

Программа «Структурная биология»

Курс « Оптическая спектроскопия»

Алексей Валерьевич Феофанов

Кафедра биоинженерии
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН

Лекция 2

Цель изучения дисциплины: получение базовых знаний о методах оптической спектроскопии, о возможностях и способах их применения к решению задач структурной биологии

Методы оптической спектроскопии:

- Молекулярная спектроскопия электронного поглощения света
- Молекулярная флуоресцентная спектроскопия**
- Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением
- Поляризационная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии
- Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул
- Спектроскопия кругового дихроизма
- Инфракрасная (ИК) спектроскопия молекул
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света и ее разновидности

Люминесценция – это эффект испускания кванта света при релаксации молекулы из возбужденного в основное электронное состояние.



Люминесценция = Флуоресценция + Фосфоресценция

Флуорофоры – это хромофоры способные флуоресцировать

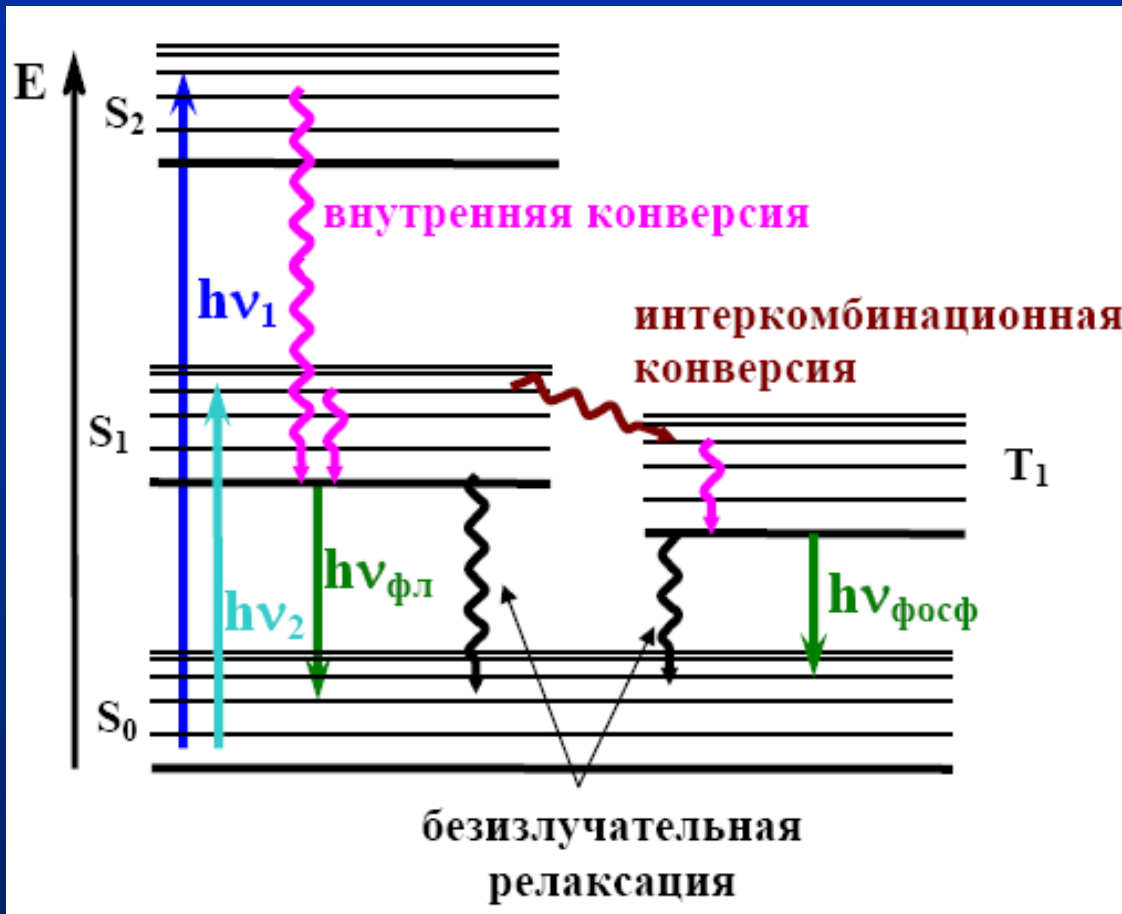


Диаграмма Яблонского

Характерные времена

Поглощение кванта света -

10^{-15} с

Внутренняя конверсия и колебательная релаксация -

$10^{-14} - 10^{-11}$ с

Испускание света:

Флуоресценция -

$10^{-9} - 10^{-7}$ с

Фосфоресценция -

$10^{-3} - 10^2$ с

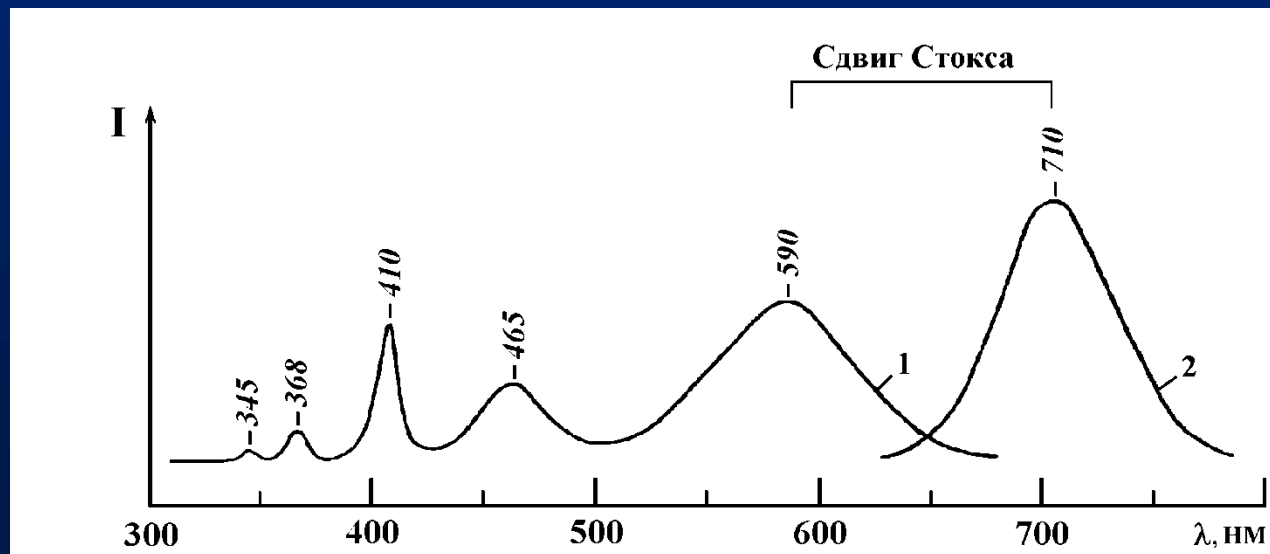
Спектр испускания флуоресценции (спектр эмиссии)— это зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны.

Правило Каши - испускание квантов флуоресценции всегда происходит с нижнего возбужденного электронного уровня молекулы, независимо от того, на каком уровне оказался электрон после поглощения фотона.

- Форма спектра флуоресценции и положение максимума не зависят от длины волны возбуждения.
- При изменении длины волны возбуждения меняется только интенсивность спектра флуоресценции

Стоксов сдвиг — разница между максимумами спектра испускания флуоресценции и длинноволновой полосы поглощения флуорофора.

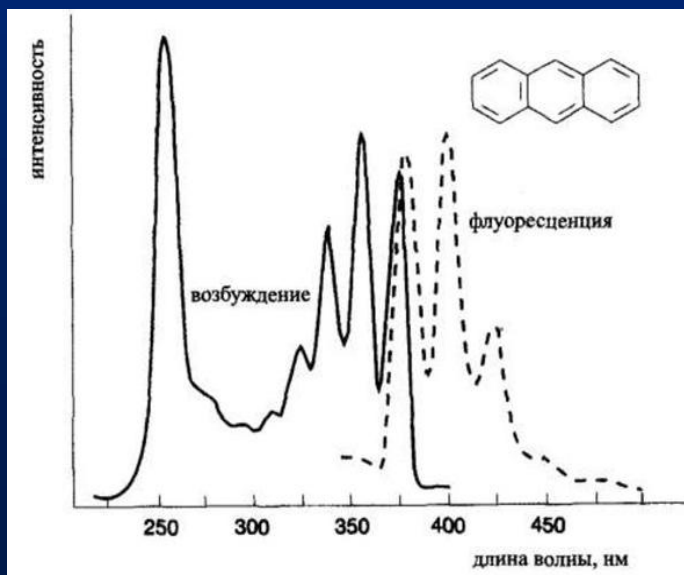
- Стоксов сдвиг варьирует от нескольких до 100-150 нм.



Правило Лёвшина (закон зеркальной симметрии) электронно-колебательные спектры поглощения и флуоресценции молекул зеркально симметричны относительно положения электронного перехода.

Правило выполняется, если колебательные частоты молекул в основном и возбуждённом электронных состояниях одинаковы, а прямые и обратные электронные переходы равновероятны

Форма спектров испускания флуоресценции является зеркальным отражением формы длинноволновой полосы поглощения



Спектр возбуждения флуоресценции – зависимость интенсивности флуоресценции на выбранной длине волны от длины волны возбуждения.

- Спектр возбуждения флуоресценции повторяет по форме спектр поглощения флуорофора.

Квантовый выход флуоресценции (Q) – отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных фотонов. Величина постоянная (при неизменном микроокружении флуорофора), не зависит от длины волны возбуждения, всегда < 1 .

$$I_{fl} = I_{abs} \times Q$$

$$I_{abs} = I_0 - I_0 \times 10^{-\epsilon cl} \rightarrow I_{fl} = I_0 (1 - 10^{-\epsilon cl}) Q$$

Для слабо поглощающих растворов $10^{-\epsilon cl} \rightarrow 1$

и при разложении в ряд Тейлора по степеням $10^{-\epsilon cl} \approx 1 - \epsilon cl$

$$I_{fl} = I_0 (\epsilon cl) Q$$

Т.е. интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации флуорофора!

Время жизни флуоресценции (τ) или время жизни возбужденного состояния— это время, за которое первоначальная заселенность возбужденного уровня снижается в e раз ($e=2,72$) после выключения возбуждающего света.

$$I_{fl} = I_{fl0} \times e^{-t/\tau}$$

$1/\tau=k$ — константа скорости дезактивации возбужденного состояния

$$I_{fl} = I_{fl0} \times e^{-kt}$$

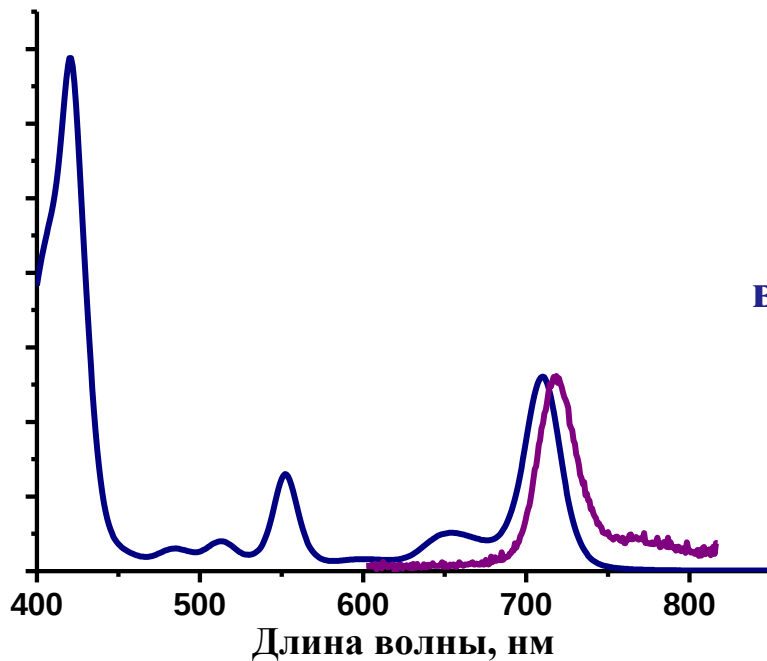
$$k=k_{fl}+k_i$$

Где k_{fl} и k_i - это константы скоростей дезактивации за счет флуоресценции и других безызлучательных процессов

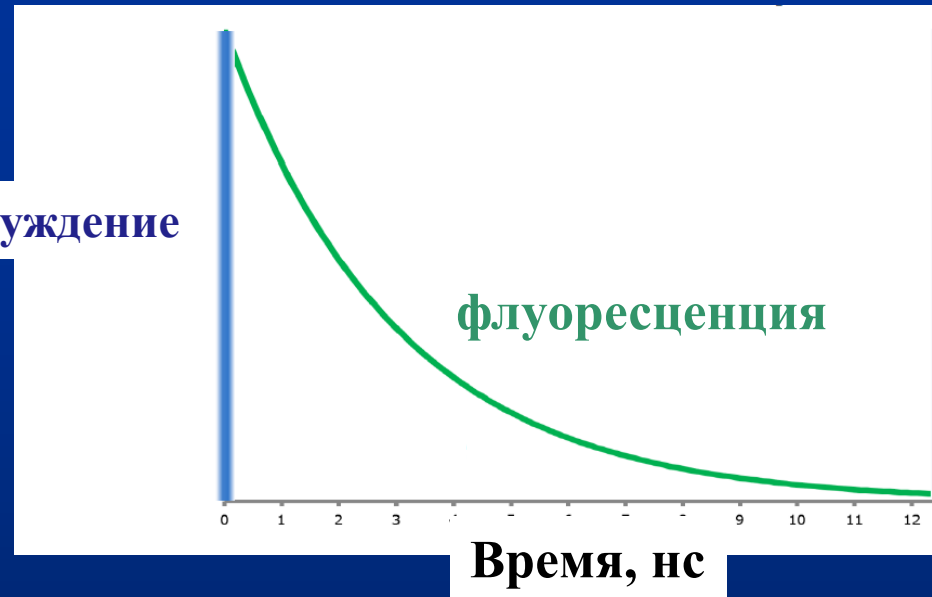
$$\tau=1/(k_{fl}+k_i)$$

$$Q=k_{fl}/(k_{fl}+k_i)$$

Флуоресценция молекул



возбуждение



Спектральные параметры, используемые во флуоресцентном анализе

1. Интенсивность флуоресценции – наличие и относительная концентрация флуорофора.
2. Форма спектра и положение максимума – идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий
3. Время жизни флуоресценции - идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий

Приборы и методы, использующие эффект флуоресценции

Спектрофлуориметры и планшетные флуориметры:

измерения растворов и взвесей в кюветах и многолуночных планшетах ($V \approx \text{мкл} - \text{мл}$)

Флуоресцентные микроскопы:

измерения пространственного распределение флуоресценции в объектах размером меньше 10 мм

Флуоресцентные сканеры:

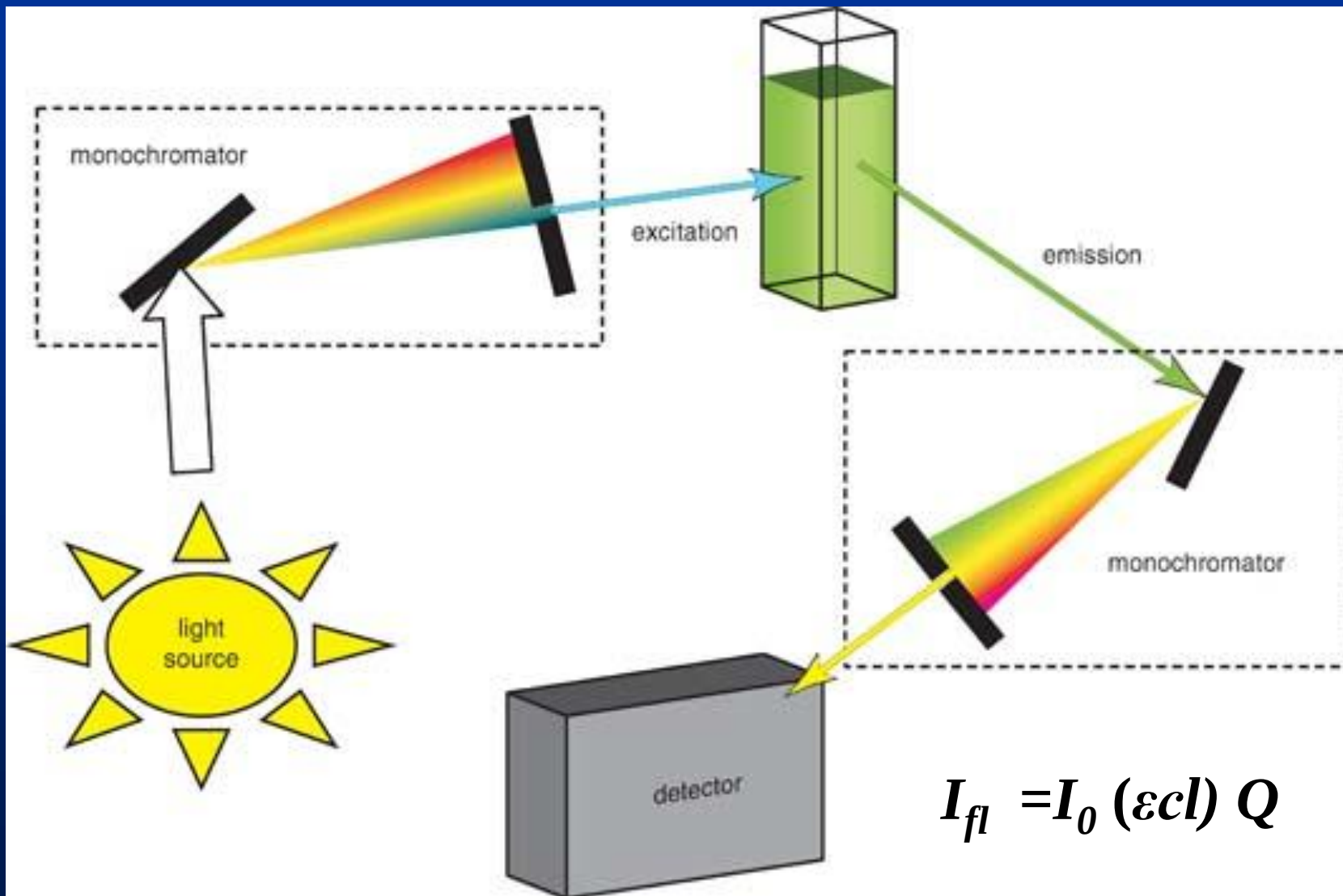
измерения пространственного распределение флуоресценции в макро-объектах (электрофорезные гели, блоты и хроматограммы)

Проточные цитометры:

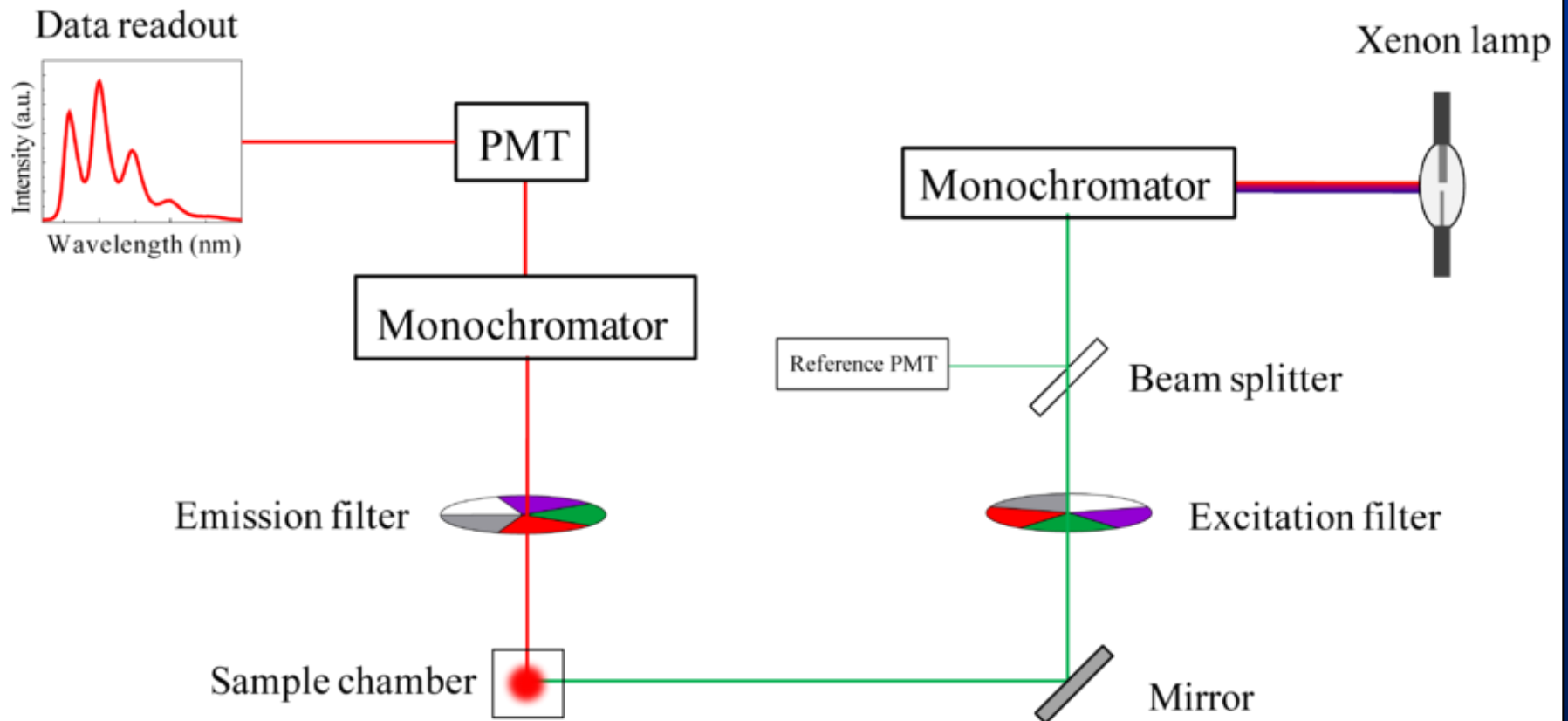
измерения флуоресценции клеток в проточных капиллярах

Приборы для капиллярного электрофореза, ВЭЖХ, сиквенаторы, с системами детекции на основе флуоресценции

Оптическая схема спектрофлуориметра



Оптическая схема спектрофлуориметра более детально



«Биологические» флуорофоры

- *белки* – флуоресценция ароматических аминокислот; возбуждение – 280 нм; испускание - максимум 330-350 нм; преобладает сигнал триптофанов.
- *восстановленные никотинадениндинуклеотид, никотинадениндинуклеотид-фосфат (NADH, NADPH)*; возбуждение – 260 и 340 нм; испускание - 465--480 нм
- *окисленные флавопротеины* в составе простетических групп содержат производные рибофлавина – *флавиномононуклеотид и флавинаденинди-нуклеотид*; возбуждение – 450 нм; испускание - максимум 520--530 нм
- *каротиноиды* (витамин А- испускание 480 нм);
- *пигменты старения* (липофуцин и др. - испускание 560 нм); *пигменты растений и водорослей* : хлорофиллы и фикобилины (испускание 572- 660 нм);
- *порфирины* (испускание- 580-640 нм)

Анизотропия флуоресценции

Анизотропия флуоресценции – количественная характеристика зависимости поляризации флуоресценции от поляризации возбуждающего света

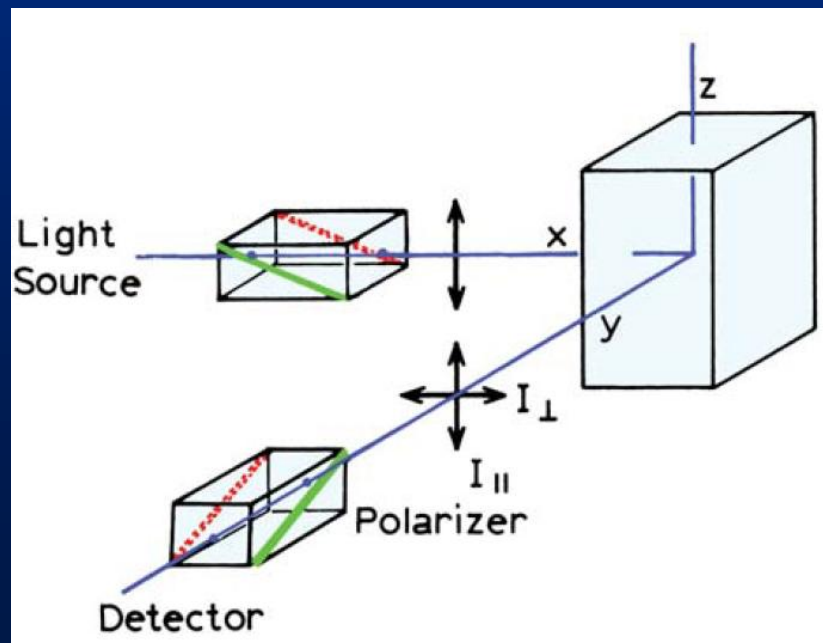
При возбуждении флуорофора светом с вертикально поляризацией выражения для анизотропии (r) и поляризации (P) флуоресценции имеют вид:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}),$$

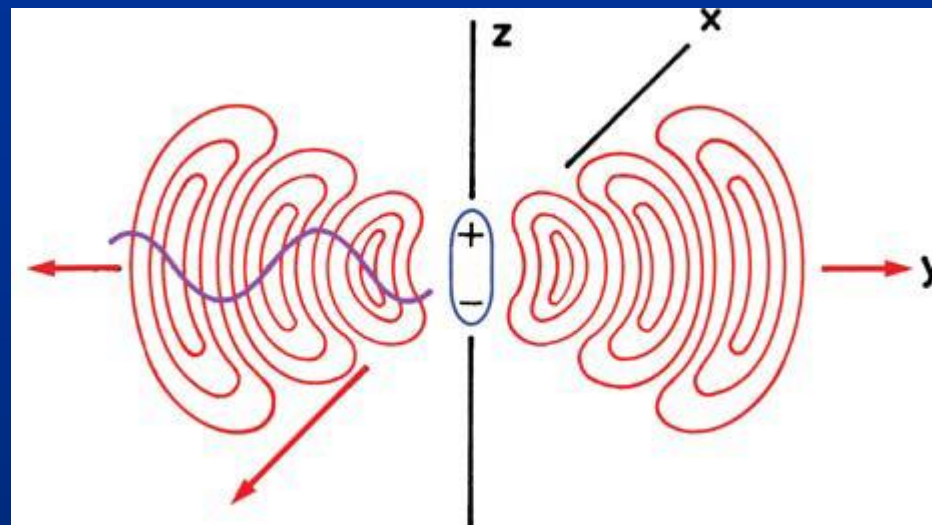
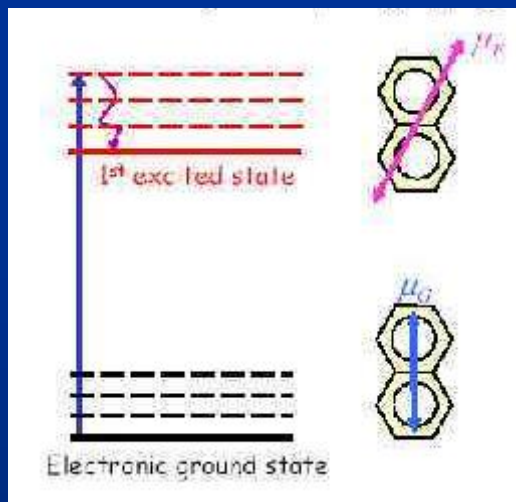
$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}),$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ - интенсивности вертикально и горизонтально поляризованной флуоресценции .

$$P = 3r/(2+r), \quad r = 2P/(3-P)$$



Анизотропия флуоресценции



Диполь молекулы ориентирован вдоль ориентации поляризации света

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right)$$

Table 10.1. Relationship between the Angular Displacement of Transition Moments (β) and the Fundamental Anisotropy (r_0) or Polarization (P_0)

β (deg)	r_0	P_0
0	0.40	0.50 = 1/2
45	0.10	0.143 = 1/7
54.7	0.00	0.000
90	-0.20	-0.333 = -1/3

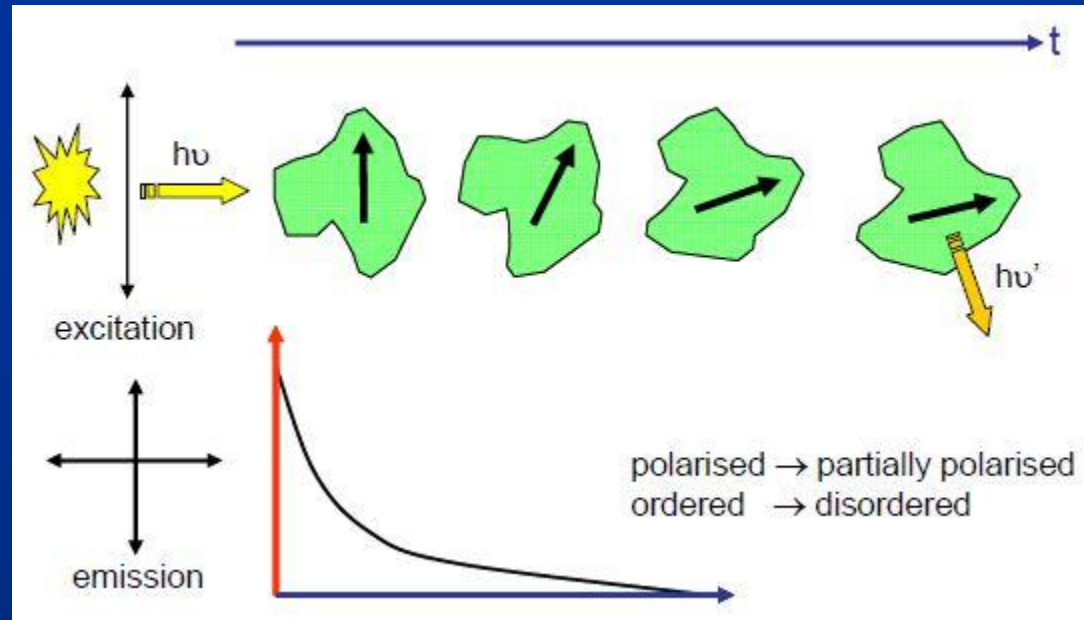
where β is the angle between the absorption and emission transitions.

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)}$$

Θ – время вращательной корреляции

$$\Theta = \eta V / kT,$$

Где η – вязкость раствора, V – объем вращающегося фрагмента молекулы.



Методы, основанные на анализе поляризации флуоресценции, широко применяются при скрининге низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с белками, и при изучении структуры белков.

Метод FRET – fluorescence resonance energy transfer флуоресцентный резонансный перенос энергии

в отсутствие переноса



в случае переноса



Описывается теорией Фёрстера на основе представлений о взаимодействии D^* и A по типу диполь – индуцированный диполь.

Вероятность переноса энергии W зависит от:

(i) ориентации дипольных моментов излучения донора и поглощения акцептора

Диполи перпендикулярны – переноса нет. Направление моментов совпадает с направлением радиус-вектора, соединяющего D^ и A – перенос энергии максимален.*

(ii) степени перекрывания спектра флуоресценции донора и поглощения акцептора

(iii) расстояния R между D^* и A

$$W(R) = 1/(1 + (R/R_0)^6),$$

где R_0 – «радиус Фёрстера», расстояние, соответствующее $W=0,5$.

$$R_0 \approx 2-5 \text{ нм.}$$

Молекулярные инструменты:

Флуорогенные и хромогенные субстраты ферментов

Область применения – выявление, анализ экспрессии/активности и локализации различных клеточных ферментов;
полуколичественный анализ рекомбинантных белков;
использование в различных иммуноферментных тест-системах .

Главное свойство субстратов: избирательность взаимодействия

Флуорогенные субстраты: продукты реакции флуоресцируют

Хромогенные субстраты: продукты реакции поглощают свет (окрашены)

Продукты реакций: растворимые в воде
нерастворимые в воде

Общее требование:

продукт реакции должен максимально отличаться по своим оптическим свойствам от субстрата -

более интенсивное или отличающееся по спектру поглощение (флуоресценция)

преимущество – детекция продукта в присутствии субстрата

Виды/классы ферментов:

β -галактозидаза,

β -глюкуронидаза,

секретируемые щелочные фосфатазы,

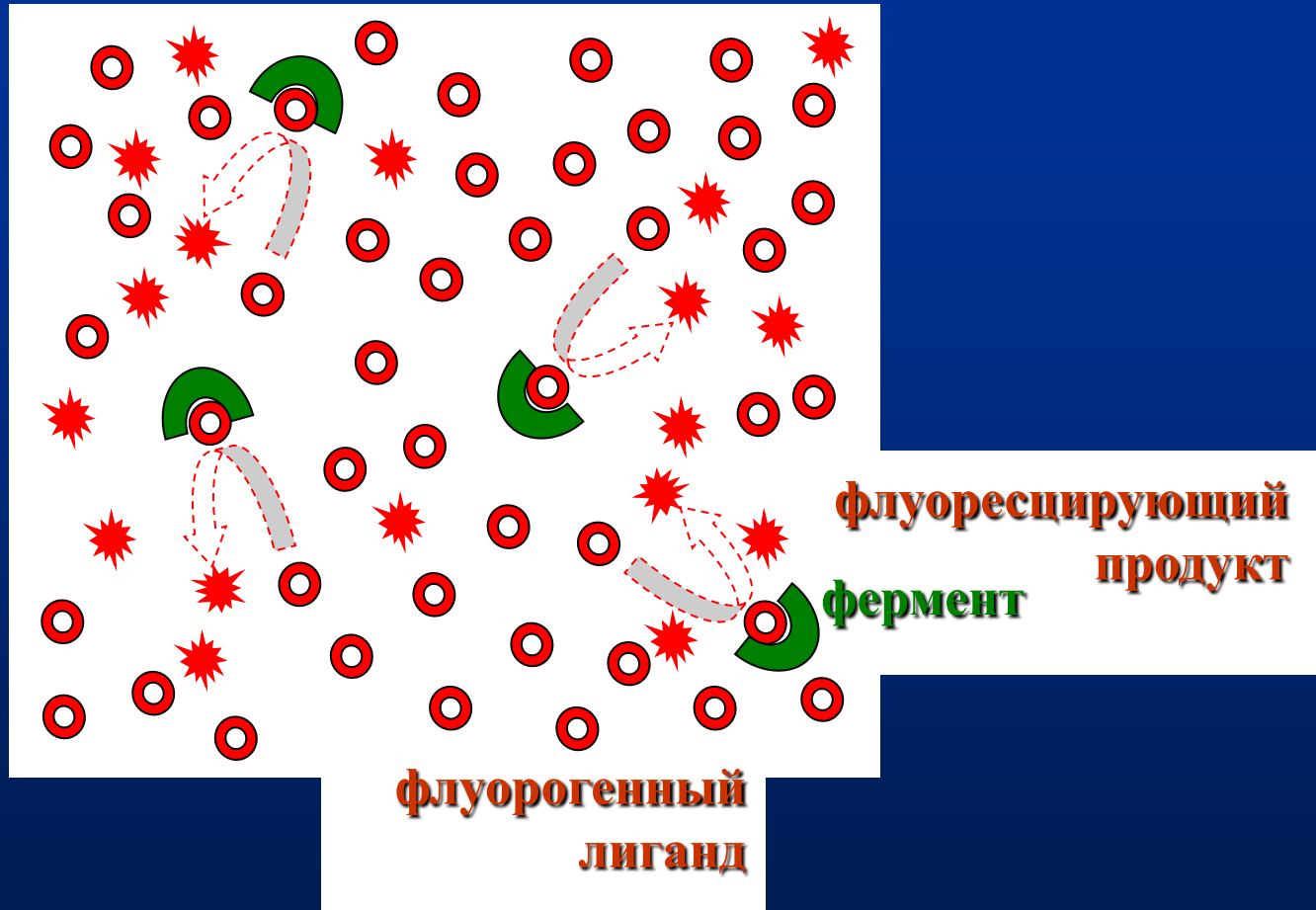
хлорамфеникол ацетилтрансфераза,

люцифераза,

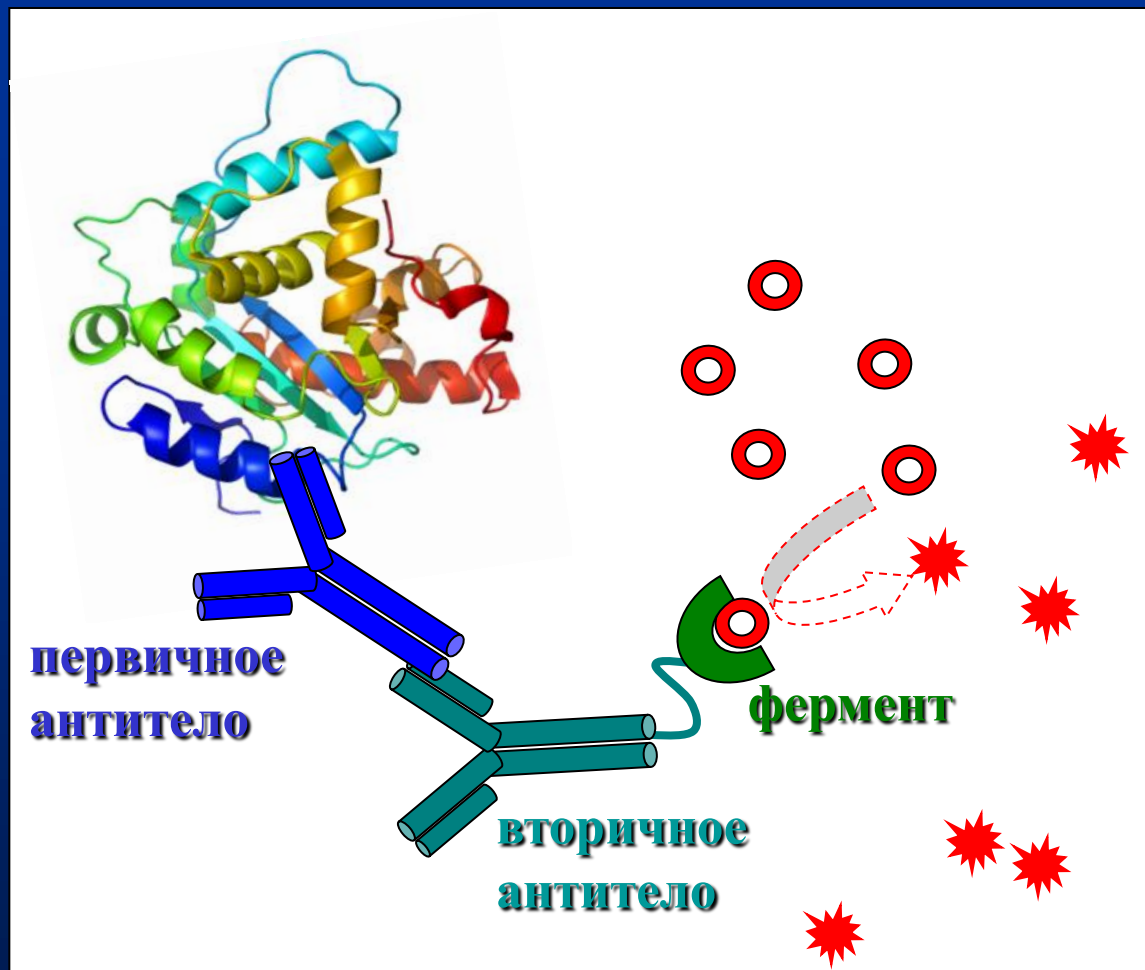
протеазы,

пероксидазы

Выявление ферментов и уровня их активности с помощью флуорогенных субстратов

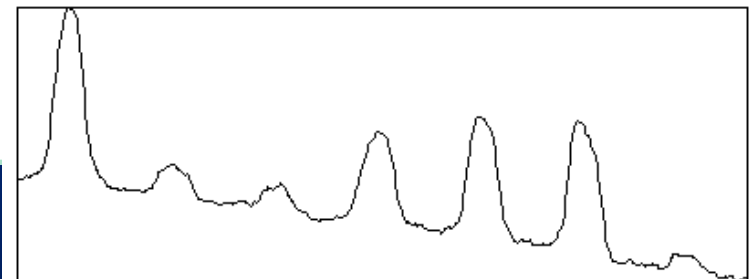
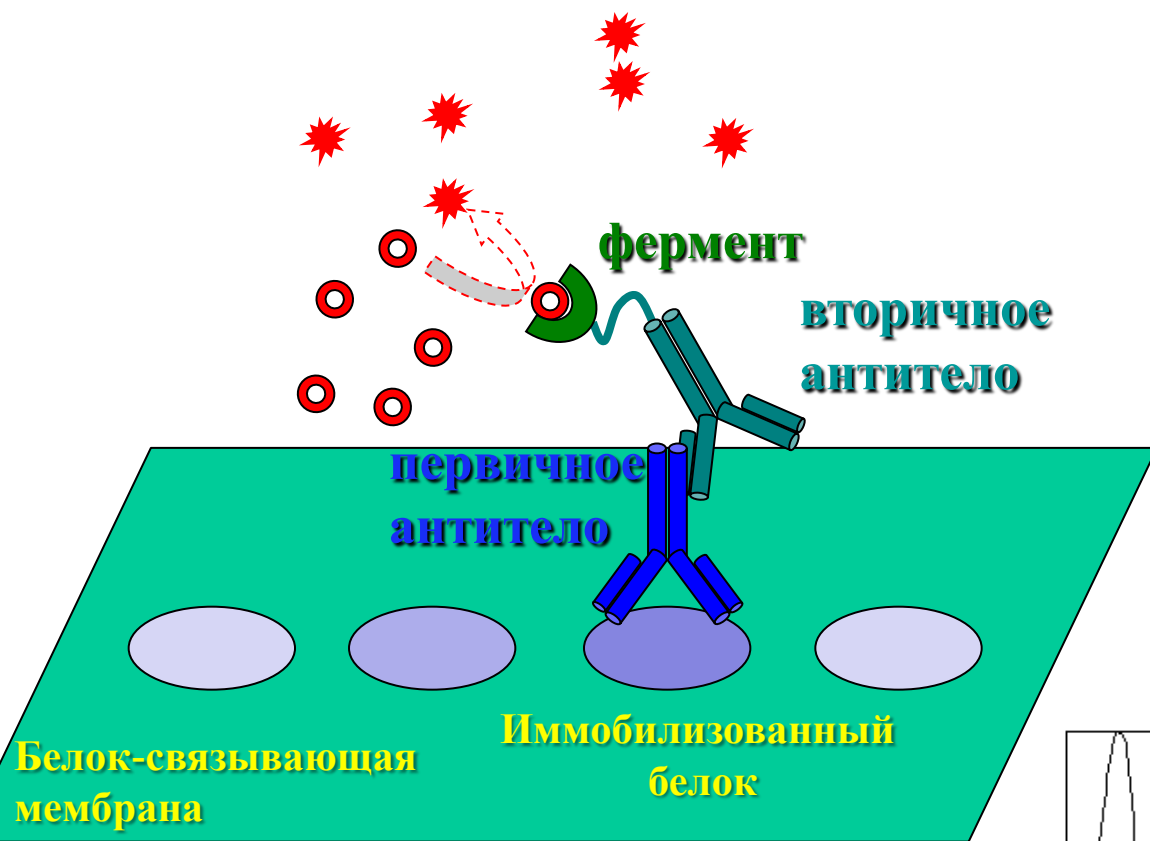


Выявление заданных молекул и их количества с помощью антител, фермента и флуорогенных субстратов

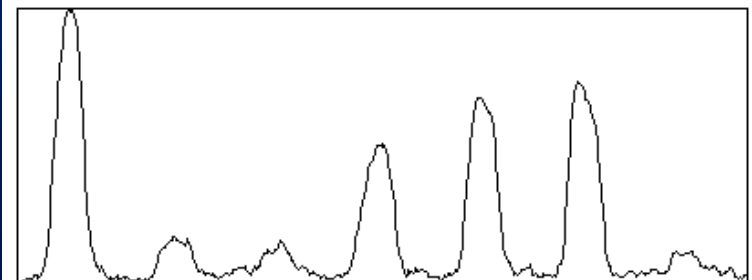


Фермент: пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза

Дот-блот



Before background subtraction



After background subtraction

ELISA - Enzyme-linked immuno sorbent assay

Иммуноферментный анализ в планшете

