

09.1;14

Поляризованная флуоресценция молекул NADH при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 720–780 nm

© М.Э. Сасин¹, И.А. Горбунова¹, Н.О. Безверхний¹, Я.М. Бельтюков¹, J. Rubayo-Soneira², О.С. Васютинский¹¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия² Atomic and Molecular Department, Havana University, Havana, Cuba

E-mail: sasin@ffm.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 25 марта 2019 г.

В окончательной редакции 25 марта 2019 г.

Принято к публикации 3 апреля 2019 г.

Исследовано затухание поляризованной флуоресценции молекул кофермента NADH в водном растворе метанола при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами в диапазоне длин волн 720–780 nm. На основе полученных сигналов определены времена затухания τ_1 и τ_2 , время вращательной диффузии τ_{rot} , а также отношение предэкспоненциальных коэффициентов a_2/a_1 . Проведено сравнение с результатами, полученными ранее для водного раствора молекул NADH.

Ключевые слова: поляризованная флуоресценция, NADH, аденин, никотинамид, спектроскопия, время-корреляционный анализ.

DOI: 10.21883/PJTF.2019.13.47956.17803

Никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD) в восстановленной (NADH) и окисленной (NAD^+) формах является внутриклеточным коферментом, участвующим в процессах переноса электронов в реакциях клеточного метаболизма. Ввиду важной роли NAD в функционировании клетки особый интерес у исследователей вызывают оптические свойства обеих его форм [1,2]. Известно, что NADH обладает двумя пиками поглощения в районе длин волн 260 и 360 nm, соответствующих поглощению хромофоров аденина и никотинамида, и полосой флуоресценции с максимумом в районе 460 nm, а окисленная форма NAD^+ имеет только один максимум поглощения на длине волны 260 nm и не флуоресцирует [1].

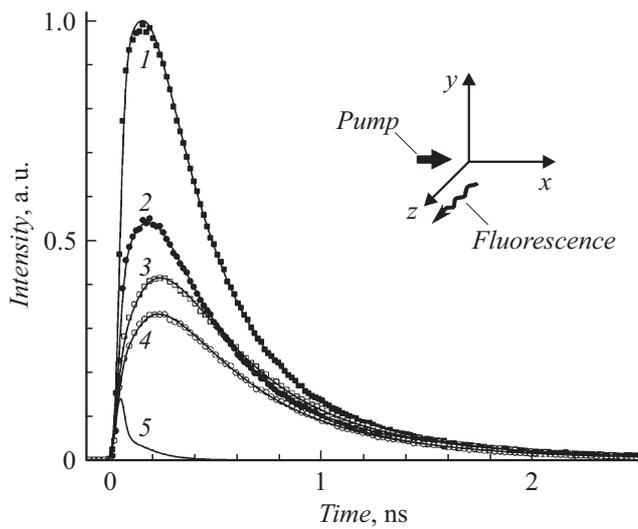
Одним из наиболее эффективных методов исследования биомолекул является изучение их поляризованной флуоресценции при двухфотонном возбуждении [3,4]. Этот метод в течение многих лет служит одним из важнейших инструментов исследования структуры и динамики возбужденных состояний многоатомных молекул, в том числе в биологических структурах [5–8]. В нашей группе была развита квантово-механическая теория молекулярной флуоресценции, возникающей при двухцветном двухфотонном (2C2P) возбуждении многоатомных молекул, основанная на методе сферических тензоров, который был успешно применен для решения ряда задач молекулярной динамики [9–12].

Известно, что затухание поляризованной флуоресценции NADH в растворах описывается суммой трех экспонент с временами затухания τ_1 и τ_2 , а также временем вращательной диффузии τ_{rot} [13,14], величины которых лежат в субнаносекундном диапазоне. Природа этого затухания до сих пор была изучена недостаточно. Также известно, что параметр анизотропии, описывающий

поляризацию излучения флуоресценции, существенно зависит от полярности и вязкости раствора [14].

В настоящей работе исследовано затухание поляризованной флуоресценции молекул NADH в водном растворе метанола при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами в диапазоне длин волн 720–780 nm. На основе полученных сигналов поляризованной флуоресценции определены времена затухания τ_1 и τ_2 , время вращательной диффузии τ_{rot} , а также отношение предэкспоненциальных коэффициентов a_2/a_1 . Проведено сравнение с результатами, полученными ранее для водного раствора молекул NADH [13].

Схема экспериментальной установки, которая применялась в настоящей работе, была в основном подобна схеме, использованной нами ранее [13]. В качестве источника возбуждения использовался титан-сапфировый лазер (Mai Tai HP, Spectra Physics), перестраиваемый в диапазоне длин волн 720–780 nm, с длительностью импульсов 100 fs и частотой повторения 80 MHz. Около 2% выходного излучения лазера отщеплялось с помощью делительной пластины и направлялось в тракт системы синхронизации, состоявшей из аттенюатора, фокусирующей линзы и быстродействующего кремниевого фотодиода. Основной пучок излучения лазера расширялся до диаметра 4 mm и затем пропускался через систему контроля поляризации, состоящую из двух последовательно расположенных фазовых пластин $\lambda/2$ и $\lambda/4$. В экспериментах использовалась либо линейная, либо циркулярная поляризация возбуждающего излучения. Лазерный пучок фокусировался линзой в центр кварцевой кюветы, содержащий раствор NADH. Средняя мощность лазерного излучения, сфокусированного на кювете, составляла 100 mW. В исследованиях использо-



Сигналы затухания поляризованной флуоресценции, полученные при двухфотонном возбуждении поляризованным излучением лазера с длиной волны 720 nm. Время $t = 0$ соответствует моменту возбуждения. Кривые поясняются в тексте.

вался водный раствор метанола с концентрацией 43%. Соль NADH в растворе имела концентрацию 1 mM. Исследования проводились при комнатной температуре.

Излучение флуоресценции собиралось линзой в пучок, перпендикулярный направлению луча лазера. Этот пучок флуоресценции пропусклся через спектральный фильтр с полосой пропускания 410–490 nm и разделялся поляризационной призмой Глана на два пучка со взаимно ортогональными поляризациями вдоль осей x и y . Сигнал флуоресценции для каждой компоненты поляризации регистрировался одновременно двумя лавинными фотодиодами (APD-050-СТС, MPD) с полушириной аппаратной функции около 56 ps, работавшими в режиме счета фотонов. Импульсы с выхода фотодиодов обрабатывались системой счета фотонов с временной корреляцией (PicoHarp 300, PicoQuant) с частотой дискретизации 4 ps и временем экспозиции 350 s.

В эксперименте использовалось семь значений длин волн возбуждающего излучения в диапазоне 720–780 nm, для которых были получены сигналы затухания компонент флуоресценции с поляризациями вдоль осей x и y . При этом использовались линейная поляризация возбуждающего излучения, направленная вдоль осей y или z , или левциркулярная поляризация.

Сигналы поляризованной флуоресценции, полученные при двухфотонном возбуждении на длине волны 720 nm, а также использованная геометрия эксперимента представлены на рисунке. Символами на рисунке показаны экспериментальные данные, а сплошными кривыми — результаты подгонки. Кривые 1 и 3 соответствуют компонентам флуоресценции I_{YY} и I_{YYx} с поляризациями вдоль осей y и x для случая линейной поляризации излучения лазера вдоль оси y . Кривые 2 и 4 отвечают компонентам флуоресценции I_{CCy} и I_{CCx} с поляризациями

Параметры флуоресценции

Растворитель	τ_1 , ns	τ_2 , ns	τ_{rot} , ns	a_2/a_1
CH ₃ OH	0.32 ± 0.03	0.73 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.38 ± 0.03
H ₂ O [13]	0.22 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.02

вдоль осей y и x для случая циркулярной поляризации пучка лазера. Кривая 5 — инструментальная функция отклика (IRF(t)) фотодетектора. Сигналы флуоресценции на рисунке могут быть представлены в виде [6–8]:

$$I_{EEy} = GI_{EE}(t)[1 + 2r_{EE}(t)], \quad (1)$$

$$I_{EEx} = I_{EE}(t)[1 - r_{EE}(t)], \quad (2)$$

где индексы $EE = YY$ обозначают линейную поляризацию возбуждающих фотонов вдоль оси Y , индексы x, y — компоненты поляризации излучения флуоресценции, $r_{EE}(t)$ — параметр анизотропии, $I_{EE}(t)$ — изотропная составляющая интенсивности флуоресценции, а G — коэффициент, учитывающий различия в чувствительности x - и y -каналов детектирования. Для случая циркулярной поляризации возбуждающих фотонов $EE = CC$, а индексы x и y в выражениях (1), (2) следует поменять местами.

Как показано в работах [13,14], затухание изотропной составляющей интенсивности флуоресценции $I_{EE}(t)$ молекул NADH в растворах хорошо аппроксимируется двухэкспоненциальной функцией

$$I_{EE}(t) = [a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)], \quad (3)$$

где a_1 и a_2 — предэкспоненциальные коэффициенты, а τ_1, τ_2 — времена затухания.

Зависимость параметра анизотропии от времени $r_{EE}(t)$ определяется взаимодействием молекул NADH с молекулами растворителя и может быть описана моноэкспоненциальной функцией [8,13,14]:

$$r_{EE}(t) = r_{EE} \exp(-t/\tau_{rot}), \quad (4)$$

где τ_{rot} — время вращательной диффузии.

Экспериментальные данные обрабатывались на основе выражений (1)–(4) с помощью процедуры глобальной подгонки, реализованной на языке Python 3, в рамках которой осуществлялась свертка выражений (1) и (2) с аппаратной функцией лавинных фотодиодов IRF(t), приведенной на рисунке.

Полученные времена затухания τ_1 и τ_2 , τ_{rot} и отношение коэффициентов a_2/a_1 представлены в первой строке таблицы. Для сравнения во второй строке таблицы приведены параметры флуоресценции, полученные для водного раствора NADH [13]. Значения параметров в пределах погрешности не зависели от длины волны возбуждения.

Как видно из таблицы, наибольшее из изотропных времен затухания флуоресценции (τ_2) практически совпадает со временем жизни $\tau_2 = 0.71 \pm 0.02$ ns, определенным ранее в водном растворе [13], тогда как второе характерное время затухания (τ_1) имело заметно большую величину для раствора с метанолом, чем для водного раствора. Как видно из таблицы, отношение коэффициентов a_2/a_1 и время вращательной диффузии τ_{rot} для раствора с метанолом оказались больше аналогичных величин, определенных для водного раствора.

Причины обнаруженных изменений параметров флуоресценции, вероятно, обусловлены изменением вязкости и полярности раствора при добавлении метанола. Как известно [15], вязкость раствора монотонно увеличивается при добавлении метанола и достигает максимума $1.7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ при концентрации метанола 43%. Таким образом, в условиях нашего эксперимента повышенная вязкость раствора замедляла релаксацию анизотропии, увеличивая время вращательной диффузии τ_{rot} относительно значения, характерного для водного раствора. Кроме того, на величину параметров флуоресценции может влиять полярность раствора. Известно, что молекула NADH может существовать в двух конформациях: свернутой (folded) и разложенной (extended), при этом в водных растворах в основном преобладает свернутая конформация. В работе [16] было показано, что при увеличении концентрации метанола в растворе количество молекул NADH в разложенной конформации увеличивается, т. е. происходит их денатурация.

Благодарности

Авторы благодарят ФТИ им. А.Ф. Иоффе за предоставление оборудования для проведения экспериментов.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-53-34001 Куба_т.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Schaefer P., Kalinina S., Rueck A., von Arnim C.A.F., von Einem B. // *Cytometry A*. 2019. V. 95. P. 34–46.
- [2] Rover L., Jr., Fernandes J.C.B., de Oliveira Neto G., Kubota L.T., Katekawa E., Serrano S.H.P. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 260. P. 50–55.
- [3] Topics in fluorescence spectroscopy. V. 5. Nonlinear and two-photon-induced fluorescence / Ed. J.R. Lakowicz. N.Y.: Kluwer Academic Publ., 2002. 544 p.
- [4] McClain W.M. // *J. Chem. Phys.* 1972. V. 57. P. 2264–2272.
- [5] Shternin P.S., Gericke K.H., Vasyutinskii O.S. // *Mol. Phys.* 2010. V. 108. P. 813–825.
- [6] Denicke S., Gericke K.-H., Smolin A.G., Shternin P.S., Vasyutinskii O.S. // *J. Phys. Chem. A*. 2010. V. 114. P. 9681–9692.
- [7] Herbrich S., Al-Hadhuri T., Gericke K.-H., Shternin P.S., Smolin A.G., Vasyutinskii O.S. // *J. Chem. Phys.* 2015. V. 142. P. 024310.
- [8] Sasin M.E., Smolin A.G., Gericke K.-H., Tokunaga E., Vasyutinskii O.S. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. P. 19922–19931.
- [9] Korovin K.O., Picheyev B.V., Vasyutinskii O.S., Valipour H., Zimmermann D. // *J. Chem. Phys.* 2000. V. 112. P. 2059–2062.
- [10] Kupriyanov D.V., Sevastianov B.N., Vasyutinskii O.S. // *Z. Phys. D*. 1990. V. 15. P. 105–115.
- [11] Kuznetsov V.V., Vasyutinskii O.S. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 127. P. 044308.
- [12] Balint-Kurti G.G., Vasyutinskii O.S. // *J. Phys. Chem. A*. 2009. V. 113. P. 14281.
- [13] Васютинский О.С., Смолин А.Г., Освальд С., Гери́ке К.Н. // *Оптика и спектроскопия*. 2017. Т. 122. № 4. С. 622–626.
- [14] Blacker T.S., Marsh R.J., Duchon M.R., Bain A.J. // *Chem. Phys.* 2013. V. 422. P. 184–194.
- [15] Thompson J.W., Kaiser Th.J., Jorgenson J.W. // *J. Chromatography A*. 2006. V. 1134. P. 201–209.
- [16] Hull R.V., Conger P.S., Hoobler R.J. // *Biophys. Chem.* 2001. V. 90. P. 9–16.