

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совета по защите диссертаций Д 01.24.01 при государственном научном учреждении «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси» по диссертационной работе **Фань Фаня «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов»**, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия

1. Специальность и отрасль науки, по которой присуждается ученая степень. Диссертация Фань Фаня соответствует отрасли «химические науки», специальности 02.00.04 – физическая химия.

2. Научный вклад соискателя заключается в следующем: Разработаны бифлуорофоры (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на основе жёсткого линкера – 3,5-диаминобензойной кислоты и проведено исследование их физико-химических характеристик в сопоставлении с монофлуорофорами флуоресцеина. Исследованы особенности флуоресценции бифлуорофоров в составе белковых конъюгатов. Установлены причины пониженных квантовых выходов флуоресценции цианиновых красителей Cy3 и Cy5, связанные с их растворимостью и конформационными перестройками в возбужденном состоянии. Показано, что при конъюгации с одноцепочечной ДНК интенсивность флуоресценции данных красителей значительно возрастает. Синтезированы производные Cy5 и Cy7 с линкерами различной длины и расположения, проведено их сравнительное исследование в свободном виде и в составе ДНК-конъюгатов. Установлены закономерности гомологичного резонансного переноса энергии (Homo-FRET) красителя Sybr Green I при его интеркаляции в двухцепочечную ДНК.

3. Формулировка конкретных научных результатов, за которые соискателю присуждается ученая степень. Ученая степень кандидата химических наук может быть присуждена в соответствии с пп. 20-26 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий» за новые научно обоснованные результаты, включающие:

- молекулярный дизайн и синтез карбоксифлуоресцеиновых бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Экспериментально доказанное снижение самотушения флуорофоров благодаря жёсткой структуре разветвленного линкера. Установление различий влияния параметров среды (рН, вязкости раствора, ионной силы и температуры) на спектры поглощения, флуоресценции и относительные квантовые выходы флуоресценции моно- и бифлуорофоров, а именно: в отличие от (5-FAM)₂, флуоресцентные свойства (6-FAM)₂ чувствительны к составу раствора;

- установление закономерностей изменения интенсивности флуоресценции красителей Cy3 и Cy5 в различных условиях, а именно: повышение истинной растворимости цианиновых красителей усиливает флуоресценцию в 3-5 раз, а увеличение энергии активации цис-транс изомеризации в результате повышения вязкости раствора повышает квантовый выход флуоресценции в 3-7 раз; 4-10 кратное усиление флуоресценции наблюдается также после конъюгации красителей с олигонуклеотидами;

- установление факта увеличения интенсивности флуоресценции в 1.2-2.0 раза при введении длинных гидрофильных заместителей для всех исследованных производных красителей Cy5 и Cy7. При конъюгации с ДНК-олигонуклеотидами у всех исследованных красителей Cy5 и Cy7 наблюдалось увеличение флуоресценции, причём в случае конъюгатов с одноцепочечной ДНК этот эффект выражен сильнее, чем с двухцепочечной ДНК;

- установленные закономерности взаимодействия интеркалирующего красителя Sybr Green I с двуцепочечной ДНК: в результате Homo-FRET при увеличении концентрации красителя интенсивность флуоресценции сначала линейно возрастает до $I_{rel} \sim 0.5$, а затем возрастает нелинейно и выходит на плато вследствие насыщения интеркалируемых сайтов в двухцепочечной ДНК; анизотропия флуоресценции с ростом концентрации красителя быстро снижается и выходит на остаточное постоянное значение до 8.3%,

что в совокупности вносит существенный вклад в развитие физической химии флуоресцентных биоконъюгатов и методов их применения в молекулярно-биологических исследованиях.

4. Рекомендации по практическому использованию результатов исследования. Установленные различия влияния параметров среды на флуоресцентные свойства бифлуорофоров (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ диктуют различные пути их практического применения: так, менее чувствительный к параметрам среды (5-FAM)₂ более пригоден для флуоресцентного мечения биомолекул благодаря более высокой интенсивности флуоресценции, в то время как (6-FAM)₂ может быть использован при разработке рН-сенсоров. Установление влияния свойств линкера и его положения в красителе на интенсивность флуоресценции создаёт методические основы для рационального дизайна меченных биоконъюгатов для диагностического применения. Оценка степени влияния безызлучательного переноса энергии внутри молекул на анизотропию флуоресценции помогает изучить взаимодействие молекулярных роторов с биологическими структурами и повысить эффективность флуоресцентных сенсоров на их основе.

Председатель Совета по защите диссертаций Д 01.24.01, д. х. н., профессор, академик

Ученый секретарь Совета по защите диссертаций Д 01.24.01, к. х. н.



А.В. Бильдокевич

С.А. Праценко