

Флуориметрические методы анализа взаимодействий между молекулами

Fluorimetric methods for molecular interaction analysis

И.А. Лифшиц^{1,2,#}.

I. A. Lifshits^{1,2,#}.

1. ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Трубетская, д. 8, Москва, Россия, 119048

2. МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, Москва, Россия, 119234

Автор для переписки: IliaGrimm@yandex.ru

1. I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya str. 8, Moscow, Russia, 119048

2. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-2, Moscow, Russia, 119991

Получено: 05.04.2025

Принято к публикации: 17.04.2025

Опубликовано: 30.06.2025

EDN: AGFDBM

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-18-24

Аннотация

Анализ параметров флуоресценции является давно известным и широко используемым подходом для описания молекулярных взаимодействий, поэтому знание сильных и слабых сторон различных флуориметрических методов значительно упростит поиск подходящего способа решения конкретной задачи. В данной работе описаны флуориметрические методы, основанные на измерениях интенсивности флуоресценции, анизотропии флуоресценции и эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии, а также экспериментально проиллюстрированы основные подходы к детекции молекулярных взаимодействий с их помощью.

Ключевые слова: Флуоресценция; Анизотропия флуоресценции; FRET; Интенсивность флуоресценции.

Annotation

The analysis of fluorescence parameters is a well-known and widely used approach for identification of molecular interactions, therefore the knowledge of strengths and weaknesses of different fluorometric methods will greatly help with solution of specific problems. In this paper, fluorometric methods based on detection of fluorescence intensity, fluorescence anisotropy and efficiency of Forster resonance energy transfer (FRET) are described and experimentally illustrated.

Key words: Fluorescence; Fluorescence anisotropy; FRET; Fluorescence intensity.

Введение

Флуоресценция — это длящийся короткое

время процесс эмиссии света объектом после его возбуждения. Вещества, поглощающие и испускающие свет, называются флуорофорами. Флуорофорами могут являться различные классы соединений, начиная с белков, примером которых может служить широко известный GFP [1], заканчивая синтетическими молекулами, такими как флуоресцеин изотиоцианат (FITC) [2].

Флуоресценция и, вместе с ней, флуорофоры уже долгое время являются незаменимыми инструментами, использующимися для наблюдения за большинством клеточных и молекулярных процессов. Примером использования флуоресценции *in vitro* может служить флуоресцентная микроскопия, в основе которой лежит мечение предмета наблюдения флуоресцентной меткой и дальнейшая его визуализация. При облучении источником возбуждения (лазером, светодиодом и т.д.) флуорофор поглощает свет определенной длины волны и испускает свет другой, более длинной волны. Таким образом, ранее невидимые структуры становятся видимыми, что позволяет наблюдать их распределение и динамику [3].

Флуоресценцию можно использовать не только как метод визуализации, но и как метод анализа молекулярных взаимодействий. Во втором случае особенное внимание стоит уделить низкомолекулярным флуорофорам, которые могут быть использованы не только как инертные метки для макромолекул, но и как непосредственно участники реакций [4]. Вследствие этого развитие новых и уже существующих флуориметрических методов, способных определять, какие конформационные изменения произошли с флуорофором и его микроокружением, является актуальным направлением для решения ряда научных проблем. Подобные исследования могут

помочь в нахождении новых сайтов связывания на макромолекулах, новых лигандов к ним и в характеристике взаимодействий молекул.

В этой работе будут рассмотрены такие подходы как:

1) наблюдение изменения интенсивности флуоресценции при изменении микроокружения флуорофора,

2) флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) и

3) метод анизотропии флуоресценции как распространенные подходы к анализу молекулярных взаимодействий.

Материалы и Методы

Анизотропия флуоресценции

В качестве буфера был использован BRB-80-TWEEN (80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.005% Tween-20, pH 6.8). В нём были разведены анализируемые пробы до концентраций: глицерин - 10%, 20% и 30%; стрептавидин - 0.1 мкМ. Далее к пробам был добавлен FITC до конечной концентрации 1 мкМ. Контроль представлял собой FITC, разведённый в чистом буфере до концентрации 1мкМ.

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка анизотропии флуоресценции проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 482-16 нм, а эмиссионный был детектирован на 530-40 нм, для соответствия спектральным характеристикам FITC. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Интенсивность флуоресценции

В качестве растворителя была использована MilliQ H₂O. В ней были разведены отдельно плазмиды и краситель SYBR Green. Далее к одному разведению SYBR Green были добавлены разведённые плазмиды (SYBR Green+DNA-ds), а к другому MilliQ H₂O (Free SYBR Green).

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка интенсивности флуоресценции проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 484-15 нм, а эмиссионный был детектирован на 529-20 нм, для соответствия спектральным характеристикам SYBR Green. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Ферстеровский перенос энергии

1) Подготовка к полимеризации тубулина

В двух пробирках смешать вещества в

концентрациях:

TAMRA меченного тубулина – 19.3 мкМ

Alexa-488 меченного тубулина – 61.6 мкМ

GTP – 1000 мкМ

MgCl₂ – 1000 мкМ

Таксол (во второй пробирке Майтанзин) – 250 мкМ

2) Полимеризация

Поставить обе пробирки и буфер в инкубатор на 37 °С. Инкубировать 20 минут. В качестве буфера был использован BRB-80 (80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 6.8)

3) Подготовка проб

Добавить в каждую из пробирок 60 мкл тёплого буфера, перемешать.

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка интенсивности FRET проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 482-16 нм для соответствия спектральным характеристикам Alexa-488, а эмиссионный был детектирован на 585-30 нм, для соответствия спектральным характеристикам TAMRA. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Методы статистического анализа

Для анализа статистической значимости различий между данными в экспериментах с интенсивностью флуоресценции, FRET и анизотропией флуоресценции был использован t-критерий Стьюдента. Обозначения статистической значимости на графиках: * - 0.05 > p-value > 0.01; ** - 0.01 > p-value > 0.001; *** - 0.001 > p-value.

Результаты и обсуждение

Детекция взаимодействий по изменению интенсивности флуоресценции флуорофора.

Измерение интенсивности флуоресценции, то есть анализ числа фотонов, испускаемых возбуждённым флуорофором, является одним из самых распространённых и развивающихся методов флуориметрии как в фундаментальных научных исследованиях, так и в поточных медицинских скринингах [5]. При изменении состояния флуорофора (его связывании с другими молекулами, изменением конформации и т. д.) интенсивность флуоресценции также может изменяться, что будет свидетельством происходящих с флуорофором процессов.

В качестве иллюстративного примера использования изменения интенсивности флуоресценции как индикатора связывания молекул в растворе можно привести наблюдение взаимодействия красителя SYBR Green и

ДНК (Рис. 1). В свободном состоянии SYBR Green является слабым флуорофором, но при связывании в малой бороздке ДНК, его интенсивность флуоресценции увеличивается в несколько порядков [6]. С помощью этого можно как детектировать наличие ДНК в растворе, так и измерять её концентрацию.

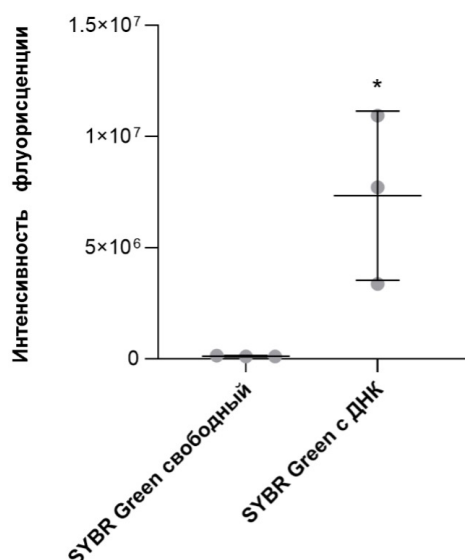


Рисунок 1. Интенсивность SYBR Green в свободном состоянии и при добавлении ДНК. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

Ещё одним примером использования интенсивности флуоресценции может служить метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) в реальном времени. При такой постановке ПЦР, помимо амплификации ДНК, второй задачей является подсчёт точного количества образующегося продукта. Сделать это можно с помощью применения специальных флуоресцирующих зондов, способных испускать свет только после взаимодействия с полимеразой (Рис. 2). По постепенному повышению интенсивности флуоресценции можно делать вывод о повышении концентрации ДНК [7].

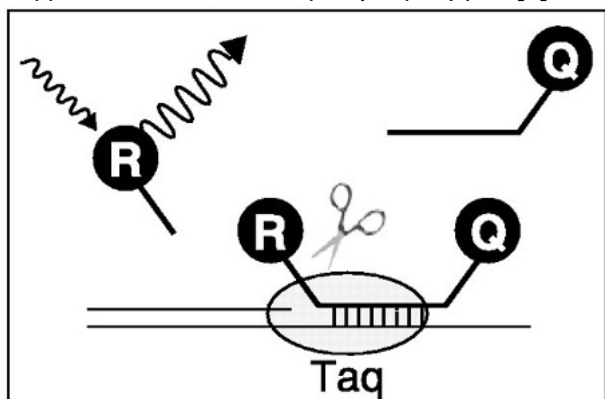


Рисунок 2. Механизм действия Taqman зонда. ДРепортерный флуорофор (R), испускает свет на длине волны, поглощаемой гасящим флуорофором (Q). Во время ПЦР-амплификации ДНК-полимераза (Taq) расщепляет зонд, высвобождая репортёр от гасителя, что позволяет измерить флуоресценцию. Иллюстрация воспроизведена из статьи [8] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

Интенсивность флуоресценции может использоваться и в исследованиях лиганд-белкового взаимодействия. Такое взаимодействие характерно для известного флуоресцентного зонда белка тубулина - вещества под названием "МТС" (2-метокси-5-(2,3,4-триметоксифенил)-2,4,6-циклогептатриен-1-она), которое является структурным аналогом колхицина. МТС способен испускать свет только в связанном с тубулином состоянии, но не в свободной форме. При наличии в растворе соединения, конкурирующего с МТС за колхициновый сайт, по уменьшению интенсивности флуоресценции можно судить об успешном вытеснении МТС из комплекса с тубулином [9]. Таким образом, может осуществляться поиск и определение неохарактеризованных лигандов к активным сайтам белков с уже известным лигандом-флуорофором.

В приведённых ранее примерах интенсивность флуоресценции изменялась при взаимодействии с органическими веществами, однако увеличение концентрации неорганических солей в микроокружении белка также может привести к изменению его спектральных свойств. Примером может служить клеточный белок, связывающий ретиноевую кислоту I (CRAB I), имеющий в своей структуре остатки аминокислоты триптофана, интенсивность флуоресценции которых повышается при добавлении увеличивающихся концентраций неорганических солей (NaCl; Na₂SO₄). CRAB I изменяет свою конформацию, в результате чего, нарушается пространственная ориентация остатков аргинина и фенилаланина, блокирующих триптофан, и флуоресценция последнего перестаёт заглушаться. Увеличение интенсивности флуоресценции ввиду взаимодействия с солью было названо "усиленной солью флуоресценцией" (SEF) [10].

Несмотря на большую распространенность метода и лёгкость в его применении, измерение интенсивности флуоресценции имеет ряд недостатков, которые стоит иметь в виду [11]. Одной из главных проблем данного метода является большое количество шума, причинами которого могут быть автофлуоресценция, фоновая засветка и т.д. Также интенсивность флуоресценции очень зависима от концентрации вещества, что делает метод незащищенным от неточностей, связанных с погрешностью пипетирования и смешивания растворов.

Ферстеровский перенос энергии

Ферстеровский перенос энергии (FRET, от англ. Förster resonance energy transfer) - это процесс, происходящий между двумя молекулами - флуорофорами (донором и акцептором), в котором после возбуждения донора энергия передается молекуле-акцептору [12].

Особенностью FRET является то, что, в отличие от обычной флуоресценции, перенос энергии возможен только при соблюдении нескольких условий: 1) нахождение пары донор-акцептор на расстоянии менее чем 10 нанометров; 2) спектр эмиссии донорного флуорофора должен перекрываться со спектром поглощения акцептора; и 3) донорный флуорофор должен иметь достаточный квантовый выход [13].

Иллюстрацией использования FRET для детекции белок-белковых взаимодействий может служить эксперимент с полимеризацией тубулиновых микротрубочек. Димеры из двух субъединиц тубулина способны полимеризоваться в 13-ти протофиламентные микротрубочки. Если сополимеризовать друг с другом две фракции тубулина, одну, помеченную зеленым красителем Alexa 488, а другую – красным красителем TAMRA, то полученные микротрубочки будут состоять из связанных между собой димеров обеих фракций. Тогда можно предположить, что меченные красителями димеры будут находиться в достаточной близости друг от друга для того, чтобы между красителями Alexa 488 и TAMRA произошёл FRET (Рис. 3 А). В этой паре флуорофоров Alexa 488 будет выступать в качестве донора энергии, а TAMRA – акцептора. Следуя той же логике, если помешать полимеризации тубулина в микротрубочки, то меченые красителями димеры тубулина будут находиться в свободном состоянии в растворе и расстояние между димерами будет недостаточным для создания условий для FRET.

Подтвердить это можно экспериментально с помощью добавления в процесс полимеризации ингибиторов динамической нестабильности микротрубочек – таксола и майтензина. Таксол – стабилизирующий агент микротрубочек, не дающий им деполимеризоваться, в то время как майтензин – дестабилизирующий агент, при добавлении которого в раствор тубулина полимеризация в микротрубочки происходить не будет, и большая часть тубулина будет находиться в свободной форме (Рис. 3 А). При проведении детекции интенсивности FRET двух растворов (с таксолом и с майтензином) было обнаружено статистически значимое увеличение интенсивности флуоресценции раствора с собранными микротрубочками (Рис. 3 Б), что говорит о возможности использования FRET как метода для обнаружения процессов полимеризации тубулина.

В предыдущем примере наличие FRET детектировалось по увеличению интенсивности флуоресценции акцепторного флуорофора, однако существуют и другие методы, позволяющие детектировать FRET как *in vivo*, так и *in vitro* [14]. Примером может являться использование FRET

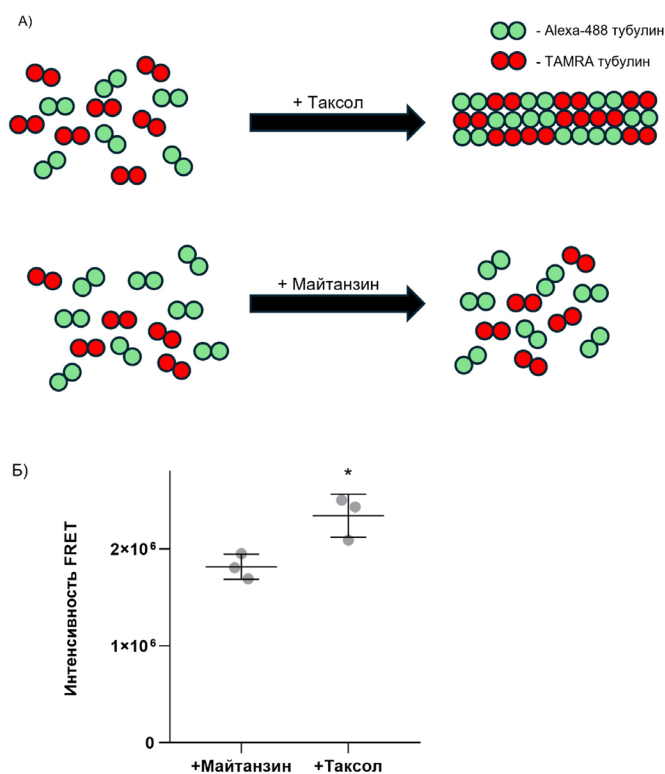


Рисунок 3. FRET между димерами тубулина, меченными красителями Alexa-488 и TAMRA при полимеризации микротрубочек. А) Постановка эксперимента по полимеризации микротрубочек в присутствии таксола и майтензина. При добавлении таксола полимеризация тубулиновых микротрубочек происходит нормально, а при добавлении майтензина полимеризации не происходит. Б) Интенсивность FRET в двух условиях. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

с временным разрешением (TR-FRET). TR-FRET объединяет в себе FRET и флуоресценцию с временным разрешением (TRF). Главной идеей метода является использование временной задержки в микросекундном диапазоне между возбуждением флуорофорной пары и детектированием флуоресценции. Это устраняет кратковременный фоновый шум, создаваемый рассеянным возбуждающим светом и автофлуоресценцией. Однако для применения метода обычно требуются высокоспецифичные неорганические флуорофоры (например, лантаноиды), которые характеризуются большой длительностью излучения до миллисекунд [15].

Расстояние между донорным и акцепторным флуорофором играет важную роль во FRET. Зависимость эффективности переноса энергии (E) от расстояния между молекулами флуорофоров определяется нижеприведённым уравнением, где “R” указывает на фактическое расстояние между донором и акцептором, тогда как “ R_0 ” представляет собой Ферстеровское расстояние, при котором вероятность передачи энергии составляет 50% [13].

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$$

Таким образом, за счёт высокой обратной зависимости от расстояния между донором и акцептором, по эффективности FRET в растворе может говорить не только о наличии (или отсутствии) флуоресценции и о концентрации флуорофоров, вовлечённых в реакцию, но и о дистанции между ними.

Использование FRET в качестве “молекулярной линейки” уже нашло своё применение в исследованиях строения белков. С помощью метода микроскопии с минимальными потоками флуоресцентных фотонов (MINFLUX) удалось измерить расстояние между флуорофорами с точностью до ангстрем. Таким образом, при присоединении FRET пары к, например, остаткам аминокислот белка расстояние между ними можно визуализировать с помощью световой микроскопии [16].

С помощью FRET можно также и детектировать изменения в структуре нуклеиновых кислот. Примером может служить синтезированная Пре-МикроРНК, где оба флуорофора находятся в разных частях одного олигонуклеотида. Таким образом, в зависимости от того, насколько изменилась интенсивность FRET, можно судить о пространственном сближении (или разделении) донора и акцептора, сообщаящем об изменении конформации олигонуклеотида [17].

К недостаткам FRET можно отнести усложнённый поиск флуорофоров, так как спектры излучения донора и возбуждения акцептора должны перекрываться для соблюдения условий FRET. Также при использовании интенсивности донора или акцептора как метода детекции FRET могут возникнуть те же проблемы, что при прямом измерении интенсивности флуоресценции (автофлуоресценция, автогашение и т.д.) [18].

Анизотропия флуоресценции

В отличие от методов на основе измерения интенсивности флуоресценции и FRET, анализ анизотропии флуоресценции использует другую характеристику света - его поляризацию. Для любого раствора флуорофоров поляризованный свет будет возбуждать только те молекулы в растворе, которые находятся в определённой ориентации; то же самое верно и для эмиссии света: ориентация молекулы определяет поляризованность испускаемого света [19]. Если измерительный прибор способен измерять интенсивность света при двух ортогональных поляризациях, то можно определить степень поляризации флуоресценции как соотношение между этими сигналами. Эта величина зависит от вращения молекулы флуорофора за время между возбуждением и эмиссией света, соответственно, чем больше коэффициент вращательной диффузии, тем в среднем быстрее она будет

поворачиваться в растворе в результате тепловых колебаний, и, следовательно ее ориентация в момент испускания света останется ближе к той, в которой произошло возбуждение. Этот эффект описывается ниже представленным уравнением Перрена, где r - наблюдаемая анизотропия; r_0 – внутренняя анизотропия молекулы; τ – время жизни флуоресценции и ϕ – характерное время вращения [20].

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\phi}}$$

Иначе говоря, скорость случайного вращения, а значит, и измеряемая степень поляризации или анизотропия флуоресценции, напрямую зависит от физических характеристик молекулы флуорофора (размера, формы) и характеристик его окружения (вязкость, гидрофобность среды) [21].

Проиллюстрировать формулу Перрена можно с помощью наглядного эксперимента, в котором, увеличивая вязкость раствора, добавляя в него повышающуюся концентрацию глицерина, мы замедляем случайное вращение молекул флуорофора FITC, тем самым увеличиваем возможность успеть испустить флуоресценцию в направлении возбуждения (Рис. 4 А). Согласно ожиданиям, анизотропия повышается с увеличением вязкости раствора.

Таким образом, анизотропию флуоресценции можно использовать в качестве метода определения физических характеристик растворов. Такие характеристики, как вязкость и температура, влияют на анизотропию флуоресценции низкомолекулярных флуорофоров, что позволяет использовать ее для вискозо- и температурометрии [22].

В то же самое время, с помощью анизотропии флуоресценции можно характеризовать взаимодействия типа “лиганд-белок”, где в роли лиганда выступает низкомолекулярный флуорофор. В такой постановке, в свободном виде флуорофор будет испускать низко поляризованный свет, а образованный во время реакции комплекс с белком - высоко поляризованный. Наглядным примером может служить взаимодействие биотина, меченного FITC, и белка стрептавидина - часто используемого в молекулярной биологии за счёт своей высокой аффинности к биотину [23] (Рис. 4 Б). Как видно из графика – комплексы стрептавидин-биотин-FITC обладают намного более высокой анизотропией, чем флуорофор в свободном виде.

О взаимодействии белка-мишени с его низкомолекулярными лигандами можно судить по конкуренции за один и тот же сайт связывания между немеченым и флуоресцентно меченным лигандом, называемым флуоресцентным зондом. При связывании с белком-мишенью анизотропия

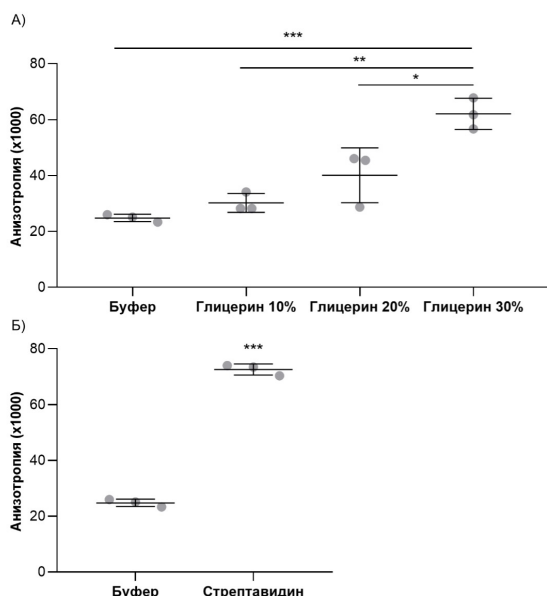


Рисунок 4. Изменение анизотропии флуоресценции.

Постановка эксперимента по полимеризации микротрубочек А) Увеличение анизотропии FITC с увеличением вязкости раствора. Б) Увеличение анизотропии комплекса стрептавидин-биотин-FITC. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

флуоресценции зонда будет повышаться, а при конкурентном вытеснении зонда из того же сайта немеченым лигандом – понижаться. Эту стратегию можно применять для выявления высокоаффинных лигандов определённого белкового сайта [24].

Также большой популярностью такой подход пользуется в экспериментах, где в роли лиганда выступает меченый олигонуклеотид и проверяется его способность связываться с ядерными белками, такими как полимеразы [25].

Помимо использования анизотропии флуоресценции как метода детекции связывания микро- и макромолекул между собой, он может применяться и как характеристика изменений, происходящих со структурой молекулы. Примером является детекция денатурации белка, где в собранном состоянии объём белка значительно меньше, чем в денатурированном варианте, и, соответственно, во время разборки детектируемая анизотропия будет увеличиваться [26].

Так как метод анизотропии флуоресценции полагается не на абсолютное значение интенсивности флуоресценции флуорофоров, а на соотношение интенсивностей в перпендикулярных направлениях поляризации света, то концентрационные погрешности не будут оказывать влияния на выходные значения. Однако большая зависимость метода от размеров молекул часто ограничивает его применимость использованием низкомолекулярных флуорофоров для получения

четкого сигнала. Для преодоления этой проблемы уже разрабатываются подходы по увеличению динамического диапазона измерений с целью приспособить метод и к молекулам большего размера [27].

Заключение

Использование флуоресценции для получения более точной оценки происходящих в растворе процессах уже давно является эффективным инструментом в исследованиях *in vivo*, *in vitro* и даже *in situ*. Флуориметрические методы, открытые ещё в 20-ом веке, не только не потеряли своей актуальности, но и находят своё применение во всё больших областях науки. Благодаря постоянному совершенствованию оптических технологий и нахождению новых целей для применения флуориметрии, с помощью интенсивности флуоресценции, FRET и анизотропии стало возможно не только говорить о наличии взаимодействия между молекулами как такового, но и давать более точную характеристику этого процесса.

Финансирование

Исследование не получало внешнего финансирования.

Благодарности

Экспериментальная часть работы проведена с использованием оборудования мультимодальный ридер CLARIOstar Plus, приобретённого в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» по программе «Наука и университеты»; оборудование включено в ЦКП «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование» при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Zimmer M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem Rev.* 1 март 2002 г.;102(3):759–82. DOI: 10.1021/cr010142r
2. Martynov V, Pakhomov A, Popova N, Deyev I, Petrenko A. Synthetic fluorophores for visualizing biomolecules in living systems. *Acta Naturae* Англоязычная Версия. 2016 г.;8(4 (31)):33–46
3. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* декабрь 2005 г.;2(12):910–9. DOI: 10.1038/nmeth817

4. Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol Ther.* 1 ноябрь 2003 г.;100(2):101–18. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2003.08.001
5. Schwartz A, Wang L, Early E, Gaigalas A, Zhang Y zhong, Marti GE, и др. Quantitating Fluorescence Intensity from Fluorophore: The Definition of MESF Assignment. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 2002 г.;107(1):83–91. DOI: 10.6028/jres.107.009
6. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, и др. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *J Fluoresc.* 2012 г.;22(4):1189–99. DOI: 10.1007/s10895-012-1059-8
7. Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour.* 2012 г.;12(3):456–63. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x
8. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* сентябрь 2005 г.;29(3):151–9. DOI: 10.1152/advan.00019.2005
9. Antúnez-Mojica M, Rodríguez-Salarichs J, Redondo-Horcajo M, León A, Barasoain I, Canales Á, и др. Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin. *J Nat Prod.* 26 август 2016 г.;79(8):2113–21. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00428
10. Millan S, Swain BC, Tripathy U, Mishra PP, Sahoo H. Effect of micro-environment on protein conformation studied by fluorescence-based techniques. *J Mol Liq.* 15 декабрь 2020 г.;320:114489. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114489
11. Lahlou A, Tehrani HS, Coghill I, Shpinov Y, Mandal M, Plamont MA, и др. Fluorescence to measure light intensity. *Nat Methods.* декабрь 2023 г.;20(12):1930–8. DOI: 10.1038/s41592-023-02063-y
12. Förster Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys.* 1948 г.;437(1–2):55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105
13. Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, Szöllősi J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int J Mol Sci.* 25 март 2015 г.;16(4):6718–56. DOI: 10.3390/ijms16046718
14. Fang C, Huang Y, Zhao Y. Review of FRET biosensing and its application in biomolecular detection. *Am J Transl Res.* 15 февраль 2023 г.;15(2):694–709.
15. Liu Y, Zhou S, Tu D, Chen Z, Huang M, Zhu H, и др. Amine-functionalized lanthanide-doped zirconia nanoparticles: optical spectroscopy, time-resolved fluorescence resonance energy transfer biodetection, and targeted imaging. *J Am Chem Soc.* 12 сентябрь 2012 г.;134(36):15083–90. DOI: 10.1021/ja306066a
16. Sahl SJ, Matthias J, Inamdar K, Weber M, Khan TA, Brüser C, и др. Direct optical measurement of intramolecular distances with angstrom precision. *Science.* 11 октябрь 2024 г.;386(6718):180–7. DOI: 10.1126/science.adj7368
17. Bood M, del Nogal AW, Nilsson JR, Edfeldt F, Dahlén A, Lemurell M, и др. Interbase-FRET binding assay for pre-microRNAs. *Sci Rep.* 30 апрель 2021 г.;11(1):9396. DOI: 10.1038/s41598-021-88922-0
18. Zhang Y, Ma X, Zhu M, Wang VYF, Guo J. Progress and Prospects in FRET for the Investigation of Protein–Protein Interactions. *Biosensors.* сентябрь 2025 г.;15(9):624. DOI: 10.3390/bios15090624
19. Lakowicz JR. Fluorescence Anisotropy. B: Lakowicz JR, редактор. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Boston, MA: Springer US; 1999. с. 291–319. DOI: 10.1007/978-1-4757-3061-6_10
20. Ozinskas AJ. Principles of Fluorescence Immunoassay. B: Lakowicz JR, редактор. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Probe Design and Chemical Sensing* Boston, MA: Springer US; 1994. с. 449–96. DOI: 10.1007/0-306-47060-8_14
21. Gradinaru CC, Marushchak DO, Samim M, Krull UJ. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *Analyst.* 22 февраль 2010 г.;135(3):452–9. DOI: 10.1039/B920242K
22. Jain P, Motosuke M. Fluorescence Anisotropy Studies on Bodipy (Pyrromethene 546) Dye as a Novel Thermal Probe. *J Fluoresc.* 1 март 2022 г.;32(2):737–43. DOI: 10.1007/s10895-021-02868-0
23. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 ноябрь 2013 г.;97(21):9343–53. DOI: 10.1007/s00253-013-5232-z
24. Dutta A, Szekely Z, Guven H, Li XP, McLaughlin JE, Tumer NE. A fluorescence anisotropy-based competition assay to identify inhibitors against ricin and Shiga toxin ribosome interactions. *Anal Biochem.* сентябрь 2024 г.;692:115580. DOI: 10.1016/j.ab.2024.115580
25. LiCata VJ, Wowor AJ. Applications of fluorescence anisotropy to the study of protein-DNA interactions. *Methods Cell Biol.* 2008 г.;84:243–62. DOI: 10.1016/S0091-679X(07)84009-X
26. Chullipalliyalil K, Elkassas K, McAuliffe MAP, Vucen S, Crean A. In-Vial Detection of Protein Denaturation Using Intrinsic Fluorescence Anisotropy. *Anal Chem.* 7 февраль 2023 г.;95(5):2774–82. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03912
27. Volpato A, Ollech D, Alvelid J, Damenti M, Müller B, York AG, и др. Extending fluorescence anisotropy to large complexes using reversibly switchable proteins. *Nat Biotechnol.* апрель 2023 г.;41(4):552–9. DOI: 10.1038/s41587-022-01489-7