

Влияние толщины разделительного слоя полиэлектролитов на кинетику затухания флуоресценции конъюгатов IgG-FITC вблизи плазмонной пленки серебра

© В.И. Степура¹, О.С. Кулакович², А.А. Маскевич³, Д.В. Гузатов³, Х.В. Демир⁴,
С.В. Гапоненко², С.А. Маскевич¹

¹Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета,
220070 Минск, Беларусь

²Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси,
220072 Минск, Беларусь

³Гродненский госуниверситет им. Янки Купалы,
230023 Гродно, Беларусь

⁴Университет Билькент, Билькент,
TR-06800 Анкара, Турция

e-mail: stsiapura@gmail.com

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

В окончательной редакции 07.09.2023 г.

Принята к публикации 13.10.2023 г.

Эффект усиления флуоресценции вблизи металлических наноструктур позволяет значительно повысить чувствительность флуоресцентных методов детекции, что находит широкое применение в диагностике и разработке биосенсоров. В настоящей работе исследовалась кинетика затухания флуоресценции конъюгатов иммуноглобулина G с флуоресцеин-изотиоцианатом вблизи плазмонной пленки серебра, образованной коллоидными наночастицами с диаметром ~ 40 nm. Обнаружено влияние толщины спейсерного слоя из катионного/анионного полиэлектролитов (число слоев менялось от 1 до 7), отделяющих флуоресцентный конъюгат от плазмонной пленки, на длительность кинетики эмиссии. Кинетика флуоресценции являлась мультиэкспоненциальной и моделировалась непрерывным распределением излучателей по длительности затухания с использованием метода максимума энтропии. На основе теоретической зависимости изменения константы скорости излучательного перехода от расстояния до металла оценены усредненные по ансамблю квантовые выходы флуоресценции для конъюгатов, расположенных на различном удалении от плазмонной пленки, и обнаружено, что усиление флуоресценции конъюгатов вблизи коллоидных наночастиц обусловлено изменением эффективности возбуждения, но не ростом квантового выхода флуоресценции.

Ключевые слова: наноплазмоника, кинетика затухания флуоресценции, метод максимума энтропии, коллоидная наночастица, флуоресцеин-изотиоцианат, иммунодиагностика.

DOI: 10.61011/OS.2023.10.56894.5544-23

Введение

Для достижения высокой чувствительности в иммунодиагностике широко используют флуоресцентные методы, а в качестве субстратов апробируются различные твердофазные системы, содержащие плазмонные частицы серебра и золота [1–11]. В таких системах вблизи поверхности металлических наночастиц (NP) происходит локализация электромагнитного излучения падающей световой волны, что позволяет в итоге повысить интенсивность регистрируемого сигнала флуоресцентных меток, в качестве которых, как правило, используют изотиоцианат флуоресцеина (FITC). Для создания наноструктурированных плазмонных пленок на поверхности различных диэлектрических материалов разработаны [7,12–15] универсальные технологии электростатического осаждения NP серебра (Ag NP). Данный способ использован в работе [15] для создания

металлизированных плазмонных покрытий в стандартных 96-луночных планшетах, что позволило заметно повысить чувствительность иммунофлуоресцентного метода определения простатспецифического антигена. Интенсивность регистрируемого флуоресцентного сигнала в присутствии Ag NP повышалась в 2–3 раза по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на интактной поверхности полистирольного планшета; отношение сигнал/шум возрастало до двух раз. Затем в работах [16,17] авторы исследовали спектральные и временные характеристики флуоресценции иммобилизованного конъюгата FITC с иммуноглобулином G (IgG-FITC) в зависимости от поверхностной плотности Ag NP, осажженных на дно лунок планшета. Оптимизирована поверхностная плотность Ag NP и технология их получения.

Показано, что увеличение интенсивности флуоресценции метки на металлизированном планшете в 3–10 раз

в зависимости от оптической плотности пленки серебра связано преимущественно с плазмонным эффектом. Зарегистрировано семикратное снижение длительности затухания флуоресценции IgG-FITC в присутствии плазмонных наночастиц, повышение эффективности возбуждения флуоресценции IgG-FITC в области расположения плазмонной полосы 420–430 nm, значительное уменьшение полуширины спектров флуоресценции.

Металлодиэлектрические структуры всегда ведут к сокращению времени жизни возбужденных состояний находящихся вблизи них квантовых систем (флуорофоров). Причем снижение длительности возбужденного состояния может сопровождаться как уменьшением, так и ростом интенсивности флуоресценции [18]. Если исходная величина квантового выхода флуоресценции для флуорофора мала ($\Phi_0 \ll 1$), то изменение вероятности протекания излучательных и безызлучательных процессов в возбужденном состоянии вследствие взаимодействия с плазмонами может приводить к возрастанию квантового выхода эмиссии ($\Phi > \Phi_0$). Наиболее явно это можно наблюдать в электролюминесценции плазмонных структур, где возрастание люминесцентного сигнала полностью определяется увеличением квантового выхода [19,20]. В случае излучателей с высоким собственным квантовым выходом флуоресценции $\Phi_0 \sim 1$ присутствие металла приводит к снижению значения квантового выхода $\Phi < \Phi_0$. Однако существует достаточно широкий набор экспериментальных условий, при которых интенсивность флуоресценции таких излучателей не уменьшается, а время жизни возбужденного состояния существенно сокращается.

Если сокращение времени жизни флуорофора вблизи металлодиэлектрических наноструктур достигается за счет роста константы скорости излучательного перехода, то в этом случае снижается вероятность побочных фотостимулированных процессов, приводящих к деградации люминофора, при неизменном уровне флуоресцентного сигнала. Сокращение времени жизни возбужденного состояния флуорофора с помощью металлодиэлектрических наноструктур может уменьшать влияние концентрационных эффектов на тушение флуоресценции, что отмечалось для биомолекул, меченных FITC [1,15], и редкоземельных ионов [21]. Важная роль эффектов, связанных с концентрационным тушением и их влиянием на интенсивность флуоресценции, может иметь место для конъюгатов IgG-FITC, когда на одну молекулу белка приходится несколько молекул флуорофора.

Традиционно в иммунодиагностике с использованием спектрально-люминесцентных методов основной измеряемой характеристикой флуоресценции является интенсивность, которая считается линейно-зависящей от концентрации анализируемого вещества, например IgG-FITC [22]. Однако эффекты, связанные с неомогенностью микроокружения флуорофоров, их невысокой фотостабильностью и концентрационным тушением, приводят к усложнению зависимости между концентрацией аналита и интенсивностью свечения. Использование

наночастиц металла для усиления флуоресценции [23], где эффект усиления существенно зависит от расстояния флуорофор-металл, приводит к еще большей гетерогенности исследуемой системы, характеристика флуоресцентных свойств которой с использованием лишь одного параметра — усредненной по ансамблю флуорофоров интенсивности — может быть недостаточной.

Измерение кинетики затухания флуоресценции может предоставить повышение чувствительности, а также дополнительную информацию о свойствах и поведении систем, характеризующихся структурной и динамической гетерогенностью излучающих центров [24,25], что широко используется при разработке тест-систем для иммунологического анализа на основе лантаноидов [26,27], а также для исследования механизма плазмон-усиленной флуоресценции [23,28,29]. Однако, несмотря на значительное развитие математических методов анализа данных кинетики затухания флуоресценции [30,31], сложность ее интерпретации остается сдерживающим фактором в более широком применении методов флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением в практических приложениях иммунодиагностики (за исключением случая ионов лантаноидов, характеризующихся кинетикой в микросекундном диапазоне).

В настоящей работе мы экспериментально исследовали кинетику затухания флуоресценции конъюгатов IgG-FITC, иммобилизованных на поверхности металлодиэлектрической пленки, в которой слой белка и слой коллоидных Ag NP с размером 40 nm отделялись чередующимися слоями полиэлектролита (PE) с числом слоев от 1 до 7. Для интерпретации полученных результатов кривые затухания свечения FITC моделировались как набором экспонент, так и непрерывным распределением излучателей по длительности затухания с использованием метода максимума энтропии. На основе полученных распределений флуорофоров по временам жизни оценены усредненные по ансамблю квантовые выходы флуоресценции для конъюгатов IgG-FITC, расположенных на различном удалении от Ag NP, и обнаружено, что усиление флуоресценции FITC вблизи коллоидных наночастиц обусловлено изменением эффективности возбуждения, но не ростом квантового выхода флуоресценции.

Методика

Приготовление наночастиц серебра и пленок полиэлектролитов. В работе использовались фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7.4, нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролиты (PE) полидиаллилдиметиламмоний хлорид (PDADMAC) и полистиролсульфонат натрия (PSS), изотиоцианат флуоресцеина (FITC) и иммуноглобулин класса G, меченный изотиоцианатом флуоресцеина (соотношение FITC:белок=4), (IgG-FITC) (Aldrich, США).

Для нанесения пленок использовались стеклянные подложки размером $1 \times 2 \text{ cm}^2$. Подложки предвари-

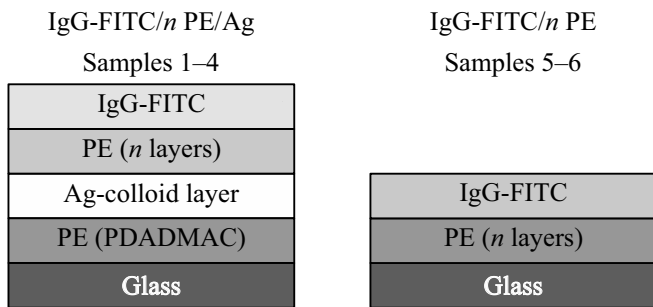


Рис. 1. Схема приготовления многослойных пленок, содержащих меченный белок IgG-FITC и наночастицы серебра. Количество слоев PDADMAC/PSS полиэлектролита n равно 1 (образцы 1, 5), 3 (образцы 2, 6), 5 (образцы 3, 7), 7 (образцы 4, 8).

тельно промывали в смеси $H_2O+H_2O_2+NH_3$ (1:1:1) при $70^\circ C$, затем на них осаждали слой PDADMAC ($M_w = 200000 \text{ g/mol}$) для придания поверхности подложки положительного заряда. Синтез наночастиц серебра осуществляли методом цитратного восстановления нитрата серебра [32]. По данным электронной микроскопии средний диаметр Ag NP в золе был равен $39 \pm 7 \text{ nm}$. Отрицательный заряд частиц серебра, обусловленный адсорбцией цитрат-ионов, позволяет электростатически осадить их на PDADMAC-модифицированные подложки [33]. На поверхности полученных таким образом серебряных пленок, а также на поверхности стеклянных подложек формировали от 1 до 7 чередующихся слоев PDADMAC и PSS [34]. Схема приготовления образцов мультислойных пленок, содержащих меченый белок IgG-FITC и коллоиды серебра, показана на рис. 1. Для обозначения образцов пленок введены следующие сокращения: IgG-FITC/ n PE/Ag (для образцов 1–4) и IgG-FITC/ n PE (для образцов 5–8), где n — количество слоев PDADMAC/PSS ($n = 1–7$). Оценочная толщина слоя полиэлектролита составляла $1.2–1.4 \text{ nm}$ [34]. Верхний слой всегда был PDADMAC, на него наносили $5 \mu\text{l}$ раствора, содержащего $1 \mu\text{g}$ IgG-FITC, в PBS буфере с pH 7.4. Измерения проводили на воздухе через 30 min после нанесения раствора.

Иммобилизация IgG-FITC из раствора на слое положительно заряженного PDADMAC обеспечивалась кулоновским взаимодействием между белком и полиэлектролитом. Изоэлектрическая точка для немодифицированного IgG составляет $pI = 7 \pm 1$ и в фосфатном буфере с pH 7.4, который использовался для приготовления растворов, отрицательный заряд белковой молекулы IgG-FITC определяется наличием дианионной формы FITC в ее составе. Типичные размеры белка IgG составляют $14.5 \times 8.5 \times 4.0 \text{ nm}$ и предполагалось, что при адсорбции белка на слое PDADMAC белковые молекулы образуют пленку толщиной $\sim 4 \text{ nm}$, т.е. неопределенность в расположении остатков FITC в белковой пленке составляет $\pm 2 \text{ nm}$. На основании данных о толщине

Таблица 1. Расстояние между слоями Ag коллоидов и FITC в образцах металлодиэлектрических пленок

Sample	R(Ag–FITC), nm
IgG-FITC/ 1 PE/Ag	3.4 ± 2
IgG-FITC/ 3 PE/Ag	5.3 ± 2
IgG-FITC/ 5 PE/Ag	8.6 ± 2
IgG-FITC/ 7 PE/Ag	10.5 ± 2

пленок PDADMAC/PSS [34] и размере IgG белка были оценены расстояния между слоями коллоидных Ag NP и FITC в образцах пленок (табл. 1).

Изображение пленки IgG-FITC/0 PE в отраженном свете, полученное с помощью конфокального микроскопа Nanofinder S (Solar, Беларусь), и спектр флуоресценции IgG-FITC в пленке приведены на рис. 2.

Измерение и анализ данных кинетики флуоресценции.

Измерение длительности затухания флуоресценции производили на импульсном флуориметре с использованием метода время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC). Для возбуждения флуоресценции использовали излучение импульсного лазерного диода с длиной волны 467 nm , длительностью 70 ps и частотой следования импульсов 20 MHz . Система регистрации включала в себя фотоприемный блок PMA-182, а также устройство для TCSPC TimeHarp 200 (PicoQuant, Германия). Для блокирования рассеянного возбуждающего света использовался красной длинноволновый фильтр Semrock, блокирующий излучение с $\lambda < 500 \text{ nm}$.

Кинетика затухания флуоресценции $F(t)$ определялась при деконволюции экспериментальных кривых $I(t)$:

$$I(t) = \int_0^t IRF(t')F(t-t')dt', \quad (1)$$

где $IRF(t)$ — аппаратная функция спектрометра, с помощью программного обеспечения, описанного ранее [35,36]. Длительность аппаратной функции $IRF(t)$ флуориметра составляла $\sim 300 \text{ ps}$, однако использование деконволюции позволяет для случая моноэкспоненциальной кинетики достичь временного разрешения $\sim 60 \text{ ps}$ [37]. Зависимость функции IRF от длины волны (цветовой эффект ФЭУ) учитывалась введением варьируемого времени задержки δ между $IRF(t)$ и $F(t)$.

При анализе экспериментальных данных функция затухания флуоресценции $F(t)$ представлялась в виде суммы экспонент или некоторым распределением излучательных центров по временам жизни. В случае использования мультиэкспоненциальной модели кинетика описывалась суммой конечного числа экспоненциальных

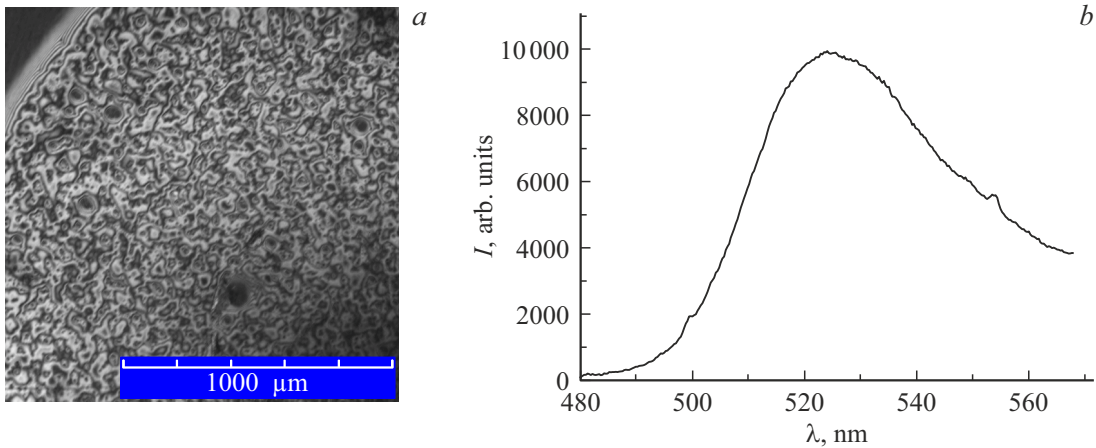


Рис. 2. Изображение пленки IgG-FITC/1 PE в отраженном свете, полученное с помощью конфокального микроскопа Nanofinder S (Solar, Беларусь) с объективом 10× (a) и спектр флуоресценции меченного белка в составе пленки (b). $\lambda_{ex} = 473 \text{ nm}$.

членов вида

$$F(t) = \sum_{i=1}^m \alpha_i \exp[-t/\tau_i], \quad (2)$$

где α_i, τ_i — предэкспоненциальный множитель (амплитуда) и время жизни i -й компоненты кинетики затухания флуоресценции. Число экспонент m выбирали из условия минимизации приведенного функционала χ_v^2 :

$$\chi_v^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{j=1}^N W_j [I(t_j) - I_{calc}(t_j)]^2, \quad (3)$$

где $I(t_j)$ и $Y(t_j)$ — экспериментальные и расчетные значения функции затухания для времени t_j , $W(t_j)$ — соответствующий статистический вес, ν — число степеней свободы, т.е. разность числа моделируемых точек данных N и числа варьируемых параметров в подгонной функции. В случае успешного моделирования мультиэкспоненциальной кинетики затухания значение функционала χ_v^2 должно стремиться к 1, что являлось одним из критериев качества подгонки. Для характеристики длительности мультиэкспоненциальной кинетики использовались средние значения времен жизни τ_α и $\langle \tau \rangle$:

$$\tau_\alpha = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^m \alpha_i}, \quad (4)$$

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^m \alpha_i \tau_i}, \quad (5)$$

где усреднение производится соответственно по амплитуде и вкладу $S_i \sim \alpha_i \tau_i$ в свечение экспоненциальных компонент.

Для случая непрерывного распределения излучательных центров по временам жизни функция затухания флуоресценции $F(t)$ представлялась в виде

$$F(t) = \int_0^\infty \alpha(\tau) \exp[-t/\tau] d\tau, \quad (6)$$

где $\alpha(\tau)$ — искомое распределение флуорофоров. Распределение $\alpha(\tau)$ рассчитывалось с помощью метода максимума энтропии (МЕМ) [38–43], которое позволяет восстанавливать наиболее вероятное распределение флуорофоров без априорных предположений о виде функции затухания. Для этого при поиске $\alpha(\tau)$ кроме минимизации приведенного функционала χ_v^2 также производится функция максимизация энтропии:

$$S = \int_0^\infty \left[\alpha(\tau) - m(\tau) - \alpha(\tau) \log \frac{\alpha(\tau)}{m(\tau)} \right] d\tau, \quad (7)$$

где $m(\tau)$ — стартовая модель распределения, характеризующая наиболее вероятное априорное распределение флуорофоров. Определение оптимального вида спектра $\alpha(\tau)$ при условии $\chi_v^2 \approx \chi_{v, \min}^2$ достигалось путем максимизации величины Ψ :

$$\Psi = S - \mu(\chi_v^2 - \chi_{v, \min}^2), \quad (8)$$

где регуляризационный параметр μ выступает в качестве множителя Лагранжа, меняющего вклад слагаемых, связанных с энтропией S и χ_v^2 , в величину Ψ .

При анализе кинетики интеграл (6) заменялся суммой M экспоненциальных членов с временами жизни, равномерно распределенными в логарифмическом масштабе с шагом $\Delta(\lg \tau)$ в диапазоне $[\tau_{\min}, \tau_{\max}]$:

$$\lg \tau_i = \lg(\tau_{\min}) + (i - 1)\Delta(\lg \tau), \quad i = 1 \dots M. \quad (9)$$

Переход к логарифмическому масштабу по временам жизни удобно при расчетах, поскольку наиболее вероятным распределением флуорофоров (в отсутствие информации о кинетике затухания) будет являться равномерное [39]. В этом случае функция $F(t)$ при замене $\alpha_i(\tau) = \alpha(\lg \tau_i)\Delta(\lg \tau)$ приводится к выражению (2), а стартовая модель распределения определяется как $m(\lg \tau_i) = m_0$, где m_0 — постоянная величина.

Как вид стартовой модели, так и значение m_0 оказывают существенное влияние на реконструкцию спектра $\alpha_i(\tau)$ [40,42,44,45]. Для задания стартовой модели предварительно проводилась аппроксимация кривой затухания суммой M экспонент с временами жизни, определяемыми согласно (9), и одинаковыми предэкспоненциальными множителями α_0 . Величина m_0 определялась из выражения $m_0 = \alpha_0/100$.

Выбор параметра регуляризации μ производился на основании зависимости величины χ_v^2 от значения μ в связи с тем, что для ряда экспериментальных данных минимальное значение χ_v^2 (при $\mu \gg 1$) существенно варьировало и не достигало 1. На первом этапе задавалось значение $\mu = 100$ и производился поиск вида распределения $\alpha_i(\tau)$ и времени задержки δ , учитывающего зависимость функции IRF от длины волны (цветовой эффект ФЭУ). Далее найденное время задержки δ фиксировалось и производилось моделирование кинетики и расчет значения χ_v^2 для набора значений μ в диапазоне от 10^2 до 10^{-4} . Значение μ_c , при котором наблюдалось изменение хода зависимости $\chi_v^2(\mu)$, использовалось для расчета распределения $\alpha(\lg \tau)$. Более подробно программный пакет для реконструкции распределения флуорофоров по временам жизни методом максимума энтропии описан в работе [36].

Результаты и обсуждение

На рис. 3 представлены кривые затухания флуоресценции IgG-FITC в растворе PBS и в составе многослойных пленок, содержащих коллоидные NP серебра. Можно видеть, что иммобилизация меченного белка и его внедрение в состав мультислойной пленки приводит к существенному увеличению скорости дезактивации возбужденного состояния флуоресцентной группы.

Флуоресцентные свойства красителей на основе флуоресцеина существенно зависят от pH [46], но в фосфатном буфере при pH 7.4 молекула несвязанного FITC находится в форме дианиона и кинетика ее флуоресценции является моноэкспоненциальной с $\tau \sim 3.9$ ns (табл. 2). Однако для IgG-FITC в буфере кинетика флуоресценции биэкспоненциальна с временами жизни ~ 1.4 и ~ 3.8 ns, причем долгоживущая компонента дает основной вклад (89%) в свечение (табл. 2). Биэкспоненциальная кинетика флуоресценции наблюдалась для различных белков, меченых FITC [1,47–50], что связывалось с наличием нескольких центров связывания метки с отличающимся микроокружением [49]. С ростом отношения FITC: белок характер кинетики затухания может усложняться до триэкспоненциального [1,48] вследствие эффектов, связанных с гомопереносом энергии и концентрационным тушением флуоресценции. В нашем случае количество групп FITC, приходящихся на белковую молекулу, для IgG-FITC составляло $n \sim 4$, однако эффекты миграции энергии для различных меток FITC в пределах белковой молекулы являются малосуществен-

ными и кинетические параметры практически не зависят от длины волны флуоресценции (табл. 2). Учитывая, что величина радиуса Фёрстера для миграции энергии между молекулами флуоресцеина составляет ~ 5 nm [51] это, вероятно, связано со значительными размерами белка и наличием более 80 остатков Lys, которые могут выступать в качестве центров связывания FITC [52].

Иммобилизация и внедрение IgG-FITC в состав мультислойной пленки приводит к снижению длительности затухания эмиссии, и кинетика может быть удовлетворительно описана с помощью по крайней мере трех экспоненциальных компонент (табл. 3). Для пленок IgG-FITC/ n PE времена жизни компонент кинетики принимают значения $\tau_1 \sim 0.3–0.5$ ns, $\tau_2 \sim 1.2–1.8$ ns, $\tau_3 \sim 3.1–3.7$ ns, а средние по амплитуде τ_a и вкладу $\langle \tau \rangle$ времена жизни варьируют в диапазонах 0.7–1.3 и 1.6–2.2 ns соответственно.

При наличии коллоидов серебра в составе пленки средняя длительность кинетики испытывает дополнительное снижение, причем наблюдается выраженная корреляция между значением $\langle \tau \rangle$ и числом слоев n полиэлектролита, отделяющих IgG-FITC от коллоидов серебра (табл. 3). Например, для образца IgG-FITC/7 PE/Ag среднее время жизни $\langle \tau \rangle$ принимает значение ~ 1 ns, тогда как для IgG-FITC/1 PE/Ag ее величина снижается до $\langle \tau \rangle \sim 0.2$ ns. Подобные изменения наблюдаются и для усредненного по амплитуде значения τ_a , которое пропорционально квантовому выходу флуоресценции.

Важно отметить, что параметрам мультиэкспоненциальных кинетик зачастую сложно приписать определенный физический смысл, если число компонент кинетики $m \geq 3$, а исследуемая флуоресцентная система обладает высокой структурной и динамической гетерогенностью. Подобная ситуация типична для флуоресцентных меток или зондов, внедренных в такие макро- и супрамолекулярные системы как биополимеры, мицеллы, мембраны и т.п. Эти системы характеризуются значительной пространственной неоднородностью и высокой конформационной подвижностью. Кинетика свечения флуорофора в таких объектах существенно неэкспоненциальна, что вызвано, с одной стороны, гетерогенностью центров связывания и их различным микроокружением, а с другой — влиянием флуктуаций межмолекулярных взаимодействий, нестационарных процессов релаксации, переноса энергии и т.д. В данном случае более адекватным подходом к исследуемой системе является моделирование кинетики с использованием непрерывного распределения излучающих центров по временам жизни флуоресценции [25,53].

Для расчета распределения излучающих центров по временам жизни использовался метод максимума энтропии. Распределение флуорофоров представлялось в виде набора 30 или 90 экспоненциальных компонент с временами жизни, значения которых распределялись в диапазоне 0.04–10 ns с одинаковым шагом в логарифмическом масштабе, и производился расчет зависимости

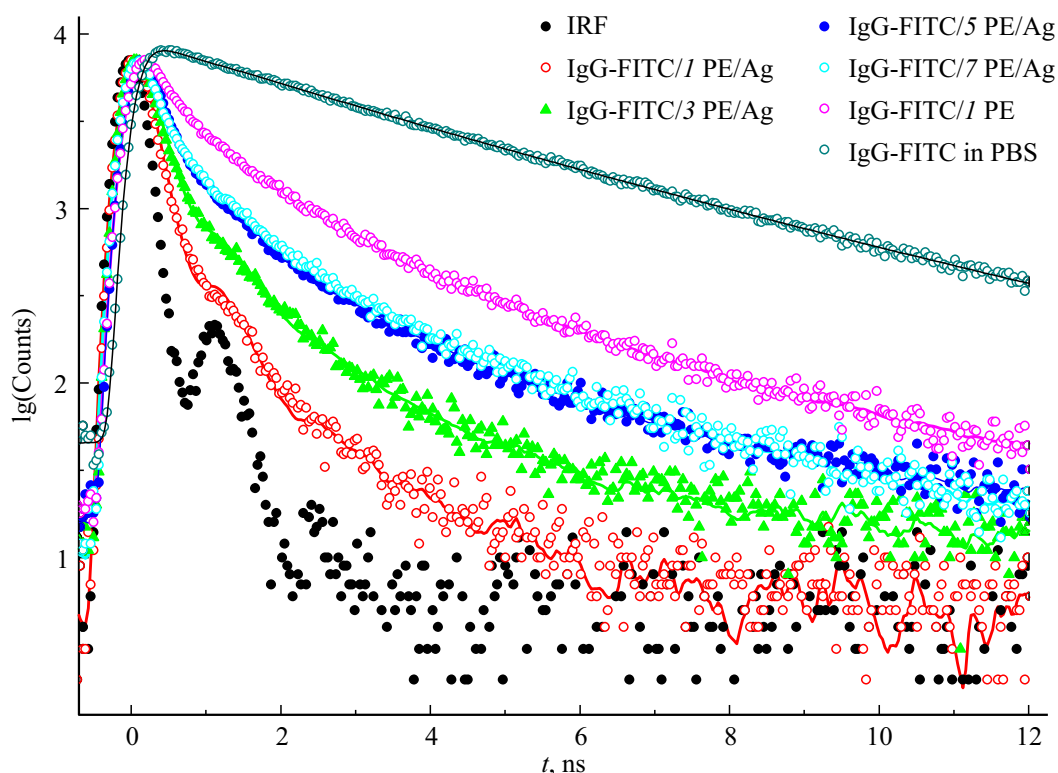


Рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции IgG-FITC в растворе PBS и в составе мультислойных пленок, содержащих коллоидные Ag NP. $\lambda_{ex} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 520 \text{ nm}$. Линиями показаны расчетные кривые кинетики. IRF-аппаратная функция (instrument response function).

Таблица 2. Параметры кинетики затухания флуоресценции свободного FITC и IgG-FITC в PBS буфере pH 7.4. $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$

Sample	$\lambda_{fl}, \text{ nm}$	α_1	$\tau_1, \text{ ns}$	$S_1, \%$	α_2	$\tau_2, \text{ ns}$	$S_2, \%$	$\langle \tau \rangle, \text{ ns}$	χ^2
FITC	520	1	3.96	100				3.96 ± 0.08	1.08
	550	1	3.94	100				3.94 ± 0.08	1.12
	570	1	3.94	100				3.94 ± 0.08	1.11
IgG-FITC	520	0.246	1.41	11.0	0.754	3.75	89.0	3.50 ± 0.07	1.03
	540	0.241	1.36	10.3	0.759	3.77	89.7	3.52 ± 0.07	1.12
	570	0.276	1.61	13.8	0.724	3.84	86.2	3.53 ± 0.07	1.12

Таблица 3. Параметры мультиэкспоненциальной кинетики затухания флуоресценции IgG-FITC в составе мультислойных пленок, содержащих коллоиды серебра. $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 520 \text{ nm}$

Sample	α_1	$\tau_1, \text{ ns}$	$S_1, \%$	α_2	$\tau_2, \text{ ns}$	$S_2, \%$	α_3	$\tau_3, \text{ ns}$	$S_3, \%$	$\tau_a, \text{ ns}$	$\langle \tau \rangle, \text{ ns}$	χ^2
IgG-FITC/1 PE/Ag	0.894	< 0.06	51.5	0.104	0.23	40.9	0.003	1.64	7.6	0.06	0.24 ± 0.12	1.71
IgG-FITC/3 PE/Ag	0.906	< 0.06	35.2	0.087	0.30	44.0	0.008	1.63	20.9	0.06	0.48 ± 0.16	1.27
IgG-FITC/5 PE/Ag	0.809	0.14	39.0	0.159	0.60	33.5	0.032	2.44	27.5	0.28	0.93 ± 0.10	1.07
IgG-FITC/7 PE/Ag	0.791	0.14	35.0	0.173	0.63	35.5	0.036	2.53	29.5	0.31	1.02 ± 0.10	1.34
IgG-FITC/1 PE	0.684	0.30	28.2	0.245	1.17	40.1	0.071	3.20	31.6	0.72	1.56 ± 0.10	1.07
IgG-FITC/3 PE	0.625	0.34	21.9	0.261	1.36	36.8	0.115	3.48	41.3	0.96	2.01 ± 0.10	1.02
IgG-FITC/5 PE	0.551	0.47	20.1	0.323	1.78	44.3	0.126	3.67	35.6	1.30	2.19 ± 0.10	1.23
IgG-FITC/7 PE	0.644	0.41	28.1	0.243	1.36	35.0	0.113	3.08	36.9	0.94	1.73 ± 0.10	1.06

$\alpha(\lg \tau)$. Параметр регуляризации μ , используемый при расчете вида распределений, выбирался на основании зависимости χ^2 от μ .

Процедура выбора параметра μ показана на следующем примере. На рис. 4,а представлена серия распределений $\alpha(\lg \tau)$ для раствора IgG-FITC в PBS буфере

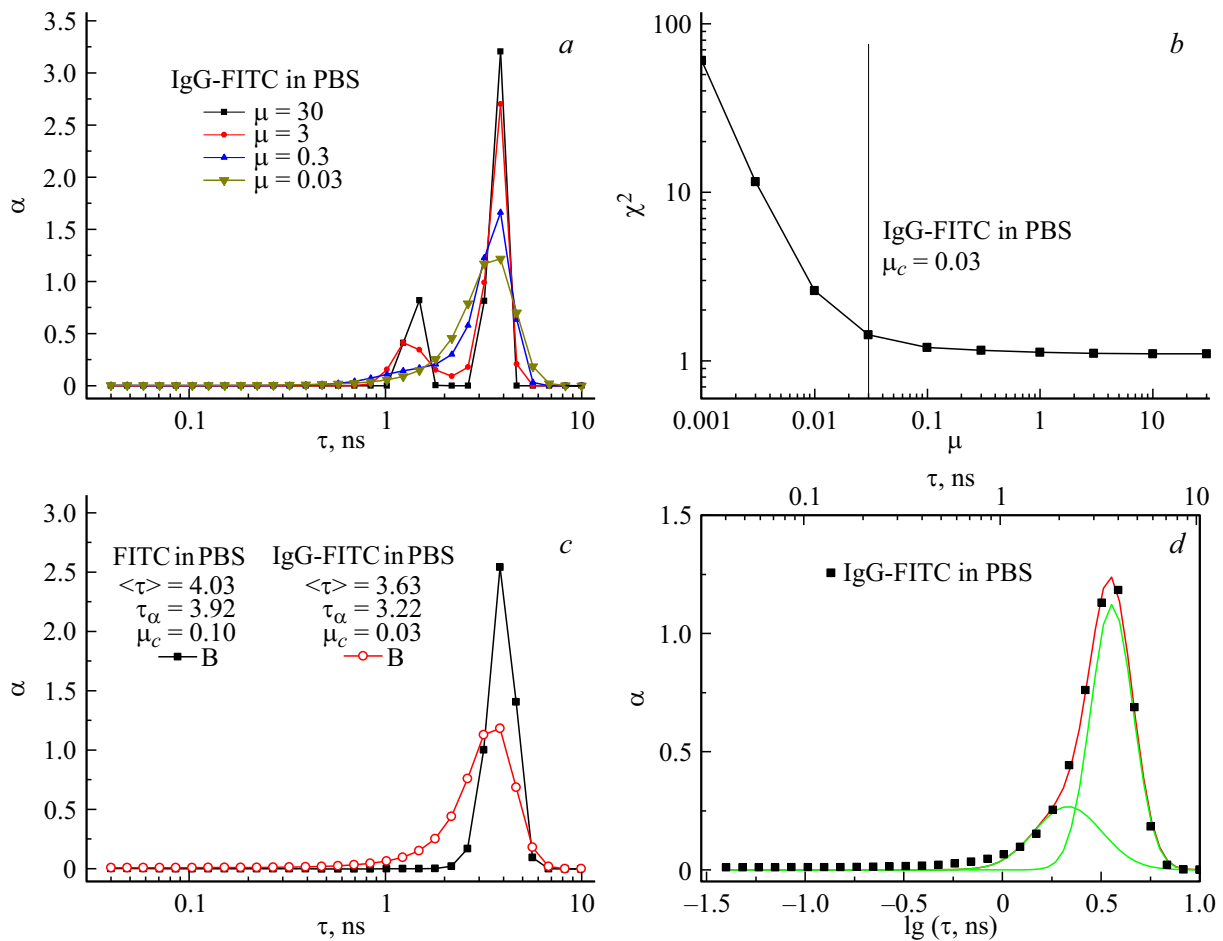


Рис. 4. Распределения флуорофоров по временам жизни для FITC и IgG-FITC в растворе PBS. $\lambda_{ex} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 520 \text{ nm}$. *a* — распределения $\alpha(\lg \tau)$ для IgG-FITC при различных значениях параметра регуляризации μ ; *b* — зависимость $\chi^2(\mu)$ для IgG-FITC с указанием критического значения $\mu_c = 0.03$, *c* — распределения $\alpha(\lg \tau)$ для FITC и IgG-FITC в растворе PBS при μ_c , равных 0.1 и 0.03 соответственно; *d* — разложение распределения $\alpha(\lg \tau)$ для IgG-FITC в растворе PBS на гауссианы.

при различных значениях параметра регуляризации μ . На основании изменения хода зависимости (рис. 4, *b*) производился выбор значения параметра $\mu = \mu_c$, начиная с которого дальнейший рост μ не приводил к существенному снижению величины χ^2 . Для случая кинетики флуоресценции IgG-FITC в PBS параметр регуляризации был выбран $\mu_c = 0.03$, а соответствующее ему распределение приведено на рис. 4, *c*.

Для белка IgG, меченного FITC, в растворе фосфатного буфера при pH 7.4 MEM не позволяет разрешить 2 экспоненциальные компоненты кинетики с $\tau_1 \sim 1.4 \text{ ns}$ и $\tau_2 \sim 3.8 \text{ ns}$ (табл. 2), и, поскольку основной вклад в свечение дает долгоживущая компонента, распределения $\alpha(\lg \tau)$ принимают асимметричный вид с пиком при $\tau \sim 3.8 \text{ ns}$ (рис. 4, *c*). Проявление второго пика при $\tau \sim 1.5 \text{ ns}$ в распределении для IgG-FITC происходит лишь при увеличении параметра регуляризации до величины $\mu \geq 3$ (рис. 4, *a*). Таким образом, при используемом нами подходе к определению параметра регуляризации μ_c уровень накопления данных кинетики, имеющих пуассоновскую статистику, не позволяет раз-

решить компоненты кинетики с $\tau_1 \sim 1.4 \text{ ns}$ и $\tau_2 \sim 3.8 \text{ ns}$ в виде отдельных пиков. Тем не менее вклад в свечение короткоживущей компоненты с $\tau_1 \sim 1.4 \text{ ns}$ (табл. 2) учитывается при анализе, что приводит к асимметрии и уширению распределения. Так, полуширины пиков распределения для IgG-FITC и свободного FITC в растворе составляют $\Delta\tau \sim 2.1 \text{ ns}$ и $\Delta\tau \sim 1.4 \text{ ns}$ соответственно, что намного выше длительности аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.3 \text{ ns}$). Моделирование распределения $\alpha(\lg \tau)$ для диапазона времен жизни 0.04–10 ns с помощью 90 экспоненциальных компонент практически не сказывается на значении полуширины пика, поэтому при дальнейших расчетах распределений мы ограничивались разбиением на 30 экспонент.

Важно отметить, что хотя короткая τ_1 и длинная τ_2 компоненты в кинетике IgG-FITC не разрешаются в виде отдельных пиков, их вклады могут быть определены путем разложения спектра $\alpha(\lg \tau)$ на гауссианы вида

$$G(A_i, x_{0i}, w_i) = A_i / (w_i \sqrt{\pi/2}) \exp \left[-2 \left(\frac{x - x_{0i}}{w_i} \right)^2 \right],$$

где A_i, x_{0i}, w_i — площадь, положение и параметр ширины для i -го пика (рис. 4, *d*, табл. 4). При переходе от логарифмической шкалы $\lg \tau$ к линейной по τ можно видеть, что положения гауссиан $\tau_{01} = 10^{x_{01}} = 2.1$ ns и $\tau_{02} = 10^{x_{02}} = 3.6$ ns, а также отношение их площадей $A_1/A_2 = 0.26/0.69$ находится в хорошем соответствии с данными кинетики биекспоненциального затухания для IgG-FITC (табл. 2).

Сдвиг и уширение пика распределения для меченного белка IgG-FITC по сравнению со свободным FITC обусловлены, главным образом, вкладом короткоживущей компоненты кинетики с $\tau_1 \sim 1.4$ ns в флуоресценцию меченного белка (табл. 2), а также отражает большую гетерогенность микроокружения FITC в составе IgG, влияющую на кинетические характеристики флуоресценции метки. Однако спектральных проявлений гетерогенности микроокружения для различных мест локализации метки в белке, либо эффектов миграции энергии не обнаружено, и распределения при различных длинах волн флуоресценции практически повторяют друг друга, что согласуется с данными табл. 2.

Адсорбция белка IgG-FITC на поверхности многослойной пленки приводит к изменениям в кинетике флуоресценции и виде распределения флуорофоров по временам жизни (рис. 5). Так, для пленок, не содержащих коллоиды серебра, кроме пика с максимумом при $\tau \sim 3$ ns, который мы связываем с флуоресценцией дианионной формы FITC, в распределении наблюдается появление дополнительного пика в области 0.3–0.5 ns (рис. 5, *a*).

При рассмотрении природы пика распределения флуорофоров в области коротких времен жизни необходимо учесть, что переход белка IgG-FITC из раствора в состав твердофазной мультислойной пленки будет приводить к снижению расстояния между группами FITC, принадлежащими различным белковым молекулам, вследствие более плотной упаковки белков в пленке. Это может приводить к тушению флуоресценции вследствие агрегации хромофорных групп с образованием нефлуоресцентных димеров FITC₂, а также роста эффективности процессов переноса энергии между остатками молекул FITC в белковой пленке. Ранее сообщалось [47], что уменьшение расстояния между отдельными антителами, меченными FITC, сопровождается снижением интенсивности и длительности затухания флуоресценции. Для красителей на основе флуоресцеина известен механизм концентрационного тушения флуоресценции [51], который заключается в формировании нефлуоресцентных димеров флуоресцеина с ростом концентрации красителя и эффективном переносе энергии от мономеров к димерам. Мы предполагаем, что появление пика в распределении $\alpha(\lg \tau)$ для области коротких времен жизни связано с процессами концентрационного тушения в белковой пленке. Кроме того, вклад в тушение флуоресценции FITC будут давать изменения в микроокружении флуорофора и во взаимодействии с полярными белковыми группами при формировании белковой пленки.

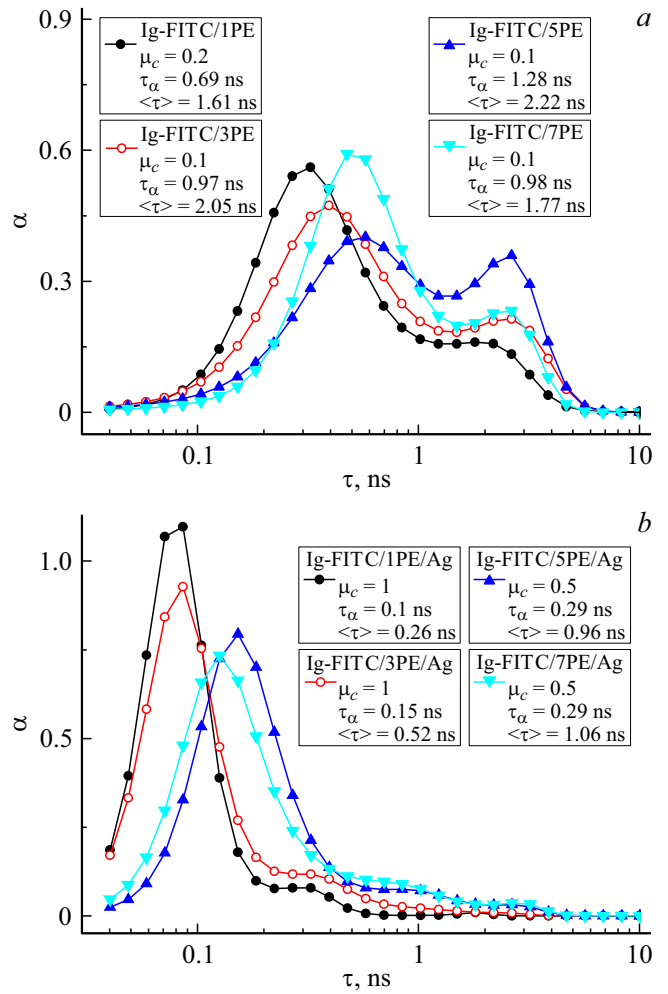


Рис. 5. Распределения флуорофоров по временам жизни для IgG-FITC в многослойной пленке без коллоидов серебра (*a*) и на различном удалении от коллоидов серебра (*b*). $\lambda_{ex} = 473$ nm, $\lambda_{fl} = 520$ nm.

Поскольку пики в бимодальном распределении (рис. 5, *a*) частично перекрываются, то долю флуорофоров, относящихся к каждому пику, оценивали, разлагая распределение на гауссианы (табл. 4). Разложение на гауссианы для образца IgG-FITC/1PE приведено на рис. 6.

Для образцов IgG-FITC в пленках без коллоидов серебра доля флуорофоров FITC, участвующих в процессе переноса энергии к тушителю (нефлуоресцентному димеру FITC₂) и относящихся к пику при $\tau_{01} = 10^{x_{01}}$ в области коротких времен жизни, находилась в диапазоне от 0.73 до 0.78, что свидетельствует о высокой эффективности процессов переноса энергии между остатками FITC в многослойной пленке (табл. 5). Однако вклад в свечение $S_i \sim \int \tau G_i(\lg \tau) d(\lg \tau)$ для первой группы флуорофоров составлял менее 50%. Для второй группы остатков FITC, которые относятся к пику при $\tau_{02} = 10^{x_{02}}$, мы не исключаем протекания процессов миграции энергии, однако физическая удаленность от

Таблица 4. Параметры гауссианов $G(A, x_{0i}, w_i) = A_i/(w_i\sqrt{\pi/2}) \exp\left[-2\left(\frac{x-x_{0i}}{w_i}\right)^2\right]$, используемых для декомпозиции распределения флуорофоров $\alpha(\lg \tau)$ для IgG-FITC в растворе и в составе мультислойных пленок. В скобках указаны стандартные отклонения. $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 520 \text{ nm}$

Sample	A_1	x_{01}	w_1	A_2	x_{02}	w_2
IgG-FITC in PBS	0.26 (0.16)	0.33(0.11)	0.34 (0.11)	0.69 (0.16)	0.56 (0.01)	0.21 (0.01)
IgG-FITC/1 PE	0.78 (0.01)	-0.503 (0.004)	0.49 (0.01)	0.21 (0.01)	0.24 (0.01)	0.45 (0.02)
IgG-FITC/3 PE	0.76(0.01)	-0.399 (0.006)	0.58 (0.01)	0.23 (0.01)	0.38 (0.01)	0.38 (0.02)
IgG-FITC/5 PE	0.73 (0.02)	-0.235 (0.008)	0.65 (0.02)	0.25 (0.02)	0.41 (0.01)	0.28 (0.01)
IgG-FITC/7 PE	0.78 (0.01)	-0.285 (0.004)	0.46 (0.01)	0.21 (0.01)	0.37 (0.01)	0.32 (0.02)
IgG-FITC/1 PE/Ag	0.92 (0.01)	-1.108 (0.002)	0.286 (0.003)	0.08 (0.01)	-0.57 (0.02)	0.32 (0.05)
IgG-FITC/3 PE/Ag	0.83 (0.02)	-1.089 (0.003)	0.317 (0.005)	0.16 (0.02)	-0.54 (0.03)	0.50 (0.06)
IgG-FITC/5 PE/Ag	0.72 (0.01)	-0.828 (0.001)	0.350 (0.004)	0.30 (0.02)	-0.49 (0.03)	1.09 (0.04)
IgG-FITC/7 PE/Ag	0.62 (0.02)	-0.904 (0.002)	0.348 (0.005)	0.40 (0.02)	-0.56 (0.03)	1.05 (0.03)

Таблица 5. Параметры распределения флуорофоров по временам жизни и средние значения квантовых выходов $\langle \Phi \rangle$ для IgG-FITC в составе мультислойных пленок без Ag NP. $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 520 \text{ nm}$

Samples	FITC residues, participating in energy transfer to FITC ₂ quencher					FITC residues, that do not experience concentration quenching					Whole ensemble of FITC residues		
	A_1	τ_{01} , ns	k_{nr01} , 10^9 s^{-1}	Δk_{nr1} , 10^9 s^{-1}	$\langle \Phi \rangle_1$	A_2	τ_{02} , ns	k_{nr02} , 10^9 s^{-1}	Δk_{nr2} , 10^9 s^{-1}	$\langle \Phi \rangle_2$	$\langle \Phi \rangle$	$\langle \tau \rangle$, ns	τ_α , ns
IgG-FITC/1 PE	0.78	0.31	2.9	3.6	0.085	0.21	1.7	0.34	0.60	0.46	0.16	1.6	0.7
IgG-FITC/3 PE	0.76	0.40	2.3	3.3	0.11	0.23	2.4	0.19	0.36	0.61	0.22	2.0	1.0
IgG-FITC/5 PE	0.73	0.58	1.5	2.6	0.18	0.25	2.6	0.16	0.25	0.62	0.28	2.2	1.3
IgG-FITC/7 PE	0.78	0.52	1.7	2.0	0.14	0.21	2.3	0.20	0.31	0.58	0.22	1.8	1.0

тушителей (димеров флуоресцеина FITC₂) приводит к тому, что их дезактивация в основное состояние происходит преимущественно за счет излучения флуоресценции.

Измеряемая длительность затухания флуоресценции (время жизни возбужденного состояния τ) определяется константой скорости излучательного перехода k_r и суммой констант скоростей всех безызлучательных переходов k_{nr} , приводящих к дезактивации возбужденного состояния

$$\tau^{-1} = k_r + k_{nr}.$$

С использованием данных о величине константы скорости излучательного перехода для дианионной формы FITC $k_r = 2.3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ [46] можно получить полную информацию о распределении флуорофоров по величине константы безызлучательной дезактивации k_{nr} (т.е. информацию о средней величине k_{nr0} и о ее вариации Δk_{nr}) для групп флуорофоров IgG-FITC, подверженных и не подверженных концентрационному тушению (табл. 5), а также о средних значениях квантового выхода флуоресценции. Значения квантового выхода флуоресценции, усредненного по всему ансамблю флуорофоров,

$$\langle \Phi \rangle = \frac{k_r \int \tau \alpha(\lg \tau) d(\lg \tau)}{\int \alpha(\lg \tau) d(\lg \tau)}, \quad (10)$$

а также аналогичные значения $\langle \Phi \rangle_i$ для i -го пика в распределении флуорофоров по временам жизни приведены

в табл. 5. Величины τ и $\langle \tau \rangle$, характеризующие среднюю длительность кинетики флуоресценции и рассчитанные на основании распределения флуорофоров по временам жизни $\alpha(\lg \tau)$ (табл. 5), хорошо соотносятся с результатами моделирования кинетики мультиэкспоненциальной функцией затухания (табл. 3).

Как можно видеть, среднее значение квантового выхода флуоресценции $\langle \Phi \rangle$ для IgG-FITC, нанесенного на поверхность пленки без коллоидов, хорошо коррелирует с величиной τ_α и лежит в диапазоне 0.2–0.3. Это существенно ниже, чем квантовый выход для свободного FITC в растворе ($\Phi = 0.93$), и связано с эффектом концентрационного тушения, которое проявляется для 70–80% остатков FITC. Для остатков FITC, испытывающих концентрационное тушение, среднее значение квантового выхода снижается до $\langle \Phi_1 \rangle \sim 0.1–0.2$. Для оставшихся групп FITC, не подверженных концентрационному тушению, значение $\langle \Phi_2 \rangle$ в $\sim 3–5$ раз выше, но не достигает величины 0.93, что может свидетельствовать об изменении микроокружения и увеличении взаимодействия остатков FITC с белковыми группами при переходе от раствора к твердофазной пленке. Изменение числа слоев полиэлектролита в пленках без коллоидных NP приводит к небольшим изменениям в параметрах кинетики и значениях $\langle \Phi \rangle$, однако в связи с отсутствием причин существенного изменения флуоресцентных свойств IgG-FITC данная вариация отражает, по нашему

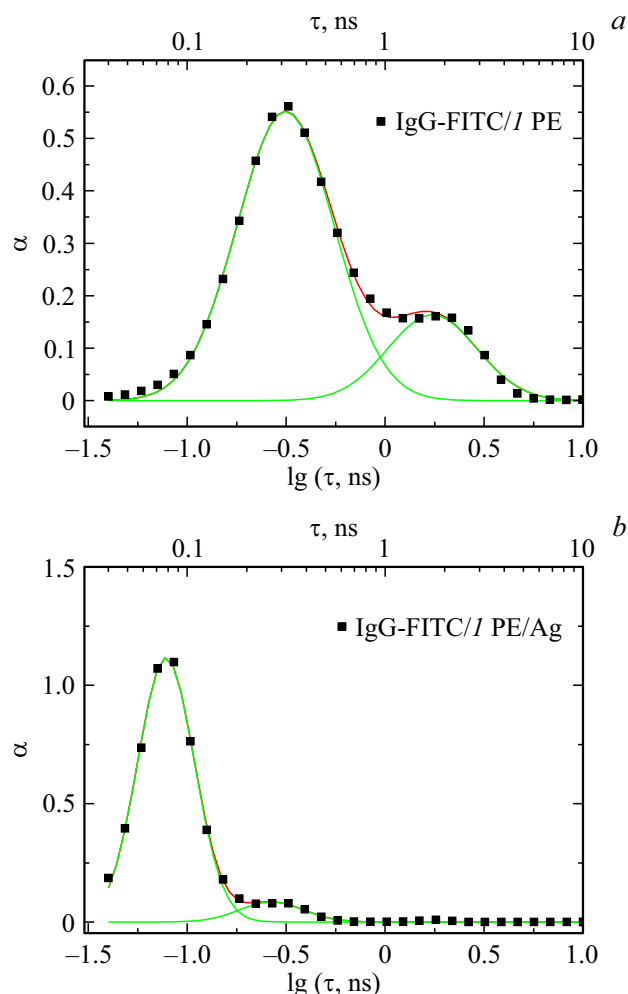


Рис. 6. Разложение распределения $\alpha(\lg \tau)$ на кривые Гаусса для IgG-FITC/1 PE (a) и IgG-FITC/1 PE/Ag (b).

мнению, уровень случайной погрешности, связанной с неодинаковой поверхностной плотностью белка в пленке для разных образцов.

Присутствие коллоидных NP в пленке приводит к смещению пиков распределения излучательных центров в область меньших времен жизни (рис. 5, b), причем пик в области коротких времен жизни становится доминирующим. Разложение распределения $\alpha(\lg \tau)$ на гауссианы для образца IgG-FITC/1 PE/Ag приведено на рис. 6, а параметры полученных гауссиан — в табл. 3.

Для пленки IgG-FITC/1 PE/Ag с минимальным расстоянием между слоями Ag коллоидов и меченым белком 3.4 ± 2 nm доля флуорофоров, относящихся к 1-му пику в распределении при $\tau_{m1} \sim 0.1$ ns (рис. 5, 6, табл. 6), составляет 0.92 и постепенно снижается до 0.62 по мере увеличения числа слоев полиэлектролитов, отделяющих Ag NP и IgG-FITC. Это указывает на существенную гетерогенность излучающих центров и, вероятно, отражает наличие распределения по расстояниям между коллоидными NP и FITC вследствие неопределенности в локализации флуоресцентной группы (± 2 nm) в со-

ставе белковой молекулы. Необходимо отметить, что $\tau_{m1} \sim 0.1$ ns будет являться верхней оценкой длительности флуоресценции для флуорофоров, соответствующих 1-му пику распределения, поскольку временное разрешение нашего спектрометра составляет также ~ 0.1 ns и в этом случае корректнее говорить, что $\tau_{m1} \leq 0.1$ ns.

Если не принимать в расчет возможное изменение диаграммы направленности излучения, то усиление флуоресценции вблизи металлических поверхностей связывают с двумя факторами [12,23,54]: 1) локальным усилением напряженности поля падающей световой волны вблизи металлических наноструктур, приводящим к росту вероятности возбуждения флуорофора, и 2) изменением квантового выхода флуоресцирующего объекта за счет изменения вероятности спонтанных оптических переходов (эффект Парселла).

При этом изменение квантового выхода для флуорофора в присутствии Φ_M и отсутствии Φ_0 металлических наноструктур определяется из выражения [54]

$$\frac{\Phi_M}{\Phi_0} = \frac{\gamma_r}{(\gamma_r + k_{nr} + \gamma_{nr})} \frac{(k_r + k_{nr})}{k_r},$$

где γ_r — константа скорости излучательного перехода вблизи металлических наноструктур, γ_{nr} — константа скорости переноса энергии от флуорофора к коллоидам металла, ведущего к тушению флуоресценции. Здесь неявно предполагается, что в присутствии металлических наноструктур изменением величины k_{nr} флуорофора можно пренебречь. В рамках указанной модели кинетика затухания флуоресценции вблизи металлических наноструктур характеризуется временем жизни $\tau = (\gamma_r + \gamma_{nr} + k_{nr})^{-1}$.

Определение γ_r или γ_{nr} требует независимых экспериментальных данных о величине квантового выхода флуоресценции, измерение которого для исследуемых систем в пленках представляет технические сложности. В связи с этим мы оценивали величину константы скорости излучательного перехода γ_r в присутствии коллоидов на основе расчетов в рамках описанной ранее теоретической модели [12].

Относительная величина изменения усредненной по ориентации константы скорости излучательного перехода $\langle \gamma_r/k_r \rangle$ для флуоресцентной молекулы на расстоянии Δr от сферической Ag-наночастицы с размером 40 nm в воздухе для различных длин волн эмиссии приведена на рис. 7. На основе зависимости величины $\langle \gamma_r/k_r \rangle$ при измерении интенсивности флуоресценции на 520 nm, где наблюдается максимум флуоресценции FITC (рис. 7, b), и расстояния между слоями Ag NP и FITC (табл. 1) была оценена величина константы скорости излучательного перехода γ_r для IgG-FITC в составе металлодиэлектрической пленки (табл. 6) и средние значения квантового выхода флуоресценции с использованием выражения (10).

Как можно видеть из табл. 6, среднее значение квантового выхода флуоресценции $\langle \Phi \rangle$ для всего ансамбля флуорофоров FITC в пленке с коллоидами не превышает

Таблица 6. Параметры кинетики флуоресценции для IgG-FITC в составе мультислойных пленок с коллоидами. $\lambda_{ex} = 467$ nm, $\lambda_{fl} = 520$ nm

Samples	$\gamma_r, 10^9$ s ⁻¹	1 st peak			2 nd peak			All FITC residues		
		A ₁	τ_{m1}, ns	$\langle\Phi_1\rangle$	A ₂	τ_{m2}, ns	$\langle\Phi_2\rangle$	τ_a, ns	$\langle\tau\rangle, ns$	$\langle\Phi\rangle$
IgG-FITC/ 1 PE/Ag	0.60	0.92	0.08	0.05	0.08	0.27	0.17	0.1	0.26	0.06
IgG-FITC/ 3 PE/Ag	0.46	0.83	0.08	0.04	0.16	0.29	0.16	0.15	0.52	0.07
IgG-FITC/ 5 PE/Ag	0.37	0.72	0.15	0.06	0.30	0.32	0.26	0.29	0.96	0.11
IgG-FITC/ 7 PE/Ag	0.32	0.62	0.12	0.04	0.40	0.28	0.18	0.29	1.06	0.09

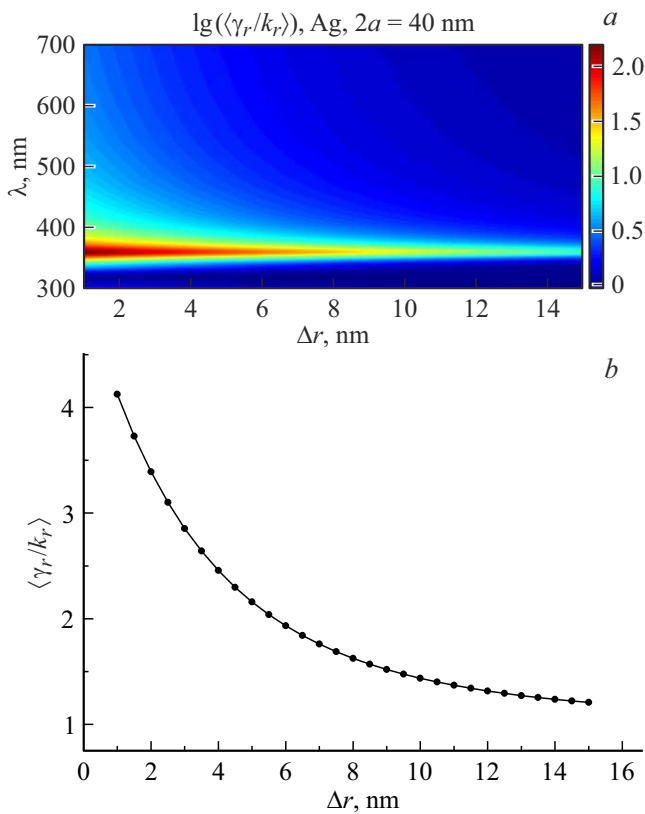


Рис. 7. *a* — изменение десятичного логарифма отношения констант скоростей излучательного перехода γ_r/k_r , усредненных по ориентации, в зависимости от длины волны флуоресценции и от расстояния до сферической наночастицы серебра с размером 40 nm. *b* — зависимость отношения констант скоростей излучательного перехода γ_r/k_r , усредненных по ориентации от расстояния флуорофора до Ag-наночастицы с размером 40 nm.

величину $\langle\Phi\rangle = 0.11$, т.е. влияние Ag NP ($d = 40$ nm) не приводит к увеличению квантового выхода, и в ~ 2 раза ниже, чем аналогичное значение $\langle\Phi\rangle$ для пленок без коллоидов (табл. 5). Таким образом, пик в распределении $\alpha(\lg \tau)$ при $\tau_{m1} \sim 0.1$ ns соответствует группе молекул FITC, испытывающих тушение флуоресценции $\langle\Phi_1\rangle \leq 0.06$ вследствие эффективного переноса энергии на Ag NP с последующей диссипацией в тепло. Для вто-

рой группы флуорофоров в распределении с пиком при $\tau_{m2} \sim 0.3$ ns величина $\langle\Phi_2\rangle$ в ~ 4 раза выше и максимум квантового выхода наблюдается при среднем расстоянии 8.6 ± 2 nm между слоями FITC и коллоидных Ag NP.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что усиление флуоресценции FITC в присутствии Ag NP с $d = 40$ nm, о котором сообщалось ранее [17], обусловлено не увеличением квантового выхода флуоресценции FITC, а главным образом связано с увеличением вероятности возбуждения флуорофоров в присутствии коллоидных Ag NP.

Выводы

Проведено экспериментальное исследование кинетики затухания флуоресценции конъюгатов IgG-FITC, иммобилизованных на поверхности диэлектрических и металло- диэлектрических пленок, в которой слой белка и слой коллоидных Ag NP со средним размером 40 nm отделялись чередующимися слоями полиэлектролитов PDADMAC/PSS с числом слоев от 1 до 7. Перевод IgG-FITC из буферного раствора в состав твердофазной диэлектрической пленки, образованной полиэлектролитами PDADMAC/PSS, приводит к изменению характера кинетики затухания флуоресценции вследствие проявления эффектов концентрационного тушения. Обнаружена зависимость длительности кинетики IgG-FITC в составе металло- диэлектрических пленок в зависимости от расстояния между слоями коллоидных Ag NP и меченного белка.

Для интерпретации полученных результатов кривые затухания свечения FITC моделировались непрерывным распределением излучателей по длительности затухания с использованием метода максимума энтропии. Изменение константы скорости излучательного перехода для FITC в зависимости от расстояния до NP металла оценивалось с использованием ранее опубликованной теоретической модели [12]. На основе полученных распределений флуорофоров по временам жизни $\alpha(\lg \tau)$ оценены усредненные по ансамблю квантовые выходы флуоресценции для конъюгатов IgG-FITC, расположенных на различном удалении от плазмонной пленки серебра, и обнаружено, что усиление флуоресценции

ФИТС вблизи коллоидных NP не связано с ростом квантового выхода флуоресценции (поскольку увеличение γ_r компенсируется более сильным возрастанием константы безызлучательного перехода γ_{nr}), а обусловлено изменением эффективности возбуждения вследствие усиления локального поля световой волны. Максимум квантового выхода IgG-ФИТС наблюдался при среднем расстоянии 8.6 ± 2 nm между ФИТС и плазмонной пленкой серебра.

Благодарности

Авторы признательны И.В. Коктыш и Я.И. Мельниковой за обсуждение результатов работы и помощь в приготовлении образцов для исследования, И.Г. Мотевич за проведение отдельных спектральных измерений и А.А. Романенко за обсуждение результатов исследований.

Финансирование работы

Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета благодарит за финансовую поддержку Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (проект № Ф22ТУРЦ-007) и Министерство образования Республики Беларусь (ГПНИ „Фотоника и электроника для инноваций“, задание 1.5).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J.R. Lakowicz, J. Malicka, S. D'Auria, I. Gryczynski. *Anal Biochem.*, **320** (1), 13 (2003). DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00351-8
- [2] О.С. Кулакович, Н.Д. Стрекаль, М.В. Артемьев, А.П. Ступак, С.А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **73** (6) 797 (2006). [O. Kulakovich, N. Strekal', M. Artem'ev, A. Stupak, S. Maskevich, S. Gaponenko. *J. Appl. Spectrosc.*, **73** (6), 892 (2006). DOI: 10.1007/s10812-006-0172-3].
- [3] K. Kneipp. *Physics Today*, **60** (11), 40 (2007). DOI: 10.1063/1.2812122
- [4] M.I. Stockman. *Physics Today*, **64** (2), 39 (2011). DOI: 10.1063/1.3554315
- [5] A. Steinbrück, A. Csaki, W. Fritzsche. *Reviews in Plasmonics 2010* (Springer New York, 2012), p. 1. DOI: 10.1007/978-1-4614-0884-0_1
- [6] N. Strekal, S. Maskevich. *Reviews in Plasmonics 2010* (Springer New York, 2012), p. 283. DOI: 10.1007/978-1-4614-0884-0_11
- [7] А.А. Романенко, С.В. Ващенко, В.В. Станкевич, А.Я. Луневич, Ю.Ф. Глухов, С. В. Гапоненко. *Журн. прикл. спектр.*, **81** (2) 228 (2014). [A. Ramanenka, S. Vaschenko, V. Stankevich, A.Y. Lunevich, Y.F. Glukhov, S. Gaponenko. *J. Appl. Spectrosc.*, **81** (2), 222 (2014). DOI: 10.1007/s10812-014-9913-x].
- [8] J. Luan, A. Seth, R. Gupta, Z. Wang, P. Rathi, S. Cao, H. Ghomami Derami, R. Tang, B. Xu, S. Achilefu, J.J. Morrissey, S. Singamaneni. *Nature Biomedical Engineering*, **4** (5), 518 (2020). DOI: 10.1038/s41551-020-0547-4
- [9] В.Ф. Аскирка, Д.В. Гузатов, С.А. Маскевич. *Опт. и спектр.*, **129**, 223 (2021). DOI: 10.21883/OS.2021.02.50562.195-20 [V. Askirka, D. Guzatov, S. Maskevich. *Opt. Spectrosc.*, **129**, 261 (2021). DOI: 10.1134/S0030400X21020028].
- [10] M. Wang, M. Wang, G. Zheng, Z. Dai, Y. Ma. *Nanoscale Advances*, **3** (9), 2448 (2021). DOI: 10.1039/D0NA01050B
- [11] N. Strekal, O. Kulakovich, V. Askirka, I. Sveklo, S. Maskevich. *Plasmonics*, **4** (1), 1 (2009). DOI: 10.1007/s11468-008-9063-1
- [12] D.V. Guzatov, S.V. Vaschenko, V.V. Stankevich, A.Y. Lunevich, Y.F. Glukhov, S.V. Gaponenko. *J. Phys. Chem. C*, **116** (19), 10723 (2012). DOI: 10.1021/jp301598w
- [13] A. Muravitskaya, O. Kulakovich, P.M. Adam, S. Gaponenko. *Phys. Stat. Sol. B*, **255** (4), 1700491 (2018). DOI: 10.1002/pssb.201700491
- [14] S. Vaschenko, A. Ramanenka, O. Kulakovich, A. Muravitskaya, D. Guzatov, A. Lunevich, Y. Glukhov, S. Gaponenko. *Proc. Engin.*, **140**, 57 (2016). DOI: 10.1016/j.proeng.2015.08.1111
- [15] И.В. Коктыш, Я.И. Мельникова, О.С. Кулакович, А.А. Романенко, С.В. Ващенко, А.О. Муравицкая, С.В. Гапоненко, С.А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **87**, 808 (2020). [I. Koktysh, Y.I. Melnikova, O. Kulakovich, A. Ramanenka, S. Vaschenko, A. Muravitskaya, S. Gaponenko, S. Maskevich. *J. Appl. Spectrosc.*, **87**, 870 (2020). DOI: 10.1007/s10812-020-01083-2].
- [16] O. Kulakovich, A. Scherbovich, I. Koktysh, Y. Melnikova, A. Ramanenka, S. Gaponenko, S. Maskevich. *Z. Phys. Chem.*, **236** (11–12), 1603 (2022). DOI: 10.1515/zpch-2021-3110
- [17] О.С. Кулакович, А.А. Щербович, А.А. Романенко, И.В. Коктыш, Я.И. Мельникова, С.В. Гапоненко, С.А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **90** (1), 48 (2023). [O. Kulakovich, A. Shcherbovich, A. Ramanenka, I. Koktysh, Y.I. Melnikova, S. Gaponenko, S. Maskevich. *J. Appl. Spectrosc.*, **90** (1), 42 (2023). DOI: 10.1007/s10812-023-01500-2].
- [18] S.V. Gaponenko, D.V. Guzatov. *Proc. IEEE*, **108** (5), 704 (2020). DOI: 10.1109/jproc.2019.2958875
- [19] D.V. Guzatov, S.V. Gaponenko, H.V. Demir. *AIP Advances*, **8** (1), 015324 (2018). DOI: 10.1063/1.5019778
- [20] X. Yang, P.L. Hernandez-Martinez, C. Dang, E. Mutlugun, K. Zhang, H.V. Demir, X.W. Sun. *Advanced Opt. Mater.*, **3** (10), 1439 (2015). DOI: 10.1002/adom.201500172
- [21] Z. Lei, M. Liu, W. Ge, X. Yang, J. Chen, Y. Lu. *J. Lumin.*, **206**, 359 (2019). DOI: 10.1016/j.jlumin.2018.10.052
- [22] A.P. Demchenko. *Introduction to fluorescence sensing* (Cham: Springer, 2015). DOI: 10.1007/978-3-319-20780-3
- [23] M. Bauch, K. Toma, M. Toma, Q. Zhang, J. Dostalek. *Plasmonics*, **9**, 781 (2014). DOI: 10.1007/s11468-013-9660-5
- [24] A.B.T. Ghisaidoobe, S.J. Chung. *International J. Mol. Sci.*, **15** (12), 22518 (2014). DOI: 10.3390/ijms151222518
- [25] J.R. Alcala, E. Gratton, F. Prendergast. *Biophys. J.*, **51** (4), 597 (1987). DOI: 10.1016/S0006-3495(87)83384-2
- [26] E.P. Diamandis. *Clin. Biochem.*, **21** (2), 139 (1988). DOI: 10.1016/0009-9120(88)90001-x
- [27] A.K. Hagan, T. Zuchner. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400** (9), 2847 (2011). DOI: 10.1007/s00216-011-5047-7
- [28] H. Mishra, B.L. Mali, J. Karolin, A.I. Dragan, C.D. Geddes. *PCCP*, **15** (45), 19538 (2013). DOI: 10.1039/C3CP50633A

- [29] Y.-T. Liu, X.-F. Luo, Y.-Y. Lee, I.-C. Chen. *Dyes and Pigments*, **190**, 109263 (2021). DOI: 10.1016/j.dyepig.2021.109263
- [30] J.S. Beckwith, C.A. Rumble, E. Vauthey. *Int. Rev. Phys. Chem.*, **39** (2), 135 (2020). DOI: 10.1080/0144235X.2020.1757942
- [31] N. Dordević, J.S. Beckwith, M. Yarema, O. Yarema, A. Rosspeintner, N. Yazdani, J. Leuthold, E. Vauthey, V. Wood. *ACS Photonics*, **5** (12), 4888 (2018). DOI: 10.1021/acsp Photonics.8b01047
- [32] P.C. Lee, D. Meisel. *J. Phys. Chem.*, **86** (17), 3391 (1982). DOI: 10.1021/j100214a025
- [33] O. Kulakovich, L. Gurinovich, H. Li, A. Ramanenka, L. Trotsiuk, A. Muravitskaya, J. Wei, H. Li, N. Matveevskaya, D.V. Guzatov, S. Gaponenko. *Nanotechnology*, **32** (3), 035204 (2021). DOI: 10.1088/1361-6528/abbdde
- [34] F. Caruso. *Adv. Mater.*, **13** (1), 11 (2001). DOI: 10.1002/1521-4095(200101)13:1<11::AID-ADMA11>3.0.CO;2-N
- [35] В. Степуро. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2*, **5** (1), 52 (2001).
- [36] А. Маскевич, В. Степуро, П. Балинский. *Журн. прикл. спектр.*, **77** (2), 209 (2010). [A. Maskevich, V. Stsiapura, P. Balinski. *J. Appl. Spectrosc.*, **77** (2), 194 (2010). DOI: 10.1007/s10812-010-9314-8].
- [37] А. Маскевич, В. Степуро, С. Кургузенков, А. Лавыш. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2*, **3** (159), 107 (2013).
- [38] M. Vincent, J. Gallay, A.P. Demchenko. *J. Phys. Chem.*, **99** (41), 14931 (1995). DOI: 10.1021/j100041a006
- [39] A. Livesey, J. Brochon. *Biophys. J.*, **52** (5), 693 (1987). DOI: 10.1016/S0006-3495(87)83264-2
- [40] J.-C. Brochon. *Methods Enzymol.*, **240**, 262 (1994). DOI: 10.1016/s0076-6879(94)40052-0
- [41] A. Siemiarz, B.D. Wagner, W.R. Ware. *J. Phys. Chem.*, **94** (4), 1661 (1990). DOI: 10.1021/j100367a080
- [42] P.J. Steinbach, R. Ionescu, C.R. Matthews. *Biophys. J.*, **82** (4), 2244 (2002). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75570-7
- [43] R. Esposito, C. Altucci, R. Velotta. *J. Fluoresc.*, **23** (1), 203 (2013). DOI: 10.1007/s10895-012-1135-0
- [44] A.T. Kumar, L. Zhu, J. Christian, A.A. Demidov, P.M. Champion. *J. Phys. Chem. B*, **105** (32), 7847 (2001). DOI: 10.1021/jp0101209
- [45] E. Henry, E. Deprez, J.-C. Brochon. *J. Mol. Struct.*, **1077**, 77 (2014). DOI: 10.1016/j.molstruc.2013.12.079
- [46] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectrosc.*, **51** (6), L7 (1995). DOI: 10.1016/0584-8539(95)01421-P
- [47] C. Deka, B.E. Lehnert, N.M. Lehnert, G.M. Jones, L.A. Sklar, J.A. Steinkamp. *Cytometry*, **25** (3), 271 (1996). DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(19961101)25:3<271::AID-CYTO8>3.0.CO;2-I
- [48] G. Hungerford, J. Benesch, J.F. Mano, R.L. Reis. *Photochem. & Photobiolog. Sci.*, **6** (2), 152 (2007). DOI: 10.1039/b612870j
- [49] E. Grell, E. Lewitzki, H. Ruf, K. Brand, F.W. Schneider, T. von der Haar, K.A. Zachariasse. *J. Fluoresc.*, **4** (3), 251 (1994). DOI: 10.1007/bf01878459
- [50] E. Lewitzki, E. Schick, R. Hutterer, F.W. Schneider, E. Grell. *J. Fluoresc.*, **8** (2), 115 (1998). DOI: 10.1023/a:1022542208027
- [51] R.F. Chen, J.R. Knutson. *Anal. Biochem.*, **172** (1), 61 (1988). DOI: 10.1016/0003-2697(88)90412-5
- [52] P. Dennler, E. Fischer, R. Schibli. *Antibodies*, **4** (3), 197 (2015). DOI: 10.3390/antib4030197
- [53] K. Palo, L. Brand, C. Eggeling, S. Jäger, P. Kask, K. Gall. *Biophys. J.*, **83** (2), 605 (2002). DOI: 10.1016/s0006-3495(02)75195-3
- [54] О. Кулакович, С. Гапоненко, Д. Гузатов. *Журн. прикл. спектр.*, **90** (3), 447 (2023). [O. Kulakovich, S. Gaponenko, D. Guzatov. *J. Appl. Spectrosc.*, **90** (3), 567 (2023). DOI: 10.1007/s10812-023-01567-x].