

На правах рукописи

БАНИШЕВ Александр Александрович

**ЛАЗЕРНАЯ ФЛУОРИМЕТРИЯ АНСАМБЛЕЙ ЛОКАЛИЗОВАННЫХ
ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫХ ПАР (НА ПРИМЕРЕ БЕЛКОВ)**

Специальность: 01.04.21 - Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

М о с к в а – 2008

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Фадеев Виктор Владимирович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Саркисов Олег Михайлович

доктор физико-математических наук,
доцент Чикишев Андрей Юрьевич

Ведущая организация: Институт спектроскопии РАН

Защита состоится “ 22 ” мая 2008 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д501.001.31 в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, ул. Академика Хохлова, д.1, корпус нелинейной оптики, аудитория им. С.А.Ахманова.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ

Автореферат разослан “ _____ ” апреля 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д501.001.31
кандидат физ.-мат. наук, доцент

Ильинова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Флуоресцентная спектроскопия (флуориметрия) широко используется в исследованиях сложных органических соединений (красителей, белков, фотосинтезирующих организмов, нефтяных углеводородов и т.д.). Однако традиционные (линейные) методы флуоресцентной спектроскопии обладают ограниченными информационными возможностями в анализе флуоресцирующих объектов из-за низкой избирательности (полосы флуоресценции большинства органических соединений при комнатной температуре широкие и бесструктурные), поэтому данных, получаемых этими методами, зачастую недостаточно для понимания структурной организации и диагностики сложного органического соединения (СОС). Задача диагностики СОС заметно усложняется, если макромолекула СОС содержит более одного флуорофора.

Интересным и важным для практического применения подклассом многофлуорофорных систем являются молекулярные объекты с локализованной донорно-акцепторной (ЛДА) парой – макромолекулы, содержащие единичную пару флуорофоров, между которыми возможен перенос энергии возбуждения. Объекты подобного рода играют большую роль в получении информации о внутреннем состоянии макромолекул СОС: их пространственной организации, размерах, состоянии микроокружения и т.д., а также изменении этих характеристик при различных внешних воздействиях. В частности, искусственно созданные системы, состоящие из пары красителей (меток), закрепленных на концах исследуемой молекулы СОС, лежат в основе так называемой «спектроскопической линейки», используемой для измерения расстояний в молекулах, и, как следствие, для наблюдения изменения конформаций, например, в белках, ДНК, полимерах. К объектам с ЛДА парой можно также отнести искусственно синтезированные бифлуорофорные красители.

Особый интерес представляют природные объекты, в которых ЛДА парами являются их собственные флуорофоры. В этом случае не возникает проблем, свойственных искусственно созданным донорно-акцепторным (ДА) парам: неизменность структуры исследуемой молекулы при введении меток, стабильность комплекса молекула-метка и т.д. К числу таких объектов относятся многие типы белков. Их удобно использовать в качестве модельных объектов, содержащих локализованную пару флуорофоров. Но белки представляют и самостоятельный интерес как неотъемлемые компоненты живых систем, обладающие к тому же свойством флуоресцировать, что открывает возможность использования белков в качестве индикаторов процессов в живых системах.

При анализе белковой флуоресценции ограничения традиционной флуориметрии становятся особенно ощутимыми, т.к. флуоресценция белков может зависеть сразу от нескольких факторов. Более того, белковая молекула часто изначально содержит несколько флуоресцирующих (и/или

поглощающих, но не флуоресцирующих) центров, а препарат белка (ансамбль молекул) представляет собой смесь нескольких, спектрально неидентичных, подансамблей молекул белка. Это приводит к тому, что получаемые традиционными флуоресцентными методами данные сложны для однозначной интерпретации и позволяют сделать, в основном, лишь качественные выводы о внутреннем состоянии объекта. Поэтому задача получения количественной информации *in vivo*, без каких-либо препаративных воздействий на объект, в ряде случаев не может быть решена методами классической флуориметрии.

Возможности флуоресцентного анализа СОС значительно расширяются с применением лазерных методов, которые в дополнение к традиционным параметрам, описывающим форму и положение полос флуоресценции, позволяют определять молекулярные фотофизические параметры флуорофоров (время жизни, сечение поглощения, скорость межмолекулярного переноса энергии и др.) в условиях дефицита априорной информации, обязательной в классических методах. Эти параметры могут быть использованы в качестве диагностических признаков.

Разработка новых эффективных подходов к исследованию свойств многофлуорофорных объектов и методов их диагностики в условиях окружающей среды является актуальной фундаментальной и прикладной задачей. Разрабатываемые применительно к белкам инструменты необходимы в различных биологических и медицинских исследованиях и в перспективе, по-видимому, могут найти свои применения в практической медицине.

Цель работы

Целью работы является развитие новых подходов, которые открываются с применением к природным ансамблям с ЛДА парами лазерной флуориметрии – нелинейной флуориметрии (флуориметрии насыщения) и кинетической флуориметрии в нано- и субнаносекундном диапазонах.

В качестве объектов исследования были выбраны: белок бычий сывороточный альбумин (БСА), в каждой из молекул которого содержится пара природных флуорофоров – триптофановых остатков, и флуоресцентный белок mRFP1 (monomeric Red Fluorescent Protein), в ансамбле молекул которого присутствуют три подансамбля ЛДА пар. Предварительно методами лазерной флуориметрии были исследованы однофлуорофорные природные объекты: триптофан в воде и белок сывороточный альбумин человека ((САЧ) каждая молекула которого содержит один триптофановый остаток).

В диссертационной работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Построить модель, описывающую флуоресцентный отклик ансамблей ЛДА пар при их импульсном лазерном возбуждении.

2. Разработать основанный на совместном применении нелинейной и кинетической флуориметрии метод определения фотофизических параметров флуорофоров в ЛДА парах.
3. Апробировать методы лазерной флуориметрии на однофлуорофорных объектах и получить фотофизические параметры их флуорофоров.
4. Провести экспериментальную проверку построенной модели и разработанного метода на примере природного моноансамбля с ЛДА парой (двухтриптофановом белке – БСА): получить кривые насыщения и кинетики флуоресценции, определить из них индивидуальные фотофизические параметры донора, акцептора и скорости переноса энергии между ними (с возбужденной молекулы донора как на невозбужденную, так и на возбужденную молекулу акцептора).
5. Провести экспериментальную проверку построенной модели и разработанного метода на примере природного объекта (флуоресцентного белка), ансамбль молекул которого является совокупностью нескольких (трех) подансамблей с ЛДА парой: получить кривые насыщения флуоресценции, определить долю каждого подансамбля в общем ансамбле, определить индивидуальные фотофизические параметры донора, акцептора и скорости переноса энергии в локализованной паре для каждого подансамбля.

Научная новизна работы

Предложена модель фотофизических процессов в молекулярных объектах с ЛДА парой, адекватно описывающая флуоресцентный отклик флуорофоров при возбуждении импульсами лазерного излучения. Введено понятие коллективных состояний ЛДА пары. Предложена модель, описывающая кинетику населенностей этих состояний и позволяющая рассчитать кривые насыщения и кинетики флуоресценции ансамбля ЛДА пар.

Впервые совместно реализуемыми на одном лазерном спектрометре методами наносекундной кинетической и нелинейной флуориметрии определены значения индивидуальных фотофизических параметров флуорофоров белков mRFP1, бычьего сывороточного альбумина и сывороточного альбумина человека. Для первых двух, на основе предложенной модели, впервые определена константа переноса энергии между флуорофорами. Для mRFP1 определены парциальные концентрации посттрансляционных форм белка.

Научная и практическая значимость

Предложенная методика определения фотофизических параметров, в частности, скорости переноса энергии в природных системах с ЛДА парами открывает новые возможности использования их в качестве сенсоров в живых организмах. Определение индивидуальных фотофизических параметров молекул каждого из подансамблей флуоресцентных белков может быть

применено для контроля свойств получаемых флуоресцентных белков. Развитый подход, основанный на измерении фотофизических параметров флуорофоров белков *in vivo*, может применяться для изучения процессов в живых системах, а значения фотофизических параметров, полученные для конкретных объектов, использованных в работе – для диагностики конкретных биологических систем, содержащих эти белки.

Положения, выносимые на защиту

1. Совместное применение наносекундной кинетической и нелинейной лазерной флуориметрии позволяет одновременно определять значения всех основных фотофизических параметров молекул триптофана в воде (сечения поглощения в основном и возбужденном синглетном состояниях; время жизни возбужденного состояния; сумма скоростей интеркомбинационной конверсии и спонтанной ионизации из возбужденного синглетного состояния) и триптофана в однофлуорофорном белке сывороточный альбумин человека (сечение поглощения; время жизни возбужденного состояния; скорость интеркомбинационной конверсии).
2. Разработанная модель коллективных состояний локализованной донорно-акцепторной (ЛДА) пары позволяет описать флуоресцентный отклик ансамбля ЛДА пар при лазерном возбуждении.
3. Разработанным методом, использующим нелинейную и кинетическую лазерную флуориметрию, по предложенной модели коллективных состояний ЛДА пары, могут быть определены значения индивидуальных фотофизических параметров ее флуорофоров, в частности, значения фотофизических параметров (сечения поглощения и времена жизни донора и акцептора пары; скорость переноса энергии с возбужденного донора на невозбужденный и возбужденный акцептор) флуорофоров белков mRFP1 и бычий сывороточный альбумин, которые являются представителями природных объектов с ЛДА парой. Для белка mRFP1 может быть определена доля молекул каждого подансамбля в общей смеси трех типов ЛДА пар.

Апробация работы и публикации

Результаты работы докладывались на следующих конференциях: IV Всероссийская конференция “Физические проблемы экологии (Экологическая физика)” (Москва, июнь, 2004); Международная конференция “Opto-Ireland 2005” (Дублин, апрель, 2005); IV Международная конференция молодых ученых и специалистов “Оптика-2005” (Санкт-Петербург, октябрь, 2005); II Троицкая конференция. Медицинская физика и инновации в медицине (Троицк, май, 2006); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2006” (Москва, апрель, 2006);

Международная конференция “Lasers, Applications and Technologies (LAT 2007)” (Минск, май-июнь, 2007); Международная конференция “Laser Applications in Life Sciences (LALS 2007)” (Москва, июнь, 2007).

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 8 статей, 4 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК России, и 6 тезисов докладов на конференциях. Список работ приведен в конце автореферата.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации 125 страниц, в том числе 49 рисунков, 6 таблиц. Список литературы включает 130 наименований.

Личный вклад автора

Все результаты в диссертации получены автором лично, либо при его определяющем участии.

Исследования возможностей применения разработанных методов в биотехнологии флуоресцентных белков выполнены совместно с П.В.Вржещем и Е.П.Вржещем, представляющими Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цель и задачи исследований, приводятся положения, выносимые на защиту, кратко излагается содержание диссертации.

В первой главе дан анализ литературы, посвящённой применению флуоресцентной спектроскопии для исследования и диагностики ансамблей ЛДА пар. Особое внимание уделено флуориметрии белков как, по-видимому, наиболее интересного и важного в практическом плане представителя такого рода систем. По этой причине в обзор включена информация и о структуре белков, макромолекулы которых содержат ЛДА пары и которые выбраны в работе в качестве объектов.

В разделе 1.1 описываются основные типы (искусственно созданные и природные), свойства и области применения объектов, содержащих ЛДА пару.

В п.п. 1.1.1, 1.1.2 приводятся примеры объектов с ЛДА парой (п. 1.1.1), рассматриваются примеры изучения структурной организации органических соединений с использованием искусственных ЛДА пар, отмечаются основные трудности, которые возникают при этом (п. 1.1.2).

В п. 1.1.3 анализируются перспективы использования природных систем с ЛДА парой на основе белков как индикаторов процессов в живых системах.

В разделе 1.2 представлены общие сведения о собственной флуоресценции белков. Даны сведения о флуоресцентных свойствах и

структуре белков сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА).

В п. 1.2.1 рассмотрены основные спектральные свойства природных флуорофоров белков (аминокислот триптофан, тирозин и фенилаланин) в водном растворе и в структуре белковой матрицы. Особое внимание уделено параметрам триптофановой флуоресценции как наиболее информативной при изучении свойств белковых молекул методами флуориметрии.

В п. 1.2.2 даны сведения о строении белков САЧ и БСА. Представлена модель трехмерной структуры молекулы этих белков (модель “сердца”). Приведена информация о параметрах флуоресценции этих белков, которая определяется одним триптофановым остатком для САЧ (Trp214) и двумя - для БСА (Trp134 и Trp212). Отмечено, что белок БСА является представителем широкого класса объектов – природных макромолекул, содержащих ЛДА пару флуорофоров (два триптофановых остатка).

В п. 1.2.3 рассмотрены фотохимические процессы, которые возникают в молекулах свободного триптофана и триптофан-содержащих белков при воздействии на них УФ света; описаны механизмы фотоионизации (одно- и двухступенчатой) и фотодеградации, свойственные этим объектам.

В разделе 1.3 представлены сведения об особом классе белков - флуоресцентных белках (ФБ), представители которого обладают следующими отличительными свойствами:

1. в отличие от других известных природных макромолекул данные белки формируют внутренний хромофор (особый участок белковой цепи), без каких бы то ни было вспомогательных кофакторов и ферментов (кроме молекулярного кислорода);
2. полосы поглощения и флуоресценции хромофора этих белков лежат в видимой области спектра.

Данные белки являются в настоящее время популярными флуоресцентными маркерами для работ *in vivo*.

В п. 1.3.1 описаны спектральные свойства и трехмерная структура флуоресцентных белков, на примере зеленого (GFP, максимум флуоресценции на 508 нм) и красного (DsRed, максимум флуоресценции на 583 нм) флуоресцентного белка. Указано, что каждая мономерная субъединица молекулы этих белков (молекула белка не являются мономером) содержит ЛДА пару: триптофан в матрице белка и хромофор белка.

В п. 1.3.2 уделено внимание процессу формирования хромофора (созреванию) флуоресцентных белков (на примере белков GFP и DsRed). Процесс созревания ФБ - это сложный процесс, который проходит в несколько стадий. На некоторых стадиях созревания ФБ образуются промежуточные интермедиаты (формы) белка, способные сохранять свое присутствие и в конечном препарате белка. *A priori* препарат ФБ представляют собой смесь нескольких неидентичных и как следствие, различающихся спектральными свойствами форм белка, т.е. ансамбль молекул ФБ является совокупностью нескольких неэквивалентных подансамблей молекул, содержащих ЛДА пару.

В п. 1.3.3 даны сведения о спектральных свойствах красного (максимум флуоресценции на 607 нм) ФБ mRFP1, который является улучшенным аналогом (мутантом) белка DsRed, не проявляющим склонности к олигомеризации и тетрамеризации. Отмечено, что в настоящее время ведутся работы по получению ФБ (в том числе и на основе белка mRFP1) с улучшенными свойствами.

Вторая глава посвящена созданию модели, описывающей кинетику населенностей коллективных состояний ЛДА пар и позволяющей рассчитывать флуоресцентный отклик ансамбля локализованных ДА пар при его лазерном возбуждении.

В разделе 2.1 на основе литературных данных приведена необходимая для изложения оригинальных результатов информация о флуоресценции СОС. Рассмотрена модель формирования флуоресцентного отклика СОС для случая двухкомпонентной смеси однофлуорофорных молекул СОС такой, что между компонентами возможен межмолекулярный перенос энергии. Рассмотрена модель формирования флуоресцентного отклика в случае слабоконцентрированного однофлуорофорного раствора СОС со спецификой, свойственной водному раствору триптофана. Выписаны системы кинетических уравнений для населенностей энергетических уровней СОС, которые используются в гл. 3.

В разделе 2.2 разрабатывается модель, описывающая флуоресцентный отклик ансамбля ЛДА пар (в предположении, что возбуждение происходит наносекундными импульсами лазерного излучения) с учётом переноса энергии с возбужденного донора на: а) невозбужденный акцептор; б) возбужденный акцептор (синглет-синглетная аннигиляция).

Введем обозначения S_{0D} , S_{1D} – основное и первое возбуждённое синглетные состояния донора, S_{0A} , S_{1A} – синглетные состояния акцептора. Молекулы СОС, содержащие ЛДА пару, под действием излучения могут находиться в одном из четырех состояний:

Состояние 1 - донор и акцептор молекулы находятся в состоянии S_{0D} и S_{0A} – концентрацию таких молекул будем обозначать $n_1 \equiv n_1(t, \mathbf{r})$;

Состояние 2 - донор молекулы находится в состоянии S_{1D} , а ее акцептор в S_{0A} - концентрацию таких молекул будем обозначать $n_2 \equiv n_2(t, \mathbf{r})$;

Состояние 3 - донор молекулы находится в состоянии S_{0D} , а ее акцептор в S_{1A} - концентрацию таких молекул будем обозначать $n_3 \equiv n_3(t, \mathbf{r})$;

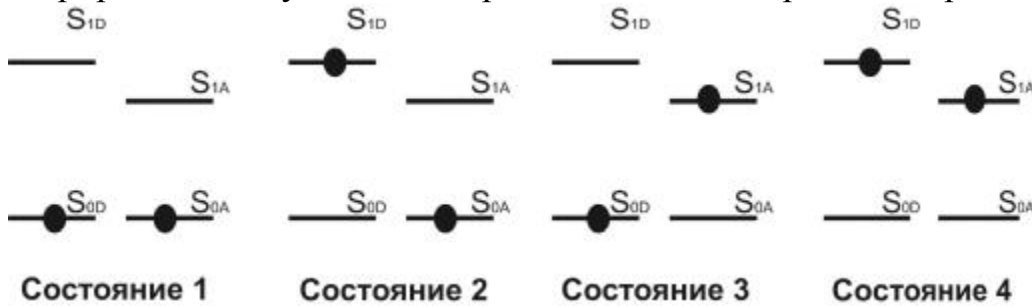
Состояние 4 - донор и акцептор молекулы находятся в состоянии S_{1D} и S_{1A} – концентрацию таких молекул будем обозначать $n_4 \equiv n_4(t, \mathbf{r})$;

Определенные таким образом состояния будем называть *коллективными состояниями* ЛДА пары. Динамика изменения концентраций приведенных выше четырех коллективных состояний ЛДА пары математически описывается следующей системой кинетических уравнений:

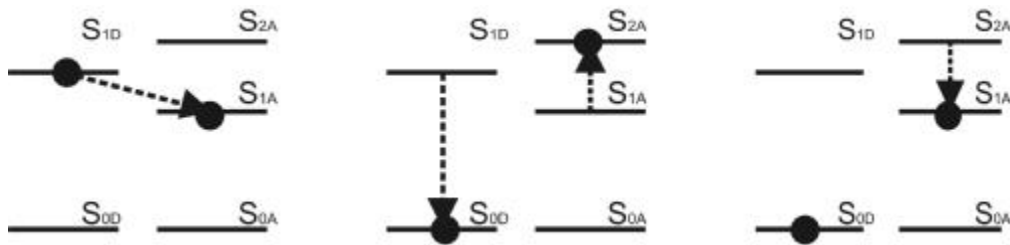
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n_1}{\partial t} = -F(t, \mathbf{r}) \cdot (\sigma_D + \sigma_A) \cdot n_1 + \frac{n_2}{\tau_3^D} + \frac{n_3}{\tau_3^A} \\ \frac{\partial n_2}{\partial t} = -F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_A \cdot n_2 - \frac{n_2}{\tau_3^D} - K_{DA} \cdot n_2 + F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_D \cdot n_1 + \frac{n_4}{\tau_3^A} \\ \frac{\partial n_3}{\partial t} = -F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_D \cdot n_3 - \frac{n_3}{\tau_3^A} + F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_A \cdot n_1 + \frac{n_4}{\tau_3^D} + K_{DA} \cdot n_2 + K_{SS} \cdot n_4 \\ \frac{\partial n_4}{\partial t} = F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_A \cdot n_2 + F(t, \mathbf{r}) \cdot \sigma_D \cdot n_3 - \frac{n_4}{\tau_3^D} - \frac{n_4}{\tau_3^A} - K_{SS} \cdot n_4 \\ n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = n_0, \end{array} \right. \quad (1)$$

где символы D и A относятся к донору и акцептору соответственно; n_0 – полная концентрация молекул СОС; σ_D – сечение поглощения донора, σ_A – сечение поглощения акцептора, соответствующие переходу $S_0 \rightarrow S_1$; K_{DA} – скорость переноса энергии с возбужденного донора на невозбужденный акцептор; K_{SS} – скорость переноса энергии с возбужденного донора на возбужденный акцептор (синглет-синглетная аннигиляция); τ_3 – время жизни флуорофора в возбужденном состоянии; $F(t, \mathbf{r})$ – плотность потока фотонов возбуждающего излучения в момент времени t в точке с координатой $\mathbf{r} = \{x, y\}$ в плоскости, перпендикулярной направлению падающего излучения (зависимость параметров от координаты z вдоль направления пучка пренебрегаем, т.е. используем приближение оптически тонкого слоя).

Описанные четыре возможные коллективные состояния можно проиллюстрировать следующими энергетическими диаграммами, рис. 1а.



а)



б)

Рис. 1. а) коллективные состояния локализованной донорно-акцепторной пары (без учета синглет-синглетной аннигиляции); б) процесс синглет-синглетной аннигиляции в модели коллективных состояний (переход $S_{2A} \rightarrow S_{1A}$ происходит за времена порядка пикосекунд).

Перенос энергии по механизму синглет-синглетной аннигиляции в предложенной модели четырех коллективных состояний схематически изображен на рис. 1б. Такой процесс возможен в ЛДА парах, которые находятся в состоянии 4. После элементарного акта синглет-синглетной аннигиляции молекула из состояния 4 переходит в состояние 3.

В разделе 2.3 рассматриваются теоретические основы методов нелинейной и кинетической лазерной флуориметрии СОС при их возбуждении наносекундными лазерными импульсами. Приводятся алгоритмы решения обратных задач кинетической и нелинейной флуориметрии, результатом применения которых является определение молекулярных фотофизических параметров флуорофоров СОС (сечения поглощения, скорости внутри- и межмолекулярного переноса энергии и др.) из кривых насыщения флуоресценции ($\Phi^{-1}(F) = N_{\text{Ref}}/N_{\text{Fl}}$, где N_{Ref} – реперный сигнал; N_{Fl} – сигнал флуоресценции) и кинетических кривых ($I(t_{\text{del}})$, где I – норм. сигнал флуоресценции; t_{del} – задержка строба приемника относительно лазерного импульса). Указано, что данные методы позволяют производить диагностику белковых молекул (в том числе содержащих ЛДА пару) в условиях дефицита априорной информации, обязательной в традиционных методах.

Третья глава посвящена экспериментальному определению фотофизических параметров природных макромолекул, содержащих локализованную донорно-акцепторную пару, методами лазерной флуориметрии. В качестве объектов исследования были выбраны белок бычий сывороточный альбумин и флуоресцентный белок mRFP1. Каждая молекула этих белков содержит ЛДА пару, причем ансамбль последнего представляет собой смесь нескольких неидентичных подансамблей молекул, содержащих ЛДА пару. Предварительно методы лазерной флуориметрии были апробированы на однофлуорофорных природных соединениях: триптофане в водном растворе и белке сывороточный альбумин человека.

В разделе 3.1 описывается универсальный лазерный флуориметр/флуорометр (п. 3.1.1), позволяющий реализовывать нелинейную и кинетическую флуориметрию. В отдельных пунктах описаны основные блоки и элементы установки: система лазерного возбуждения на основе импульсного ИАГ:Nd лазера (1.06 мкм, частота следования импульсов 10 Гц) с набором нелинейных кристаллов для получения гармоник основного излучения (532, 355 и 266 нм); система регистрации, на основе стробируемого многоканального анализатора спектра с УФ ССD камерой (длительность строба – 10 нс, шаг перемещения – 2.5 нс). Приведены основные характеристики лазерного излучения, показано, что распределения излучения в поперечном сечении пучка и во времени хорошо аппроксимируются гауссовыми распределениями. Описана (п. 3.1.2) дополнительная аппаратура, которая использовалась в работе: пикосекундный лазерный флуорометр, спектрофотометр и спектрофлуориметр.

Раздел 3.2 посвящен определению фотофизических параметров молекул триптофана в слабоконцентрированном водном растворе при возбуждении импульсами лазерного излучения с длиной волны 266 нм.

В п. 3.2.1 измеряются и анализируются спектры поглощения и флуоресценции триптофана, делается вывод о необходимости учета двухступенчатых процессов при обработке кинетических кривых и кривых насыщения.

В п. 3.2.2 измеряются и анализируются кривые насыщения и кинетики раствора триптофана, из которых (решением обратной задачи по модели, представленной в разделе 2.1) определяются значения фотофизических параметров молекул триптофана:

а) время жизни возбужденного состояния молекулы триптофана (в моноэкспоненциальном приближении, при низком уровне возбуждения) $\tau_3=(2.8\pm 1)$ нс;

б) сечение поглощения молекулы триптофана $\sigma=(1.6\pm 0.3)\times 10^{-17}$ см²;

в) суммарная скорость интеркомбинационной конверсии и ионизации из первого возбужденного синглетного состояния S_1 ($K_{32}+K_{3i}$)= $(6\pm 2)\times 10^7$ с⁻¹, которой соответствует сумма квантовых выходов в триплет и ионизации ($\eta_T+\eta_i$)= (0.17 ± 0.05) ;

г) суммарное сечение обратимого и необратимого фотопревращения при поглощении возбуждающего излучения (266 нм) молекулами в возбужденном состоянии S_1 ($\sigma_{3i}+\sigma_{ph}$)= $(2.2\pm 0.7)\times 10^{-18}$ см².

Таким образом, видно, что совместное применение нелинейной и кинетической флуориметрии позволяет производить диагностику сложных органических соединений, фотофизические процессы в которых описываются значительным числом (в данном случае четыремя) параметров.

Раздел 3.3 посвящен определению фотофизических параметров триптофан-содержащих белков, таких как сывороточный альбумин человека и бычий сывороточный альбумин в водном растворе, методами лазерной флуориметрии. Последний является представителем широкого класса объектов – макромолекул, содержащих локализованную донорно-акцепторную пару.

В п. 3.3.1 производится измерение и анализ спектров поглощения и флуоресценции этих белков. Из анализа спектров поглощения делается вывод о том, что в общем случае, не корректно сечению поглощения триптофанового остатка в белке приписывать значение сечения поглощения свободного триптофана в растворе, считая, что этот параметр является консервативным и слабо зависит от его окружения. Из анализа спектров флуоресценции делается вывод, что в БСА два флуорофора (триптофаны Trp134 и Trp212) находятся в разном локальном окружении.

В п. 3.3.2, на основе материала, изложенного в п. 3.3.1 и литературном обзоре, делается вывод, что в ЛДА паре белка БСА донором энергии является Trp212, а акцептором Trp134. Далее, измеряются и анализируются кинетические кривые и кривые насыщения флуоресценции белков САЧ и БСА, из которых путем решения обратной задачи нелинейной и кинетической флуориметрии определяются фотофизические параметры флуорофора САЧ и флуорофоров БСА. При обработке экспериментальных кривых использовалась трехуровневая модель формирования флуоресцентного отклика,

представленная в разделе 2.1 (для САЧ), и модель коллективных состояний (1) (для БСА). При проведении экспериментов с белком БСА регистрация флуоресценции производилась на длинах волн 310 нм (при построении кинетических кривых и кривых насыщения флуоресценции донора) и 390 нм (при построении аналогичных кривых для акцептора). Измеренные кривые насыщения и кинетики для белка БСА представлены на рис. 2. Определенные значения фотофизических параметров флуорофоров белков приведены в таблице 1.

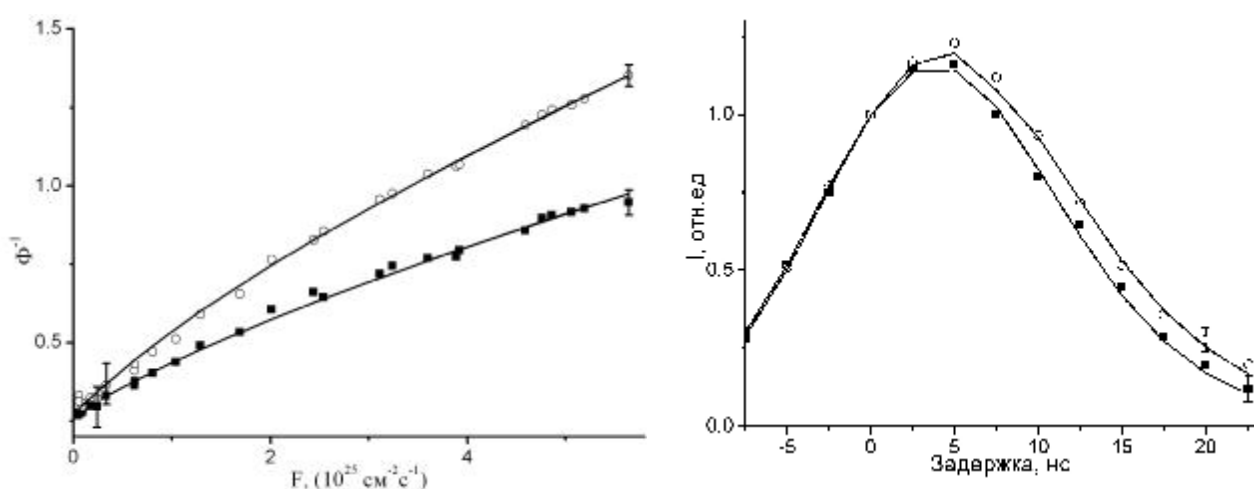


Рис. 2. Кривые насыщения (слева) и кинетические кривые (справа) для белка БСА; квадраты – длина волны регистрации 390 нм, круги – 310 нм; линии – теоретические кривые, построенные по модели (1) для параметров, приведенных в таблице 1.

Таблица 1. Фотофизические параметры флуорофоров белков БСА и САЧ.

Белок	Параметры*		
САЧ	τ_3 , нс		Trp214
	σ , 10^{-17} см ²		4.5±1
	K_{32} , с ⁻¹		1.3±0.2
			<10 ⁻⁷
		Trp134	Trp212
БСА	τ_3 , нс	6.2±1	5±1
	σ , 10^{-17} см ²	3±0.4	1±0.2
	K_{DA} , с ⁻¹		<10 ⁻⁷
	K_{SS} , с ⁻¹		<10 ⁻⁷

* в таблице:

- t_3 - время жизни возбужденного состояния флуорофора;
- σ - сечение поглощения флуорофора;
- K_{DA} и K_{SS} – скорость переноса энергии с возбужденного донора (Trp212) на невозбужденный и возбужденный акцептор (Trp134), соответственно.

В раздел 3.4 описан основанный на лазерной флуориметрии (совместном применении нелинейной и кинетической флуориметрии) комплексный метод

определения индивидуальных фотофизических параметров флуорофоров подансамблей ЛДА пар флуоресцентных белков. Для белка mRFP1 как представителя природных объектов с ЛДА парами установлена схема фотофизических процессов и определены: доля молекул каждого подансамбля ЛДА пар в конечном препарате белка, фотофизические параметры ЛДА пар.

В п. 3.4.1 измеряются и анализируются спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции ансамбля молекул флуоресцентного белка mRFP1. Показано, что возбуждение раствора белка mRFP1 УФ светом (270 нм) приводит к появлению не только флуоресценции в УФ области (максимум 330 нм), которая соответствует флуоресценции триптофана белковой матрицы, но и флуоресценции в видимом диапазоне (максимум 607 нм). Таким образом, молекула белка mRFP1 представляет собой объект с ЛДА парой, донором возбуждения в которой является триптофан матрицы белка, а акцептором – хромофор белка, причем данные стационарной спектроскопии свидетельствуют о наличии эффективного переноса энергии внутри ЛДА пар.

Показано, что конечный препарат белка mRFP1 - это ансамбль молекул с ЛДА парой, состоящий из трех подансамблей, молекулы которых условно обозначаются как R, G и B формы белка. Действием внешних факторов (изменением кислотности раствора и облучением светом с длиной волны 488 нм (п. 3.4.2)) можно сократить количество форм белка до двух (R и G или R и B).

В п. 3.4.3 разработан метод, основанный на совместном применении абсорбционной спектроскопии и наносекундной лазерной флуориметрии с возбуждением на длине волны 532 нм. Метод позволил сформировать первый блок информации, описывающий фотофизические процессы в подансамблях ЛДА пар белка mRFP1, а именно, индивидуальные фотофизические параметры акцептора ЛДА пары (хромофора белка) в каждой из трех форм белка: сечение поглощения, квантовый выход в триплетное состояние (только для R формы), квантовый выход флуоресценции (только для R формы) и время затухания флуоресценции (только для R формы). Помимо этого, определяется соотношение концентраций молекул трех подансамблей ЛДА пар в общем препарате белка.

Разработанный метод имеет практическое значение как метод контроля направленного мутагенеза mRFP1 и поиска мутантов белка с необходимыми для конкретных применений оптическими свойствами. Информация, получаемая методом, также необходима для определения остальных фотофизических параметров (п. 3.4.5), фигурирующих в предложенной модели коллективных состояний (1).

В п. 3.4.4 изложенный в п. 3.4.3 метод применен для определения влияния на соотношение концентраций и индивидуальные фотофизические параметры хромофора белка mRFP1 точечных мутаций по 66 положению: белки mRFP1/Q66S и mRFP1/Q66C. Показано, что индивидуальные значения коэффициентов экстинкции хромофоров коррелируют с объемами боковых радикалов по 66 положению (коэффициент корреляции >0.9).

В п. 3.4.5 развит метод, формирующий второй блок информации, описывающей фотофизические процессы в подансамблях ЛДА пар белка mRFP1, а именно, скорости переноса энергии с донора на акцептор в ЛДА паре каждой из трех форм белка и время внутриволновой релаксации донора (для В и G форм). Для этого разработанный в п. 3.4.3 метод был дополнен измерениями кривых насыщения и кинетических кривых (с пикосекундным возбуждением) при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 266 нм. Регистрация флуоресценции при этом производилась в УФ (флуоресценция акцептора ЛДА пары, максимум на 330 нм) и видимой областях спектра (флуоресценция донора ЛДА пары, максимум на 607 нм). Для уменьшения числа одновременно присутствующих в растворе форм белка (для облегчения анализа данных лазерной флуориметрии) применялась процедура, предложенная в п.п. 3.4.2, 3.4.3. Полученные кривые насыщения изображены на рис. 3 (для случая раствора с R и В формами). Определенные фотофизические параметры представлены в таблице 2.

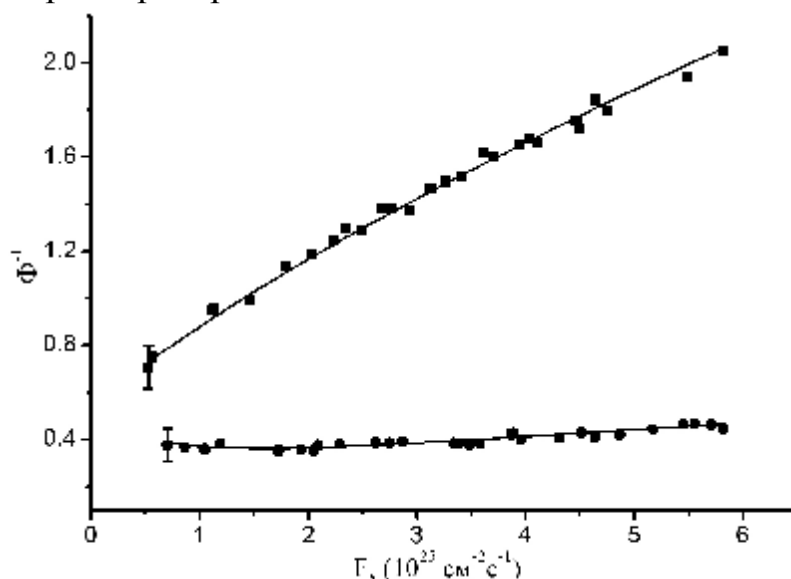


Рис. 3. Кривые насыщения донора (круги) и акцептора (квадраты) в белке mRFP1 для R и В форм.

Таблица 2. Значения фотофизических параметров ЛДА пар белка mRFP1.

Параметр*	Значение параметра для R формы	Значение параметра для В формы	Значение параметра для G формы
$\sigma_D(\lambda_{ex}=266), 10^{-16} \text{ см}^2$	1±0.2		
$K_{DA}, 10^9 \text{ с}^{-1}$	3.7±0.7	7.8±1	2.5±0.7
E	0.89	0.94	0.84
$\tau_3^A, \text{ нс}$	3±1	1.9±0.4	1.7±0.4

* в таблице:

- $S_D(I_{ex}=266)$ – сечение поглощения донора на длине волны 266нм;
- K_{DA} и E – скорость и эффективность переноса энергии с донора на акцептор;
- t_3^A – время жизни возбужденного состояния акцептора.

В заключении сформулированы основные результаты работы.

1. Методом лазерной флуориметрии, использующим согласованно наносекундную кинетическую и нелинейную флуориметрию, одновременно определены значения фотофизических параметров молекул триптофана в воде: сечений поглощения в основном и возбужденном синглетном состояниях, времени жизни возбужденного состояния, суммы скоростей интеркомбинационной конверсии и спонтанной ионизации из возбужденного синглетного состояния. Определены значения фотофизических параметров триптофана в однофлуорофорном белке сывороточный альбумин человека: сечения поглощения, времени жизни возбужденного состояния, скорости интеркомбинационной конверсии.

2. На основе совместного применения абсорбционной спектроскопии, классической и нелинейной лазерной флуориметрии разработан метод определения индивидуальных фотофизических параметров (сечения поглощения, скорости интеркомбинационной конверсии, времени жизни возбужденного состояния) флуоресцирующего хромофора флуоресцентного белка mRFP1 и родственных ему флуоресцентных белков. Метод позволяет также определять долю флуоресцирующего хромофора в смеси хромопротеинов.

3. Введено понятие коллективных состояний локализованных донорно-акцепторных пар (ЛДА пар). Предложена модель, описывающая кинетику населенностей коллективных состояний ЛДА пар и позволяющая рассчитывать кривые насыщения и кинетики флуоресценции ансамблей ЛДА пар при лазерном возбуждении.

4. Предложена методика определения фотофизических параметров флуорофоров в ЛДА паре, основанная на совместном применении нелинейной и кинетической лазерной флуориметрии. Методика применена к растворам двухтриптофанового белка бычьего сывороточного альбумина и флуоресцентного белка mRFP1. Установлена схема фотофизических процессов в них как в представителях систем с локализованными донорно-акцепторными парами. Определены значения индивидуальных фотофизических параметров флуорофоров (хромофоров) указанных белков: сечения поглощения, времени жизни возбужденного состояния, скорости внутримолекулярного переноса энергии.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Банишев А.А., Маслов Д.В., Фадеев В.В. Наносекундный лазерный флуорометр. // Приборы и техника эксперимента, 2006, №3, с. 143-148.
2. Банишев А.А., Вржещ Е.П., Дмитриенко Д.В., Друца В.Л., Маслов Д.В., Пащенко В.З., Ширшин Е.А., Вржещ П.В., Фадеев В.В. Метод определения индивидуальных оптических характеристик посттрансляционных флуоресцентных форм флуоресцентных белков с использованием нелинейной флуориметрии. // Биофизика, 2007, т. 52, №.5, с.792-798.
3. Банишев А.А., Ширшин Е.А, Фадеев В.В. Определение фотофизических параметров молекул триптофана методами лазерной флуориметрии. // Квантовая электроника, 2008, т. 38, №1, с. 77-81.
4. Банишев А.А., Маслов Д.В., Фадеев В.В. Определение квантового выхода синглет-триплетной конверсии в молекулах сложных органических соединений методом нелинейной лазерной флуориметрии. // Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика, астрономия, 2008, №3, с.69-71.
5. Банишев А.А., Маслов Д.В., Мешканцов А.А., Остроумов Е.Е., Фадеев В.В. Кинетическая флуориметрия природных вод. // Сб. статей «Физические проблемы экологии (экологическая физика)», М.: МАКСПресс, 2005, №12, с.138-147.
6. Ostroumov E.E., Banishev A.A., Fadeev V.V., Maslov D.V. Determination of photophysical parameters of organic compounds and their complexes by methods of laser fluorimetry. // Conference on Spectroscopy, Dublin, Ireland, 4-6 April, 2005, Conf. Digest, p.80.
7. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Banishev A.A., Litvinov P.N., Maslov D.V., Ostroumov E.E. Matrix method in laser fluorimetry of organic compounds. // Proc. of SPIE, Opto-Ireland 2005: Optical Sensing and Spectroscopy, 2005, v. 5826, p.44-55.
8. Банишев А.А., Маслов Д.В., Литвинов П.Н. Определение фотофизических параметров сложных органических соединений методом лазерной флуориметрии. // Труды четвертой международной конференции молодых ученых и специалистов “Оптика-2005”, Санкт-Петербург, Россия, 2005, с.306-307.
9. Фадеев В.В., Вржещ П.В., Маслов Д.В., Банишев А.А., Вржещ Е.П., Дмитриенко Д.В., Ширшин Е.А. Флуоресцентные характеристики и молекулярные фотофизические параметры красного флуоресцентного белка mRFP1. // Труды конференции «Альманах клинической медицины», издается МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, 2006. Том XII, с. 42.
10. Ширшин Е.А., Банишев А.А., Вржещ Е.П. Фотофизические параметры и механизмы флуоресценции белка. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-

- 2006», секция «Физика», Москва, Россия, апрель 2006, Тезисы докладов, с. 157.
11. Banishev A.A., Shirshin E.A., Fadeev V.V. Non-linear fluorimetry of fluorescent proteins. // Technical Digest of International Conference on Lasers, Applications and Technologies, Minsk, Belarus, May 28-June 1, p. L06/II-4 (on CD-ROM).
 12. Banishev A.A., Shirshin E.A., Fadeev V.V., Non-linear fluorimetry of fluorescent proteins. // Proc. of SPIE, International Conference on Lasers, Applications and Technologies, Minsk, Belarus, May 28-June 1, V.6733, p.67331B.
 13. Banishev A.A., Shirshin E.A., Fadeev V.V. The investigation and laser control of a new class of biosensors – fluorescent proteins. // Technical Digest of International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS 2007), Moscow, Russia, June 11-14, 2007, p. TuL03P14 (on CD-ROM).
 14. Банишев А.А., Загидуллин В.Э., Пашенко В.З., Ширшин Е.А., Фадеев В.В. Лазерная флуориметрия белков. // Сб. статей «Физические проблемы экологии (экологическая физика)», М.: МАКСПресс, 2007, №14, с.43-61.