

ПРИЛОЖЕНИЯ К СТАТЬЕ Д. А. РУЧКИНА И СОАВТ. «ДВЕ КЛЮЧЕВЫЕ ЗАМЕНЫ В ХРОМОФОРНОМ ОКРУЖЕНИИ БЕЛКА mKate2 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО FusionRed-ПОДОБНОГО КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА»

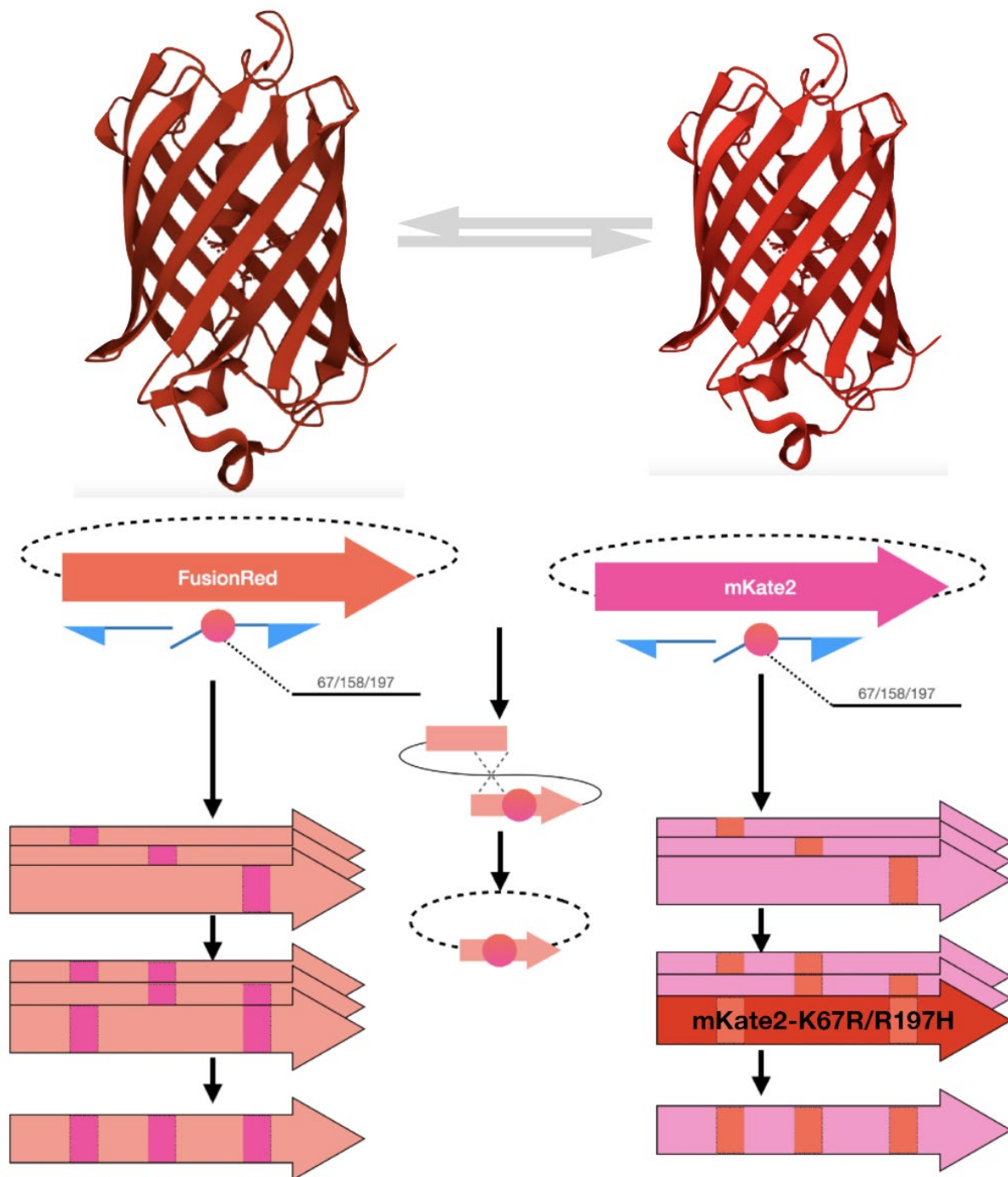
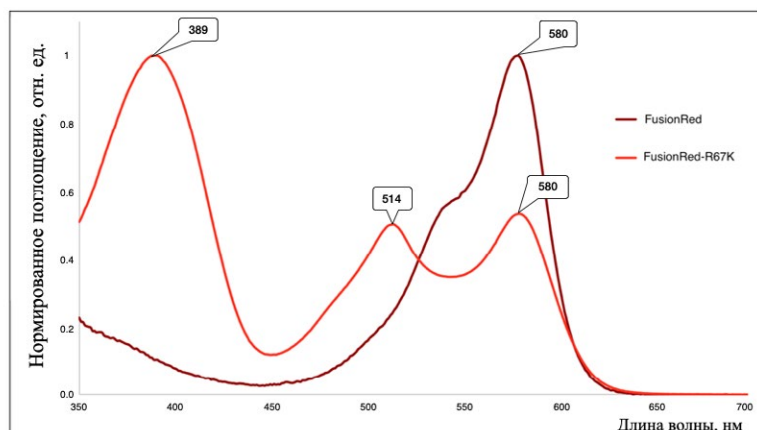


Рис. S1. Схема получения набора мутантов FusionRed и mKate2, содержащих замены по положениям 67/158/197. Верхняя панель иллюстрирует «обмен» аминокислотными остатками в указанных положениях. В центре схемы графически показан принцип сайт-направленного мутагенеза на основе клонирования методом IVA (синие стрелки — олигонуклеотиды, розовые круги — кодоны, содержащие замены, пунктирные эллипсы изображают векторную основу, пунктирный крест показывает рекомбинацию продукта полновекторной ПЦР). Прямые широкие стрелки слева и справа обозначают полученные варианты, положения замен показаны в виде вертикальных полос «противоположного» цвета

A



B

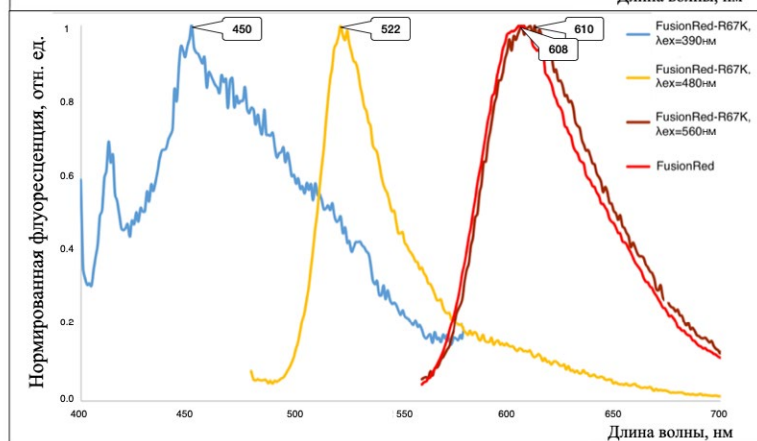
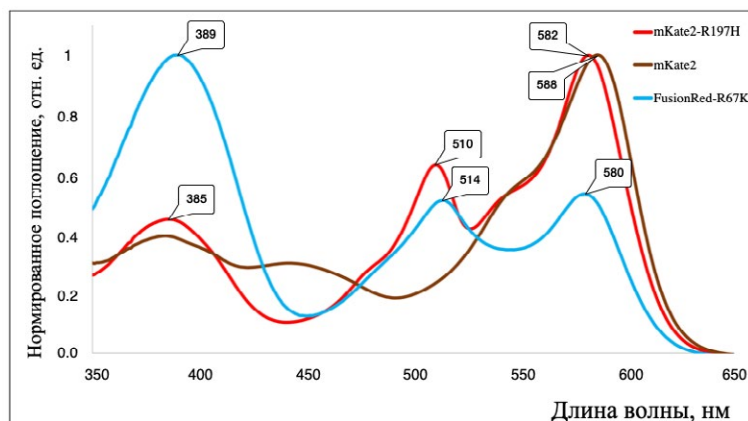


Рис. S2. Сравнение спектров поглощения (А) и эмиссии флуоресценции (Б) FusionRed-R67K и FusionRed. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

A



B

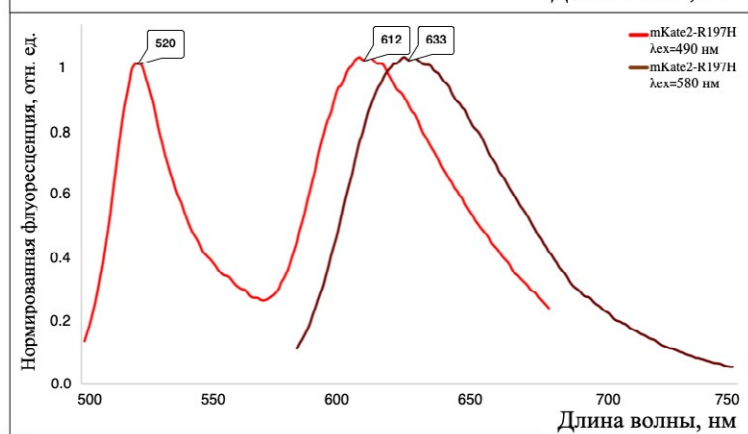
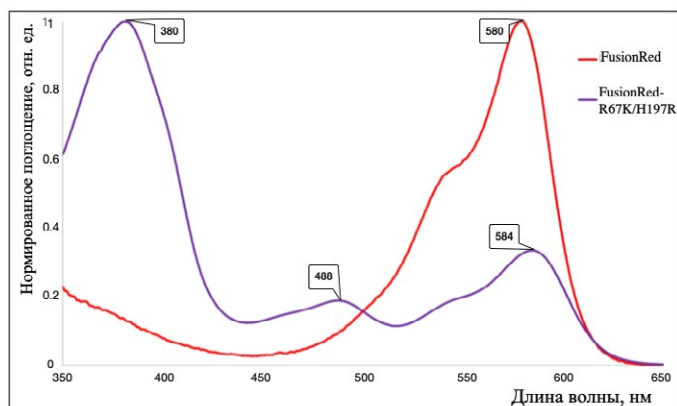


Рис. S3. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-R197H и mKate2. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Спектр поглощения FusionRed-R67K добавлен для сравнения (сплошная синяя линия, А). Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

А



Б

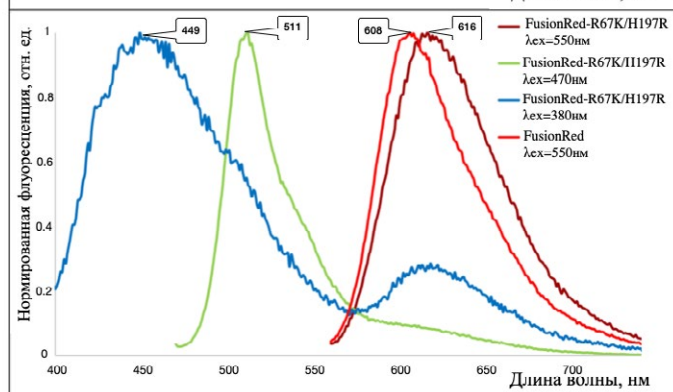
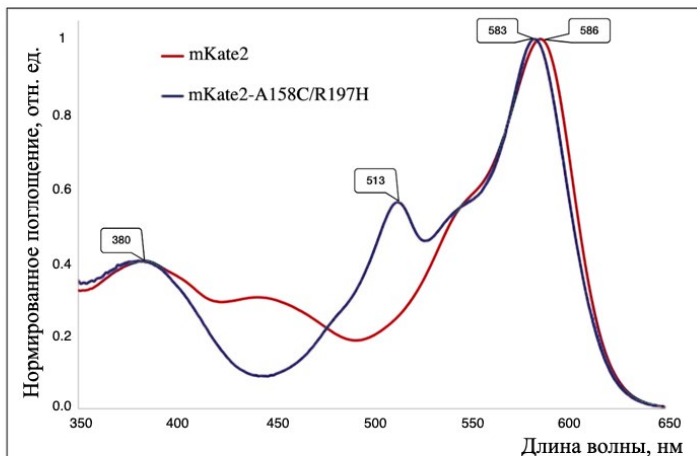


Рис. S4. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) FusionRed-R67K/H197R и FusionRed. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

А



Б

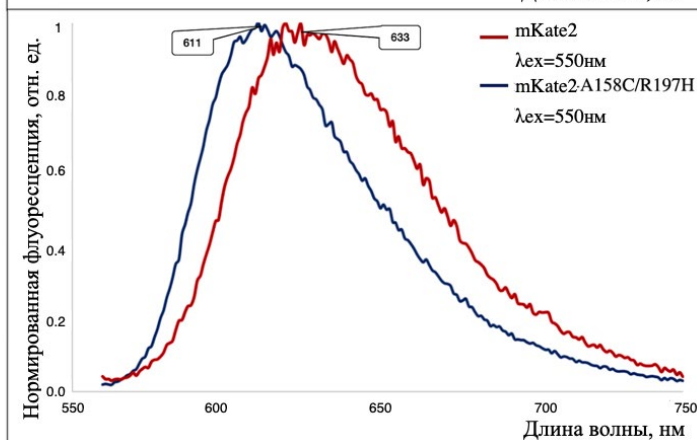


Рис. S5. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-A158C/R197H и mKate2. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

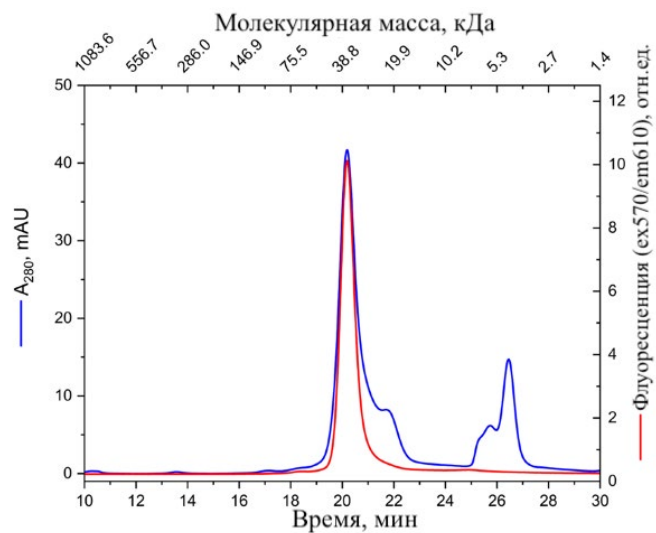


Рис. S6. Хроматограмма очищенного образца mKate2-K67R/R197H (Diogenes). Элюцию проводили под контролем встроенных детекторов поглощения и флуоресценции. Синим показано поглощение на 280 нм, красным – флуоресценция. Длины волн возбуждения и детекции флуоресценции указаны в легенде (правый верхний угол)

Таблица S1. Белковые стандарты, использованные для калибровки установки гель-фильтрации

Белок	Молекулярная масса, кДа	Время элюции, мин
Цитохром с из лошадиного сердца	12.4	23.354
Карбоангидраза из бычьих эритроцитов	29	21.265
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	66	17.767
Алкогольдегидрогеназа дрожжей	150	15.995
β-Амилаза батата	200	15.253
Ферритин лошадиной селезенки	450	12.723

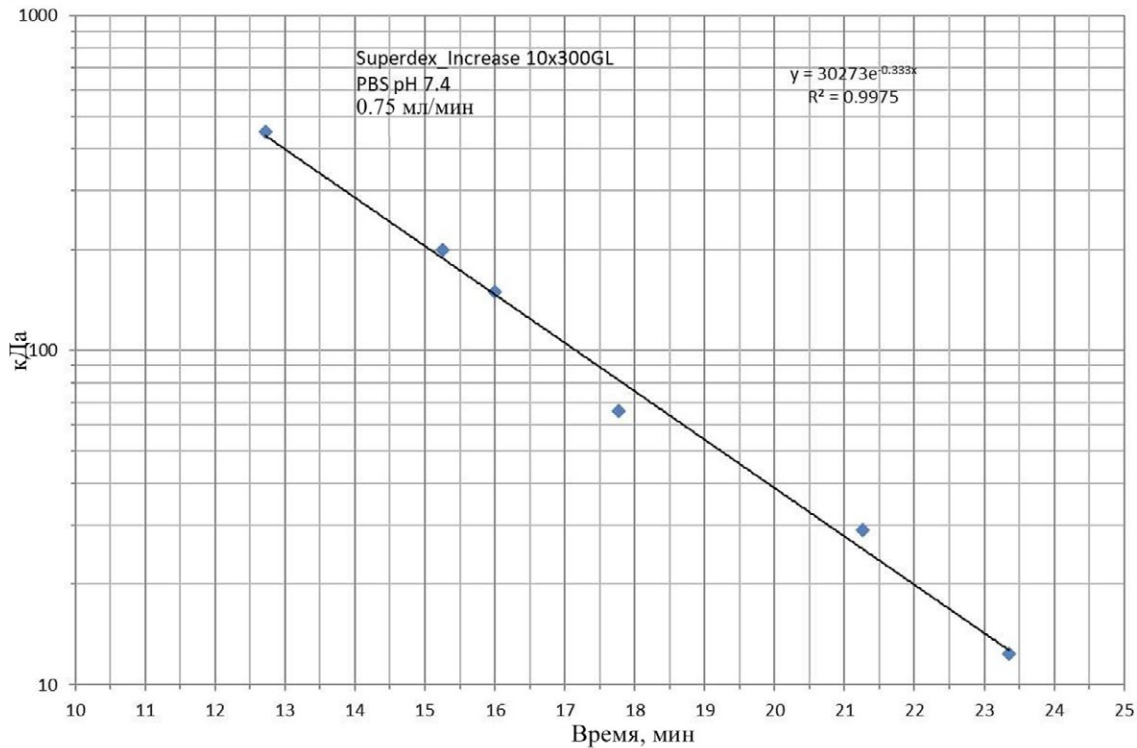


Рис. S7. Калибровочная прямая для определения молекулярных масс при хроматографическом анализе (см. раздел «Экспериментальная часть», основной текст). Синие квадраты показывают белковые стандарты, использованные для калибровки. Тип колонки и параметры уравнивания/элюции, а также результаты линейной аппроксимации показаны на графике

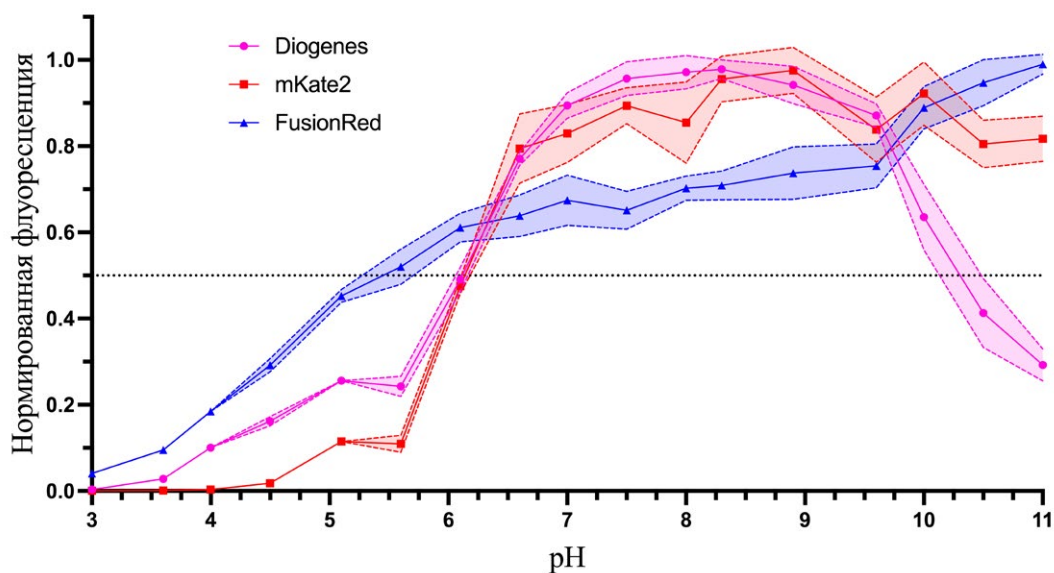


Рис. S8. Зависимость интенсивности флуоресценции очищенных mKate2-K67R/R197H (Diogenes), mKate2 и FusionRed от pH (pH-стабильность). Каждая точка показывает сигнал, нормированный на максимальное в наборе значение

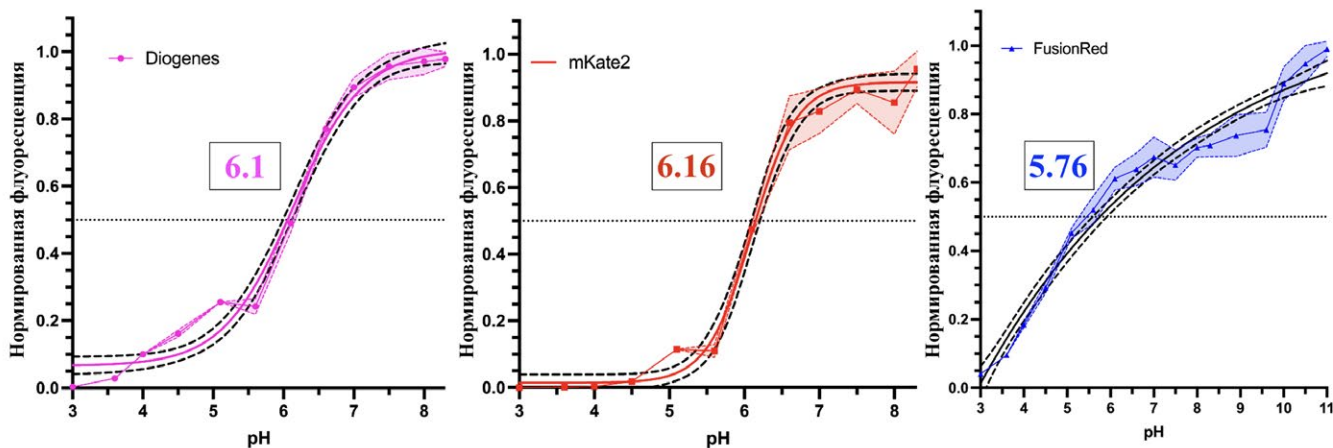


Рис. S9. Сигмоидные кривые аппроксимации pH-стабильности Diogenes, mKate2 и FusionRed. Цветные графики представляют экспериментальные данные со стандартными отклонениями в виде полупрозрачных областей ($n = 6$). Сплошная черная кривая – кривая аппроксимации с 95% доверительным интервалом, показанным черными пунктирными линиями. Аппроксимация выполнена в пакете GraphPad Prism10 в режиме четырехпараметрической логистической кривой (4PL). Горизонтальная линия обозначает половину от максимума флуоресценции

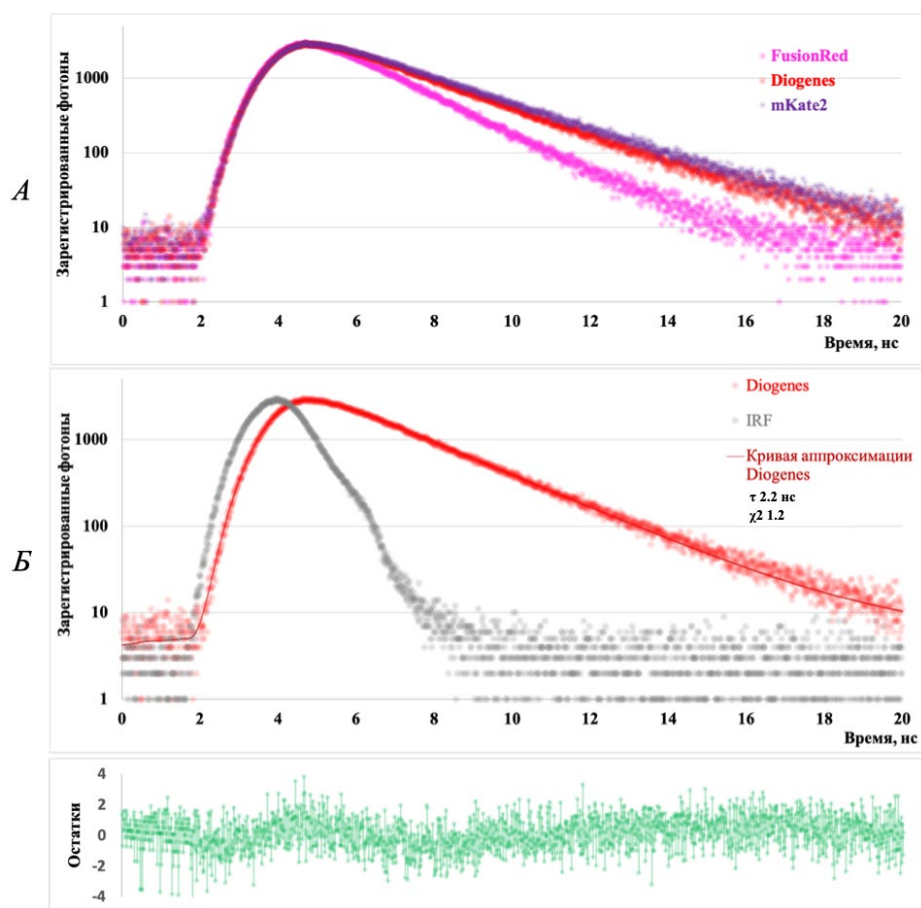


Рис. S10. Сравнение кривых затухания флуоресценции FusionRed, mKate2 и Diogenes при однофотонном возбуждении наносекундным импульсным светодиодом с частотой повторения 20 МГц, 590 нм (А). Моноэкспоненциальная аппроксимация кривой затухания Diogenes (Б). Для построения кривой использовали деконволюцию с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым

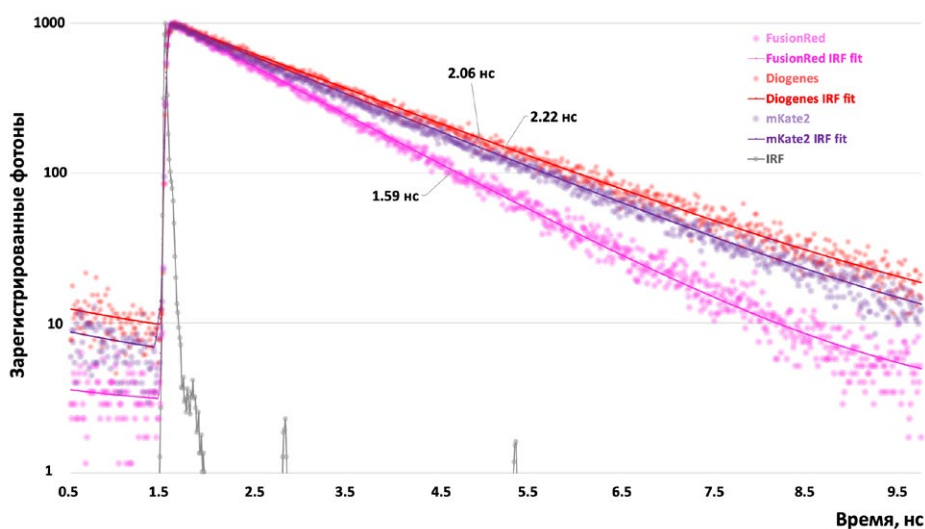
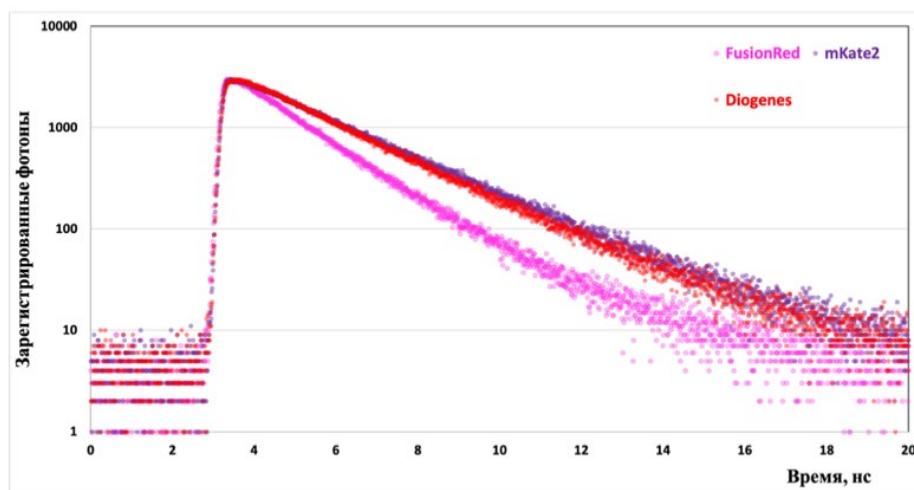


Рис. S11. Сравнение кривых затухания флуоресценции FusionRed, Diogenes и mKate2 при однофотонном возбуждении фемтосекундным лазером с частотой повторения 80 МГц, 590 нм. Шариками показаны экспериментальные данные, сплошными линиями — экспоненциальные кривые аппроксимации. Для FusionRed использовали биэкспоненциальную аппроксимацию, для mKate2 и Diogenes — моноэкспоненциальную. Средние значения времен жизни указаны рядом с кривыми. Для аппроксимации использовалась деконволюция с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым

A



B

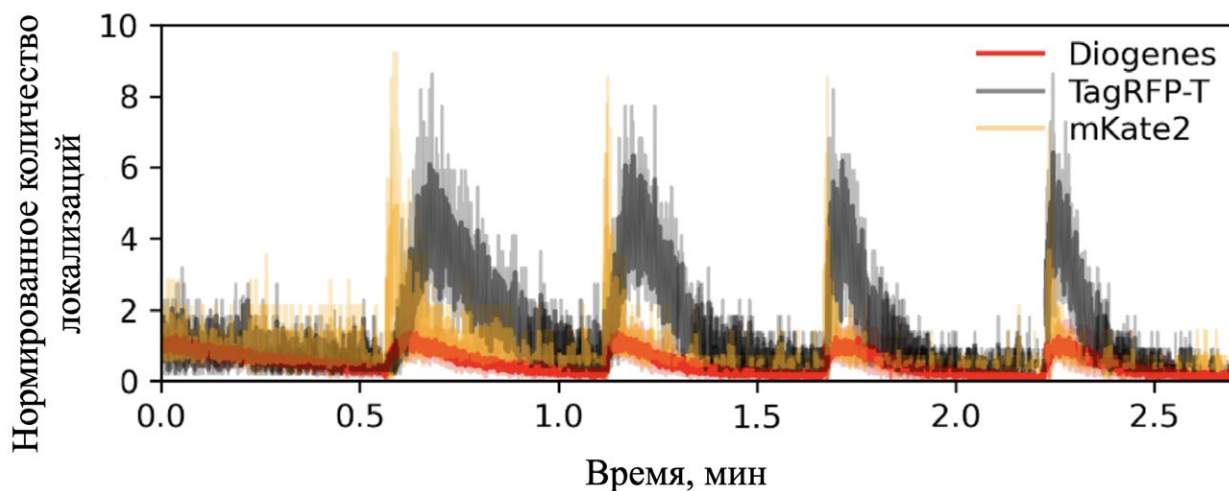
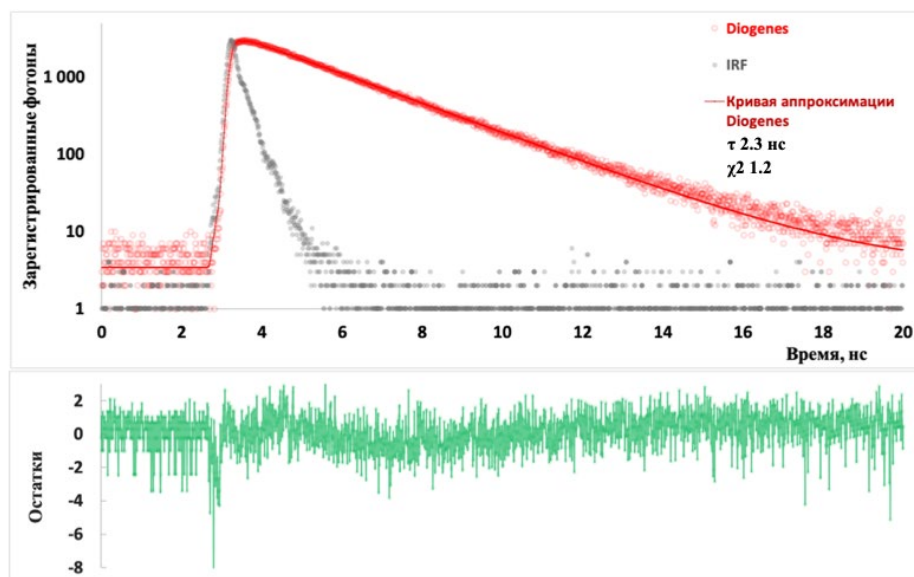


Рис. S13. Влияние лазерного освещения с длиной волны 405 нм на плотность локализации Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитых с виментином, в живых клетках HeLa во время визуализации при следующих условиях: лазер 2 кВт см⁻², 561 нм, время кадра 16.7 мс, 10 000 кадров. Интервал между вспышками лазерного излучения с длиной волны 405 нм составлял 22 с при продолжительности импульсов 0.4 с и плотности мощности освещения ~215 Вт·см⁻²

Рис. S12. Кривые затухания флуоресценции для FusionRed, mKate2 и Diogenes при однофотонном возбуждении пикосекундным диодным лазером с частотой повторения 20 МГц, 450 нм (А). Кривая затухания флуоресценции Diogenes и ее моноэкспоненциальная аппроксимация (Б). Для аппроксимации использовали деконволюцию с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым