

Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов

И.В. Говор

Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины», г. Харьков

Investigation of Conformational Changes in Proteins Using Donor-Acceptor Pair of Fluorescent Probes

I.V. Govor

Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Для разработки новых методик криоконсервирования плазмы крови и органов, а также при мониторинге их сохранности необходимо проводить оценку конформационных изменений белков. В настоящее время для такого мониторинга применяют два подхода, основанных на флуоресценции. При использовании первого метода регистрируют изменение флуоресцентного сигнала от красителя-зонда, спектральные характеристики которого чувствительны к микроокружению, в частности, к конформации белка. Другой метод использует изменение эффективности ферстеровского переноса энергии (FRET) между двумя нечувствительными красителями – донором (D) и акцептором (A), ковалентно связанными с белком. Однако эти классические методы часто не обеспечивают необходимую чувствительность к малым изменениям конформации белка.

В работе представлен новый метод определения конформационных изменений белков, сочетающий оба подхода: в качестве донора и акцептора во FRET-паре использованы чувствительные к микроокружению зонды – скварайновые красители Square-634 (D) и Square-685 (A) («SETA BioMedicals», США). Модельным белком был бычий сывороточный альбумин, конформационные изменения которого вызывали мочевиной ($c_{\text{Urea}} = 0-7 \text{ M}$) в 10 mM фосфатном буфере с pH 7,4. Полученные результаты сопоставляли с таковыми для известных методов: FRET-пары нечувствительных к микроокружению цианиновых красителей Cy5 и Cy5.5 и с использованием индивидуальных флуоресцентных зондов Square-634 и Square-685.

Показано, что наибольшей чувствительностью к конформационным изменениям белка обладает новый метод, использующий FRET-пару чувствительных к микроокружению красителей Square-634 и Square-685. Так, в присутствии 5 M мочевины, вследствие изменения конформации белка, отмечается ~17-кратное уменьшение эффективности FRET. Существенно меньшей чувствительностью (изменение флуоресцентного сигнала примерно в 3–5 раза) обладает известный метод флуоресцентных зондов (Square-634 и Square-685), а еще более низкой чувствительностью (всего ~1,1 раза) – метод FRET (Cy5-Cy5.5).

Таким образом, предложенный метод позволяет значительно повысить чувствительность флуоресцентного определения конформационных изменений белков. Кроме того, этот метод может применяться при определении биологических свойств плазмы крови в процессе длительного хранения.

Работа выполнена при поддержке Национальной академии наук Украины (проект 0113U001410).

To develop new methods for cryopreservation of blood plasma and organs, as well as during monitoring of organs' preservation it is necessary to evaluate the conformational changes of proteins. Currently, for such a monitoring two approaches based on fluorescence measurements are used. One of them is the control of the change in fluorescent signal from a dye-probe, which spectral characteristics are sensitive to a microenvironment, in particular to the protein conformation. The other one consists in the determination of the change of the Foerster energy transfer (FRET) efficiency between two microenvironment-insensitive dyes, donor (D) and acceptor (A), which are bound to protein by a covalent chemical bond. However, these classical methods often do not provide the necessary sensitivity to small changes in protein conformation.

We developed a method to assess the conformational changes in proteins, which combines these two classical approaches: there were used microenvironment sensitive probes as a donor and an acceptor in the FRET pair. Squaraine dyes Square-634 (D) and Square-685 (A) (SETA BioMedicals, USA) were selected as microenvironment sensitive probes. Bovine serum albumin (BSA) was assumed as a model protein. Conformational changes in BSA were induced by urea ($c_{\text{Urea}} = 0-7 \text{ M}$) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. Results of the study were compared to those obtained by the classical methods, *i.e.* using FRET pairs of microenvironment-insensitive cyanine dyes Cy5 and Cy5.5 and fluorescent probe method with individual Square-634 or Square-685 dyes.

New method, using a FRET pair of microenvironment-sensitive Square-634 and Square-685 dyes, was found to be the most sensitive to the conformational changes in protein. In particular, protein unfolding in the presence of 5 M urea caused about 17-fold reduction in the FRET efficiency. Substantially lower sensitivity (3-5 fold variation of the fluorescence signal) exhibited the classical method of fluorescent probes (with Square-634 and Square-685). FRET method (with Cy5-Cy5.5 pair) had the lowest sensitivity (only ~1.1).

To conclude, the proposed method allowed to significantly increase the sensitivity of fluorescence-based examining of conformational changes in proteins. Among others, this method can be applied to determine biological properties of blood plasma during long-term storage.

The investigation was supported by the National Academy of Sciences of Ukraine (Project 0113U001410).

