



УДК 577.345

БИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ НА ОСНОВЕ КРАСНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА FUSIONRED

© 2016 г. Л. А. Кост^{*, **}, Е. В. Путинцева^{*}, А. Р. Переверзева^{*}, Д. М. Чудаков^{*, **},
К. А. Лукьянов^{*, ***}, А. М. Богданов^{*, ***}, #

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

^{**}Российский национальный исследовательский университет имени Н.И. Пирогова,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

^{***}Нижегородская государственная медицинская академия,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1

Поступила в редакцию 21.03.2016 г.

Принята к печати 10.05.2016 г.

Цель работы – создание “сплит”-вариантов красного флуоресцентного белка FusionRed, каждый из которых состоит из двух отдельных полипептидов, нефлуоресцентных частей белка FusionRed, а их комплекс при созревании формирует функциональный флуоресцентный белок. На первом этапе работы созданы различные варианты белка FusionRed, пермутированные по кругу (в круговых пермутантах полипептидную цепь белка делят на две части, которые меняют друг с другом местами, так что *N*-концевой фрагмент идет после *C*-концевого). Были протестированы 23 точки пермутации, из которых выбраны два варианта с наибольшей скоростью созревания хромофора (появления флуоресценции). Эти белки, названные srFR76-73 и srFR189-188 (первое число соответствует номеру последнего аминокислотного остатка *N*-концевого фрагмента, второе число – номеру первого аминокислотного остатка *C*-концевого фрагмента), были спектрально схожи с FusionRed, но обладали несколько сниженным квантовым выходом флуоресценции. Далее мы получили и протестировали сплит-белки FR76-73 и FR189-188, соответствующие данным пермутированным вариантам, в клетках млекопитающих. Для ассоциации разделенных *N*- и *C*-фрагментов FusionRed были использованы гетеродимеризующиеся “лейциновые молнии”. Было показано, что сплит-вариант FR189-188 созревает при 37°C и обладает яркостью флуоресценции, не уступающей таковой исходного белка FusionRed. Таким образом, FR189-188 потенциально применим для широкого круга задач, например, для выявления взаимодействий двух целевых белков или определения популяций клеток, в которых одновременно активны два изучаемых генных промотора.

Ключевые слова: красный флуоресцентный белок, сплит-белок, FusionRed, белок-белковые взаимодействия, флуоресцентная микроскопия.

DOI: 10.7868/S0132342316060051

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время белки семейства зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) являются незаменимым инструментом меченая разнообразных живых систем [1]. Благодаря способности GFP-подобных белков образовывать хромофор самостоятельно внутри белковой

глобулы, их можно использовать в качестве генетически кодируемых флуоресцентных меток. Полностью белковая природа такой метки позволяет с помощью введения в клетку одного гена метить целевые белки (в составе рекомбинантного белка с флуоресцентным белком), клеточные органеллы (путем присоединения к флуоресцентному белку сигналов внутриклеточной локализации) или клеточные популяции (с помощью экспрессии гена флуоресцентного белка под контролем специфического промотора).

Основными недостатками природных флуоресцентных белков, ограничивающими их практическое использование, являются олигомеризация и низкая скорость формирования хромофора (созревания). Большинство природных GFP-подобных белков обладают ярко выраженной тен-

¹ Сокращения: БиФК – бимолекулярная флуоресцентная комплементация (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC), GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein), FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer), sr – пермутированный по кругу (circularly permuted), FR – красный флуоресцентный белок FusionRed, LZ – лейциновая молния (leucine zipper).

Автор для связи (тел.: +7 (499) 724-81-22, эл. почта: noobis@yandex.ru).

денцией к образованию тетрамеров или, реже, димеров [1]. Олигомерные флуоресцентные белки малоприменимы для белкового мечения, так как вызывают олигомеризацию рекомбинантного белка, что может приводить к неправильному функционированию целевого белка. Для решения этой проблемы, были созданы мономерные варианты флуоресцентных белков. Это потребовало значительных усилий многих лабораторий во всем мире, поскольку сложный процесс образования хромофора внутри флуоресцентного белка оказался адаптирован к олигомерному состоянию. В результате этой работы на протяжении последних 10–15 лет были получены мономерные красные флуоресцентные белки, такие как mRFP1 [2], mCherry [3], mKate [4], mKate2 [5] и FusionRed [6].

Важным этапом развития методологии флуоресцентных белков стало изобретение метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации (БиФК, Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) [7, 8]. В этом случае полипептидную цепь флуоресцентного белка разделяют на две нефлуоресцентные части (рис. 1а), которые при объединении формируют функциональный флуоресцентный белок. Такой разделенный (“сплит”) флуоресцентный белок может быть использован для различных приложений [1]. Например, сплит-варианты флуоресцентных белков, неспособные к самопроизвольной реассоциации в клетке, применяются для детекции белок-белковых взаимодействий [8, 9]. В этом случае создают рекомбинантные белки, в которых первый из изучаемой пары целевых белков присоединен к одной части флуоресцентного белка, а второй – к другой. Если целевые белки взаимодействуют друг с другом, сближенные части флуоресцентного белка объединяются, и в клетке возникает флуоресцентный сигнал. Если взаимодействия нет, то флуоресцентный белок не реассоциирует и не дает флуоресценции. Также, данный подход позволяет детектировать появление специфической РНК в клетках бактерий [10].

В других методах БиФК используют сплит-варианты, в которых части флуоресцентных белков самостоятельно реассоциируют при одновременном появлении в цитоплазме клетки за счет их высокого сродства друг к другу [11] или присоединения к ним коротких гетеродимеризующихся последовательностей (например, “лейциновых молний”) [7, 8]. Этот подход применим, например, для выявления в многоклеточном организме клеток, в которых одновременно активны два изучаемых генных промотора [12]. Другой областью применения самореассоциирующихся сплит-вариантов является выяснение общей топологии мембранных белков [13]. В этом случае одну часть флуоресцентного белка направляют в цитоплазму, а другую присоединяют к *N*- или *C*-концу целевого белка. По возникновению флуоресцентного

сигнала судят об экспонировании *N*- или *C*-конца мембранного бека в цитоплазму.

Методы на основе БиФК существенно отличаются от методов на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) между флуоресцентными белками, который также часто используется для визуализации белок-белковых взаимодействий в живых клетках [1, 14]. Если FRET обеспечивает детекцию в режиме реального времени и полностью обратим, то БиФК необратимо накапливает сигнал за большой промежуток времени. Таким образом, методы на основе БиФК способны надежно выявлять даже слабые белок-белковые взаимодействия, но неприменимы в случаях, когда нужно определить временные точки возникновения и прекращения взаимодействий. Преимуществом БиФК является простота детекции и узость занимаемого спектрального диапазона (только один цвет), что расширяет возможности многоцветного мечения.

Большая часть методов на основе БиФК была апробирована на вариантах GFP. В последние годы, для расширения возможностей технологии, были созданы сплит-варианты красных флуоресцентных белков mRFP1 [15], mCherry [16], DsRed-monomer [17], mKate [18]. К сожалению, все они, кроме сплит-варианта белка mKate, могли функционировать только при температуре ниже 30°C, что делает их непригодными к использованию в клетках млекопитающих, культивируемых при 37°C.

В настоящей работе мы провели поиск возможных точек разрыва мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed для создания его сплит-вариантов. Белок FusionRed обладает рядом преимуществ, таких как строго мономерное состояние и очень низкая токсичность для клеток [6], что делает его перспективной основой для развития методов БиФК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание циркулярно пермутированных вариантов белка FusionRed

В качестве первого этапа создания сплит вариантов белка FusionRed мы сконструировали множество так называемых пермутированных по кругу вариантов этого белка (circularly permuted FusionRed, cpFR). Метод круговой пермутации основан на генно-инженерных манипуляциях, с помощью которых первичную последовательность белка делят на две части и меняют друг с другом местами, так что *N*-концевая часть идет после *C*-концевой (Рис. 1б) [19]. В результате, *N*- и *C*-концы исходного белка оказываются соединенными аминокислотным линкером, а в качестве новых *N*- и *C*-концов пермутированного белка выступают аминокислотные остатки, находящиеся внутри аминокислотной последовательности ис-

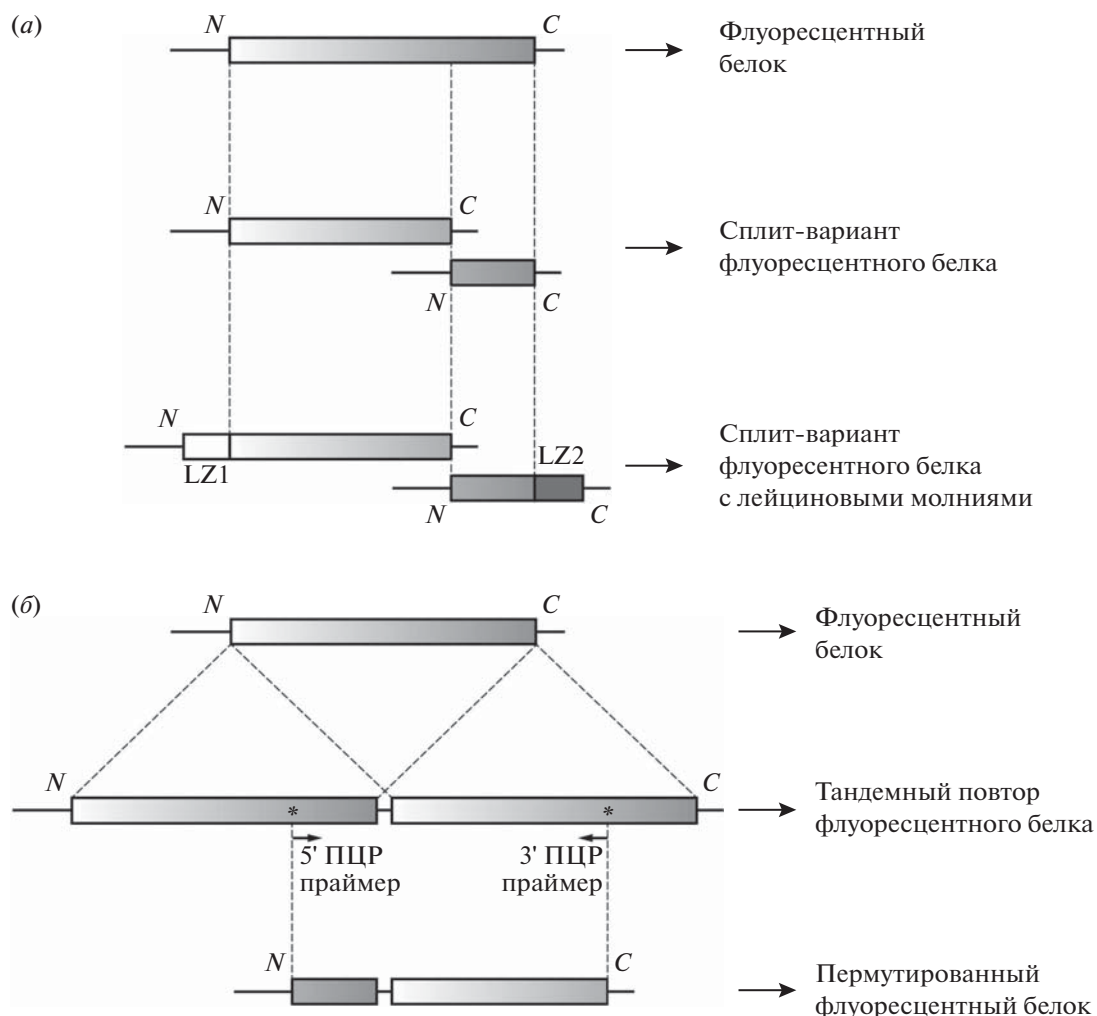


Рис. 1. Схема создания сплит (а) и пермутированных (б) вариантов флуоресцентного белка. Области, кодирующие флуоресцентный белок, показаны прямоугольниками с градиентной заливкой. Лейциновые молнии LZ1 и LZ2 показаны белым и темным прямоугольниками соответственно. Праймеры для ПЦР-амплификации области, кодирующей пермутированный вариант флуоресцентного белка, показаны стрелками. Звездочки показывают точки пермутации.

ходного белка. Благодаря своей простоте, такой подход позволяет быстро тестировать точки в аминокислотной последовательности, разрыв по которым не приводит к существенному нарушению созревания флуоресцентного белка [20]. Было обнаружено, что точки разрыва аминокислотной последовательности для функционально активных пермутированных и сплит-вариантов белка часто совпадают [21].

На основе опубликованной пространственной структуры белка mKate [22], который отличается от белка FusionRed всего несколькими заменами, мы выбрали 23 перспективные точки пермутации. Из них первая группа имела разрыв в петлевых участках полипептидной цепи: 75-74, 76-73, 87-85, 150-151, 152-151, 167-166, 168-167, 169-168, 189-188, 167-167, 167-168, 168-168; вторая группа имела разрыв внутри β -тяжа, непосредственно примыкающего к фенольному кольцу

хромофора: 142-141, 143-142, 144-143, 145-144, 142-142, 142-143, 142-144, 143-143, 143-144, 144-144, 150-149 (первое число соответствует номеру последнего аминокислотного остатка N-концевой части белка, второе число – номеру первого аминокислотного остатка C-концевой части белка). Соответствующие генно-инженерные конструкции были получены и экспрессированы в *E. coli*. Из 23 проверенных вариантов 11 пермутированных белков, в том числе все варианты с разрывом β -тяжа, были нефлуоресцентны, что говорит о существенном нарушении фолдинга таких белков и/или процесса формирования их хромофорной группы. Остальные 12 вариантов проявили детектируемую красную флуоресценцию. Вместе с тем, большая часть пермутированных белков обладала очень низкой скоростью созревания. Это привело к необходимости инкубировать белок несколько дней до полного созревания, что непри-

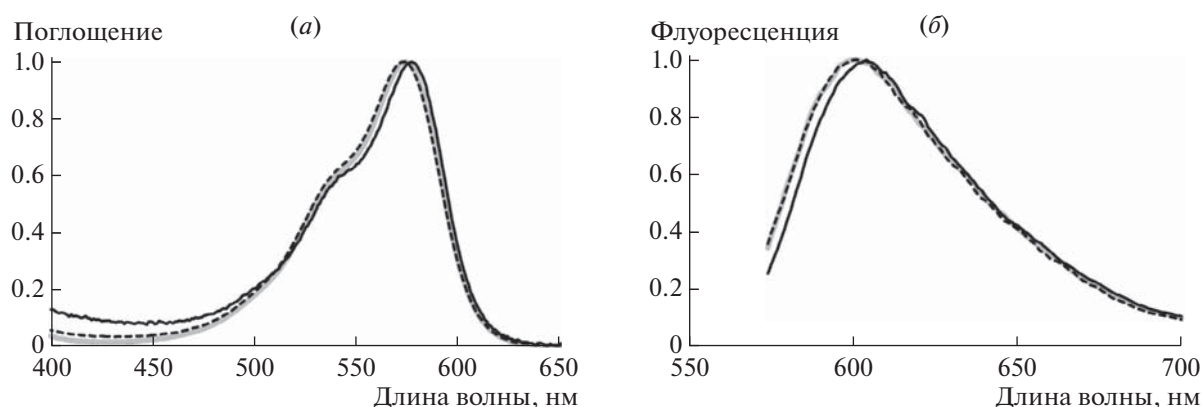


Рис. 2. Нормированные спектры поглощения (а) и эмиссии (б) белков FusionRed (серые линии), cpFR76-73 (пунктирные линии) и cpFR189-188 (сплошные черные линии).

менимо для большинства экспериментов. Поэтому для дальнейших экспериментов мы выбрали два наиболее быстро созревающих варианта, cpFR76-73 и cpFR189-188.

Эти белки были спектрально схожи с FusionRed (максимум возбуждения при 573–577 нм, максимум эмиссии при 603–606 нм), но обладали несколько сниженным квантовым выходом флуоресценции (рис. 2, таблица).

Сплит-варианты белка FusionRed

Далее мы получили и протестировали сплит-белки, соответствующие пермутированным вариантам cpFR76-73 и cpFR189-188, в клетках млекопитающих. Для этого были сконструированы плазмиды, кодирующие N- и C-концевые фрагменты FusionRed под контролем двух одинаковых промоторов. Плазида pFR76-73 кодировала фрагменты FusionRed 1-76 и 73-232; плазида pFR189-188 – фрагменты 1-189 и 188-232. Для взаимной ассоциации фрагментов FusionRed были использованы гетеродимеризующиеся “лейциновые молнии” (leucine zippers) (рис. 1а), широко применяемые для реассоциации сплит-вариантов флуоресцентных белков [7, 8] (плазмиды pFR76-73-zip и pFR189-188-zip).

Клетки HEK293Т были временно трансфицированы плазмидами pFR76-73-zip и pFR189-188-

zip и проанализированы с помощью флуоресцентной микроскопии. В обоих случаях, клетки проявляли хорошо видимую красную флуоресценцию. Яркость флуоресценции клеток со сплит-белком FR189-188-zip была схожа с таковой клеток с исходным белком FusionRed (Рис. 3). Вместе с тем, сплит-белок FR76-73-zip был приблизительно в 5 раз тусклее исходного белка FusionRed. Важно отметить, что в тех же условиях экспрессии сплит-варианты белков FR76-73 и FR189-188 без лейциновых молний не проявляли детектируемой флуоресценции.

Таким образом, мы показали, что сплит-вариант белка FusionRed с разрывом по 188-189 положениям (FR189-188) обладает рядом свойств, удобных для его практического использования. Так, в отличие от большинства описанных ранее сплит-вариантов красных флуоресцентных белков, FR189-188 способен реассоциировать и формировать хромофор при 37°C, что делает возможным его применение в клетках млекопитающих. При этом яркость флуоресценции FR189-188 не уступает таковой исходного белка FusionRed, что свидетельствует о высокой эффективности ассоциации фрагментов и созревания красного хромофора. Наконец, FR189-188 не имеет склонности к самопроизвольной реассоциации в отсутствие димеризующих доменов (лейциновых молний в наших экспериментах). Эти свойства делают

Спектральные свойства белка FusionRed и его циркулярно пермутированных вариантов cpFR76-73 и cpFR189-188.

Название белка	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм	Молярный коэффициент поглощения, $M^{-1}cm^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции	Относительная яркость флуоресценции
FusionRed	574	603	95500	0.19	1.00
cpFR76-73	573	603	76000	0.10	0.42
cpFR189-188	577	606	109000	0.14	0.84

FR189-188 потенциально применимым для широкого круга задач, например, выявления взаимодействий двух целевых белков или определения популяций клеток, в которых одновременно активны два изучаемых генных промотора. Флуоресценция FR189-188 в красной области спектра удобна для многоцветного мечения совместно с какими-либо из многочисленных доступных сенсоров на основе GFP или рекомбинантных белков, меченных GFP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для создания циркулярно пермутированных вариантов белка FusionRed мы клонировали кодирующую область данного белка в виде тандемного повтора, соединенного последовательностью ДНК, кодирующей аминокислотный линкер GGTGGG. Эта конструкция служила матрицей для ПЦР-амплификации последовательностей ДНК, кодирующих *srFR*-варианты, с использованием прямого (5'-концевого) праймера, соответствующего последовательности, кодирующей начало С-концевой части первой копии FusionRed, и обратного (3'-концевого) праймера, комплементарного последовательности ДНК, кодирующей конец N-концевой части второй копии FusionRed (см. рис. 1б). Фрагменты, кодирующие пермутированные варианты, были клонированы в вектор pQE-30 по сайтам *Bam*HI и *Hind*III. Полученные плазмиды были экспрессированы в *E. coli* (штамм XL1 Blue). Рекомбинантные белки были выделены с помощью металл-аффинного сорбента Talon (Clontech) согласно рекомендациям производителя.

Спектры поглощения и флуоресценции выделенных белков были измерены с помощью спектрофотометра Carry 100 (Varian) и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian). Молярные коэффициенты поглощения были вычислены с помощью нормировки на количество зрелого хромофора, определяемого в образце белка, денатурированного 1M NaOH (как описано в работе [6]). Квантовый выход определяли, используя FusionRed как стандарт (квантовый выход 0.19 [6]).

Для экспрессии сплит-вариантов в клетках млекопитающих использовали вектор с двумя одинаковыми промоторами цитомегаловируса (CMV), аналогичный описанному в работе [23]. Под контроль первого промотора помещали фрагмент, кодирующий С-концевую часть FusionRed (аминокислотные остатки 73-232 или 188-232), слитую с С-конца с последовательностью лейциновой молнии LZ2 (MEQLEKKLQALEKKLANVEWKNQALEKKLAQGTPGRPAGNG). Под контроль второго промотора помещали фрагмент, кодирующий N-концевую часть FusionRed (аминокислотные остатки 1-76 или 1-189), слитую с N-конца с последовательностью лейциновой молнии LZ1 (AGTPGRPAALKKELQANKKELAQLKWELQALKKELAQKLN). В качестве кон-

Флуоресцентный сигнал, у. е.

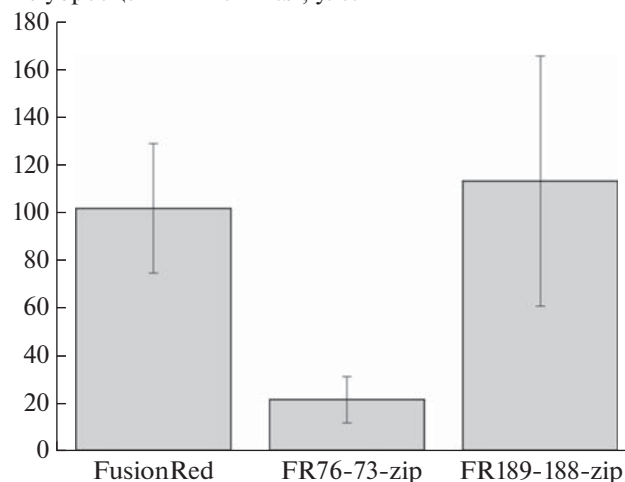


Рис. 3. Сравнение яркости флуоресцентного сигнала белка FusionRed и его сплит-вариантов FR76-73-zip и FR189-188-zip в клетках млекопитающих HEK293. Показаны средние значения и стандартные отклонения сигнала по данным флуоресцентной микроскопии (по 40–50 клеток в трех независимых экспериментах).

троля отсутствия самопроизвольной реассоциации сплит-фрагментов использовали конструкции, лишённые фрагментов, кодирующих лейциновые молнии LZ1 и LZ2.

Клетки линии HEK293 выращивали в стандартных условиях в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Sigma, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на 35-мм чашках со стеклянными дном Fluorodish (WPI, США). Трансфекцию проводили с помощью реагента FuGene (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Микроскопию проводили через 48 ч после трансфекции на инвертированном флуоресцентном микроскопе AF6000 (Leica, Германия) с объективом HCX PL APO lbd. BL 63 × 1.4NA с масляной иммерсией, CCD камерой Photometrics CoolSNAP HQ (США). Для визуализации красной флуоресценции использовали набор оптических фильтров TX2 (возбуждение 540–580 нм, эмиссия 605–685 нм). Для сравнения яркости флуоресценции белка FusionRed и его сплит-вариантов съемку проводили при одинаковых параметрах (интенсивность возбуждающего света и экспозиция). Яркость сигнала в клетках измеряли с помощью программы Leica LAS AF для 40–50 клеток в трех независимых экспериментах для каждого флуоресцентного белка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ 14-25-00129. Исследования частично выполнены на оборудовании ЦКП ИБХ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
2. Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 7877–7882.
3. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
4. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zاراisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 741–746.
5. Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S.A., Zاراisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. P. 567–574.
6. Shemiakina I.I., Ermakova G.V., Cranfill P.J., Baird M.A., Evans R.A., Souslova E.A., Staroverov D.B., Gorokhovatsky A.Y., Putintseva E.V., Gorodnicheva T.V., Chepurnykh T.V., Strukova L., Lukyanov S.A., Zاراisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M., Shcherbo D. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1204.
7. Ghosh I., Hamilton A.D., Regan L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 5658–5659.
8. Hu C.D., Chinenov Y., Kerppola T.K. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 789–798.
9. Weinthal D., Tzfira T. // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 59–63.
10. Valencia-Burton M., McCullough R.M., Cantor C.R., Broude N.E. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 421–427.
11. Cabantous S., Terwilliger T.C., Waldo G.S. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 102–107.
12. Zhang S., Ma C., Chalfie M. // *Cell.* 2004. V. 119. P. 137–144.
13. Zamyatnin A.A. Jr., Solovyev A.G., Bozhkov P.V., Valkonen J.P., Morozov S.Y., Savenkov E.I. // *Plant J.* 2006. V. 46. P. 145–154.
14. Ciruela F. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. V. 19. P. 338–343.
15. Jach G., Pesch M., Richter K., Frings S., Uhrig J.F. // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 597–600.
16. Fan J.Y., Cui Z.Q., Wei H.P., Zhang Z.P., Zhou Y.F., Wang Y.P., Zhang X.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 367. P. 47–53.
17. Kodama Y., Wada M. // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 70. P. 211–217.
18. Chu J., Zhang Z., Zheng Y., Yang J., Qin L., Lu J., Huang Z.L., Zeng S., Luo Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 25. P. 234–239.
19. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 11241–11246.
20. Shui B., Wang Q., Lee F., Byrnes L.J., Chudakov D.M., Lukyanov S.A., Sondermann H., Kotlikoff M.I. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e20505.
21. Kodama Y., Hu C.D. // *Biotechniques.* 2012. V. 53. P. 285–298.
22. Pletnev S., Shcherbo D., Chudakov D.M., Pletneva N., Merzlyak E.M., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 28980–28987.
23. Pereverzev A.P., Gurskaya N.G., Ermakova G.V., Kudryavtseva E.I., Markina N.M., Kotlobay A.A., Lukyanov S.A., Zاراisky A.G., Lukyanov K.A. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 7729.

Bimolecular Fluorescence Complementation on the Base of Red Fluorescent Protein FusionRed

L. A. Kost*, **, E. V. Putintseva*, A. R. Pereverzeva, D. M. Chudakov*, **, K. A. Lukyanov*, ***, and A. M. Bogdanov*, ***, #

#Phone: +7 (499) 724-81-22; e-mail: noobis@yandex.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow, Russia

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, 117997, Moscow, Russia

***Nizhny Novgorod State Medical Academy, pl. Minin, 10/1, 603005, Nizhny Novgorod, Russia

The aim of this work was to construct split variants of red fluorescent protein FusionRed, which consist of two separate polypeptides, nonfluorescent parts of FusionRed that can form functional fluorescent proteins upon reassociation. At the first stage, we created various circularly permuted FusionRed variants (in circular permutants, protein sequence parts are exchanged with each other, so that the C-end part becomes first followed by the N-end part). We tested 23 permutation points and selected two variants with highest rate of chromophore maturation (fluorescence development). These proteins called cpFR76-73 and cpFR189-188 (the first number indicates the last amino acid residue of the N-end part, the second number — the first residue of the C-end part) were spectrally similar to the parental FusionRed but possesses lower fluorescence quantum yields. Then, split variants corresponding to these two circular permutants were tested in mammalian cells. For reassembly of the fluorescent protein fragments, heterodimerizing leucine zippers were used. Split variant FR189-188 was found to mature at 37°C and possesses fluorescence brightness similar to that of FusionRed. Thus, FR189-188 is potentially suitable for a wide range of applications, for example, to study protein-protein interactions, or to visualize cell populations where two target gene promoters are active simultaneously.

Keywords: red fluorescent protein, split, FusionRed, protein-protein interaction, fluorescence microscopy