



ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»
Институт Инженерной физики и Радиоэлектроники
(ИИФирЭ СФУ)



Научная сессия
Объединенного ученого совета по
физическим наукам СО РАН

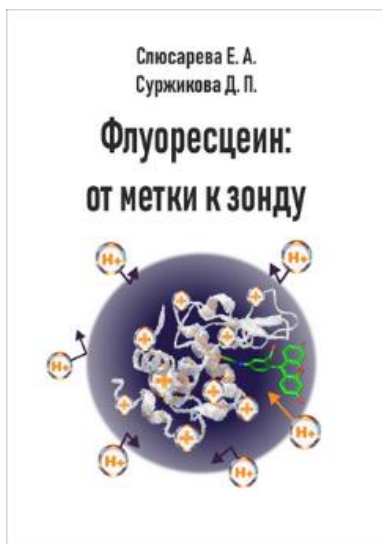
Конкурс работ молодых ученых
на соискание премий имени
выдающихся ученых СО РАН

Флуоресцеин: от метки к зонду

монография

Суржикова Дарья Павловна

Томск
2026 г.



Слюсарева Е. А., Суржикова Д. П.
Флуоресцеин: от метки к зонду: монография. –
СПб.: Научные технологии, 2026. – 122 с.

Цикл из 6 статей



Суржикова Дарья Павловна:

- инженер-исследователь и старший преподаватель ИИФиРЭ СФУ;
- защита диссертации в срок обучения в аспирантуре (2025 г.)
- руководитель гранта РНФ № 26-72-00151;
- основной исполнитель гранта РНФ № 26-12-00361;
- читает лекционный курс «Оптическая спектроскопия»;
- лауреат государственной премии Красноярского края в области профессионального образования.



Работа выполнена в научной школе Е.А. Слюсаревой,
д-ра физ.-мат. наук, профессора базовой кафедры
фотоники и лазерных технологий ИИФиРЭ СФУ.

Работа поддержана грантами:

1. РНФ № 22-22-00724 «Влияние диффузионного ограничения на фотокислотные свойства флуоресцеина при физиологических значениях pH» (**Руководитель – Е.А. Слюсарева**);
2. РФФИ № 19-02-00450 «Роль фотоиндуцированного переноса протона в природе релаксации возбужденного состояния флуоресцеиновых красителей» (**Руководитель – Е.А. Слюсарева**);
3. Госзадание Минобрнауки (FSRZ-2020-0008) «Разработка фундаментальных основ перспективных оптических и магнитных материалов и синхротронных рентгеноспектральных методов исследования вещества» (Руководитель – С.П. Полютков);
4. **РНФ № 26-72-00151 «Локальное зондирование поверхности белка с помощью флуоресцентной метки»**
(**Руководитель – Д.П. Суржикова**)

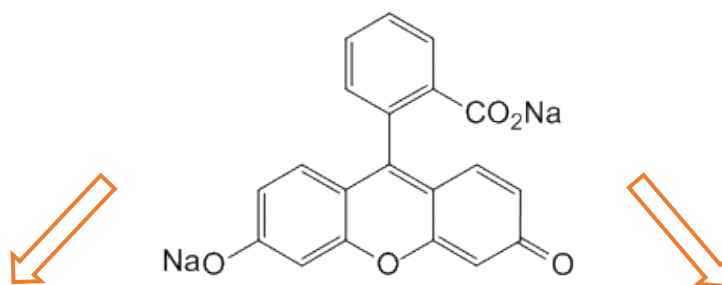


Почему сигнал флуоресцеина неоднозначен?

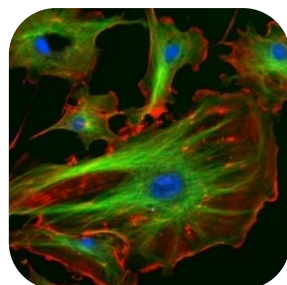
Как были установлены излучающие ионные формы красителя?

Как температура, фосфат-ионы и вязкость влияют на ратиометрический сигнал флуоресцеина?

Как спектральные свойства зонда флуоресцеин-изотиоцината могут быть использованы для зондирования поверхности белка?



Краситель как метка

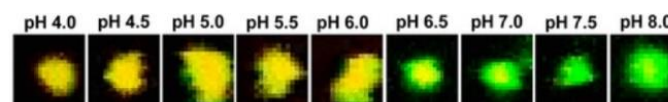


Краситель как зонд

Чувствительность проявляется в изменении:

- значения интенсивности (I);
- флуоресцентного времени жизни ($\tau_{\text{фл}}$);
- формы спектров поглощения/флуоресценции;
- анизотропии флуоресценции (r).

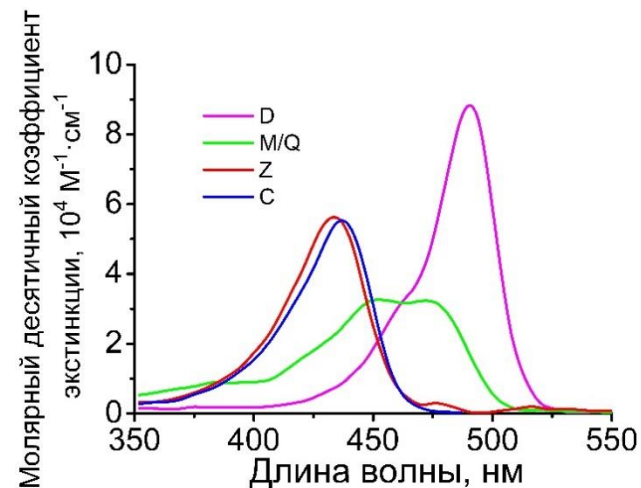
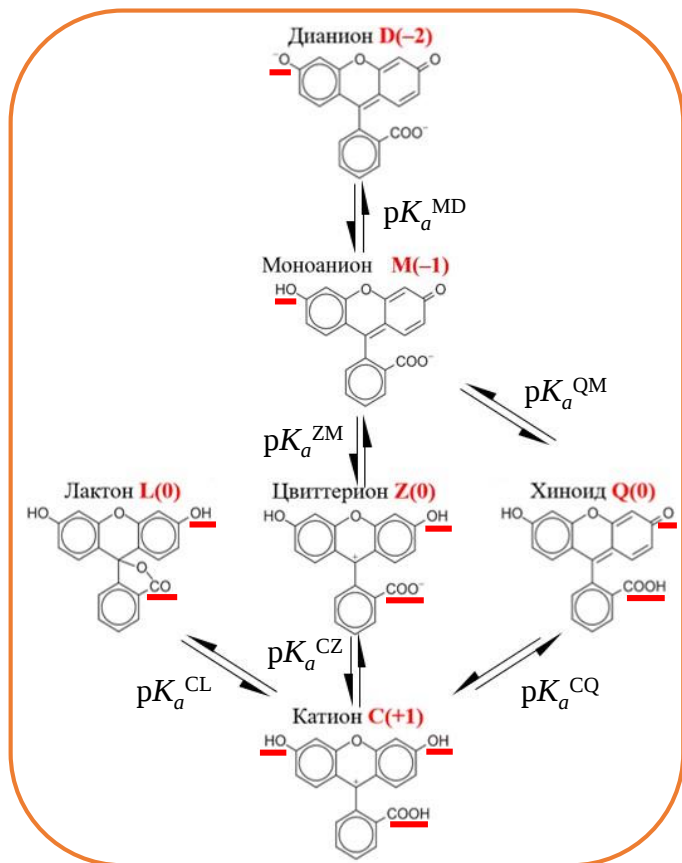
Анализ как гомогенных, так гетерогенных систем.



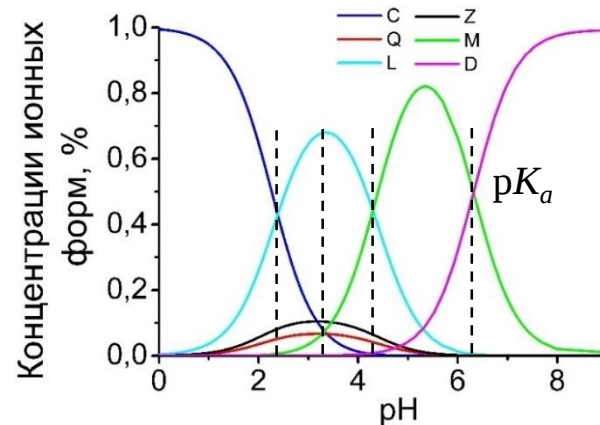


$$\text{MH} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{M}^- \rightarrow \text{p}K_a = -\lg \left(\frac{[\text{M}^-][\text{H}^+]}{[\text{MH}]} \right)$$

Структурные формулы
ионных форм флуоресцеина



Спектры поглощения ионных форм флуоресцеина*

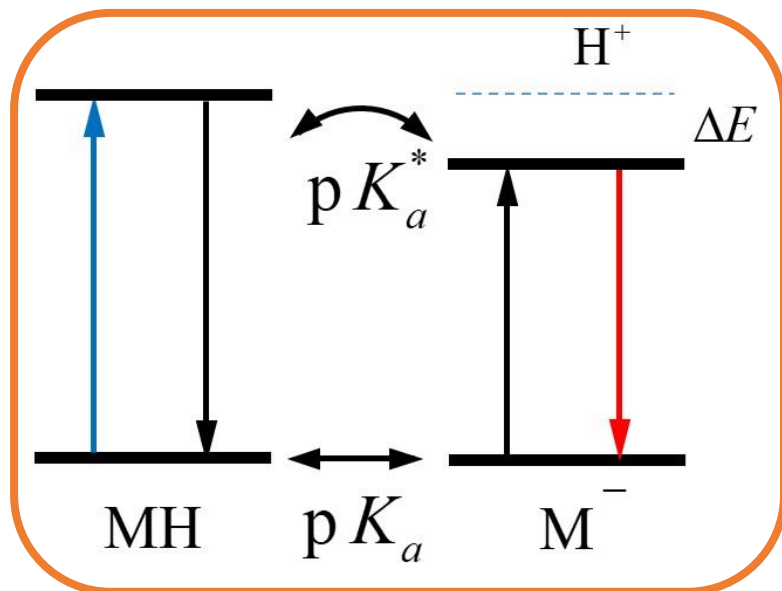


Зависимость концентрации ионных форм от pH
в основном состоянии*

*N. Klonis, W.H. Sawyer // J. Fluoresc. 1996. V.6 P.147–157



Обратимая фотохимическая реакция



$pK_a \neq pK_a^*$
Перенос протона в
возбужденном
состоянии! (ESPT)

$pK_a^* < pK_a$
фотокислота
 $pK_a^* > pK_a$
фотооснование

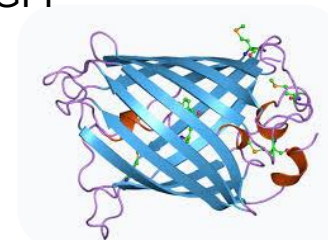
Цикл Фёрстера:

$$pK_a^* = pK_a - \frac{\Delta E}{kT}$$

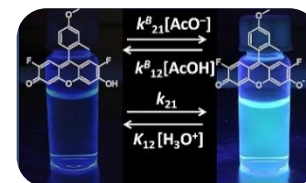


Теодор Фёрстер
1910-1974

GFP



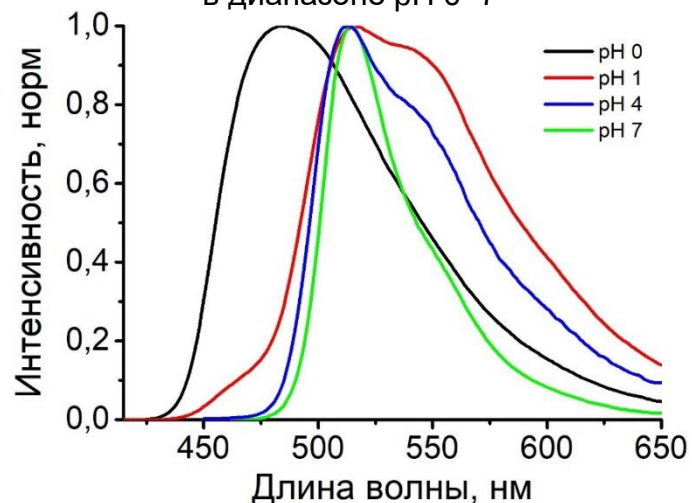
Природный механизм



Зонд*



Спектры люминесценции растворов флуоресцеина
в диапазоне pH 0÷7



Проблема анализа спектров люминесценции флуоресцеина:

- Несколько ионных форм существует одновременно;
- Их спектры поглощения и флуоресценции сильно перекрываются;
- Они имеют различный квантовый выход;
- За счет переноса протона в возбужденном состоянии поглощает одна форма, а излучает другая.

Какая ионная форма флуоресцеина излучает?

Таблица. Квантовые выходы ионных форм флуоресцеина

	C	N	M	D
*	0	0	0,37	0,93
**	0,9-1	0,29	0,36	0,93
***	0,9-1	0,2-0,25	0,25-0,35	
****	0,39	0	0,26	0,93

* R. Sjöback et al // Spectrochim. Acta A, V. 1995, 51(6), P. L7-L21

** N. Klonis, W.H. Sawyer // J. Fluoresc., 1996, V.6 P.147-157

*** M.M. Martin, L. Lindqvist // J. Lumin., 1975, V. 10(6), P. 381-90

**** H. Leonhardt et al // J. Phys. Chem., 1971 V. 75(2), P. 245-249

Нейтральная молекула (N) представлена хиноидной (Q),
лактонной (L) и цвиттерионной (Z) формами

Спектры люминесценции зависят от:

- pH;
- длины волны возбуждения;
- вероятности переноса протона;
- температуры.

Что известно: C, Q, L, Z, M, D и D*

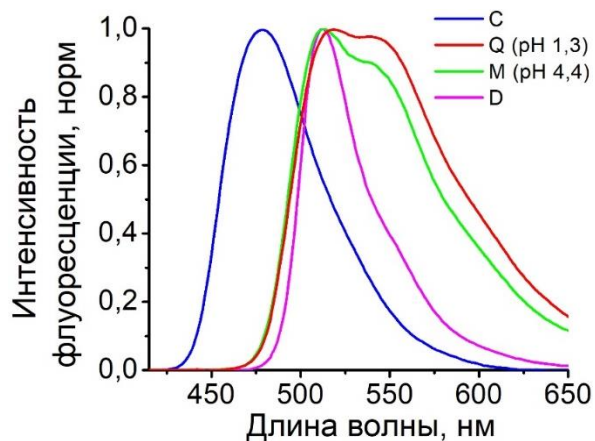
Что неизвестно: C*, Q*, Z*, M*



Глава 2. Спектральные и фотофизические свойства ионных форм флуоресцеина

7/13

Спектры флуоресценции ионных форм флуоресцеина

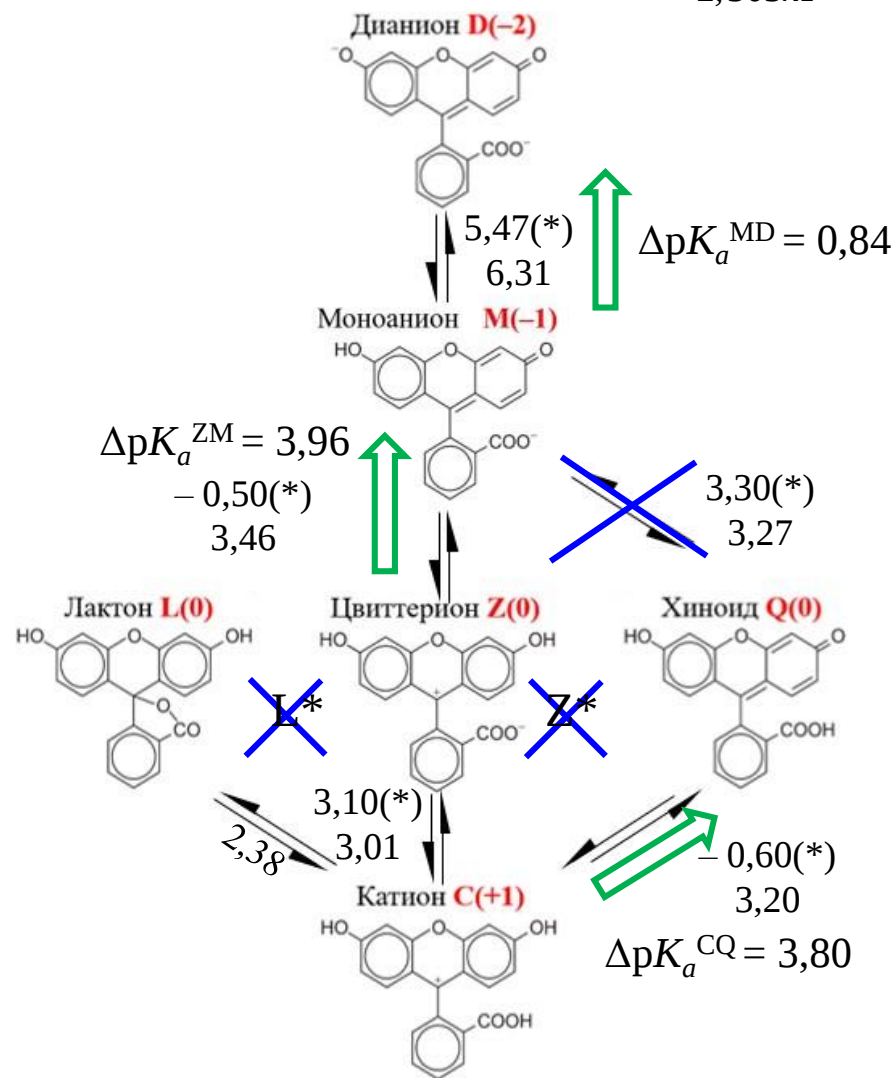


Фотофизические характеристики для ионных форм флуоресцеина

	C	Q	M	D
ϕ	0,92 $\pm 0,07$	0,42 $\pm 0,04$	0,46 $\pm 0,05$	0,93 $\pm 0,06$
$\tau_{\text{фл}} \pm 0,1, \text{ нс}$	3,6	3,0	3,3	4,1
$\tilde{\nu}_{0-0} \pm 0,01, 10^4 \text{ см}^{-1}$	2,21	2,03	2,03	1,99

- ✓ Определены типы флуоресцирующих форм флуоресцеина и их фотофизические параметры.
- ✓ Найдено направление переноса протона на трех ступенях диссоциации (фотокислотные свойства).
- ✓ Объяснены разночтения в определении квантовых выходов и времен жизни в опубликованных ранее работах.

Цикл Фёрстера: $\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a = hc \frac{\tilde{\nu}_{0-0}^{M^-} - \tilde{\nu}_{0-0}^{MH}}{2,303kT}$,



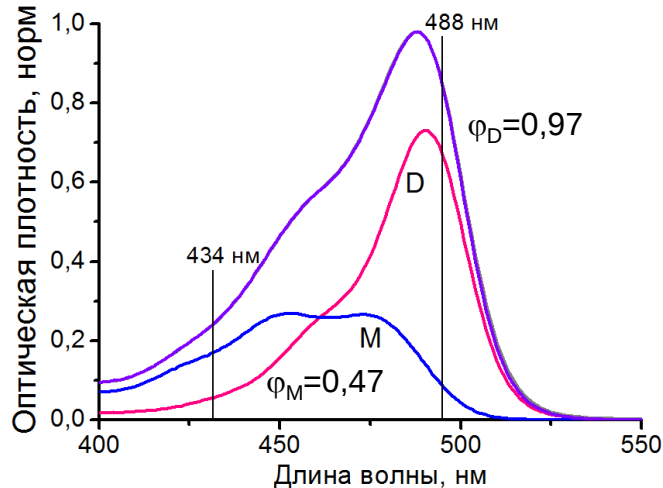


Глава 3. Дианион-моноанионное равновесие флуоресцеина с точки зрения спектроскопии

8/13

Исследована зависимость поглощения и флуоресценции от концентрации фосфат-ионов, вязких соразтворителей и температуры

Разложение составного контура поглощения (pH 6,5)



Аналитический ратиометрический сигнал S:

- ✓ линеен в диапазоне температур 283÷353K;
- ✓ обратим в цикле охлаждения;
- ✓ обусловлен сдвигом ионного равновесия в основном состоянии pK_a^{MD} (температура) и возбужденном pK_a^{*MD} (фосфат-ионы);
- ✓ имеет температурное разрешение 2K;
- ✓ не требует калибровки по интенсивности;
- ✓ специфичен к типу вязкого соразтворителя.

Ратиометрический сигнал:

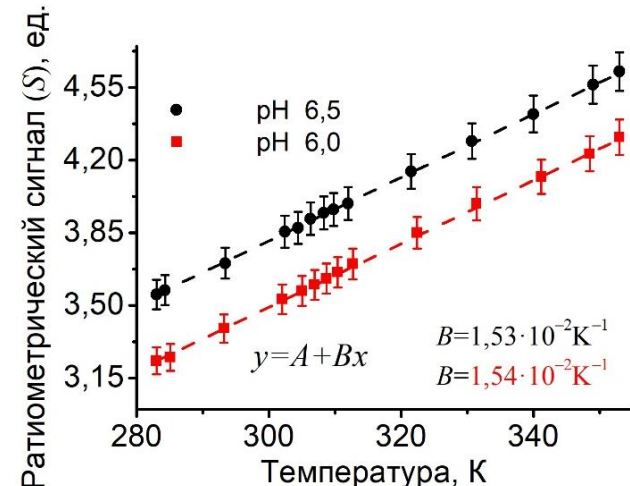
$$S = \frac{I_{488}}{I_{435}}$$

Уравнение Вант-Гоффа:

$$-\frac{d \ln K_a}{d(1/T)} = \frac{\Delta_r H}{R}$$

$$\Delta_r H = 7,3 \pm 0,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$$

Изменение молярной энтальпии реакции диссоциации



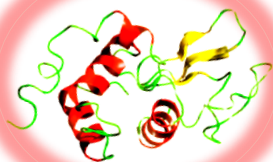


Глава 4. Спектральное зондирование поверхности белка

9/13

Суммарный заряд при pH 6,50, e:

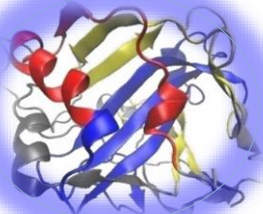
+9



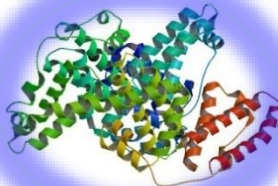
ЛКБ – лизоцим куриного белка

-2

КАБ –
карбоксиангидраза Б быка



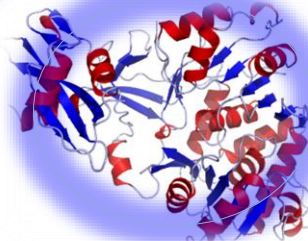
-11



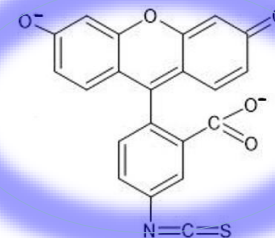
БСА – бычий сывороточный альбумин

-21

БЛ –
бактериальная люцифераза

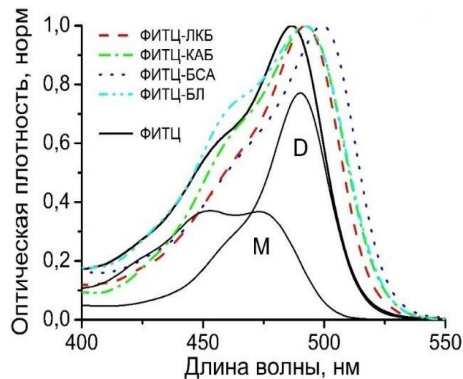
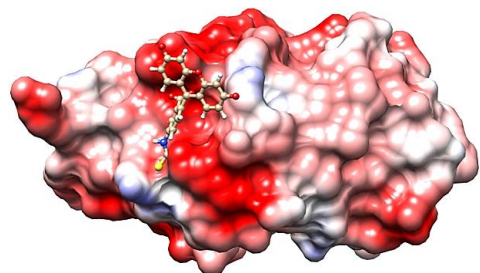


-1[M], -2[D]



Флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ)

ЛКБ, меченный ФИТЦ (ФИТЦ-ЛКБ) PDB ID 5EIL

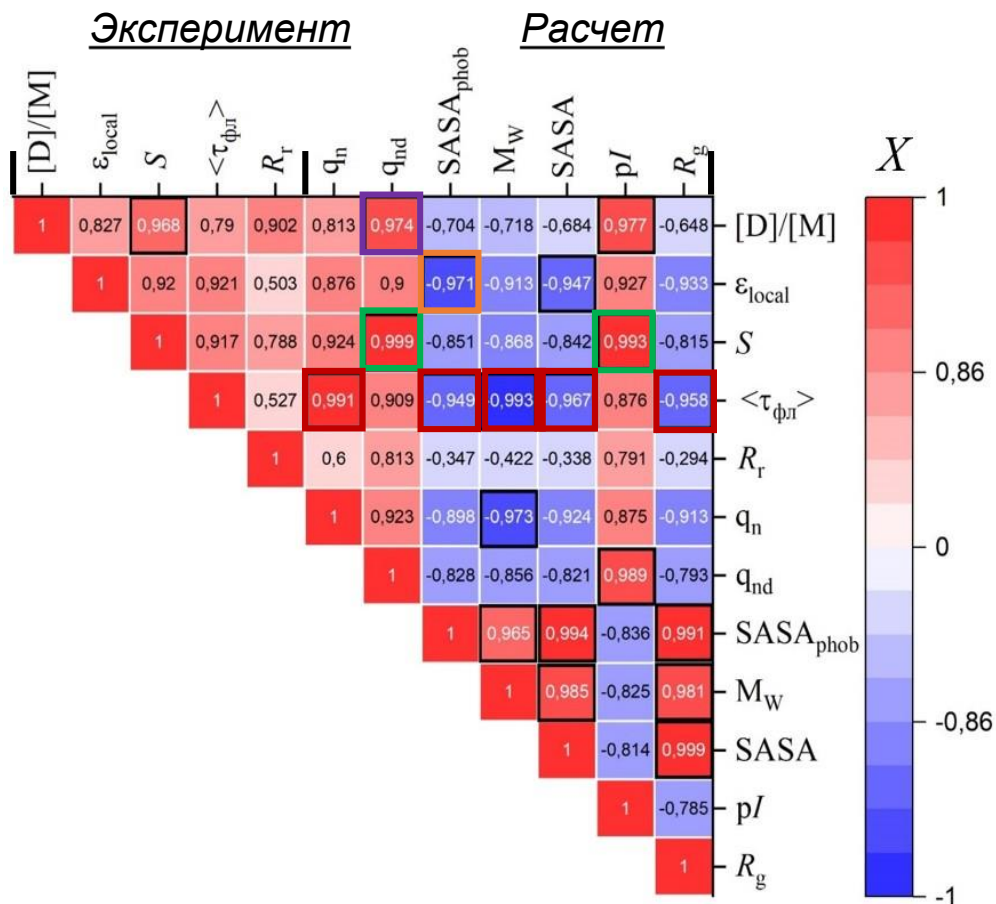


- Изменение формы спектра ([D]/[M])
- Сдвиг спектра ($\Delta\lambda \rightarrow \epsilon_{\text{local}}$)
- Ратиометрический сигнал (I_{488}/I_{435})
- Заряд поверхности, e
- Удельный заряд белка, e/nm²
- Площадь незаряженной поверхности, nm²



Корреляционная матрица экспериментальных и расчетных данных

10/13



Высокая корреляция:

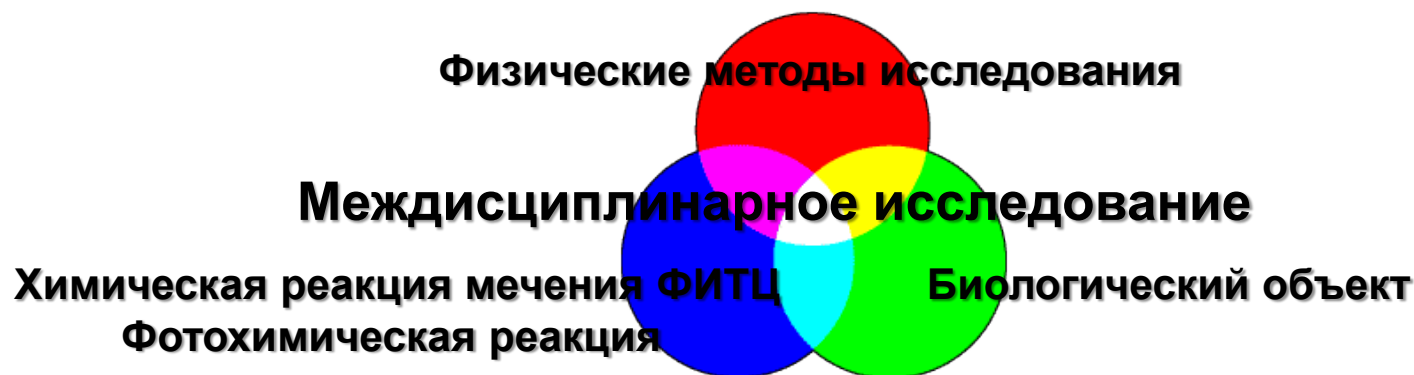
- удельный (на единицу площади) заряд белка q_{nd} , изоэлектрическая точка pI и ратиометрический флуоресцентный сигнал S – прямая;
- площадь незаряженной поверхности белка $SASA_{\text{phob}}$ и локальная диэлектрическая проницаемость ϵ_{local} – обратная;
- удельный (на единицу площади поверхности) q_{nd} заряд белка и ионное равновесие $[D]/[M]$ – прямая;
- среднее время жизни флуоресценции $\langle \tau_{\text{фл}} \rangle$ площади поверхности $SASA$, гидрофобной площади $SASA_{\text{phob}}$, радиуса гирации R_g и молекулярной массы M_w – обратная, суммарный заряд поверхности q_{in} – прямая.

ФИТЦ – многоцелевой молекулярный зонд, локализованный на поверхности белка и формирующий несколько независимых спектральных сигналов, зависящих от параметров его поверхности.

Полученные корреляции между теоретическими и экспериментальными параметрами требуют дальнейшего исследования и будут исследованы в рамках проекта **РНФ 26-72-00151 (Руководитель Суржикова Д.П.)**.



- Установлены флуоресцирующие формы С, Q, М флуоресцеина и определены их спектральные и фотофизические параметры.
- Найдены направления фотоиндуцированного переноса протона: $C \rightarrow Q$, $Z \rightarrow M$ и $M \rightarrow D$.
- Показано, что M/D-равновесие формирует обратимый ратиометрический сигнал, чувствительный к температуре, фосфат-ионам и типу вязкого соразтворителя.
- Продемонстрирована возможность использования ФИТЦ для локального спектрального зондирования поверхности белка.



Флуоресцеин – органический краситель, относящийся к семейству ксантеновых красителей, который был синтезирован 1871 году немецким химиком Адольфом фон Байером...



6 статей:

1. **D.P. Surzhikova**, E.V. Nemtseva, L.A. Sukovaty, A.V. Borgoyakova, E.A. Slyusareva, Local optical probing of proteins of various sizes and charges with FITC label // Biophysical Chemistry. – 2025. – Vol. 325. – № 107488 (**4 глава**);
2. **D.P. Surzhikova**, L.A. Sukovaty, E.V. Nemtseva, E.N. Esimbekova, E.A. Slyusareva, Functioning of a Fluorescein pH-Probe in Aqueous Media: Impact of Temperature and Viscosity // Micromachines, – 2023. – Vol. 14(7), № 1442 (**3 глава**);
3. **D.P. Surzhikova**, N.Yu. Romanova, E.A. Slyusareva, Mechanisms of temperature dependence of the ratiometric signal of fluorescein // Proc. SPIE, – 2023. – Vol. 12920, №129200Z (**3 глава**);
4. **D. Surzhikova**, M. Gerasimova, E. Slyusareva, Effect of Phosphate Ions on the Dianion–Anion Equilibrium of Fluorescein Excited State // Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys., – 2022. – Vol. 86(10), pp. 1203–1206 (**3 глава**);
5. **D.P. Surzhikova**, M.A. Gerasimova, E.A. Slyusareva, Protolytic Equilibrium of Excited States of Fluorescein // Russ. Phys. J., – 2022. – Vol. 64(11), pp. 2102–2109 (**2 глава**);
6. **D. Surzhikova**, M. Gerasimova, V. Tretyakova, A. Plotnikov, E. Slyusareva, Emission properties of fluorescein in strongly acidic solutions // J. Photochem. Photobiol. A. – 2021. – Vol. 413, № 113233 (**2 глава**).

2 свидетельства о гос. регистрации программы для ЭВМ:

1. Программа расчета протолитического равновесия органического красителя с трехступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состояниях **Суржикова Д.П.**, Слюсарева Е.А, Ципотан А.С., Шамшурин А.В. №2021616577, от 23.04.2021 (**2 глава**);
2. Программа расчета равновесной концентрации ионных форм органического флуорофора с учетом влияния термодинамического и кинетического факторов на трехступенчатую диссоциацию. **Суржикова Д.П.**, Слюсарева Е.А., Шамшурин А.В. №2022669602, от 21.10.2022 (**3 глава**).

Спасибо за внимание!



Модель населенностей ионных форм флуоресцеина



* N. Klonis, W.H. Sawyer // Journal of Fluorescence. 1996. V.6 pp.147–57

* Surzhikova D. et al // J. Photochem. Photobiol. A. 2021. V.413 P. 113233

* Surzhikova D. et al // Russ. Phys. J. 2022. V. 64(11) pp. 2102–2109

* J.M. Alvarez-Pez et al // J. Phys. Chem. A. 2001. V.105 pp. 6320–32

* A. Orte et al // J. Phys. Chem. A. 2005. V.109 pp. 8705–8718

* Surzhikova D. et al // Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys., 2022. V. 86(10), pp. 1203–1206

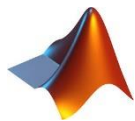


Система линейных уравнений

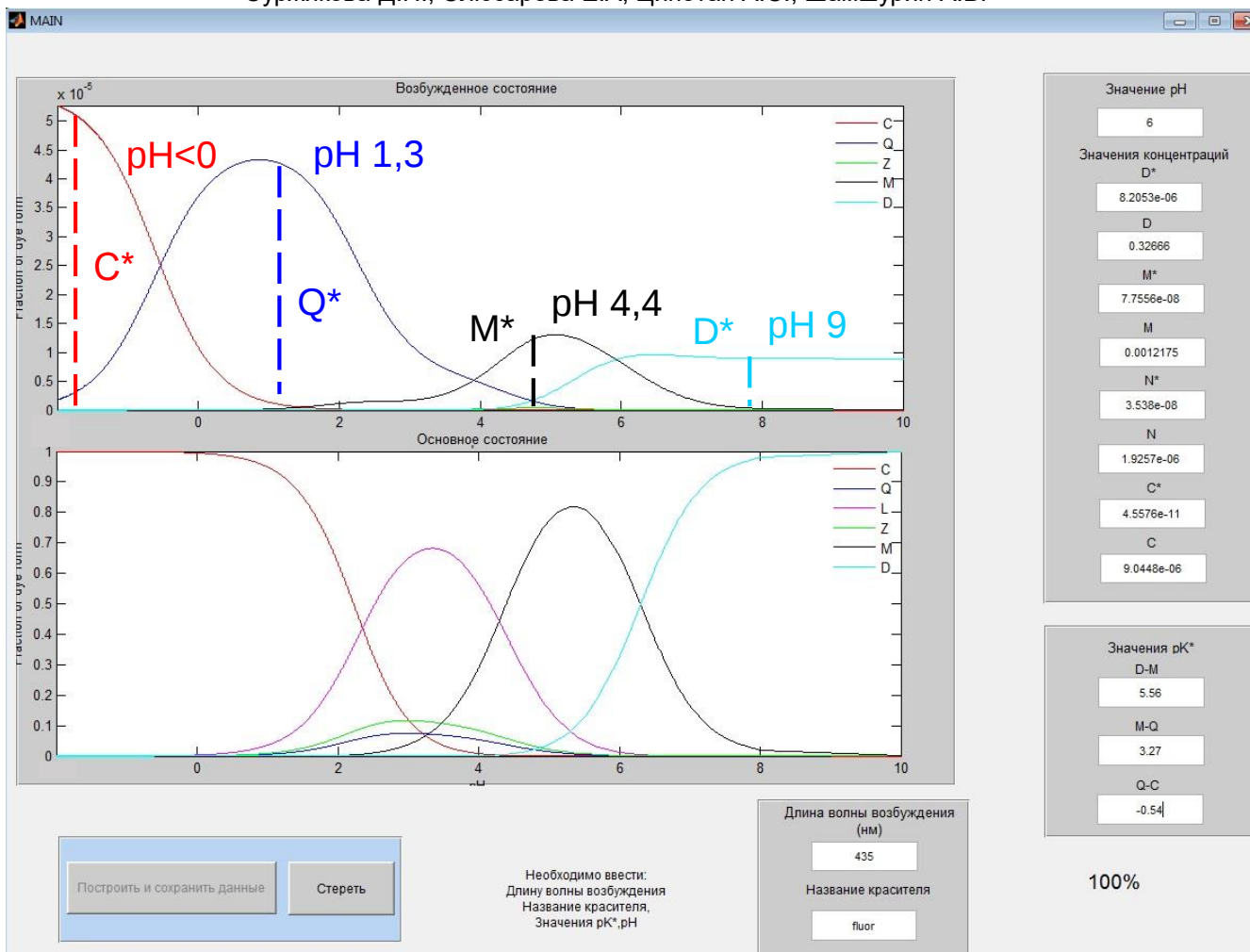
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial C^*}{\partial t} = I \sigma_{\lambda}^C [C] - k_{\phi\lambda}^C [C^*] - k_{QC}^* [C^*] + k_{CQ}^* [Q^*] [H^+] - k_{ZC}^* [C^*] + k_{CZ}^* [Z] [H^+] = 0 \\ \frac{\partial Q^*}{\partial t} = I \sigma_{\lambda}^Q [Q] - k_{\phi\lambda}^Q [Q^*] - k_{CQ}^* [H^+] [Q^*] + k_{QC}^* [C^*] - k_{MQ}^* [Q^*] + k_{QM}^* [H^+] [M^*] = 0 \\ \frac{\partial Z^*}{\partial t} = I \sigma_{\lambda}^Z [Z] - k_{\phi\lambda}^Z [Z^*] - k_{CZ}^* [H^+] [Z^*] + k_{ZC}^* [C^*] - k_{MZ}^* [Z^*] + k_{ZM}^* [H^+] [M^*] = 0 \\ \frac{\partial M^*}{\partial t} = I \sigma_{\lambda}^M [M] - k_{\phi\lambda}^M [M^*] - k_{QM}^* [H^+] [M^*] + k_{MQ}^* [Q^*] - k_{ZM}^* [H^+] [M^*] + k_{MZ}^* [Z^*] + k_{MD}^* [H^+] [D^*] - k_{DM}^* [M^*] = 0 \\ \frac{\partial D^*}{\partial t} = I \sigma_{\lambda}^D [D] - k_{\phi\lambda}^D [D^*] - k_{MD}^* [H^+] [D^*] + k_{DM}^* [M^*] = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial t} = k_{\phi\lambda}^C [C^*] - I \sigma_{\lambda}^C [C] - k_{QC} [C] + k_{CQ} [Q] [H^+] - k_{ZC} [C] + k_{CZ} [Z] [H^+] - k_{LC} [C] + k_{CL} [L] [H^+] = 0 \\ \frac{\partial Q}{\partial t} = k_{\phi\lambda}^Q [Q^*] - I \sigma_{\lambda}^Q [Q] - k_{CQ} [H^+] [Q] + k_{QC} [C] - k_{MQ} [Q] + k_{QM} [H^+] [M] = 0 \\ \frac{\partial L}{\partial t} = k_{LC} [C] - k_{CL} [H^+] [L] = 0 \\ \frac{\partial Z}{\partial t} = k_{\phi\lambda}^Z [Z^*] - I \sigma_{\lambda}^Z [Z] - k_{CZ} [H^+] [Z] + k_{ZC} [C] - k_{MZ} [Z] + k_{ZM} [H^+] [M] = 0 \\ \frac{\partial M}{\partial t} = k_{\phi\lambda}^M [M^*] - I \sigma_{\lambda}^M [M] - k_{QM} [H^+] [M] + k_{MQ} [Q] - k_{ZM} [H^+] [M] + k_{MZ} [Z] + k_{MD} [H^+] [D] - k_{DM} [M] = 0 \\ \frac{\partial D}{\partial t} = k_{\phi\lambda}^D [D^*] - I \sigma_{\lambda}^D [D] - k_{MD} [H^+] [D] + k_{DM} [M] = 0 \end{array} \right.$$



Интерфейс программы



Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ: № 2021616577, от 23.04.2021,
Суржикова Д.П., Слюсарева Е.А, Ципотан А.С., Шамшурин А.В.

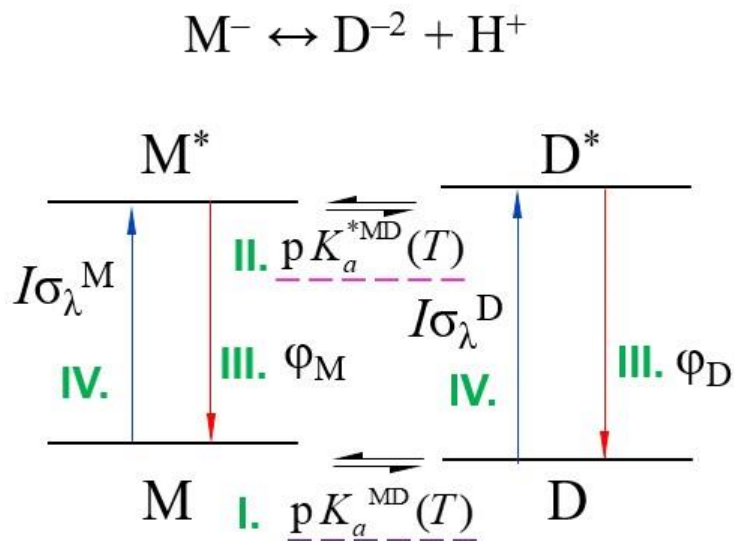


Подтверждение модели:

- Совпадение распределения населённостей в основном состоянии* с опубликованным;
- Подтверждением фотофизических характеристик дианионной (D^*) формы флуоресцеина* с опубликованным.
- Неизменность форм спектров люминесценции при вариации длины волны возбуждения Q^* (pH 1,3) и M^* (pH 4,4)



Глава 3. Температурное влияние на флуоресцентный сигнал (pH 5÷8)



Цикл Фёрстера:

$$\underline{pK_a^{*MD}} = pK_a^{MD} + hc \frac{\tilde{\nu}_{0-0}^D - \tilde{\nu}_{0-0}^M}{2,303kT}$$

Константа диссоциации:

$$\underline{pK_a^{MD}} = -\lg \left(\frac{[D][H^+]}{[M]} \right) = -\lg \left(\frac{k_{DM}}{k_{MD}} \right)$$

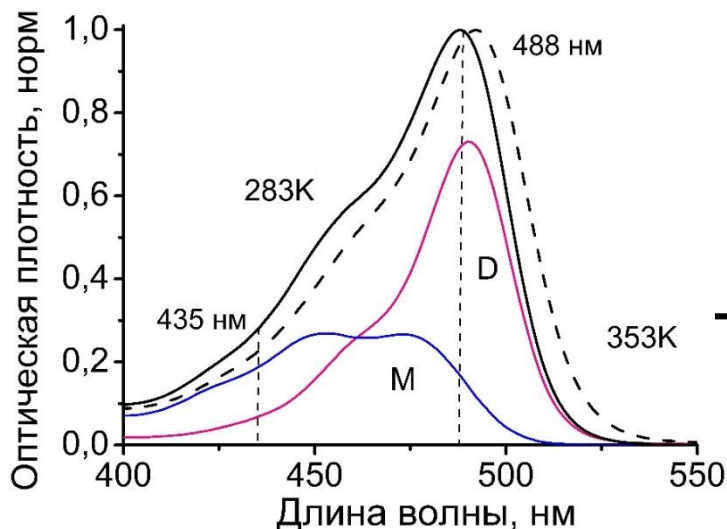
Механизмы температурного влияния на флуоресцентный сигнал:

- I. изменение ионного равновесия (pK_a^{MD}) в основном состоянии;
- II. изменение ионного равновесия (pK_a^{*MD}) в возбужденном состоянии;
- III. изменение квантового выхода (φ) флуоресценции;
- IV. изменение вероятности поглощения (σ_λ) из-за температурного изменения формы спектра поглощения.

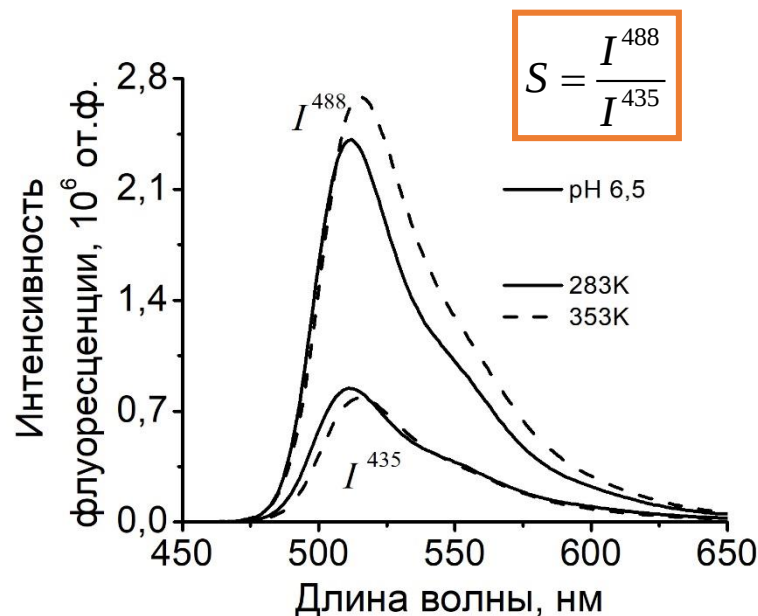


Температурные зависимости флуоресцентного сигнала водных растворов флуоресцеина в диапазоне 283K÷353K

Спектры поглощения водных растворов флуоресцеина при pH 11,0(D), 5,0(M) и 6,5(M+D) при температурах 283K, 353K



Спектры флуоресценции водных растворов флуоресцеина при 6,5(M+D) при температурах 283K, 353K



$$S = \frac{I^{488}}{I^{435}}$$

Из анализа спектров поглощения:

$$K_a = \frac{[D][H^+]}{[M]}$$

$$pK_a(283K) = 6,57$$

$$pK_a(353K) = 6,30$$

$$\Delta pK_a^{temp} = 0,27$$

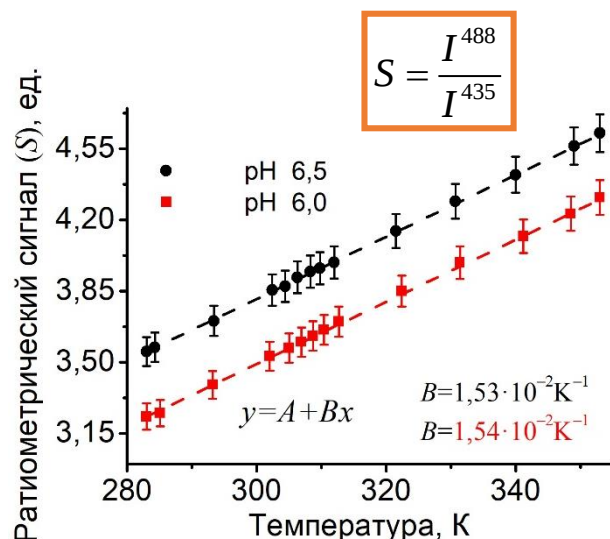
$$-\frac{d \ln K_a}{d(1/T)} = \frac{\Delta_r H}{R}$$

Изменение молярной энтальпии реакции:
 $\Delta_r H \ 7,4 \pm 0,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$

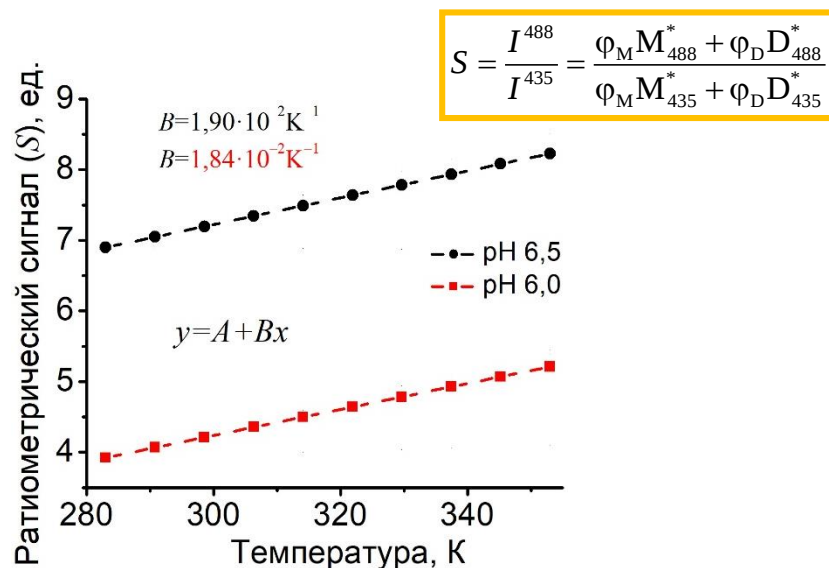


Экспериментальная и модельная температурная зависимость ратиометрического сигнала

Температурная зависимость экспериментального ратиометрического (S) сигнала



Температурная зависимость модельного ратиометрического (S) сигнала



Аналитический ратиометрический сигнал S:

- ✓ Линеен в диапазоне температур 283÷353 K.
- ✓ Обратим в цикле охлаждения.
- ✓ Не требует калибровки по интенсивности.
- ✓ Имеет температурное разрешение 2 K.

★Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ: № 2022669602, от 21.10.2022

Суржикова Д.П., Слюсарева Е.А., Шамшуринов А.В.

Механизмы температурного влияния на ратиометрический сигнал

I. Смещение ионного равновесия (pK_a) в основном состоянии.

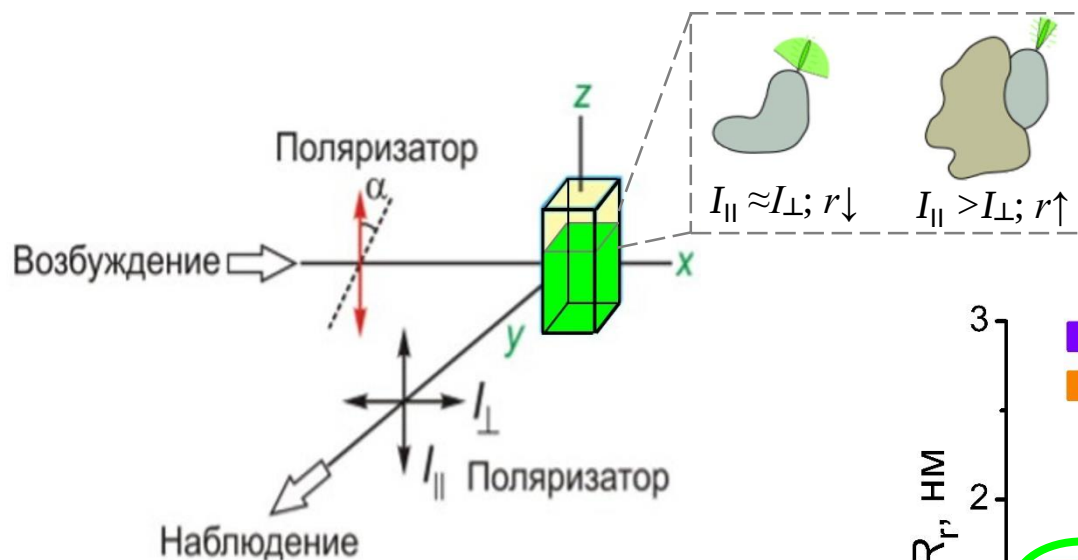
II. Смещение ионного равновесия (pK_a^*) в возбужденном состоянии.

III. Изменение квантового выхода флуоресценции.

IV. Температурное изменение формы спектра поглощения.



Анизотропия флуоресценции



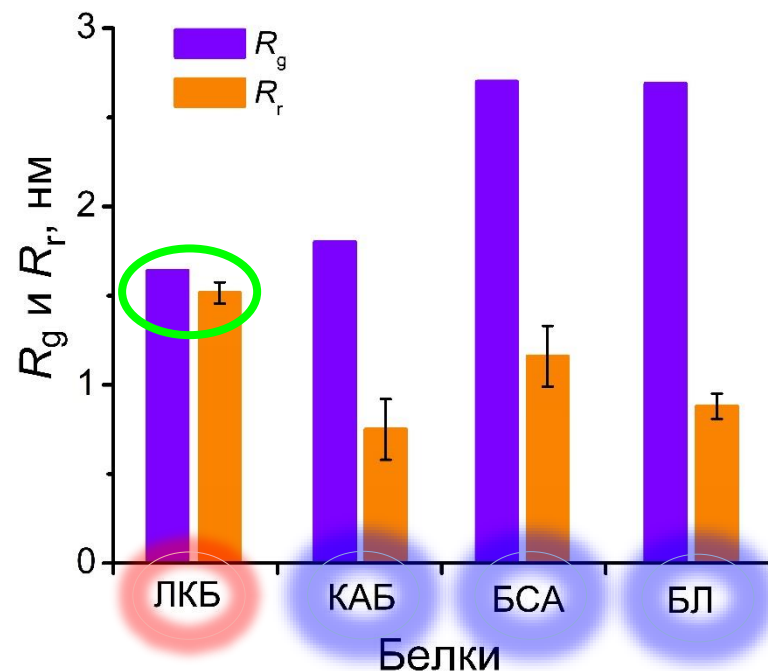
Анизотропия флуоресценции (r)

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Эффективный радиус излучателя (R_r),
Уравнение Перрена

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \tau_{\text{фл}} \frac{kT}{\eta \pi R_r^3}$$

где r_0 – значение предельной анизотропии;
 k – постоянная Больцмана;
 T – температура;
 η – вязкость среды.



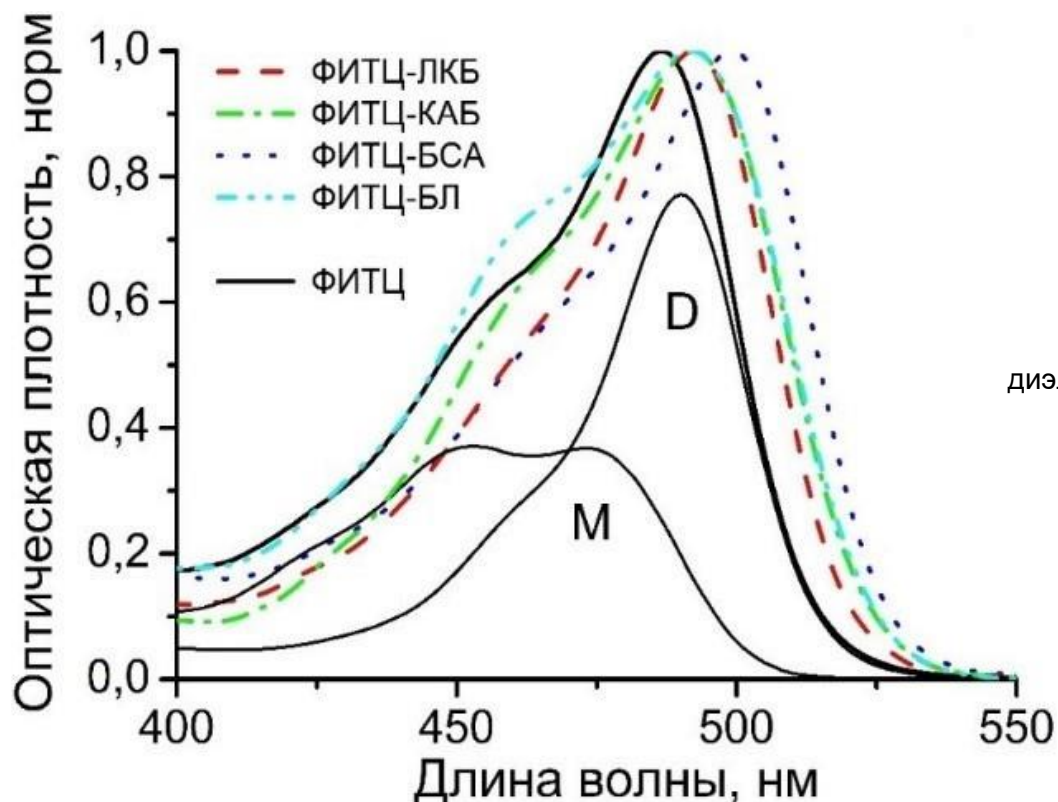
R_g – радиус инерции (теория*);
 R_r – эффективный радиус излучателя (эксперимент).

* Рассчитано методами молекулярной динамики
Суковатым Л.А.



Спектры поглощения метки ФИТЦ, ковалентно связанной с белками

Спектры поглощения ФИТЦ-меченых белков
в буфере (рН 6,5) и свободного ФИТЦ в буфере



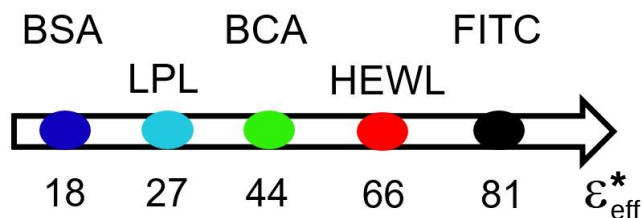
Изменение:

Форма спектров поглощения – ионное
равновесие $[D]/[M]$;

Максимум спектра поглощения ($\Delta\lambda$) –
полярности окружения.

$$\Delta\lambda \rightarrow \epsilon_{\text{eff}}$$

Графическое представление результатов расчета
диэлектрической проницаемости (ϵ_{eff}) для растворов ФИТЦ
и ФИТЦ меченых белков

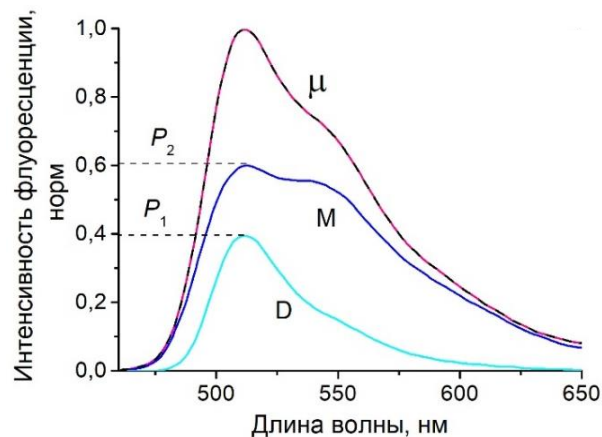


* Рассчитано по калибровке из Otsu T et al //
Chemical Physics Letters. 2018. V.693, P.165–
169

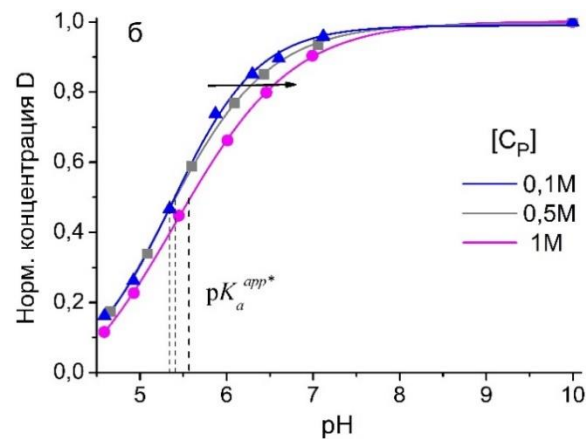
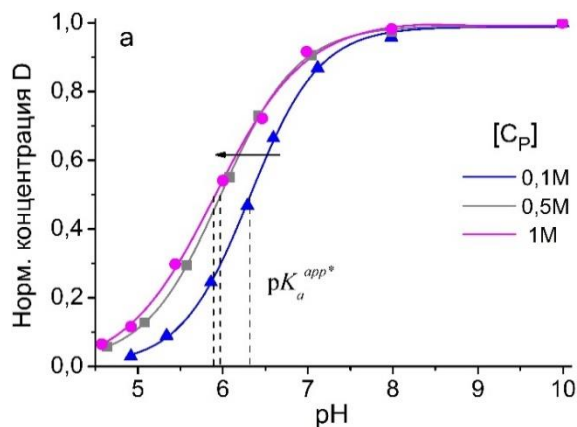


Влияние концентрации фосфат-ионов

Пример разложения и флуоресценции на составляющие М и D форм



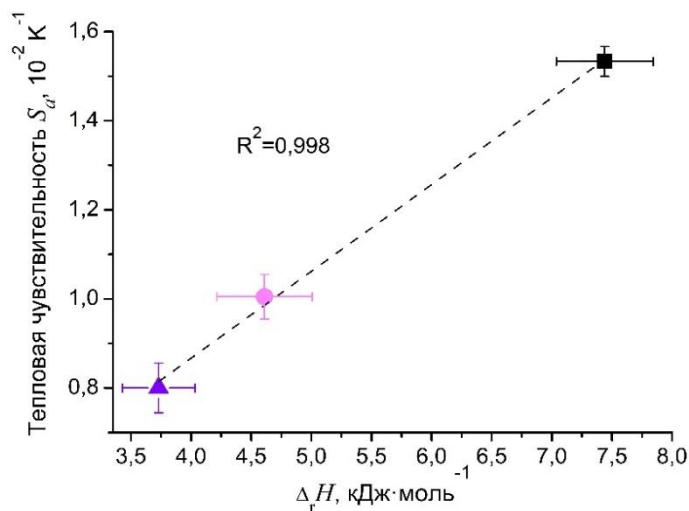
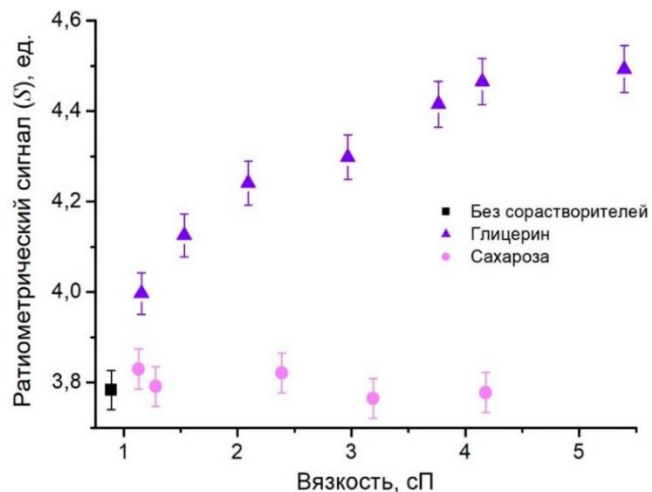
Калибровочная кривая для нахождения констант равновесия М-D диссоциации в возбужденном состоянии pK_a^* при двух длинах волн возбуждения 435 (а) и 488 (б) нм



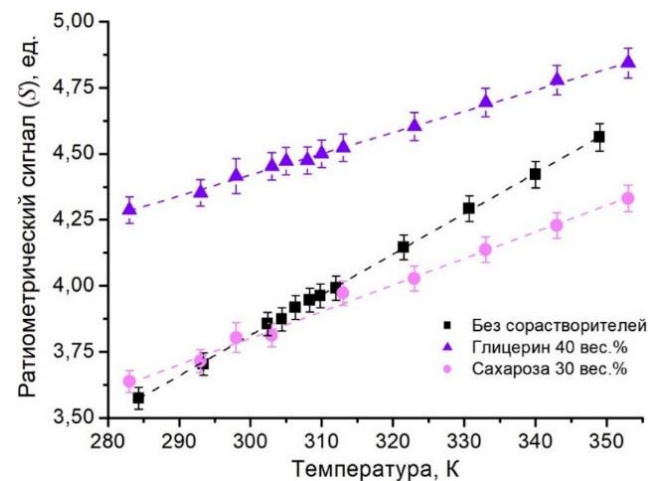


Влияние концентрации вязких соразтворителей

Зависимости ратиометрического сигнала S флуоресцеина от вязкости при температуре среды 298K и pH 6,5 в присутствии глицерина (фиолетовые символы) и сахарозы (розовые символы)



Зависимости ратиометрического сигнала S флуоресцеина от температуры среды при pH 6,5 в присутствии глицерина (фиолетовые символы) и сахарозы (розовые символы). Черные символы обозначают данные, полученные без соразтворителей



Тепловая чувствительность ратиометрического сигнала в зависимости от изменения энтальпии реакции в отсутствие и в присутствии соразтворителей.



Экспериментальные и модельные методы

Экспериментальные методы:

Абсорбционные исследования:

- Спектры поглощения.

В спектрах было учтено влияние фона



Спектрофотометр Lambda 35 (Perkin Elmer)



Люминесцентные исследования:

- Стационарные спектры люминесценции;
- Время-разрешенная спектроскопия;
- Поляризационная спектроскопия.

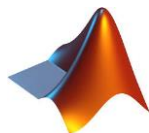
Учет реабсорбции, спектральной чувствительности и фонового значения



Спектрофлуориметр Fluorolog 3-22 (Horiba)



Модельные методы:



- Модель на основе кинетического подхода, описывающая распределение населенностей ионных форм в зависимости от: рН, длины волны возбуждения, температуры;
- Метод Аленцева – Фока разделения сложных контуров флуоресценции;
- Разложение спектров поглощения на компоненты с использованием алгоритма нелинейной аппроксимации Левенберга – Марквардта.