

# ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА ЙОДИД-ИОНАМИ

## Теоретическое введение

### *Явление флуоресценции*

Каждая молекула имеет серию заполненных и свободных электронных орбиталей. При поглощении кванта света электрон переходит на орбиталь с более высокой энергией (при этом молекула переходит с основного электронного энергетического уровня  $S_0$  на один из возбужденных  $S_1^*$ ,  $S_2^*$ , ...) (рис. 1). Вне зависимости от того, на какой возбужденный электронный уровень попала молекула при поглощении фотона, в течение  $10^{-13} - 10^{-12}$  с она оказывается на нижнем колебательном подуровне состояния  $S_1^*$ . Возврат молекулы с этого подуровня в невозбужденное состояние  $S_0$  может сопровождаться излучением кванта флуоресценции. Для большинства органических молекул время жизни в состоянии  $S_1^*$  составляет  $10^{-9} - 10^{-8}$  с, что соответствует времени затухания флуоресценции после отключения возбуждающего света.

Так как часть поглощенной световой энергии теряется в тепло (внутренняя конверсия), кванты флуоресценции имеют меньшую энергию, чем поглощенные кванты (спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую область относительно спектра поглощения – закон Стокса).

Кроме излучательного перехода (флуоресценция), возможна и безызлучательная дезактивация возбужденного состояния  $S_1^*$ . Существуют различные механизмы обратного перехода возбужденной молекулы в основное состояние без высвечивания фотонов: внутренняя конверсия (растрата энергии в тепло), переход через триплетный уровень, взаимодействие с тушителем и др. Параметр, характеризующий вероятность излучательного перехода, называют квантовым выходом флуоресценции. По определению, квантовый выход – это отношение числа квантов, высвеченных в виде флуоресценции, к числу поглощенных квантов.

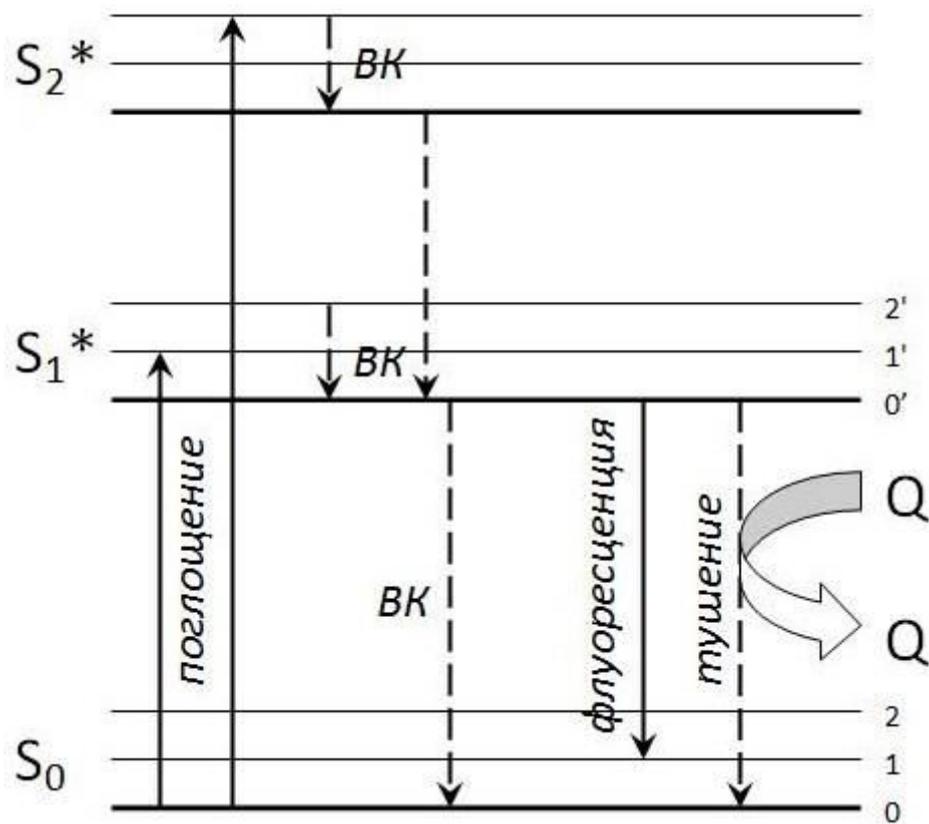


Рис. 1. Схема энергетических уровней молекулы.

$S_0$  – основное (невозбужденное) состояние,  $S_1^*$  и  $S_2^*$  - возбужденные состояния. Жирные горизонтальные линии – чисто электронные энергетические уровни, тонкие линии – колебательные уровни (0, 0', 1, 1', 2, 2'). Сплошные стрелки – поглощательные и излучательные электронно-колебательные переходы, штриховые стрелки – безызлучательные переходы. ВК – внутренняя конверсия.

Флуоресцируют многие биомолекулы: НАДН (восст.), ФАД и ФМН (окисл.), пиридоксальфосфат, хлорофиллы и белки. Собственная флуоресценция белков (при отсутствии флуоресцирующих кофакторов и простетических групп) обусловлена ароматическими аминокислотами, главным образом, триптофаном. Флуоресценция триптофана весьма чувствительна к полярности микроокружения: при увеличении гидрофобности максимум флуоресценции сдвигается в коротковолновую область. В ряде случаев спектр флуоресценции триптофана изменяется при конформационных переходах в белках, связывании лигандов, денатурации.

## Тушение флуоресценции

Взаимодействие флуорофора, находящегося в возбужденном состоянии, с некоторыми молекулами (тушителями флуоресценции) может приводить к безызлучательному переходу в основное электронное состояние (рис. 1). Таким образом, в присутствии тушителя снижается квантовый выход флуоресценции. Этот процесс называют динамическим тушением флуоресценции. Действие большинства молекул тушителей связано с возмущением электронной структуры флуорофора.

Наиболее активными тушителями являются тяжелые анионы и катионы (I, Br<sup>-</sup>, Cs<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>), парамагнетики (O<sub>2</sub>, NO, Mn<sup>2+</sup>, нитроксильные радикалы), акриламид.

Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K[Q] \quad (1)$$

Здесь  $I_0$  и  $I$  — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя,  $k_q$  — бимолекулярная константа скорости тушения,  $\tau_0$  — время жизни флуоресцирующей молекулы в возбужденном состоянии в отсутствие тушителя, а  $[Q]$  — концентрация тушителя. Произведение  $k_q \cdot \tau_0 = K$  называют константой Штерна-Фольмера или константой тушения. Из уравнения (1) следует, что график зависимости  $I_0/I$  от  $[Q]$  (график Штерна-Фольмера) представляет собой прямую, угловой коэффициент которой равен константе тушения  $K$ .

Флуоресценция аминокислоты триптофана весьма чувствительна к присутствию тушителей. В белках флуоресценция триптофановых остатков, локализованных на поверхности глобулы, эффективно тушится водорастворимыми тушителями, например ионами I. Если триптофан локализован внутри макромолекулы и белок непроницаем для йодид-ионов, то тушение наблюдаться не будет. Таким образом, тушение флуоресценции можно использовать для определения локализации остатков триптофана в белках.

При наличии в белке триптофанов, недоступных для тушителя, линейная зависимость между  $I_0/I$  и  $[Q]$  нарушается: график Штерна-Фольмера изгибается к оси  $x$  при высоких концентрациях тушителя.

Предположим, что в белке имеются два остатка триптофана, один из которых доступен для тушителя, а другой — недоступен. Интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя ( $I_0$ ) равна сумме интенсивностей флуоресценции каждого из триптофановых остатков ( $I_{01}$  и  $I_{02}$ ):

$$I_0 = I_{01} + I_{02}. \quad (2)$$

В присутствии тушителя интенсивность флуоресценции доступных остатков снижается в соответствии с уравнением Штерна-Фольмера (1). При этом флуоресценция недоступных для тушителя остатков триптофана не изменяется:

$$I = \frac{I_{01}}{1+K[Q]} + I_{02}. \quad (3)$$

Вычитание уравнения (3) из уравнения (2) дает

$$\Delta I = I_0 - I = \frac{I_{01}K[Q]}{1+K[Q]}. \quad (4)$$

После несложных преобразований получаем

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{fK[Q]} + \frac{1}{f}, \quad (5)$$

где  $f = \frac{I_{01}}{I_{01} + I_{02}}$  — доля начальной флуоресценции, доступной для тушителя.

Уравнение (5) — это модифицированная форма уравнения Штерна-Фольмера. График зависимости  $I_0/(I_0 - I)$  от  $[Q]^{-1}$  представляет собой прямую, отсекающую на оси  $y$  величину, обратную  $f$ . По наклону прямой можно определить константу Штерна-Фольмера для доступного тушителю триптофанового остатка.

## Практическая часть

В задаче используются следующие растворы:

1. Раствор триптофана (250 мкМ).
2. Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) (25 мкМ).
3. Раствор NaI (0,5 М).

Все растворы готовятся на 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,4.

Спектры поглощения растворов триптофана и БСА регистрируют на двухлучевом спектрофотометре Specord UV-VIS. Спектры флуоресценции получают на спектрофлуориметре Hitachi 850.

Задание 1. Зарегистрируйте спектры поглощения растворов триптофана (100 мкМ) и БСА (25 мкМ) в буфере в диапазоне длин волн 240 – 340 нм. Определите положение максимумов поглощения.

Задание 2. Приготовьте растворы триптофана (10 мкМ) и БСА (1 мкМ), содержащие различные концентрации тушителя NaI (0, 25, 50, 100, 200 мМ). Зарегистрируйте спектры флуоресценции этих растворов в диапазоне длин волн 300 – 500 нм (длина волны возбуждения – 280 нм). Определите положение максимумов флуоресценции.

Обработка результатов проводится в программе OriginLab 8.0.

1. Постройте графики зависимости интенсивности флуоресценции в максимуме для растворов триптофана и БСА от концентрации тушителя (NaI).
2. Постройте графики Штерна-Фольмера (зависимость  $I_0/I$  от концентрации NaI, уравнение (1)) для тушения флуоресценции триптофана и БСА. Аппроксимируйте данные для триптофана линейной функцией и найдите константу тушения.
3. Постройте модифицированные графики Штерна-Фольмера (зависимость  $I_0/(I_0 - I)$  от величины, обратной концентрации тушителя, уравнение (5)). Аппроксимируйте данные линейной функцией и найдите параметр  $f$ , а также константу тушения для доступного иону Г остатка триптофана БСА.

## Контрольные вопросы

1. Переход молекул флуоресцирующего вещества из первого возбужденного электронного состояния  $S_1^*$  в основное  $S_0$  можно представить как совокупность параллельных реакций, характеризующихся константами  $k_f$  (флуоресценция),  $k_d$  (тепловая диссипация) и  $k_q[Q]$  — тушение. Покажите, что после отключения возбуждающего света, количество молекул флуоресцирующего вещества в состоянии  $S_1^*$  ( $N$ ) будет уменьшаться по закону  $N = N_0 \cdot \exp(-t / \tau)$ , где  $N_0$  — количество молекул в  $S_1^*$  в момент отключения

света,  $t$  — время, а  $\tau = I / (k_f + k_d + k_q[Q])$  — время жизни молекулы в возбужденном состоянии.

2. Покажите, что в случае динамического тушения флуоресценции  $\tau_0 / \tau = \varphi_0 / \varphi = 1 + K[Q]$ . Здесь  $\tau_0$  и  $\varphi_0$  — время жизни возбужденного состояния и квантовый выход флуоресценции в отсутствие тушителя, а  $\tau$  и  $\varphi$  — эти величины в присутствии тушителя,  $K$  — константа тушения,  $[Q]$  — концентрация тушителя.

3. Для многих глобулярных белков показано, что молекулярный кислород является значительно более эффективным тушителем флуоресценции остатков триптофана, чем йодид-ион. Как можно объяснить эти данные?

4. Кроме описанного ранее динамического тушения флуоресценции существует статическое тушение, связанное с образованием нефлуоресцирующих комплексов НК флуоресцирующих молекул  $\Phi$  с молекулами тушителя  $Q$ . Покажите, что для статического тушения зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя описывается уравнением аналогичным уравнению Штерна-Фольмера  $I_0 / I = 1 + K[Q]$ , где  $K$  — константа равновесия реакции  $\Phi + Q = \text{НК}$ .

5. Как экспериментально различить статическое и динамическое тушение флуоресценции?