

УДК 577.3

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ВЛИЯЕТ НА МИГРАЦИЮ ЭНЕРГИИ ОТ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК К РЕАКЦИОННЫМ ЦЕНТРАМ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Rb. sphaeroides*

П. М. Красильников, Е. П. Лукашев, П. П. Нокс*, Н. Х. Сейфуллина,
член-корреспондент РАН А. Б. Рубин

Поступило 12.09.2018 г.

Температурная зависимость эффективности миграции энергии от покрытых гидрофильной полимерной оболочкой квантовых точек (КТ) CdSe/CdS/ZnS с максимумом флуоресценции при 580 нм к реакционным центрам (РЦ) бактерий *Rb. sphaeroides* практически постоянна в диапазоне температур от 100 до ~230–240 К, но затем снижается в 2,5–3 раза при дальнейшем росте температуры до 310 К. Анализ данной зависимости на основе теории Фёрстера показал, что основные изменения эффективности переноса энергии связаны с температурным изменением величины квантового выхода флуоресценции КТ, что обусловлено активацией внутримолекулярной подвижности в структуре РЦ.

Ключевые слова: квантовые точки, фотосинтетический реакционный центр, миграция энергии.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524842233-237>

В настоящее время интенсивно исследуются возможности создания фотопреобразующих устройств с использованием fotocувствительных белков, в частности фотосинтетических реакционных центров (РЦ), и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек, КТ). Квантовые точки имеют ряд важных преимуществ в качестве дополнительного светосборщика для потенциальных новых гибридных фотопреобразователей: высокий коэффициент экстинкции, большое сечение и широкий спектр поглощения, узкая полоса флуоресценции. Одним из важных моментов является стабильность функционирования подобных устройств в разных условиях. Она может достигаться в том числе высушиванием сохраняющих активность гибридных конструкций, а также включением их в различные органические матрицы [1, 2]. Важнейшим фактором, влияющим на перенос энергии электронного возбуждения от КТ к РЦ, является температура. Известно, что КТ — высокостабильные структуры, а РЦ сохраняют максимальную (100%) квантовую эффективность разделения зарядов при варьировании температуры от комнатных до криогенных значений [3].

Предметом настоящей работы явилось исследование эффективности миграции энергии от КТ к РЦ в широком диапазоне температур.

Фотосинтетические РЦ выделяли из клеток пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* при помощи детергента лаурилдиметиламинооксида (ЛДАО), как описано в работе [4]. Концентрация РЦ, ресуспендируемых в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,05% ЛДАО, составляла ~45 мкМ. В качестве КТ использовали нанокристаллы CdSe/CdS/ZnS, функционализированные гидрофильным полимерным покрытием с терминальными карбоксильными группами (PT-type, “Роснотех”, Россия). Квантовые точки имели максимум люминесценции при 580 нм.

Флуоресцентные измерения проводили с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (“HORIBA Jobin Yvon Inc.”, Франция). Время жизни флуоресценции τ регистрировали с помощью приставки TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) при возбуждении импульсным светодиодом NanoLED (“HORIBA Scientific”, Франция), $\lambda_{\text{излуч}} = 390$ нм, полуширина импульса 0,8 нс. Образцы замораживали с помощью жидкого азота в кювете криостата в темноте до 100 К. Затем температуру повышали с шагом 10 °С и в каждой температурной точке регистрировали спектр флуоресценции и время жизни флуоресценции КТ. Кинетику флуоресценции анализировали с помощью программы DAS-6 (Fluorescence Decay Analysis Software), как описано в работе [2]. Кинетические кривые наилучшим образом аппроксимировались в виде суммы трёх экспонент.

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова
*E-mail: knox@biophys.msu.ru

При изучении взаимодействия между КТ и РЦ в зависимости от температуры использовали водно-глицериновую (70%) суспензию КТ в концентрации 1 мкМ и РЦ в концентрации 10 мкМ, и воздушно-сухие плёнки в отношении РЦ/КТ = 3 : 1. Температурные зависимости, полученные для препаратов в водно-глицериновой суспензии и в виде сухой плёнки, были сходны. Однако для точных количественных оценок результаты измерений на плёночных препаратах были предпочтительнее, поскольку при измерении спектров флуоресценции в водно-глицериновой среде ухудшалась прозрачность образца из-за его растрескивания при низких температурах.

Как известно, эффективность миграции энергии по механизму Фёрстера зависит от перекрытия полос флуоресценции донора и поглощения акцептора. В данном случае это КТ с люминесценцией в области 580 нм и РЦ с поглощением в полосе Q_x в области 590 нм при температуре ~ 295 К. Предварительное исследование зависимости этих параметров от температуры показало, что спектральное положение максимума полосы Q_x РЦ практически не изменялось при понижении температуры вплоть до 100 К, однако сужение полосы приводило к увеличению поглощения: коэффициент молярной экстинкции изменялся от значения 68 000 до 96 000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Максимум спектра флуоресценции КТ при понижении температуры до 100 К практически линейно сдвигался на ~ 20 нм в коротковолновую область, а интенсивность флуоресценции при этом увеличивалась в 2–3

раза. Несмотря на ухудшение перекрытия полос люминесценции донора (КТ) и поглощения акцептора (РЦ) при криогенных температурах, увеличение квантового выхода излучения КТ и молярной экстинкции полосы Q_x поглощения РЦ приводило в итоге к низкотемпературному росту эффективности переноса энергии возбуждения от КТ к РЦ.

Для оценки эффективности (К) Фёрстеровского переноса энергии (FRET) от КТ к РЦ вычисляли относительное изменение интенсивности флуоресценции и времени жизни КТ в гибридном образце КТ + РЦ по сравнению с контрольным образцом чистых КТ. Использовали стандартные формулы вычисления $K = 1 - F/F_0$ и $K = 1 - \tau/\tau_0$, где F и τ — это интеграл под кривой флуоресценции и время жизни для КТ + РЦ, а F_0 и τ_0 — аналогичные параметры для КТ. Зависимость от температуры эффективности миграции энергии от КТ на РЦ — показателя K тушения флуоресценции КТ представлена на рис. 1 (кривая 1). Соответствующая температурная зависимость изменения среднего времени жизни флуоресценции КТ ($1 - \tau_{avr}/\tau_{avr}^0$) имеет сходный вид (кривая 2), что подтверждает факт увеличения эффективности миграции энергии возбуждения от КТ к РЦ при понижении температуры.

На полученных кривых отчётливо разделяются два температурных интервала: сильное увеличение тушения флуоресценции от 20 до 55% в интервале от 310 К до ~ 240 –230 К и последующее почти постоянное значение данного параметра при более низких температурах вплоть до 100 К.

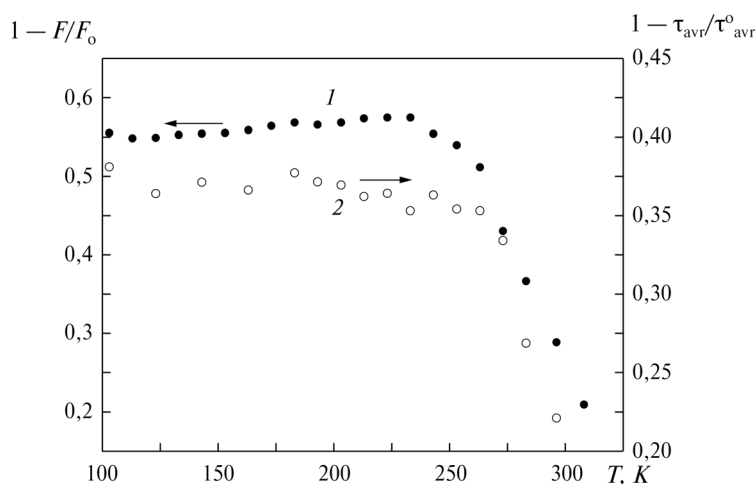


Рис. 1. Зависимость от температуры эффективности миграции энергии от КТ на РЦ в гибридной плёнке, измеренная по изменению интенсивности флуоресценции (закр. символы, шкала слева) и времени жизни КТ (открытые символы, шкала справа). Для каждой температурной точки величина F и τ_{avr} соответственно интеграл под кривой флуоресценции и значение времени жизни КТ в гибридной плёнке. F_0 и τ_{avr}^0 — аналогичные параметры в плёнке чистых КТ при этой же температуре. В плёнке чистых КТ время жизни изменялось от 17,3 нс при 100 К до 10,8 нс при 310 К. В гибридной плёнке КТ + РЦ — от 10,7 нс до 9,1 нс.

Очевидно, что ни о каких выраженных изменениях взаимной ориентации КТ и РЦ, расстояний между ними для плёночных образцов при температурах ниже 273 К говорить не приходится. Вместе с тем известно, что в температурном диапазоне выше ~230–240 К наблюдается выраженное возрастание внутримолекулярной подвижности белков, включая крупномасштабные конформационные смещения. Как уже давно установлено [5], это область так называемого динамического перехода от гармонических движений в белке по типу твёрдого тела к негармоническим диффузионным движениям, как в жидкости. В дополнение к этому заметим, что в этом же температурном диапазоне резко возрастает эффективность прямого фотопереноса электрона между хинонными акцепторами Q_A и Q_B , которая, по-видимому, обусловлена увеличением конформационной подвижности белка РЦ и ингибируется при температурах ниже ~230 К [6, 7].

Очевидно, что понимание механизмов переноса энергии между КТ и РЦ требует учёта температурной зависимости параметров, влияющих на эффективность миграции энергии, в том числе изменения спектра флуоресценции и квантового выхода КТ. Кроме этого, определённую роль может играть фактор внутримолекулярной подвижности, а также вариация линейных размеров комплексов с ростом температуры. Из характера кривых на рис. 1 следует, что наблюдаемая температурная зависимость эффективности миграции энергии обуславливается определёнными активационными процессами, связанными, очевидно, с внутримолекулярными движениями. Рассмотрим этот аспект более подробно.

В теории Фёрстера константа скорости k_m миграции энергии электронного возбуждения между молекулами донора и акцептора может быть представлена в виде $k_m = \tau_0^{-1} (R_F / R)^6$, где τ_0 — собственное (радиационное) время жизни возбуждённого состояния изолированной молекулы донора, R_F — радиус Фёрстера, R — расстояние между центрами дипольных моментов перехода $\bar{\mu}_D$ и $\bar{\mu}_A$ соответственно молекул донора и акцептора [8]. Отсюда следует, что температурная зависимость величины k_m может обуславливаться зависимостью от температуры, как одного из параметров τ_0 , R_F , R , так и их совместным изменением. Известно, что величина R_F в основном определяется интегралом перекрытия спектров поглощения донора и флуоресценции акцептора, величиной квантового выхода флуоресценции донора ϕ , а также величиной так называемого форм-фактора χ^2 , значение которого определяется взаимной ориентацией векторов $\bar{\mu}_D$ и $\bar{\mu}_A$, причём

$R_F^6 \propto \phi \cdot \chi^2$ [9]. Кроме этого, величина интеграла перекрытия спектров зависит от молярного коэффициента экстинкции ϵ , величина которого также может изменяться с температурой.

Мы проанализировали возможный вклад, вносимый изменением некоторых отдельных параметров. При этом в качестве начальных условий приняли их значения, полученные в эксперименте при 100 К: радиус Фёрстера $R_{F0} = 52 \text{ \AA}$, рассчитанный при $\chi^2 = \frac{2}{3}$, радиационное время жизни $\tau_0 = 10^{-8} \text{ с}$, квантовый выход флуоресценции КТ $\phi_0 = 0,5$, молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_0 = 9,6 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Расстояние R_C между дипольными моментами перехода при этой температуре $R_C = 50 \text{ \AA}$, а величина константы скорости $k_{m0} \approx 1,27 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$.

Рассмотрим температурную зависимость следующих параметров: квантовый выход $\phi(T)$, форм-фактор $\chi^2(T)$, расстояние между дипольными моментами перехода $R(T)$. С учётом указанных начальных условий, выражение для функции $k_m(T)$ представим в виде

$$k_m(T) = \frac{3}{2} \chi^2(T) \frac{\phi(T)}{\phi_0} \left(\frac{R_C}{R(T)} \right)^6 k_{m0}. \quad (1)$$

Для нашей системы (сухая плёнка) квантовый выход флуоресценции ϕ можно рассчитать по формуле $\phi = (1 + k_S \tau_0)^{-1}$, где k_S — константа скорости, определяющая эффективность всех возможных безызлучательных переходов молекулы из возбуждённого в основное электронное состояние (внутренняя конверсия). Константу скорости k_S представим как сумму $k_S = k_{SN} + k_{ST}$, где k_{ST} определяется механизмами тушения флуоресценции, не зависящими (или слабо зависящими) от температуры, а k_{ST} определяется активационными механизмами тушения. Следовательно,

$k_{ST} = k_{ST}^0 \cdot e^{-\frac{E_a}{k_B T}}$, где E_a — энергия активации, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, k_{ST}^0 — константа скорости при бесконечно высоких температурах. С учётом этого функция

$$\frac{\phi(T)}{\phi_0} \text{ примет вид} \quad \frac{\phi(T)}{\phi_0} = \left(1 + k_{SN} \tau_0 + k_{ST}^0 \tau_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{k_B T}} \right)^{-1} \phi_0^{-1}. \quad (2)$$

Анализ показывает, что варьирование параметра E_a в пределах 0,3–0,33 эВ и произведения $k_{ST}^0 \tau_0$ в диапазоне 10^4 – 10^5 позволяют получить ход кривой $\phi(T)/\phi_0$, качественно соответствующий кривой I на рис. 1. При этом необходимо положить произведение $k_{SN} \tau_0 = 1$, чтобы обеспечить

квантовый выход, равным 0,5 при низких температурах. Отметим, что при значении $\tau_0 \approx 10^{-8}$ с величина $k_{ST}^0 \propto 10^{13}$ с $^{-1}$, что соответствует частотам внутримолекулярных колебаний.

Изменение величины параметра χ^2 связано в основном с вращательной диффузией. Проведённый анализ процесса активации вращательной диффузии как РЦ в целом, так и вращения внутренних фрагментов РЦ, содержащих акцептор, показал, что при данных условиях температурные изменения величины этого фактора не могут быть использованы для интерпретации полученных результатов. В связи с этим для оценок величины k_m мы принимаем значение $\chi^2 = \frac{2}{3}$.

Теоретическая кривая $k_m(T)$, рассчитанная по формуле (1) с учётом (2), показана на рис. 2 (кривая 1). Расчёт произведён при значениях постоянных параметров: $E_a = 0,32$ эВ, $k_{SN}\tau_0 = 1$, $R(T) = R_C$. Как видно из рис. 2, кривая 1 удовлетворительно согласуется с экспериментом в области резкого уменьшения величины $k_m(T)$.

Учитывая этот результат и полагая, что энергия E_a определяет активацию молекулярной подвижности, можно попытаться оценить величину микровязкости η внутренней белковой структуры РЦ. Для этого можно воспользоваться известной формулой Андраде $\eta = \eta_\infty \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)$, где η_∞ — вязкость

при “бесконечно” высоких температурах. Однако в силу того, что значение η_∞ а priori неизвестно,

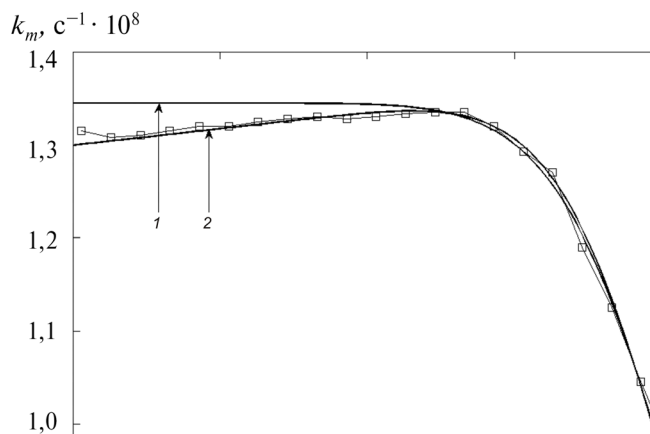


Рис. 2. Температурная зависимость константы скорости миграции энергии k_m от КТ к РЦ, рассчитанная по формулам (1) и (2) при значениях постоянных параметров $E_a = 0,32$ эВ, $k_{SN}\tau_D = 1$, $k_{ST}^0\tau_D = 2 \cdot 10^5$ (кривая 1). Кривая 2 получена при дополнительном предположении о зависимости величины расстояния R от температуры. Квадратные символы — экспериментальные точки показателя тушения флуоресценции $K = 1 - F/F_0$ из данных рис. 1.

оценка величины η существенным образом зависит от выбора значения η_∞ . Если, например, принять $\eta_\infty = 2,2 \cdot 10^{-3}$ пуаз (вязкость глицерина при 200 °С [10]), то для внутренней структуры РЦ получим оценку для комнатной температуры $\eta_{T=300} \approx 5 \cdot 10^2$ пуаз. Согласно данным мёссбауэровской спектроскопии, эффективная микровязкость белковой глобулы при комнатной температуре составляет ~ 100 пуаз [11].

Известно, что все тела, за небольшим исключением, расширяются при нагревании. Тогда этот эффект должен вызвать изменение величины R_C , что качественно представим в виде $R(T) = R_C (1 + \alpha \cdot T)$, где коэффициент линейного расширения белковых структур $\alpha \approx 1,9 \cdot 10^{-4}$ К $^{-1}$ [12]. Однако если учесть такого рода увеличение R_C , то ход кривой k_m не будет соответствовать эксперименту, так как величина k_m будет линейно уменьшаться в области температур 100–230 К, а в опыте (рис. 1) она, наоборот, возрастёт. Предположим, однако, что в системе может существовать эффект, компенсирующий тепловое расширение. Например, поскольку молекулярная структура РЦ существенно неоднородна, то на фоне общего теплового расширения РЦ могут произойти такие взаимные сдвиги фрагментов внутренней структуры, которые приведут к эффективному уменьшению R_C . Допустим, что этот эффект также линейно зависит от температуры: $R(T) = R_C (1 - \beta \cdot T)$, где коэффициент β по аналогии назовём коэффициентом структурного сжатия. На рис. 2 представлена кривая 2, полученная как при учёте теплового расширения $\alpha \approx 1,9 \cdot 10^{-4}$ К $^{-1}$, так и при учёте “теплового сжатия” с подобранным коэффициентом $\beta = 2,1 \cdot 10^{-4}$ К $^{-1}$ (остальные расчётные параметры те же, что и при расчёте кривой 1). Как видно из рис. 2, кривая 2 хорошо ложится на экспериментальные точки. Подчеркнём, что представленное рассуждение — это достаточно формальное допущение, а реальная физическая причина может быть обусловлена совершенно другими факторами. В этой связи основной результат работы представляет кривая 1 на рис. 2, полученная при допущении, что наблюдаемая температурная зависимость константы скорости переноса энергии между КТ и фоточувствительными белками обусловлена тепловой активацией внутримолекулярной подвижности комплекса в области ~ 230 –240 К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lukashev E.P., Knox P.P., Gorokhov V.V., et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2016. V. 164. P. 73–82.*

2. *Lukashev E.P., Oleinikov I.P., Knox P.P., et al.* // Biophysics. 2017. V. 62. P. 722–727.
3. *Wraight C.A., Clayton R.K.* // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 333. P. 246–260.
4. *Захарова Н.И., Чурбанова И.Ю.* // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 181–193.
5. *Doster W., Cusack S., Petry W.* // Nature. 1989. V. 337. P. 754–756.
6. *Pieper J., Hauss T., Buchsteiner A., et al.* // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 11 398–11 409.
7. *Кононенко А.А., Нокс П.П., Чаморовский С.К. и др.* // Хим. физика. 1986. Т. 5. С. 795–804.
8. *Агранович В.М., Галанин М.Д.* Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. М.: Наука, 1978. 384 с.
9. *Красильников П.М., Зленко Д.В., Стадничук И.Н.* // Компьют. исслед. и моделирование. 2015. Т. 7. С. 125–144.
10. Физические величины. Справочник/ Под ред. И.С. Григорьева, Е.З. Михайлова. М.: Энергоатомиздат, 1991. 1232 с.
11. *Гольданский В.И., Крупянский Ю.Ф., Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 761–774.
12. *Cordier F., Grzesiek S.* // J. Mol. Biol. 2002. V. 715. P. 739–752.

INTRAMOLECULAR MOBILITY AFFECTS THE ENERGY MIGRATION FROM QUANTUM DOTS TO REACTION CENTERS OF PHOTOSYNTHESIZING BACTERIUM *Rb. sphaeroides*

P. M. Krasilnikov, E. P. Lukashev, P. P. Knox, N. Kh. Seyfullina,

Corresponding Member of the RAS A. B. Rubin

Received September 12, 2018

The temperature dependence of the efficiency of energy migration from the CdSe/CdS/ZnS quantum dots (QDs, a fluorescence maximum at 580 nm) to the reaction centers (RCs) of the bacteria *Rb.sphaeroides* is practically constant over the temperature range from 100 to ~230–240 K but then decreases 2,5–3 times as temperature further increases to 310 K. The analysis of this dependence on the basis of Forster's theory showed that the major changes in the energy transfer efficiency are associated with the temperature change in the quantum yield of QD fluorescence, which is due to the activation of intramolecular mobility in the RC structure.

Keywords: quantum dots, photosynthetic reaction center, energy migration.