

УДК 577.7; 577.112.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ СПЕКТР ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ВО ВРЕМЕНИ

Ф.В. Субач¹, Е.С. Морозова^{1,2}, В.В. Верхуша¹, Е.Э. Перский²

¹ Медицинский колледж им. А.Эйнштейна, 1300 Моррис Парк авеню, Нью-Йорк, 10461, США

² Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61077, Украина

E-mail: vverkhush@aecom.yu.edu, epersky@list.ru

Поступила в редакцию 4 мая 2009 г.

Принята 22 мая 2009 г.

Изучены спектральные характеристики трёх мономерных флуоресцентных белков - флуоресцентных таймеров (ФТ), созданных из исходного белка mCherry. Основной особенностью ФТ является способность изменять свою флуоресценцию с голубой на красную во времени. Полученные варианты характеризуются большим (Б), средним (С) и малым (М), временем созревания хромофора от голубого к красному. Время перехода от голубой флуоресценции к красной обратнопропорционально температуре. При температуре 37⁰С, максимумы голубой флуоресценции наблюдаются через 0,25, 1,2 и 9,8 часа для очищенных БФТ, СФТ и МФТ, соответственно. Полу максимумы красной флуоресценции у этих белков наблюдаются через 3,9; 7,1 и 28 часов. У всех трёх вариантов ФТ пики возбуждения и флуоресценции для голубых форм равны 403 нм и 583 нм, а для красных форм - 466 нм и 606 нм соответственно. Флуоресценция всех изученных форм ФТ имеет высокую рН-стабильность в области рН от 4,5 до 7,5 со значением pK_a , соответственно, около 3,0 для голубых и 4,1-4,7 для красных форм. Молярные коэффициенты экстинкции и квантовые выходы голубых форм ФТ находятся в пределах 33400-49700 М⁻¹см⁻¹ и 0,30-0,41, соответственно. Коэффициенты экстинкции красных форм ФТ выше, чем для голубых, и варьируют от 75300 М⁻¹см⁻¹ у БФТ до 84200 М⁻¹см⁻¹ у МФТ. Квантовые выходы красных форм ФТ находятся в пределах 0,05-0,09. Флуоресцентные свойства исследованных вариантов ФТ позволяют изучать процессы с существенно отличающимися временными характеристиками. Исследованные ФТ можно также использовать при создании пар с зелёными флуоресцентными белками для флуоресцентного индуктивного переноса энергии от голубой формы на зелёную, или от зелёной на красную, что расширяет возможности многоцветной флуоресцентной внутриклеточной детекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуоресцентный белок, микроскопия, хромофор, флуоресценция.

В настоящее время флуоресцентные белки являются универсальными инструментами при проведении исследований в области биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и биологии развития. Оптимальными зондами для визуализации динамики различных внутриклеточных процессов могут стать мономерные флуоресцентные белки (ФБ), способные изменять спектры флуоресценции во времени (флуоресцентные таймеры - ФТ). Это определяется тем, что разные времена созревания хромофора позволяют детектировать хронологию и пространственную локализацию молекулярных событий.

В настоящей работе изучены спектральные и биохимические свойства очищенных белков БФТ, СФТ и МФТ, полученных из исходного мономерного красного белка mCherry, сведения о которых необходимы для применения ФТ в микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения очищенных рекомбинантных белков, клетки LMG194 выращивали в течение ночи и затем разбавляли до оптической плотности 1,0,

измеренной при длине волны 600 нм, после чего добавляли 0,2% арабинозы, индуцируя, тем самым, экспрессию белка.

Далее бактериальные культуры росли в 50 мл пробирках, заполненных до краёв и плотно закрытых для ограничения доступа кислорода при 37°C. Через 1 час клетки осаждали центрифугированием в тех же плотно закрытых пробирках. Осаждённые клетки разрушали при температуре -80°C, белки выделяли B-Per реактивом (Pierce) и очищали с применением Ni-NTA смолы (Qiagen) в течение 15 мин при 4°C [1].

Исследования флуоресценции в процессе созревания голубой и красной форм проводили при температурах 16°C, 25°C, 37°C и 45°C в солевом фосфатном буфере PBS.

Коэффициенты экстинкции ФТ рассчитывали по формулам:

Для голубых форм -

$$X = (A_{399} \times 28500) \div B_{382} \quad [M^{-1}cm^{-1}] \quad (1),$$

Для красных форм -

$$X = (A_{583} \times 44000) \div B_{447} \quad [M^{-1}cm^{-1}] \quad (2),$$

где - X – коэффициент экстинкции. A_{399} , A_{583} – значения поглощения нативного хромофора на указанной длине волны. B_{382} , B_{447} – значения поглощения денатурированного хромофора на указанной длине волны. 28500 $M^{-1}cm^{-1}$, 44000 $M^{-1}cm^{-1}$ - коэффициенты экстинкции модельного состава тирозинсодержащих стандартов ЗБФ-подобных (зелёный флуоресцентный белок) хромофоров на 382 нм в 1M HCl [2] и на 447 нм в 1M NaOH [3], соответственно.

В случае измерения этого показателя для голубых форм, белки денатурировали 1M HCl сразу после очистки, а красные формы белков созревали в течение 24-48 часов на 37°C и затем были денатурированы 1M NaOH.

Величину квантового выхода флуоресценции вычисляли по формуле:

$$QY_x = (I_{фл_x} \div A_x) \times (A_{standart} \div I_{фл_{standart}}) \times QY_{standart} \quad (3),$$

где: $I_{фл_x}$ – площадь под спектром флуоресценции образца; A_x – величина поглощения в пике возбуждения; $I_{фл_{standart}}$ - площадь под спектром флуоресценции стандарта; $A_{standart}$ - величина поглощения в пике возбуждения стандарта; $QY_{standart}$ - величина квантового выхода стандарта. Образец разбавляли до величины $A < 0,1$.

В экспериментах по определению квантового выхода интенсивности флуоресценции голубых и красных форм сравнивались с таковыми для стандартов – ЗБФ (квантовый выход 0,60) [4] и mCherry (квантовый выход 0,22) [5], соответственно, при одинаковой величине поглощения сравниваемых белков.

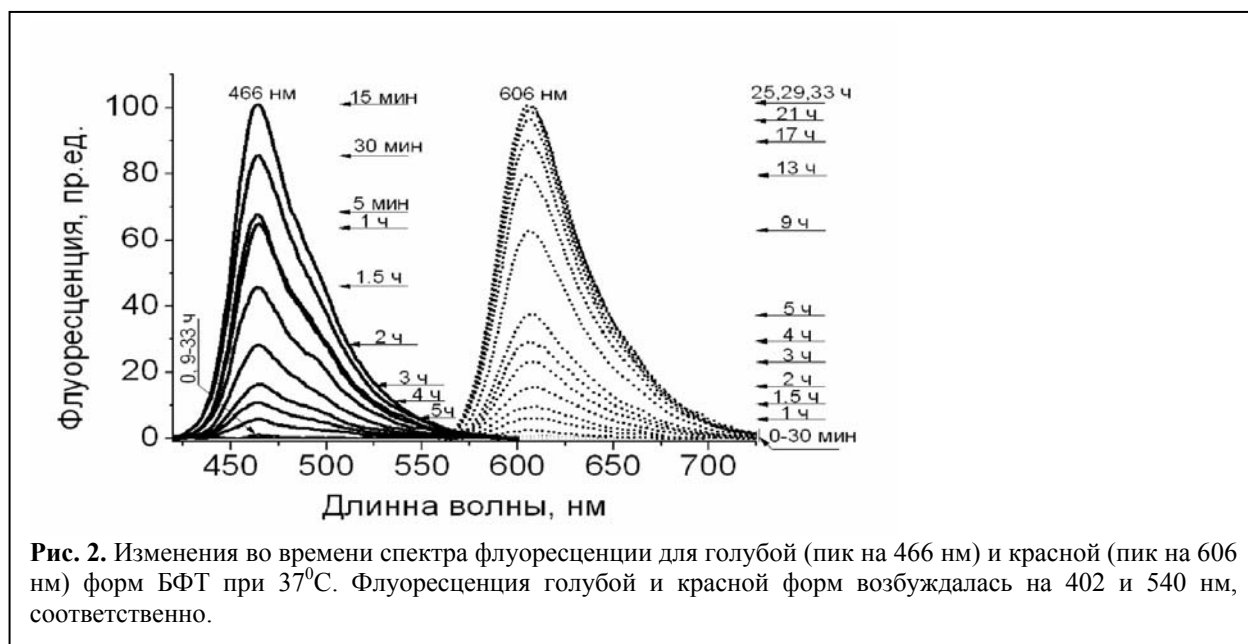
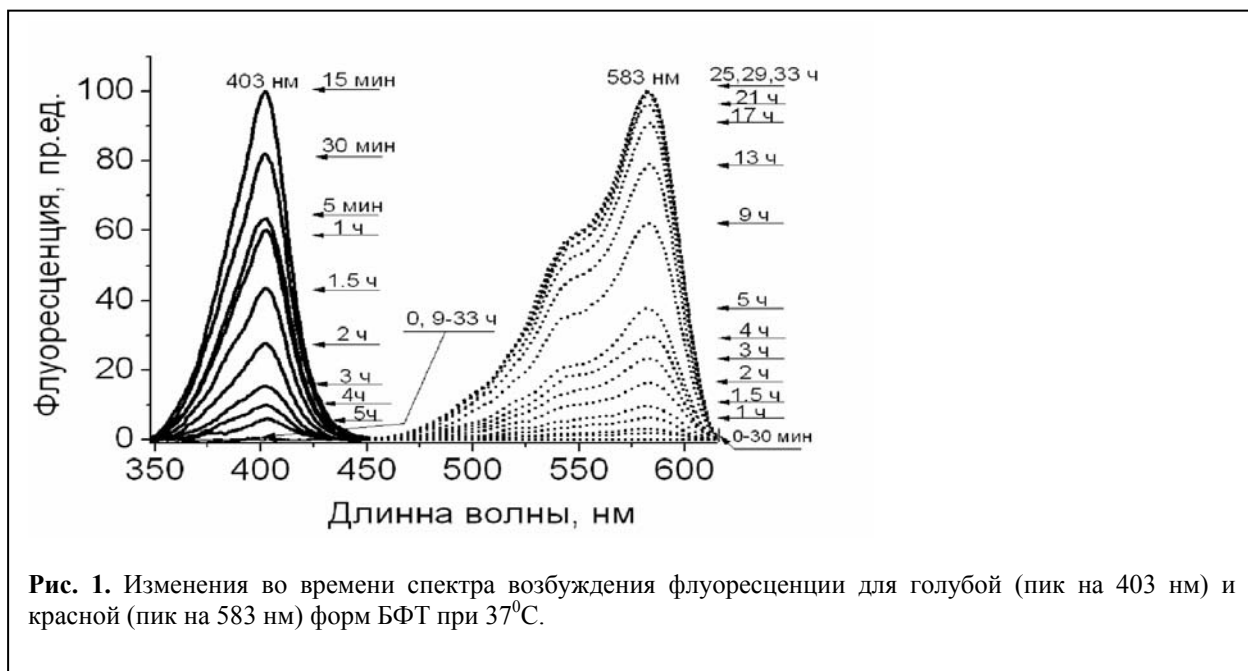
Определение зависимости интенсивностей флуоресценции от pH проводили, используя различные соотношения буферных растворов 100 mM NaOAc и 300 mM NaCl для pH 2,5-5,0, и 100 mM NaH_2PO_4 и 300 mM NaCl для pH 4,5-9,0.

Флуоресценцию белков измеряли на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Jobin Yvon). Инструментальная ошибка измерений спектральных характеристик составляла ± 1 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 1 и 2 приведены спектры возбуждения и флуоресценции очищенной голубой и красной форм БТФ на различных этапах созревания. Как видно, независимо от

времени созревания, соответствующие пики, как возбуждения, так и флуоресценции, остаются неизменными для обеих форм и составляют 403/466 нм и 583/606 нм, соответственно. В случае СФТ и МФТ пики возбуждения и флуоресценции для голубой и красной форм в пределах ошибки измерения не отличаются от БФТ.



Из рис. 1 и 2 видно, что интенсивность флуоресценции исходной формы становится максимальной уже через 15 мин существования и снижается практически до 0 после 5 часов для БТФ. В то же время в процессе её перехода в красную форму последняя позволяет фиксировать достаточно интенсивную флуоресценцию в период от нескольких часов до суток.

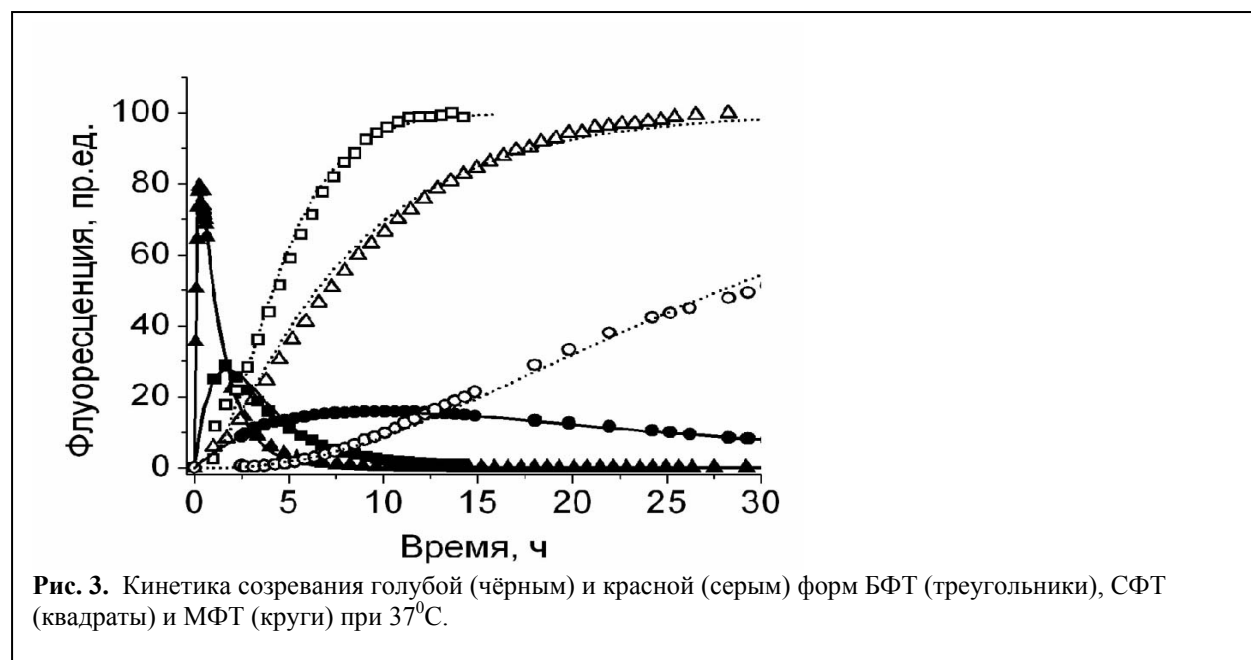
На рис. 3 приведены рассчитанные по данным рис. 2 кинетические кривые интенсивности флуоресценции БФТ, СФТ, МФТ для голубой и красной форм белка.

В процессе созревания ФТ флуоресценция голубых форм увеличивается до своих максимальных значений, и после этого уменьшается до нуля (Рис. 1-3), тогда как флуоресценция красных форм увеличивается во времени с некоторой задержкой и затем выходит на плато. При температуре 37°C максимумы интенсивностей голубой флуоресценции наблюдается через 0,25, 1,2 и 9,8 часа для БФТ, СФТ и МФТ, соответственно. Полу максимумы интенсивностей красной флуоресценции достигаются через 7,1, 3,9 и 28 часов. Эти времена увеличиваются при более низких (16°C или 25°C) и уменьшаются при более высоких (45°C) температурах по сравнению с 37°C (Табл. 1).

Весьма существенным для использования ФБ является их устойчивость при локальных изменениях рН при протекании различных метаболических процессов в клетке. В связи со сказанным на рис. 4 приведены зависимости интенсивности флуоресценции для голубых и красных форм исследуемых ФТ от рН. Как видно, в области рН от 4,5 до 7,5 интенсивность флуоресценции всех изученных голубых и красных форм не различаются.

Следует отметить, что рН-стабильность флуоресценции красных форм близка к таковой исходного белка mCherry, имеющего значения $pK_a = 4,1-4,7$ [5] (Рис. 4б).

Так как флуоресценция обеих форм - голубой и красной - уменьшается при



защелкиванию среды, отношение между их интенсивностями флуоресценций изменяются при понижении рН значительно меньше, чем красный сигнал, но больше чем голубой (Рис. 4в).

Для всех ФТ это отношение меняется в пределах физиологических значений рН 5,4-7,4 менее чем на 8%.

Молярные коэффициенты экстинкции и квантовые выходы голубых форм ФТ находятся в пределах 33400-49700 $M^{-1}cm^{-1}$ и 0,30-0,41, соответственно (Табл. 2). Флуоресценция голубых форм отличается высокой рН-стабильностью со значением pK_a около 3,0 (Рис. 4а). Для сравнения можно отметить, что лучший голубой ФБ, известный в настоящее время - EBFP2 -, характеризуется более низкой рН-стабильностью со значением pK_a около 4,5 [5].

Коэффициенты экстинкции красных форм ФТ выше, чем эти же величины для голубых форм и варьируют от 73100 до 84200 $M^{-1}cm^{-1}$. Квантовые выходы красных форм ФТ находятся в пределах 0,05-0,09.

Табл. 1. Характерные времена созревания голубой и красной форм очищенных белков ФТ.

| Белок | | Характерные времена, ч | | | |
|------------------|---------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 16 ⁰ С | 25 ⁰ С | 37 ⁰ С | 45 ⁰ С |
| Быстрый -ФТ | Голубая форма | 1,6 | 0,58 | 0,25 | 0,18 |
| | Красная форма | 42 | 18 | 7,1 | 4,2 |
| Средний -ФТ | Голубая форма | 2,2 | 1,6 | 1,2 | 0,70 |
| | Красная форма | 23 | 8,8 | 3,9 | 2,4 |
| Медленный -ФТ | Голубая форма | 33 | 20 | 9.8 | 7,3 |
| | Красная форма | 108 | 69 | 28 | 17 |

Следует отметить, что благодаря уникальным спектральным и структурной устойчивости мономерные ФТ позволяют визуализировать транспортные процессы между компартментами клетки, выяснить пространственно-временные изменения в судьбе молекул до и после определённого клеточного события, и охарактеризовать время посттрансляционных внутриклеточных модификаций без необходимости дополнительного клеточного мечения.

Выбор подходящего ФТ зависит от временных характеристик конкретного

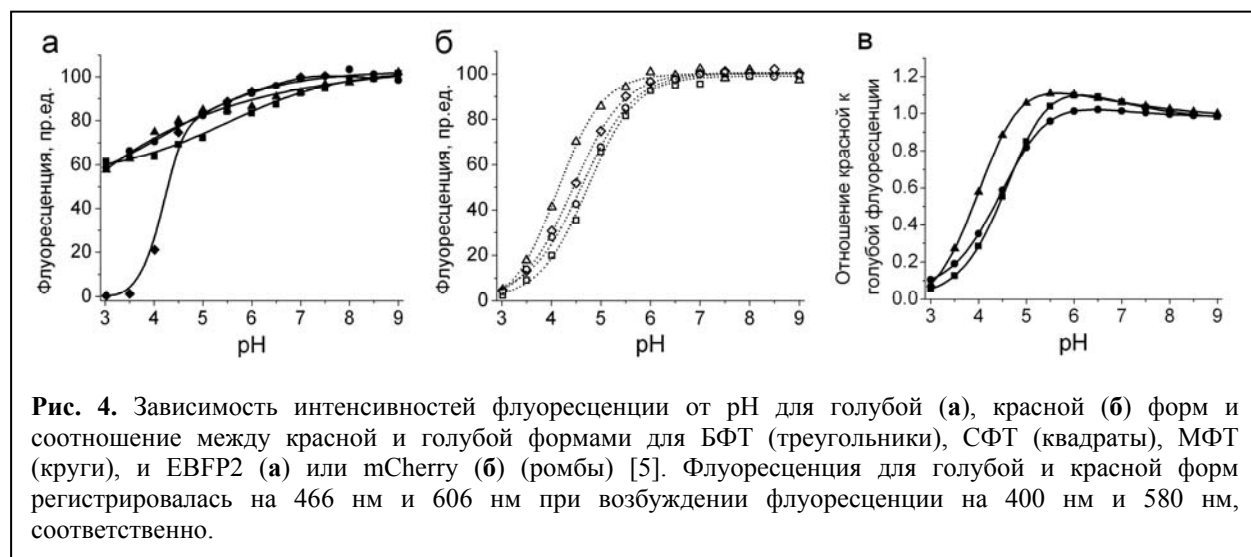


Рис. 4. Зависимость интенсивностей флуоресценции от рН для голубой (а), красной (б) форм и соотношение между красной и голубой формами для БФТ (треугольники), СФТ (квадраты), МФТ (круги), и EBFP2 (а) или mCherry (б) (ромбы) [5]. Флуоресценция для голубой и красной форм регистрировалась на 466 нм и 606 нм при возбуждении флуоресценции на 400 нм и 580 нм, соответственно.

клеточного процесса. Следовательно, наличие трёх вариантов ФТ с различными временами созревания хромофора позволит изучать процессы с существенно отличающимися временными характеристиками. Более того, голубой и красный флуоресцентные цвета ФТ, вместе с зелёными ФБ, могут применяться для многоцветного флуоресцентного мечения клетки, что существенно расширяет возможности метода.

Табл. 2. Оптические свойства голубой и красной форм очищенных белков ФТ.

| Белок | | Пик возбуждения, нм | Пик флуоресценции, нм | Коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$ | Квантовый выход | pK_a |
|---------------|---------------|---------------------|-----------------------|---|-----------------|--------|
| Быстрый -ФТ | Голубая форма | 403 | 466 | 49700 | 0,30 | 2,8 |
| | Красная форма | 583 | 606 | 75300 | 0,09 | 4,1 |
| Средний -ФТ | Голубая форма | 401 | 464 | 44800 | 0,41 | 2,7 |
| | Красная форма | 579 | 600 | 73100 | 0,08 | 4,7 |
| Медленный -ФТ | Голубая форма | 402 | 465 | 33400 | 0,35 | 2,6 |
| | Красная форма | 583 | 604 | 84200 | 0,05 | 4,6 |

В заключение, стоит упомянуть, что мономерное состояние ФТ может оказаться важным свойством при создании пар с зелёными ФБ для флуоресцентного индуктивного переноса энергии от голубой формы ФТ на ЗФБ, или от ЗФБ на красную форму ФТ белков.

ВЫВОДЫ

1. Изучены спектральные характеристики трёх мономерных красных флуоресцентных белков - флуоресцентных таймеров (ФТ), созданных из белка mCherry и способных с различной скоростью изменять спектр флуоресценции во времени с голубого на красный - БФТ, СФТ и МФТ.

2. При температуре 37^0 С, максимумы голубой флуоресценции наблюдаются через 0,25, 1,2 и 9,8 часа для очищенных БФТ, СФТ и МФТ, соответственно. Полу максимумы красной флуоресценции у этих белков наблюдаются через 3,9; 7,1; и 28 часов. У всех трёх вариантов ФТ пики возбуждения и флуоресценции для голубых форм равны 403 нм и 583 нм, а для красных форм – 466 нм и 606 нм соответственно.

3. Молярные коэффициенты экстинкции и квантовые выходы голубых форм ФТ находятся в пределах $33400-49700 M^{-1}cm^{-1}$ и 0,30-0,41, а красных форм - варьируют от $75300 M^{-1}cm^{-1}$ у БФТ до $84200 M^{-1}cm^{-1}$ у МФТ и от 0,05 до 0,09 соответственно.

4. Флуоресценция всех изученных форм ФТ имеет высокую рН-стабильность в области рН от 4,5 до 7,5 со значением pK_a , соответственно, около 3,0 для голубых и 4,1-4,7 для красных форм.

5. Флуоресцентные свойства исследованных вариантов ФТ принципиально позволяют изучать внутриклеточные процессы с существенно отличающимися временными характеристиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Subach F.V., Subach O.M., Gundorov I.S., Morozova K.S., Piatkevich K.D., Cuervo A.M., Verkhusha V.V. Monomeric fluorescent timers that change the color from blue to red. *Nat. Chem. Biol.* **5** (2), 118-126 (2009)
2. Niwa, H. et al. Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13617-13622, (1996).
3. Chudakov, D.M. et al. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1435-1439, (2004).
4. Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R. & Piston, D.W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **73**, 2782-2790, (1997).
5. Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* **2**, 905-909, (2005).