

Применение лазерной флуориметрии для определения влияния единичной аминокислотной замены на индивидуальные фотофизические параметры флуоресцирующей формы флуоресцентного белка mRFP1

А.А.Банишев, Е.П.Вржещ, Е.А.Ширшин

Определены индивидуальные фотофизические параметры хромофора флуоресцирующей формы флуоресцентного белка mRFP1 и двух его мутантов (аминокислотная замена по положению 66 – белки mRFP1/Q66C и mRFP1/Q66S). Для этого, наряду с традиционными методами флуориметрии и спектрофотометрии, использовался метод нелинейной лазерной флуориметрии. Показано, что значение индивидуального коэффициента экстинкции хромофора белков коррелирует (коэффициент корреляции более 0.9) с объемом заменяемого аминокислотного остатка по положению 66 (аналогично положениям максимумов поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции).

Ключевые слова: нелинейная лазерная флуориметрия, индивидуальные фотофизические параметры, mRFP1, хромофор.

1. Введение

Флуоресцентная спектроскопия (флуориметрия) широко используется в исследованиях сложных органических соединений (СОС) [1]. Однако традиционные (линейные) методы флуориметрии обладают ограниченными информационными возможностями при анализе флуоресцирующих объектов из-за низкой избирательности (полосы флуоресценции большинства СОС при комнатной температуре широкие и бесструктурные [1]). Ограничения традиционных методов становятся особенно ощутимыми при анализе белковой флуоресценции, т. к. последняя может зависеть одновременно от нескольких факторов, а препарат белка (ансамбль молекул) – представлять собой смесь нескольких спектрально неидентичных подансамблей молекул белка [2, 3]. Из-за этого получаемые традиционными флуоресцентными методами данные сложны для однозначной интерпретации и позволяют сделать, в основном, лишь качественные выводы о внутреннем состоянии белковой молекулы.

Возможности флуоресцентного анализа СОС значительно расширяются с применением методов лазерной флуориметрии, к числу которых относится нелинейная лазерная флуориметрия (НЛФ) [3–10]. Метод НЛФ позволяет определять индивидуальные фотофизические параметры (время жизни, сечение поглощения, скорость синглет-триплетной конверсии и др.) флуорофоров СОС в условиях дефицита априорной информации, обязательной в традиционных методах [3]. Указанные параметры могут быть использованы в качестве диагностических признаков.

Интересным и важным классом белков, применение к которому метода НЛФ позволяет получить новые, недо-

ступные для традиционной флуориметрии, результаты, являются флуоресцентные белки (ФБ) [11]. Это особый класс белков, чьим отличительным свойством является способность образовывать хромофор (гетерогруппу, отвечающую за поглощение света и флуоресценцию в видимом диапазоне длин волн) без участия каких-либо кофакторов или ферментов (кроме молекулярного кислорода [12]). Именно это уникальное свойство позволяет успешно использовать ФБ в качестве внутриклеточных флуоресцентных маркеров для визуализации внутриклеточных процессов [13].

В настоящей работе исследовалось влияние единичной аминокислотной замены в ФБ mRFP1 на индивидуальные фотофизические параметры флуоресцирующего хромофора этого белка. В качестве заменяемой позиции был выбран 66-й аминокислотный остаток (глутамин-66). Данный остаток участвует в образовании хромофора белка, поэтому замена его другим способна привести к изменению спектральных и фотофизических свойств образовавшегося мутанта белка mRFP1. Замена осуществлялась на остатки серина и цистеина (белки mRFP1/Q66S и mRFP1/Q66C соответственно). Показано, что величина индивидуального коэффициента экстинкции (сечения поглощения) флуоресцирующего хромофора белков коррелирует с объемом заменяемого аминокислотного остатка по положению 66, т. е. большему объему остатка соответствует более высокое значение коэффициента экстинкции. В работе также определена концентрация флуоресцирующих молекул в конечном растворе каждого ФБ. Для этого, наряду с традиционными методами флуориметрии и спектрофотометрии, в работе использовался метод НЛФ.

2. Объект

Методика наработки и очистки белков описана в [14]. Все эксперименты с белками проводились в фосфатном буфере (концентрация 0.06 М, рН = 7.4, температура 25 ± 1 °С). Первоначальная концентрация белка опреде-

А.А.Банишев, Е.П.Вржещ, Е.А.Ширшин. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: shirshin@lid.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 7 августа 2008 г.

лялась по методу Бредфорда [15]. Рабочие концентрации были таковы: при стационарных спектральных измерениях и определении времени затухания флуоресценции 10^{-6} М; при определении квантового выхода флуоресценции 4.8×10^{-10} (mRFP1), 5.2×10^{-10} (mRFP1/Q66S), 3.5×10^{-10} М (mRFP1/Q66C); при реализации метода НЛФ 10^{-8} М.

Область применения и свойства ФБ подробно рассмотрены в работах [11–13]. Отметим, что на сегодняшний день известно более 200 видов ФБ, однако наиболее востребованными при практическом применении являются ФБ, флуоресценция которых смещена в красную область спектра (красные ФБ) и молекулы которых являются мономерами [12]. Белок mRFP1 обладает этими свойствами [16], что и обусловило его выбор в качестве объекта исследования.

Формирование способной флуоресцировать молекулы красных ФБ (его принято обозначать термином «созревание») – это сложный процесс, который проходит несколько стадий [16, 17]. На некоторых стадиях образуются промежуточные формы белка* (так называемые синяя и зеленая [16], далее обозначаемые как В- и G-форма белка), способные сохранять свое присутствие и в конечном препарате (растворе) белка. Поэтому раствор красных ФБ представляет собой ансамбль молекул белка, состоящий из нескольких химически неэквивалентных подансамблей (смесь различных, препаративно не разделяемых спектральных форм ФБ), а именно молекул созревшей (R-форма) и несозревшей (В- и/или G-форма) формы.

Отметим, что одновременное присутствие нескольких форм белка в растворе осложняет определение индивидуальных фотофизических параметров хромофоров этих форм традиционными методами спектроскопии (классическая флуориметрия, спектрофотометрия и т. д.). Эти методы позволяют определять только интегральные оптические характеристики хромофора, т. е. полученные на основе общей концентрации молекул белка, а не парциальной концентрации отдельной формы [12]. Как будет показано ниже, указанное ограничение может быть преодолено использованием метода НЛФ.

3. Аппаратура

3.1. Нелинейная лазерная флуориметрия

Для реализации НЛФ использовался лазерный флуориметр, описанный в [6, 8]. Источником излучения являлся импульсный (частота следования импульсов 10 Гц) Nd:YAG-лазер с длиной волны излучения 532 нм (вторая гармоника основной длины волны излучения лазера – 1064 нм). Параметры лазерного излучения были таковы: длительность лазерного импульса 12 нс, энергия 2 мДж, диаметр лазерного пучка 800 мкм. В качестве

системы регистрации флуоресценции использовался монохроматор «МУМ» (Россия) с фотоэлектронным умножителем ФЭУ-100 (Россия). Флуоресценция регистрировалась на длине волны 610 нм. Интенсивность флуоресценции измерялась при изменении плотности F потока фотонов лазерного излучения в диапазоне $7 \times 10^{23} - 8 \times 10^{25} \text{ с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ (определение F см. в работе [10]). В пределах указанного изменения значения F шумы не превышали 15%. Для исключения процесса накопления фотопродукта применялась система перемешивания (магнитная мешалка, объем раствора препарата белка – 3 мл). Методика измерения кривой насыщения описана в [9]. Специальными тестами было установлено отсутствие поврежденных образцов в процессе эксперимента.

3.2. Традиционная (линейная) спектроскопия

Времена затухания флуоресценции определяли на пикосекундном лазерном флуориметре на основе Nd:YAG-лазера со следующими характеристиками: длина волны возбуждения 532 нм, длительность импульса 20 пс, диаметр пучка 5 мм, энергия излучения в импульсе 160 мкДж. В качестве приемника использовали стрик-камеру Агат СФ 3М (ВНИИОФИ, Россия). Ошибка в определении времени жизни флуоресценции на описанном флуориметре не превышает 5% (для диапазона времен в несколько наносекунд).

Помимо лазерной техники в работе для измерения спектров поглощения света использовался спектрофотометр Cary 100 («Varian Inc», США), а для измерения спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции – спектрофлуориметр Cary Eclipse («Varian Inc», США, спектральная ширина щелей 5 нм).

4. Метод нелинейной лазерной флуориметрии

Метод НЛФ был предложен в работе [4] и в современной его версии подробно изложен в работах [5–10], поэтому отметим лишь основные моменты. Метод основан на эффекте насыщения флуоресценции, который начинает проявляться при возбуждении молекул СОС интенсивным лазерным излучением.

Теория НЛФ базируется на уравнениях, описывающих кинетику изменения концентраций находящихся в соответствующих энергетических состояниях молекул СОС. Система кинетических уравнений для населенностей n_1 , n_3 и n_2 основного (S_0 – уровень 1), первого возбужденного синглетного (S_1 – уровень 3) и первого возбужденного триплетного (T_1 – уровень 2) энергетических состояний имеет следующий вид (в предположении возбуждения разбавленного раствора СОС лазерным излучением с характеристиками, приведенными в п.3.1):

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_1(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= -F(t, \mathbf{r})\sigma[n_0(t, \mathbf{r}) - n_3(t, \mathbf{r}) - n_2(t, \mathbf{r})] + \frac{n_3(t, \mathbf{r})}{\tau_{31}}, \\ \frac{\partial n_3(t, \mathbf{r})}{\partial t} &= F(t, \mathbf{r})\sigma[n_0(t, \mathbf{r}) - n_3(t, \mathbf{r}) - n_2(t, \mathbf{r})] - \frac{n_3(t, \mathbf{r})}{\tau_{31}} \\ &\quad - K_{32}n_3(t, \mathbf{r}), \end{aligned} \quad (1)$$

$$\frac{\partial n_2(t, \mathbf{r})}{\partial t} = K_{32}n_3(t, \mathbf{r}),$$

$$n_0 = n_1 + n_2 + n_3,$$

где $F(t, \mathbf{r})$ – плотность потока фотонов возбуждающего излучения в момент времени t в точке с координатой \mathbf{r} ; σ –

* В данной статье используются следующие термины: синяя форма белка (В-форма) – молекула белка, хромофор которой имеет максимум поглощения в области длин волн 360–420 нм и не флуоресцирует (для некоторых красных ФБ эта форма имеет очень слабую флуоресценцию с максимумом при 450 нм [17]); зеленая форма белка (G-форма) – молекула белка, хромофор которой имеет максимум поглощения в области длин волн 450–520 нм и не флуоресцирует [16] или флуоресцирует в зеленой области спектра (максимум при 500 нм [12]); красная форма белка (R-форма) – молекула белка, хромофор которой имеет максимум поглощения в области длин волн 550–600 нм и флуоресцирует в красной области спектра.

сечение поглощения флуорофора; n_0 – полная концентрация молекул СОС; $\tau_{31} \equiv 1/(K_{31} + K'_{31})$; K_{31}, K'_{31} – скорости излучательного и безызлучательного переходов из состояния S_1 в S_0 ; K_{32} – скорость синглет-триплетной конверсии. Полное время жизни молекулы в состоянии S_1 (время затухания флуоресценции) в данной модели определяется как $\tau_3^{-1} \equiv K_3 = \tau_{31}^{-1} + K_{32}$.

Путем аналитического или численного решения системы (1) можно найти концентрацию молекул $n_3(t, r)$ и определить число фотонов флуоресценции из объема V , испущенных в результате воздействия лазерного импульса,

$$N_{F1} = K_{31} \int_0^\infty dt \int_V n_3(t, r) dr. \quad (2)$$

При небольших значениях плотности потока фотонов F (интенсивности) возбуждающего излучения зависимость N_{F1} является линейной по F (т. е. $N_{F1} \sim F$), однако при увеличении F она начинает отклоняться от линейного режима – происходит насыщение флуоресценции.

Существует несколько механизмов насыщения флуоресценции, однако в настоящей работе рассматривалась модель (1), насыщение в которой обусловлено конечным временем жизни флуоресцирующих молекул в возбужденном состоянии и синглет-триплетной конверсией. Такой выбор был обусловлен следующим: 1) исследуемые белки в растворе являются мономерами (одна молекула содержит один хромофор [16]), поэтому в такой системе отсутствует механизм насыщения, который может быть связан с переносом энергии между хромофорами внутри молекулы; 2) при выбранных параметрах лазерного излучения (см. п.3.1) вероятность двухфотонного возбуждения для красных ФБ [18] мала в сравнении с рассматриваемыми механизмами и не вносит заметного вклада в процесс насыщения флуоресценции. Поэтому эти два механизма в (1) не учитывались. Для большинства СОС, описываемых моделью (1), насыщение начинает проявляться при $F > 10^{22} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Идея метода НЛФ состоит в определении (путем решения обратной задачи) молекулярных фотофизических параметров СОС (в модели (1) это σ , K_{32} и τ_3) из вида зависимости $N_{F1}(F)$ (из нелинейного участка этой зависимости), называемой кривой насыщения флуоресценции. При экспериментальной реализации метода удобно число регистрируемых фотонов флуоресценции N_{F1} нормировать на опорный сигнал N_{Ref} , в качестве которого можно использовать часть возбуждающего излучения, направленную отводящей пластинкой в опорный канал системы регистрации (как в нашем случае), или сигнал комбинационного рассеяния (КР) молекулами воды и оперировать не с $N_{F1}(F)$, а с зависимостью (называемой также кривой насыщения) $[\Phi(F)]^{-1} = N_{Ref}/N_{F1}$ ($\Phi(F)$ – флуоресцентный параметр). В отсутствие насыщения Φ перестает зависеть от F и стремится к постоянному значению, которое обозначается Φ_0 ($\Phi_0 \equiv \lim_{F \rightarrow 0} \Phi(F)$) [3, 9].

Если при измерении Φ_0 использовать в качестве опорного сигнала полосу КР молекул воды, то можно определить квантовый выход флуоресценции η СОС (метод впервые описан в работе [19]). Таким образом, для нахождения квантового выхода флуоресценции необходимо измерить полный спектр вторичного излучения, в котором присутствует как полоса флуоресценции исследуемого вещества, так и полоса КР воды (для этого при измерениях используют раствор вещества низкой кон-

центрации, при которой обе полосы сравнимы по интенсивности).

Выделим две особенности метода НЛФ: 1) метод предполагает регистрацию фотонов флуоресценции (см. (2)), поэтому определяемые из кривой насыщения фотофизические параметры относятся только к флуоресцирующей молекуле СОС; 2) при нахождении фотофизических параметров из кривой насыщения не используются данные о концентрации флуоресцирующих молекул СОС [3, 5].

Таким образом, метод НЛФ позволяет определять индивидуальные фотофизические параметры молекулы флуоресцирующего подансамбля в случае, если имеет место следующая сложная ситуация: 1) исследуемый объект – это многокомпонентный ансамбль молекул СОС, полосы поглощения подансамблей которого перекрываются (т. е. при возбуждении объекта поглощают свет все подансамбли); 2) концентрации молекул подансамблей в общей смеси априори неизвестны; 3) среди подансамблей флуоресцируют молекулы только одного из них.

Отметим, что третье условие может быть ослаблено: флуоресцировать могут молекулы всех подансамблей, однако необходимо, чтобы полосы флуоресценции этих подансамблей не перекрывались полностью. Тогда, регистрируя флуоресценцию на длине волны, не попадающей в область перекрытия полос, можно определять индивидуальные фотофизические параметры молекул подансамблей СОС.

Сказанное является достоинством метода, отличающим его от методов традиционной спектроскопии, в которых для определения индивидуальных фотофизических параметров необходимо априори знать концентрацию поглощающих и/или флуоресцирующих молекул СОС (например, методы спектрофотометрии, корреляционной спектроскопии [20]).

5. Результаты

5.1. Анализ спектров поглощения и возбуждения

Из спектров поглощения исследуемых белков (рис.1) видно, что в диапазоне длин волн 370–650 нм существуют три полосы поглощения, обусловленные наличием в растворе каждого белка трех спектральных форм [16, 17] – R, G и B (соответствующие максимумы поглощения расположены в диапазоне длин волн 561–584, 503–507 и

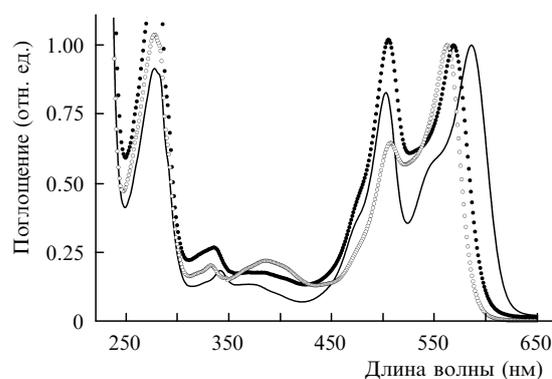


Рис.1. Спектры поглощения белков mRFP1 (сплошная кривая), mRFP1/Q66C (●) и mRFP1/Q66S (○). Спектры нормированы на значение оптической плотности в максимуме поглощения R-формы белков (длины волн 584 (mRFP1), 568 (mRFP1/Q66C) и 562 нм (mRFP1/Q66S)).

377–384 нм в зависимости от формы белка). Видно также, что полосы поглощения G- и R-формы перекрываются для всех трех образцов. Возбуждение флуоресценции в полосе поглощения каждой из форм выявило, что во всех трех белках формы G и B не флуоресцируют, R-форма флуоресцирует с максимумами на длине волны 607 (mRFP1), 588 (mRFP1/Q66C) и 561 нм (mRFP1/Q66S).

Отметим, что качественно присутствие трех форм белка можно наблюдать по спектру поглощения (рис.1). Однако количественное определение соотношения концентраций этих форм, а также определение индивидуальных фотофизических параметров их хромофора затруднительны в рамках только традиционных методов. Например, для определения сечения поглощения σ (или, чаще, коэффициента экстинкции ε , при этом ε (в $\text{M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) = $2.6 \times 10^{20} \sigma$ (в см^2)) хромофора R-формы белка из спектра поглощения необходима информация о концентрации этой формы в растворе, однако стандартные биохимические методы (например, методы Бредфорда или Лоури [15]) позволяют находить только общую концентрацию молекул белка в растворе, но не отдельной его формы. В этом случае, определяя сечение поглощения из спектра поглощения по формуле $2.3D = \sigma C_0 l$ (D – оптическая плотность, l – толщина слоя раствора), в качестве концентрации C_0 (в см^{-3}) берут общую концентрацию молекул белка (всех трех форм), и в результате находят интегральное значение сечения поглощения ФБ. Это вызвано тем, что препаративное разделение форм (и, как следствие, определение парциальных концентраций) затруднительно. Их молекулы по физико-химическим свойствам (молекулярная масса, коэффициент диффузии и т. д.) практически схожи, различия заключаются лишь в химическом строении хромофора этих форм. В подобной ситуации необходим метод, в котором для нахождения индивидуальных фотофизических параметров не нужно априори знать информацию о концентрации молекул белка. Как было указано выше, таким методом является метод НЛФ.

5.2. Определение молекулярных фотофизических параметров хромофора R-формы белков методом нелинейной лазерной флуориметрии

Метод НЛФ, в принципе, позволяет определять все три молекулярных фотофизических параметра, указанных в п.4, – σ , τ_3 и K_{32} . Однако, как показали результаты численного моделирования [21], для практической реализации этой возможности необходим специальный подбор параметров импульса лазерного излучения, возбуждающего флуоресценцию, при которых обеспечивается достаточно высокая практическая устойчивость решения обратной задачи. В настоящей работе задача была редуцирована до двухпараметрической, в которой для каждого из трех белков определяемыми параметрами были σ

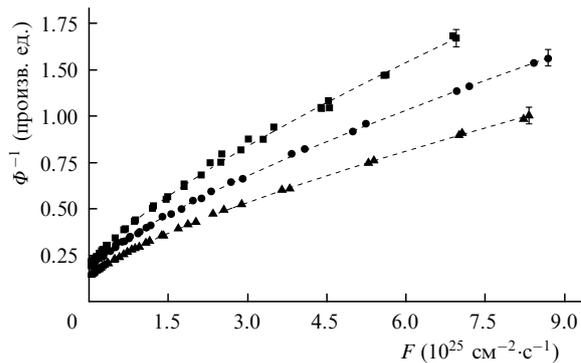


Рис.2. Кривые насыщения флуоресценции для белка mRFP1 (■), mRFP1/Q66S (●) и mRFP1/Q66C (▲). Штриховые кривые – кривые насыщения, рассчитанные путем решения прямой задачи [3–10], для приведенных в табл.1 параметров τ_3 , $\sigma_R^{(532)}$ и η_T .

и K_{32} , а значения τ_3 были измерены независимо на пикосекундном лазерном флуориметре. Кинетики затухания флуоресценции всех трех препаратов оказались одноэкспоненциальными, восстановленные времена τ_3 приведены в табл.1.

Измерение кривых насыщения флуоресценции проводили на установке, описанной в п.3.1. Полученные зависимости Φ^{-1} от F представлены на рис.2. Решая обратную задачу нелинейной флуориметрии для каждой кривой насыщения, при заданных значениях τ_3 определили значения σ и K_{32} для каждого белка. Обратные задачи решались с использованием техники искусственных нейронных сетей и вариационного метода [7, 21], результаты представлены в табл.1 (в пересчете на квантовый выход в триплетное состояние $\eta_T = K_{32}/K_3$).

Отметим следующее: 1) как было сказано в п.5.1, раствор каждого из трех белков представляет собой совокупность флуоресцирующей и нефлуоресцирующих форм; поскольку при измерении τ_3 , σ и K_{32} регистрировались фотоны флуоресценции, то полученные значения этих параметров для всех трех белков относятся к флуоресцирующей R-форме белка; 2) в данной схеме реализации НЛФ возбуждение образцов осуществлялось лазерным излучением с длиной волны 532 нм (см. п.3), поэтому σ – это сечение поглощения R-формы белков на длине волны 532 нм, т. е. $\sigma \equiv \sigma_R^{(532)}$.

5.3. Определение концентраций флуоресцирующей и нефлуоресцирующей форм белков

Используя совместно результаты, полученные в п.5.2, и данные спектрофотометрических измерений, можно определить концентрацию флуоресцирующих и нефлуоресцирующих молекул исследуемых белков.

Известно [22], что равновесие между B- и G-формами ФБ может нарушаться под воздействием внешних фак-

Табл.1. Индивидуальные фотофизические параметры R-формы и доля флуоресцирующих молекул исследуемых белков.

Белки	$\sigma_R^{(532)*}$ (10^{-16} см^2)	$\sigma_R^{(570)**}$ (10^{-16} см^2)	$\varepsilon_R^{\text{max}}$ ($\text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$)	τ_3 (нс)	η	η_T^*	n_R/n_0^{**} (%)
mRFP1	3.4 ± 0.6	6.5 ± 1.1	215 ± 40	3 ± 0.15	0.24 ± 0.03	$0 - 0.02$	26 ± 6
mRFP1/Q66C	3 ± 0.5	5.1 ± 0.8	135 ± 20	2.8 ± 0.14	0.19 ± 0.04	$0 - 0.02$	17 ± 6
mRFP1/Q66S	2.2 ± 0.5	3 ± 0.5	85 ± 13	2.9 ± 0.14	0.20 ± 0.04	0.05 ± 0.02	34 ± 6

Примечания: $\sigma_R^{(532)}$ и $\sigma_R^{(570)}$ – сечение поглощения хромофора R-формы белка на длинах волн 532 и 570 нм; $\varepsilon_R^{\text{max}}$ – коэффициент экстинкции хромофора R-формы белка в максимуме поглощения (см. рис.1); τ_3 , η и η_T – время затухания флуоресценции, квантовый выход флуоресценции и квантовый выход в триплетное состояние исследуемого белка соответственно; n_R/n_0 – доля флуоресцирующих (R-форма) молекул белка в растворе.

* Определены из кривой насыщения флуоресценции; ** определены в результате решения системы (3) (см. ниже).

торов (например, в результате облучения светом, попадающим в полосу поглощения G-формы). Используя это свойство красных ФБ, в принципе, можно найти соотношение концентраций всех трех форм белков (как это сделано в работе [22] применительно к белку mRFP1). Однако, как было сказано, в препарате всех трех белков флуоресцирует только R-форма, и именно ее флуоресценция используется при практическом применении mRFP1 [12, 16]. В- и G-формы являются побочным продуктом созревания, и в идеале предполагается их отсутствие. Поэтому для прогнозирования спектральных свойств mRFP1 в первую очередь важно знать характеристики R-формы белка. Второстепенность информации о нефлуоресцирующих формах позволяет упростить процедуру измерения, а именно исключить дополнительные измерения спектров поглощения после воздействия внешних факторов. При этом становится возможным определить концентрацию R-формы и суммарную концентрацию В- и G-форм.

Действительно, при выполнении указанных выше предположений можно записать следующую систему уравнений:

$$\frac{\Phi_0^{(570)}}{\Phi_0^{(532)}} \frac{\sigma_{RS}^{(570)}}{\sigma_{RS}^{(532)}} = \frac{\sigma_R^{(570)}}{\sigma_R^{(532)}},$$

$$C_R \sigma_R^{(570)} = 2.3 D^{(570)} l^{-1}, \quad (3)$$

$$C_{GB} \sigma_{GB}^{(532)} + C_R \sigma_R^{(532)} = 2.3 D^{(532)} l^{-1},$$

$$C_R + C_{GB} = C_0,$$

где C_R , $C_{GB} \equiv (C_G + C_B)$ – концентрации R-формы и суммарная концентрация В- и G-формы белка в растворе (в см^{-3}); $\sigma_{GB}^{(570)}$ и $\sigma_{GB}^{(532)}$ – интегральное сечение поглощения хромофора нефлуоресцирующих форм на длинах волн 570 и 532 нм; $D^{(570)}$, $D^{(532)}$ и $\sigma_{RS}^{(570)}$, $\sigma_{RS}^{(532)}$ – оптическая плотность раствора белка и сечение КР воды [3, 19] на длинах волн 570 и 532 нм соответственно.

Первое равенство в (3) является следствием равенства квантового выхода при возбуждении раствора белка на длинах волн 532 и 570 нм, записанного через флуоресцентный параметр Φ_0 [3, 19]. Второе и третье равенства – это оптическая плотность (определяемая из спектра поглощения белков), записанная через концентрацию поглощающих на длинах волн 570 и 532 нм молекул белка и через их сечение поглощения. Четвертое – полная концентрация молекул белка в растворе, определяемая стандартными методами [15].

В системе (3) значение длины волны 570 нм было выбрано так, чтобы оптическая плотность D , измеренная на спектрофотометре, определялась поглощением только флуоресцирующей R-формой белка. Значение 532 нм выбрано в связи с тем, что в данной работе при экспериментальной реализации метода НЛФ возбуждение осуществлялось излучением с длиной волны 532 нм, поэтому определенное из кривой насыщения (п.5.2) сечение поглощения – это сечение поглощения на длине волны 532 нм.

В системе (3) искомыми величинами являются C_R , C_{GB} , $\sigma_R^{(570)}$, $\sigma_{GB}^{(532)}$, а экспериментально измеряемыми – $\Phi_0^{(570)}$, $\Phi_0^{(532)}$, $D^{(570)}$, $D^{(532)}$, l , C_0 , $\sigma_{RS}^{(532)}$ (сечение поглощения, полученное методом НЛФ). Решая систему (3) от-

носительно неизвестных, можно определить концентрации и сечения поглощения R-формы белка. Результаты для всех трех образцов представлены в табл.1.

Отметим, что помимо концентраций флуоресцирующих и нефлуоресцирующих молекул важный результат, который следует из системы (3), – это сечение $\sigma_R^{(570)}$, позволяющее найти максимальную величину индивидуального сечения поглощения σ_R^{max} (или, для удобства сравнения с литературными данными, коэффициента экстинкции ϵ_R^{max}) хромофора R-формы белка. Данное значение может быть пересчитано из спектра поглощения на основе соотношения $D^{\text{max}}/D^{(570)} = \epsilon_R^{\text{max}}/\epsilon_R^{(570)}$, где D^{max} – оптическая плотность в максимуме полосы поглощения R-формы. Результат представлен в табл.1.

6. Обсуждение результатов

Как видно из табл.1, в максимуме полосы поглощения R-формы белка mRFP1 (на длине волны 584 нм) $\epsilon_R^{\text{max}} = (215 \pm 40) \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, что в четыре раза выше значения, представленного в работе [16]. Такое различие, по всей видимости, связано с тем, что в работе [16] при расчете коэффициента экстинкции использовали суммарную концентрацию белка (и поэтому находили интегральный коэффициент экстинкции), а не парциальную, как в нашем случае. Как следствие, определение парциальной концентрации флуоресцирующих молекул позволило нам найти индивидуальный коэффициент экстинкции хромофора R-формы белков. В общем случае определение фотофизических параметров ФБ на основе интегральных характеристик препарата является некорректным, доказательством этого может служить ряд примеров. В частности, различаются опубликованные значения коэффициента экстинкции хромофоров красных ФБ: для белка DsRed он равен $75 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [12, 16] на одну полипептидную цепь, для tdimer2(12) – $120 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [16] на одну полипептидную цепь, для mRFP1 и mStrawberry – 50 [16] и $90 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [23] соответственно, несмотря на то что хромофоры этих белков считаются химически идентичными.

Отметим, однако, что в рассматриваемой модели формирования флуоресцентного отклика (1) нами не были учтены фотохимические процессы (фотоионизация, фотовыцветание и т. д. [8, 22]). Эффективность этих процессов в трех исследованных нами белках может быть разной. При большой эффективности фотохимические процессы могут являться дополнительным механизмом насыщения флуоресценции, поэтому их учет может приводить к завышенной оценке сечения поглощения, определяемого из кривой насыщения флуоресценции, и, как следствие, к завышенному значению ϵ_R^{max} . Влияние фотохимических процессов на полученные значения фотофизических параметров планируется учесть в будущем. Первый шаг в этом направлении был нами сделан в работе [22], в которой был учтен процесс фотовыцветания (по двухступенчатому механизму) в mRFP1. Из [22] следует, что для этого белка данный процесс имеет низкую эффективность (по сравнению с процессами, учтенными в (1)) и не вносит заметного искажения в полученные результаты.

Как было установлено ранее [14], положение максимума полосы поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции R-формы исследуемых в работе белков зависит от заменяемого аминокислотного остатка по поло-

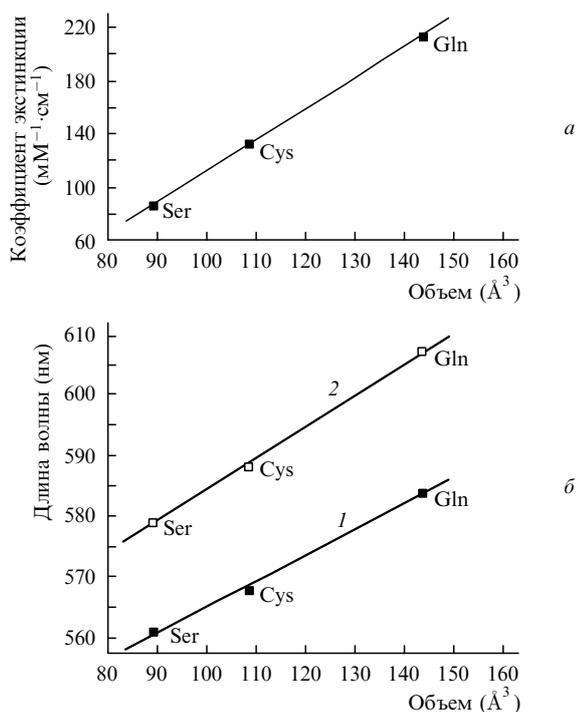


Рис.3. Зависимость коэффициента экстинкции (а), положения максимума поглощения/возбуждения (1) и эмиссии флуоресценции (2) (б) R-формы белков от объемов аминокислотного остатка по положению 66; Ser – серин, Cys – цистеин и Gln – глутамин.

жению 66 и хорошо коррелирует с объемом этого остатка (рис.3). С увеличением объема остатка положение максимума сдвигается в длинноволновую область спектра. Подобная корреляция наблюдается и для индивидуального значения коэффициента экстинкции хромофора R-формы (рис.3): большему объему остатка соответствует более высокое значение коэффициента экстинкции (коэффициент корреляции более 0.9). Для интегрального значения коэффициента экстинкции (в максимуме полосы поглощения R-формы) такой зависимости не наблюдается.

Полученный результат не противоречит представлению, согласно которому в случае полярной аминокислоты по положению 66 (какими являются использованные в работе серин и цистеин) её боковой радикал может образовывать водородные связи с боковыми радикалами глутамин-213 и глутамат-215 [14]. Эти радикалы, в свою очередь, принадлежат внешней оболочке белка (β -бочонку) и достаточно жестко закреплены относительно нее [14]. Изменение геометрии бокового радикала по положению 66 в таком случае будет приводить к изменению геометрии хромофора, а именно имидазалидонового кольца, и, как следствие, к изменению индивидуальных оптических (положение спектров поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции) и фотофизических параметров мутантов. В случае неполярных аминокислот такого эффекта может не наблюдаться, что предстоит проверить в дальнейшем.

В настоящее время активно ведутся работы по получению новых видов красных мономерных ФБ с улучшенными свойствами [14, 23]: с более длинноволновым положением спектра флуоресценции, большими значениями квантового выхода флуоресценции, яркости, фото- и рН-стабильности. В то же время необходимое для развития данного направления понимание взаимосвязи между оп-

тическими или фотофизическими свойствами красных ФБ и их структурой практически отсутствует. Нет методики прогнозирования этих свойств у того или иного ФБ на основании его структуры. Поэтому представленные в работе результаты анализа свойств мутантных белков, содержащих единичную точечную аминокислотную замену, могут быть использованы для решения общей задачи разработки алгоритма дизайна красных ФБ с заранее заданными свойствами.

7. Выводы

В настоящей работе с помощью метода лазерной флуориметрии были определены индивидуальные фотофизические параметры хромофора флуоресцирующей формы красного флуоресцентного белка mRFP1 и его мутантов (mRFP1/Q66C и mRFP1/Q66S). Найдена концентрация флуоресцирующей компоненты в конечном препарате указанных белков. Выявлена нарастающая зависимость индивидуального коэффициента экстинкции хромофора R-формы белка (в максимуме полосы поглощения) от объема аминокислоты по положению 66, что может быть применено для прогнозирования свойств новых мутантов красных флуоресцентных белков и синтеза белков с заранее заданными свойствами.

1. Пермяков Е.А. *Метод собственной люминесценции белка* (М.: Наука, 2003).
2. Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Lukyanov S., Lukyanov K.A. *Chem. Biol.*, **11**, 845 (2004).
3. Банишев А.А., Вржещ Е.П., Дмитриенко Д.В., Друца В.Л., Маслов Д.В., Пашенко В.З., Ширшин Е.А., Вржещ П.В., Фадеев В.В. *Биофизика*, **52**, 792 (2007).
4. Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Чубаров В.В. *ДАН СССР*, **262**, 338 (1982).
5. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Filippova E.M., Chubarov V.V. *Opt. Commun.*, **166**, 25 (1999).
6. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Banishev A.A., Litvinov P.N., Maslov D.V., Ostroumov E.E. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5824**, 44 (2005).
7. Фадеев В.В., Доленко С.А., Доленко Т.А., Увенков Я.В., Филиппова Е.М., Чубаров В.В. *Квантовая электроника*, **24**, 571 (1997).
8. Банишев А.А., Ширшин Е.А., Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **38**, 77 (2008).
9. Маслов Д.В., Остроумов Е.Е., Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **36**, 163 (2006).
10. Banishev A.A., Shirshin E.A., Fadeev V.V. *Laser Phys.*, **18**, 861 (2008).
11. Shimomura O. *The discovery of green fluorescent protein* (N.Y.: Wiley, 1998).
12. Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П. *Усп. биол. химии*, **43**, 163 (2003).
13. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. *Science*, **263**, 802 (1994).
14. Khromeeva E.E., Druca V.L., Vrzheschch E.P., Dmitrienko D.V., Vrzheschch P.V. *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1085 (2008).
15. McCluskey K. *Adv. Appl. Microbiol.*, **52**, 245 (2003).
16. Campbell R.E. *Biochemistry*, **99**, 7877 (2002).
17. Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Lukyanov S., Lukyanov K.A. *Chem. Biol.*, **11**, 845 (2004).
18. Nifos R., Luo Yi. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 505 (2007).
19. Chekalyuk A.M., Fadeev V.V., Georgiyev G., Kalkanjev T. *Spectrosc. Lett.*, **15**, 355 (1982).
20. Thompson N.L. *Fluorescence Correlation Spectroscopy. In Topics in Fluorescence Spectroscopy* (N.Y.: Plenum Press, 1991).
21. Бойчук И.В., Доленко Т.А., Сабиров А.Р., Фадеев В.В., Филиппова Е.М. *Квантовая электроника*, **30**, 611 (2000).
22. Banishev A.A., Shirshin E.A., Fadeev V.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6733**, 67331B (2007).
23. Shaner C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1567 (2004).