

# Локализованные донорно-акцепторные пары флуорофоров: определение скорости переноса энергии методом нелинейной флуориметрии

Е. А. Ширшин<sup>1)</sup>, А. А. Банишев, В. В. Фадеев

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 6 апреля 2009 г.

На основе предложенной авторами модели коллективных состояний локализованных донорно-акцепторных пар флуорофоров развит лазерно-флуоресцентный метод определения скорости переноса энергии, использующий нелинейную флуориметрию (одновременно определяются и другие фотофизические параметры донора и акцептора). Предложенный подход апробирован на флуоресцентном (красном) белке mRFP1.

PACS: 33.15.Nr, 42.62.Fi

1. Под системами с локализованными донорно-акцепторными парами (ЛДАП) подразумеваются объекты (например, макромолекулы) с наличием единичной пары флуорофоров, между которыми возможен перенос энергии возбуждения, что может быть использовано для исследования фотофизических процессов в макромолекулах. Для большинства представляющих практический интерес ЛДА-пар перенос энергии происходит по индуктивно-резонансному (Фёрстеровскому) механизму [1]; за такими парами закрепилось название “FRET-пары” [2]. В данной работе мы будем использовать термин ЛДАП, имеющий более общее значение. Из многочисленных систем, содержащих ЛДА-пары, особый интерес представляют природные соединения – белки, а среди них – флуоресцентные белки (ФБ) [3], прежде всего, благодаря перспективам их использования в качестве индикаторов процессов в живых клетках [4]. Особенности структуры ФБ предоставляют широкие возможности использования ФБ как модельных систем, содержащих ЛДАП. Все это определило выбор одного из представителей ФБ – красного белка mRFP1 [5] в качестве объекта для апробации предлагаемого в данной работе подхода в определении скорости переноса энергии.

Классический метод определения скорости переноса энергии [6] предусматривает этап измерения интенсивности или времени жизни флуоресценции донора в отсутствие акцептора или изменения этих характеристик при калиброванном изменении концентрации акцептора. Для многих систем с ЛДАП, представляющих практический интерес (в частнос-

ти, ФБ), этот прием не может быть реализован. От необходимости указанной процедуры свободен сравнительно новый метод определения скорости переноса энергии, основанный на нелинейной лазерной флуориметрии [7] (при этом одновременно определяются и другие параметры – сечения поглощения и возбуждения, времена жизни возбужденных состояний, скорости интеркомбинационной конверсии). Однако и этот метод, развитый для объектов с конечными значениями концентрации акцептора в области эффективного переноса энергии (например, в пределах нескольких Фёрстеровских радиусов), не применим к ЛДАП, в которых в указанной области находится всего одна молекула акцептора.

2. В данной работе предложен и реализован (на примере ФБ mRFP1) метод определения скорости переноса энергии в ЛДАП, основанный на модели коллективных состояний ЛДАП, предложенной нами в работе [8] применительно к двухтриптофановому белку бычьего сывороточного альбумина (БСА). В [8] с использованием метода нелинейной лазерной флуориметрии определены некоторые фотофизические параметры триптофана (триптофановых остатков) в БСА, но не определена скорость переноса энергии. В настоящей статье мы делаем акцент именно на этой задаче. Общепринятая процедура расчета числа фотонов флуоресценции донора и акцептора базируется на системах кинетических уравнений для населенностей энергетических состояний молекул донора и акцептора [7]. Перенос энергии отражен в этих уравнениях членом  $\bar{K}_{DA} n_3^D n_1^A$ , где  $\bar{K}_{DA}$  – константа скорости переноса энергии,  $n_3^D$  – населенность возбужденного синглетного состояния  $S_1$  донора,  $n_1^A$  – населенность основного состояния  $S_0$  акцептора. Такая

<sup>1)</sup>e-mail: shirshin@lid.phys.msu.ru

запись предполагает, что молекулы акцептора равномерно распределены в объеме, окружающем молекулу донора, где имеет место эффективный перенос энергии. В случае ЛДАП по указанной выше причине этот формализм неприменим. Поэтому введем понятие коллективных состояний, учитывающих одновременно состояния и донора и акцептора, и для них напишем кинетические уравнения. В рамках этой модели возможны четыре коллективных состояния, схематически изображенные на рис.1. Концентрации

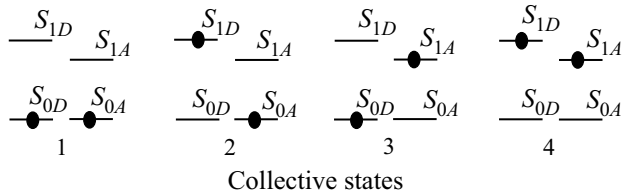


Рис.1. Схематическое изображение коллективных состояний ЛДА пары,  $S_0$  и  $S_1$  – основное и первое возбужденное синглетные состояния; символы D и A относятся к донору и акцептору соответственно

ЛДАП, находящихся в коллективных состояниях 1, 2, 3 и 4, обозначим, соответственно,  $n_1, n_2, n_3, n_4$ . Динамика изменения концентраций приведенных выше четырех коллективных состояний ЛДА-пары математически описывается следующей системой кинетических уравнений:

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

где символы  $D$  и  $A$  относятся к донору и акцептору, соответственно;  $\sigma$  – сечение поглощения;  $K_{DA}$  –

скорость переноса энергии с возбужденного донора на невозбужденный акцептор;  $K_{SS}$  – скорость переноса энергии с возбужденного донора на возбужденный акцептор (синглет-синглетная аннигиляция);  $n_0$  – полная концентрация молекул содержащих ЛДА-пару;  $F(t, \mathbf{r})$  – плотность потока фотонов возбуждающего излучения,  $t$  – время,  $r$  – координата в поперечном сечении лазерного пучка; изменением интенсивности излучения вдоль направления распространения пучка пренебрегаем (приближение оптически тонкого слоя), также пренебрегаем интеркомбинационной конверсией – заселением триплетных состояний донора и акцептора. Зная закон изменения концентрации (населенности) возбужденного синглетного состояния флуоресцирующих молекул, можно рассчитать число фотонов флуоресценции  $N_{fl}$ , испущенных в результате воздействия возбуждающего излучения. В случае осесимметричного пучка этого излучения, для модели (1) имеем

$$N_{fl}^D(\lambda) \propto \int_0^\infty 2\pi r \cdot dr \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} (n_2(t, r) + n_4(t, r)) dt, \quad (2)$$

$$N_{fl}^A(\lambda) \propto \int_0^\infty 2\pi r \cdot dr \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} (n_3(t, r) + n_4(t, r)) dt, \quad (3)$$

где (2) – число фотонов для донора, а (3) – для акцептора.

При небольших значениях плотности потока фотонов  $F$  (интенсивности) возбуждающего излучения зависимость числа испущенных фотонов флуоресценции от  $F$  линейна, однако при увеличении интенсивности падающего излучения она начинает отклоняться от линейной – происходит насыщение флуоресценции (для большинства органических соединений насыщение начинает проявляться при значениях  $F > 10^{23} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  [7], которые достигаются в импульсных лазерах). Вид зависимости  $N_{fl}$  от  $F$  (кривая насыщения флуоресценции) определяется, в общем случае, всеми параметрами модели, в том числе, интересующим нас, в первую очередь, параметром  $K_{DA}$ . Решая обратную задачу, можно, в принципе, определить эти параметры, в чем и состоит метод нелинейной флуориметрии [7] (анализ единственности и устойчивости решения см., например, в [9]). Точность решения задачи возрастает, если провести нормировку числа фотонов флуоресценции  $N_{fl}$  на сигнал, линейно зависящий от  $F$ , например, на сигнал спонтанного комбинационного рассеяния (Raman scattering, RS) возбуждающего излучения молекулами основной компоненты

среды (для водных сред – воды) [7]. Тогда кривая насыщения флуоресценции описывается зависимостью  $\Phi(F) = N_{fl}/N_{RS}$  или  $\Phi^{-1}(F)$ , что на практике удобнее.

3. Предложенные модель и метод апробированы на растворе красного флуоресцентного белка mRFP1. Как модельный объект, этот ФБ предоставляет широкие возможности для такой апробации: формирующийся в результате созревания белка ансамбль макромолекул ФБ mRFP1 состоит, в общем случае, из трех подансамблей, в макромолекуле каждого из которых присутствует ЛДА-пара. Везде донором является триптофан (максимум полосы поглощения  $\lambda_{abs}^D = 260$  нм, максимум полосы флуоресценции  $\lambda_{fl}^D = 350$  нм), а акцептором либо один из хромофоров-интермедиатов – синий ( $\lambda_{abs}^A = 350$  нм) или зеленый ( $\lambda_{abs}^A = 500$  нм), либо красный флуорофор (максимум полосы поглощения с основного состояния на второй возбужденный синглетный уровень  $\lambda_{abs}^A = 350$  нм, максимум полосы флуоресценции  $\lambda_{fl}^A = 607$  нм). Оптические свойства ФБ mRFP1, включая значения фотофизических параметров зеленого хромофора и красного флуорофора, измеренные с использованием нелинейной флуориметрии, приведены в [10]. В настоящей работе объектом исследования была ЛДАП, образованная триптофаном и красным флуорофором белка mRFP1. Получение значения параметра  $K_{DA}$  для этой ЛДАП имело не только методическое значение, но и представляло самостоятельный интерес в связи с возможным использованием этого ФБ в качестве индикатора процессов в живых клетках.

В связи с краткостью изложения мы не останавливаемся здесь на предварительных экспериментах, показавших, что в результате переноса энергии с триптофана на красный флуорофор последний переходит во второе возбужденное синглетное состояние  $S_2$ , а также опускаем ряд других деталей эксперимента.

4. Для измерения  $K_{DA}$  были сняты кривые насыщения донора и акцептора (рис.2) при возбуждении импульсным лазерным излучением с длиной волны 266 нм (4-я гармоника излучения ИАГ:Nd-лазера). Было установлено, что на этой длине волны сечение поглощения красного флуорофора практически равно нулю, то есть не происходит прямого возбуждения акцептора.

По модели (1) из кривых насыщения флуоресценции были восстановлены фотофизические параметры, в том числе скорость переноса энергии, то есть решена обратная задача, в которой было четыре определяемых фотофизических параметра:  $\sigma_{266}$ ,  $\tau_3^D$ ,  $\tau_3^A$

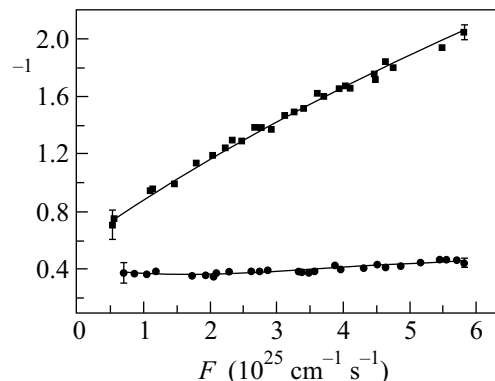


Рис.2. Кривые насыщения донора (нижняя, регистрация флуоресценции на 330 нм) и акцептора (верхняя, регистрация флуоресценции на 607 нм) в mRFP1

и  $K_{DA}$ . С применением поэтапной процедуры эта задача была решена, и получены следующие значения параметров:

$$K_{DA} = (3.7 \pm 7) \cdot 10^9 \text{ с}^{-1},$$

$$\sigma_{266}^D = (1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-17} \text{ см}^2,$$

$$\tau_3^D = (1.7 \pm 0.2) \text{ нс}.$$

5. Обсудим кратко полученный результат.

а) Метод нелинейной флуориметрии позволяет определить истинное (не искаженное влиянием других источников ослабления света на данной длине волны) значение сечения поглощения флуоресцирующей молекулы, причем в отсутствие информации о концентрации молекул (которая, как известно, необходима в традиционных методах абсорбционной спектроскопии). Полученное нами значение  $\sigma_{266}^D$  триптофана в матрице ФБ mRFP1 интересно сравнить со значениями этого параметра для триптофана в водном растворе ( $\sigma_{266} = 1.6 \cdot 10^{-17} \text{ см}^2$  [11]) и в белках САЧ ( $\sigma_{266} = 1.3 \cdot 10^{-17} \text{ см}^2$  [8]) и БСА ( $\sigma_{266}^D = 1 \cdot 10^{-17} \text{ см}^2$  и  $\sigma_{266}^A = 3 \cdot 10^{-17} \text{ см}^2$  [8]).

б) Обратим внимание на то, что значение времени жизни возбужденного состояния донора, которое было бы в отсутствие акцептора, получено без применения процедуры удаления акцептора. Для ФБ mRFP1 оно также получено нами. Для триптофана в водном растворе  $\tau_3^D = 2.8$  нс [11], для триптофана в сывороточном альбумине человека (САЧ)  $\tau_3^D = 4.5$  нс [8], в БСА  $\tau_3^D = 5$  нс и  $\tau_3^A = 6.2$  нс [8].

в) Полученное в данной работе значение параметра  $\tau_3^A = (2.7 \pm 0.3)$  нс (для красного флуорофора ФБ mRFP1) в пределах погрешности совпало со значением этого параметра, полученного в работе [10] при прямом возбуждении в полосу поглощения красного флуорофора.

г) Из полученных значений фотофизических параметров следует, что эффективность (квантовый выход) переноса энергии в ЛДАП ФБ mRFP1 составила  $0.85 \pm 0.15$ . Это свидетельствует о перспективности данного ФБ как индикатора состояния живых систем с использованием скорости переноса энергии в качестве информативного параметра. Впрочем, эта проблема имеет многофакторный характер и требует специального рассмотрения.

Таким образом, предложенный способ измерения  $K_{DA}$  в ЛДАП, основанный на методе нелинейной лазерной флуориметрии с применением модели коллективных состояний ЛДАП, показал свою работоспособность при апробации на одном из популярных в настоящее время объектов – ФБ mRFP1. Отметим, что был использован упрощенный вариант модели, не учитывающий ряд возможных факторов: интеркомбинационную конверсию в молекулах донора и акцептора; обратимые и необратимые фотохимические процессы, влияющие на населенности энергетических состояний донора и акцептора и др. С применением предложенного метода нет принципиальных препятствий для учета такого рода факторов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант # 08-05-00892а).

1. В. М. Агранович, М. Д. Галанин, М.: Наука, 1978.
2. L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819 (1978).
3. R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998).
4. Н. Н. Зубова, А. П. Савицкий, *Успехи биологической химии*, **45**, 391 (2005).
5. R. Campbell, O. Tour, A. Palmer et al., *PNAS* **99**, 7877 (2002).
6. Дж. Лакович, М: Мир, 1986.
7. В. В. Фадеев, *Вестник МГУ, сер.3, Физика, астрономия* **4**, (1998),
8. А. А. Банисhev, Е. А. Shirshin, and V. V. Fadeev, *Laser Physics*, **18**, 7 (2008).
9. И. В. Бойчук и др., *Квантовая электроника* **30**, 7 (2002).
10. А. А. Банишев, Е. П. Вржеш, Д. В. Дмитриенко и др., *Биофизика* **52**, 792 (2007).
11. А. А. Банишев, Е. А. Ширшин, В. В. Фадеев, *Квантовая электроника* **38**, 77 (2008).