

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Кратасюк В.А.

«_____» _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

Спектрально-люминесцентные характеристики нового флуоресцентного зонда
– молекулярного ротора

Руководитель

доцент, к.ф.-м.н.

Е.В. Немцева

Выпускник

И.В. Шахматов

Красноярск, 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Спектрально-люминесцентные характеристики нового флуоресцентного зонда – молекулярного ротора» содержит 36 страниц текстового документа, 19 иллюстраций, 1 таблицу, 5 формул, 28 использованных источников.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ЗОНД, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ РОТОР, ВЯЗКОСТЬ, СВЕТЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.

Цель исследования: сравнить характеристики нового флуоресцентного зонда RY3(I) со свойствами близкого аналога RY3, а также оценить его применимость для определения внутриклеточной вязкости светящихся бактерий.

Задачи:

1. Сравнить со свойствами RY3:

- положение спектров поглощения и испускания флуоресценции,
- квантовый выход флуоресценции,
- зависимость оптических характеристик от вязкости растворителя.

2. Изучить взаимодействие зонда с бактериальными клетками.

В результате исследования было установлено, что положение полос поглощения и флуоресценции нового зонда RY3(I), квантовый выход флуоресценции близки с опубликованными данными для RY3. Зонд RY3(I) проявляет свойства молекулярного ротора: показатель степени x в уравнении Фёрстера-Хоффмана по $I_{650} \sim 0,48$. Зонд RY3(I) характеризуется большим соотношением I_{650}/I_{456} , чем RY3 (426 vs 12.6, в глицерине), что затрудняет его применение как ратиометрического зонда. Зонд RY3(I) взаимодействует с бактериями *P. phosphoreum*, демонстрируя при этом повышение квантового выхода, характерное вязкости 2,7 сП.

Содержание

Введение	4
1. Принципы флуоресцентного зондирования (литературный обзор).....	5
1.1. Флуоресцентное зондирование биологических и биохимических объектов	5
1.2. Молекулярные ротаторы: принципы работы, разновидности	9
1.3. Спектральные свойства молекулярного ротатора RY3	13
2. Материалы и методы	18
2.1. Реактивы и образцы	18
2.2. Оборудование	18
2.3. Методика эксперимента.....	19
2.4. Обработка данных.....	20
3. Результаты и обсуждение	22
3.1. Свойства нового молекулярного ротатора RY3(I).....	22
3.2. Чувствительность RY3(I) к вязкости	27
3.3. Взаимодействие RY3(I) с бактериями	29
Заключение	32
Список сокращений	33
Список использованных источников	34

Введение

Для изучения характера протекания ферментативных процессов во внутриклеточных условиях актуальной задачей является определение физико-химических характеристик микроокружения ферментов в цитоплазме на разных стадиях развития клетки, при различных внешних воздействиях и т.п. Экспериментальную оценку вязкости внутриклеточной среды можно проводить с помощью специальных флуоресцентных зондов – молекулярных роторов. В данной работе были изучены спектральные свойства молекулярного ротора RY3(I), аналог которого был использован для вычисления внутриклеточной вязкости [1].

Вязкость, измеряемая внутри живых клеток с использованием молекулярных роторов, может являться достаточно чувствительным параметром, характеризующим микроокружение ферментативных систем. Описание движения жидкости в цитозоле позволяет определить направление упорядочения компонентов клетки, ферментов и питательных веществ, а величина сопротивления потоков – установить скорости распространения веществ внутри клетки.

Метод флуоресцентного зондирования, примененный в данной работе, эффективен для исследования физико-химических параметров в микроскопических масштабах, поскольку чаще всего флуоресцентные зонды используются в тех случаях, когда приборы не имеют подходящей разрешающей способности, а зонды, в противовес, способны проникать в межклеточные и внутриклеточные пространства и давать хороший отклик при взаимодействии, отражающийся в изменении характеристик флуоресценции.

Целью данного исследования являлось сравнение характеристик нового флуоресцентного зонда RY3(I) со свойствами близкого аналога – RY3, а также оценка его применимости для определения внутриклеточной вязкости светящихся бактерий.

1. Принципы флуоресцентного зондирования (литературный обзор)

1.1. Флуоресцентное зондирование биологических и биохимических объектов

Флуоресцентная спектроскопия – это один из важнейших аналитических методов, использующийся в биологических исследованиях. За последние двадцать лет произошло значительное усовершенствование функциональных характеристик оборудования, которое применяется в спектральном анализе. Так, теперь представляется возможным детектировать отдельные фотоны и флуоресцирующие молекулы (флуорофоры) [2]. По получаемым в результате экспериментов спектральным данным делают выводы о том, как устроены биологические молекулы, какие изменения могут с ними происходить при внешних воздействиях, при взаимодействии флуорофоров с растворителями с разными показателями рН, полярности, вязкости и т.д.

Анализ с помощью флуоресцентного зондирования является удобным и достаточно простым методом изучения биологических систем, в частности с использованием зондов-красителей. Например, существуют такие флуоресцентные молекулы, которые способны изменять свою пространственную конфигурацию при их добавлении в растворитель. Такими молекулами могут быть мезо-замещенные полиметиновые красители [3]. Для полиметиновых (цианиновых) красителей в растворе наблюдается равновесие между транс- и цис-изомерами. Для красителей, не имеющих замены в полиметиновой цепи, транс-изомер обладает более низкой энергией, чем цис-изомер, и равновесие значительно смещается в сторону транс-изомера (рис. 1, А). В случае наличия мезо-заместителей (R) в полиметиновой структуре, транс- и цис-изомеры становятся сравнимыми по энергии, и энергетическое равновесие между изомерами определяется исключительно за счет микроокружения молекул зонда-красителя (рис. 1, Б). Было выяснено, что в неполярных растворителях мезо-замещенные модификации присутствуют в основном в виде транс-изомеров, а в полярных наоборот переходят в

энергетически более выгодную цис-форму. Эффективность их применения была подтверждена в экспериментах с сывороточными альбуминами человека, крысы, быка, а также в ходе исследований стекловидного тела глаза человека.

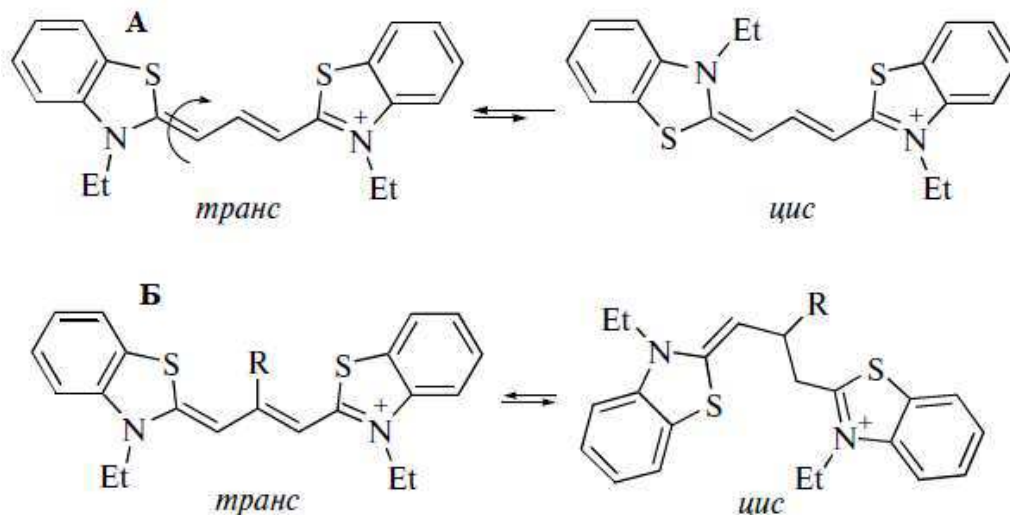


Рисунок 1 – Равновесие транс- и цис-изомеров 3,3'-диэтилтиакарбоцианина (А) и его мезо-модификации (Б) [3]

Другая разновидность зондов – флуоресцентные белки, выступающие в качестве внутриклеточных репортеров, имеют множество преимуществ перед обычными флуоресцентными красителями при визуализации структуры живых клеток. Они могут генетически кодироваться в самой клетке, поэтому непосредственное внедрение красителя не требуется, что обеспечивает неинвазивную визуализацию. Такие белки являются могут быть специфичны к практически любой органелле, компартменту или ткани [4].

Некоторые флуоресцентные белки (FP) обладают специфичными рН-зависимыми спектрально-люминесцентными свойствами, которые могут применяться для оценки гомеостаза внутри клетки. Примером такого белка является зеленый флуоресцентный белок дикого типа (wtGFP), существующий в протонированном и депротонированном состояниях, каждое из которых характеризуется своими полосами поглощения и испускания флуоресценции. В протонированном состоянии wtGFP поглощает свет на длине волны 395 нм и

флуоресцирует на длине волны 508 нм, в то время как депротонированное состояние поглощает на 475 нм и излучает на 503 нм [5]. Информативным показателем такого зонда является интенсивность флуоресценции, на основе которой можно судить об изменениях рН среды внутри клетки, но нельзя точно определить само значение рН.

Испускание флуоресценции белков-индикаторов рН на основе интенсивности зависит от общей концентрации флуорофора, поэтому трудно установить, вызваны ли наблюдаемые изменения флуоресценции вариацией рН либо концентрации зонда. Способ обойти проблему, связанную с интенсивностью – использовать ратиометрические индикаторы рН, которые не требуют точного измерения концентрации белка и основаны на нахождении отношения значений интенсивности флуоресценции на характерных полосах возбуждения или испускания. Примером такого ратиометрического зонда является другая модификация GFP – ratio-pHluorin (r-pHluorin), которая обладает большей интенсивностью флуоресценции на пике испускания 508 нм при возбуждении на 475 нм, чем при возбуждении на 395 нм и обладает чувствительностью к интервалу рН от 7,5 до 5,5. r-pHluorin был успешно протестирован на способность проникать внутрь различных органелл эукариотических клеток [6].

Известны также молекулярные зонды, позволяющие определять концентрацию ионов металлов *in vivo* путем рассмотрения эффекта тушения флуоресценции при добавлении ионов в систему. Ионы Cu^{2+} и Fe^{3+} играют важную роль в биологических системах: например, участвуют в формировании простетических групп в структуре ферментов, участвующих в основных путях метаболизма живых клеток. Из-за низких концентраций, в которых эти ионы металлов присутствуют в биологических системах [7], необходимы высокочувствительные зонды. Для ионов меди большинство известных зондов активирует процесс «выключения» флуоресценции, поскольку этот ион часто действует как тушитель посредством процессов передачи энергии или электрона. Однако существуют зонды, разработанные на основе родаминов,

которые демонстрируют отклик «включения» флуоресценции, показывая тем самым обратимое поведение при связывании [8]. Касательно ионов железа было выяснено, что наиболее подходящим способом их детектирования является индуцированный этими же ионами гидролиз основания Шиффа (N-замещенного имида) с участием молекулы родамина [9]. Кроме того, было установлено, что сенсоры, основанные на производных кумарина, проявляют свою специфичность к ионам металлов и применимы как для определения Cu^{2+} , так и Fe^{3+} [10].

Флуоресцентное зондирование находит свое применение в области генной инженерии, когда возникает необходимость в детектировании нуклеиновых кислот. Молекулярные маяки и бинарные зонды представляют собой два важных класса зондов для методов гибридизации, разработанных на базе известных фотофизических принципов. Эти зонды нашли свое применение в различных исследованиях, таких как отслеживание мРНК, мониторинг полимеразной цепной реакции (ПЦР) и идентификация микроорганизмов [11]. Примером использования флуоресцентного маяка может быть спектральный анализ, основанный на определении сдвига характерной длины волны испускания при резонансном переносе энергии между двумя флуорофорами зонда. В отсутствие мишеней наиболее интенсивно флуоресцирует акцепторный флуорофор, но при наличии мишени – нуклеиновой кислоты – флуорофоры удаляются друг от друга (рис. 2), что снижает эффективность переноса энергии и приводит к увеличению интенсивности испускания флуоресценции донора [12].

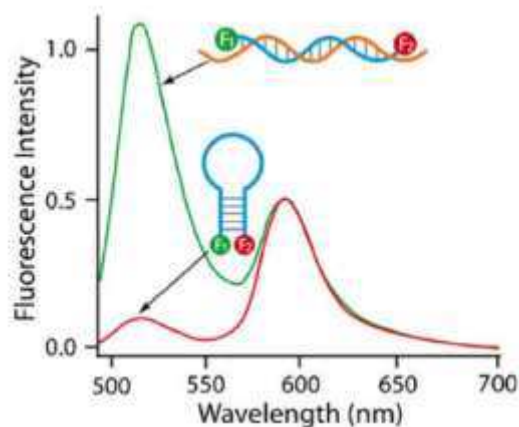


Рисунок 2 – Спектр флуоресценции молекулярного маяка в присутствии (зеленый цвет) и в отсутствие мишени (красный цвет) [12]

1.2. Молекулярные роторы: принципы работы, разновидности

Вязкость и температура представляют собой тесно взаимосвязанные ключевые параметры внутренней среды живых систем: они влияют на процессы, движущим фактором которых является диффузия. Вязкость микроокружения оказывает влияние на скорости переноса вещества и передачи сигналов; она регулирует метаболизм и может быть показателем патологических состояний или отклонений от физиологической нормы [13].

Если на макроскопическом уровне измерение вязкости и температуры является тривиальной задачей, то определение этих величин в микроскопических объектах, таких как живые клетки или атмосферные аэрозоли, значительно усложняется в силу малой разрешающей способности приборов и отсутствия подходящих методов исследования. Несмотря на то, что существуют различные методики спектроскопического анализа вязкости на микроскопическом уровне, такие как электронный парамагнитный или ядерный магнитный резонансы, наиболее удобным средством является флуоресцентная спектроскопия, т.к. она более чувствительна к внешним воздействиям, что упрощает построение корреляционных зависимостей изучаемых параметров.

Таким образом, более выгодным подходом к изучению вязкости или температуры микрообъектов является флуоресцентное зондирование. Зонды –

это флуорофоры, способные изменять флуоресцентный сигнал, основываясь на мгновенных характеристиках среды, в которую они помещены. Для нахождения величины вязкости на микро- и макроуровнях применяется специальный класс веществ – молекулярные роторы [14]. Поскольку молекулярные роторы представляют собой относительно небольшие органические молекулы, которые по размеру схожи с молекулами растворителя, их флуоресценция реагирует на микровязкость – трение, которое молекулярный ротор испытывает в конденсированной фазе при внутримолекулярном вращении.

При облучении светом молекула ротора переходит из основного в возбужденное состояние путем поглощения фотонов. Затем это возбуждение может быть дезактивировано двумя способами. В первом случае в молекулярных роторах происходит свободное внутреннее вращение «роторной группы» (части молекулы), в результате чего молекула возвращается в основное состояние безызлучательно (внутренняя конверсия). Во втором случае, когда вязкость внешней среды достаточно высокая, вращение роторной группы замедлено, и система избирает путь перехода в основное состояние через испускание квантов света – флуоресценцию [15]. В конечном итоге происходит увеличение как квантового выхода, так и времени жизни флуоресценции в вязких средах.

Возможные трудности применения молекулярных роторов могут возникнуть в случае их особой реакции со средой. Чувствительность зондов к полярности микроокружения часто может приводить к спонтанному перераспределению заряда внутри молекулы, что, как следствие, может давать искажения измеряемых показаний вязкости [16]. Поэтому существует необходимость в синтезе такого молекулярного ротора, который будет давать отклик исключительно на вязкость среды, при этом не зависеть от прочих факторов.

Первыми молекулярными роторами, использованными для оценки микровязкости, были зонды на основе малонитрила. Гидрофобный 9-

дициановинил юлолидин (DCVJ) (рис. 3, А) был применен для определения микровязкости полимеров [17], бислоев фосфолипидов [18], а также мембран при нахождении напряжения сдвига [19]. Для измерения микровязкости плазмы крови была создана гидрофильного модификация этого зонда – 9-(2-карбоксивинил) юлолидин (CCVJ) (рис. 3, Б) [20]. К сожалению, молекулярные роторы на основе малонитрила имеют ряд недостатков. Известно, что в них может происходить явление внутреннего переноса заряда в возбужденном состоянии [14], что делает их чувствительными к полярности растворителя, наряду с микровязкостью. Кроме того, их максимальная длина волны излучения (~500 нм) находится далеко от оптического окна прозрачности биологических тканей (650-900 нм) и, следовательно, не всегда подходит для работы с биологическими образцами. Важно отметить, что для флуорофоров с одной полосой излучения и с чрезвычайно коротким временем жизни флуоресценции, таких как DCVJ и CCVJ, микровязкость оценивается по изменениям интенсивности флуоресценции флуорофоров, на которые могут влиять изменения концентрации, колебания мощности возбуждающего лазера, неравномерное освещение или мутность изучаемого образца.

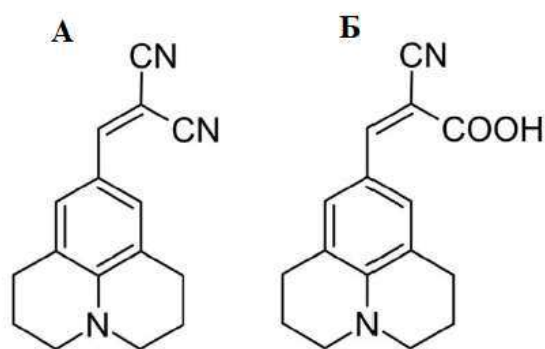


Рисунок 3 – Структура молекулярных роторов DCVJ (А) и CCVJ (Б)

Существует два действенных подхода, позволяющих избежать сдвигов полос испускания и искажения квантовых выходов роторов, вызванных концентрацией добавляемого зонда: нахождение характерных времен жизни флуоресценции роторов и ратиометрический метод. Время жизни

флуоресценции не зависит от концентрации (в отсутствие агрегации и тушения), что позволяет количественно измерять микровязкость. Исследование микровязкости с помощью ратиометрических зондов основывается на получении соотношения полос интенсивности, где одна из полос не зависит от вариации вязкости растворителя, а другая является чувствительной к незначительным ее изменениям.

Примером молекулярных роторов, для которых анализируют времена жизни флуоресценции, являются производные бора-дипиррометена (BODIPY) [21]. BODIPY удобны для измерения, поскольку описание спада флуоресценции возможно с помощью моноэкспоненциальной функции. Зонды на основе BODIPY способны проникать в отдельные органеллы клеток и определять специфические взаимодействия, происходящие в них [22]. Другими роторами, чье применение основано на определении времени жизни флуоресценции, являются некоторые производные индоцианина, например краситель DiSC₂ (рис. 4, А), предназначенный для оценки микровязкости в различных аэрозолях [23], для наблюдения процессов агрегации белков в качестве свободного, несвязанного вещества, и краситель сульфат-Cy3 (рис. 4, В), с помощью которого также изучают кинетику агрегации белка, но уже путем ковалентного связывания с его структурой [24]. Другая модификация индоцианина – меченый триметопримом (TMP) Cy3 (TMP-tagged Cy3) (рис. 4, Г) используется для определения микровязкости вблизи плазматической мембраны, внутри митохондрий и ядер живых клеток [25].

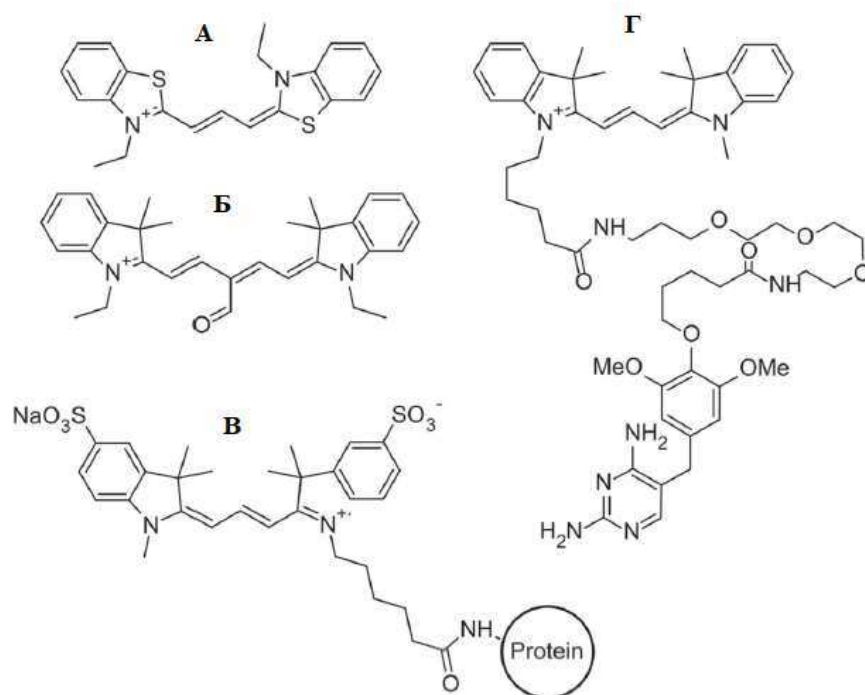


Рисунок 4 – Структура молекулярных роторов на основе индоцианина: DiSC₂ (A), RY3 (Б), сульфат-Cy3 (B), TMP-меченый Cy3 (Г)

Ратиометрическим зондом является производное малонитрила – метиловый эфир 2-циано-3-(4-диметиламинофенил) акриловой кислоты, ковалентно связанный с нечувствительной к вязкости 7-метоксикумарин-3-карбоновой кислотой. Он имеет два пика в спектре флуоресценции, величина одного из которых чувствительна к вязкости [26]. Другая группа молекулярных роторов, действующих по ратиометрическому принципу, основана на структуре порфириновых димеров. Их применяют для регистрации динамики вязкости клеток в процессе апоптоза [27].

1.3. Спектральные свойства молекулярного ротора RY3

RY3 представляет собой пентаметиновый краситель, также являющийся производным веществом индоцианина (рис. 4, Б), способный проникать внутрь живых клеток и проявляющий свойства молекулярного ротора. Было показано, что он подходит для измерения и визуализации распределения вязкости внутри

клетки обоими способами, как ратиометрическим методом, так и на основе времени жизни флуоресценции. Зонд имеет характерные полосы поглощения с максимумами при 400 и 613 нм и полосы испускания флуоресценции с максимумами при 456 нм и 650 нм [1].

Чувствительность RY3 к вязкости среды обусловлена вращением альдегидной группы в центральной (мезо-) позиции его молекулы. Флуоресценция RY3 в невязких средах мало интенсивная, однако с увеличением вязкости микроокружения значительно усиливается испускание в красной области спектра (при 650 нм), при этом коротковолновый пик испускания остается неизменным, что позволяет использовать RY3 как ратиометрический зонд. Основываясь на данных теории функционала плотности [28], пик на 456 нм характеризуется переходом из синглетного состояния S_2 в основное состояние S_0 , который является квантовомеханически запрещенным переходом, и интенсивность этой полосы не меняется, в то время как разрешенный переход $S_1 \rightarrow S_0$ описывает чувствительный к вязкости длинноволновый пик флуоресценции.

В общем случае растворители с разной полярностью оказывают влияние на положение полос флуоресценции и квантовые выходы, но их действие на спектральные показатели RY3 оказались незначительным. В ряде экспериментов было проверено взаимодействие зонда с растворителями, диэлектрическая константа которых варьирует от 7,43 (тетрагидрофуран) до 78,36 (вода). Было установлено, что квантовый выход флуоресценции изменяется от 0,03 в тетрагидрофуране до 0,02 в воде. Этот результат имеет важное значение для свойств молекулярного ротора, которые должны определяться вязкостью среды и исключать влияния полярности.

В статье Peng и др. [1], где непосредственно описываются свойства нового синтезированного зонда RY3, рассматриваются также другие разновидности молекулярных роторов класса RY, различающиеся радикалом в мезо-позиции молекулы: у RY1 – атом водорода, RY2 – атом хлора, RY4 – этилен. Было установлено, что прочие модификации не могут использоваться

для ратиометрического анализа, т.к. у них имеется только одна характерная полоса испускания, в то время как у зонда RY3 их две (рис. 5). Вариация вязкости растворителей не вызывала отклика в флуоресценции этих аналогов, в отличие от случая RY3. При этом, RY1 имеет высокие показатели квантового выхода в растворителях разных вязкостей, поэтому он может быть использован в качестве флуоресцентного маркера, но не как сенсор вязкости.

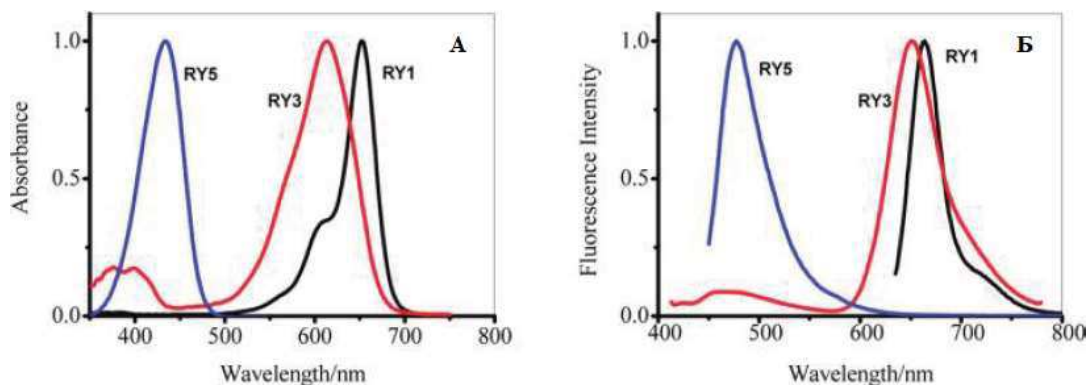


Рисунок 5 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) зондов класса RY в 99% глицерине [1]

Радикалы RY3 и RY4 являются слишком массивными для того, чтобы переход молекул в возбужденное состояние обеспечивал их вращение или колебания. Однако в молекуле RY3 вращение вокруг одинарной связи в альдегидной группе осуществляется проще, чем вокруг двойной в этилене (рис. б). За счет этого свойства (а также возможности эффективного переноса заряда в ходе процессов возбуждения и релаксации) RY3 имеет лучшую чувствительность к микровязкости.

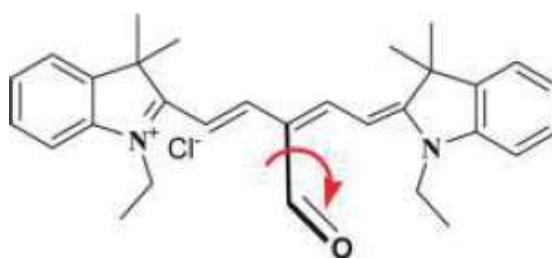


Рисунок 6 – Предполагаемое вращение альдегидной группы в RY3 [1]

Был рассмотрен ратиометрический сигнал флуоресценции RY3 в этанол-глицериновых и водно-глицериновых растворах. Оба случая показали, что длинноволновый пик спектра флуоресценции реагирует на изменения вязкости, а коротковолновый практически не изменяется. Кроме того, было показано, что зависимость отношения интенсивностей пиков от показателей вязкости растворов является линейной в двойных логарифмических координатах, что удовлетворяет условию чувствительности молекулярного ротора к вязкости среды (рис. 7). Так, в эксперименте при добавлении глицерина в этанольный раствор RY3 вязкость среды повышается от 1,2 сП в чистом этаноле до 950 сП в 99%-ом растворе глицерина.

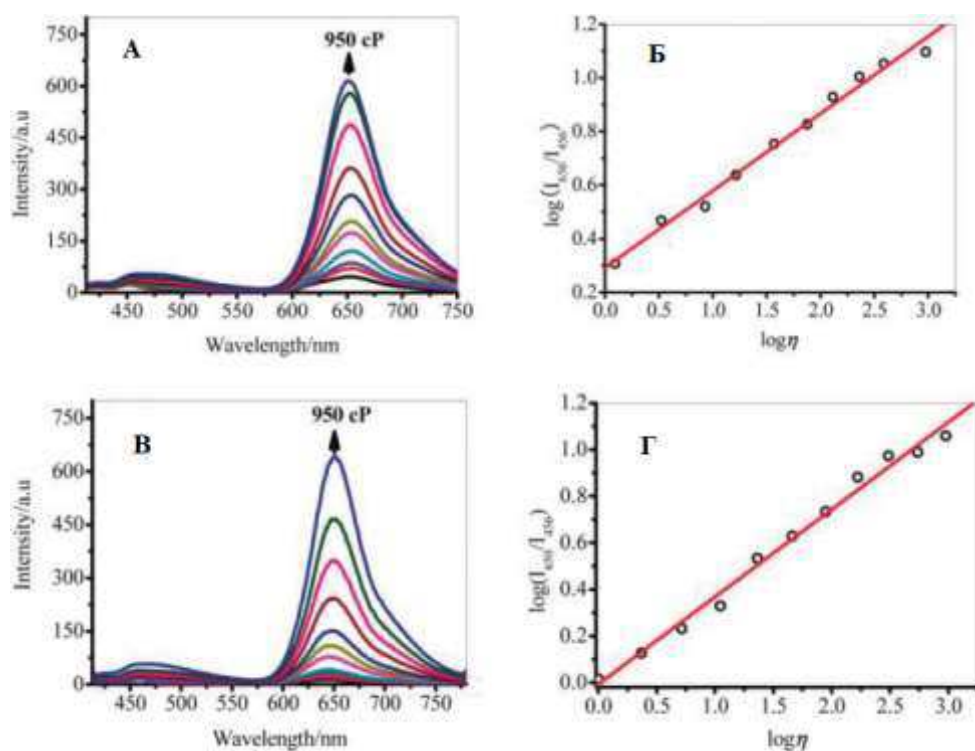


Рисунок 7 – Изменения спектров флуоресценции и линейные зависимости $\log(I_{650}/I_{456})$ от $\log \eta$ (вязкости) в этанол-глицериновом (А, Б) и водно-глицериновом (В, Г) растворах [1]

Было также проведено измерение времени жизни флуоресценции зонда RY3 в различных этанол-глицериновых смесях и определено, что при концентрации глицерина в растворе более 70 % время жизни увеличивается.

Время жизни флуоресценции полосы с максимумом при 650 нм увеличивается от 200 пс до более чем 1400 пс, при вариации концентрации глицерина в этаноле от 0 до 99% (рис. 8).

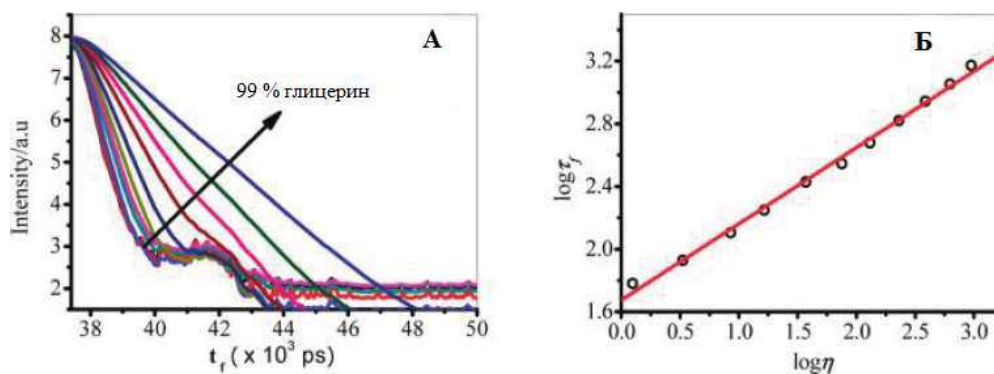


Рисунок 8 – Изменение спада (времен жизни) флуоресценции RY3 с увеличением вязкости этанол-глицеринового раствора (А) и линейная зависимость $\log \tau_f$ (времени жизни) от $\log \eta$

[1]

Флуоресценция RY3 зависит также от температуры среды: при уменьшении температуры вплоть до отрицательных значений квантовый выход на длинноволновой полосе испускания флуоресценции увеличивается. Это происходит в силу того, что при низких температурах подвижность альдегидной группы молекулы снижается, соответственно вращение замедляется, и происходит переход на релаксацию возбужденного состояния путем флуоресценции. Тот же самый принцип работает и для времени жизни флуоресценции: при низких температурах его значение становится более высоким по сравнению со стандартными условиями экспериментов (20-25 °С).

2. Материалы и методы

2.1. Реактивы и образцы

В данной работе исследован флуоресцентный зонд RY3(I), синтезированный в лаборатории молекулярной спектроскопии Института химии и химической технологии СО РАН. Структура зонда является идентичной зонду RY3 в статье [1] за исключением природы противоиона: вместо хлорид-иона присутствует йодид-ион.

Использовали стоковый раствор зонда в диметилсульфоксиде (DMSO) с концентрацией 2 мМ.

В качестве растворителей использовали: этанол, этиленгликоль («Компонент-Реактив», Россия), диметилсульфоксид (AppliChem, Германия), ацетонитрил (AppliChem, Испания), ацетон (AppliChem, Испания), глицерин (AppliChem, Испания) и воду высокой чистоты (Milli-Q).

Для нахождения величины квантового выхода флуоресценции относительным методом в качестве стандартного вещества использовали родамин В (раствор 1 мМ в 1мМ NaOH).

Модельными клетками служила жидкая культура светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* 1883 (штамм предоставлен музеем ИБФ СО РАН). Для отмывки бактерий использовался 0,1М калий-фосфатный буфер на основе 2%-ого раствора NaCl с pH 7,5.

2.2. Оборудование

Спектры поглощения и флуоресценции регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies, Австралия) и спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba, JobinYvon, Франция), соответственно. Для определения pH буфера использовали pH-метр (иономер) SevenCompact S220 (Mettler Toledo, США). Осаждение бактерий в средах проводили с

помощью центрифуги Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Германия). Уровень свечения культуры бактерий определяли с помощью люминометра GloMax 20/20 (Promega, США).

2.3. Методика эксперимента

Спектральные характеристики зонда

Описание характерных свойств RY3(I) на всех этапах эксперимента проводили на основе спектров поглощения и флуоресценции зонда, образцов и модельных сред. В большинстве экспериментов (если не указано иначе) в кварцевую кювету с сечением 10x10 мм помещали 2 мл рассматриваемого растворителя и 2 μ л стокового раствора RY3(I). Таким образом, концентрация зонда в кювете составляла 2 μ M.

При определении относительного квантового выхода зонда RY3(I) использовали раствор красителя родамина В, чья концентрация в кювете составляла 1 нМ. При этом раствор RY3(I) в различных средах разбавляли так, чтобы оптическая плотность на длине волны возбуждения (530 нм) составляла $\leq 0,02$. Измеряли спектр флуоресценции в диапазоне 540-750 нм.

Для определения зависимости квантового выхода флуоресценции зонда RY3(I) от вязкости измеряли испускание зонда в шести смесях фосфатного буфера с глицерином с содержанием глицерина 0, 20, 40, 50, 60, 100 % (0 М; 2,27 М; 4,77 М; 6,11 М; 7,51 М; 13,69 М).

Отмывка бактериальной культуры и зондирование её вязкости

Исходную культуру бактерий центрифугировали в течение 10 минут в эппендорфах объемом 1,5 мл при значении относительного центробежного ускорения 10000. После центрифугирования забирали надосадочный объем (приблизительно 1,4 мл) и добавляли такой же объем калий-фосфатного буфера. Осадок в эппендорфах разбивали и распределяли по объему буфера, а затем снова центрифугировали. После этого снова забирали надосадочную жидкость и добавляли буфер. В 2 мл надосадочной и перемешанной осадочной

жидкости добавлялось по 2 $\mu\text{л}$ RY3(I). Получившиеся образцы с зондом анализировались на люминесценцию, поглощение и флуоресценцию.

2.4. Обработка данных

Анализ и обработку полученных экспериментальных данных производили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и MicroCAL OriginLab 8, а также приложенного к оборудованию ПО.

Построение калибровочных прямых для RY3(I) проводили на основе уравнения Фёрстера-Хоффмана (1), описывающего взаимосвязь квантового выхода флуоресценции с вязкостью среды. Общий вид уравнения:

$$\varphi_f = C\eta^x \quad (1)$$

где φ_f – квантовый выход, C – константа, зависящая от концентрации и температуры, η – вязкость, x – константа, характеризующая молекулярный ротор.

В двойных логарифмических координатах уравнение представляется в виде:

$$\log \varphi_f = C + x \log \eta \quad (2)$$

Расчет квантовых выходов для зонда в различных растворителях был сделан относительным методом по формуле:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{I_0 S D_0}{I S_0 D} \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \quad (3)$$

где φ – квантовый выход, I – интенсивность возбуждающего света, D – оптическая плотность на длине волны возбуждения, S – площадь под кривой спектра флуоресценции, n – показатель преломления раствора. Нулевой индекс присваивается показателям стандартного вещества (в данном случае – родамина В).

Для описания взаимосвязи полярности используемых растворителей с изменением характерных спектров испускания флуоресценции использовали уравнение Липперта-Матаги:

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2\Delta f (\mu_F - \mu_G)^2}{hc a^3} \quad (4)$$

где $(\nu_A - \nu_F)$ – стоксов сдвиг флуоресценции, h – постоянная Планка, c – скорость света, $(\mu_F - \mu_G)$ – разность дипольных моментов молекулы в возбужденном (μ_F) и основном состоянии (μ_G), a – радиус Онзагера.

Поляризуемость растворителя Δf определяется по формуле:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (5)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость растворителя, n – показатель преломления среды.

3. Результаты и обсуждение

Изъято 10 страниц текста в связи с защитой авторского права

Заключение

В результате проведенного исследования были сделаны следующие выводы:

- 1) Положение полос поглощения и флуоресценции нового зонда RY3(I), квантовый выход флуоресценции близки (но не идентичны) с опубликованными данными для RY3.
- 2) Зонд RY3(I) проявляет свойства молекулярного ротора: показатель степени x в уравнении Фёрстера-Хоффмана по $I_{650} \sim 0,48$.
- 3) Зонд RY3(I) характеризуется большим соотношением I_{650}/I_{456} , чем RY3 (426 vs 12.6, в глицерине), что затрудняет его применение как ратиометрического зонда.
- 4) Интенсивность полосы флуоресценции RY3(I) при 456 нм также проявляет чувствительность к вязкости среды ($x=0.17-0.22$), что снижает чувствительность параметра I_{650}/I_{456} ($x=0.24-0.30$).
- 5) Характерными особенностями зонда являются потеря стабильности при воздействии УФ и (фото-)химическая деградация разбавленных растворов в DMSO.
- 6) Зонд RY3(I) взаимодействует с бактериями *P. phosphoreum*, демонстрируя при этом повышение квантового выхода, соответствующее вязкости 2,7 сП.

Список сокращений

FP – fluorescent proteins (флуоресцентные белки)

GFP – green fluorescent protein (зелёный флуоресцентный белок)

wtGFP – wild-type green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок дикого типа)

r-pHluorin – ratio-pHluorin

ПЦР – полимеразная цепная реакция

DCVJ – гидрофобный 9-дициановинил юлолидин

CCVJ – 9-(2-карбоксии-2-циановинил) юлолидин

BODIPY – бор-дипиррометен

TMP – триметоприм

DMSO – диметилсульфоксид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Peng, X. Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity. / X. Peng, Z. Yang, J. Wang, J. Fan, Y. He, F. Song, B. Wang, S. Sun, J. Qu, J. Qi, M. Yan // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Т. 133. – С. 6626–6635.
2. Hui-wang, Ai. Fluorescent sensors for biological applications. / Ai Hui-wang // *Sensors*. – 2014. – Т. 14. – С. 17829–17831.
3. Татиколов, А. С. Мезо-замещенные полиметиновые красители – эффективные спектрально-люминесцентные зонды для биомакромолекул. / А. С. Татиколов, Т. М. Акимкин, А. С. Кашин, И. Г. Панова // *Химия высоких энергий*. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 252–255.
4. Bencina, M. Illumination of the spatial order of intracellular pH by genetically encoded pH-sensitive sensors. / M. Bencina // *Sensors*. – 2013. – Т. 13. – С. 16736–16758.
5. Bizzarri, R. Green fluorescent protein-based pH indicators for in vivo use: A review. / M. Serresi, S. Luin, F. Beltram // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – Т. 393. – С. 1107–1122.
6. Miesenböck, G. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. / G. Miesenböck, D.A. de Angelis, J.E. Rothman // *Nature*. – 1998. – Т. 394. – С. 192–195.
7. *Inorganic Chemistry*, 4th ed. / Atkins, P. Overton, T.; Rourke, J.; Weller, M.; Armstrong, F. – Prentice Hall: Oxford. UK. – 2006. – С. 712.
8. Zhao, Y. Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent chemosensor for Cu²⁺ in aqueous solution and living cells. / Y. Zhao, X.-B. Zhang, Z.-X. Han, L. Qiao, C.-Y. Li, L.-X. Jian, G.-L. Shen, R.-Q. Yu // *Anal. Chem.* – 2009. – Т. 81. – С. 7022–7030.
9. Lee, M.H. A novel strategy to selectively detect Fe (III) in aqueous media driven by hydrolysis of a rhodamine 6G Schiff base. / M.H. Lee, T.V. Giap, S.H. Kim, Y.H. Lee, C. Kang, J.S. Kim // *Chem. Commun.* – 2010. – Т. 46. – С. 1407–1409.

10. Lim, N.C. Squaramide hydroxamate-based chemidosimeter responding to iron(III) with a fluorescence intensity increase. / N.C. Lim, S.V. Pavlova, C. Bruckner // *Inorg. Chem.* – 2009. – T. 48. – C. 1173–1182.
11. Martí, A.A. Fluorescent hybridization probes for sensitive and selective DNA and RNA detection. / A.A. Martí, S. Jockusch, N. Stevens, J. Ju, N.J. Turro // *Acc Chem Res.* – 2007. – T. 40. – C. 402–409.
12. Jockusch, S. Spectroscopic investigation of a FRET molecular beacon containing two fluorophores for probing DNA/RNA sequences. / S. Jockusch, A.A. Martí, N.J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D.L. Akins // *Photochem Photobiol Sci.* – 2007. – T. 5. – C. 493–498.
13. Himms-Hagen, J. Cellular thermogenesis. / J. Himms-Hagen // *Annual Review of Physiology.* – 1976. – T. 38. – C. 315–351.
14. Haidekker, M.A. Molecular rotors – fluorescent biosensors for viscosity and flow. / M.A. Haidekker, E.A. Theodorakis // *Organic & Biomolecular Chemistry.* – 2007. – T. 5. – C. 1669–1678.
15. Kuimova, M.K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. / M.K. Kuimova // *Physical Chemistry Chemical Physics.* – 2012. – T. 14. – C. 12671–12686.
16. Haidekker, M.A. Dyes with segmental mobility: molecular rotors. / M.A. Haidekker, M. Nipper, A. Mustafic, D. Lichlyter, M. Dakanali, E.A. Theodorakis // Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. – 2010. – T. 8. – C. 267–308.
17. Loutfy, R.O. Fluorescence probes for polymer free-volume. / R.O. Loutfy // *Pure Appl Chem.* – 1986. – T. 58. – C. 1239–1248.
18. Kung, R. Microviscosity measurements of phospholipid bilayers using fluorescent dyes that undergo torsional relaxation. / R. Kung // *Biochemistry.* – 1986. – T. 25. – C. 6114–6121.
19. Haidekker, M.A. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. / M.A. Haidekker, N. Heures, J.A. Frangos // *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* – 2000. – T. 278. – C. H1401–H1406.

20. Haidekker, M.A. A novel approach to blood plasma viscosity measurement using fluorescent molecular rotors. / M.A. Haidekker, A.G. Tsai, T. Brady, H.Y. Stevens, J.A. Frangos, E. Theodorakis, M. Intaglietta // *Am J Physiol. - Heart Circ Physiol.* – 2002. – T. 282. – C. H1609–H1614.
21. Kuimova, M.K. Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. / M.K. Kuimova, G. Yahioglu, J.A. Levitt, K. Suhling // *J Am Chem Soc.* – 2008. – T. 130. – C. 6672–6673.
22. Wang, L. Activatable rotor for quantifying lysosomal viscosity in living cells. / L. Wang, Y. Xiao, W. Tian, L. Deng // *J Am Chem Soc.* – 2013. – T. 135. – C. 2903–2906.
23. Hosny, N.A. Fluorescent lifetime imaging of atmospheric aerosols: a direct probe of aerosol viscosity. / N.A. Hosny, C. Fitzgerald, C. Tong, M. Kalberer, M.K. Kuimova, F.D. Pope. // *Faraday Discuss.* – 2013. – T. 165. – C. 343–356.
24. Kubánková, M. Probing supramolecular protein assembly using covalently attached fluorescent molecular rotors. / M. Kubánková, I. López-Duarte, J.A. Bull, D.M. Vadukul, L.C. Serpell, M. de Saint Victor, E. Stride, M.K. Kuimova // *Biomaterials.* – 2017. – T. 139. – C. 195–201.
25. Gatzogiannis, E. Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag. / E. Gatzogiannis, Z. Chen, L. Wei, R. Wombacher, Y.-T. Kao, G. Yefremov, V.W. Cornish, W. Min. // *Chem Commun.* – 2012. – T. 48. – C. 8694–8696.
26. Haidekker, M.A. A ratiometric fluorescent viscosity sensor. / M.A. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, E.A. Theodorakis // *J Am Chem Soc.* – 2006. – T. 128. – C. 398–399.
27. Kuimova, M.K. Dual mode quantitative imaging of microscopic viscosity using a conjugated porphyrin dimer. / A. Vyšniauskas, M. Balaz, H.L. Anderson, M.K. Kuimova // *Phys Chem Chem Phys.* – 2015. – T. 17. – C. 7548–7554.
28. Runge, E. Density-functional theory for time-dependent systems. / E. Runge, E. K. U. Gross // *Physical Review Letters.* – 1984. – T. 52. – C. 997–1000.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк Кратасюк В.А.

«28» июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

Спектрально-люминесцентные характеристики нового флуоресцентного зонда
– молекулярного ротора

Руководитель

Е.В. Немцева

28.06.21

доцент, к.ф.-м.н.

Е.В. Немцева

Выпускник

И.В. Шахматов

28.06.21

И.В. Шахматов

Красноярск, 2021