

УДК 577.112.7:577.113.7:57.088.1

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНДЕНСАТОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПОДЛОЖКЕ

© 2025 г. А. С. Шторк*, Ю. И. Павлова*, Ю. И. Светлова*, М. С. Юдин*, Е. Н. Графская*, В. А. Манувера*, С. Э. Алиева*, А. М. Варижук*, В. Н. Лазарев*, Т. С. Ведехина*, **,

* Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

** МИРЭА – Российский технологический чниверситет. Россия. 119454 Москва. просп. Вернадского. 78

Поступила в редакцию 06.10.2024 г. После доработки 17.10.2024 г. Принята к публикации 18.10.2024 г.

Биомолекулярные конденсаты представляют собой скопления биополимеров, образующиеся в водных растворах по механизму разделения фаз "жидкость-жидкость". Нарушения фазовых переходов белков и нуклеиновых кислот в клетке лежат в основе ряда патологий, и необходимость их моделирования *in vitro* стимулирует развитие методов исследования конденсатов. В данной работе рассмотрена ключевая проблема визуализации конденсатов меченых белков и РНК методом флуоресцентной микроскопии в бесклеточных моделях. Она сводится к тому, что подвижность конденсатов в слое образца на стекле осложняет обработку и интерпретацию данных. Для ее решения ранее предлагалось иммобилизовать конденсаты на модифицированной подложке – стекле, обработанном 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС). Такая подложка предполагает нековалентное связывание РНК/ДНК и неоптимальна для белковых конденсатов. С помощью обработки АПТЭС N,N'-дисукцинимидилкарбонатом нами была получена альтернативная подложка ДСК-АПТЭС для ковалентного связывания конденсатов по лизиновым остаткам экспонированных на поверхности конденсата белковых фрагментов. Сравнительный анализ образцов известных конденсатов на всех трех типах подложки выявил значимое снижение их подвижности на модифицированной (АПТЭС или ДСК-АПТЭС) подложке, причем оптимальный тип модификации зависел от состава конденсатов. Эффективная иммобилизация улучшила качество фокусировки, что проявилось в повышении показателя солокализации олигонуклеотидного и белкового компонентов, а также упростила количественный анализ разделения фаз на основе объемной доли конденсатов в образце. Для идентификации конденсатов и автоматизации расчета их доли была разработана программа Droplet Calc. Полученные с ее помощью данные подтверждают преимущества АПТЭС и ДСК-АПТЭС в сравнении с немодифицированным стеклом при анализе концентрационной зависимости доли конденсатов для построения фазовых диаграмм. Оптимизация подложки и автоматизация обработки изображений открывают возможность быстрого и надежного количественного анализа фазовых переходов биополимеров методами микроскопии, что может быть востребовано в скрининге терапевтических агентов для разрушения патогенных конденсатов.

Ключевые слова: биомолекулярные конденсаты, разделение фаз "жидкость–жидкость", АПТЭС, N-белок, РНК

DOI: 10.31857/S0132342325010022, EDN: MAAQNP

Сокращения: DEPC – диэтилпирокарбонат; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; HD – 1,6-гександиол; Fmoc – флуоренилметоксикарбонильная защитная группа; LLPS – разделение фаз "жидкость-жидкость"; LNA – конформационно-закрепленные нуклеиновые кислоты; N-белок – нуклеокапсидный белок; PEG – полиэтиленгликоль; SR – фрагмент, босгатый остатками серина и аргинина; SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; АПТЭС – 3-аминопропилтриэтоксисилан; ДИЭА – диизопропилэтиламин; ДСК – N,N'-дисукцинимидилкарбонат. [#]Автор для связи: (тел.: +7 (915) 289-95-66; эл. почта: vedekhina.ts@rcpcm.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие отмечено прогрессом в изучении фазовых переходов биологических макромолекул. Стимулом к развитию направления стало применение теории поведения гибкоцепных полимеров в растворе [1], допускающей разделение фаз "жидкость-жидкость" (LLPS, liquidliquid phase separation), для описания пространственной сегрегации внутриклеточных процессов [2, 3]. Это позволило объяснить общую инактивацию или локальную активацию биохимических процессов депонированием реагентов или концентрированием ферментов в немембранных органеллах, также известных как биоконденсаты [4]. Примерами конденсатов-"микрореакторов" и конденсатов-"депо" служат транскрипционные фабрики, сплайсинговые спеклы и прочие ядерные/ цитоплазматические гранулы в клетках эукариот [5, 6]. Транскрипция и репликация геномов ряда вирусов (в частности, SARS-CoV-2) также требуют формирования конденсатов в цитоплазме или мембранных везикулах клетки-хозяина [7]. Наряду с синтезом и процессингом биополимеров LLPS позволяет клетке осуществлять контроль их вторичной структуры, изолировать некорректно упакованные эндогенные белки в ядрышках [8] или экзогенные патогены – в стрессовых гранулах [9]. Поскольку нарушения фазовых переходов биополимеров лежат в основе широкого спектра патологий [10], актуальной задачей является моделирование этих процессов in vitro, что требует визуализации и количественного анализа биоконденсатов.

Физические свойства конденсатов традиционно исследуют методами микрореологии, оптическими методами и др. Например, анализ кинетики слияния конденсатов и кинетики восстановления флуоресценции их меченых компонентов после фотообесцвечивания позволяют определить вязкость конденсатов и коэффициенты диффузии компонентов [11]. Физические характеристики и состав конденсатов практически не меняются в сравнительно широком диапазоне концентраций основного компонента выше критического значения (минимальной концентрации, необходимой для разделения фаз). Введение в систему избытка биополимера увеличивает лишь число и/или диаметр конденсатов, тогда как коэффициент распределения биополимера между конденсатами и раствором практически постоянен при постоянных внешних условиях [12]. Таким образом, важными интегральными характеристиками фазовых переходов являются критическая концентрация и коэффициент распределения биополимера при фиксированных внешних условиях или зависимость этих параметров от внешних условий, обычно представляемая в формате фазовой диаграммы [2]. Для построения фазовых диаграмм используют простейшие методы обнаружения конденсатов – турбидиметрию, световую или флуоресцентную микроскопию, реже – полуавтоматические методы с применением микрофлюидных технологий [2, 13].

Метод флуоресцентной микроскопии получил наибольшее распространение ввиду простоты и наглядности. Конденсаты удается визуализировать как подвижные капли в объеме образца между стеклами или осевшие капли на стеклянной подложке. При соприкосновении со стеклом капли частично смачивают поверхность, но сохраняют основные свойства – например, способность к слиянию, которая отличает их от твердых агрегатов и гелей. В теории движение осевших капель в придонном слое незначительно и ограничено плоскостью. На практике фокусировка и морфологический анализ конденсатов даже в придонном слое затруднены ввиду их заметной подвижности при неэффективном смачивании. Проблема частично решается путем модификации стекла, допускающей множественные электростатические взаимодействия с биополимерами. На данный момент описан единственный вариант модификации 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) [14]. Установлено, что такая модификация пригодна для иммобилизации конденсатов, образованных протяженными пролин-аргинин-богатыми пептидами и РНК [15]. Она снижает подвижность конденсатов без заметного искажения морфологии. Эти эффекты объясняют контактами отрицательно заряженного остова РНК-компонента конденсата с аминогруппами АПТЭС. Универсальность АПТЭС-подложки остается открытым вопросом, поскольку неотъемлемыми компонентами большинства биологически значимых конденсатов являются не нуклеиновые кислоты, а белки с неструктурированными участками [16].

В данной работе мы рассмотрели альтернативный вариант модификации стеклянной подложки, допускающий ковалентное связывание экспонированных на поверхности конденсата фрагментов белков. Для тестирования модифицированной подложки были использованы хорошо известные биоконденсаты на основе нуклеокапсидного (N) белка SARS-CoV-2 [7, 17]. Сам по себе вирусный белок формирует затравки конденсатов лишь в высокой концентрации. Однако при добавлении в систему модельной РНК [18] или шпилечных структур из 5'-нетранслируемой области вирусного генома [19] критическая кон-



Рис 1. Формирование биоконденсатов и их взаимодействия с подложками. На верхней панели схематично показано формирование конденсатов на основе пептидов или белков с неструктированными доменами. На нижней панели изображены вероятные контакты экспонированных на поверхности конденсата фрагментов биополимеров с поверхностью стеклянной подложки или подложки, обработанной 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС), а также подложки, полученной путем функционализации АПТЭС *N*,*N*'-дисукцинимидилкарбонатом (ДСК) в присутствии диизопропилэтиламина (ДИЭА). При контакте с немодифицированной стеклянной подложкой ключевую роль, предположительно, играют водородные связи и ван-дер-ваальсовые взаимодействия. АПТЭС-подложка способна к кулоновским взаимодействиям с фосфатами РНК-остова. ДСК-АПТЭС-подложка несет на поверхности активированную карбоксильную группу для ковалентного присоединения белков по остатками лизина с образованием соответствующего амида. Побочный продукт функционализации (результат взаимодействия ДСК с двумя соседними остатками АПТЭС), а также накапливающийся при инкубации в водных растворах продукт гидролиза ДСК-АПТЭС способны дополнительно фиксировать конденсаты за счет слабых нековалентных взаимодействий.

центрация N-белка снижается. Получаемые конденсаты удерживаются за счет комбинации неспецифических взаимодействий неструктурированных участков N-белка с РНК, а также специфических взаимодействий димеризационных доменов N-белка друг с другом или РНКузнающего домена белка с РНК. Помимо образцов вирусного N-белка с РНК для тестирования новой подложки были использованы конденсаты эукариотических пептидов – фрагментов факторов сплайсинга с протяженным серин-аргинин-богатым (SR) участком [20]. Они также склонны к РНКзависимому разделению фаз [21]. Получаемые конденсаты удерживаются исключительно за счет неспецифических взаимодействий (гидрофобных, электростатических, "катион-л"- и водородных связей) (рис. 1). Хотя конденсаты обоих типов рассмотрены как модельные, они значимы для жизненного цикла вируса (N-белок + PHK) или клетки (SR + PHK), выступают регуляторами репликации/транскрипции и сплайсинга соответственно, т.е. представляют собой потенциальные терапевтические мишени. Совершенствование подходов к их количественному анализу упростит дальнейший дизайн препаратов – активаторов/ ингибиторов их формирования.

Целью данной работы был сравнительный анализ стеклянных подложек с модификациями и без модификаций для визуализации и количественной оценки конденсатов методом флуоресцентной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация стеклянной подложки способствует иммобилизации конденсатов. Модифицированную подложку для иммобилизации конденсатов за счет ковалентного связывания белкового компонента получали на основе известной АПТЭС-подложки, предназначенной для

нековалентного связывания РНК-компонентов [14]. АПТЭС-стекла обрабатывали бифункциональным реагентом – N, N'-дисукцинимидилкарбонатом (ДСК) – в присутствии диизопропилэтиламина согласно опубликованному протоколу [22]. Итоговая подложка ДСК-АПТЭС содержала на поверхности активированные карбоксильные группы (*N*-гидроксисукцинимидные эфиры), способные к in situ взаимодействиям с аминогруппами остатков лизина при физиологических условиях (рН 7-8). Также не исключены реакции с остатками тирозина, серина, гистидина и треонина, однако они протекают с малой скоростью [23]. На этапе функционализации подложки возможны побочные реакции циклизации от взаимодействия двух активированных карбоксильных групп ДСК с АПТЭС, а при инкубации после функционализации – гидролиз сукцинимидного эфира с образованием свободной карбоксильной группы, доступной для электростатических взаимодействий (рис. 1). Выбранный метод функционализации [22] успешно применялся ранее при изготовлении белковых чипов и сенсоров [24, 25] для ковалентной иммобилизации макромолекул из растворов, но не из двухфазной системы с биоконденсатами. Нами была проверена применимость ДСК-АПТЭСподложки для иммобилизации конденсатов SRбогатого пептида с РНК и N-белка с РНК при их визуализации методом флуоресцентной микроскопии. Для сравнения те же конденсаты были визуализированы на АПТЭС-подложке и немодифицированном стекле.

При получении конденсатов использовали опубликованные протоколы [18, 26], адаптированные для флуоресцентной микроскопии: к смеси SRбогатого пептида с РНК добавляли 1% того же пептида, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (флуоресценция в зеленом канале); к смеси Nбелка с РНК добавляли 15% того же белка, меченного Red-NHS (флуоресценция в красном канале). Смеси в натрий-фосфатных буферных растворах (рН 7.4 и 7.0 для SR-пептида и N-белка соответственно) инкубировали при комнатной температуре 15 мин; аликвоту смеси переносили в микрокамеру на подложке, помещали под покровное стекло и регистрировали изображения с флуоресцентного микроскопа непосредственно после нанесения либо после 5 мин инкубации для осаждения части конденсатов. Конденсаты визуализировали как ярко окрашенные капли различной степени подвижности, смачивающие подложки разных типов с разной эффективностью и способные к слиянию при соприкосновении. Наблюдаемые размеры капель варьировались в микрометровом диапазоне (рис. 2*a*).

Для оценки подвижности капель получали серию кадров с 10-секундным интервалом (рис. 2δ) и по координатам центров масс капель рассчитывали среднеквадратичное смещение за время между кадрами. Полуавтоматический (с визуальным контролем) анализ 10 траекторий капель для каждой подложки (рис. 26) выявил значимое снижение подвижности конденсатов с SRпептидом на АПТЭС (среднеквадратичное смещение уменьшилось более чем на 40%, p < 0.05) и конденсатов с N-белком на ДСК-АПТЭС (среднеквадратичное смещение уменьшилось более чем на 50%, p<0.001) в сравнении с немодифицированным стеклом. Эффективная иммобилизация конденсатов SR-пептида с РНК на АПТЭС согласуется с опубликованными ранее данными для сходных конденсатов пролин-аригинин-богатого (PR) пептида с РНК [14]. Эффективная иммобилизация конденсатов N-белка с РНК на ДСК-АПТЭС согласуется с предполагаемым ковалентным связыванием белкового компонента по остаткам лизина (рис. 1). В случае SR-пептида преимущества ДСК-АПТЭС не проявляются, т.к. пептид не содержит остатков лизина.

Как видно из рис. 26, средние и медианные значения смещения конденсатов практически совпадали в случае АПТЭС и ДСК-АПТЭС, что согласуется с их нормальным распределением. В случае немодифицированного стекла наблюдались отдельные выпадающие значения, соответствующие высокой подвижности капель. Для уточнения типа распределения на примере конденсатов с *N*-белком повторяли анализ в автоматическом режиме (без визуального контроля) с помощью программы FastTrack (version 6.3.2) на расширенной выборке кадров (по 100 траекторий для каждой подложки). Результаты качественно согласуются с результатами полуавтоматического анализа и представлены на рис. 2г. Наиболее подвижные капли, для которых не удалось провести фокусировку, были исключены из рассмотрения. Прочие капли можно разделить на минорную фракцию подвижных и доминирующую фракцию осевших/ иммобилизованных, что согласуется с опубликованными ранее данными для конденсатов SR-пептида с РНК [14]. В подвижной фракции среднеквадратичное смещение составляло 6.5 ± 0.8 мкм, а доля менялась от $15 \pm 9\%$ (стекло, АПТЭС) до ~6% (ДСК-АПТЭС). Среднеквадратичное смещение конденсатов основной фракции значимо (*p* < 0.01) различалось для разных типов подложки и составляло 3.6 ± 0.2 мкм (стекло), 3.3 ± 0.1 мкм



Рис. 2. Анализ влияния модификации подложки на подвижность конденсатов. (*a*) – Визуализация конденсатов на различных подложках методом флуоресцентной микроскопии непосредственно после нанесения (верхний ряд) и после 5 мин инкубации (нижний ряд). Левая панель: конденсаты SR-пептида (10 мг/мл, 1% FITC-меченого) с PHK (10 мг/мл) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4). Правая панель: конденсаты N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с PHK (0.5 мг/мл) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7) с добавлением 50 мМ NaCl; (*б*) – примеры изображений, полученных с интервалом в 30 с для анализа подвижности конденсатов; (*в*) – результаты полуавтоматического анализа подвижности конденсатов. Анализ включал расчет среднеквадратичного смещения конденсата за 10 с на основании траектории из 3–5 кадров, сделанных с 10-секундным интервалом, с визуальным контролем построения траектории. Представлено обобщение данных по 10 траекториям на каждом типе подложки. * p < 0.05; ** p < 0.01 (тест Стьюдента, среднеквадратичного отклонения построены по 100 траекториям для каждого типа подложки без визуального контроля построения построены по 100 траекториям для каждого типа подложки без визуального контроля построения.

(АПТЭС) и 2.12 ± 0.03 мкм (ДСК-АПТЭС). Таким образом, нами было показано, что АПТЭС- и ДСК-АПТЭС-модификации снижают подвижность конденсатов различных типов. Наиболее эффективная иммобилизация конденсатов N-белка с PHK достигается на ДСК-АПТЭС-подложке. Иммобилизация качественно не меняет состав конденсатов и фазовое состояние системы. Учитывая различное сродство АПТЭС и ДСК-АПТЭС к РНК-компонентам и белковым компонентам конденсатов, нельзя было проверить равномерность иммобилизации, т.е. сохранение

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 51 № 1 2025

обоих компонентов в конденсатах на подложке. Проверка была выполнена на примере N-белка с РНК. Для этого помимо меченного остатком флуорофора REDN-белка (15% от общего количества белка) к смеси добавляли меченный остатком 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) олигонуклеотид. Последовательность олигонуклеотида взята из 5'-нетранслируемой области генома SARS-CoV-2. В литературе она фигурирует под шифром SL4 [19] и образует шпильку, стебель которой узнается РНК-связывающим доменом N-белка, что способствует формированию конденсатов за счет комбинации специфического и неспецифического связывания [27]. В данной работе вместо нативной РНК использовали модифицированный олигонуклеотид, содержащий остатки LNA (конформационно-закрепленные нуклеиновые кислоты) для повышения устойчивости к нуклеазному гидролизу [28]. Поскольку его геометрия (А-форма) соответствует геометрии РНК, мы ожидали сохранения сродства к N-белку и включения олигонуклеотида в конденсаты, что должно проявляться как его солокализация с N-белком.

Солокализацию N-белка и шпильки в конденсатах оценивали по результатам микроскопии в красном и зеленом каналах (рис. 3а) двумя методами. В первом рассчитывали процент капель с сигналом значимо выше фона в обоих каналах от обшего числа капель (N^{RED и FAM}/[N^{RED} + N^{FAM} + N^{RED и FAM}]), во втором определяли коэффициент солокализации R^{coloc} по интенсивностям сигналов в каждом пикселе. Результаты качественно согласуются между собой (рис. 36). Солокализация проявилась отчетливо, что подтверждает присутствие обоих компонентов в конденсатах, но была неполной, что может говорить о различии коэффициентов распределения белка и РНК. В случае немодифицированной подложки значения показателей солокализации были занижены по причине смешения капель за время переключения между каналами. При переходе от немодифицированной подложки к АПТЭС и ДСК-АПТЭС по мере снижения подвижности капель наблюдали рост показателей солокализации. Таким образом, было показано, что иммобилизация качественно не меняет состав конденсатов: в них присутствует и белковый компонент, и олиго-



Рис. 3. Анализ влияния подложки на соотношение компонентов конденсатов и фазовое состояние системы. (*a*) – Примеры визуализации конденсатов N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с PHK (0.5 мг/мл, 15% FAM-меченного LNAолигонуклеотида) в натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7) по флуоресценции белка (в красном канале) и LNA (в зеленом канале); (δ) – оценка солокализации белка и LNA в конденсатах по данным флуоресцентной микроскопии (три повтора на каждый тип подложки). Количественный анализ включал расчет процента капель, визуализированных в обоих каналах (метод 1) и определение коэффициента корреляции Пирсона, отражающего корреляцию интенсивностей флуоресценции в красном и зеленом каналах (метод 2). * p < 0.05 (тест Стьюдента); (ϵ) – примеры визуализации растворения конденсатов и их перехода в гель, индуцированные добавлением 10% 1,6-гександиола (HD) и лиганда на основе перилена (Peryl-3b) до финальной концентрации 20 мкМ, на различных подложках.

нуклеотидный. Иммобилизация конденсатов упрощает анализ солокализации при последовательной съемке в различных каналах.

Косвенный, но широко известный отличительный признак конденсатов – чувствительность к контрольным модуляторам. Нами был использован известный универсальный модулятор конденсатов. удерживаемых частично или полностью за счет гидрофобных взаимодействий – 1.6-гександиол (HD) [12]. Также был использован разработанный ранее низкомолекулярный модулятор конденсатов N-белка с РНК – амфифильное производное перилена Peryl-3b [29]. НD разрушает конденсаты, т.е. переводит оба компонента в раствор, тогда как Pervl-3b частично переводит их в гель/твердые агрегаты. Сравнение результатов флуоресцентной микроскопии на трех типах подложек после инкубации конденсатов с HD и Peryl-3b представлено на рис. 36. В присутствии HD во всех случаях удалось детектировать лишь единичные остаточные конденсаты. В присутствии Peryl-3b на каждой подложке наблюдали преимущественно объекты неправильной формы – неподвижные и не склонные к слиянию, что характерно для твердых или гелеобразных структур. Подводя промежуточные итоги, можно констатировать, что иммобилизация конденсатов на модифицированной подложке качественно не меняет состав конденсатов и фазовое состояние системы.

Иммобилизация упрощает количественную оценку формирования конденсатов. Для количественной оценки формирования конденсатов по данным флуоресцентной микроскопии могут быть использованы следующие параметры: коэффициент распределения меченого компонента между фазами (отношение флуоресцентного сигнала в капле к фону), общая площадь/объем капель или их число на единицу площади/объема камеры, а также средний размер. Коэффициент распределения сложно оценить достоверно из-за выгорания меток. Количество капель и их распределение по размеру меняются с течением времени из-за слияния. Общая площадь капель (S^t) представляется наиболее удобным параметром.

Под площадью капель в данном случае понимается площадь их проекций на плоскость подложки. В диапазоне между критическими значениями общая концентрация ключевого компонента в системе (C^t), общий объем капель (V^t) и их общая площадь (S^t) связаны уравнением (1):

$$(S_1^t/S_2^t)^{1.5} = V_1^t/V_2^t = C_1^t/C_2^t.$$
 (1)

Левая часть уравнения перестает выполняться при заметном отклонении формы конденсатов от сферической (например, в случае перехода капель в гель или твердый агрегат), правая – при изменении коэффициента распределения компонента между конденсатами и основным раствором (например, в случае разрыхления конденсатов или растворения). Оба случая характерны для фазовых переходов. Таким образом, концентрационная зависимость S^t – это удобный ориентир при построении фазовых диаграмм.

Видимое значение S^t зависит от качества фокусировки (рис. 2). Поскольку АПТЭС- и ДСК-АПТЭС-подложки способствуют иммобилизации конденсатов в плоскости придонного слоя, можно ожидать их положительного влияния на воспроизводимость результатов оценки S^t. Для проверки этого предположения был выполнен анализ S^t конденсатов N-белка с PHK при различных концентрациях на стекле и модифицированных подложках.

Ввиду отсутствия доступного специализированного ПО для расчета S^t по данным флуоресцентной микроскопии была разработана оригинальная программа Droplet_Calc. Она принимает на вход изображение или серию изображений с микроскопа, позволяет пользователю отсечь дефекты и скомпенсировать неоднородность освещения/ кривизну подложки при бинаризации изображения (выделении капель). Выходные данные содержат значения коэффициента кривизны для капель и его среднее значение для изображения, а также S^t. Код программы находится в открытом доступе (https://github.com/biopolymers-lab-FRCC-PCM/ droplets_area_calculation/tree/main).

При определении границ капель в данной программе используется адаптивный метод расчета порога яркости пикселя [30]. Пороговое значение для каждого пикселя определяется разностью средневзвешенного значения пикселей окружения, размер которого задается как параметр Block size, и константы (С), также задаваемой как параметр. Веса в данном случае представляют собой центрированные по выбранному пикселю 2D-гауссианы. Значения параметров адаптивного порога могут выбираться эмпирически или экспериментально (путем перебора значений) для каждой серии изображений. К примеру, для параметра Block size оптимален диапазон, соответствующий размеру окружения от максимального размера капель до минимального расстояния между ними. В этом диапазоне зависимость S^t от Block size близка к линейной.

Программа также содержит опцию предварительной обработки изображения методом размытия по Гауссу (Blur). Размытие фона целесообразно использовать при дефектах поверхности или проблемах фокусировки либо в случае анализа конденсатов в клетках. В бесклеточной модельной системе при использовании модифицированной подложки подобных артефактов не наблюдалось. Признаком наличия артефактов из-за дефектов поверхности может служить значимое отклонение распределения капель по размеру от нормального. В большинстве случаев дефекты поверхности, загрязнения образца или твердые частицы неправильной формы не распознаются программой как капли благодаря ограничению по коэффициенту кривизны circularity (0 < circularity < 1, circularity = 1 соответствует объектам идеальной сферической формы).

При наличии априорных данных об отсутствии в образце твердых агрегатов и гелей целесообразно рассматривать объекты с circularity не менее 0.6. Анализ конденсатов N-белка с PHK, имеющих преимущественно сферическую форму с небольшими отклонениями из-за слияния или смачивания подложки, дал значения circularity в диапазоне 0.8 ± 0.1 . В случае частичного перехода капель в гель, инициированного добавлением лиганда Peryl-3b (рис. 3), наблюдалось снижение circularity до 0.7 ± 0.1 (статистический анализ 50 объектов в образцах с лигандом/без лиганда подтвердил значимое различие: p = 0.02, *t*-тест).

Программа Droplet_Calc была использована при анализе серий изображений (по три реплики в каждой серии) образцов смесей N-белка (12.5– 50 мкМ) с PHK (0–0.5 мг/мл) на стекле, АПТЭСподложке и ДСК-АПТЭС для проверки влияния типа подложки на детектируемые фазовые переходы. Конденсаты наблюдались во всех случаях, однако их доля, выраженная через S^t, значительно варьировалось в зависимости от концентраций белка/РНК и соотношения компонентов (рис. 4).



Рис. 4. Анализ влияния подложки на наблюдаемую площадь конденсатов и получаемые фазовые диаграммы. (a) – Сравнение нормированной общей площади конденсатов на единицу площади покровного стекла при различных концентрациях белка и РНК, рассчитанной в программе Droplet_Calc для трех серий изображений: на стекле (серый), на АПТЭС-подложке (оранжевый) или на ДСК-АПТЭС (зеленый). Значения нормированы на максимальные для каждой серии, результаты (фрагменты фазовых диаграмм) представлены в формате тепловых карт; (δ) – примеры изображений, соответствующие диагональным элементами тепловых карт; (a) – ненормированные значения общей площади конденсатов, соответствующие диагональным элементами тепловых карт в панели (a) и изображениям в панели (δ).

Максимальное S^t на каждом типе подложки наблюдалось при максимальной концентрации компонентов (50 мкМ N-белка и 0.5 мг/мл РНК). На эту величину были нормированы значения S^t, полученные для смесей разбавленных компонентов.

Как видно из тепловых карт на рис. 4а и примеров изображений на рис. 46, двукратное разбавление исходных образцов без изменения соотношения белок : РНК приводило к снижению S^t в среднем на 60% при визуализации капель на модифицированных подложках, что соответствует снижению объемной доли конденсатов вдвое. Эти результаты соответствуют уравнению (1) и указывают на отсутствие фазового перехода системы. В случае немодифицированной подложки соответствие уравнению (1) едва выполняется с учетом погрешности – предположительно, ввиду завышенного S^t в максимальной концентрации из-за проблем фокусировки. В отсутствие РНК наблюдалось падение S^t до 0-10% от максимального на всех подложках (рис. 46), что указывает на фазовый переход (растворение капель).

Таким образом, количественный анализ конденсатов в программе Droplet_Calc показал, что результаты визуализации на трех типах подложки качественно согласуются друг с другом. Однако модифицированные подложки позволяют более четко установить диапазон концентраций, соответствующий двухфазной системе, за счет более эффективной иммобилизации конденсатов и улучшения фокусировки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биополимеры. N-белок SARS-CoV-2 с С-концевой гексагистидиновой меткой экспрессировали в Escherichia coli BL21-Gold(DE3) и выделяли методом металлохелатной хроматографии согласно опубликованным протоколам [29]. Мечение N-белка проводили красителем RED, испускающим флуоресценцию в дальнем красном диапазоне спектра, с помощью набора RED-NHS 2nd Generation Protein Labeling Kit (Nanotemper, Fepмания). В качестве РНК случайного состава для получения конденсатов с N-белком и SR-богатым пептидом использовали коммерчески доступную РНК, выделенную из дрожжей Torula (HiMedia Laboratories, Индия). В экспериментах по проверке солокализации компонентов конденсатов к РНК случайного состава добавляли меченый модифицированный олигонуклеотид, формирующий шпильку SL4 [27] с удлиненным стеблем. Модифицированный олигонуклеотид представлял собой гибрид ДНК-LNA FAM-CTGCGTGGCTGCAC-

ТССССТССАТ<u>ССССАСТССАСССАСС</u> (LNA-часть подчеркнута). Модифицированный олигонуклеотид был получен от ООО "Литех", чистота не менее 95% по данным ВЭЖХ.

SR-богатый пептид PRSPSYGRSRSRSRSRSR-SRSRSNSRSRSYSP(фрагмент фактора сплайсинга SRF1) синтезировали на автоматической микроволновой системе для твердофазного синтеза пептидов по Fmoc-стратегии Liberty Blue (CEM Corp., США) с использованием смолы Fmoc-Rink-Amide PEG (Iris Biotech, Германия). Для активации и конденсации Fmoc-аминокислот применяли этил-(гидроксиимино)цианоацетат (0.5 М) в присутствии *N*,*N*'-диизопропилкарбодиимида (0.25 M); Fmoc-группу удаляли обработкой 20% пиперидина в ДМФА, отщепляли пептид со смолы и удаляли защитные группы обработкой трифторуксусной кислотой в дихлорметане с триизопропилсиланом и 2,2-(этилендиокси)диэтантиолом. Мечение SRбогатого пептида проводили с помощью флуоресцеинизотиоцианата. Для этого к раствору пептила с концентрацией не менее 2 мг/мл в 0.1 М карбонатно-натриевом буфере (рН 9.0) порциями добавляли раствор флуоресцеинизотиоцианата в безводном DMSO в концентрации 1 мг/мл (на 1 мл раствора пептида – 50 мкл раствора метки) и инкубировали смесь в темноте в течение 8 ч при 4°С. Гашение реакционной смеси проводили 50 мМ водным раствором NH₄Cl и дополнительно инкубировали в течение 2 ч при 4°С. Меченый и немеченый пептиды очищали методом ВЭЖХ с УФдетекцией на хроматографе Acta Pure (GE Healthcare Life Sciences, США), используя колонку Zorbax SB-C18 (Agilent, США); для контроля чистоты использовали систему ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией LCMS-2020 (Shimadzu, Япония); очищенный продукт (чистота >90%) высушивали лиофилизацией.

Стоки *N*-белка, PHK, LNA и SR-богатого пептида готовили в DEPC-воде.

Модифицированные подложки. В качестве подложки для конденсатов использовали предметные стекла Ругех glass slides (Corning, CША). Перед модификацией проводили химическую шлифовку стекол с помощью H₂SO₄/H₂O₂, затем промывали водой и высушивали. Модификацию осуществляли в соответствии с опубликованными протоколами [22, 24]. Для получения АПТЭСподложки химически отполированное стекло обрабатывали 3-аминопропилтриэтоксисиланом (Sigma-Aldrich, США) в этиловом спирте (95%-ный водный раствор) при рН 4.5–5.5 (доводили 80%ным водным раствором уксусной кислоты) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 51 № 1 2025

27

в течение 2 ч. Стекла промывали чистым этиловым спиртом. Для получения ДСК-АПТЭС-подложки дополнительно функционализировали АПТЭС-подложку, обрабатывая *N*,*N'*-дисукцинимидилкарбонатом (Sigma-Aldrich, США) в присутствии диизопропилэтиламина (Sigma-Aldrich, США) в безводном ацетоне (Компонент-Реактив, Россия) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Стекла промывали чистым ацетоном. После промывок модифицированные подложки в обоих случаях высушивали в лиофилизаторе в течение 30 мин. Для создания микрокамер на подложки наносили ламинирующий адгезив 3М 467 МР (3М, США).

Флуоресцентная микроскопия и количественный анализ конденсатов. Количественную оценку формирования конденсатов осуществляли по данным флуоресцентной микроскопии. Непосредственно перед экспериментом готовили образцы N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с РНК (0.5 мг/мл) в 10 мМ натрий-фосфатном DEPC-буфере (рН 7.0), N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с РНК (0.5 мг/мл, 15% FAMмеченной LNA) в 50 мМ Tris-HCl DEPC-буфере (pH 7.0) с добавлением 50 мМ NaCl, N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с РНК (0.5 мг/мл, 20 мкМ Peryl-3b) в 10 мМ натрий-фосфатном DEPC-буфере (рН 7.0), N-белка (50 мкМ, 15% RED-меченого) с РНК (0.5 мг/мл, 10% HD) в 10 мМ натрий-фосфатном DEPC-буфере (рН 7.0), SR-пептида (10 мг/мл, 1% FITC-меченого) с РНК (10 мг/мл) в 10 мМ натрий-фосфатном DEPCбуфере (рН 7.4). Образцы при комнатной температуре переносили в микрокамеры с немодифицированной поверхностью, АПТЭС-и ДСК-АПТЭСподложками соответственно и накрывали покровными стеклами. Изображения получали на микроскопе Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония).

Для оценки подвижности капель использовали программу FastTrack (https://www.fasttrack.sh) [31] и следующие параметры: *Background – Method: Average, Number of images: от 4 до 8, Registration: None; *Binarization – Type: Dark background, Value: 5–10; *Detection – Maximal size: 200, Minimal size: 5; *Tracking Options – Normalization Distance: 50– 100, Normalization Angle: 30–50, Maximal Distance: 75–100, Maximal Time: 25–35, Spot to track: Head, остальные параметры по умолчанию.

Для оценки площади капель и коэффициента кривизны использовали программу Droplet_Calc со следующими настройками: n (количество изображений) от 4 до 10; blockSize = 3 # odd number like 3,5,7,9,11; C = -3 # constant to be subtracted;

maxValue = 255, остальные параметры по умолчанию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для визуализации разделения фаз меченых биополимеров в водных растворах методом флуоресцентной микроскопии была разработана модификация стеклянной подложки (ДСК-АПТЭС), обеспечивающая иммобилизацию конленсатов за счет in situ взаимодействий с белковым компонентом (рис. 1). Преимущества модификации были продемонстрированы на примере известных объектов конденсатов *N*-белка с РНК. Анализ изображений с микроскопа в программе FastTrack показал, что ДСК-АПТЭС-модификация вдвое уменьшала среднеквадратичное смещение конденсатов на поверхности подложки – предположительно, благодаря эффективному смачиванию поверхности и ковалентному присоединению белка по остаткам лизина.

Кроме того, модификация вызывала значимое снижение фракции наиболее подвижных конденсатов в придонном слое образца, создающих основные сложности при фокусировке (рис. 2). Преимущества модификации не проявлялись при отсутствии в белковом компоненте остатков лизина, т.е. в случае SR-богатого фрагмента факторов сплайсинга (рис. 2), что согласуется с предполагаемым механизмом иммобилизации (рис. 1). В случае образцов N-белка с РНК подложка ДСК-АПТЭС обеспечивала более эффективную иммобилизацию не только в сравнении с немодифицированным стеклом, но и в сравнении с известной АПТЭСподложкой для нековалентной иммобилизации поли/олигонуклеотидного компонента (рис. 2).

Для меченого олигонуклеотида наблюдалось сохранение солокализации с белковым компонентом конденсатов на модифицированных подложках (рис. 3). Таким образом, взаимодействие с АПТЭС и ДСК-АПТЭС не вызывало перераспределения компонентов и качественного изменения состава конденсатов. Более того, солокализация проявлялась более отчетливо именно на модифицированной подложке – предположительно, за счет улучшения фокусировки при эффективной иммобилизации конденсатов. Индуцированные низкомолекулярными соединениями фазовые переходы (разрушение конденсатов и их переход в гель) проявлялись аналогично на подложках всех типов, следовательно, модификация не влияла на фазовое состояние системы.

Решающим преимуществом ДСК-АПТЭС-подложки представляется возможность более точного определения площади и объемной доли конденсатов в образце при построении фазовых диаграмм, что было продемонстрировано на примере смесей N-белка с PHK в различных концентрациях (рис. 4). Для оценки площади конденсатов параллельно с контролем сохранения их сферической формы была разработана программа Droplet_Calc. Использование подходящей подложки для микроскопии образцов конденсатов и программы Droplet_ Calc для расчета их геометрических параметров открывает возможность полуавтоматического количественного анализа разделения фаз в растворах биополимеров. Эти разработки могут найти применение в моделировании ассоциированных с патологией фазовых переходов и скрининге малых молекул для их ингибирования.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Публикация выполнена при государственном финансировании проекта "Шаперон", номер государственной регистрации 124031200005-4 (модификация подложек) и гранта Российского научного фонда 22-15-00129 (визуализация конденсатов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Flory P.J.* // J. Chem. Phys. 1949. V. 17. P. 303–310. https://doi.org/10.1063/1.1747243
- Dignon G.L., Best R.B., Mittal J. // Annu. Rev. Phys. Chem. 2020. V. 71. P. 53–75. https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-071819-113553
- Bergeron-Sandoval L.-P., Safaee N., Michnick S.W. // Cell. 2016. V. 165. P. 1067–1079. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.026
- Mehta S., Zhang J. // Nat. Rev. Cancer. 2022. V. 22. P. 239–252. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00444-7
- Erdel F, Rippe K. // Biophys. J. 2018. V. 114. P. 2262–2270.
 - https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.011

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 51 № 1

- Ilık İ.A., Aktaş T. // FEBS J. 2022. V. 289. P. 7234–7245. https://doi.org/10.1111/febs.16117
- Svetlova J.I., Pavlova Iu.I., Aralov A.V., Varizhuk A.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 917–929. https://doi.org/10.1134/S1068162023050229
- Rekulapally P., Suresh S.N. // Trends Biochem. Sci. 2019. V. 44. P. 993–995. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.001
- Protter D.S.W., Parker R. // Trends Cell Biol. 2016.
 V. 26. P. 668–679. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004
- Wang B., Zhang L., Dai T., Qin Z., Lu H., Zhang L., Zhou F. // Sig. Transduct. Target Ther. 2021. V. 6. P. 290. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00678-1
- Ganser L.R., Myong S. // Trends Biochem. Sci. 2020.
 V. 45. P. 1004–1005. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.011
- Alberti S., Gladfelter A., Mittag T. // Cell. 2019. V. 176. P. 419–434. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035
- Erkamp N.A., Qi R., Welsh T.J., Knowles T.P.J. // Lab Chip. 2023. V. 23. P. 9–24. https://doi.org/10.1039/D2LC00622G
- Chen C., Li P., Luo W., Nakamura Y., Dimo V.S., Kanekura K., Hayamizu Y. // Langmuir. 2021. V. 37. P. 5635–5641. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00493
- Chen C., Jia H., Nakamura Y., Kanekura K., Hayamizu Y. // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 19280–19287. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00811
- Saar K.L., Morgunov A.S., Qi R., Arter W.E., Krainer G., Lee A.A., Knowles T.P.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. P. e2019053118. https://doi.org/10.1073/pnas.2019053118
- Cascarina S.M., Ross E.D. // J. Biol. Chem. 2022.
 V. 298. P. 101677.

https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101677.

- Perdikari T.M., Murthy A.C., Ryan V.H., Watters S., Naik M.T., Fawzi N.L. // EMBO J. 2020. V. 39. P. e106478. https://doi.org/10.15252/embj.2020106478
- Iserman C., Roden C.A., Boerneke M.A., Sealfon R.S.G., McLaughlin G.A., Jungreis I., Fritch E.J., Hou Y.J., Ekena J., Weidmann C.A., Theesfeld C.L., Kellis M., Troyanskaya O.G., Baric R.S., Sheahan T.P., Weeks K.M., Gladfelter A.S. // Mol Cell. 2020. V. 80. P. 1078–1091. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.041
- Zheng X., Peng Q., Wang L., Zhang X., Huang L., Wang J., Qin Z. // Int. J. Biol. Sci. 2020. V. 16. P. 2442– 2453.

https://doi.org/10.7150/ijbs.46751

2025

 Fargason T., De Silva N.I.U., King E., Zhang Z., Paul T., Shariq J., Zaharias S., Zhang J. // Elife. 2023. V. 12. P. e84412. https://doi.org/10.7554/eLife.84412

- Hermanson G.T. // Bioconjugate Techniques, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier BV, 2013. https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/ bioconjugate-techniques
- Koniev O., Wagner A. // Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. P. 5495–5551.

https://doi.org/10.1039/c5cs00048c

- Svetlova J., Gustin D., Manuvera V., Shirokov D., Shokina V., Prusakov K., Aldarov K., Kharlampieva D., Matyushkina D., Bespyatykh J., Varizhuk A., Lazarev V., Vedekhina T. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 13220. https://doi.org/10.3390/ijms232113220
- Matyushkina D., Shokina V., Tikhonova P., Manuvera V., Shirokov D., Kharlampieva D., Lazarev V., Varizhuk A., Vedekhina T., Pavlenko A., Penkin L., Arapidi G., Pavlov K., Pushkar D., Kolontarev K., Rumyantsev A., Rumyantsev S., Rychkova L., Govorun V. // Viruses. 2022. V. 14. P. 1141.

https://doi.org/10.3390/v14061141
26. Hong Y., Najafi S., Casey T., Shea J.E., Han S.I., Hwang D.S. // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 7326.

https://doi.org/10.1038/s41467-022-35001-1

- Roden C.A, Dai Y., Giannetti C.A., Seim I., Lee M., Rachel Sealfon, McLaughlin G.A., Boerneke M.A., Iserman C., Wey S.A., Ekena J.L., Troyanskaya O.G., Weeks K.M., You L., Chilkoti A., Gladfelter A.S. // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. P. 8168–8192. https://doi.org/10.1093/nar/gkac596
- Kurreck J. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 1911– 1918.

https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911

- Svetlova J., Knizhnik E., Manuvera V., Severov V., Shirokov D., Grafskaia E., Bobrovsky P., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Kozlovskaya L., Miropolskaya N., Aralov A., Khodarovich Y., Tsvetkov V., Kochetkov S., Lazarev V., Varizhuk A. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 15281. https://doi.org/10.3390/ijms232315281
- Пелевин Е.Е., Балясный С.В. // Juvenis Scientia. 2017. № 1. Р. 4–7. https://doi.org/10.15643/JSCIENTIA.2017.1.001
- Gallois B., Candelier R. // PLoS Comput. Biol. 2021.
 V. 17. P. e1008697. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008697

31

Quantitative Analysis of Biomolecular Condensates on a Modified Support

A. S. Shtork*, Iu. I. Pavlova*, J. I. Svetlova*, M. S. Iudin*, E. N. Grafskaia*, V. A. Manuvera*, S. E. Alieva*, A. M. Varizhuk*, V. N. Lazarev*, and T. S. Vedekhina*, **, #

[#]*Phone:* +7 (915) 289-95-66; *e-mail:* vedekhina.ts@rcpcm.ru

* Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia ** MIREA — Russian technological university, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

Biomolecular condensates are associates of biopolymers formed in aqueous solutions via "liquid-liquid" phase separation. Aberrant phase transitions of proteins or nucleic acids underlie several pathologies, and the need for their *in vitro* models stimulates the development of methods for biocondensate investigation. This work addresses the key problem of visualizing labeled protein-RNA condensates using fluorescence microscopy. The SARS-CoV-2 N-protein with a C-terminal hexahistidine tag was expressed in Escherichia coli BL21-Gold(DE3) and isolated by metal chelate chromatography. The N-protein was labeled with the RED dye, which emits fluorescence in the far-red range of the spectrum, using the RED-NHS dye. Commercially available RNA isolated from Torula yeast was used as random RNA to obtain condensates with the N-protein and SR-rich peptide. In experiments to test the colocalization of the condensate components. a labeled modified oligonucleotide forming an SL4 hairpin with an elongated stem was added to the random RNA. To obtain the APTES substrate, chemically polished glass was treated with 3-aminopropyltriethoxysilane in ethyl alcohol at pH 4.5–5.5. To obtain the DSC-APTES substrate, the APTES substrate was additionally functionalized by treating with NN'-disuccinimidyl carbonate in the presence of diisopropylethylamine in anhydrous acetone. Quantitative assessment of condensate formation was performed using fluorescence microscopy data. The FastTrack program was used to assess droplet mobility. The Droplet Calc program was used to assess the droplet area and curvature coefficient. The mobility of the condensates in a sample layer on glass complicates data processing. In previous studies, condensate immobilization on 3-aminopropyltriethoxysilane-treated glass (APTES), was proposed to overcome this problem. The APTES support allows non-covalent RNA/DNA binding but is suboptimal for proteins. By treating APTES with N, N'-disuccinimidyl carbonate, we obtained an alternative support, DSC-APTES, which allows covalent binding of protein fragments via lysine residues. A comparative analysis of known condensates on the abovementioned supports revealed their decreased mobility on APTES/DSC-APTES, and the optimal type of support modification depended on the condensate composition. Condensate immobilization improved image quality, and increased the colocalization of the oligonucleotide and protein components. It also facilitated the quantitative analysis of the phase separation based on the condensate fractions. New software, Droplet_Calc, was developed to automate condensate identification and fraction calculation. The results confirmed the advantages of APTES and DSC-APTES over glass when analyzing the concentration dependence of the condensate fraction and creating phase diagrams. Thus, the optimization of the support and the automation of image processing pave the way for rapid and reliable quantitative analysis of biopolymer phase transitions, which may find application in the screening of therapeutic agents disrupting pathogenic condensates.

Keywords: biomolecular condensates, liquid-liquid phase separation, APTES, N-protein, RNA