

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»



На правах рукописи

Кудрявцев Александр Николаевич

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ
ЛЮЦИФЕРАЗЫ В ИММУНОАНАЛИЗЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
Франк Людмила Алексеевна

Красноярск – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ КАК РЕПОРТЁРЫ В ИММУНОАНАЛИЗЕ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Структурно-функциональные особенности целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем	13
1.2 Рекombинантные люциферазы Renilla как репортёры в анализе <i>in vitro</i>	20
1.3 Люциферазы Metridia и Gaussia, примеры использования в качестве репортеров в анализе <i>in vitro</i>	25
1.4 Люцифераза NanoLuc в анализе <i>in vitro</i>	28
1.4.1 Полноразмерная NanoLuc как репортер в молекулярном анализе <i>in vitro</i>	30
1.4.2 Однофазный биолюминесцентный молекулярный анализ на основе гибридных производных комплементирующих фрагментов NanoLuc.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Оборудование.....	43
2.2 Реактивы и реагенты.....	44
2.3 Получение биомассы рекombинантных клеток <i>E. coli</i> , синтезирующих целевые гибридные белки	47
2.4 Получение гибридных белков, включающих миниантитело 14D5a и люциферазу Rm7, а также 14D5a и фрагменты люциферазы NLuc	47
2.5 Получение гибридных белков, включающих белок prED3 и фрагменты люциферазы NLuc	48
2.6 Определение кинетических параметров биолюминесцентной реакции гибридного белка 14D5a-Rm7.....	48

2.7 Анализ связывания гибридного белка 14D5a-Rm7 с рекомбинантным белком E.....	49
2.8 Выявление вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом сэндвич типа.....	50
2.9 Анализ связывания домена sc14D5a (Ab) в составе гибридов NLucL-Ab, Ab-NLucL, Ab-NLucS, NLucS-Ab с белком E конкурентным биолюминесцентным твердофазным анализом	50
2.10 Анализ сборки фрагментов и восстановления биолюминесцентной активности люциферазы NLuc при сорбировании эквимоллярных смесей гибридных белков антитело sc14D5a–фрагмент люциферазы NLuc на поверхности, активированной белком DE3.....	51
2.11 Модельный однофазный биолюминесцентный иммуноанализ prED3 сэндвич типа.....	51
2.12 Анализ связывания домена prED3 в составе гибридов с фрагментами люциферазы NLuc со специфичными антителами.....	52
2.13 Определение биолюминесцентной активности эквимоллярных смесей гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NLuc и антитело sc14D5a либо белок prED3.....	52
2.14 Определение кинетических параметров биолюминесцентной реакции комплекса sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL	53
2.15 Анализ связывания белков в комплексе sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL...	53
2.16 Гомогенный биолюминесцентный анализ конкурентного типа ВКЭ-ассоциированных мишеней (белок ED3, вакцина Клещ-Э-ВАК, экстракты природный клещей)	54
2.17 Получение лиофилизированных смесей, готовых для иммуноанализа ВКЭ и их характеристика.....	54
2.18 Приготовление и хранение активированных микропланшетов.....	56

2.19 Приготовление и хранение лиофилизированных образцов СВР и 14D5a-Rm7	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	57
3.1 Получение и свойства новых гибридных белков – биоспецифичных репортеров для биолюминесцентного иммуноанализа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).....	57
3.1.1 Получение гибридного белка 14D5a-Rm7.....	58
3.1.2 Каталитическая активность домена люциферазы в составе гибрида 14D5a-Rm7.....	60
3.1.3 Анализ связывания домена миниантитела 14D5a с мишенью.	63
3.1.4 Получение гибридных белков Ab-NLucL, Ab-NLucS, NLucL-Ab, NLucS-Ab	65
3.1.5 Связывание домена антител в полученных гибридных белках с мишенью.....	65
3.1.6 Исследование сборки на твердой фазе фрагментов люциферазы NLuc	67
3.1.7 Получение гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NLuc и белок prED3 в разной последовательности.....	68
3.1.8 Биолюминесценция бинарных смесей гибридных белков включающих разные комбинации доменов 14D5a, prED3, NLucS, NLucL	70
3.2 Биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ И ВКЭ-ассоциированных мишеней.....	75
3.2.1 Твердофазный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка 14D5a-Rm7.....	75
3.2.2 Тестирование образцов природных клещей.....	77

3.2.3 Гомогенный биолюминесцентный иммуноанализ на основе гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NanoLuc.....	80
3.2.4 Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа.....	81
3.2.5 Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа.....	84
3.2.6 Создание лиофилизированного реагента, готового к использованию для одностадийного тестирования клещей	85
3.2.7 Стабильность компонентов биолюминесцентного анализа в различных условиях хранения.	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Создание новых высокочувствительных и специфичных аналитических систем, способных отвечать на постоянно возникающие вызовы современной биотехнологии, биомедицины, эпидемиологии и других направлений, является важнейшей задачей современной фундаментальной и прикладной науки. В этом аспекте исследования, проводимые в Институте биофизики СО РАН на протяжении почти 50 лет по изучению морской биolumинесценции и разработке способов ее применения в аналитике, являются актуальными: ферментативные реакции, лежащие в основе биolumинесцентных процессов и обладающие высоким квантовым выходом, способны обеспечивать высокую чувствительность анализа.

Основой одной из биolumинесцентных систем известных на сегодня светящихся морских организмов, являются люциферазы, использующие в качестве субстрата одно и то же соединение – производное имидазолпиразинона, так называемый целентеразин, CTZ (от англ. coelenterazine, люциферин Coelenterata [1]) или его близкие аналоги. Несмотря на существенные структурно-функциональные различия и принадлежность к различным таксонам (целентеразин как субстрат обнаружен у кишечнополостных, копепод, остракод, рыб и других животных), люциферазы этих организмов объединяют в одну группу целентеразин-зависимых люцифераз [2]). Это, как правило, сравнительно небольшие одноцепочечные белки – ферменты, катализирующие реакцию окислительного декарбоксилирования субстрата, продуктами которой являются CO_2 и целентерамид в возбужденном состоянии. Переход в основное состояние сопровождается излучением кванта голубого света ($\lambda_{\text{max}}=470\text{-}490\text{ нм}$). Различают 2 типа целентеразин-зависимых люцифераз – а) ферменты, катализирующие окисление целентеразина молекулярным кислородом по кинетике Михаэлиса-Ментен и б) Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, представляющие собой стабильный фермент-субстратный комплекс из белковой глобулы и предокисленного целентеразина, иммобилизованного в ее гидрофобной полости.

Биолюминесцентная реакция возникает при присоединении ионов Ca^{2+} по трем кальций-связывающим сайтам этого белка и имеет характер однократной кратковременной вспышки. Гены многих целентеразин-зависимых люцифераз и фотопротеинов клонированы, получены их рекомбинантные аналоги, определены пространственные структуры белков, синтезированы целентеразин и множество его химических аналогов. С помощью генетической инженерии получено большое семейство белков с новыми полезными свойствами, в том числе варианты с измененными характеристиками биолюминесцентного сигнала, а также гибридные белки, представляющие собой люциферазы, генетически слитые с биоспецифическими полипептидами (антигенами, антителами и пр.).

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является инфекционным агентом тяжелейшего нейрозаболевания – клещевого энцефалита, поражающего центральную нервную систему и отличающегося полиморфизмом клинического течения. Он переносится иксодовыми клещами, ареал распространения которых вся лесная и лесостепная зона умеренного пояса Евразийского континента, в том числе Сибирский регион Российской Федерации, Китай и Монголия. Современная эпидемиологическая ситуация в отношении клещевого энцефалита характеризуется значительным ростом заболеваемости в России, и в мире [3].

Поскольку высокоэффективные этиотропные препараты для лечения КЭ до сих пор не созданы, единственной стратегией снижения заболеваемости КЭ является массовая вакцинопрофилактика населения эндемичных регионов [4].

Несмотря на то, что вакцинация считается наиболее надежным способом защиты от этой инфекции – разработаны эффективные и доступные вакцины против ВКЭ для взрослых и детей, ее уровень в европейских странах (около 25%) и России (менее 10%) остается недостаточным. Между тем в России количество обращений по поводу укусов клещей остается стабильно высоким и в период 2022-24 г. составил около полумиллиона в год [3].

Экстренная профилактика клещевого энцефалита, рутинно применяемая в России в качестве постконтактной профилактики для невакцинированных

укушенных пациентов, включает введение препарата иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, полученного из сыворотки донорской крови. Однако она сопряжена с определенными биологическими рисками и часто не рекомендуется. Вместе с тем показано, что в среднем носителями вируса клещевого энцефалита являются лишь 5-10 % клещей. В связи с этим возникает необходимость выявления вируса у клещей, что могло бы существенно снизить вероятность возможных осложнений, связанных с необоснованной иммунопрофилактикой, и стать основой для своевременного терапевтического вмешательства.

Несмотря на наличие коммерческих аналитических систем для выявления ВКЭ колориметрическим иммуноанализом или на основе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), известными производителями которых в России являются такие биотехнологические компании как Вектор-Бест и Микроген, задача разработки подходов, обеспечивающих быстрый и достоверный анализ, пригодный для рутинного применения, в том числе во внелабораторных условиях, остается актуальной.

Целью исследования являлось создание систем биолюминесцентного иммунологического микроанализа вируса клещевого энцефалита в клещах с использованием преимуществ репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи:**

- 1 Разработать способ получения целевых репортерных белков – гибридных производных генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, изучить их свойства как потенциальных репортерных белков для выявления ВКЭ биолюминесцентным иммуноанализом.
- 2 Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гетерогенным биолюминесцентным иммуноанализом с использованием гибридного производного генетически модифицированной люциферазы *Renilla muelleri* в

качестве метки и оценить пригодность этого способа для тестирования природных клещей.

3. Разработать способ выявления ВКЭ в клещах гомогенным биолюминесцентным иммуноанализом на основе гибридных производных искусственной люциферазы NLuc и исследовать возможности его применения для экспрессного тестирования природных клещей.

4. Разработать готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты реакционной смеси, для однофазного биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны способы получения высокоочищенных препаратов генетически-модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, генетически слитых с иммуноглобулинами или антигенами, изучены свойства этих гибридных белков как репортеров для иммуноанализа ВКЭ.

2. Биолюминесцентный твердофазный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка генетически модифицированной люциферазы Rm7 и миниантитела sc14D5a позволяет выявлять вирус с диагностической чувствительностью 100% и специфичностью 98,9%.

3. Однофазный конкурентный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc позволяет достоверно выявлять вирус в инфицированных природных клещах ($p=0,000013$, $N=86$).

4. Разработан и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты для однофазного биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Научная новизна. Получены и исследованы свойства ряда новых бифункциональных гибридных белков. Установлена перспективность их использования для быстрого выявления ВКЭ микропланшетным

биолюминесцентным иммуноанализом. Разработан и испытан способ тестирования клещей однофазным биолюминесцентным иммуноанализом, пригодный для использования во внелабораторных условиях. Получен готовый к использованию лиофилизированный реагент, позволяющий одностадийно выявлять наличие ВКЭ в экстракте клеща.

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны эффективные способы получения бифункциональных гибридных белков, обладающих свойствами исходных полипептидов – люцифераз, антител или антигенов. Получены препараты новых гибридных белков высокой степени чистоты и изучены их свойства: кинетические параметры биолюминесцентной реакции люциферазных доменов, аффинные свойства доменов анти-ВКЭ миниантитела и его антигенной детерминанты – рекомбинантного белка prED3.

Разработан способ твердофазного иммуноанализа ВКЭ в клещах на основе гибридного белка sc14D5a-Rm7 и проведены его успешные испытания при тестировании природных клещей.

Продemonстрирован эффект комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесцентной реакции при сборке иммунокомплекса биоспецифичных доменов гибридных белков – анти-ВКЭ миниантитела и белка prED3. На основе выявленного эффекта разработан дизайн биолюминесцентного однофазного конкурентного иммуноанализа по выявлению ВКЭ.

Получен готовый к использованию реагент, включающий контрольные и рабочие смеси гибридных белков и субстрат люциферазы. Показана его применимость для достоверного выявления ВКЭ однофазным биолюминесцентным анализом.

Все результаты получены впервые и могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолюминесцентных диагностикумов для выявления ВКЭ в клещах как в санитарно-

эпидемиологических лабораториях, так и в полевых условиях. Предложенный подход однофазного анализа на основе комплементации фрагментов люциферазы NLuc может быть использован для детекции других молекулярных мишеней путем замены биоспецифических доменов гибридных белков-репортеров.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом данных, а также выполнением работы с использованием современных методов исследования и статистического анализа.

Результаты работы были представлены в виде докладов и тезисов на следующих научных конференциях: 19-ом Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Цукуба, Япония, 2016); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019); 9-ом съезде Российского фотобиологического общества (п. Шепси, 2021); Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022); 13-ой международной научной конференции «Биокатализ: фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023); на семинарах лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Исследования проводили при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-240648); Сибирского отделения Российской академии наук в рамках Междисциплинарного интеграционного проекта № 139 и государственного бюджета, выделенного на

фундаментальные исследования в Российской академии наук: проекты № VI 57.1.1, № 0356-2016-0712 и № 0287-2022-0002.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе: 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов (Scopus, WoS, Белый список) и рекомендованных ВАК; 8 публикаций в сборниках докладов научных конференций; 4 патента РФ.

Структура и объем работы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (172 источника, из них 163 иностранных). Диссертационная работа содержит 7 таблиц и 40 рисунков.

Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология: Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология по п. 7. Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии; п. 22. Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства (биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов.

ГЛАВА 1. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ КАК РЕПОРТЁРЫ В ИММУНОАНАЛИЗЕ.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структурно-функциональные особенности целентеразин-зависимых биolumинесцентных систем

Функционирование биolumинесцентных систем большинства известных морских животных основано на реакции окисления молекулярным кислородом одного и того же субстрата — целентеразина (coelenterazine, CTZ), катализируемой ферментом люциферазой. Несмотря на разнообразие структур и механизмов функционирования, эти ферменты можно объединить в общую группу, называемую целентеразин-зависимыми люциферазами. Наряду с глубоким и всесторонним фундаментальным изучением этих систем разрабатываются подходы и методы их практического использования в качестве высокочувствительных репортёров в аналитике. Исследования, направленные на создание искусственных люцифераз и синтетических аналогов CTZ с новыми уникальными свойствами, привели к разработке новых экспериментальных аналитических методов на их основе. Коммерческая доступность множества готовых к использованию тест-систем на основе CTZ-зависимых люцифераз также важна при их выборе начинающими пользователями. В настоящее время ведутся интенсивные работы по созданию аналитических методов на основе этих биolumинесцентных систем. Описано их успешное применение в различных областях биологических исследований, что подтверждает их роль как мощного аналитического инструмента. В данном обзоре рассматриваются основные направления, результаты и достижения в исследованиях с использованием этих люцифераз.

Не будет большим преувеличением сказать, что большинство известных к настоящему времени светящихся организмов являются морскими обитателями. Это представители разных таксонов, с биolumинесцентными системами разной

степени сложности, с разными механизмами биолюминесцентных реакций. Тем не менее, как уже упоминалось, в большинстве этих биолюминесцентных систем в качестве субстрата (люциферина) используются соединения со схожей химической структурой, содержащие скелет имидазопиразинона, чаще всего целентеразин (рисунок 1.1.). История его открытия, сведения о распространении, свойства и реакции изложены в недавно переизданной книге О. Shimomura [5].

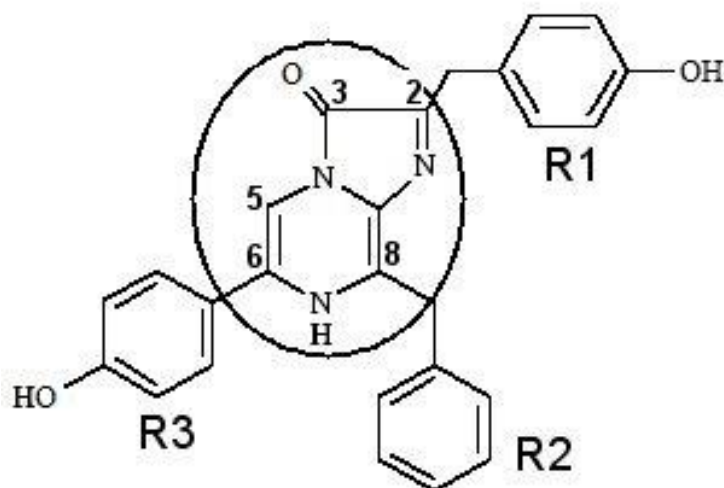


Рис.1.1. 2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидроксифенил)-8-бензил-3,7-дигидроимидазо (1,2-а)пирозин-3-он—целентеразин (CTZ), мол масса 423,5. Имидазопиразиноновый скелет выделен окружностью [6].

CTZ-зависимые люциферазы представлены двумя существенно различными типами — люциферазами и фотопротеинами, биолюминесценция которых зависит от Ca^{2+} (так называемые Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, PhP). Первые катализируют окисление CTZ молекулярным кислородом в соответствии с классическим взаимодействием фермент-субстрат с образованием целентерамида (coelenteramide, CTM, декарбоксилированное производное CTZ), CO_2 и кванта синего света. Фотопротеины представляют собой стабильный нековалентный комплекс из апобелка и предокисленного целентеразина (2-пероксицелентеразина). В аминокислотной последовательности апобелка находятся три кальций-связывающих сайта EF-hand типа. Присоединение ионов Ca^{2+} приводит к быстрому декарбоксилированию субстрата с выделением избытка

энергии в виде света. Конечными продуктами реакции являются комплекс целентерамид–апобелок–3 Ca^{2+} и квант голубого цвета.

Люциферазы и фотопротеины различных организмов хорошо изучены, их кДНК клонированы, получены рекомбинантные аналоги, а также множество генетически модифицированных вариантов с новыми улучшенными свойствами [7, 8].

По общему мнению, биолюминесценция является жизненно важной адаптацией, выработанной в ходе эволюции. Поскольку проницаемость мембраны для CTZ достаточно высока [9], этот субстрат может быть распределен по всему организму. Поддержание биолюминесцентной системы в «готовом к действию» режиме реализуется в нескольких вариантах (Рис. 1.2.):

А) В биолюминесцентных системах веслоногих рачков *Metridia* или *Gaussia* люцифераза и CTZ хранятся отдельно в специальных секреторных железах и при необходимости впрыскиваются в воду, где они смешиваются, образуя светящееся облако, обманывающее или отпугивающее хищника.

Б) В биолюминесцентной системе мягкого коралла *Renilla* целентеразин «упакован» в гидрофобной полости Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка (СВР) [10]. Когда ионы кальция связываются с СВР субстрат становится доступным для окисления, катализируемое люциферазой *Renilla* [11]. В экспериментах *in vitro* было показано, что СВР в качестве субстрата обеспечивает более высокую эффективность биолюминесценции по сравнению со свободным CTZ, возможно, из-за образования комплекса СВР–люцифераза–ионы кальция [11]. Следует отметить, что благодаря устойчивости к спонтанному окислению целентеразина, локализованного в СВР, этот белок оказался полезным при аналитическом применении этой формы субстрата [12–14].

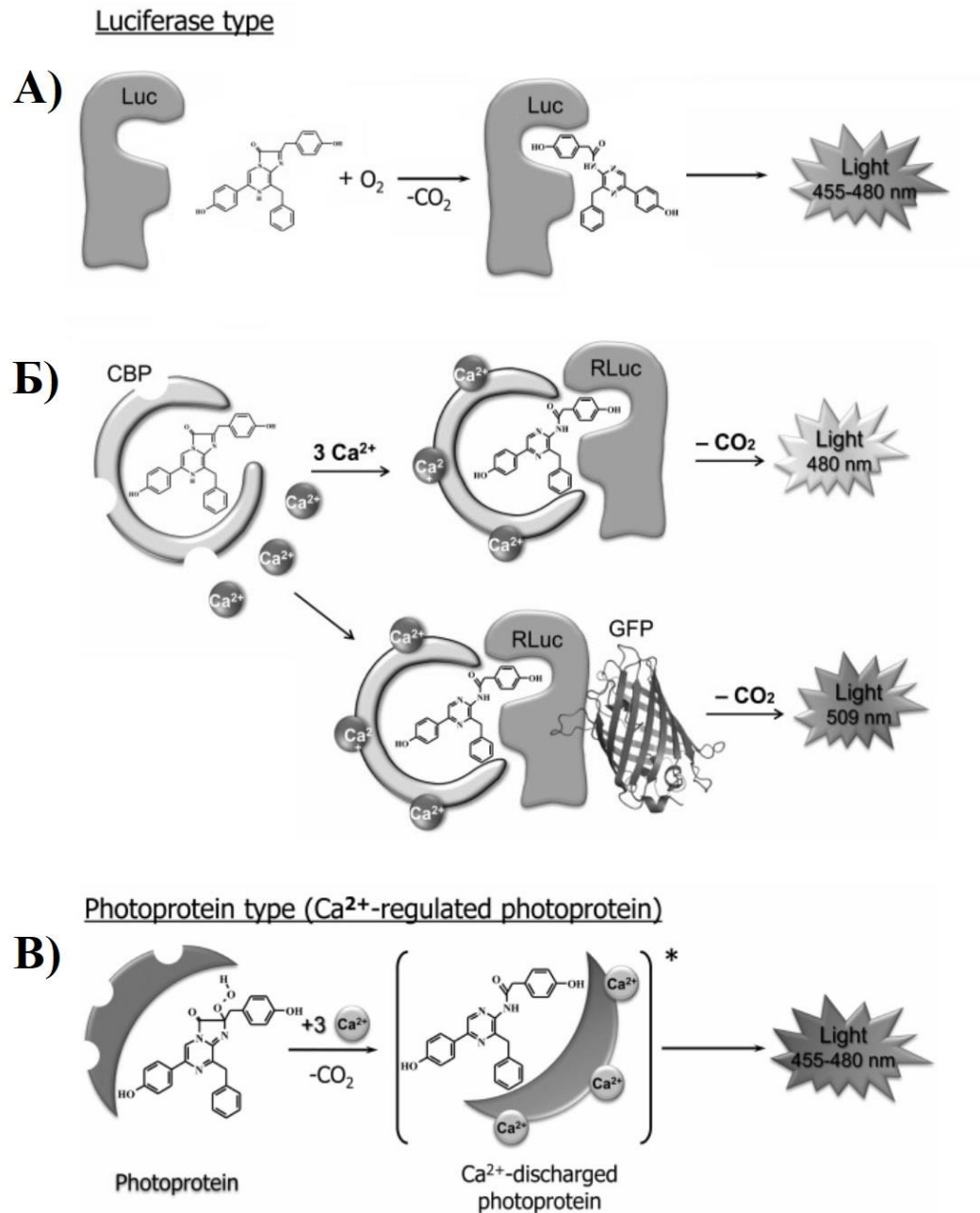


Рис. 1.2. Схемы биOLUMиНЕСЦЕНТНЫХ РЕАКЦИЙ ЛЮЦИФЕРАЗНОГО (А, Б) И ФОТОПРОТЕИНОВОГО (В) ТИПОВ. [по 15, с изменениями].

В) БиOLUMиНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ *Aequoria*, *Obelia*, *Clytia*, *Verreauxia* и других представлена Ca^{2+} -регулируемыми фотопротеинами — фермент-субстратными комплексами, где биOLUMиНЕСЦЕНЦИЯ ВОЗНИКАЕТ ПОД КОНТРОЛЕМ ИОНОВ Ca^{2+} , КОНЦЕНТРАЦИЯ КОТОРЫХ ПОВЫШАЕТСЯ ПРИ НЕРВНОЙ

стимуляции, возникает при нервном раздражении, которое передается потоком Ca^{2+} .

Все природные CTZ-зависимые люциферазы излучают синий свет с максимумами при 460–480 нм, поскольку излучателем во всех случаях является молекула целентерамида (или его близкие производные) в возбужденном состоянии [5]. Однако биолюминесцентные системы многих кишечнорастворимых содержат молекулу-переизлучатель, спектр флуоресценции которой смещен в более длинноволновую часть, вследствие чего животные светятся зелёным цветом. Эта молекула была открыта в 1961 г. лауреатом Нобелевской премии японо-американским ученым О. Shimomura при изучении биолюминесцентной системы медузы *Aequorea aequorea* и получила название «зелёный флуоресцентный белок» (green fluorescent protein, GFP) [16]. Позже GFP был обнаружен и в других организмах (например, в медузе *Clytia* и мягком коралле *Renilla*). Пространственная структура белка представляет собой β -бочонок, внутри которого содержится хромофор, который спонтанно образуется при окислении трёх аминокислот (Ser65, Tyr66 и Gly67) [17, 18]. Световая энергия, высвобождаемая при окислении целентеразина, передается GFP, флуоресценция которого наблюдается в более длинноволновом диапазоне. Этот процесс реализуется посредством резонансного переноса энергии флуоресценции (биолюминесценции) (FRET/BRET), и который лежит в основе многих современных методов исследования (Рис. 1.3.). После того как кДНК GFP была клонирована [19], и получен рекомбинантный белок экспрессией в бактериальных и эукариотических клетках [20, 21] в живых организмах, полезность этого белка в качестве маркера *in vivo* стала очевидной. Несомненная важность GFP для биомедицинских исследований активировала разработку его рекомбинантных форм с улучшенными свойствами (более яркие, другие спектры излучения и т. д.). В настоящее время количество публикаций об этом белке и его применении огромно. За открытие и исследование GFP в 2008 г. была присуждена Нобелевская премия по химии группе учёных – О. Shimomura, М. Chalfie и Р. Tsien.

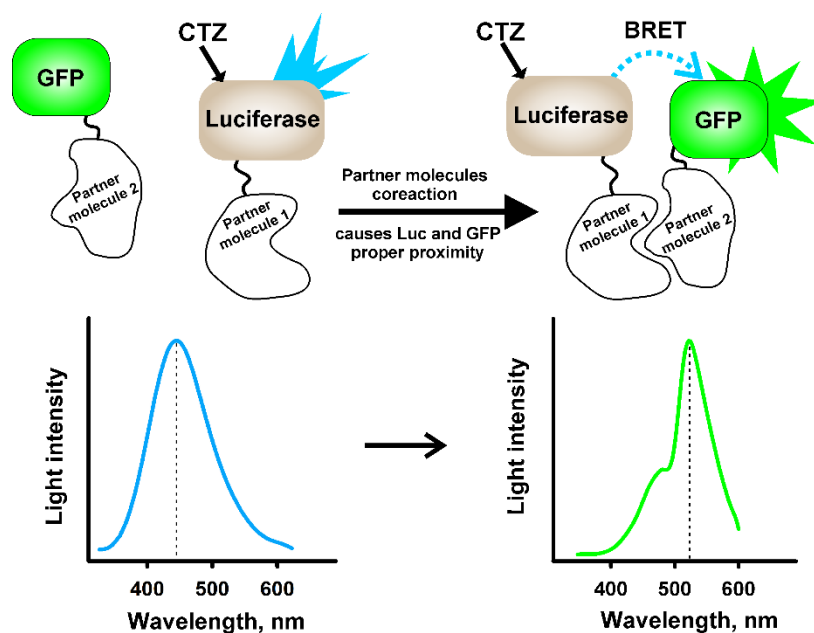


Рис. 1.3. Принцип методов на основе явления BRET [6].

Химическая структура целентеразина природного типа была определена, и молекула химически синтезирована в середине 1960-х – 1970-х годов [22]. Фундаментальный интерес к явлению билюминесценции, его механизму и стремление изменить его характеристики привели к разработке новых синтетических молекул, подобных целентеразину. Часть исследований была направлена на поиск вариантов, которые демонстрируют улучшенный или измененный билюминесцентный сигнал. На сегодняшний день синтезированы и протестированы на применимость в качестве субстратов сотни вариантов CTZ. Особый интерес представляли варианты CTZ, обеспечивающие альтернативные спектры и кинетику билюминесценции, будучи при этом более стабильными при хранении [23–26]. Все аналоги целентеразина сохраняют скелет молекулы и различаются структурами радикалов R1, R2 и R3 (Рис. 1.1.). Многие из вариантов CTZ демонстрируют хорошие перспективы для практического применения и коммерчески доступны. Так, например, вариант DeepBlueC (рис. 1.4.B) излучает синий цвет в реакции и с NanoLuc и с RLuc. Пик спектра билюминесценции, смещается в более коротковолновую область ($\lambda_{\max} = 400$ нм), что позволяет более эффективно использовать это излучение в резонансной передаче энергии флуоресцентным белкам в системах BRET.

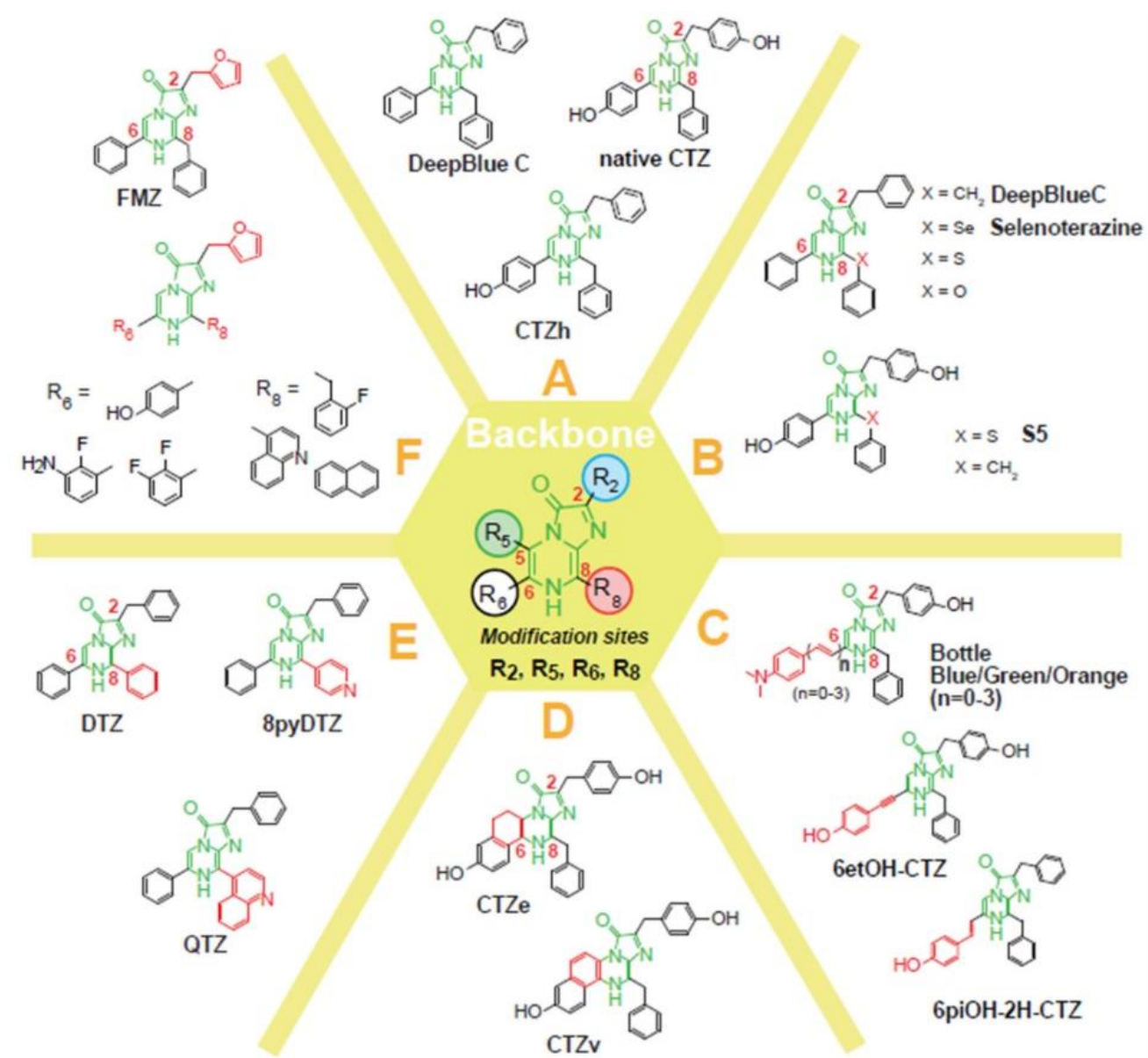


Рис. 1.4. Структуры химических аналогов CTZ (27, обзор 2025 г.). Положения C-2, C-5, C-6 и C-8 основной цепи были модифицированы для улучшения оптических свойств. Группы: (A) представляет исторически старые и структурно простые химические аналоги CTZ; (B) показывает аналоги CTZ со специфическим заместителем в радикале C-8; (C) содержит аналоги CTZ с увеличенной π-системой в позиции C-6; (D) представляет аналоги CTZ с мостиком, соединяющим позиции C-5 и C-6; (E) содержит модифицированные радикалы в положениях 6 и 8 одновременно; (F) представляет варианты субстрата фуримазина (FMZ), предложенного в качестве эффективного субстрата искусственной люциферазы NanoLuc [27].

В обзоре 2025 г. Kim et al. попытались перечислить и систематизировать разнообразие синтезированных химически вариантов CTZ [27]. Они объединили их в несколько групп, содержащих аналогичные модификации (Рис. 1.4.). Как

показал анализ эффектов на биолюминесценцию, многие аналоги групп В-Г способствуют смещению спектра биолюминесценции в красную область, а аналоги групп С-Г приводят к эффекту специфичности для некоторых люцифераз, что позволяет использовать их для многорепортёрных систем анализа [27].

В целом, СТЗ-зависимые люциферазы представляют собой относительно небольшие, как правило одноцепочечные, белки с молекулярной массой от 36 (люцифераза *Renilla*, RLuc) [28]) до 16,5 кДа (одна из изоформ люциферазы веслоногого рачка *Metridia longa* [29]). Применение репортёрных белков в молекулярном анализе предполагает их модификацию – присоединение молекулярного адреса (антитела, антигена, олигонуклеотида и пр.) для обеспечения специфичности анализа. Показано, что люциферазы, нестабильны к химическим модификациям и в процессе синтеза биоспецифических конъюгатов могут терять до 60% исходной биолюминесцентной активности (см., например, [30]). Для преодоления этой проблемы было разработано несколько оригинальных подходов. Так, были разработаны методы биоортогональной конъюгации или фотоконъюгации для получения конъюгатов люцифераза-антитело, которые обеспечивали бы высокий выход конъюгата, контроль над местом конъюгации и стехиометрией, а также сохранение активности люциферазы [31, 32]. Однако аналитическое применение люцифераз в большинстве случаев основано на биолюминесценции их производных, удлинённых биоспецифическими полипептидами, полученными путём генетического слияния. Ниже рассмотрим конкретные примеры применения целентеразин-зависимых люцифераз как специфичных репортёров в молекулярном анализе.

1.2 Рекомбинантные люциферазы *Renilla* как репортёры

в анализе *in vitro*

Люцифераза мягкого коралла *Renilla reniformis* – мономерный белок, состоящий из 314 аминокислот (37 кДа), была впервые выделена и

охарактеризована Karkhanis и Cormier в 1971 г. [33]. Люминесцентная реакция люциферазы имеет оптимум при pH=7,4, при температуре 32°C, спектр эмиссии имеет максимум при 480 нм [28]. Кодирующая люциферазу кДНК, а также рекомбинантный вариант этого белка были получены Lorenz et al. в 1991 г. [28].

Ген, кодирующий люциферазу коралла другого вида – *Renilla muelleri* (36 кДа), а также ген, кодирующий её Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок (CBP), были клонированы, соответствующие рекомбинантные белки получены и изучены их свойства в работе Titushin et al. в 2007 г. [34].

Люциферазы *Renilla*, являются наиболее ранними из изученных, они активно использовались в качестве репортёров, особенно с 2006 г., когда с помощью мутагенеза был получен вариант RLuc8 со значительно повышенными стабильностью и квантовым выходом биолюминесценции [35].

Биоспецифичные производные люцифераз *Renilla* получали, как правило, генетическим фьюзингом. В качестве сенсорного компонента гибридов использовали различные биоспецифические полипептиды — антитела или их фрагменты [36–39], антигены [40–43], полипептиды с особой связывающей способностью [44–47] и др. На основе феномена сборки производных расщеплённых фрагментов люциферазы с восстановлением биолюминесцентной активности разработано несколько подходов гомогенного анализа [48–54], а также для изучения белок-белковых или белок-лигандных взаимодействий [55–58], активности белков [59, 60] и процесса фолдинга белка [61, 62].

Оригинальный аналитический подход был предложен в работе Krasitskaya et al. [13]. Для одновременного выявления двух мишеней в образце в качестве меток использовали два Ca^{2+} -зависимых белка — фотопротеин обелин и CBP. Их химически конъюгировали с антителами к молекулам-мишеням (репродуктивным гормонам, лютеинизирующему ЛН и фолликулостимулирующему FSH). Твердофазный иммуноанализ проводили по схеме, приведенной на Рис. 1.5. Быстрый биолюминесцентный сигнал обелии новой метки регистрировали при добавлении Ca^{2+} , а медленный — при внесении раствора люциферазы в те же

лунки. Биолюминесцентный сигнал люциферазы, количественно отражающий присутствие FSH возникал в результате наличия в системе ионов Ca^{2+} и CBP.

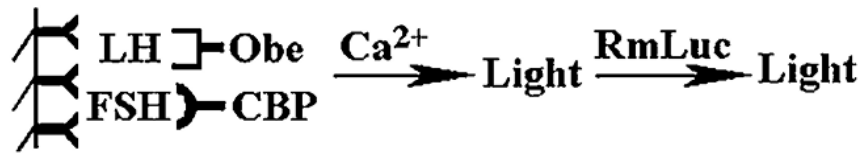


Рис. 1.5. Одновременный твердофазный иммуноанализ на основе 2-х Ca^{2+} -зависимых белков – обелина (Obe) и CBP. RmLuc – люцифераза *Renilla muelleri*.

Ниже приводим несколько примеров применения люцифераз *Renilla* как высокочувствительного репортера опубликованных за последние 5-7 лет.

Sakono et al. предложили конкурентный иммуноанализ амилоидного бетта-пептида A/3 (диагностическая молекулярная мишень болезни Альцгеймера). Ими был сконструирован и бактериальным синтезом получен гибрид этого пептида с люциферазой *Renilla*. В модельном анализе этот гибрид конкурировал с бетта-пептидом A/3 за связывание с иммобилизованными анти-A/3 антителами. Биолюминесцентный сигнал комплексов на поверхности определяли при добавлении h-целентеразина. Показано, что полученную обратную зависимость от концентрации A/3 можно применять для диагностирования заболевания [63].

Burbelo et al. разработали подход под названием «Люциферазная иммуноосаждающая система» (Luciferase immunoprecipitation system, LIPS) [64], схема которой представлена на Рис. 1.6. для количественного определения специфичных антител в биологических образцах. Образец, содержащий аутоантитела, инкубируют с гибридом люцифераза-антиген, а затем полученные комплексы осаждают на магнитных частицах, активированных белками A/G. Комплексы проявляют по биолюминесценции при добавлении субстрата. Например, при аутоиммунном интерстициальном заболевании легких были сконструированы новые гибридные белки люцифераз с антигенами для обнаружения характерных для этого заболевания аутоантител против ряда белков: MDA5 (IFIH-1), PL7 (TARS1), PL12 (AARS1), EJ (GARS1), KS (NARS1), На

(YARS1), OJ (IARS1), Zo (FARS1), ABLIM (актин-связывающий белок LIM 1) и CDH5R (кадгерин-5). Во всех конструкциях белки были слиты с люциферазой Renilla по С-концу, за исключением CDH5R, который был получен в виде N-концевого гибрида с люциферазой Gaussia. Авторы продемонстрировали, что LIPS может достоверно обнаруживать и количественно определять многочисленные миозит-специфические, миозит-ассоциированные и другие аутоантитела, связанные с заболеваниями легких, и может количественно определять широкий диапазон уровней аутоантител у пациентов с идиопатическими воспалительными миопатиями и с болезнью Шегрена [65].

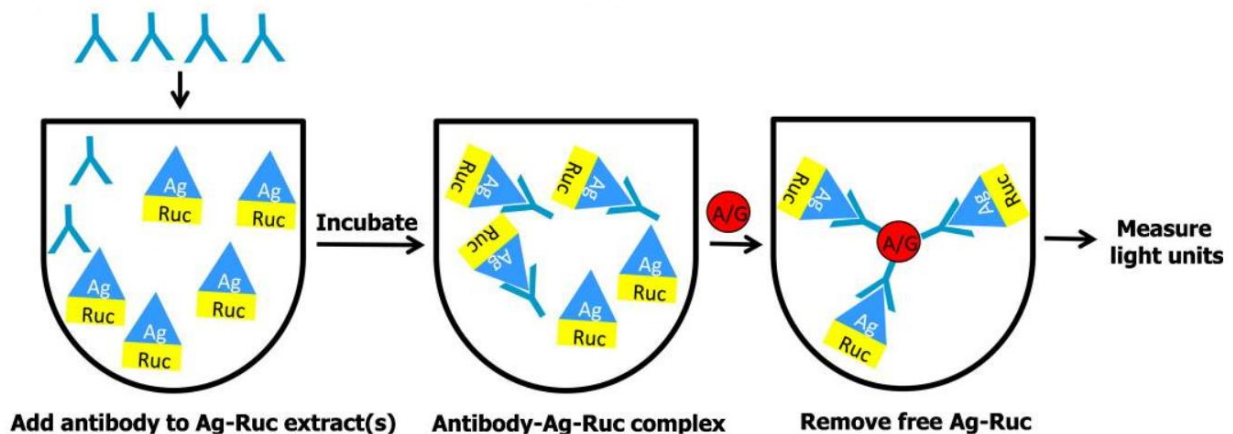


Рис. 1.6. Выявление аутоантител с помощью «Люциферазной иммуноосаждающей системы» (Luciferase immunoprecipitation system, LIPS) для выявления аутоантител [66]. Ag – антиген; Ruc – люцифераза Renilla; красные шарики – магнитные частицы, активированные белками A/G.

Shi et al. использовали систему анализа LIPS для выявления аутоантитела к TSPAN7A, которое является недавно обнаруженным аутоантителом поджелудочной железы и имеет потенциальную диагностическую ценность при аутоиммунном диабете при исследованиях больных сахарным диабетом 1-го типа [67]. Для анализа был сконструирован гибридный белок люцифераза-тетраспанин 7. Авторы пришли к выводу, что комбинированное тестирование на антитела к

TSPAN7A повышает выявляемость заболевания до 85% и представляет ценность для улучшения диагностики аутоиммунного сахарного диабета 1 типа.

Анализ на основе эффекта BRET с использованием RLuc в качестве донора энергии стал популярным с конца 1990-х годов и применялся для изучения белок-белковых взаимодействий и конформационных перестроек в живых клетках [68–70], для неинвазивной биовизуализации [71] и в качестве зондов для биосенсорики [48, 72].

Так, например, Stumpf et al. разработали несколько биосенсоров eBRET2 для количественного определения фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Рис 1.7). Сенсоры состояли из мутантной люциферазы Renilla (RLuc8) с N-конца и зеленого флуоресцентного белка (GFP2) с C-конца, соединенных через разные домены, аффинные к VEGF. В зависимости от конструкции связывающих доменов, были получены разные пределы обнаружения VEGF – от 4 нг/мл до 500 нг/мл и определены оптимальные конструкции [72].

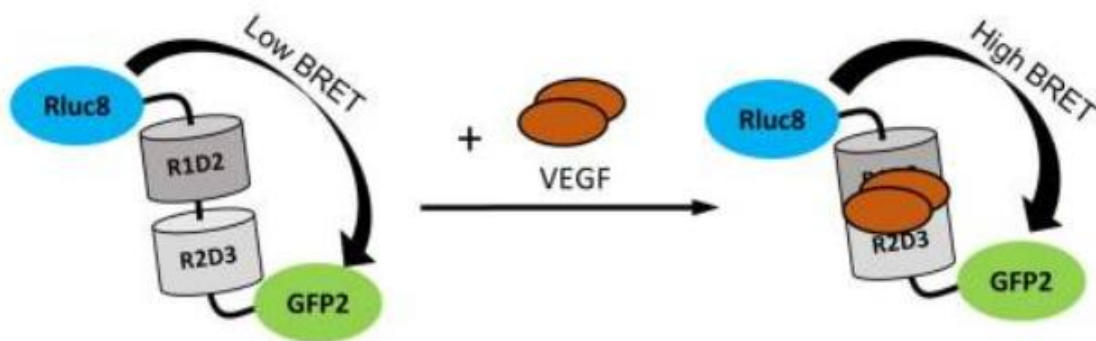


Рис. 1.7. Принцип работы биосенсора eBRET2 для выявления VEGF. Конформационное изменение после связывания VEGF приводит к более эффективной передаче энергии и, следовательно, к более высокому сигналу BRET в зависимости от концентрации VEGF [72].

Чувствительность анализов на основе BRET была существенно улучшена благодаря разработке новых молекул-участников BRET. В качестве доноров были

получены варианты RLuc2 и RLuc8 с улучшенными квантовым выходом, стабильностью и яркостью [73]. В качестве акцепторов были разработаны разнообразные варианты GFP: GFP2, YFP, Venus, mOrange, TagRFP, TurboFP, а также полупроводниковые квантовые точки или углеродные точки [74–76], что позволило эффективнее разделить спектры акцепторов и доноров, существенно сместив спектр переизлучения в красную область.

Однако, как показывают литературные данные, гибридные производные люциферазы RLuc нашли основное применение в качестве генетических репортерных белков. Этот подход стал бесценным и рутинным инструментом для молекулярно-биологических исследований. Они включают идентификацию и характеристику функциональных вариантов белков [77, 78]; исследование экспрессии генов [78–81]; факторов транскрипции [82–86]; активности рецепторов [87, 88]; экспрессию микроРНК [89–91]; мониторинг событий сплайсинга мРНК в клетках [92, 93]; исследование вирусов [94–102]; открытие новых лекарств [103, 104]; и идентификацию и оценку ингибиторов вирусов [105–111].

1.3 Люциферазы *Metridia* и *Gaussia*, примеры использования в качестве репортеров в анализе *in vitro*

Люцифераза морского веслоногого рачка *Gaussia princeps* – это мономерный белок, состоящий из 185 аминокислот (19,9 кДа). Люминесцентная реакция рекомбинантной люциферазы имеет оптимум при pH = 7,7 с эмиссией голубого света ($\lambda_{\max}$ =470 нм) [112, 113].

Люциферазы рачка *Metridia longa*, были изучены в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН: авторами были клонированы гены, кодирующие 4-е изоформы люциферазы рачков *Metridia longa*, получены соответствующие рекомбинантные белки и изучены их свойства. Это мономерные белки, с молекулярной массой от 23,9 до 16,5 кДа (кстати, это наименьшая из известных на сегодняшний день природных люцифераз), люминесцентная

реакция которых сопровождается эмиссией голубого света ($\lambda_{\max}=485$ нм) [114–116].

Хотя свойства этих люцифераз все еще недостаточно изучены, они привлекают внимание как перспективные репортеры из-за небольшого размера, уникальной термостабильности и наличия генетически закодированной системы секреции. Это делает их идеальными репортерами для приложений *in vivo*, предоставляя возможность мониторинга клеточных событий посредством измерения биолюминесценции в культуральных средах без лизиса клеток (см., напр., [117, 118]).

Необходимо отметить, что люциферазы копепод *Metridia* и *Gaussia* в своем составе имеют по 10 цистеиновых остатков, образующих, очевидно до 5 дисульфидных связей. Это обстоятельство существенно затрудняет корректный фолдинг люциферазы при использовании бактериальных систем экспрессии. Однако, с другой стороны, очевидно, именно оно обуславливает высокую стабильность этих белков.

Тем не менее, в литературе имеется информация о применении люцифераз копепод в анализе *in vitro*, где, как правило, биоспецифичные метки получают генетическим фьюзингом с другими полипептидами (напр., антителами). Так, люцифераза *Metridia* MLuc7 (16,5 кДа) используется как биолюминесцентный репортёр для обнаружения вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в виде гибридного белка с анти-ВКЭ миниантителом [46]. В твердофазном модельном анализе рекомбинантного гликопротеина Е чувствительность составила 45 пг.

Peltomaa et al. использовали гибрид пептидомиметика (GWWGPYGEIELL) с люциферазой *Gaussia* (GW-GLuc), для обнаружения микотоксинов в конкурентном иммуноанализе без необходимости во вторичных антителах. Количество микотоксина зеараленона (ZEA) в образце определялось путем конкурентного связывания между ZEA и пептидомиметиком в составе гибрида GW-GLuc с антителами против ZEA. В свою очередь, эти антитела были иммобилизованы на магнитных микрошариках, активированных белком G (Рис.

1.8.). Шарики с образованными на поверхности комплексами отделяли магнитной сепарацией и измеряли биолюминесцентный сигнал люциферазы при добавлении субстрата. Этот биолюминесцентный сенсор позволил определить ZEA с пределом обнаружения 4,2 нг/мл [119].

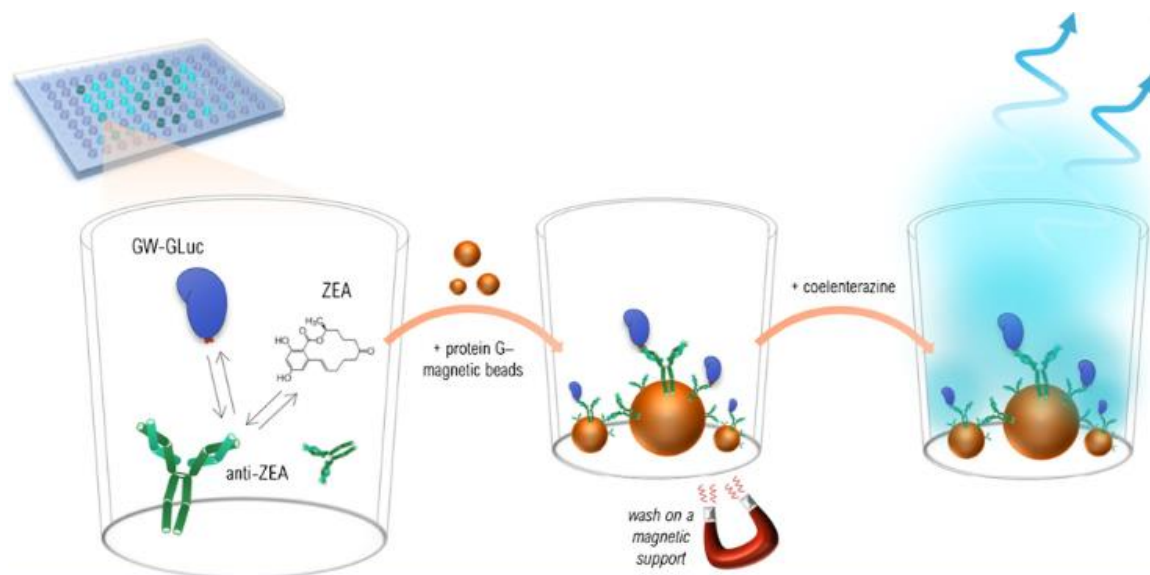


Рис. 1.8. Обнаружение микотоксина ZEA конкурентным иммуноанализом [119].

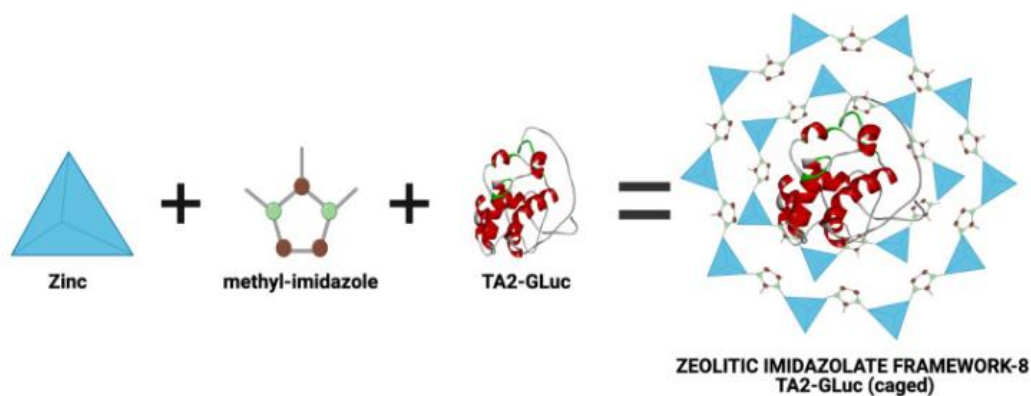


Рис. 1.9. Инкапсуляция тамавидин-Gluc (TA2-Gluc) в металлоорганическом каркасе (ZIF-8) [120].

В работе Reyes et al. разработан биолюминесцентный анализ по выявлению антигена – шипа S1 вируса SARS-CoV2 с использованием гибридного белка тамавидин-Gluc, где тамавидин – авидин-подобный белок Tam-avidin2, Gluc – люцифераза Gaussia. В ходе исследования они показали, что инкапсуляция

гибридного белка в металл-органическую оболочку (Рис. 1.9.), позволяет сохранять этот репортёрный белок при комнатной температуре в течение более 6 месяцев и успешно использовать его в качестве репортёра для анализа [120].

1.4 Люцифераза NanoLuc в анализе *in vitro*

Особый интерес представляет искусственная люцифераза, разработанная недавно сотрудниками фирмы Promega Co и названная NanoLuc из-за ее небольшого размера в 19 кДа. Нативная люцифераза глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* состоит из двух полипептидов: небольшой субъединицы в 19 кДа (OLuc-19), которая отвечает за биолюминесцентную активность, но нестабильна в отсутствие большой субъединицы в 35 кДа. Структурная оптимизация OLuc-19 после трех раундов случайного мутагенеза дала стабильный фермент с заменой 16 аминокислот. Удельная активность его свечения почти в 81 000 раз больше, чем у исходного OLuc-19, и в 5 раз больше, чем у RLuc (при тех же условиях реакции) [23]. Новый разработанный вариант целентеразина, представленный в той же статье — фуримазин (Рис. 1.4.F) — повышает уровень биолюминесценции почти в 25 раз по сравнению с целентеразином и обеспечивает долговременный сигнал ($t_{1/2} = 2,5$ ч) с максимумом спектра излучения при 460 нм. Коммерческая доступность NanoLuc, ее расщепленных (сплит) вариантов, способных при принудительном сближении к восстановлению биолюминесценции, а также фуримазина, способствовали широкому спектру их применения в качестве универсального и гибкого аналитического инструмента. Обзор England et al. 2016 г. (всего через 4 года после первой публикации о NanoLuc) выделил пять основных областей успешного использования системы, а именно для: изучения взаимодействий белок-белок и белок-лиганд, изучения регуляции генов и клеточной сигнализации, мониторинга стабильности белков и использования в качестве биосенсоров на основе BRET и биолюминесцентной визуализации [121]. Система становится все более популярной: на Рис 1.10.

показан рост количества публикаций с применением этой люциферазы по данным PubMed.

В рамках обзора приведем некоторые недавние публикации, описывающие принципиально новые аналитические системы на основе этой люциферазы. В целом они используются в тех же областях исследований, что и люцифераза Renilla, но успешно конкурируют с последней благодаря существенно меньшей молекулярной массе и коммерческой доступности различных вариантов этого фермента, предоставляемых Promega Co вместе с руководствами для пользователя. К названиям таких систем часто добавляется приставка Nano (NanoBRET, NanoBiT и т. д.).

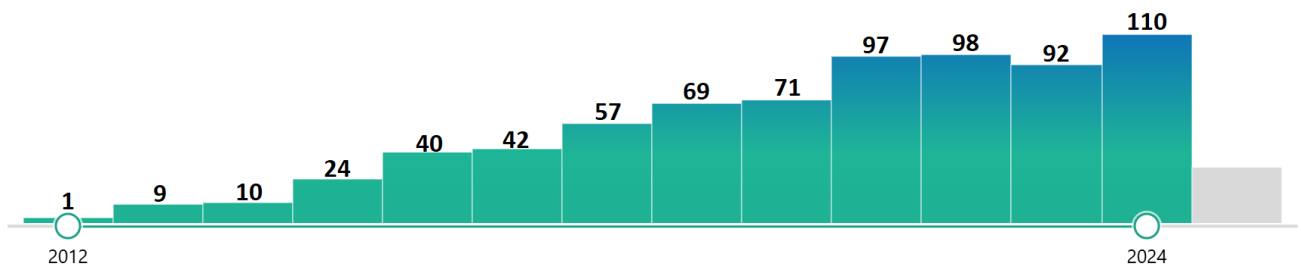


Рис. 1.10. Рост числа публикаций авторов, использующих NanoLuc в своих исследованиях, данные с сайта PubMed.

Структурно-функциональное устройство этой люциферазы, обеспечивающее ее уникальные каталитические свойства, вызывает естественный интерес. Недавно Nemergut et al. исследовали механизм люциферазной реакции NanoLuc и показали, что люциферины связываются с внутренним каталитическим сайтом, а также с аллостерическим сайтом, сформированным на поверхности фермента. Посредством согласованных конформационных изменений связывание продукта реакции с аллостерическим сайтом предотвращает одновременное связывание субстрата с каталитическим сайтом, и наоборот. Генетические модификации аллостерического сайта позволили авторам увеличить каталитическую эффективность взаимодействия NanoLuc с естественным

субстратом – целентеразином более чем на порядок и приблизить ее к эффективности реакции с фуримазином, что подтверждает гипотезу авторов о механизме реакции NanoLuc [122].

1.4.1 Полноразмерная NanoLuc как репортер в молекулярном анализе *in vitro*

Подобно другим люциферазам, NanoLuc теряет свою биолюминесцентную активность при химическом конъюгировании с биоспецифическими молекулами. Поэтому получение биоспецифичных меток на ее основе получают путём генетического слияния с биоспецифическими полипептидами — антителами или антигенами.

Рассмотрим несколько примеров использования гибридных белков NanoLuc-антитело в иммуноанализе различных антигенов, опубликованных за последние 5 лет.

В исследовании W. Ren et al. NanoLuc генетически слили с афлатоксин-специфическим нанотелом G8, полученным фаговым дисплеем. Слитый белок был применён в качестве метки в одношаговом конкурентном биолюминесцентном иммуноанализе для обнаружения афлатоксина В1 в злаках, который показал более чем 20-кратное улучшение чувствительности по сравнению с классическим ИФА [123]. В работе [124] Y Kiguchi et al. удалось увеличить чувствительность иммуноанализа кортизола на несколько порядков по сравнению с колориметрическим анализом с помощью сконструированных гибридных белков, включающих новые более аффинные одноцепочечные антитела и NanoLuc. В своём исследовании Q. He et al. получили ряд одноцепочечных фрагментов антител к ферритину (серологическому биомаркеру заболеваний печени и рака). С наиболее аффинным из них был сконструирован гибрид с NanoLuc и на его основе разработан иммуноанализ ферритина, предел обнаружения которого составил 0,93 нг/мл, что почти в 2 раза ниже, чем у ELISA [125]. В работе Zhao et al. был разработан метод анализа опиоидов (фентанила и его аналогов) в моче человека. В качестве метки использовали конструкцию,

включающую полноразмерное антитело и NanoLuc. Авторы выявляли опиоиды с пределом обнаружения 0,8 пг/мл и временем анализа, не превышающем 1ч. [126].

В период пандемии в связи с острой необходимостью был разработан ряд подходов для выявления SARS-CoV-2. P.S. Los Santos et al. предложили набор для определения этого вируса, включающий гибрид наноантитела к его нуклеокапсиду и NanoLuc. Предел обнаружения нуклеокапсида составил 61 пг/мл, чувствительность 78,7% и специфичность 100,0% [127]. Ещё один метод определения SARS-CoV-2 предложили Y Yan et al. в работе [128], где они использовали гибрид NanoLuc с одноцепочечным миниантителом к нуклеокапсиду, полученному фаговым дисплеем. Высокочувствительный биолюминесцентный иммуноанализ, достигал предела обнаружения ниже 0,1 пмоль [128].

В статье [129], Н. Oyama et al. напрямую сравнили различные гибридные белки фрагмента одноцепочечного миниантитела к тироксину (гормон Т4) с NanoLuc, люциферазой Gaussia и щелочной фосфатазой для выявления тироксина и комплекса тироксина с альбумином. Для гибрида scFv-NLuc был показан существенно более низкий предел обнаружения тироксина – 0.67 пг, что в 9.3 и 6.3 раза ниже по сравнению с гибридами с люциферазой Gaussia и щелочной фосфатазой, соответственно.

Гибридные метки с NanoLuc получают и с антигенами, когда они представляют собой полипептид для обнаружения соответствующих антител.

NanoLuc, слитую с антигенами вируса ВИЧ-1, белками p24 или gp41, применили для качественного и количественного обнаружения антител к ВИЧ-1 в сыворотке человека с чувствительностью, превышающей чувствительность ИФА в 104 раза [130]. Похожий анализ использовался для обнаружения антител, специфичных к человеческому норовирусу [131] или аутоантител, направленных против проинсулина/инсулина, что важно для диагностики диабета 1 типа [132]. A. Luque-Uria et al. разработали конкурентный иммуноанализ микофеноловой кислоты (МФК, иммунодепрессант, обычно используемый для предотвращения

отторжения органов у пациентов после трансплантации). Фаговым дисплеем отобрали наилучший пептидный миметик МФК, и получили гибрид этого пептида с NanoLuc. Анализа на основе этой биолюминесцентной метки позволил детектировать МФК с пределом обнаружения 0,26 нг/мл [133]. Генетический гибрид нуклеопротеина SARS-CoV-2 с NanoLuc использовали для определения наличия антител в образцах сыворотки и плазмы [134].

S. Nandy et al. получили высокочувствительную универсальную метку для определения иммуноглобулинов, включающую IgG-связывающий домен Z стафилококкового белка A и люциферазу NanoLuc. Этот белок использовали для количественного определения IgG к нуклеопротеину SARS-CoV-2 в твердофазном анализе, где этот антиген был иммобилизован на поверхности. Предел обнаружения анти-SARS-CoV-2 антител составил 10 пг/мл [135].

Оригинальный подход к получению конструкции NanoLuc с фрагментами ДНК как биоспецифическим доменом метки описан в работе M. Mie et al. [136]. Люцифераза была генетически слита с каталитическим доменом белка-инициатора репликации (pRep) из свиного цирковируса типа 2. Антитромбиновый ДНК-аптамер, удлинённый олигонуклеотидом распознавания pRep, был синтезирован химически. Стабильный нековалентный комплекс ДНК-NanoLuc был получен путём смешивания этих двух соединений. Комплекс использовали в качестве метки в модельном сэндвич-твердофазном анализе тромбина, предел обнаружения которого составил 0,1 нМ. Ценность этого метода заключается в том, что, в принципе, его можно применять для синтеза многих других комплексов ДНК-люцифераза.

Для исследования бактериального загрязнения среды был предложен способ на основе фагов. В работе Hinkley et al. был генетически сконструирован колифаг T7 для экспрессии NanoLuc, который использовали в качестве биолюминесцентного индикатора загрязнения клетками *E. coli* [137]. В этой конструкции NanoLuc была слита с модулем связывания углеводов (CBM), обеспечивая специфическое связывание репортера с кристаллической

целлюлозой. Сконструированный фаг инфицировал *E. coli* в образце воды (если таковой имелся), что приводило к экспрессии NanoLuc-CBM. Гибрид необратимо иммобилизовался на частицах целлюлозы, которые добавляли в образец и собирали центрифугированием или фиксировали на целлюлозной мембране фильтрацией. Биолюминесценция репортера измерялась при добавлении субстрата. Анализ на основе фага демонстрирует его значительную диагностическую ценность для недорогого, быстрого и чувствительного обнаружения *E. coli* в питьевой воде [137]. Благодаря присущей фагам специфичности к соответствующим бактериям можно разработать подход для обнаружения других бактериальных загрязнителей. Так, похожий подход использовался для определения бактериального загрязнения в сыре [138].

Генетическое слияние имеет преимущество, поскольку позволяет создавать гомогенные конъюгаты с чётко определённой стехиометрией антитело-люцифераза. Однако оно требует клонирования для каждого нового конъюгата антитело-люцифераза и часто включает в себя громоздкую оптимизацию экспрессии и доступ к системам экспрессии млекопитающих. Кроме того, с его помощью можно получать только гибриды с биоспецифичными фрагментами полипептидной природы. Поиск путей получения биоконъюгатов люцифераза-непептидный специфичный фрагмент (олигонуклеотид, гаптен и пр.) весьма актуальны.

Wouters et al. сообщили о легкодоступном, эффективном и хемоселективном методе синтеза конъюгатов антитело-люцифераза. [32]. NanoLuc была генетически слита с доменом белка G, содержащим фотосшивающуюся неприродную аминокислоту пара-бензоилфенилаланин (разработанную J.Z. Hui et al. [139]), которая может быть «сшита» с антителом под воздействием УФ-облучения (365 нм). Метод не требует клонирования или рекомбинантной экспрессии антител и может быть напрямую применён практически ко всем человеческим и многим млекопитающим моноклональным антителам IgG.

Полученные конъюгаты NanoLuc-антитело использовались в иммуноокрашивании клеток, твердофазном иммуноанализе и вестерн-блоттинге [32].

Чтобы существенно расширить спектр специфичных меток на основе NanoLuc, Krasitskaya et al. было разработано производное люциферазы NLuc(C164S) LCTPSR, с заменой природного цистеина Cys164→Ser и генетически удлиненное с С-конца гексапептидом, несущим уникальный остаток Cys [140]. Биолюминесцентная активность и кинетика реакции практически не отличались от таковых интактной NanoLuc. С использованием уникального цистеинового остатка был разработан способ получения химических конъюгатов с олигонуклеотидами (в том числе аптамерами) и гаптенами, который можно применять для получения конъюгатов с любыми молекулами с доступными для синтеза первичными аминогруппами.

1.4.2 Однофазный биолюминесцентный молекулярный анализ на основе гибридных производных комплементирующих фрагментов NanoLuc

В 2016 г. A.S. Dixon et al. опубликовали работу, в которой предложена технология измерения взаимодействия белков в клетках [141]. В ее основе лежит так называемая система NanoBiT (NanoLuc Binary Technology[®]), состоящая из двух специально разработанных фрагментов NanoLuc — большой BiT (LgBit, 18 кДа) и малой BiT (SmBit, 1,3 кДа) Рис. 1.11. Эти субъединицы взаимодействуют очень слабо ($K_D = 190$ мкМ), поэтому их сборка в активный люминесцентный комплекс происходит только при взаимодействии отдельных белков-партнеров, с которыми они слиты генетически. В другом варианте, наоборот, система включает 11-аминокислотный пептид, HiBiT, с существенно более высоким сродством к LgBit ($K_D = 700$ пМ). Интересующий белок генетически сливают с HiBiT, и его экспрессию можно отслеживать с помощью биолюминесценции при комплементации с LgBit в присутствии фуримазина. Таким образом, в то время как SmBiT и LgBit применимы для обнаружения белок-белковых взаимодействий, HiBiT действует как метка обнаружения при комплементации с

LgBiT. Все составляющие компоненты, а также готовые аналитические наборы коммерчески доступны и поставляются фирмой Prolume Co (США).

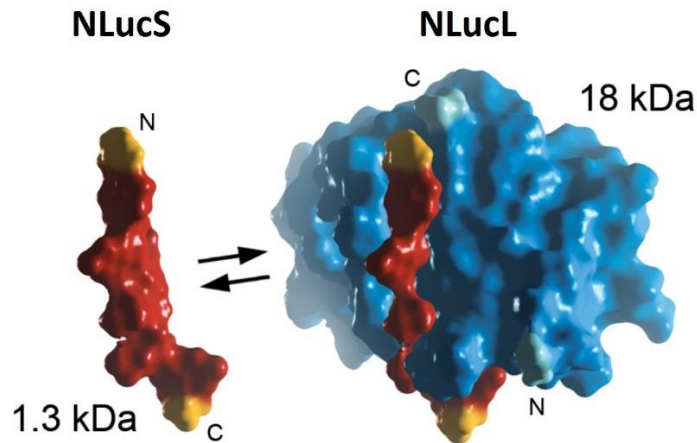


Рис. 1.11. Субъединицы NanoBiT: пептид NLucS 1,3 кДа, полипептид NLucL 18 кДа имеют слабую константу ассоциации [141].

Ранее подобные технологии расщепления были предложены для люцифераз светляков, шелконов или *Renilla* и использовались в качестве репортёров, которые демонстрируют чувствительные и обратимые сигналы. Однако, эти люциферазы не стабильны, а их эффективность восстановления биолюминесценции при сборке в комплекс не очень высока — обычно менее 1% (см., например, [55, 56, 142]). По этой причине применение анализа на основе комплементации фрагментов люцифераз в диагностике *in vitro* затруднен, несмотря на потенциал его использования в гомогенном анализе.

Система нашла широкое и разнообразное применение при разработке гомогенного биолюминесцентного анализа, в частности, для высокочувствительного выявления молекулярных мишеней в среде (к примеру, эпоксидгидролазы (sEH) — маркера многих заболеваний [143]), для быстрого поиска специфичных моноклональных антител [144], для определения константы диссоциации (Kd) взаимодействия антиген-антитело в растворе [145], для количественного определения активности ферментов (например, лизин

деацилирующей активности сиртуина [146]), для выявления токсинов (например, ботулинических нейротоксинов [147]), для изучения активности белков в зависимости от их конформационных состояний (например, белка Merlin – супрессора клеток пролифации [148]) и других исследований.

Анализ литературы показывает, что на основе эффекта коплементации расщепленной NanoLuc можно создавать аналитические системы, пригодные для применения не только в лабораторных условиях, но и по месту требования. Например, E. Bergeron et al. разработали гомогенный одностадийный mix-and-read («смешай и измерь») анализ для выявления антител к зоонозному вирусу Нипах (Nipah, NiV), вызывающему острый энцефалит. Для иммуноанализа сконструировали конъюгаты антигена с фрагментами люциферазы NiV-G–LgBiT и NiV–SmBiT, которые при наличии анти-NiV антител формировали комплекс, с коплементацией фрагментов люциферазы и восстановлением её биOLUMиНесцентной активности (Рис. 1.12.). Анализ более 700 образцов показал чувствительность (98,6%) и специфичность (100%), результаты были сопоставимы с эффективностью ELISA [149].

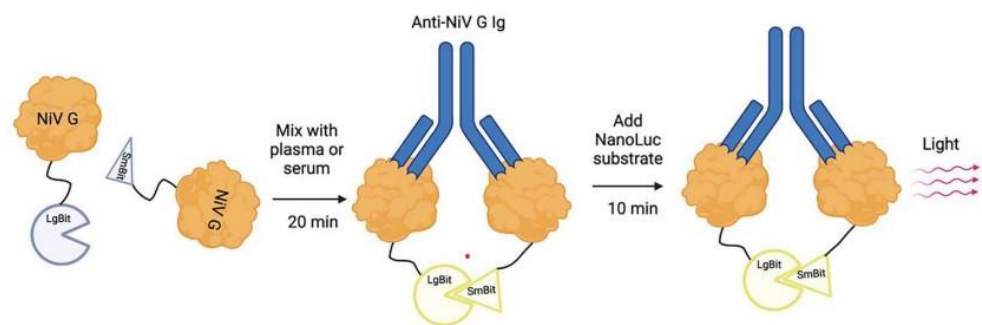


Рис. 1.12. Гомогенный анализ по выявлению антител к вирусу Нипах на основе NanoBiT системы [149].

Y. Ohmuro-Matsuyama и H. Ueda разработали гомогенный неконкурентный сэндвич-биOLUMиНесцентный иммуноанализ пептида остеокальцина на основе коплементации фрагментов белка NanoLuc [150]. Оказалось, что для их целей,

эффективность анализа на основе коммерческих фрагментов люциферазы недостаточна. Чтобы ее повысить, они дополнительно разделили LgBiT на две части, получив меньшее N-концевое производное (LnBiT) и два C-концевых пептида из 11 остатков (LcBiT и SmBiT), соответствующих последовательным бета-цепям белка (Рис. 1.13.). Эти фрагменты были слиты с переменными областями V_H и V_L антитела против остеокальцина соответственно.

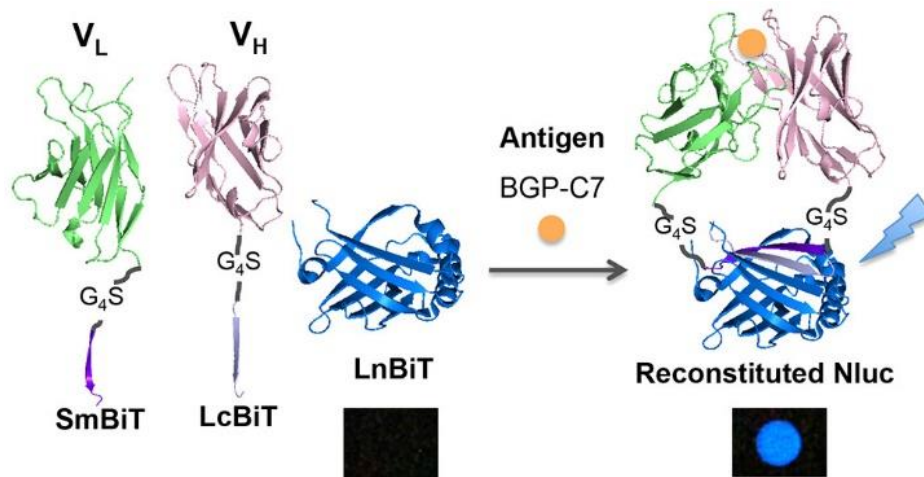


Рис. 1.13. Трехкомпонентная система однофазного гомогенного анализа мишени на основе комплементации фрагментов NanoLuc. BGP – bone Gla protein, остеокальцин [150].

Сборка комплекса LnBiT, V_H -LcBiT и V_L -SmBiT в присутствии мишени приводила к возникновению биolumинесценции, интенсивность которой зависела от количества пептида остеокальцина. Значение EC_{50} и предел обнаружения составили соответственно 123 ± 16 нМ и 5 нМ. Поскольку биolumинесцентный сигнал был достаточно сильным и стабильным и мог наблюдаться невооруженным глазом или цифровой камерой, авторы предложили полученную систему как основу для разработки других систем обнаружения, в том числе по месту оказания помощи.

Трехкомпонентный вариант анализа выглядит несколько сложнее, чем двухкомпонентный и менее популярен, однако имеет некоторые преимущества,

иногда обеспечивая, например, более высокую чувствительность детекции. Эти аспекты подробно рассмотрены в недавнем обзоре [151].

Особенно интересны работы по созданию универсальных аналитических платформ, когда для перехода к выявлению той или иной мишени требуются минимальные вариации комплектующих реагентов.

Y. Ni et al. разработали унифицированную платформу для выявления различных мишеней в гомогенной среде на основе NanoBiT системы, где Lg и Sm домены люциферазы «сшивали» с белком G с помощью фотоконъюгации (Рис.1.14. b) [152]. Полученные конъюгаты благодаря специфичности белка G способны легко присоединяться к Fc фрагментам любых иммуноглобулинов (Рис. 1.14. a).

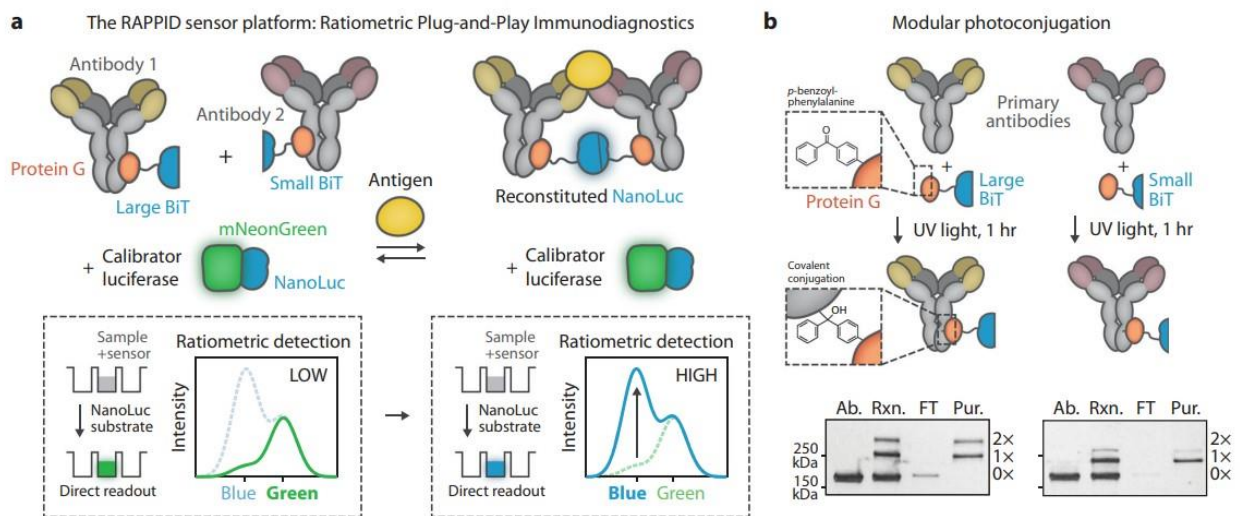


Рис. 1.14. Унифицированная платформа иммунодиагностики на основе NanoBiT системы [152].

В систему включен калибратор – гибридный белок NanoLuc с флуоресцентным акцептором mNeonGreen. Если в системе нет мишени, то при добавлении субстрата фуримазина наблюдается зелёное свечение калибратора. Если мишень есть, то образуется иммунореактивный комплекс, и реконструированная при

этом люцифераза излучает синий свет, перекрывая зелёный. Соотношение синего (при 458 нм) / зелёного (при 518 нм) свечений используют для количественного определения мишени. Универсальность платформы авторы продемонстрировали на примере высокочувствительного анализа кардиального тропонина I (предел обнаружения 4,2 пМ), С-реактивного белка (CRP) (предел обнаружения 4 мг/л), спайкового гликопротеина SARS-CoV-2 и других [152].

Ещё одна унифицированная аналитическая платформа предложена А. Quijano-Rubio et al. [153]. Биосенсор включает два белка (рис 1.15.). Один состоит из 2-х доменов – неизменного большого (Cage, «клетка») и малого (Latch, «замок») соединённых гибким линкером. В составе домена «замок» находится

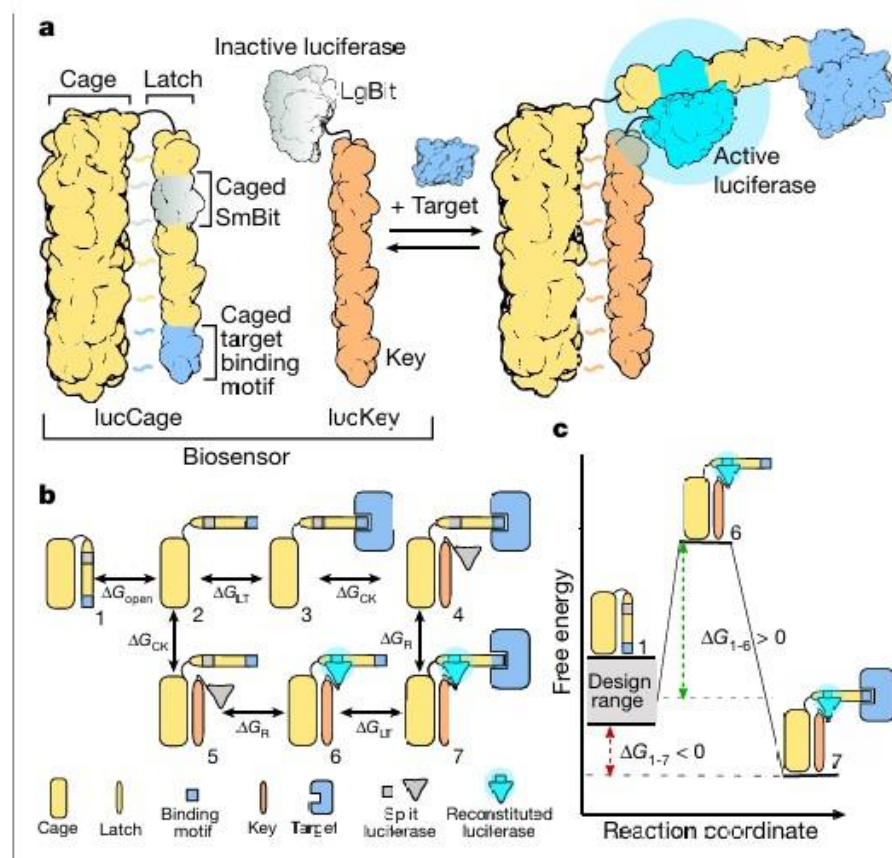


Рис. 1.15. Разработка модульного настраиваемого биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО биосенсора [153] (a) – общий дизайн биосенсора; (b, c) – образующиеся молекулярные комплексы и термодинамическая основа функционирования системы.

фрагмент люциферазы SmBiT, а также, на его конце – аффинный фрагмент, специфично «узнающий» и связывающий мишень, структура которого меняется в зависимости от мишени. Эти два домена иммобилизованы относительно друг друга сетью водородных связей, образуемых боковыми радикалами входящих в их состав аминокислот. Другой белок (Key, «ключ») состоит из домена люциферазы LgBiT и полипептида, также способного образовывать нековалентный комплекс с доменом «клетка». В присутствии мишени образуется комплекс с доменом «замок», который ослабляет взаимодействие между доменами – белок как бы «раскрывается». В этот момент второй белок сенсора образует более устойчивый комплекс с доменом «клетка», что приводит к сближению и комплементации фрагментов люциферазы с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесценции. Авторам удалось сконструировать аминокислотную последовательность «ключа» таким образом, чтобы в момент связывания с мишенью его связывание с «клеткой» было термодинамически более выгодным, чем с связывание с «замком».

Авторы продемонстрировали ряд биосенсоров, сконструированных на этой основе предназначенных для гомогенного анализа таких мишеней, как антиапоптозный белок BCL-2, домен Fc IgG1, рецептор HER2 и ботулинический нейротоксин В, сердечный тропонин I, антитела к вирусу гепатита В, вирус SARS-CoV-2 и антитела к нему, с высокой чувствительностью, необходимой для клинического обнаружения этих молекул (см. примеры на Рис. 1.16.).

Преимущества биолюминесцентных репортеров на основе целентеразин зависимых люцифераз позволяют своевременно отвечать на возникающие проблемы биомедицинской аналитики. Так, в ответ на пандемию были разработаны системы биолюминесцентного гомогенного неконкурентного открытого сэндвич-иммуноанализа направленные на быстрое выявление вируса SARS-CoV-2 [152, 154].

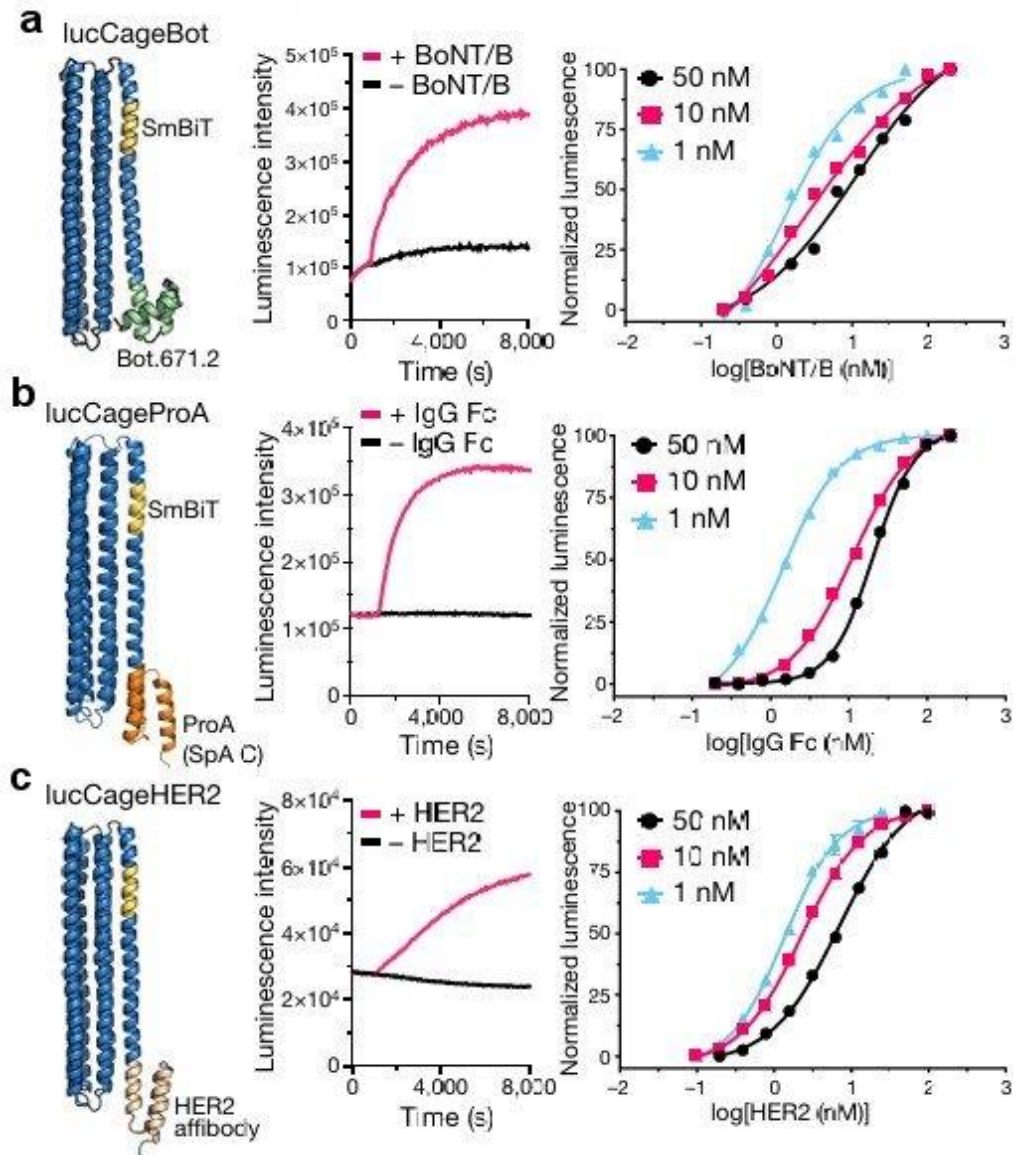


Рис. 1.16. Конструкции модульного биоломинесцентного биосенсора и результаты анализа по выявлению ботулистического нейротоксина (а), иммуноглобулина IgG (b), рецептора HER2 (c). Во всех случаях для каждого биосенсора меняется только аффинный фрагмент в домене «замок», специфично «узнающий» и связывающий мишень [153, с модификациями].

Анализ литературных данных по использованию целентеразин-зависимых люцифераз в качестве биоломинесцентных репортеров наглядно показывает, что они являются мощным аналитическим инструментом, способным решать широкий спектр исследовательских и прикладных задач. Мы перечислили ряд основных принципов аналитических методов и исследований, которые могут быть проведены на их основе. Ряд подходов стали общепринятыми и широко

используются, в то время как другие имеют большие перспективы для развития высокочувствительной и специфичной аналитики, необходимой в ответ на вызовы современной биомедицины, биотехнологии, аграрного сектора экономики, экологии.

Огромное количество разнообразных ферментов и их субстратов, в том числе искусственно созданных и коммерчески доступных, обладающих различными полезными свойствами, предоставляет экспериментатору реальную возможность выбора наиболее подходящего для его нужд варианта. В рамках данного обзора мы не упоминали о доступности современных фотометров — их многообразие и высокие аналитические характеристики способны удовлетворить самые высокие требования пользователей. Аналитические подходы и методы на основе этих биолюминесцентных систем позволяют успешно решать не только сугубо фундаментальные задачи современной биологии. Очевидна и их широкая внедрённость в практику биомедицинских и экологических лабораторий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: система видео документации (Alpha Innotech Corporation, США), двухлучевой спектрофотометр UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия), спектрофотометр SmartSpec Plus (BioRad), спектрофлуориметр AMINCO (Thermo Spectronic, США), ультразвуковой дезинтегратор UD-20 (Techran, Польша), планшетный ридер iMark (BioRad), термостатированный шейкер-инкубатор ThermoMixer C (Eppendorf).

При очистке апобелков использовали стандартное хроматографическое оборудование: системы AKTApurifier (GE Healthcare, Германия) и Biologic LP (Bio Rad, США). Гель-фильтрацию проводили на колонках D-salt desalting (Pierce, Швеция), Superose12 (GE Healthcare), Superdex 200 и Superdex 75 (Pharmacia, Швеция), ионообменную хроматографию – на колонках monoQ (GE Healthcare) и Hi Trap DEAE FF (GE Healthcare), металл-аффинную – на колонках HisTrap Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Германия), выделение стрептавидина – на смоле Iminobiotin Agarose (Pierce).

Биолюминесцентный сигнал люцифераз измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия) и люминометра (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск), калиброванного по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера (Hastings, Weber, 1963).

Для твердофазного иммуноанализа использовали непрозрачные 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Costar, США), непрозрачные стриповые 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Corning, США) и с высокой связывающей способностью (NEST, Китай). Промывку планшет проводили с помощью автоматического промывателя планшетов Аквамарин (сделано в ЕС для компании Вектор-Бест).

Низкотемпературный холодильник CryoCube F101h (Eppendorf), лиофильная сушилка BenchTop Pro (SP 85 Scientific, США)

2.2 Реактивы и реагенты

Плазмиды, содержащие генетические конструкции, кодирующие рекомбинантные белки, в том числе и гибридные, получены коллегами лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН к.б.н. Л.П. Бураковой, к.б.н. Е.Е. Денисовой (Башмаковой).

Природный и рекомбинантный белок E вируса клещевого энцефалита предоставлен сотрудниками федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики» (ИЦиГ СО РАН).

Моноклональные мышинные иммуноглобулины клоны 1B1 и 14D5 к белку E вируса клещевого энцефалита получены от ЗАО «БИОСАН», Россия.

Плазида, несущая ген люциферазы *NLuc*, кодон-оптимизированный для экспрессии в бактериальных клетках синтезирована фирмой Evrogen (Москва, Россия). Рекомбинантные штаммы *E. coli* получали стандартной процедурой трансформации компетентных клеток соответствующими плазмидами.

Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок *Renilla* (CBP), получен как описано в [34].

Белок prED3 (третий домен белка E, капсидного белка ВКЭ) получен по [155]; модифицированную люциферазу NanoLuc(C164S)LCTPSR – получали как описано в [140]; модифицированную люциферазу *Renilla muelleri* (Rm7) получали, как описано в работе [13].

Биотинилированное производное белка prED3 получали инкубированием с 50-кратным молярным избытком N-гидроксисукцинимидного эфира биотинамидогексановой кислоты (Sigma- Aldrich), 2 часа, при комнатной температуре в 0,1 М NaHCO_3 . Избыток реагента отделяли гельфильтрацией на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare) уравновешенной PBS.

Рекомбинантный стрептавидин получали экспрессией в созданном нами штамме-продуcente *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)/pET19b-SAV [156] разработанным нами способом [157].

Модельную мишень (нековалентный комплекс стрептавидин–prED3) получали инкубированием биотинилированного производного белка prED3 со стрептавидином в мольном соотношении 1:4,5 в течение ночи при 5°C (в PBS). Полученный аддукт использовали без дополнительной очистки.

Питательные среды для культивирования биомассы рекомбинантных бактерий *E. coli* содержали: дрожжевой экстракт, пептон, ампициллин изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (СибЭнзим, Новосибирск).

При выделении и работе с рекомбинантными белками использовали: мочевины, тритон X-100, трис (Fluca, Швеция), ЭДТА-натриевую соль (Sigma-Aldrich, США), дитиотреитол, додецилсульфат натрия, Tween-20 (Aldrich, США), бычий сывороточный альбумин (Serva, Германия), диметилсульфоксид (MP Biomedicals, Германия), имидазол (Sigma, США). Все остальные использованные реактивы были квалификации не ниже ос.ч. и х.ч.

Синтетический целентеразин был получен от Prolume Ltd. (Pinetop, США). Стоковый раствор целентеразина готовили растворением в этаноле и хранили при –20 °C. Концентрацию целентеразина определяли по его поглощению при длине волны 434 нм, используя коэффициент экстинкции 9800 см⁻¹ М⁻¹ [158]. Синтетический фуримазин получен от TargetMol (США). Стоковый раствор фуримазина готовили растворением в DMSO и хранили при –20 °C.

Для электрофореза белков использовали: акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), тетраметилэтилендиамин (TEMED), 0,1 % SDS, персульфат аммония (ПСА) (Bio-Rad, США), стандартные смеси белков для электрофореза (Serva, Германия).

Чистоту белковых препаратов при выделении контролировали электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS по методу Лэммли [159].

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с помощью набора DC Protein Assay (Bio-Rad). Оптическую плотность растворов измеряли при 750 нм. В качестве калибровочного белка использовали бычий сывороточный альбумин.

В работе использовали буферные растворы и среды, состав которых приведен в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. – Состав буферных растворов и сред

Название	Состав
LB-среда	10 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 7,5 г/л NaCl, pH 7,0
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM глюкозы, pH 7,0
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
TFB буфер	0,1 M KCl, 10 mM CaCl ₂ , 45 mM MnCl ₂ , 10 mM K Mes pH 6,2, 3 mM H ₂ CoCl ₃
T буфер	20 mM Трис-HCl pH 7,0
TE буфер	20 mM Трис-HCl pH 7,0, 5 mM ЭДТА
SM буфер	20 mM Tris-HCl pH 7,0, 25 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА
Кальциевый буфер	0,1 M CaCl ₂ , 0,1 M Трис-HCl pH 8,8
PBS	0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,1 M K ₂ HPO ₄ , 0,15 M NaCl
Промывочный буфер	PBS, 0,1% Tween20, 5 mM ЭДТА
Буфер А	5 mM имидазол, 0,3 M NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,0

Экстракты природных клещей были получены от Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края. Более 40 % исследованных образцов экстрактов было приготовлено из целых клещей самостоятельно, по методу,

описанному для набора D-1154 (Вектор Бест, Россия). Цельные клещи для исследований предоставлены добровольцами, а также работниками ветеринарных клиник г. Красноярска. ВКЭ в клещах выявляли колориметрическим иммуноанализом с использованием «Набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита D-1154» (Вектор Бест, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

В качестве антигена использовали вакцину Клещ-Э-Вак, содержащей инактивированный вирус клещевого энцефалита штамм «Софьин» (рабочий титр не менее 1:128) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (Россия).

2.3 Получение биомассы рекомбинантных клеток *E. coli*, синтезирующих целевые гибридные белки

Клетки *E. coli* Rosetta-gami2 (Novagen, США), трансформированные соответствующими плазмидами, культивировали при активном перемешивании в LB среде, содержащей 200 мкг/мл ампициллина, при 37 °С. При оптической плотности культуры $OD_{590} = 0,6-0,7$, ее охлаждали до 23 °С, вносили 0,5 мМ ИПТГ и продолжали культивирование при 23 °С в течение 20 ч, после чего осаждали клетки центрифугированием (4000 g, 20 мин). Полученную биомассу использовали для выделения целевых белков.

2.4 Получение гибридных белков, включающих домены миниантитела sc14D5a и люциферазы Rm7, а также sc14D5a и фрагменты люциферазы NLuc

Клеточную пасту рекомбинантных клеток *E. coli* Rosetta-gami2 суспендировали в десятикратном объеме буфера А разрушали обработкой ультразвуком 6-кратно по 20 сек при охлаждении льдом. Полученную смесь центрифугировали (6000 g, 5 мин), супернатант отбирали и вновь

центрифугировали (10000 g, 10 мин). Полученный супернатант наносили на колонку HisTrap Ni-NTA Agarose, и элюировали белки линейным градиентом концентрации имидазола 10-200 мМ в буфере А. Скорость элюции – 1,5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой белок объединяли и переводили в PBS гель-фильтрацией.

2.5 Получение гибридных белков, включающих белок prED3 и фрагменты люциферазы NLuc

Клеточную пасту рекомбинантных клеток *E. coli* Rosetta-gami2 разрушали и центрифугировали как описано выше. Супернатант отбрасывали, осадок растворяли в 6 М мочеvine и наносили на колонку HisTrap Ni-NTA Agarose. Далее белок очищали как описано выше в разделе 2.3.

2.6 Определение кинетических параметров биолюминесцентной реакции гибридного белка 14D5a-Rm7

А) Измерение биолюминесцентной активности проводили в кюветном люминометре (модель Биолуцинометр 8802 МВЕ, СКБ Наука, Красноярск). В кювету вносили 495 мкл SM буфера и 5 мкл образца белка (конечная концентрация $1,32 \times 10^{-6}$ М) и помещали в измерительный блок прибора. С помощью автоматического шприца (Hamilton CR-700-50) впрыскивали 10 мкл CTZ разной концентрации, в молярном соотношении концентрация белка / CTZ равном 1; 2; 4; 8; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 200; 300; 400 и 500. Люминесцентный сигнал регистрировали с помощью самописца (REC 112, Amersham Biosciences). За биолюминесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум трех параллельных измерений. На основании биолюминесцентных сигналов строили зависимость: обратное значение биолюминесцентного сигнала – обратное значение концентрации CTZ, в интервале от 10 до 200 кратного превышения концентрации CTZ концентрацию белков. Определение значения кажущейся константы Михаэлиса K_m проводили с использованием пакета программ Sigma Plot.

Б) В кювету для измерения вносили 495 мкл 50 мМ Трис-НСl pH 7,0, 25 мМ NaCl, 50 мМ CaCl₂ и 5 мкл образца белка (конечная концентрация 0,15 x 10⁻⁶ М). Далее в кювету впрыскивали 10 мкл СВР в разном молярном избытке, как описано выше. Измерение сигнала и определение значения Км проводили аналогично А).

2.7 Анализ связывания гибридного белка 14D5a-Rm7 с рекомбинантным белком Е

В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка Е (в PBS, 1 мкг/мл) или 100 мкл PBS (контрольные лунки) и инкубировали 12 ч при 7 °С. После промывки (трижды, промывочный буфер) блокировали не занятые места на поверхности 2% раствором обезжиренного молока в 10 мМ ЭДТА (1 час при 37 °С). После промывки в лунки, вносили по 100 мкл раствора гибридного белка в PBS с концентрациями от 418 до 0,16 нМ с шагом два. Инкубировали планшет при перемешивании в течение часа при 23 °С, 350 об/мин, затем тщательно промывали. Биолуминесцентный сигнал связавшегося гибридного белка измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия), интегрировали в течении 20 сек сразу после впрыска раствора CTZ в PBS. Сигналы от контрольных лунок использовали как фон. Все измерения были проведены в трех повторях.

Константу аффинности рассчитывали, используя следующее уравнение [160]:

$$B = \frac{x + R + \frac{1}{k} - \sqrt{\left(x + R + \frac{1}{k}\right)^2 - 4xR}}{2R}$$

Где B=L/Lmax; отношение сигнала в лунке (L) к сигналу в лунке с максимальной концентрацией гибрида (Lmax); R – концентрация белка Е; x – концентрация гибрида в растворе, вносимого в лунки; k – константа аффинности. Подсчет константы аффинности k проводили с использованием пакета программ Sigma Plot.

2.8 Выявление вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) биолюминесцентным твердофазным иммуноанализом сэндвич типа

В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора мышинных моноклональных антител 1B1 в PBS (5 мкг/мл) и инкубировали при 8°C в течение ночи. После промывки в лунки вносили по 100 мкл 2% раствора обезжиренного молочного порошка в PBS и инкубировали при 37°C, 1 час, промывали и вносили по 100 мкл растворов нативного белка Е (с концентрациями от 1 до 0,004 нг/мл) в PBS или экстрактов клещей, инкубировали при 37°C, 1 час. После промывки в лунки вносили по 100 мкл раствора белка 14D5a-Rm7 (1 мкг/мл в PBS), инкубировали при комнатной температуре 1 час. После промывки биолюминесцентный сигнал связавшегося гибридного белка измеряли сразу после впрыска 100 мкл раствора целентеразина (2×10^{-6} М, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0, 25 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА) с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия). Сигнал интегрировали в течение 5 секунд.

В качестве критерия наличия вируса использовали значение дискриминационного фактора D , равного отношению биолюминесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (С-, набор D-1154, Вектор Бест, Россия). При значении $D \geq 2$ образец считали положительным по ВКЭ, в остальных случаях – отрицательным по ВКЭ.

2.9 Анализ связывания домена sc14D5a (Ab) в составе гибридов NLucL-Ab, Ab-NLucL, Ab-NLucS, NLucS-Ab с рекомбинантным белком prED3 конкурентным биолюминесцентным твердофазным анализом

В лунки планшета вносили по 100 мкл белка prED3 вируса клещевого энцефалита 1 мкг/мл в PBS и инкубировали 1 ч при 37°C. Промывали (PBS, содержащий 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 1 ч при 37°C. После промывки, вносили по 100 мкл растворы PBS, содержащие 14D5a-Rm7 (0,5 мкг/мл) и либо белок NLucL-Ab (5; 1; 0,2; 0 мкг/мл) либо белок Ab- NLucL (5; 0,5; 0,05; 0 мкг/мл) либо белок Ab- NLucS

(5; 0,5; 0,05; 0 мкг/мл) либо белок NLucS-Ab (5; 0,5; 0,05; 0 мкг/мл), инкубировали 1 ч при 23°C, затем промывали. Биолюминесценцию измеряли с помощью планшетного люминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия) сразу после впрыска 100 мкл раствора целентеразина (0,1 мкМ, в PBS), в течении 5 секунд.

2.10 Анализ сборки фрагментов и восстановления биолюминесцентной активности люциферазы NLuc при сорбировании эквимольных смесей гибридных белков, включающих антитело sc14D5a на поверхности, активированной рекомбинантным белком prED3

В лунки планшета вносили по 100 мкл белка prED3 вируса клещевого энцефалита 1 или 0 мкг/мл в PBS и инкубировали 1 ч при 37°C. Промывали (промывочный буфер) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 1 ч при 37°C. Затем в лунки планшета вносили раствор белков NLucL-Ab и Ab-NLucS или NLucL-Ab и NLucS-Ab или Ab-NLucL и Ab-NLucS или Ab-NLucL и NLucS-Ab (2 мкг/мл каждый, 50 мкл в PBS) инкубировали 1 ч при 25°C, затем измеряли биолюминесцентную активность образовавшегося комплекса сразу после впрыска 50 мкл раствора целентеразина (0,3 мкМ, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия), сигнал интегрировали в течении 7 секунд.

2.11 Модельный однофазный биолюминесцентный иммуноанализ prED3 сэндвич типа

В лунки планшета вносили раствор белков NLucS-sc14D5a и sc14D5a-NLucL (2 мкг/мл каждого, 50 мкл в PBS) и модельной молекулы-мишени – нековалентного аддукта биотинилированного производного белка prED3 с рекомбинантным стрептавидином (20; 4; 0,8; 0 мкг/мл, 50 мкл в PBS), инкубировали 1 ч при 25 °C, затем измеряли биолюминесцентную активность образовавшегося комплекса сразу после впрыска 50 мкл раствора целентеразина (0,3 мкМ, в PBS) с помощью планшетного люминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия), сигнал интегрировали в течении 7 секунд.

2.12 Анализ связывания домена prED3 в составе гибридов с фрагментами люциферазы NLuc со специфичными антителами

А) В лунки планшета вносили по 100 мкл белка Е вируса клещевого энцефалита либо белок ED3-NLucS, либо белок NLucS-ED3 (1000; 333; 111; 37; 12,4; 4,1; 1,4 нг/мл в PBS и инкубировали 1 ч при 37°C. Промывали (PBS, содержащий 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 1 ч при 37°C. После промывки, вносили по 100 мкл растворы PBS, содержащие 14D5a-Rm7 (0,5 мкг/мл), инкубировали 1 ч при 23°C, затем промывали. Биолюминесценцию измеряли с помощью планшетного люминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия) сразу после впрыска 100 мкл раствора целентеразина (0,1 мкМ, в PBS), в течении 5 секунд.

Б) В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора мышинных моноклональных антител к ВКЭ 14D5 (10000; 2500; 625; 156,3; 39,1; 9,8; 2,4; 0,6 нг/мл в PBS и инкубировали 1 ч при 37°C. Промывали (PBS, содержащий 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 1 ч при 37°C. После промывки, вносили по 100 мкл растворы, содержащие Ag-NLucL либо NLucL-Ag (0,5 мкг/мл в PBS), инкубировали 1 ч при 23°C, затем промывали. Биолюминесценцию измеряли как описано выше.

2.13 Определение биолюминесцентной активности эквимольных смесей гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NLuc и либо антитело sc14D5a либо белок prED3

100 мкл аликвоты эквимольных смесей пар гибридных белков разного состава (100 нМ каждого, PBS), всего 8 вариантов, помещали в лунки планшета, инкубировали 30 мин при комн. температуре. Биолюминесцентный сигнал измеряли при впрыске 100 мкл свежеприготовленного раствора фуримазина (1 мкМ, PBS) как описано выше. Эксперименты проводили в 3-х повторностях.

2.14 Определение кинетических параметров биolumинесцентной реакции комплекса sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL

А) В лунки планшета вносили растворы фуримазина в концентрации от 0,2 до 25 мкМ в PBS (либо CBP в 20 мМ Трис HCl pH=7.0, 50 мМ CaCl₂) и впрыскивали смесь sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL (конечная концентрация составляла 1 нМ в PBS, 0,05% BSA), предварительно инкубированную при комнатной температуре в течение 0,5 ч, с перемешиванием. Биolumинесцентный сигнал интегрировали в течении 5 секунд после впрыска смеси белков.

Б) В лунки планшета вносили растворы CBP в концентрации от 0,1 до 12,5 мкМ (в 20 мМ Трис HCl pH=7.0, 50 мМ CaCl₂) и впрыскивали смесь Ab-NLucS + Ag-NLucL (конечная концентрация составляла 1 нМ в 20 мМ Трис HCl pH=7.0, 0,15 М NaCl, 0,05% BSA, предварительно инкубированную при комнатной температуре в течение 0,5 ч, с перемешиванием. Биolumинесцентный сигнал измеряли как описано выше.

2.15 Анализ связывания комплекса sc14D5a-NLucS + prED3-NLucL

В лунки планшета для блокировки поверхности вносили по 150 мкл раствора 1% BSA (в PBS) инкубировали 1 ч при 37 °С 500 об/мин. После промывки в лунки, вносили по 50 мкл эквимольной смеси гибридных белков Ab-NLucS и Ag-NLucL с концентрацией от 193 до 0,09 нМ (в 0,1% BSA, PBS) раститровывая шагом два и а) по 50 мкл PBS, либо б) по 50 мкл белка prED3 (2 мкг/мл в PBS, финальная концентрация 1 мкг/мл). Инкубировали планшет при перемешивании в течение 30 мин при 23 °С, 350 об/мин. Биolumинесцентный сигнал связавшегося гибридного белка измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия), интегрировали в течении 5 с сразу после впрыска 100 мкл раствора FMZ(0,2 10⁻⁶ М в PBS). Все измерения были проведены в трех повторах.

Определяли (ΔL) – разницу сигналов от соответствующих лунок параллелей а) и б) и нормировали ее на величину $\Delta L_{\max}$ – максимальную разницу сигналов. Полученные значения использовали для определения константы аффинности, как описано выше (см. раздел 2.7).

2.16 Гомогенный биолюминесцентный анализ конкурентного типа ВКЭ-ассоциированных мишеней (белок ED3, вакцина Клещ-Е-ВАК, экстракты природный клещей)

В лунки вносили по 150 мкл раствора БСА (1% в PBS), инкубировали 1 ч при 37 °C, промывали. Далее вносили по 50 мкл эквимольной смеси Ab-NLucS + Ag-NLucL (в PBS, 0,1 мкМ каждого) и: **а)** 50 мкл раствора белка ED3 (16; 5; 4; 1; 0,2; 0 мкг/мл в PBS) **б)** 20 мкл вакцины Клещ-Е-ВАК, разбавленной в PBS в соотношении 1:200, 1:100, 1:40, 1:20, 1:10; **в)** 50 мкл экстракта природный клещей, инкубировали со встряхиванием 30 мин при комнатной температуре и измеряли биолюминесценцию полученных комплексов добавлением раствора фуримазина как описано выше.

При анализе природных клещей сигнал от образца с prED3 с концентрацией 5 мкг/мл принимали как положительный контроль (C^+). Сигнал от смеси экстрактов 10 «здоровых» клещей (по результатам колориметрического иммуноанализа) принимали как отрицательный контроль (C^-). Отношение сигналов от образца к сигналу от буфера (PBS), L/L_0 принимали как дискриминационный фактор D.

2.17 Получение лиофилизированных смесей, готовых для иммуноанализа ВКЭ и их характеристика

1) В лунки микропланшета вносили следующие смеси: Ag-NLucL and Ab-NLucS (по 100 мкл/лунку, 100 нМ каждого) в следующих растворах: а) PBS; б) PBS, 0,1% БСА; в) PBS, 5% трегалоза. После чего замораживали при –80 °C и

лиофилизировали. Далее в лунки с лиофилизированными растворами а), б), в) добавляли по 100 мкл воды, перемешивали 30 мин и измеряли биolumинесценцию сразу после добавлении раствора фуримазина (100 мкл, 1 мкМ, PBS).

2) В лунки вносили следующие смеси: (I) Ag-NLucL и Ab-NLucS (по 100 мкл/лунку, 100 нМ каждого, PBS, 0,1% БСА), далее этот образец — контроль минус (C-); (II) Ag-NLucL, Ab-NLucS, prED3 (конечная концентрация 0,23 мкМ), далее этот образец — контроль плюс (C+). Далее к смесям добавляли субстраты в разном порядке:

а) к образцам C+ и C- добавляли CBP (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) получая образцы C+(с) и C-(с), либо раствор фуримазина (конечная концентрация 1 мкМ) получая C+(f) и C-(f) замораживали при -80°C и лиофилизировали.

б) образцы смеси C+ и C- вначале замораживали при -80°C , а далее в лунки добавляли по 20 мкл 6 мкМ раствора фуримазина (PBS, 0°C), немедленно замораживали и лиофилизировали.

Планшеты с лиофилизированными образцами покрывали специальной клейкой пленкой далее хранили при 5°C и -20°C и тестировали на восстановление биоспецифической активности белков через определенные промежутки времени.

3) В лунки с лиофилизированными смесями C+ и C- добавляли по 100 мкл воды, перемешивали 30 мин и измеряли биolumинесценцию сразу после добавлении раствора фуримазина (100 мкл, 1 мкМ, PBS) и через 30 мин.

В лунки с лиофилизированными смесями, содержащими субстраты — варианты а) и б) добавляли по 100 мкл воды, перемешивали 5 мин и измеряли биolumинесценцию сразу и еще через 30 мин.

В лунки с лиофилизированной смесью C-(f) добавляли 100 мкл вакцины (с титром 40 либо 5), перемешивали со встряхиванием 30 мин и измеряли биolumинесцентный сигнал.

В лунки с лиофилизированными трехкомпонентными смесями C-(с) и C+(с) добавляли либо по 100 мкл воды, либо в C-(с) вносили prED3 (0,2; 1; 5 мкг/мл в H₂O), перемешивали 30 мин и измеряли биолюминесценцию сразу после добавления раствора кальция (100 мкл, 0,1М CaCl₂ 0,1 М Трис-HCl pH=8,8) и через 30 мин.

2.18 Приготовление и хранение активированных микропланшетов

В лунки непрозрачного микропланшета (Corning, США) вносили по 100 мкл раствора мышинных моноклональных антител 14D5 (Биосан, Россия), 5 мкг/мл в PBS, инкубировали ночь при 8 °С, промывали (PBS, содержащий 0,1 % Tween 20) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора поливинилпирролидона в PBS в течение 1 ч при 37 °С. Далее планшет промывали, сушили на воздухе, покрывали клейкой пленкой и хранили при температуре 8 или -18 °С.

Работоспособность пре-активированных микропланшетов после хранения проверяли через определенные промежутки времени в модельном иммуноанализе.

2.19 Приготовление и хранение лиофилизированных образцов

CBP и 14D5a-Rm7

Растворы белков (CBP – 2,5 мг/мл, 14D5a-Rm7 – 0,5 мг/мл) в PBS либо в PBS, содержащем: 5 % трегалозы; 0,1 % либо 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma-Aldrich, США); 50 либо 200 мМ имидазола (для 14D5a-Rm7), быстро замораживали –80 °С и лиофилизировали. Полученные образцы хранили в камере бытового холодильника (около 8 °С).

Проверяли лиофилизированные белки в модельном иммуноанализе (постановка описана выше) с использованием образцов C+ (Вектор Бест, Россия) в качестве антигена. Для сравнения тот же анализ проводили параллельно с использованием свежевыделенных белков.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение и свойства новых гибридных белков – биоспецифичных репортеров для биолюминесцентного иммуноанализа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ)

В состав гибридных белков в качестве биоспецифичной части использовали одноцепочечное миниантитело sc14D5a, которое связывает капсидный гликопротеин Е вируса ВКЭ с высокой аффинностью ($K_a = 8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) [161]. Этот белок состоит из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей V_H и V_L мышинных моноклональных антител 14D5 [162], соединенных гибким линкером. Антитело было получено в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН на основе моноклонального антитела 14D5, которое в свою очередь получено иммунизацией мышей одним из дальневосточных типов ВКЭ [163].

Ряд гибридных белков в качестве биоспецифичной части содержали белок prED3 – домен D3 капсидного белка Е вируса ВКЭ, антигенная детерминанта миниантитела sc14D5a [155].

В качестве сигнальной части гибридов использовали люциферазу Rm7, термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* [12], а также искусственную люциферазу NanoLuc [23] либо ее фрагменты. Сигнальную и специфическую части гибридных белков соединяли гибким линкером (GGS)₄ в случае получения гибрида с люциферазой Rm7 либо (GGS)₅ в случае гибридов с фрагментами люциферазы NanoLuc.

Все белки содержали полигистидиновый фрагмент H₆, благодаря чему их очистку проводили металл-аффинной хроматографией. Перечень гибридных белков, использованных для биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ приведен в Таблице 3.1.

Синтез белков проводили в рекомбинантных клетках *E. coli* Rosetta-gami2, содержащих мутированные гены тиоредоксин редуктазы и глутатион редуктазы, в

результате чего существенно активируется образование дисульфидных связей в белках, а в нашем случае в домене миниантитела 14D5a.

Таблица 3.1. Полученные гибридные белки – метки в иммуноанализе ВКЭ

№	Обозначение	Состав и последовательность доменов в гибридных белках	Назначение
1	sc14D5a-Rm7	одноцепочечное миниантитело 14D5a к ВКЭ–термостабильный вариант люциферазы Renilla Rm7–His ₆	Твердофазный иммуноанализ ВКЭ
2	Ab-NLucL	His ₆ –миниантитело sc14D5a–N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc, 1-159 а.к.	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа
3	Ab-NLucS	His ₆ –миниантитело sc14D5a–C-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc, 160-171 а.к.	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа
4	NLucL-Ab	His ₆ – N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc—миниантитело sc14D5a	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа
5	NLucS-Ab	His ₆ – C-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc—миниантитело sc14D5a	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа
6	Ag-NLucL	His ₆ –белок prED3, иммунная детерминанта капсидного белка Е вируса ВКЭ–N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа
7	NLucL-Ag	His ₆ –N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc– белок prED3	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа
8	Ag-NLucS	His ₆ – белок prED3–N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа
9	NLucS-Ag	His ₆ –C-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc– белок prED3	Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа

3.1.1 Получение гибридного белка sc14D5a-Rm7

В результате эмпирического поиска в том числе и с другими антителами (были получены образцы грубой очистки и изучены варианты гибридов с

различной последовательностью белковых доменов и пептида His₆.) была установлена оптимальная последовательность доменов в гибриде sc14D5a-Rm7, где к домену антитела остальные полипептиды присоединены по его С-концу.

Для получения с помощью бактериальной экспрессии гибридного белка, проявляющего свойства обоих входящих в его состав доменов, были рассмотрены два варианта конструкций с локализацией:

(а) в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* штамм BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, для чего ген целевого белка включал последовательность, кодирующую лидерный пептид *ompA*. Окислительный потенциал периплазмы и наличие ферментов дисульфидизомеразной системы обеспечивают образование дисульфидной связи домена антитела;

(б) в цитоплазме клеток *E. coli* Rosetta-gami2. Эти клетки содержат мутированные гены тиоредоксин редуктазы и глутатион редуктазы, в результате чего существенно активируется образование дисульфидных связей в белках.

На рис. 3.1. А и Б приведены результаты электрофоретического анализа фракций при получении и очистке целевого гибридного белка. В обоих случаях добавление ИПТГ инициирует синтез целевого гибрида и на электрофореграммах появляется полоса с молекулярной массой, близкой к расчетному значению 65,5 кДа. Видно, что количество белка, выделяемое из периплазматического пространства клеток *E. coli* BL21 (рис. 3.1. А), чрезвычайно мало, его присутствие контролировали по биолюминесцентной активности люциферазного домена. После очистки белка металл-аффинной хроматографией выход белка составил 0,02–0,025 мг на литр культуры. При этом из данных электрофореграммы видно, что значительное количество белка локализовано в виде нерастворимой фракции телец включения. К сожалению, после растворения 6 М мочевиной с последующей заменой буфера гибрид из этой фракции не обладает биолюминесцентной активностью. Попытки увеличить выход целевого белка в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* других штаммов TG1, HB2151 и DH5α не привели к желаемому результату (данные не приводятся). Возможно,

перенос гибридного белка в периплазму затруднен из-за его высокой молекулярной массы или специфической пространственной структуры.

При синтезе гибрида в клетках *E. coli* Rosetta-gami2 практически весь гибридный белок сосредоточен в цитоплазматической фракции, где его количество составляет 0,9 % от всех цитоплазматических белков (рис 3.1. Б). В результате двух хроматографий (металл-аффинной и последующей гель-фильтрации) получили препарат целевого белка 87%-й чистоты с выходом 2–3 мг на литр культуры, обладающего биолуминесцентной активностью при добавлении целентеразина. Этот белок использовали для последующих работ.

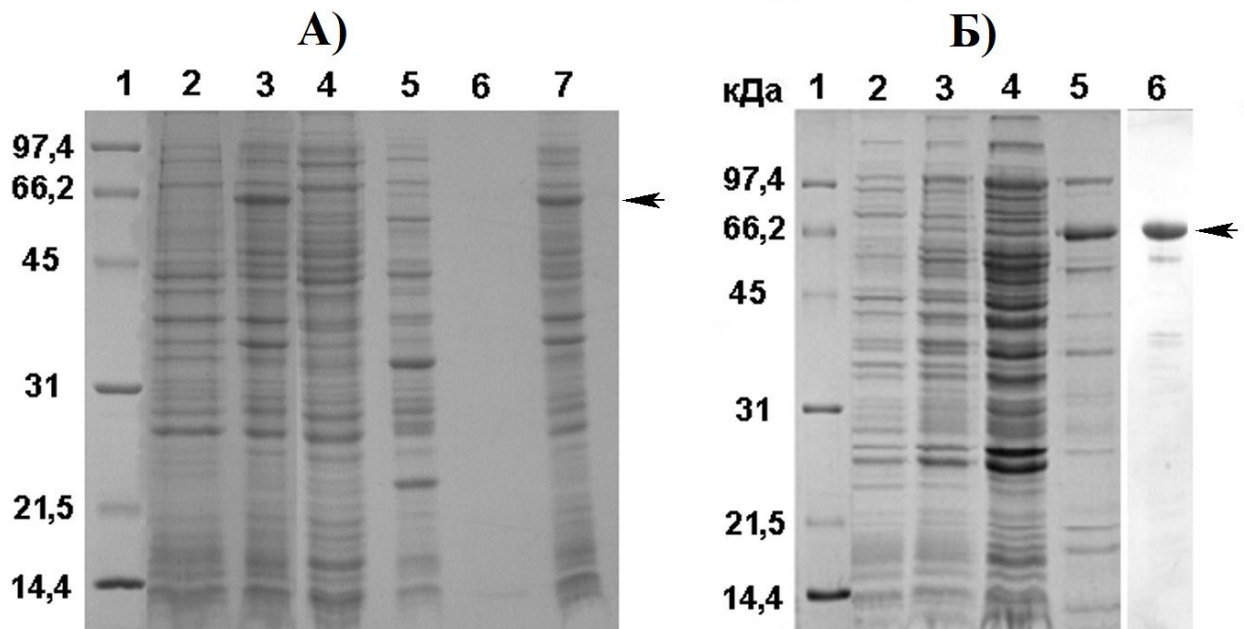


Рис. 3.1. Электрофоретический анализ образцов, полученных при выделении гибридного белка sc14D5a-Rm7 из клеток *E. coli* А) штамм BL21 Codon Plus (DE3) RIPL: 1 – стандартные белки; 2, 3 – лизат клеток до и после индукции; 4 – цитоплазматическая фракция; 5 – периплазматическая фракция, сконцентрированная в 10 раз; 6 – препарат после очистки из периплазмы; 7 – экстракт телец включения в 6 М мочевины. Б) штамм Rosetta-gami2: 1-4 – то же, что и для случая (А); 5, 6 – препараты после первой и второй хроматографий. Молекулярная масса стандартных белков (Amersham Bioscience) показана числами. Электрофорез проводили в 12,5%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, окрашивание Coomassie blue. Стрелками показана полоса целевого гибридного белка.

3.1.2 Каталитическая активность домена люциферазы в составе гибрида 14D5a-Rm7

Биолюминесценция *Renilla* возникает в результате реакции окисления целентеразина кислородом, катализируемой люциферазой, с образованием целентерамида, CO_2 и кванта света ($\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ нм}$). В фотофорах животного это соединение иммобилизовано во внутренней полости Ca^{2+} -активируемого целентеразин-связывающего белка (СВР) [34]. Присоединение ионов Ca^{2+} вызывает конформационные изменения молекулы, в результате которых целентеразин становится доступным для окисления, катализируемого люциферазой [11]. Применение целентеразина в системах *in vitro* сопровождается рядом неудобств: он является гидрофобным соединением, плохо растворимым в водных средах. Поскольку это соединение довольно быстро самопроизвольно окисляется, необходимо использовать только свежеприготовленные растворы. В то же время СВР – стабильный, хорошо растворимый белок, представляет собой более удобную для рутинного использования форму субстрата. Нами были рассмотрены каталитические свойства домена люциферазы при взаимодействии с

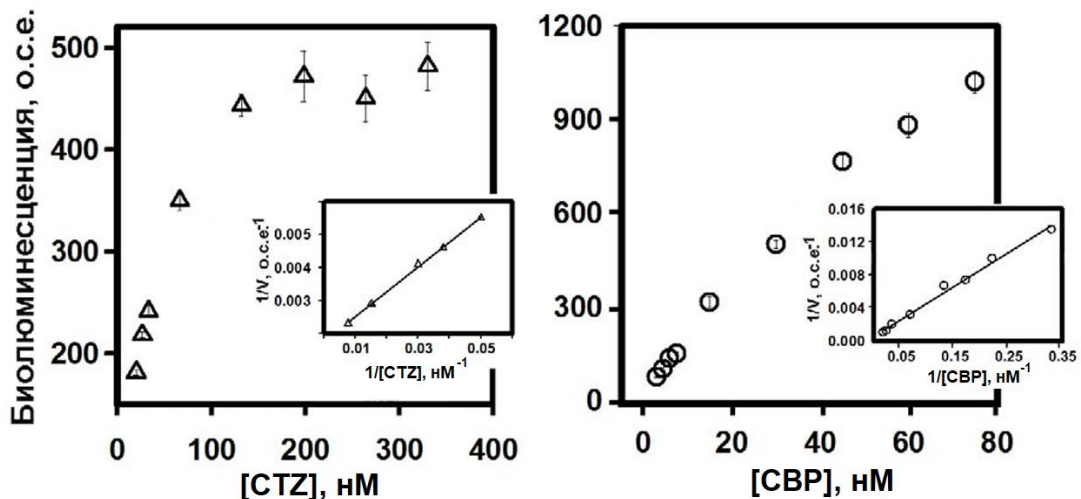


Рис. 3.2. Зависимость биолюминесцентного сигнала 14D5a-Rm7 от концентрации целентеразина (СТЗ, слева) и СВР (справа). Каждая точка – среднее от трех измерений начальной максимальной интенсивности сигнала. На врезках – графики Лайнуивера-Берка. о.с.е. – относительные световые единицы.

обеими формами субстрата (Рис. 3.2.). В Табл. 3.2. приведены значения кинетических параметров этих реакций: константы Михаэлиса (K_M), максимальная скорость реакции (V_{max}). Необходимо заметить, что биолуминесцентная реакция люциферазы протекает с определенным квантовым выходом и потому полученные по биолуминесценции значения кинетических параметров следует считать кажущимися (термин, который далее опускаем).

Можно видеть, что значение k_{cat} , отражающее число оборотов фермента в единицу времени, а также параметр k_{cat} / K_M для случая СВР существенно выше, чем для свободного целентеразина, что свидетельствует в пользу более высокой эффективности биолуминесцентной реакции. Аналогичные результаты были получены при исследовании каталитических свойств свободной люциферазы *Renilla muelleri* с этими формами субстрата [34]. Было показано, что присоединение ионов Ca^{2+} вызывает конформационные изменения белка с разрушением сети водородных связей, участвующих в иммобилизации целентеразина, делая его доступным для окисления. Наблюдаемое увеличение эффективности биолуминесцентной реакции с высокой долей вероятности объясняется образованием короткоживущего комплекса «люцифераза – Ca^{2+} -активированный СВР» [11]. Таким образом, использование СВР как субстрата в разрабатываемой тест-системе дает очевидные преимущества по сравнению со «свободным» целентеразином. Отметим, что рекомбинантный СВР доступен благодаря наличию бактериального штамма-суперпродуцента апобелка, а также разработанному простому способу его получения [34].

Таблица 3.2. Кинетические параметры биолуминесцентной реакции Rm7 и 14D5a-Rm7 с разными формами субстрата

Параметр	Люцифераза Rm7		14D5a-Rm7	
	CTZ	СВР	CTZ	СВР
K_M	4	0,6	0,9	0,4
V_{max}	8664	4073	588	1094
k_{cat}	656	2715	44,5	729
k_{cat} / K_M	164,8	4451	48,9	1696

Интенсивность биолюминесценции «свободной» люциферазы в несколько раз выше, чем у слитого белка во всех динамических диапазонах обоих субстратов, т. е. от 13,2 до 6600 нМ CTZ или от 1,5 до 750 нМ СВР. Для характеристики эффективности люцифераз Rm7 и 14D5a-Rm7 с этими двумя субстратами мы оценили числа оборотов $k_{cat} = V_{max}[E]^{-1}$, где $[E]$ - концентрация белка. Как можно судить по кажущемуся значению k_{cat} , числа оборотов обеих люцифераз значительно больше в случае СВР по сравнению со «свободным» целентеразином. Значения кажущихся констант скорости (k_{cat}/K_M), характеризующие эффективность фермента, также существенно выше в случаях использования СВР в качестве субстрата. Таким образом, СВР, превосходящий целентеразин в 16 раз по обороту и в 30 раз по эффективности домена Rm7, является более предпочтительным субстратом для биолюминесценции гибридных белков. Эти результаты хорошо коррелируют с результатами, полученными для рекомбинантной люциферазы Renilla дикого типа: она превращается в реакции с СВР в 6 раз быстрее и окисляет целентеразин, связанный в СВР, в 2,5 раза эффективнее, чем в реакции со свободным целентеразином.

3.1.3 Анализ связывания домена миниантитела 14D5a с мишенью

При изучении аффинных свойств гибрида на поверхность лунок микропланшета сорбировали рекомбинантный белок E ВКЭ, а затем вносили растворы гибридного белка разной концентрации. Полученная зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации гибрида приведена на Рис. 3.3. Ее использовали для расчета константы аффинности белка (см. Разд. 2. Материалы и методы). Полученное для гибридного белка значение константы аффинности $K_{af} = 2,65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ близко таковому для исходного рекомбинантного антитела мыши sc14D5a – $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [164], рассчитанного с помощью технологии SPR.

Таким образом, синтез гибридного белка 14D5a-Rm7 в цитоплазме клеток *E. coli* Rosetta-gami2 обеспечивает хороший выход гибрида, домены которого независимо образуют пространственную структуру и обладают биоспецифическими свойствами исходных белков.

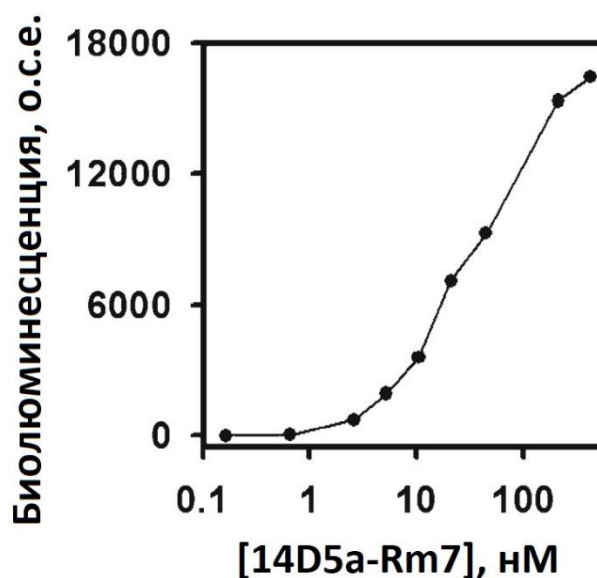


Рис. 3.3. Кривая зависимости биолюминесценции гибридного белка, связавшегося с мишенью от его концентрации.

3.1.4 Получение гибридных белков Ab-NLucL, Ab-NLucS, NLucL-Ab, NLucS-Ab (№2-5, Табл. 3.1.)

Синтез гибридных белков, содержащих домен того же антитела к ВКЭ и фрагменты NanoLuc – искусственного варианта целентеразин-зависимой люциферазы *Oplophorus gracilirostris* проводили в клетках *E. coli* Rosetta-gami2, трансформированных соответствующими плазмидами, с локализацией целевых белков в цитоплазме. Как было показано выше, такой вариант обеспечивал как минимум правильный фолдинг домена миниантитела. Очистку белков проводили с помощью металл-хелатной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. За ходом выделения и очистки следили с помощью гель-электрофореза по Лэммли (см. пример очистки на Рис. 3.4.). Видно, что после ИПТГ-индукции в клетках появляются новые белки, молекулярная масса которых около 45 кДа и 29 кДа, близка расчетной массе гибридных белков Ab-NLucL и NLucS-Ab, соответственно. Белки находятся в цитоплазматической фракции. После очистки цитоплазматической фракции металл-хелатной хроматографией и гель-

фильтрации получены препараты, в которых целевые белки составляют 98% и 96% (дорожки 4 и 9 для Ab-NLucL и NLucS-Ab, соответственно). Выход белка на г биомассы составляет 1-1,5 мг для NLucS-Ab и около 0,5 мг для Ab-NLucL.

Полученные белки исследовали на наличие биолюминесцентной активности. Как и ожидалось, она полностью отсутствовала у гибридов малого С-концевого фрагмента NLucS. Гибриды, включающие большой N-концевой фрагмент (NLucL) обладали слабой фуримазин-индуцируемой биолюминесценцией, составляющей 0,005% от таковой для полноразмерной NanoLuc.

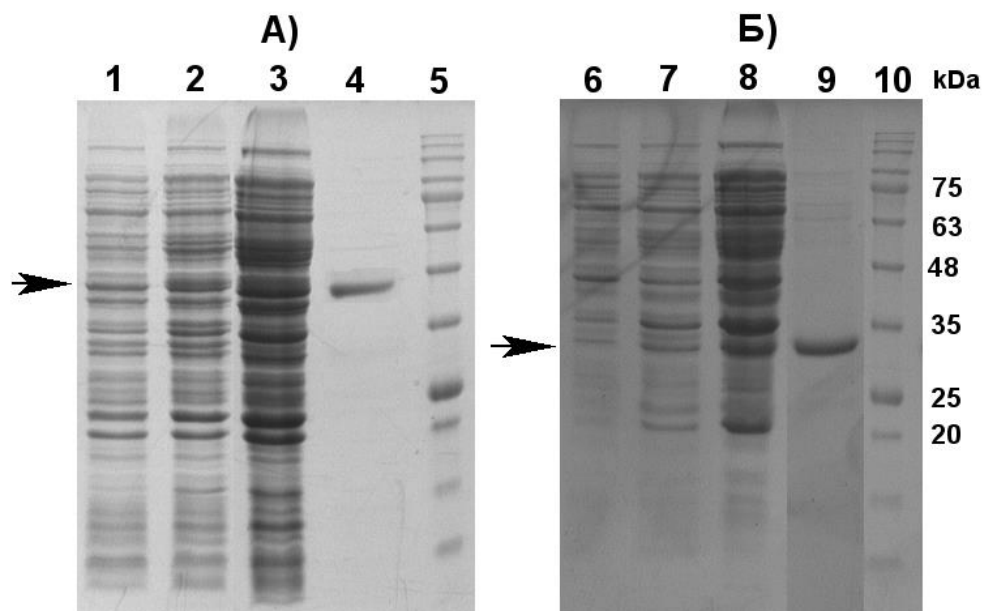


Рис. 3.4. Электрофоретический анализ образцов при выделении гибридных белков Ab-NLucL-NLuc (А) и NLucS-Ab (Б) из клеток *E. coli* Rosetta-gami2: 1, 6 и 2, 7 – полный лизат клеток до и после ИПТГ-индукции, соответственно; 3 и 8 – цитоплазматическая фракция; 4 и 9 – финальные образцы после очистки; 5 и 10 – маркеры молекулярных масс. Цифрами показана мол масса маркерных белков, стрелками – полосы целевых рекомбинантных белков. Условия анализа – как на Рис 3.1.

3.1.5 Связывание домена антител в полученных гибридных белках с мишенью

Связывание домена 14D5a с мишенью (белок prED3 – антигенная детерминанта капсидного белка Е вируса ВКЭ) исследовали с помощью

биолюминесцентного твердофазного анализа конкурентного типа. Для этого поверхность лунки микропланшета активировали сорбцией рекомбинантного белка E, а затем вносили в лунки гибридный белок 14D5a-Rm7 в смеси с исследуемыми гибридными белками (№2-5, Табл.3.1.) разной концентрации. Биолюминесцентный сигнал инициировали целентеразином. Схема анализа и его результаты приведены на Рис 3.5. Как видно из рисунка, все 4 исследуемых белка конкурируют с 14D5a-Rm7 за связывание с prED3, в результате чего наблюдается падение биолюминесцентного сигнала Rm7 с увеличением концентрации белка-конкурента. Причем, в случае белков-компетиторов, включающих большой фрагмент люциферазы NLucL падение биолюминесцентного сигнала существенно замедлено. Это можно объяснить вкладом остаточной биолюминесценции большого фрагмента NLucL.

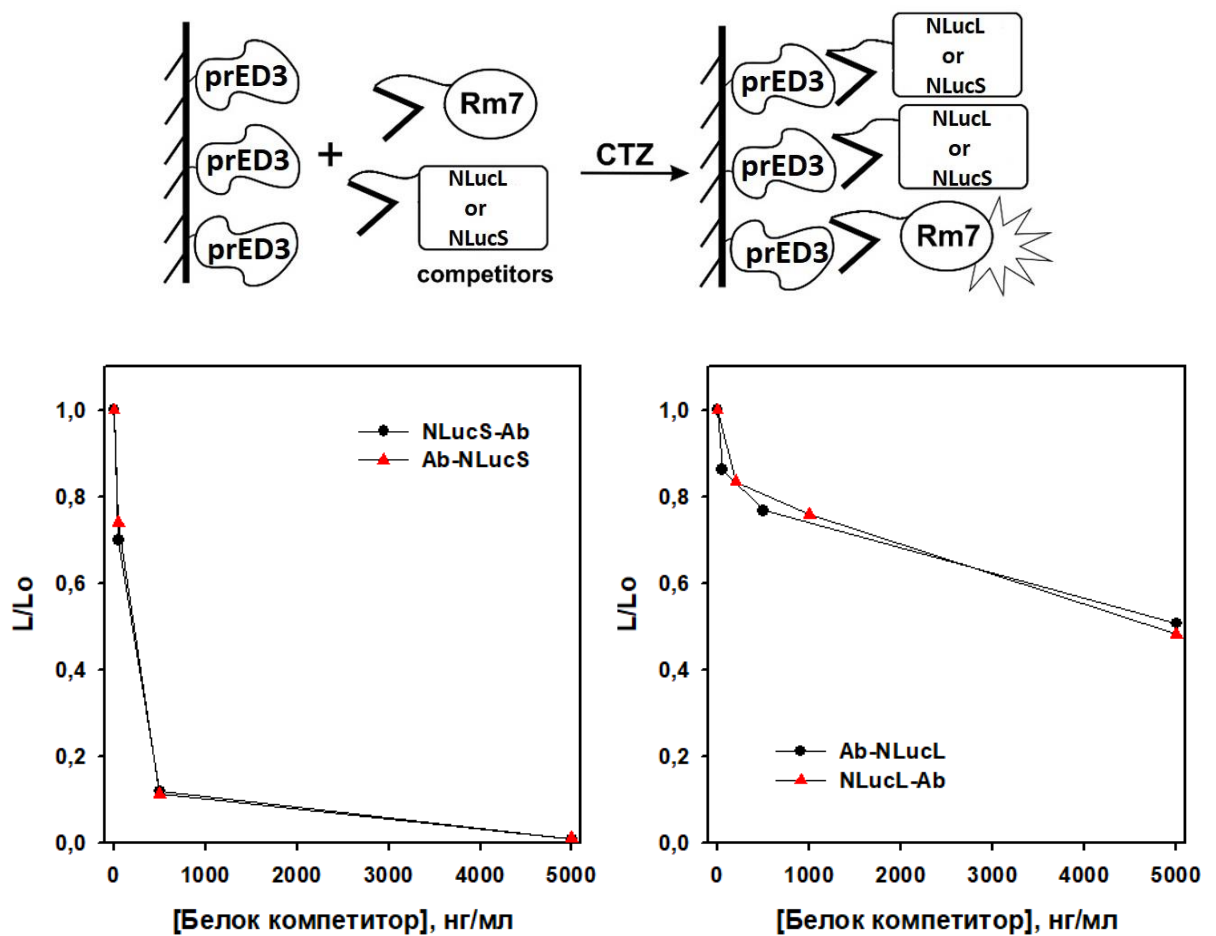


Рис. 3.5. Твердофазный конкурентный анализ связывания исследуемых гибридных белков в конкуренции с аналогичным гибридом люциферазы Renilla (Rm7) с белком-мишенью prED3. Ab – антитело sc14D5a.

Таким образом нами показана способность домена антитела в этой группе гибридных белков связывать белок-мишень.

3.1.6 Исследование сборки на антиген-активированной твердой фазе, фрагментов люциферазы NLuc

Сборку фрагментов люциферазы при сближении гибридных белков, сорбированных на антиген-активированной поверхности проводили, добавляя пары гибридов, содержащих малый и большой фрагменты люциферазы. В случае комплементации фрагментов возникает биолюминесцентный сигнал при добавлении субстрата фуримазина (Рис. 3.6.).

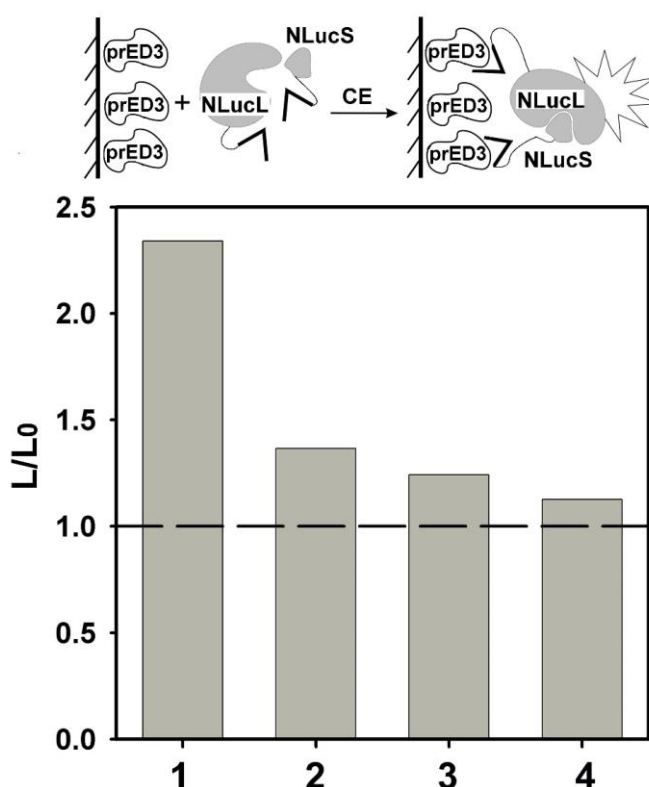


Рис. 3.6. Анализ сборки фрагментов люциферазы на твердой фазе, активированной белком-мишенью prED3. Вверху – схема анализа, внизу – биолюминесцентный сигнал от лунок, содержащих смеси: 1 – Ab-NLucL+NLucS-Ab; 2 – Ab-NLucL+Ab-NLucS; 3 – NLucL-Ab+Ab-NLucS; 4 – NLucL-Ab+NLucS-Ab.

Из рисунка видно, что максимальный биолюминесцентный ответ получается при сборке пары Ab-NLucL + NLucS-Ab. Эту пару использовали далее при проведении гомогенного анализа модельной мишени (Глава 3.2).

3.1.7 Получение гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NLuc и белок prED3 (№ 6-9, Табл. 3.1) в разной последовательности

Обозначенные гибридные белки получали способом, аналогичным описанному в п. 3.1.1 Синтез проводили в рекомбинантных клетках *E. coli* Rosetta-gami2, трансформированных соответствующими плазмидами. Белки выделяли из фракций нерастворимых телец включения, очистку проводили металл-хелатной хроматографией после растворения в 6 М мочевиновом растворе. За ходом выделения и очистки следили с помощью гель-электрофореза (Рис. 3.7.). Чистота полученных белковых препаратов составила более 95%. Выход белка составил около 1 мг/г бактериальной биомассы для 14D5a-NLucS (из цитоплазмы) и до 5 мг/г для prED3-NLucL (из телец включения).

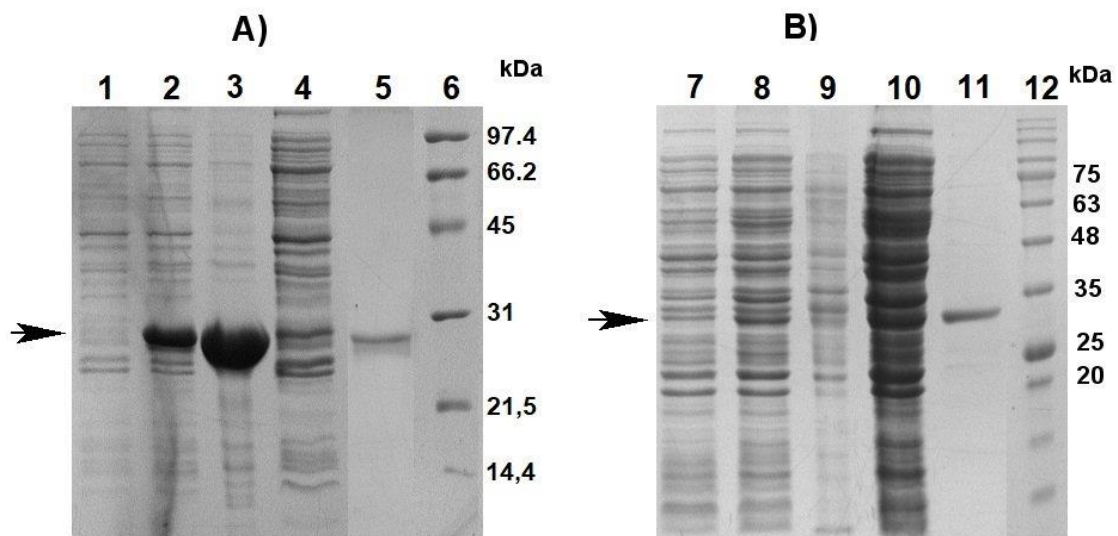


Рис. 3.7. Электрофоретический анализ образцов при выделении гибридных белков Ag-NLucL (A) and Ab-NLucS (B) из клеток *E. coli* Rosetta-gami2. Дорожки: 1, 7 и 2, 8 – лизат клеток до и после ИПТГ-индукции, соответственно; 3, 9 – экстракты телец включения в 6М мочевины; 4, 10 – цитоплазматические фракции; 5, 11 – белки после хроматографической очистки; 6, 12 – белки-маркеры молекулярного веса (показан цифрами). Электрофорез проводили в 12,5%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, окрашивание Coomassie blue. Стрелками показана полосы гибридных белков.

Полученные белки исследовали на способность домена антигена prED3 быть «узнанным» и связанным специфичным антителом. Эта проверка особенно важна, поскольку соответствующие гибридные белки выделяли из телец включения, где они были в денатурированном состоянии.

Пару белков с малым фрагментом люциферазы – prED3-NLucS и NLucS-prED3, анализировали по схеме, представленной на Рис. 3.8.A. Для этого поверхность лунки микропланшета активировали сорбцией разной концентрации гибридного белка содержащий домен ED3, а затем вносили в лунки гибридный белок 14D5a-Rm7. Биолюминесцентный сигнал инициировали целентеразином.

Как видно из рисунка Рис. 3.8., оба исследуемых белка связываются с 14D5a-Rm7, образуя специфичные комплексы с доменом антитела, в результате чего наблюдается зависимость биолюминесцентного сигнала Rm7 от концентрации белка-мишени.

Пару белков с большим фрагментом люциферазы – NLucL, анализировали твердофазным микроанализом: в лунки сорбировали антитела к ВКЭ в разной концентрации, а затем вносили в лунки гибридные белки (prED3-NLucL или NLucL-prED3). Как было показано ранее большой аминоконцевой фрагмент NLucL обладает остаточной биолюминесценцией, составляющей 0,005% от биолюминесценции полноразмерной люциферазы (см. п. 1.1.4). Биолюминесцентный сигнал гибридов, содержащих большой фрагмент люциферазы, формирующих специфичные комплексы на поверхности инициировали целентеразином. Как видно из рисунка, оба исследуемых белка связываются с 14D5a, в результате чего наблюдается зависимость биолюминесцентного сигнала NLucL от концентрации сорбированных антител (Рис. 3.8.Б)

Как видно из результатов этого эксперимента, домен антигена prED3 во всех 4-х гибридных белках связывается с антителами. Таким образом, эти белки пригодны для дальнейших исследований по восстановлению биолюминесцентной

активности расщепленной люциферазы NanoLuc при образовании комплекса между доменами антигена и антитела.

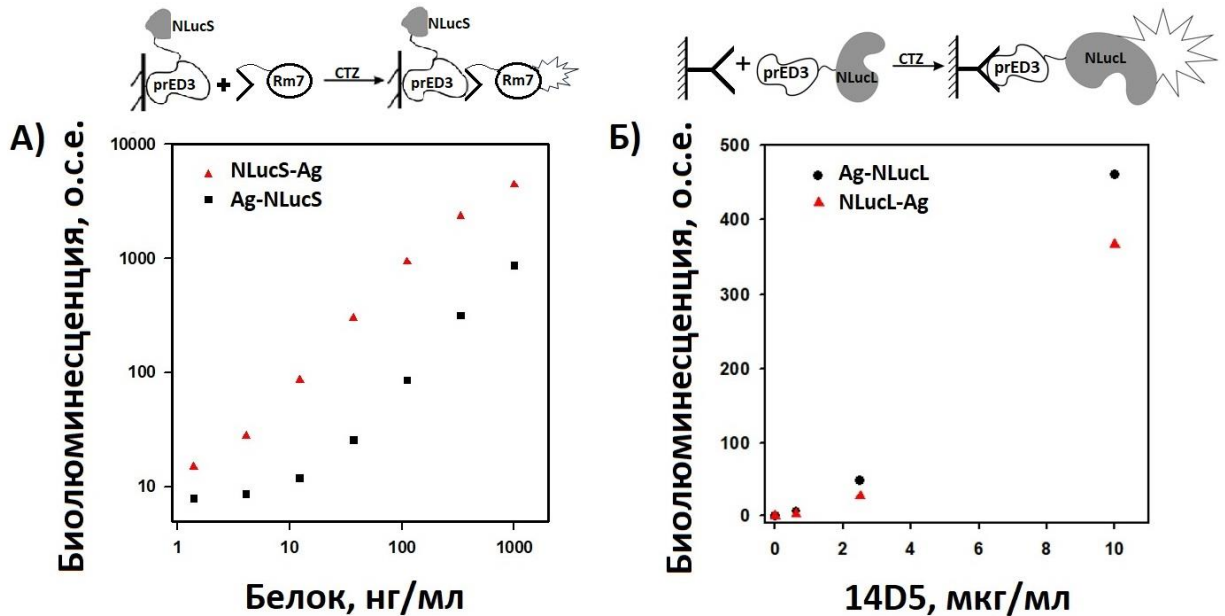


Рис. 3.8. Твердофазный биолуминесцентный анализ связывания со специфичным антителом гибридных белков, включающих домен prED3: А) – гибриды с малым фрагментом люциферазы NLucS выявляли по биолуминесцентному сигналу 14D5a-Rm7; Б) – комплексы со специфичным антителом 14D5 к ВКЭ гибридов с большим фрагментом NLucL выявляли с помощью его остаточной биолуминесценции.

3.1.8 Биолуминесценция бинарных смесей гибридных белков включающих разные комбинации доменов 14D5a, prED3, NLucS, NLucL (№ 2–9, Табл. 3.1)

Эквимоллярные бинарные смеси полученных гибридных белков исследовали на восстановление фуримазин-зависимой биолуминесцентной активности фрагментов люциферазы, сближенных благодаря образованию комплекса антиген-антитело. Всего было исследовано 8 возможных вариантов таких бинарных смесей (Рис. 3.9.). Как видно из рисунка максимальная величина сигнала была получена в случае пары Ab-NLucS+Ag-NLucL, что свидетельствует о наиболее оптимальном сближении и взаимной ориентации

фрагментов люциферазы, обеспечивающему восстановление ее биolumинесцентной активности в этом случае. Эта пара гибридов была использована для последующих экспериментов.

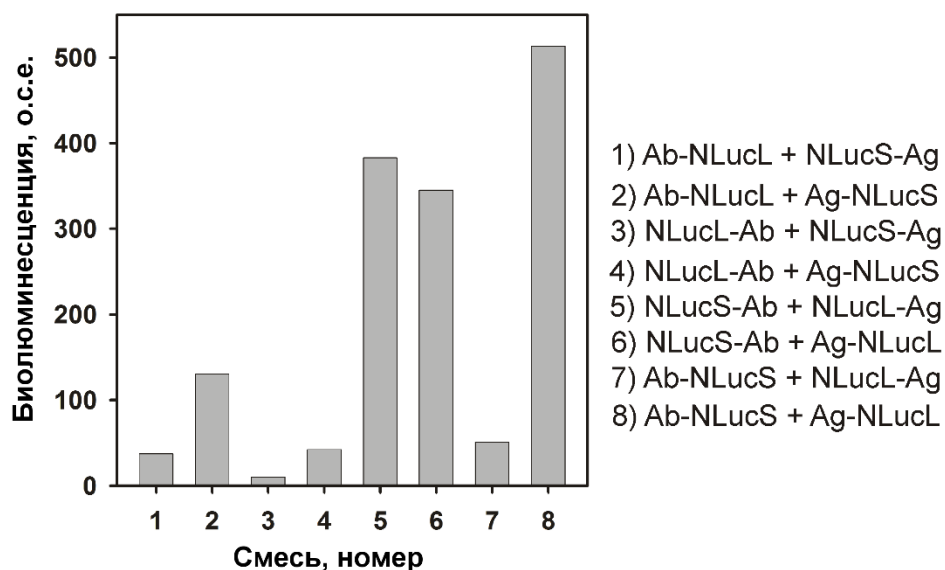


Рис. 3.9. Биolumинесцентный сигнал эквимольных бинарных смесей полученных гибридных белков. Справа показан состав смесей.

При близкой кинетике сигнала, 5-секундная интегральная биolumинесценция полученного комплекса составляет 2,4% от таковой исходной полноразмерной люциферазы (Рис. 3.10.А). Были определены кажущиеся кинетические параметры биolumинесцентной реакции комплекса. В качестве субстрата использовали фуримазин (Рис. 3.10.Б), а также Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок Renilla (CBP) при добавлении избытка Ca^{2+} (Рис. 3.11.). Полученные значения кинетических параметров реакции смеси Ab-NLucS+Ag-NLucL в сравнении с таковыми исходной полноразмерной люциферазы приведены в Таблице 3.3. Можно видеть, что значение k_{cat} для смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS, отражающее число оборотов фермента в единицу времени, а также параметр $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ при использовании CBP существенно ниже, чем для свободного фуримазина, что свидетельствует о более низкой эффективности биolumинесцентной реакции.

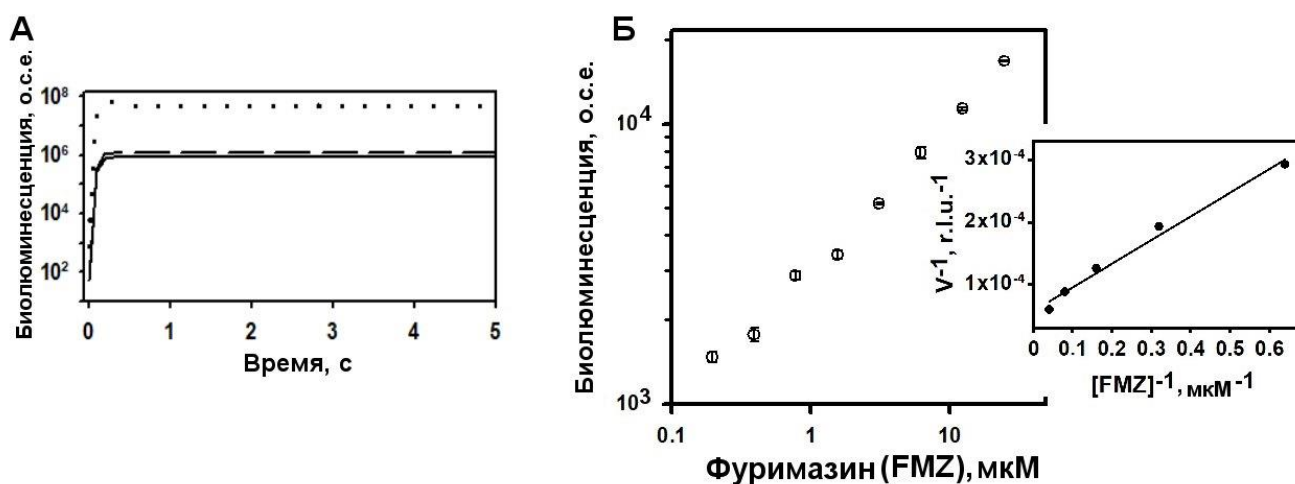


Рис. 3.10. А) Нормированные на белок фуримазин-индуцированные сигналы биолуминесценции исходной люциферазы ($\cdots$), смеси гибридных белков NLucS+Ag-NLucL (---) и этой же смеси после лиофильного высушивания (—). Б) Log–log график зависимости биолуминесцентного сигнала смеси NLucS+Ag-NLucL от концентрации фуримазина; на вставке график Лайнуивера-Берка. Концентрация гибридных белков 1 нМ во всех экспериментах. Точки на кривой – среднее от 3-х независимых определений.

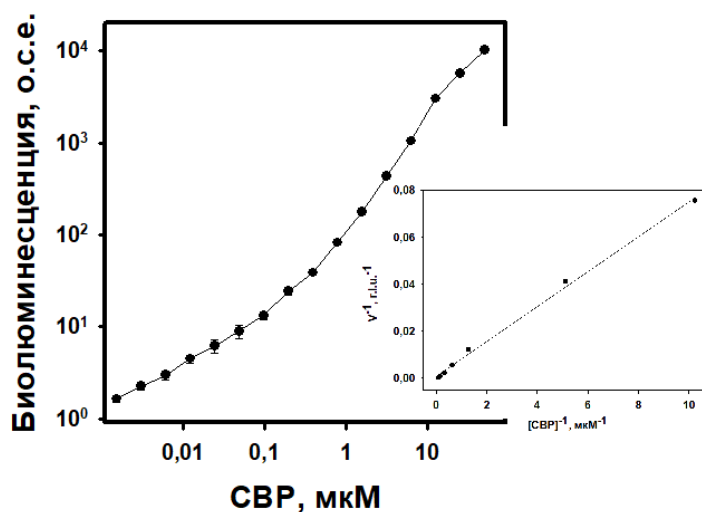


Рис. 3.11. Log–log график зависимости биолуминесценции смеси NLucS+Ag-NLucL, индуцируемой целентеразин-связывающим белком CBP от концентрации CBP; на вставке график Лайнуивера-Берка. Концентрация гибридных белков 1 нМ во всех экспериментах. Точки на кривой – среднее от 3-х независимых определений.

Из Табл. 3.3. видно, что эффективность фуримазин-зависимой люминесцентной реакции «собранный» люциферазы, определенная как

отношение k_{cat}/K_M почти на 2 порядка меньше чем эффективность реакции полноразмерной люциферазы: $2,9 \cdot 10^3$ против $4,5 \cdot 10^5 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Фактически это указывает на не очень высокую эффективность процесса комплементации фрагментов люциферазы при их сближении благодаря образованию комплекса антиген-антитело, входящих в состав гибридных белков. Связывание этих доменов оценивали с помощью конкурентного твердофазного билюминесцентного анализа.

Таблица 3.3. Кинетические параметры билюминесцентной реакции NanoLuc [168] и смеси (Ab-NLucS+Ag-NLucL) с разными субстратами

Параметр	NanoLuc		Ag-NLucL+Ab-NLucS	
	FMZ	CBP	FMZ	CBP
K_M	0,6	0,5	5,5	9,2
V_{max}	$2,6 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$
k_{cat}	$2,6 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$
k_{cat} / K_M	$4,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$

Для этого параллельно в лунки планшета, а) – пустые, либо б) – содержащие белок prED3 вносили растворы эквимольной смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS разной концентрации. Билюминесценцию инициировали добавлением фуримазина. Полученные зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации гибрида показаны на Рис. 3.12. Наблюдаемое падение сигнала связано как с падением концентрации смеси, так и с диссоциацией комплекса. В присутствии избытка антигена в лунки варианта б), диссоциированный гибрид Ab-NLucS образует с ним комплекс, не обладающий билюминесценцией. Билюминесцентный сигнал наблюдается только от недиссоциированного комплекса. Таким образом, разницу сигналов можно использовать как показатель для расчета константы аффинности этих гибридных белков (см. Разд. 2. Материалы и методы). После подсчета с использованием пакета программ Sigma Plot, константа аффинности K_a для смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS составила $3,77 \times 10^7 \text{ М}^{-1}$, что близко к таковой для исходного рекомбинантного антитела мыши sc14D5a и белка ED3 – $1,6 \times 10^7 \text{ М}^{-1}$ [164], а также гибридного антитела 14D5a-Rm7 – $2,65 \times 10^7 \text{ М}^{-1}$.

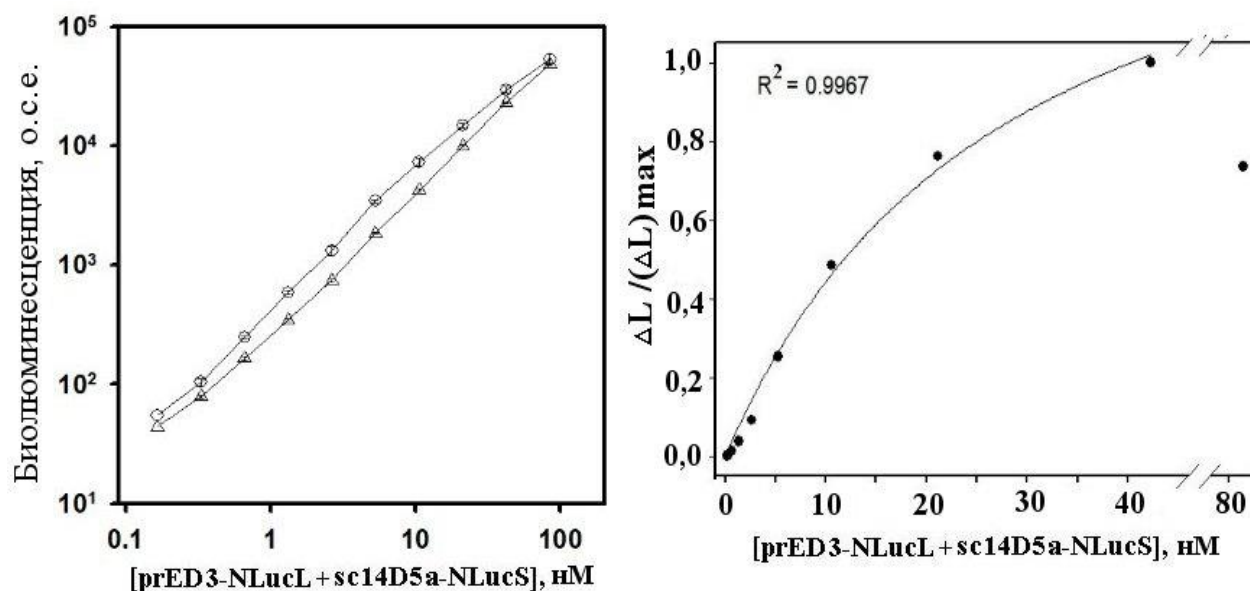


Рис. 3.12. Слева: биолуминесценция смеси Ag-NLucL+Ab-NLuc в отсутствие антигена DE3 (-○-) и его присутствии (-Δ-). Справа: зависимость разницы сигналов смеси (ΔL), нормализованная на максимальную разницу (ΔL)_{max}, N=3. о.с.е. – относительный световые единицы.

Таким образом, нами получена пара гибридных белков, включающие фрагменты люциферазы NanoLuc и функциональное специфическое миниантитело к ВКЭ (14D5a) либо его антигенную детерминанту (prED3), способные образовывать иммуноткомплекс 14D5a-prED3 с высокой аффинностью, что приводит к комплементации фрагментов люциферазы с восстановлением биолуминесцентной активности. Невысокий процент восстановления ее биолуминесцентной активности очевидно можно объяснить возникающими стерическими препятствиями при образовании комплекса, а также неправильной взаимной ориентацией фрагментов люциферазы. Повлиять на эти факторы возможно варьируя состав гибридных молекул – удалением полигистидиновых фрагментов, меняя структуру полипептидных линкеров и пр. Эти исследования оставлены за рамками данной работы.

3.2 Билюминесцентный иммуноанализ ВКЭ И ВКЭ-ассоциированных мишеней

3.2.1 Твердофазный билюминесцентный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка 14D5a-Rm7[36, 170]

Для изучения аналитического потенциала гибридного белка 14D5a-Rm7 как репортера в твердофазном иммуноанализе ВКЭ были проведены модельные эксперименты по выявлению гликопротеина Е параллельно билюминесцентным методом и с помощью коммерческого колориметрического набора Вектор Бест на основе пероксидазы хрена (Рис. 3.13).

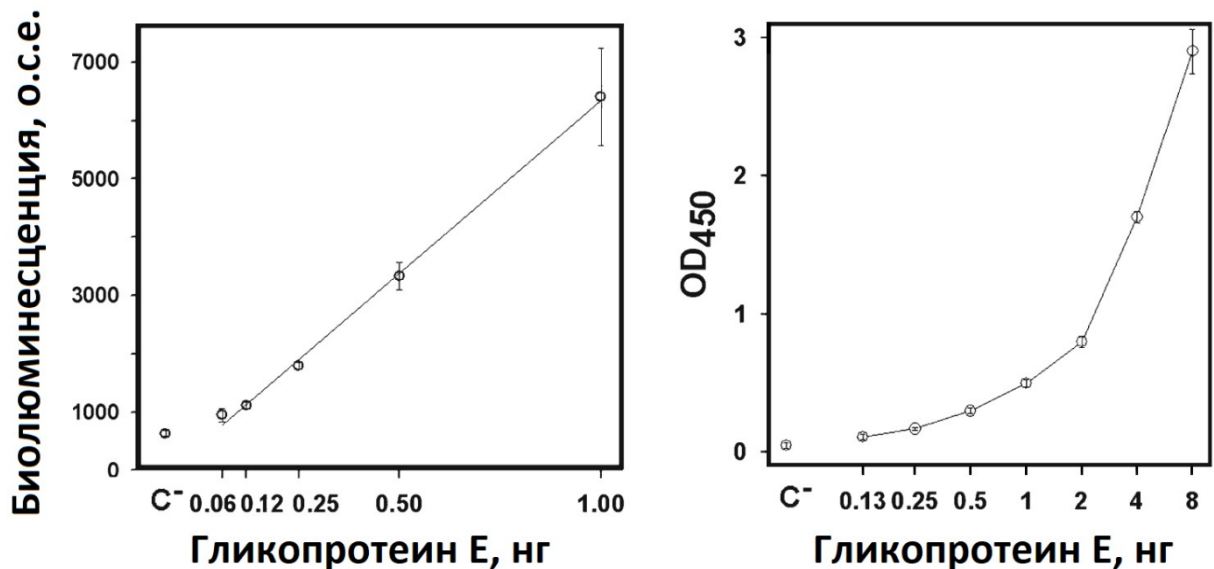


Рис. 3.13. Билюминесцентный (слева) и колориметрический (справа) твердофазный иммуноанализ гликопротеина Е. о.с.е. – относительные световые единицы; OD₄₅₀ – оптическая плотность образца при длине волны 450 нм. Каждая точка – среднее значение ± стандартное отклонение, n=3.

Из рисунка видно, что сигнал билюминесцентного репортера линейно зависит от концентрации белка Е в диапазоне 0,015 – 1 нг, ($R^2=0.997$). Используя эту зависимость как калибровочную, определили чувствительность анализа как среднее значение от контрольного отрицательного образца (C⁻) + 2 стандартных отклонения, которое составило 56 пг. Это почти в пять раз ниже, чем чувствительность колориметрического определения – 250 пг.

Особый интерес представляет эксперимент по сравнению результатов билюминесцентного иммуноанализа и анализа на основе ОТ-ПЦР. Для него коллегами из Омского НИИ природно-очаговых инфекций были предоставлены клещи, специально инфицированные ВКЭ (5 особей) и «здоровые» клещи (3 особи). На Рис. 3.14. показан результат параллельного тестирования этих клещей методом ОТ-ПЦР и билюминесцентным иммуноанализом.

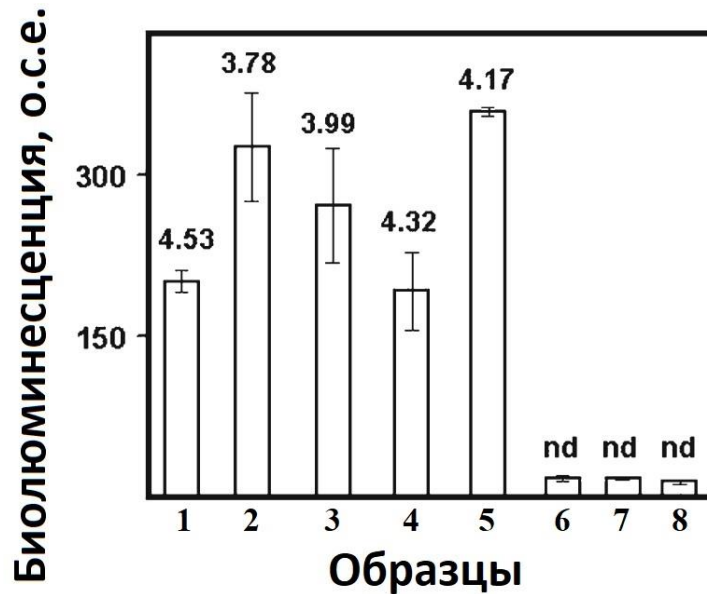


Рис. 3.14. Иммуноанализ экстрактов ВКЭ-инфицированных (№ 1-5) и «здоровых» (№ 6-8) клещей. Колонки показывают величину билюминесцентного сигнала, числа над колонками – логарифм количества копий РНК ВКЭ, определенных с помощью РТ-ПЦР в соответствующих образцах. nd – отсутствие сигнала. Каждая колонка- среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, $n=3$. О.с.е. – относительный световые единицы.

Колориметрическое исследование не выявило вируса ни в одном из этих образцов. Результаты билюминесцентного и ПЦР анализа совпали. По данным последнего, билюминесцентный анализ позволяет определять около 10^4 - 10^5 вирусных частиц, что составляет около 1 пг вирионов. При этом билюминесцентный анализ гораздо проще, дешевле и быстрее – сигнал от образца интегрируется всего 10 с. Высокопроизводительных планшетный формат позволяет одновременно анализировать от 8 (отдельный стрип) до 96 (стандартный иммунологический микропланшет) образцов.

3.2.2 Тестирование образцов природных клещей [14]

Тестирование природных клещей на наличие ВКЭ проводили твердофазным иммуноанализом в двух вариантах, по схеме, представленной на Рис. 3.15.: А) в лунки планшета, активированные мышиными анти-ВКЭ антителами вносили анализируемый образец и метку одновременно, а затем после инкубирования и промывок инициировали биолуминесценцию люциферазы добавлением субстрата; Б) образец и метку вносили последовательно, инкубировали и промывали лунки на каждой стадии, а затем добавляли субстрат. В качестве последнего использовали свежеприготовленный раствор целентеразина либо раствор целентеразин-связывающего белка Renilla в буфере, содержащем CaCl_2 .

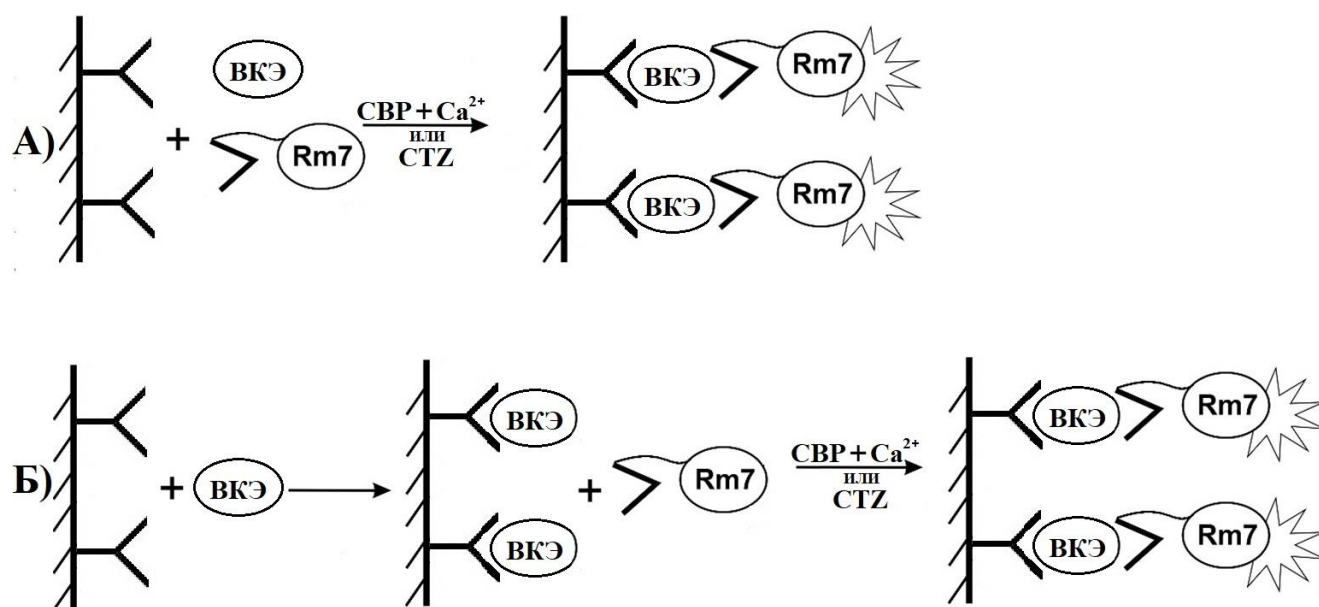


Рис. 3.15. Твердофазный биолуминесцентный анализ ВКЭ: А) – одновременное внесение анализируемого образца и метки; Б) – последовательное внесение и инкубирование образцов.

Проведение анализа в варианте А) существенно укорачивает время анализа, и совпадает с процедурой анализа с помощью коммерческого набора Вектор Бест для колориметрического иммуноанализа. Однако, начиная с 2019 г. протокол анализа набором Вектор Бест предлагает проводить тестирование с последовательным инкубированием образцов. Поэтому начиная с этого времени

мы проводили тестирование так же, чтобы условия анализа были максимально близкими.

В 2016 г было исследовано более 500 клещей одновременным биolumинесцентным анализом (Рис 3.15.А), из них по данным колориметрического анализа 15 образцов содержали ВКЭ, в 487 случаев ВКЭ отсутствовал. При этом в качестве субстрата использовали СВР. Для сравнения, около 30% из этих же образцов были проанализированы с использованием свежеприготовленного раствора СТЗ. В качестве критерия наличия вируса использовали значение дискриминационного фактора D , равного отношению биolumинесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (С-, набор D-1154, Вектор Бест, Россия). При $D \geq$ образец считали ВКЭ положительным. Все образцы параллельно были исследованы с помощью набора для колориметрического иммуноанализа, результаты которого принимали как истинные. Один из образцов со значением $D = 1,9$ был принят как отрицательный, что не совпало с данными колориметрического анализа и, как мы полагаем, такой результат мог быть связан с так называемым «хук» эффектом. Результаты представлены в Таблице 3.4. Видно, что значение D у образцов, исследованных с помощью целентеразина выше, чем у СВР, но результаты тестирования на наличие ВКЭ в образцах совпадают.

Таблица 3.4. Выявление ВКЭ твердофазным биolumинесцентным способом в природных клещах с запуском биolumинесценции разными субстратами (2016 г.)

Субстрат	D , ВКЭ-/С-	D , ВКЭ+ /С-	С+ /С-
СТЗ	$1,4 \pm 0,3$, $n = 157$	$4,9 \pm 2,4$, $n = 14$	$24,3 \pm 3,6$, $n = 4$
СВР	$1,2 \pm 0,3$, $n = 487$	$2,8 \pm 0,8$, $n = 15$	$5,2 \pm 1,3$, $n = 9$

Как отмечалось выше, целентеразин плохо растворяется в водных средах и подвержен автоокислению. В этом аспекте показанная возможность заменить его на стабильный, хорошо растворимый субстрат СВР делает предлагаемый

биолюминесцентный способ детекции ВКЭ более удобным для рутинного использования. В то же время, его получение требует дополнительных трудозатрат по получению и выделению активированного целентеразином СВР. В условиях лаборатории приготовление растворов СТЗ не представляет особых трудностей. Тестирование клещей в последующие сезоны было проведено с применением этого субстрата.

В течение сезонов 2017 – 2023 гг. разработанный способ выявления ВКЭ использовали для исследования природных клещей. Результаты исследований приведены в Таблице 3.5. Все образцы параллельно были исследованы с помощью набора для колориметрического иммуноанализа, результаты которого принимали как истинные. Всего за период с 2016 по 2023г. нами исследовано более 1500 образцов экстрактов клещей, из которых положительными оказались 28, т.е. около 2% от всех исследованных образцов.

Таблица 3.5. Выявление ВКЭ в природных клещах твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом.

Год	Д, образец-/С-	Д, образец+/С-	С+/С-
2017	1,1±0,3 (n=414)	5,3±1,1 (n=4)	16,6±5,8 (n=17)
2019	0,9±0,3 (n=96)	6,8 (n=1)	42,6±14,9 (n=3)
2020	1,1±0,3 (n=124)	3,2±1,0(n=4)	30,1±6,3 (n=3)
2021	1,1±0,4 (n=155)	4,7±0,2 (n=2)	18,3±6,2 (n=2)
2022	0,9±0,4 (n=104)	2,7 (n=1)	9,6±2,3 (n=2)
2023	0,8±0,3 (n=124)	2,5 (n=1)	10,2±3,3 (n=3)

Полученное по результатам 2017-2023 сезонов значение чувствительности биолюминесцентного способа выявления ВКЭ составило 100%: Специфичность анализа составила 98,9 %, т.е. ложноположительными оказались 10 образцов. Возможно, этот результат связан с разницей в чувствительности колориметрического и биолюминесцентного способов анализа. К сожалению,

ограниченный объем предоставленного материала не позволил провести дополнительный независимый анализ спорных образцов методом ОТ-ПЦР. Необходимо отметить, что значение дискриминационного фактора было выбрано из общих соображений и не исключено, что дополнительные исследования позволят уточнить его значение.

В целом, по сравнению с колориметрическим иммуноанализом ВКЭ в клещах предложенный биолуминесцентный способ характеризуется более высокой чувствительностью (о чем свидетельствуют эксперименты с лабораторными клещами) и укороченным временем анализа: в процедуре отсутствуют стадии инкубирования субстрата фермента, а также добавления стоп реагента ($2\text{M H}_2\text{SO}_4$). По сравнению с анализом на основе ОТ-ПЦР метод существенно проще, поскольку не требует специального оборудования, ферментов и особых условий проведения анализа.

3.2.3 Гомогенный биолуминесцентный иммуноанализ на основе гибридных белков, включающих фрагменты люциферазы NanoLuc

Вирус клещевого энцефалита представляет собой сферическую частицу с диаметром около 50 нм, характерным для других флавивирусов. На поверхности зрелого вириона располагаются 180 копий гликопротеина E (prE) и белка M [165]. Иммунодоминантный белок prE состоит из 3-х поверхностных доменов (D1-D3), стержневого и трансмембранного участков [166]. Предполагается, что домен D3 (prED3) опосредует связывание вириона с клеткой [167]. Анти-ВКЭ одноцепочечное мышиное миниантитело (sc14D5a), включающее области V_H и V_L , соединенные гибким линкером $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$, связывает рекомбинантный белок E с константой сродства $2,65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [164]. Гибридные белки, полученные нами, включают это миниантитело и фрагменты люциферазы NanoLuc, соединенные гибким линкером $(\text{Gly}_2\text{Ser})_5$, приблизительная длина которого – 65 Å. По нашим предположениям, это достаточное расстояние позволяющая сближению фрагментов люциферазы, когда миниантитело гибридной молекулы присоединится к вирусной частице. Модельные расчеты

показали, что максимальное расстояние между присоединенными Fab фрагментами похожего химерного антитела ch14D5 составляет примерно 45 Å [168], Рис. 3.16.

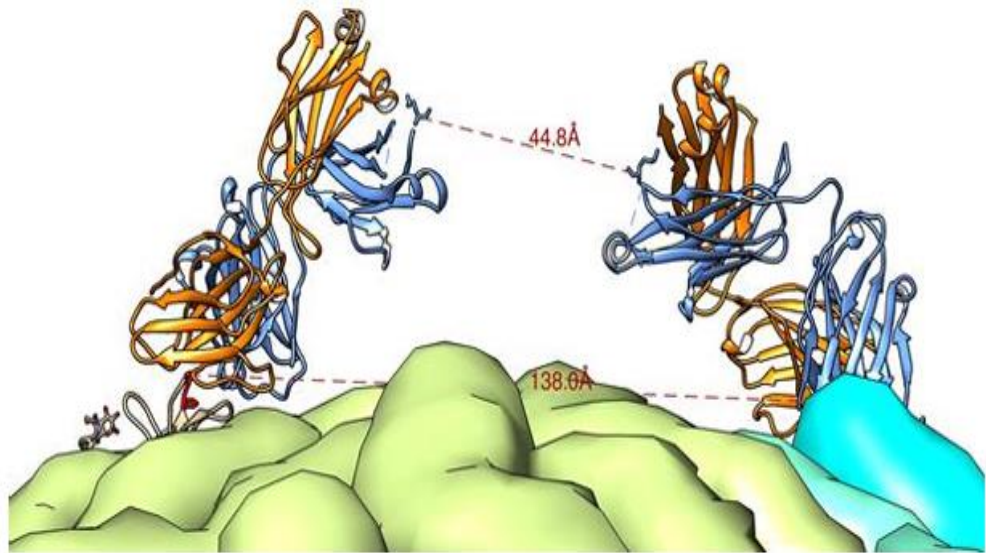


Рис. 3.16. Предполагаемая модель расположения миниантител связанных с доменами prED3. Расстояние между доменами – 138 Å, а между концевыми участками антител – 45 Å. [168].

3.2.4 Гомогенный иммуноанализ ВКЭ сэндвич типа

Для проведения модельных экспериментов по сборке люциферазы на мишени в растворе использовали молекулярную мишень, представляющую собой нековалентный комплекс стрептавидина с биотинилированным производным белка prED3. Мы предполагали, что при смешивании этих белков благодаря высокоаффинному взаимодействию стрептавидин-биотин и наличию 4 сайтов связывания (стрептавидин состоит из 4-х субъединиц, каждая из которых связывает биотин), будут образовываться комплексы, содержащие более одной молекулы prED3 на молекулу стрептавидина. Гель-электрофорезный анализ в неденатурирующих условиях показал, что полученные аддукты имеют молекулярную массу, существенно превосходящую массу исходного стрептавидина (Рис. 3.17.), что свидетельствует об образовании комплексов с

биотинилированным белком prED3. Таким образом, полученный комплексный белок стрептавидин-(prED3)_n можно использовать в качестве модельной мишени, на которую могут присоединяться исследуемые гибридные белки.

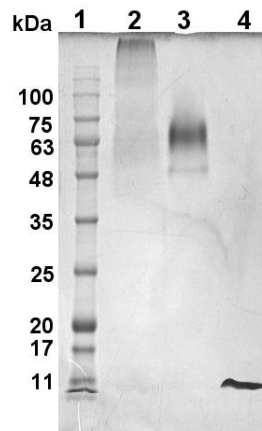


Рис. 3.17. Электрофоретический анализ фракций при получении модельного белка-мишени (10%-ный SDS-ПААГ, без денатурации белков, окрашивание Coomassie blue). Дорожки: 1 - маркерные белки, мол масса (kDa) показана цифрами; 2 - образец молекулы-аддукта стрептавида и биотинилированного производного белка prED3; 3 - исходный стрептавидин; 4 - исходный белок prED3.

На Рис. 3.18. приведена гипотетическая схема сборки эквимольной смеси гибридов на модельной мишени стрептавидин-(prED3)_n, а также зависимость возникающего при этом биолюминесцентного сигнала благодаря сближению фрагментов люциферазы с восстановлением фуримазин-зависимой активности от концентрации модельной мишени. Эксперимент проводили с использованием в качестве субстрата целентеразин либо его стабильную форму в виде Ca²⁺-зависимого целентеразин связывающего белка *Renilla* (CBP). Ранее нами было показано, что обе формы субстрата окисляются люциферазой NanoLuc [169].

Для сборки модельного комплекса использовали пару гибридных молекул Ab-NLucL+NLucS-Ab, при сборке которой на поверхности, активированной белком E был получен максимальный биолюминесцентный ответ (п. 3.1.6, Рис. 3.6). Как видно из полученной нами зависимости сигнала от концентрации, синтезированной нами мишени (Рис. 3.18.), можно заключить, что в растворе

образуются многокомпонентные комплексы со сближением и комплементацией фрагментов люциферазы и возникновением биолюминесценции в присутствии обоих субстратов как СВР, так и «свободного» целентеразина.

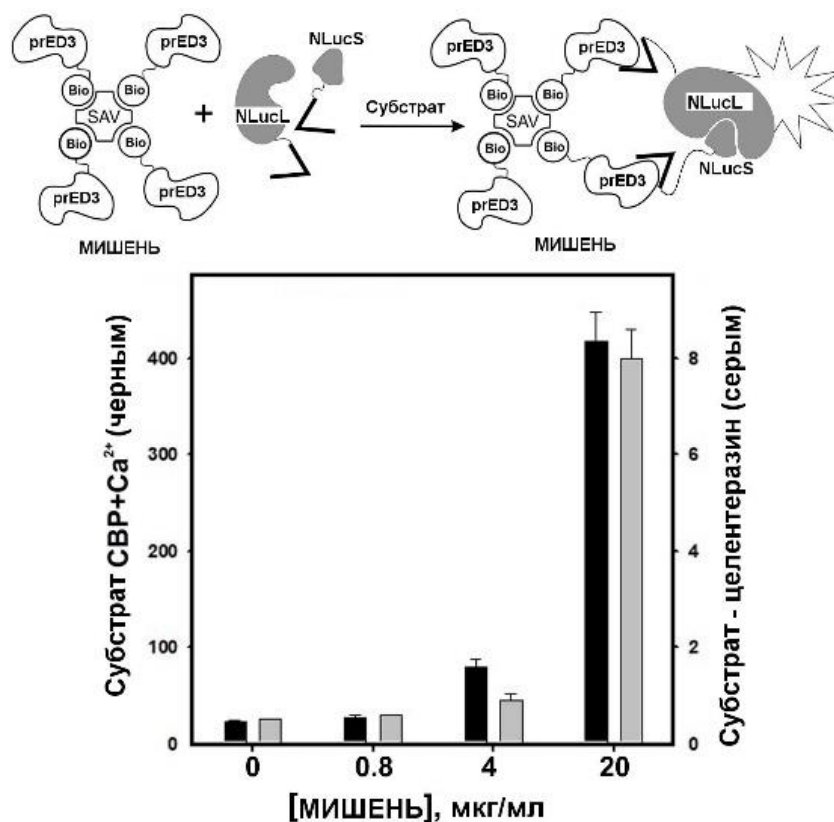


Рис. 3.18. Зависимость биолюминесцентного сигнала в результате комплементации фрагментов люциферазы NLucL и NLucS от концентрации модельной мишени в растворе. Bio-биотин, SAV – стрептавидин. Образование комплекса с комплементацией фрагментов люциферазы представлена на схеме сверху. n=3.

Однако, несмотря на наши ожидания, при переходе от модельной к ВКЭ-ассоциированным мишеням (анти-ВКЭ вакцина, экстракты природных клещей) эффект комплементации обнаружить не удалось. Очевидно, фрагменты люциферазы при сборке подобного типа надмолекулярных комплексов сближаются недостаточно, либо их ориентация не обеспечивает комплементации фрагментов фермента с восстановлением биолюминесцентной активности.

3.2.5 Гомогенный иммуноанализ ВКЭ конкурентного типа [171]

Как было показано в разделе 3.1.8 образование высокоаффинного комплекса антиген-антитело – в нашем случае белков sc14D5a и prED3 в составе гибридных молекул, может обеспечить сближение и комплементацию фрагментов люциферазы в этих же гибридах с восстановлением её биолюминесцентной активности. В таком случае, присутствующие в среде вирус-ассоциированные мишени могут конкурировать за связывание с миниантителом, что будет приводить к разрушению комплекса и падению биолюминесцентного сигнала. Возможность такого анализа была исследована.

В качестве компетиторов были исследованы рекомбинантный белок prED3 и вакцина Клещ-Е-Век, содержащая инактивированный вирус штамма Софьин. Как видно из Рис. 3.19 А и Б в обоих случаях добавление компетиторов приводит к падению биолюминесцентного сигнала, величина которого соответствует увеличению концентрации компетитора. Пользуясь зависимостью сигнала от концентрации белка prED3 (Рис. 3.19.А) мы определили предел обнаружения как среднее от трех значений, полученных от раствора PBS минус три стандартных отклонения, который составил 0,3 нг. По грубой оценке, это соответствует 10^8 вирионам в образце (используя значение мол. массы белка 12 кДа и содержанию на поверхности вируса 180 копий белка Е). Известно, что один клещ может содержать 10^7 - 10^{10} вирионов, это означает, что полученное значение предела обнаружения является клинически значимым. Отметим, что при обнаружении ВКЭ коммерческим набором Вектор Бест, предел чувствительности соответствует $2,3 \times 10^7$ вирионов.

В случае вакцины с рабочим титром 1:128 (по инструкции производителя) эффект наблюдается даже при большем разведении – 1:200.

Были протестированы также образцы специально отобранных природных клещей. Величину L/L_0 , использовали как дискриминационный фактор (D), где L_0 – это биолюминесцентный сигнал от независимого негативного контроля (Вектор Бест), L – сигнал от образца. Были определены

7 ВКЭ-положительных и 79 ВКЭ-отрицательных образцов. Предложенный нами вариант анализа достоверно разделяет группу «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей ($p=0,000013$, U тест Манна-Уитни, величина $Me(C_{25}-C_{75})$ составила 1 (0,93-1,2) и 0,56 (0,53-0,65), соответственно (Рис. 3.19.В).

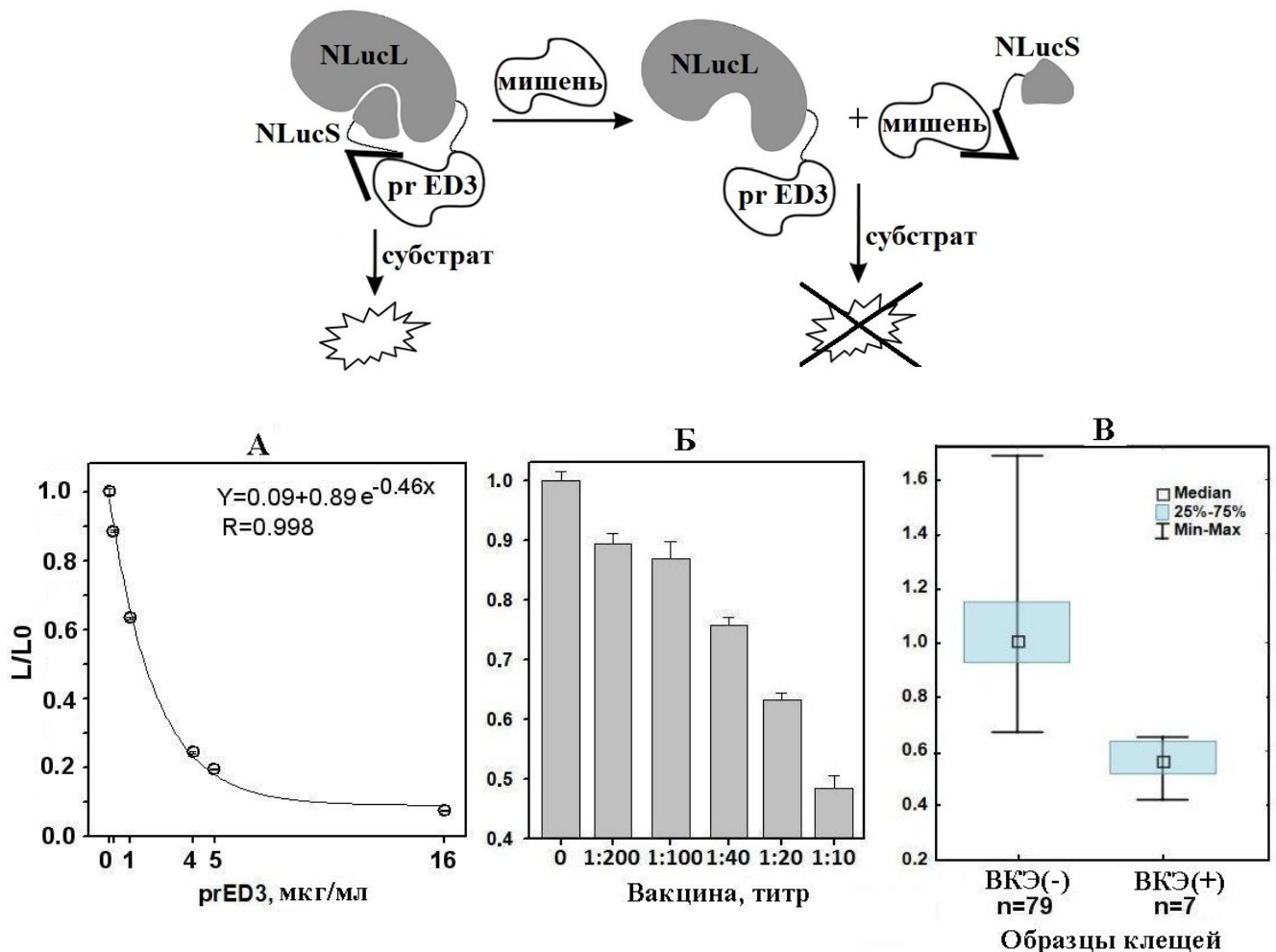


Рис. 3.19. Гомогенный биолуминесцентный иммуноанализ схема (сверху); prED3 (А) и вакцины КлеЩ-Е-Вак (Б); $n=3$. Результаты анализа природных клещей (С). Во всех экспериментах в качестве субстрата использовали фуримазин. L/L_0 – фактор дискриминации Д, где L_0 , L – биолуминесцентные сигналы от буферного раствора и от экспериментального образца, соответственно.

Одновременно эти образцы были проанализированы коммерческим набором для колориметрического иммуноанализа фирмы Вектор Бест. Результаты тестирования полностью совпали. Таким образом, на основе

полученных результатов при значении D фактора ниже 0,65 образец может считаться ВКЭ-положительным.

3.2.6 Дизайн лиофилизированного реагента, готового к использованию для одностадийного тестирования клещей

Известно, что при лиофильном высушивании, которое включает стадию замораживания их растворов, белки часто теряют значительную часть специфической активности, поскольку как правило содержат молекулы воды в своём составе. Чтобы избежать этого в растворы вносят различные соединения (нейтральные белки, углеводы и т.п.) в качестве стабилизаторов. В нашей работе в качестве таких добавок исследовали 5% трегалозу и 0,1% БСА. Эксперименты по поиску оптимальных условий получения лиофилизированной смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS показали, что добавление в раствор 0,1% БСА в качестве стабилизатора является оптимальным: эта добавка обеспечивает практически полную регенерацию биолуминесцентной активности этой смеси (Таблица 3.6.) после лиофилизации. Эту добавку использовали при лиофилизировании смесей для однофазного анализа ВКЭ- ассоциированных образцов.

Таблица 3.6. Регенерация биолуминесцентной активности смеси гибридов Ag-NLucL+Ab-NLucS после лиофилизирования в разных условиях

Условия лиофилизации	Регенерация сигнала, %*
Свежеприготовленная смесь в PBS	100%
Ллиофилизированная смесь в PBS	31,3%
Ллиофилизированная смесь в PBS, 0,1% БСА;	96,8%
Ллиофилизированная смесь в PBS, 5% трегалоза	0,7%

*Субстрат - фуримазин

При создании однофазной аналитической системы, готовой к употреблению при добавлении образца были приготовлены следующие лиофилизированные смеси:

- образцы бинарной смеси Ag-NLucL+Ab-NLucS фактически представляющие собой отрицательный контроль (C-),
- образцы трехкомпонентной смеси, где присутствует антиген — Ag-NLucL+Ab-NLucS+prED3 представляющие собой положительный контроль (C+)

Регенерацию белков в C+ и C- после лиофилизирования проверяли после растворения в исходном объеме дистиллированной воды при добавлении субстрата фуримазина. Сигналы регистрировали сразу после добавления субстрата и через 30 мин. (Рис. 3.20.А). Из рисунка видно, сигнал от смеси C+ почти в 4 раза ниже, чем от смеси C-, т.е. эти образцы могут служить контрольными в разрабатываемой нами аналитической системе. Обращает внимание длительность биолюминесцентного сигнала, характерного для люциферазы NanoLuc — через полчаса его интенсивность в обоих образцах

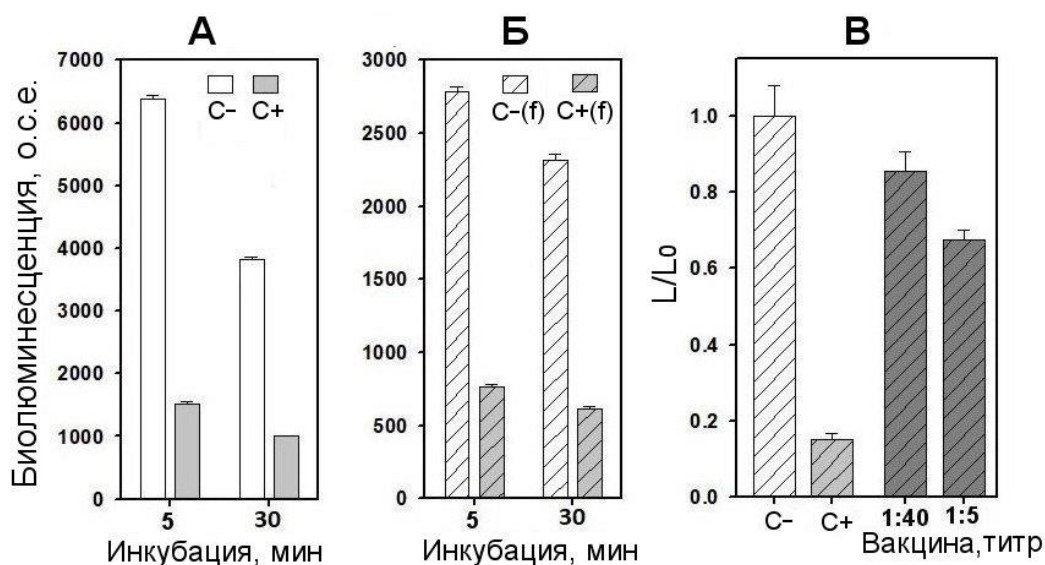


Рис. 3.20. Регенерация биолюминесценции лиофилизированных смесей после растворения: (А) сигналы смесей C- и C+, инициированные фуримазином; (Б) сигналы смесей C+(f) и C-(f), лиофилизированных вместе с фуримазином; (В) падение биолюминесценции смеси C-(f) в присутствии вакцины. C- и C+ — негативный и позитивный контроли.

снизилась только в полтора раза, при этом их соотношение практически не изменилось. Это создает возможность многократной записи сигналов при анализе образцов, а также накоплению сигнала при низкой концентрации мишени.

Особый интерес представляют образцы $C+(f)$ и $C-(f)$, содержащие одновременно еще и субстрат биолуминесцентной реакции люциферазы фуримазин. Смеси готовили из предварительно охлажденных до $+5^{\circ}\text{C}$ растворов и быстро замораживали, чтобы свести к минимуму выгорание субстрата.

На Рис. 3.20.Б видно, что после растворения лиофилизированных с фуримазином контрольных смесей, абсолютные значения сигналов уменьшились примерно в 3 раза, однако соотношение сигналов $C+(f)/C-(f)$ равно 3,8, т.е. практически не отличается от такового для смесей, лиофилизированных без субстрата.

Моделируя условия анализа, к лиофилизированному раствору $C-(f)$ добавили образцы вакцины, как одной из ВКЭ-ассоциированных мишеней. Как видно из Рис 3.21.В, 10% падение сигнала определяется в образце вакцины с титром 1:40, что существенно хуже, чем при анализе с помощью свежеприготовленных растворов: там такое же падение сигнала наблюдается в образцах вакцины с титром до 1:200 (см. Рис. 3.19.).

Было обнаружено, что лиофилизирование предварительно приготовленной смеси, представляющей собой готовый реагент (белки + фуримазин) приводит практически к полной потере биолуминесценции системы уже при хранении в течение 1,5 месяцев, независимо от температуры хранения, очевидно в результате окисления субстрата. С целью сохранения субстрата от преждевременного окисления и увеличения сроков хранения смесей были проведены эксперименты с последовательным замораживанием образцов: вначале замораживали растворы белков, а затем к этим образцам добавляли охлажденные растворы фуримазина. Лيوфилизированные образцы хранили при температурах $+5$ и -20°C и проверяли регенерацию биолуминесцентного сигнала сразу после лиофилизации, а также через определенные промежутки времени. Как видно из Рис. 3.21.А,

последовательное замораживание белков и субстрата позволяет сохранить биolumинесцентную активность системы при более длительном хранении: через 6 месяцев хранения при -20°C в системе восстанавливается 9% от биolumинесцентной активности, полученной сразу после лиофилизирования. Температурный режим не сильно влияет на падение биolumинесценции — так через 6 недель восстанавливается 13 и 18 % активности при хранении при $+5$ и -20°C , соответственно. Соотношение сигналов $C+(f) / C-(f)$ изменяется слабо и колеблется в диапазоне 0,1- 0,19.

Моделируя условия анализа, к лиофилизированному раствору $C-(f)$ добавили образцы рекомбинантного белка $prED3$, как одного из ВКЭ-ассоциированных мишеней. Как видно из Рис 3.21.Б, конкуренция этой мишени наблюдается, но существенно более слабая по сравнению с таковой в свежеприготовленных растворах $C+$ и $C-$. Так, при концентрации $prED3$, равной 1 мкг/мл падение сигнала составляет всего 10%, тогда как в случае свежеприготовленной системы оно составляет почти 40% (см. Рис. 3.19.) Таким образом, наблюдается ослабление конкуренции молекулы-мишени за связывание с доменом антитела при хранении лиофилизированных образцов аналитической

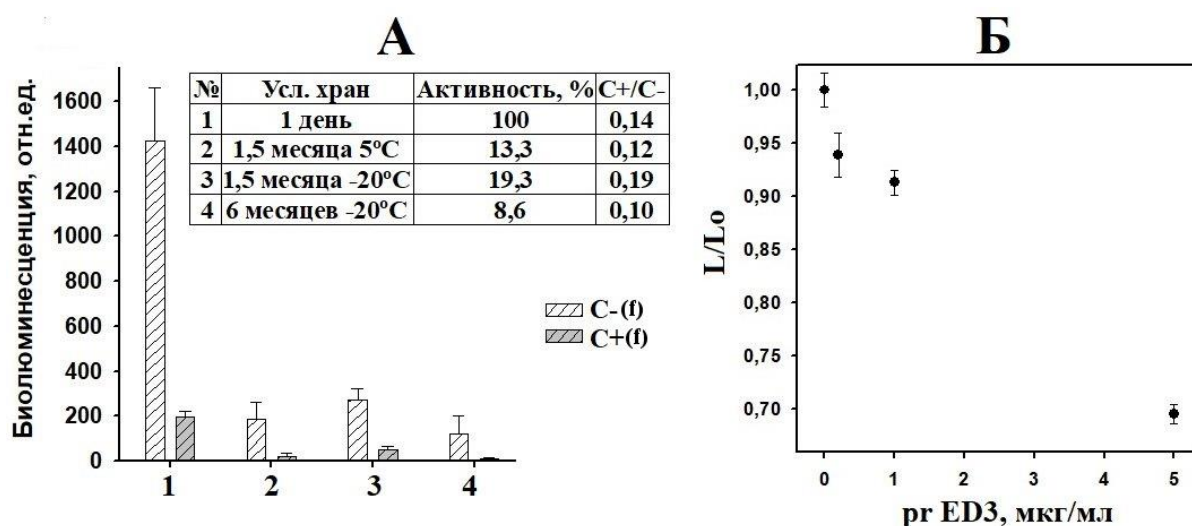


Рис. 3.21. А) Регенерация биolumинесценции в образцах $C+(f)$ и $C-(f)$ после лиофилизации образцов с последовательным замораживанием смеси гибридных белков и фуримазина. Б) Конкурентный анализ рекомбинантного белка $prED3$ при добавлении к лиофилизированному образцу $C-(f)$ после 6-ти месячного хранения.

смеси, что отражается на чувствительности анализа. Как было показано выше связывание гибридных белков происходит с высокой аффинностью: $K_a = 3,77 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Мы предположили, что связывание мишени с доменом антитела 14D5a-NLucS, которое уже находится в комплексе с доменом антигена prED3-NLucL затруднено в силу высокой аффинности этих доменов и стерических препятствий. Чтобы проверить эту гипотезу были проведены следующие эксперименты.

Смеси для лиофилизации были подготовлены в 3-х разных вариантах:

А) эквимольные растворы C+ и C- смешивали, инкубировали 30 мин при 24°C со встряхиванием 500 об/мин. Далее замораживали и лиофилизировали (так готовили растворы во всех ранее проведенных экспериментах);

Б) Приготовить смесь А) и, минуя инкубирование, заморозить и лиофилизировать;

В) Замораживать растворы каждого из гибридных белков последовательно, наслаивая охлажденный раствор каждого белка на замороженный раствор предыдущего.

При этом в случае А) создаются все условия для создания комплекса 14D5a-NLucS+prED3-NLucL в отрицательном контроле и оптимальные условия для конкуренции с белком prED3 в положительном контроле. В случае Б) эти условия несколько хуже – нет периода инкубирования, а в случае В) эти условия сведены к минимуму – белки не смешиваются, не инкубируются и могут взаимодействовать очень кратко на границе между замороженным и наслоенным раствором. Регенерацию белков наблюдали по биолюминесценции после растворения в воде и добавления субстрата фуримазина. Полученные результаты представлены на Рис. 3.22. Соотношение сигналов C+/C- в случае А составляет 0,2, а при добавлении конкурента prED3 к образцу отрицательного контроля, эта величина существенно выше и составляет 0,6. В случае Б), соотношение C+/C- составляет 0,22, а в образце с конкурентом – 0,4. В случае В), когда практически нет условий для предварительного формирования комплекса 14D5a-NLucS+prED3-NLucL, эти соотношения составляют 0,2 и 0,2 для обоих случаев. Т.е. в случае В) в системе

создаются условия равной конкуренции за связывание с доменом миниантитела в гибриде 14D5a-NLucS между гибридом prED3-NLucL и мишенью в образце prED3, как в экспериментах со свежеприготовленными растворами C+ и C-.

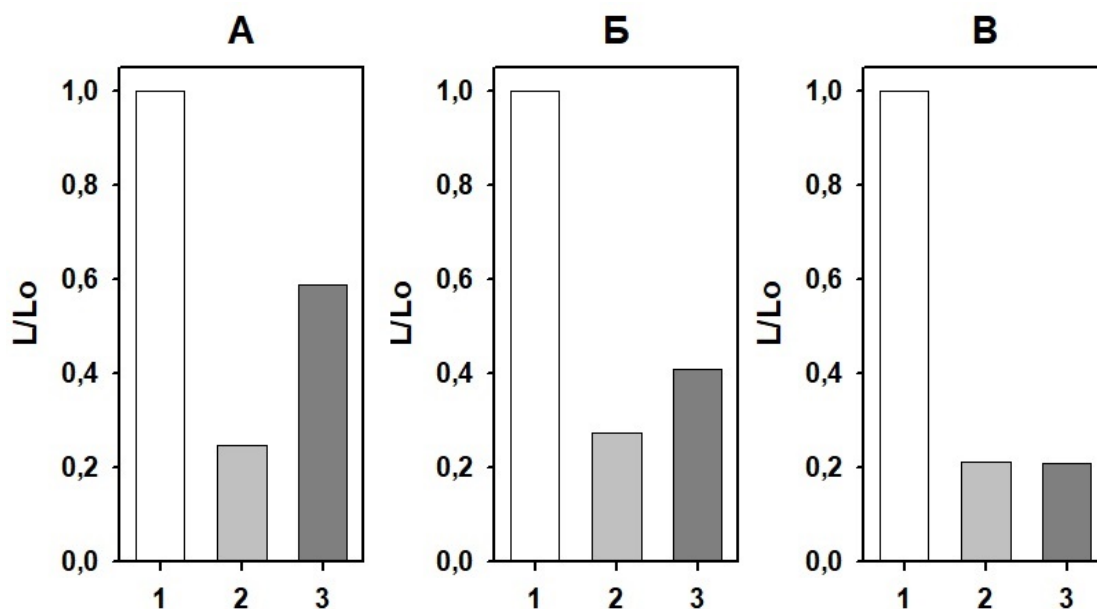


Рис. 3.22. Регенерация биолуминесценции C-, C+ и ответ на конкуренцию белка prED3 при разном порядке замораживания растворов для лиофилизации: А) – смеси гибридных белков, инкубировали в течение 30 мин с перемешиванием при 24°C; Б) – смеси белков без инкубирования; В) – растворы гибридных белков, замороженные изолированно друг от друга. L/L_0 – относительная биолуминесцентная активность образцов после лиофилизации: 1 – образец C-; 2 – образец C+; 3 – образец C- при добавлении prED3 (система для выявления модельной мишени).

Образцы полностью готовых к использованию реагентов были изготовлены с последовательной заморозкой компонентов смеси и фуримазина: в лунки вносили и замораживали растворы в следующем порядке:

для C- и рабочей лунки: prED3-NLucL, sc15D5a-NLucS, фуримазин,

для C+: prED3-NLucL, sc15D5a-NLucS, prED3, фуримазин.

Лиофилизированные смеси хранили при разных температурах и отслеживали регенерацию люциферазы при их растворении (Рис. 3.23А).

Предложенный дизайн реагента позволяет сохранить в течение трех месяцев более 50% активности при хранении при -20°C и около 15% при $+5$. Соотношение сигналов $C+(f)/C-(f)$ в обоих случаях составило около 0,4. Имеет смысл заполнять лунки планшета инертным газом (азотом, гелием) или использовать вакуумную упаковку с влагопоглотителем для избежания выгорания субстрата при длительном хранении. Образец $C-$ использовали для однофазного анализа белка prED3, а также экстрактов «здорового» и ВКЭ-инфицированного клещей. Как видно из Рис. 3.23., падение относительного биолюминесцентного сигнала при prED3 в концентрации 5 мкг/мл составляет почти 80%, что близко к таковому при использовании свежеприготовленного реагента (Рис. 3.19.). Сигналы от экстрактов ВКЭ-инфицированного и «здорового» клещей различаются почти на порядок.

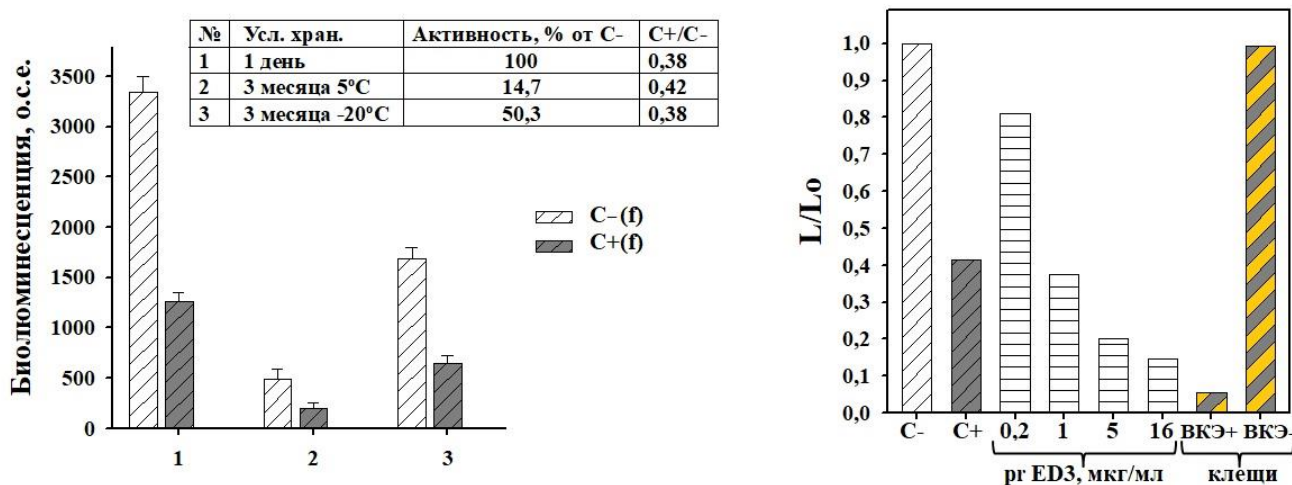


Рис. 3.23. А). Регенерация люциферазы при хранении полностью готового реагента для однофазного выявления ВКЭ. Б). Выявление антигена prED3 и тестирование вируса в образцах ВКЭ-инфицированного (ВКЭ+) и «здорового» (ВКЭ-) клещах.

Ранее нами была показана возможность применения в качестве стабильного водорастворимого субстрата Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка СВР Renilla. Хранение аналитических систем в присутствии этого субстрата

представляет особый интерес. Были приготовлены растворы C+(c) и C-(c), содержащие помимо гибридных белков избыток СВР. Смеси лиофилизировали, хранили при +5 и -20°C и контролировали регенерацию биолюминесценции через определенные промежутки времени. В этих экспериментах для запуска сигнала к образцам после растворения добавляли раствор CaCl₂. Как видно из Рис. 3.24, в целом работоспособность такой аналитической системы существенно выше — так при хранении в течение 6 месяцев при +5°C в системе регенерируется более 30% исходной активности. Хранение при -20°C приводит почти к 1,5 -кратному увеличению активности — факт, который мы затрудняемся объяснить. Соотношение сигналов C+(c)/C-(c) изменяется слабо и колеблется в диапазоне 0,1-0,17. В целом использование этого субстрата выглядит перспективным, хотя требует дополнительных затрат на получение рекомбинантного белка СВР.

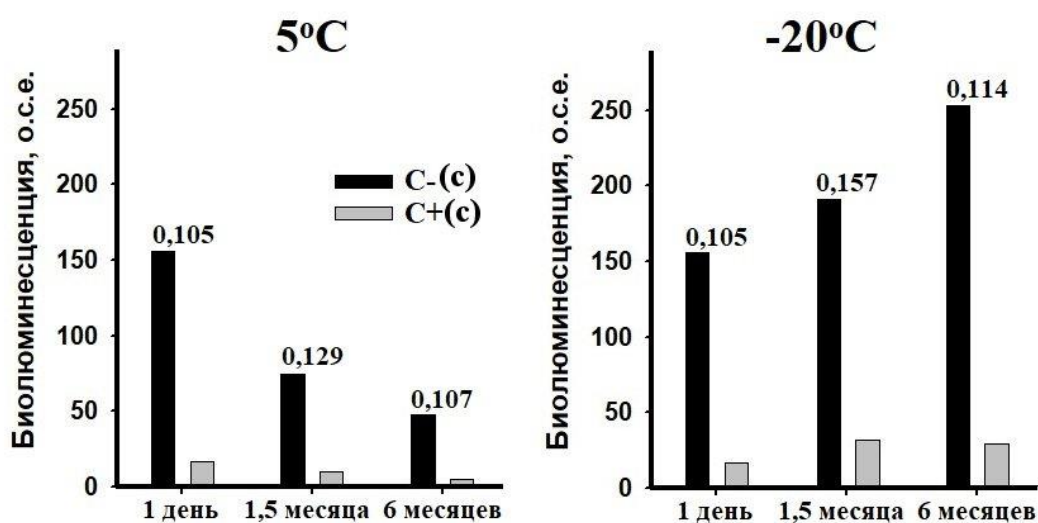


Рис. 3.24. Регенерация биолюминесценции из лиофилизированных образцов C+(c) и C-(c) после хранения в разных условиях. Цифры над колонками отражают соотношение сигналов C+(c)/C-(c).

Таким образом нами показано, что оптимальными условиями для получения готовых к использованию в тестировании ВКЭ лиофилизированных аналитических смесей являются:

- добавление в систему в качестве стабилизатора 0,1% БСА;
- проведение лиофилизации образцов без смешивания растворов белков-компонентов аналитической системы и фуримазина при замораживании;

Использование в качестве субстрата Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка обеспечивает длительное хранение реагента, однако существенно более низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции может снизить чувствительность детекции ВКЭ.

3.2.7 Стабильность компонентов твердофазного биолюминесцентного анализа в различных условиях хранения [172]

При изучении условий хранения репортерного гибридного белка sc14D5a-Rm7, а также субстрата СВР в лиофилизированном виде было обнаружено, что образцы, лиофилизированные из фосфатно-солевого буфера, необратимо теряют до 70 % биолюминесцентной и субстратной активности. При попытке лиофилизации sc14D5a-Rm7 из буфера, содержащего имидазол (после первой хроматографии) теряется 99,9% активности. Добавление к раствору трегалозы либо бычьего сывороточного альбумина по-разному влияет на стабильность белка при лиофильной сушке. Показано, что биолюминесцентная активность sc14D5a-Rm7, лиофилизированного в присутствии 0,1% БСА, практически не изменялась при хранении в камере бытового холодильника (5–8°C) через сутки, 4 месяца и год и составляла $86,5 \pm 0,7\%$, $85,1 \pm 1,6\%$ и $88,3 \pm 1,2\%$, $n=4$, от активности свежевыделенного образца, соответственно. В то же время в присутствии 5% трегалозы сразу после лиофилизации сохраняется порядка 12% активности sc14D5a-Rm7 от таковой исходного белка.

Биолюминесцентные сигналы при запуске добавлением препарата СВР (лиофилизированного в присутствии 0,1% БСА) через сутки, 4 месяца и год

хранения практически не изменялись: их интенсивность составляла $98 \pm 4,5\%$, $93,3 \pm 5,8\%$ и $90,9 \pm 5,3\%$, $n=3$, соответственно, от сигналов, полученных при использовании свежеприготовленного препарата.

Планшеты, с активированной антителом поверхностью подготовленные, как описано в «Материалах и методах», хранили при $+8^{\circ}\text{C}$ либо -18°C . Периодически планшеты тестировали в биolumинесцентном иммуноанализе контрольного образца C^+ . Показано, что поверхность планшетов не теряет способности иммобилизовать мишень: после 1, 3, 12 месяцев хранения величина биolumинесцентного сигнала составила $95,2 \pm 3,4\%$ ($n=12$) от сигнала при аналогичном анализе на свежеприготовленных планшетах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена разработке эффективных аналитических систем для выявления вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах на основе гибридных белков, включающих домены высокоаффинного антитела и целентеразин-зависимых люцифераз в качестве высокочувствительных репортерных молекул. ВКЭ является инфекционным агентом тяжелейшего нейрозаболевания – клещевого энцефалита, поражающего центральную нервную систему и отличающегося полиморфизмом клинического течения. Он переносится иксодовыми клещами, ареал распространения которых вся лесная и лесостепная зона умеренного пояса Евразийского континента, в том числе Сибирский регион Российской Федерации, Китай и Монголия. Современная эпидемиологическая ситуация в отношении клещевого энцефалита характеризуется значительным ростом заболеваемости как в России, так и в мире. Несмотря на наличие коммерческих тест-систем по выявлению этого инфекционного агента, разработка подходов, обеспечивающих достоверный анализ и, в то же время, более простых и быстрых в использовании, а также применимых по месту требования является актуальной. С этой целью в работе предложено использовать в качестве репортерных молекул светоизлучающие белки – целентеразин-зависимые люциферазы. Преимуществами этих репортеров являются яркая биолуминесценция, обеспечивающая высокую чувствительность анализа, простой способ запуска реакции, наличие кДНК этих белков, а также их рекомбинантных аналогов.

В ходе исследования нами разработан и успешно испытан на значительном количестве образцов клещей способ выявления ВКЭ высокопроизводительным микропланшетным иммуноанализом на основе биолуминесцентного репортера – гибридного белка sc14D5a-Rm7, включающего одноцепочечное миниантитело sc14D5a и целентеразин-зависимую люциферазу Rm7, термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri*. При близких аналитических показателях биолуминесцентный способ реализуется в более

короткое время, чем колориметрический иммуноанализ и гораздо проще способа выявления ВКЭ на основе РТ ПЦР.

Для проведения тестирования клещей в условиях удаления от биомедицинских лабораторий был предложен и испытан способ однофазного тестирования на присутствие ВКЭ на основе конкурентного биолуминесцентного иммуноанализа. Разработанный реагент включает гибридный белок, состоящий из антитела sc14D5a и малого фрагмента целентеразин-зависимой люциферазы NLuc и гибридного белка, состоящего из антигенной детерминанты белка prED3 и большого фрагмента той же люциферазы. Эти белки образуют иммунокомплекс, в результате которого происходит комплементация фрагментов люциферазы с восстановлением субстрат-зависимой биолуминесценции. Показано, что величина сигнала падает в присутствии ВКЭ-ассоциированных мишеней и, в частности, инфицированных вирусом клещей. Показано, что этот эффект позволяет достоверно различать условно «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей. В ходе работ разработан дизайн лиофилизированного реагента «все в одном», пригодного для выявления ВКЭ при простом добавлении экстракта клеща. Разработанный способ пригоден для использования не только при лабораторном тестировании, но и в условиях удаления (экспедиции, лагеря и пр.).

Предложенный способ однофазного выявления ВКЭ на основе комплементации фрагментов люциферазы при соответствующей замене биоспецифических доменов в гибридных белках может быть использован для быстрого тестирования других мишеней (например, вирусных и бактериальных инфекций) при диагностировании социально-значимых заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

В связи с настоящей работой автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность коллегам лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических биотехнологий ИБФ СО РАН за творческую и дружественную атмосферу при проведении исследований.

Отдельную благодарность автор выражает сотрудникам Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края за предоставление экстрактов клещей и результатов их исследований на присутствие ВКЭ колориметрическим и ОТ ПЦР методами.

Автор чрезвычайно благодарен коллегам Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН д.б.н. Н.В. Тикуновой, к.б.н. И.К. Байкову и к.б.н. В.В. Морозовой за предоставление кДНК, кодирующих одноцепочечное миниантитело 14D5a, а также белка prED3, и полезные консультации при выполнении совместных исследований.

Отдельную благодарность автор выражает коллегам к.б.н. Л.П. Бураковой и к.б.н. Е.Е. Денисовой (Башмаковой) за конструирование генов, кодирующих гибридные белки, без которых эта работа просто бы не состоялась.

Приношу сердечную благодарность своему научному руководителю д.б.н. Л.А. Франк за поддержку и стимулирование моих исследований, чьи настойчивость и терпение помогли привести работу в законченный вид.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения высокоочищенных гибридных белков, включающих домены одноцепочечного анти-ВКЭ-миниантитела либо антигенной детерминанты вируса и домены целентеразин-зависимых люцифераз: генетически модифицированной люциферазы Rm7, либо фрагментов искусственной люциферазы NLuc.
2. Показано, что во всех гибридных белках домены образуют реакционно способные пространственные структуры, сохраняя специфические свойства исходных белков: анти-ВКЭ-миниантитело во всех гибридных белках связывает ВКЭ-ассоциированные антигены с аффинностью, близкой к таковой исходного миниантитела; домен люциферазы Rm7 обладает субстрат-зависимой биолюминесценцией; домены фрагментов люциферазы NLuc комплементируют с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесценции при образовании комплексов между доменами антитела и антигена.
3. Показано, что гибридный белок 14D5a-Rm7 является высокочувствительным репортером для иммуноанализа ВКЭ. Разработан способ выявления ВКЭ твердофазным микроанализом в клещах; протестированы экстракты более чем 1500 природных клещей, диагностическая чувствительность и специфичность анализа соответственно составили 100% и 98,9%.
4. Получена пара гибридных белков, пригодных для высокочувствительного выявления ВКЭ однофазным конкурентным иммуноанализом. Разработан дизайн анализа для тестирования природных клещей. Биотест достоверно разделяет группу «здоровых» и ВКЭ-инфицированных клещей ($p=0,000013$, U тест Манна-Уитни, величина $Me(C_{25}-C_{75})$ составила 1 (0,93-1,2) и 0,56 (0,53-0,65).
5. Разработаны условия хранения компонентов биолюминесцентного выявления ВКЭ твердофазным иммуноанализом сэндвич-типа (поверхностно активированные планшеты, лиофилизированный биолюминесцентный

гибридный белок 14D5a-Rm7), при которых не меняются поверхностные свойства планшет и бифункциональные свойства гибридного белка.

- 6 Получен и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент «Все в одном», включающий образцы положительного и отрицательного контролей и рабочий образец, для выявления ВКЭ в клещах однофазным биолюминесцентным анализом конкурентного типа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CTZ – целентеразин

FMZ – фуримазин

Rm7– термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri*

sc14D5a – одноцепочечное миниантитело к ВКЭ

CBP – целентеразин-связывающий белок *Renilla*

NanoLuc- искусственная целентеразин-зависимая люцифераза

NLucL – большой N-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc (18 кДа)

NLucS – малый фрагмент C-концевой фрагмент люциферазы NanoLuc (11 а.к.)

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

C⁺ – положительный контрольный образец (буферный раствор содержащий антиген ВКЭ)

C⁻ – отрицательный контрольный образец (буферный раствор не содержащий антиген ВКЭ)

L/L₀ – отношение биолюминесцентного сигнала от образца к сигналу от буферного раствора, не содержащего антигена

prED3 (ДЕЗ) – иммуногенный домен капсидного белка Е ВКЭ

БСА (BSA) – бычий сывороточный альбумин

K-Mes – 2N-морфолинэтансульфоновая кислота-КОН

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, Na соль

ПААГ – полиакриламидный гель

TEMED – тетраметилэтилендиамин

SDS – додецилсульфат натрия

ПСА – персульфат аммония

ДТТ – дитиотреитол

DMSO – диметилсульфоксид

кДа – килодальтон

Каф – константа аффинности

K_M – константа Михаэлиса

V_{max} – максимальная скорость реакции фермента

K_{cat} – число оборотов фермента в единицу времени

о.с.е. – относительные световые единицы (приборные)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimomura O. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates / O. Shimomura, F.H. Johnson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* –1975.–, Vol. 72– P. 1546–1549.
2. Маркова С.В. Целентеразин–зависимые люциферазы / С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // *Биохимия.* –2015.– Т. 6– С. 845 – 866.
3. Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации за 2015–2024 гг. и краткосрочный прогноз заболеваемости на 2025 г. / Е.И. Андаев, А.Я. Никитин, М.И. Толмачёва, И.Д. Зарва, Е.А. Сидорова, А.Н. Бондарюк, Е.В. Яцменко, А.В. Севостьянова, К.В. Лопатовская, В.А. Бабаш, С.В. Балахонов // *Проблемы особо опасных инфекций.* – 2025.– Т. 1– С. 6–17.
4. Колясникова Н. М. Современное состояние проблемы клещевого энцефалита в России и мире / Н. М. Колясникова, А. А. Ишмухаметов, В. Г. Акимкин // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* –2023.– Т. 22– № 1– С. 104–123.
5. Shimomura, O., Yampolsky, I. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, 3rd ed. // World Scientific Publishing: Singapore, –2019.
6. Krasitskaya V.V. Coelenterazine-Dependent Luciferases as a Powerful Analytical Tool for Research and Biomedical Applications / V.V. Krasitskaya, E.E. Bashmakova, L. A. Frank // *Int. J. Mol. Sci.* –2020. – Vol. 21– P. 7465.
7. Markova, S.V. Coelenterazine–dependent luciferases / S.V. Markova, E.S Vysotski // *Biochemistry* –2015. – Vol. 80– P. 714–732.
8. Frank, L.A. Creation of artificial luciferases to expand their analytical potential / L.A. Frank // *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* –2015. – Vol. 18– P. 919–929.
9. Shimomura, O. Membrane permeability of coelenterazine analogues measured with fish eggs / O. Shimomura // *Biochem. J.* –1997. – Vol. 326– P. 297–298.

10. Stepanyuk, G.A. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: Why it is not a calcium-regulated photoprotein / G.A. Stepanyuk, Z.J. Liu, S.S. Markova, L.A. Frank, J. Lee, E.S. Vysotski, B.C. Wang // *Photochem. Photobiol. Sci.* –2008. – Vol. 7– P. 442–447.
11. Stepanyuk, G.A. Structure based mechanism of the Ca^{2+} –induced release of coelenterazine from the *Renilla* binding protein / G.A. Stepanyuk, Z.J. Liu, E.S. Vysotski, J. Lee, J.P. Rose, B.C. Wang // *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* –2009. – Vol. 74– P. 583–593.
12. Stepanyuk, G.A. Coelenterazine–v ligated to Ca^{2+} –triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase / G.A. Stepanyuk, J. Unch, N.P. Malikova, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski // *Anal. Bioanal. Chem.* –2010. – Vol. 398– P. 1809–1817.
13. Krasitskaya, V.V. Ca^{2+} –triggered coelenterazine-binding protein from *Renilla* as an enzyme-dependent label for binding assay / V.V. Krasitskaya, S.I. Korneeva, A.N. Kudryavtsev, S.V. Markova, G.A. Stepanyuk, L.A. Frank // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401– P. 2573–2579.
14. Kudryavtsev, A.N. Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks / A.N. Kudryavtsev, L.P. Burakova, L.A. Frank // *Anal. Methods* –2017. – Vol. 9– P. 2252–2255.
15. Markova S. V. Coelenterazine-dependent luciferases / S. V. Markova, E. S. Vysotski // *Biochemistry (Mosc).* –2015.– Vol. 80– № 6– P. 714–732.
16. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* / O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga // *J. Cell Comp. Physiol.* –1962.– Vol. 59– P. 223–239.
17. Shimomura, O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein / O. Shimomura // *FEBS Lett.* –1979.– Vol. 104– P. 220–222.

18. Craggs, T.D. Green fluorescent protein: Structure, folding and chromophore maturation / T.D. Craggs // Chem. Soc. Rev. –2009.– Vol. 38– P. 2865–2875.
19. Prasher D.C. Primary structure of *Aequorea Victoria* green fluorescent protein./ D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier // Gene –1992.– Vol. 111– P. 229–233.
20. Inouye S. *Aequorea* green fluorescence protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein / S. Inouye, F.I. Tsuji // FEBS Lett. –1994.– Vol. 341– P. 277–280.
21. Chalfie M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression./ M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher // Science. –1994.– Vol. 263– P. 802–805.
22. Teranishi, K. Luminescence of imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one compounds / K. Teranishi // Bioorganic Chem. –2007.– Vol. 35– P. 82–111.
23. Hall, M.P. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate / M.P. Hall, J. Unch, B.F. Binkowski, M.P. Valley, B.L. Butler, M.G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M.B. Robers, H.A. Benink, C.T. Eggers, M.R. Slater, P.L. Meisenheimer, D.H. Klaubert, F. Fan, L.P. Encell, K.V. Wood // ACS Chem. Biol. –2012.– Vol. 7– P. 1848–1857.
24. Giuliani, G. New red-shifted coelenterazine analogues with an extended electronic conjugation / G. Giuliani, P. Molinari, G. Ferretti, A. Cappelli, M. Anzini, S. Vomero, T. Costa // Tetrahedron Lett. –2012.– Vol. 53– P. 5114–5118.
25. Contant, E.P. Gram-scale synthesis of luciferins derived from coelenterazine and original insight into their bioluminescence properties / E.P. Contant, S. Goyard, V. Hervin, G. Gagnot, R. Baatallah, Y. Jacob, T. Rose, Y. Janin // Org. Biomol. Chem. –2019.– Vol. 17– P. 3709–3713.
26. Contant, E.P. Bioluminescence profiling of NanoKAZ/NanoLuc luciferase using a chemical library of coelenterazine analogues / E.P. Contant, G. Gagnot, V. Hervin, R.

Baatallah, S. Goyard, Y. Jacob, T. Rose, Y.L. Janin // Chem. Eur. J. –2020.– Vol. 26– P. 948–958.

27. Kim S.B. Coelenterazine Analogs for Bioassays and Molecular Imaging / S. B. Kim, G. Kamiya, T. Furuta, S. A Maki // Sensors (Basel) –2025.– Vol 25– № 6– P. 1651.

28. Lorenz, W.W. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase / W.W. Lorenz, R.O. McCann, M. Longiaru, M.J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. USA –1991.– Vol. 88– P. 4438–4442.

29. Markova, S.V. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, M.D. Larionova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Biochem. Biophys. Res. Commun. –2015. – Vol. 457– P. 77–82.

30. Krasitskaya, V.V. Bioluminescent reporters for identification of gene allelic variants / V.V. Krasitskaya, L.P. Burakova, I.A. Pyshnaya, L.A. Frank // Russ. J. Bioorg. Chem. –2012. – Vol. 38– P. 298–305.

31. Moutsipoulou, A. Bioorthogonal protein conjugation: Application to the development of a highly sensitive bioluminescent immunoassay for the detection of interferon- γ / A. Moutsipoulou, E. Hunt, D. Broyles, C.A. Pereira, K. Woodward, E. Dikici, A. Kaifer, S. Daunert, S.K. Deo // Bioconjugate Chem. –2017. – Vol. 28– P. 1749–1757.

32. Wouters, S.F.A. Bioluminescent antibodies through photoconjugation of protein G-luciferase fusion proteins / S.F.A. Wouters, W.J.P. Vugs, R. Arts, N.M. de Leeuw, R.W.H. Teeuwen, M. Merckx // Bioconjugate Chem. –2020. – Vol. 31– P. 656–662.

33. Karkhanis YD Isolation and properties of *Renilla reniformis* luciferase, a low molecular weight energy conversion enzyme / YD Karkhanis, MJ Cormier // Biochemistry –1971.– Vol. 10– P. 317–326.

34. Titushin, M.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M.S. Titushin, S.V.

Markova, L.A. Frank, N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, J. Lee, E.S. Vysotski // Photochem. Photobiol. Sci. –2008. – Vol. 7– P. 189–196.

35. Loening, A.M. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output / A.M. Loening, T.D. Fenn, A.M. Wu, S.S. Gambhir // Protein Eng. Des. Sel. –2006. – Vol. 19– P. 391–400.

36. Burakova, L.P. Bioluminescent detection probe for tick–borne encephalitis virus immunoassay / L.P. Burakova, A.N. Kudryavtsev, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank // Anal. Bioanal. Chem. –2015. – Vol. 407– P. 5417–5423.

37. Lu, Q. A novel probe to assess cytosolic entry of exogenous proteins / Q. Lu, J.E. Grotzke, P. Cresswell // Nat. Commun. –2018. – Vol. 9– P. 3104.

38. Varnosfaderani, Z.G. Detection of a prostate cancer cell line using a bioluminescent affiprobe: An attempt to develop a new molecular probe for ex vivo studies / Z.G. Varnosfaderani, R. Emamzadeh, M. Nazari, M. Zarean // Int. J. Biol. Macromol. –2019. – Vol. 138– P. 755–763.

39. Kim, M.A. Engineering of monobody conjugates for human EphA2–specific optical imaging / M.A. Kim, H.S. Yoon, S.H. Park, D.Y. Kim, A. Pyo, H.S. Kim, J.J. Min, Y. Hong // PLoS ONE –2017.– Vol 12– P. e0180786.

40. Burbelo, P.D. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases / P.D. Burbelo, E.E. Lebovitz, A.L. Notkins // Transl. Res. –2015. – Vol. 165– P. 325–335.

41. Tin, C.M. A luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assay for profiling human norovirus antibodies / C.M. Tin, L. Yuan, R.J. Dexter, G.I. Parra, T. Bui, K.Y. Green, S.V. Sosnovtsev // J. Virol. Methods –2017. – Vol. 248– P. 116–129.

42. Farkas, T. Renilla luciferase–LC3 based reporter assay for measuring autophagic flux / T. Farkas, M. Jäättelä // Methods Enzymol. –2017. – Vol. 588– P. 1–13.

43. Head, T. An enhanced bioluminescence-based Annexin V probe for apoptosis detection *in vitro* and *in vivo* / T. Head, P. Dau, S. Duffort, P. Daftarian, P.M. Joshi, R. Vazquez-Padron, S.K. Deo, S. Daunert // *Cell Death Dis.* –2017. – Vol. 8– P. e2826.
44. Farzannia, A. FcUni-RLuc: An engineered Renilla luciferase with Fc binding ability and light emission activity / A. Farzannia, R. Roghanian, S.H. Zarkesh-Esfahani, M. Nazari, R. Emamzadeh // *Analyst* –2015. – Vol. 140– P. 1438–1441.
45. Nazari, M. Renilla luciferase-labeled Annexin V: A new probe for detection of apoptotic cells / M. Nazari, R. Emamzadeh, S. Hosseinkhani, L. Cevenini, E. Michelini, A. Roda // *Analyst* –2012. – Vol. 137– P. 5062–5070.
46. Larionova, M.D. The smallest isoform of *Metridia longa* luciferase as a fusion partner for hybrid proteins / M.D. Larionova, S.V. Markova, N.V. Tikunova, E.S. Vysotski // *Int. J. Mol. Sci.* –2020. – Vol. 21– P. 4971.
47. De Leo, T.C. Engineering of galectin-3 for glycan-binding optical imaging / T.C. De Leo, S.N.D. Santos, C.D.C. Andrade, E. Ricci, W.M. Turato, N.P. Lopes, R.S. Oliveira, E.S. Bernardes, M. Dias-Baruffi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* –2020. – Vol. 521– P. 674–680.
48. Weihs, F. A red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensing system for rapid measurement of plasmin activity in human plasma / F. Weihs, A. Peh, H. Dacres // *Anal. Chim. Acta* –2020. – Vol. 1102– P. 99–108.
49. Tao, H. Comparison of teratoma formation between embryonic stem cells and parthenogenetic embryonic stem cells by molecular imaging / H. Tao, X. Chen, A. Wei, X. Song, W. Wang, L. Liang, Q. Zhao, Z. Han, Z. Han, X. Wang, Z. Li // *Stem. Cells Int.* –2018.–, Vol. 2018– P. 7906531.
50. Saw, W.T. Using a split luciferase assay (SLA) to measure the kinetics of cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins / W.T. Saw, Z. Matsuda, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, D. Atanasiu // *Methods* –2015. – Vol. 90– P. 68–75.

51. Nakane, S. Dual split protein (DSP) assay to monitor cell–cell membrane fusion / S. Nakane, Z. Matsuda // *Methods Mol. Biol.* –2015. – Vol. 1313– P. 229–236.
52. Yamamoto, M. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of middle east respiratory syndrome coronavirus S protein–mediated membrane fusion using the split–protein–based cell–cell fusion assay / M. Yamamoto, S. Matsuyama, X. Li, M. Takeda, Y. Kawaguchi, J.–I. Inoue, Z. Matsuda // *Antimicrob. Agents Chemother.* –2016. – Vol. 60– P. 6532–6539.
53. Ashkenazi, S. Effective cell–free drug screening protocol for protein–protein interaction / S. Ashkenazi, A. Plotnikov, A. Bahat, R. Dikstein // *Anal. Biochem.* –2017. – Vol. 532– P. 53–59.
54. Toribio, V. Development of a quantitative method to measure EV uptake / V. Toribio, S. Morales, S. López–Martín, B. Cardeñes, C. Cabañas, M. Yáñez–Mó // *Sci. Rep.* –2019. – Vol. 9– P. 10522.
55. Lund, C.H. A reversible Renilla luciferase protein complementation assay for rapid identification of protein–protein interactions reveals the existence of an interaction network involved in xyloglucan biosynthesis in the plant Golgi apparatus / C.H. Lund, J.R. Bromley, A. Stenbæk, R.E. Rasmussen, H.V. Scheller, Y. J. Sakuragi // *Exp. Bot.* – 2015. – Vol. 66– P. 85–97.
56. Wang, J. The split Renilla luciferase complementation assay is useful for identifying the interaction of Epstein–Barr virus protein kinase BGLF4 and a heat shock protein Hsp90 / J. Wang, W. Guo, C. Long, H. Zhou, H. Wang, X. Sun // *Acta Virol.* –2016. – Vol. 60– P. 62–70.
57. Varnum, M.M. A split–luciferase complementation, real–time reporting assay enables monitoring of the disease–associated transmembrane protein TREM2 in live cells / M.M. Varnum, K.A. Clayton, A. Yoshii–Kitahara, G. Yonemoto, L. Koro, S. Ikezu, T. Ikezu // *J. Biol. Chem.* –2017. – Vol. 292– P. 10651–10663.

58. Siddiqui, F.A. Medium-throughput detection of Hsp90/Cdc37 protein–protein interaction inhibitors using a split Renilla luciferase–based assay / F.A. Siddiqui, H. Parkkola, G.B. Manoharan, D. Abankwa // *SLAS Discov.* –2020. – Vol. 25– P. 195–206.
59. Leng, W. Novel Bioluminescent Activatable Reporter for Src Tyrosine Kinase Activity in Living Mice / W. Leng, D. Li, L. Chen, H. Xia, Q. Tang, B. Chen, Q. Gong, F. Gao, F. Bi // *Theranostics* –2016. – Vol. 6– P. 594–609.
60. Kim, S.B. A genetically encoded bioluminescent indicator for illuminating proinflammatory cytokines / S.B. Kim, T. Ozawa, Y. Umezawa // *MethodsX* –2016. – Vol. 3– P. 483–489.
61. Lin, J. Functional characterization and efficient detection of Nucleophosmin/NPM1 oligomers / J. Lin, M. Hisaoka, K. Nagata, M. Okuwaki // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* –2016. – Vol. 480– P. 702–708.
62. Paulmurugan, R. A protein folding molecular imaging biosensor monitors the effects of drugs that restore mutant p53 structure and its downstream function in glioblastoma cells / R. Paulmurugan, R. Afjei, T.V. Sekar, H.A. Babikir, T.F. Massoud // *Oncotarget* – 2018. – Vol. 9– P. 21495–21511.
63. Sakono, M. Preparation of luciferase–fused peptides for immunoassay of amyloid beta / M. Sakono, T. Arisawa, T. Ohya, N. Sakono, A. Manaka // *Anal. Sci.* –2021.– Vol. 37– № 5– P. 759–763.
64. Burbelo P.D. A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian–produced Renilla luciferase–antigen fusion proteins / P. D. Burbelo, R. Goldman, T. L. Mattson // *BMC Biotechnol.* –2005.– Vol. 5 P. 22.
65. Burbelo P. D. Quantification of autoantibodies using a luminescent profiling method in autoimmune interstitial lung disease / P. D. Burbelo, J. A. Huapaya, Z. Khavandgar, M. Beach, I. Pinal–Fernandez, A. L. Mammen, J. A. Chiorini, P. N. Farhadi, F. W.

Miller, A. Schifffenbauer, K. Sarkar, B. M. Warner, L. G. Rider // Front Immunol. – 2024.– Vol. 15– P. 1462242.

66. Burbelo P. D. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases / P. D. Burbelo, E. E. Lebovitz, A. L. Notkins // Transl Res. –2014.– Vol. 165– № 2– P. 325–335.

67. Shi, X. J. [The establishment and application of testing methods of tetraspanin 7 autoantibody in type 1 diabetes] / X. J. Shi, P. L. Zheng, Z. Wang, X. Li, G. Huang, Z. G. Zhou // Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi. –2021.– Vol. 101– № 4– P. 243–248.

68. Kobayashi, H. Bioluminescence resonance energy transfer–based imaging of protein–protein interactions in living cells / H. Kobayashi, L.P. Picard, A.M. Schönege, M. Bouvier // Nat. Protoc. –2019. – Vol. 14– P. 1084–1107.

69. Dimri, S. Use of BRET to study protein–protein interactions *in vitro* and *in vivo* / S. Dimri, S. Basu, A. De // Methods Mol. Biol. –2016. – Vol. 1443– P. 57–78.

70. Strungs, E.G. Probing arrestin function using intramolecular FAsH–BRET biosensors / E.G. Strungs, L.M. Luttrell, M.H. Lee // Methods Mol. Biol. –2019. – Vol. 1957– P. 309–322.

71. Tsuboi, S. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) coupled near–infrared imaging of apoptotic cells / S. Tsuboi, T. Jin // Methods Mol. Biol. –2020.– Vol. 2081– P. 15–27.

72. Stumpf, C. Creation of different bioluminescence resonance energy transfer based biosensors with high affinity to VEGF / C. Stumpf, T. Wimmer, B. Lorenz, K. Stieger // PLoS ONE –2020.– Vol. 15– P. e0230344.

73. Dacres, H. Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) / H. Dacres, M. Michie, J. Wang, K.D. Pflieger, S.C. Trowell // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012.– Vol. 425– P. 625–629.

74. Rathod, M. Reporter-based BRET sensors for measuring biological functions *in vivo* / M. Rathod, A. Mal, A. De // Methods Mol. Biol. –2018.– Vol. 1790– P. 51–74.
75. Samanta, A. Bioluminescence-based energy transfer using semiconductor quantum dots as acceptors / A. Samanta, I.L. Medintz // Sensors –2020.– Vol. 20– P. 2909.
76. Song, J. Self-illumination of carbon dots by bioluminescence resonance energy transfer / J. Song, J. Zhang // Sci. Rep. –2019.– Vol. 9– P. 13796.
77. Nair, A.K. Using luciferase reporter assays to identify functional variants at disease-associated loci / A.K. Nair, L.J. Baier // Methods Mol. Biol. –2018.– Vol. 1706– P. 303–319.
78. Kim, B. 50-UTR and ORF elements, as well as the 30 -UTR regulate the translation of Cyclin / H.M. Kim, M.K. Kang, D.H. Sohn, S.J. Han // Biochem. Biophys. Res. Commun. –2020.– Vol. 527– P. 968–973.
79. Wang, L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses post-transcriptionally the protein expression of IFN- β by upregulating cellular microRNAs in porcine alveolar macrophages *in vitro* / L. Wang, L. Zhou, D. Hu, X. Ge, X. Guo, H. Yang // Exp. Ther. Med. –2018.– Vol. 15– P. 115–126.
80. Shen, Z. Structural basis for the inhibition of host gene expression by porcine epidemic diarrhea virus nsp1 / Z. Shen, G. Ye, F. Deng, G. Wang, M. Cui, L. Fang, S. Xiao, Z.F. Fu, G. Peng // J. Virol. –2018.– Vol. 92– P. e01896–17.
81. Salsoso, R. Insulin requires A2B adenosine receptors to modulate the L-arginine/nitric oxide signalling in the human fetoplacental vascular endothelium from late-onset preeclampsia / R. Salsoso, A. Mate, F. Toledo, C. M. Vázquez, L. Sobrevia // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis. –2021.– Vol. 1867– № 1– P. 165993.
82. Eguchi, T. Promoter analyses of CCN genes / T. Eguchi, S. Kubota, M. Takigawa // Methods Mol. Biol. –2017.– Vol. 1489– P/ 177–185.
83. Palavecino, C.E. The 50 untranslated region of the anti-apoptotic protein Survivin contains an inhibitory upstream AUG codon / C.E. Palavecino, N. Carrasco-Véliz,

A.F.G. Quest, M.P. Garrido, M. Valenzuela–Valderrama // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* –2020.– Vol. 526– P. 898–905.

84. Ji, H. Quantitative evaluation of the transcriptional activity of steroid hormone receptor mutants and variants using a single vector with two reporters and a receptor expression cassette / H. Ji, Y. Li, Z. Liu, M. Tang, L. Zou, F. Su, Y. Zhang, J. Zhang, H. Li, L. Li, B. Ai, J. Ma, L. Wang, M. Liu, F. Xiao // *Front. Endocrinol.* –2020.– Vol. 11– P. 167.

85. Adams, P.P. A dual luciferase reporter system for *B. burgdorferi* measures transcriptional activity during tick–pathogen interactions / P.P. Adams, C. Flores Avile, M.W. Jewett // *Front. Cell Infect. Microbiol.* –2017.– Vol. 7– P. 225.

86. Inan, C. Transcriptional analysis of the putative glycosyltransferase gene (amv248) of the *Amsacta moorei* entomopoxvirus / C. Inan, H. Muratoglu, B.M. Arif, Z. Demirbag // *Virus. Res.* –2018.– Vol. 243– P. 25–30.

87. Unal, H. Luciferase reporter assay for unlocking ligand–mediated signaling of GPCRs / H. Unal // *Methods Cell Biol.* –2019.– Vol. 149– P. 1930.

88. Vincelli, G. Renilla luciferase reporter assay to study 3'–UTR–driven posttranscriptional regulation of OPRM1 / G. Vincelli, A. Bedini // *Methods Mol. Biol.* –2021.– Vol. 2201– P. 15–26.

89. Zheng, H. Real–time functional bioimaging of neuron–specific microRNA dynamics during neuronal differentiation using a dual luciferase reporter / H. Zheng, X. Wang, S. Chen, X. Shi, J. Xie, W. Mao, J. Tian, F. Wang // *ACS Chem. Neurosci.* – 2019.– Vol. 10– P. 1696–1705.

90. Dai, C.Y. The IL–6/STAT3 pathway upregulates microRNA–125b expression in hepatitis C virus infection / C.Y. Dai, Y.S. Tsai, W.W. Chou, T. Liu, C.F. Huang, S.C. Wang, P.C. Tsai, M.L. Yeh, M.Y. Hsieh, C.I. Huang, S.Y. Vanson Liu, J.F. Huang, W.L. Chuang, M.L. Yu // *Oncotarget* –2018.– Vol. 9– P. 11291–11302.

91. Wang, M. MiR-182 promotes glucose metabolism by upregulating hypoxia-inducible factor 1 α in NSCLC cells / M. Wang, W. Wang, J. Wang, J. Zhang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* –2018.– Vol. 504– P. 400–405.
92. Zheng, H. Intron retained bioluminescence reporter for real-time imaging of pre-mRNA splicing in living subjects / H. Zheng, S. Chen, X. Wang, J. Xie, J. Tian, F. Wang // *Anal. Chem.* –2019.– Vol. 91– P. 12392–12398.
93. Salani, M. Development of a screening platform to identify small molecules that modify ELP1 pre-mRNA splicing in familial dysautonomia / M. Salani, F. Urbina, A. Brenner, E. Morini, R. Shetty, C.S. Gallagher, E.A. Law, S. Sunshine, D.J. Finneran, G. Johnson, L. Minor, S.A. Slaugenhaupt // *SLAS Discov.* –2019.– Vol. 24– P. 57–67.
94. Cao, D. Roles of the genomic sequence surrounding the stem-loop structure in the junction region including the 30 terminus of open reading frame 1 in hepatitis E virus replication / D. Cao, Y.Y. Ni, M. Walker, Y.W. Huang, X.J. Meng // *J. Med. Virol.* – 2018.– Vol. 90– P. 1524–1531.
95. Chen, S. Establishment of a reverse genetics system for duck Tembusu virus to study virulence and screen antiviral genes / S. Chen, Y. He, R. Zhang, P. Liu, C. Yang, Z. Wu, J. Zhang, M. Wang, R. Jia, D. Zhu, M. Liu, Q. Yang, Y. Wu, A. Cheng // *Antiviral. Res.* –2018.– Vol. 157– P. 120–127.
96. Cao, D. Substitution of amino acid residue V1213 in the helicase domain of the genotype 3 hepatitis E virus reduces virus replication / D. Cao, Y.Y. Ni, X.J. Meng // *Virol. J.* –2018.– Vol. 15– P. 32.
97. Oestereich, L. Establishment of recombinant trisegmented Mopeia virus expressing two reporter genes for screening of Mammarenavirus inhibitors / L. Oestereich, S. Wurr, B. Becker-Ziaja, S. Bockholt, M. Pahlmann, D. Cadar, B. M. Kümmerer, S. Günther, R. Kerber // *Viruses.* –2022.– Vol. 14– № 9– P. 1869.
98. Tanaka, T. Establishment of a stable SARS-CoV-2 replicon system for application in high-throughput screening / T. Tanaka, A. Saito, T. Suzuki, Y. Miyamoto, K. Takayama, T. Okamoto, K. Moriishi // *Antiviral Res.* –2022.– Vol. 199– P. 105268.

99. Chen, S. A new luciferase immunoprecipitation system assay provided serological evidence for missed diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome / S. Chen, M. Xu, X. Wu, Y. Bai, J. Shi, M. Zhou, Q. Wu, S. Tang, F. Deng, B. Qin, S. Shen // *Virol. Sin.* –2022.– Vol. 37– № 1– P. 107–114.
100. Fan, S. Enterovirus 71 2A protease inhibits p-body formation to promote viral RNA synthesis / S. Fan, Z. Xu, P. Liu, Y. Qin, M. Chen // *J. Virol.* –2021.– Vol. 95– № 19– P. e0092221.
101. Shen, Z. Lysine 164 is critical for SARS-CoV-2 Nsp1 inhibition of host gene expression / Z. Shen, G. Zhang, Y. Yang, M. Li, S. Yang, G. Peng // *J. Gen. Virol.* – 2021.– Vol. 102– № 1– P. jgv001513.
102. Shen, Z. Structural and biological basis of alphacoronavirus nsp1 associated with host proliferation and immune evasion / Z. Shen, Y. Yang, S. Yang, G. Zhang, S. Xiao, Z. F. Fu, G. Peng // *Viruses.* –2020.– Vol. 12– № 8– P. 812.
103. Xie, W. A luciferase reporter gene system for high-throughput screening of γ -globin gene activators / W. Xie, R. Silvers, M. Ouellette, Z. Wu, Q. Lu, H. Li, K. Gallagher, K. Johnson, M. Montoute // *Methods Mol. Biol.* –2016.– Vol. 1439– P. 207–226.
104. Feng, L. A novel dual-luciferase assay for anti-HIV drug screening based on the CCR5/CXCR4 promoters / L. Feng, W. Lu, Y. Ma, W. Guo, Y. Wang, Q. Sun, J. Wu, G. Zhao, X. Zhang // *J. Virol. Methods* –2018.– Vol. 256– P. 17–23.
105. Lang, Y. Identification and evaluation of antivirals for Rift Valley fever virus / Y. Lang, Y. Li, D. Jasperson, J. Henningson, J. Lee, J. Ma, Y. Li, M. Duff, H. Liu, D. Bai, S. McVey, J.A. Richt, T. Ikegami, W.C. Wilson, W. Ma // *Vet. Microbiol.* –2019.– Vol. 230– P. 110–116.
106. Shen, L. High-throughput screening and identification of potent broad-spectrum inhibitors of coronaviruses / L. Shen, J. Niu, C. Wang, B. Huang, W. Wang, N. Zhu, Y. Deng, H. Wang, F. Ye, S. Cen, W. Tan // *J. Virol.* –2019.– Vol. 93– P. e00023–19.

107. Ma, C. Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays / C. Ma, H. Tan, J. Choza, Y. Wang, J. Wang // *Acta Pharm. Sin. B.* –2022.– Vol. 12– № 4– P. 1636–1651.
108. Dorjsuren, D. A platform of assays for the discovery of anti-Zika small-molecules with activity in a 3D-bioprinted outer-blood-retina model / D. Dorjsuren, R. T. Eastman, M. J. Song, A. Yasgar, Y. Chen, K. Bharti, A. V. Zakharov, A. Jadhav, M. Ferrer, P. Y. Shi, A. Simeonov // *PLoS One.* –2022.– Vol. 17– № 1– P. e0261821.
109. Zhang, Q. Y. SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening / Q. Y. Zhang, C. L. Deng, J. Liu, J. Q. Li, H. Q. Zhang, N. Li, Y. N. Zhang, X. D. Li, B. Zhang, Y. Xu, H. Q. Ye // *J. Gen. Virol.* –2021.– Vol. 102– № 5– P. 001583.
110. Bohning, K. A high throughput reporter virus particle microneutralization assay for quantitation of Zika virus neutralizing antibodies in multiple species / K. Bohning, S. Sonnberg, H. L. Chen, M. Zahralban-Steele, T. Powell, G. Hather, H. K. Patel, H. J. Dean // *PLoS. One.* –2021.– Vol. 16– № 4– P. e0250516.
111. Yamamoto, M. The antimalarial compound atovaquone inhibits Zika and Dengue virus infection by blocking E protein-mediated membrane fusion / M. Yamamoto, T. Ichinohe, A. Watanabe, A. Kobayashi, R. Zhang, J. Song, Y. Kawaguchi, Z. Matsuda, J. I. Inoue // *Viruses.* –2020.– Vol. 12– № 12– P. 1475.
112. Ballou B Properties of a new luciferase from the copepod *Gaussia princeps*/ Ballou B Szent-Gyorgyi C, Finley G // *Proc 11th Int Symp Biolumin. Chemilumin.* Abstract Asilomar CA P. 34.
113. Verhaegen M. Recombinant *Gaussia* luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization/M. Verhaegen, T. K. Christopoulos// *Anal Chem.* –2002.– Vol. 74– № 17– P. 4378–4385.
114. Markova S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme/ [S.V. Markova](#), S. Golz, L. A. Frank, B. Kalthof, E. S. Vysotski//. *J Biol Chem.* –2004.– Vol. 279– № 5– P. 3212–3217.

115. Borisova V. V. Recombinant Metridia luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay / V. V. Borisova, L. A. Frank, S. V. Markova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // Photochem Photobiol Sci. –2008.– Vol. 7– P. 1025–1031.
116. Markova S.V. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod Metridia longa / S.V. Markova, M.D. Larionova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Biochem Biophys Res Commun. –2015.– Vol. 457– № 1– P. 77–82.
117. Маркова. С.В. Биолюминесцентный мониторинг обеспечивает возможность регистрации внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток и тканей / С.В. Маркова, Н.П. Маликова, Е.С. Высоцкий, Л.А. Франк, И.И. Гительзон. // Биофизика, –2017.– Т 62– № 3– С. 618–624.
118. Markova, S.V. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications / S.V. Markova, M.D. Larionova, E.S. Vysotski // Photochem. Photobiol. –2019.– Vol. 95– P. 705–721.
119. Peltomaa, R. Bioluminescent detection of zearalenone using recombinant peptidomimetic Gaussia luciferase fusion protein / R. Peltomaa, S. Fikacek, E. Benito-Peña, R. Barderas, T. Head, S. Deo, S. Daunert, M. C. Moreno-Bondi // Mikrochim. Acta. –2020.– Vol. 187– № 10– P. 547.
120. Reyes, S. Metal organic framework encapsulated tamavidin-Gluc reporter: application in COVID-19 spike antigen bioluminescent immunoassay / S. Reyes, E. Rizzo, A. Ting, E. Dikici, S. Daunert, S. K. Deo // Sens. Diagn. –2022.– Vol. 1– №6– P. 1198–1208.
121. England, C.G. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence / C.G. England, E.B. Ehlerding, W. Cai // Bioconjugate Chem. – 2016.– Vol. 27– P. 1175–1187.
122. Nemergut M. Illuminating the mechanism and allosteric behavior of NanoLuc luciferase/M. Nemergut, D. Pluskal, J. Horackova, T. Sustrova, J. Tulis, T. Barta, R.

Baatallah, G. Gagnet, V. Novakova, M. Majerova, K. Sedlackova, S. M. Marques, M. Toul, J. Damborsky, Z. Prokop, D. Bednar, Y. L. Janin, M. Marek // *Nat Commun.* – 2023.– Vol. 14– № 1– P. 7864.

123. Ren, W. One–Step ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on Nanobody/Nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B1 in cereal / W. Ren, Z. Li, Y. Xu, D. Wan, B. Barnych, Y. Li, Z. Tu, Q. He, J. Fu, B.D. Hammock // *J. Agric. Food Chem.* –2019. – Vol. 67– P. 5221–5229.

124. Kiguchi, Y. Framework–directed amino–acid insertions generated over 55–Fold affinity–matured antibody fragments that enabled sensitive luminescent immunoassays of cortisol / Y. Kiguchi, I. Morita, K. Yamaki, S. Takegami, N. Kobayashi // *Biol. Pharm. Bull.* –2023.– Vol. 46– № 12– P. 1661–1665.

125. He, Q. Generation of bioluminescent enzyme immunoassay for ferritin by single–chain variable fragment and its NanoLuc luciferase fusion / Q. He, L. Yang, M. Lin, H. Yang, X. Cui, M. R. McCoy, B. D. Hammock, Y. Fang, S. Zhao // *Anal. Bioanal. Chem.* –2022.– Vol. 414– № 23– P. 6939–6946.

126. Zhao, J. Y. Rapid and sensitive detection of fentanyl and its analogs by a novel chemiluminescence immunoassay / J. Y. Zhao, M. Uddin, D. Unsihuay, W. Butler, T. W. Xia, J. Z. Xu, S. Wang, X. Sheng, P. J. Jannetto, P. Wang, X. Xia // *Clin. Chem.* –2024.– Vol. 70– № 7– P. 978–986.

127. Los Santos, P. S. A highly sensitive nanobody–based immunoassay detecting SARS–CoV–2 nucleocapsid protein using all–recombinant reagents / P. S. de Los Santos, C. Padula–Roca, X. Simon, C. Echaidés, G. Lassabe, G. Gonzalez–Sapienza // *Front. Immunol.* –2023.– Vol. 14– P. 1220477.

128. Yan, Y. Rapid and sensitive detection of SARS–CoV–2 based on a phage–displayed scFv antibody fusion with alkaline phosphatase and NanoLuc luciferase / Y. Yan, G. Shang, J. Xie, Y. Li, S. Chen, Y. Yu, P. Yue, X. Peng, M. Ai, Z. Hu // *Anal. Chim. Acta.* –2024.– Vol. 1322– P. 343057.

129. Oyama, H. NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays / H. Oyama, Y. Kiguchi, I. Morita, T. Miyashita, A. Ichimura, H. Miyaoka, A. Izumi, S. Terasawa, N. Osumi, H. Tanaka, T. Niwa, N. Kobayashi // *Anal. Chim. Acta.* –2021.– Vol. 1161– P. 238180.
130. Wang, H. A simple and high-throughput luciferase immunosorbent assay for both qualitative and semi-quantitative detection of anti-HIV-1 antibodies / H. Wang, Q. Cai, Y. Liang, J. Shui, S. Tang // *Virus Res.* –2019. – Vol. 263– P. 9–15.
131. Tin, C.M. Detection of human norovirus-specific antibodies using the luciferase immunoprecipitation system (LIPS) / C.M. Tin, S.V. Sosnovtsev // *Methods Mol. Biol.* –2019.– Vol 2024– P. 137–152.
132. Ling, Y. A luciferase immunoprecipitation assay for the detection of proinsulin/insulin autoantibodies / Y. Ling, P. Jiang, N. Li, Q. Yan, X. Wang // *Clin. Biochem.* –2018. – Vol. 54– P. 51–55.
133. Luque-Uriá, Á. Recombinant peptide mimetic NanoLuc tracer for sensitive immunodetection of mycophenolic acid / Á. Luque-Uriá, R. Peltomaa, T. K. Nevanen, H. O. Arola, K. Iljin, E. Benito-Peña, M. C. Moreno-Bondi // *Anal. Chem.* –2021.– Vol. 93– № 29– P. 10358–10364.
134. Liang, Y. A luciferase immunosorbent assay for quantitative detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2 nucleoprotein / Y. Liang, H. Yan, L. Huang, J. Zhao, H. Wang, M. Kang, Z. Wan, J. Shui, S. Tang // *J. Virol. Meth.* –2021. – Vol. 292– P. 114141.
135. Nandy, S. Protein A-Nanoluciferase fusion protein for generalized, sensitive detection of immunoglobulin G / S. Nandy, M. Crum, K. Wasden, U. Strych, A. Goyal, V. Maranholkar, W. Mo, B. Vu, K. Kourentzi, R. C. Willson // *Anal. Biochem.* –2023.– Vol. 660– P. 114929.

136. Mie, M. Construction of DNA–NanoLuc luciferase conjugates for DNA aptamer–based sandwich assay using Rep protein / M. Mie, T. Niimi, Y. Mashimo, E. Kobatake // *Biotechnol. Lett.* –2019. – Vol. 41– P. 357–362.
137. Hinkley, T.C. Reporter bacteriophage T7 NLC utilizes a novel NanoLuc: CBM fusion for the ultrasensitive detection of *Escherichia coli* in water / T.C. Hinkley, S. Garing, S. Singh, A.M. Le Ny, K.P. Nichols, J.E. Peters, J.N. Talbert, S.R. Nugen // *Analyst* –2018. – Vol. 143– P. 4074–4082.
138. Kozak, S. Phage–based forensic tool for spatial visualization of bacterial contaminants in cheese / S. Kozak, S.D. Alcaine // *J. Dairy Sci.* –2020. – Vol. 103– P. 5964–5971.
139. Hui, J.Z. LASIC: Light activated site–specific conjugation of native IgGs / J.Z. Hui, S. Tamsen, Y. Song, A. Tsourkas // *Bioconjugate Chem.* –2015. – Vol. 26– P. 1456–1460.
140. Krasitskaya, V. V. Luciferase NLuc site–specific conjugation to generate reporters for *in vitro* assays / V. V. Krasitskaya, M. K. Efremov, L. A. Frank // *Bioconjugate Chem.* –2023. – Vol. 34– P. 1282–1289.
141. Dixon A. S. Complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells / A. S. Dixon, M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T. H. Lubben, B. L. Butler, B. F. Binkowski, T. Machleidt, T. A. Kirkland, M. G. Wood, C. T. Eggers, L. P. Encell, K. V. Wood // *ACS Chem. Biol.* –2016.– Vol. 11– P. 400–408.
142. Ohmuro–Matsuyama, Y. Demonstration of protein–fragment complementation assay using purified firefly luciferase fragments / Y. Ohmuro–Matsuyama, C.I. Chung, H. Ueda // *BMC Biotechnol.* –2013. – Vol. 13– P. 31.
143. He, Q. Mix–and–read nanobody–based sandwich homogeneous split–luciferase assay for the rapid detection of human soluble epoxide hydrolase / Q. He, M. R. McCoy, H. Yang, M. Lin, X. Cui, S. Zhao, C. Morisseau, D. Li, B. D. Hammock // *Anal. Chem.* –2023.– T. 95– № 14– C. 6038–6045.

144. Kincaid, V.A. Simple, rapid chemical labeling and screening of antibodies with luminescent peptides / V. A. Kincaid, H. Wang, C. A. Sondgeroth, E. A. Torio, V. T. Ressler, C. Fitzgerald, M. P. Hall, R. Hurst, M. G. Wood, J. K. Gilden, T. A. Kirkland, D. Lazar, H. Chia–Chang, L. P. Encell, T. Machleidt, W. Zhou, M. L. // *DartACS Chem. Biol.*– 2022.– T.17– № 8– C. 2179–2187.
145. Ranawakage, D.C. HiBiT–qIP, HiBiT–based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions / D.C. Ranawakage, T. Takada, Y. Kamachi // *Sci. Rep.* –2019. – Vol. 9– P. 6895.
146. Van Scoyk, A. N. Bioluminescence assay of lysine deacylase sirtuin activity / A. N. Van Scoyk, O. Antelope, D. E. Ayer, R. T. Peterson, A. D. Pomicter, S. C. Owen, M. W. Deininger // *Cell. Chem. Biol.*–2024. – Vol. 31– № 11– P. 2002–2014.
147. Cotter, L. Split luciferase–based assay to detect botulinum neurotoxins using hiPSC–derived motor neurons / L. Cotter, F. Yu, S. Roqueviere, J. Duchesne de Lamotte, J. Krupp, M. Dong, C. Nicoleau // *Commun. Biol.* –2023. – Vol. 6– № 1– C. 122.
148. Pipchuk, A. Development of novel bioluminescent biosensors monitoring the conformation and activity of the Merlin tumour suppressor / A. Pipchuk, T. Kelly, M. Carew, C. Nicol, X. Yang // *Int. J. Mol. Sci.* –2024. – Vol.25– №3– C. 1527.
149. Bergeron, É. Streamlined detection of Nipah virus antibodies using a split NanoLuc biosensor / É. Bergeron, C. F. Chiang, M. K. Lo, E. Karaaslan, S. M. Satter, M. Z. Rahman, M. E. Hossain, W. R. Aquib, D. I. Rahman, S. B. Sarwar, J. M. Montgomery, J. D. Klena, C. F. Spiropoulou // *Emerg. Microbes Infect.* –2024.– T. 13– № 1– C. 2398640.
150. Ohmuro–Matsuyama, Y. Homogeneous noncompetitive luminescent immunodetection of small molecules by ternary protein fragment complementation / Y. Ohmuro–Matsuyama, H. Ueda // *Anal. Chem.* –2018. – Vol. 90– P. 3001–3004.

151. Oliayi M. Tri-part NanoLuc as a new split technology with potential applications in chemical biology: a mini-review / M. Oliayi, R. Emamzadeh, M. Rastegar, M. Nazari // *Anal Methods*, –2023.– Vol. 15– № 32– P. 3924–3931.
152. Ni, Y. A plug-and-play platform of ratiometric bioluminescent sensors for homogeneous immunoassays / Y. Ni, B. J. H. M. Rosier, E. A. van Aalen, E. T. L. Hanckmann, L. Biewenga, A. M. M. Pistikou, B. Timmermans, C. Vu, S. Roos, R. Arts, W. Li, T. F. A. de Greef, M. M. G. J. van Borren, F. J. M. van Kuppeveld, B. J. Bosch, M. Merckx // *Nat. Commun.* –2021.– T.12– № 1– C. 4586.
153. Quijano-Rubio A. De novo design of modular and tunable protein biosensors / A. Quijano-Rubio, H.W. Yeh, J. Park, H. Lee, R.A. Langan, S.E. Boyken, M.J. Lajoie, L. Cao, C.M. Chow, M.C. Miranda, J. Wi, H.J. Hong, L. Stewart, B.H. Oh, D. Baker // *Nature*. –2021.– Vol. 591 № 7850– P. 482–487.
154. Alves, J. A bioluminescent and homogeneous SARS-CoV-2 spike RBD and hACE2 interaction assay for antiviral screening and monitoring patient neutralizing antibody levels / J. Alves, L. Engel, R. deVasconcelos Cabral, E. L. Rodrigues, L. de Jesus Ribeiro, L. M. Higa, O. da Costa Ferreira Júnior, T. M. P. P. Castiñeiras, I. de Carvalho Leitão, A.Tanuri, S.A. Goueli, H. Zegzouti // *Scientific Reports* –2021. – Vol. 11– P. 18428.
155. Байков И.К. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита / И.К. Байков, Л.А. Емельянова, Л.М. Соколова, Е.М. Карелина, А.Л. Матвеев, И.В. Бабкин, Я.А. Хлусевич, В.Ф. Подгорный, Н.В. Тикунова // *Вавиловский журнал генетики и селекции* –2018.– Т.22– № 4– С. 459–467.
156. Патент РФ №2728652, 30.07.2020. Е. Е. Башмакова, А. Н. Кудрявцев, Л. А. Франк Рекомбинантная плазмидная ДНК pET19b-SAV, обеспечивающая синтез полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*, штамм бактерий *Escherichia coli* –продуцент растворимого полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*. Бюл. № 22.

157. Башмакова Е.Е. Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках *Escherichia coli* / Е.Е. Башмакова, А.Н. Кудрявцев, Л.А. Франк // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология –2020.– Т 13– № 2 – С. 218–229.
158. Hori K. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin / K. Hori, H. Charbonneau, R. C. Hart, M.J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1977. – Vol. 74– P. 4285–4287.
159. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U. K. Laemli // Nature. – 1970. – Vol. 227– P. 680–685.
160. Beatty J.D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay / J.D. Beatty, B.J Beatty, W.G. Vlahos// J. Immunol. Methods. – 1987. – Vol. 100– P. 173–179.
161. Baykov I.K. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis / I.K. Baykov, A.L. Matveev, O.V. Stronin, A.B. Ryzhikov, L.E. Matveev, M.F. Kasakin, V.A. Richter, N.V. Tikunova // Vaccine –2014.– Vol. 32– P. 3589–3594.
162. Baykov I.K. Comparative analysis of variable domains of monoclonal antibodies against tick-born encephalitis virus / I.K. Baykov, L.E. Matveev, A.L. Matveev, N.V. Tikunova // Sibirskij Medicinskij Zurnal (in Russian) –2012.– Vol. 111– № 4– P. 30–33.
163. Tsekhanovskaya, N.A. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) / N.A. Tsekhanovskaya, L.E. Matveev, S.G. Rubin, A.S. Karavanov, E.K. Pressman // Virus Res. –1993.– Vol. 30– P. 1–16.
164. Baykov I.K. Computational and rational design of single-chain antibody against tick-borne encephalitis virus for modifying its specificity / I.K. Baykov, P.Y. Desyukevich, E.E. Mikhaylova, O.M. Kurchenko, N.V. Tikunova // Viruses – 2021.– Vol. 13– P.1494. <https://doi.org/10.3390/v13081494>

165. Kellman E.M. Viral determinants of virulence in tick-borne flaviviruses / E.M. Kellman, D.K Offerdahl, W. Melik, M.E. Bloom // *Viruses* –2018.– Vol. 10– № 6– P. 329.
166. Füzik T. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / T. Füzik, P. Formanová, D. Růžek, K. Yoshii, M. Niedrig, P. Plevka // *Nat. Commun.* –2018.– Vol. 9– № 1– P. 436.
167. Rey F.A. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution / F.A. Rey, F.X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S.C. Harrison // *Nature* –1995.– Vol. 375– № 6529– P. 291–298.
168. Baykov I.K. Structural insights into tick-borne encephalitis virus neutralization and animal protection by a therapeutic antibody / I.K. Baykov, G. Chojnowski, P. Pachl, A.L. Matveev, N.A. Moor, L. A. Emelianova, P. M. Rezacova, V.S. Lamzin, N. V. Tikunova // *BioRxiv preprint* –2021. – <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.45394316>
169. Kudryavtsev A.N. Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein Renilla: expected and unexpected features / A.N. Kudryavtsev, V.V. Krasitskaya, M.K. Efremov, S.V. Zangeeva, A.V. Rogova, F.N. Tomilin, L. A. Frank // *Int. J. Mol. Sci.* –2023.– Vol. 24– P. 2144
170. Frank L.A. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for *in vitro* assay / L.A. Frank, E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev // *Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия: Биология.* –2017.– Т. 10– № 2– С. 199 – 210.
171. Kudryavtsev A.N. Designing the homogeneous competitive bioluminescence-based assay for tick-borne encephalitis virus (TBEV) point-of-care detection / A.N. Kudryavtsev, E.E. Denisova, V.V. Krasitskaya, I.K. Baykov, N.V. Tikunova, L.A. Frank // *Anal. Bioanal. Chem.* –2025. – Vol. 417– P. 5931-5939.
172. Кудрявцев А.Н. Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биolumинесцентным иммуноанализом / А.Н. Кудрявцев, Л.П. Буракова, К.А. Баринаова, Л.А. Франк // *Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия: Биология.* –2020. – Т. 13– № 3– С. 310–321.