

РЕЗОНАНСНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ МЕЖДУ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ РОТОРАМИ SYBR GREEN, ИНТЕРКАЛИРОВАННЫМИ В ДНК

С. А. Тихомиров¹, А. П. Блохин¹, В. А. Поводайло^{1*}, А. С. Пилипович,
Д. Л. Яковлев¹, Ф. Фань², В. В. Шманай², Р. Н. Minh³, P. V. Duong³

УДК (535.37+535.338.42):547.963.32

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-2-202-210>

¹ Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail: lsfm@imaph.bas-net.by

² Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³ Институт физики, Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой, Вьетнам

(Поступила 2 декабря 2022)

Изучены зависимости интенсивности и анизотропии флуоресценции молекулярных роторов SYBR Green (SG) и двуцепочечных ДНК с 10, 20 и 100 парами оснований от их относительной концентрации в растворах, а также от вязкости среды. Показано, что увеличение интенсивности флуоресценции с повышением концентрации SG и последующий выход на постоянное значение связаны с начальным ростом числа интеркалированных в ДНК молекул SG и дальнейшим процессом насыщения и образования нефлуоресцирующих состояний. Для объяснения резкого падения анизотропии флуоресценции из-за фёрстеровского внутримолекулярного переноса энергии между молекулами SG, связанными с ДНК, разработана обобщенная модель, учитывающая как внутренние повороты, так и вращательную диффузию молекулярного комплекса в целом. Предложенная модель позволила универсальным способом рассчитать полученные экспериментальные зависимости анизотропии флуоресценции от вязкости среды при различных соотношениях краситель/ДНК и сделать оценки скорости фёрстеровского переноса энергии.

Ключевые слова: молекулярные роторы, интеркаляторы, двуцепочечные ДНК, диполь-дипольный перенос энергии, анизотропия флуоресценции.

The dependences of the fluorescence intensity and anisotropy of molecular rotors SYBR Green (SG) and double-stranded DNA with 10, 20, and 100 base pairs on their relative concentration in solutions, as well as on the viscosity of the medium, were studied. It was shown that an increase in the fluorescence intensity with an increase in the SG concentration and subsequent reaching a constant value is associated with an initial increase in the number of SG molecules intercalated in DNA and a further process of saturation and the formation of nonfluorescent states. To explain the sharp drop in fluorescence anisotropy due to the Förster intramolecular energy transfer between DNA-bound SG molecules, a generalized model was developed that takes into account both internal rotations and rotational diffusion of molecular complex as a whole. The proposed model made it possible to calculate universally the obtained experimental dependences of the fluorescence anisotropy on the viscosity of the medium at various dye/DNA ratios and to estimate the Förster energy transfer rates.

Keywords: molecular rotors, intercalators, double-stranded DNA, dipole-dipole energy transfer, fluorescence anisotropy.

RESONANCE ENERGY TRANSFER BETWEEN MOLECULAR ROTORS SYBR GREEN INTERCALATED IN DNA

S. A. Tikhomirov¹, A. P. Blokhin¹, V. A. Povedailo^{1*}, A. S. Pilipovich, D. L. Yakovlev¹, F. Fan², V. V. Shmanai², P. H. Minh³, P. V. Duong³ (¹ B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: lsfm@imaph.bas-net.by; ² Institute of Physical Organic Chemistry, Minsk, Belarus; ³ Institute of Physics, Vietnam Academy of Sciences and Technology, Da Dinh, Hanoi, Vietnam)

Введение. Для анализа ДНК в последнее время активно используются цианиновые красители SYBR Green I (SG) и Pico Green (PG), которые отличаются от известных интеркаляторов существенным увеличением интенсивности флуоресценции при взаимодействии с двухцепочечной спиралью (дцДНК). Молекулы SG и PG представляют собой молекулярные роторы [1—4], в которых доноры и акцепторы зарядов связаны мостиком и могут совершать сверхбыстрые повороты в маловязких средах. Эффект резкого увеличения интенсивности связан с торможением их внутренних поворотов после возбуждения в результате интеркаляции в ДНК. Показано [5], что при встраивании PG в амилоидные фибриллы интенсивность флуоресценции красителя увеличивается в 1000 раз, тогда как в тех же условиях интенсивность теофлавина Т (ThT) возрастает в 400 раз. О существенном росте интенсивности флуоресценции ThT (на несколько порядков) в составе комплекса с амилоидными фибриллами сообщалось в работах [6, 7]. Спектры поглощения и флуоресценции SG и PG по сравнению с ThT смещены в низкочастотную область на ~60 нм, что имеет преимущество в более глубоком проникновении возбуждающего излучения и дает более четкую визуализацию амилоидных фибрилл [5]. При исследовании спектральных свойств молекул SG при взаимодействии с дцДНК обнаружено [1], что кроме интеркаляции они могут связываться и с малой бороздкой дцДНК. Известно [8], что краситель Hoechst 33258 эффективно связывается в малой бороздке дцДНК предпочтительно с АТ сайтами. В [9] показано, что SG вытесняет первоначально связанные с дцДНК молекулы Hoechst 33258. Конкурентное замещение молекул Hoechst 33258 красителем SG подтверждает взаимодействие SG с малыми бороздками дцДНК. При повышении плотности интеркаляции молекул красителя в цепочки ДНК и сокращении расстояний между ними существенно возрастает вероятность резонансного переноса энергии оптического возбуждения. Для контроля эффективности переноса для одинаковых молекул доноров и акцепторов помимо исследования зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации SG в растворе необходимо проводить измерения анизотропии флуоресценции. С целью изучения процесса переноса между молекулярными роторами выбраны короткоцепочечные олигонуклеотиды — фрагменты дцДНК с интеркалированными молекулами SG. Такие дцДНК имеют достаточно жесткую структуру, и для них можно оценивать количество интеркалированных молекул SG и расстояния между последними.

Эксперимент. Краситель SG приобретен у фирмы Invitrogen (Carlsbad, California, США) в виде концентрированного раствора в диметилсульфоксиде. Олигонуклеотиды синтезированы ОДО “Праймтех” (Беларусь). Исследованы три дуплексные нуклеиновые кислоты с 10, 20 и 100 парами оснований при постоянной концентрации $3.7 \cdot 10^{-7}$ М. Экспериментально в фосфатный буферный раствор (рН 7.0) с дцДНК добавляли SG. Концентрация красителя определялась по спектрам поглощения в растворе при комнатной температуре с учетом коэффициента экстинкции в максимуме первой полосы $\varepsilon_{495} = 70000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В качестве растворителя использована вода с технологией очистки milli Q. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции, а также времена жизни возбужденных состояний комплексов SG и дцДНК зарегистрированы при возбуждении излучением 450 нм на спектрометрическом комплексе Horiba Scientific Fluorolog-3, спектры поглощения — на спектрофотометре Shimadzu UV-3600 Plus.

Теория. Для анализа экспериментальных данных по анизотропии флуоресценции молекул SG, интеркалированных в дцДНК, необходимы сведения о взаимном расположении молекул красителя между плоскостями олигонуклеотидов. В связи с этим проведен расчет равновесной конфигурации молекулы SG в основном состоянии, энергии возбужденного электронного состояния S_1 и ориентации дипольного момента S_0 – S_1 -перехода методами DFT и TD-DFT программы Gaussian 09. Для оптимизации равновесной конфигурации использован функционал UB3LYP с базисным набором функций 6-311G(d,p) для катионной формы с зарядом +2 в вакууме.

Согласно расчетам, молекула SG обладает двумя конформерами, различающимися разворотом тиазольного фрагмента молекулы относительно хинолинового. Оптимизированная равновесная конфигурация молекулы SG представлена на рис. 1 для более устойчивого конформера. Структура SG неплоская, двугранный угол между хинолиновым и фенильным фрагментами ~93°, угол между хинолиновой и тиазольной составляющими ~35°. Поскольку атомы каждого из трех фрагментов молекулы SG не лежат в плоскостях, указаны приблизительные значения двугранных углов. Две ветви молекулы (диметиламинопропиловая и пропиловая) могут свободно вращаться вокруг C–N-связи. Рассчитанная длина волны электронного перехода S_0 – S_1 438.83 нм⁻¹, сила осциллятора 0.876. Данное возбужденное состояние описывается одной волновой функцией в одноэлектронном приближении и соответствует продвижению электрона из верхней заполненной молекулярной орбитали (HOMO)

136a,b на нижнюю вакантную молекулярную орбиталь (LUMO) 137a,b, принадлежащую тиазольно-хинолиновой составляющей (рис. 1). Длина волны электронного $S_0 \rightarrow S_1$ -перехода, полученная из спектров поглощения SG в буферном растворе с pH 7.0, составляет 513 нм. Вращательные постоянные молекулы: $A = 0.1134835$, $B = 0.0624806$ и $C = 0.0462575$ ГГц, проекции вектора дипольного момента перехода (\mathbf{d}) на оси главных моментов инерции 3.3185, 1.2811 и -0.0041 отн. ед. соответственно. Вектор \mathbf{d} и оси главных моментов инерции (x, y, z) молекулы SG приведены на рис. 1, ось z наибольшего главного момента инерции перпендикулярна плоскости рисунка. Можно полагать, что вектор дипольного момента перехода молекул SG, интеркалированных в структуру дцДНК, ориентирован примерно перпендикулярно оси цепочки. Это следует из результатов [10], согласно которым тиазол-хинолиновый фрагмент интеркалированной молекулы расположен параллельно между плоскостями оснований нуклеотидов дцДНК, а также из приведенных выше результатов расчета ориентации вектора дипольного момента перехода SG.

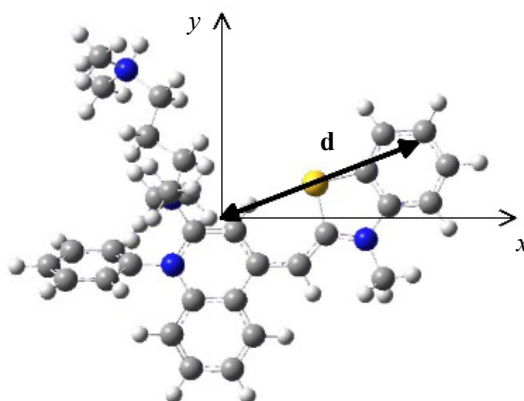


Рис. 1. Рассчитанная квантово-химическим методом равновесная структура молекулы SG и ориентация дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ в осях главных моментов инерции (x, y, z)

Известно, что в системах на основе ДНК между одинаковыми интеркалированными хромофорами может происходить перенос энергии по фёрстеровскому механизму (homo-FRET). Так как спектры доноров и акцепторов одинаковы, по изменениям интенсивности флуоресценции можно лишь оценивать количество интеркалировавших красителей в молекулы ДНК. В этом случае параметры процесса безызлучательного диполь-дипольного переноса энергии от донора к акцептору контролируют по анизотропии флуоресценции. Вероятность переноса рассчитывается из выражения [11]

$$w_{12} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{12}} \right)^6, \quad (1)$$

где

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \gamma_D}{128 \pi^5 n^4 N} \int_0^\infty I_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \nu^{-4} d\nu, \quad (2)$$

R_0 — критическое расстояние между донором и акцептором при равенстве скоростей переноса энергии и распада возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора (радиус Фёрстера); τ_D и γ_D — время жизни и квантовый выход донора в отсутствие переноса энергии; n — показатель преломления среды; N — число Авогадро; $I_D(\nu)$ — спектральное распределение флуоресценции донора, нормированное к единице; $\epsilon_A(\nu)$ — молярный коэффициент экстинкции акцептора,

$$\kappa = (\mathbf{d}_1 \cdot \mathbf{d}_2) - 3(\mathbf{d}_1 \cdot \mathbf{r}_{12})(\mathbf{d}_2 \cdot \mathbf{r}_{12}) \quad (3)$$

— ориентационный фактор переноса; \mathbf{d}_1 , \mathbf{d}_2 — единичные векторы дипольных моментов переходов донора и акцептора; \mathbf{r}_{12} — единичный вектор вдоль направления от донора к акцептору. Если подставить в выражение (3) вместо скалярных произведений векторов

$$(\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}) = d_{00}^1(\Theta_{ab}), \quad (\mathbf{a} \cdot \mathbf{b})^2 = \frac{1}{3}(1 + 2d_{00}^2(\Theta_{ab})), \quad (4)$$

$$d_{00}^j(\theta_{ab}) = \sum_{m=-j}^j D_{m0}^j(\Omega_a) D_{m0}^{j*}(\Omega_b), \quad (5)$$

функции Вигнера $D_{m0}^j(\Omega_i) \equiv D_{m0}^j(\Psi_i, \Theta_i, 0)$ [12] ($\Psi_i, \Theta_i, (i = \mathbf{a}, \mathbf{b})$ — полярный и азимутальный углы векторов \mathbf{a} и \mathbf{b} в молекулярной системе координат) и преобразовать их произведения, используя свойства неприводимых тензоров, как в [13], можно получить выражение для квадрата ориентационного фактора

$$\begin{aligned} \frac{3}{2} \kappa^2 = 1 + \frac{1}{5} \sum_{m=-2}^2 D_{m0}^2(\Omega_1) D_{m0}^{2*}(\Omega_2) + \sum_{m=-2}^2 (D_{m0}^2(\Omega_{1r}) + D_{m0}^2(\Omega_{2r}) - \\ - \frac{2}{7} T_m^2(\Omega_1, \Omega_2)) D_{m0}^{2*}(\Omega_r) + \frac{108}{35} \sum_{m=-4}^4 T_m^4(\Omega_1, \Omega_2) D_{m0}^{4*}(\Omega_r), \\ T_{m_r}^j(\Omega_1, \Omega_2) = (C_{2020}^{j0})^{-1} \sum_{m_d, m_a=-2}^2 C_{2m_d, 2m_a}^{jm_r} D_{m_d0}^2(\Omega_1) D_{m_a0}^2(\Omega_2), \end{aligned} \quad (6)$$

где $C_{2m_1, 2m_2}^{jm}$ — коэффициенты Клебша—Гордана; $C_{2020}^{20} = -\sqrt{2/7}$, $C_{2020}^{40} = 3\sqrt{2/35}$ [12]. В качестве молекулярной системы координат для описания ориентационного фактора ДНК с флуоресцентными метками удобно выбрать систему координат, в которой вектор \mathbf{r} направлен вдоль оси ДНК $\Omega_r(0,0,0)$. Тогда выражение (6) упрощается:

$$\begin{aligned} \frac{3}{2} \kappa^2 = 1 + \frac{1}{5} \sum_{m=-2}^2 (D_{m0}^2(\Omega_{1r}) D_{m0}^2(\Omega_{2r}) + D_{m0}^2(\Omega_{1r}) + D_{m0}^2(\Omega_{2r})) - \frac{2}{7} T_0^2(\Omega_{1r}, \Omega_{2r}) + \frac{108}{35} T_0^4(\Omega_{1r}, \Omega_{2r}), \\ T_0^j(\Omega_{1r}, \Omega_{2r}) = (C_{2020}^{j0})^{-1} \sum_{m=-2}^2 C_{2m2-m}^{j0} D_{m0}^2(\Omega_{1r}) D_{-m0}^2(\Omega_{2r}). \end{aligned} \quad (7)$$

В теоретическом подходе процесс переноса энергии между парой флуорофоров, интеркалированных в олигонуклеотид с внутримолекулярной вращательной диффузией, можно описать через тензорные ориентационные корреляционные функции, для которых разработаны различные апробированные модели. Положим, что донор и акцептор совершают повороты по азимутальным углам $\varphi_1(t)$, $\varphi_2(t)$ в конусах с углами раствора ϑ_1 , ϑ_2 . При этом оси конусов направлены под углами ξ_1 , ξ_2 к длинной оси олигонуклеотида z . Матрицы поворотов от системы координат, ось z которой совпадает с вектором \mathbf{r} , к системам координат донора и акцептора для такой ситуации имеют вид:

$$D_{k0}^2(\Omega_{r1}(t)) = \sum_{n=-2}^2 D_{kn}^2(\psi_1, \xi_1, 0) D_{n0}^2(\varphi_1(t), \theta_1, 0), \quad (8)$$

$$D_{k0}^2(\Omega_{r2}(t)) = \sum_{n=-2}^2 D_{kn}^2(\psi_2, \xi_2, 0) D_{n0}^2(\varphi_2(t), \theta_2, 0), \quad (9)$$

а матрица их поворота относительно друг друга

$$d_{00}^2(\Theta_{12}(t)) = \sum_{k, n_1, n_2=-2}^2 D_{kn_1}^2(\psi_1, \xi_1, 0) D_{n_10}^2(\varphi_1(t), \theta_1, 0) D_{kn_2}^{2*}(\psi_2, \xi_2, 0) D_{n_20}^{2*}(\varphi_2(t), \theta_2, 0). \quad (10)$$

Можно полагать, что динамика внутренних диффузионных вращений донора и акцептора хаотична и взаимно не коррелирована. Кроме того, даже для короткоцепочечных фрагментов ДНК скорости внутренних поворотов существенно выше скоростей вращательной диффузии молекулярного комплекса в целом. Например, для молекул PG, интеркалированных в ДНК, измеренное в поляризационном эксперименте время внутренней ориентационной релаксации < 0.4 нс [14]. Поэтому полагаем, что ориентация диполей донора и акцептора равномерно распределена по азимутальным углам диффузии φ_1 , φ_2 от 0 до 2π . После подстановки (8)—(10) в (7) получаем усредненный по φ_i ориентационный фактор:

$$\begin{aligned} \frac{3}{2} \langle \kappa^2 \rangle_{\varphi_i} = 1 + d_{00}^2(\xi_1) d_{00}^2(\theta_1) + d_{00}^2(\xi_2) d_{00}^2(\theta_2) + d_{00}^2(\xi_1) d_{00}^2(\xi_2) \times \\ \times \left(\frac{1}{5} d_{00}^2(\vartheta_{12}) - \frac{2}{7} \sum_{k=-2}^2 \bar{C}_{2k2-k}^{20} D_{2k}^2(\psi_1, \vartheta_1, 0) D_{2-k}^2(\psi_1, \vartheta_1, 0) + \frac{108}{35} \sum_{k=-2}^2 \bar{C}_{2k2-k}^{20} D_{2k}^2(\psi_1, \vartheta_1, 0) D_{2-k}^2(\psi_2, \vartheta_2, 0) \right). \end{aligned} \quad (11)$$

Здесь $\bar{C}_{2k2-k}^{j0} = C_{2k2-k}^{j0} / C_{2020}^{j0}$. Предположим, что оси диффузионных конусов примерно направлены под углами $\xi_1 = \xi_2 \approx \pi/2$ к оси z . Тогда выражение (11) можно привести к виду

$$\frac{3}{2} \langle \kappa^2 \rangle = 1 - \frac{1}{2} (d_{00}^2(\theta_1) + d_{00}^2(\theta_2)) + \frac{1}{5} d_{00}^2(\theta_1) d_{00}^2(\theta_2) d_{00}^2(\psi) + \frac{1}{10} (7 + 6 \cos 2\psi) d_{00}^2(\theta_1) d_{00}^2(\theta_2). \quad (12)$$

В таком случае угол между конусами диффузии $\psi = \psi_1 - \psi_2$ донора и акцептора представляет собой угол поворота в плоскости, перпендикулярной оси ДНК. В отсутствие внутренних поворотов донора и акцептора, т. е. при $\theta_1 = \theta_2 = 0$, из (12) следует $\kappa^2 = \cos^2 \psi$.

Известно, что при внутримолекулярном диполь-дипольном переносе энергии происходит деполяризация флуоресценции из-за внутренних поворотов доноров и акцепторов. Поскольку скорости вращательной диффузии молекулярного объекта в целом намного меньше скоростей внутренней диффузии, для учета вращательной деполяризации флуоресценции комплекса короткоцепочечных ДНК с парой молекул SG можно использовать систему диффузионных уравнений для плотностей вероятностей распределений осей конусов внутренней диффузии донора $\rho_1(\Omega, t)$ и акцептора $\rho_2(\Omega, t)$ по углам ориентации относительно лабораторной системы координат Ω :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho_1(\Omega, t)}{\partial t} &= -(D_{\parallel} \hat{L}_{\parallel} + D_{\perp} \hat{L}_{\perp} + \tau_1^{-1} + w_{12}) \rho_1(\Omega, t) + w_{21} \rho_2(\Omega, t), \\ \frac{\partial \rho_2(\Omega, t)}{\partial t} &= -(D_{\parallel} \hat{L}_{\parallel} + D_{\perp} \hat{L}_{\perp} + \tau_2^{-1} + w_{21}) \rho_2(\Omega, t) + w_{12} \rho_1(\Omega, t). \end{aligned} \quad (13)$$

Здесь D_{\parallel}, D_{\perp} — компоненты тензора вращательной диффузии молекулярного комплекса в целом вдоль длинной оси олигонуклеотида и перпендикулярно к ней; $\hat{L}_{\parallel}, \hat{L}_{\perp}$ — компоненты оператора углового момента. Фактически уравнение (13) для усредненных по быстрым переменным соответствует предположению о разделении внутренней и общей вращательных диффузий [15, 16]. Если обмен энергией происходит между одинаковыми молекулами, которые находятся в одинаковом локальном окружении, можно предположить, что $w_{12} = w_{21} = w$ и $\tau_1 = \tau_2 = \tau$. Положим, после возбуждения импульсом света с вектором поляризации \mathbf{e}_1 в момент времени $t = 0$ в ансамбле доноров образуется анизотропия, пропорциональная угловой зависимости вероятности поглощения $\sim (\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{d}_1(0))^2$, а в момент t происходит испускание света с вектором поляризации \mathbf{e}_2 донором с вероятностью $\sim (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_1(t))^2$ или акцептором $\sim (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_2(t))^2$. Используем в (13) для вероятностей поглощения и испускания:

$$(\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{d}_i)^2 = 1 + 2 \sum_{m,k,n=-2}^2 D_{0m}^2(\Omega_{E1L}) D_{mk}^2(\Omega_{LM}) D_{kn}^2(\psi_i, \xi_i, 0) D_{n0}^2(\varphi_i, \theta_i, 0), \quad (14)$$

как и для скоростей переноса, усредненные по быстрым вращениям величины

$$\langle (\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{d}_i)^2 \rangle_{\varphi_i} = 1 + 2 \sum_{m,k=-2}^2 D_{0m}^2(\Omega_{E1L}) D_{mk}^2(\Omega_{LM}) D_{k0}^2(\psi_i, \xi_i, 0) d_{00}^2(\theta_i). \quad (15)$$

Преимущество уравнений (13) в том, что они допускают аналитическое решение. Деление на донора и акцептора для одинаковых молекул SG, интеркалированных в ДНК, чисто условно, так как любая молекула может быть и донором, и акцептором. Различие проявляется лишь в начальных условиях: $\rho_1(\Omega, 0) = 1$, $\rho_2(\Omega, 0) = 0$. Решение уравнений с этими начальными условиями следующее:

$$\begin{aligned} \rho_1(\Omega, t) &= \frac{1}{2} e^{-t/\tau} (1 + e^{-2wt}) \left(1 + 2 \sum_{m,k=-2}^2 D_{0m}^2(\Omega_{E1L}) D_{mk}^2(\Omega_{LM}(t)) D_{k0}^2(\psi_1, \xi_1, 0) d_{00}^2(\theta_1) \right), \\ \rho_2(\Omega, t) &= \frac{1}{2} e^{-t/\tau} (1 - e^{-2wt}) \left(1 + 2 \sum_{m,k=-2}^2 D_{0m}^2(\Omega_{E1L}) D_{mk}^2(\Omega_{LM}(t)) D_{k0}^2(\psi_1, \xi_1, 0) d_{00}^2(\theta_1) \right). \end{aligned} \quad (16)$$

Предположение об одинаковых условиях окружения для homo-FRET приводит к тому, что суммарное анизотропное распределение

$$\rho_1(\Omega, t) + \rho_2(\Omega, t) = e^{-t/\tau} \left(1 + 2 \sum_{m,k=-2}^2 D_{0m}^2(\Omega_{E1L}) D_{mk}^2(\Omega_{LM}(t)) D_{k0}^2(\psi_1, \xi_1, 0) d_{00}^2(\theta_1) \right) \quad (17)$$

не зависит от переноса или фактически обмена энергией между донором и акцептором. Перенос энергии в этом случае можно контролировать по анизотропии флуоресценции. Используя решение (16), можно найти интенсивности поляризованной флуоресценции донора и акцептора:

$$\begin{aligned} I_{11}(t) &= \langle \rho_1(t) (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_1)^2 \rangle_{\Omega_{LM}} / \langle \rho_1(0) (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_1)^2 \rangle_{\Omega_{LM}}, \\ I_{12}(t) &= \langle \rho_2(t) (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_2)^2 \rangle_{\Omega_{LM}} / \langle \rho_2(0) (\mathbf{e}_2 \cdot \mathbf{d}_2)^2 \rangle_{\Omega_{LM}}, \end{aligned} \quad (18)$$

и анизотропию флуоресценции

$$r_{ij}(t) = \frac{I_{ij}^{\parallel}(t) - I_{ij}^{\perp}(t)}{I_{ij}^{\parallel}(t) + 2I_{ij}^{\perp}(t)} \quad (19)$$

для донора и акцептора

$$\begin{aligned} r_{11}(t) &= 0.2(1 + e^{-2\omega t}) \sum_{k=-2}^2 G_k^2(t) \Gamma_{kk}^{11}(t) (d_{k0}^2(\xi_1) d_{00}^2(\theta_1))^2, \\ r_{12}(t) &= 0.2(1 - e^{-2\omega t}) \sum_{k=-2}^2 G_k^2(t) \Gamma_{kk}^{12}(t) d_{k0}^2(\xi_1) d_{k0}^2(\xi_2) d_{00}^2(\theta_1) d_{00}^2(\theta_2), \end{aligned} \quad (20)$$

где $G_k^2(t) = e^{-[(6-k^2)D_{\perp} + k^2D_{\parallel}]t}$ — компоненты тензорной ориентационной корреляционной функции для вращательной диффузии молекулярного комплекса в целом, $\Gamma_{kk}^{ij}(t) = \langle e^{in(\psi_i(0) - \psi_j(t))} \rangle$ — компоненты ориентационной корреляционной функции для внутренней азимутальной диффузии. Если предположить, что молекулы, интеркалированные в цепи ДНК в центрах локализации, могут совершать дополнительно ограниченную азимутальную диффузию в плоскости, перпендикулярной оси молекулы ДНК, с коэффициентом диффузии D и угловой амплитудой $\delta(0 \leq \psi_i(t) \leq \delta)$ [17, 18] при $\xi_1 = \xi_2 \approx \pi/2$, то выражения (20) имеют вид

$$\begin{aligned} r_{11}(t) &= 0.1(1 + e^{-2\omega t}) (d_{00}^2(\theta_1))^2 \left(e^{-6D_{\perp}t} + \frac{3p}{2} e^{-(2D_{\perp} + 4D_{\parallel}')t} \right), \\ r_{12}(t) &= 0.1(1 - e^{-2\omega t}) d_{00}^2(\theta_1) d_{00}^2(\theta_2) \left(e^{-6D_{\perp}t} + \frac{3p \cos 2\psi}{2} e^{-(2D_{\perp} + 4D_{\parallel}')t} \right), \end{aligned} \quad (21)$$

где $D_{\parallel}' = D_{\parallel} + D$, $p = \sin^2 \delta / \delta^2$, $\psi = \psi_2(0) - \psi_1(0)$. Из аддитивности параметра анизотропии для одинаковых молекул следует, что суммарная анизотропия флуоресценции донора и акцептора $r_s = (r_{11}(t) + r_{12}(t))/2$. В результате для интегральной анизотропии

$$r_s = \tau^{-1} \int_0^{\infty} e^{-t/\tau} r_s(t) dt \quad (22)$$

получаем

$$r_s = 0.1 \left(\frac{1}{1 + 6D_{\perp}} + \frac{3p \cos^2 \psi}{1 + 2D_{\perp} + 4D_{\parallel}'} + \frac{3p \sin^2 \psi}{1 + 2D_{\perp} + 4D_{\parallel}' + 2\omega} \right). \quad (23)$$

Выражения (12) и (23) далее использованы для расчета анизотропии флуоресценции в стационарных условиях эксперимента.

Результаты и их обсуждение. Спектры поглощения и флуоресценции SG имеют малый стоксов сдвиг, а квантовый выход при интеркаляции резко возрастает. Поэтому для переноса энергии между одинаковыми интеркалированными в ДНК хромофорами критическими параметрами являются расстояние между донором и акцептором и ориентация дипольных моментов переходов. В комплексах SG с короткоцепочечными дцДНК может обеспечиваться достаточно близкое расположение хромофоров друг к другу с увеличением концентрации красителя, что приводит к миграции энергии. Известно [9], что одна интеркалированная в дцДНК молекула SG занимает в среднем четыре места оснований нуклеотидов. Простой расчет показывает, что в дцДНК с 10 парами оснований может быть интеркалировано не более двух молекул SG. Использовано расстояние между центрами диполей $R_{12} = 1.53$ нм. Фёрстеровский радиус для пары молекул SG в условиях данного эксперимента после расчета перекрытия спектров флуоресценции SG составляет $(R_0)^6 = \langle \kappa^2 \rangle (4.68 \text{ нм})^6$, параметр $\langle \kappa^2 \rangle$ варьируется, время жизни в возбужденном состоянии для SG в отсутствие акцептора $\tau = 5.1$ нс.

На рис. 2 приведены зависимости обратной анизотропии флуоресценции комплекса дцДНК с 10 парами оснований в *трис*-ацетатном буферном растворе от T/η (T — температура, η — вязкость) для соотношений концентраций SG/дцДНК: 1:50, 1:21, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1. Для соотношения 1:1 концентрация $C_{SG} = 10^{-7}$ М, $C(\text{дцДНК}) = 10^{-7}$ М, в других образцах выполнялась соответствующая пропорция. Измерения проведены при стационарном возбуждении ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм) с регистрацией излучения в максимуме полосы (520 нм). Так как в растворе всегда присутствует определенное количество молекул ДНК с одним интеркалированным SG, особенно при малых концентрациях, экспериментальные зависимости подгонялись суммой анизотропий

$$r = 0.5(n_1 r_1 + n_s r_s), \quad (24)$$

где анизотропия флуоресценции для одного интеркалятора:

$$r_1 = 0.1[1/(1 + 6D_{\perp}) + 3p/(1 + 2D_{\perp} + 4D_{\parallel})], \quad (25)$$

n_1 , n_s — относительные концентрации ($n_1 + n_s = 1$) молекулярных комплексов SG/дцДНК с одной и двумя молекулами SG. Предложенная модель, учитывающая помимо эффекта фёрстеровского переноса полную и внутреннюю вращательные диффузии, позволяет объяснить экспериментальные зависимости для анизотропии флуоресценции SG/дцДНК. Предельное значение r_0 при $T = 1$ °C в *трис*-ацетатном буфере (рН 8.5) и соотношении SG/дцДНК 1:50 составляет 0.37, что ниже предельного значения 0.4. Пониженное значение в комплексе с практически одной интеркалированной молекулой SG подтверждает наличие движений молекулы SG, снижающих анизотропию флуоресценции. Такие движения приводят к тому, что ориентации дипольных моментов переходов распределены внутри диффузионного конуса. Сравнение теоретических зависимостей и экспериментальных данных во всем диапазоне температур и концентраций SG дает вероятность переноса энергии $w \approx 1.25 \cdot 10^{11}$ с. При этом соотношение коэффициентов вращательной диффузии молекулярного комплекса $D_{\parallel}' \approx 2.1D_{\perp}$, а угол между осями диффузионных конусов для векторов диполей донора и акцептора $\sim 39^\circ$.

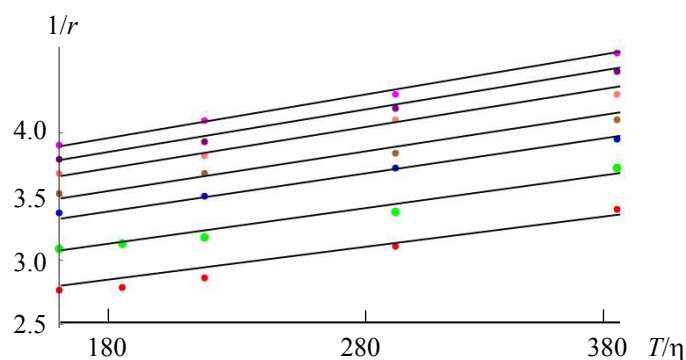


Рис. 2. Зависимости обратной величины анизотропии флуоресценции $1/r$ комплексов SG с дцДНК (10 пар оснований) от T/η для соотношений концентраций $C_{SG}/C_{дцДНК}$ (сверху вниз): 1:50; 1:21; 1:1; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1; точки соответствуют экспериментальным значениям при $T = 1, 5, 10, 20, 30$ °C, вязкость раствора равна вязкости воды при соответствующей температуре

Измерения зависимостей интенсивности и анизотропии флуоресценции от соотношения концентраций SG/дцДНК проведены также для дцДНК с 20 парами оснований при 22 °C (рис. 3) с возбуждением на $\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм и регистрацией в максимуме полосы 520 нм. Повышение концентрации SG в растворе с концентрацией дцДНК $3.7 \cdot 10^{-7}$ М приводит к постоянному увеличению интенсивности флуоресценции I_{rel} . На рис. 3 приведена зависимость степени анизотропии флуоресценции r комплекса $C_{SG}/C_{дцДНК}$ (20 пар оснований) от концентрации красителя. Наблюдается резкое снижение степени анизотропии от 20 % с выходом на постоянное плато до 8.3 %. Снижение анизотропии флуоресценции обусловлено безызлучательным переносом энергии между одинаковыми интеркалированными молекулами SG по фёрстеровскому механизму. Осцилляторы поглощения и испускания интеркалированных молекул SG расположены перпендикулярно оси спиральных молекул дцДНК и под некоторым углом, зависящим от их взаимного расстояния. Весь участок зависимости $I_{\text{rel}}(C_{SG}/C_{дцДНК})$ можно разбить на две области. Вначале наблюдается линейный рост интенсивности флуоресценции раствора с увеличением концентрации красителя до $I_{\text{rel}} \sim 0.5$. В случае превышения указанного значения происходит нелинейное возрастание интенсивности с последующим выходом на насыщение. Практически линейный рост интенсивности флуоресценции связан с ростом числа интеркалированных молекул SG. Расчет показывает, что с одной молекулой дцДНК при этом связано в среднем 7—8 молекул SG. Дальнейшее непропорциональное возрастание интенсивности флуоресценции красителя с увеличением его концентрации свидетельствует о наличии процессов концентрационного тушения флуоресценции SG и самотушения флуоресценции интеркалированного SG. Молекулы также могут присоединяться в малые бороздки, располагаться на поверхности нуклеотида или быть в свободном и агрегатном состояниях. Полагаем, что такие молекулы не вносят значительного вклада в интенсив-

ность флуоресценции. Возбуждение нефлуоресцирующих соединений или перенос энергии с возбужденной интеркалированной молекулы SG на нефлуоресцирующие приводит к нарушению линейной зависимости. После достижения молекулами красителя максимального уровня заполнения дцДНК все избыточное количество красителя может оставаться в буферном растворе в несвязанном с дцДНК состоянии. Этим можно объяснить выход на постоянное плато интенсивности флуоресценции при высоких концентрациях SG.

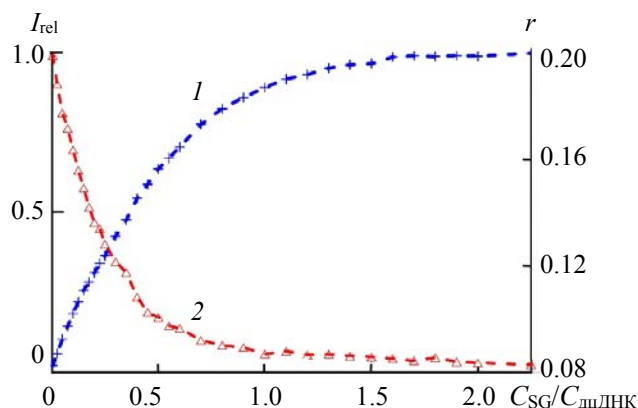


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции I_{rel} (1) и анизотропия флуоресценции r (2) для дцДНК (20 пар оснований) с интеркалированными SG от соотношения концентраций $C_{SG}/C_{дцДНК}$, $C_{дцДНК} = 3.7 \cdot 10^{-7}$ М, $T = 22$ °С

Аналогичная зависимость анизотропии от концентрации SG измерена для ДНК со 100 парами оснований. Примерно линейный участок интенсивности люминесценции происходит в среднем в расчете 30 молекул SG на одну молекулу дцДНК с полным насыщением при 200 молекулах красителя. Как и в первом случае, наблюдается резкое падение анизотропии флуоресценции с 24 до 7.5 %. Значение r постоянно вплоть до 200 SG/дцДНК. Большая концентрация красителя обусловлена, по-видимому, и адсорбцией молекул SG поверхностью дцДНК. Молекула дцДНК несет отрицательный заряд, поэтому положительно заряженные молекулы SG адсорбируются поверхностью нуклеотида. Анализ результатов показывает, что предельно низкое значение r остается постоянным (~8.3 %) в широком интервале концентраций SG, что дополнительно подтверждает концентрационный механизм тушения флуоресценции.

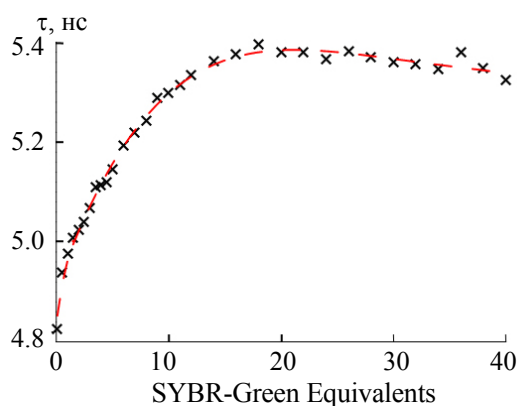


Рис. 4. Зависимость времени жизни возбужденного состояния интеркалированного SG от соотношения концентраций $C_{SG}/C_{дцДНК}$, $C_{дцДНК} = 3.7 \cdot 10^{-7}$ М, дцДНК = 20 пар оснований

Измерения времени жизни возбужденных состояний комплексов SG/дцДНК от концентрации SG (рис. 4) показывают, что с увеличением концентрации красителя возрастает τ . Кривая затухания хорошо описывается двумя экспонентами — длительной компонентой и короткоживущей компонентой с длительностью от 0.5 нс при низкой концентрации SG и до 1.5 нс при высокой концентрации SG.

Молекулы SG при интеркалировании локально деформируют дцДНК, что вызывает взаимодействие оснований нуклеотидов с красителем. При этом молекула SG может находиться в различных окружениях пар оснований нуклеотидов, что приводит к нарушению моноэкспоненциального затухания т.

Заключение. Экспериментальные и теоретические исследования зависимостей интенсивности и анизотропии флуоресценции образующихся в буферном растворе молекулярных комплексов красителя SYBR Green I и двухцепочечных ДНК от соотношения их концентраций, а также от температуры и вязкости среды показали, что интенсивность и анизотропия флуоресценции сложным нелинейным образом зависят от концентрации SYBR Green I при постоянной концентрации двухцепочечных ДНК. Для двухцепочечных олигонуклеотидов с 10, 20 и 100 парами оснований увеличение концентрации SYBR Green I в растворе приводит сначала к линейному росту интенсивности флуоресценции, а затем переходу в режим насыщения и выходу на плато, что связано с увеличением количества нефлуоресцирующих состояний SYBR Green I и эффектами концентрационного тушения. Измерения анизотропии флуоресценции показали ее быстрое падение с ростом концентрации SYBR Green I и дальнейший выход на остаточное постоянное значение. Такое поведение можно объяснить наличием фёрстеровского резонансного переноса энергии между молекулами SYBR Green I, связанными с ДНК. Для выяснения степени влияния внутримолекулярного переноса энергии для короткоцепочечных ДНК с жесткой структурой, для которых можно определить количество интеркалирующих молекул красителя и расстояния между ними, проведены измерения анизотропии флуоресценции в зависимости от вязкости среды. Выполненные оценки степени влияния внутримолекулярного безызлучательного переноса энергии на анизотропию флуоресценции могут быть полезны для изучения взаимодействий молекулярных роторов с биоструктурами и повышения эффективности флуоресцентных сенсоров на их основе.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф22В-009) и Вьетнамской академии наук и технологий (проект № QTBV01.07/18–19).

- [1] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum. Nucl. Acids Res., **32**, N 12 (2004) e103A
- [2] V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue, R. P. Haugland. Anal. Biochem., **249** (1997) 228–238
- [3] V. Wang, R. Zhou, W. Lin, P. Wu. Chin. Chem. Phys., **31** (2020) 2950–2954
- [4] K. Mora, S. Nath. J. Phys. Chem. B, **133** (2019) 8767–8776
- [5] A. K. Mora, P. K. Singh, B. S. Patro, S. Nath. Chem. Commun., **52** (2016) 12163–12166
- [6] Е. С. Воропай, П. М. Самцов, К. Н. Каплевский. Журн. прикл. спектр., **70** (2003) 767–773
[E. S. Voropai, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevskii. J. Appl. Spectr., **70** (2003) 721–728]
- [7] A. I. Sulatskaya, A. A. Maskevich, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov. PLoS One, **5**, N 10 (2010) e15385(1–7)
- [8] I. Haq, J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, T. C. Jenkins, J. B. Chaires. J. Mol. Biol., **271** (1997) 244–257
- [9] A. I. Dragan, R. Pavlovic, J. B. McGivney, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. A. Schenerman, C. D. Geddes. J. Fluoresc., **22** (2012) 1189–1199
- [10] M. Okoshi, P. Sapparcorn, Y. Takada, S. Hanogha, H. Nakai. Bull. Chem. Soc. Jpn., **81** (2014) 267–273
- [11] L. W. Runnels, S. F. Scarlata. Biophys. J., **69** (1995) 1569–1583
- [12] Д. А. Варшалович, А. Н. Москалев, В. К. Херсонский. Квантовая теория углового момента, Ленинград, Наука (1975)
- [13] А. П. Блохин, В. А. Толкачев. Журн. прикл. спектр., **77** (2010) 11–17 [A. P. Blokhin, V. A. Tolkahev. J. Appl. Spectr., **77** (2010) 6–12]
- [14] S. K. Noothi, M. Kombrabail, T. K. Kundu, G. Krishnamoorthy. FEBS J., **276** (2009) 541–551
- [15] L. B. Johanson, P. Edman, P. O. Westlund. J. Chem. Phys., **105** (1996) 10896–10904
- [16] C. Carlson, A. Larsson, M. Bjorkman, M. Jonsson, B. Albinson. Biopolymers, **41**, N 5 (1997) 481–491
- [17] P. Wahl. Chem. Phys., **7** (1975) 210–219
- [18] J. Duhamel, J. Kanyo, G. Dinter-Gottlieb, P. Lu. Biochemistry, **35** (1996) 16687–16697