

УДК 577.1:577.336

Синтетические флуорофоры для визуализации биомолекул в живых системах

В. И. Мартынов*, А. А. Пахомов, Н. В. Попова, И. Е. Деев, А. Г. Петренко

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: vimart@list.ru

Поступила в редакцию 12.12.2015

Принята к печати 26.04.2016

РЕФЕРАТ В последнее десятилетие прогресс в методах визуализации живых систем с помощью флуоресцентных маркеров был в основном связан с обнаружением различных вариантов цветных флуоресцентных белков. Применение этих белков имеет свои ограничения. В ряде случаев предпочтительно использовать флуоресцентные зонды на основе небольших органических молекул. В обзоре рассмотрен арсенал синтетических низкомолекулярных флуорофоров, который перекрывает практически весь спектр от УФ до видимой и ближней инфракрасной области. Приведены данные по сайт-направленным реакциям включения синтетических флуорофоров в целевые клеточные белки. Обсуждается применение низкомолекулярных флуорофоров для решения различных биологических задач, в частности, для определения локальных концентраций ионов и pH в живых системах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА измерение концентрации ионов, измерение локального pH, сайт-направленная реакция, флуорофор, флуоресцентная микроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦКБ – целевой клеточный белок; ФБ – флуоресцентный белок; АГТ – O⁶-алкилгуанинтрансфераза; еДГФР – дигидрофолатредуктаза; ТМП – триметоприм; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; NBD – 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол; дансилхлорид – (5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонилхлорид); EDANS – 5-((2-аминоэтил)амино)нафталин-1-сульфоновая кислота; FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии; SRh 101 – сульфородамин 101; BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; λ_{ex} – максимум возбуждения; λ_{em} – максимум эмиссии; ϵ – коэффициент экстинкции; Φ – квантовый выход.

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные маркеры, основанные на флуоресценции, давно используются как инструмент для визуализации биомолекул *in vitro*. Флуоресцентное мечение с помощью синтетического флуорофора было впервые описано в 1942 году, когда с использованием флуоресцеинизотиоцианата (FITC) получили меченые антитела против пневмококков [1]. Вплоть до 1980-х годов флуоресцентное мечение применялось в основном для анализа фиксированных биологических образцов. За последнее двадцатилетие разработан ряд методов, позволяющих включать флуоресцентные метки в живые объекты [2], в частности, в виде генетически кодируемых химер целевых клеточных белков (ЦКБ) с GFP-подобными флуоресцентными белками (ФБ) [3–5]. Однако в ряде случаев для анализа живых систем необходимы низкомолекулярные флуоресцентные зонды [6, 7] и на-

правленная модификация ими ЦКБ [8, 9]. Основное преимущество этих флуорофоров – их небольшой размер и доступность соединений с заданными химическими и фотофизическими свойствами.

Возможность применения каждого конкретного флуорофора определяется его химическими (реакционная способность, растворимость, липофильность, pK_a , стабильность) и фотофизическими (максимум возбуждения (λ_{ex}), максимум эмиссии (λ_{em}), коэффициент экстинкции (ϵ), квантовый выход (Φ), время жизни в возбужденном состоянии, фотостабильность) свойствами. Наиболее универсальный параметр, определяющий чувствительность метода для различных флуорофоров, – произведение коэффициента экстинкции и квантового выхода ($\epsilon \times \Phi$). Эта величина прямо пропорциональна яркости и учитывает количество поглощенного света и эффективность эмиссии флуорофора.

СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ

Флуорофоры с эмиссией флуоресценции в УФ- и синей области спектра

Флуорофоры с эмиссией в УФ-области спектра не так часто применяются для мечения объектов живых систем, поскольку УФ-свет для них токсичен. Кроме того, флуоресцентные сигналы этих меток сложно отличить от автофлуоресценции самой клетки. Классический пример флуорофоров с эмиссией в ближней УФ-области спектра – производные пирена (рис. 1), которые характеризуются $\lambda_{ex} = 340$ нм, $\lambda_{em} = 376$ нм, высокими значениями квантового выхода $\Phi = 0.75$, химической устойчивостью и большими временами жизни флуоресценции, что позволяет молекулам флуорофора образовывать эксимеры с батохромным сдвигом в спектрах эмиссии. Эти свойства пиренов используются для мониторинга конформационных изменений в структуре белков [10], а также для определения концентрации ионов некоторых металлов [11, 12]. Производные пирена, такие, как 8-гидрокси-1,3,6-пирентрисульфонат (пиранин, рис. 1), применяют в качестве рН-индикаторов, а также сенсоров ионов Cu^{+} [13]. Производное 8-О-карбоксиметилпиранин имеет $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 401.5/428.5 нм и $\epsilon = 2.5 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (405 нм). Этот флуорофор может использоваться в качестве яркой, фотостабильной метки, излучающей в фиолетовой области спектра, для многоцветного мечения клеточных объектов [14].

Флуоресцентные маркеры, основанные на производных кумарина, широко используются в качестве хемосенсоров и в мечении биомолекул [15, 16]. Введение заместителя в 7-й позиции кумарина позволяет получить флуорофоры с эмиссией в видимой области спектра, например, 7-гидрокси-4-метилкумарин (рис. 2). Этот флуорофор имеет $\lambda_{ex} = 360$ нм, $\lambda_{em} = 450$ нм, $\epsilon = 1.7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ и $\Phi = 0.63$. Производные 7-гидроксикумарина служат внутриклеточным флуоресцентным сенсором фосфатазной активности, а его смешанные карбонаты используют для определения липазной и эстеразной активностей [17, 18]. Родственное соединение

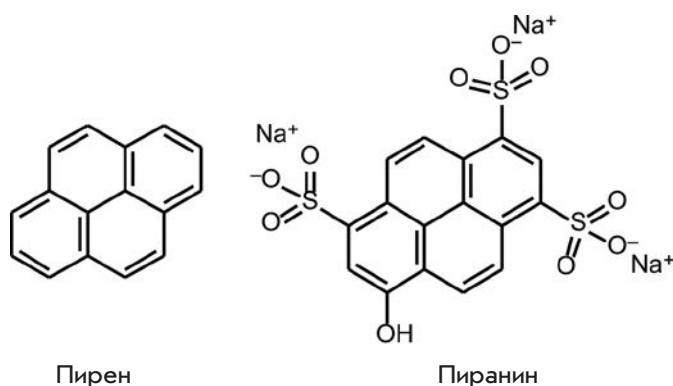


Рис. 1. Флуорофоры на основе конденсированных ароматических соединений с эмиссией в УФ- и синей области спектра



7-гидрокси-4-метилкумарин 7-амино-4-метилкумарин

Рис. 2. Флуорофоры на основе производных кумарина

7-амино-4-метилкумарин (рис. 2) проявляет такие же спектральные свойства, как и гидрокси-производное при значениях рН выше 5.

Производное индола 4',6'-диамидино-2-фенилиндол (DAPI; рис. 3) впервые синтезировали в 1971 году в лаборатории Отто Данна в поисках лекарств против трипаносомоза. Это соединение оказалось неудачным в качестве лекарственного средства, но обладало способностью связываться с ДНК [19]. Поскольку связывание DAPI с ДНК сопровождается значительным увеличением флуоресценции в синей области спектра (в связанном с ДНК виде $\lambda_{em} = 461$ нм), этот маркер широко используется для мечения ДНК в живой клетке [20]. Недавно показали, что при освещении УФ-светом либо лазером с длиной волны 405 нм DAPI претерпевает фотопревращение [21, 22]. При возбуждении фотоконвертированной формы DAPI с помощью аргонового лазера при 458 нм мак-

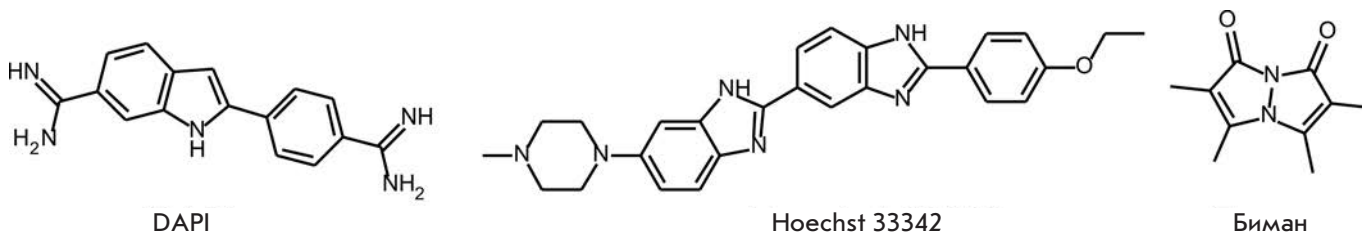


Рис. 3. Синтетические флуорофоры с эмиссией в сине-циановой области спектра

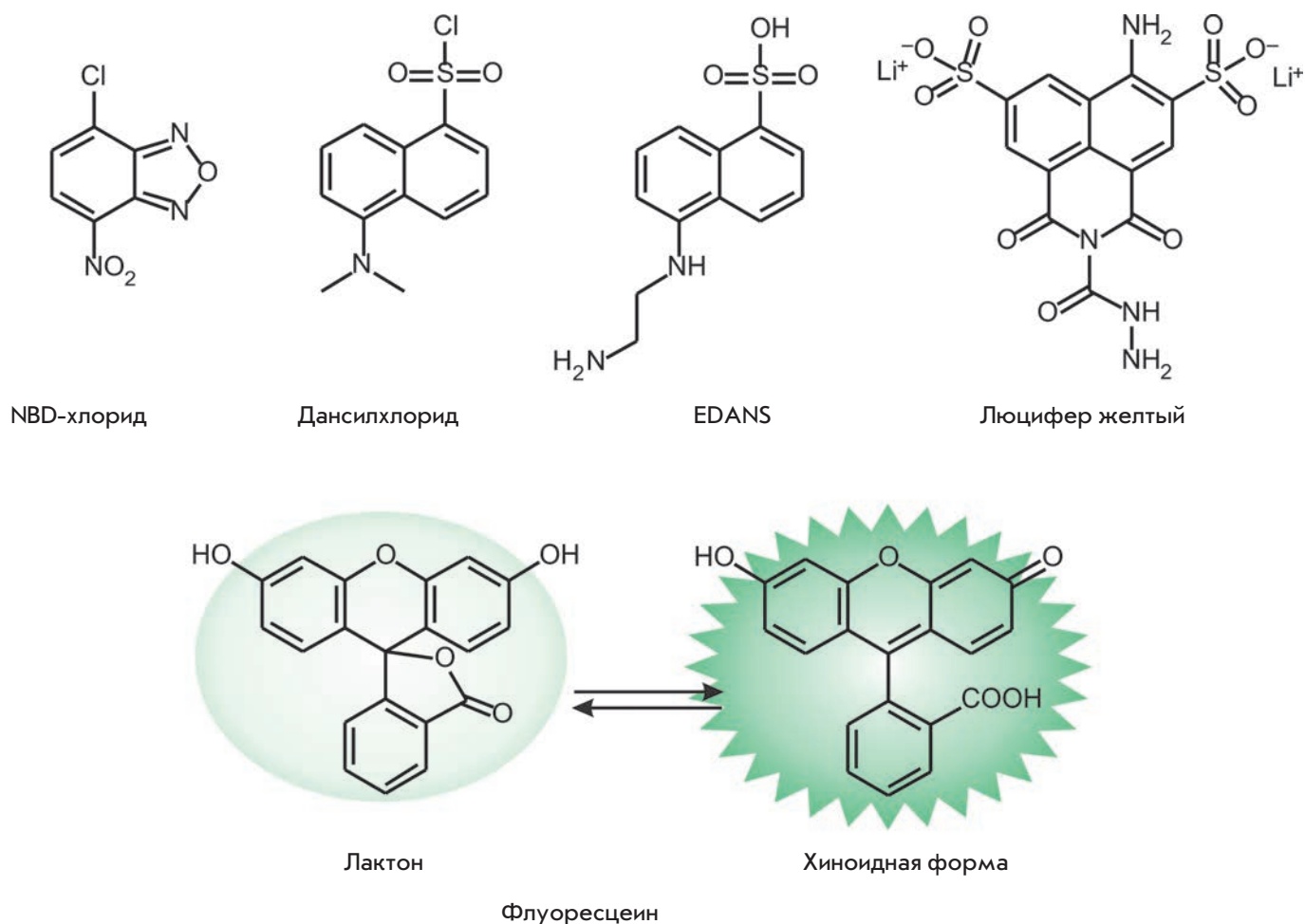


Рис. 4. Флуорофоры с эмиссией в зелено-желтой области спектра

симум эмиссии флуорофора сдвигается в зеленую область спектра (505 нм). Кроме того, фотоконвертированная зеленая форма флуорофора обесцвечивается при возбуждении синим цветом [22]. Это свойство использовано в локализационной микроскопии единичных молекул (метод SMLM субдифракционной микроскопии) ДНК, что позволило реконструировать точную карту распределения этих молекул в ядрах клеток и в хромосомах в процессе митоза [20].

Флуоресцирующие производные дибензимидазола были впервые получены и применены химической компанией Hoechst AG для флуоресцентной микроскопии. Соединение Hoechst 33342 (рис. 3) флуоресцирует в цианово-синей области спектра и имеет максимум эмиссии при 461 нм. Оно связывается с ДНК, хорошо проникает через клеточную мембрану и пригодно для экспериментов в живой клетке [20].

Биман, 1,5-диазабицикло[3.3.0]окта-3,6-диен-2,8-дион (рис. 3), имеет $\lambda_{ex} = 390$ нм, $\lambda_{em} = 482$ нм и $\Phi = 0.3$. Флуоресценция бимана тушится в присут-

ствии триптофана и тирозина, причем степень тушения зависит от расстояния между этими остатками ($\leq 10-15$ нм). Это свойство флуорофора использовали для определения конформационных изменений ферментов в реальном времени при связывании субстрата [23, 24].

Флуорофоры с эмиссией в зелено-желтой области спектра

NBD (4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол) и его производные обладают эмиссией в зеленой области спектра. NBD-хлорид (рис. 4) реагирует по амини- и тиоловым группам. Соединения NBD-хлорида с первичными аминами обладают максимумами возбуждения и эмиссии $\lambda_{ex} = 465$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм ($\epsilon = 2.2 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ и $\Phi = 0.3$). Другое производное NBD, селективно взаимодействующее с цистеином, успешно использовали в качестве флуоресцентного сенсора Cys в клетках HeLa [25]. Чувствительность производных NBD к микроокружению оказалась

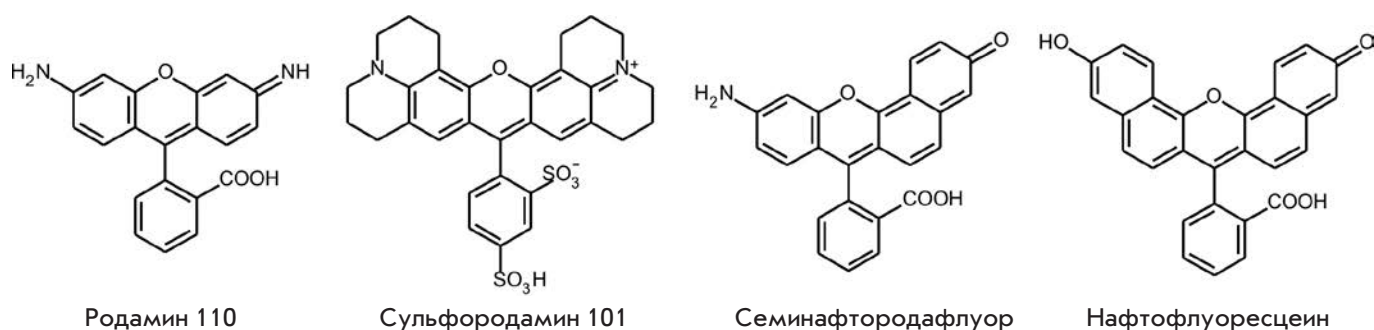


Рис. 5. Синтетические флуорофоры на основе производных ксантена

важной при получении липидных маркеров [26, 27] или новых субстратов киназ [28]. На основе NBD созданы сенсоры Cu^{2+} и S^{2-} , позволяющие определять концентрацию этих ионов в живой клетке [29].

NBD-SCN использовали для детекции цистеина и гомоцистеина. Замена тиоцианатной группы на цистеин или гомоцистеин приводит к 470- и 745-кратному увеличению интенсивности флуоресценции NBD при 550 нм соответственно [30]. Кроме того, NBD-SCN обладает достаточно высокой мембранопроницаемостью и может применяться для визуализации концентрационных изменений цистеина и гомоцистеина в живой клетке [30].

В число наиболее часто используемых флуорофоров с эмиссией в зеленой спектральной области входят производные нафталина. Эта группа меток включает в себя реагирующий по аминогруппам дансилхлорид и EDANS (рис. 4). Производные этого соединения имеют $\lambda_{\text{ex}} = 336$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм, $\epsilon = 6.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.27$. Флуоресцентные маркеры на основе EDANS в настоящее время применяют в экспериментах *in vivo* [31]. Еще один флуорофор – 4-амино-3,6-дисульфонилнафталимид, характеризуется эмиссией флуоресценции в желтой области спектра. Карбогидразид этого соединения под названием Люцифер желтый ($\lambda_{\text{ex}} = 428$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 534$ нм, рис. 4) применяется в качестве полярной метки и в экспериментах при двухфотонном возбуждении [32].

Флуорофор флуоресцеин (рис. 4) обладает необычными свойствами: в водных растворах он может существовать в семи прототропных формах, включая наиболее биологически значимые моноанионную и дианионную, которые взаимопревращаются с $pK_a \sim 6.4$ [33]. Дианион представляет собой форму с наибольшей флуоресценцией ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 514$ нм, $\epsilon = 9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.95$). pH-чувствительность производных флуоресцеина была использована для получения флуоресцентных pH-индикаторов [34, 35]. На основе этих производных

получены сенсоры ионов различных металлов, например, Fluo-3 для измерения концентрации ионов кальция в живых клетках [36, 37]. Флуоресцеин существует в двух равновесных формах – в виде лактона и в хиноидной форме (рис. 4). Ацилирование или алкилирование фенольных групп приводит к фиксации молекулы в виде нефлуоресцентного лактона, что может быть использовано для получения флуорогенных субстратов ряда ферментов [38, 39]. Флуорофоры на основе флуоресцеина обладают и существенными недостатками. У них высокая скорость фотообесцвечивания, их широкая полоса эмиссии ограничивает применение этих флуорофоров в многоцветном мечении клеточных объектов, также они обладают выраженной тенденцией к самогашению при высоких плотностях включения метки в ЦКБ.

Еще одна группа синтетических флуорофоров с эмиссией в зеленой области основана на производных родамина. Введение различных заместителей в структуру родамина позволяет настраивать его спектральные характеристики. Наиболее характерный пример – родамин 110 (рис. 5) ($\lambda_{\text{ex}} = 497$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм, $\epsilon = 7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.88$ [40]). Введение заместителей в виде четырехчленных азетиридиновых колец по двум атомам азота значительно увеличивает квантовый выход и яркость флуорофора [41], в то время как введение четырех метильных групп по атомам N, N' приводит к смещению максимумов возбуждения и эмиссии в более длинноволновую область ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 548/572 нм), но снижает квантовый выход флуорофора ($\Phi = 0.41$) в водных растворах [42]. Родамины, содержащие вместо аминогрупп жесткие циклические системы, имеют более высокие квантовые выходы и спектры, сдвинутые в более длинноволновую область. В частности, сульфородамин 101 (Texas Red) (рис. 5) и его производные – одни из наиболее часто применяемых в точной биологии [43, 44], используются также в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической

терапии [45]. Родаминовые метки вместе с флуоресцеином входят в состав FRET-пар [46, 47]. При замещении обеих аминогрупп родамина можно получить его нефлуоресцирующее производное. Это свойство используется в синтезе фотоактивируемых аналогов родамина [48] и для получения флуорогенных субстратов при изучении механизмов ферментативного катализа. Производные родамина 110 использовали в качестве субстратов для определения активности различных ферментов [49]. Гибридные флуорофоры, состоящие из квантовой точки и родамина, соединенных полипептидом, расщепляемым каспазой-1, использовали в тестах на апоптоз [50]. Производные родамина применяют также при конструировании индикаторов pH и ионов некоторых металлов [51, 52].

Соединения под общим торговым названием Alexa Fluor объединяют большую группу гидрофильных отрицательно заряженных меток, представляющих собой сульфированные производные флуорофоров различных типов, таких, как флуоресцеин, кумарин, цианин или родамин. Хорошо известный Alexa Fluor 488 является производным родамина и обладает свойствами, во многом схожими с FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 493$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 519$ нм). Однако в отличие от FITC, Alexa Fluor 488 более фотостабилен, обладает большей яркостью и меньшей pH-чувствительностью. В сравнительных экспериментах по специфическому мечению модифицированных гистонов оптимальные результаты показали Fab-фрагменты, меченные Alexa Fluor 488 [53]. Alexa Fluor 488 может служить флуорофором-донором для изучения структуры различных клеточных рецепторов с использованием эффекта FRET [54].

Флуорофоры с эмиссией в красной, дальнекрасной и ближней инфракрасной области спектра

Флуорофоры с эмиссией флуоресценции в дальнекрасной и ближней инфракрасной области спектра представляют наибольший интерес, поскольку свет, возбуждающий флуоресценцию этих флуорофоров, не токсичен для живых систем. Кроме того, инфракрасные лучи способны проникать в живые ткани на существенно большие расстояния, чем более коротковолновые. Также на визуализацию биомолекул в живых системах с помощью дальнекрасных и инфракрасных флуорофоров фоновая автофлуоресценция практически не влияет. К сожалению, большинство известных синтетических флуорофоров этой группы страдают существенным недостатком – низким квантовым выходом флуоресценции в водных растворах. Среди флуорофоров этой группы особого внимания заслуживают производные флуоресцеина и родамина, в которых ксантеновые структуры модифицированы за счет добавления

ароматических колец. Эти заместители вызывают значительный батохромный сдвиг в спектрах флуоресценции. Одно из таких производных – нафтофлуоресцеин (рис. 5) – в щелочных условиях флуоресцирует в значительно более длинноволновой спектральной области ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 595/660$ нм). Однако все преимущества этой дальнекрасной флуоресцентной метки нивелируются более низким коэффициентом экстинкции ($\epsilon = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и квантовым выходом ($\Phi = 0.14$). Производные этого ряда успешно использовали в качестве различных сенсоров в живых клетках [55, 56].

Для получения более длинноволновых производных родамина синтезированы его аналоги, в которых атом кислорода между двумя ароматическими циклами заменен на атомы кремния (Si-родамин), германия (Ge-родамин) или олова (Sn-родамин) [57]. Полученные производные сохраняют важные характеристики самого родамина, такие, как высокий квантовый выход в водных растворах, устойчивость к фотообесцвечиванию и хорошую растворимость в воде. При введении дополнительных ароматических заместителей в Si-родамин получены три новых соединения SiR680, SiR700 и SiR720 с флуоресценцией в ближнем инфракрасном диапазоне (670–740 нм). Показано, что SiR680 и SiR700 обладают достаточно высокими квантовыми выходами в водных растворах ($\Phi = 0.35$ и 0.12 соответственно) [58]. Активированные сукцинимидные производные SiR700 использовали *in vivo* для визуализации развития опухолей [58, 59].

Замечательными фотофизическими свойствами обладают ксантеновые метки, структура которых расширена одним ароматическим кольцом. В отличие от симметричных флуоресцеинов и родаминов, резонансные формы этих меток неэквивалентны друг другу и поэтому различаются спектральными свойствами. Таким образом, асимметрия этих меток может использоваться для создания ратиометрических флуоресцентных индикаторов. По соотношению (ratio) интенсивностей флуоресценции различных форм таких индикаторов можно точно определять внутриклеточную концентрацию различных ионов. Флуорофоры на основе семинафтофлуоресцеинового ядра служат pH-сенсорами и индикаторами других ионов. Семинафтоксантены на основе родолового ядра также используются как pH-индикаторы. Один из примеров – ратиометрический pH-сенсор, семинафтородафлуор (рис. 5) [60, 61]. Это соединение имеет $\lambda_{\text{ex}} = 573$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 631$ нм, $\epsilon = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.092$ при повышенных значениях pH.

Резорурфин (рис. 6) используется, в частности, для детекции эндогенной фосфатазной активности в живых клетках в реальном времени [62]. При pH более 7.5 резорурфин существует в виде аниона

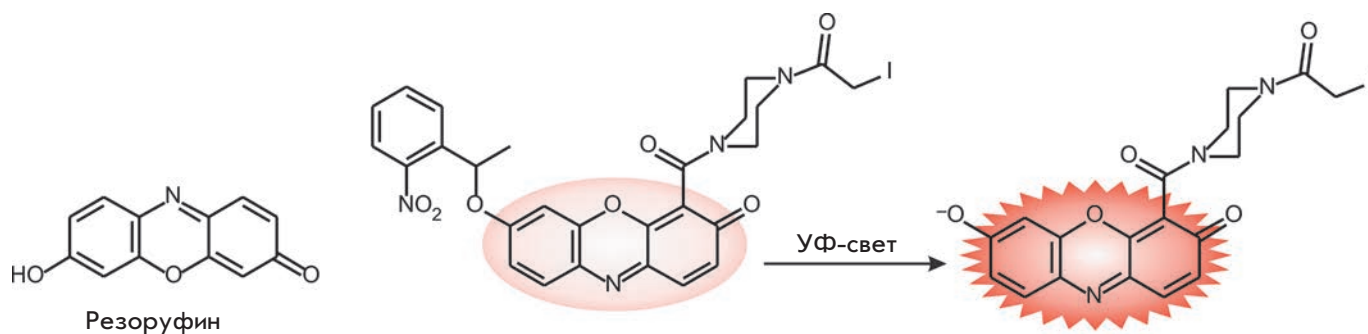


Рис. 6. Резорурфин и его фотоактивируемое *o*-нитробензильное производное

с эмиссией флуоресценции в красной области спектра ($\lambda_{\text{ex}} = 572$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 585$ нм, $\epsilon = 5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.74$). При понижении pH интенсивность флуоресценции этой метки значительно снижается.

Некоторые синтетические флуорофоры могут быть модифицированы таким образом, что их флуоресценция «включается» только после активации светом определенной длины волны. Эти фотоактивируемые, или скрытые, флуорофоры используются для визуализации процессов в динамике, где требуется активация небольших популяций флуоресцентных маркеров, с разрешением во времени и пространстве. Такие флуорогенные маркеры получают, в частности, с помощью реакций флуорофора с *o*-нитробензилбромидом. Молекула может быть активирована при облучении светом 365 нм, при этом *o*-нитробензильная группа отщепляется с высвобождением активного флуорофора (рис. 6). Используя метод фотоактивации метки, конъюгированной с тубулином, впервые было показано активное передвижение микротрубочек в процессе митоза и изучена динамика актиновых микрофиламентов [63]. Получен ряд фотоактивируемых аналогов кумарина, способных проникать в клетку [64, 65]. После проникновения внутрь клетки небольшая популяция молекул кумарина была активирована и использовалась как флуоресцентный репортер для наблюдения за миграцией молекул через щелевые контакты [65].

Соединения на основе бордифтордипиррометена, широко известные под названием BODIPY, служат основой для создания флуоресцентных маркеров [66, 67], в том числе для мечения биомолекул в живых клетках [68]. Они характеризуются высокой фото-стабильностью и квантовым выходом, нейтральным зарядом и узкими полосами поглощения и эмиссии. Метки этого ряда можно настроить на нужную длину волны с помощью определенных заместителей [69]. Однако широкое использование этих замечательных флуорофоров ограничено их плохой растворимостью

в воде. Некоторые флуорофоры ряда BODIPY (рис. 7) обладают спектральными свойствами, сходными с флуоресцеином, например BODIPY FL ($\lambda_{\text{ex}} = 505$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 511$ нм, $\epsilon = 9.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.94$). Введение дополнительных ароматических заместителей в молекулу BODIPY FL (рис. 7) сдвигает эмиссию в красную и дальнекрасную область (BODIPY TR, BODIPY 630/650 и BODIPY 650/665).

Большая часть меток, полученных на основе BODIPY, относятся к стабильным флуоресцентным маркерам. Помимо этого, получены флуорофоры с оптическими свойствами, изменяемыми при фотоактивации или присоединении к биологически важным молекулам [70, 71]. Нейтрально заряженный BODIPY способен проникать через клеточную мембрану. BODIPY и некоторые его производные обладают значительной липофильностью и, как следствие, накапливаются в основном в мембранах субклеточных структур [72]. Поэтому для визуализации биомолекул, локализованных в цитозоле, необходимо иметь модифицированные производные BODIPY, содержащие гидрофильные заместители.

BODIPY и его производные имеют небольшой сдвиг Стокса, что является причиной самотушения этих маркеров при большой плотности мечения биомолекулы. Это свойство используется для создания флуорогенных субстратов протеиназ, интенсивность флуоресценции которых возрастает при протеолизе белков, меченных этой меткой с большой плотностью [73].

Карбоцианиновые метки (цианины) представляют собой соединения с полиметиновыми цепями различной длины с нечетным числом атомов углерода, расположенных между двумя атомами азота ($\text{R}_2\text{N}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{N}^+\text{R}_2$) [70] (рис. 8). Структура этих соединений очень похожа на структуру хромофора зрительного пигмента родопсина [74]. Это свойство недавно использовали для получения конструкции, кодирующей специфический белок, связывающий

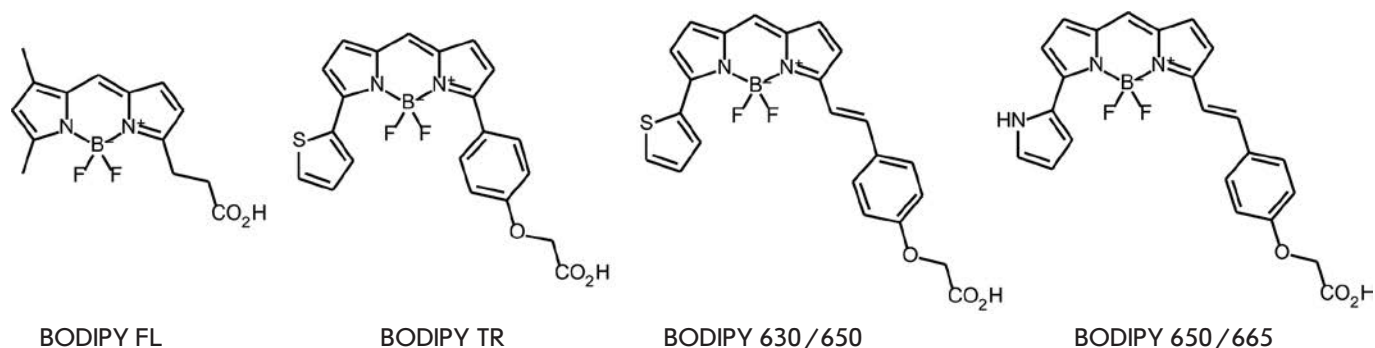


Рис. 7. Флуорофоры на основе производных BODIPY

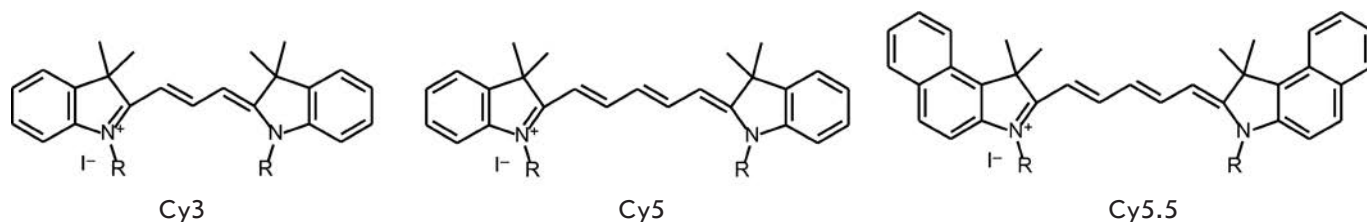


Рис. 8. Производные цианиновых красителей Cy3, Cy5 и Cy5.5

ретиновую кислоту (CRABPII), способный образовывать комплекс с флуорогенным производным цианиновой метки. Этот комплекс, в отличие от исходного профлуорофора, обладает яркой флуоресценцией в дальнекрасной области спектра и высоким квантовым выходом [75]. Гемидицианиновыми называют метки, у которых только один концевой атом азота включен в ароматический гетероцикл. Гемидицианины используют в качестве ратиометрических флуоресцентных сенсоров pH в экспериментах *in vivo* [76]. Цианиновые метки, у которых несущие заряд концевые атомы непосредственно связаны с метиновой цепью, называются стрептоцианиновыми. Стрептоцианиновые метки использовали в качестве индикатора активности супероксиддисмутазы [77].

Карбоцианиновым соединениям присвоены названия, соответствующие количеству атомов углерода между дигидроиндольными составляющими молекулы. Cy3 (рис. 8) по спектральным характеристикам сопоставимо с тетраметилродамином ($\lambda_{\text{ex}} = 554$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 568$ нм). У Cy5 спектры сдвинуты в длинноволновую область ($\lambda_{\text{ex}} = 652$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 672$ нм), а у более протяженных конструкций, таких, как Cy7, наблюдается эмиссия флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне ($\lambda_{\text{ex}} = 755$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 788$ нм). Цианины имеют высокие значения коэффициента экстинкции (до $300\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и хорошо растворимы в воде. Поглощение и эмиссию можно сдвигать в более длинноволновую область либо за счет увеличения

протяженности полиметиновой цепи, либо за счет ароматической части концевых гетероциклических фрагментов. Удлинение полиметиновой цепи на два атома углерода сдвигает максимум поглощения на ~ 100 нм, в то время как добавление бензольного кольца к концевому индольному остатку приводит к сдвигу поглощения примерно на 30 нм [78]. Такие структурные модификации, как в последнем случае, обозначают индексом «.5», например, Cy5.5.

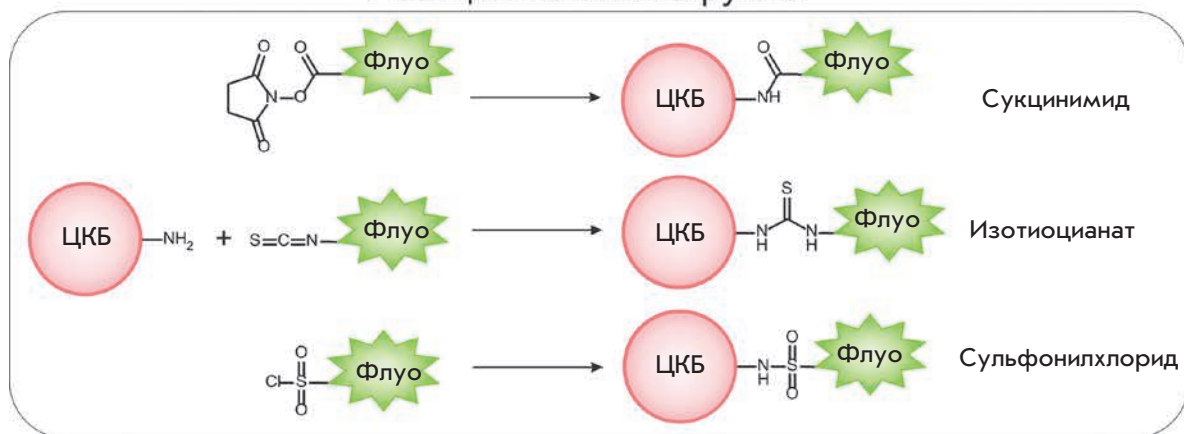
n-Нитробензоильное производное гептацианинового флуорофора с эмиссией в ближнем инфракрасном диапазоне использовали как ратиометрический сенсор цистеина в митохондриях при окислительном стрессе. Показана возможность применения этого флуорофора в живых мышцах в качестве сенсора уровня Cys [79] и глутатиона в живых клетках [80].

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЕ РЕАКЦИИ ВКЛЮЧЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ В ЦКБ

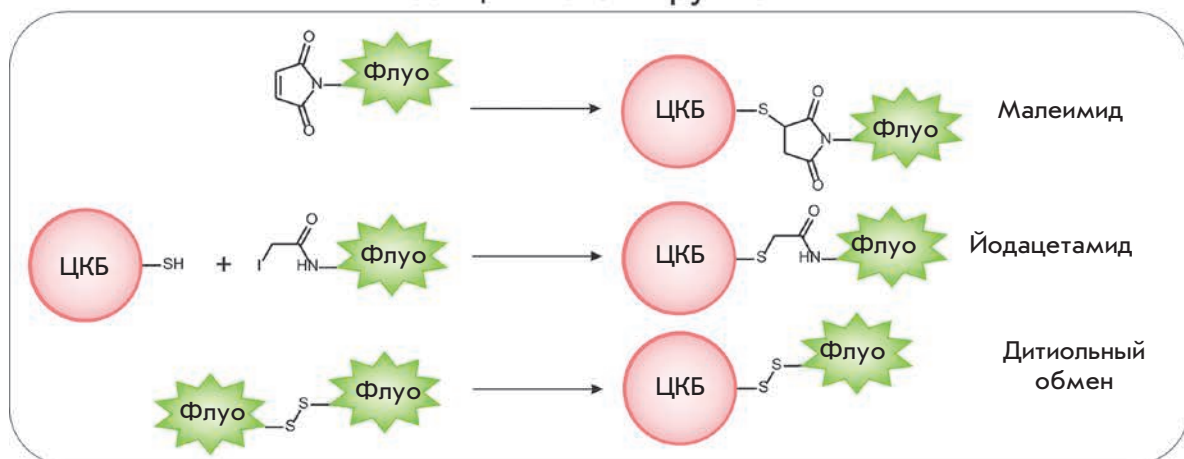
Реакции ковалентного связывания

В настоящее время для связывания синтетических флуорофоров с функциональными группами биомолекул используют различные химические реакции [81]. Наиболее часто применяется сукцинимидный эфир (рис. 9), который после реакции с первичными и вторичными аминогруппами образует стабильную амидную связь, также используется изотиоцианат. Флуорофоры, модифицированные йодацетамидом,

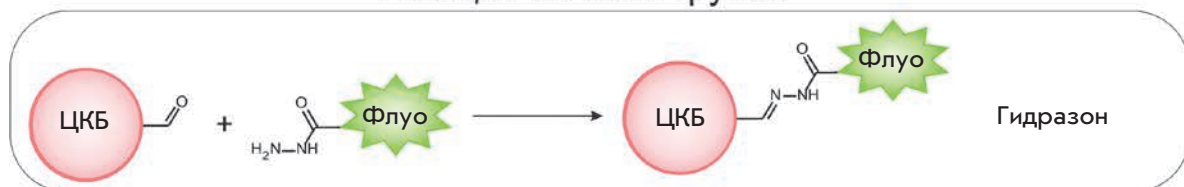
Реакции по аминогруппе



Реакции по SH-группе



Реакция по оксо-группе



Реакции с азидом

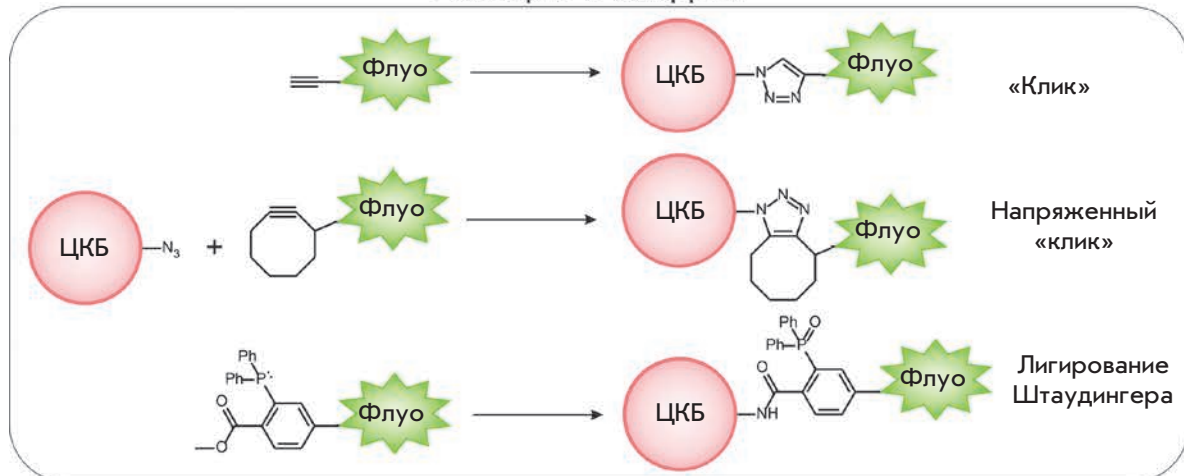


Рис. 9. Реакции с образованием ковалентной связи с биомолекулами

малеимидом или дитиолами, применяют для мечения по сульфгидрильным группам.

Особое внимание привлекает метод биоортогонального конъюгирования [82] и так называемая «клик»-химия [83–85]. В этом случае химические группы, вступающие в реакцию конъюгирования с биомолекулой, не реагируют с другими функциональными группами. Включение этих химических групп в молекулу происходит либо за счет метаболического аппарата клетки [86, 87], либо за счет ферментативной активности ЦКБ [88, 89]. Всем требованиям биоортогональной химической группы удовлетворяет азидная группировка, так как ей свойственна высокая реакционная способность при селективности реакций, устойчивости в водной среде и низкой реакционной способности по отношению к функциональным группам биологических молекул. Введение небольшой азидной группы приводит лишь к незначительным структурным пертурбациям биомолекулы. Включенная в клеточный объект биоортогональная метка может ковалентно связываться с флуорофором за счет высокоселективных химических «клик»-реакций, классическим примером которых служит циклоприсоединение азидов к алкинам (рис. 9), катализируемое одновалентной медью [90, 91]. Однако катализируемые медью реакции могут применяться в основном в опытах *in vitro*, поскольку в живых системах катализатор должен доставляться к месту реакции. Кроме того, медь в концентрациях, используемых для мечения, токсична. Бертоцци и соавт. [92] разработали метод модификации, в котором алкин включен в состав напряженного восьмичленного кольца (рис. 9). В этой системе алкин проявляет повышенную реакционную способность и не требует катализатора. Позднее получили дифторциклооктины [93] с гораздо более высокой реакционной способностью, позволяющей применять «клик»-химию для меченных азидом биомолекул в живых организмах [94]. Еще один пример биоортогональной реакции, используемой для мечения *in vivo*, – реакция лигирования по Штаудингеру (рис. 9) [95, 96].

Реакции с образованием сульфидов и металл-хелатных комплексов флуорофора с ЦКБ

Один из перспективных методов конъюгации синтетических флуорофоров с ЦКБ – введение с помощью генетических манипуляций небольшой последовательности аминокислот в целевой белок. Эта последовательность должна иметь достаточно высокое сродство к выбранному флуоресцентному маркеру. Например, последовательность Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys, благодаря вставке -Pro-Gly-, образует структуру, подобную шпильке [97]. Четыре

остатка цистеина, таким образом, образуют кластер, имеющий высокое сродство к органическим соединениям мышьяка [98]. В частности, дважды замещенное мышьяком производное флуоресцеина F1AsH ($\lambda_{\text{ex}} = 508$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 528$ нм) образует с такой тетрацистеиновой последовательностью комплекс с константой диссоциации в пикомольном интервале (рис. 10А) [8, 99]. Кроме того, F1AsH обладает ярко-зеленой флуоресценцией только в связанном с тетрацистеиновой последовательностью виде, что существенно снижает фоновую флуоресценцию. Кроме F1AsH, существует ReAsH ($\lambda_{\text{ex}} = 593$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 608$ нм), маркер на основе резорурфина (рис. 10А), который обладает флуоресценцией в красной области спектра [8, 100].

Следует отметить, что F1AsH и ReAsH проникают через мембрану, что облегчает их введение в клетку. Их недостаток – побочные реакции с монотиолами, однако неспецифическое связывание может быть подавлено избытком дитиотреитола. Мечение с помощью F1AsH и ReAsH затруднено также в окислительных условиях вследствие окислительных реакций последовательности тетра-Cys.

В еще одном методе включения флуорофора в ЦКБ используются координационные соединения с металлами [101]. Комплексообразователем здесь служит полигистидиновая последовательность $(\text{His})_n$, где $n \geq 6$, которая образует комплексы с нитрилтриацетатом никеля (Ni^{2+} -НТА) (рис. 10Б). Для специфического мечения белков с поли-His-последовательностью синтезированы производные цианиновых меток с ковалентно присоединенными одним или двумя Ni^{2+} -НТА. Двухзамещенные производные Су3 и Су5 показали более высокую аффинность по сравнению с однозамещенными и использовались в экспериментах FRET для определения расстояний при образовании комплекса ДНК с поли-His-меченым белком [102].

Ключевой недостаток системы поли-His/ Ni^{2+} -НТА для *in vivo* экспериментов – низкая аффинность связывания (значения K_d в пределах 1–20 мкМ), что негативно сказывается на стабильном включении метки и, в конечном итоге, на визуализации ЦКБ. Пиелер и соавт. синтезировали производные флуоресцеина с ковалентно связанными 1–4 остатками НТА и охарактеризовали их взаимодействие с поли-His-последовательностью (His6 и His10). Стабильность связывания мультивалентных хелатирующих групп возрастала более чем на 4 порядка и достигала субнанолярного уровня в сравнении с моно-НТА [103].

Еще одно серьезное препятствие для применения Ni^{2+} -НТА-комплекса *in vivo* – плохое прохождение через клеточную мембрану. Для доставки Ni^{2+} -НТА внутрь клетки Тампе и соавт. использовали мембранотранслоцирующий ТАТ-пептид

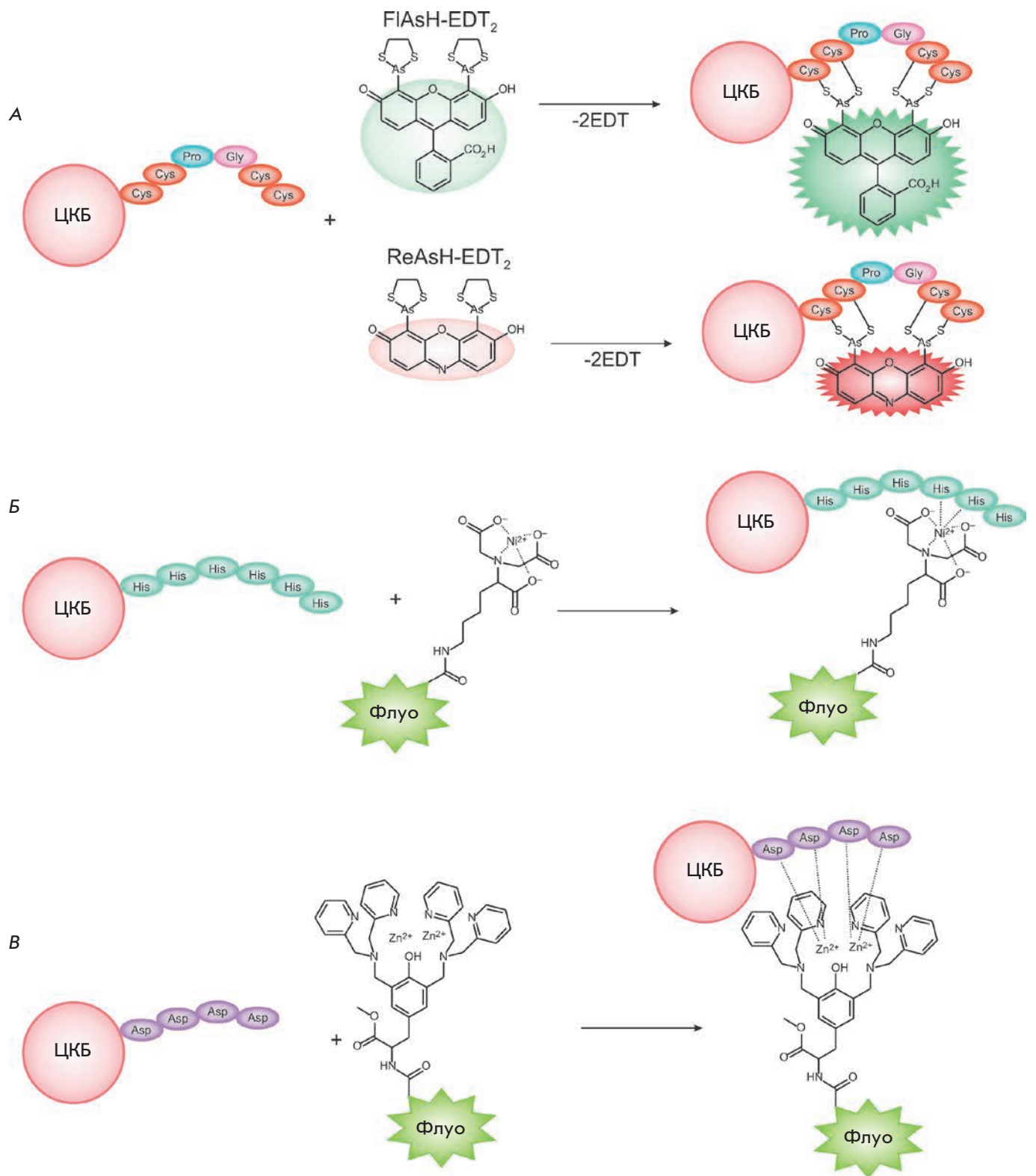


Рис. 10. Реакции с образованием сульфидов и металл-хелатных комплексов флуорофора с целевым клеточным белком (ЦКБ), содержащим тетра-Cys (А), гекса-His (Б) и тетра-Asp (В) аминокислотные последовательности

(49RKKRRQRRR57) [104]. Полученный комплекс trisNTA/His6-TAT49–57 использовали в качестве переносчика флуоресцентно меченного NTA в клетку – в цитозоль и ядро, далее trisNTA преимущественно связывался уже с His10-меченым внутриклеточным белком. При этом транслоцирующий His6-TAT49–57 пептид высвобождался, поскольку имел большую аффинность связывания ($K_d = 0.1$ нМ) с His10 [103].

Другой подход к получению мембранопроницаемых конструкций применили Сан и соавт. [105]. Они синтезировали соединение, в котором NTA ковалентно связан с флуорофором и арилазидом (Ni^{2+} -NTA-AC). Ni^{2+} -NTA-AC прекрасно проходил через клеточную мембрану и связывался с внутриклеточными белками, несущими поли-His-последовательность. После активации светом арилазид ковалентно связывался с ЦКБ, что приводило к 13-кратному увеличению флуоресценции и образованию устойчивой связи с флуоресцентной меткой.

Помимо тетрацистеиновой и поли-His-последовательностей для мечения ЦКБ использовали также поли-Asp ((Asp₄)_n, где $n = 1-3$). Хамачи и соавт. синтезировали многоядерные комплексы Zn^{2+} , меченные флуоресцеином (на рис. 10B показан двухъядерный комплекс Zn^{2+}) [106]. Увеличение аффинности в этом случае наблюдалось при большей длине цепи поли-Asp. С помощью тетраядерных комплексов Zn^{2+} проведено флуоресцентное мечение мускаринового ацетилхолинового рецептора, при котором сохранялась его исходная активность.

Сайт-направленное мечение с помощью ферментативных реакций

Еще один метод включения флуорофора в ЦКБ основан на ферментативных реакциях. В этих технологиях используются так называемые методы SNAP-tag [107], CLIP-tag [108], HALO-tag [109] и TMP-tag [110–112].

В методе SNAP-tag O^6 -алкилгуанинтрансфераза (АГТ, рис. 11A) используется в качестве белка слияния с ЦКБ. АГТ имеет молекулярную массу 20 кДа, она переносит алкильные группы с O^6 алкилированного остатка гуанина на остаток цистеина в активном центре фермента (см. обзор [113]). Показано, что при инкубации клеток, экспрессирующих АГТ-ЦКБ, с O^6 -бензилгуаниновым субстратом, в котором бензильная группа в пара-положении несет флуорофор, происходит флуоресцентное мечение АГТ-ЦКБ по цистеину в активном центре АГТ [9]. Получены также мутантные формы АГТ, которые катализируют реакцию переноса алкил-радикала на АГТ-ЦКБ в 50 раз быстрее, чем фермент дикого типа [107]. В настоящее время технология SNAP-tag наиболее

часто используется для мечения внутри- и внеклеточных белков.

Метод CLIP-tag похож на SNAP-tag, в нем используется мутантная форма АГТ, субстратами которой являются флуоресцентные аналоги O^2 -бензилцитозина (рис. 11B) [108]. Несмотря на сходство этих технологий, SNAP-tag и CLIP-tag имеют различную субстратную специфичность и могут применяться для визуализации одновременно нескольких клеточных объектов.

В методе HALO-tag белком слияния служит генно-инженерный вариант фермента галоалкандегалогеназы, которая вступает в специфическую реакцию с галогензамещенными алканами, ковалентно связанными с флуорофором (рис. 11B) [114, 115]. Эта реакция, в которой образуется ковалентная связь между ферментом и флуоресцентно меченым алканом, высокоспецифична и позволяет быстро вводить метку в белки *in vitro* и *in vivo* (10^3-10^6 М⁻¹ с⁻¹) в физиологических условиях, причем, что важно, эта реакция необратима.

Стоит отметить, что во всех перечисленных методах для достижения высокого контраста требуется тщательная отмывка непрореагировавшей метки. Для устранения этого недостатка были синтезированы флуорогенные субстраты для SNAP-tag, которые содержат ферментативно удаляемый тушитель флуоресценции (рис. 11A). В результате ферментативной реакции с SNAP-tag химическая группа-тушитель отщепляется, что дает почти 50-кратное увеличение интенсивности флуоресценции. Преимущество таких «no wash» флуорофоров показано с помощью пространственно-временной динамики рецепторов эпидермального фактора роста в процессе миграции клеток [116].

Альтернативную систему представляет собой TMP-tag, в котором в качестве фермента, соединенного с ЦКБ, используется мутант дигидрофолатредуктазы (eДГФР L28C) из *Escherichia coli* (мол. масса ~18 кДа). В результате ферментативной реакции флуоресцентно меченный 2,4-диамино-5-(3,4,5-триметоксибензил) пиримидин (триметоприм, или TMP) связывается с eДГФР-ЦКБ (рис. 11Г), экспрессируемой в животных клетках. Система имеет достаточно низкие значения фоновой флуоресценции и быструю кинетику [111]. Для дальнейшего снижения фоновой флуоресценции, обусловленной несвязавшейся или неспецифически связавшейся флуоресцентной меткой, получено нефлуоресцирующее TMP-производное, содержащее флуорофор и его тушитель. В процессе ферментативной реакции TMP-лиганд связывается с eДГФР-ЦКБ, при этом тушитель удаляется. Эффективность данного метода показана при мечении гистонов в ядрах клеток НЕК 293Т [117].

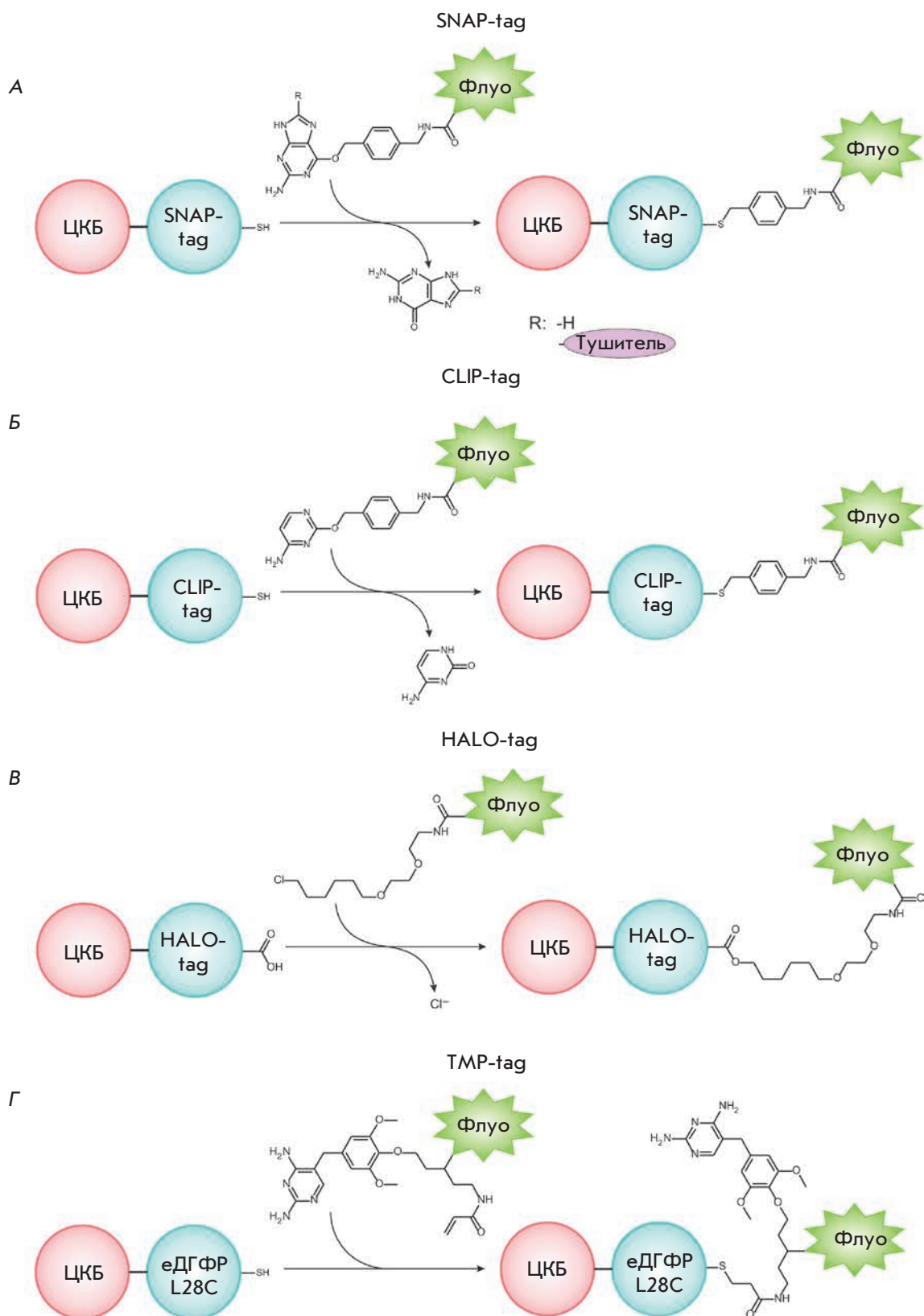


Рис. 11. Ферментативные методы меченя ЦКБ с использованием SNAP-tag (А), CLIP-tag (Б), HALO-tag (В) и TMP-tag (Г)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы методы визуализации биомолекул в живых системах с помощью синтетических флуорофоров претерпели значительные изменения, последовательно преодолевая различные экспериментальные и концептуальные ограничения, что, в первую очередь, касается сайт-направленных реакций, позволяющих вводить флуоресцентную метку в ЦКБ. На основе новых фотопереключаемых флуорофоров стремительно развивались современные технологии, такие, как субдифракционная микроскопия, позволяющая визуализировать клеточные объекты с разрешением в нанометровом диапазоне.

Метод биоортогонального мечения позволил вводить в ЦКБ синтетические флуорофоры, которые по своим размерам значительно меньше ФБ. Этот метод также предоставляет возможность мечения внутренних сайтов ЦКБ, в отличие от N- и C-концевых областей при использовании ФБ. Кроме того, спектральные свойства синтетических флуорофоров подвергаются более легкой настройке по сравнению с ФБ. Также с помощью синтетических флуорофоров возможно осуществлять мечение небелковых объектов (нуклеотидов, липидов, гликанов, метаболитов и т.п.).

Хотя конструкции, применяемые в ферментативных методах введения флуорофора (SNAP-tag, CLIP-tag, HALO-tag и TMP-tag), сопоставимы по размеру с ФБ, эти методы позволяют вводить любые небольшие молекулы в ЦКБ. Ферментативные методы включения флуорофоров в ЦКБ в последние годы все чаще привлекаются для решения сложных

задач современной биологии и медицины. Следует отметить, что описано использование этих технологий в трансгенных животных [118].

В настоящее время метод с образованием металл-хелатных комплексов и сульфидов также часто используется для флуоресцентного мечения *in vivo*. В отличие от предыдущих, в нем используется небольшой пептидный фрагмент, слитый с ЦКБ. Со времени появления первой публикации, в которой описано использование FAsH, созданы новые флуорофоры с большей аффинностью связывания и большей яркостью флуоресценции. На основе металл-хелатных технологий получены также ЦКБ, меченные фотопереключаемыми флуоресцентными метками.

Учитывая множество прикладных задач, существующих в визуализации биомолекул в живых системах, маловероятным представляется создание единого универсального флуорофора, удовлетворяющего всем возможным требованиям. Кроме того, исследование сложных систем с несколькими целевыми объектами требует применения одновременно нескольких различных флуорофоров. В этой связи дальнейший прогресс в этой области целиком зависит от синтеза новых флуорофоров, удовлетворяющих таким требованиям флуоресцентной микроскопии, как высокая фотостабильность, низкая фототоксичность при длительной визуализации объекта, а также возможность мечения множественных объектов в живых системах. ●

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E. // *J. Immunol.* 1942. V. 45. P. 159–170.
- Sung M.H., McNally J.G. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2011. V. 3. № 2. P. 167–182.
- Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. № 3. P. 1103–1163.
- Day R.N., Davidson M.W. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 10. P. 2887–2921.
- Pakhomov A.A., Martynov V.I. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 8. P. 755–764.
- Terai T., Nagano T. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 5. P. 515–521.
- Lavis L.D., Raines R.T. // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. № 4. P. 855–866.
- Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., Tsien R.Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 21. P. 6063–6076.
- Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H., Johnsson K. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 86–89.
- Bains G., Patel A.B., Narayanaswami V. // *Molecules.* 2011. V. 16. № 9. P. 7909–7935.
- Wu Y., Li C., Li Y., Li D., Li Z. // *Sens. Actuator B-Chem.* 2016. V. 222. P. 1226–1232.
- Pinheiro D., de Castro C.S., de Melo J.S.S., Oliveira E., Nunez C., Fernandez-Lodeiro A., Capelo J.L., Lodeiro C. // *Dyes Pigment.* 2014. V. 110. P. 152–158.
- Saha T., Sengupta A., Hazra P., Talukdar P. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. V. 13. № 10. P. 1427–1433.
- Legenzov E.A., Dirda N.D., Hagen B.M., Kao J.P. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0133518.
- Hara D., Komatsu H., Son A., Nishimoto S., Tanabe K. // *Bioconjug. Chem.* 2015. V. 26. № 4. P. 645–649.
- Han S., Zhang F.F., Qian H.Y., Chen L.L., Pu J.B., Xie X., Chen J.Z. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 93. P. 16–32.
- Mizukami S., Watanabe S., Kikuchi K. // *Chembiochem.* 2009. V. 10. № 9. P. 1465–1468.
- Zadlo A., Koszelewski D., Borys F., Ostaszewski R. // *Chembiochem.* 2015. V. 16. № 4. P. 677–682.
- Morikawa K., Yanagida M. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. № 2. P. 693–696.
- Szczurek A.T., Prakash K., Lee H.K., Zurek-Biesiada D.J., Best G., Hagmann M., Dobrucki J.W., Cremer C., Birk U. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 4. P. 331–340.
- Piterburg M., Panet H., Weiss A. // *J. Microsc.* 2012. V. 246. № 1. P. 89–95.
- Zurek-Biesiada D., Kedracka-Krok S., Dobrucki J.W. // *Cytometry A.* 2013. V. 83. № 5. P. 441–451.

23. Brunette A.M., Farrens D.L. // *Biochemistry*. 2014. V. 53. № 40. P. 6290–6301.
24. Smirnova I., Kasho V., Kaback H.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 23. P. 8440–8445.
25. Wang J.M., Liao Y., Shao S.J. // *Chem. Lett*. 2015. V. 44. № 10. P. 1437–1439.
26. Makiyama T., Nakamura H., Nagasaka N., Yamashita H., Honda T., Yamaguchi N., Nishida A., Murayama T. // *Traffic*. 2015. V. 16. № 5. P. 476–492.
27. Gaibelet G., Allart S., Terce F., Azalbert V., Bertrand-Michel J., Hamdi S., Collet X., Orlowski S. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 4. e0121563.
28. Lima S., Milstien S., Spiegel S. // *J. Lipid Res*. 2014. V. 55. № 7. P. 1525–1530.
29. Meng Q., Shi Y., Wang C., Jia H., Gao X., Zhang R., Wang Y., Zhang Z. // *Org. Biomol. Chem*. 2015. V. 13. № 10. P. 2918–2926.
30. Chen Y.H., Tsai J.C., Cheng T.H., Yuan S.S., Wang Y.M. // *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 56. P. 117–123.
31. Urru S.A.M., Veglianese P., De Luigi A., Fumagalli E., Erba E., Diaza R.G., Carra A., Davoli E., Borsello T., Forloni G., et al. // *J. Med. Chem*. 2010. V. 53. № 20. P. 7452–7460.
32. Kristoffersen A.S., Erga S.R., Hamre B., Frette O. // *J. Fluoresc*. 2014. V. 24. № 4. P. 1015–1024.
33. Lavis L.D., Rutkoski T.J., Raines R.T. // *Anal. Chem*. 2007. V. 79. № 17. P. 6775–6782.
34. Meier R.J., Simburger J.M., Soukka T., Schaferling M. // *Chem. Commun*. 2015. V. 51. № 28. P. 6145–6148.
35. Lopez S.G., Crovetto L., Alvarez-Pez J.M., Talavera E.M., San Roman E. // *Photochem. Photobiol. Sci*. 2014. V. 13. № 9. P. 1311–1320.
36. Minta A., Kao J.P., Tsien R.Y. // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. № 14. P. 8171–8178.
37. Cheng Z.Y., Wang X.P., Schmid K.L., Han X.G. // *Neuroscience*. 2014. V. 280. P. 254–261.
38. Zaikova T.O., Rukavishnikov A.V., Birrell G.B., Griffith O.H., Keana J.F. // *Bioconjug. Chem*. 2001. V. 12. № 2. P. 307–313.
39. Smith E.L., Bertozzi C.R., Beatty K.E. // *ChemBiochem*. 2014. V. 15. № 8. P. 1101–1105.
40. Grimm J.B., Sung A.J., Legant W.R., Hulamm P., Matlosz S.M., Betzig E., Lavis L.D. // *ACS Chem. Biol*. 2013. V. 8. № 6. P. 1303–1310.
41. Grimm J.B., English B.P., Chen J., Slaughter J.P., Zhang Z., Revyakin A., Patel R., Macklin J.J., Normanno D., Singer R.H., et al. // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 3. P. 244–250.
42. Vogel M., Rettig W., Sens R., Drexhage K.H. // *Chem. Phys. Lett*. 1988. V. 147. № 5. P. 452–460.
43. Hill R.A., Grutzendler J. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 11. P. 1081–1082.
44. Schnell C., Shahmoradi A., Wichert S.P., Mayerl S., Hagos Y., Heuer H., Rossner M.J., Hulsman S. // *Brain Struct. Funct*. 2015. V. 220. № 1. P. 193–203.
45. Kryman M.W., Davies K.S., Linder M.K., Ohulchanskyy T.Y., Detty M.R. // *Bioorg. Med. Chem*. 2015. V. 23. № 15. P. 4501–4507.
46. Fudala R., Mummert M.E., Gryczynski Z., Gryczynski I. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2011. V. 104. № 3. P. 473–477.
47. Chib R., Raut S., Fudala R., Chang A., Mummert M., Rich R., Gryczynski Z., Gryczynski I. // *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2013. V. 14. № 4. P. 470–474.
48. Gee K.R., Weinberg E.S., Kozlowski D.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2001. V. 11. № 16. P. 2181–2183.
49. Sueyoshi K., Nogawa Y., Sugawara K., Endo T., Hisamoto H. // *Anal. Sci*. 2015. V. 31. P. 1155–1161.
50. Moquin A., Hutter E., Choi A.O., Khatchadourian A., Castonguay A., Winnik F.M., Maysinger D. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 11. P. 9585–9598.
51. Huang Q., Zhang Q., Wang E., Zhou Y., Qiao H., Pang L., Yu F. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2016. V. 152. P. 70–76.
52. Wang E., Zhou Y., Huang Q., Pang L., Qiao H., Yu F., Gao B., Zhang J., Min Y., Ma T. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2016. V. 152. P. 327–335.
53. Hayashi-Takanaka Y., Stasevich T.J., Kurumizaka H., Nozaki N., Kimura H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 9. e106271
54. Mahalingam M., Girgenrath T., Svensson B., Thomas D.D., Cornea R.L., Fessenden J.D. // *Structure*. 2014. V. 22. № 9. P. 1322–1332.
55. Xue S., Ding S., Zhai Q., Zhang H., Feng G. // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 68. P. 316–321.
56. Albers A.E., Dickinson B.C., Miller E.W., Chang C.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2008. V. 18. № 22. P. 5948–5950.
57. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. // *ACS Chem. Biol*. 2011. V. 6. № 6. P. 600–608.
58. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Piao W., Kusakabe M., Saito N., Terai T., Okabe T., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc*. 2012. V. 134. № 11. P. 5029–5031.
59. McCann T.E., Kosaka N., Koide Y., Mitsunaga M., Choyke P.L., Nagano T., Urano Y., Kobayashi H. // *Bioconjug. Chem*. 2011. V. 22. № 12. P. 2531–2538.
60. Rathje R.L., Fang H., Bachman J.L., Anggono V., Gether U., Haganir R.L., Madsen K.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 35. P. 14426–14431.
61. Capellini V.K., Restini C.B., Bendhack L.M., Evora P.R., Celotto A.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. e62887.
62. Zhang H., Xu C., Liu J., Li X., Guo L. // *Chem. Commun*. 2015. V. 51. № 32. P. 7031–7034.
63. Theriot J.A., Mitchison T.J. // *Nature*. 1991. V. 352. № 6331. P. 126–131.
64. Zhao Y., Zheng Q., Dakin K., Xu K., Martinez M.L., Li W.H. // *J. Am. Chem. Soc*. 2004. V. 126. № 14. P. 4653–4663.
65. Guo Y.M., Chen S., Shetty P., Zheng G., Lin R., Li W.H. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 9. P. 835–841.
66. Loudet A., Burgess K. // *Chem. Rev*. 2007. V. 107. № 11. P. 4891–4932.
67. Boens N., Leen V., Dehaen W. // *Chem. Soc. Rev*. 2012. V. 41. № 3. P. 1130–1172.
68. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K. // *Chem. Soc. Rev*. 2015. V. 44. № 14. P. 4953–4972.
69. Le Guennic B., Jacquemin D. // *Acc. Chem. Res*. 2015. V. 48. № 3. P. 530–537.
70. Zhang Y., Swaminathan S., Tang S.C., Garcia-Amoros J., Boulina M., Captain B., Baker J.D., Raymo F.M. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. № 14. P. 4709–4719.
71. Yang C.D., Gong D.Y., Wang X.D., Iqbal A., Deng M., Guo Y.L., Tang X.L., Liu W.S., Qin W.W. // *Sens. Actuator B-Chem*. 2016. V. 224. P. 110–117.
72. Uppal T., Hu X., Fronczek F.R., Maschek S., Bobadova-Parvanova P., Vicente M.G. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 13. P. 3893–3905.
73. Jones L.J., Upson R.H., Haugland R.P., PanchukVoloshina N., Zhou M.J., Haugland R.P. // *Anal. Biochem*. 1997. V. 251. № 2. P. 144–152.
74. Abdulaev N.G., Artamonov I.D., Bogachuk A.S., Feigina M.Y., Kostina M.B., Kudelin A.B., Martynov V.I., Miroshnikov A.I., Zolotarev A.S., Ovchinnikov Y.A. // *Biochem. Int*. 1982. V. 5. № 6. P. 693–703.
75. Yapici I., Lee K.S., Berbasova T., Nosrati M., Jia X., Vasileiou C., Wang W., Santos E.M., Geiger J.H., Borhan B. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. № 3. P. 1073–1080.
76. Li Y., Wang Y., Yang S., Zhao Y., Yuan L., Zheng J., Yang R. // *Anal. Chem*. 2015. V. 87. № 4. P. 2495–2503.

77. Vinatier V., Guieu V., Madaule Y., Maturano M., Payrastré C., Hoffmann P. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 405. № 2. P. 255–259.
78. Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant C.M., Waggoner A.S. // *Bioconjug. Chem.* 1996. V. 7. № 3. P. 356–362.
79. Yin K., Yu F., Zhang W., Chen L. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 74. P. 156–164.
80. Yin J., Kwon Y., Kim D., Lee D., Kim G., Hu Y., Ryu J.H., Yoon J. // *Nat. Protoc.* 2015. V. 10. № 11. P. 1742–1754.
81. Kalia J., Raines R.T. // *Curr. Org. Chem.* 2010. V. 14. № 2. P. 138–147.
82. Hao Z., Hong S., Chen X., Chen P.R. // *Acc. Chem. Res.* 2011. V. 44. № 9. P. 742–751.
83. Best M.D. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. № 28. P. 6571–6584.
84. Kurpiers T., Mootz H.D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009. V. 48. № 10. P. 1729–1731.
85. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001. V. 40. № 11. P. 2004–2021.
86. Kiick K.L., Saxon E., Tirrell D.A., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 1. P. 19–24.
87. Kho Y., Kim S.C., Jiang C., Barma D., Kwon S.W., Cheng J., Jaunbergs J., Weinbaum C., Tamanoi F., Falck J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 34. P. 12479–12484.
88. Speers A.E., Adam G.C., Cravatt B.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 16. P. 4686–4687.
89. Speers A.E., Cravatt B.F. // *Chem. Biol.* 2004. V. 11. № 4. P. 535–546.
90. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002. V. 41. № 14. P. 2596–2599.
91. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. № 9. P. 3057–3064.
92. Agard N.J., Prescher J.A., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 46. P. 15046–15047.
93. Codelli J.A., Baskin J.M., Agard N.J., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 34. P. 11486–11493.
94. Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 43. P. 16793–16797.
95. Saxon E., Bertozzi C.R. // *Science.* 2000. V. 287. № 5460. P. 2007–2010.
96. Kohn M., Breinbauer R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004. V. 43. № 24. P. 3106–3116.
97. Madani F., Lind J., Damberg P., Adams S.R., Tsien R.Y., Graslund A.O. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 13. P. 4613–4615.
98. Pomorski A., Krezel A. // *Chembiochem.* 2011. V. 12. № 8. P. 1152–1167.
99. Griffin B.A., Adams S.R., Tsien R.Y. // *Science.* 1998. V. 281. № 5374. P. 269–272.
100. Chen B., Liu Q., Popowich A., Shen S., Yan X., Zhang Q., Li X.F., Weinfeld M., Cullen W.R., Le X.C. // *Metallomics.* 2015. V. 7. № 1. P. 39–55.
101. Uchinomiya S., Ojida A., Hamachi I. // *Inorg. Chem.* 2014. V. 53. № 4. P. 1816–1823.
102. Kapanidis A.N., Ebricht Y.W., Ebricht R.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 48. P. 12123–12125.
103. Lata S., Reichel A., Brock R., Tampe R., Piehler J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 29. P. 10205–10215.
104. Wieneke R., Laboria N., Rajan M., Kollmannsperger A., Natale F., Cardoso M.C., Tampe R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. № 40. P. 13975–13978.
105. Lai Y.T., Chang Y.Y., Hu L., Yang Y., Chao A., Du Z.Y., Tanner J.A., Chye M.L., Qian C., Ng K.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 10. P. 2948–2953.
106. Ojida A., Honda K., Shinmi D., Kiyonaka S., Mori Y., Hamachi I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. № 32. P. 10452–10459.
107. Keppler A., Pick H., Arrivoli C., Vogel H., Johnsson K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 27. P. 9955–9959.
108. Gautier A., Juillerat A., Heinis C., Correa I.R., Jr., Kindermann M., Beaufils F., Johnsson K. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 2. P. 128–136.
109. Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Ohana R.F., Urh M., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2008. V. 3. № 6. P. 373–382.
110. Miller L.W., Cai Y., Sheetz M.P., Cornish V.W. // *Nat. Methods.* 2005. V. 2. № 4. P. 255–257.
111. Gallagher S.S., Sable J.E., Sheetz M.P., Cornish V.W. // *ACS Chem. Biol.* 2009. V. 4. № 7. P. 547–556.
112. Wang T.Y., Friedman L.J., Gelles J., Min W., Hoskins A.A., Cornish V.W. // *Biophys. J.* 2014. V. 106. № 1. P. 272–278.
113. Correa I.R., Jr. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. V. 20. P. 36–45.
114. Benink H.A., Urh M. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1266. P. 119–128.
115. England C.G., Luo H., Cai W. // *Bioconjug. Chem.* 2015. V. 26. № 6. P. 975–986.
116. Komatsu T., Johnsson K., Okuno H., Bito H., Inoue T., Nagano T., Urano Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. № 17. P. 6745–6751.
117. Jing C.R., Cornish V.W. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 8. P. 1704–1712.
118. Yang G., de Castro Reis F., Sundukova M., Pimpinella S., Asaro A., Castaldi L., Batti L., Bilbao D., Reymond L., Johnsson K., et al. // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 2. P. 137–139.