

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.343

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ГОРЯЧИХ ТОЧЕК» ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОЗРЕВАНИЯ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА moxSAASoti ПРИ 37 °С**

Надежда Константиновна Марынич¹, Александр Павлович Савицкий^{1,2}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химиче-
ский факультет

Автор, ответственный за переписку: Надежда Константиновна Марынич,
marynich_n@mail.ru

Аннотация. Проведен поиск аминокислотных остатков, замена которых мо-
жет способствовать более оптимальному созреванию флуоресцентного белка
moxSAASoti при 37 °С. Для многих других флуоресцентных белков улучшение
этой характеристики было получено случайно при множестве раундов случайного
мутагенеза, однако нам удалось найти два положения – 74 и 125, которые, оче-
видно, влияют на процесс созревания moxSAASoti, что было проверено методом
введения замен в эти положения путем сайт-направленного и сайт-насыщающего
мутагенезов.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, сайт-насыщающий мутагенез, созрева-
ние флуоресцентных белков

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-3-255-261

Список сокращений: GFP – green fluorescent protein, PCR, ПЦР – полимеразная
цепная реакция, ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалакто-пиранозид, ФПФБ – фо-
топереключаемый флуоресцентный белок, ФКФБ – фотоконвертируемый флуо-
ресцентный белок.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания.

Для цитирования: Марынич Н.К., Савицкий А.П. Определение «горячих то-
чек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °С //
Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261.

SCIENTIFIC REVIEW

**DEFINITION OF “HOTSPOTS” TO IMPROVE THE MATURATION
OF THE FLUORESCENT PROTEIN MOXSAASOTI AT 37 °C**

Nadezhda K. Marynich¹, Alexander P. Savitsky^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry A.N. Bach, Federal Research Center “Fundamentals of
Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences

² Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Faculty of Chemistry

Corresponding author: Marynich Nadezhda Konstantinovna, marynich_n@mail.ru

Abstract: In the present work, we searched for amino acid residues, the replacement of
which can contribute to more optimal maturation of the fluorescent protein moxSAASoti
at 37 °C. For many other fluorescent proteins, an improvement in this characteristic has
been obtained by chance through many rounds of random mutagenesis, however, we

were able to find two positions – 74 and 121 – which obviously affect the maturation process of moxSAASoti, which was verified by introducing substitutions at these positions by the site directed and site-saturating mutagenesis.

Keywords: fluorescent proteins, site-saturating mutagenesis, maturation of fluorescent proteins

Abbreviations: GFP – green fluorescent proteins, PCR, PCR – polymerase chain reaction, IPTG – isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

Financial Support. The work was carried out within the framework of the state assignment.

For citation: Marynich N.K., Savitsky A.P. Determination of “hot spots” to improve the maturation of the fluorescent protein moxSAASoti at 37 °C // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 3. S. 255–261.

Генетически кодируемые флуоресцентные белки позволяют практически неинвазивно визуализировать динамические процессы в живых клетках и организмах [1–3]. Фотопревращающиеся флуоресцентные белки представляют собой подкласс флуоресцентных белков, которые меняют свои свойства флуоресцентной эмиссии в ответ на облучение светом определенных длин волн. Такие белки нашли широкое применение в качестве меток для методов микроскопии сверхвысокого разрешения, позволяя визуализировать структуры за пределами дифракционного барьера [4–6]. К таким белкам относятся фотоконвертируемые флуоресцентные белки (ФКФБ), способные менять длину волны эмиссии (сине-зеленые, оранжево-красные, и наиболее распространенные благодаря своей контрастности – зелено-красные ФКФБ [7–11]), фотопереключаемые белки (ФПФБ), способные переключаться между флуоресцентным и нефлуоресцентным состояниями [12–16]. Также существует малочисленная группа бифотохромных флуоресцентных белков, объединяющих в себе предыдущие два свойства, что позволяет использовать их в комбинации методов суперразрешающей микроскопии и получать более точные изображения [17]. Большинство бифотохромных белков получено путем мутагенеза ФКФБ [18, 19] и ФПФБ [20], однако уникальным примером такого белка является SAASoti. Уже в диком типе без введения замен он обладает одновременно несколькими свойствами фотопревращений: необратимой фотоконверсией [21], обратимым фотопереключением зеленой формы [22], а также для SAASoti продемонстрирована возможность фотопереключения красной формы при интенсивном фотооблучении зеленой формы белка перед фотоконверсией [23]. Для применения его в компартаментах клетки с окисли-

тельными условиями была получена бесцистеиновая форма moxSAASoti [24].

В случае применения GFP-подобного белка для исследования клеток теплокровных животных *in vivo* большое значение имеет эффективное созревание при 37 °C. Созревание флуоресцентных белков – сложный процесс, объединяющий экспрессию, фолдинг белка и автокаталитическое формирование хромофора. Поскольку все известные на сегодняшний день GFP-подобные белки выделены из морских организмов (кораллов или медуз), для большинства из них нормальная физиологическая температура созревания находится около 20 °C. Оптимизация созревания GFP-подобных белков в клетках млекопитающих является важной задачей, однако рациональный поиск аминокислотных остатков представлен нечасто. В большинстве случаев это свойство приобретает белками в результате многих циклов случайного мутагенеза. В этой работе впервые были обнаружены «горячие точки», т.е. положения в аминокислотной последовательности, которые влияют на процесс созревания SAASoti при 37 °C.

Материалы и методы

Сайт-направленный и сайт-насыщающий мутагенез были осуществлены методом «Overlap-extension PCR» [25] с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Pfu. Праймеры для ПЦР составляли вручную, синтез проведен компанией «Евроген», Россия. Для сайт-насыщающего мутагенеза использовали выроджденные праймеры со случайным набором дезоксирибонуклеотидов в кодоне заменяемой аминокислоты, обозначенном как NNN, ПЦР проводили последовательно с каждой парой праймеров. Последовательности используемых праймеров представлены ниже:

moxSAASotiH74K_fw GTA ACA GAG
GGA TTG TCA AAT ACC CTC
moxSAASotiH74K_rev GAG GGT ATT TGA
CAA TCC CTC TGT TAC
moxSAASotiH74X_fw GTA ACA GAG
GGA TTG TCN NNT ACC CTC
moxSAASotiH74X_rev GAG GGT ANN
NGA CAA TCC CTC TGT TAC
moxSAASotiH125Y_fw CAT CCA TGT TTT
ACG GTA CAA ACT TTC
moxSAASotiH125Y_rev GAA AGT TTG TAC
CGT AAA ACA TGG ATG
moxSAASotiG78N_fw: TAC CCT CCC AAC
ATC CCC GAC TA
moxSAASotiG78N_rev: TAG TCG GGG
ATG TTG GGA GGG TA
moxSAASotiI15K_fw: TGG AAT TAA AGT
TTC ACA TGG ATG GCA A
moxSAASotiI15K_rev: TT GCC ATC CAT
GTG AAA CTT TAA TTC CA

ДНК с заменами клонировали в вектор pET22b и трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). Трансформированные клетки высевали на агаризованную LB-среду с селективным антибиотиком (ампициллин в конечной концентрации 1 мг/л) и ИПТГ в конечной концентрации 100 мкМ, выращивали в течение ночи (16 ч).

Колонии анализировали на испускание флуоресценции при длине волны 520 нм на установке на базе микроскопа Olympus BX-43. 4 Thorlabs LEDs были коллимированы ахроматическими конденсорными линзами Thorlabs ACL2520-A и объединены с тремя дихроическими зеркалами Thorlabs DMLP425R, DMLP490R и Edmund Optics #67-078 с отсекающими фильтрами на длине волны возбуждения 458 нм. Спектральные полосы пропускали полосовым фильтром ET470/24m. Была использована схема Köhler для получения более гомогенного пучка света после объектива микроскопа. Пучок света после коллиматорных линз фокусировался на задней плоскости объектива ахроматическими линзами (Thorlabs AC254-125-A). Затем ахроматический свет отражался разделителем светового луча 50/50 на объектив. Флуоресцентное изображение проецировалось на CCD-камеру после разделителя светового луча через трубчатые линзы после фильтров Chroma 500LP и ZET562NF Notch. Камеру использовали для фокусировки и ориентирования образца. При этом ахроматический объектив фокусировал изображение на входной щели спектрометра «Avesta ASP-75» через второй разделитель светового луча 70/30. Светодиоды управлялись с помощью драйвера Thorlabs LEDD1B и собственноручно

спроектированного USB DAC с самописным программным обеспечением Python.

Результаты и их обсуждение

При выравнивании последовательности SAASoti и других фотопревращающихся белков можно видеть, что у большинства белков в положениях 15 и 74 стоят лизины, что может свидетельствовать о высокой консервативности остатка в этом положении (рис. 1, А). Таким образом, были индивидуально введены замены I15K и H74K, G78N в последовательность moxSAASoti.

Анализ интенсивности флуоресценции колоний на 520 нм показал, что флуоресценция выросла только для варианта с заменой H74K. Это положение было выбрано как перспективное. Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по положению 74. Получено 62 колонии, флуоресценция наблюдалась у 16 (рис. 2, А). Наиболее высокая интенсивность флуоресценции характерна для клона 12, она более чем в 2 раза превышает интенсивность для варианта H74K. Секвенирование ДНК показало, что этот клон содержит замену H74A.

Из полученных данных можно видеть, что положение 74 влияет на процесс созревания moxSAASoti, возможно, участвуя в электростатических взаимодействиях при фолдинге.

В работе [26] были проведены аналогичные исследования, направленные именно на улучшение созревания при 37°C фотоконвертируемого белка mEosFP[11], в результате была получена форма mEos2[26]. Белок EosFP имеет высокую степень идентичности по первичной последовательности с moxSAASoti (53%). На его основе с помощью одной замены удалось также получить бифотохромный белок, что также свидетельствует о возможной схожести фотохимических свойств и строения β – бочонка. Для mEos2, в отличие от SAASoti, результативными оказались три замены: N15K, E74K и H78N (нумерация здесь и далее по SAASoti).

В работе [26] была также обнаружена «счастливая», как назвали ее авторы, замена, приведшая к улучшению созревания белка mEos2 – H125Y. В нашей работе проверено, является ли это положение «горячей точкой» и у moxSAASoti, учитывая, что у moxSAASoti, так же как у EosFP, в этом положении находится гистидин. Была проанализирована интенсивность флуоресценции белка в клетках. Для варианта moxSAASoti H125Y характерно многократное возрастание флуоресценции

А

	1	10	20	30	40	50
moxSAASoti	-----MALS	KQYIPDDMEI	IIFHMDGNVNGHYFT	IVATGKAKPYEGKQNL	KATVTKGAPLP	
PS-CFP	-MSKGA----	ELFTGIVPIL	IELNGDVNGHKFSV	SVEGEGDATYGKLT	TLKFICTT-GKLP	
PSmOrange	MVSKGEENMAI	IKEFMREK	VRMEGTVNGHEFE	IEGEGEGRPYEGFQ	TAKLKVTKGGPLP	
Dendra2	----MNTPGINL	IKEDMRVK	VHMEGNVNGHAFV	IEGEGKPKPYEGTQ	TANLTVKEGAPLP	
Dronpa	-----MSVIK	PDMKIK	LRMEGAVNGHPFA	IEGVGLGKPFEGKQ	SMDLVKVEGGPLP	
mEos2	-----MSAIK	PDMKIK	LRMEGNVNGHHFV	IDGDGTGKPFEGKQ	SMDLVEKVEGGPLP	
	60	70	80	90	100	110
moxSAASoti	FSTDILSTVMHYG	NRGIVHYPPSI	--PDYFKQSFPEGY	SWERTFAFEDGGFW	TVSADIKL	
PS-CFP	VPWPTLVATLSY	GVQCFSRYPDH	MKQHDFFKSAMPE	GYIQERTIFFEDDG	NYKSRAEVKF	
PSmOrange	FAWDILSELFTY	GSKAYVKHPADI	--PDYFKLSFPEGF	KWERVMNYEDGGV	VTVQDSSL	
Dendra2	FSYDILTTAVHY	GNRVFKYPEDI	--PDYFKQSFPEGY	SWERTMTFEDKGIC	ITRSDISL	
Dronpa	FAYDILTTVFCY	GNRVFAKYPENI	--VDYFKQSFPEGY	SWERSMNYEDGGI	CNATNDITL	
mEos2	EAFDILTTAFHY	GNRVFAKYPDNI	--QDYFKQSFPEGY	SWERSLTFEDGGIC	ARNDITM	
	120	130	140	150	160	
moxSAASoti	KDNTFIHTSMFH	GTNFPADGPFVMQ	RKTIQWEKSIEKMT	VSDGIVKGDITMF	----LLLEG	
PS-CFP	EGDTLVSRIELT	GTDFKEDGNILGN	KM-EYNYNATNVY	IMTDKARNGIKVN	FVRRHNIKD	
PSmOrange	QDGEFINKVKMR	GTNFPSDGPFVMQ	KKTMGWEASSER	MPEDGALKEIRMR	----LKLKD	
Dendra2	EGDCFFQNVRFK	GTNFPNGPFVMQ	KKTLKWEKSTK	KLHVRDGLLVGN	INMA----LLLEG	
Dronpa	DGDCYIIEIRFD	GVNFPANGPFVMQ	RKTVKWEKSTK	LYVRDGVKGDV	NMA----LSLEG	
mEos2	EGDTFYNKVRFY	GTNFPANGPFVMQ	KKTLKWEKSTK	MYVRDGVLTGDI	HMA----LLLEG	
	170	180	190	200	210	220
moxSAASoti	GGKY-RAQFHT	SYKAK-KVVEM	PQSHYVEHSIERT	ND--DGTQFELNE	HAVARLINEI	---
PS-CFP	GSVQLADHYQ	ONTPIGDGPVLL	PDNHYLSIQSALS	KDPNEKRDRHMI	YLEFVTAAAIT	HGM
PSmOrange	GGHY-TSEVK	TTYKAK-KSVQL	PGAYIVGIKLDIT	SHNEDYTIIVEQ	YERAEGRHS	-TGGM
Dendra2	GGHY-LCDFK	TTYKAK-KVVQL	PDAAHFVDEHRIE	ILGNSDYNNKVK	LYEHAVARYS	PLPSQ
Dronpa	GGHY-RCDFK	TTYKAK-KVVQL	PDYHFVDEHIEI	KSHDKDYSNVN	LHEHAAEASE	-LPRQ
mEos2	NAHY-RCDFR	TTYKAKEKGVK	LPGYHFVDEHCIEI	LSHDKDYNKVK	LYEHAVAHSG	-LPDN

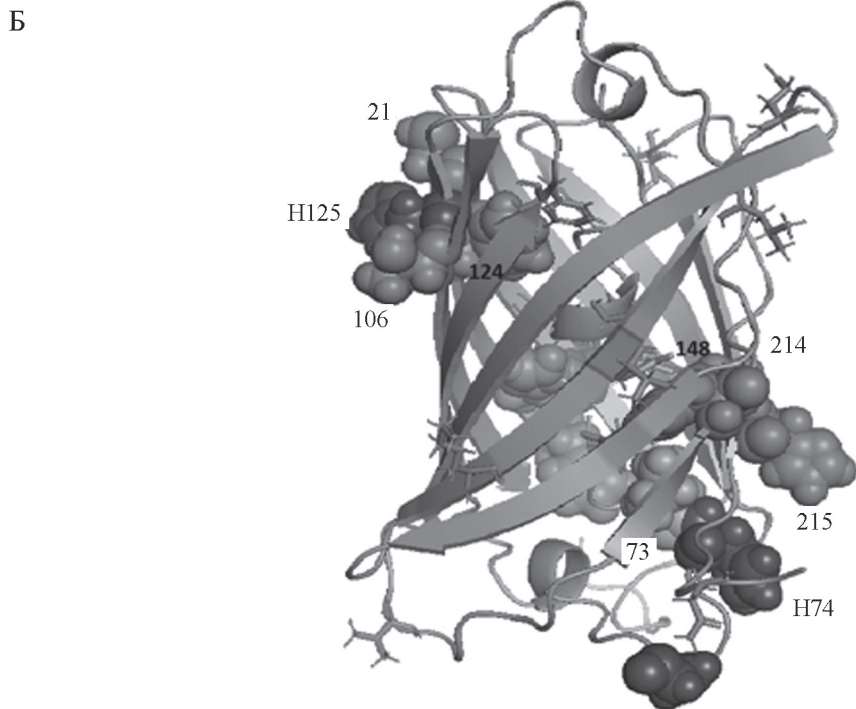


Рис. 1. Выравнивание последовательностей moxSAASoti и других фототрансформируемых и бифотохромных белков. Серым выделением обозначены замены в PS-CFP, подчеркиванием – PSmOrange, квадратной рамкой – в mEos2, светло-серым шрифтом в mIrisFP, белым текстом на черном фоне – Dronpa, жирным шрифтом – Dendra2. После выравнивания приведены значения процента идентичности последовательностей выбранных белков с moxSAASoti, все белки, кроме PS-CFP, произошли из кораллов. Б – трехмерная модель moxSAASoti с обозначением аминокислотных остатков, которые повлияли на созревание в других белках. Сфероидными моделями обозначены остатки, находящиеся в близком контакте. Темно-серым – остатки, замененные в moxSAASoti, светло-серым – в других белках

клеток по сравнению с предыдущими вариантами (рис. 2, Б). Очевидно, что положение 125 тоже влияет на созревание *moxSAASoti*. Таким образом, для *moxSAASoti* были обнаружены два, общие с *mEos2*, положения (74 и 125), играющие важную роль в процессе созревания белка.

Для многих белков в настоящее время получены формы, стабильно сворачивающиеся и созревающие при температуре тела млекопитающих. Выяснение аминокислотных остатков или даже областей, которые могли бы регулировать это свойство все еще остается нетривиальной задачей. Часто эти свойства возникают в совокупности с другими свойствами. Так, например, сине-зеленый ФКФБ PS-CFP был получен из мо-

номерного нефлуоресцирующего белка *aceGFP* (*Aequorea coerulescens*) с помощью комбинации сайт-насыщающего мутагеза и случайного мутагеза с результирующими девятью заменами: T63A, N120S, H148T, K158R, I164V, E168K, F213L, G214E и K227Q. Полученный белок эффективно созревает в клетках млекопитающих, но выяснить, какие именно замены оказали влияние на процесс созревания, пока не удалось [15]. Однако известно, что PS-CFP является потомком белка, выделенного из медузы вида *Aequoria*. Все флуоресцентные белки можно разделить на две многочисленные группы: 1) выделенные из медуз, 2) выделенные из кораллов. Эти две группы сходны по третичной структуре, но значительно различают-

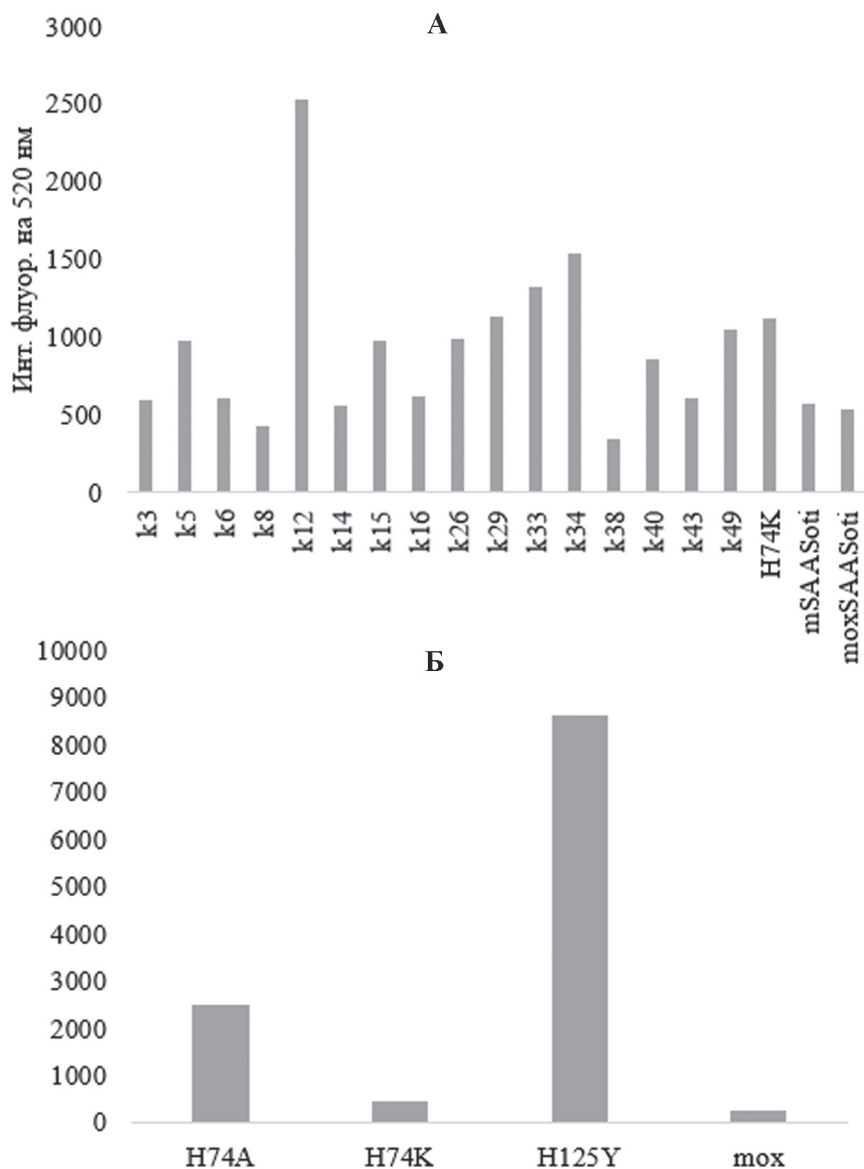


Рис. 2. Интенсивности флуоресценции колоний, содержащих клоны ($\lambda = 520$ нм)

ся по первичной. Это можно видеть при анализе первичных последовательностей представителей разных групп. SAASoti выделен из коралла, поэтому идентичность его последовательности с ФКФБ, выделенными из медуз, составляет лишь 20%, в то время как идентичность с ФКФБ, выделенными из кораллов, составляет 50% (PS-CFP – 22%, PSmOrange – 47%, Dendra2 – 55%, Dronpa – 52%, mEos2 – 53%). Очевидно, наибольший интерес представляет сравнение именно со второй группой белков, в особенности с фотопревращающимися белками, как близкими, в том числе и по сложности фотохимических реакций, протекающих в окружении хромофора.

Для анализа были выбраны ФКФБ, ФПФБ, а также их бифотохромные варианты с известным числом замен, которые улучшают их созревание при 37 °С.

1. Оранжево-красный ФКФБ PSmOrange был получен из оранжевого флуоресцентного белка mOrange девятью раундами случайного мутагенеза по всей последовательности с результирующими шестью заменами (S21T, Q64L, F99Y, L124M, K162R, R186S), которые привели не только к получению ФКФБ с повышенной яркостью и фотостабильностью, но и увеличили скорость созревания этого белка при 37 °С в 1,6 раза [27].

2. Фотопереключаемый флуоресцентный белок (ФПФБ) Dronpa [28] был получен из зеленого ФБ 22G путем случайного мутагенеза с результирующими заменами I106N, F118Y, L166S, R198N, N209S, G220E, что привело не только к появлению свойства обратимого фотопереключения, но также дало стабильное созревание при 37 °С. Его бифотохромные варианты pcDronpa (C66H-N106I-E220G) и pcDronpa2 (C66H-N106I-

Y120N-E220G) также эффективно созревают при 37 °С, хотя при их получении произошли обратные замены в положениях 106 и 220 [20].

3. Зелено-красный ФКФБ Dendra эффективно созревает при 37 °С благодаря единственной замене Y99F, полученной методом случайного мутагенеза [29]. Интересно, что эта замена является обратной замене F99Y для PSmOrange, так что возможно замена F99Y повлияла на какой-то другой параметр, а не на созревание.

4. Бифотохромный белок mIrisFP, отличается от мономерного mEosFP четырьмя введенными заменами – A73V, F177S, K149I и Y193A. При скрининге было обнаружено, что замена A73V устраняет недостающую термотолерантность; вариант mEosFPthermo и mIrisFP демонстрирует превосходную экспрессию при 37 °С [17].

При расположении всех вышеописанных положений на модели SAASoti можно выделить некоторые группы вокруг положений, замены в которых повлияли на созревание SAASoti (рис. 1, Б). Так, в тесном контакте с положением 125 находятся также положения 21 и 124, обнаруженные у PSmOrange и 106, обнаруженное у Dronpa. Это свидетельствует о взаимодействии аминокислотных остатков в определенных областях бета-бочонка, отвечающих за фолдинг и созревание при 37 °С, причем каждая из замен изменяет взаимодействие между аминокислотными остатками. Вблизи от положения 74 находится целая группа: 73 от mIrisFP, 148, 214, 215 от PS-CFP и 197 от Dronpa. Можно предположить, что при подборе замены необходимо также анализировать область контактов аминокислотного остатка и сравнивать с контактами в «успешных» белках подобного типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Solovyev I.D., Maloshenok L.G., Savitsky A.P. // *Materials*. MDPI, 2022. Vol. 15. N 14 (DOI: 10.3390/ma15144962).
- Zherdeva V.V., Kazachkina N.I., Shcheslavskiy V.I., Savitsky A.P. // *J. Biomed. Opt.* 2018. Vol. 23. N 03. P. 035002 (DOI: 10.1117/1.JBO.23.3.035002).
- Welling M., Mohr M.A., Ponti A., Sabater L.R., Boni A., Kawamura Y.K., Liberali P., Peters A.H.F.M., Pelczar P., Pantazis P. // *eLife*, 2019. P. 1 (DOI: 10.7554/eLife.44491).
- Subach F.V., Patterson G.H., Renz M., Lippincott-Schwartz J., Verkhusa V.V. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2010. Vol. 132. N 18. P. 6481 (DOI: 10.1021/ja100906g).
- Subach F.V., Patterson G.H., Manley S., Gillette J.M., Lippincott-Schwartz J., Verkhusa V.V. // *Nat. Methods*. 2009. Vol. 6. N 2. P. 153 (DOI: 10.1038/nmeth.1298).
- Gunewardene M.S., Subach F.V., Gould T.J., Penoncello G.P., Gudheti M.V., Verkhusa V.V., Hess S.T. // *Biophys J.* 2011. Vol. 101. N 6. P. 1522 (DOI: 10.1016/j.bpj.2011.07.049).
- Nienhaus K., Nienhaus G.U., Wiedenmann J., Nar H. // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. Vol. 102. N 26. P. 9156 (DOI: 10.1073/pnas.0501874102).
- Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M., Mizuo H., Miyawaki A. // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99. N 20. P. 12651 (DOI: 10.1073/pnas.202320599).
- Pletneva N.V., Pletnev S., Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I., Muslinkina L., Dauter Z., Pletnev V.Z. // *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.* 2016. Vol. 72. N 8. P. 922 (DOI: 10.1107/s205979831601038x).
- Habuchi S., Tsutsui H., Kochaniak A.B., Miyawaki A., van Oijen A.M. // *PLoS One*. 2008. Vol. 3. N 12 (DOI: 10.1371/journal.pone.0003944).
- Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F.,

- Röcker C., Salih A., Spindler K.-D., Nienhaus G.U. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. N 45. P. 15905. (DOI: 10.1073/PNAS.04036681012004).
12. Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G., Andresen M., Eggeling C., Hell S.W., Jakobs S., Wahl M.C. // Biochem. J. 2007. Vol. 402. N 1. P. 35 (DOI: 10.1042/BJ20061401).
13. Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Schäfer L.V., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Jakobs S. // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. 26. P. 1035 (DOI: 10.1038/nbt.1493).
14. Pennacchietti F., Serebrovskaya E.O., Faro A.R., Shemyakina I.I., Bozhanova N.G., Kotlobay A.A., Gurskaya N.G., Bodén A., Dreier J., Chudakov D.M., Lukyanov K.A., Verkhusha V.V., Mishin A.S., Testa I. // Nat. Methods. 2018. Vol. 15. N 8. P. 601 (DOI: 10.1038/s41592-018-0052-9).
15. Chudakov D.M., Verkhusha V.V., Staroverov D.B., Souslova E.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22. N 11. P. 1435 (DOI: 10.1038/nbt1025).
16. Zhou X.X., Lin M.Z. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2013. Vol. 17. № 4 P. 682 (DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.05.031).
17. Wiedenmann J., Gayda S., Adam V., Oswald F., Nienhaus K., Bourgeois D., Nienhaus G.U. // J. Biophotonics. 2011. Vol. 4. N 6. P. 377 (DOI: 10.1002/jbio.201000122).
18. Adam V., Lelimosin M., Boehme S., Desfonds G., Nienhaus K., Field M.J., Wiedenmann J., McSweeney S., Nienhaus G.U., Bourgeois D. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. N 47. P. 18343 (DOI: 10.1073/pnas.0805949105).
19. Adam V., Moeyaert B., David C.C., Mizuno H., Lelimosin M., Dedeker P., Ando R., Miyawaki A., Michiels J., Engelborghs Y., Hofkens J. // Chem. Biol. 2011. Vol. 18. N 10. P. 1241 (DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.08.007).
20. Moeyaert B., Nguyen Bich N., De Zitter E., Rocha S., Clays K., Mizuno H., Van Meervelt L., Hofkens J., Dedeker P. // ACS Nano. 2014. Vol. 8. N 2. P. 1664 (DOI: 10.1021/nn4060144).
21. Lapshin G., Salih A., Kolosov P., Golovkina M., Zavorotnyi Y., Ivashina T., Vinokurov L., Bagratashvili V., Savitsky A. // J. Innov. Opt. Health. Sci. 2015. Vol. 8. N 4. P. 1550028 (DOI: 10.1142/S1793545815500285).
22. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. // J. Biomed. Photonics. Eng. 2017. Vol. 3. N 4. P. 040303 (DOI: 10.18287/jbpe17.03.040303).
23. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. N 14. P. 19 (DOI: 10.3390/ijms20143399).
24. Marynich N.K., Khrenova M.G., Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P. // Sci. Rep. 2022. Vol. 12. N 1. P. 7862 (DOI: 10.1038/s41598-022-11249-x).
25. Higuchi R., Krummell B., Saiki R.K. // Nucleic Acids Res. 1988. Vol. 16. N 15. P. 73577 (DOI: 10.1093/nar/16.15.7351).
26. McKinney S.A., Murphy C.S., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Looger L.L. // Nat. Methods. 2009. Vol. 6. N 2. P. 1313 (DOI: 10.1038/nmeth.1296).
27. Subach O.M., Patterson G.H., Ting L.M., Wang Y., Condeelis J.S., Verkhusha V.V. // Nat. Methods. 2011. Vol. 8. N 9. P. 771 (DOI: 10.1038/nmeth.1664).
28. Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. // Science. 2004. Vol. 306. N 5700. P. 1370 (DOI: 10.1126/science.1102506).
29. Gurskaya N.G., Verkhusha V.V., Shcheglov A.S., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Nat. Biotechnol. 2006. Vol. 24. N 4. P. 461 (DOI: 10.1038/nbt1191).

Информация об авторах

Надежда Константиновна Марынич – мл. науч. сотр. лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (marynich_n@mail.ru);

Александр Павлович Савицкий – доцент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; докт. хим. наук, профессор (apsavitsky@inbi.ras.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;

одобрена после рецензирования 12.11.2023;

принята к публикации 14.11.2023