

---

**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ  
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

---

УДК 577.352; 535.37

© А. Г. Варехов

**ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ СУСПЕНЗИЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ (ОБЗОР)**

В статье рассматривается флуоресценция как метод исследования суспензий биологических частиц (бактериальных клеток, митохондрий, хлоропластов, липосом и др.). Приводятся выражения для расчета мембранного потенциала, трансмембранного градиента pH и плотности поверхностного заряда частиц. Рассматриваются новые направления флуоресцентных исследований, в том числе технологии, основанные на процессах миграции энергии возбуждения в биологическом материале. Рассмотрены многочисленные FRET-сенсоры, предназначенные для таких технологий, и особенности их использования.

Кл. сл.: мембранный потенциал, градиент pH, поверхностный заряд, FRET-сенсоры

**ВВЕДЕНИЕ**

В широко известной монографии [1] отмечается главное достоинство флуоресцентных методов исследования биологических мембран — разнообразие получаемой информации при стандартном наборе аппаратных средств и методических приемов. В последние несколько десятилетий, однако, это положение существенно изменилось. Во-первых, существенно расширился круг задач, в которых целесообразно использование флуоресцентных методов. Во-вторых, появились новые методы флуоресцентных исследований. В-третьих, существенно выросли количество и специализация используемых красителей (зондов). В целом наблюдается радикальное увеличение сфер применения флуоресцентных методов и исследовательских приемов. Остаются существенными такие классические задачи, как применение гидрофобных зондов (пирен, перилен) для исследования липидного бислоя; измерения трансмембранного потенциала и трансмембранного градиента pH (такие зонды, как АНС или 9-аминоакридин) и другие задачи. Однако появились такие специфические задачи, как исследование фрагментов протеинов и ДНК, исследование генетически кодируемых белков, метаболических потоков металлов (например,  $Zn^{2+}$ ) использование комплексов, содержащих переходные металлы ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и др.). В последнее время началось массовое использование лантанидных комплексов, являющихся донорами электронов для органических флуорофоров, в том числе флуоресцентных белков, включая генетически кодируемые белки. Разработано множество флуоресцентных сенсоров с использованием лантанидов и комплексов переходных металлов.

Считается [2], что флуоресцентные исследования частиц биологического происхождения (бактериальных клеток, митохондрий, хлоропластов, липосом и др.) начались с работы [3] по измерению с использованием цианинового красителя DiS-C<sub>3</sub>-(5) (дипропилтиадикарбоцианин) трансмембранного потенциала клеток, митохондрий и везикул. Немного позже были выполнены измерения концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  с использованием флуоресцирующего кальциевого индикатора Fura-2 (на основе аминополикарбоксильной кислоты) [4]. На сегодня номенклатура красителей постоянно растет, а технологические приемы флуоресцентных исследований становятся все более разнообразными. При связывании красителя с мембранами клеток или частиц принципиальными являются две проблемы.

Первая из них относится непосредственно к механизму адсорбции красителя и его проникновения в мембрану и связывания с мембранными структурами. Эти процессы определяются электрофизическими условиями на поверхности (зарядом и потенциалом), а также и химическим сродством красителя к поверхности и к мембранному матриксу. Обе эти задачи объединяются в одно целое при исследовании мембранных ионных каналов. Для эффективного связывания красителей с поверхностью частиц используются гибридные технологии (fluorescent in-situ hybridization, FISH), т. е. использование различных факторов физического или химического характера, способствующих связыванию. Например, при окрашивании конидий грибов *A. niger* диамидинофенилиндолом связывание возрастало при совместном действии красителя с комбинацией, содержащей Triton X-100, ЭДТА и β-меркаптоэтанол [5]. Окрашивание препаратов грибов *A. fumigatus* и *P. brevicompac-*

*tum* возрастало при микроволновом облучении [6]. Тушение флуоресценции 9-аминоакридина при связывании его с липосомами, приготовленными из растительных липидов, увеличивалось при добавлении фосфатидиловой кислоты [7].

Вторая проблема сводится к вопросу о том, как изменяется квантовый выход флуоресценции при связывании и насколько далеко без значительных потерь мигрирует энергия делокализованного возбуждения в неоднородном биологическом материале. Эта проблема разрешается либо поглощением (с потерями) энергии возбуждения и тушением флуоресценции, либо переносом энергии возбуждения и переизлучением в относительно длинноволновой части спектра. Для гетерогенных систем, какими являются суспензии биологических частиц, в этих процессах наиболее существенны свойства границ раздела, прежде всего поверхностей разделяющих мембран, а также двойных электрических слоев, существующих на границах раздела или во внутреннем объеме мембран.

Использование переноса энергии возбуждения, известного как фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) [2, 7], получило широкое распространение в разнообразных направлениях, которые будут рассмотрены ниже.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Приведем несколько имеющих практическую ценность примеров использования флуоресценции как измерительного средства при исследованиях биокolloидов.

В стационарном состоянии измеряемая интенсивность флуоресценции определяется выражением

$$F = Q_1 C_1 V_{in} + Q_2 C_2 (V_{tot} - V_{in}), \quad (1)$$

где  $Q_1, Q_2$  — квантовые выходы флуоресценции связанного и несвязанного красителей соответственно;  $C_1, C_2$  — соответствующие концентрации;  $V_{in}$  — объем внутреннего (осмотического) компартмента, т. е. внутренний объем частиц, окруженных бесконечно тонкой оболочкой;  $V_{tot}$  — общий объем исследуемой пробы. Поскольку начальная интенсивность флуоресценции инкубационной среды (до добавления частиц) определяется равенством

$$F_0 = Q_2 C_0 V_{tot}, \quad (2)$$

то из (1) и (2) изменение уровня флуоресценции в относительных единицах дается соотношением

$$q = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{Q_2 C_0 V_{tot} - Q_1 C_1 - Q_2 C_2 (V_{tot} - V_{in})}{Q_2 C_0 V_{tot}}. \quad (3)$$

Кроме того, выполняется условие, показывающее сохранение числа молекул красителя, т. е.

$$C_1 V_{in} + C_2 (V_{tot} - V_{in}) = C_0 V_{tot},$$

или

$$C_1 p + C_2 (1 - p) = C_0,$$

где  $p = V_{in}/V_{tot}$  доля объема, занятого частицами.

Для относительного изменения уровня флуоресценции в более общем виде получим вместо (3):

$$q = \frac{Q_2 C_0 - Q_1 C_1 p - Q_2 C_2 (1 - p)}{Q_2 C_0}. \quad (5)$$

Решая теперь (4) и (5) совместно, получим выражения для обеих концентраций  $C_1$  и  $C_2$ , выраженные через начальную концентрацию красителя  $C_0$ , т. е.

$$C_1 = C_0 \frac{Q_2 q}{p(Q_2 - Q_1)}; \quad C_2 = C_0 \frac{Q_1 - Q_2(1 - q)}{(1 - p)(Q_1 - Q_2)}. \quad (6)$$

Рассмотрим три практически важных случая.

1. Для измерения трансмембранного градиента pH хлоропластов и бактериальных хроматофоров использовались, начиная с работы [9], положительно заряженные в нейтральной среде аминокислотные производные акридина (диаминоакридин (атебрин), а также моноамины 9-аминоакридин и 9-ацетамидоакридин). При связывании с частицами имеет место тушение флуоресценции, хотя квантовый выход флуоресценции несвязанного красителя невелик (для атебрина при pH 7.0 равен 0.04). Для таких измерений наиболее удобным оказался слабо взаимодействующий с частицами 9-аминоакридин, содержащий два атома азота, один из которых, принадлежащий кольцу (пиридин), имеет значение  $pK_1 = 9.99$ , т. е. значительно более высокое, чем внешнее значение pH, а второй (азот аминокислотной группы) —  $pK_2 < -2$ , т. е. гораздо меньшее, чем внешнее значение pH, и тем более меньшее, чем внутреннее значение pH. Таким образом, в интервале pH от 6 до 9 почти все молекулы 9-аминоакридина протонированы. Считается [1], что движущей силой поверхностного связывания положительно заряженных акридинов на отрицательно заряженной поверхности частиц является не мембранный потенциал, а именно трансмембранный градиент pH. Это означает, что от-

ношение концентраций  $C_1$  и  $C_2$  определяется отношением концентраций протонов в обоих компартментах и может быть заменено отношением концентраций протонов, т. е.

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2},$$

откуда с учетом соотношений (6) следует выражение для трансмембранного градиента pH в виде

$$\Delta pH = \lg \frac{C_1}{C_2} = \lg \frac{qQ_2(1-p)(Q_1-Q_2)}{p(Q_2-Q_1)[Q_1-Q_2(1-q)]}. \quad (7)$$

Таким образом, на основании (7) можно по измеренному значению  $q$  и при известных заранее  $p, Q_1$  и  $Q_2$  рассчитать  $\Delta pH$ . Если не принимать во внимание внутренний объем частиц по сравнению с объемом пробы, т. е. считать, что  $p \ll 1$ , то выражение (7) упрощается:

$$\Delta pH = \lg \frac{qQ_2(Q_1-Q_2)}{p(Q_2-Q_1)[Q_1-Q_2(1-q)]}.$$

Для слабо взаимодействующего с частицами 9-аминоакридина можно, кроме того, считать, что  $q \ll 1$ . Наконец, квантовый выход красителя в растворе значительно больше квантового выхода связанного красителя, т. е.  $Q_2 \gg Q_1$ . Тогда получаем приближенное выражение

$$\Delta pH \cong \lg(q/p),$$

тождественное выражению

$$\Delta pH = \lg \frac{F_0 - F}{F} + \lg \frac{V}{v} = \lg \frac{\Delta F}{F(V/v)},$$

полученному для суспензии хлоропластов [10]. Линейная (в диапазоне значений pH 6–8) зависимость уровня тушения флуоресценции от концентрации частиц является доказательством верности теории. Флуоресценция акридина и его производных интересна для изучения процесса эксимеризации, признаком которой служит большая величина стоксовского сдвига. Образование эксимеров в целом типично для ароматических углеводов. В частности, образование слоистых эксимероподобных H-, J-агрегатов акридинов может быть использовано для производства светоизлучающих диодов и дисплеев цифровой настройки [11].

2. Для измерения трансмембранной разности потенциалов целесообразно использовать флуоресцентный зонд, наименее чувствительный к изменениям трансмембранного градиента pH, одна-

ко квантовый выход которого существенно возрастает при связывании с липидным содержимым мембран. Этим условиям удовлетворяет анилино-нафталинсульфонат (АНС), квантовый выход которого в воде мал (0.0004), однако возрастает при связывании с липидным бислоем (до значения 0.29 при связывании с бислоем из димиристоиллецитина [1]). Считается, что амфифильные зонды, и в том числе АНС, локализуются на поверхности раздела мембрана—растворитель. В случае АНС также предполагается, что водородная связь NH-группы (связка нафталинового ядра с анилином) с водой стабилизирует нефлуоресцирующий конформер зонда.

Обращаясь к выражениям (6) для концентраций связанной с частицами и свободной частями красителя, получаем при использовании уравнения Нернста выражение для трансмембранной разности потенциалов

$$\Delta \varphi_m = k_\varphi \ln \frac{Q_2 q (1-p)(Q_1-Q_2)}{p(Q_2-Q_1)[Q_1-Q_2(1-q)]},$$

где  $k_\varphi = k_B T / e = 25.7 \text{ мВ}$  ( $T = 300 \text{ К}$ ). При условиях  $p \ll 1$  и  $Q_2 \ll Q_1$ , а также при учете того, что  $\Delta F = |F_0 - F|_{(F_0 < F)}$  и соответственно замене  $q \rightarrow |q|$ , из общего выражения получаем упрощенное выражение

$$\Delta \varphi_m = k_\varphi \ln \frac{|q|}{p},$$

аналогичное (с точностью до множителя  $k_\varphi$ ) выражению для  $\Delta pH$ .

## ИЗМЕРЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ЗАРЯДА ЧАСТИЦ

Тушение флуоресценции 9-аминоакридина как результат электростатического взаимодействия катионов красителя с отрицательно заряженной поверхностью мембран тилакоидов и липосом из фосфатидилсерина было использовано [12] для измерения поверхностного заряда и поверхностного потенциала. Вычисления на основе модели Гюи—Чапмена—Штерна (GCS) показали максимальную плотность заряда  $\sigma = 0.16 \text{ Кл/м}^2$  (1 элем. заряд на  $100 \text{ \AA}^2$ ). Расчеты по данным, полученным при использовании других (нефлуоресцентных) техник [13], показали значение  $\sigma = 0.25 \text{ Кл/м}^2$ . Максимальная плотность отрицательного поверхностного заряда для бислоя на основе фосфатидилсерина, определяющая число

центров связывания для одновалентных катионов, оценивалась [14] величиной  $\sigma_{\max} = 0.23 \text{ Кл/м}^2$ . Потенциометрические измерения [15] с использованием селективного мембранного электрода также позволили рассчитать поверхностную плотность заряда клеток *E. coli*, равную в этом случае  $\sigma = 0.07 \text{ Кл/м}^2$  (1 элем. заряд на  $225 \text{ \AA}^2$ ).

Отмечалось [7] фундаментальное противоречие, состоящее в том, что, хотя флуоресцентные измерения отражают заряд и потенциал поверхности, расчет строился на использовании GCS-модели, что не вполне корректно, поскольку эта модель отражает штерновский и электрокинетический потенциалы, но не потенциал, непосредственно существующий на мембранной поверхности. Таким образом, для точного расчета заряда и потенциала необходимо развитие модели.

### РАЗВИТИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FRET-СЕНСОРОВ

Поглощение электромагнитной энергии и флуоресценция как реакция биологического материала носит статистический характер, т. е. приводит к возбуждению многих осцилляторов, принадлежащих некоторой протяженной области.

Первый порядок в квантовой теории возмущений основан, как известно, на представлении о резонансном характере энергетических электронных переходов. Резонансный характер передачи поглощенной энергии электромагнитного поля наиболее точно проявляется в фотосинтетических системах [16]. Однако в теории нелинейных динамических систем, к которым относятся и биологические системы, принято рассматривать квазирезонансный характер реакции системы. Это означает, что хотя наблюдаемый флуоресцентный ответ имеет частоты, не совпадающие с собственными частотами связанных колебательных звеньев биологической среды, реакция этой среды, т. е. стокова линейная флуоресценция, находится в согласии (когерентна) с частотой колебательного воздействия.

При возбуждении электромагнитным полем вероятность перехода электронов квантовой системы из исходного состояния (i) в континуум состояний (f) определяется выражением (золотое правило Ферми)

$$W_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} |M_{if}|^2 \rho_f,$$

где  $M_{if}$  — матричный интеграл взаимодействия волновых функций;  $\rho_f$  — плотность конечных состояний в расчете на единицу энергии. Таким образом, введение сенсорных групп равносильно увеличению заселенности энергетических уровней.

FRET-технология основана, как известно [1], на кулоновском ван-дер-ваальсовом взаимодействии (индукционном притяжении) в цепочках "диполь—индуцированный диполь" с энергией взаимодействия таких пар  $U = -\chi d_1^2 / 2\pi\epsilon_0 r^6$  ( $d_1$  — дипольный момент постоянного диполя;  $\chi$  — поляризуемость индуцированного диполя  $d_{\text{ind}}$ ;  $r$  — расстояние между диполями). Из выражения для энергии взаимодействия следует, что FRET-технологии представляют собой очень чувствительный инструмент для оценки расстояний. FRET-сенсор использовался, например [17], для оценки расстояния между боковой цепью флуорофора и цинк-связывающим белком при изучении конформационных изменений в месте связывания.

Вероятность переноса энергии возбуждения в функции расстояния  $R$  остается почти единичной для малых расстояний, а затем с увеличением расстояния монотонно падает (с точкой перегиба) до нуля. Радиус Фёрстера  $R_0$ , Å, определяющий 50 %-ю вероятность, записывается в виде [18]

$$R_0 = 9.79 \cdot 10^3 (k^2 \cdot Q_D \cdot J \cdot n^{-4})^{1/6},$$

где  $Q_D$  — квантовый выход донора;  $0 \leq k^2 \leq 4$  — фактор ориентации связки "диполь—индуцированный диполь";  $n$  — показатель преломления инкубационной среды;  $J$  — нормированный интеграл перекрытия спектров эмиссии донора и поглощения акцептора

$$J = \frac{\int F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \nu^{-4} d\nu}{\int F_D(\nu) d\nu},$$

где  $\epsilon_A$  — молярная экстинкция акцептора, определяемая из спектра поглощения;  $\nu$  — волновое число.

Расчеты фёрстеровского радиуса достаточно хорошо согласуются с экспериментальными наблюдениями. Например, вычисления [18] для нафтилдансила ( $\alpha$ -naphthyl-dansyl) при  $k^2 = 2/3$  (диполи, принадлежащие донору и акцептору, вращаются с частотой поля);  $n = 1.4$ ;  $J = 4.4 \cdot 10^{-15} \text{ см}^6/\text{ммоль}$  дают значение радиуса Фёрстера  $R_0 = 27.2 \text{ \AA}$ . Наблюдаемое значение при этом равно  $R_0 = 34.6 \text{ \AA}$ .

Для случая сильного перекрытия орбиталей (малое расстояние между донором и акцептором) Декстер [19] получил соотношение для константы скорости передачи энергии возбуждения  $k_{\text{ET}}$  в виде

$$k_{\text{ET}} \sim e^{-2R/L} \int_0^\infty F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) d\nu,$$

где  $R = R_{\text{ДА}}$  — расстояние между донором и акцептором. Этот процесс в отличие от классического фёрстеровского диполь-дипольного переноса энергии, протекает по обменному (специфически квантовому или туннельному) механизму чаще всего на расстоянии 10–15 Å. При этом энергия возбуждения распространяется по сети ковалентных и водородных связей, которые намного сильнее, чем диполь-дипольные. Вероятность туннельного переноса электрона быстро падает с увеличением расстояния. Прямые вычисления можно показать, что прозрачность для электронов прямоугольного барьера уменьшается примерно в 1000 раз при увеличении ширины барьера (длины туннелирования) от 5 до 20 Å. Экспоненциальный множитель в последнем соотношении указывает, вообще говоря, на быстрое убывание энергии возбуждения при увеличении расстояния между донором и акцептором. Однако отмечено [20] тушение триплетной флуоресценции антраценакрилата посредством переноса энергии возбужденного донора  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (трисбипиридинрутений) на расстояние 90 Å. Дикатион метилвиологен ( $\text{MV}^{2+}$ ) использовался как ловушка в цепочке сенсibilизированного переноса электронов, что и приводило к тушению флуоресценции. Для расчета было использовано среднее значение эффективного радиуса низшей электронной орбиты донора, равное  $L = 11.2$  Å. Простой расчет экспоненциального множителя показывает ослабление энергии в  $10^7$  раз. Однако дальнедействующий перенос энергии возможен, если удастся найти донорно-акцепторные пары, действующие по обменному механизму.

Рассмотрим далее перенос энергии (электронов) при флуоресцентном зондировании в терминах диффузии и туннелирования, как это принято для детального анализа химической кинетики [21].

Сопоставление экспериментальных данных позволяет сделать следующие выводы: если расстояние  $R_{\text{ДА}}$  мало (2–5 Å), т. е. в случае сильного перекрытия орбиталей, характер процесса переноса близок к туннельному и в предельном случае — резонансному. Если же расстояние  $R_{\text{ДА}}$  относительно велико (20–100 Å) и соответствует радиусу Фёрстера, то процесс передачи имеет характер диффузии на расстояние, соответствующее тушению или переизлучению в относительно длинноволновой части спектра. Однако и в этом случае диффузионный процесс передачи электрона можно рассматривать как многоступенчатую (multistep [18]) последовательность туннельных переходов по близко расположенным квантовым точкам. Диффузионный перенос электронов в твердом теле постулирован достаточно давно для объяснения

малой подвижности ( $\ll 1 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ ) носителей (электронов). Это породило, в частности, сначала концепцию перескоковой подвижности, а затем и представление о многоступенчатом туннелировании по дискретным квантовым точкам.

Известно, например, [1], что коэффициент поступательной диффузии для пирена в липосомальных мембранах равен  $D = 4 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ . Удвоенный радиус пирена (размер диффундирующей частицы) составляет около 10 Å. Тогда микровязкость  $\eta$ , определяемая из формулы Стокса—Эйнштейна  $D = k_B T / 6\pi\eta R_s$  (где  $k_B$  — постоянная Больцмана,  $R_s$  — эффективный радиус частицы), оказывается равной примерно 0.06 Па·с (0.6 пуаз).

Пусть теперь радиус Фёрстера составляет  $R_0 = 100$  Å, что соответствует толщине мембраны, а донорный и акцепторный центры расположены по обе стороны мембраны. Тогда можно вычислить время жизни возбужденного состояния, исходя из известного соотношения  $\bar{x}^2 = 2Dt$ . Примем, как и раньше, коэффициент диффузии равным  $D = 4 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ . Тогда необходимое для трансмембранного перемещения зонда время жизни возбужденного состояния должно составлять около  $10^{-5}$  с. Однако в большинстве случаев и для большинства зондов это время оценивается в пределах  $10^{-9} - 10^{-6}$  с, и, следовательно, рассчитанное время оказывается недостаточным. Если же принять время жизни равным  $t = 100$  нс, то коэффициент диффузии должен быть равным не менее  $D = 0.5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ , а размер диффундирующей частицы, рассчитанный по формуле Стокса—Эйнштейна, не более 0.06 Å. Таким образом, в отношении наблюдения и измерения трансмембранных эффектов имеются существенные трудности. Исключения составляют, как уже отмечалось выше, технологии с использованием сенсоров с обменным взаимодействием.

Еще одна возможность связана с использованием сенсоров на основе лантанидных хелатов, для которых характерны большое время жизни возбужденных состояний ( $10^{-6} - 10^{-3}$  с) и большой, как и следует ожидать, стоксовский сдвиг.

С другой стороны, близкодействующий (туннельный) перенос энергии и электронов может быть эффективно использован для измерений граничных потенциалов или потенциалов двойных электрических слоев. В частности, это относится к проблеме измерения дипольного потенциала мембран, который описывается иногда как принципиально неизмеримый.

Процессы передачи энергии возбуждения становятся эффективными при наличии в среде ис-

точников экзогенных электронов от таких органических соединений, как ЭДТА и аскорбиновая кислота, или от неорганических (металлических) ионов ( $Me^{n+}$ ), встроенных в FRET-сенсоры.

Металл-содержащие FRET-сенсоры активно используются для изучения клеточной биологии металлов, например цинка. Такой сенсор при отсутствии металла функционирует как тушитель возбуждения. В одной из работ [23] отмечается, что в первых вариантах сенсоров использовались цинковые хелаты на основе иминодиацетата (IDA) или дипикколиламина (DPA), возбуждаемые в УФ-диапазоне и имеющие невысокий квантовый выход и плохую растворимость в воде. Однако сенсоры нового поколения на основе бисхинолина (две связанные хинолиновые группы) давали 40-кратное увеличение эмиссии при незначительной зависимости от параметров среды.

Металл-содержащие FRET-сенсоры на основе лантанидов также применяются очень широко [24]. Лантанидный комплекс (чаще всего на основе  $Eu^{3+}$  или  $Tb^{3+}$ ) используется как донор электрона, а акцептором служит огромное разнообразие органических флуорофоров, включая белки и, в частности, генетически кодируемые белки.

Поскольку молярная экстинкция лантанидов очень мала (в десятки тысяч раз меньше молярной экстинкции большинства органических флуорофоров), для увеличения чувствительности используются соединения металла с органическим сенситизатором ( $\beta$ -дикетонат, салициловые альдегиды, в частности фенантролин для  $Eu^{3+}$ ). Сенситизатором не только для лантанидов, но также для переходных и благородных металлов использовался [25] нафталин, причем присутствие в водной среде отрицательно заряженных нитчатых мицелл из додецилсульфата натрия приводило к тушению сенситизированной нафталином флуоресценции.

Для лантанид-содержащих хелатов характерны большое время жизни возбужденных состояний ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  с) и большой стоксовский сдвиг, что позволяет исключить короткоживущую (наносекундную) автофлуоресценцию (например, флавиновых и пиридиновых компонентов). Наконец, радиус Фёрстера для лантанидных хелатов составляет 20–90 Å, т. е. приближается к толщине мембраны.

Для получения флуоресцентного ответа строится двухступенчатый молекулярный механизм переноса энергии, первой ступенью которого является сенситизированный комплекс металла, а второй ступенью — комплекс, содержащий лантанид-связанный короткий (не более 20 аминокислот) пептид и, наконец, крупный функциональный белок.

## ТЕКУЩИЕ ЗАДАЧИ

Одна из главных проблем флуоресцентного исследования сводится к доставке сенсора в гидрофобный мембранный матрикс.

Номенклатура мембранных липофильных зондов достаточно велика. В детальном обзоре [26] липофильные зонды, предназначенные для исследования липидных рафтов, делятся на два класса. Первый из них образуют красители (например, диалкилоксакарбоданин), имеющие длинноцепочечные углеводородные хвосты (tails), подобные липидным хвостам; второй класс образуют полициклические ароматические углеводороды, одни из которых (террилен, нафтопирен) предпочтительно располагаются, подобно холестерину, между липидами упорядоченной фазы (liquidordered), другие (перилен, рубицен) не имеют предпочтительной локализации (ordered/disordered). Однако, как отмечает автор обзора и что наиболее существенно для флуоресцентного зондирования, сенсоры, ассоциированные с мембранными липидами, нечувствительны (blind) по отношению к мембранным белкам, если только при этом не используются FRET-технологии, т. е. перенос энергии возбуждения. При этом именно мембранные белки (транспортные белки и белки системы трансформации энергии) представляют наибольший интерес. Поэтому соединение липофильности и чувствительности к мембранным белкам считается актуальным предметом ближайших исследований.

Материал статьи показывает, что флуоресцентное зондирование суспензий коллоидных частиц различного происхождения и различной природы не только продолжает оставаться одним из самых плодотворных инструментов исследований, но постоянно обогащается новыми методами и приемами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
2. Lemke E.A., Schultz C. Principles for designing fluorescent sensors and reporters // *Nature Chemical Biology*. 2011. Vol. 7, no. 8. P. 480–483. Doi: 10.1038/nchembio.620.
3. Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1979. Vol. 8. P. 47–68. Doi: 10.1146/annurev.bb.08.060179.000403.
4. Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. P. 2396–2404. Doi: 10.1021/bi00552a018.
5. Villa F., Cappitelli F., Principi P., Polo A., Sorlini C. Permeabilization method for in-situ investigation of fun-

- gal conidia on surfaces // *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 48, no. 2. P. 234–240. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02520.x.
6. *Prigione V., Marchisio V.F.* Methods to maximise the staining of fungal propagules with fluorescent dyes // *J. of Microbiol. Methods.* 2004. Vol. 59, no. 3. P. 371–379. Doi: 10.1016/j.mimet.2004.07.016.
  7. *Brauer D.K., Yermiyahu U., Ritwo G., Kinraide T.B.* Characteristics of the quenching of 9-aminoacridine fluorescence by liposomes from plant lipids // *J. membrane Biol.* 2000. Vol. 178. P. 43–48. Doi: 10.1007/s002320010013.
  8. *Selvin P.R.* The renaissance of fluorescence resonance energy transfer // *Nature Structural and molecular Biology.* 2000. Vol. 7, no. 9. P. 730–734. Doi: 10.1038/78948.
  9. *Kraajenhof R.* Quenching of uncoupler fluorescence in relation on energized state in chloroplasts // *FEBS Letters.* 1970. Vol. 6. P. 161. Doi: 10.1016/0014-5793(70)80047-3.
  10. *Schuldiner Sh., Rottenberg H., Avron M.* Determination of  $\Delta$  pH in chloroplasts. Fluorescent amines as a probe for the determination of  $\Delta$  pH in chloroplasts // *Eur. J. Biochem.* 1972. Vol. 25. P. 64–70. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb01667.x.
  11. *Рожкова Ю.А.* Исследование водородных связей акридина в различных агрегатных состояниях. Автореф. дис. ... к. ф.-м. н. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014.
  12. *Chow W.S., Barber J.* 9-aminoacridine fluorescence changes as a measure of surface charge density of the thylakoid membrane // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1980. Vol. 589, no. 2. P. 346–352. Doi: 10.1016/0005-2728(80)90050-X.
  13. *Jain M.K., Wagner R.C.* Introduction to biological membranes. Wiley and Sons, NY, 1980. 36 p.
  14. *Ермаков Ю.А.* Биоэлектрохимия бислойных липидных мембран // *Российский химический журнал.* 2005. Т. 49, № 5. С. 114–120.
  15. *Варехов А.Г.* Потенциометрические измерения трансмембранного потенциала клеток с использованием проникающих ионов // *Научное приборостроение.* 2015. Т. 25, № 1. С. 27–35. URL: <http://213.170.69.26/mag/2015/full1/Art3.pdf>.
  16. *Engel G.S., Calhoun T.R., Read E.L. et al.* Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems // *Nature.* 2007. Vol. 446. P. 782–786. Doi: 10.1038/nature05678.
  17. *Qiao W., Mooney M., Bird A.J., Winge D.R., Eide D.J.* Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, no. 6. P. 8674–8679. Doi: 10.1073/pnas.0600928103.
  18. *Stryer L., Haugland R.* Energy transfer: a spectroscopic ruler // *Proc. Natl. Acad. USA.* 1967. Vol. 58. P. 719–726. Doi: 10.1073/pnas.58.2.719.
  19. *Dexter D.L.* A theory of sensitized luminescence in solids // *J. Chem. Phys.* 1953. Vol. 21. P. 836–850. Doi: 10.1063/1.1699044.
  20. *Ito A., Stewart D.J., Zhang Fang, Brennaman M.K., Meyer Th.J.* Sensitization of ultra-long-range excited-state electron transfer by energy transfer in a polymerized film // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109, no. 38. P. 15132–15135. Doi: 10.1063/1.1699044.
  21. *Воробьев А.Х.* Диффузионные задачи в химической кинетике. М.: Изд-во МГУ, 2003. 75 с.
  22. *Gray H.B., Winkler J.R.* Long-range electron transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, no. 10. P. 3534–3539. Doi: 10.1073/pnas.0408029102.
  23. *Tomat E., Lippard S.J.* Imaging mobile zinc in biology // *Current Opinion in Chemical Biology.* 2010. Vol. 14, no. 2. P. 225–230. Doi: 10.1016/j.cbpa.2009.12.010.
  24. *Жердева В.В., Савицкий А.П.* Применение лантанидного индуктивно-резонансного переноса энергии при изучении биологических процессов invitro // *Успехи биологической химии.* 2012. Т. 52. С. 315–362.
  25. *Silva A.F., Fiedler H.D., Nome F.* Ionic quenching of naphthalene fluorescence in sodium dodecyl sulfate micelles // *J. Phys. Chem. A.* 2011. Vol. 115, no. 12. P. 2509–2514. Doi: 10.1021/jp109759f.
  26. *Klymchenko A.S.* Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells // *Chemistry and Biology.* 2014. Vol. 21, no. 1. P. 97–113. Doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.009.

**Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения**

Контакты: Варехов Алексей Григорьевич,  
varekhov@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 11.03.2016

## FLUORESCENT PROBING OF BIOLOGICAL PARTICLES SUSPENSIONS

A. G. Varekhov

*Saint-Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, Russia*

The article considered fluorescence as a method of research of biological particles suspensions (bacterial cells, mitochondrions, chloroplasts, liposomes and others). The expressions for calculation of membrane potential, a transmembrane gradient of pH and density of a surface-bound charge of particles are given. The new directions of fluorescent researches, including the technologies based on processes of excitation energy migration in biological material are considered. There have been discussed the numerous *FRET*-sensors intended for such technologies, and feature of their use.

**Keywords:** membrane potential, *pH* gradient, surface-bound charge, *FRET*-sensors

### REFERENCES

- Vladimirov Yu.A., Dobrezov G.E. *Fluoreszentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membran* [Fluorescent probes in research of biological membranes]. Moscow, Nauka Publ., 1980. 320 p. (In Russ.).
- Lemke E.A., Schultz C. Principles for designing fluorescent sensors and reporters. *Nature Chemical Biology*, 2011, vol. 7, no. 8, pp. 480–483. Doi: 10.1038/nchembio.620.
- Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1979, vol. 8, pp. 47–68. Doi: 10.1146/annurev.bb.08.060179.000403.
- Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, pp. 2396–2404. Doi: 10.1021/bi00552a018.
- Villa F., Cappitelli F., Principi P., Polo A., Sorlini C. Permeabilization method for in-situ investigation of fungal conidia on surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 48, no. 2, pp. 234–240. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02520.x.
- Prigione V., Marchisio V.F. Methods to maximise the staining of fungal propagules with fluorescent dyes. *J. of Microbiol. Methods*, 2004, vol. 59, no. 3, pp. 371–379. Doi: 10.1016/j.mimet.2004.07.016.
- Brauer D.K., Yermiyahu U., Ritwo G., Kinraide T.B. Characteristics of the quenching of 9-aminoacridine fluorescence by liposomes from plant lipids. *J. Membrane Biol.*, 2000, vol. 178, pp. 43–48. Doi: 10.1007/s002320010013.
- Selvin P.R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2000, vol. 7, no. 9, pp. 730–734. Doi: 10.1038/78948.
- Kraajenhof R. Quenching of uncoupler fluorescence in relation on energized state in chloroplasts. *FEBS Letters*, 1970, vol. 6, pp. 161. Doi: 10.1016/0014-5793(70)80047-3.
- Schuldiner Sh., Rottenberg H., Avron M. Determination of  $\Delta$  pH in chloroplasts. Fluorescent amines as a probe for the determination of  $\Delta$  pH in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, 1972, vol. 25, pp. 64–70. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb01667.x.
- Rozhkova Yu.A. *Issledovanie vodorodnykh svyazey akridina v razlichnykh agregatnykh sostoyaniyakh*. Autoref. diss. kand. f.-m. nauk. [Research of hydrogen communications of acridin in various aggregate states. Cand. diss.]. Saint-Petersburg, 2014 (In Russ.).
- Chow W.S., Barber J. 9-aminoacridine fluorescence changes as a measure of surface charge density of the thylakoid membrane. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1980, vol. 589, no. 2, pp. 346–352. Doi: 10.1016/0005-2728(80)90050-X.
- Jain M.K., Wagner R.C. *Introduction to biological membranes*. Wiley and Sons, NY, 1980. 36 p.
- Ermakov Yu.A. [Bioelectrochemistry bisloynnykh of lipidic membranes]. *Rossiyskiy himicheskij zhurnal* [Russian chemical magazine], 2005, vol. 49, no. 5, pp. 114–120 (In Russ.).
- Varekhov A.G. [Electrometric measurements of transmembrane potential of cages with use of the getting ions]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 1, pp. 27–35. Doi: 10.18358/np-25-1-i2735 (In Russ.).
- Engel G.S., Calhoun T.R., Read E.L. et al. Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems. *Nature*, 2007, vol. 446, pp. 782–786. Doi: 10.1038/nature05678.
- Qiao W., Mooney M., Bird A.J., Winge D.R., Eide D.J. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 6, pp. 8674–8679. Doi: 10.1073/pnas.0600928103.
- Stryer L., Haugland R. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1967, vol. 58, pp. 719–726. Doi: 10.1073/pnas.58.2.719.
- Dexter D.L. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.*, 1953, vol. 21, pp. 836–850. Doi: 10.1063/1.1699044.
- Ito A., Stewart D.J., Zhang Fang, Brennaman M.K., Meyer Th.J. Sensitization of ultra-long-range excited-state

- electron transfer by energy transfer in a polymerized film. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 38, pp. 15132–15135. Doi: 10.1063/1.1699044.
21. Vorob'ev A.H. *Diffuzionnye zadachi v himicheskoy kine-tike* [Diffusive tasks in chemical kinetics]. Moscow, MGU Publ., 2003. 75 p. (In Russ.).
22. Gray H.B., Winkler J.R. Long- range electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 10, pp. 3534–3539. Doi: 10.1073/pnas.0408029102.
23. Tomat E., Lippard S.J. Imaging mobile zinc in biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, vol. 14, no. 2, pp. 225–230. Doi: 10.1016/j.cbpa.2009.12.010.
24. Zherdeva V.V., Savickij A.P. [Application of lanthanide inductive and resonant transfer of energy when studying biological processes of invitro]. *Uspekhi biologicheskoy himii* [Achievements of biological chemistry], 2012, vol. 52, pp. 315–362 (In Russ.).
25. Silva A.F., Fiedler H.D., Nome F. Ionic quenching of naphthalene fluorescence in sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Phys. Chem. A*, 2011, vol. 115, no. 12, pp. 2509–2514. Doi: 10.1021/jp109759f.
26. Klymchenko A.S. Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chemistry and Biology*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 97–113. Doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.009.

Contacts: *Varekhov Aleksey Grigor'evich*,  
varekhov@mail.ru

Article received in edition: 11.03.2016