

На правах рукописи



Кириллова Мария Александровна

**ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНЫЕ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ И СВЕТЛЯКОВ:
СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ
ДЛЯ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

1.5.6. Биотехнология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск.

Научный руководитель: **Кратасюк Валентина Александровна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Решетилов Анатолий Николаевич**
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), г. Пущино, ведущий научный сотрудник лаборатории биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Трофимов Алексей Владиславович
доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва, заместитель директора по науке, заведующий лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов (ИБХФ РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ), г. Казань

Защита диссертации состоится **13 октября 2026 г. в 15:00** на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru/diser/diser.php>

Автореферат разослан «___» июля 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.1.228.03, к.б.н.

Дементьев
Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Современный этап развития биосенсорики характеризуется стремительными темпами появления новых биосенсоров широкого профиля действий. Среди большого разнообразия биосенсоров важную нишу занимают ферментные биосенсоры, в состав биоэлемента которых входят ферменты светящихся организмов – люциферазы.

Люциферин-люциферазная система светляков активно используется для контроля чистоты различных поверхностей, воздуха, воды, качества пищевых продуктов и др. При этом анализ основан на количественном обнаружении аденозин-5'-трифосфата (АТФ) в люциферин-люциферазной реакции, которое пропорционально количеству клеток.

Ферментная система светящихся бактерий также может быть использована в избирательном анализе, основанном на фермент-субстратном взаимодействии, для обнаружения таких клеточных метаболитов, как флаavinмоноклеотид (FMN) или никотинамидадениндинуклеотид (NADH).

Основными характеристиками биолюминесцентных ферментных биосенсоров являются их экспрессность, высокая специфичность и чувствительность к субстратам реакции, а также сохранение активности ферментов с течением времени, то есть их стабильность. Если экспрессность характерна для всех биолюминесцентных методов, то чувствительность подвержена изменениям в силу таких факторов как, например, потеря активности фермента из-за низкой стабильности или снижение светового сигнала в связи с неоптимальными условиями проведения анализа. Актуальным остается не только задача сохранения стабильной структуры фермента, но и соблюдения оптимальных условий для сохранения высокого сигнала люминесценции. В связи с этим возникает вопрос о том, какие способы усиления интенсивности свечения подходят для разных биолюминесцентных систем.

Цель работы заключалась в разработке комплекса методов усиления биолюминесцентного сигнала люциферин-люциферазной системы бактерий и светляков для создания биораспознающего элемента биосенсора, характеризующегося повышенной чувствительностью и стабильностью.

В работе рассматривали разные подходы для повышения интенсивности свечения биолюминесцентных ферментных систем, такие как использование стабилизирующих агентов, наночастиц золота и белка-шаперона.

Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач:

1. Подобрать оптимальные условия проведения биолюминесцентного анализа путем изменения соотношения компонентов ферментных реакций для увеличения чувствительности анализа.

2. Оценить способ усиления люминесценции люциферазных систем наночастицами золота. Провести синтез наночастиц золота, охарактеризовать полученные наночастицы и исследовать их стабильность.

3. Оценить возможность использования шаперонов для сохранения сигнала люминесценции в условиях повышенной температуры на примере люциферазы светляков и белка теплового шока 90 (Hsp90).

4. Оценить влияние иммобилизации на стабильность и чувствительность люциферазных систем.

5. Применить исследованные подходы для разработки биораспознающего элемента биосенсора.

Научная новизна

Впервые проведен систематический анализ способов усиления биолюминесценции люциферин-люциферазных систем бактерий и светляков и обеспечения стабильности ферментных систем, а именно защита структуры люциферазы стабилизирующими добавками, усиление люминесценции в присутствии наночастиц золота, поддержание работы фермента с помощью шаперона Hsp90. Предложен способ стабилизации наночастиц золота липидной смесью, отличающийся своей простотой и низкой стоимостью. Показана возможность сохранения активности люциферазы светляков в условиях повышенной температуры с помощью Hsp90 без участия ко-шаперонов.

Показано, что для улучшения функциональных характеристик биолюминесцентных методов важным аспектом является подбор условий проведения анализа и компонентного состава реакционной смеси, а также использование наночастиц для усиления сигнала биолюминесценции. Стабилизация ферментной системы достигается путем иммобилизации или добавления стабилизирующих агентов. Использование шаперонов целесообразно для проведения анализов при высокой температуре.

Теоретическая и практическая значимость

Сравнительный анализ способов усиления биолюминесцентного сигнала ферментных систем бактерий и светляков показал, что выбранные способы, отличающиеся механизмами, лежащими в основе усиления сигнала, способствуют улучшению характеристик биолюминесцентных методов. На основе сравнения ферментных систем светляков и светящихся бактерий разработаны методы анализа

клеточных метаболитов, являющихся субстратами реакций (АТР, FMN и NADH). Представленные способы были выборочно использованы для создания стабильного иммобилизованного реагента на основе люциферазы светляков, пригодного для использования в качестве биораспознающего элемента биосенсоров для количественного определения АТР. Разработан метод оценки микробного загрязнения с применением полученных реагентов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стабильность ферментной системы светляков повышается путем иммобилизации в желатиновый гель, введения стабилизирующих агентов и применения шаперона Hsp90 (при высокой температуре).

2. Присутствие наночастиц золота усиливает сигнал биolumинесценции биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза.

3. Раздельная иммобилизация люциферазы светляков и D-люциферина в желатиновый гель обеспечивает создание стабильного и чувствительного реагента для количественного определения АТР.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов исследований до проведения экспериментов с последующим обобщением и интерпретацией результатов, подготовкой и оформлением публикаций.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом данных, их внутренней согласованностью и воспроизводимостью, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены в виде научных докладов и постерных сообщений на Международном симпозиуме и молодежной школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, Россия, 25 – 28 октября 2016); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, Россия, 10 – 14 апреля 2017); 3-ей Международной конференции по инжинирингу продуктов питания и биосистем (Родос, Греция, 1 – 4 июня 2017); 9-ой Международной конференции по экологическому инжинирингу и менеджменту (ICEEM-09) (Болонья, Италия, 6 – 9 сентября 2017); 20-ом Международном симпозиуме по биolumинесценции и хемиolumинесценции (Нант, Франция, 28 – 31 мая

2018), III международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни» (Красноярск, Россия, 1 – 4 октября 2018), VI Съезде биофизиков России (Сочи, Россия, 16 – 21 сентября 2019), I региональном собрании РФО и Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (Нижний Новгород, Россия, 14 – 19 октября 2024); конференции молодых ученых Института биофизики СО РАН (Красноярск, Россия, 9 апреля 2026).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности №18-44-242003, №16-44-242126, а также гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №9590ГУ/2015.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют п.7 – Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии и п.22 в части – Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК России, входящих в Белый список и индексируемых в базах Web of Science, Scopus, 6 публикаций в сборниках докладов научных конференций и 1 патент.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 2 глав с результатами работы и заключения. Полный объем диссертации 121 страница текста с 50 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 196 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе представлен обзор современного состояния проблемы, а именно: представлены общие характеристики ферментных биосенсоров, описаны основные объекты исследования – биолюминесцентные системы светляков и светящихся бактерий. Рассмотрены факторы, влияющие на изменение чувствительности биолюминесцентных ферментных систем, такие как усиление сигнала и стабилизация ферментов. Представлено описание способов усиления сигнала биолюминесценции,

включая изменение компонентов реакции: добавления стабилизирующих агентов и наночастиц металлов. Обсуждаются механизмы повышения стабильности ферментных биоэлементов при иммобилизации ферментов и использовании шаперонов. Анализ литературных данных подтверждает актуальность и новизну диссертационного исследования, а также выбранные методические подходы для его выполнения.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной главе приводится список используемых реактивов с указанием их изготовителей. Описывается аппаратура, на которой проводилась экспериментальная работа. Излагаются применяемые методы исследования, подробно описываются методики экспериментов.

В работе использовали мутантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* (FLuc) («Люмтек», Россия), люциферазу светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* (BLuc) и NADH:FMN-оксидоредуктазу *Vibrio fischeri* (Red), а также препарат, содержащий оба фермента (Red + BLuc) (Институт Биофизики СО РАН, Красноярск, Россия). Белок теплового шока 90 (Hsp90a Active Human, рекомбинантный) и апираза из картофеля были приобретены в компании «Merck», Германия.

1. Подбор оптимальных условий проведения анализов с использованием люциферазных систем проводили путем количественного варьирования компонентов ферментативных реакций.

2. Для усиления люминесцентного сигнала люциферазных систем использовали наночастицы золота, синтезированные цитратным методом. Конечные концентрации реагентов в полученных четырех растворах наночастиц составили:

- AuNP1: 0,29 мМ HAuCl₄; 1,54 мМ Na₃C₆H₅O₇;
- AuNP2: 0,29 мМ HAuCl₄; 3,08 мМ Na₃C₆H₅O₇;
- AuNP3: 0,29 мМ HAuCl₄; 1,54 мМ Na₃C₆H₅O₇ и 5,3 мкМ AgNO₃;
- AuNP4: 0,29 мМ HAuCl₄; 1,54 мМ Na₃C₆H₅O₇; 10,6 мкМ AgNO₃.

Получение AuNP, покрытых липидной оболочкой (AuNP-L), проводили путем добавления к раствору наночастиц липидной смеси 1 («Sigma-Aldrich», США), состоящей из труднорастворимых жирных кислот неживотного происхождения, таких как арахидоновая, линолевая, линоленовая, миристиновая, олеиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты, а также холестерина, твин-80, ацетата токоферола и плуроника F-68. Анализ частиц проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония), оснащенного энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (EDS), а также анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern

Instruments Ltd., Великобритания) для измерения дзета-потенциала (ζ -потенциала) и размеров наночастиц.

Влияние AuNP и AuNP-L на изменение интенсивности излучения люциферазных реакций изучали путем смешивания растворов AuNP или AuNP-L с FMN или АТР, затем добавляли остальные компоненты биoluminesцентной реакции и измеряли интенсивность свечения.

Другого типа наночастицы золота (AuNP-АТР) синтезировали с использованием АТР в качестве стабилизатора и NaBH₄ в качестве восстановителя. Взаимодействие люциферазы светляков (FLuc) с AuNP-АТР исследовали путем регистрации кинетики биoluminesцентной реакции методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания).

3. Оценку стабилизирующего действия шаперона Hsp90 (белка теплового шока 90) на FLuc исследовали путем никубирования Hsp90, АТР, FLuc при высокой температуре (50°C).

4. Разработку реагента для количественного определения АТР проводили путем иммобилизации FLuc и D-люциферина в крахмальный и желатиновый гель. Применимость полученного иммобилизованного реагента для анализа микробного загрязнения определяли с использованием клеток *Escherichia coli* (штамм BL21-CodonPlus (DE3) RIPL) в качестве модельного микробного образца.

ГЛАВА 3 СПОСОБЫ УПРАВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ

В главе представлены результаты поиска оптимальных условий, обеспечивающих низкий предел обнаружения субстратов АТР, FMN и NADH биoluminesцентными ферментными системами светляков и светящихся бактерий.

3.1 Поиск оптимальных концентраций основных компонентов ферментных реакций, обеспечивающих низкий предел обнаружения субстратов

Изменение количественного состава реакционной смеси оказывает значительное влияние на чувствительность ферментных систем. Более того интерферирующим фактором для биoluminesцентных ферментных систем является наличие фонового свечения, детектируемого в отсутствие субстрата реакции. Присутствие фонового светового сигнала является ограничением метода, препятствующим достижению низкого предела обнаружения аналита. При использовании FLuc для анализа количества АТР или ферментной системы Red + BLuc для определения NADH и FMN наблюдали фоновое свечение, что может быть связано с присутствием следовых количеств субстрата в ферментном препарате. Одним из простых путей решения

данного ограничения является выдерживание реакционной смеси в течение некоторого времени до снижения фонового свечения, при этом время выдерживания может варьироваться в зависимости от концентрации используемых реагентов.

Для определения оптимальных условий, позволяющих оценивать минимальное содержание FMN и NADH в анализируемом образце, варьировали содержание компонентов ферментной реакции. При этом особое внимание уделялось именно отношению сигнал/фон (I/I_{фон}). При выбранных концентрациях компонентов реакционной смеси (для обнаружения NADH: 10 мкг BLuc, 0,002 ед. акт. Red, 10⁻⁴ % тетрадеканала и 1 мкМ FMN; для обнаружения FMN: 0,63 мкг BLuc, 0,0002 ед. акт. Red, 10⁻⁴ % тетрадеканала, 29 мкМ NADH) предел обнаружения субстратов сопряженной ферментной системы светящихся бактерий Red + BLuc составил 1,2 нМ FMN и 0,1 пМ NADH.

При работе с люциферазой светляков (FLuc) увеличение количества фермента и D-люциферина в реакционной смеси приводило к усилению интенсивности свечения, а также к увеличению соотношения I/I_{фон}. С учетом этого были выбраны оптимальные количества FLuc и D-люциферина: 4,2 мкг FLuc и 0,125 мМ D-люциферина.

3.2 Использование стабилизирующих добавок для увеличения чувствительности ферментной системы светляков

На примере люциферин-люциферазной системы светляков было исследовано влияние дополнительных стабилизирующих добавок на активность люциферазы. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), дитиотрейтол (ДТТ) и сахарозу. Стабилизаторы разных концентраций добавляли в реакционную смесь, содержащую FLuc, D-люциферин и трис-ацетатный буфер pH 7,8, и инкубировали при 24°C в течение 1 часа.

Добавление БСА в реакционную смесь приводило к увеличению интенсивности свечения в 2,5 раза по сравнению с контролем. Наибольшая интенсивность свечения наблюдалась при концентрации БСА 0,6 мг/мл. При добавлении ДТТ концентрации 0,25 мМ и выше интенсивность свечения биolumинесцентной системы увеличилась в 1,5 раза. В то время как в присутствии сахарозы увеличения активности фермента не наблюдалось. Таким образом, показано, что выбор дополнительных компонентов реакционной смеси играет важную роль для увеличения активности люциферин-люциферазной системы светляков и повышения чувствительности биolumинесцентного метода.

3.3 Применение наночастиц золота для усиления люминесцентного сигнала

В разделе описаны характеристики двух типов наночастиц золота, синтезированных цитратным методом (AuNP), и методом с образованием оболочки

АТР (AuNP-АТР). А также представлены результаты усиления люминесцентного сигнала в присутствии наночастиц.

3.3.1 Наночастицы золота с цитратной оболочкой

Очень часто снижение чувствительности биолюминесцентных биосенсоров происходит из-за низкого светового сигнала, что может происходить в силу недостаточно высокого квантового выхода люциферазы (квантовый выход BLuc составляет 10 – 16% (Суковатая, Кратасюк, 2007), квантовый выход FLuc составляет 40 – 50% (Ando et al., 2008; Niwa et al., 2010)) или высокого фонового свечения биолюминесцентной ферментной системы. В этом случае повысить чувствительность можно путем усиления светового излучения с помощью наночастиц благородных металлов, золота или серебра. Ранее было показано, что усиление сигнала биолюминесценции рекомбинантных светящихся бактерий в присутствии наночастиц серебра (Golberg et al., 2014) происходит за счет взаимодействия излучения, возникающего в результате биолюминесцентной химической реакции, с поверхностными плазмонами на наночастицах металла.

Были синтезированы наночастицы золота с различным содержанием тринатрий цитрата: 1,54 мМ в образцах AuNP1, AuNP3 и AuNP4 и 3,08 мМ в образце AuNP2. Кроме этого, образцы AuNP3 и AuNP4 представляли собой золото-серебряные частицы (концентрация нитрата серебра при синтезе составляла 5,3 мкМ для AuNP3 и 10,6 мкМ для AuNP4). Методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ-анализ) было показано, что синтезированные AuNP представляли собой нанокристаллы. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDS) показала, что AuNP3 и AuNP4 содержали $1,5\% \pm 0,5\%$ и $2,5\% \pm 0,5\%$ серебра соответственно.

Для стабилизации полученных AuNP использовали липидную смесь (LP) с последующей ультразвуковой обработкой (рисунок 1).

Предположительно, AuNP, обработанные липидной смесью, образуют гидрофобный слой, окружающий область, покрытую цитратом, при этом карбоновая кислота (-COOH) с различными длинами цепей направлена в сторону гидрофильного окружения. Было найдено оптимальное соотношение липидной смеси и раствора наночастиц (LP:AuNP как 1:200), при котором AuNP не были подвержены агрегации под действием ионов натрия. Стабильность AuNP, синтезированных с использованием AgNO₃ (AuNP3 и AuNP4) была значительно ниже, чем стабильность AuNP1 и AuNP2, что говорит о том, что ионы Ag⁺ играют существенную роль в дестабилизации AuNP с липидной оболочкой.

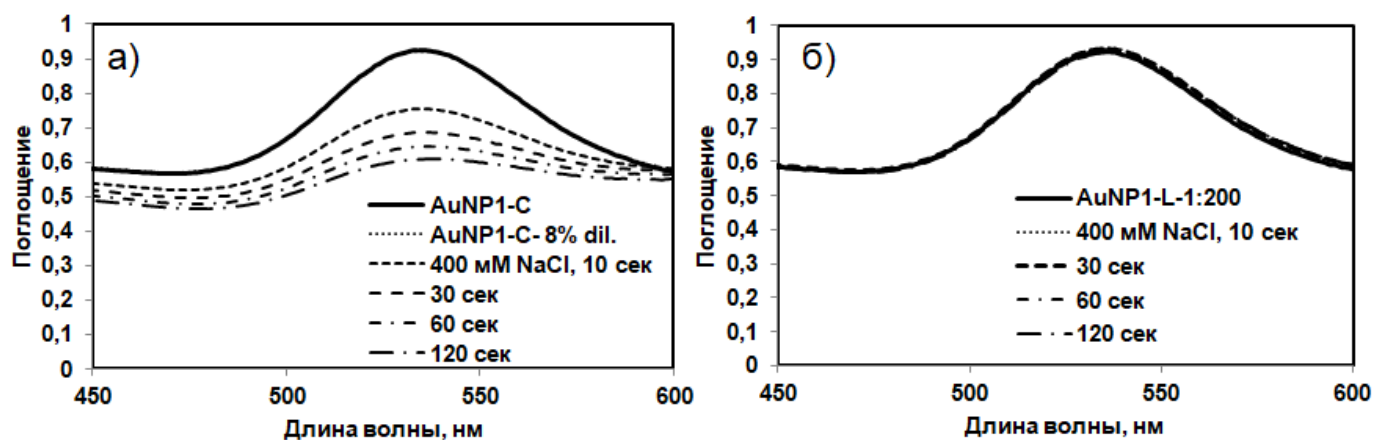


Рисунок 1 – Эффект водного раствора 400 мМ NaCl на спектры поглощения: а) AuNP1 и б) AuNP1-L-1:200 через 10, 30, 60 и 120 сек. AuNP1-C – исходный раствор наночастиц золота, принятый за контроль, AuNP1-L-1:200 – AuNP1, стабилизированные липидной смесью при соотношении LP:AuNP как 1:200, AuNP1-C-8% dil. – 8% разведение водой исходного раствора AuNP1

Эффект усиления биолюминесценции исследовали в присутствии наночастиц золота, синтезированных цитратным методом. Ранее уже было продемонстрировано усиление биолюминесценции ферментативных систем светящихся бактерий и светляков в присутствии наночастиц золота (Abhijith et al., 2014; Karimi et al., 2022).

При добавлении AuNP и AuNP-L к люциферин-люциферазной системе светляков, было отмечено, что интенсивность света остается чуть ниже уровня контроля, то есть не превышает интенсивность света ферментной системы в отсутствие AuNP (рисунок 2). Это может свидетельствовать о том, что происходит безызлучательный перенос энергии между FLuc и наночастицей, и происходит тушение люминесценции наночастицами золота.

Также исследовали влияние AuNP и AuNP-L на изменение интенсивности свечения биолюминесценции ферментной системы Red + BLuc. В присутствии наночастиц золота наблюдалось увеличение интенсивности свечения в 1,6 раз (рисунок 2). При этом наличие липидной оболочки вокруг золотых наночастиц не оказывало значительного эффекта на изменение сигнала. Следует отметить, что ранее эффект усиления биолюминесценции посредством металлических наночастиц наблюдался для светящихся бактерий *Aliivibrio fischeri* и рекомбинантных бактерий *Escherichia coli* (Eltzov et al., 2009; Golberg et al., 2014; He et al., 2026), при этом усиление сигнала происходило в 1,5 – 2,5 раза, что согласуется с полученными в настоящей работе результатами. Усиление сигнала ферментной системы Red + BLuc говорит о перспективах применения данного подхода для изменения сигнала люминесценции.

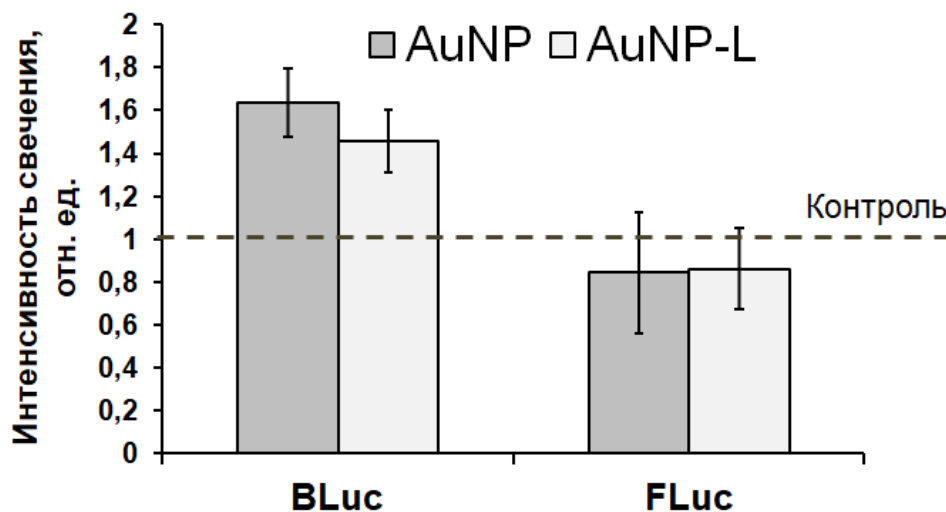


Рисунок 2 – Нормированная интенсивность свечения а) FLuc и б) Red + BLuc в присутствии образцов наночастиц золота: AuNP и AuNP-L. Контролем выступает интенсивность свечения в системе в отсутствие AuNP

3.3.2 Наночастицы золота, покрытые оболочкой АТР (AuNP-АТР)

Другого типа наночастицы золота были синтезированы с использованием АТР в качестве стабилизатора, покрывающего золотое ядро (AuNP-АТР). Взаимодействие FLuc с AuNP-АТР исследовали путем использования раствора наночастиц AuNP-АТР вместо субстрата АТР в люциферин-люциферазной реакции. С помощью метода остановленного потока было показано, что FLuc может взаимодействовать только со свободным АТР, находящимся в растворе, при этом концентрация свободного АТР в растворе AuNP-АТР примерно в 50 раз меньше концентрации АТР, используемой при синтезе частиц (рисунок 3).

Полученные данные подтверждают, что АТР покрывает золотое ядро наночастиц, способствуя их стабилизации, при этом АТР является недоступным для взаимодействия с FLuc, вследствие чего FLuc взаимодействует только со свободным АТР. Таким образом, полученные AuNP-АТР не способствуют усилению биолюминесценции, поэтому в целях повышения чувствительности биолюминесцентного метода рекомендовано использовать наночастицы, синтезированные цитратным методом.

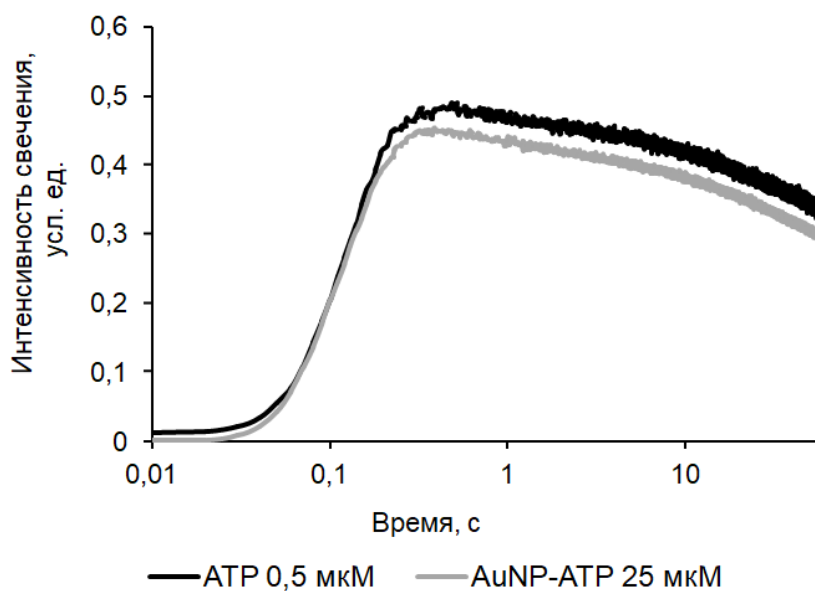


Рисунок 3 – Кинетика люциферин-люциферазной реакции в присутствии 25 мкМ AuNP-АТФ и 0,5 мкМ АТФ

3.4 Белки теплового шока как стабилизаторы люциферазы светляков

В данном разделе рассмотрен подход сохранения активности FLuc в присутствии белка теплового шока 90 в условиях повышенной температуры. Белок теплового шока (Hsp) 90 является широко распространенным молекулярным шапероном, который помогает сворачиванию белков и способствует стабильному поддержанию гомеостаза белков. Ранее было показано, что Hsp90 обеспечивает эффективное сворачивание FLuc при инкубировании с лизатом ретикулоцитов кролика (RRL), который является источником необходимых ко-шаперонов, таких как Hsp70, Hsp40, Hop и др. (Minami et al., 1999, 2000, 2001). Недавние исследования показали, что в отсутствие ко-шаперонов Hsp90 помогает восстановить каталитическую активность FLuc до 20%, а в присутствии АТФ до 45% (Ishida et al., 2013). В настоящей работе исследовали изменение люминесценции FLuc в присутствии Hsp90 (Kirillova et al., 2019).

Способность Hsp90 сохранять активность FLuc в условиях термоденатурации проверяли при температуре 50°C. Было обнаружено, что в присутствии Hsp90 и АТФ активность FLuc сохраняется (рисунок 4). После инкубирования при 50°C в течение 15 минут образец, содержащий FLuc, Hsp90 и АТФ, имел наибольший сигнал люминесценции по сравнению с контрольными образцами, содержащими FLuc и Hsp90; FLuc и АТФ; FLuc, что указывает на защитную роль Hsp90 и стабилизацию FLuc во время анализа при повышенной температуре.

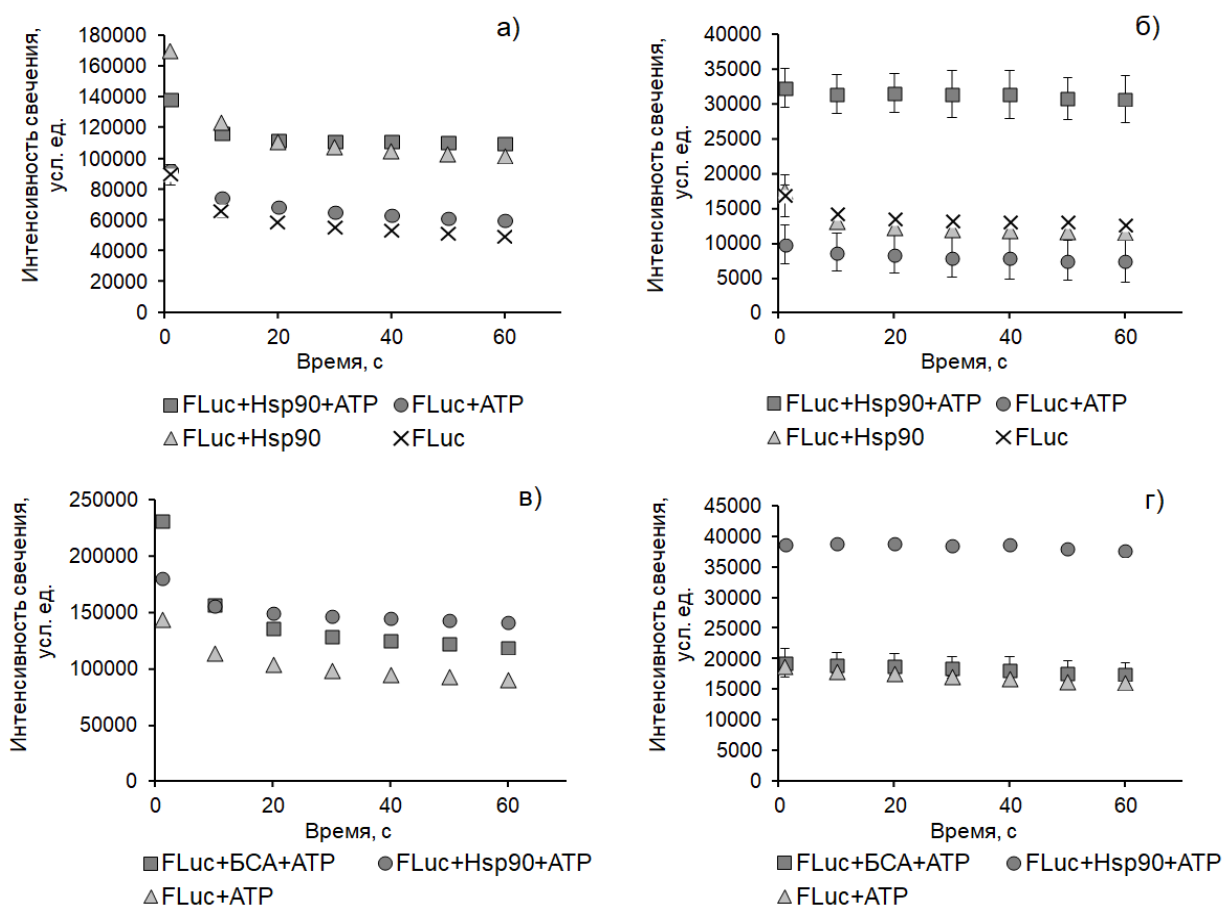


Рисунок 4 – Интенсивность свечения реакционной смеси в присутствии образцов (а, в) без инкубации; (б, г) инкубированных при 50°C в течение 15 мин. Каждая точка представляет собой среднее значение двух измерений

Также было показано, что при использовании БСА (в качестве контроля) при высокой температуре стабилизации FLuc не наблюдалось (рисунок 4г), что доказывает исключительный эффект Hsp90 на термостабильность FLuc. Таким образом, настоящее исследование показало, что Hsp90 обладает потенциалом предотвращения агрегации FLuc в отсутствие других шаперонов.

ГЛАВА 4 СОЗДАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АТФ

4.1 Иммобилизация люциферазы светляков

Качество биолюминесцентных ферментных биосенсоров зависит не только от чувствительности к исследуемым веществам, но также важным параметром является стабильность ферментов, входящих в состав биораспознающего элемента. При низкой стабильности люциферазы происходит потеря каталитической активности, вследствие чего снижается чувствительность фермента к аналиту. Поэтому при создании

биолюминесцентного ферментного биосенсора важно особое внимание уделять стабильности биоэлемента и поддержания люциферазы в активном состоянии. Одним из способов сохранения активности ферментов при изменении внешних условий является иммобилизация. В предыдущей главе были рассмотрены несколько способов усиления сигнала биолюминесцентных ферментных реакций бактерий и светляков. С целью внедрения исследованных способов усиления сигнала для практического применения был создан чувствительный иммобилизованный реагент на основе люциферазы светляков.

В качестве носителей для иммобилизации FLuc использовали крахмальный и желатиновый гели. Наибольшая активность иммобилизованной FLuc достигалась при использовании 1% желатинового геля. Полученные иммобилизованные реагенты представляли собой тонкие диски диаметром 6-7 мм (рисунок 5а).

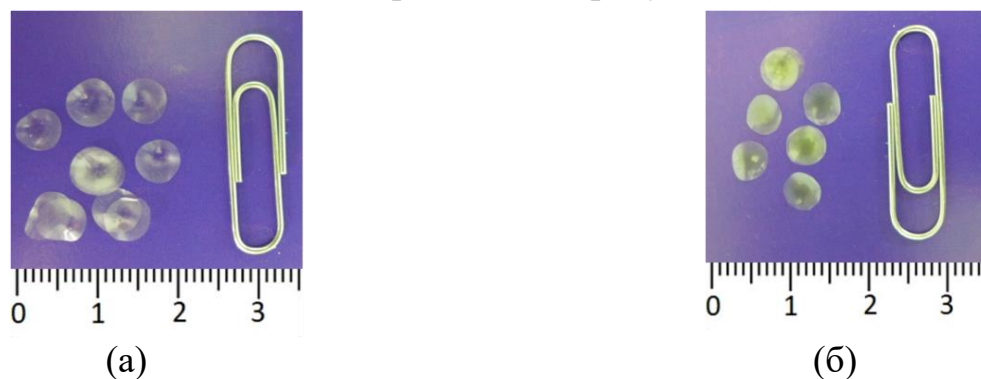


Рисунок 5 – Иммобилизованные реагенты на основе люциферин-люциферазной системы светляков: (а) реагент, включающий 4,2 мкг FLuc, иммобилизованной в 1% желатиновый гель; (б) реагент, содержащий 0,125 мМ D-люциферин в 1% желатиновом геле

4.1.1 Активность иммобилизованной люциферазы светляков в присутствии стабилизирующих добавок

В качестве способа повышения активности люциферазы светляков был выбран способ защиты структуры фермента стабилизирующими агентами.

Было обнаружено, что добавление сахарозы в желатиновый гель препятствует полному высыханию иммобилизованных реагентов, что приводило к их повреждению и создавало трудности для использования. Поэтому сахароза была исключена из состава реагента.

Внесение в состав реагента ДТТ привело к увеличению интенсивности свечения FLuc в 2 – 2,5 раза. Показано, что после 2,5 месяцев хранения реагент, содержащий FLuc, иммобилизованную совместно с 0,5 мМ ДТТ, сохраняет 60% от первоначальной активности.

Внесение БСА в иммобилизованный реагент, содержащий 0,5 мМ ДТТ, не приводило к увеличению активности иммобилизованной FLuc. По всей видимости, это связано с восстановительным действием ДТТ, разрушающим множественные дисульфидные связи в структуре БСА. Полученные данные для FLuc схожи с тем, что ранее было показано для иммобилизованной в желатиновый гель BLuc (Lonshakova-Mukina et al., 2015).

4.1.2 Применение биолюминесцентных ферментных систем для анализа микробного загрязнения

Полученные иммобилизованные реагенты были использованы для анализа микробного загрязнения. Оценку микробного загрязнения различных сред с использованием FLuc проводят, определяя количество АТР в растворе, содержащем лизированные бактериальные клетки. В качестве модельного микробного образца использовали клетки *E. coli*, разрушенные ультразвуковым дезинтегратором при частоте 44 кГц. Образцы бактериального лизата добавляли в реакционную смесь вместо раствора АТР. Каждый раз перед добавлением анализируемого образца измерялось фоновое свечение.

Минимальная обнаруживаемая концентрация АТР составила 0,3 пМ (рисунок 47а), линейный диапазон отклика находится в интервале от 0,3 пМ до 3 нМ. Предел обнаружения бактериальных клеток составил $2 \cdot 10^4$ кл/мл.

Для сравнения полученных результатов с биолюминесцентной системой Red + BLuc был проведен анализ микробного загрязнения по специфическому обнаружению NADH и FMN. При этом для достижения минимального предела обнаружения бактериальных клеток, в работе была использована ферментная система в растворимой форме. Предел обнаружения биолюминесцентной системы Red + BLuc составил $3,9 \cdot 10^6$ кл/мл и $8 \cdot 10^5$ кл/мл при анализах, основанных на определении содержания FMN и NADH соответственно (Kirillova et al., 2018), что в 40 раз превышает предел обнаружения бактериальных клеток системой FLuc. Полученные результаты говорят о том, что в силу высокого фонового свечения, система Red + BLuc не способна определять ультрамалые количества микробных клеток. Тем не менее, система Red + BLuc может применяться для анализа других образцов.

4.1.3 Иммобилизация D-люциферина

Одним из способов упрощения процедуры проведения биолюминесцентного ферментативного анализа является включение в биологический элемент субстрата реакции. Подобный подход был успешно применен ранее при разработке целого ряда многокомпонентных ферментных препаратов (Esimbekova et al., 2007, 2009, 2015; Lonshakova-Mukina et al., 2022).

Проводили совместную иммобилизацию D-люциферина и FLuc в 1% желатиновый гель. Активность многокомпонентных реагентов зависела от концентрации внесенного D-люциферина, при этом оптимальная концентрация D-люциферина составила 2,5 мМ, в этом случае максимальная интенсивность свечения была на 40% меньше по сравнению с таковой для FLuc, иммобилизованной без D-люциферина (контроль) (рисунок 6а). Таким образом, совместная иммобилизация FLuc и D-люциферина приводит к снижению активности иммобилизованного реагента.

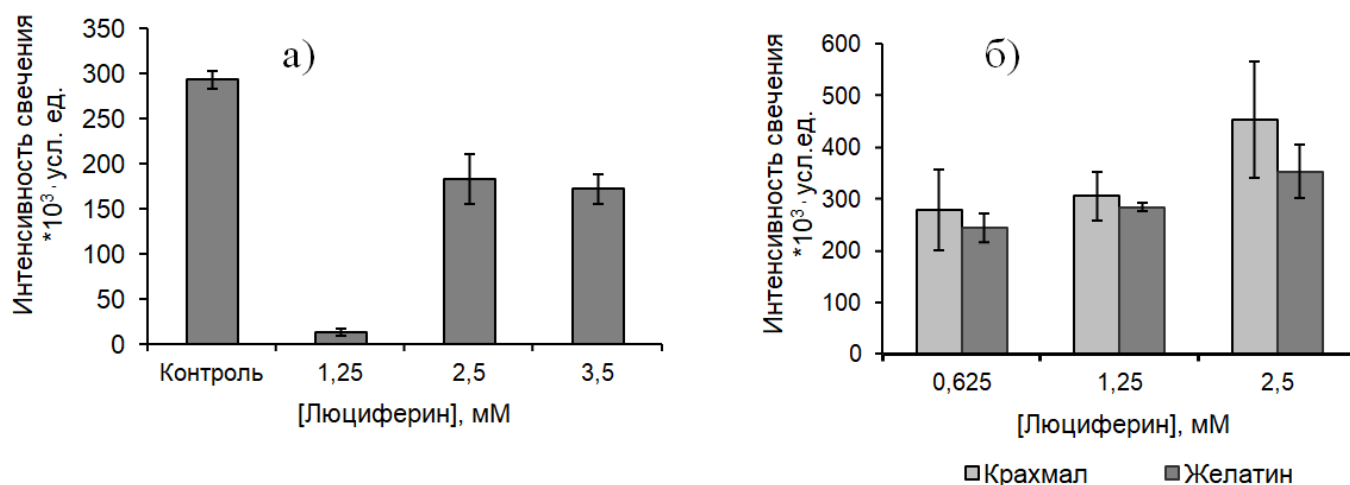


Рисунок 6 – Интенсивность свечения реагентов различного состава на основе люциферин-люциферазной системы светляков: а) интенсивность свечения многокомпонентного иммобилизованного в 1% желатиновый гель реагента включающего FLuc и D-люциферин разных концентраций; б) интенсивность свечения FLuc в присутствии иммобилизованного D-люциферина (FLuc в реакционную смесь вносили в виде раствора, реакцию запускали добавлением 20 мкл 50 нМ раствора АТР); иммобилизацию проводили в 3% крахмальный и 1% желатиновый гели

Однако раздельная иммобилизация FLuc и D-люциферина в крахмальный и желатиновый гели показала, что интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы светляков возрастает с увеличением концентрации D-люциферина в иммобилизованном реагенте. Это свидетельствует о том, что гелевая структура желатина и крахмала не препятствует перемещению молекул D-люциферина в раствор. Подобно иммобилизованной FLuc, иммобилизованный D-люциферин представлял собой сухие диски небольшого размера (рисунок 5б), предназначенные для однократного применения.

Достоверных различий в активности биолуминесцентной системы в зависимости от природы геля, используемого для иммобилизации D-люциферина, не наблюдалось

(рисунок 5б). Тем не менее, при использовании D-люциферина, иммобилизованного в крахмальный гель, наблюдали бóльший разброс в значениях биолуминесцентного сигнала, что приводило к плохой воспроизводимости результатов. Таким образом, для иммобилизации D-люциферина наиболее подходящим носителем оказался желатиновый гель, в этом случае предел обнаружения АТР составил 0,3 пМ.

На рисунке 7 представлено сравнение активности биолуминесцентной системы светляков в зависимости от условий проведения анализа.

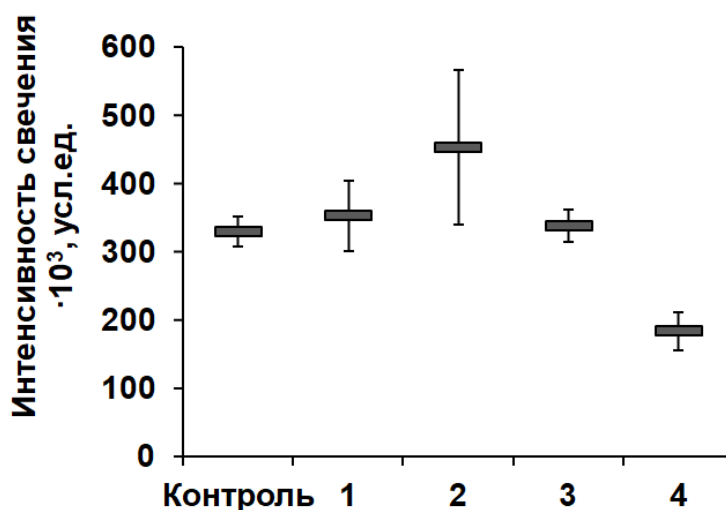


Рисунок 7 – Интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы светляков при разных условиях. Реакционные смеси содержали 4,2 мкг FLuc, 2,5 мМ D-люциферина и 3 нМ АТР. Контроль – FLuc и D-люциферин в виде растворов; 1 – FLuc в виде раствора и D-люциферин, иммобилизованный в желатиновый гель, 2 – FLuc, в виде раствора и D-люциферин, иммобилизованный в крахмальный гель, 3 – два реагента: FLuc и D-люциферин, раздельно иммобилизованные в желатиновый гель, 4 – многокомпонентный реагент, содержащий совместно иммобилизованные в желатиновый гель FLuc и D-люциферин

Показано, что раздельная иммобилизация FLuc и D-люциферина в 1% желатиновый гель (линия 3 на рисунке 7) не снижает активности фермента, и интенсивность свечения находится на уровне контроля, т.е. интенсивности свечения растворимой FLuc в присутствии раствора D-люциферина.

Таким образом, иммобилизация D-люциферина отдельно или совместно с FLuc позволила существенно упростить процедуру количественного определения АТР в образце. Оптимизированный протокол биолуминесцентного анализа при раздельной иммобилизации FLuc и D-люциферина для определения количества АТР включает помещение в кювету с исследуемым образцом два иммобилизованных реагента

(рисунок 5), один из которых содержит FLuc, а второй – D-люциферин. При использовании многокомпонентного реагента, в анализируемый раствор помещается один диск, содержащий совместно иммобилизованные FLuc и D-люциферин. Таким образом, полученные реагенты исключают применение фермента и субстрата в виде раствора, и могут быть использованы в качестве биоэлемента биосенсора для быстрого и удобного проведения анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведен анализ и сравнительная оценка методов управления ключевыми характеристиками – чувствительностью и стабильностью биолюминесцентных ферментных систем светляков и светящихся бактерий, применяемых в качестве биораспознающего элемента в биосенсорах. Представлены способы усиления сигнала люциферазных реакций с целью улучшения чувствительности методов и снижения предела обнаружения аналитов.

Показано, что для анализа, нацеленного на количественное определение субстратов (ATP, NADH, FMN), важным фактором при увеличении чувствительности является достижение максимального отношения сигнал/фон за счет подбора оптимального соотношения компонентов ферментативной реакции. Для FLuc эффективным способом повышения чувствительности является использование стабилизирующих агентов, таких как ДТТ и БСА, защищающих структуру фермента, в то время как для системы Red + BLuc был продемонстрирован положительный эффект от применения наночастиц золота (AuNP).

Для решения проблемы низкой стабильности люцифераз, что является одним из основных ограничений для их практического применения, были предложены и апробированы два подхода. Во-первых, для сохранения активности FLuc и предотвращения ее инактивации в условиях повышенной температуры рассмотрена возможность применения шаперона Hsp90. Преимуществами использования шаперона для поддержания активности FLuc заключается в сохранении работоспособности люциферазы с течением времени, в то время как другие белковые добавки, например, БСА, не способны стабилизировать белок при длительном воздействии высокой температуры. Во-вторых, представлен метод иммобилизации FLuc и D-люциферина в желатиновый гель, что позволило создать чувствительные реагенты, которые могут применяться в качестве биоэлемента биосенсора. Полученные реагенты обладают стабильностью при хранении, и сохраняют активность, достаточную для определения бактериальных клеток с пределом обнаружения $2 \cdot 10^4$ кл/мл.

Проведенное сравнение выявило, что универсальных методов улучшения характеристик не существует. Иммобилизация, успешно применяемая для стабилизации системы Red + BLuc, в случае с FLuc потребовала тщательного подбора носителя и условий. Также эффект усиления сигнала в присутствии AuNP, который наблюдался для BLuc, не был зафиксирован для FLuc в аналогичных условиях, что подчеркивает важность учета молекулярных особенностей каждого фермента.

Таким образом, полученные результаты показывают значимость представленных методов повышения чувствительности и стабильности биолюминесцентных ферментных систем и вносят существенный вклад в понимание принципов функционирования биолюминесцентных ферментативных биосенсоров, и могут быть полезны при разработке новых биосенсоров.

ВЫВОДЫ

1. Найдены оптимальные соотношения компонентов реакционной смеси для люциферин-люциферазной системы светляков и биферментной системы бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза, позволяющие достичь чувствительности анализа АТР до 0,3 пМ, NADH до 0,1 пМ и FMN до 1 нМ.

2. Усиление интенсивности биолюминесценции люциферин-люциферазной системы светляков достигается добавлением стабилизирующих агентов (0,5 мМ ДТТ и 0,6 мг/мл БСА), а при повышенной температуре эффективным способом поддержания активности люциферазы светляков во времени является применение шаперона Hsp90.

3. Для биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза эффективным способом усиления сигнала является взаимодействие люциферазы с наночастицами золота.

4. Липидная смесь стабилизирует наночастицы золота с цитратной оболочкой, предотвращая агрегацию под действием ионов натрия, при этом наилучшая стабильность наночастиц достигается при соотношении AuNP:LP как 200:1. Наличие серебра в составе наночастиц снижает их стабильность в присутствии липидной смеси.

5. Выход активности люциферазы светляков при совместной иммобилизации с люциферин-люциферазой на 40 % ниже активности люциферазы светляков, иммобилизованной отдельно в желатиновый гель.

6. Предложен и разработан стабильный и чувствительный комплекс реагентов из отдельно иммобилизованных в желатиновый гель люциферазы светляков и D-люциферина для количественного определения АТР. Комплекс реагентов предназначен для анализа микробного загрязнения как биораспознающий элемент биосенсора.

7. Сравнение методов анализа микробного загрязнения на основе оценки концентрации АТФ люциферин-люциферазной системой светляков и NADH и FMN с использованием биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза показала преимущества АТФ-системы по чувствительности анализа, которая составила $2 \cdot 10^4$ кл/мл при обнаружении АТФ, $3,9 \cdot 10^6$ кл/мл и $8 \cdot 10^5$ кл/мл при обнаружении FMN и NADH соответственно.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **Kirillova M.A.** Bioluminescent enzymatic biosensors: ways to manage their characteristics / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // Biophysical Reviews. – 2025. – P. 1–17.

2. Esimbekova E.N. Immobilization of firefly bioluminescent system: Development and application of reagents / E.N. Esimbekova, **M.A. Kirillova**, V.A. Kratasyuk // Biosensors. – 2023. – V. 13. – N. 1. – P. 47.

3. **Kirillova M.A.** Role of Hsp90 and ATP in modulating apyrase activity and firefly luciferase kinetics / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 131. – P. 691–696.

4. **Kirillova M.A.** Bioluminescent system of luminous bacteria for detection of microbial contamination / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, R. Ranjan, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2018. – V. 11. – N. 2. – P. 174–180.

5. Ranjan R. Agglomeration behavior of lipid capped gold nanoparticles / R. Ranjan, **M.A. Kirillova**, E.N. Esimbekova, S.M. Zharkov, V.A. Kratasyuk // Journal of Nanoparticle Research. – 2018. – N. 20. – P. 107–118.

6. Ranjan R. Metal-enhanced luminescence: Current trend and future perspectives / R. Ranjan, E.N. Esimbekova, **M.A. Kirillova**, V.A. Kratasyuk // Analytica Chimica Acta. – 2017. – V. 971. – P. 1–13.

Патент

Патент РФ № 2654672C1, «Набор реагентов для количественного определения аденозин-5'-трифосфата» дата регистрации 21.05.2018. Авторы **Кириллова М.А.**, Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А. Патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский федеральный университет". Заявка на патент РФ № 2017121916, дата приоритета 21.06.2017.

Тезисы в сборниках материалов конференций

1. **Кириллова М.А.** Кинетика люциферазы светляков в присутствии белка теплового шока 90 и апиразы / М.А. Кириллова, Р. Ранджан, В.А. Кратасюк // I региональное собрание РФО и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» Сборник тезисов. – Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2024. – С. 240–241.

2. **Кириллова М.А.** Роль белка теплового шока 90 в усилении люминесценции люциферазы светляков / М.А. Кириллова, Р. Ранджан, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России: в 2 томах – Краснодар: Полиграфическое объединение «Плехановец». – 2019. – Т. 2. – С. 105–106.

3. **Kirillova M.A.** Lipid protection of gold nanoparticles against agglomeration / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Материалы III международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни». – Красноярск: Сибирский федеральный университет. – 2018.

4. **Kirillova M.A.** Bioluminescence enhancement by interactions of FMN and ATP with gold nanoparticles / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Abstracts of 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. – Nantes, France. – 2018.

5. **Kirillova M.A.** Bioluminescence application to control microbial contamination / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Proceedings of the 9th International Conference Environmental Engineering and Management: Circular Economy and Environmental Sustainability: Conference Abstracts Book. – Bologna, Italy. – 2017. – P. 433–434.

6. **Кириллова М.А.** Фотофизические взаимодействия субстратов биолюминесцентных систем с наночастицами золота // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017». – Москва. – 2017.