie, S. R. Kain. – 2 ed. – V. 47. – New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2005. – 488 p. DOI: 10.1002/0471739499
62. Shimomura, O. *Bioluminescence: chemical principles and methods* / O. Shimomura. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2006. – 470 p.
63. Ameloot, M. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves / M. Ameloot, H. Hendrickx // *Biophysical journal*. – 1983. – T. 44. – №. 1. – С. 27-38.
64. Knutson, J. R. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves: a global approach / J. R. Knutson, J. M. Beechem, L. Brand // *Chemical physics letters*. – 1983. – T. 102. – №. 6. – С. 501-507.
65. Roy, K. Predictive QSPR modeling of the acidic dissociation constant (pKa) of phenols in different solvents/ K. Roy, P. L. A. Popelier // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2009. – V. 22. – P. 186-196.
66. Немцева, Е.В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции белков разной сложности / Е.В. Немцева, О.О. Лащук, М.А. Герасимова // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61. – №. 2. – С. 231-238.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Врашан

« до » июня 20 ___ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 - Физика

Изучение времен жизни флуоресценции свободного целентерамида методом
флуоресценции с временным разрешением

Руководитель

Кудряшева Н.С.

д.ф-м.н Кудряшева Н.С.

Выпускник

Чмурин А.Ю.

Чмурин А.Ю.

Красноярск 2017