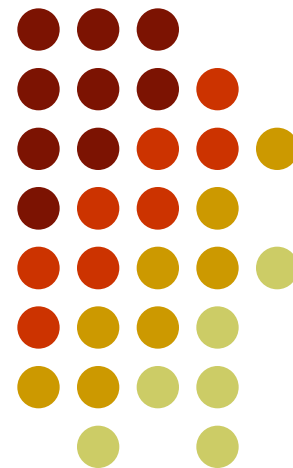
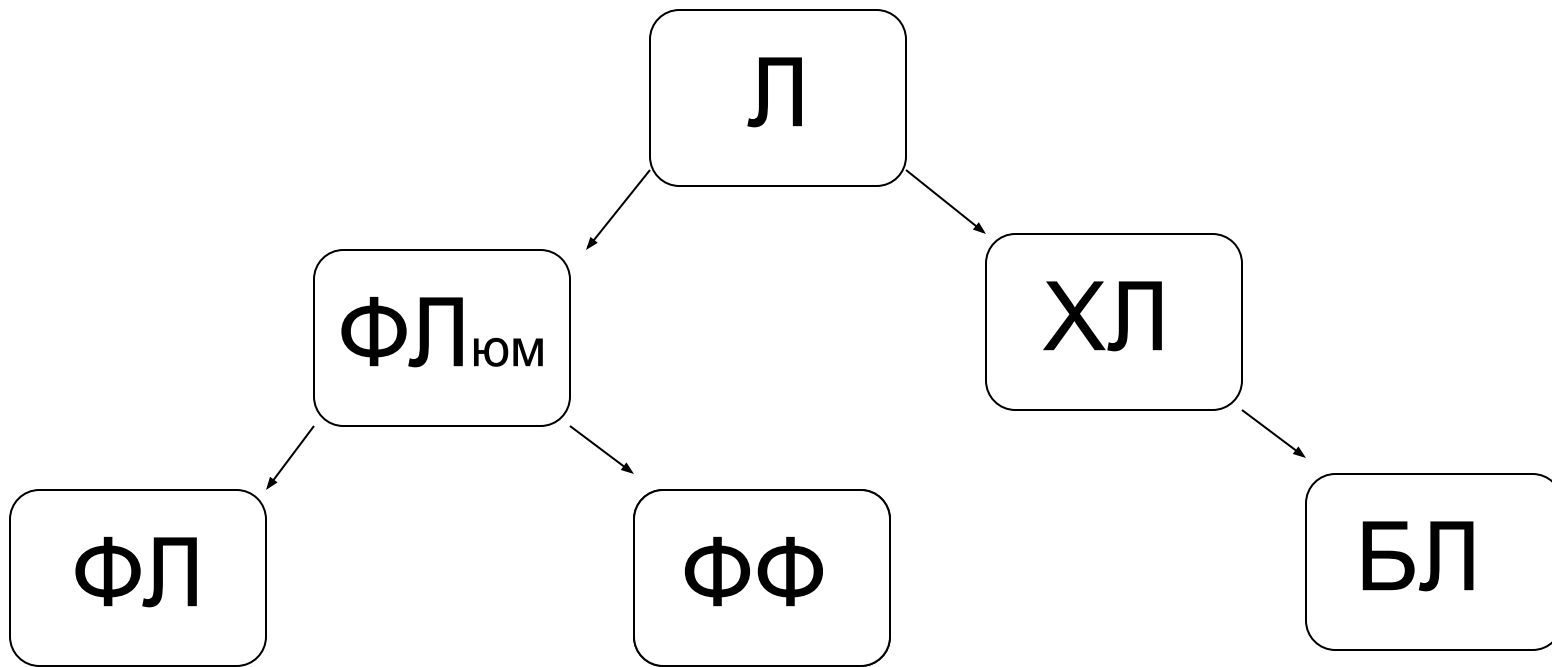

**Применение методов
флуоресцентных зондов
для исследования
белковых комплексов**





Люминесценция – все виды излучения, вызванные возбуждением молекул

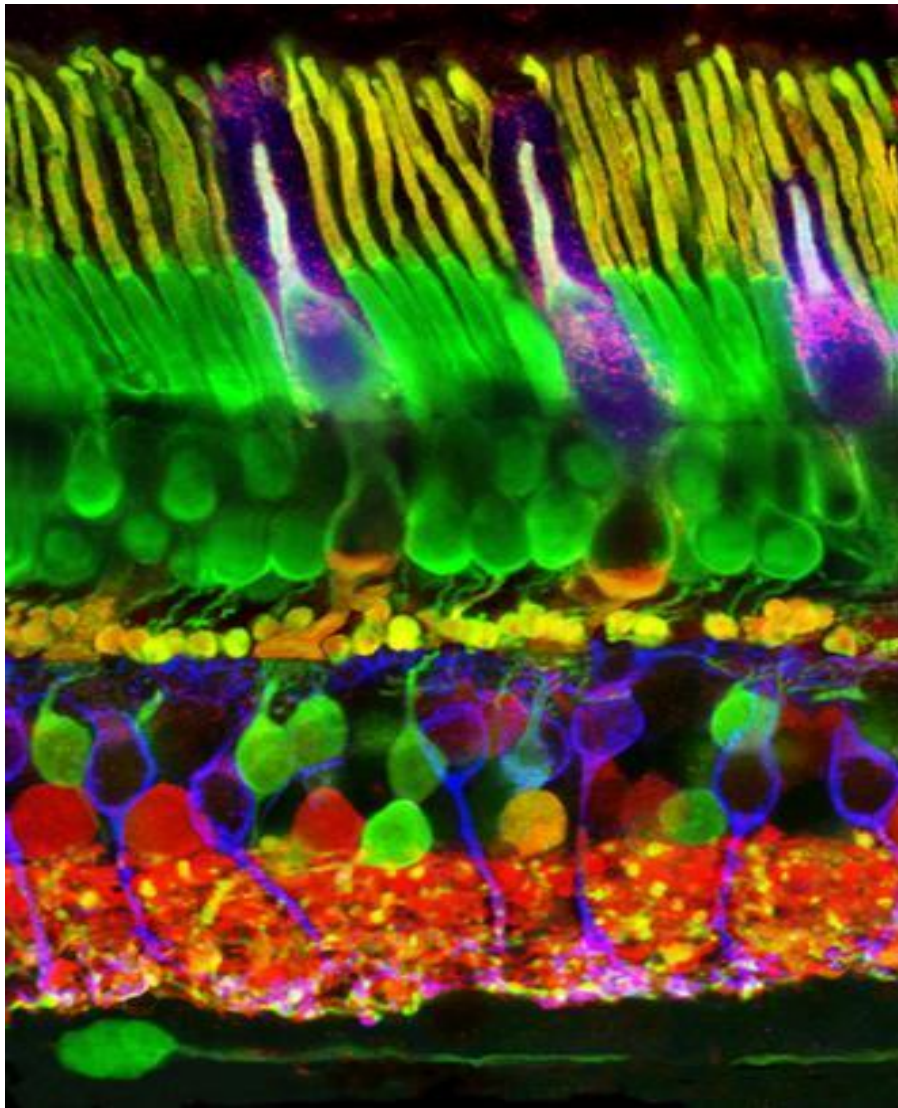
Фотолюминесценция – свечение, возникающее после поглощения фотонов видимого света

Флуоресценция – кратковременная фотолюминесценция

Фосфоресценция – сравнительно длительная фотолюминесценция

Хемолюминисценция – люминесценция, сопровождающая химические реакции

Биолюминесценция - хемолюминисценция в биообъектах

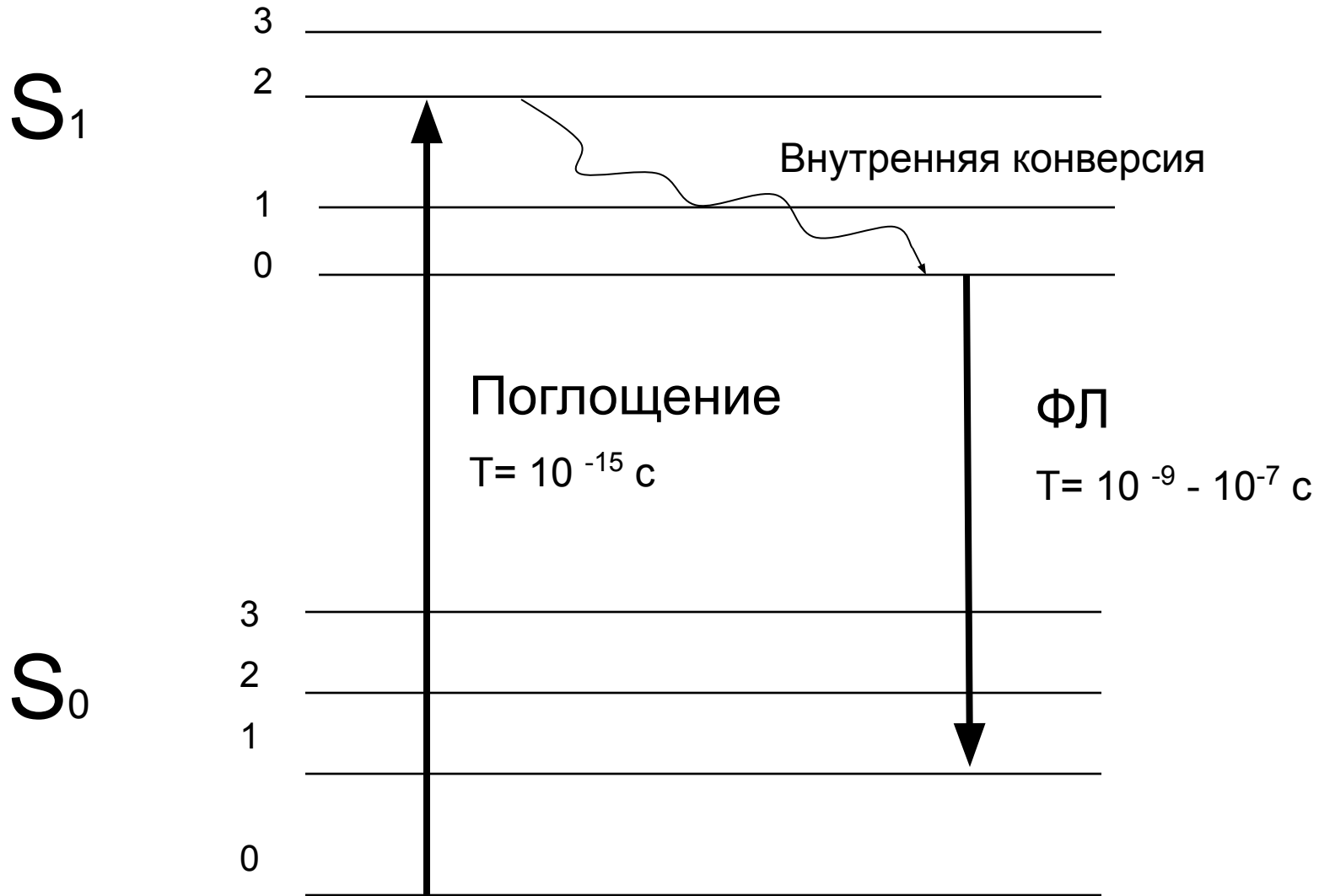


Сетчатка обезьяны

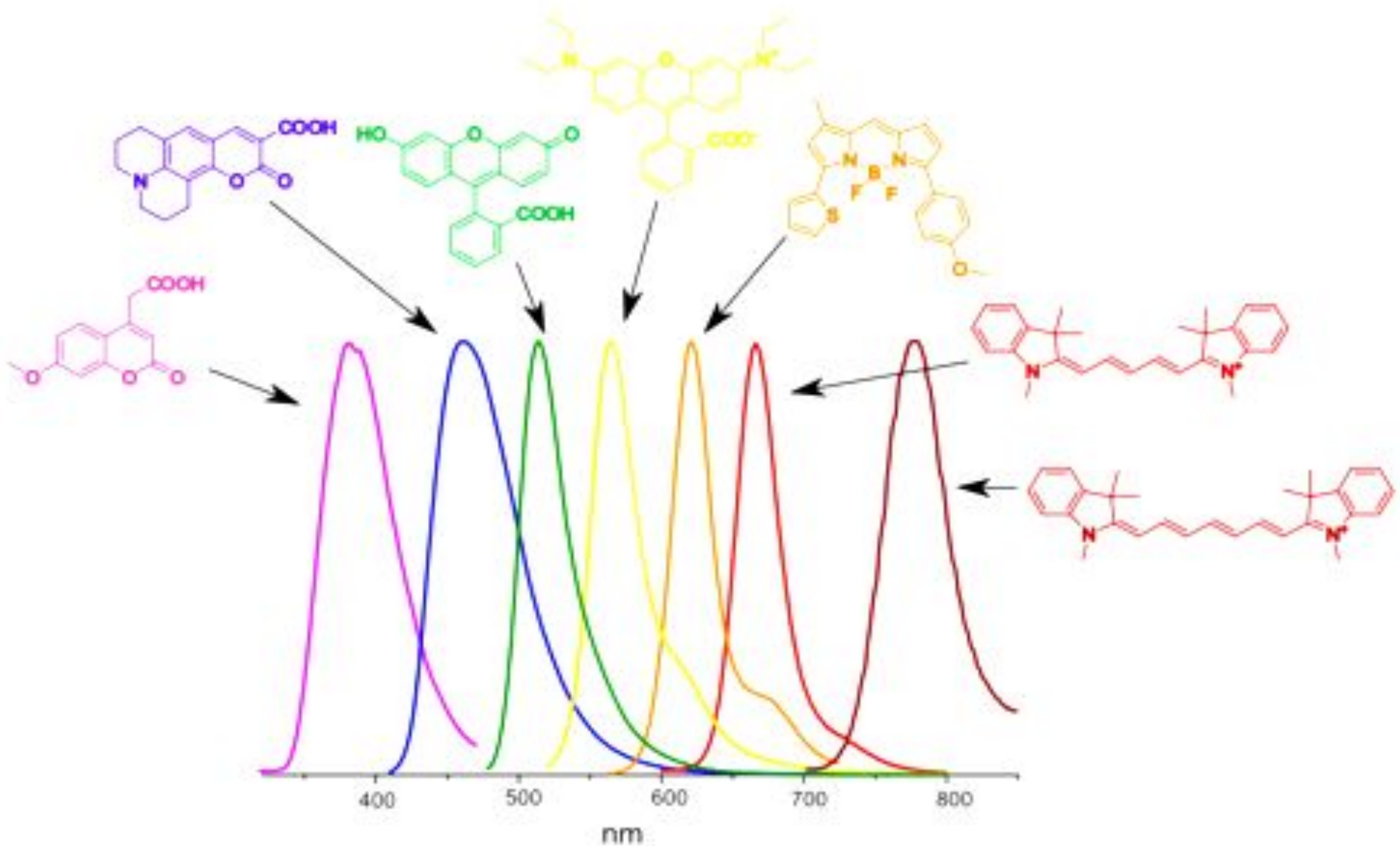


Срез почки мыши

Диаграмма Яблонского



Флуоресцентные красители различной химической природы

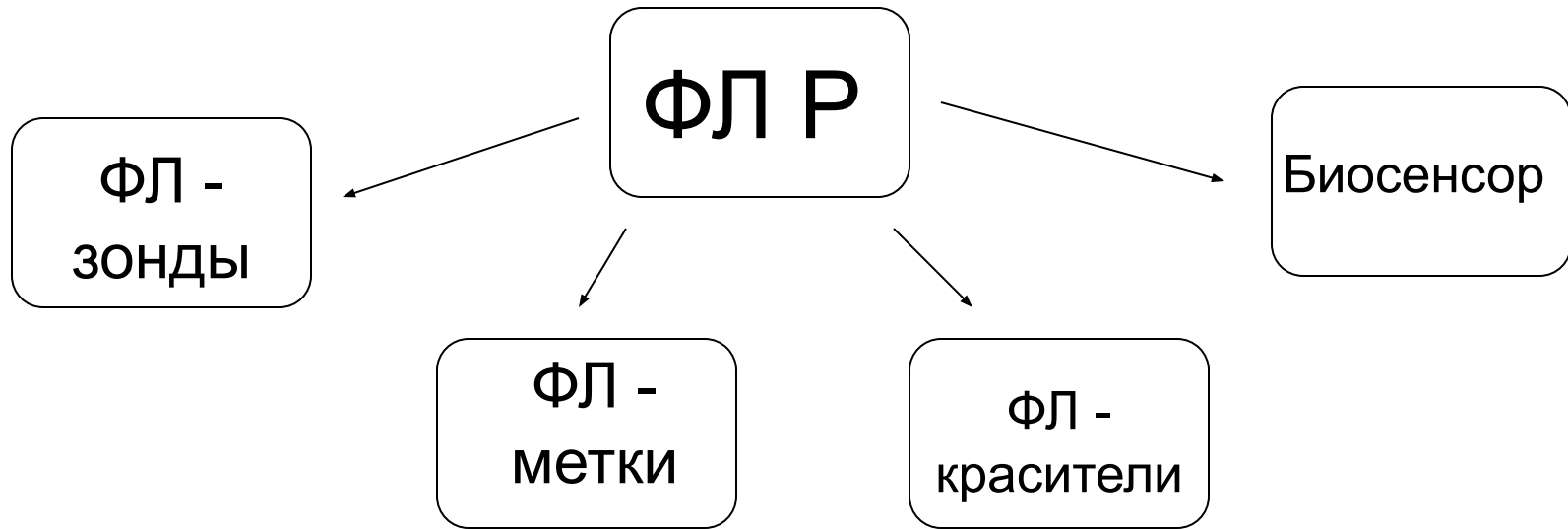




Флуорохромы – все виды флуоресцирующих молекул

Флуорофоры – флуоресцирующие группировки крупной молекулы

Молекулярный репортер – флуорохром, сообщающий о физико-химических условиях своего окружения за счет изменения параметров флуоресценции

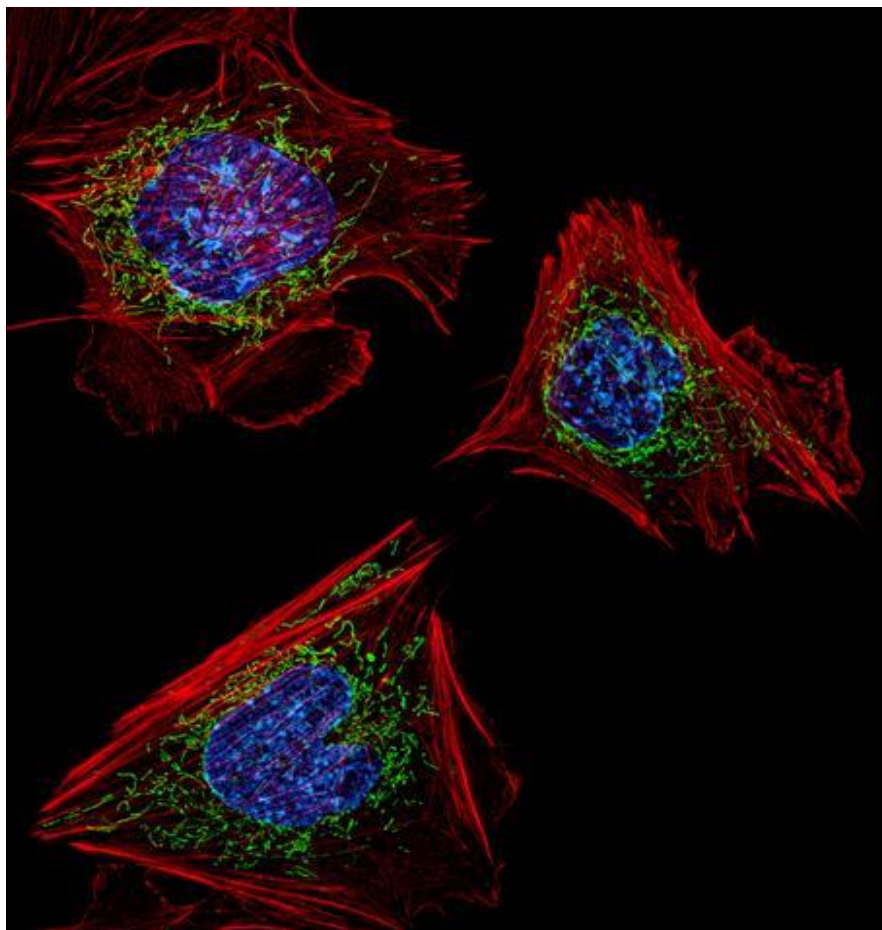


ФЛ - зонды - вводят в систему как индивидуальные вещества

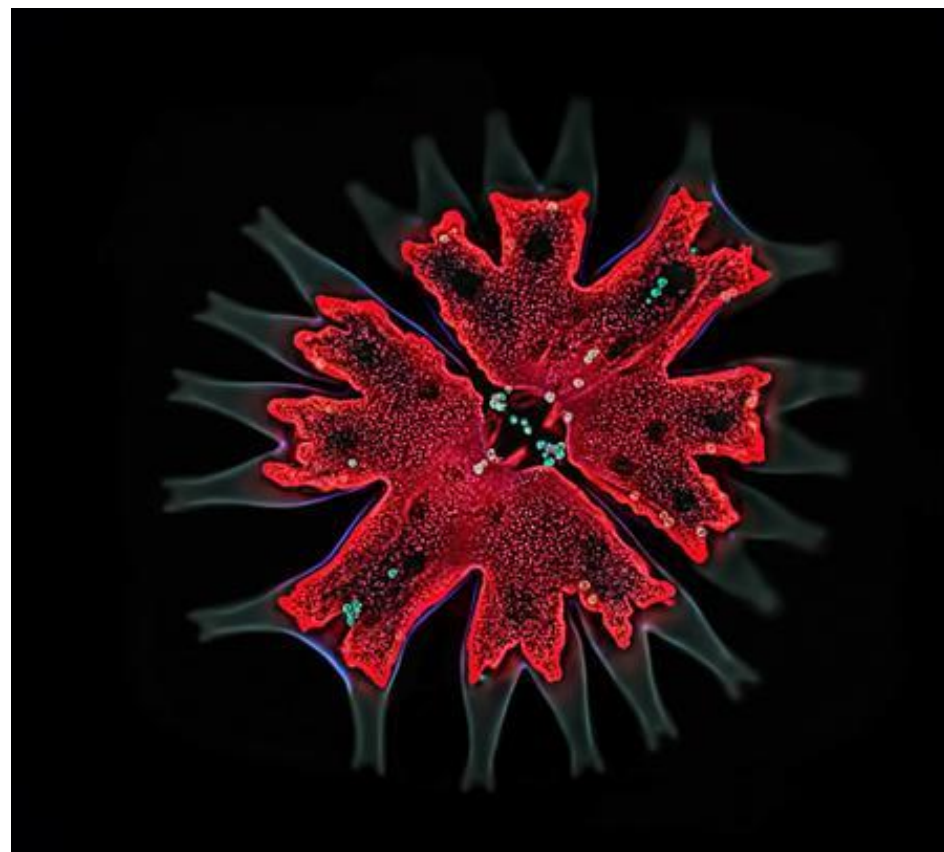
ФЛ - метки - ковалентно-присоединенный флуоресцентный компонент



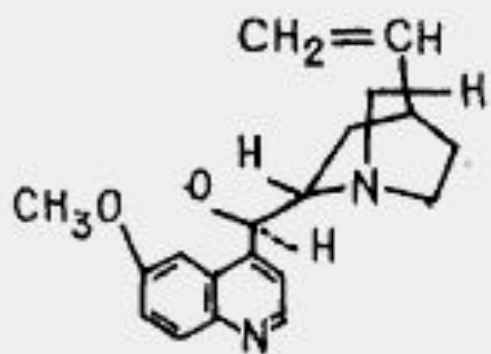
Microsterias furcata из
образца озерной
воды



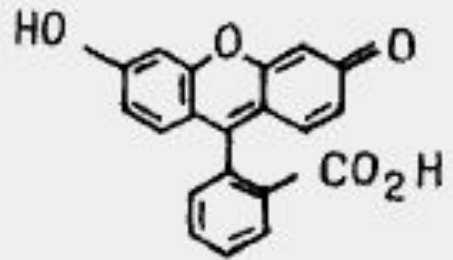
**Эмбриональные
фибробласты мышцы**
(Нити актина - красный,
митохондрии –зеленые и ДНК -
синяя)



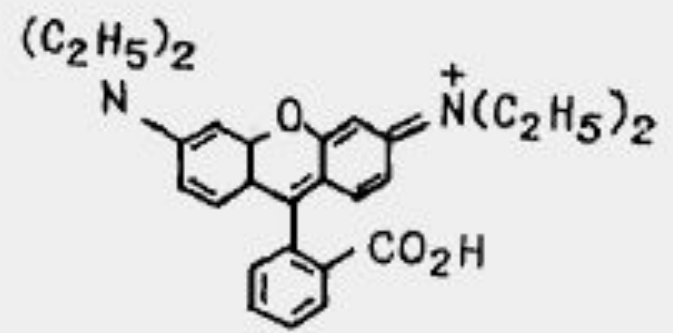
Структуры типичных флуоресцирующих соединений



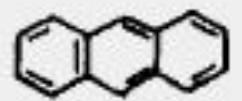
Хинин



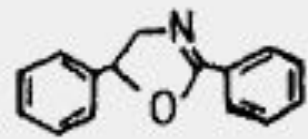
Флуоресцеин



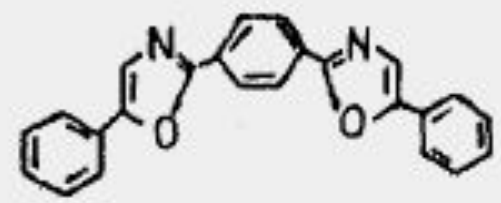
Родамин В



Антрацен



РРО



РОРОР



Параметры флуоресценции

1) **Спектры поглощения и ФЛ** – длины волн света, которые преимущественно поглощает и излучает вещество

Параметры спектра:

- Интенсивность ФЛ
- Положение максимумов
- Полуширина спектра

2) **Квантовый выход ФЛ** – эффективность трансформации поглощенной энергии в энергию излучения

Высвеченные фотоны

Поглощенные фотоны

Параметры флуоресценции

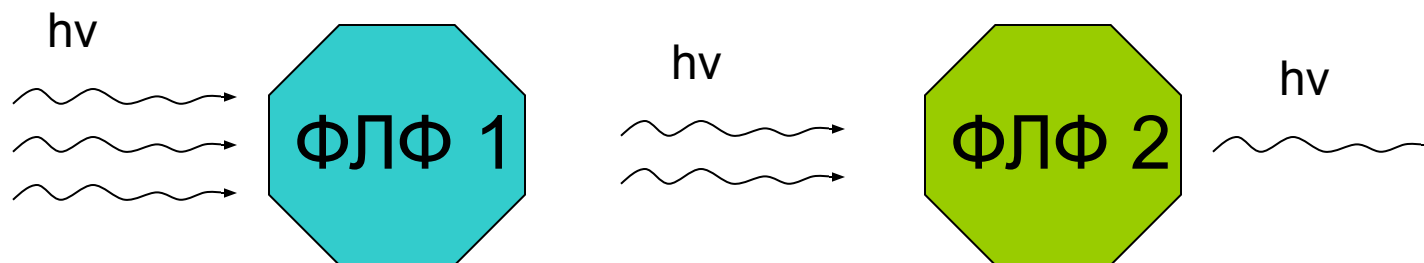


- 3) **Время жизни ФЛ** – усредненное время в течении которого молекулы флуорофоров находятся в возбужденном состоянии перед испусканием фотонов
- 4) **Анизотропия ФЛ** – количественная характеристика зависимости поляризации ФЛ поляризации возбуждающего света

Дополнительные информационные возможности ФЛР



5) Безызлучательная передача энергии



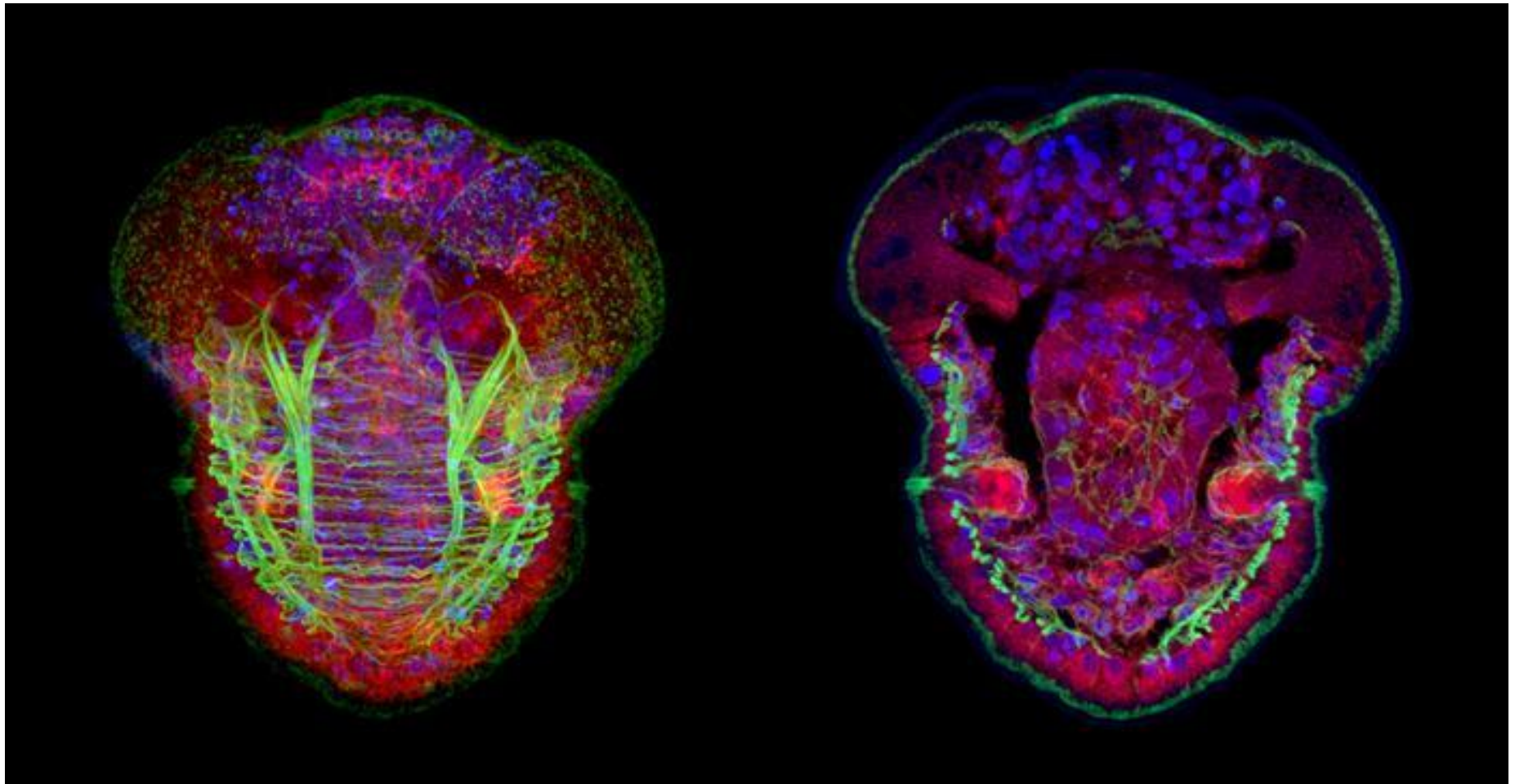
6) Тушение ФЛ

Молекулы – тушители:

кислород, галогены, электрондефицитные органические молекулы

**Морской червь *Phascolion cruratum*. Вид с нижней и
передней верхней поверхности.**

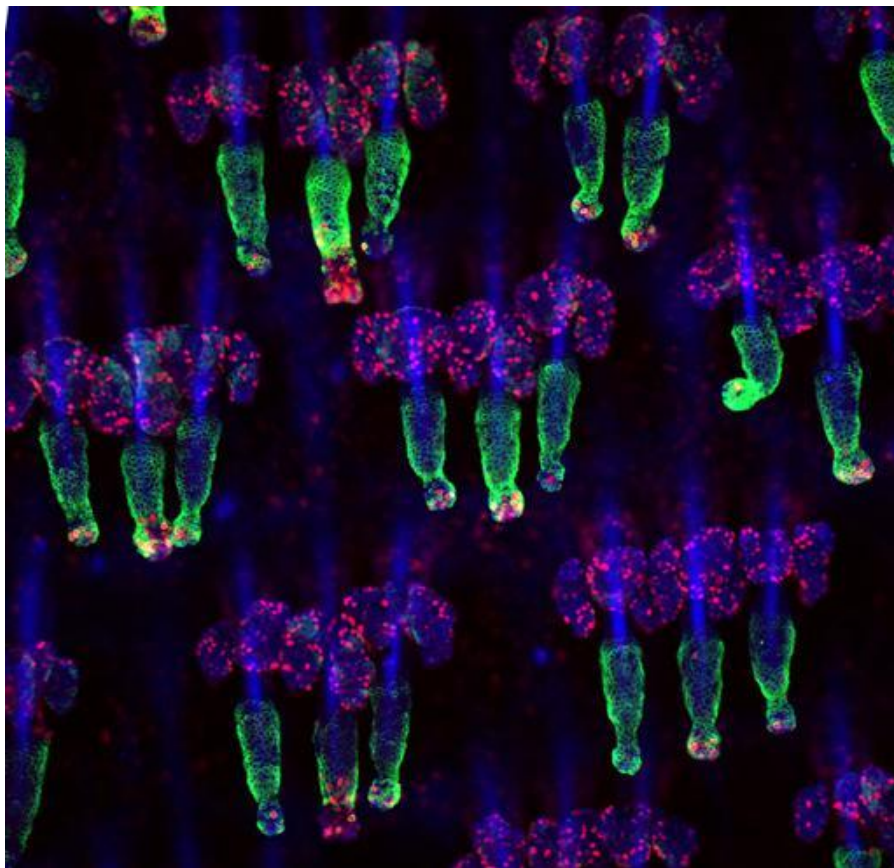
(Синий - ДНК; зеленый - мышцы; красные - белковые нити
внутри клеток)



● Спектры	-Сообщение о свойствах окружения, в котором находится ФЛ Р(pH)
● Квантовый выход	-Чувствительность к физико-химическим изменениям ФЛ Р
● Время жизни	- Чувствительность к физико-химическим изменениям ФЛ Р -Получение репортажа из одного образца от ФЛФ с похожими характеристиками без перекрывания сигнала
● Анизотропия	- Вращательная подвижность репортера(вязкость среды)
● БПЭ	- Выявление взаимодействия между молекулами и расстояния между ними
● Тушение	-Сообщение о присутствии тушителей - Сообщение о вязкости и диффузии цитоплазмы

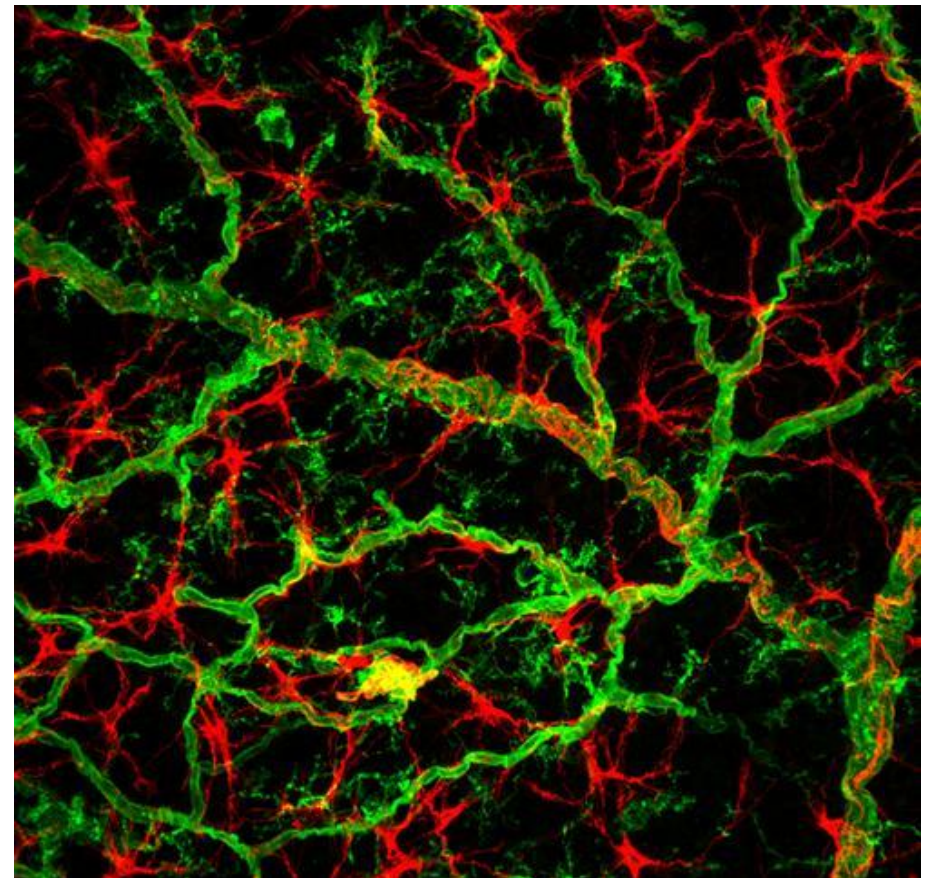
Белок-содержащие комплексы. Функции и особенности структуры.

Комплексы с белками	Примеры комплексов	Функция	Примеры белков и особенности их структуры
Углеводы	Комплекс лектин-рецептор	Клеточное узнавание	<i>Лектины</i> : субъединичные белки, каждая субъединица содержит один углевод связывающий центр; высокое содержание β -структуры
Липиды	Липопротеины свободные структурные	Структурная, транспортная и рецепторная функции клеточных мембран	<i>Интегральные белки</i> : наличие протяженных участков с высоким содержанием неполярных аминокислот; содержание α -спиралей 30–50%
Белки <i>гомокомплексы</i>	Субъединичные ферменты	Регуляция активности и стабильности ферментов	Наиболее распространены димерные и тетрамерные белки; сложно выделить в виде мономеров
<i>гетерокомплексы</i>	Комплекс антиген-антитело	Иммунная система	<i>Антитела</i> : комплекс Y- или T-образной формы, состоит из 4-х полипептидных цепей; содержит два F_{ab} фрагмента (связывание антигенов) и F_C фрагмент (связывание с мембраной). Цепи дыхательных и фосфорилирующих ферментов
Мультимерные системы (метабоны)	Мультиферментные системы (метабоны)	Последовательное протекание реакций метаболического пути	
Нуклеиновые кислоты	Нуклеопротеиды (рибосомы, информосомы, хроматин)	Хранение и реализация генетической информации	<i>Гистоны</i> : высокое содержание остатков Lys и Arg, отсутствие Trp. Вторичная структура: преобладают α -спирали. Третичная структура: C-концевая часть и N-концевая часть не структурированы и обогащены Lys и Arg
Синтетические ПЭ	Белок-ПЭ комплексы	Биокаталитическая, аналитическая	Белки являются полиамфолитами, содержат положительно и отрицательно заряженные группы, способны образовывать неспецифические комплексы электростатической природы с ПЭ
Олигоэлектролиты (ОА)		Регуляция активности и стабильности ферментов	АМФ-независимые протеинкиназы, аминоксил-тРНК-синтазы, неспецифические белки, содержащие доступные $-COO^-$ группы



**Стволовые и
пролиферирующие
клетки волосяного
фолликула хвоста
мышы**

**Слой нервных
волокон сетчатки
мышы**

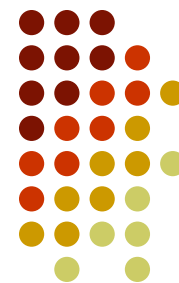


ФИЗИКО ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ БЕЛОК СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ В РАСТВОРЕ

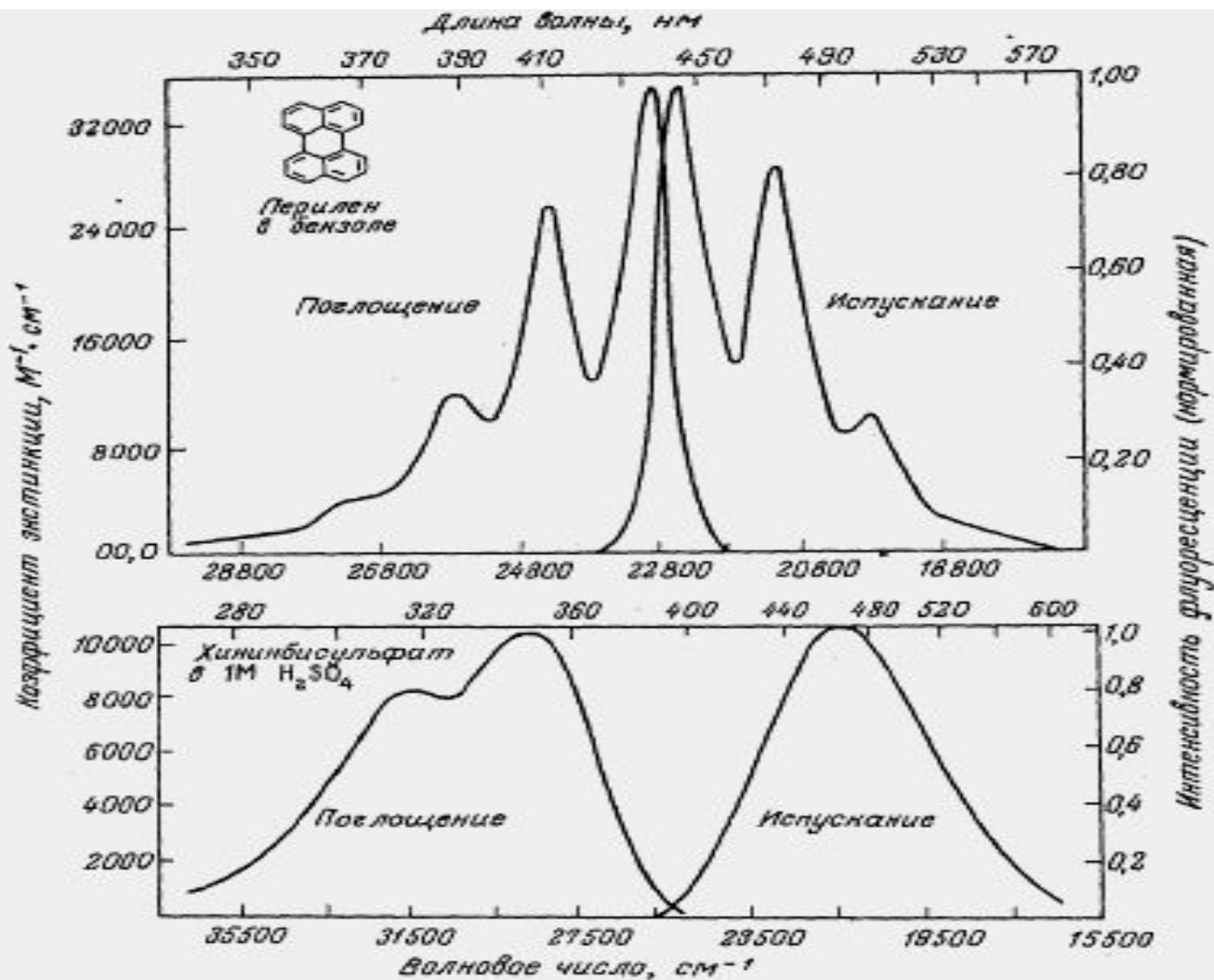


Физико-химические методы	Определяемые свойства
ДСК	Термодинамические параметры конформационных переходов в белках
ИК-спектроскопия	Вторичная структура белка:
область «амид 1»	<i>β-структура</i> 1628–1635 см ⁻¹ <i>α-спираль</i> 1652–1657 см ⁻¹
область «амид 2»	1521–1525 см ⁻¹ 1545–1551 см ⁻¹
Спектроскопия КД в дальней и ближней УФ области	Вторичная структура белка — дальняя УФ-область (185–260 нм) Третичная структура белка — ближняя УФ-область (260–340 нм)
Абсорбционная спектроскопия а) интегральная б) дифференциальная	Изменения в микроокружении хромофоров белка, агрегация
Флуоресцентные методы (схема 1)	Изменения в микроокружении флуоро-форов белка; вращательная динамика
Спектроскопия ЯМР	Пространственная структура белка в растворе, динамика.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

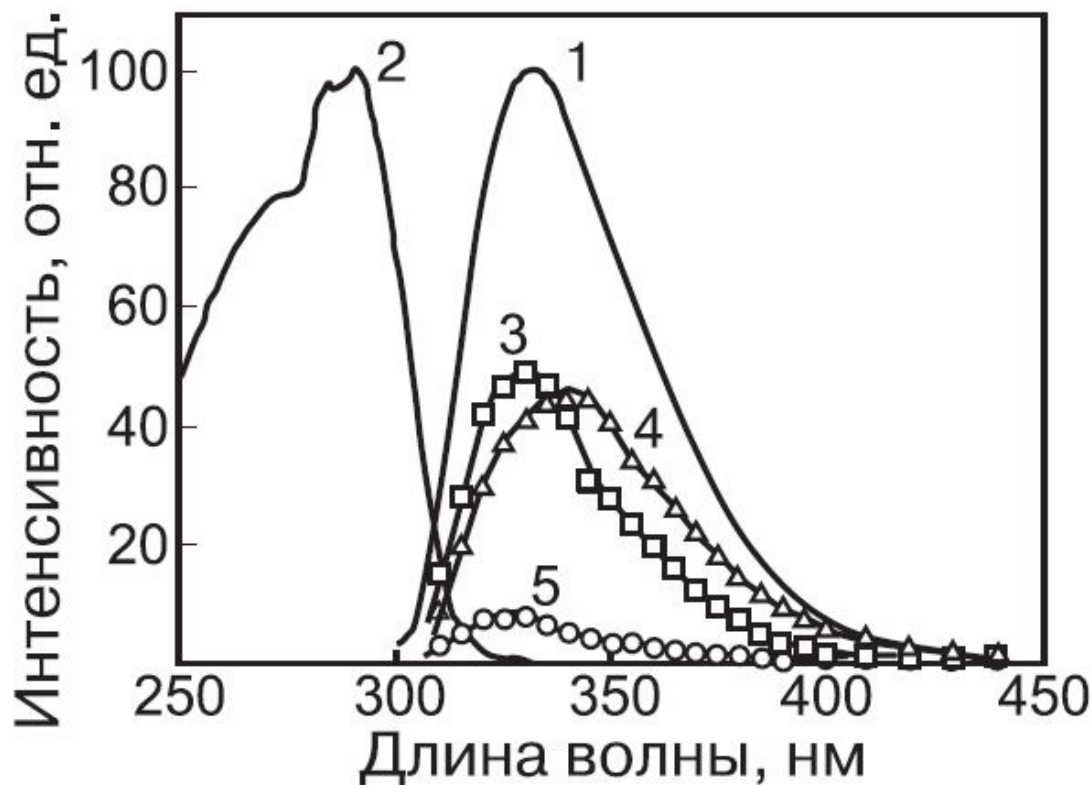


МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ



Спектры
поглощения
и
испускания
ФЛ
перилена
хинина

МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ



Спектр собственной флуоресценции альфа - химотрипсина (ХТ) (кривая 1). Длина волны возбуждения 296 нм. Теоретические спектры компонентов собственной флуоресценции ХТ (кривые 3–5), полученные путем деконволюции экспериментального спектра (кривая 1)

Кривая 2 – спектр возбуждения ХТ.

Методы тушения флуоресценции

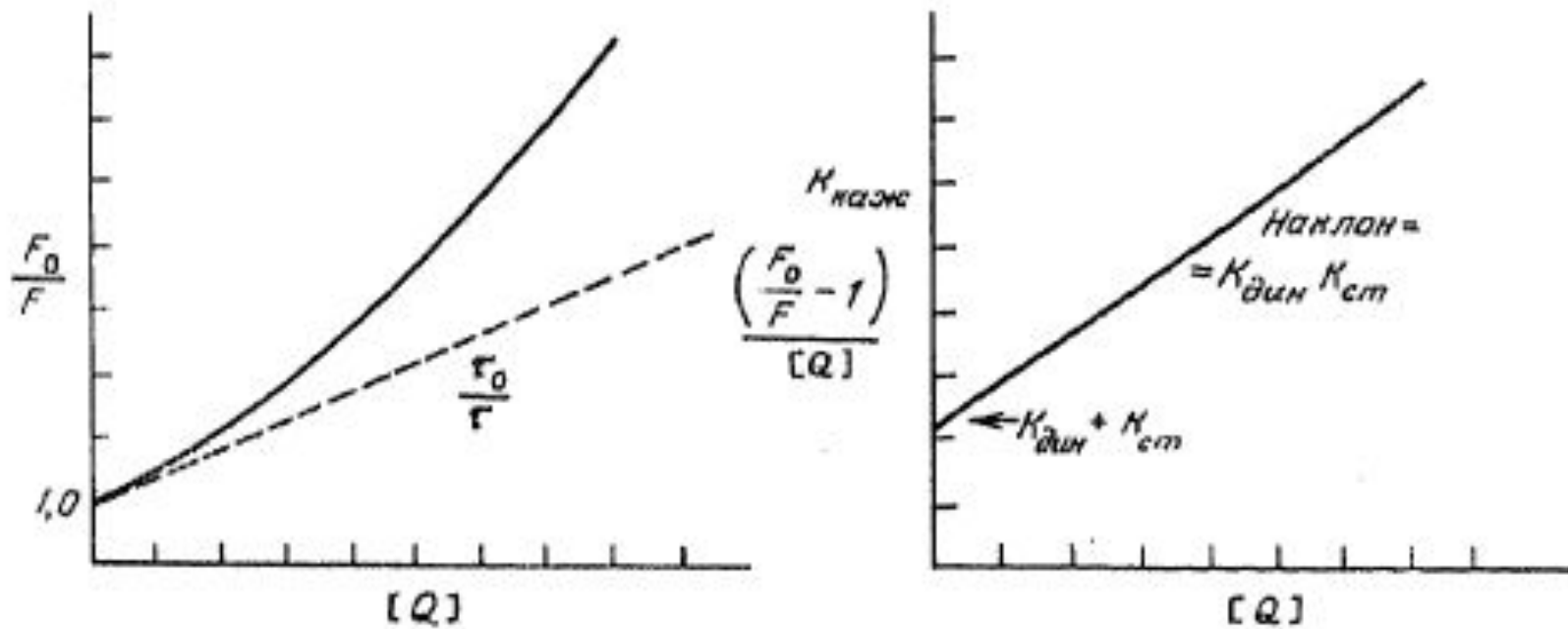
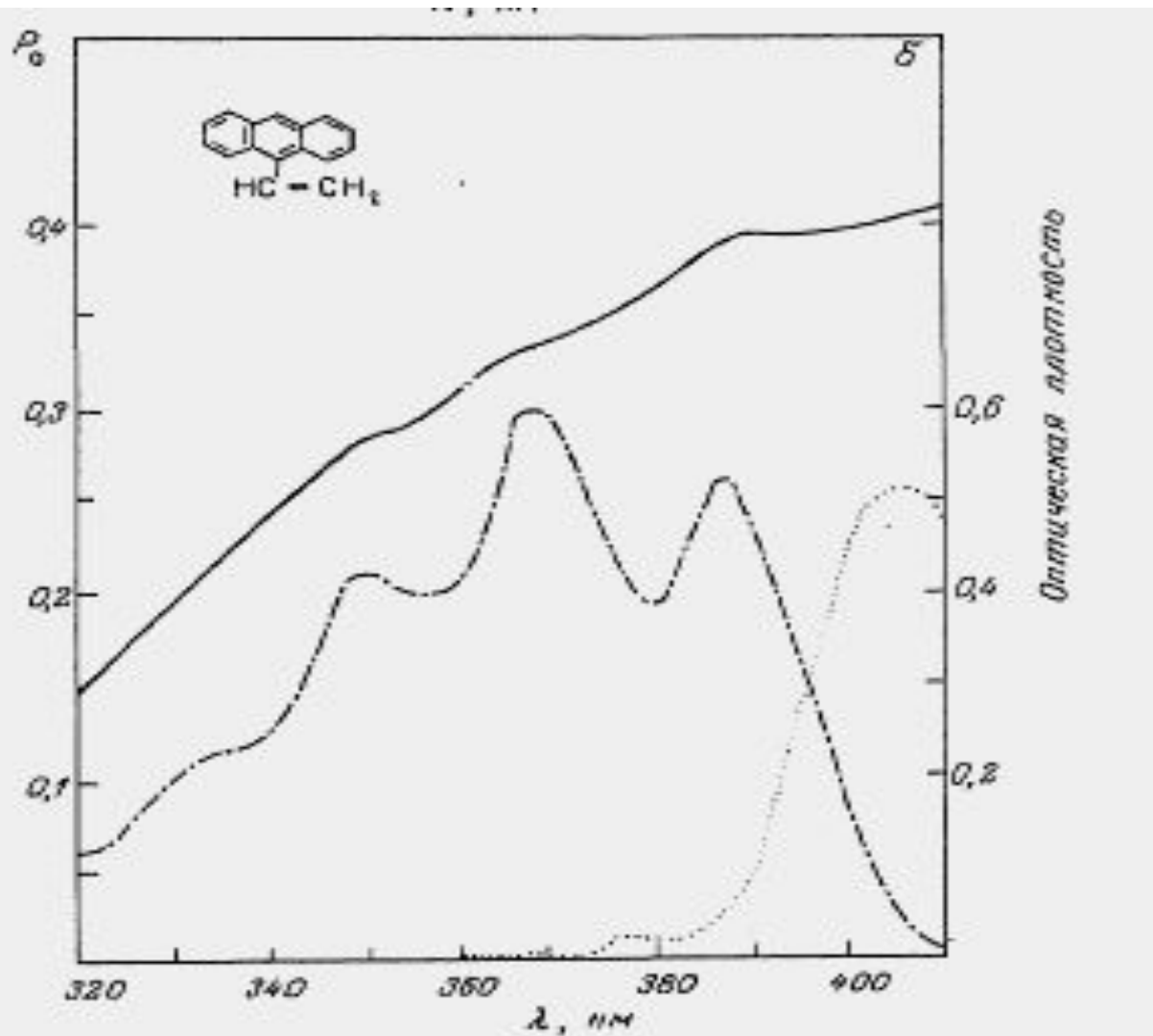
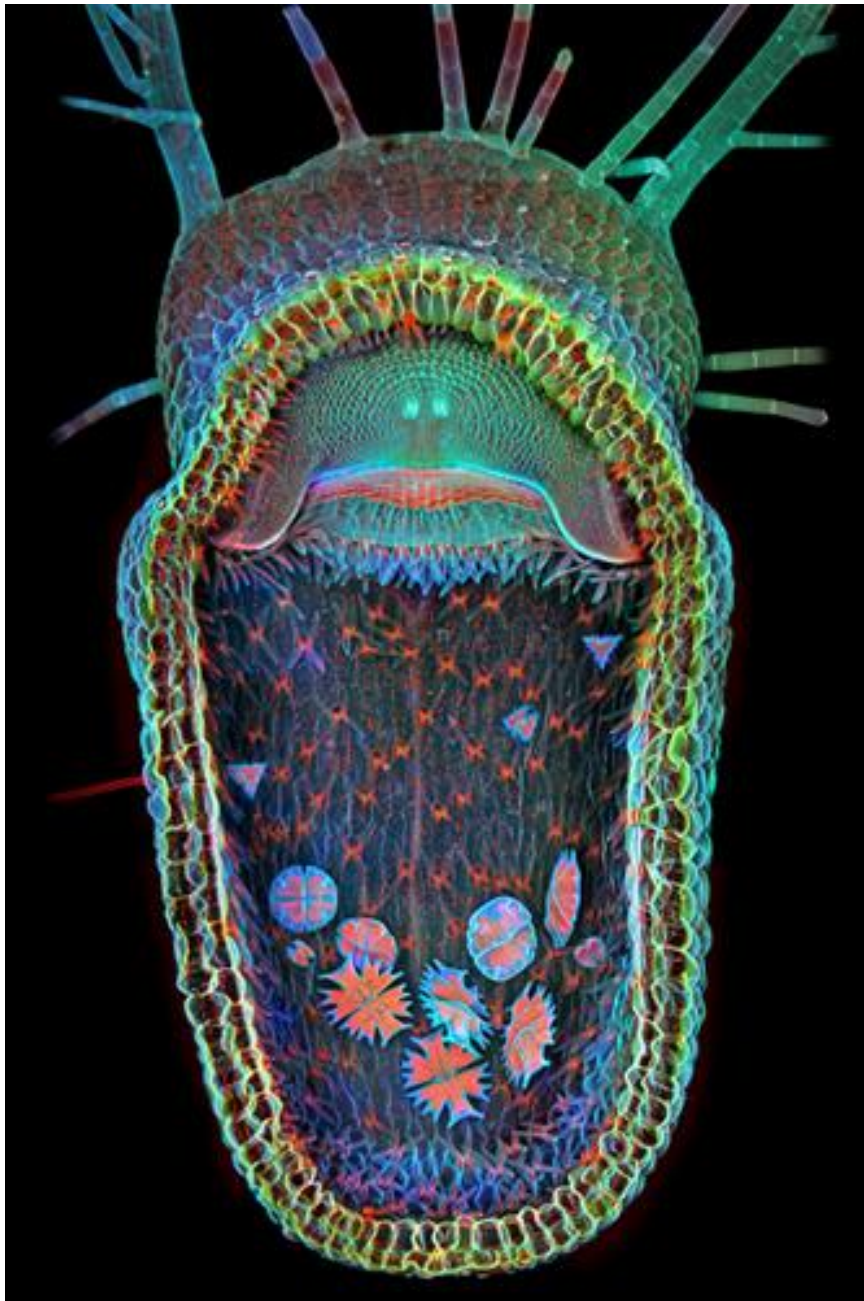


РИС. 9.2. Графические зависимости для смешанного динамического и статического тушения флуорофоров одного вида.

Флуоресцентная анизотропия

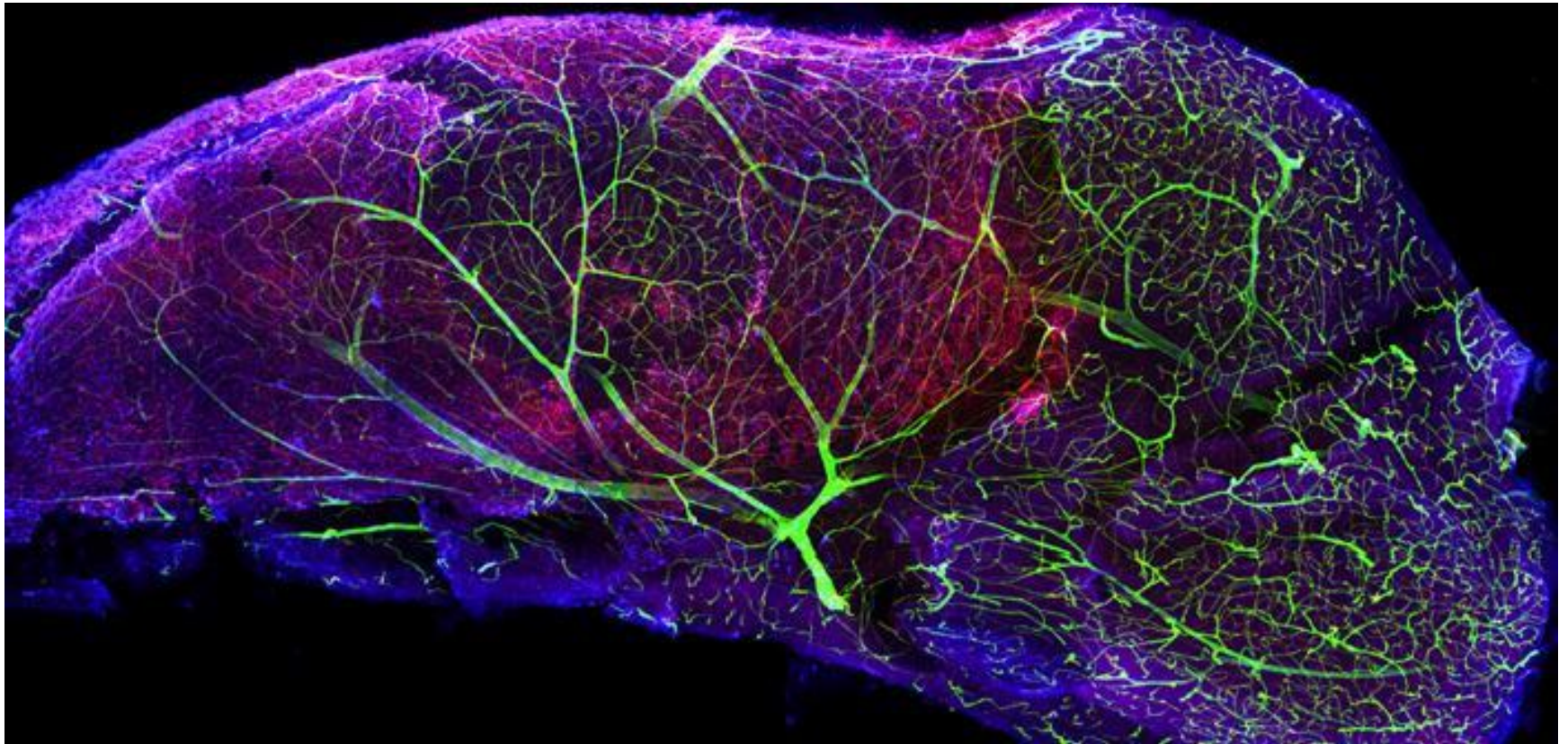


Спектры поляризации 9-винилантрацена в пропиленгликоле при -50°C



**Водное полотноядное
растение –горбатая
пузычатка *Utricularia
gibba* с одноклеточными
организмами внутри**

Спасибо за внимание!



Мозг мыши, субвентрикулярная зона, сеть кровеносных сосудов

МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Метод флуоресцентной спектроскопии является одним из наиболее распространенных для изучения физикохимических свойств биологических систем и, в частности, структуры белков. Этот метод позволяет следить за изменениями в микроокружении собственных флуорофоров белка или введенной флуоресцентной метки. Белки содержат три аминокислотных остатка, которые вносят основной вклад в собственную флуоресценцию белка (тирозин, фенилаланин и триптофан). Собственная флуоресценция большинства белков обусловлена, в первую очередь, триптофановыми остатками. Для селективного возбуждения остатков триптофана используется диапазон длин волн 295–305 нм, в котором поглощение тирозина и фенилаланина минимально. Флуоресцентные свойства триптофана крайне чувствительны к изменению его микроокружения, и главным образом, полярности. В соответствии с этим, комплексообразование с низкомолекулярными лигандами и макромолекулами, денатурация, агрегация и другие процессы существенным образом влияют на спектры флуоресценции белков. Например, при термоденатурации ХТ триптофановые остатки переходят из гидрофобных областей белка в полярное водное микроокружение. В результате этого максимум собственной флуоресценции белка сдвигается в сторону больших длин волн (от 333 до 340 нм), а интенсивность флуоресценции увеличивается в два раза. Следует учесть, что триптофан в свободном состоянии) характеризуется в водном растворе максимумом 354 нм. Высокая чувствительность метода (10⁻⁶–10⁻⁷ М по белку) позволяет исследовать разбавленные растворы, что важно при изучении структуры склонных к агрегации белков, а также в случае, когда необходимо следить за структурой фермента в условиях определения его каталитической активности (обычно это концентрации белка 10⁻⁶–10⁻⁷ М). Однако детальный анализ собственной флуоресценции белков затрудняется как обилием факторов, влияющих на флуоресценцию триптофана, так и наличием в белках нескольких остатков триптофана, различающихся микроокружением и степенью экспонированности. Спектры испускания остатков перекрываются во всем используемом диапазоне длин волн, в связи с чем крайне сложно разделить спектральные вклады каждого из них. Разделение вкладов триптофановых остатков в спектр флуоресценции белков. Установить спектральные вклады различных триптофановых остатков можно путем изучения кинетики затухания флуоресценции методом разрешенновременной флуоресцентной спектроскопии, позволяющим определить флуоресцентные времена жизни для каждого из триптофановых остатков, а также с помощью дифференциального метода анализа флуоресцентных спектров. Преимущество последнего метода состоит в существенно большем разрешении пиков по сравнению с интегральным спектром. Данный метод анализа спектров наиболее широко применяется в абсорбционной и ИК спектроскопии. На основе анализа пространственной структуры белка (из данных РСА) и данных по кинетике затухания флуоресценции (или динамического тушения флуоресценции) в спектре испускания осуществляют соотнесение флуоресцентных максимумов к индивидуальным триптофановым остаткам. Разделение спектра флуоресценции и идентификация индивидуальных триптофановых остатков основаны на предположении о влиянии микроокружения флуорофора на зависимость времени затухания от длины волны. Идентификация индивидуальных триптофановых остатков в спектрах флуоресценции позволяет получить детальную информацию об изменении структуры белка.

Методы тушения флуоресценции

Обычно рассматривают два вида тушения флуоресценции: статическое — связанное с образованием нефлуоресцирующего комплекса, и динамическое — связанное со случайными столкновениями между флуорофором и тушителем. Данные по тушению обычно представляют в координатах F_0/F (интенсивности флуоресценции, соответственно, в отсутствии и в присутствии тушителя) от $[Q]$ (концентрация тушителя), так как ожидается, что F_0/F должно линейно зависеть от концентрации тушителя. Линейная зависимость в координатах Штерна-Фольмера указывает на существование одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя. При тушении триптофановых остатков в белках полярными или заряженными тушителями, которые с трудом могут проникнуть внутрь белковой глобулы, экспериментальная кривая отклоняется от линейного вида. На этом основано использование метода динамического тушения для определения поверхностной доступности триптофановых остатков. Примером может являться исследование тушения флуоресценции триптофановых остатков люциферазы, Cs⁺ ионами и акриламидом. Тушение доступных остатков триптофана во многих случаях позволяет различить спектры испускания внутренних и внешних остатков.



Флуоресцентная анизотропия

При возбуждении поляризованным светом испускание флуоресцирующего образца также поляризовано. Поляризация является результатом флуктуации флуорофоров в соответствии с их ориентацией по отношению к направлению поляризованного возбуждения. Испускание может быть деполаризовано по ряду причин, относительная важность которых зависит от исследуемого образца. Вращательная диффузия флуорофоров – одна из общих причин деполаризации. Измерения поляризации или анизотропии выявляют среднее угловое смещение флуорофора, которое происходит между поглощением и последующим испусканием фотона. Оно зависит от скорости и степени вращательной диффузии за время жизни возбужденного состояния. Диффузионные движения в свою очередь зависят от вязкости растворителя и размеров и формы диффундирующих частиц. Например, для флуорофора, находящегося в растворе, скорость вращения зависит от вязкого сцепления, накладываемого на флуорофор растворителем. В результате изменение вязкости растворителя будет приводить к изменению анизотропии флуоресценции. Обнаружение зависимости анизотропии флуоресценции от вращательной диффузии привело к многочисленным применениям этого метода в биохимических исследованиях. В качестве примера отметим, что измерение анизотропии флуоресценции использовалось для количественной оценки денатурации и реакций ассоциации белков с лигандами, изучения скорости вращения белков. Кроме того, на основе анизотропии мембранно-связанных флуорофоров были установлены внутренняя вязкость мембран и влияние состава мембран на их фазовые переходы.

В этой главе будут описаны основы теории стационарных измерений анизотропии флуоресценции и приведены избранные примеры применения метода в биохимии. В следующей главе мы рассмотрим теорию и применение кинетических измерений анизотропии флуоресценции.

Существует несколько причин деполаризации (уменьшения анизотропии), среди которых основной является вращательная диффузия флуорофоров. Таким образом, величину флуоресцентной анизотропии определяет скорость вращательной диффузии флуорофора во время жизни его возбужденного состояния. Взаимосвязь между экспериментально определяемой флуоресцентной анизотропией, флуоресцентным временем жизни и скоростью вращательной диффузии флуорофора устанавливается уравнением Перрена. Данная взаимосвязь лежит в основе использования методов измерения флуоресцентной анизотропии в биохимических исследованиях. Измерение анизотропии флуоресценции используется для количественной оценки денатурации и реакций ассоциации белков с лигандами [131], для изучения комплексообразования с макромолекулами: связывание антигена с антителом, ассоциация белков [109]. При комплексообразовании существенно меняются размер, пространственная структура и подвижность сегментов макромолекулы, которые сопровождаются изменением флуоресцентной анизотропии. Приведем несколько примеров исследования белоксодержащих комплексов методом стационарной анизотропии.