

УДК 544.03., 543.4

ЗАВИСИМОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НОВОГО ФОТОАКТИВИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ОТ ПАРАМЕТРОВ СРЕДЫ

Шапошников М.Н., Чудаков Д.Б., Генералов А.А., Савина А.А., Зайцев С.Ю.

ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологий имени К.И. Скрябина», Москва, e-mail:mihan2404@mail.ru

В работе представлены исследования зависимости спектральных свойств нового фотоактивируемого флуоресцентного красителя (ФФК-813) от параметров среды (вязкости и pH), а также выявление концентрационного тушения флуоресценции. Показано, что имеется степенная зависимость интенсивности флуоресценции от вязкости, соответствующая уравнению Фёрстера-Гофмана; например в растворах глицерин-вода при увеличении вязкости в 1000 раз интенсивность флуоресценции возрастает в 2,5 раза. pH также оказывает влияние на спектральные свойства красителя, особенно на интенсивность его флуоресценции, которая в 1,5–2 раза больше у катионной формы по сравнению с цвиттерионной. Явление концентрационного тушения наблюдалось уже при концентрациях от $6,3 \cdot 10^{-5}$ М (30 мкг/мл), это даёт возможность оценить значения оптимальных концентраций для окрашивания биологических объектов изучаемым красителем. Используя концентрацию красителя 5 мкг/мл ($1,06 \cdot 10^{-5}$ М), получена микрофотография монослоя клеток A431, на которой интенсивность флуоресценции между визуально яркими и темными внутриклеточными структурами отличалась в среднем в 5–10 раз. Неодинаковую яркость разных субклеточных органелл при окрашивании клетки можно объяснить не только различной селективностью связывания красителя, но и с помощью неоднородности параметров внутриклеточной среды.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, фотоактивация, вязкость, pH, тушение флуоресценции, окрашивание клеток, флуоресцентная микроскопия

DEPENDENCE THE SPECTRAL PROPERTIES OF NEW PHOTOACTIVATED FLUORESCENT DYE FROM THE PARAMETERS OF THE MEDIUM

Shaposhnikov M.N., Chudakov D.B., Generalov A.A., Savina A.A., Zaitsev S.Y.

Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology by K.I. mSkryabin, Moscow, e-mail:mihan2404@mail.ru

We presented in this article The investigations of dependence the spectral properties of the novel photoactivated fluorescent dye (PFD-813) from the parameters of the medium (viscosity and pH), and also the investigations of fluorescence concentration quenching. We presented that a power-law dependence of intensity from viscosity, corresponding to the Förster–Hoffmann equation; For example in solutions of glycerol-water with increasing viscosity by 1000 times fluorescence intensity increasing by 2,5 times. pH also influences on spectral properties of the dye, especially on its fluorescence intensity, which is by 1,5–2,5 times larger in cationic form, than in zwitterionic. The concentration quenching was observed already at concentrations from $6,3 \cdot 10^{-5}$ M (30 µg/ml), this makes it possible to assess the optimal concentration values for staining of biological objects by the investigated dye. Using a dye concentration of 5 µg/ml ($1,06 \cdot 10^{-5}$ M) microphotograph of the A 431 cell monolayer was obtained, in which the fluorescence intensity distinguished between the visually brightest and visually darker intracellular structures on the average from 5 to 10 times. Unequal brightness of different subcellular organelles can be explained not only by different selective staining of different subcellular organelles by the dye, but also by heterogeneity parameters of the intracellular environment.

Keywords: fluorescent dyes, photoactivation, viscosity, pH, quenching of the fluorescence, cells staining, fluorescence microscopy

Создание и исследование ФФК является важным и актуальным направлением на пересечении ряда областей биохимии, физико-химической биологии и биотехнологии [1, 3, 4, 6, 8].

Для многих флуорофоров (молекулярных роторов) характерна сильная зависимость интенсивности флуоресценции от вязкости. Для её описания обычно используют уравнение Фёрстера-Гофмана [4, 6]:

$$\lg I = x \cdot \lg \eta + C, \quad (1)$$

где I – интенсивность флуоресценции; x – константа, меньше либо равная единице; η – вязкость; C – постоянная. Из уравнения, зная интенсивность флуоресценции, находят вязкость после калибровки параметров

флуорофора по разным вязкостям в системе, где его планируют использовать.

Спектральные свойства красителей родаминового ряда также зависят от вязкости (хотя молекулярными роторами они не являются) и pH [8]. Фотоактивируемые флуоресцентные красители родаминового ряда в этом плане интересны потому, что, облучая окрашенные клетки узким лазерным пучком длиной волны около 400 нм, можно активировать строго ограниченное число молекул ФФК, переведя их во флуоресцентную форму лишь в ограниченном объёме клетки [3]. Данные по влиянию вязкости и pH на флуоресценцию этих красителей можно будет использовать для исследования параметров внутриклеточной среды

в различных клеточных структурах [1, 6], что имеет немалое значение для изучения биохимических процессов [2].

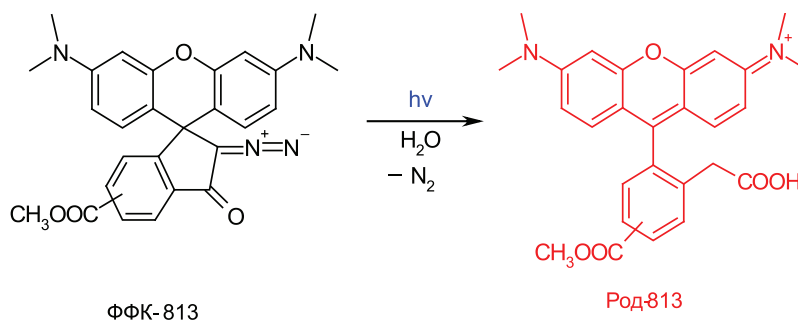
Для родаминовых красителей характерно явление концентрационного тушения [7]. Для практического применения красителей важно знать, при каких концентрациях оно начинает оказывать заметное влияние на спектральные свойства.

Целью данной работы являлось изучение влияния параметров микроокружения и концентрационного тушения на спектральные свойства ФФК-813 (его открытой формы, называемой Род-813).

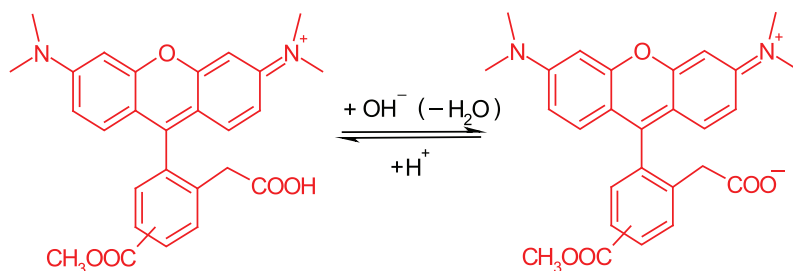
Материалы и методы исследования

Исследуемый краситель (ФФК-813) синтезирован Беловым В.Н. в Макс-Планк Институте биофизической химии (ФРГ), как описано ранее [5].

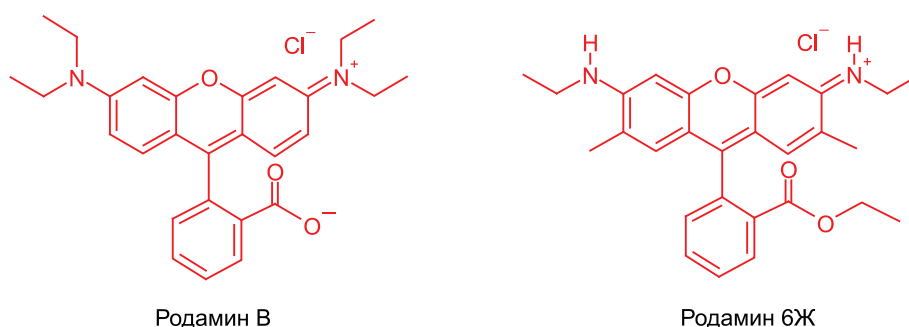
Для исследования ФФК-813 был растворён в ДМФА до концентрации 10 мг/мл. Далее разбавляли водой до концентрации 200 мкг/мл и подвергали фотоактивации в стандартной кювете для снятия спектра из набора Spectra Suite действием ртутной лампы (100 Вт), помещаемой на расстоянии 3 см от кюветы на 5 минут. Данной операцией переводили краситель из нефлуоресцентной во флуоресцентную форму, как показано на рис. 1, а, и получали маточный раствор:



а



б



в

Рис. 1. а – структурные формулы ФФК-813 и флуоресцентного красителя Род-813, схема фотореакции;

б – протонирование и депротонирование Род-813;

в – структурные формулы родамина В и родамина 6Ж

Для получения спектров Род-813 при pH = 3, 7 и 11 использовали маточный раствор Род-813, дистиллированную воду и 0,01 N растворы КОН и HCl.

Для исследования зависимости спектральных свойств от вязкости были приготовлены по 975 мкл растворов глицерина в воде в различных концентрациях, к которым добавляли 25 мкл маточного раствора.

Для исследования концентрационного тушения были измерены спектральные свойства Род-813 в растворах убывающих концентраций, приготовленных из маточного путём последовательно повторяемого разбавления его дистиллированной водой.

Для каждого случая были измерены как спектр поглощения, так и флуоресценции на спектрометре «Ocean Optics USB 4000-FL». Измерения проводились в стандартных пластиковых кюветах. Спектр поглощения измеряли с помощью источника света Ocean «Optics PX-2», излучающего в диапазоне 220–750 нм, свет от которого наводился на кювету при помощи оптоволоконного кабеля P400-1-SR; для возбуждения флуоресценции применяли светодиод с длиной волны света 514 нм, который устанавливали в кюветодержатель прибора в неподвижном положении.

Все спектры получены в сравнении с контролями, в качестве которых служили дистиллированная вода или растворы глицерина соответствующей концентрации. В экспериментах по концентрационному тушению для каждой концентрации снимали по 5 спектров поглощения и флуоресценции, в этом случае данные были обработаны путём подсчёта доверительных интервалов по методике Стьюдента.

Для окрашивания монослоя линии клеток А 431 (эпидермоидная **карцинома человека**) краситель сначала растворяли в ДМФА, а затем разводили в воде до концентрации 200 мкг/мл, также как для спектральных измерений. Раствор красителя добавляли в ячейку планшета с предварительно выращенным на покровном стекле монослоем клеток до конечной концентрации раствора 5 мкг/мл. Клетки инкубировали с красителем 30 мин в CO₂-инкубаторе, затем дважды отмывали свежей средой культивирования. Покровное стекло вынули из ячейки, положили на предметное стекло клетками между стекол и немедленно микрофотографировали. Данный препарат необходимо быстро исследовать, до того как испарится питательная среда между стекол. На лазерном конфокальном инвертированном микроскопе «Nikon Eclipse TE2000», используя лазеры 405 (для фотоактивации) и 543 нм, микрофотографировали полученный клеточный препарат.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние pH. Спектры поглощения и флуоресценции растворов Род-813 концентрацией 5 мкг/мл при pH = 3, 7 и 11 изображены на рис. 2. При pH = 3 интенсивность поглощения и флуоресценции была больше, чем при pH = 7 и 11, причём прирост интенсивности флуоресценции при pH = 3 по сравнению с нейтральной и щелочной средой был больше, чем прирост поглощения, что указывает на больший квантовый выход Род-813 при кислом pH. При pH = 3 длина волны максимума поглощения была явно меньше (549 нм), чем при pH = 7 и 11 (554 и 553 нм). Разница между значениями длин волн максимума абсорбции при pH = 7 и 11 и между значениями длин волн максимумов флуоресценции для всех pH (значения максимумов находились в интервале 575–576 нм) сопоставима с приборной погрешностью (около 1 нм) и не является достоверной. Согласно структурной формуле Род-813, это соединение должно находиться при pH = 3 в катионной форме, а при pH = 11 – в цвиттерной (рис. 1, б). Исходя из полученных данных, спектр цвиттериона смещён батохромно, что противоречит данным работы [8] для родамина В (формула на рис. 1, в). Но родамин В, в отличие от Род-813, имеет карбоксильную группу при сопряжённой системе (а у Род-813 она отделена от сопряжённой системы метиленовой группой), и, значит, протонирование-депротонирование данной группы Род-813 не окажет такое же влияние на спектральные свойства, какое оказывала в родамине В. В случае точечного детектирования флуоресценции в живых клетках этот эффект необходимо учитывать. Уменьшение внутриклеточного pH увеличивает интенсивность флуоресценции в клеточных препаратах.

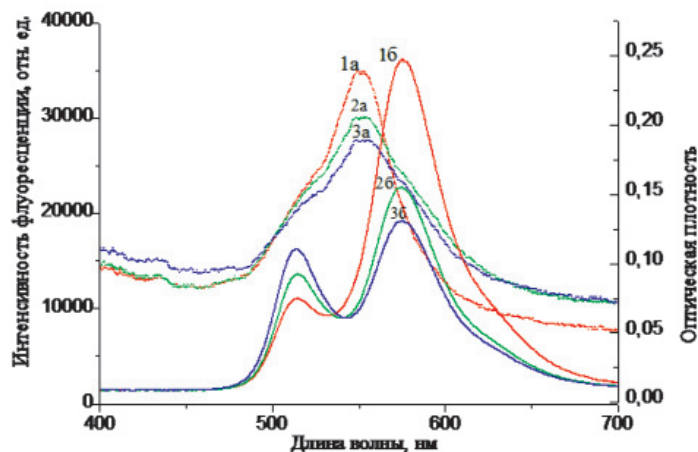


Рис. 2. Спектр поглощения (1а) и флуоресценции (1б) при pH = 3; поглощения (2а) и флуоресценции (2б) при pH = 7; поглощения (3а) и флуоресценции (3б) при pH = 11

Концентрационное тушение. График на рис. 3 и данные, представленные в таблице, свидетельствуют в пользу того, что, как и родамину 6Ж (формула на рис. 1, в) [7], исследованному нами красителю присуще явление концентрационного тушения.

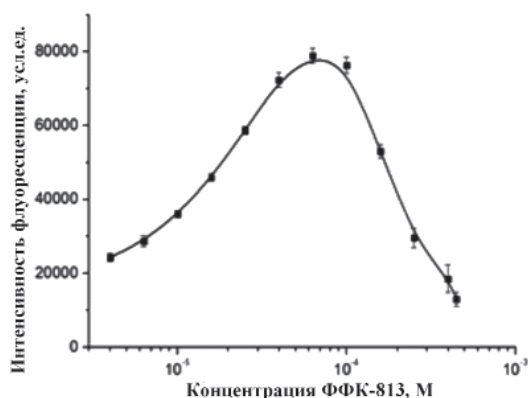


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции ФФК-813 от его концентрации в дистиллированной воде

Линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации для Род-813 наблюдается вплоть до значений около $(3 - 5) \cdot 10^{-5}$ М (14–25 мкг/мл), далее рост замедляется; наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдается при концентрациях около $6,3 \cdot 10^{-5}$ М (30 мкг/мл). Да-

лее она резко падает (рис. 3). Примерно до этих же концентраций наблюдается прямая пропорциональность между концентрацией и оптической плотностью, а далее наблюдается отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бэра, что свидетельствует об образовании ассоциатов, ответственных за эффект концентрационного тушения [7]. Начиная с концентрации 10^{-4} М (47 мкг/мл) максимум спектра флуоресценции сдвигается батохромно и в исследованном диапазоне концентраций доходит далее до 625 нм, что объясняется перекрыванием π -электронных облаков молекул, сопровождающемся увеличением степени делокализации электронов, а в сопряженных системах это всегда приводит к батохромному сдвигу максимума флуоресценции. Труднее объяснить гипсохромный сдвиг спектра поглощения. Возможно, он вызван тем, что в ассоциатах может быть затруднен перенос зарядов от элетронодонорной к электронакцепторной группе, часто сопровождающий процесс возбуждения [4, 6], что может приводить к затруднённости самого процесса возбуждения, необходимости большей энергии поглощаемого кванта для него. Ясно, что при окрашивании красителем ФФК-813 живых клеток нецелесообразно использовать количества красителя, создающие его конечную концентрацию в окрашиваемом материале более чем $6,3 \cdot 10^{-5}$ М (25–30 мкг/мл).

Спектральные свойства Род-813 при разных концентрациях красителя

Концентрация ФФК, моль/л (мкг/мл)	Измеренная оптическая плотность	Длина волны максимума поглощения, нм	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. · 10 ⁻³	Длина волны максимума флуоресценции, нм
$3,985 \cdot 10^{-6}$ (1,9)	$0,127 \pm 0,004$	$551,6 \pm 0,5$	$24,3 \pm 1,1$	$574,7 \pm 0,0$
$6,315 \cdot 10^{-6}$ (3,0)	$0,154 \pm 0,008$	$552,1 \pm 0,3$	$28,8 \pm 1,5$	$574,7 \pm 0,0$
$1 \cdot 10^{-5}$ (4,7)	$0,199 \pm 0,006$	$551,83 \pm 0,18$	$36,1 \pm 0,9$	$574,7 \pm 0,0$
$1,586 \cdot 10^{-5}$ (7,5)	$0,274 \pm 0,003$	$551,71 \pm 0,14$	$46,0 \pm 1,0$	$575,5 \pm 0,0$
$2,514 \cdot 10^{-5}$ (12)	$0,398 \pm 0,002$	$551,8 \pm 0,5$	$58,7 \pm 1,2$	$575,8 \pm 0,0$
$3,983 \cdot 10^{-5}$ (19)	$0,606 \pm 0,003$	$551,8 \pm 0,2$	72 ± 2	$577,1 \pm 0,0$
$6,313 \cdot 10^{-5}$ (30)	$0,921 \pm 0,006$	$552,07 \pm 0,12$	79 ± 2	$578,5 \pm 0,0$
$1 \cdot 10^{-4}$ (47)	$1,46 \pm 0,10$	$552,4 \pm 1,0$	76 ± 2	$580,5 \pm 0,0$
$1,586 \cdot 10^{-4}$ (75)	$1,622 \pm 0,005$	$544,0 \pm 0,8$	$53,1 \pm 1,9$	$584,1 \pm 0,0$
$2,514 \cdot 10^{-4}$ (118)	$1,78 \pm 0,08$	$530,5 \pm 1,1$	30 ± 3	602 ± 4
$3,983 \cdot 10^{-4}$ (187)	$1,83 \pm 0,22$	$530,5 \pm 1,2$	19 ± 4	622 ± 3
$4,474 \cdot 10^{-4}$ (200)	Нет данных	Нет данных	$13 \pm 1,9$	$624,8 \pm 0,3$

Влияние вязкости. Влияние вязкости на интенсивность флуоресценции определяли в растворах глицерина разной концентрации. Поскольку коэффициент экстинк-

ции красителя от вязкости не зависит, но фактически оптическая плотность в этих растворах менялась из-за разной растворимости соединения, то учитывалась

эффективная интенсивность, рассчитанная как

$$I_{eff} = I_{fl} \frac{D_{nom}}{D},$$

где I_{fl} – приборная интенсивность флуоресценции; D – измеренное поглощение; D_{nom} – номинальное поглощение, наблюдавшееся в воде.

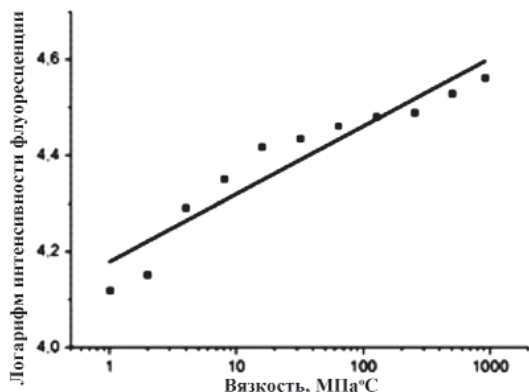


Рис. 4. Зависимость логарифма интенсивности флуоресценции ФФК-813 от вязкости водных растворов с разной концентрацией

Согласно уравнению (1) зависимость интенсивности флуоресценции от вязкости должна иметь вид прямой в логарифмических координатах, что и видно из рис. 4. При этом тангенс наклона полученной прямой, то есть постоянная «х», равная 0,141. Константа $C = 4,179$. Не очень большая величина x говорит об умеренной зависимости интенсивности флуоресценции от вязкости. При увеличении вязкости в 1000 раз интенсивность флуоресценции возрастает в 2,5 раза. Окрашенные клетки линии А 431 представлены на микрофотографии с горизонтальной линией, по которой построен профиль интенсивности флуоресценции (рис. 5). Взяв из полученного спектра значения максимумов интенсивности флуоресценции и разделив на минимум, получаем в среднем от 5 до 10, т.е. во столько раз интенсивность флуоресценции ярких частей клеток отличаются от темных. Из вышеописанных экспериментов следует, что такая разница связана не только с селективностью окрашивания красителя определённых структур, но и с различными свойствами микроокружения (вязкости, рН).

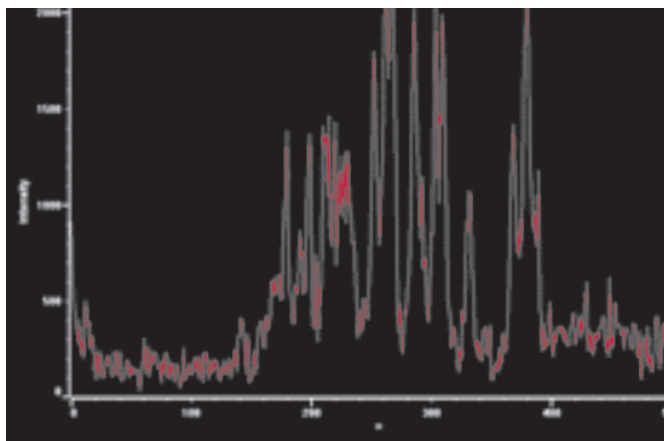
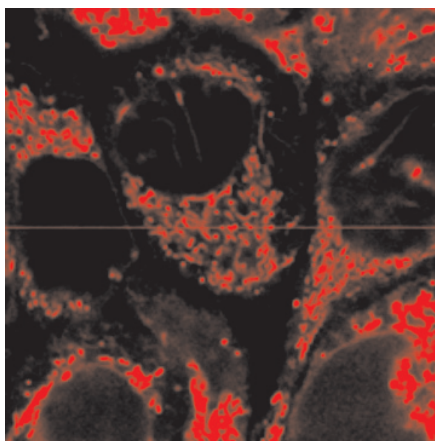


Рис. 5. Микрофотография монослоя живых клеток А 431 окрашенных ФФК-813 концентрацией 5 мкг/мл ($1,06 \cdot 10^{-5} \text{ М}$), после фотоактивации (размер кадра $36 \text{ на } 36 \text{ мкм}$, сверху) и соответственно спектр интенсивности флуоресценции по горизонтальной линии (внизу)

Выводы

рН среды влияет на интенсивность флуоресценции Род-813, которая в 1,5–2 раза больше у катионной формы по сравнению с цвиттерионной. Зависимость интенсивности флуоресценции от вязкости подчиняется уравнению Фёрстера-Гофмана, при увеличении вязкости в 1000 раз интенсивность флуоресценции возрастает в 2,5 раза.

Для красителя характерно концентрационное тушение с образованием малофлуоресцирующих ассоциатов, начиная

с концентраций от $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ (30 мкг/мл), что необходимо учитывать при его практическом использовании для окрашивания клеток.

В разных участках живых клеток, окрашенных с помощью ФФК-813, интенсивность флуоресценции отличается между визуально яркими и темными внутриклеточными структурами в среднем от 5 до 10 раз, что обусловлено не только различной селективностью связывания красителя, но и неоднородностью параметров внутриклеточной среды.

Список литературы

1. Красовицкий Б.М. Органические люминофоры / Б.М. Красовицкий, Б.М. Болотин; под ред. Б.М. Красовицкого. – М.: Химия, 1984. – С. 262–266.

2. Сетлоу Р. Молекулярная биофизика / Р. Сетлоу, Э. Поллард; под ред. Д.А. Франк-Каменецкого. – М.: Мир, 1964. – С. 140–141.

3. Новые флуоресцентные красители для окрашивания клеток животных / М.Н. Шапошников, Е.В. Свирищевская, А.А. Генералов, С.Ю. Зайцев // Современная ветеринарная медицина. – М., 2011. – №1. – С. 24–25.

4. Akers W. A molecular rotor as viscosity sensor in aqueous colloid solutions / W. Akers, M.A. Haidekker // Journal of Biomechanical Engineering. – 2004. – Vol. 126. – P. 340–345.

5. Belov V. N. Rhodamines NN: a novel class of caged fluorescent dyes / V.N. Belov, C.A., Wurm V.P. Boyarskiy // Angew. Chem. Int. Ed. – 2010. – V. 49. – P. 3520–3523.

6. Lord S.J. Photophysical Properties of Acene DCDHF Fluorophores: Long-Wavelength Single-Molecule Emitters Designed for Cellular Imaging / S.J. Lord, L. Zhikuan, H. Wang, K.A. Willets, P. J. Schuck, H.D. Lee, S.Y. Nishimura, R.J. Twieg, W.E. Moerner // J. Phys. Chem. – 2007. – Vol. 111. – P. 8934–8941.

7. Penzkofer A. Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration / A. Penzkofer, Y. Lu // Chemical Physics. – 1986. – Vol 103. – P. 399–405.

8. The photophysics of rhodamine B / M.J. Snare, F.E. Treloar, K.P. Ghiggino, P.J. Thistlethwaite // Journal of Photochemistry. – 1982. – Vol 18. – P. 335–346.

References

1. Krasovickij B.M. Organicheskie l'juminofory / B.M. Krasovickij, B.M. Bolotin; pod red. B.M. Krasovickogo. M.: Himija, 1984. pp. 262–266.

2. Setlou R. Molekuljarnaja biofizika / R. Setlou, Je. Pollard; pod red. D.A. Frank-Kameneckogo. M.; Mir, 1964. pp. 140–141.

3. Shaposhnikov M.N. Novye fluorescentnye krasiteli dlja okrashivaniya kletok zhivotnyh / M.N. Shaposhnikov, E.V. Svirwevskaja, A.A. Generalov, S.Ju. Zajcev // Sovremennaja veterinarnaja medicina M., 2011, no. 1. pp. 24–25.

4. Akers W. A molecular rotor as viscosity sensor in aqueous colloid solutions / Akers W., Haidekker M.A. // Journal of Biomechanical Engineering. 2004. Vol. 126, pp. 340–345.

5. Belov V. N. Rhodamines NN: a novel class of caged fluorescent dyes / Belov V.N., Wurm C.A., Boyarskiy V.P. // Angew. Chem. Int. Ed., 2010. V. 49. P. 3520–3523.

6. Lord S.J. Photophysical Properties of Acene DCDHF Fluorophores: Long-Wavelength Single-Molecule Emitters Designed for Cellular Imaging / S.J. Lord, L. Zhikuan, H. Wang, K. A. Willets, P. J. Schuck, H.D. Lee, S.Y. Nishimura, R.J. Twieg, W.E. Moerner // J. Phys. Chem, 2007, Vol 111, pp. 8934–8941.

7. Penzkofer A. Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration / A. Penzkofer, Y. Lu // Chemical Physics, 1986, Vol 103, pp. 399–405.

8. Snare M. J. The photophysics of rhodamine B / M.J. Snare, F. E. Treloar, K. P. Ghiggino, P. J. Thistlethwaite // Journal of Photochemistry, 1982, Vol 18, pp. 335–346.

Рецензенты:

Белопухов С.Л., д.с.-х.н., к.х.н., профессор, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии, Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва;

Клопов М.И., д.б.н., профессор кафедры химии, Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, ГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный заочный университет», г. Балашиха.

Работа поступила в редакцию 23.07.2012.