

Введение в молекулярную биоинженерию

**Молекулярные инструменты для
флуоресцентного анализа**

лекция №2

Алексей Валерьевич Феофанов

Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

***Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН***



Зеленый флуоресцирующий белок

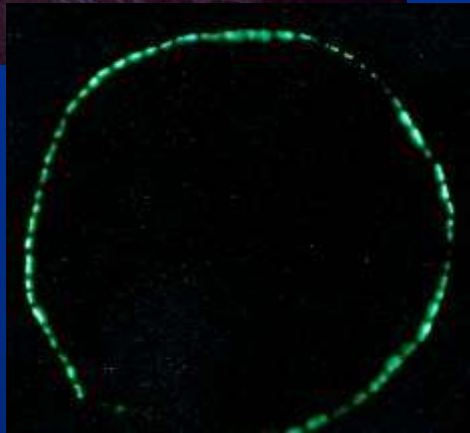
Открыт в 1961 г. Шимомурой и др. при изучении биолюминесценции медузы *Aequorea victoria*.

Кодируется одним геном, $M \approx 27$ кДа, 238 а.к.

Клонирован в 1992 г.

Первое применение – в 1994 г.

Нобелевская премия 2008 г. Роджер Тсиен, Мартин Чалфи, Осама Шимомура



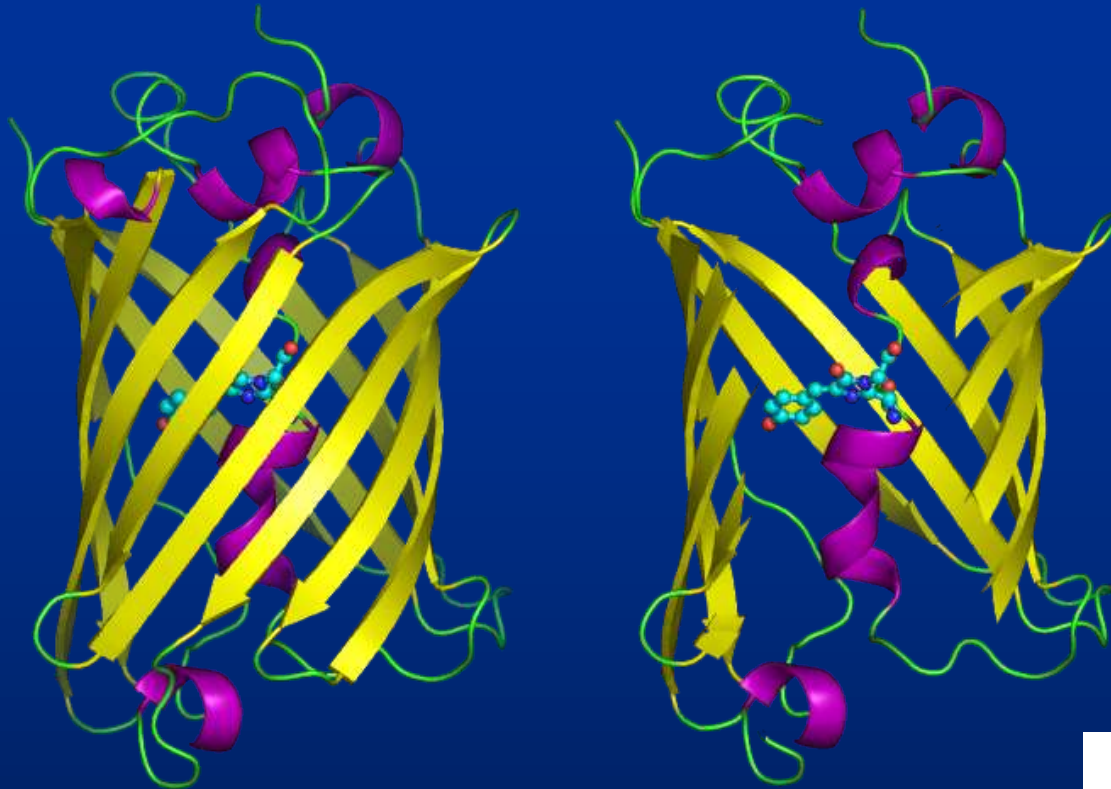
Более 20 GFP-подобных белков обнаружено в родственных кишечнополостных *Obelia* (гидроид) и *Renilla* (морской огурец), других морских животных и кораллах.

GFP из *A. victoria* - мономер.

Остальные природные FP — стабильные, недиссоциирующие димеры.

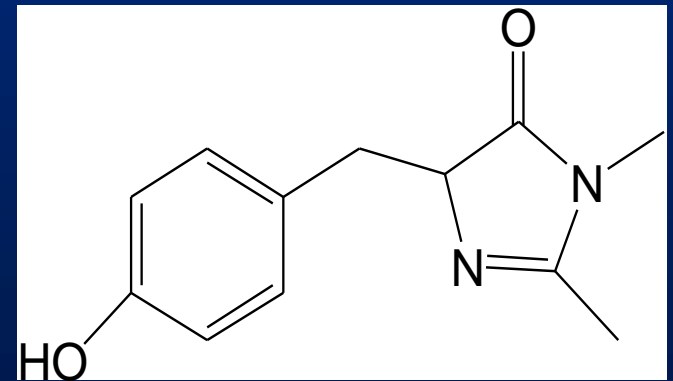


Зеленый флуоресцирующий белок



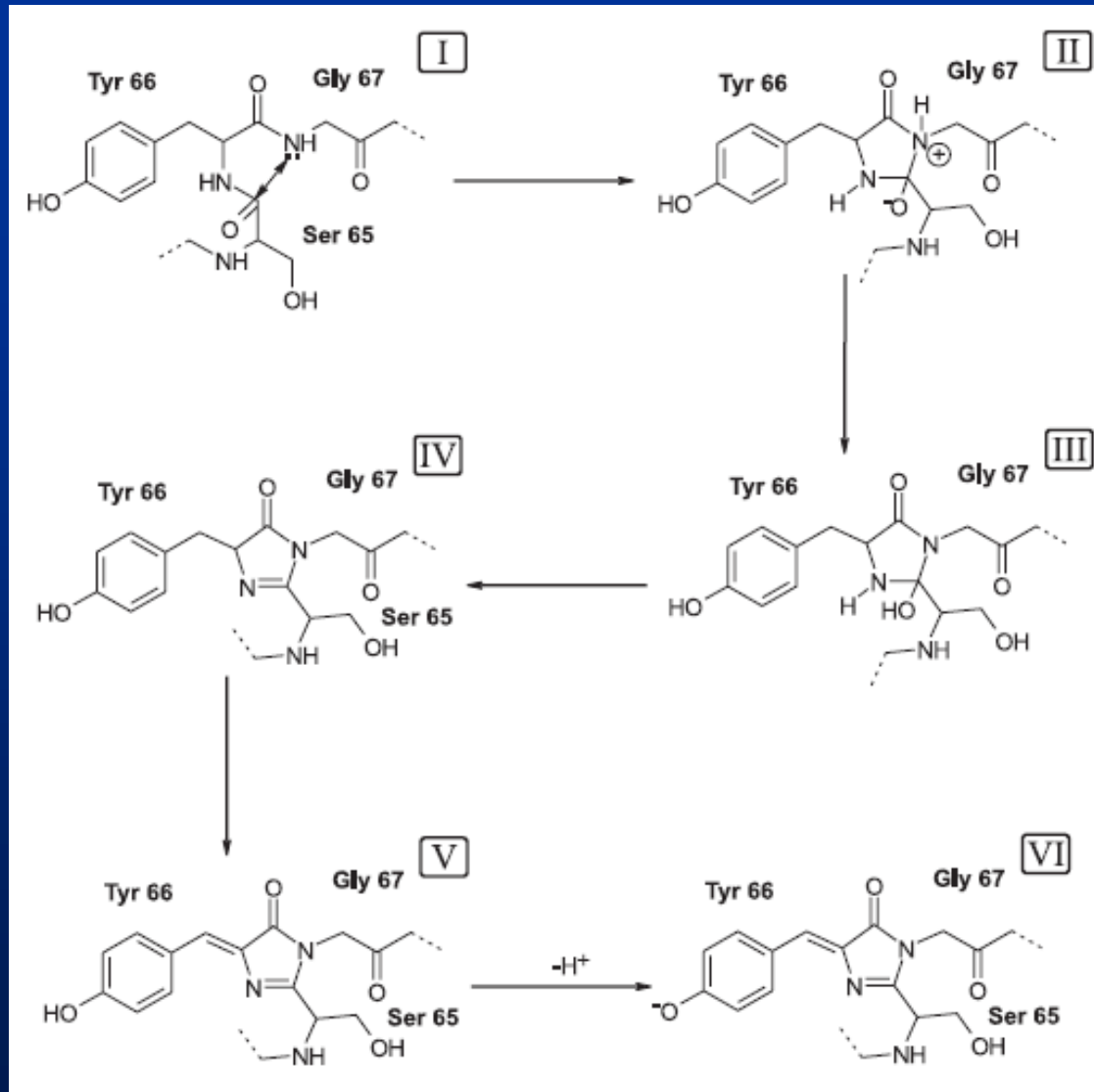
11 β -листов окружают центральную α -спираль. Цилиндр прикрыт сверху и снизу «крышками» из подраскрученных α -спиралей

**Кристаллизован
в 1996 г.**



Структура хромофора зеленого флуоресцирующего белка (4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-он).

Зеленый флуоресцирующий белок



Формирование хромофора происходит из Ser65–Tyr66–Gly67 в присутствии молекулярного кислорода благодаря внутренней посттрансляционной автокаталитической циклизации, не требующей субстратов и кофакторов.

Зеленый флуоресцирующий белок



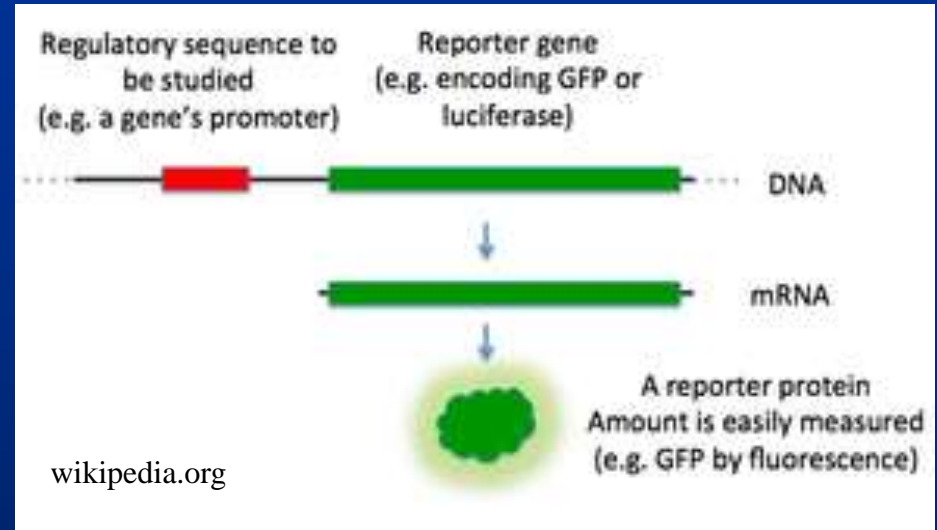
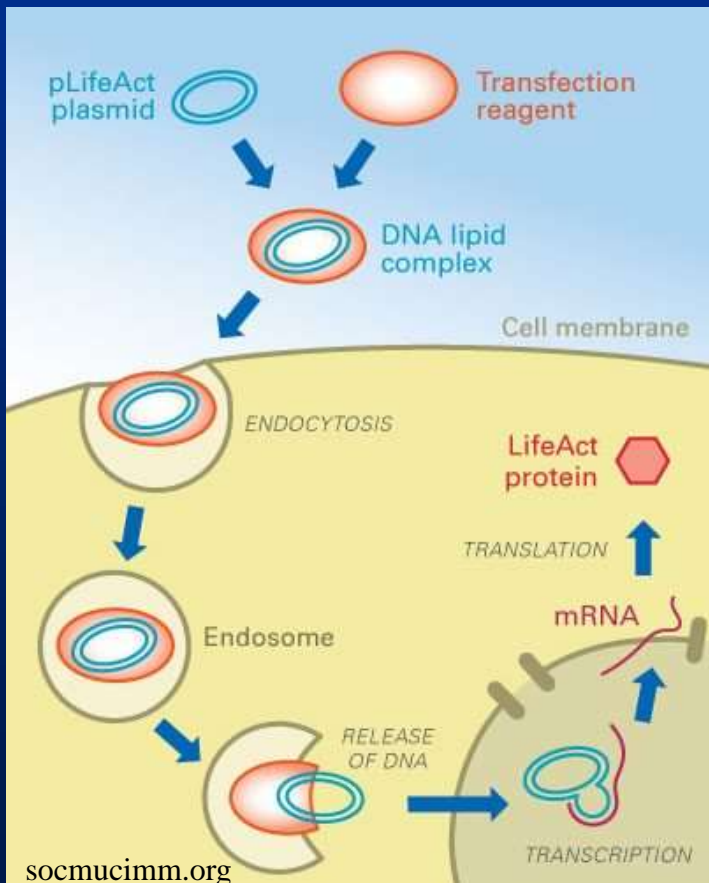
Свойства:

- устойчив к различного рода протеазам и изменению $\text{pH} > 6$;
- способен накапливаться и долгое время сохраняться в клетке;
- низкая чувствительность к тушителям флуоресценции;
- флуоресценция pH -зависима в диапазоне pH 4-6.

Зеленый флуоресцирующий белок

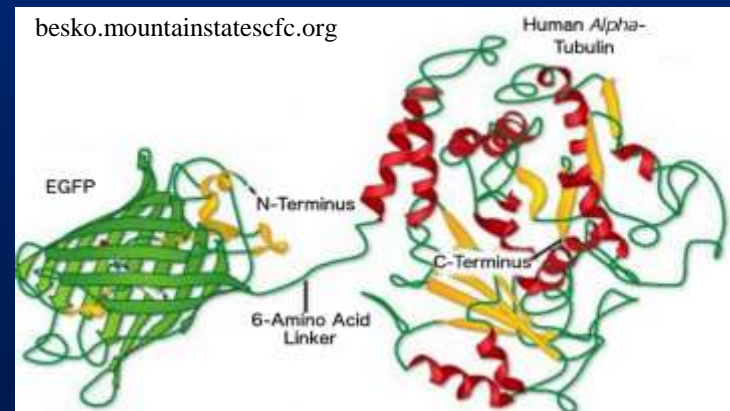
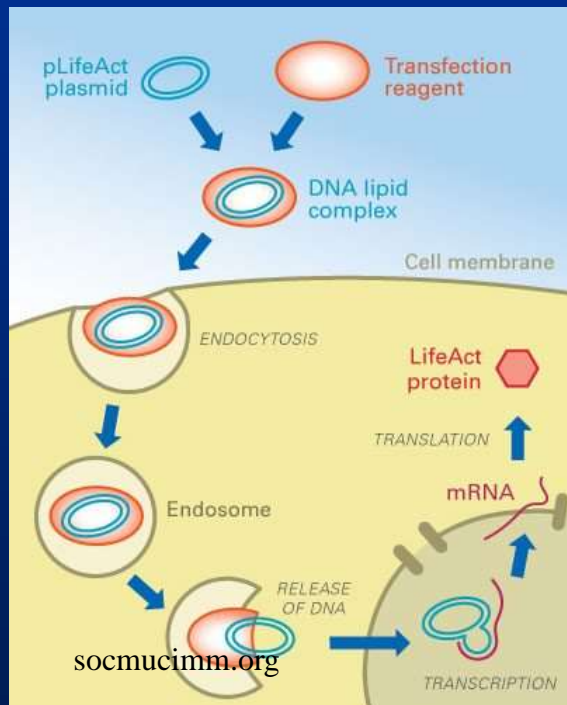
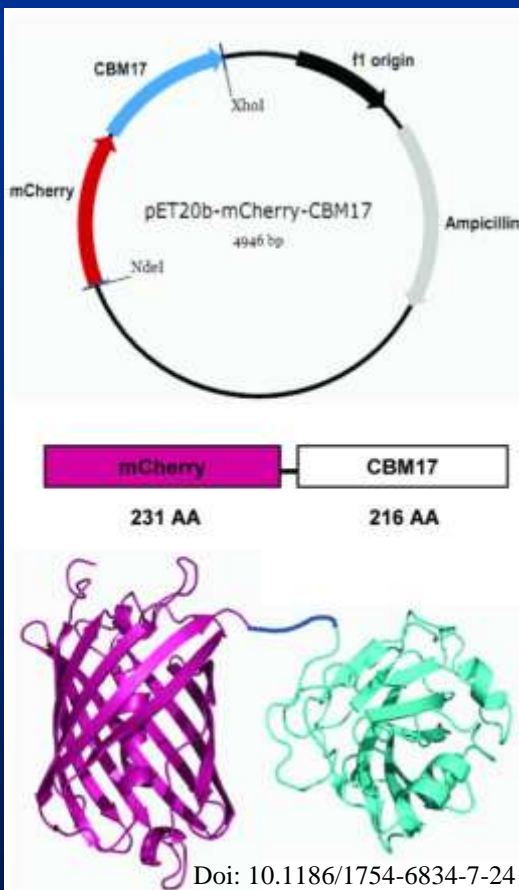
Применения:

- в технологии репортерных генов



Зеленый флуоресцирующий белок

Применения химер GFP-белок X:



Зеленый флуоресцирующий белок

Применения химер GFP-белок X:

- прижизненный маркер для изучения молекулярных и клеточных процессов в животных;
- исследования перемещений белка X в живых клетках;
- изучение локализации белка X в эукариотических и прокариотических клетках, эмбрионах;
- прижизненное контрастирование клеточных органоидов и структур;
- исследования взаимодействий белка X в клетках.

прижизненное контрастирование клеточных органовидов и структур

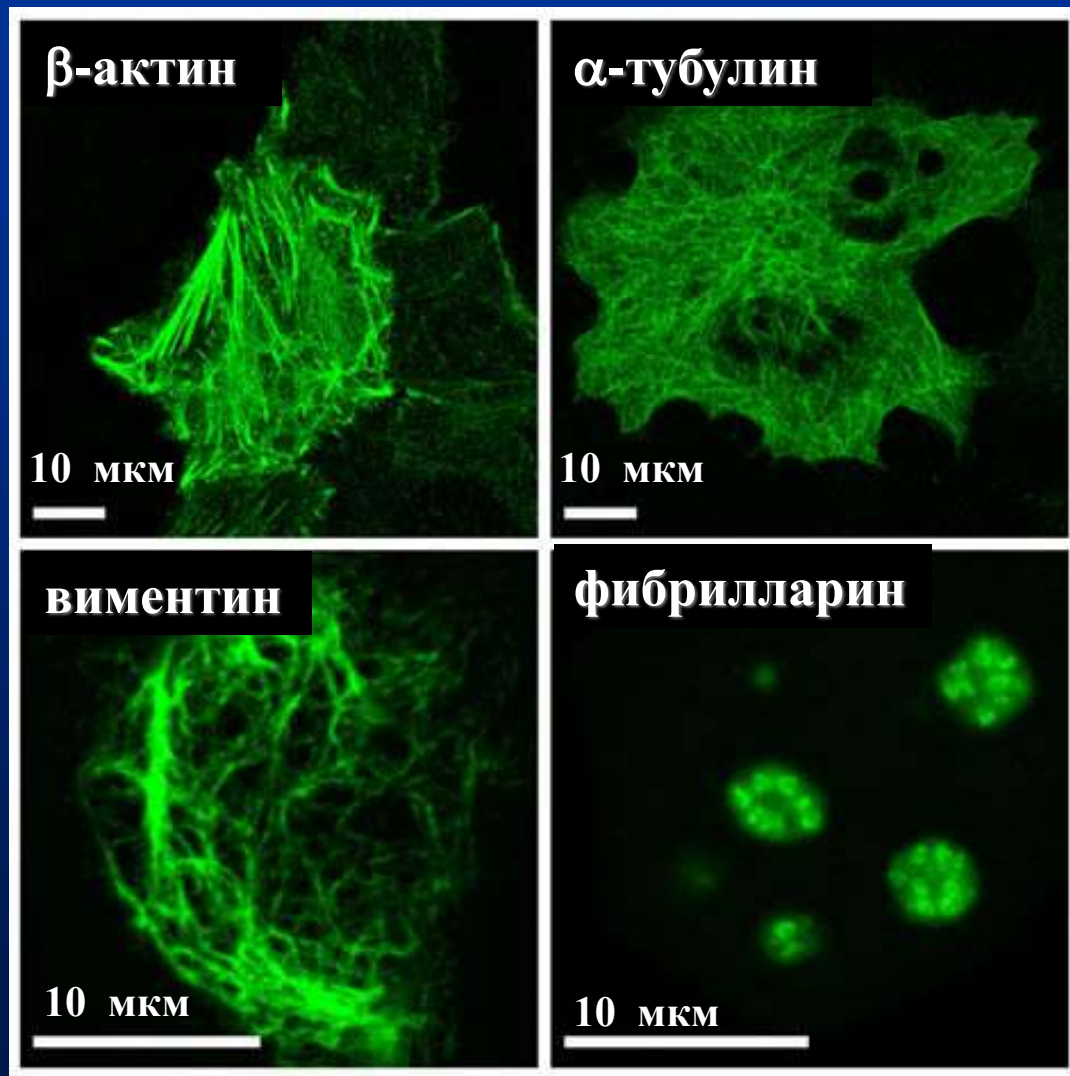


Table. Spectral properties of GFP, its analogs and mutants [Zubova et al., 2003]

protein	absorption		fluorescence	
	λ_{\max} , nm	ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$	λ_{\max} , nm	Quant. yield
GFP (<i>A. victoria</i>)	396	26000	508-509	0.8
EGFP (S65T/F64L)	488	56000	508	0.6

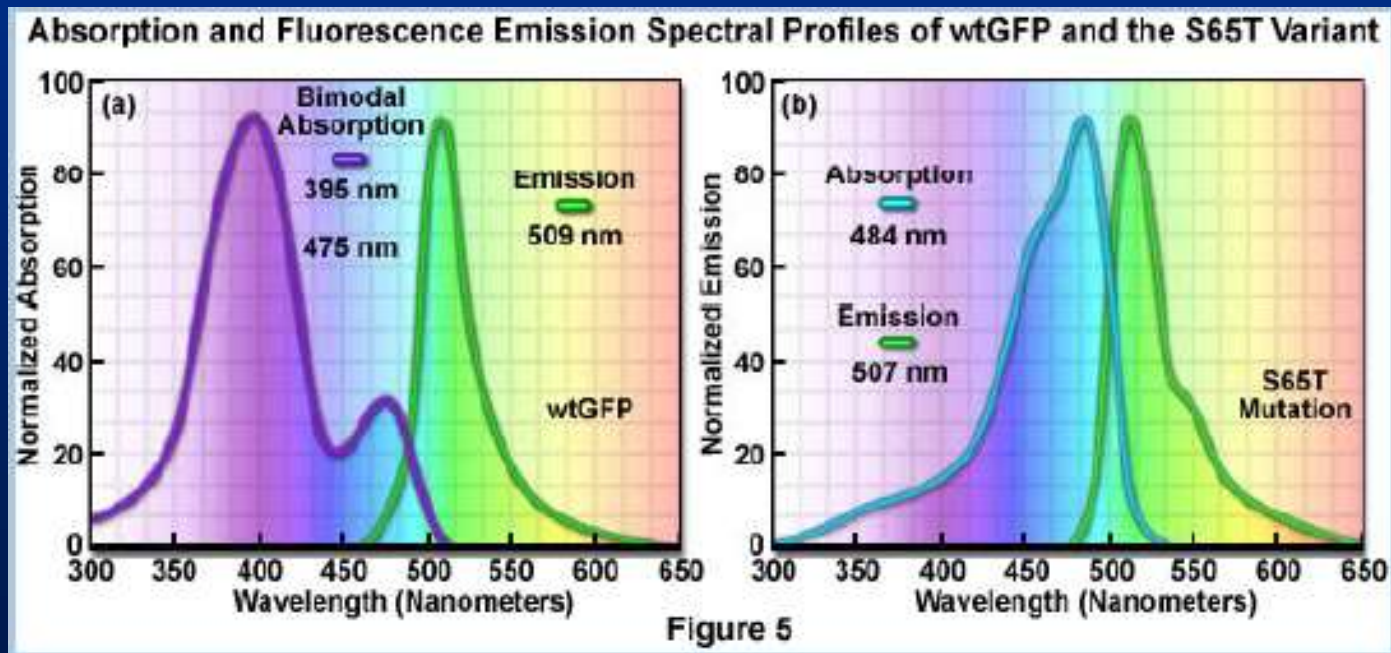


Table. Spectral properties of GFP, its analogs and mutants [Zubova et al., 2003]

protein	absorption		fluorescence	
	λ_{\max} , nm	ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$	λ_{\max} , nm	Quant. yield
GFP (<i>A. victoria</i>)	396	26000	508-509	0.8
EGFP (S65T/F64L)	488	56000	508	0.6
YFP (T203Y)	510		524	
EYFP (T203Y; S65G/V68L/S72A)	514	83400	528	0.61
CFP (Y66W)	436		476-485	
BFP (Y66H)	384	21000	442-450	0.24

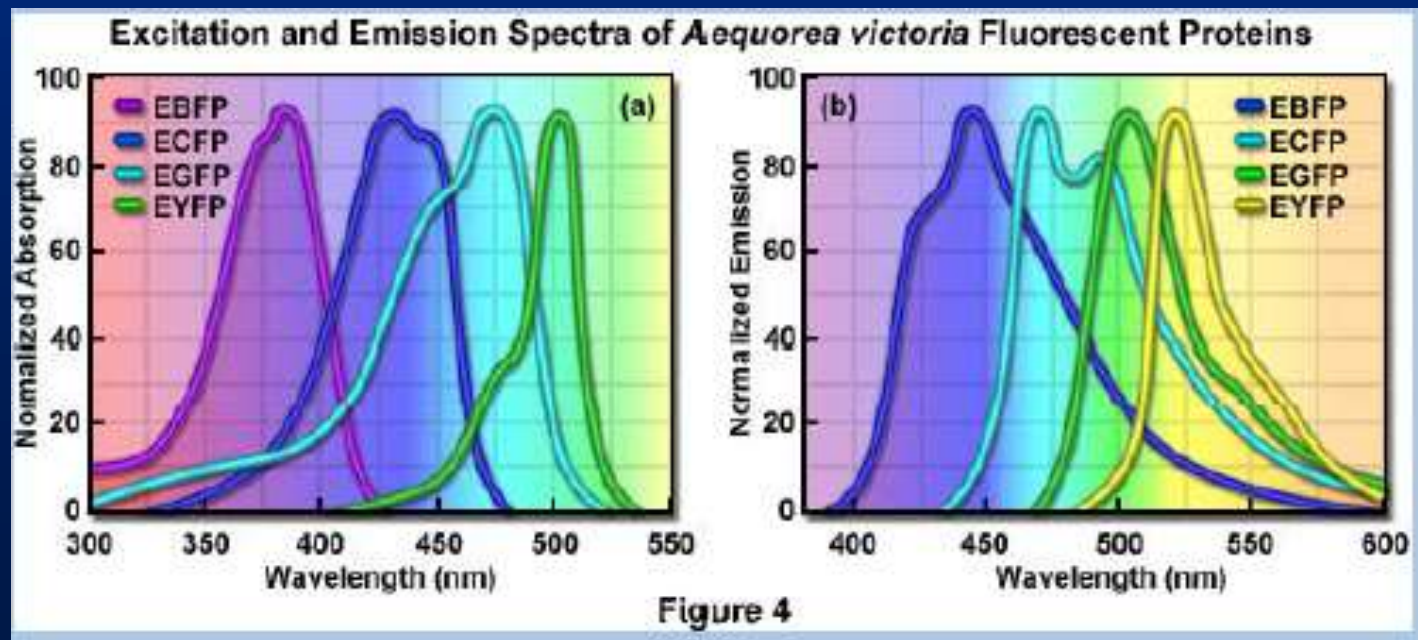
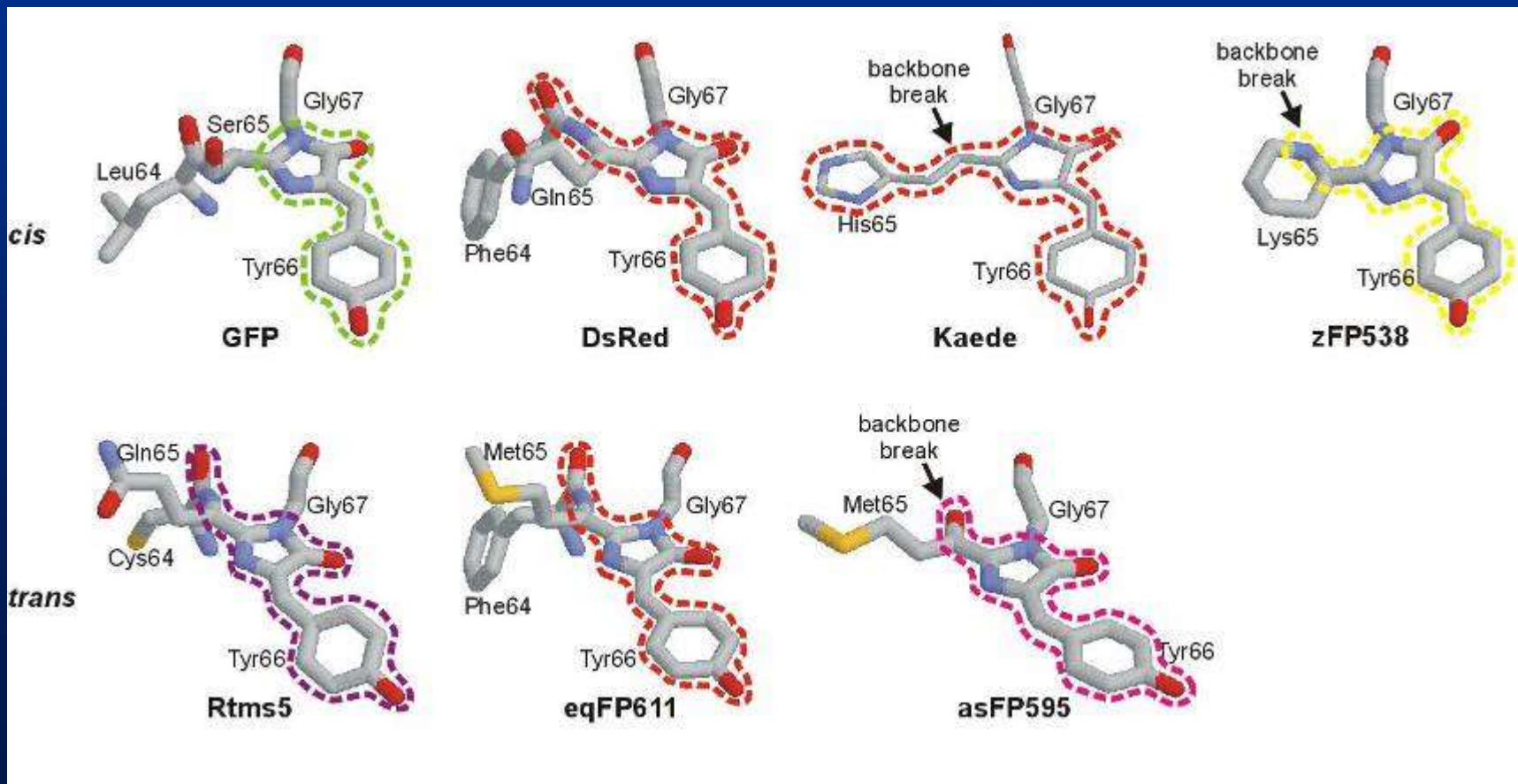
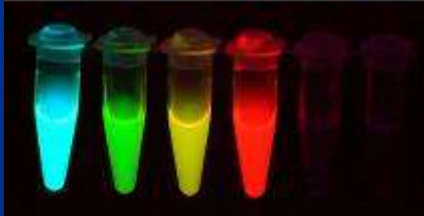


Таблица. Спектральные свойства GFP, его аналогов и мутантов [Зубова и др., 2003]

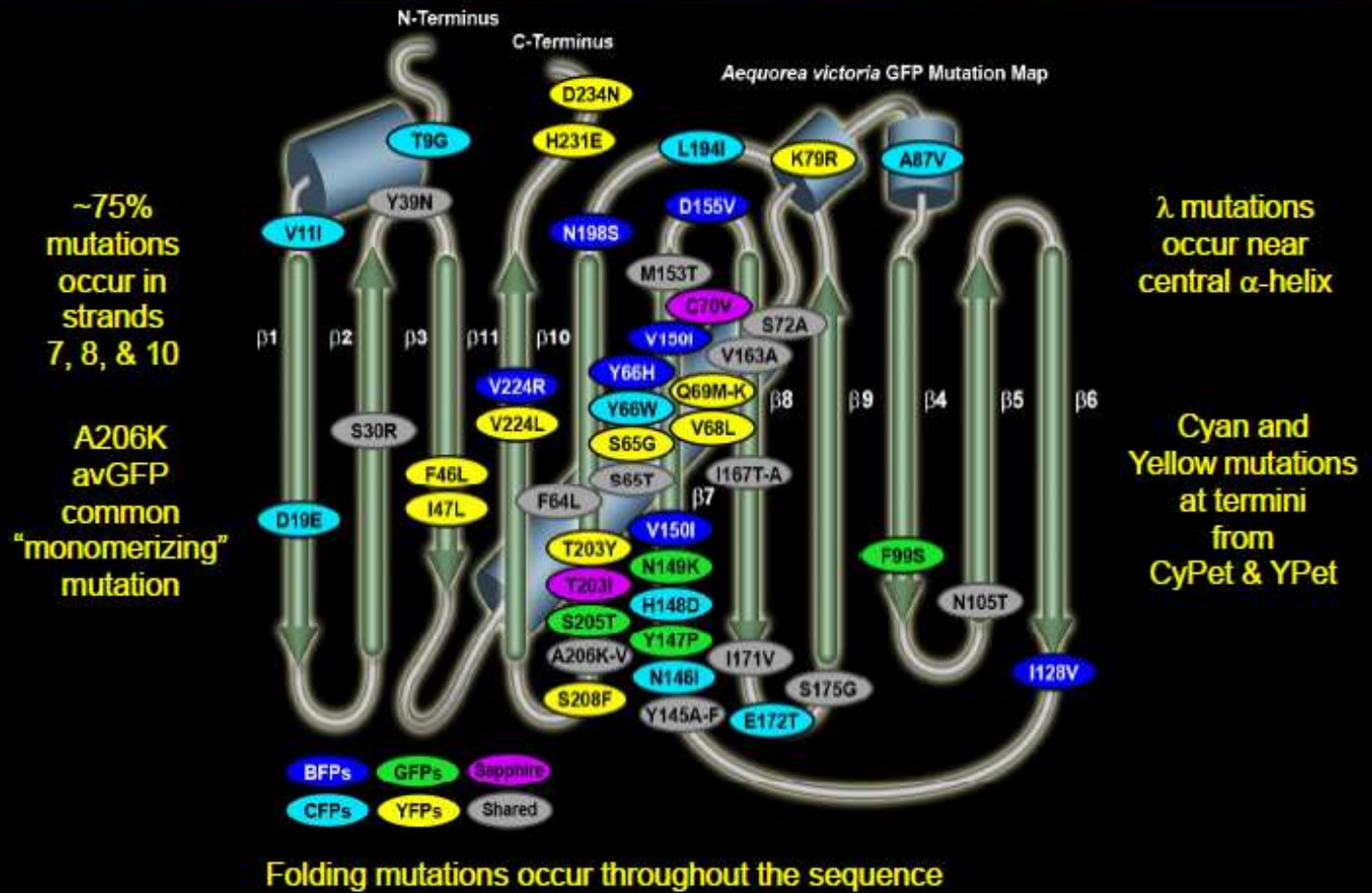
белок	поглощение		флуоресценция	
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	квант. выход
GFP (<i>A. victoria</i>)	396	26000	508-509	0,8
EGFP (S65T/F64L)	488	56000	508	0,6
YFP (T203Y)	510		524	
EYFP (T203Y; S65G/V68L/S72A)	514	83400	528	0,61
CFP (Y66W)	436		476-485	
BFP (Y66H)	384	21000	442-450	0,24
zFP506 (кораллы рода <i>Zoanthus</i>)	496	35600	506	0,63
zFP538 (кораллы рода <i>Zoanthus</i>)	528	20200	538	0,42
amFP486 (кораллы <i>Anemonia majano</i>)	453,458	40000	486	0,24
dsFP483 (кораллы <i>Discosoma striata</i>)	443	23900	483	0,46
TurboRFP	553	92000	574	0,62
TagRFP	555	100000	584	0,48
mKate2	588	62500	633	0,4
eqFP650	592	65000	650	0,24

Изменения в структуре хромофора, обеспечивающие разнообразие флуоресцирующих белков





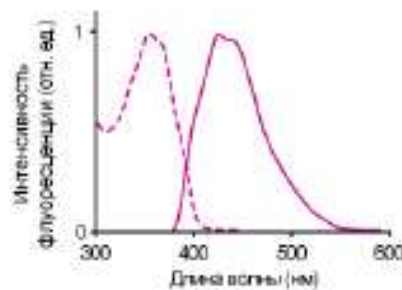
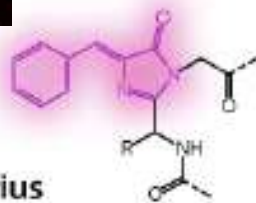
Improved GFPs Through Mutagenesis



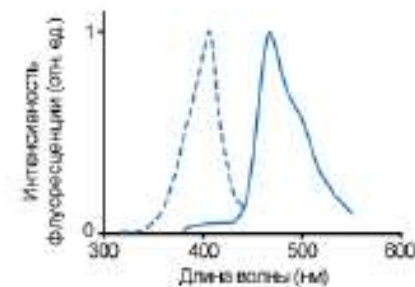
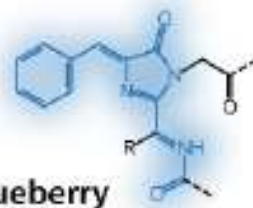
Строение и спектральные свойства некоторых вариантов хромофоров флуоресцирующих белков



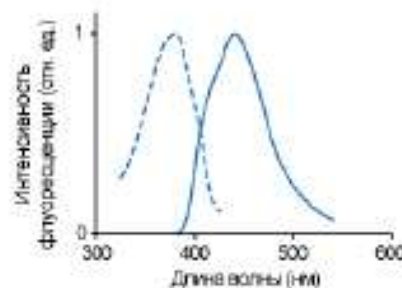
Sirius



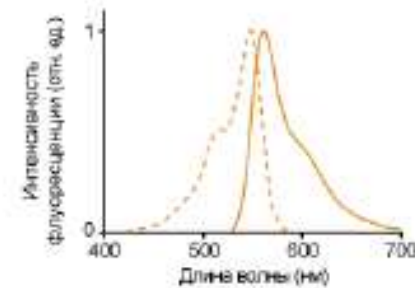
mBlueberry



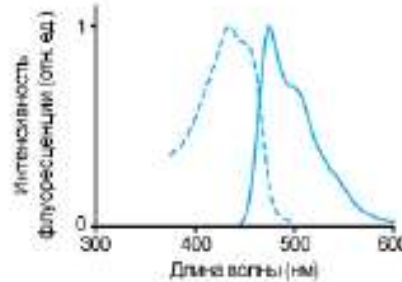
BFP



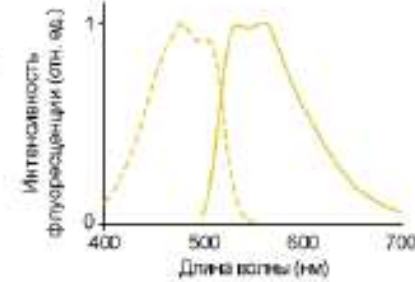
mOrange



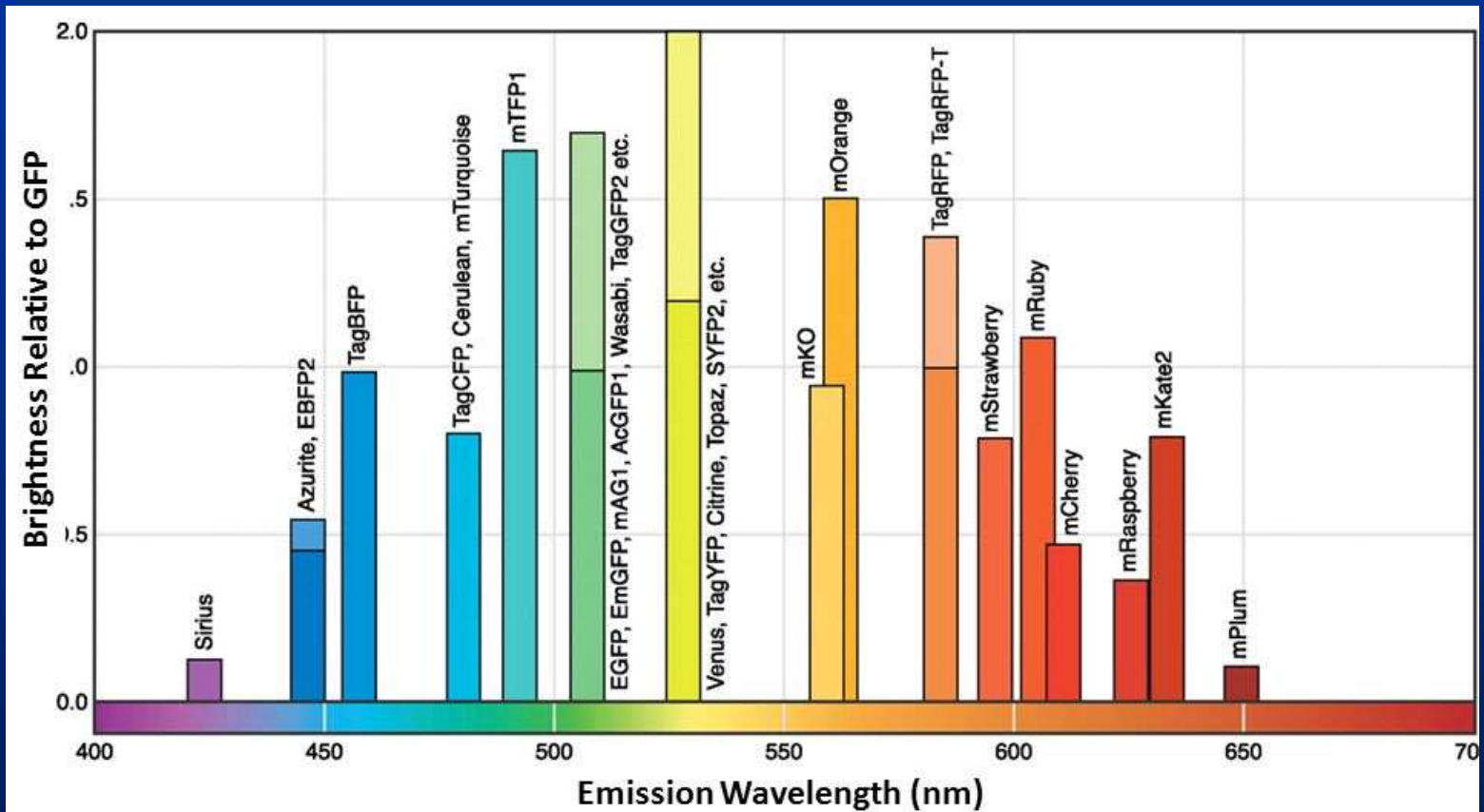
CFP



mHoneydew



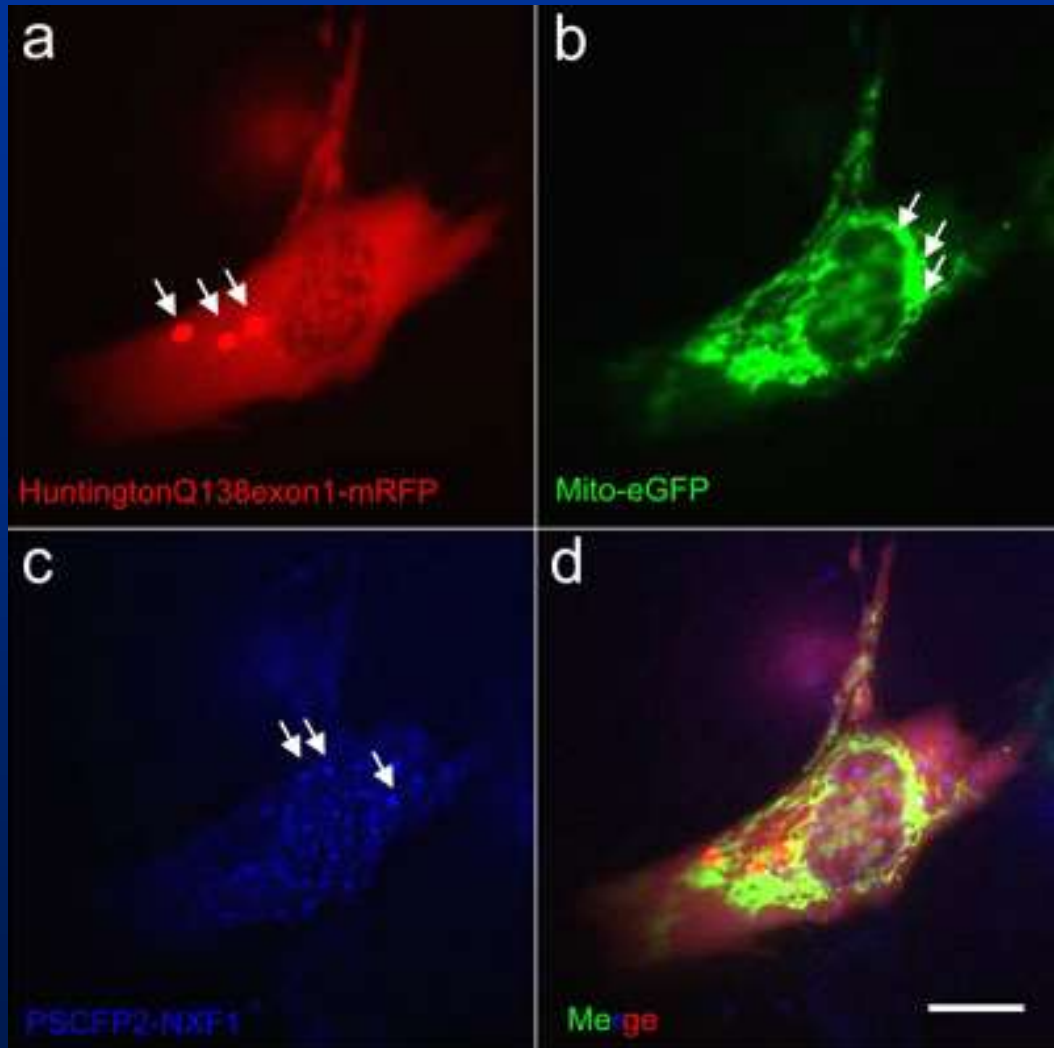
Яркость флуоресценции различных вариантов флуоресцентных белков

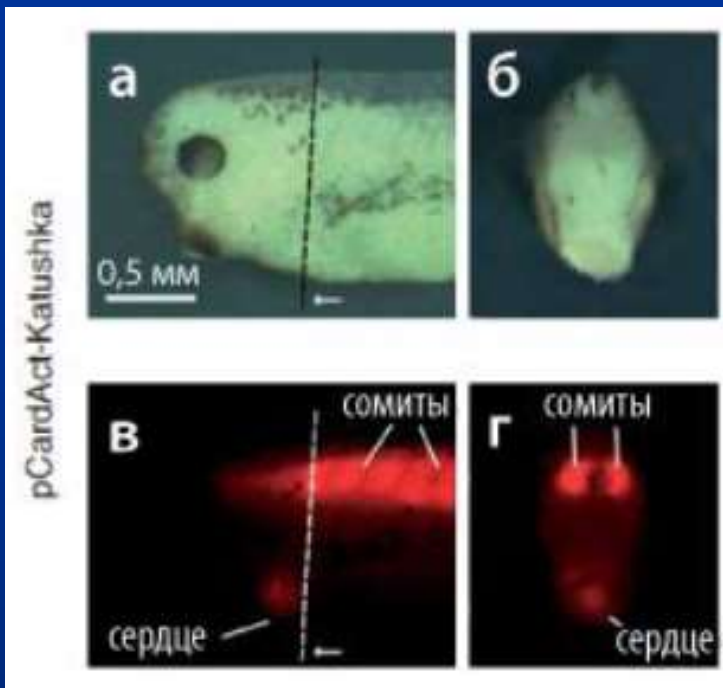


Chudakov et al, 2010. <http://physrev.physiology.org/content/90/3/1103>

Яркость- произведение молярного коэффициента экстинкции на квантовый выход флуоресценции деленное на 10^5

Трехцветное окрашивание клеточных структур флуоресцирующими белками





Трансгенные эмбрионы *X.laevis*, экспрессирующие *Katushka* под контролем промотора кардиоактина.

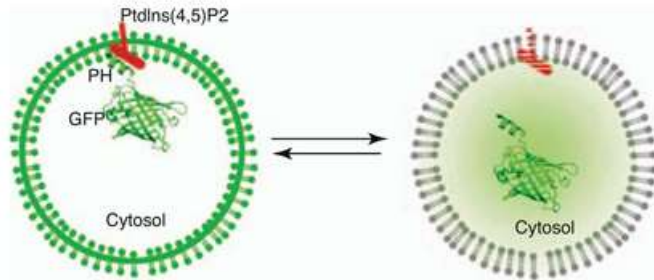
2,5-месячные лягушки, экспрессирующих *DsRed-Express* (слева) и *Katushka* (справа).

Из диссертации Щербо Д.С.

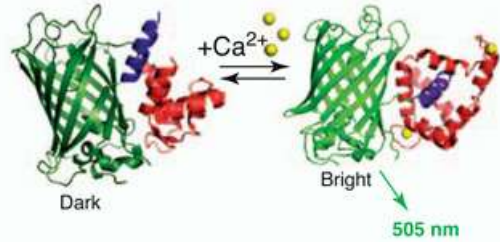
Молекулярные конструкции – сенсоры на основе флуоресцирующих белков

- сенсоры на ионы кальция, цинка (II), меди (II) в заданных клеточных органоидах;
- субстраты для оценки активности протеаз и киназ;
- внутриклеточные индикаторы NO, пероксида водорода;
- сенсоры pH в заданных клеточных органоидах.

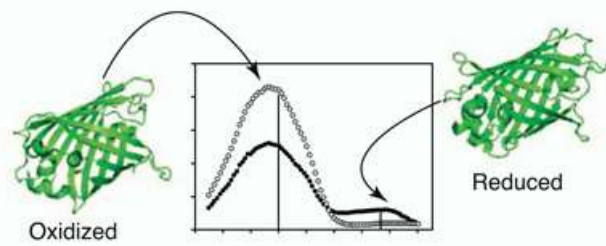
(a) Translocation-based probes



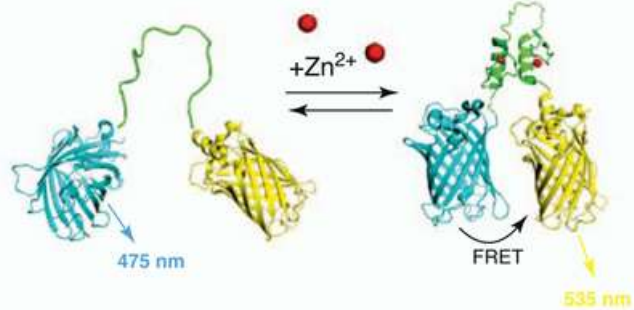
(b) Intensity-based single FP probes



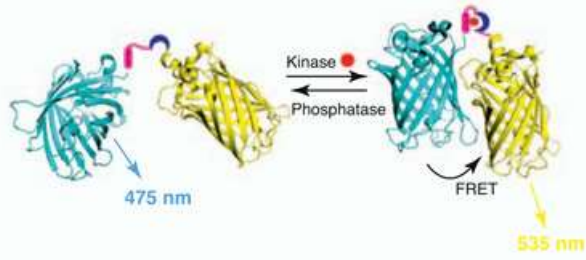
(c) Ratiometric-based single FP probes



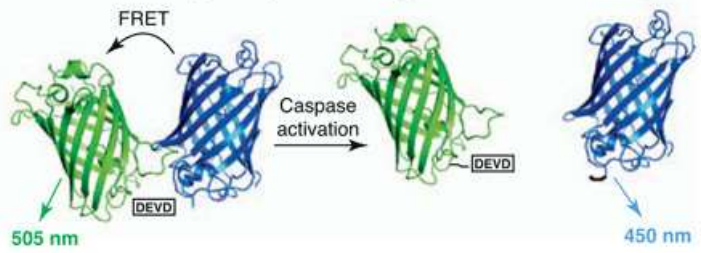
(d) FRET-based sensor: activated by conformational change



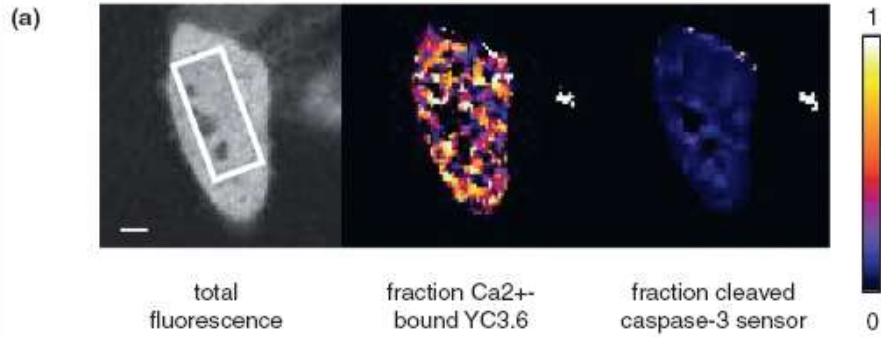
(e) FRET-based sensor: for enzyme activity/activation



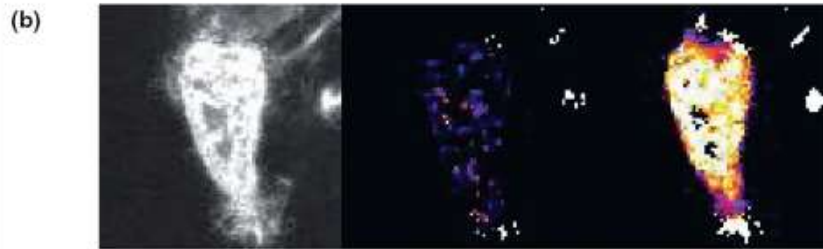
(f) FRET-based sensor: activated by enzyme cleavage



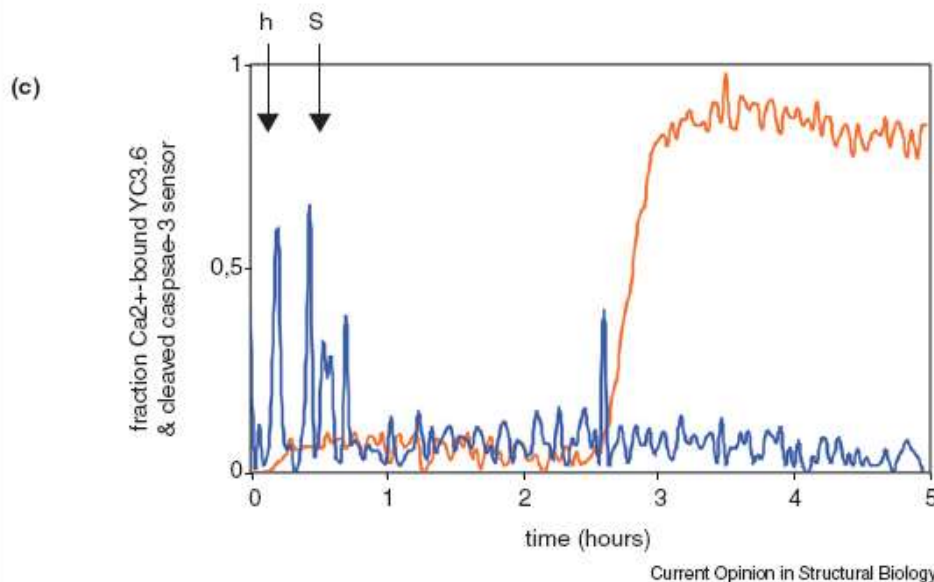
Два сенсора на основе ФР в клетках HeLa: на Ca^{2+} YC3.6 и на активность каспаз



10 мин после внесения гистамина



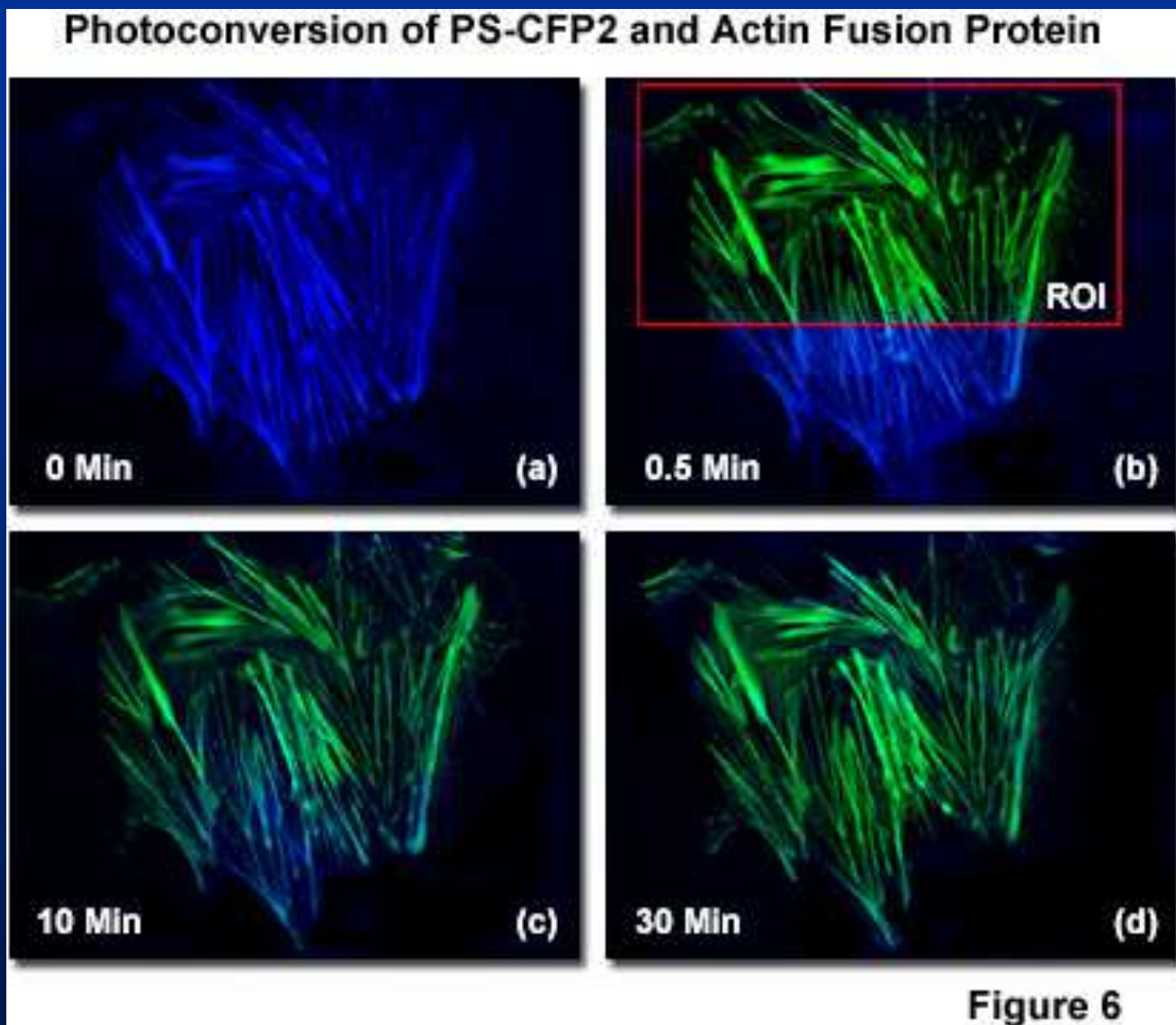
4 ч после внесения гистамина



Активность каспаз

Колебания концентрации Ca^{2+}

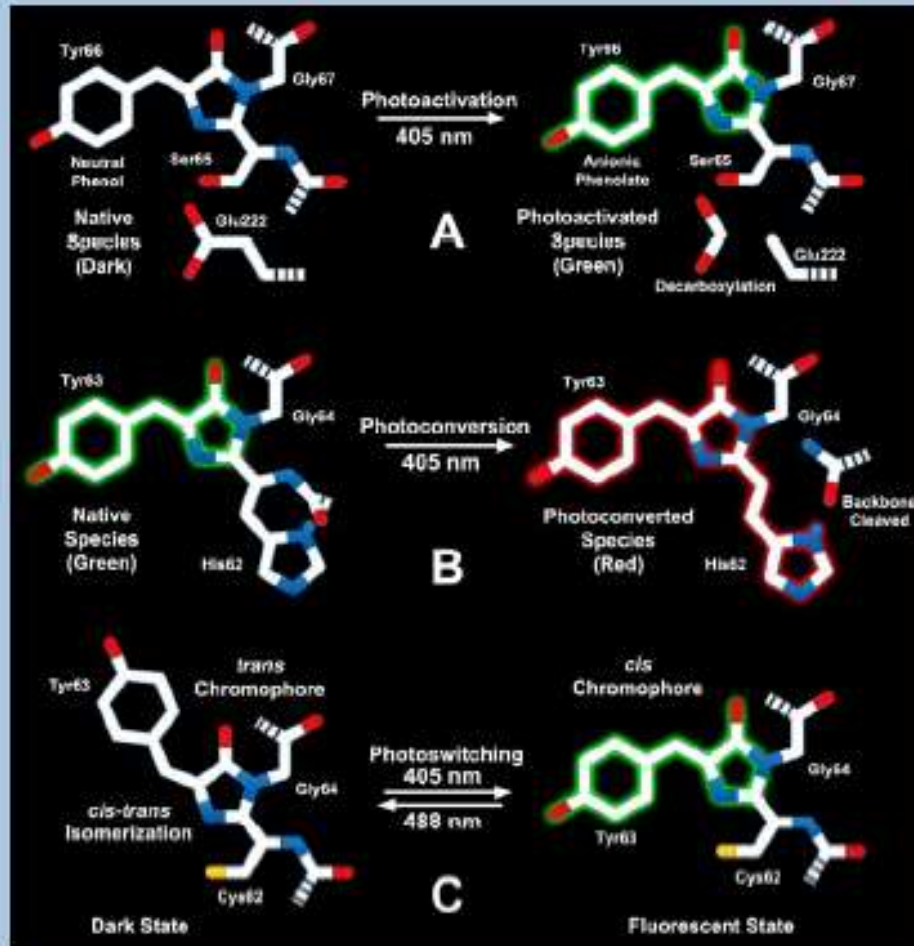
Фотоконвертируемые флуоресцирующие белки



Фотоконвертируемые, фотоактивируемые и фотопереключаемые флуоресцирующие белки

Green to Red Photoconversion

Kaede – Tetramer
Eos – Tandem Dimer
mEos2 – Monomer
Dendra – Monomer
KikGR – Tetramer
mKikGR – Monomer
mClavGR – Monomer



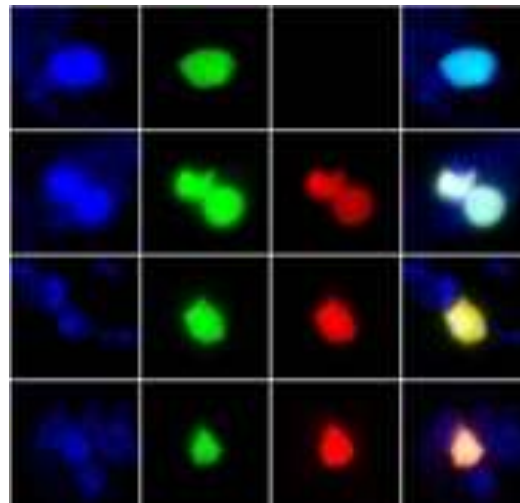
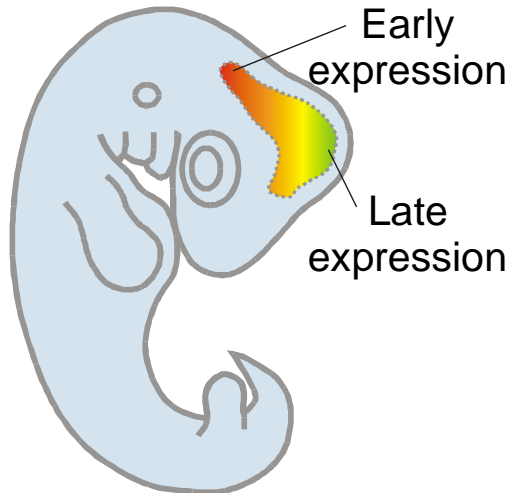
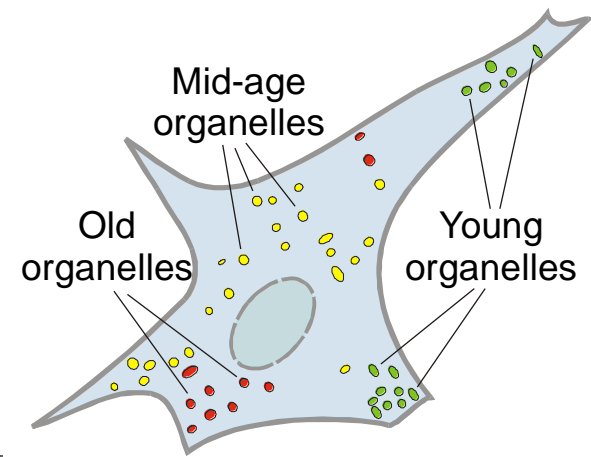
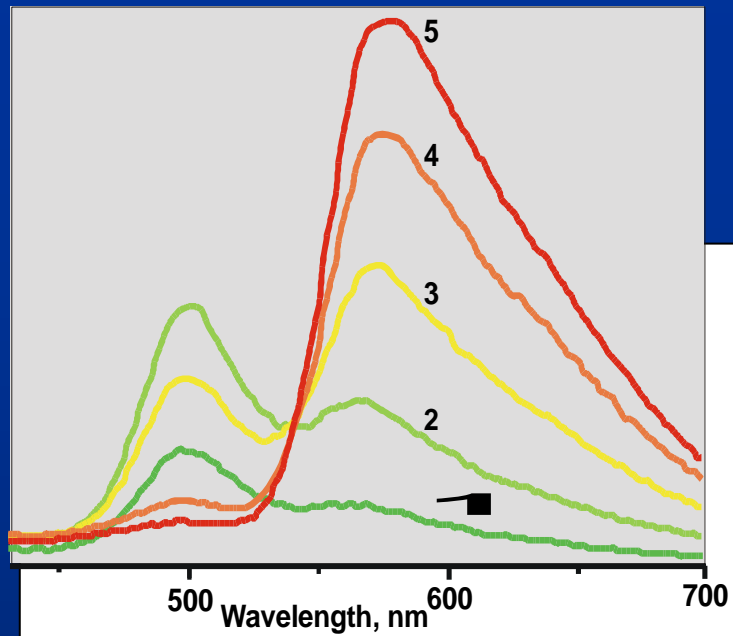
Photoactivation

PA-GFP – Monomer
PS-CFP – Monomer
PA-mCherry1 – Monomer
PA-TagRFP – Monomer

Photoswitching

Dronpa – Monomer
KFP1 – Tetramer
mTFP0.7 – Monomer

Флуоресцентный таймер - мутант DsRed Белок меняет цвет со временем

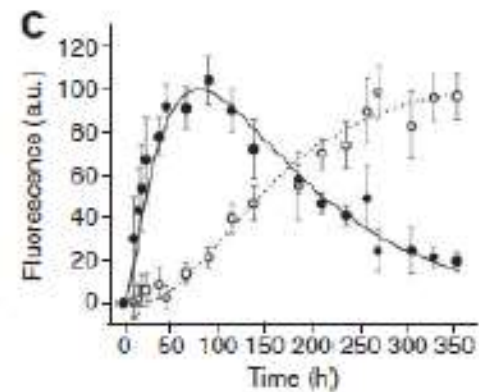
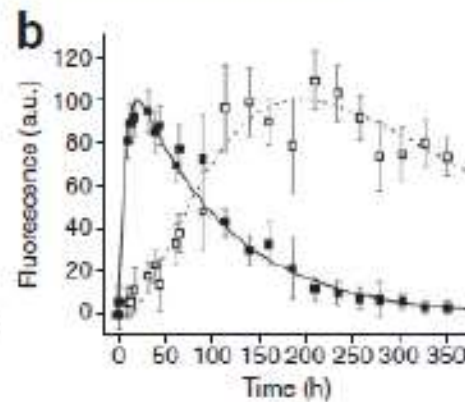
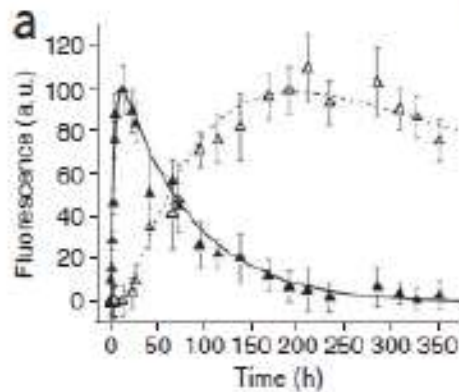
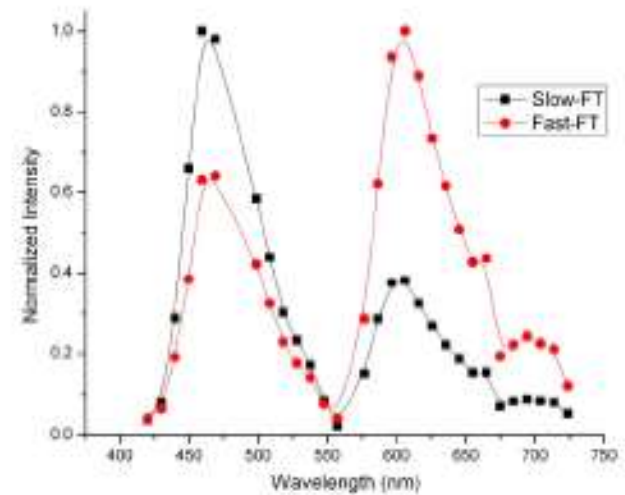
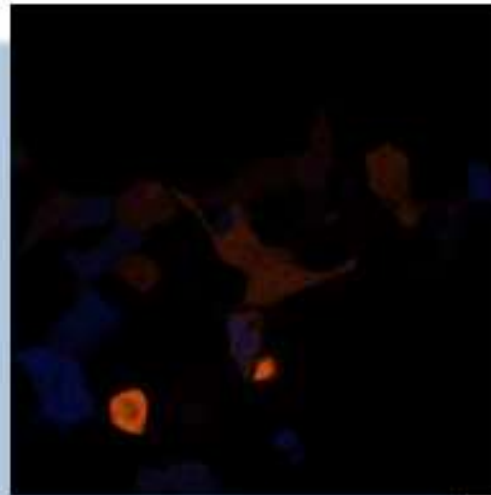
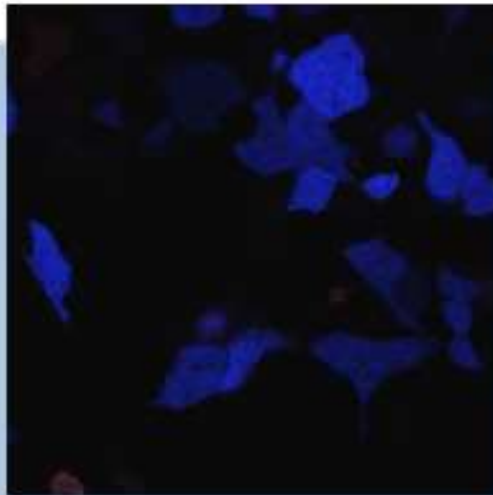


исходный мономерный белок со временем образует тетрамеры, в которых он флуоресцирует в красной области спектра

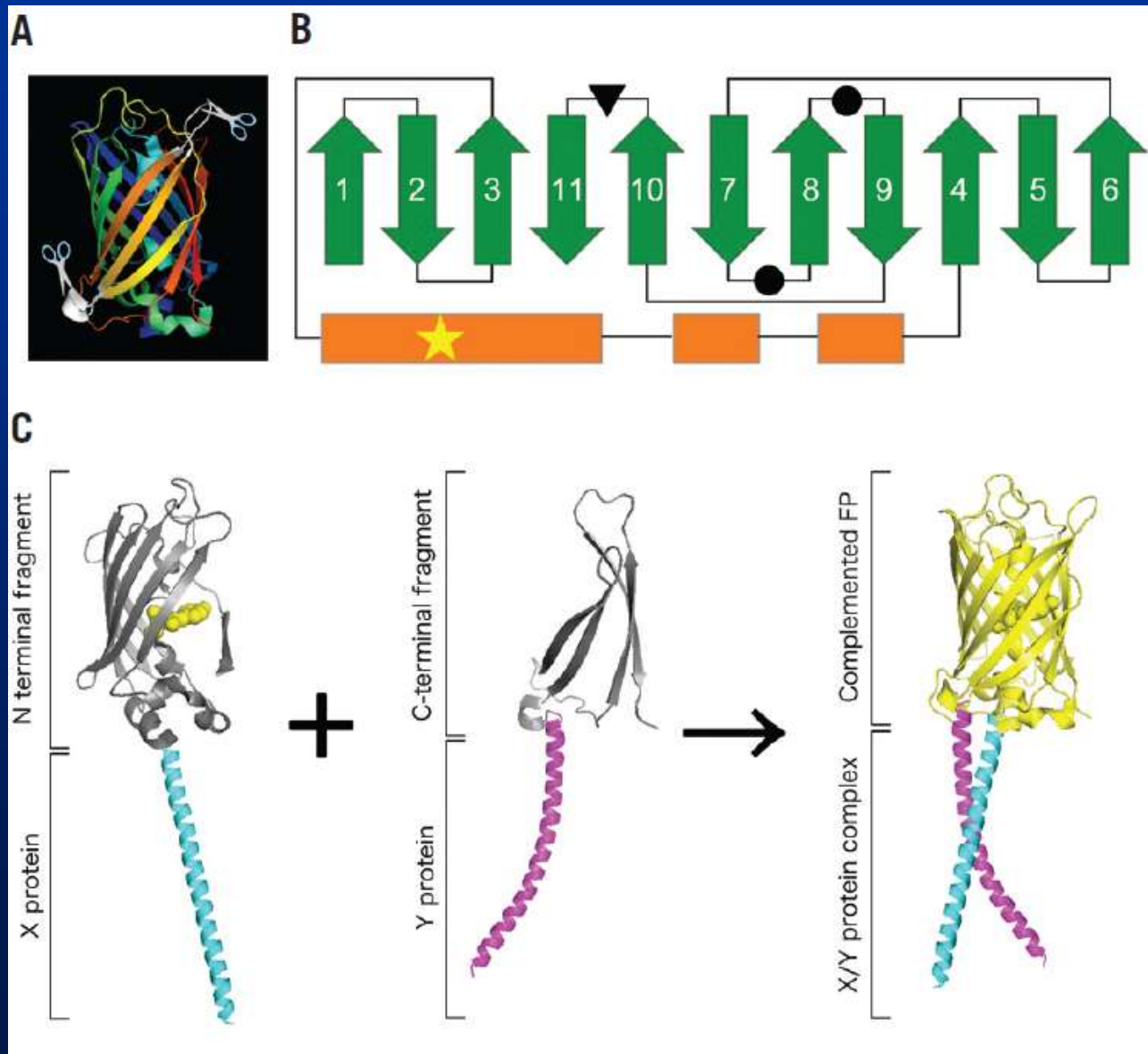
Fluorescent protein timers

Fluorescent Protein Timers:

Fast-FT, Medium-FT and Slow-FT

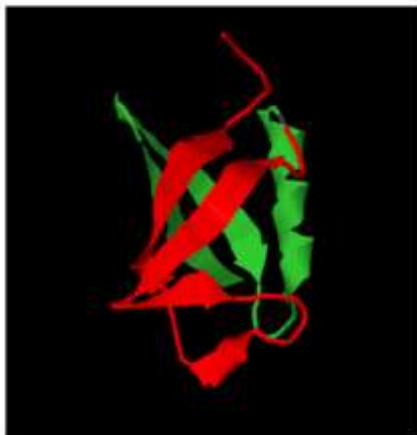


Бимолекулярная флуоресцентная комплементация Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

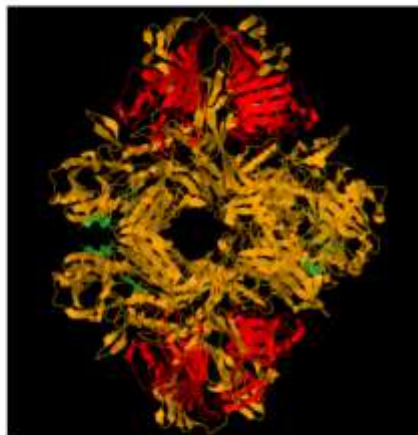


Примеры белков, которые могут быть реконструированы из фрагментов с восстановлением функциональной активности

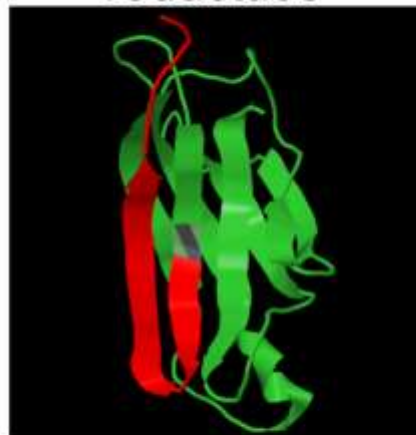
ubiquitin



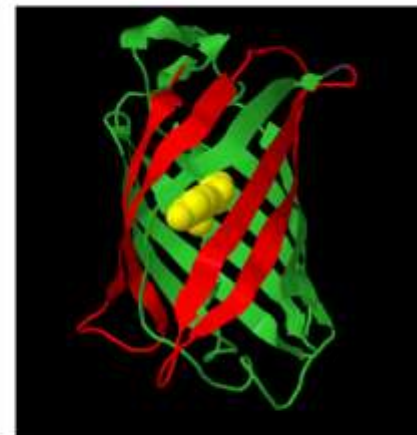
β -galactosidase



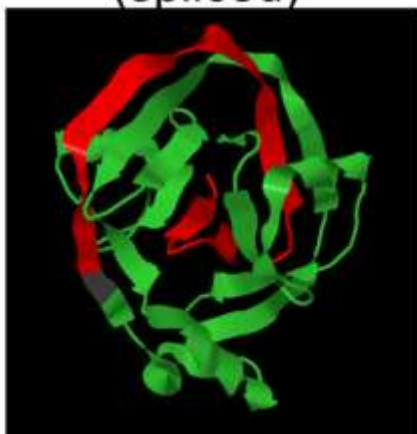
dihydrofolate reductase



GFP variants



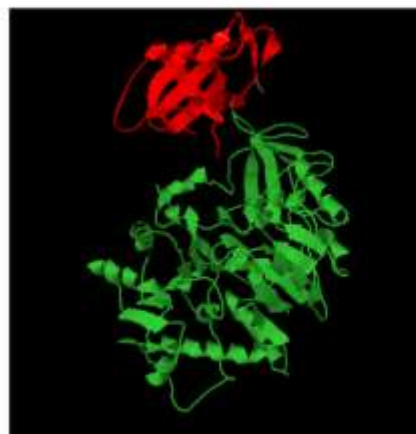
dnaE intein
(spliced)



β -lactamase



firefly luciferase



TEV protease

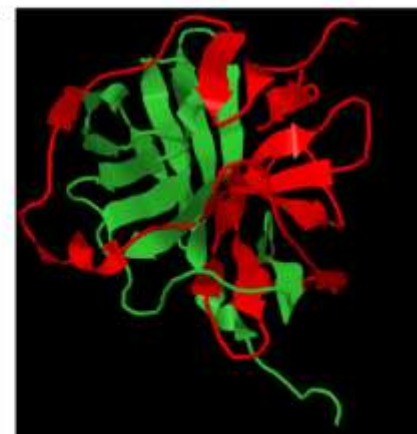
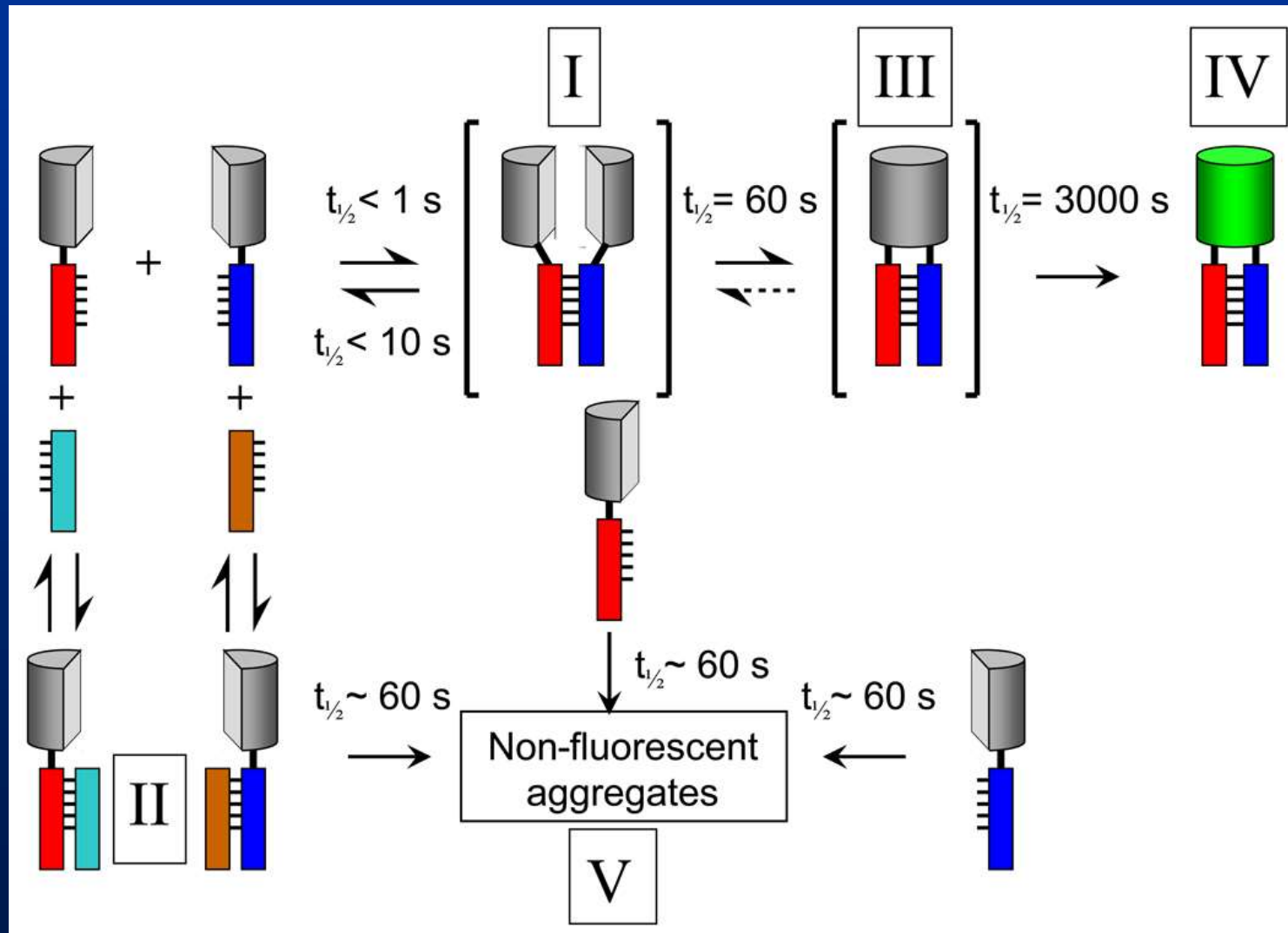


Table 1. List of fluorescent proteins used in BiFC assays.

Fluorescent protein	Excitation Peak (nm)¹	Emission Peak (nm)¹	Cell type or organism in the first use	Additional mutation
EBFP	382*	448*	Mammalian (COS-1)	None
Cerulean	439	479	Mammalian (COS-1)	None
ECFP	452	478	Mammalian (COS-1)	None
EGFP	488	512	Bacteria (<i>E. coli</i>)	None
GFP-S65T	489*	510	Plant (Onion epidermis)	V163A
frGFP	485*	510*	Bacteria (<i>E. coli</i>)	None
sfGFP	503*	518*	Mammalian (HeLa)	None
Dronpa	503*	518*	Mammalian (HEK293)	None
EYFP	514/515	527	Mammalian (COS-1)	None
Venus	515	528	Mammalian (COS-1)	None
Citrine	516	529	Mammalian (COS-1)	None
mRFP	549*	570*	Plant (Tobacco BY2 and Onion epidermis)	Q66T
DsRed monomer	556*	556*	Plant (Onion epidermis)	None
mCherry	587*	610*	Mammalian (Vero)	None
mKate	587*	621*	Mammalian (COS-7)	S158A

Стадии и кинетика бимолекулярной флуоресцентной комплементации



Применения метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации

Одноклеточные и многоклеточные организмы. Клетки животных, растений, бактерий, дрожжей.

Обнаружение взаимодействий белков между собой в живых клетках

Выявление индивидуальных взаимодействий в сложной сети передачи сигнала посредством белковых молекул (диффундирующие комплексы и мембранные рецепторы)

Выявление локализации комплексов в клетках (возможен анализ в самых различных компартментах)

Анализ взаимодействий сигнальных систем в цитоплазме и в ядре

Обнаружение образования смешанных комплексов с участием исследуемых белков, РНК, ДНК, липидов, сахаров и т. п.

Исследование белковых комплексов, экспортирующих РНК из ядра, анализ скорости циркуляции этих комплексов

Ограничения метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации

Ассоциация фрагментов флуоресцирующего белка стабилизирует комплекс между взаимодействующими белками партнерами. Комплекс теряет способность диссоциировать. Нарушается правильное функционирование комплекса.

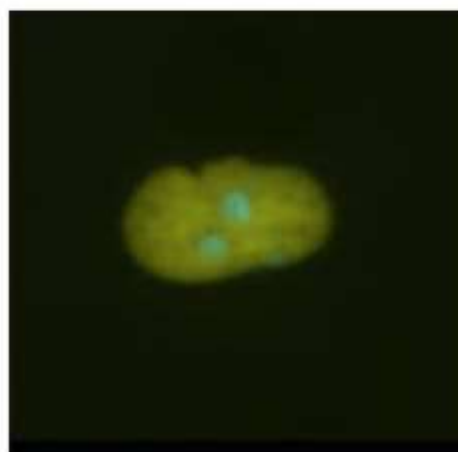
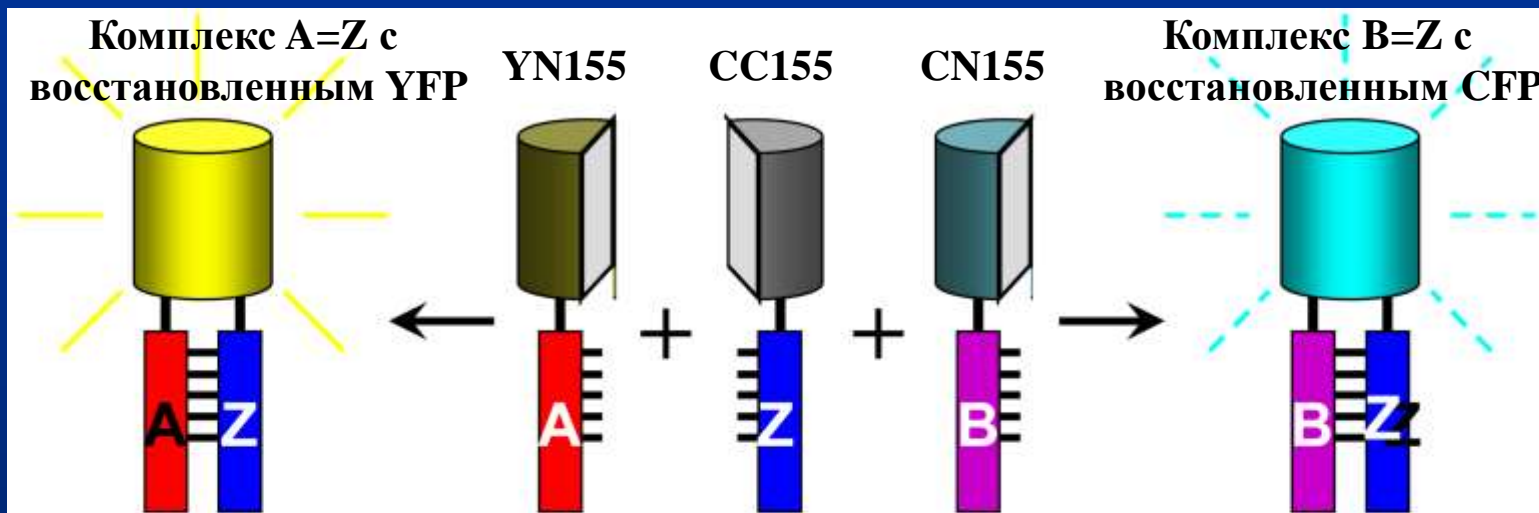
Флуоресцирующие комплексы, сформированные в составе сложных комплексов (ДНК, РНК), сохраняют способность флуоресцировать после диссоциации

Существует вероятность артефактного образования комплексов из-за взаимодействия самих комплементарных фрагментов флуоресцирующих белков.

Следует избегать артефактно высокого уровня экспрессии исследуемых белков в клетках.

Многоцветный флуоресцентный комплементационный анализ (МФКА)

A, B – альтернативные белки-партнеры; Z- общий белок-партнер



Применения многоцветного флуоресцентного комплементационного анализ

1. Анализ эффективности образования комплексов между различными семействами ядерных транспортных регуляторных белков

2. Анализ эффективности образования комплексов между представителями большого семейства цитоплазматических малых субъединиц G-белков

Результаты этих исследований показали, что эффективности взаимодействия белков близких по а.к. последовательности и структуре могут существенно отличаться в клетке.

Выявление причин этих отличий требует дополнительных исследований

Применения флуоресцирующих белков для моделирования путей и способов распространения инфекции

Изучение распространения патогенных клеток *E.coli* с участием мух и экскрементов.

Заражение листьев салата Сальмонеллой (*Salmonella sp.*).

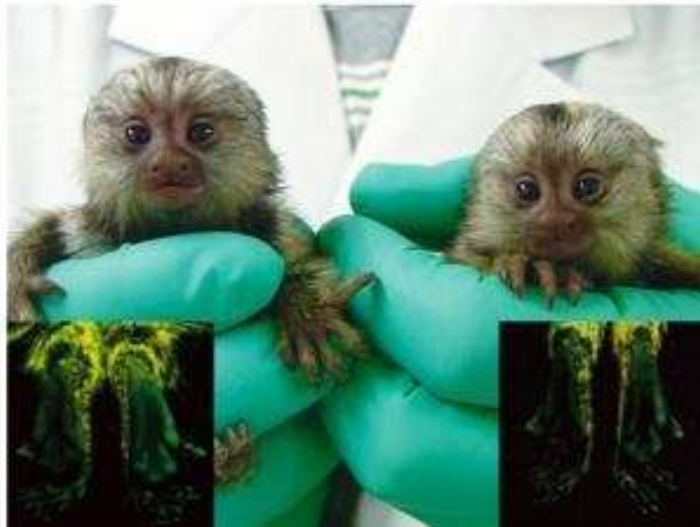
Перенос спор *Bacillus cereus* с упаковочной бумаги на продукты питания.

Примеры использования GFP в промышленности:

- контроль за содержанием мясных бродильных лактобацилл в колбасах;
- анализ распределения *Lactococcus lactis* в «модельном» сыре;
- анализ физиологических процессов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, используемых для сбраживания при изготовлении рисовой водки (саке) и вина (фрагментация митохондрий и вакуолей в процессе брожения);
- контроль за распространением бактерий, которые усваивают дизельное топливо в почвах;

•выращивание трансгенных флуоресцирующих домашних животных (мыши, кролики, обезьяны), а также растений (елки и цветы).





Credit: E. Sasaki et al 2009