

**Classification of fluorescent
organic compounds
Medvedev E. (Russian Federation)
Классификация флуоресцентных
органических соединений
Медведев Е. А. (Российская Федерация)**

*Медведев Евгений Анатольевич / Medvedev Evgeny – бакалавр,
факультет компьютерных технологий, кафедра биомедицинских систем,
Национальный исследовательский университет Московский институт электронной техники, г. Москва*

Аннотация: в статье рассматриваются различные семейства флуоресцентных органических красителей, описываются их спектральные характеристики и области применения.

Abstract: the article considers the various families of fluorescent organic dyes, described their spectral characteristics and applications.

Ключевые слова: органические красители, флуоресцентные белки, спектры флуоресценции, флуоресценция, визуализация, квантовый выход, флуорофоры.

Keywords: organic dyes, fluorescent proteins, fluorescence spectra, fluorescence imaging, quantum yield, fluorophores.

Флуоресценция – это испускание света веществом, которое поглотило свет или другое электромагнитное излучение. В этом процессе излучаемый свет имеет большую длину волны, и соответственно, меньшую энергию излучения, чем поглощённый.

При поглощении фотонов энергии в молекуле флуорофора наблюдается переход электронов из основного состояния на один из подуровней возбуждённого. В возбуждённом состоянии происходит процесс релаксации, при котором молекула теряет часть своей энергии и опускается до самого низкого подуровня возбуждённого состояния. После чего с низшего подуровня происходит переход в основное состояние, что сопровождается флуоресценцией. Из-за потерь энергии во время перехода от более высоких уровней, возбуждённого состояния на самый нижний колебательный подуровень, испускаемое излучение имеет меньшую энергию, а значит большую длину волны, по сравнению со светом, поглощённым в начале.

Эндогенные флуорофоры

Большой вклад во флуоресценцию биоткани вносят эндогенные флуорофоры, в их состав входят ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин и триптофан.

Эти три молекулы возбуждаются в УФ-диапазоне. Наиболее выраженными люминесцентными свойствами обладает триптофан. Его максимум поглощения приходится на длину волны 275 нм, а максимум излучения находится в пределах 350 нм. Фотофизические данные трёх флуорофоров приведены в таблице 1.

Таблица 1. Люминесцентные данные флуоресцентных аминокислот

Название	Поглощение, нм	Излучение, нм	Коэффициент экстинкции нм ⁻¹ М ⁻¹ см ⁻¹	Квантовый выход
Фенилаланин	260	282	200	0,024
Тирозин	275	303	1500	0,2
Триптофан	287	350	6000	0,14

Раствор фенилаланина имеет слабую флуоресценцию по сравнению с растворами тирозина и триптофана, что сказывается на его квантовом выходе и молярной экстинкции.

Спектры излучения тирозина сильно зависят от таких факторов как температура, присутствие акцепторов и самой среды. Его квантовый выход является самым высоким из трёх аминокислот, но значение уменьшается на 40-90% при связывании с белком.

Флуоресценция триптофана позволяет исследовать структуру клеток и организма. Он обладает самой высокой яркостью и имеет наибольшую длину волны излучения по сравнению с другими флуоресцентными аминокислотами [1].

Цианиновые красители

Цианиновые красители представляют собой молекулы, содержащие цепь из нечётного числа метиновых групп между 2-мя атомами азота. Благодаря особенностям своей структуры цианины обладают очень большим коэффициентом экстинкции, достигающим $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. С помощью различных заместителей можно контролировать различные свойства цианиновых красителей, например, длину волны возбуждения, фотостабильность. Выбирая различные полимерные цепочки, можно также регулировать длину волны поглощения и излучения: длинноцепочечные цианины поглощают излучение в более длинноволновой области, вплоть до ближнего ИК [2].

Многочисленные цианины и связанные полиметиновые структуры могут использоваться в качестве метки для белков и ДНК. Но наиболее распространённое применение флуорофоры имеют в научных исследованиях.

Среди циановых красителей выделяют два вида: сульфированные и несulfированные цианины. Их спектральные свойства примерно одинаковые и оба типа можно использовать для мечения биомолекул. Различие заключается в способности растворяться в воде: первые растворимы, и не требуют добавления органических растворителей при мечении. Что касается несulfированных, то эти цианины должны быть растворены в органическом растворителе и в таком виде добавлены к раствору молекулы-мишени.

Флуоресцеин

Флуоресцеин представляет собой синтетическое органическое соединение в виде тёмно-оранжевого порошка, слабо растворим в воде, лучше в водных растворах щелочей и этаноле. Химическая формула $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Раствор флуоресцеина хорошо светится в ультрафиолетовых лучах и обладает жёлто-зелёной люминесценцией. Спектральные характеристики флуоресцеина имеют максимум поглощения при 490 нм и эмиссию в 514 нм, что делает его отличным средством для визуализации процессов в организме.

Очень широкое применение нашли производные флуоресцеина в иммуноцитохимии. Для этого используют реакции флуоресцентных маяков с белками-антителами и затем по люминесценции маяка судят о путях распространения антитела по организму. Наличие флуоресцеина в клетке можно регистрировать с помощью люминесцентного микроскопа или спектрофлуориметра [3].

Родамины

Родамины – это семейство флуороновых красителей, широко используемых в качестве флуорофоров. Ключевые характеристики этого класса это: низкая рН чувствительность и настраиваемые спектральные свойства. Различные замещения N-алкильных радикалов могут привести к коррекции спектральных характеристик родамина. Простейший член этого класса – родамин 110, с молекулярной формулой $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ и спектральными характеристиками в зелёной области.

Другими представителями этого класса являются: родамин 6G и родамин В. В возбуждённом состоянии их длина волны находится в жёлто-красной области спектра. Люминесценцию родаминов легко обнаружить с помощью флуориметра. Они проникают в клетки легче, чем производные флуоресцеина. Находят своё применение родамины во флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и иммуноферментном анализе [4].

Существуют гибридные конструкции между флуоресцеином и родамином, которые демонстрируют отличные люминесцентные свойства. В зависимости от выбора заместителей, максимумы поглощения варьируется от 490 до 550 нм с коэффициентом экстинкции более $50000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, а максимумы излучения составляют 520-580 нм. Некоторые примеры показывают возможность поглощения в пределах 515 нм, что является полезным для многоцветной флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Флуоресцентные белки

Флуоресцентные белки (ФБ) являются наиболее распространёнными флуоресцентными метками в молекулярной и клеточной биологии. Благодаря сочетанию технологий мечения, высокой высокоточной микроскопии и компьютерному анализу изображений, стало возможно единовременное изучение локализации и функции сотен различных белков [5, 6].

Органические красители, класс ФБ, имеют высококонсервативную пространственную структуру и наделены способностью к формированию хромофоров – групп атомов, обуславливающего цвет химического соединения.

Хромофор формируется из аминокислотных остатков, это делает возможным поглощение и испускание видимого света. Сам белок представляет собой типичную бета-складчатую структуру, формирующую «бочонок», внутри которого находится хромофор. Оболочка цилиндра защищает хромофор от тушения его флуоресценции компонентами микроокружения. Кроме этого, внутренняя структура молекулы вызывает специфические реакции, что приводит к образованию хромофора. Этот процесс называется созреванием и включает несколько этапов, каждый из которых формирует промежуточный или конечный продукты с различными спектральными свойствами [7].

Первым представителем этого класса является ЗФБ – зелёный флуоресцентный белок с очень яркой флуоресценцией. Его спектры возбуждения лежат в пределах 395 и 475 нм, а максимум флуоресценции составляет 508 нм. Белок совершенно не токсичен и устойчив к фотообесцвечиванию, что позволяет проводить длительные исследования клеточной динамики.

Излучения полученных на сегодняшний день флуоресцентных белков покрывают почти весь видимый диапазон, начиная от голубого и расширяясь в ближний инфракрасный. Также, такой белок может синтезироваться внутри живой клетки, что позволяет обнаружить и визуализировать различные белки, образованные им [8].

Литература

1. *Vishwanath K., Ramanujam N.* Fluorescence spectroscopy in vivo // Encyclopedia of analytical chemistry, 2006.
2. *Yan D. et al.* Near-infrared absorption and polarized luminescent ultrathin films based on sulfonated cyanines and layered double hydroxide // The Journal of Physical Chemistry C., 2011. Vol. 115. № 16. P. 7939-7946.
3. *Urano Y. et al.* Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes // Journal of the American Chemical Society, 2005. Vol. 127. № 13. P. 4888-4894.
4. *Zehentbauer F. M. et al.* Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. Vol. 121. P. 147-151.
5. *Dean K. M., Palmer A. E.* Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging // Nature chemical biology, 2014. Vol. 10. № 7. P. 512-523.
6. *Sauer M., Hofkens J., Enderlein J.* Basic principles of fluorescence spectroscopy // Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles, 2011. P. 1-30.
7. *Campbell R. E. et al.* A monomeric red fluorescent protein // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. Vol. 99. № 12. P. 7877-7882.
8. *Chudakov D. M. et al.* Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // Physiological reviews, 2010. Vol. 90. № 3. P. 1106-1121.