УДК 953.01:537.5

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ КУБУЛУШУ ЖАНА ФЛУОРОФОРЛОР

Өзбекова Жылдызай Эрназаровна, PhD, и.о.доцент, «Тамак-аш инженерлиги» бөлүмү, Кыргыз-Түрк Манас университети, Бишкек ш., Кыргыз Республикасы, e-mail: zhyldyzai.ozbekova@manas.edu.kg

Аннотация. Бул жумуштун максаты, флуоресценция кубулушу, анын физикалык негиздери жана флуорофорлор тууралуу жалпы түшүнүк берүү. Флуоресценция молекулалардын дүүлүккөн абалдарын, молекулярдык процесстердин динамикасын, татаал химиялык жана биологиялык объекттердин түзүлүшүн жана касиеттерин изилдөөдө артыкчылык көрсөтөт. Бул флуоресценциянын кыска убакыт диапазону, жогорку

сезимталдыгы жана аппаратынын жөнөкөйлүгү менен байланыштуу. Көптөгөн биологиялык заттардын молекулалары табигый флуорофор болуп саналат. Ар бир флуорофор өзүнө тиешелүү гана толкун узундугунда дүүлүгөт жана эмиссия чыгарат. Флуоресценцияга негизги салымды белоктор кошот. Белоктордун өздүк флуоресценциясы 3 ароматикалык аминокислоталар: фенилаланин, тирозин жана триптофан менен шартталган. Бул үч аминокислотанын ичинен триптофандын флуоресценциясы белоктордун жалпы флуоресценциясынын 90% ын түзөт.

Ачкыч сөздөр: флуорофор, флуоресценция, аминокислоталар, белоктор, жарыктык, энергия, электрондор

ЯВЛЕНИЯ ФЛУОРЕССИИ И ФЛУОРОФОРЫ

Өзбекова Жылдызай Эрназаровна, и.о. доцента, кафедра «Пищевой инженерии», Кыргызско-Турецкий университет «Манас», г. Бишкек, Кыргызская Республика, e-mail: zhyldyzai.ozbekova@manas.edu.kg

Аннотация. Цель данной работы – дать общее представление о феномене флуоресценции, ее физических основах и флуорофорах. Флуоресценция является приоритетом в изучении возбужденных состояний молекул, динамики молекулярных процессов, структуры и свойств сложных химических и биологических объектов. Это связано с малым временным диапазоном флуоресценции, высокой чувствительностью и простотой устройства. Молекулы многих биологических веществ – естественные флуорофоры. Каждый флуорофор возбуждается и излучает на своей собственной длине волны. Белки вносят основной вклад в флуоресценцию. Самофлюоресценция белков вызывается 3 ароматическими аминокислотами: фенилаланином, тирозином и триптофаном. Из этих трех аминокислот флуоресценция триптофана составляет 90% от общей флуоресценции белков.

Ключевые слова: флуорофор, флуоресценция, аминокислоты, белки, свет, энергия, электроны.

ORGANOLEPTIC INDICATORS AND WATER-HOLDING CAPACITY OF SOUR MILK BEVERAGE THICKNESS

Өzbekova Zhyldyzai Ernazarovna, PhD, Acting Associate Professor, Tamak-ash Engineering League Bөlүmү, Kyrgyz-Turk Manas University, Bishkek, Kyrgyz Republics, e-mail: zhyldyzai.ozbekova@manas.edu.kg

Annotation. The purpose of this work is to give a general idea of the phenomenon of fluorescence, its physical basis and fluorophores. Fluorescence is a priority in the study of the excited states of molecules, the dynamics of molecular processes, the structure and properties of complex chemical and biological objects. This is due to the short time range of fluorescence, high sensitivity and simplicity of the device. The molecules of many biological substances are natural fluorophores. Each fluorophore is excited and emits at its own wavelength. Proteins make a major contribution to fluorescence. The self-fluorescence of proteins is caused by 3 aromatic amino acids: phenylalanine, tyrosine and tryptophan. Of these three amino acids, the fluorescence of tryptophan accounts for 90% of the total fluorescence of proteins.

Keywords: fluorophore, fluorescence, amino acids, proteins, light, energy, electrons

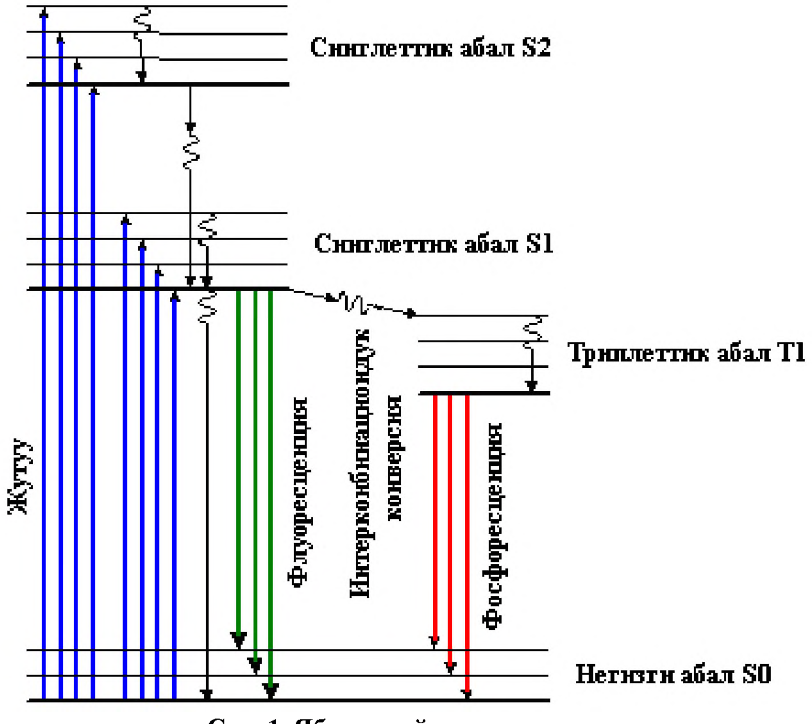
1. Флуоресценция кубулушу

Кванттык химиянын негиздерине ылайык, электрондор атомдордо энергетикалык деңгээлдерде жайгашкан. Молекуладагы энергетикалык деңгээлдер арасындагы аралык ал молекуланын түзүлүшүнөн көз каранды. Затты жарык менен нурлантууда ар кандай энергетикалык деңгээлдер арасында электрондордун өтүүлөрү мүмкүн. Энергетикалык деңгээлдер арасындагы энергиянын айырмасы жана жутулган жарыктын термелүү жыштыгынын арасындагы катышы төмөнкү теңдеме менен берилет (Бордун II постулаты).

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

Жарыктын жутулушунан кийин алынган системанын энергиясынын бир бөлүгү релаксация натыйжасынан коротулат. Бир бөлүгү кандайдыр бир энергиянын фотону түрүндө чыгарылат [1, 2].

Жарыктын жутулушун жана флуоресценцияны Яблонский тарабынан сунушталган энергия деңгээлинин диаграммасы (Яблонский диаграммасы) көрсөтөт (Сүрөт 1). Негизги электрондук абал S_0, дүүлүккөн синглеттик абалдар S_1, S_2 ж. б., дүүлүккөн триплеттик абал T_1 менен белгиленет. Бул ар бир энергия деңгээли көптөгөн термелүү энергетикалык деңгээлдерден турат. Нормалдуу шарттарда көптөгөн молекулалар негизинен электрондук абалда S_0 болушат. Молекула жарыкты жутканда дүүлүккөн абалга S_1 ге өтөт. Ар кандай электрондук деңгээлдер арасындагы өтүүлөр вертикалдуу сызыктар менен берилген [2, 3].



Сүр. 1. Яблонский диаграммасы

Флуоресценциянын өтүү убактысы 10^{-10} – 10^{-6} с түзөт [3]. Синглеттик дүүлүккөн абалдын салыштырмалуу аз жашоо убактысы S_1 ден S_0 деңгээлине өтүү спин боюнча уруксат берилген жана жогорку ыктымалдуулук менен өтөт. Ал эми фосфоресценцияны 10^{-10} – 1 с га чейинки убакыт мүнөздөйт, себеби T_1 ден S_0 деңгээлине өтүүгө спин боюнча уруксат берилген эмес; төмөнкү ыктымалдуулук жана төмөнкү ылдамдык менен өтөт [2, 3].

Синглеттик дүүлүккөн абалдарда, энергетикалык жогорку орбиталга ээ болгон электрон менен төмөнкү энергиядагы орбиталда жайгашкан экинчи электрон карама-каршы ориентациядагы спиндерге ээ. Электрондун дүүлүккөн синглеттик абалдан негизги абалга өтүүсүндө спининин ориентациясы өзгөрбөшү керек. Спиндин ориентациясы триплеттик абалдан синглеттик негизги абалга өтүүсүндө өзгөрүшү шарт. Флуоресценция – карама-каршы спиндеги электрондун төмөнкү орбиталга өтүүсүндө болуп өтүүчү эмиссия [3, 4].

Люминесценция – электрондук-дүүлүккөн абалдан фотондорду чыгаруу – негизги жана дүүлүккөн абалдардын жаратылышынан көз каранды болгон эки типтен түзүлөт [4]. Люминесценциянын физикалык жаратылышы электрондордун дүүлүккөн абалдан негизги абалга нурлануу (жарык чыгаруу) менен өтүүлөрүндөн турат. Системанын алгачкы дүүлүгүүсүнө ар кандай факторлор: тышкы нурлануу, химиялык реакция ж. б. таасир көрсөтүшү мүмкүн. Эгер дүүлүгүүнүн себеби тышкы (сырткы) нурлануу болсо, анда экинчилик нурлануунун чыгаруу (эмиссия) кубулушу фотолюминесценция деп аталат. Дүүлүккөн абалдар мультиплеттигине (суммалык спинине) жараша синглеттик (S) жана триплеттик (T) деп бөлүнүшөт. Жалпысынан алганда, мультиплеттик өзгөрүүсүз фотолюминесценция (S_1 ден S_0 го, T_1 ден T_0 го) флуоресценция деп аталат, ал эми мультиплеттик өзгөрүү менен болгон фотолюминесценция (T_1 ден S_0 го) – фосфоресценция деп аталат [3, 4, 5].

Флуоресценция – фосфоресценциядан айырмаланып кыска убакыттын ичинде дүүлүктүрүү бүткөндөн кийинки өчүп бараткан люминесценция [6]. Флуоресценция – зат менен электромагниттик нурлануудун өз ара аракеттешүүсү натыйжасында жүргөн физикалык кубулуш. Эреже катары, молекула жана атомдордун спонтандык кванттык өтүүлөрүндө пайда болот, ошондуктан флуоресценциянын узактыгы алардын дүүлүккөн абалынын жашоо убактысы менен аныкталат. Фосфоресценциядан айырмаланып флуоресценция энергия булагы болбогон учурда токтолот [2].

Флуоресценция, фотондун кошулмалар тарабынан жутулуп (10^{-9} с жашоо убактысындагы дүүлүккөн абалга өткөн), кайра алардан чыгарылышында байкалат. Бирок дүүлүккөн абалдагы молекула, өзүнүн энергиясын башка молекула менен түртүлүүсүнүн же ошол эле молекуладагы башка группага энергиясын берүүсүнүн натыйжасында жоготушу мүмкүн. Бул кубулуш флуоресценциянын өчүшү деп аталат [2, 4].

2. Флуорофорлор

Люминесценцияга ээ болгон заттар флуорофорлор деп аталат [3, 5, 6]. Жалпысынан айтканда, жеке флуоресценцияны бардык эле молекулалык системалар көрсөтө бербейт. Жарым каныкпаган, конденсацияланган, ароматикалык жана жарым ароматикалык байланыштар, өзгөчө гетеро-атомдук байланыштар жакшы флуоресценцияга ээ [5].

Маанилүү флуоресценцияны көрсөткөн заттардын электрондору негизинен делокалиделген жана формалдуу түрдө кошоктошкон кош байланыштарда жайгашкан.

Флуоресценцияга жөндөмдүү болгон ар бир молекула үчүн дүүлүгүү жана чыгаруу толкун узундуктары индивидуалдуу (Таблица 1). Молекулалардын флуоресценттик касиеттери аны курчаган айлана-чөйрөнүн курамы, касиети, температура, pH, иондордун концентрациясы ж. б. факторлордон көз каранды [2, 6].

Таблица 1.

Флуорофорлордун дүүлүгүү жана эмиссия максимумдары [2]

Флуорофор	**Дүүлүгүү максимуму (нм)**	**Эмиссия максимуму (нм)**
Аминокислоталар		
Триптофан	280	350
Тирозин	275	300
Фенилаланин	260	280
Структуралык белоктор		
Коллаген	325	400, 405
Эластин	290, 325	340, 400
Энзимдер жана коэнзимдер		
FAD, флавиндер	450	535

NADH	290, 351	450, 460
NADHP	336	464
Витаминдер		
А витамини	322	510
B_2 витамини	380	565
B_6 витамин компоненттери		
пиридоксин	332, 340	400
пиридоксаль	335	400
пиридоксамин	330	385
пиридоксин кислотасы	315	425
пиридоксальфосфат	330	400
Липиддер		
фосфолипиддер	436	540, 560
липофусцин	340 - 395	540, 430 - 460
цероид	340 - 395	430 - 460, 540
Порфириндер	400 - 450	630,690

Флуорофорлор табигый жана жасалма болушат. Биологиялык заттардын молекулаларынын көбү жаратылыштык же табигый флуорофорлор болуп саналат [3, 5].

2.1 Табигый флуорофорлор

Табигый флуорофорлор – белоктор, витаминдер жана коэнзимдер. Белоктордун жаратылыштык флуорофорлору болуп триптофан, тирозин жана фенилаланин аминокислоталары эсептелет (Таблица 1) [2, 6, 8].

Триптофан - белоктордогу эң эле интенсивдүү флуоресценцияга ээ болгон аминокислота болуп саналат. Орточо 90% белоктордун флуоресценциясы триптофандын калдыктары менен шартталган. Бул табигый флуорофор айлана-чөйрөнүн полярдуулугуна өтө сезгич келет. Белоктор жарыкты 280 нм де жутат, ал эми флуоресценция спектрлеринин максимуму 320-350 нм толкун узундугунда жатат. Триптофан калдыктарынын флуоресценциясынын өчүү убактысы 10^{-9} с диапазонунда жатат [6, 9].

Нуклеотиддер жана нуклеин кислоталары көбүнчө флуоресценцияга ээ эмес. Бирок дрожждордун $tRNA^{phe}$ сы интенсивдүү флуоресценттик негизге ээ.

NADH кофакторлору күчтүү флуоресценцияга ээ жана анын жарыкты максимум жутуусу 340 нм жана чыгаруусу 450 нм толкун узундугунда жатат.

Рибофлавин, флавинмононуклеотид жана флавинадениндинуклеотид жарыкты көрүнүүчү областтын 450 нм толкун узундугунда жутат жана 515 нм областында чыгарат [3].

Витаминдерден, А витамини (жутуусу-322 нм, эмиссиясы-387-510 нм), B_2 витамини (жутуусу-380 нм, эмиссиясы-525-531 нм) жана Е витамини табигый флуорофорлор болуп саналат [3, 6].

2.2 Жасалма флуорофорлор

Көбүнчө табигый флуоресценттик касиеттеги макромолекулалар эксперименттен күткөн маалыматтарды алууга мүмкүндүк бербейт. Ошондуктан изилденип жаткан системага байланышы болбосо да, эң жакшы спектралдык касиетти көрсөткөн жасалма

флуорофорлорду колдонууга туура келет. Жасалма флуорофорлорго флуоресцеин, родамин, дансилхлорид, нуклеин кислоталары, Са зонду, Mg зонду, Ph зонддору ж. б. кирет [3].

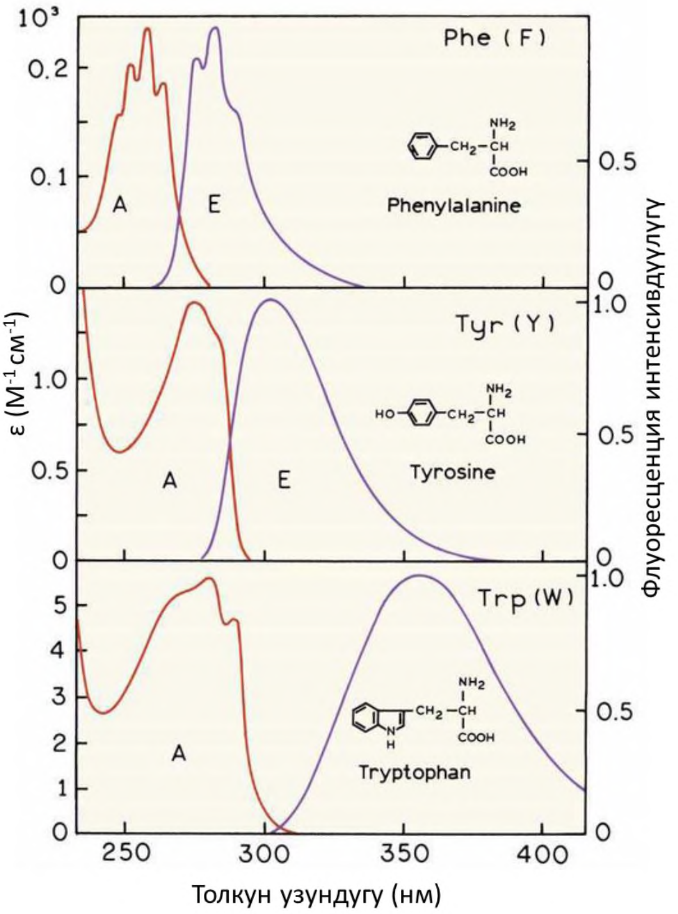
Изоцианат, флуоресцеин жана родамин изотиоцианаттары атайын жогорку кванттык чыгыштары үчүн тандалат. Ошондой эле, жогорку толкун узундуктагы жутуу жана чыгаруулары үчүн биологиялык үлгүлөрдүн фондук флуоресценция проблемасы азаят жана кварц оптикасынын колдонуу керектиги төмөндөйт [3, 8].

Дансилхлорид (DNS-C1) – дансилдик группалардын чыгаруу спектрлерине ээритменин полярдуулугу чоң таасир көрсөтөт. Нафтиламинсульфон кислотасы, 1-анилино-8-нафталинсульфон кислотасы (1.8-ATS же ANS), 2-n-толуидинилнафталин-6-сульфон кислотасы (2.6-TNS же TNS) жана алардын туундулары [10].

Гидрофобдук мембрандык зонддор - липиддер көбүнчө флуоресценцияга ээ эмес. Мембрандар көбүнчө перилен, 9-винилантрацен и 1.6-дифенилгексатриен (DPH) сыяктуу зонддор менен белгиленет.

Нуклеин кислоталары - АТР жана анын туундулары, мисалы ε-АТР ээритменин илешкектүүлүгүнө аябай сезгич келип, жогорку чектеги полярдуулуктагы флуоресценцияга ээ [6, 10].

Белоктордун өздүк флуоресценциясы 3 ароматикалык аминокислоталар – фенилаланин, тирозин жана триптофан менен шартталган. Флуоресценциясынын максимумдары фенилаланин үчүн 258, 282 нм, тирозин үчүн 276, 303 нм жана триптофан үчүн 280, 348 нм (Сүрөт 2) [3]. Гистидин жана пролин азыраак деңгээлдеги флуоресценцияга ээ [11].



Сүр. 2. Фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr) жана триптофандын (Trp) абсорбция жана флуоресценция спектрлери

Белоктордун максимум жутулушу 280 нм толкун узундугунда жатат. Альбуминдин жаркыроосу 380 нм толкун узундуктагы жарык менен дүүлүктүрүүдө 450 нм толкун узундугунда байкалган [8].

Белоктордун флуоресценттик аминокислоталарынын ичинен триптофан эң чоң флуоресценцияны көрсөтөт. Ошондой эле, триптофан эрүүчү цитоплазматикалык белоктордо 1 моль % концентрацияда жана мембрандык белоктордо 3 моль % концентрацияда кармалат [3,12].

Корутунду

Флуоресценция жогорку сезимталдуу жана молекулалардын дүүлүккөн абалдарын, фотохимиялык реакцияларды, молекулярдык процесстердин динамикасын, татаал химиялык жана биологиялык объекттердин касиеттерин изилдөөгө мүмкүнчүлүк түзөт. Ошондой эле, флуоресценциянын өтө ыңгайлуу убакыт диапазону артыкчылык көрсөтөт, себеби флуоресценциянын чыгышы жарыкты жутуп алгандан кийин ~10^{-9} с аралыгында жүрөт.

Биологиялык заттардын молекулаларынын көбү жаратылыштык б. а. табигый флуорофорлор болуп саналат. Эгерде изилдөөгө алынган молекуланын флуоресценттик касиети болбосо, ага флуоресценттик зонд же флуоресценттик белги колдонулат. Ар бир флуорофор өзүнө гана тиешелүү толкун узундугунда дүүлүгөт жана эмиссия чыгарат.

Флуоресценцияга негизги салымды белоктор кошот, белоктордун максимум жутуусу 280 нм толкун узундугунда жатат. Белоктордун өздүк флуоресценциясы 3 ароматикалык аминокислоталардын – фенилаланин, тирозин жана триптофан негизинде жүрөт. Бул үч аминокислотанын ичинен триптофан эң интенсивдүү флуоресценцияга ээ. Белоктордун жалпы флуоресценциясынын 90 % ы триптофандык калдыктар менен шартталган.

Колдонулган адабияттар

1. Черноуцан А.И. Краткий курс физики. – М.: ФизМатЛит, 2002. -320 с.
2. Зайдель А.Н., Островская Г.В., Островский Ю.И. Техника и практика спектроскопии. – М.: Наука, 1972.-375 с.
3. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (Third Edition).- Baltimor, USA: Center for Fluorescence Spectroscopy, 1986, -385p.
4. Никитин В. А. Спектрофотометр // Физическая энциклопедия / Гл. ред. А. М. Прохоров. - М.: Большая Российская энциклопедия, 1994.-704 с. ISBN 5-85270-087-8.
5. Sharma A., Schulman S. G. Introduction to Fluorescence Spectroscopy. United Kingdom: Wiley interscience, 1999. -226 p.
6. Rettig W., Strehmel B., Schrader S., Seifert H. Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine. Berlin: Springer, 1999. -457p.
7. Valeur Bernard. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley:Verlag GmbH, 2001. -569 p.
8. Колтовой Н.А. Краевой С.А. Флуоресцентные методы диагностики в медицине.-М.: Bookvika.ru. 2014. - 228 с.
9. Vivian J. T., Callis P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins // Biophysical Journal. -2001. -№80. -С. 93-109.
10. Rendell D., Mowthorpe D. J. Fluorescence and phosphorescence spectroscopy. London, UK: John Wiley and Sons Ltd, 1987. -119 p.
11. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка. - М.: Наука, 2003. - 188 с. ISBN 5-02-006453-X
12. Джунушалиева Т.Ш. Реагент для быстрой очистки питьевой воды / Джунушалиева Т.Ш., Борбиева Д.Б., Сыдыкова Ш.С. // Известия Кыргызского государственного технического университета им. И. Раззакова – 2017 - № 3 (43). – С. 58 – 63.