A fluorescence microscopy image of a biological sample, likely a tissue section, showing a complex network of structures. The image is dominated by three colors: a dense red signal forming a background or structural framework, a bright green signal tracing a central path or network, and numerous cyan-colored spots and structures scattered throughout. The overall appearance is that of a highly detailed, interconnected biological system.

**Флуоресцентные белки для
фундаментальных и
биомедицинских
исследований**

Константин Лукьянов

Институт биоорганической химии

Зеленый флуоресцентный белок GFP медузы *Aequorea victoria*

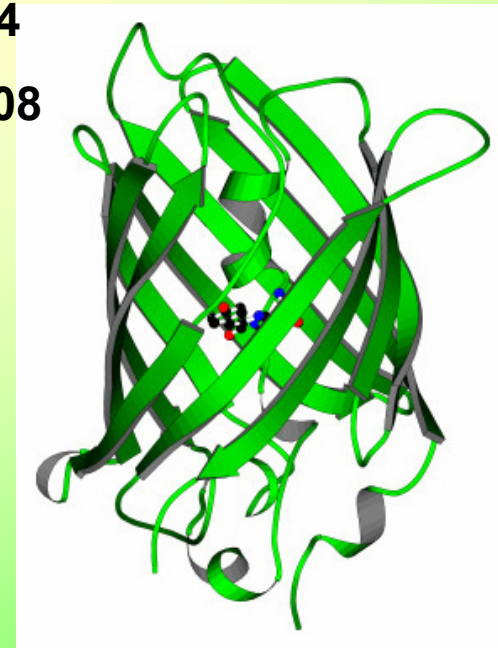
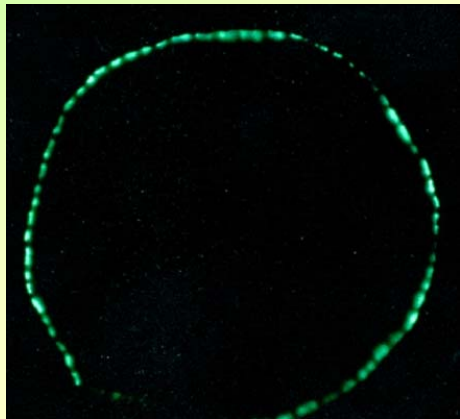


Открытие – 1962

Клонирование – 1992

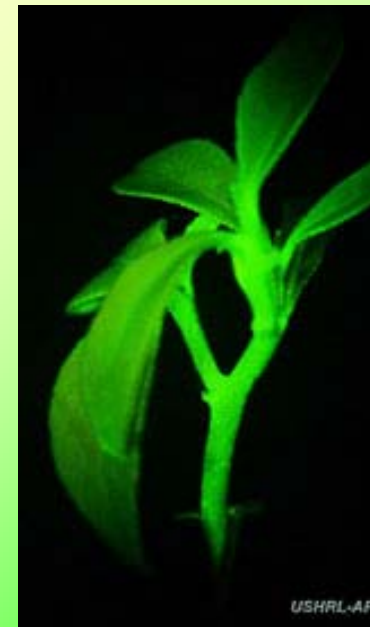
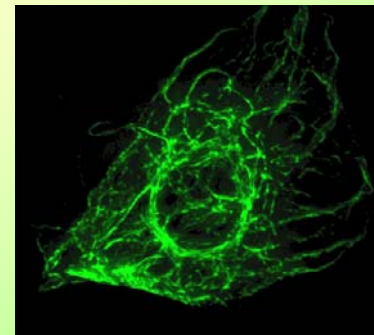
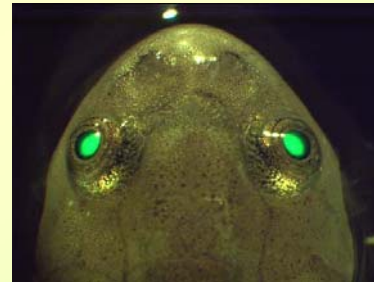
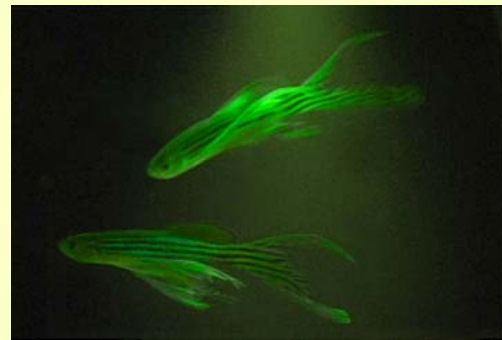
Первое применение – 1994

Нобелевская премия – 2008

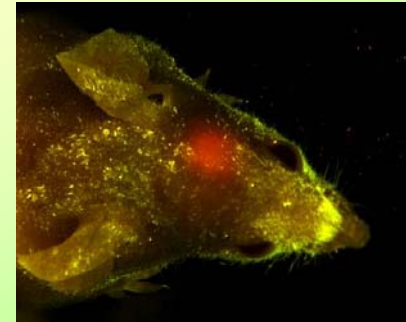
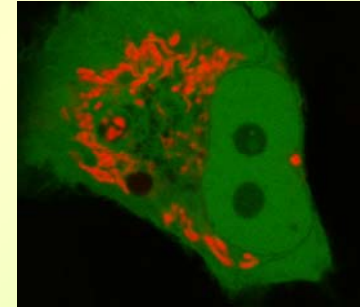
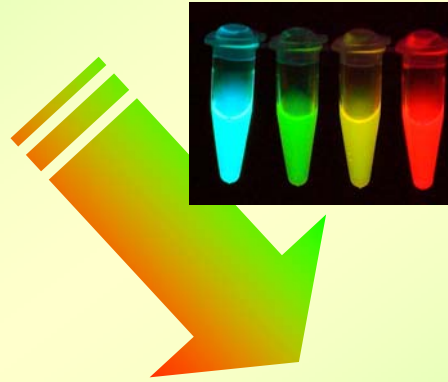
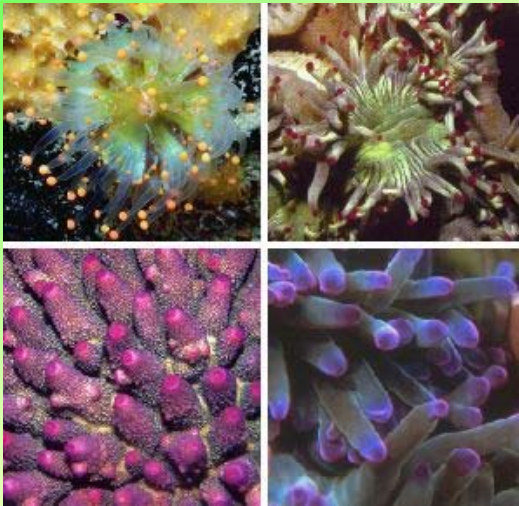
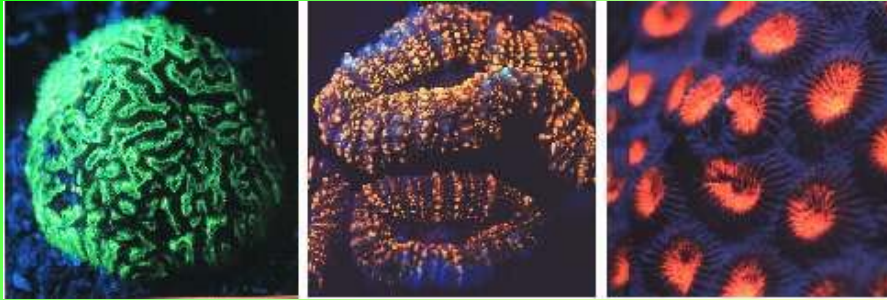


Важнейшие свойства GFP

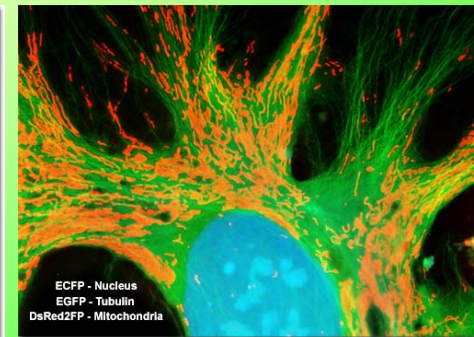
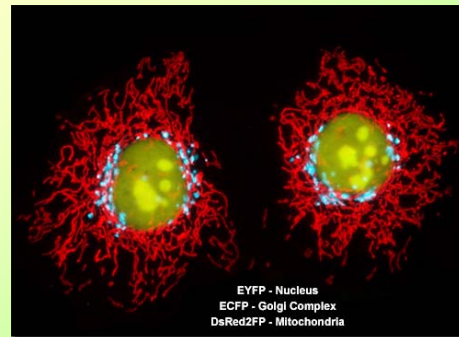
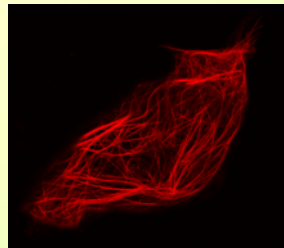
- Сам образует хромофор (нужен только O₂)
- Высокая стабильность
- Низкая фототоксичность
- Низкая токсичность
- Мономер



GFP-подобные белки кораллов (1999)



**Nature
Biotechnology
1999**

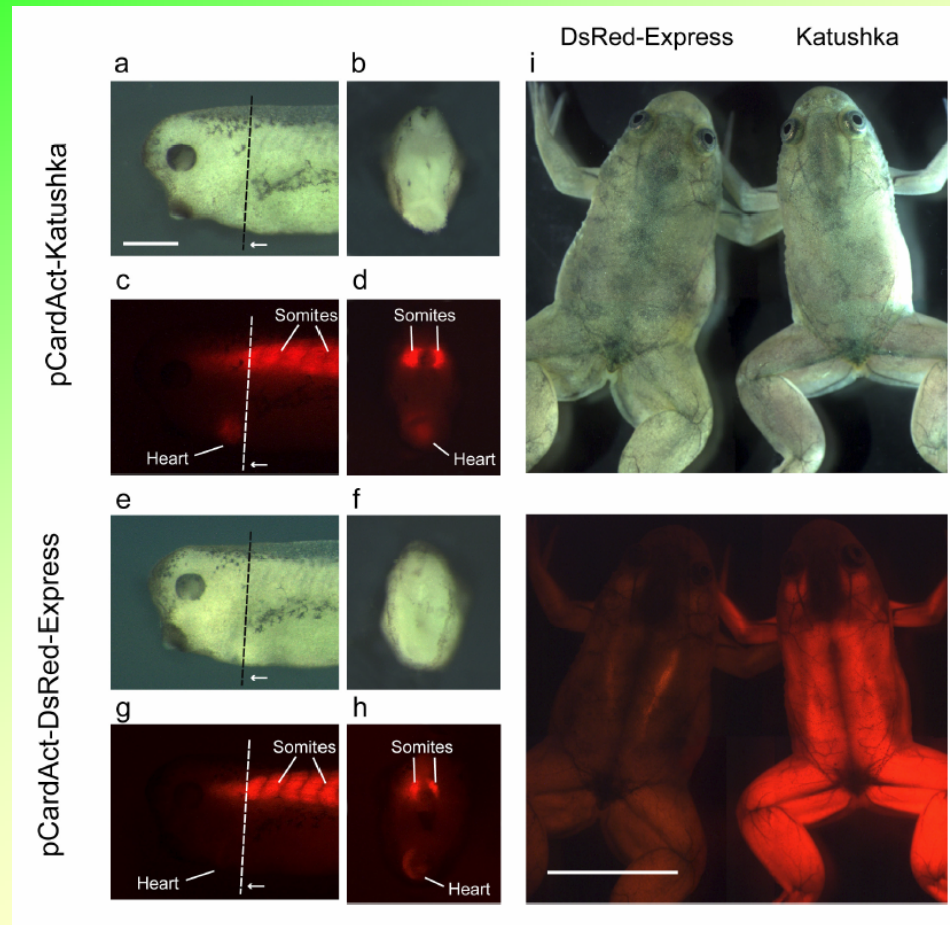


Самые яркие красные и дальне-красные флуоресцентные белки:

- TurboRFP (димер), TagRFP (мономер) 555/585 нм
- Katushka(2) (димер), mKate(2) (мономер) 588/635 нм



Entacmea quadricolor



Сравнение в эмбрионах *Xenopus laevis*.

Трансгенные эмбрионы *Xenopus laevis* экспрессирующие Катюшу и DsRed-Express под контролем кардио-актинового промотера. (a,c) Катюша, стадия эмбриона 33 (b,d) Головная часть, на срезе (e-h) DsRed-Express, аналогичные фото. Сердце визуализируется только на срезе (i) 2.5 месячные лягушки.

Фото А.Г. Зарайского

September 2007 | volume 4 | number 9

nature | methods

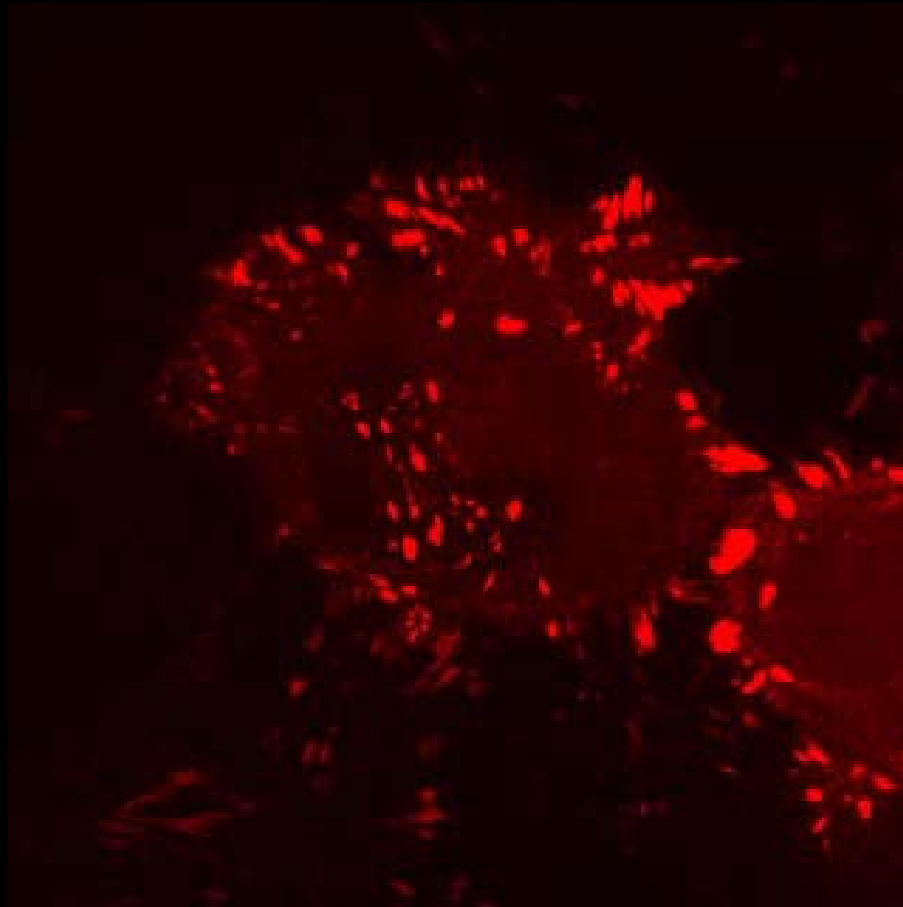
www.nature.com/naturemethods

Techniques for life scientists and chemists



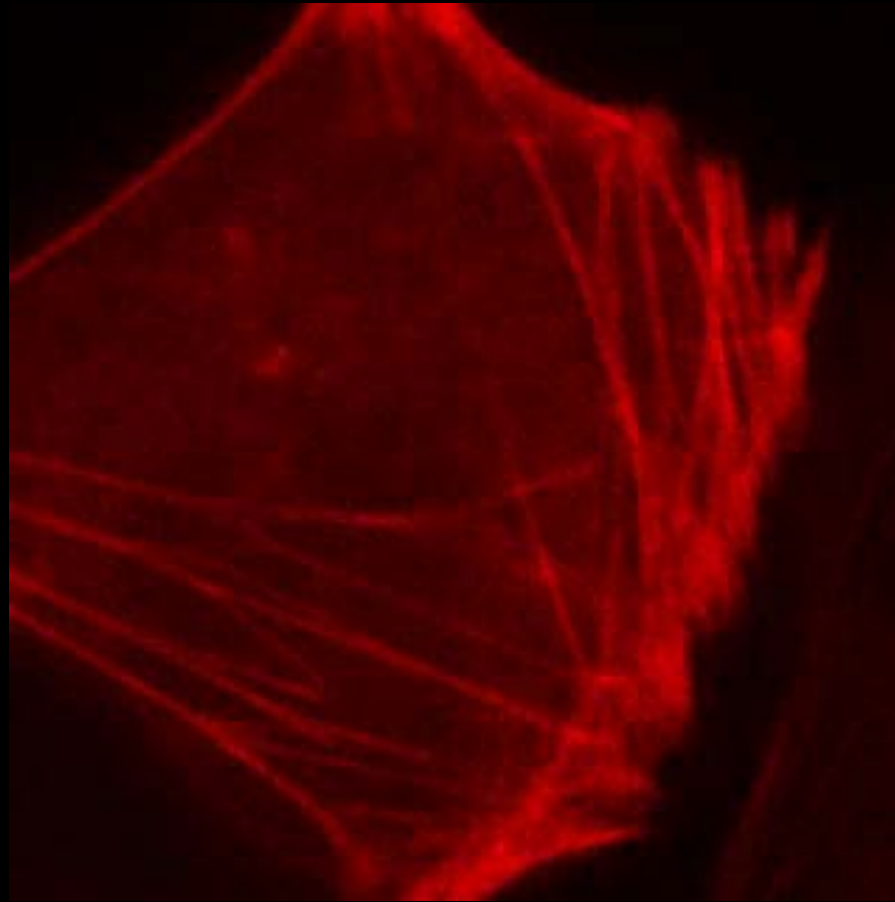
- A far-red fluorescent protein for whole-body imaging
- microRNA sponges
- A worm chip to study neuronal activity
- Viral assay for ion channel function
- Perspective: NMR of supramolecular structures

tdKatushka2-Zyxin

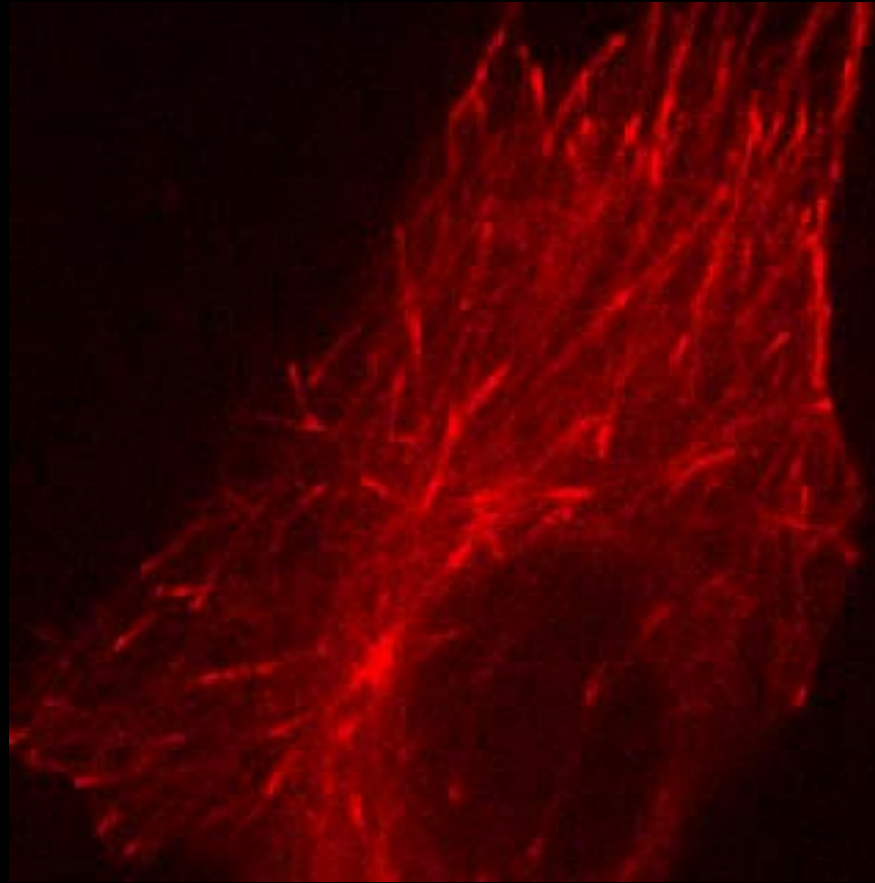


Images were kindly provided by Michael W. Davidson (Florida State University)

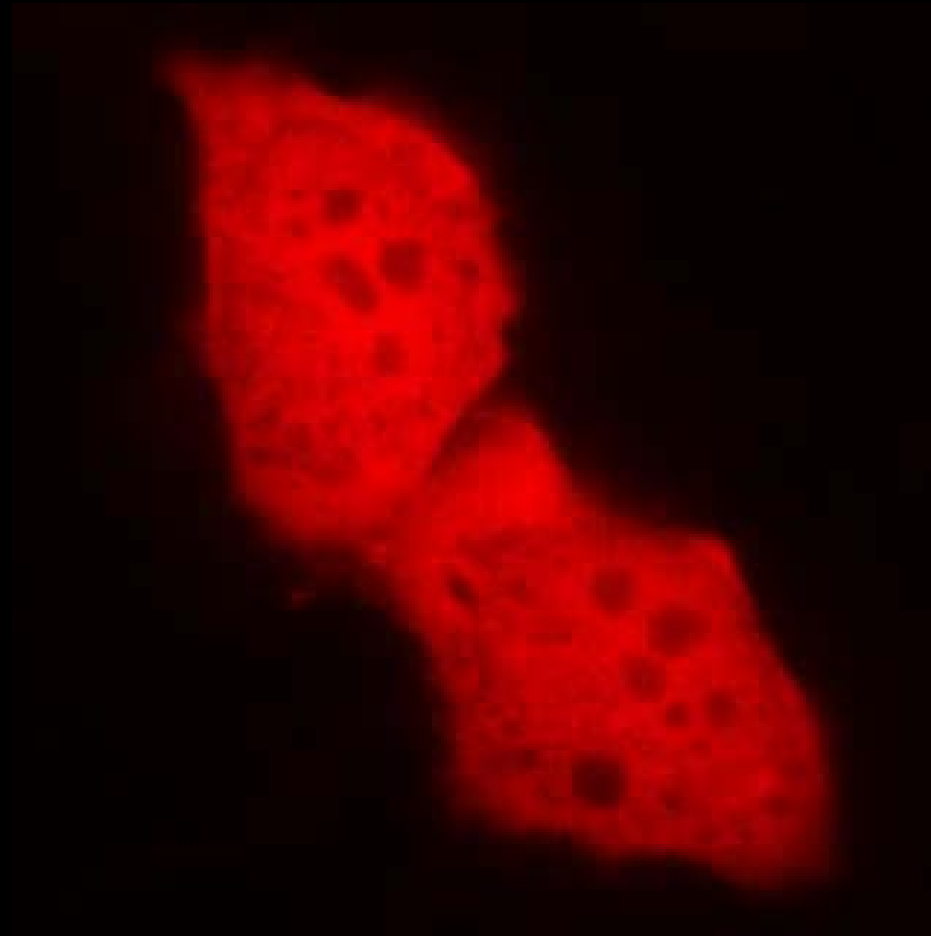
tdKatushka2- β -Actin



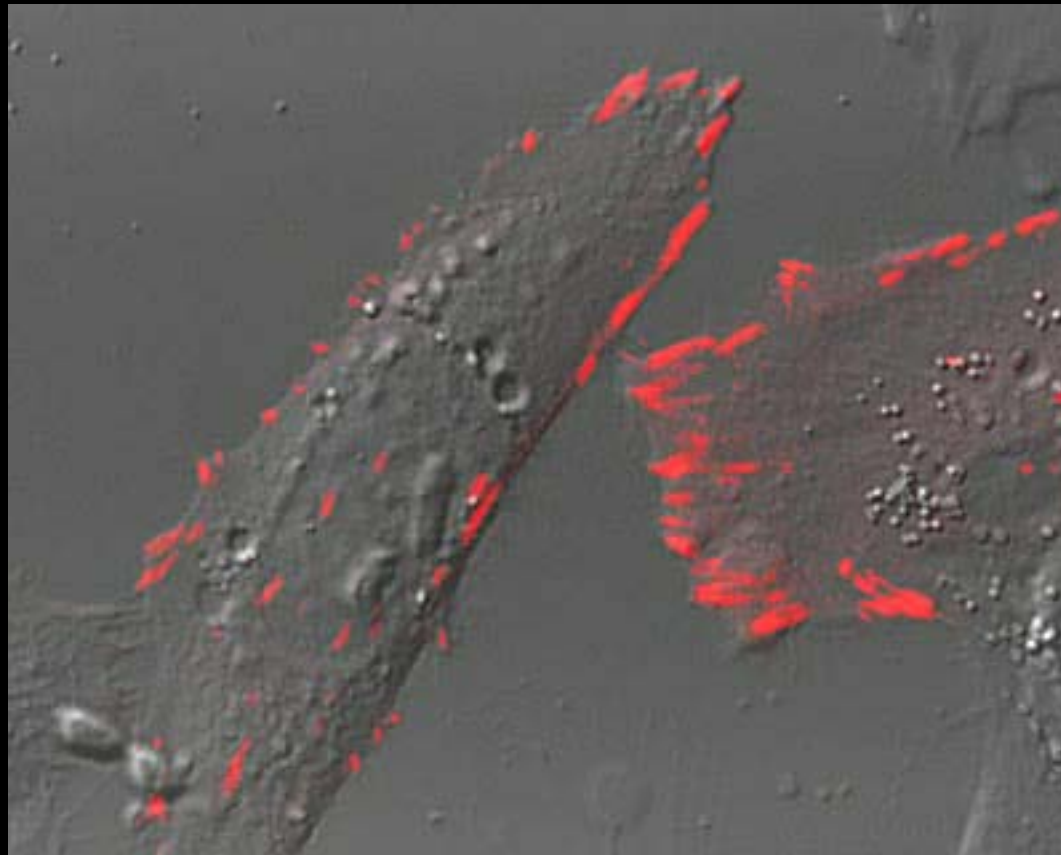
mKate2-EB3
(microtubule end-binding protein)



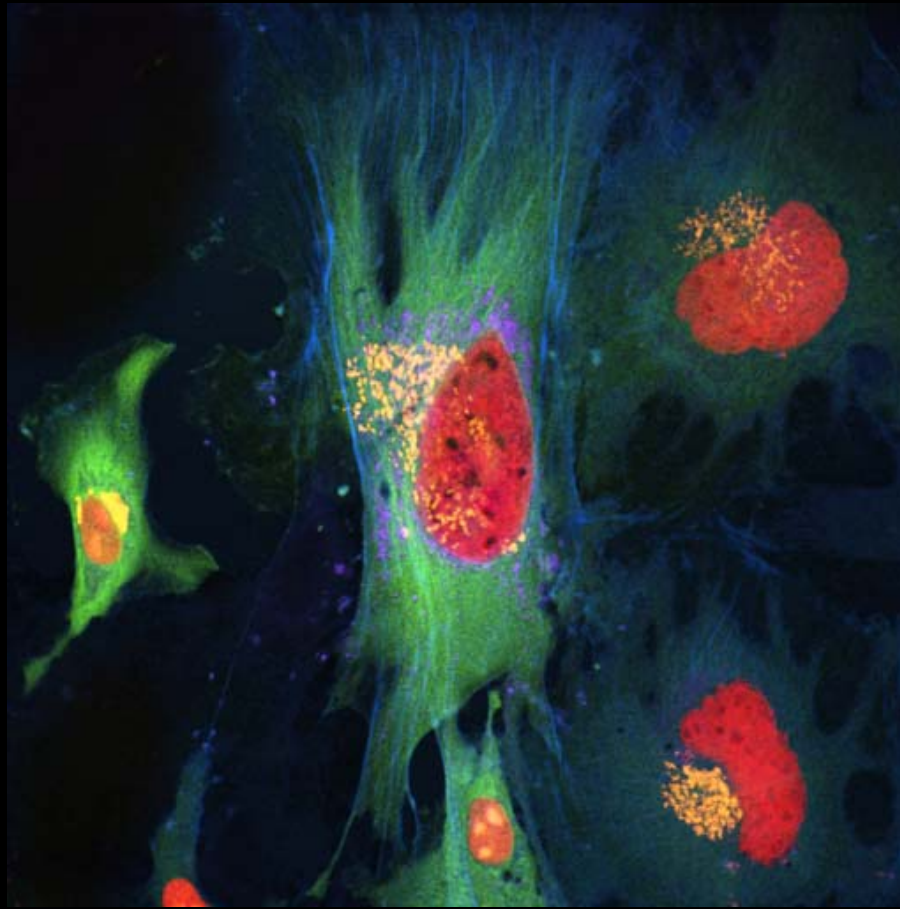
mKate2-Annexin A4



tdKatushka2-Zyxin



**5-цветное мечение с
TagBFP, TagGFP, TagYFP, TagRFP, mKate**



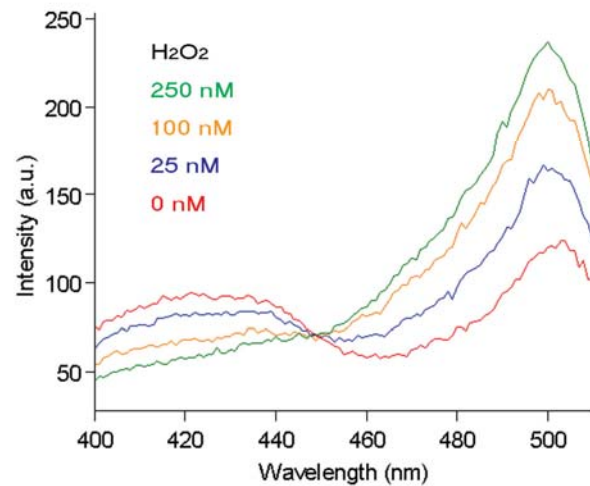
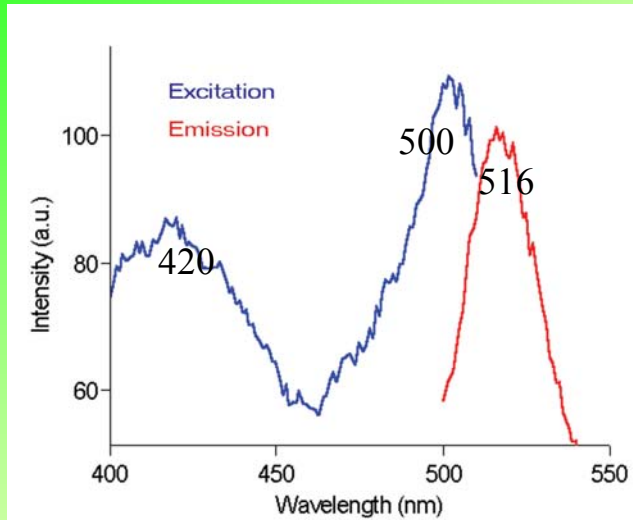
Генетически кодируемый сенсор пероксида водорода

Belousov *et al.*, Nature Methods 2006

Предпосылки:

- Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль во множестве патологических и нормальных процессов. Детекция АФК *in vivo* затруднительна.
- Химические сенсоры АФК обладают рядом недостатков:
 - низкая специфичность;
 - свето-индуцируемая продукция АФК;
 - нельзя направить в разные клеточные компартменты.
- Генетически-кодированных сенсоров АФК не разработано.

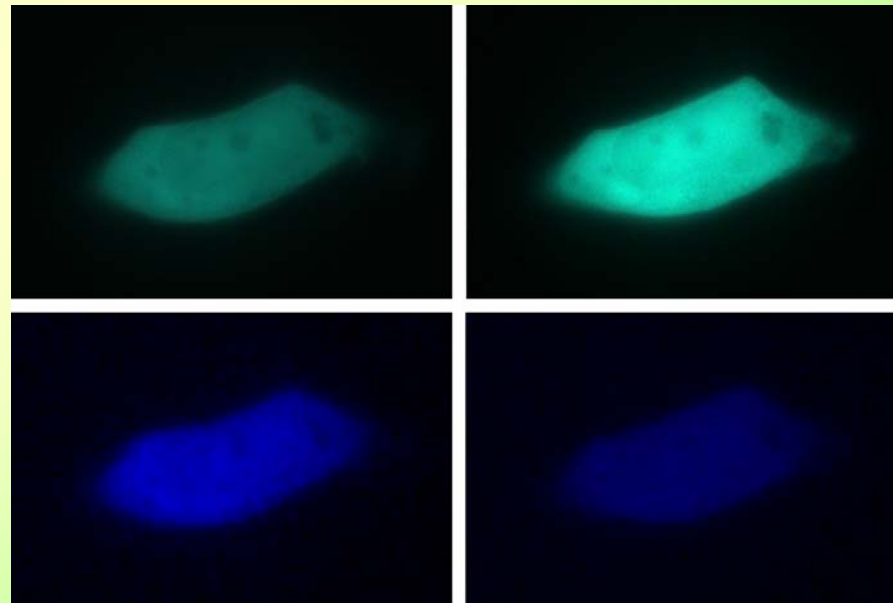
Спектральные свойства сенсора HyPer

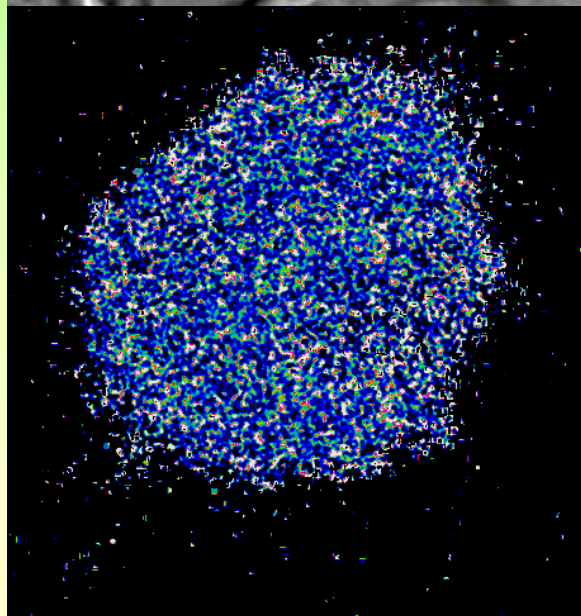
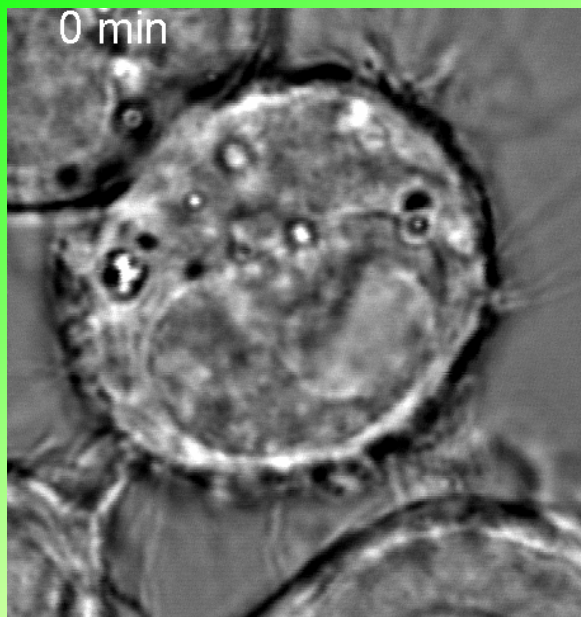


Клетка HeLa перед и после
добавления 50 mM H₂O₂

- H₂O₂

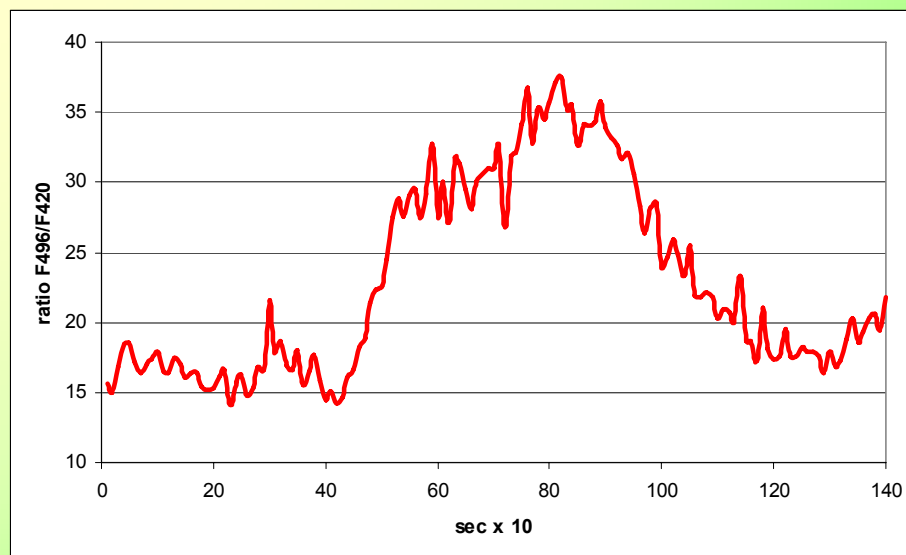
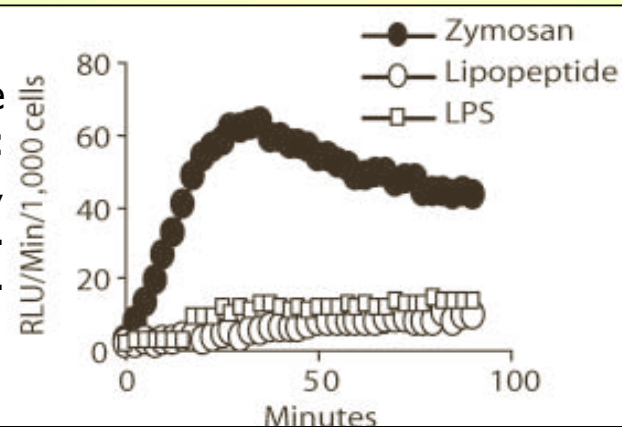
+ H₂O₂

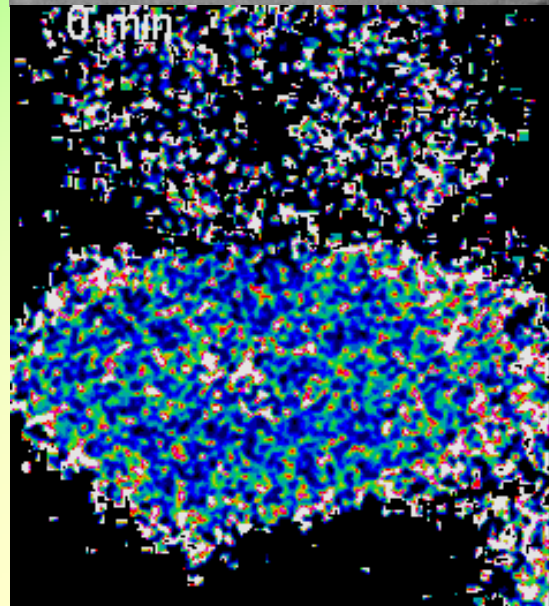
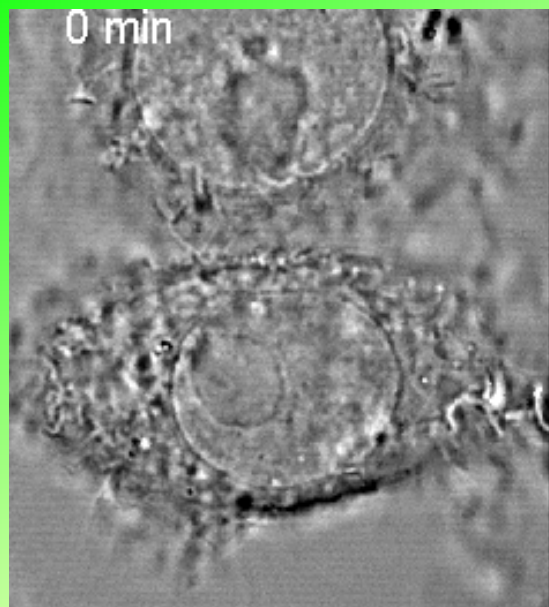




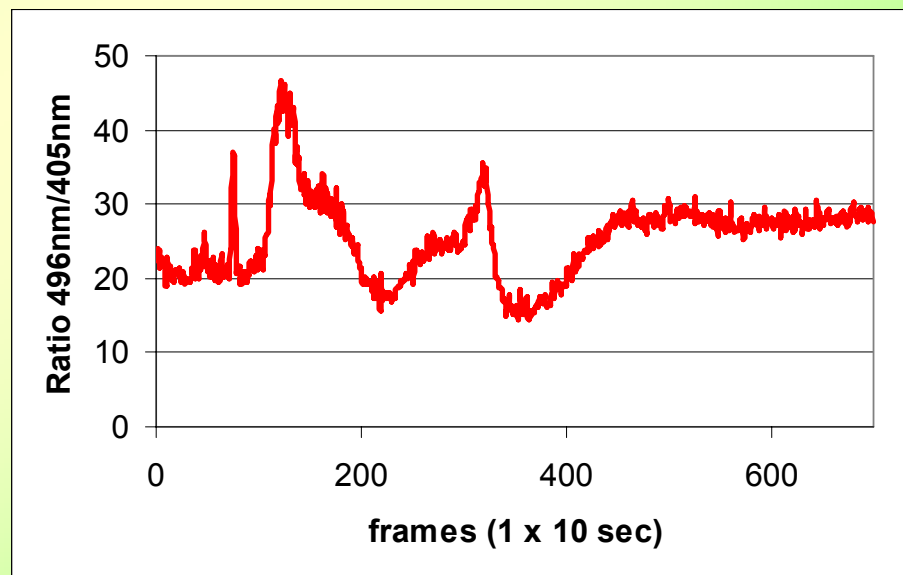
Изменения концентрации пероксида водорода в цитоплазме макрофагов линии Raw 264.7 при фагоцитозе (гранулы опсонизированного зимозана).

Литературные данные:
Gantner et al.,
J Exp Med.
2003.





Небольшая популяция макрофагов способна к нескольким циклам фагоцитоза и продукции H_2O_2 , после чего такие клетки погибают.



Преимущества HyPer :

- Высокая специфичность к H_2O_2
- Обратимый количественный отклик
- Может быть направлен в различные типы клеток и в различные компартменты клетки
- Нет светоиндуцируемой генерации активных форм кислорода

	Blue, Cyan	Green	Yellow	Red	Photo-activatable	Photo toxic	Sensors
Amaxa (www.amaxa.com)		maxFP-Green	maxFP-Yellow	maxFP-Red			
Clontech (www.clontech.com)	AmCyan1	ZsGreen1 <u>AcGFP1</u>	ZsYellow1	DsRed2 DsRed-Express Timer AsRed2 HcRed1 DsRed-Monomer <u>mCherry</u>			
Evrogen (www.evrogen.com)	<u>TagBFP</u> <u>TagCFP</u>	TurboGFP <u>TagGFP</u>	TurboYFP <u>TagYFP</u>	TurboRFP TurboFP602 TurboFP635 <u>TagRFP</u> <u>TagFP635</u>	KFP-Red <u>PS-CFP2</u> <u>Dendra2</u>	KillerRed	HyPer Case12
Invitrogen (www.invitrogen.com)	<u>BFP</u> <u>CFP</u>	<u>EmGFP</u> <u>Cycle 3 GFP</u>	<u>YFP</u>				Cameleon
Lux Biotechnology (www.luxbiotech.com)		RmGFP PtGFP RrGFP					
MBL International (www.mblintl.com)	Midoriishi-Cyan	<u>Azami Green</u>		<u>Kusabira-Orange</u> <u>Keima-Red</u>	<u>Dronpa-Green</u> Kaede KikGR		
NanoLight Technology (www.nanolight.com)		RmGFP PtGFP RrGFP					
Perkin Elmer www.perkinelmer.com		<u>GFP²</u>					
Promega (www.promega.com)		Monster Green					
Qbiogene (www.qbiogene.com)	<u>SuperGloBFP</u>	<u>SuperGloGFP</u>					
Stratagene (www.stratagene.com)		hrGFP					

**Commercially
available fluorescent
proteins**

Флуоресцентные белки:

- Генетически кодируемые метки.
- Детальная информация о локализации и динамике белков в живой клетке.
- Мечение клеточных популяций на уровне целого организма.
- Специфические сенсоры на вторичные мессенджеры и ферментативные активности

- Фундаментальные исследования.
- Высокопроизводительный скрининг лекарственных препаратов на стабильных линиях клеток.
- Анализ лекарственных препаратов на модельных животных

ИБХ, лаб. С.А. Лукьянова

К. Лукьянов

Д. Чудаков

В. Белоусов

Д. Щербо

К. Марквичева

Н. Сафронова

ИБХ, лаб. А.Г. Зарайского

ИБХ, лаб. В.З. Плетнева

ЗАО Евроген

Е. Мерзляк

Т. Чепурных

**Florida State University
Tallahassee FL, USA**

M. Davidson

**Albert Einstein College of
Medicine, Bronx NY, USA**

В. Верхуша

Работа поддержана: Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология», EU FP6 Integrated Project “Molecular Imaging”, ННМІ grant 55005618, ЗАО Евроген.