

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Кириллова Мария Александровна

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

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Валентина Александровна Кратасюк

Красноярск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Описание объектов исследования	9
1.1.1 Билюминесцентная ферментная система светляков.....	9
1.1.2 Билюминесцентная система светящихся бактерий	13
1.2 Изменение характеристик биологических элементов биосенсоров.....	17
1.2.1 Влияние соотношения основных компонентов ферментных реакций на чувствительность билюминесцентного метода	19
1.2.2 Влияние стабилизирующих агентов на активность люцифераз	22
1.2.3 Применение металлических наночастиц для усиления люминесцентного сигнала	26
1.2.4 Обеспечение нативного состояния ферментов с помощью шаперонов...	30
1.2.5 Иммобилизация как способ стабилизации люцифераз.....	32
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1 Материалы	35
2.2 Подготовка стоковых растворов и рабочих стандартов	36
2.3 Синтез AuNP, покрытых цитратом	37
2.4 Синтез AuNP с липидной оболочкой.....	38
2.5 Размеры, форма и характеристики полученных AuNP	38
2.6 Синтез AuNP, покрытых оболочкой АТР.....	39
2.7 Агрегация AuNP в присутствии хлорида натрия.....	39
2.8 Взаимодействие апиразы с AuNP-АТР	40
2.9 Агрегация AuNP-АТР в присутствии NaBH ₄	40
2.10 Кинетики билюминесцентной реакции в присутствии AuNP-АТР.....	40
2.11 Люминесцентная реакция люцифераз в присутствии AuNP.....	41
2.12 Температурная зависимость активности Hsp90.....	41
2.13 Инкубирование Hsp90 с АТР	42
2.14 Активность FLuc в присутствии Hsp90 и АТР	42
2.15 Зависимость АТР-азной активности апиразы от температуры.....	43
2.16 Взаимодействие Hsp90 и апиразы.....	43
2.17 Иммобилизация FLuc и D-люциферина	43

2.18 Модельный микробный образец.....	45
ГЛАВА 3 СПОСОБЫ УПРАВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ.....	46
3.1 Поиск оптимальных концентраций основных компонентов ферментных реакций, обеспечивающих низкий предел обнаружения субстратов.....	46
3.2 Использование стабилизирующих добавок для увеличения чувствительности ферментной системы светляков.....	52
3.3 Применение наночастиц золота для усиления люминесцентного сигнала ...	54
3.3.1 Наночастицы золота с цитратной оболочкой	54
3.3.1.1 Исследование агрегации AuNP и AuNP-L	59
3.3.1.2 Взаимодействие ферментов биолюминесцентных систем с наночастицами золота	67
3.3.2 Наночастицы золота, покрытые оболочкой АТР (AuNP-АТР)	69
3.4 Белки теплового шока как стабилизаторы люциферазы светляков	75
3.4.1 Зависимость активности Hsp90 от температуры	76
3.4.2 Анализ рефолдинга люциферазы	77
3.4.3 Зависимость АТРазной активности апиразы от температуры. Взаимодействие Hsp90 и апиразы.....	79
ГЛАВА 4 СОЗДАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АТР.....	82
4.1 Иммобилизация люциферазы светляков	82
4.1.1 Активность иммобилизованной люциферазы светляков в присутствии стабилизирующих добавок	83
4.1.2 Применение биолюминесцентных ферментных систем для анализа микробного загрязнения.....	85
4.1.3 Иммобилизация D-люциферина.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	94
БЛАГОДАРНОСТИ	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	99

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Современный этап развития биосенсорики характеризуется стремительными темпами появления новых биосенсоров широкого профиля действий. Среди большого разнообразия биосенсоров важную нишу занимают ферментативные биосенсоры [1], в состав биоэлемента которых входят ферменты светящихся организмов – люциферазы [2].

Люциферин-люциферазная система светляков [3,4] активно используется для контроля чистоты различных поверхностей, воздуха, воды, качества пищевых продуктов и др. [3,5–8]. При этом анализ основывается 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 флавиномононуклеотид (FMN) или никотинамидадениндинуклеотид (NADH) [9–13].

Основными характеристиками билюминесцентных 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 билюминесцентных 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 том, какие способы усиления интенсивности свечения подходят для разных билюминесцентных 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 компонентный состав 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 (АТФ, 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 АТФ. 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 биолюминесценции 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 АТФ.

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 биолюминесценции и хемилюминесценции (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, 1 патент и 6 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав с результатами работы и заключения. Полный объем диссертации 121 страница текста с 50 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 196 наименований.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Ферментными биосенсорами называют аналитические устройства, которые содержат ферменты в качестве биораспознающего элемента, или, другими словами, биоэлемента, тесно связанного с физическим преобразователем. При этом получаемый электронный или оптический сигнал пропорционален концентрации аналита, присутствующего в образце [1]. Биолюминесцентные ферментные биосенсоры содержат в качестве биоэлемента ферменты светящихся организмов, что дает им определенные преимущества, главное из которых заключается в простоте детектирования светового сигнала, испускаемого в ходе биолюминесцентной реакции, а отсутствие источников возбуждения предотвращает появление каких-либо неспецифических сигналов, что позволяет достигнуть очень низкого предела обнаружения аналита [14].

В настоящей работе исследовали способы усиления светового сигнала биолюминесцентных систем с целью повышения чувствительности метода с возможностью применения полученных результатов в биосенсорах. В качестве объектов исследования были выбраны люциферин-люциферазная система светляков и биолюминесцентная ферментная система светящихся бактерий, включающая в себя люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу, сопряженных реакцией восстановления FMN.

1.1 Описание объектов исследования

1.1.1 Биолюминесцентная ферментная система светляков

Люцифераза светляков (FLuc) относится к классу монооксигеназ [15] и катализирует окисление субстрата люциферина (LH_2), в присутствии АТФ и катиона металла. Люцифераза светляков состоит из двух доменов - N-терминального домена и С-терминального домена меньшего размера, соединенных гибким пептидным линкером [15], таким образом, что образуется щель между двумя доменами (рисунок 1). В ходе реакции два домена сходятся

вместе, принимая закрытую форму и образуя гидрофобный карман вокруг активного центра.

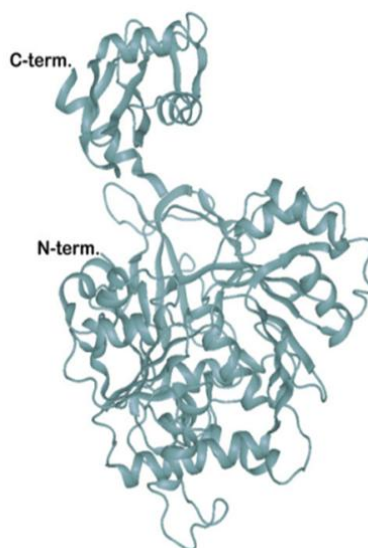


Рисунок 1 – Люцифераза *Photinus pyralis* [16]

Основным субстратом FLuc является D-люциферин, состоящий из двух частей – бензотиазольной и тиазол карбоновой кислоты (рисунок 2) [17].

Спектр излучения FLuc лежит в желто-зеленой области (550–570 нм), с максимумом на 562 нм при pH 7,5–7,8 [18].

Реакция, катализируемая FLuc, проходит в две стадии:

- (1) люциферин + АТФ → люцифериладенилат + РРi,
- (2) люцифериладенилат + O₂ → оксилуцеферин + АМР + СО₂ + свет,

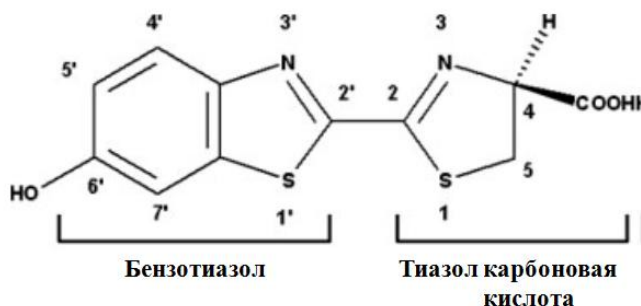


Рисунок 2 – Химическая структура люциферина светляков [18]

Первая стадия реакции (1) проходит в присутствии ионов Mg^{2+} . Потребность в двухвалентных катионах объясняется образованием комплекса Mg^{2+} -АТР, который частично защищает отрицательные заряды и влияет на конформацию фосфатных групп, что облегчает присоединение субстрата к активному центру фермента. На второй стадии - стадии оксигенации (2) - происходит образование возбужденного оксилуциферина, аденозин монофосфата (АМР) и диоксида углерода (CO_2). Испускание света происходит при переходе возбужденного состояния оксилуциферина в основное состояние [18].

Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светлячков, изображен на рисунке 3. Более подробно первая стадия реакции - реакция аденилирования люциферина, представлена на рисунке 4. На этом этапе происходит отщепление неорганического пирофосфата (PPi) от молекулы АТР, что приводит к формированию интермедиата D-люцифериладенилата (D-LH₂-AMP).

На второй стадии люминесцентной реакции (рисунок 3) происходит формирование интермедиата – диоксетана [19]. При этом атомы кислорода встраиваются в оксилуциферин и молекулу CO_2 . Распад диоксетана приводит к испусканию света возбужденным состоянием оксилуциферина благодаря механизму химически инициированной электронно-обменной люминесценции [15].

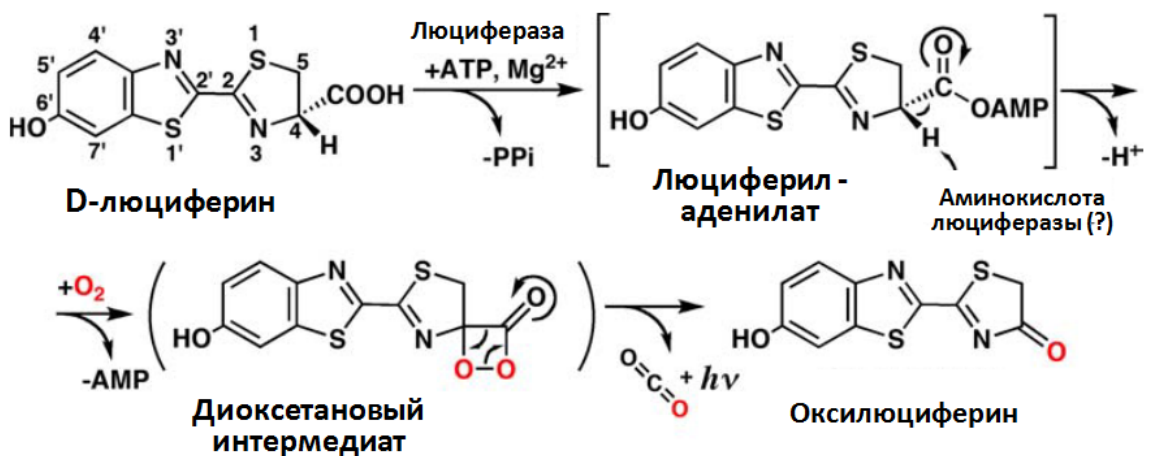


Рисунок 3 – Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светлячков [15]

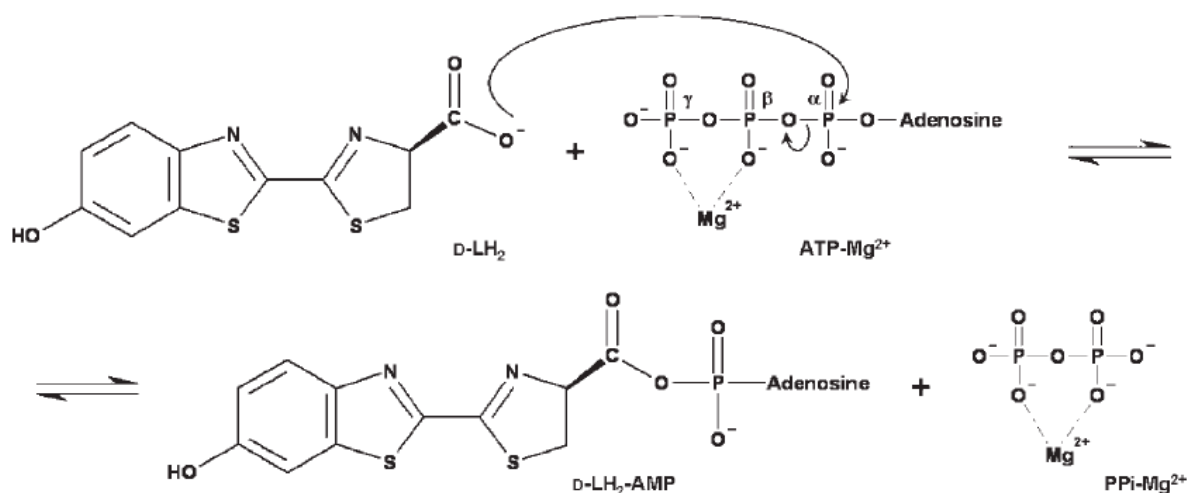


Рисунок 4 – Химический механизм аденилирования D-люциферина [18]

Люциферазная реакция является нестационарным ферментативным процессом, при котором оборот фермента мал из-за медленной диссоциации комплекса фермент-продукт и соизмеримой по скорости инактивации фермента и его комплексов с субстратами и продуктом [20]. Квантовый выход реакции составляет приблизительно 40% и может меняться при разном pH [21,22].

Интенсивность биолюминесценции, возникающей в люциферин - люциферазной системе светляков в присутствии АТФ, пропорциональна концентрации АТФ в широком диапазоне [15,23], что позволяет использовать люциферин-люциферазную систему светляков для обнаружения ультра-малых количеств АТФ в различных объектах. Чувствительность биолюминесцентного метода с использованием люциферазы светляков достигает 10^{-18} М АТФ [24], что эквивалентно содержанию АТФ в одиночных клетках. По этой причине данный метод широко применяется для анализа микробиологических загрязнений воды, воздуха, пищевых продуктов, для оценки степени чистоты различных поверхностей [25,26]. В настоящее время разработан целый ряд методов биолюминесцентного анализа с использованием люциферазы светляков, в том числе метод изучения антимикробной активности медицинских препаратов [27,28], метод обнаружения пестицидов [29,30].

Для определения некоторых клеточных метаболитов люцифераза светляков может быть сопряжена в ферментативный каскад с другими ферментами, такими как, например, пируватотрифосфаткиназа [31], аденилаткиназа [32] или ацетаткиназа [33].

In vivo люцифераза светляков активно используется в качестве репортерного гена для наблюдения за выживаемостью и ростом клеток, например трансплантированных стволовых или раковых клеток [34]. Включение люциферазных репортеров в патогены, такие как бактерии, вирусы и паразиты, позволяет обнаружить инфекцию или ответ на терапию *in vivo* [34].

Очень распространены биосенсоры, содержащие как рекомбинантные бактериальные клетки с репортерным геном люциферазы светляков [35–37], так и биосенсоры, содержащие иммобилизованную люциферазу светляков [38,39].

1.1.2 Билюминесцентная система светящихся бактерий

Билюминесценция светящихся бактерий осуществляется в результате ферментативного окисления восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH_2) и длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) с помощью люциферазы (BLuc).

Несмотря на незначительные различия в структуре люцифераз различных видов бактерий, все они представляют собой $\alpha\beta$ -гетеродимер, при этом субъединицы α и β являются гомологичными, с молекулярной массой 40 и 35 кДа соответственно (рисунок 5). α - и β -субъединицы похожи и имеют форму скрученного бочонка ($[\beta/\alpha]_8$) [40,41]. Две субъединицы соприкасаются достаточно большой поверхностью, при этом активный центр фермента расположен, в большей степени, на α -субъединице, β -субъединица участвует во взаимодействии субстратов с люциферазой и существенна для стабилизации интермедиатов реакции [40,42].

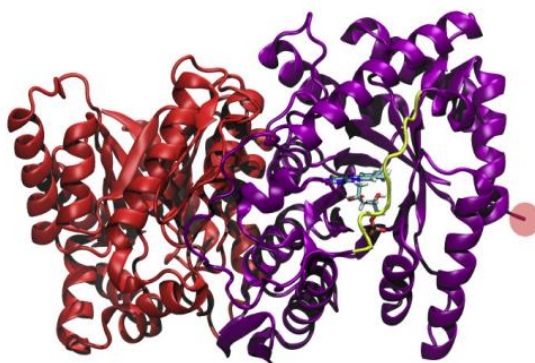


Рисунок 5 – Структура бактериальной люциферазы [42]: α -субъединица люциферазы обозначена фиолетовым, β -субъединица красным цветом; зеленым цветом изображена молекула флавина в активном центре фермента

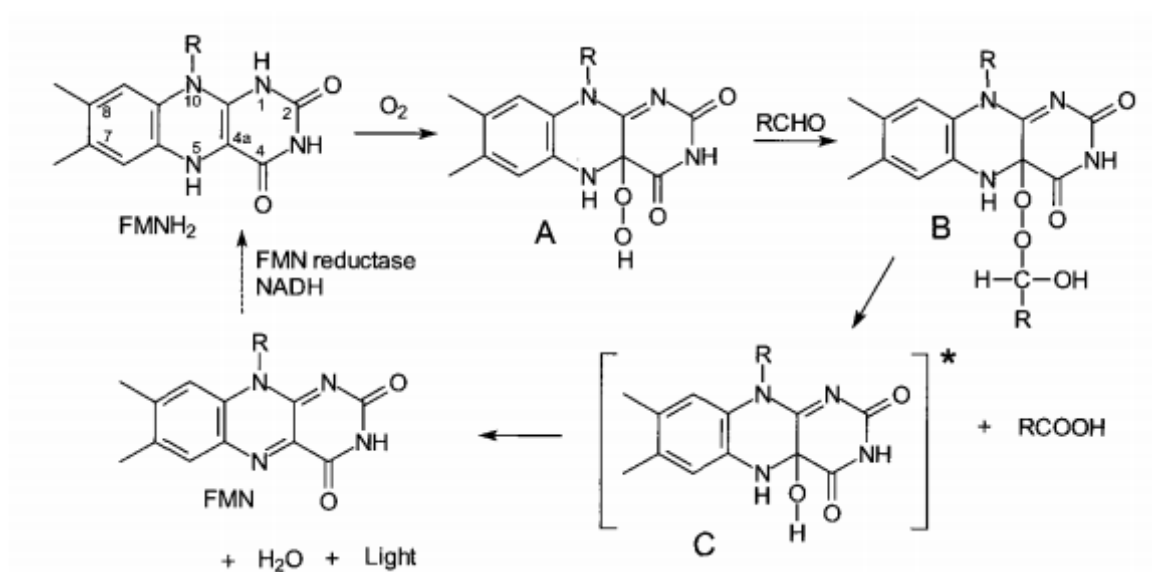


Рисунок 6 – Механизм биOLUMиНесцентной реакции бактерий [43]

На рисунке 6 представлен механизм биOLUMиНесцентной реакции, катализируемой VLuc [43]. На первом этапе реакции после связывания VLuc с восстановленным флавиномононуклеотидом (FMNH_2) под действием молекулы кислорода происходит образование пероксифлавина (интермедиат А). Пероксифлавин взаимодействует с длинноцепочечным альдегидом, образуя интермедиат В. На следующем этапе происходит окисление альдегида до жирной

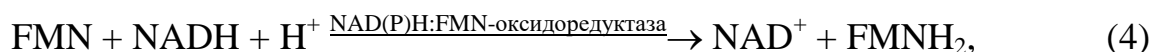
кислоты с одновременным образованием возбуждённого гидроксифлавина (интермедиат С), при переходе которого в основное состояние образуется FMN и вода, и происходит испускание света. Все три переходные формы (интермедиаты) связаны с BLuc [44,45]. Обобщённая схема данной реакции имеет следующий вид:



где FMN и FMNH₂ – флавинмоноклеотид в окисленной и восстановленной форме соответственно, RCHO и RCOOH длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая карбоновая кислота.

Максимальное излучение света BLuc наблюдается на длине волны 490 нм при pH 7,0 [42,46]. Квантовый выход реакции составляет приблизительно 10% [46].

Для эффективной работы люциферазы необходимо присутствие других ферментных систем, обеспечивающих образование субстратов реакции. Так образование альдегида в клетках бактерий происходит в результате работы ферментного комплекса восстановления жирных кислот, включающий трансферазы, синтетазы и редуктазы [47]. FMNH₂ образуется в результате ферментативного восстановления FMN, катализируемого NAD(P)H-зависимой оксидоредуктазой [48]:



где NADH и NAD⁺ - восстановленная и окисленная формы никотинамидадениндинуклеотида.

NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза является флавопротеином, состоящим из двух одинаковых субъединиц, которые формируют два активных центра, расположенных симметрично в области межсубъединичного интерфейса (рисунок

7) [49]. Фермент катализирует реакцию восстановления FMN, путем переноса электронов с донора NADH или NADPH.

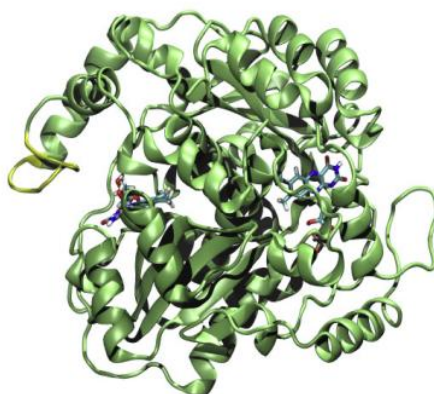


Рисунок 7 – Структура NADH:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio fischeri* [42]

Биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза (Red + VLuc) используется для разработки методов анализа различных метаболитов и активности ферментов [50]. VLuc высоко специфична по отношению к субстратам FMNH₂ и альдегиду, что позволяет проводить избирательный биолюминесцентный анализ данных веществ.

Использование многозвенных цепей сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой позволило значительно расширить круг веществ, анализируемых биолюминесцентным методом, а также включить в него соединения, не принимающие непосредственного участия в реакции светоизлучения. Так, например, биферментная система Red + VLuc позволяет анализировать не только субстраты люциферазы, но и субстрат NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы – NADH. Биферментная система может быть сопряжена с другими ферментами, такими как лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа и др., образуя трехферментные системы для расширения круга определяемых метаболитов. Такие методы избирательного биолюминесцентного анализа активно применяются в медицине [51].

Помимо этого, ферментные системы светящихся бактерий используют для определения интегральной токсичности различных сред [52]. Оценку токсических свойств анализируемых веществ оценивают по их влиянию на параметры

биоломинесценции. При этом также могут использоваться сопряженные ферментные системы. На данный момент создан комплекс ферментативных тестов, чувствительных к различным группам поллютантов, который включает сопряженные системы, такие как алкогольдегидрогеназа – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза, лактатдегидрогеназа – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза и трипсин – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза, применяющиеся для мониторинга природных и лабораторных водных экосистем [53,54], а также анализа токсичности ряда пестицидов [55–58]. Помимо этого биоломинесцентные ферментные системы используют для мониторинга загрязнения воздуха [59], радиационной токсичности, оценки загрязнения почв [60], для решения спектра аналитических задач в медицине, анализа стресса в растениях по содержанию пиридиновых нуклеотидов [61], а также являются весьма перспективными для анализа качества пищевых продуктов [62].

Несмотря на обширное применение биоломинесцентных ферментных систем, при создании биоломинесцентных сенсоров исследователи сталкиваются с рядом ограничений, связанных главным образом с низкой стабильностью и/или чувствительностью реагентов. Для того, чтобы успешно использовать люциферазные системы в качестве биоэлементов биосенсоров особое внимание стоит уделять способам изменения данных характеристик ферментных систем.

1.2 Изменение характеристик биологических элементов биосенсоров

Предел обнаружения аналитов с помощью биоломинесцентных биосенсоров может быть лимитирован низкой активностью ферментов, включенных в биоэлемент, и/или действием внешних факторов. Для достижения хорошей чувствительности и возможности определять низкие концентрации исследуемого вещества необходимо иметь высокий сигнал люминесценции люциферазной системы.

Согласно ранее представленной в литературе схеме (рисунок 8), включающей шесть этапов подготовки проведения анализа с использованием биолюминесцентного биосенсора [62], чувствительность ферментного сенсора зависит от целого ряда параметров. Так изменение соотношения ферментов и субстратов, выбор буферной смеси и стабилизирующих агентов, выбор носителя для биологического элемента и температурного режима его приготовления играют важную роль в создании биосенсора. В качестве основных способов, позволяющих направленно изменять характеристики биосенсоров, могут быть рассмотрены: изменение компонентного состава биоэлемента, добавление стабилизирующих агентов, защищающих структуру ферментов или усиление биолюминесцентного сигнала посредством взаимодействия с металлическими наночастицами, а также повышение стабильности биологического элемента за счет взаимодействия с шаперонами или путем иммобилизации ферментов. При этом следует отметить, что при разных условиях один и тот же способ может привести как к улучшению, так и ухудшению характеристик биосенсора.

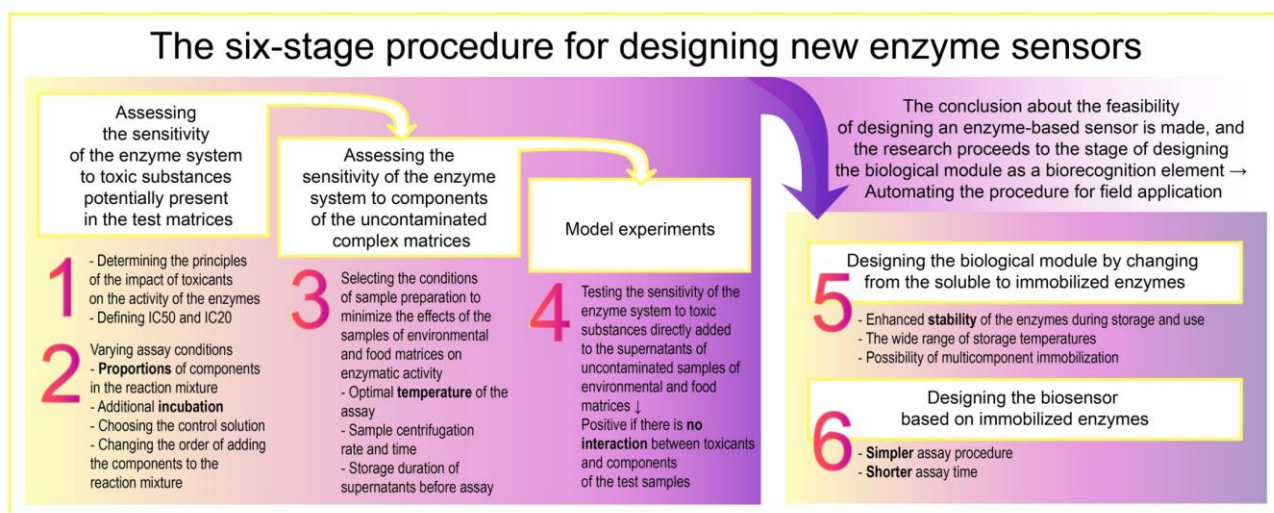


Рисунок 8 – Шесть этапов проектирования новых ферментных сенсоров [62]

1.2.1 Влияние соотношения основных компонентов ферментных реакций на чувствительность биолюминесцентного метода

Наиболее важной характеристикой любого ферментного биосенсора является чувствительность к аналиту. Чувствительность биолюминесцентного биосенсора определяется исходя из количественной зависимости значений интенсивности испускаемого света от концентраций исследуемого аналита. Также важной характеристикой биосенсора является диапазон концентраций аналита, при котором наблюдается линейный отклик биосенсора. Эта характеристика указывает на верхний и нижний предел обнаружения, т.е. максимальную и минимальную обнаруживаемую концентрацию аналита [63].

Известно, что скорость ферментативной реакции зависит как от количества фермента, так и от концентрации субстратов [64]. Поэтому наиболее простым и быстрым способом варьирования чувствительности ферментных биосенсоров является изменение соотношения ферментов и субстратов в реакционной смеси. При этом процедура подбора оптимальной реакционной смеси проводится отдельно для каждого определяемого аналита, а первостепенной задачей становится поиск наиболее значимых компонентов реакционной смеси, определяющих чувствительность ферментной системы к аналиту.

Существенно упростить решаемую задачу может понимание кинетических особенностей ферментативной реакции и знание основных кинетических параметров. Так, чувствительность ферментов к ингибиторам увеличивается при уменьшении количества фермента и снижении концентрации субстратов ниже константы Михаэлиса (K_m). Ранее было показано, что чувствительность сопряженной ферментной системы Red + BLuc к некоторым тяжелым металлам увеличивается при снижении содержания ферментов в реакционной смеси [62,65]. В работе [52] на примере модельных токсикантов сульфата меди и бензохинона было показано, что чувствительность ферментной системы Red + BLuc зависит не только от количества ферментов, но и концентрации одного из субстратов – NADH. Максимальная чувствительность к действию ингибиторов достигалась

при минимальных количествах ферментов и NADH. Кроме того, активность ферментной системы Red + BLuc зависела от выбора алифатического альдегида (деканаль или тетрадеканаль), являющегося субстратом BLuc [62].

Таким образом, максимальная чувствительность ферментативной системы Red + BLuc к действию ингибиторов достигается значительным уменьшением количества ферментов в реакционной смеси, а также при отсутствии насыщения фермента субстратом. В то же время, при использовании ферментной системы Red + BLuc для оценки содержания NADH в тканях растений для достижения максимальной чувствительности метода количество ферментов в реакционной смеси должно быть многократно выше [61].

При разработке метода количественного анализа АТФ с помощью люциферин-люциферазной системы светляков также важно первоначально определить оптимальное соотношение фермента люциферазы (FLuc) и субстрата D-люциферина в реакционной смеси. Так, в работе [66] отмечается, что именно соотношение концентраций FLuc и D-люциферина влияет на интенсивность светового излучения и определяет нижний предел обнаружения АТФ. При низких концентрациях люциферазы АТФ расходуется медленно, в результате наблюдается равномерный световой сигнал, что является удобным для непрерывного мониторинга реакций образования или гидролиза АТФ. При высоких концентрациях люциферазы происходит быстрое расходование АТФ, при этом наблюдается высокое начальное значение интенсивности свечения, которое быстро уменьшается по мере расходования АТФ. При таких условиях достигается высокая чувствительность метода и, соответственно, низкий предел обнаружения АТФ [67].

Еще более сложной задачей является оптимизация условий проведения анализа с использованием мультиферментных систем. Действительно, в этом случае 1) увеличиваются финансовые затраты (в связи с высокой стоимостью реагентов); 2) требуется внесение большого количества компонентов при условии сохранения небольшого объема реакционной смеси; 3) необходима оптимизация состава по нескольким сопряженным ферментным реакциям. Так, в работе [18]

проведена оптимизация условий анализа оксида азота с использованием мультиферментной системы, включающей глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, фосфоглицерат киназу и бактериальную люциферазу. В работе [68] оптимизировано соотношение компонентов трехферментной системы лактатдегидрогеназа – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза – бактериальная люцифераза, применяемой для количественного определения лактата.

Оптимизировать условия проведения анализа, включая компонентный состав реакционной смеси, можно путем варьирования таких факторов среды как, например, pH, ионная сила раствора, концентрация кофакторов, стабилизаторов и активаторов, а также изменение температурного режима. Например, FLuc весьма чувствительна к ионной силе раствора [69,70], что следует учитывать при выборе буферной среды. Концентрация кофактора (иона магния) должна быть выше концентрации АТР и хелаторов, таких как ЭДТА, в то же время использование высоких концентраций соли магния способствуют повышению ионной силы раствора, что приводит к инактивации FLuc [67,71,72].

При выборе коммерческого препарата фермента FLuc следует уделить внимание степени его очистки, поскольку может наблюдаться фоновое свечение в отсутствие субстрата АТР из-за примесей АТР в препарате. Отношение интенсивности свечения в присутствии АТР к интенсивности фонового свечения системы без добавления АТР является важной характеристикой препарата [73].

Таким образом, при разработке ферментных биосенсоров одним из первых этапов является выбор состава реакционной смеси путем количественного варьирования соотношений количеств обязательных компонентов ферментной реакции. Выбранные концентрации компонентов реакционной смеси будут различаться в зависимости от поставленной задачи, будь то определение аналита, являющегося субстратом реакции или выявление ингибитора фермента. Ранее такой способ повышения чувствительности уже был описан и для других сенсоров [74], и он отлично работает для ферментных биосенсоров.

1.2.2 Влияние стабилизирующих агентов на активность люцифераз

Одним из ограничений, препятствующих широкому применению биолюминесцентных ферментных систем, является нестабильность люцифераз к действию физических и химических факторов среды.

Как и другие ферменты люциферазы теряют активность вплоть до инактивации в присутствии конкурентных и неконкурентных ингибиторов. Для FLuc конкурентными ингибиторами являются молекулы, содержащие бензотиазол, бензоксазол или бензимидазол. В качестве ингибиторов выступают также соединения, которые не имеют схожей с D-люциферинем структуры, но содержат хинолиновую или диариловую группы [75]. Кроме того, ингибировать активность FLuc могут продукты реакции, например оксилуциферин, аденозин-5'-монофосфат и пирофосфат [76], или примеси в препарате D-люциферина, такие как L-люциферин и дегидролюциферин [8,77]. Для VLuc ингибиторами являются вещества, конкурирующие с флавином или альдегидом, например 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилвалерат, 2,3-дихлор-(6-фенилфенокси)этиламин, паргилин или производные N-фенацилтиазольных солей [78,79]. Ингибитором может быть и альдегид, являющийся субстратом VLuc, если он присутствует в избытке [80–82].

Помимо устойчивости к химической инактивации люциферазы, для целей практического применения весьма важна такая характеристика, как термостабильность фермента. Для сохранения активности люцифераз в условиях повышенных температур применяют осмолиты, к которым относятся полиолы (этиленгликоль, глицерол, сорбитол), сахара (сахароза, трегалоза), аминокислоты и их производные (глицин, таурин, пролин, бетаин) и метиламины (ТМАО, холин-О-сульфат, саркозин) (рисунок 9) [83,84]. Термодинамически действие осмолитов приводит к увеличению свободной энергии Гиббса развернутых состояний по отношению к энергии нативного состояния, что, в свою очередь, сдвигает равновесие, в сторону именно нативного состояния белка [85].

Для люцифераз из различных источников показан стабилизирующий эффект сахарозы. Так, в присутствии сахарозы наблюдали увеличение квантового выхода FLuc [86]. В работе [87] показано, что смесь сахарозы и трегалозы способствует повышению активности и термостабильности FLuc, смещает температурный оптимум фермента на 5°C и предотвращает его агрегирование. В другой работе доказано, что сахароза, глицин и DMSO защищают FLuc от протеолитического расщепления [88]. Увеличение стабильности FLuc в 2-5 раз наблюдалось в присутствии полиолов [89].

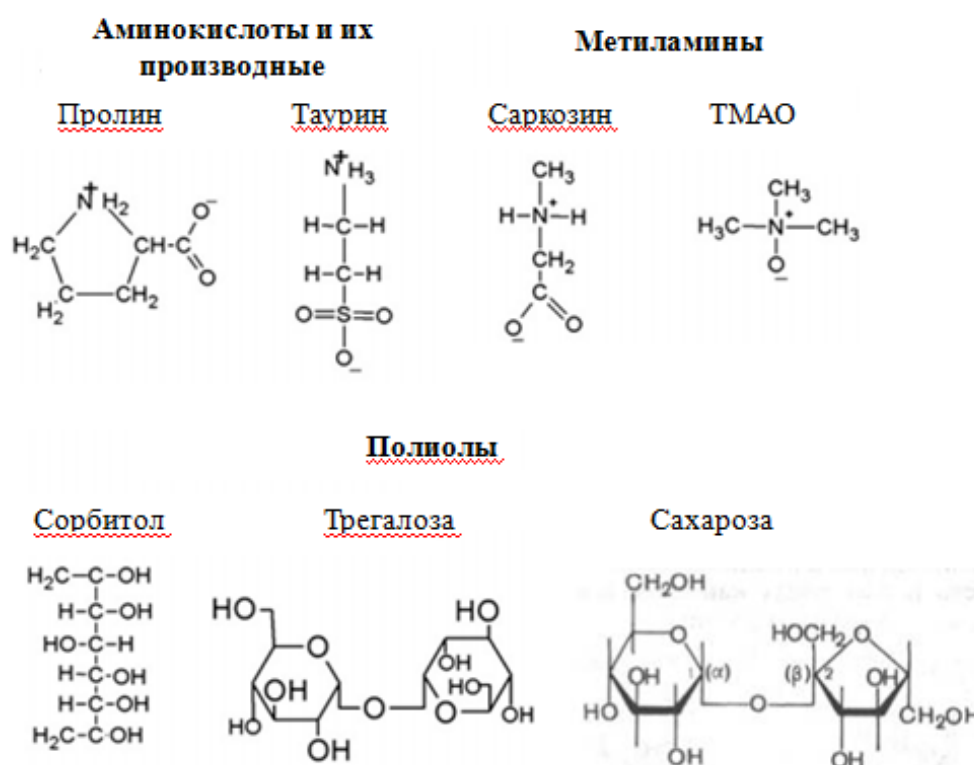


Рисунок 9 – Химические структуры представителей трех классов осмолитов: аминокислоты, метиламины, полиолы

Несмотря на большое количество данных, указывающих на наличие стабилизирующего эффекта осмолитов на ферменты, есть работы, в которых те же самые вещества оказывают, напротив, дестабилизирующее действие [90,91], так что в целом эффект является дозозависимым. Так, в присутствии 10% глицерина наблюдалось увеличение квантового выхода FLuc, однако повышение концентрации глицерина приводило к снижению люминесценции, что связано с

ухудшением динамики фермента за счет встраивания глицерина в активный центр FLuc [86]. В работе [73] добавление к FLuc сахарозы в концентрации 0,1- 0,4 М не оказывало никакого эффекта.

Другой класс стабилизирующих агентов применяется для защиты SH-групп ферментов. К таким стабилизаторам относятся дитиотреитол (ДТТ) и 2-меркаптоэтанол. Действие ДТТ заключается в полном восстановлении внутри- или межмолекулярных дисульфидных связей посредством реакции тиол-дисульфидного обмена и включает образование двух восстановленных тиолов на молекуле белка, при этом ДТТ превращается в стабильный циклический дисульфид (рисунок 10) [92,93]. Монотиольным аналогом ДТТ является 2-меркаптоэтанол.

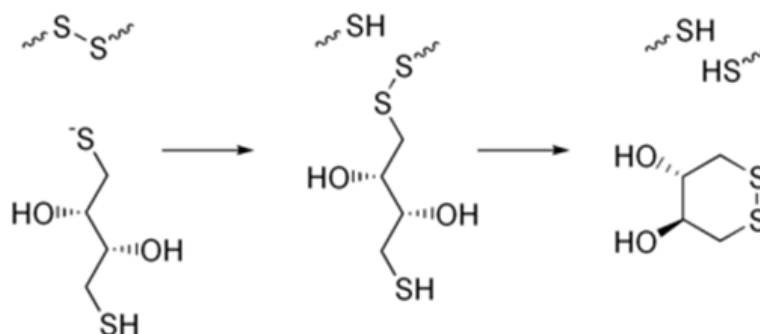


Рисунок 10 – Восстановление дисульфидных связей путем двух последовательных реакций тиол-дисульфидного обмена

Люциферазы разных видов организмов различаются по количеству остатков цистеинов, при этом на стабильность фермента в первую очередь влияет количество остатков цистеина, расположенных на поверхности белковой глобулы и подверженных окислению. Поэтому люциферазы с большим количеством остатков цистеина в структуре фермента являются менее стабильными. Люцифераза светляков *Photinus pyralis* содержит четыре SH-группы, одна из которых находится на поверхности белка; люцифераза *Luciola mingrelica*

содержит восемь SH-групп, из которых только три расположены на поверхности; а люциферазы ямайских шелкоунов семейства *Elateridae* содержат 13 SH-групп [94,95]. Люцифераза светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* содержит в своей структуре 14 остатков цистеина (10 на α субъединице и 4 на β субъединице), но только четыре из них выходят на поверхность белка. ДТТ и 2-меркаптоэтанол показали хорошую эффективность при стабилизации люциферазы светляков *Luciola mingrellica* [95] и биолюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий Red + VLuc [96].

Еще одним классом стабилизаторов являются альбумины, наиболее часто из которых используется бычий сывороточный альбумин (БСА) [97]. В лабораторной практике БСА используют в качестве стандарта для многих процедур, включая изготовление вакцин, антигенные тесты, иммунологические тесты ELISA и др., а также как стандарт молекулярного веса [98]. Было показано, что БСА помогает сохранить высокую активность FLuc *Luciola praeusta* в течение 90 дней [99], а VLuc, иммобилизованная совместно с БСА в крахмальный гель, сохраняет 90% активности после 6 месяцев хранения [96].

Более того, в присутствии БСА наблюдается нейтрализация ингибирующего действия VLuc большими концентрациями альдегида, что связано со способностью БСА связывать компоненты реакции (субстраты или продукты) [100]. Однако при использовании БСА необходимо понимать, что данный белок денатурирует при температуре выше 42°C и, таким образом, он не способен увеличивать термостабильность ферментов, что и было показано на примере люциферазы *Renilla* [101].

Таким образом, использование стабилизирующих добавок способствует сохранению активности и повышению стабильности люцифераз, что указывает на необходимость включения таких добавок в состав биологического элемента биолюминесцентных биосенсоров. Выбор стабилизаторов определяется индивидуально в каждом конкретном случае и зависит от структуры люциферазы, наличия дисульфидных связей и условий проведения анализа. Также следует учитывать дозозависимый характер действия большинства стабилизаторов.

1.2.3 Применение металлических наночастиц для усиления люминесцентного сигнала

Одним из способов усиления люминесцентного сигнала является взаимодействие люминесцентных систем с наноматериалами [102]. Явление усиления биолюминесценции посредством металлических частиц (МЭВ) наблюдается, когда падающий свет, взаимодействуя с поверхностными электронами в зоне проводимости металла на наночастицах, приводит к возникновению локализованного поверхностного плазмонного резонанса (LSPR) (рисунок 11) [103–105]. Поверхностные плазмоны представляют собой коллективные колебания электронов в зоне проводимости. При малых размерах частиц, когда длина волны света намного больше размера наночастицы, электромагнитное излучение заставляет свободные электроны в металле колебаться с той же частотой, тем самым вызывая резонанс [106]. Именно это усиленное локальное поле обеспечивает рост интенсивности биолюминесценции.

Ранее наблюдали усиление сигнала люциферазы светляков в присутствии наночастиц золота (AuNP) и серебра (AgNP) [107]. Наночастицы серебра и золота синтезировали с Тритон X-100 и бензалкония хлоридом (BAC) в качестве стабилизаторов, и использовали для экстракции АТФ из клеток молочнокислых бактерий. При этом сигнал люминесценции был в 100-200 раз выше, чем при отсутствии наночастиц. Также было показано, что в присутствии магнитных наночастиц, покрытых ионной жидкостью, повышается стабильность и активность люциферазы светляков [108]. Более того в работе [109] было показано усиление биолюминесцентного сигнала люциферазы светляков в присутствии AuNP. При этом важным условием усиления сигнала является перекрытие спектров поглощения наночастиц со спектрами испускания люциферазы для обеспечения переноса энергии с фермента на наночастицы [109].

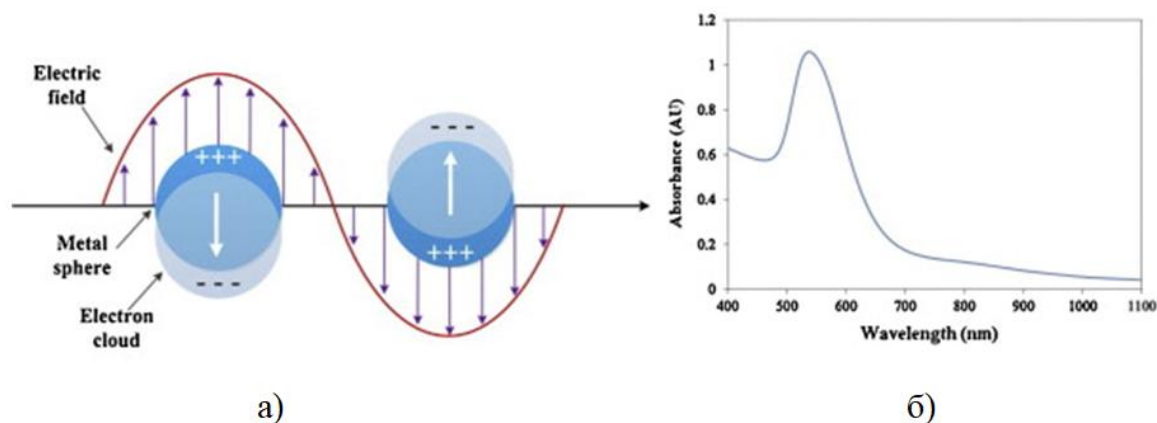


Рисунок 11 – а) Схема возбуждения локализованного поверхностного плазмонного резонанса сферических наночастиц [110], б) спектр поглощения локализованного поверхностного плазмонного резонанса сферических наночастиц [111]

LSPR сильно зависит от размера, формы и диэлектрических свойств наночастиц металлов, а также от природы локального окружения [111]. Важную роль играет баланс между радиационными и безызлучательными процессами передачи энергии между молекулой, испускающей свет, и наночастицей. На малых расстояниях (до 5 нм) может происходить безызлучательная передача энергии с молекулы на наночастицу, следствием чего является тушение светового излучения [112,113]. С увеличением расстояния электрическое поле все еще достаточно сильное, но наночастица не может напрямую взаимодействовать с электронами молекулы, вследствие чего наблюдается усиление светового сигнала [106]. Однако при дальнейшем увеличении расстояния между наночастицей и молекулой фермента происходит экспоненциальное ослабление электрического поля и затухание радиационной передачи [102]. Поэтому расстояние, на котором излучающая молекула (в частности люцифераза) находится относительно поверхности наночастицы, имеет важное значение для возникновения МЭВ. Размер наночастиц также очень важен, так, небольшие сферические AuNP (например, диаметром 13 нм) поглощают зеленый свет, который соответствует полосе поглощения (поверхностной плазмонной полосе) ~ 520 нм, поэтому

раствор AuNP выглядят красным. По мере увеличения размера AuNP, которое наблюдается при агрегации небольших AuNP, происходит расширение поверхностной плазмонной полосы и смещение ее в красноволновую область, что объясняет изменение цвета раствора наночастиц с красного на фиолетовый [114].

Одним из самых распространенных методов синтеза наночастиц золота является цитратный метод, который включает в себя восстановление тетрахлороаурата(III) водороода (HAuCl_4) цитратом натрия. При этом цитрат действует и как восстановитель, и как стабилизирующий агент. Размер частиц можно контролировать путем варьирования отношения HAuCl_4 и цитрата натрия. Так, при высокой концентрации цитрата происходит более быстрая стабилизация AuNP малых размеров, в то время как низкие концентрации цитрата способствуют образованию AuNP большего размера (рис 12).

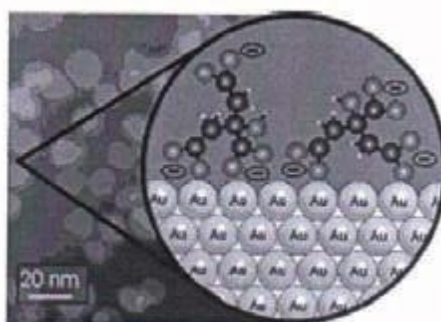


Рисунок 12 – Структура поверхности наночастицы золота [115]

Образование коллоидных частиц происходит в три стадии: нуклеация - образовании ядра, агрегация и покрытие поверхности [116–118]. Цитратная оболочка создает анионный экран вокруг восстановленного ядра Au (Au^0), тем самым сохраняя его целостность. Однако в присутствии солей, под влиянием ионов металлов, особенно Na^+ и Mg^{2+} , происходит повреждение равномерно распределенного слоя отрицательных зарядов на поверхности AuNP, что приводит к агрегации наночастиц.

В качестве стабилизирующего агента при синтезе наночастиц возможно использовать нуклеиновые кислоты, а также составные части нуклеиновых

кислот: нуклеозиды и нуклеотиды [119]. Химическая структура нуклеотидов предполагает, что они могут быть эффективными лигандами в процессах образования металлических наночастиц: нуклеиновые основания связываются с поверхностью металлических наночастиц благодаря взаимодействию между функциональными группами (аминной и карбонильной) в нуклеооснованиях и поверхностью металла. Отрицательно заряженная фосфатная группа стабилизирует наночастицы от агрегации во время фазы роста посредством электростатического отталкивания [120]. В результате взаимодействия образуются наночастицы, покрытые защитной оболочкой NTP (АТР, ГТР, СТР, ТТР) [119]. Также было показано, что при уменьшении числа фосфатных групп (АТР, АДФ, АМР, аденозин) увеличивается агрегация наночастиц [121].

Взаимодействие люциферазы с наночастицами не всегда способствует усилению люминесцентного сигнала, и во многих случаях может привести к его существенному снижению. Так, например, при связывании рекомбинантных люцифераз бразильских биолюминесцентных жуков *Pyrearinus termitilluminans* и *Phrixothrix hirtus* с наночастицами золота и магнитными гибридными частицами Au/F₃O₄, наблюдали значительное снижение люминесценции вследствие поглощения наночастицами испускаемого света [116]. Также потеря активности FLuc наблюдалась в присутствии графеновых квантовых точек. При взаимодействии люциферазы с графеновыми квантовыми точками происходили структурные изменения фермента, что приводило к изменениям кинетических параметров ферментативной реакции, повышению K_m для АТР и люциферина, а также снижению термостабильности [122]. Также, поглощение люминесценции наночастицами золота наблюдали при связывании мутантной люциферазы *Renilla reniformis* [123].

Таким образом, выбор наночастиц и особенности их характеристик, такие как происхождение, размер и форма, а также способы связывания наночастиц с люциферазой являются ключевыми факторами при использовании наночастиц в биораспознающих элементах с целью повышения чувствительности биолюминесцентных биосенсоров.

1.2.4 Обеспечение нативного состояния ферментов с помощью шаперонов

Молекулярные шапероны – это белки, которые помогают сворачиванию других белков [124]. Наиболее известными членами этого семейства являются АТР-зависимые молекулярные шапероны Hsp70 и Hsp90 (белок теплового шока 70 и белок теплового шока 90) [125].

Hsp90 взаимодействует с широким кругом клиентских белков, участвующими почти во всех физиологических процессах: передачи сигналов, в клеточном цикле и регуляции транскрипции. Hsp90 обеспечивает правильное сворачивание, активацию, транспортировку и даже деградацию клиентских белков [126–128]. Структурно мономер Hsp90 состоит из трех доменов: N-концевой домен, отвечающий за связывание и гидролиз АТР; средний домен (М-домен), который важен для связывания клиентских белков и γ -фосфата АТР; и карбокси-концевой домен (С-домен), который важен для димеризации Hsp90 (рисунок 13) [124,129]. Hsp90 взаимодействует более чем с 20 ко-шаперонами, которые определяют скорость гидролиза АТР, отвечают за связывание клиентских белков, стабилизируют определенные конформационные состояния [125,127]. Это универсальный многофункциональный белок в живой системе, который сверхэкспрессируется в стрессовых условиях, например при реакции теплового шока, в раковых клетках, при нейродегенеративных заболеваниях и вирусных инфекциях [130,131].

Сворачивание белков за счет шаперонной системы Hsp70 (в клетках прокариотов DnaK) происходит совместно с другими белками, такими как J-белок и факторы нуклеотидного обмена (у прокариотов DnaJ и GrpE соответственно). Путем распознавания коротких гидрофобных участков на частично денатурированных белках система Hsp70 предотвращает агрегацию белков и увеличивает количество правильно свернутых белков [125].

Ранее было показано, что в условиях тепловой обработки FLuc *Photinus pyralis* до 34°C система шаперонов DnaK/DnaJ/GrpE в присутствии АТР хорошо поддерживает активность люциферазы и предотвращает неправильное

сворачивание и агрегирование фермента. Однако в отсутствие АТФ система шаперонов теряет свою эффективность [132]. В работе [133] авторы показали, что система из трех белков DnaK/DnaJ/GrpE ускоряет сворачивание FLuc *in vitro* примерно в 20 раз по сравнению со скоростью спонтанного сворачивания. Было показано, что скорость спонтанного сворачивания FLuc *Photinus pyralis* замедляется из-за неправильного сворачивания белка в области между доменами. Связывание люциферазы с комплексом DnaK/GrpE позволяет ферменту быстро свернуться в нативное состояние [133].

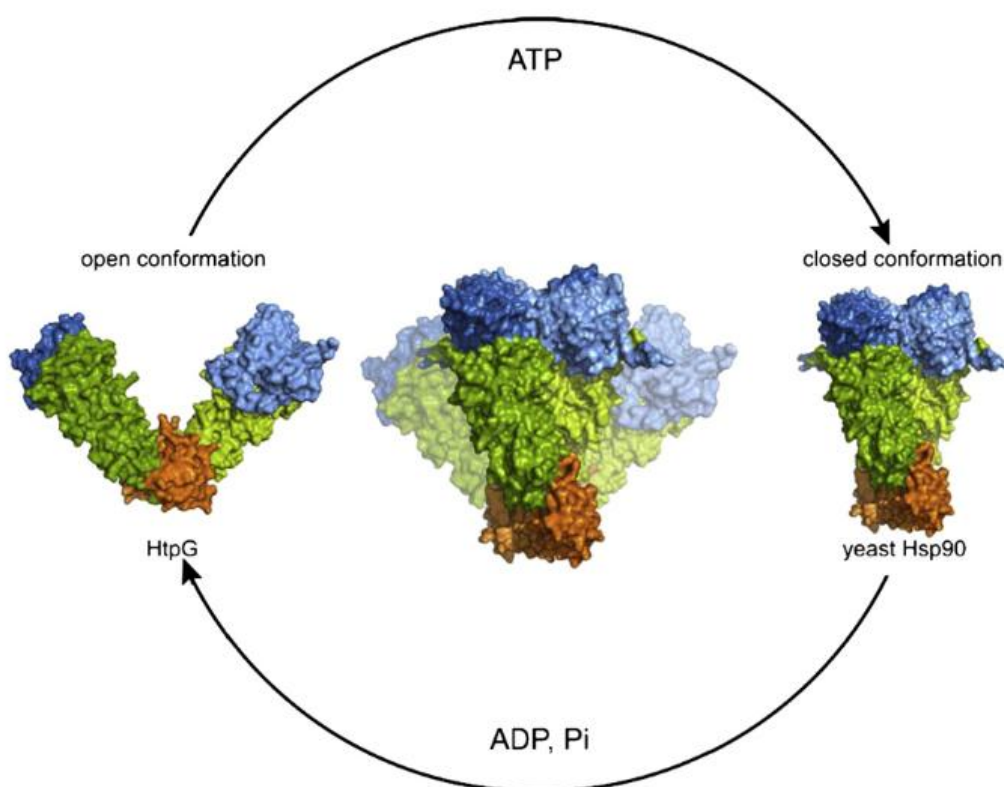


Рисунок 13 – Структура Hsp90 из *E. coli* (HtpG) в открытой конформации (слева, PDB 2IOQ) и структура связанного с нуклеотидом Hsp90 дрожжей в закрытой конформации (справа, PDB 2CG9). N-домен изображен синим цветом, M-домен – зеленым, а C-домен – оранжевым [126]

Белок теплового шока с низкой молекулярной массой AgsA является АТФ независимым, и был использован для стабилизации люцифераз *Renilla reniformis* и *Photinus pyralis in vitro*. Результаты показали, что AgsA оказывает

стабилизирующее действие на обе люциферазы, преимущественно в присутствии ДТТ [101].

Присутствие белков теплового шока в биолюминесцентных сенсорных системах помогает сохранить работоспособность люциферазы в условиях повышенной температуры. Однако следует отметить, что белки теплового шока работают в системе с ко-шаперонами, что вносит свои трудности в применении таких систем, а именно создание условий для работы всех белков и условий хранения препаратов, а также увеличивает их стоимость.

Помимо этого, наличие большого количества дополнительных белковых молекул в биоэлементе биосенсора могут оказывать влияние на работу самого сенсора, хотя с другой стороны дополнительные белковые молекулы могут выступать стабилизаторами наравне с БСА. Поэтому при возможности использования шаперонов для стабилизации люциферазных систем необходимо рассчитать преимущества метода по отношению к затратам.

1.2.5 Иммобилизация как способ стабилизации люцифераз

Помимо описанных выше способов улучшения характеристик биолюминесцентных ферментных биоэлементов существуют другие подходы, позволяющие повысить стабильность используемых ферментов с сохранением их активности. Самым распространённым из них является иммобилизация ферментов в разного рода носители.

Иммобилизацию ферментов проводят с целью обеспечения их стабильности при хранении и использовании в различных условиях. Действительно, изменяя микроокружение ферментов можно направленно менять их характеристики, обеспечивая их устойчивость к изменению температуры, pH, ионной силы раствора и т.д.

Для иммобилизации люцифераз используют различные носители, такие как полисахариды [134,135], нейлоновые трубки [136,137], алкилзамещенная сефароза 4В [138,139], мембраны из нановолокна поли(винилового спирт-

коэтилена) (PVA-coPE) [140] и др. Хорошо себя зарекомендовали носители белковой природы, такие как альбуминовый [139,141] или желатиновый [135,142–145] гели.

Наиболее простым способом иммобилизации ферментов является включение его в полимерные гели. Причем такой способ иммобилизации позволяет соединить несколько ферментов и субстратов в одном реагенте, создавая многокомпонентный комплекс. Например, был разработан многокомпонентный ферментный реагент, включающий совместно иммобилизованные в крахмальный гель ферменты FLuc и Red, а также их субстраты тетрадеканаль и восстановленный никотинамиддинуклеотид (NADH) [146]. Основным недостатком использования полимерных гелей в качестве матрицы для иммобилизации заключается в возможности появления диффузионных ограничений. Если скорость диффузии субстрата в полимерной матрице ниже скорости потребления субстрата ферментом, можно ожидать снижение каталитической эффективности иммобилизованного фермента [147].

При иммобилизации люциферазы ковалентным способом или путем адсорбции на носитель происходят конформационные изменения фермента, которые могут приводить к ухудшению связывания с субстратами и тем самым изменению кинетики реакции и повышению K_m . Однако, несмотря на это в некоторых случаях наблюдается повышенная термостабильность FLuc [148,149].

В последние годы интерес представляют металлоорганические каркасы, которые используют для ковалентного или нековалентного связывания с FLuc [148]. Недавно был представлен бумажный портативный биосенсор, основанный на FLuc, иммобилизованной на металлоорганическом каркасе [150]. Такой биосенсор обладает высокой чувствительностью к АТФ и стабильностью в широком диапазоне температур.

Описанные в главе подходы универсальны, и позволяют добиться повышенной чувствительности и стабильности ферментов, используемых в качестве биораспознающего элемента. Каждый из описанных способов имеет свои преимущества и ограничения. Следует также отметить, что не все способы

сохранения и увеличения чувствительности люциферазы применимы к ферменту одновременно. Поэтому при выборе способа повышения чувствительности путем усиления сигнала и сохранения активности люциферазы следует оценить преимущества и недостатки каждого из них и применять оптимальный с точки зрения конечного эффекта (усиления сигнала и улучшения стабильности фермента).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В работе использовали высокоочищенный фермент мутантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* производства «Люмтек», Россия. Активность фермента составляла $5,5 \cdot 10^{12}$ усл.ед./мг. Препарат хранили при 0°C. Для проведения анализа к 5 мкл раствора фермента добавляли 125 мкл буфера, в реакционную смесь добавляли 4 мкл полученного раствора фермента. Также использовали лиофилизированные высокоочищенные ферменты бактериальную люциферазу (BLuc) и NADH:FMN-оксидоредуктазу (Red), а также препарат, содержащий оба фермента (комплект реактивов аналитической биолюминесценции, КРАБ), произведённые в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск, Россия). Один флакон лиофилизированного препарата BLuc содержал 0,5 мг фермента из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*), флакон с лиофилизированным препаратом Red содержал 0,15 ед. активности фермента (*Vibrio fischeri*), один флакон КРАБ включал в себя оба фермента в таких же количествах. Во флаконы с Red, BLuc и КРАБ вносили 1, 2 и 4 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 6,8, соответственно. Растворы хранили на льду и использовали в течение 8 часов после приготовления. Лيوфилизированные ферменты хранились в морозильной камере при температуре от -20 до -60°.

Помимо этого использовали следующие реактивы: D-люциферин («Люмтек», Россия), белок теплового шока 90 (Hsp90a Active Human, рекомбинантный, экспрессированный в *E.coli*, $\geq 80\%$ SDS-PAGE), апираза из картофеля (ЕС 3.6.1.5, АТРаза $\geq 3,0$ единиц/мг белка, лиофилизированный порошок), трис(гидроксиметил)аминометан (трис), аденозин-5'-трифосфат (АТР), тетрадеканаль и пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоукислота) (PIPES) компании «Merck», Германия. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сульфат магния (MgSO₄), хлорид натрия (NaCl) и хлорид калия (KCl) («Медиген»,

Россия), NADH и FMN («Serva», Германия). Хлорид магния ($MgCl_2$) и 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота (HEPES) были приобретены у «PanReac AppliChem», США. Хлорид кальция ($CaCl_2$), бычий сывороточный альбумин (BCA) и гидроксид натрия (NaOH) были произведены компанией «Diam», Россия. А также ДТТ («Sigma», США), сахароза («Gerbu», Германия), ледяная уксусная кислота («Химснаб», Россия), азотная кислота (HNO_3) и соляная кислота (HCl) («Гиредмет», Россия).

Для иммобилизации FLuc использовали крахмал («Sigma», США) и желатин («Fluka», Германия).

Для синтеза наночастиц золота использовали тетрахлороаурат(III) водорода ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) («Alfa Aesar» («ThermoFisher Inc.», Германия)), тринатрий цитрат ($Na_3C_6H_5O_7$) («PanReac AppliChem», Германия), нитрат серебра ($AgNO_3$) («Уралхим», Россия) и борогидрид натрия ($NaBH_4$) («Sigma-Aldrich», США). Для стабилизации наночастиц золота использовали липидную смесь 1 («Sigma-Aldrich», США), состоящую из труднорастворимых жирных кислот неживотного происхождения (2 мкг/мл арахидоновая, 10 мкг/мл линолевая, 10 мкг/мл линоленовая, 10 мкг/мл миристиновая, 10 мкг/мл олеиновая, 10 мкг/мл пальмитиновая и 10 мкг/мл стеариновая жирные кислоты), а также 0,22 мг/мл холестерина из новозеландской овечьей шерсти, 2,2 мг/мл твин-80, 70 мкг/мл ацетата токоферола и 100 мг/мл плуроника F-68, растворенного в воде для культивирования клеток.

2.2 Подготовка стоковых растворов и рабочих стандартов

Рабочие растворы FLuc и D-люциферина готовили с использованием буферной смеси, содержащей 0,1 М трис, 2 мМ ЭДТА и 10 мМ $MgSO_4$, pH 7,8. Ледяную уксусную кислоту использовали для корректировки pH с помощью pH-метра (HI2211, «HANNA Instruments», Германия).

Исходный раствор Hsp90 (100 мкл, 1,9 мг/мл, 0,022 мМ) переносили по 5 мкл Hsp90 в 20 флаконов и хранили в морозильной камере при $-80^\circ C$ («Sanyo»,

Japan). Рабочие растворы Hsp90 были приготовлены с использованием буферной смеси, содержащей 40 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl и 5 mM MgCl₂.

Стоковый раствор апиразы готовили путем разбавления 14,6 мг лиофилизированной апиразы в 7,3 мл дистиллированной воды. Полученный раствор распределяли по 521 мкл в 14 флаконов, содержащих 1 мг фермента (40,8 мкМ, 13,7 ед.акт.) каждый. Флаконы хранили при -20°C до дальнейшего использования. Рабочий раствор готовили путем разбавления стокового раствора с использованием буферной смеси, содержащей 40 mM PIPES pH 6,0, 0,1 M NaOH и 4 mM CaCl₂.

Свежеприготовленные водные исходные растворы ATP, FMN, NADH использовали для получения желаемых рабочих растворов в ходе экспериментов.

2.3 Синтез AuNP, покрытых цитратом

Всю стеклянную посуду (круглодонная колба с тремя горлышками, стеклянные пробки, стаканы, пипетки, обратный конденсатор), использованную в эксперименте, тщательно промывали и помещали в смесь азотной и соляной кислот в соотношении 3:1, затем споласкивали дистиллированной водой и прокаливали в сушильном шкафу.

Стоковый раствор тетрахлоуроурата(III) водорода (0,1 M) готовили путем растворения 0,393 г HAuCl₄ в 10 мл деионизованной воды и хранили в темноте при 4°C. Раствор нитрата серебра (0,1%) готовили непосредственно перед использованием путем растворения 2 мг AgNO₃ в 2 мл деионизованной воды.

AuNP синтезировали по методу, описанному [151] с небольшими изменениями. Были синтезированы четыре типа наночастиц золота: AuNP1 и AuNP2 содержали 20 мг и 40 мг тринатрий цитрата (Na₃C₆H₅O₇) (2 мл) соответственно и 145 мкл HAuCl₄ (0,1 M); AuNP3 и AuNP4 содержали 45 мкл и 90 мкл 0,1% AgNO₃ соответственно, с 20 мг тринатрий цитрата и 145 мкл HAuCl₄ (0,1 M) каждый.

145 мкл HAuCl_4 (0,1 М) растворяли в 5 мл воды, затем добавляли 2 мл свежеприготовленного раствора тринатрий цитрата и 0,1% нитрата серебра. Объем доводили до 10 мл и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 минут. После этого раствор добавляли к 40 мл кипящей деионизированной воды в круглодонной колбе, подогреваемой на водяной бане с использованием глицерина. Раствор нагревали при постоянном перемешивании в течение 15 минут на магнитной мешалке (RH basic 2, ИКА, Германия), после чего охлаждали до комнатной температуры. Конечные концентрации реагентов в полученном растворе составили

- AuNP1: 0,29 мМ HAuCl_4 ; 1,54 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$;
- AuNP2: 0,29 мМ HAuCl_4 ; 3,08 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$;
- AuNP3: 0,29 мМ HAuCl_4 ; 1,54 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ и 5,3 мкМ AgNO_3 ;
- AuNP4: 0,29 мМ HAuCl_4 ; 1,54 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ и 10,6 мкМ AgNO_3 .

2.4 Синтез AuNP с липидной оболочкой

Образование AuNP, покрытых липидной оболочкой (AuNP-L), проводили путем добавления липидной смеси 1 к раствору наночастиц в различных пропорциях (1:1000, 1:500, 3:1000, 1:200 и 1:50, общий объем 5 мл) с последующей ультразвуковой обработкой на ультразвуковом дезинтеграторе (Sonopuls HD 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Германия) с мощностью 0,048 КДж и амплитудой 80 % в течение 1 сек. четыре раза с интервалом в 2 сек.

2.5 Размеры, форма и характеристики полученных AuNP

Анализ частиц проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ТЕМ) путем помещения капли AuNP на ультратонкую пластинку, покрытую углеродом типа А и формваром на медной решетке размером 400 ячеек (Ted Pella, USA) и высушивали при комнатной температуре.

Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (JEOL, Япония), оснащенный приставкой энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS), работающий при 200 кВ, был использован для визуализации, фазового и элементного анализа.

Измерения дзета-потенциала (ζ -потенциала) и размеров наночастиц проводились с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

2.6 Синтез AuNP, покрытых оболочкой ATP

Синтез AuNP, покрытых оболочкой ATP (AuNP-ATP) проводили согласно протоколу, описанному в [120]. 6 мкл HAuCl_4 (0,1 М) и 60 мкл ATP (10 мМ) добавляли к 2,75 мл дистиллированной воды и инкубировали раствор в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем добавляли 100 мкл свежеприготовленного раствора NaBH_4 (100 мМ) и быстро перемешивали в течение 10 секунд. Полученный раствор приобретал светло-оранжевый цвет и постепенно темнел в течение 3 часов.

2.7 Агрегация AuNP в присутствии хлорида натрия

Стабильность AuNP проверяли в присутствии хлорида натрия. Стоковый раствор 5 М NaCl готовили с использованием деионизированной воды и добавляли в раствор синтезированных наночастиц золота в различной концентрации. Спектры поглощения AuNP снимали на спектрофотометре (Cary 60, Agilent technologies, США) до и после добавления NaCl с перерывами в 10 сек, 30 сек, 1 мин, 2 мин.

2.8 Взаимодействие апиразы с AuNP-АТФ

Образец для исследования готовили путем добавления 50 мкл апиразы (2 мг/мл, 13,7 ед. акт.) к 400 мкл AuNP-АТФ. 10 мкл полученной смеси добавляли в кювету люминометра, содержащую 320 мкл трис-ацетатного буфера, 10 мкл FLuc и 10 мкл 39 мкМ D-люциферина. Измерения проводили до тех пор, пока интенсивность свечения в присутствии смеси AuNP-АТФ с апиразой не достигала уровня фонового свечения. Через 30-40 минут смесь AuNP-АТФ и апиразы нагревали до 80°C в течение 10 минут, после чего повторяли измерения интенсивности свечения биоломинесцентной системы в присутствии смеси.

Для построения калибровочной кривой измеряли интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы в присутствии АТФ различной концентрации. В кювету люминометра помещали 320 мкл трис-ацетатного буфера, 10 мкл FLuc и 10 мкл 39 мкМ D-люциферина и 10 мкл раствора АТФ. Кювету помещали в биоломинометр и измеряли максимальную интенсивность свечения.

2.9 Агрегация AuNP-АТФ в присутствии NaBH₄

Агрегацию AuNP-АТФ проводили путем добавления NaBH₄. При этом исследовали три образца: 1) 100 мкл AuNP-АТФ + 50 мкл H₂O (контроль), 2) 100 мкл AuNP-АТФ + 50 мкл, 10 мМ NaBH₄, 3) 100 мкл AuNP-АТФ + 50 мкл, 100 мМ NaBH₄. Исследовали AuNP-АТФ, синтезированные с использованием АТФ 10, 20, 30, 40 и 50 мМ. Полученные образцы добавляли в реакционную смесь люциферин-люциферазной реакции вместо АТФ.

2.10 Кинетика биоломинесцентной реакции в присутствии AuNP-АТФ

Кинетику биоломинесцентной реакции регистрировали методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания). В один из шприцов для измерения помещали 5 мл FLuc (14,6

мкг/мл), в другой шприц помещали смесь субстратов реакции 1 мл D-люциферина (0,02 мг/мл) и 1 мл AuNP-АТР. В контроле AuNP-АТР заменяли на раствор АТР. Реакция протекала при 20°C, время измерения составляло 10 секунд.

2.11 Люминесцентная реакция люцифераз в присутствии AuNP

Взаимодействие излучения люциферазных реакций с AuNP и AuNP-L изучали путем смешивания в пробирке эппендорфа растворов AuNP, FMN или АТР таким образом, что конечные концентрации компонентов составляли 100 мкМ АТР или FMN, и инкубировали смесь в течение 2 часов при комнатной температуре. В качестве контроля использовали растворы АТР и FMN соответственно. После чего проводили биолюминесцентный анализ: для люциферин-люциферазной реакции светляков 10 мкл приготовленной смеси добавляли в кювету, содержащую 300 мкл трис-буфера, 10 мкл (9,6 мкг/мл) FLuc, 10 мкл (2,2 мкг/мл) D-люциферина. Кювету встряхивали и помещали в люминометр (GloMax 20/20, США), и регистрировали максимум люминесценции. Для ферментативной системы светящихся бактерий 10 мкл смеси добавляли к 300 мкл натрий-фосфатного буфера (50 мМ, рН 6,8), 10 мкл ферментного реагента, содержащего люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу, 50 мкл 0,0025% тетрадеканала, 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М NADH. Кювету встряхивали и помещали в люминометр и регистрировали максимум люминесценции.

2.12 Температурная зависимость активности Hsp90

Для работы с Hsp90 использовали буфер, содержащий 40 мМ HEPES, 150мМ KCl и 5 мМ MgCl₂ (рН 7,5). Так 5 мкл Hsp90 (0,0095 мг, 0,022 мМ) разводили в 4 раза в буфере HEPES, добавляли к 80 мкл 1 мкМ раствора АТР и равномерно распределяли в пять флаконов. В качестве контроля использовали смесь из 80 мкл 1 мкМ раствора АТР и 20 мкл буфера HEPES. Образцы инкубировали при 4°C, 30°C, 50°C и 70°C с использованием Thermomixer Comfort

(«Eppendorf», Германия) в течение 45 мин. После инкубационного периода 15 и 45 минут 5 мкл образца пипетировали в люминометрическую кювету, содержащего 300 мкл трис буфера, pH 7,8, 10 мкл FLuc (24 мкг/мл) и 10 мкл 9,75 мкМ D-люциферина. Измерения люминесценции проводили с использованием люминометра Glomax 20/20 («Promega», США).

2.13 Инкубирование Hsp90 с АТР

40 мкл раствора Hsp90 (0,0095 мг, 0,022 мМ) инкубировали с 20 мкл 5 мкМ АТР при 50°C в течение 30 мин. В качестве контроля использовали раствор 5 мкМ АТР, разбавленный в 3 раза буфером HEPES. Непосредственно перед инкубированием, а также после 15 мин и 30 мин инкубирования 10 мкл образца помещали в кювету люминометра, содержащую 320 мкл трис буфера, 10 мкл FLuc (96 мкг/мл) и 10 мкл 39 мкМ D-люциферина. Измерения сигнала люминесценции проводили в течение 60 сек.

2.14 Активность FLuc в присутствии Hsp90 и АТР

Анализ рефолдинга люциферазы проводили путем инкубирования Hsp90 в присутствии АТР и FLuc. В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). Были исследованы 4 образца. В первом случае 10 мкл 10 нМ FLuc инкубировали в присутствии 10 мкл 0,53 мкМ Hsp90, 10 мкл 1,25 мМ АТР и 10 мкл буфера HEPES при 50°C в течение 15 минут. Второй образец включал FLuc, АТР и буфер HEPES. Третий образец содержал FLuc и Hsp90, а четвертый – только FLuc. Общий объем реакционной смеси доводили до 40 мкл буфером HEPES. Также проводилась инкубация FLuc, БСА, АТР; FLuc, Hsp90, АТР и FLuc, АТР. 10 мкл образца пипетировали в люминометрическую кювету, содержащую 330 мкл трис буфера и 10 мкл 39 мкМ D-люциферина, кювету помещали в люминометр и регистрировали интенсивность свечения. Измерения люминесценции проводили перед инкубированием и через 15 мин.

2.15 Зависимость АТР-азной активности апиразы от температуры

Рабочий раствор апиразы готовили разбавлением стокового раствора в буфере PIPES (рН 6,0) в 100 раз, до достижения активности фермента 0,137 ед/мл (0,41 мкМ). 10 мкл апиразы добавляли в буфер HEPES, предварительно нагретый до 20 – 70°C в присутствии АТР (20 мкл, 8,3 мкМ) и продолжали инкубировать в течение 15 минут. Через 5 и 15 минут 10 мкл образца помещали в кювету, содержащую 320 мкл трис буфера, 10 мкл FLuc (9,6 мкг/мл) и 10 мкл 39 мкМ D-люциферина, кювету помещали в люминометр и регистрировали интенсивность свечения.

2.16 Взаимодействие Hsp90 и апиразы

Взаимодействие Hsp90 и апиразы исследовали путем инкубирования 20 мкл 0,022 мМ Hsp90 и 20 мкл 4 мМ апиразы (0,2 мг/мл) в присутствии 20 мкл 5 мкМ АТР. Смесь инкубировали при 50°C в течение 30 мин. В качестве контроля использовали смесь Hsp90 с раствором АТР. Измерения люминесценции проводили с интервалом времени 15 и 30 мин.

2.17 Иммобилизация FLuc и D-люциферина

Анализ влияния микроокружения на стабильность и активность фермента проводили путем иммобилизации FLuc и D-люциферина в гели, приготовленные на основе картофельного крахмала и желатина. Для приготовления крахмального и желатинового гелей использовали трис-ацетатный буфер рН 7,8.

Иммобилизацию в крахмальный гель производили следующим образом: 3%, 4% и 5% суспензии крахмала кипятили в течение двух минут, постоянно перемешивая. После охлаждения геля до 25°C в него добавляли раствор FLuc. Далее, дозировали по 25 мкл геля на фторопластовую подложку и высушивали при температуре 8°C в течение 24 часов.

Иммобилизацию в желатиновый гель проводили путем нагревания до 80°C суспензии желатина 1%, 1,2%, 1,5%, 1,7%, 2%. Затем желатин охлаждали до 25 °C и добавляли растворы FLuc и стабилизаторов. Далее, дозировали по 25 мкл геля на фторопластовую пленку и высушивали при температуре 8°C в течение 24 часов. Полученный реагент представлял собой диски диаметром 6 – 7 мм (рисунок 14). Хранение реагентов осуществлялось при температуре 4°C. Иммобилизацию D-люциферина в крахмальный и желатиновый гели проводили аналогичным образом.

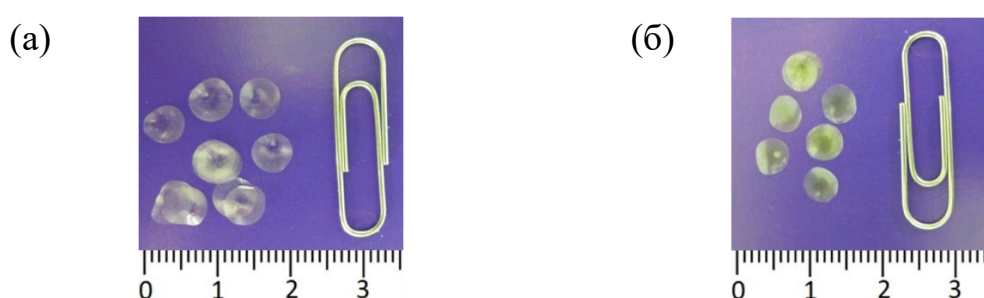


Рисунок 14 – Иммобилизованные реагенты на основе люциферин-люциферазной системы светляков: (а) Реагент, включающий 4,2 мкг FLuc, иммобилизованной в 1% желатиновый гель; (б) Реагент, содержащий 0,125 мМ D-люциферин в 1% желатиновом геле

Активность полученных иммобилизованных реагентов проверяли путем добавления к одному диску, 310 мкл трис-ацетатного буфера pH 7,8 и 20 мкл D-люциферина. Кювету выдерживали при комнатной температуре (25°C) до спада фонового свечения (Ифон). Билюминесцентную реакцию инициировали добавлением 20 мкл раствора АТР. Смесь быстро перемешивали, помещали в кюветное отделение билюминометра Glomax 20/20 («Promega», США) и регистрировали максимальную интенсивность свечения (I). Для определения количества АТР в модельном микробном образце вместо раствора АТР добавляли 20 мкл бактериальной суспензии.

2.18 Модельный микробный образец

Для анализа чувствительности биолюминесцентных методов к бактериальному загрязнению в качестве модельного объекта использовали клетки *Escherichia coli* (BL21 Codon Plus (DE3) RIPL) в стационарной фазе роста, выращенные в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН на среде LB без антибиотиков в течение 18 часов при 30°C в инкубаторе Excella E25 (Eppendorf AG, Германия). Титр клеток *E. coli* в исходной культуре определяли по светорассеянию при 600 нм, принимая, что 1 единица оптической плотности соответствует $5 \cdot 10^8$ кл/мл.

ГЛАВА 3 СПОСОБЫ УПРАВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ

Разработка методов анализа, основанных на фермент-субстратном взаимодействии, является основной нишей применения билюминесцентных ферментных систем. Благодаря высокой специфичности билюминесцентных ферментных систем к субстратам реакций, люциферазы применяют для определения FMN, NADH, альдегида или АТФ [152,153], а также для определения количества живых клеток по концентрации данных метаболитов, оценки жизнеспособности клеток по соотношению концентраций АТФ, АДФ и АМФ [154], или определения уровня клеточного стресса по соотношению NAD^+ и NADH [61].

Цепи сопряжения люцифераз с другими ферментами позволяют определять клеточные метаболиты (пируват, лактат, глюкозо-6-фосфат, FAD, NADH и др.) и ферменты, такие как флаavin зависимые белки, дегидрогеназы, [51], АТФ зависимые белки (апираза, белки теплового шока, креатинфосфокиназа и др.) [20].

Интенсивность свечения билюминесцентных ферментных систем пропорциональна концентрации субстратов в исследуемом образце, и для достижения высокой чувствительности специфического анализа следует подобрать компоненты реакционной среды, обеспечивающие минимальный предел обнаружения субстратов. В главе представлены результаты подбора условий проведения билюминесцентного анализа с использованием ферментных систем светляков и бактерий, обеспечивающих минимальный предел обнаружения АТФ, FMN и NADH.

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 interfering фактором для билюминесцентных ферментативных систем

является наличие фонового свечения, то есть свечения в отсутствие субстрата реакции. Присутствие фонового сигнала является ограничением метода, препятствующим достижению низкого предела обнаружения. При использовании FLuc для анализа количества АТР или ферментативной системы Red + BLuc для определения NADH и FMN наблюдалось фоновое свечение. Это может быть связано с присутствием следовых количеств субстрата в ферментном препарате. Одним из путей решения данного ограничения является более тщательная очистка ферментов, однако такие процедуры приведут к увеличению стоимости препаратов. Поэтому более простым способом снижения фонового свечения биолюминесцентных ферментативных систем 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 определять минимальное содержание FMN и NADH в анализируемом образце, варьировали содержание ферментов (NADH:FMN-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы (Red + BLuc)) и субстратов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание остальных компонентов. Так, при варьировании количества люциферазы и NADH, определили оптимальное соотношение компонентов для обнаружения FMN в образце. На рисунке 15 представлена зависимость нормированной интенсивности свечения от концентрации NADH и количества BLuc в реакционной смеси.

При увеличении концентрации ферментов в реакционной смеси наблюдалось увеличение фонового свечения, то есть свечения в отсутствие FMN. Поэтому при выборе оптимального количества ферментов особое внимание уделялось именно отношению сигнал/фон. Наибольшее значение отношения интенсивности свечения биферментной системы в присутствии FMN к интенсивности свечения биферментной системы в отсутствие FMN (сигнал/фон) достигалось при концентрации NADH равной 29 мкМ и количестве фермента 0,63 мкг (рисунок 15).

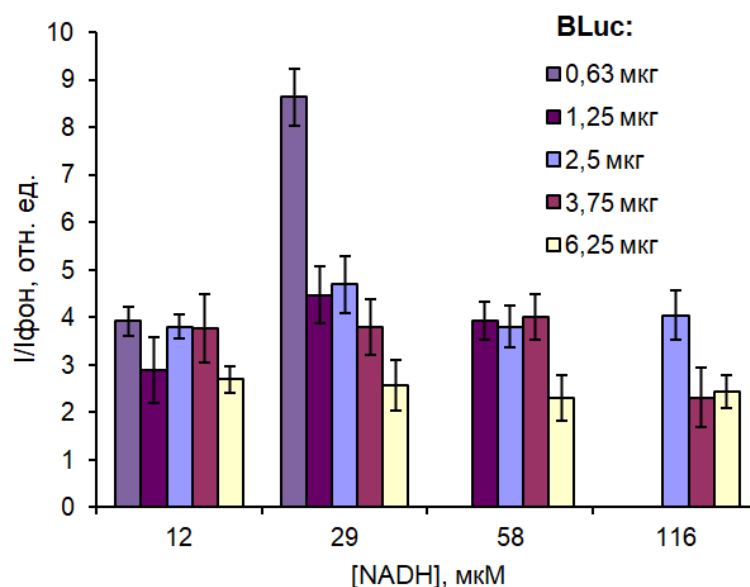


Рисунок 15 – Зависимость нормированной интенсивности свечения биферментной системы Red + BLuc от концентрации NADH и количества BLuc в реакционной смеси: 1 – 0,63 мкг BLuc, 2 – 1,25 мкг BLuc, 3 – 2,5 мкг BLuc, 4 – 3,75 мкг BLuc, 5 – 6,25 мкг BLuc. I/фон – отношение интенсивности свечения системы в присутствии FMN к интенсивности свечения в отсутствие FMN.

Концентрация FMN в реакционной смеси составляла 5 мкМ

Биолюминесцентная система Red + BLuc позволяет производить анализ не только FMN, но и оценивать содержание NADH, например, в тканях растений [61]. Для определения минимального предела обнаружения NADH биферментной системой были найдены концентрации ферментов и субстратов оптимальные с точки зрения отношения сигнал/фон. Для этого измеряли биолюминесцентный сигнал при добавлении 100 мкл 5 нМ раствора NADH при поочередном варьировании содержания FMN, тетрадеканала или ферментов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание других компонентов. На рисунке 16 представлены зависимости интенсивности свечения биферментной системы в присутствии NADH от количества Red и BLuc. Из полученных данных было выбрано такое соотношение ферментов в реакционной смеси, которое

обеспечивает достаточно высокое свечение системы и соотношение сигнал/фон: 10 мкг люцiferазы и 0,002 ед. акт. оксидоредуктазы.

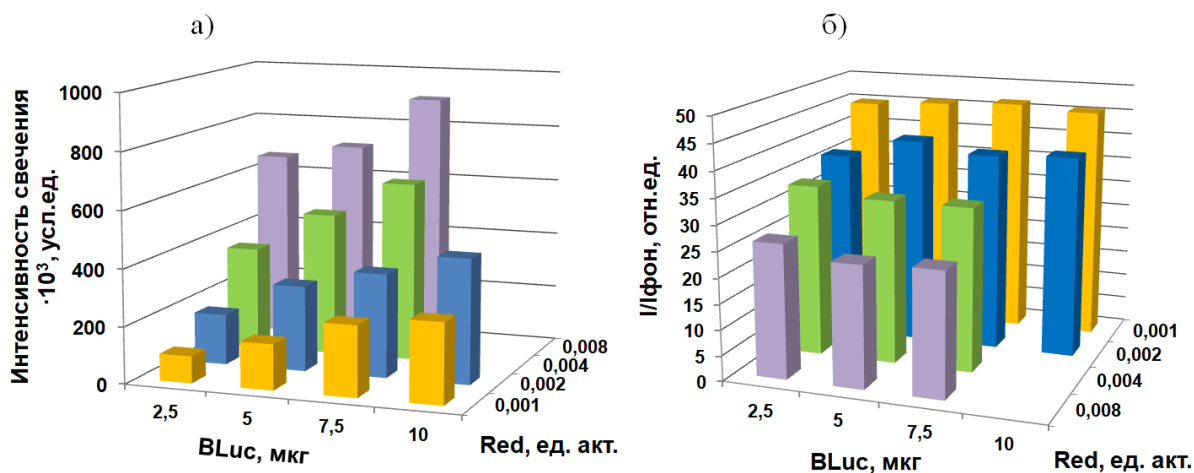


Рисунок 16 – а) Зависимость интенсивности свечения биферментной системы Red + BLuc от количества ферментов в реакционной смеси; б) зависимость соотношения интенсивности свечения биферментной системы Red + BLuc в присутствии NADH и фонового свечения (сигнал/фон) от количества ферментов в реакционной смеси

При проведении исследований по определению NADH реакционную смесь предварительно выдерживали несколько минут до уменьшения фонового свечения, после чего запускали реакцию добавлением NADH различных концентраций.

Путем варьирования концентрации FMN и количества тетрадеканала в реакционной смеси, были подобраны концентрации этих веществ, обеспечивающие наибольшую интенсивность свечения (рисунок 17, 18). Минимальный предел обнаружения NADH достигался при концентрации тетрадеканала в реакционной смеси 10^{-4} % ед. и концентрации FMN - 1 мкМ.

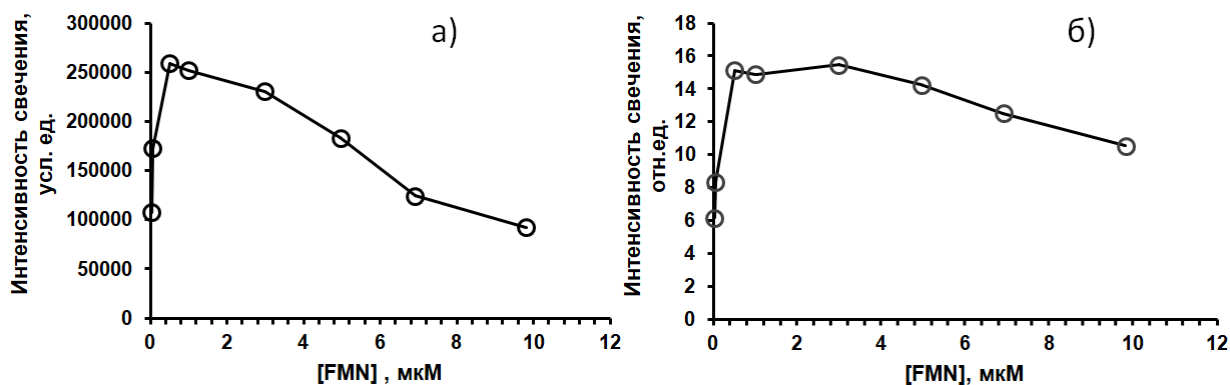


Рисунок 17 – а) Зависимость интенсивности свечения биферментной системы Red + VLuc от концентрации FMN в реакционной смеси; б) зависимость нормированной интенсивности свечения биферментной системы (сигнал/фон) от концентрации FMN в реакционной смеси. Концентрация NADH в реакционной смеси составляла 1 нМ

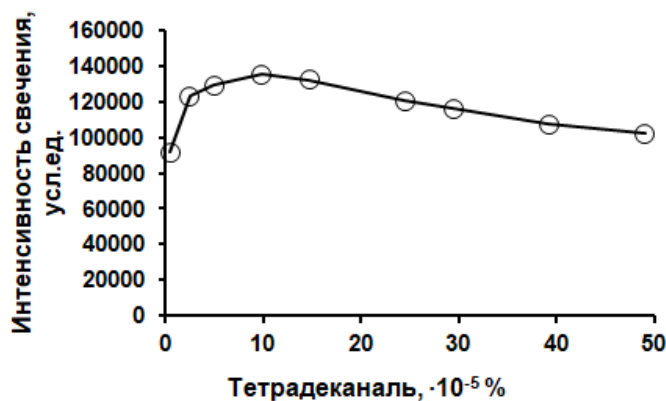


Рисунок 18 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы Red + VLuc от концентрации тетрадеканала в реакционной смеси. Концентрации NADH и FMN в реакционной смеси составляли 1 нМ и 2 мкМ соответственно

При выбранных параметрах ферментной системы Red + VLuc предел обнаружения субстратов составил 1,2 нМ FMN и 0,1 пМ NADH. Линейные отклики системы находятся в диапазоне от 1,2 нМ до 10 мкМ FMN и от 0,1 пМ до 1 нМ NADH (рисунок 19).

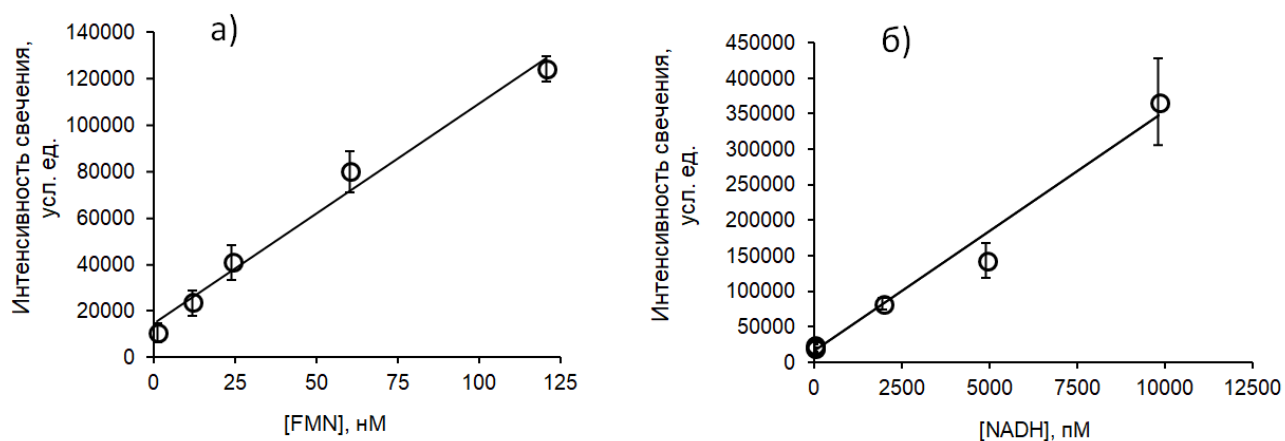


Рисунок 19 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы Red + VLuc от концентрации а) FMN, б) NADH в реакционной смеси

При работе с FLuc для достижения низкого предела обнаружения АТР, были подобраны компоненты реакционной смеси и условия проведения анализа, способствующие сохранению активности фермента и при этом усилению сигнала. Были найдены концентрации FLuc и D-люциферина, при которых интенсивность свечения, а также отношение максимальной интенсивности к фоновому свечению достигают наибольших значений. На рисунке 20 представлена зависимость интенсивности свечения люциферин-люциферазной системы светляков от количества FLuc и концентрации D-люциферина в реакционной смеси.

При увеличении количества фермента и субстратов в реакционной смеси интенсивность свечения возрастает, также как и значение отношения интенсивности свечения в присутствии АТР к интенсивности фонового свечения. В дальнейших экспериментах использовали количество FLuc и D-люциферина, оптимальные с точки зрения соотношения I/фон: 4,2 мкг FLuc и 0,125 мМ D-люциферина.

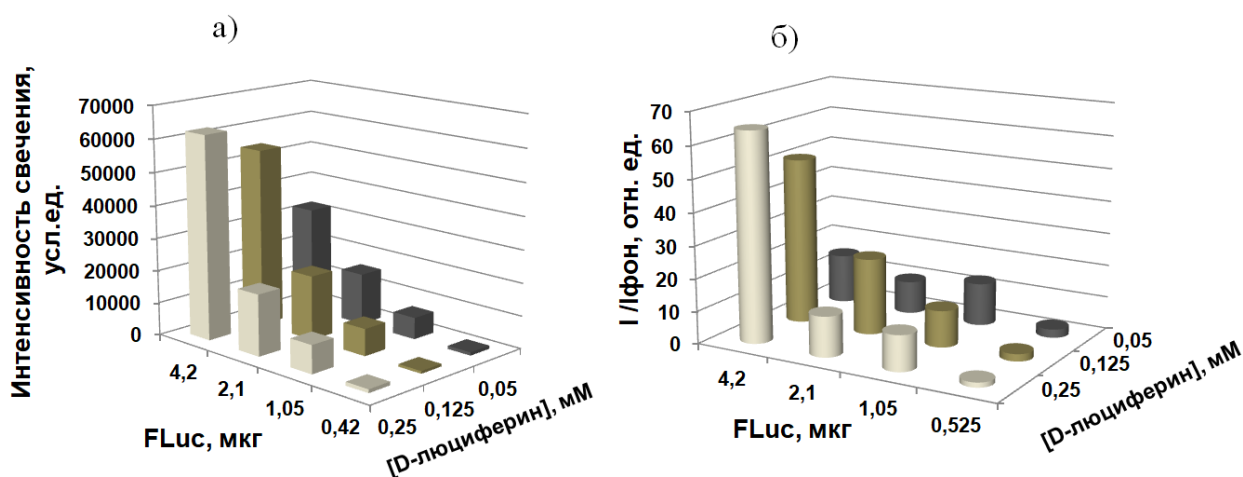


Рисунок 20 – Варьирование компонентов ферментной реакции светляков: а) интенсивность свечения FLuc при различных концентрациях D-люциферина; б) зависимость отношения интенсивности свечения FLuc в присутствии АТФ и фонового свечения (сигнал/фон) от количества фермента и субстрата в реакционной смеси

3.2 Использование стабилизирующих добавок для увеличения чувствительности ферментной системы светляков

Изменение характеристик ферментных систем может проявляться при добавлении стабилизирующих агентов, которые способствуют сохранению активности фермента в условиях повышенной температуры, изменения рН, ионной силы раствора и др. [155]. На примере люциферин-люциферазной системы светляков было исследовано влияние стабилизаторов из трех разных классов, обладающие разными механизмами стабилизации фермента: бычий сывороточный альбумин (БСА), дитиотрейтол (ДТТ) и сахароза. Присутствию стабилизирующих агентов способствовало изменению стабильности и активности ферментативной системы светляков.

Разные концентрации стабилизаторов добавляли к реакционной смеси, состоящей из трис-ацетатного буфера рН 7,8, FLuc и D-люциферина, и оставляли на 1 час при 24°C, после чего проводили измерения биолуминесценции.

Добавление БСА в реакционную смесь приводило к увеличению интенсивности свечения в 2,5 раза по сравнению с контролем (рисунок 21а).

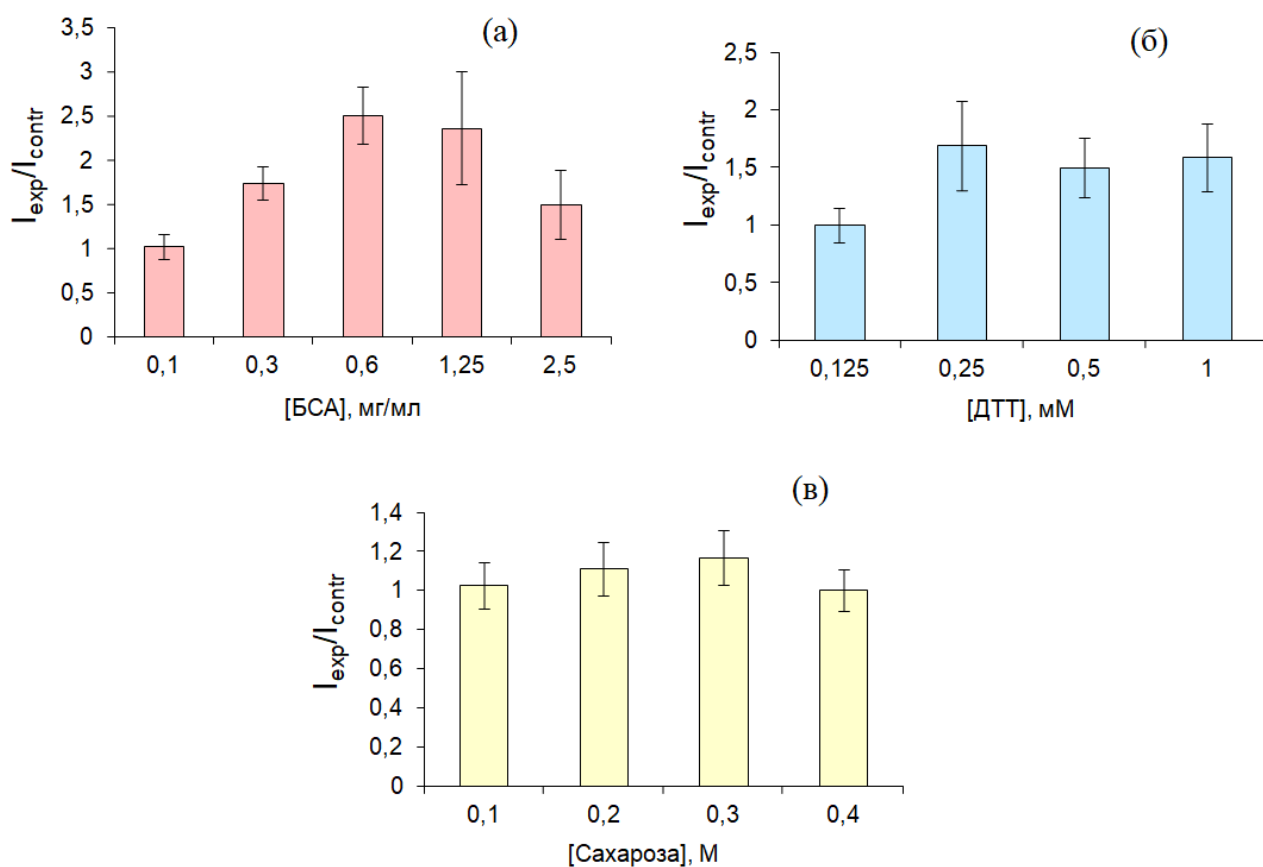


Рисунок 21 – Зависимость относительной интенсивности свечения FLuc от концентрации стабилизаторов в реакционной смеси после инкубирования при температуре 24°C в течение 1 часа. Реакционная смесь содержит 4,2 мкг FLuc, 0,125 мМ D-люциферина и стабилизаторы различных концентраций: (а) БСА, (б) ДТТ, (в) сахароза. I_{contr} – интенсивность свечения без добавления стабилизатора, I_{exp} – интенсивность свечения при добавлении стабилизатора

Наибольшая интенсивность свечения зафиксирована 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 (рисунок 21б). В то время как в присутствии сахарозы увеличения активности фермента не наблюдалось (рисунок 21в).

Таким образом, показано, что выбор дополнительных компонентов реакционной смеси играет важную роль для увеличения активности люциферин-люциферазной системы светляков и повышения чувствительности биолюминесцентного метода.

3.3 Применение наночастиц золота для усиления люминесцентного сигнала

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% [46], квантовый выход $FLuc$ составляет 40-50% [21,22]) или высокого фонового свечения биолюминесцентной ферментативной системы. В этом случае повысить чувствительность можно путем усиления светового излучения с помощью наночастиц благородных металлов [105]. Ранее было показано, что взаимодействие люминесцентного сигнала с наночастицами золота и серебра приводит к увеличению сигнала [102,109,156].

В данной главе рассмотрены два типа наночастиц золота, синтезированных методом с образованием цитратной оболочки ($AuNP$), и наночастиц золота, покрытых оболочкой АТР ($AuNP$ -АТР).

3.3.1 Наночастицы золота с цитратной оболочкой

Синтезировали 4 варианта наночастиц, покрытых цитратом: раствор $AuNP1$ содержал 0,29 мМ $HAuCl_4$ и 1,54 мМ тринатрий цитрата, раствор $AuNP2$ содержал в два раза больше тринатрий цитрата, чем раствор $AuNP1$ (0,29 мМ $HAuCl_4$; 3,08 мМ $Na_3C_6H_5O_7$); в $AuNP3$ добавляли количество тринатрий цитрата как и $AuNP1$, а также нитрат серебра (0,29 мМ $HAuCl_4$; 1,54 мМ $Na_3C_6H_5O_7$ и 5,3 мкМ $AgNO_3$), а $AuNP4$ отличался от $AuNP3$ в два раза большим количеством нитрата серебра (0,29 мМ $HAuCl_4$; 1,54 мМ $Na_3C_6H_5O_7$; 10,6 мкМ $AgNO_3$)

Стабилизировали полученные AuNP путем добавления липидной смеси 1 (AuNP-L), 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.

Спектры поглощения синтезированных AuNP и AuNP-L показаны на рисунок 22. Максимумы поглощения находились в диапазоне 525-533 нм. Наибольшее и наименьшее значения поглощения наблюдались у AuNP2 и AuNP1, соответственно. Пик поглощения AuNP3 был смещен в низковолновую область относительно других образцов (рисунок 22а). Спектры поглощения AuNP, покрытых липидной оболочкой, были смещены в красную область спектра на 1–2 нм с незначительным увеличением поглощения. Наибольшее красное смещение наблюдалось в случае AuNP1-L-1:200 (AuNP-L-1:200 означает обработанный липидами AuNP в соотношении 1:200, где x представляет собой липидную смесь 1), тогда как наибольшее увеличение поглощения наблюдалось для AuNP4-L-1:200 (рисунок 22б). Увеличение поглощения в системе AuNP-L объясняется формированием липидного слоя вокруг золотых наночастиц. Этот слой изменяет локальный показатель преломления, что приводит к возрастанию экстинкции и красному сдвигу плазмонного резонанса. Наблюдаемый сдвиг максимума поглощения подтверждает взаимодействие липидов с поверхностью AuNP и свидетельствует об увеличении их гидродинамического радиуса [157].

Методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ-анализ) (рисунок 23а, б, в и г) было показано, что синтезированные AuNP представляли собой нанокристаллы. Достаточно высокий индекс полидисперсности ($>0,4$) указывает на широкое распределение по размерам наночастиц.

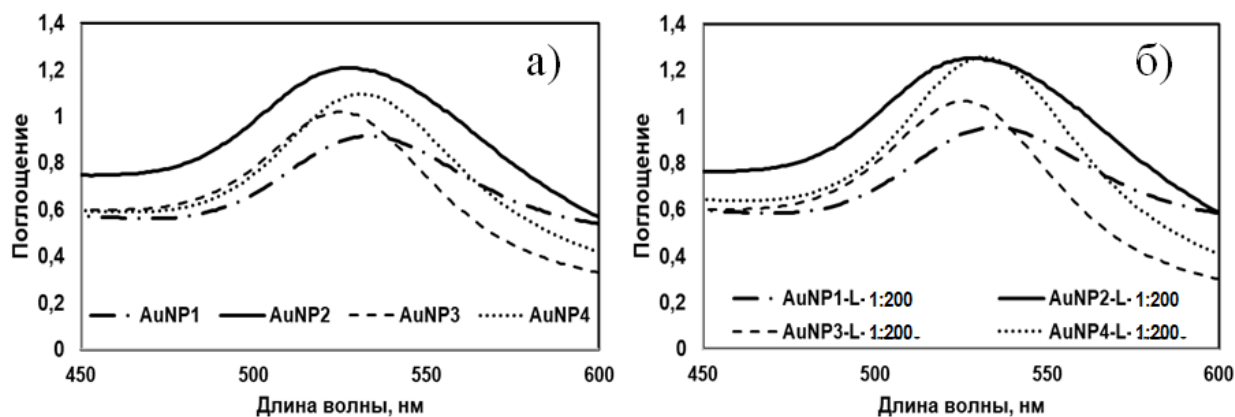


Рисунок 22 – а) Спектры поглощения AuNP1 (λ_{max} 532 нм, Abs 0,92); AuNP2 (λ_{max} 529 нм, Abs 1,2); AuNP3 (λ_{max} 525 нм, Abs 1,02) и AuNP4 (λ_{max} 531 нм, Abs 1,01) и б) спектры поглощения AuNP1-L-1x/200 (λ_{max} 534 нм, Abs 0,98), AuNP2-L-1x/200 (λ_{max} 530 нм, Abs 1,25), AuNP3-L-1x/200 (λ_{max} 526 нм, Abs 1,07) и AuNP4-L-1x/200 (λ_{max} 531 нм, Abs 1,25)

Размер AuNP1 составлял 25–50 нм со средним диаметром 35 ± 5 нм. AuNP2, AuNP3 и AuNP4 имели размеры в диапазоне 10–25 нм, 17–40 нм и 10–45 нм соответственно, при этом средний размер составлял 15 ± 5 нм для AuNP2, 30 ± 5 нм для AuNP3 и 30 ± 5 нм для AuNP4. Полученные результаты согласуются с литературными данными [115].

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия показала, что AuNP3 и AuNP4 содержали $1,5\% \pm 0,5\%$ и $2,5\% \pm 0,5\%$ серебра соответственно. Следует отметить, что частицы с более высоким содержанием серебра (AuNP4) имели меньший размер. Это можно объяснить влиянием нитрата серебра на кинетику нуклеации золота: увеличение концентрации AgNO_3 с 5,3 до 10,6 мкМ приводит к образованию большего числа центров кристаллизации, что при фиксированном количестве ионов золота ($0,29$ мМ HAuCl_4) обуславливает формирование более мелких частиц (рисунок 24). Исследование дифракции электронов (ED) показало, что характер дифракции электронов схож для всех синтезированных AuNP [158]. Все наблюдаемые отражения соответствуют кубической гранецентрированной структуре Au (пространственная группа Fm-3m, постоянная решетки $a =$

4,0786 Å). Следует отметить, что Au и Ag имеют одинаковый тип кристаллической структуры, и разница постоянных решетки составляет менее 0,2%. Это объясняет, почему дифракционные картины, полученные для AuNP1 и AuNP2, содержащих Au, и картины, полученные для AuNP3 и AuNP4, содержащих Au и Ag, не отличаются.

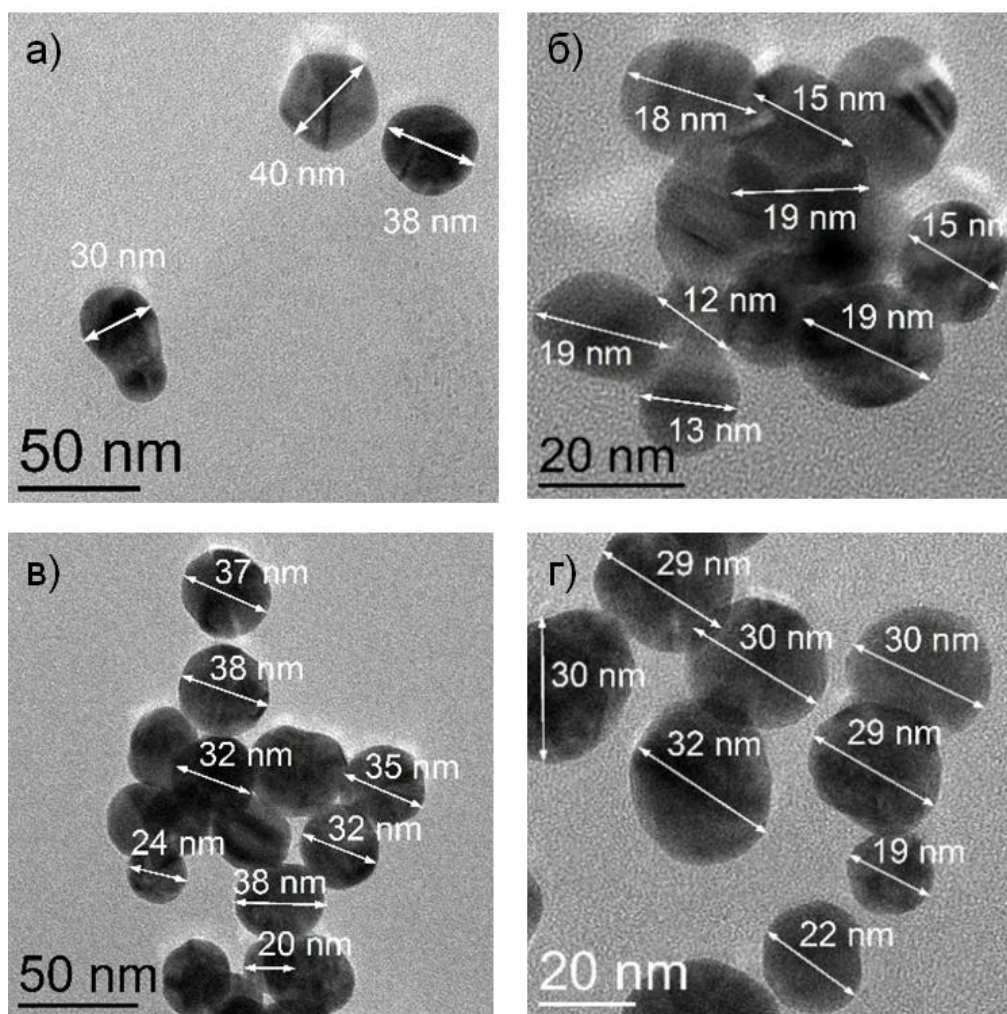


Рисунок 23 – Электронно-микроскопическое изображение: а) AuNP1, б) AuNP2, в) AuNP3 и г) AuNP4

В таблице 1 представлены ζ -потенциал и размер полученных частиц. Максимальное значение ζ -потенциала наблюдалось для AuNP2, и составило $49,47 \pm 0,81$ мВ, в то время как минимальное значение наблюдалось для AuNP4 – $36,43 \pm 1,27$ мВ. Отрицательные значения ζ -потенциала объясняются отрицательно

заряженным цитратом вокруг ядра Au^0 . При этом в случае с AuNP3 и AuNP4, наблюдается частичное экранирование отрицательного заряда ионами Ag^+ . А также наблюдается корреляция между снижением ζ -потенциала и увеличением массовой доли серебра по данным энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

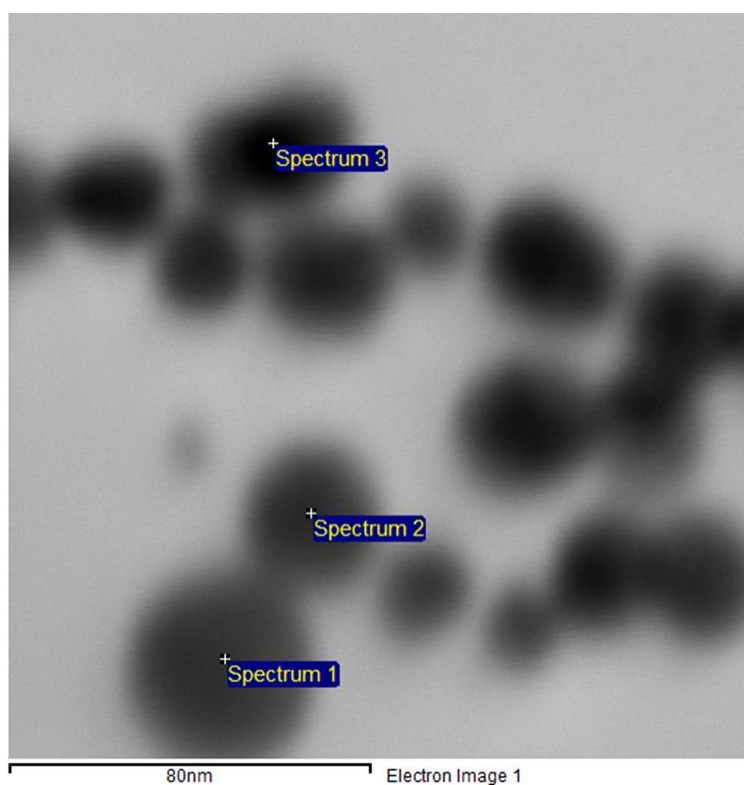


Рисунок 24 – Фотография энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS) AuNP4. Spectrum 1 – 1,67 % мас. Ag, 98,33 % мас. Au; Spectrum 2 – 2,42 % мас. Ag, 97,58 % мас. Au; Spectrum 3 – 3,29 % мас. Ag, 96,71 % мас. Au

Согласно полученным результатам стабильность наночастиц уменьшается в следующей последовательности $\text{AuNP2} > \text{AuNP1} > \text{AuNP3} > \text{AuNP4}$. Тем не менее, после покрытия наночастиц золота липидной оболочкой, ζ -потенциал снизился для всех AuNP-L, что свидетельствует о наличии липидной оболочки. Полученные результаты также согласуются с литературными данными [159]. для AuNP ζ -среднее уменьшалось в ряду $\text{AuNP2} > \text{AuNP1} > \text{AuNP4} > \text{AuNP3}$, после обработки липидной смесью значение ζ -среднего для AuNP3-L-1:200 увеличилось

в 1,7 раз по сравнению с ζ -средним для AuNP3, тем самым меняя тренд следующим образом AuNP2 > AuNP3 > AuNP1 > AuNP4.

Таблица 1 – Характеристики наночастиц золота

Образец	Диаметр (ТЕМ) (нм)	ζ -среднее, диаметр (нм)	Полидисперсность	ζ -потенциал (мВ)
AuNP1	35 ± 5	31,23	0,51	- 37,8 ± 0,66
AuNP2	15 ± 5	63,8	0,54	- 49,47 ± 0,81
AuNP3	30 ± 5	26,08	0,51	- 36,83 ± 0,15
AuNP4	30 ± 5	28	0,463	- 36,43 ± 1,27
AuNP1-L-1:200		39,88	0,553	- 17,93 ± 1,02
AuNP2-L-1:200		78,45	0,561	- 21,63 ± 0,7
AuNP3-L-1:200		44,96	0,503	- 14,54 ± 0,9
AuNP4-L-1:200		35,86	0,419	- 13,77 ± 0,83

При сравнении ζ -средних с измерениями ТЕМ-анализа, размеры всех синтезированных AuNP хорошо коррелировали, за исключением AuNP2 (рисунок 23б и таблица 1). Изображение просвечивающего электронного микроскопа показало средний размер AuNP2 15 ± 5 нм, а ζ -среднее было определено как 63,8 нм. Это наблюдение свидетельствует о том, что при увеличении концентрации цитрата в 2 раза гидродинамический диаметр возрастает примерно в 4 раза по сравнению с диаметром ядра, что согласуется с литературными данными о формировании плотной цитратной оболочки на поверхности наночастиц золота.

3.3.1.1 Исследование агрегации AuNP и AuNP-L

Цитратная оболочка, окружающая золотое ядро (Au^0), и силы межмолекулярного отталкивания препятствуют объединению и агрегированию AuNP [160]. Тем не

менее, под действием хлорида натрия наблюдалась быстрая агрегация всех видов наночастиц. Ионы натрия связываются с анионами цитрата, что приводит к нейтрализации и разрушению анионного экранирования. В результате AuNP теряют свои плазмонные свойства. На этом этапе их характерный плазмонный пик расширяется и наблюдается снижение поглощения [161]. На рисунке 25а – в изображены спектры поглощения AuNP1 при воздействии раствора NaCl.

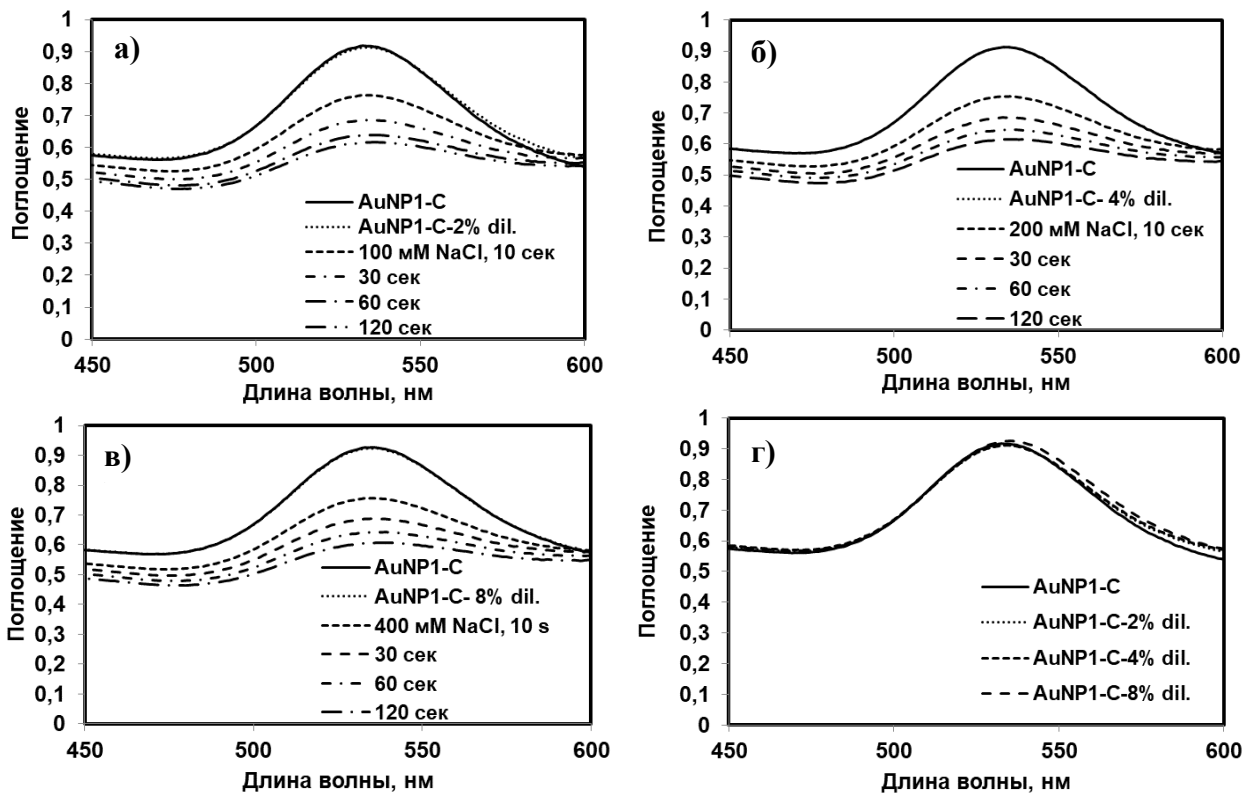


Рисунок 25 – Агрегирование AuNP1, где AuNP1-C является контролем, AuNP1-C-2% (4%; 8%) dil. – 2% (4%; 8%) разведение контроля водой; а, б, в – эффект водного раствора NaCl на спектры поглощения AuNP1 при 100, 200 и 400 mM NaCl соответственно; г – эффект водных разведений AuNP1, принятых за контроль, на спектры поглощения

В течение 10 секунд пик поглощения AuNP1 уменьшался примерно на 20% и продолжал снижаться. Наблюдалось расширение и смещение плазмонного пика в сторону красной области (до 6 нм), при этом AuNP менял цвет с розового на пурпурно-голубой. Расширение пиков указывает на неоднородную агрегацию

AuNP, приводящую к образованию частиц разного размера [162]. Рисунок 25г демонстрирует спектры поглощения AuNP при разбавлении водой. При 8%-ном разведении контрольного образца наночастиц золота (AuNP1-C-8%) наблюдается незначительное изменение оптической плотности.

В отличие от контрольных образцов AuNP (AuNP1-C на рисунке 25), обработанные липидом AuNP (AuNP1-L-1:200) выдерживали раствор NaCl при всех концентрациях (рисунок 26). При этом расширения пиков или заметного уменьшения поглощения не наблюдалось, что указывает на стабилизацию AuNP.

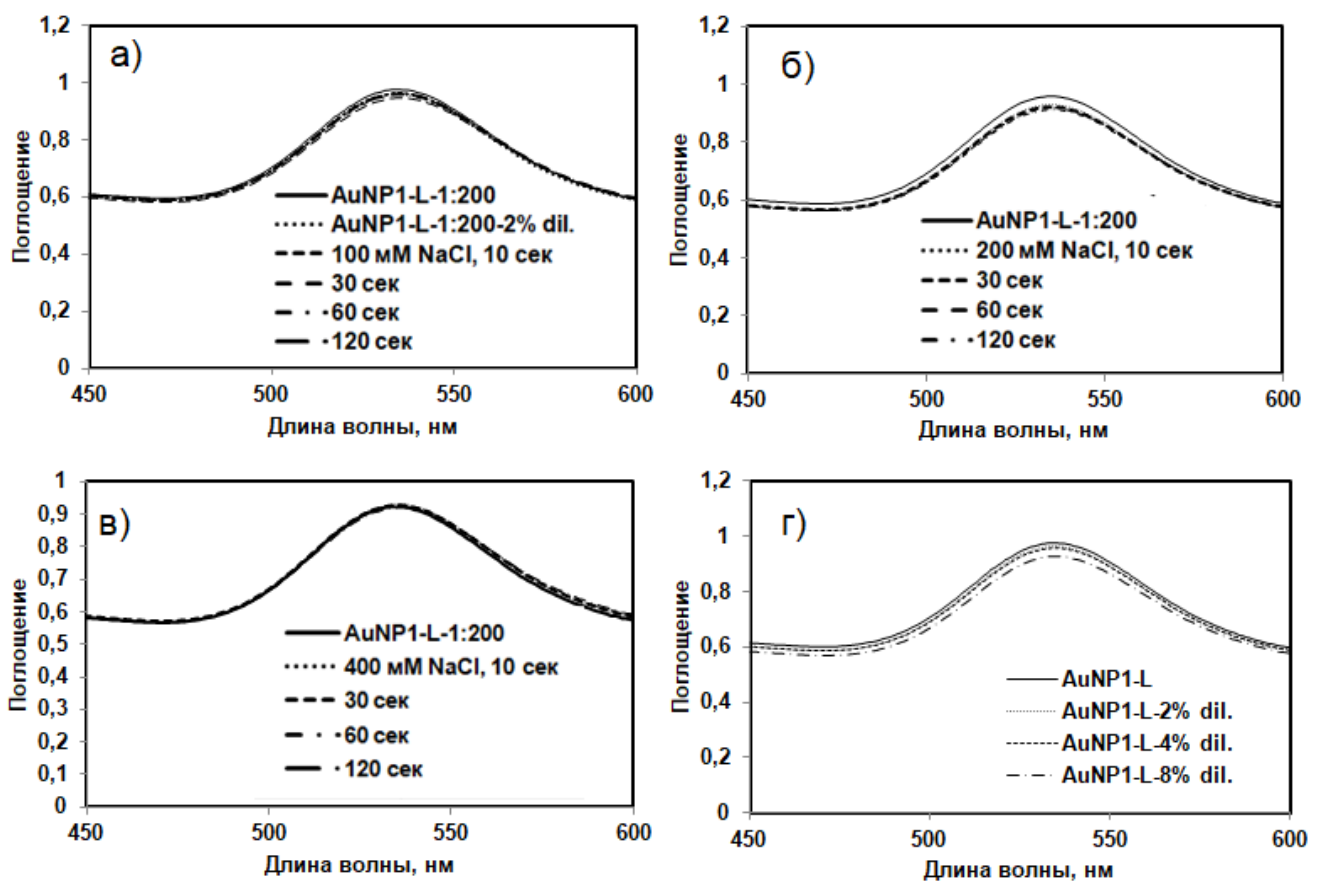


Рисунок 26 – Спектры поглощения AuNP1-L-1:200. а, б, в – эффект водного раствора NaCl на спектры поглощения AuNP1 при 100, 200 и 400 мМ NaCl соответственно; г – эффект водных разведений AuNP1 (принятых за контроль) на спектры поглощения, где AuNP1-L-2% (4%; 8%) dil. – 2% (4%; 8%) разведение водой

Предположительно, AuNP, обработанные липидной смесью, образуют гидрофобный слой, окружающий область, покрытую цитратами, при этом карбоновая кислота (-COOH) с различными длинами цепей направлена в сторону гидрофильного окружения. Это наблюдение было дополнительно подтверждено измерениями ζ -потенциала и размера AuNP перед обработкой липидной смесью (таблица 1). Несмотря на снижение абсолютного значения ζ -потенциала более чем на 50%, AuNP1-L и AuNP2-L продемонстрировали повышенную стабильность в отношении агрегации под действием соли NaCl.

Было предположено, что липидные «рукава» с гидрофильными внешними концами не позволяют ионам натрия (Na^+) связываться с цитратом и нейтрализовать его. Было обнаружено, что оптимальное соотношение стабилизирующего агента (липидной смеси) и AuNP1 составляет 1:200. При содержании липидной смеси к объему наночастиц в соотношении 1:1000 и 1:500 наблюдалась агрегация AuNP1-L при всех концентрациях NaCl (рисунок 27а-е).

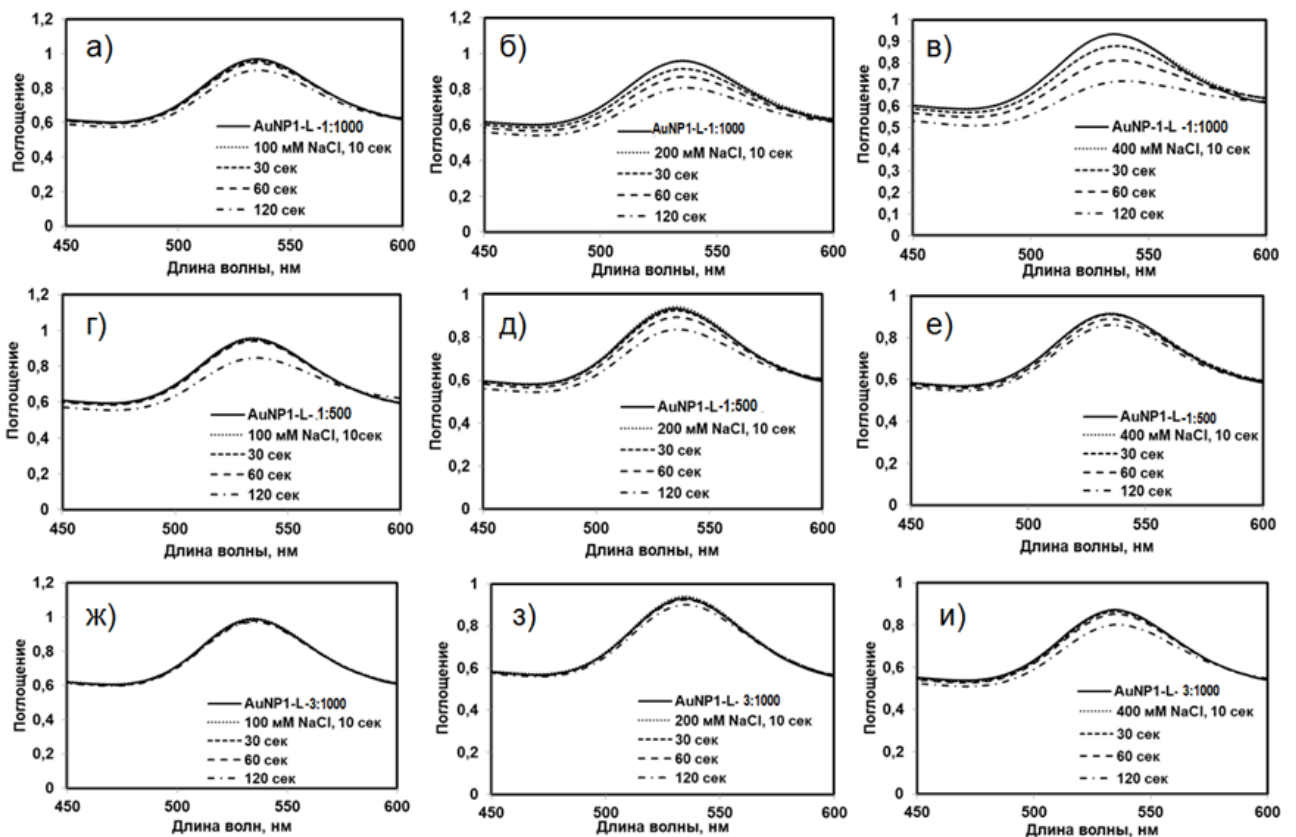


Рисунок 27 – Спектры поглощения AuNP1-L-1:1000 (а - в), AuNP1-L-1:500 (г - е), AuNP1-L-3:1000 (ж - и) в присутствии 100, 200 и 400 мМ NaCl

При этом, несмотря на то, что агрегация частиц проходила медленнее по сравнению с агрегацией AuNP1 (рисунок 25), с течением времени у AuNP-L-1:500 наблюдалось изменение цвета раствора с красного на синий, что говорит о слипании частиц. При увеличении концентрации липидной смеси до соотношения 3:1000 агрегации AuNP1-L не наблюдалось при 100 мМ NaCl, но при более высоких концентрациях (200 и 400 мМ NaCl) наблюдалось постепенное снижение поглощения, что говорит о медленной агрегации наночастиц (рисунок 27ж-и). Таким образом, AuNP1-L-1:200 оказались наиболее стабильными в присутствии ионов натрия.

Кроме того, была исследована роль цитрата в стабилизации AuNP путем синтеза AuNP2, в котором использовался тринатрийцитрат вдвое большей концентрации по сравнению с AuNP1. Увеличение концентрации тринатрийцитрата привело к образованию AuNP2 с более высоким поглощением (Abs: 1,2) по отношению к AuNP1 (Abs: 0,92) (рисунок 28а).

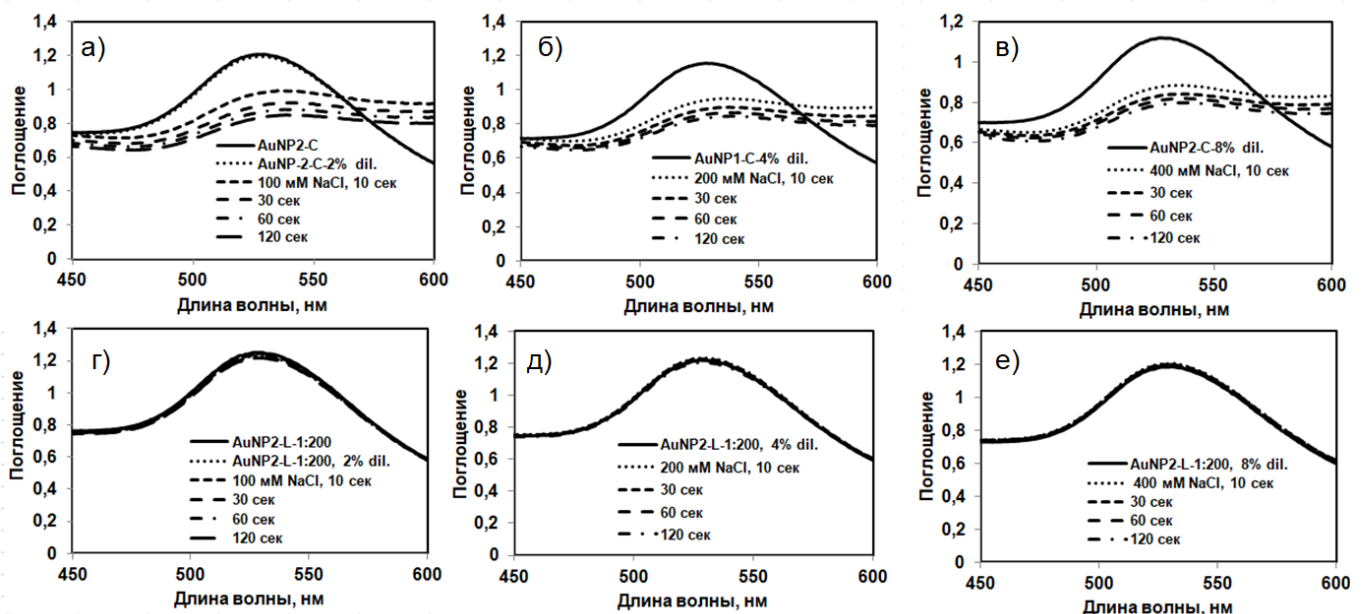


Рисунок 28 – Спектры поглощения AuNP2 (а – в) и AuNP2-L (г – е) в присутствии 100, 200, 400 мМ NaCl. 2% (4%; 8%) dil. – 2% (4%; 8%) разведение водой.

Наблюдалось изменение агрегации AuNP2 по сравнению с AuNP1. В этом случае сдвиг пика в красную область и его расширение были более выраженными (рисунок 28а-в), однако стабильность AuNP2-L-1:200 оставалась на прежнем

уровне (рисунок 28г – е). Стабильность AuNP2-L была также изучена при более низких соотношениях липидной смеси и AuNP (1:1000, 1:500 и 3:1000), что представлено на рисунок 29. Результат показал поразительную разницу в стабильности AuNP2-L по сравнению с AuNP1-L. Даже при наименьшем соотношении липидной смеси и AuNP (1:1000), наблюдалось незначительное снижение поглощения в отличие от AuNP1-L (1:1000–3:1000) (рисунок 27а - в) и (рисунок 29а - в) соответственно.

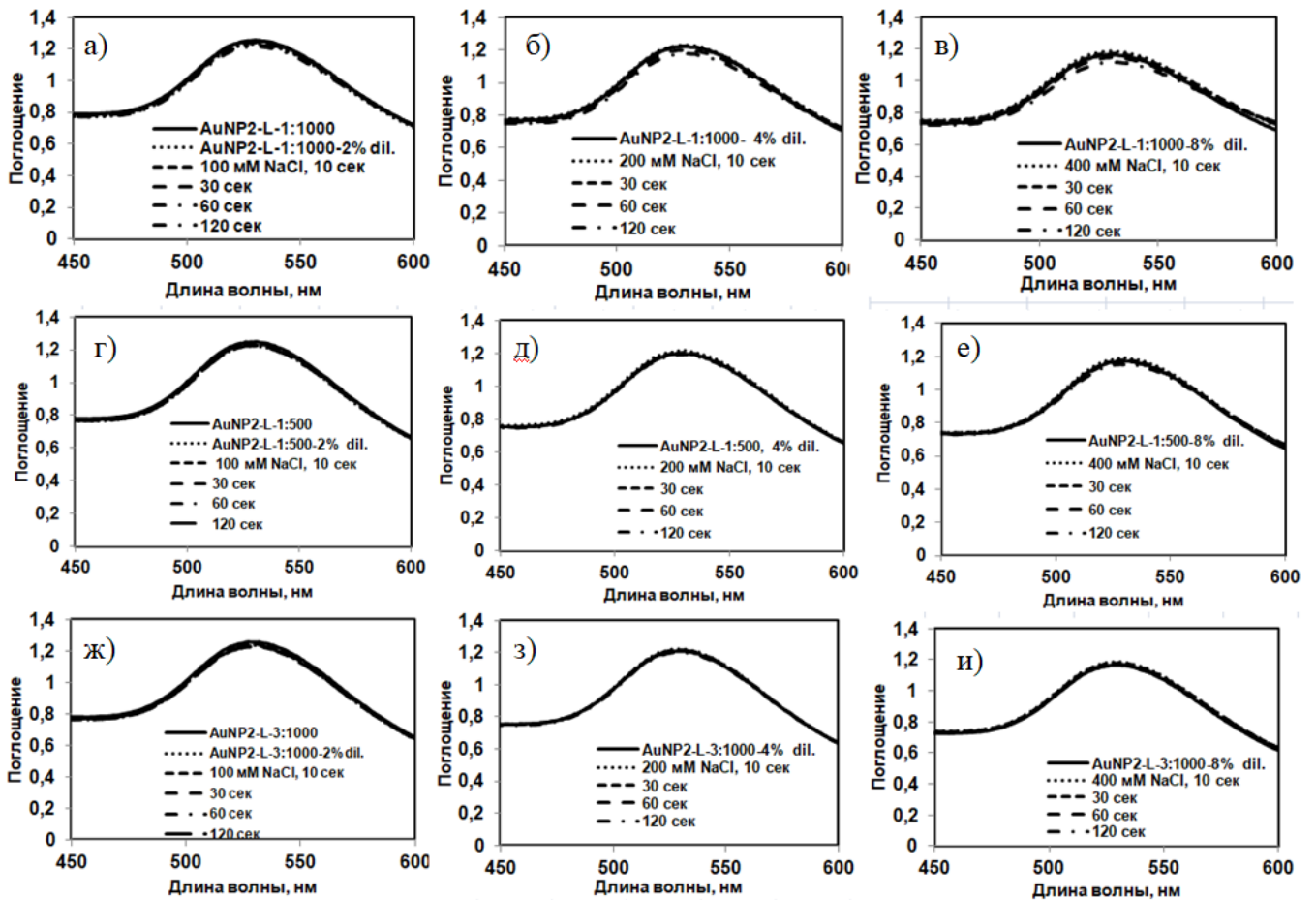


Рисунок 29 – Спектры поглощения AuNP2-L с различным содержанием липидной смеси в присутствии 100, 200 и 400 мМ NaCl. 2% (4%; 8%) dil. – 2% (4%; 8%) разведение водой

Таким образом, следует подчеркнуть роль тринатрий цитрата в повышении стабильности наночастиц золота при обработке их липидной смесью. Возможное

объяснение этого явления заключается в улучшенном экранировании AuNP2-L от ионов.

Однако, стабильность AuNP, синтезированных с использованием AgNO_3 в качестве дополнительного компонента (AuNP3 и AuNP4), была значительно ниже. Было обнаружено, что агрегация AuNP3-L-1:200 под действием NaCl значительно выше (рисунок 30).

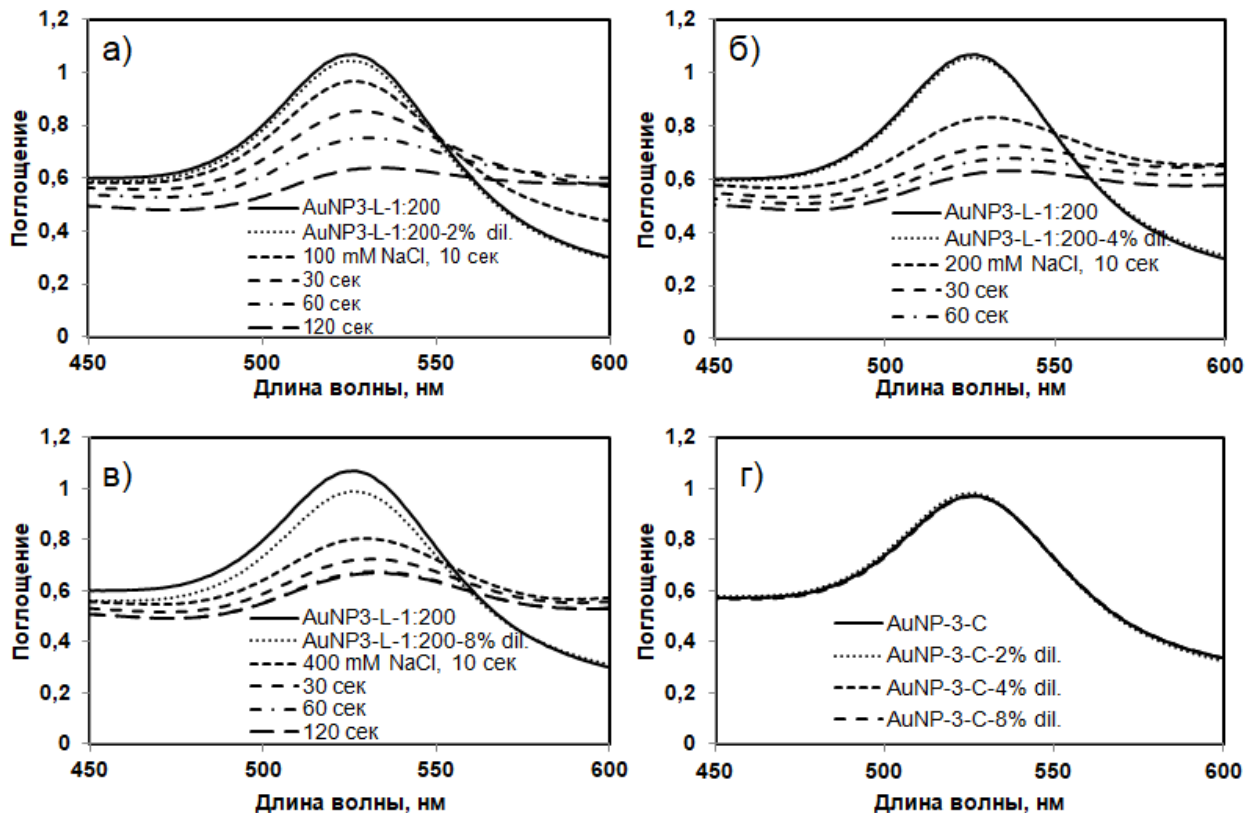


Рисунок 30 – Спектры поглощения AuNP3-L-1:200 в присутствии 100 – 400 мМ NaCl (а – в); г – спектры поглощения контрольных разведений AuNP3, где AuNP3-C – контроль, 2% (4% ; 8%) dil. – 2% (4%; 8%) разведение водой

Кроме того, чтобы увидеть эффект стабилизации при 100 мМ NaCl, были исследованы AuNP3-L-1:50 с количеством стабилизирующего агента в четыре раза больше (рисунок 31), но тенденция снижения поглощения оставалась почти такой же. Чтобы подтвердить роль ионов Ag^+ в дестабилизации AuNP, был синтезирован AuNP4 путем удвоения концентрации AgNO_3 . В этом случае было обнаружено, что ни AuNP4, ни AuNP4-L-1:200 не обладали устойчивостью к

ионному воздействию (рисунок 32). Полученные результаты показали, что ионы Ag^+ играют существенную роль в дестабилизации AuNP с липидной оболочкой [158].

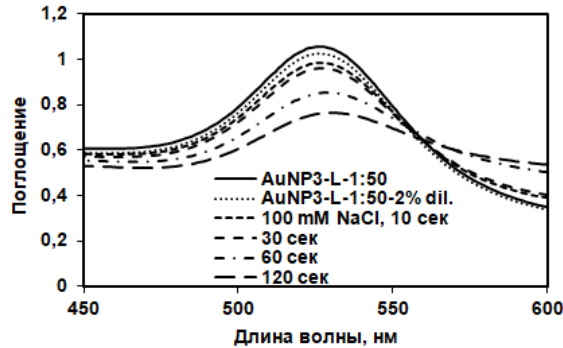


Рисунок 31 – Спектры поглощения AuNP3-L-1:50 в присутствии 100 мМ NaCl, где 2% dil. – 2% разведение водой

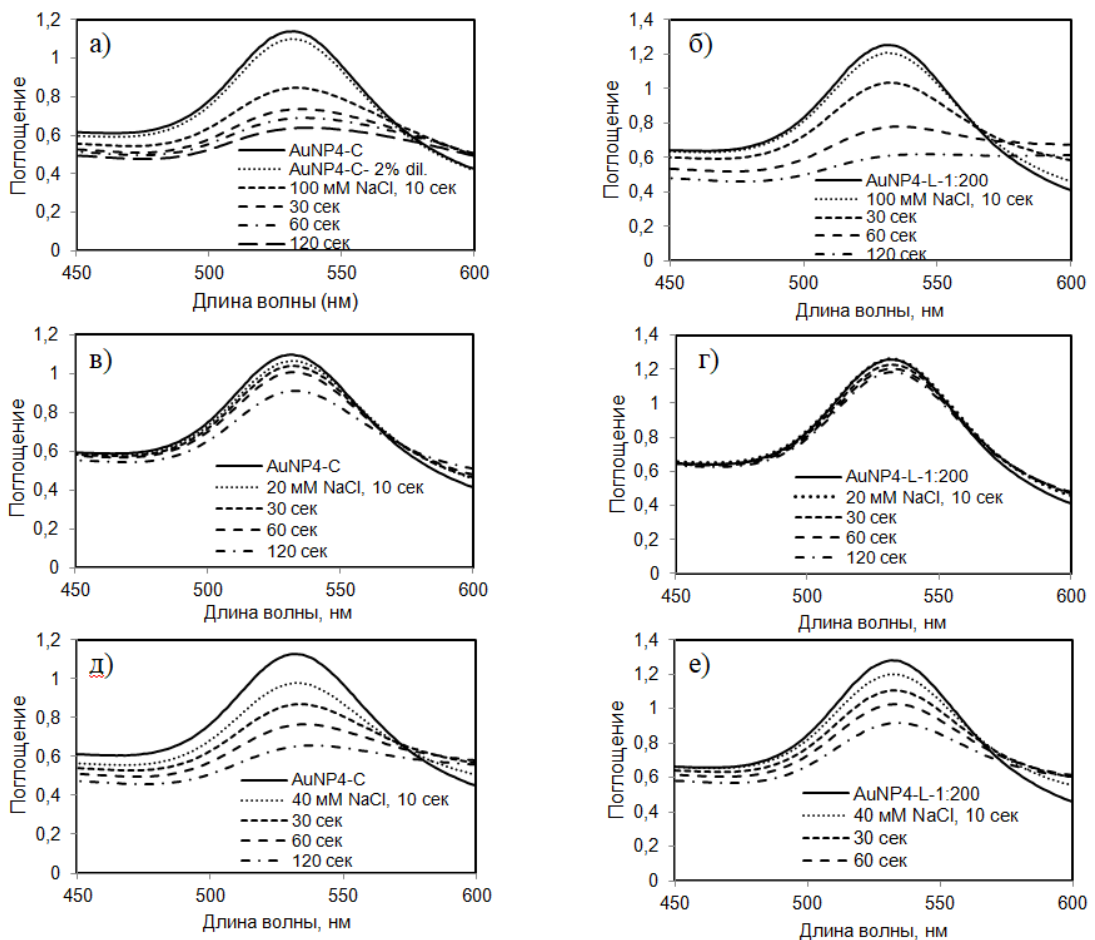


Рисунок 32 – Спектры поглощения AuNP4 и AuNP4-L-1:200 в присутствии 20–100 мМ NaCl, где AuNP4-C – контроль, AuNP4-L-1:200 – наночастицы золота, стабилизированные липидной смесью, 2% dil. – 2% разведение водой

3.3.1.2 Взаимодействие ферментов биолюминесцентных систем с наночастицами золота

Полученные наночастицы были использованы для проверки возможности усиления биолюминесцентного сигнала, исходящего в результате ферментных реакций светляков и бактерий. Усиление сигнала может происходить за счет взаимодействия излучения, возникающего в результате биолюминесцентной химической реакции, с поверхностными плазмонами на наночастицах металла [104]. При этом важным условием для реализации такого взаимодействия является расстояние от молекулы, излучающей свет, до наночастицы. Правильное положение металлических наночастиц и люциферазы обеспечивает перенос энергии, при этом спектры поглощения металлических наночастиц должны находиться в диапазоне спектров биолюминесценции люциферазы, чтобы вызывать перенос энергии. Поверхность наночастиц, модифицированных цитратом, покрыта карбоксильными группами и обладает отрицательным суммарным зарядом, что способствует электростатическому притяжению к положительно заряженным группам белка [109].

При добавлении AuNP и AuNP-L к люциферин-люциферазной системе светляков, было отмечено, что интенсивность света остается чуть ниже уровня контроля, то есть не отличается от интенсивности света в системе без AuNP (рисунок 33). Это может свидетельствовать о том, что происходит безизлучательный перенос энергии между FLuc и наночастицей, и наблюдается тушение люминесценции наночастицами золота. В работе [163] было показано, что ковалентное связывание нанокристаллов золота (GNC) с пероксидазой хрена (HRP) значительно улучшает излучение люминесценции, при этом усиление становится возможным только тогда, когда расстояние GNC-HRP находится в ограниченном диапазоне от 5 до 20 нм. Вероятно, для достижения эффекта усиления биолюминесценции FLuc необходимо изменить такие параметры наночастиц как размер и форма, а также варьировать расстояние между люциферазой и наночастицей.

Ранее в работе [109] наблюдалось усиление активности FLuc примерно в пять раз через пять часов совместного инкубирования FLuc с разными наночастицами золота и серебра. Эти данные говорят об отложенном эффекте усиления биолюминесценции (эффект МЕВ), который достигается при длительном взаимодействии FLuc и наночастиц. При этом авторы показали, что при использовании люциферазы *Renilla* эффект усиления люминесценции в 3-5 раз наблюдался в течение 15 минут [109].

В настоящей работе исследовали влияние AuNP и AuNP-L на изменение интенсивности свечения биолюминесценции ферментной системы Red + BLuc. Растворы AuNP (или AuNP-L) и FMN помещали в пробирку эппендорф и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем проводили биолюминесцентный анализ. В присутствии наночастиц золота наблюдалось увеличение интенсивности свечения в 1,6 раз (рисунок 33). При этом наличие липидной оболочки вокруг золотых наночастиц не оказывало значительного эффекта на изменение сигнала.

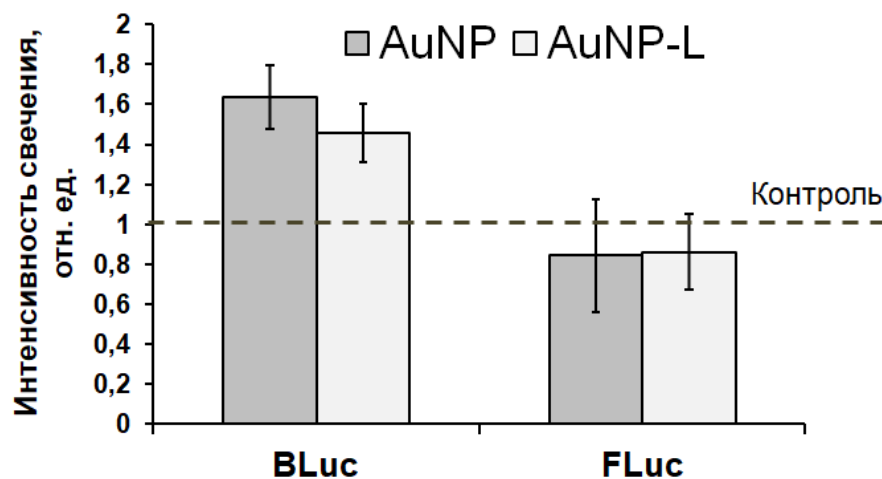


Рисунок 33 – Нормированная интенсивность свечения а) FLuc и б) Red + BLuc в присутствии образцов наночастиц золота: AuNP и AuNP-L. Контролем выступает интенсивность свечения в системе в отсутствие AuNP

Следует отметить, что ранее эффект МЕВ наблюдался для светящихся бактерий *Aliivibrio fischeri* и рекомбинантных бактерий *E. Coli* [103,104,164], при

этом усиление сигнала происходило в 1,5-2,5 раза, что согласуется с полученными в настоящей работе результатами. Усиление сигнала ферментной системы Red + FLuc говорит о возможности применения данного подхода для изменения сигнала люминесценции путем варьирования формы и размера наночастиц золота с целью поиска оптимальных параметров.

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). AuNP-АТР были исследованы с помощью анализатора размеров частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). В таблице 2 представлены данные измерения ζ -потенциала AuNP-АТР, синтезированных с использованием различного содержания АТР (10, 20, 30, 40, 50 мМ АТР). Наблюдалось увеличение ζ -потенциала полученных наночастиц с увеличением концентрации АТР, используемой при синтезе. При этом размер частиц варьировался от 6 до 7,9 нм без какой-либо корреляции от концентрации АТР.

Таблица 2 - Характеристика наночастиц золота с оболочкой АТР

Образец	Концентрация АТР при синтезе	Размер частиц (нм)	ζ -среднее, диаметр (нм)	Полидисперсность	ζ -потенциал (мВ)
AuNP-АТР 1	10 мМ	7,7	$33,9 \pm 0,51$	$0,585 \pm 0,01$	$- 38,9 \pm 6,9$
AuNP-АТР 2	20 мМ	7,9	$40,9 \pm 6,11$	$0,868 \pm 0,055$	$- 32,7 \pm 11,3$
AuNP-АТР 3	30 мМ	6	$36,95 \pm 4,12$	$0,635 \pm 0,177$	$- 28,9 \pm 3,0$
AuNP-АТР 4	40 мМ	6,4	$21,43 \pm 0,57$	$0,712 \pm 0,023$	$- 25,6 \pm 3,09$
AuNP-АТР 5	50 мМ	7	$25,60 \pm 4,79$	$0,690 \pm 0,139$	$- 15,9 \pm 1,68$

Была исследована возможность взаимодействия FLuc с AuNP-АТР. При использовании раствора AuNP-АТР вместо АТР в люциферин-люциферазной

реакции наблюдался высокий люминесцентный сигнал, пропорциональный концентрации АТР, используемого при синтезе наночастиц, что говорит о присутствии в растворе большого количества свободного АТР, не связанного с ядрами наночастиц. Для удаления свободного АТР из раствора использовали апиразу.

После добавления апиразы в раствор AuNP-АТР уже в первые секунды наблюдался резкий спад биолюминесценции, что свидетельствует о быстром взаимодействии апиразы со свободным АТР в растворе наночастиц. После чего сигнал постепенно снижался до фонового уровня в течение 30-40 минут (рисунок 34). После термоденатурации апиразы интенсивность свечения увеличивалась на два порядка и оставалась постоянной с течением времени. Согласно калибровочному графику (рисунок 35) после денатурации апиразы концентрация АТР в растворе наночастиц соответствовала 50-80 нМ.

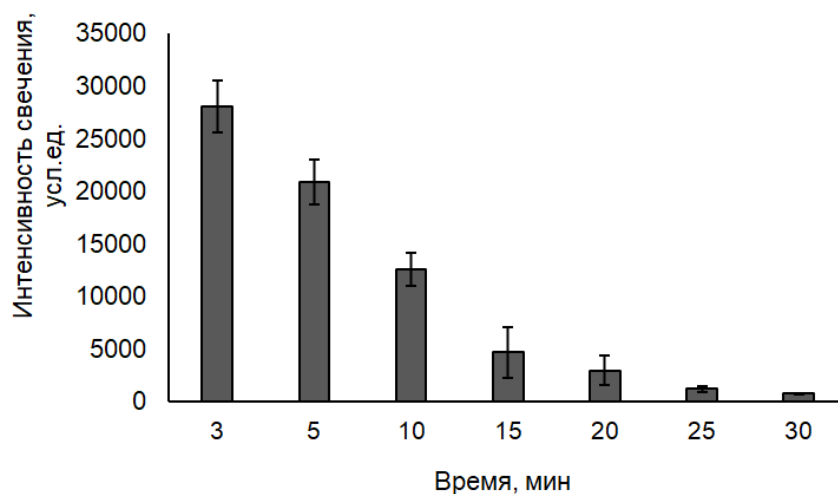


Рисунок 34 – Интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы в присутствии AuNP-АТР, инкубированных совместно с апиразой

При этом наночастицы оставались стабильны в присутствии NaCl во время всего эксперимента (рисунок 36), что говорит о наличие оболочки вокруг ядра, которая предотвращает агрегацию наночастиц.

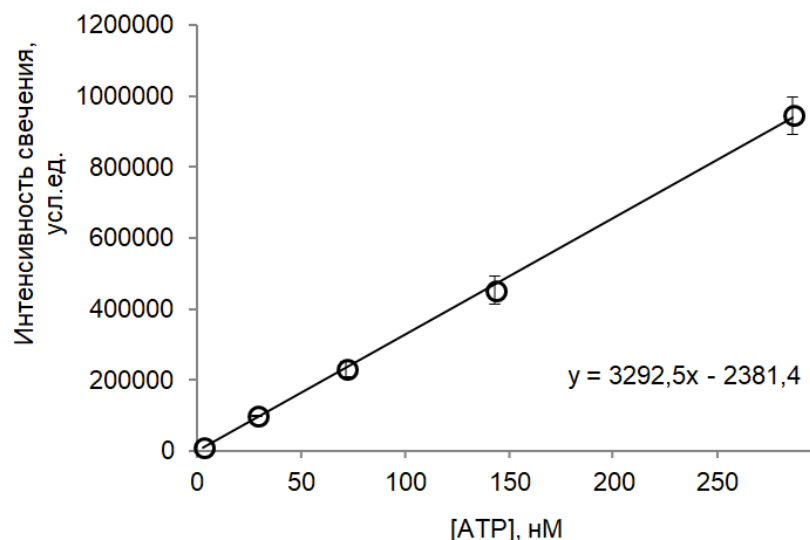


Рисунок 35 – Калибровочный график зависимости интенсивности свечения от концентрации АТР

Борогидрид натрия (NaBH_4), используемый в ходе синтеза наночастиц, является сильным восстановителем, и увеличение его концентрации в растворе AuNP-АТР может привести к агрегации частиц. При этом в процессе агрегации частиц предполагается отсоединение молекул АТР от золотого ядра, что приводит к повышению концентрации свободного АТР в растворе.

Действительно, при добавлении к синтезированным наночастицам 10 мМ NaBH_4 наблюдалось медленное изменение цвета раствора наночастиц. При повышении концентрации NaBH_4 до 100 мМ наблюдалась быстрая агрегация AuNP-АТР. На рисунке 37 представлен график зависимости интенсивности свечения от концентрации АТР в трех образцах наночастиц в присутствии или отсутствии NaBH_4 .

Сигнал биолюминесценции не меняется при агрегации частиц относительно контроля, за который был принят раствор AuNP-АТР. Данный результат может свидетельствовать о том, что при агрегации наночастиц FLuc взаимодействует только со свободным АТР, находящимся в растворе, при этом концентрация АТР в растворе практически не меняется. Для подтверждения этого наблюдения было

проведено исследование кинетики биолюминесцентной реакции в присутствии AuNP-АТФ методом остановленного потока.

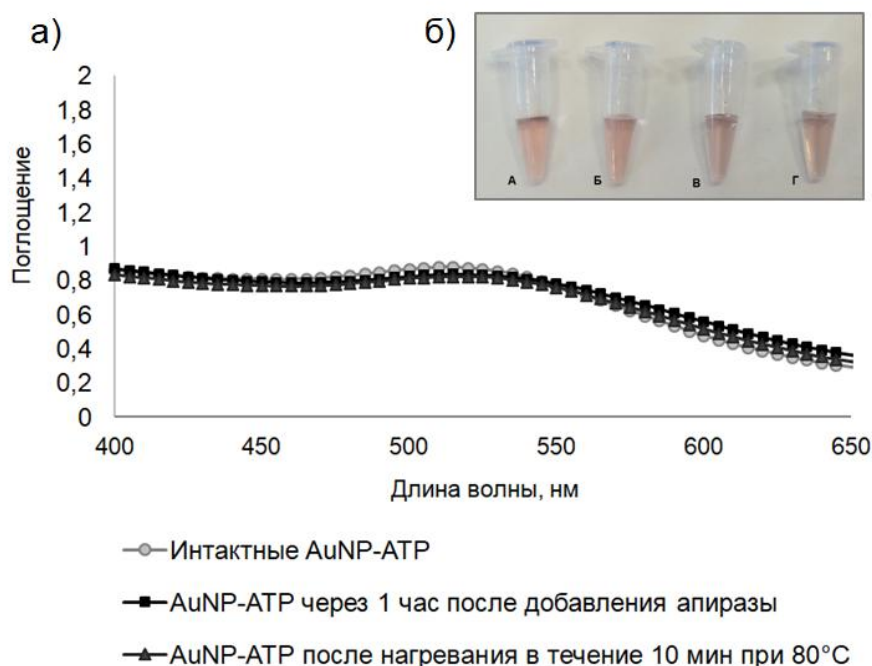


Рисунок 36 – а) Спектры поглощения наночастиц золота AuNP-АТФ 1) в интактном состоянии; 2) через 1 час после добавления апиразы; 3) после нагревания в течение 10 мин при 80°С; б) наночастицы золота с оболочкой АТФ: А – AuNP-АТФ, Б – AuNP-АТФ + NaCl, В – AuNP-АТФ + апираза + NaCl, Г – AuNP-АТФ + денатурированная апираза + NaCl

Для запуска биолюминесцентной реакции использовали AuNP-АТФ, синтезированные с 10 мМ АТФ и разбавленные таким образом, что конечные концентрации АТФ в реакционной смеси составляли 5 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ, 0,5 мМ, 2,5 мМ. В качестве контроля использовали раствор АТФ тех же концентраций. Кинетика люциферазы в присутствии AuNP-АТФ и АТФ представлена на рисунке 38. При концентрации АТФ 5 мкМ кинетика люциферазной реакции в присутствии АТФ отличается от кинетики реакции в присутствии AuNP-АТФ (рисунок 38а). При этом при увеличении концентрации АТФ до 0,5 мМ кинетика реакции была схожа, но максимум интенсивности

свечения в присутствии раствора AuNP-АТР отличался от контроля примерно в 3 раза (рисунок 38б).

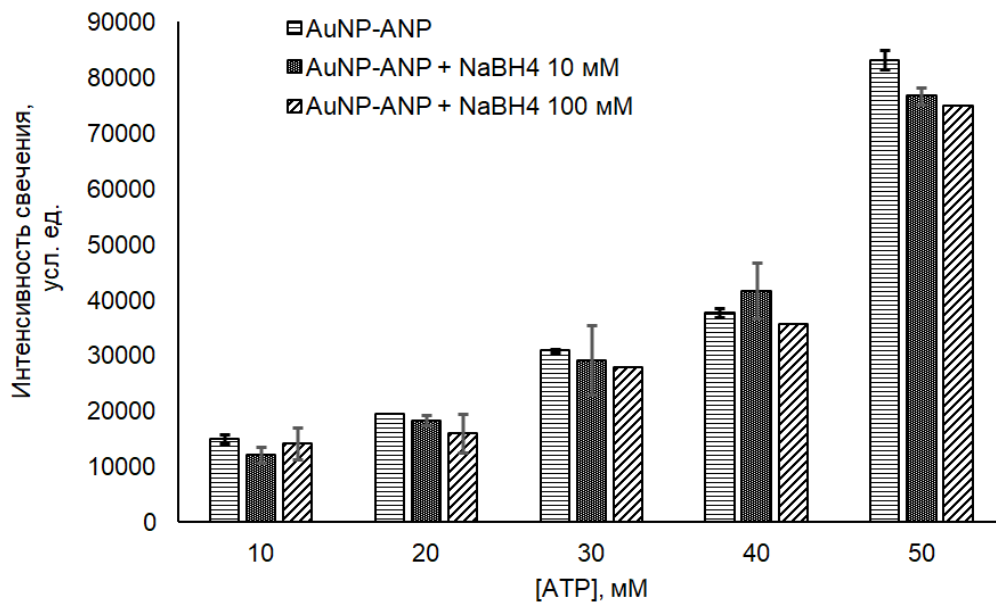


Рисунок 37 – Изменение интенсивности свечения люциферин-люциферазной системы в присутствии наночастиц золота с оболочкой АТР, агрегированных в присутствии NaBH₄

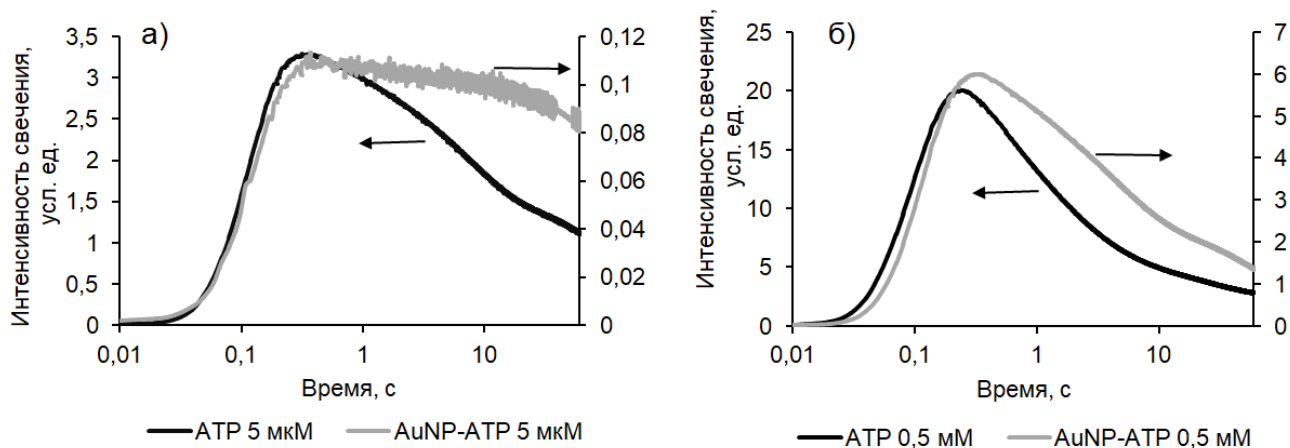


Рисунок 38 – Кинетика люциферин-люциферазной реакции в присутствии AuNP-АТР и АТР а) 5 мкМ, б) 0,5 мМ

Однако было замечено, что в присутствии 25 мкМ AuNP-АТФ и 0,5 мкМ АТФ кинетика реакции в обоих случаях одинакова (рисунок 39). Что может служить свидетельством взаимодействия люциферазы со свободным АТФ одинаковой концентрации. Таким образом, можно сказать, что концентрация свободного АТФ в растворе AuNP-АТФ примерно в 50 раз меньше концентрации АТФ, используемой при синтезе частиц.

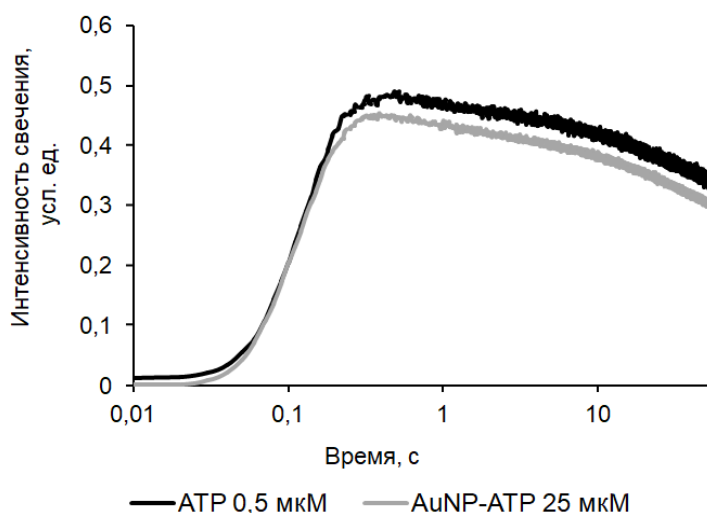


Рисунок 39 – Кинетика люциферин-люциферазной реакции в присутствии 25 мкМ AuNP-АТФ и 0,5 мкМ АТФ

Это наблюдение подтверждается тем, что зависимость интенсивности свечения от концентрации свободного АТФ и квантовый выход реакции в обоих случаях совпадают (рисунок 40). Полученные данные подтверждают, что АТФ покрывает золотое ядро наночастиц, способствуя их стабилизации, при этом АТФ является недоступным для взаимодействия с FLuc, вследствие чего FLuc взаимодействует только со свободным АТФ. Таким образом, полученные AuNP-АТФ не способствуют усилению биолюминесценции, поэтому в целях повышения чувствительности метода рекомендовано использовать наночастицы, синтезированные цитратным методом.

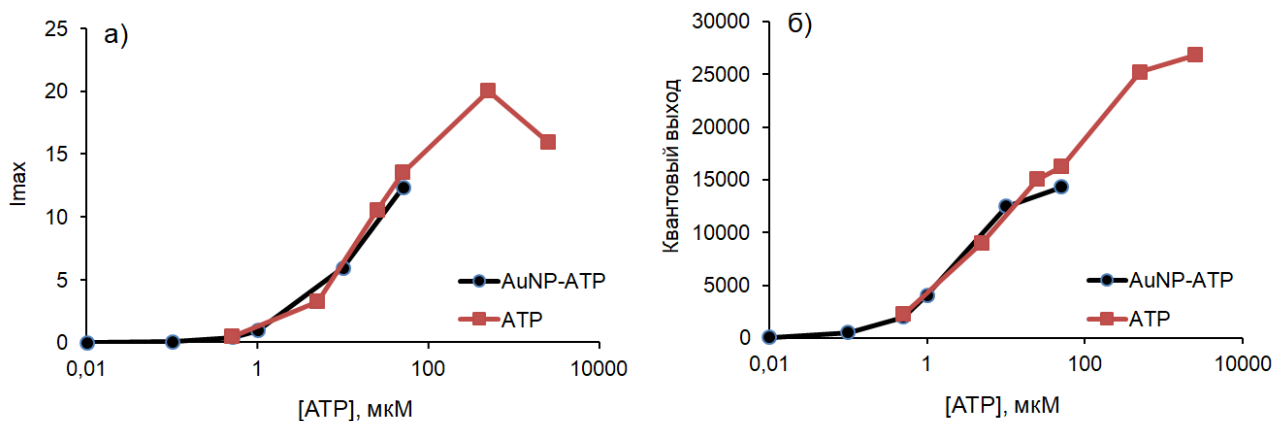


Рисунок 40 – а) максимумы интенсивности свечения FLuc и б) квантовый выход биолюминесцентной реакции в присутствии AuNP-ATP и ATP

3.4 Белки теплового шока как стабилизаторы люциферазы светляков

Белок теплового шока (Hsp) 90 является высоко консервативным и широко распространенным молекулярным шапероном, который помогает сворачиванию белков и способствует стабильному поддержанию гомеостаза белков [127,165]. Это универсальный многофункциональный белок в живой системе, который сверхэкспрессируется в стрессовых условиях, например при реакции теплового шока, в раковых клетках, нейродегенеративных заболеваниях и вирусных инфекциях [166–168]. Выживание раковых клеток в значительной степени зависит от Hsp90, его кофакторов и ко-шаперонов, которые восстанавливают и поддерживают белки в их естественной форме.

Hsp90 получил большое внимание благодаря его сверхэкспрессии в раковых клетках с примерной АТРазной активностью в 100 раз выше, чем у нормальных клеток [169]. Hsp90 стабилизирует клиентские белки, которые способствуют онкогенезу, такие как киназы, сигнальные белки и факторы транскрипции [170]. Поэтому в качестве терапевтического метода для борьбы с раком применяется ингибирование Hsp90 [171,172]. Исследования рефолдинга на основе люциферазы светляков (FLuc) открыли новые перспективы для высокопроизводительного

скрининга потенциальных ингибиторов Hsp90 [173–176]. Было показано, что Hsp90 обеспечивает эффективный рефолдинг FLuc при инкубации с лизатом ретикулоцитов кролика (RRL), который является источником необходимых ко-шаперонов, таких как Hsp70, Hsp40, Hop и др. [177–179]. Образование необратимых агрегатов FLuc предотвращалось, когда частично денатурированную FLuc инкубировали с Hsp90. Однако каталитическая активность FLuc восстанавливалась только тогда, когда Hsp90 был дополнен лизатом ретикулоцитов кролика. Недавние исследования показали, что только Hsp90 помогает восстановить каталитическую активность FLuc до 20%, а в присутствии АТФ до 45%. Добавление ко-шаперона Aha1 к Hsp90 и АТФ увеличивало биолуминесценцию до 55% [180]. В настоящей работе исследовали изменение люминесценции и кинетики FLuc в присутствии Hsp90 и апиразы [181].

3.4.1 Зависимость активности Hsp90 от температуры

Hsp90 представляет собой АТФазу с константой диссоциации (K_d) в диапазоне 100 – 840 мкМ, при этом связывание и гидролиз АТФ определяют способность Hsp90 восстанавливать клиентские белки *in vivo* и *in vitro* [182]. Hsp90 имеет V-образную открытую конформацию в нативной форме, которая подвергается большим, АТФ-опосредованным конформационным изменениям, что приводит к закрытому состоянию [127].

Исследование зависимости активности Hsp90 от температуры проводили путем инкубирования Hsp90 совместно с АТФ в течение 45 минут при различных температурах (4°C, 30°C, 50°C и 70°C). По истечении времени раствор Hsp90 добавляли в реакционную смесь, содержащую люциферин-люциферазную систему светляков, и регистрировали люминесцентный сигнал. На рисунок 41 показана АТФазная активность Hsp90 после инкубирования. Затухание люминесценции как показатель деградации АТФ наблюдалось как в контрольной пробе, содержащей только АТФ, так и в пробе, содержащей Hsp90 и АТФ. Более

низкий сигнал люминесценции в присутствии Hsp90 и АТР по отношению к контролю говорит о наличии меньшего количества свободного АТР в растворе. Однако следует отметить, что распад АТР в контроле, возможно, происходил из-за низкой стабильности АТР при более высоких температурах. Стоит отметить, что активность Hsp90 сохранялась при всех температурах, однако в дальнейшем для проверки способности Hsp90 сохранять активность FLuc в условиях термоденатурации, использовали температуру 50°C, что согласуется с предыдущими исследованиями [177].

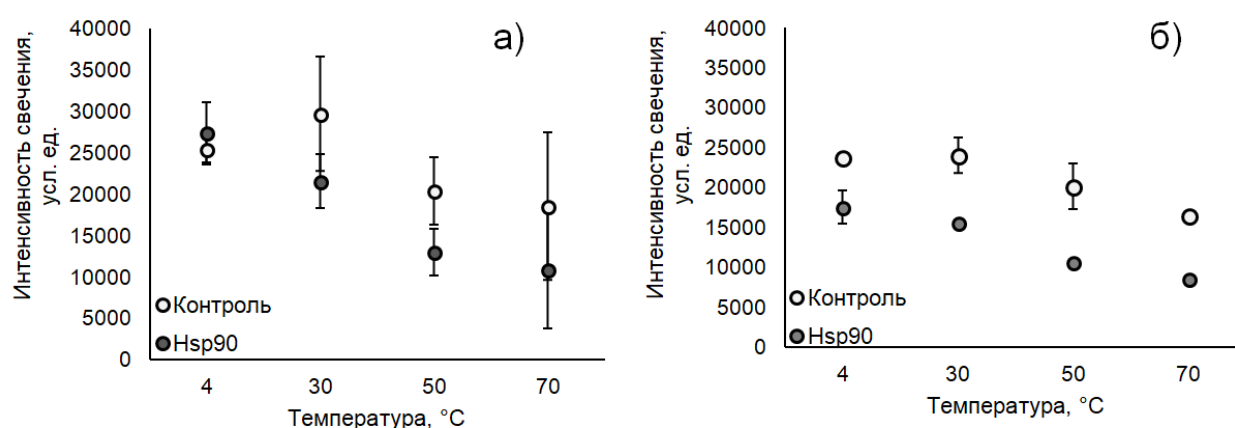


Рисунок 41 – Зависимость АТР-азной активности Hsp90 от температуры при инкубировании в течение а) 15 минут и б) 45 минут. За контроль брали раствор 0,8 мкМ АТР

3.4.2 Анализ рефолдинга люциферазы

Влияние Hsp90 на FLuc в присутствии и отсутствие АТР анализировали без использования RRL или дополнительных шаперонов. Было обнаружено, что в присутствии Hsp90 и АТР активность FLuc увеличивалась (рисунок 42а). Однако после инкубирования при 50°C в течение 15 минут образец, содержащий FLuc, Hsp90 и АТР, имел наибольший сигнал люминесценции по сравнению с образцами, содержащими FLuc и Hsp90, FLuc и АТР, FLuc, что указывает на защитную роль Hsp90 против нестабильности FLuc во время анализа. Рисунки 42а

и 42б демонстрируют роль Hsp90 в предотвращении ингибирования FLuc продуктами реакции. FLuc окисляет D-люциферин в присутствии кислорода и АТФ, что приводит к образованию продуктов – ингибиторов FLuc, таких как оксилюциферин, аденозин-5'-монофосфат и пирофосфат [76]. Биолуминесцентная реакция FLuc происходит быстро, однако, ингибирование FLuc является одной из причин затухания люминесценции с течением времени.

Однако при добавлении в реакционную смесь БСА сигнал люминесценции был выше по сравнению с сигналом реакционной смеси, содержащей FLuc, Hsp90 и АТФ (рисунок 42в). Несмотря на то, что БСА увеличивает устойчивость к поверхностной инактивации и защищает FLuc от ингибирования продуктами, БСА не способствует стабилизации FLuc при высокой температуре (рисунок 42г).

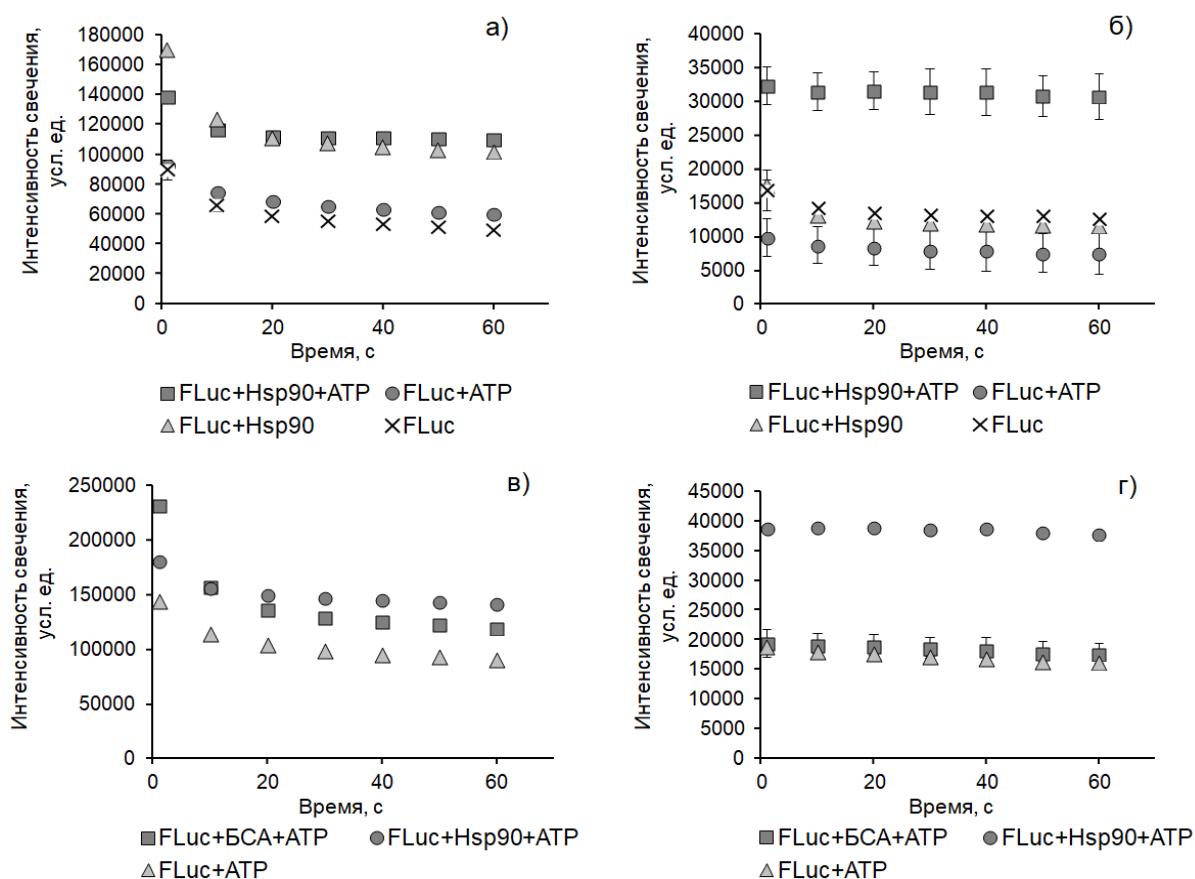


Рисунок 42 – Интенсивность свечения реакционной смеси в присутствии образцов (а, в) без инкубации; (б, г) инкубированных при 50°C в течение 15 мин. Каждая точка представляет собой среднее значение двух измерений.

Ранее были опубликованы аналогичные результаты, показывающие улучшение стабильности FLuc с использованием гидрофобина-1, который связывается с внешней поверхностью FLuc и защищает от агрегации при повышении температуры [183]. Также известно, что осмолиты способствуют стабилизации FLuc, увеличивая энергию активации белка [184]. Тем не менее, роль Hsp90 в восстановлении клиентского белка является незаменимой и уникальной [185,186]. Более того ранее было показано, что Hsp90 способен без участия дополнительных шаперонов предотвращать агрегацию и восстанавливать активность казеинкиназы 2 [187], цитратсинтазы [188] и белка p53 [189].

3.4.3 Зависимость АТРазной активности апиразы от температуры.

Взаимодействие Hsp90 и апиразы

Люциферин-люциферазная система светляков может быть использована для анализа Hsp90 как биомаркера стресса, опосредованно через другие белки, например апиразу. Апираза является мощной АТРазой и катализирует гидролиз АТР [190]. Анализ АТРазной активности апиразы с использованием FLuc проводили при различной температуре (рисунок 43). Апиразу инкубировали совместно с АТР при температуре 20 – 70°C в течение 30 минут, затем добавляли в реакционную смесь, содержащую FLuc, D-люциферин и трис-ацетатный буфер. Апираза сохраняет свою активность при температуре ниже 40°C (рисунок 43). При повышении температуры инкубирования апиразы до 50°C и 70°C, сигнал люминесценции возрастал, что свидетельствовало о термической инактивации апиразы. Это наблюдение было учтено при изучении роли Hsp90 в стабилизации апиразы, которое проводили путем совместного инкубирования апиразы и Hsp90 при 50° С. Так, при добавлении в реакционную смесь, содержащую люциферин-люциферазную систему светляков, апиразу и Hsp90 в присутствии АТР наблюдалась потеря люминесцентного сигнала. При этом в отсутствие апиразы сигнал люминесценции возрастал (рисунок 44).

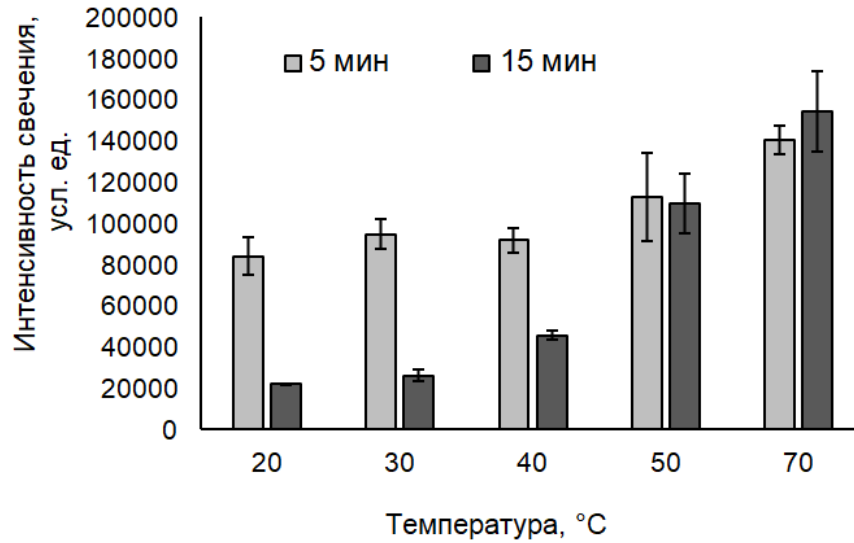


Рисунок 43 – Интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы светлячков в присутствии апиразы, инкубированной при разной температуре в течение 5 и 15 минут

Рисунок 44 демонстрирует сохранение активности апиразы в присутствии Hsp90 и АТФ даже при 50°C. При инкубировании апиразы с Hsp90 и АТФ в течение 15 минут люминесцентного сигнала не наблюдалось, что говорит о способности апиразы гидролизовать АТФ, делая его недоступным для FLuc.

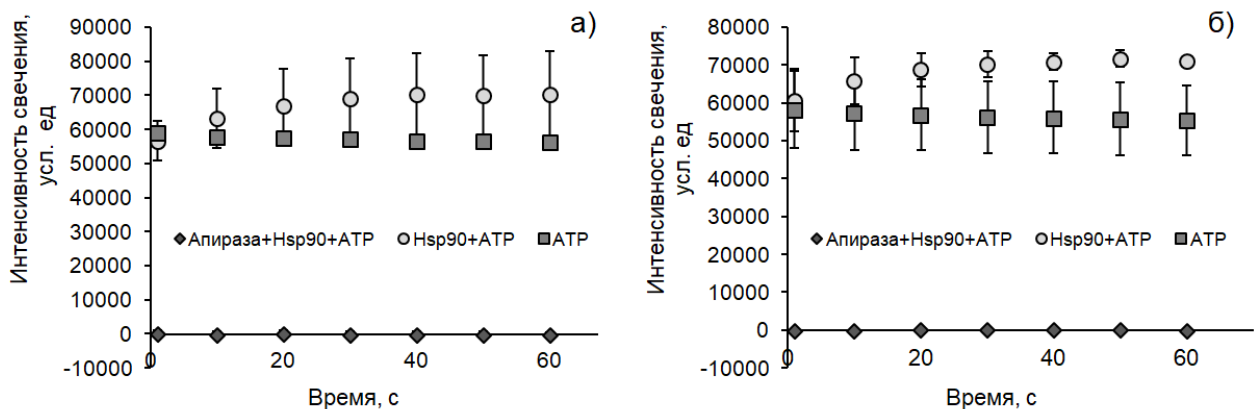


Рисунок 44 – Интенсивность свечения FLuc в присутствии образцов апиразы, совместно инкубированной с Hsp90 при 50°C в течение а) 15 мин, б) 30 мин

Однако следует отметить, что предварительно агрегированная апираза не может восстановить свою активность в присутствии Hsp90.

При сравнении рисунков 42 и 44 можно заметить, что FLuc теряет примерно 60% активности через 15 минут инкубирования с Hsp90 и АТФ, в то время как апираза сохраняла активность после инкубационного периода 15 - 30 минут в присутствии Hsp90 и АТФ.

Таким образом, несмотря на то, что для восстановления активности денатурированной люциферазы необходим шаперонный комплекс, состоящий из Hsp90, Hsp70, Hsp40 и Нор [191], в настоящей работе наблюдали сохранение активности FLuc в присутствии Hsp90 и АТФ при повышенной температуре. Настоящее исследование показало, что Hsp90 обладает потенциалом предотвращения агрегации люциферазы в отсутствие других шаперонов.

ГЛАВА 4 СОЗДАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АТР

4.1 Иммобилизация люциферазы светляков

В главе 3 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.

Иммобилизация позволяет сделать ферменты более устойчивыми к изменениям внешних условий, например повышению температуры или изменению ионной силы раствора. Иммобилизованные ферменты удобны в использовании и подходят в качестве биораспознающего элемента биосенсоров.

Иммобилизацию FLuc проводили в крахмальный (3, 4 и 5 %) и желатиновый (1; 1,2; 1,5; 1,7 %) гели. Выбор гелей в качестве носителя для иммобилизации FLuc обусловлен их относительно низкой стоимостью, простотой процедуры иммобилизации, а также ранее представленными данными об успешной иммобилизации биолюминесцентных ферментных систем светящихся бактерий [144,146]. В работе [145] было показано отсутствие существенных изменений в функционировании люциферин-люциферазной системы светляков в 5% желатиновом геле. В настоящей работе наибольшая активность иммобилизованной FLuc достигалась при использовании 1%-ного желатинового геля [73]. В процессе иммобилизации суспензия гелей с внесенной FLuc подвергалась дозированию по 25 мкл на фторопластовую подложку с последующим высушиванием. Полученные реагенты представляли собой тонкие диски диаметром 6 – 7 мм (рисунок 14а). После 24 часов высушивания FLuc, иммобилизованной в крахмальный гель, диски оставались липкими, что препятствовало отделению их от гидрофобной подложки и приводило к невозможности их использования. Несмотря на то, что ранее крахмальный гель

был успешно использован для иммобилизации других ферментных систем, например, биолюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий [39,44] и бутирилхолинэстеразы [45-47], данный носитель оказался неподходящим для иммобилизации люциферазы светляков, возможно из-за взаимодействия компонентов буферных растворов с крахмальным гелем, препятствующим полному высыханию дисков с иммобилизованной FLuc.

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. В литературе имеются данные о применении стабилизирующих добавок при иммобилизации ферментов в гели [96], что способствует повышению активности иммобилизованных ферментов.

На увеличение активности люциферин-люциферазной системы светляков в водном растворе добавление стабилизирующих добавок, таких как БСА и ДТТ, оказало положительный эффект. Однако, действие стабилизирующих агентов на иммобилизованную в желатиновый гель FLuc может отличаться от того, что наблюдали в растворе.

Было обнаружено, что добавление сахарозы в желатиновый гель препятствует полному высыханию иммобилизованных реагентов, что приводит к их повреждению и создает 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 (рисунок 45а). Показано, что после 2,5 месяцев хранения реагент, содержащий FLuc, иммобилизованную совместно с 0,5 мМ ДТТ, сохраняет 60% от первоначальной активности (рисунок 46).

Ранее было показано, что БСА способствует стабилизации FLuc *Luciola praeusta* во время хранения [99]. Однако в данной работе несмотря на то, что БСА

способствовал стабилизации растворимой FLuc (рисунок 21а), добавление БСА в иммобилизованный реагент, содержащий 0,5 мМ ДТТ, не приводило к увеличению активности иммобилизованной FLuc (рисунок 45б). Полученные данные для FLuc схожи с тем, что ранее было показано для иммобилизованной в желатиновый гель BLuc [96].

Более того, из рисунка 46 видно, что внесение БСА не приводит к увеличению времени хранения реагента. Действительно, активность FLuc, иммобилизованной с добавлением 0,5 мМ ДТТ (контроль), практически не отличается от активности FLuc, иммобилизованной с добавлением одновременно 0,5 мМ ДТТ и БСА разных концентраций. Таким образом, в качестве компонентов, входящих в состав реагента чувствительного к АТФ и пригодного для использования в качестве биологического элемента биосенсора, были использованы FLuc (4 мкг на один реагент) и ДТТ (0,5 мМ).

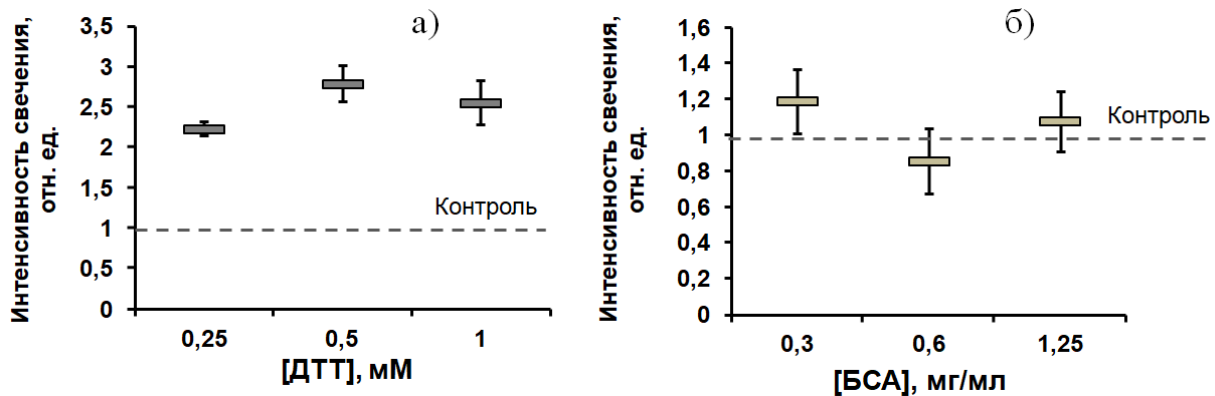


Рисунок 45 – Зависимость интенсивности свечения от концентрации стабилизирующих добавок в иммобилизованном реагенте: а) ДТТ и б) БСА различной концентрации совместно с 0,5 мМ ДТТ. Контроль – интенсивность свечения иммобилизованной FLuc без стабилизирующих добавок.

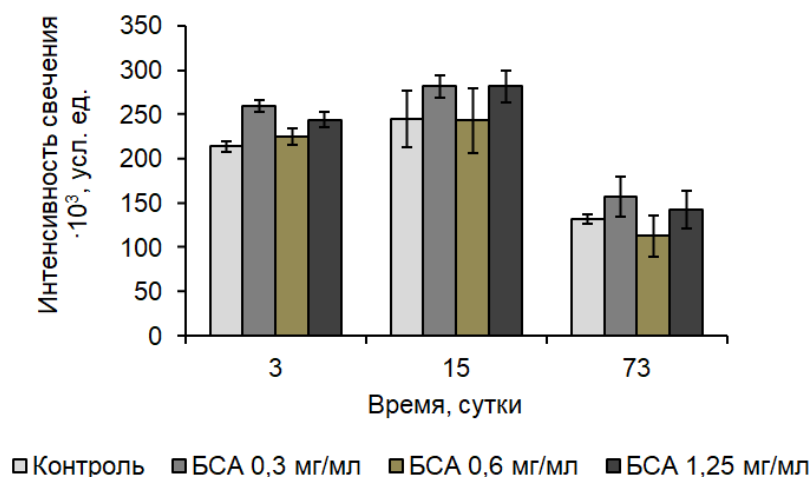


Рисунок 46 – Влияние БСА и ДТТ на активность иммобилизованной FLuc при хранении при температуре 4°C. ДТТ присутствовал во всех образцах, включая контроль, в концентрации 0,5 мМ.

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 *Escherichia coli*, разрушенные ультразвуковым дезинтегратором при частоте 44 кГц. Образцы добавляли по 10 мкл в реакционную смесь вместо раствора FMN или NADH. Для построения зависимости интенсивности свечения от количества клеток в образце клеточные суспензии разбавляли дистиллированной водой. Каждый раз перед добавлением анализируемого образца в реакционную смесь измерялось фоновое свечение.

С помощью калибровочной зависимости активности FLuc, иммобилизованной в 1% желатиновый гель, от концентрации АТР, была

установлена корреляция между интенсивностью свечения иммобилизованной FLuc и количеством лизированных клеток *E. coli* в реакционной смеси (рисунок 47). Предел обнаружения определяли как количество клеток, при внесении которых в реакционную смесь интенсивность свечения FLuc в 3 раза превышала интенсивность фонового свечения. 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.

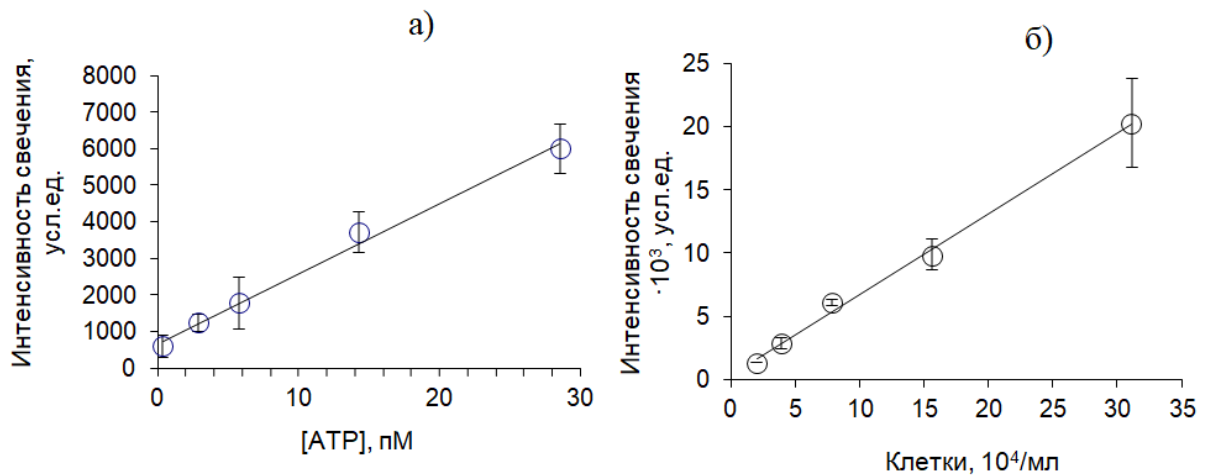


Рисунок 47 – Зависимость интенсивности свечения иммобилизованной FLuc от а) концентрации АТР в растворе; б) количества лизированных клеток *E. Coli*

Для сравнения полученных результатов с биолюминесцентной системой Red + BLuc был проведен анализ микробного загрязнения по обнаружению NADH и FMN. При этом для достижения минимального предела обнаружения бактериальных клеток, в работе была использована ферментативная системы в растворимой форме.

Предел обнаружения биолюминесцентной системы 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 [192] (рисунок 48), что в 40 раз превышает предел обнаружения бактериальных клеток системой FLuc.

Полученные результаты говорят о том, что в силу высокого фонового свечения, система Red + VLuc не способна определять ультрамалые количества микробных клеток. Тем не менее, система Red + VLuc может применяться для анализов других образцов. По этой причине данная ферментная система нашла активное применение в интегральном анализе определения малых концентраций ингибиторов, таких как тяжелые металлы или пестициды [55,56,193]. В этом случае нет необходимости достижения низкого предела обнаружения субстратов, поскольку анализ происходит за счет инактивации активности ферментов в присутствии ингибитора.

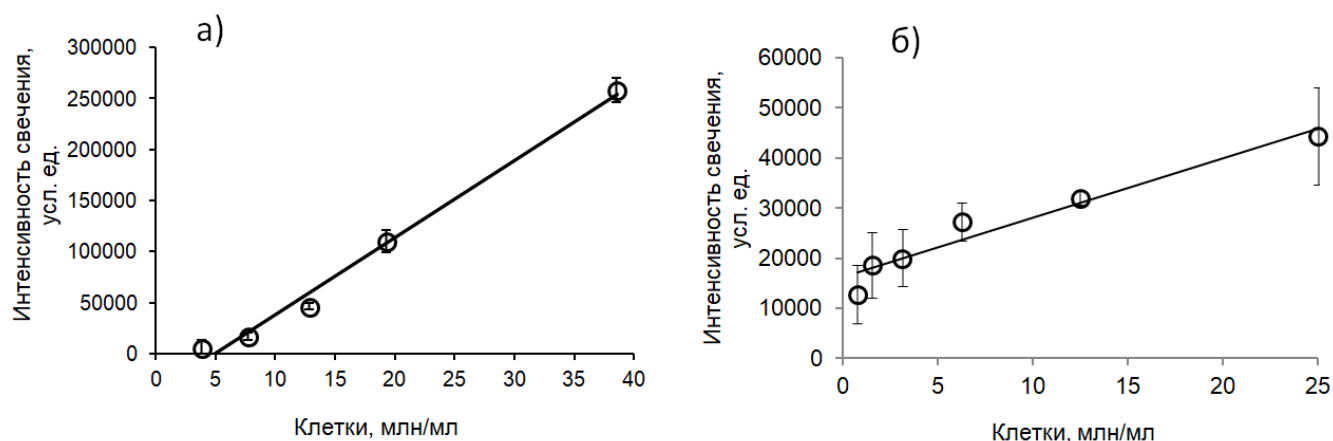


Рисунок 48 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы Red + VLuc от количества бактериальных клеток а) при использовании методики, основанной на количественном определении FMN, б) при использовании методики, основанной на количественном определении NADH

4.1.3 Иммуобилизация D-люциферина

Одним из способов упрощения процедуры проведения биолюминесцентного ферментативного анализа является включение в биологический элемент одного из субстратов реакции. Подобный подход был успешно применен ранее при разработке целого ряда многокомпонентных

ферментных препаратов. Так, в работах [134,146,194] описано получение многокомпонентного реагента, включающего биолюминесцентную биферментную систему светящихся бактерий, а также ее субстраты NADH и миристиновый альдегид. В работе [195] одновременно с бутирилхолинэстеразой в иммобилизованный препарат вносили индикатор тиоловых групп 5,5-дителиобис-(2-нитробензойную кислоту). В работе [38] проводили совместную иммобилизацию FLuc и D-люциферина на бумажные диски, пригодные для оценки микробного загрязнения воздуха с пределом обнаружения $2,32 \cdot 10^3$ кл/мл. В работе [196] FLuc и D-люциферина также были иммобилизованы на бумажный носитель с возможностью обнаружения 10 фмоль АТФ. В настоящей работе получены реагенты, содержащие совместно иммобилизованные в 1% желатиновый гель FLuc и ее субстрат D-люциферин. Из рисунка 49а видно, что активность многокомпонентных реагентов зависит от концентрации внесенного D-люциферина. Оптимальная концентрация D-люциферина составляет 2,5 мМ, в этом случае максимальная интенсивность свечения на 40% меньше по сравнению с таковой для FLuc, иммобилизованной без D-люциферина (контроль). Таким образом, совместная иммобилизация FLuc и D-люциферина приводит к снижению интенсивности свечения иммобилизованного реагента.

Отдельную иммобилизацию D-люциферина проводили согласно процедуре, описанной в разделе 2.17. Подобно иммобилизованной FLuc, реагенты с иммобилизованным D-люциферинем представляют собой сухие диски небольшого размера (рисунок 14б), каждый диск предназначен для проведения одного анализа. Для проведения анализа в кювету помещали 4 мкл раствора FLuc ($5,5 \cdot 10^{12}$ усл.ед./мг), 1 иммобилизованный диск, содержащий люциферин и буферный раствор. Затем добавляли раствор АТФ, помещали кювету в люминометр и регистрировали интенсивность свечения. В качестве контроля использовали реакционную смесь, состоящую из буферного раствора, 4 мкл FLuc, 20 мкл раствора люциферина и раствора АТФ.

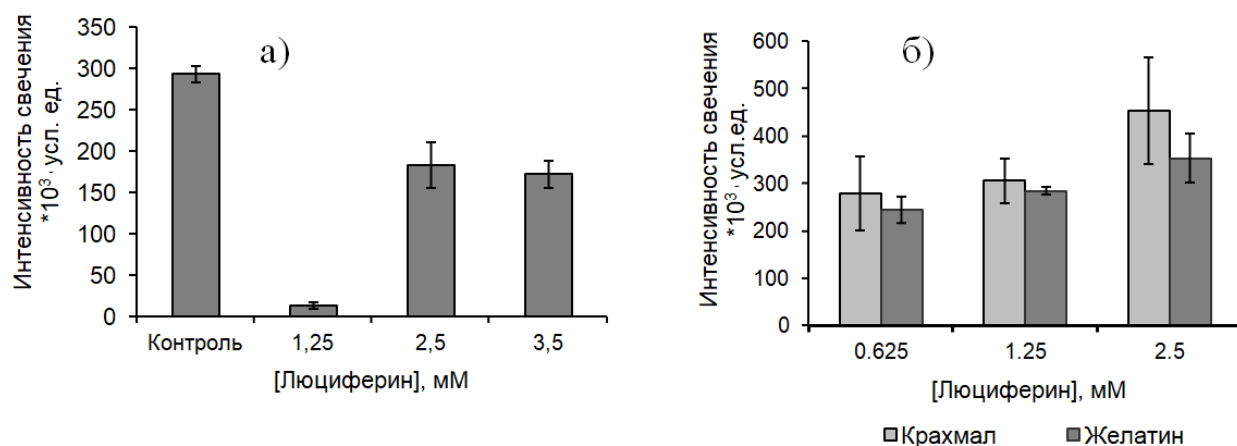


Рисунок 49 – Интенсивность свечения реагентов различного состава на основе люциферин-люциферазной системы светляков: а) Интенсивность свечения многокомпонентного иммобилизованного в 1% желатиновый гель реагента включающего FLuc и D-люциферин разных концентраций; б) Интенсивность свечения FLuc в присутствии иммобилизованного D-люциферина (FLuc в реакционную смесь вносили в виде раствора, реакцию запускали добавлением 20 мкл 50 нМ раствора АТР); иммобилизацию проводили в 3% крахмальном и 1% желатиновом гели.

Раздельная иммобилизация FLuc и D-люциферина в крахмальном и желатиновом гели показала, что интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы светляков возрастает с увеличением концентрации D-люциферина в иммобилизованном реагенте. При этом гелевая структура желатина и крахмала не препятствует перемещению молекул D-люциферина в раствор. Достоверных различий в активности биолюминесцентной системы в зависимости от природы геля, используемого для иммобилизации D-люциферина, не наблюдается (рисунок 49б). Тем не менее, в силу того, что при использовании для иммобилизации D-люциферина крахмального геля наблюдали большой разброс в значениях биолюминесцентного сигнала, для создания реагента наиболее подходящим носителем был выбран желатиновый гель, в этом случае предел определения АТР составил 0,3 пМ.

На рисунке 50 представлено сравнение активности биolumинесцентной системы светлячков в зависимости от условий проведения анализа. Показано, что при использовании FLuc и D-люциферина, иммобилизованных в 1% желатиновый гель как совместно, так и по-отдельности, интенсивность свечения находится на уровне контроля, т.е. интенсивности свечения растворимой FLuc в присутствии раствора D-люциферина.

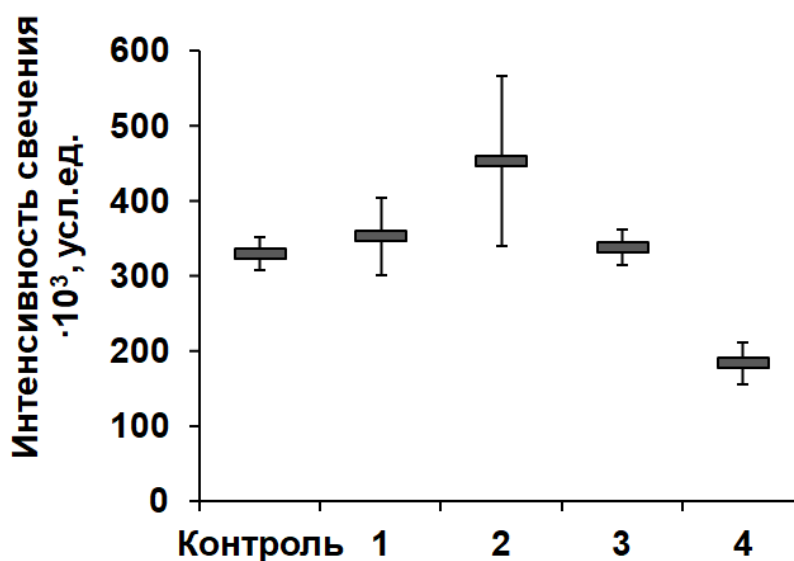


Рисунок 50 – Интенсивность свечения люциферин-люциферазной системы светлячков при разных условиях. Реакционные смеси содержали 4,2 мкг FLuc, 2,5 мМ D-люциферина и 3 нМ АТФ. Контроль – FLuc и D-люциферин в виде растворов; 1 – FLuc в виде раствора и D-люциферин, иммобилизованный в желатиновый гель, 2 – FLuc, в виде раствора и D-люциферин, иммобилизованный в крахмальный гель, 3 – два реагента: FLuc и D-люциферин отдельно иммобилизованные в желатиновый гель, 4 – многокомпонентный реагент, содержащий совместно иммобилизованные в желатиновый гель FLuc и D-люциферин

Таким образом, иммобилизация D-люциферина отдельно или совместно с FLuc позволила существенно упростить процедуру количественного определения АТФ в образце. Для количественного определения АТФ в кювету с анализируемым образцом помещают два иммобилизованных реагента (рисунок 14), один из которых содержит FLuc, а второй – D-люциферин, и измеряют интенсивность свечения. Или используют один многокомпонентный реагента, включающий оба компонента реакции. 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 ферментативных 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 (АТФ, NADH, FMN), важным фактором при увеличении чувствительности является достижение максимального отношения сигнал/фон, что достигается за счет строгого подбора 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 + VLuc 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, представлен метод иммобилизации FLuc и D-люциферина в желатиновый гель, что позволило создать 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. Во-вторых, 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. Дополнительно рассмотрена система из двух ферментов FLuc и апиразы в присутствии Hsp90. Hsp90 восстанавливает активность апиразы при повышении температуры, что было продемонстрировано с помощью люциферин-люциферазной системы светляков. Было отмечено, что при частичной термоинактивации FLuc теряет примерно 60% люминесцентного сигнала даже в присутствии Hsp90, в то время как потери активности апиразы не наблюдалось. Полученные результаты показывают возможность конструирования ферментативного биораспознающего элемента на основе апиразы и FLuc. Этот подход не только расширяет температурный диапазон применения биосенсора, но и открывает перспективы для создания аналитических систем, позволяющих по изменению активности шаперонов прогнозировать стрессовые состояния и заболевания.

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

Таким образом, полученные результаты показывают значимость различных 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 АТФ 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 люциферинем 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 АТФ. 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 АТР-системы по чувствительности анализа, которая составила $2 \cdot 10^4$ кл/мл при обнаружении АТР, $3,9 \cdot 10^6$ кл/мл и $8 \cdot 10^5$ кл/мл при обнаружении FMN и NADH соответственно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору Валентине Александровне Кратасюк за помощь в работе над диссертацией; к.б.н. Елене Николаевне Есимбековой – за всестороннюю поддержку и совместную работу над публикациями, а также Ранджану Раджеву – за наставничество и помощь в проведении экспериментов. Автор также глубоко признательна к.б.н. Жаркову Сергею Михайловичу, заведующему лабораторией электронной микроскопии, за помощь в исследовании наночастиц золота, использованных в работе, и обсуждение полученных результатов, а также Ивану Владимировичу Опарину и Эльвире Васильевне Кирилловой за постоянную поддержку.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ADP** – аденозин-5'- дифосфат
- AgNP** – наночастицы серебра
- Aha1** - ко-шаперон белка теплового шока 90
- AMP** - аденозин монофосфат
- ATP**- аденозин-5'-трифосфат
- AuNP** – наночастицы золота
- AuNP-ATP** –наночастицы золота, покрытые оболочкой ATP
- AuNP-L** – наночастицы золота, покрытые липидной оболочкой
- BAC** - бензалкония хлорид
- BLuc** – люцифераза светящихся бактерий
- CTP** - цитидин-5'-трифосфат
- Cys** – цистиамин
- D-LH₂-AMP** - люцифериладенилат
- DMSO** - диметилсульфоксид
- DnaJ** – молекулярный шаперон, аналог Hsp40 у прокариот
- DnaK** - молекулярный шаперон прокариот
- ED** - этилендиамин
- EDC** - 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
- EDS** - энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
- ELISA** - иммуноферментный анализ
- FLuc** – люцифераза светляков
- FMN** – флавиномононуклеотид
- FMNH₂** - флавиномононуклеотид восстановленный
- GNC** - нанокристаллы золота
- GrpE** - фактор нуклеотидного обмена прокариот
- GTP** - гуанозин-5'-трифосфат
- HAuCl₄** - тетрахлороаурат(III) водорода

Hop – ко-шаперон белков теплового шока 70 и 90

HRP - пероксидаза хрена

Hsp40 - белок теплового шока 40

Hsp70 – белок теплового шока 70

Hsp90 - белок теплового шока 90

HtpG – молекулярный шаперон прокариот

Km – константа Михаэлиса

LH₂ - люциферин

LSPR - локализованный поверхностный плазмонный резонанс

MEB - усиление биоллюминесценции посредством металлических частиц

NADH - никотинамиддинуклеотид восстановленный

NTP - нуклеозидтрифосфат

PPi - пирофосфат

Red - NADH:FMN-оксидоредуктаза

RRL - лизат ретикулоцитов кролика

TEM - просвечивающий электронный микроскоп

TTP - тимидин-5'-трифосфату

BSA – бычий сывороточный альбумин

ДТТ - дитиотрейтол

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karunakaran, C. Enzymatic Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics* / C. Karunakaran, T. Madasamy, N.K. Sathy. – Elsevier, 2015. – P. 133–204.
2. Lopreside, A. Bioluminescence goes portable: recent advances in whole-cell and cell-free bioluminescence biosensors / A. Lopreside, M.M. Calabretta, L. Montali, M. Zangheri, M. Guardigli, M. Mirasoli, E. Michelini // *Luminescence*. – 2021. – Vol. 36. – N 2. – P. 278–293.
3. Branchini, B.R. A highly sensitive biosensor for ATP using a chimeric firefly luciferase. In *Methods in Enzymology* / B.R. Branchini, T.L. Southworth. – Elsevier, 2017. – Vol. 589. – P. 351–364.
4. Roda, A. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging / A.Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 28. – N. 3. – P. 307–322.
5. Bottari, B. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP / B. Bottari, M. Santarelli, E. Neviani // *Trends in Food Science & Technology*. – 2015. – Vol. 44. – N. 1. – P. 36–48.
6. Calabretta, M.M. ATP sensing paper with smartphone bioluminescence-based detection. In *Bioluminescence. Methods in Molecular Biology* / M.M. Calabretta, R. Alvarez-Diduk, E. Michelini, A. Merkoçi. – Humana: New York, NY, 2022. – Vol. 2525. – P. 297–307.
7. Moon, H.-S. Real-time detection of food-borne bacterial adenosine triphosphate (ATP) using dielectrophoretic force and a bioluminescence sensor / H.-S. Moon, H.T. Im, A. Choi, H.-I. Jung // *Microchimica Acta*. – 2010. – Vol. 170. – N. 3-4. – P. 283–288.
8. Syed, A.J. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond / A.J. Syed, J.C. Anderson // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – P. 38.
9. Branchini, B.R. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications / B.R. Branchini,

T.L. Southworth, D.M. Fontaine, D. Kohrt, M. Talukder, E. Marchegiani, L. Cevenini, A. Roda, M.J. Grossel // *Analytical Biochemistry*. – 2015. – Vol. 484. – P. 148–153.

10. Karp, M.T. Simultaneous Extraction and Combined Bioluminescent Assay of NAD⁺ and NADH. / M.T. Karp, R.P. Raunio, T.N.-E. Lövgren // *Analytical Biochemistry*. – 1983. – Vol. 128. – P. 175–180.

11. Nascetti, A. Integrated chemiluminescence-based lab-on-chip for detection of life markers in extraterrestrial environments / A. Nascetti, M. Mirasoli, E. Marchegiani, M. Zangheri, F. Costantini, A. Porchetta, L. Iannascoli, N. Lovecchio, D. Caputo, G. De Cesare, et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2019. – Vol. 123. – P. 195–203.

12. Santangelo, M.F. Integrating Printed Microfluidics with Silicon Photomultipliers for Miniaturised and Highly Sensitive ATP Bioluminescence Detection / M.F. Santangelo, S. Libertino, A.P.F. Turner, D. Filippini, W.C. Mak // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 99. – P. 464–470.

13. Yu, Q. A biosensor for measuring NAD⁺ levels at the point of care / A.Q. Yu, N. Pourmandi, L. Xue, C. Gondrand, S. Fabritz, D. Bardy, L. Patiny, E. Katsyuba, J. Auwerx, K. Johnsson // *Nature Metabolism*. – 2019. – Vol. 1. – P. 1219–1225.

14. Roda, B. Shining light on biosensors: chemiluminescence and bioluminescence in enabling technologies / B. Roda, S.K. Deo, G. O'Connor, M. Moraskie, S. Giordani, V. Marassi, A. Roda, S. Daunert // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2024. – Vol. 180. – P. 117975.

15. Inouye, S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions / S. Inouye // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2010. – Vol. 67. – P. 387–404.

16. Thorne, N. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology / N. Thorne, J. Inglese, D.S. Auld // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17. – N. 6. – P. 646–657.

17. Day, J.C. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin / J.C. Day, L.C. Tisi, M.J. Bailey // *Luminescence*. – 2004. – Vol. 19. – P. 8–20.

18. Marques, S.M. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions / S.M. Marques, J.C.G.E. Da Silva // *IUBMB Life*. – 2009. – Vol. 61. – N. 1. – P. 6–17.

19. Shimomura, O. Source of oxygen in the CO₂ produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin / O.Shimomura, T. Goto, F.H. Johnson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. –1977. – Vol. 74. – P. 2799–2802.

20. Угарова, Н.Н. Люцифераза светляков *Luciola Mingrelica*. Исторический аспект / Н.Н. Угарова, Г.Ю. Ломакина // *Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия*. – 2025. – Т. 66. – С. 25–42.

21. Ando, Y. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission / Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya, H. Akiyama // *Nature Photonics*. – 2008. – Vol. 2. – N. 1. – P. 44-47.

22. Niwa, K. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases / K. Niwa, Y. Ichino, S. Kumata, Y. Nakajima, Y. Hiraishi, D. Kato, V.R. Viviani, Y. Ohmiya // *Photochemistry and Photobiology*. – 2010. – Vol. 86. – N. 5. – P. 1046-1049.

23. Lundovskikh, I. Recombinant firefly luciferase in *Escherichia Coli* / I. Lundovskikh, E. Dementieva, N. Ugarova // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2000. – Vol. 88. – N.1. – P. 127–136.

24. Noda, K. Single bacterial cell detection using a mutant luciferase /K. Noda, T. Matsuno, H. Fujii, T. Kogure, M. Urata, Y. Asami, A. Kuroda // *Biotechnology Letters*. – 2008. – Vol. 30. – N. 5. – P. 1051–1054.

25. Lin, C.-J. In situ rapid evaluation of indoor bioaerosols using an ATP bioluminescence assay; Y.-T. Wang, K.-J. Hsien, Y.I. Tsai, P.-Y. Kung, J.-M. Chyan // *Aerosol and Air Quality Research*. – 2013. – Vol. 13. – N.3. – P. 922–931.

26. Venkateswaran, K. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities / K. Venkateswaran, N. Hattori, M.T. La Duc, R. Kern // *Journal of Microbiological Methods*. – 2003. – Vol. 52. – N. 3. – P. 367–377.

27. Andreu, N. Rapid in vivo assessment of drug efficacy against Mycobacterium Tuberculosis using an improved firefly luciferase / N. Andreu, A. Zelmer, S.L. Sampson, M. Ikeh, G.J. Bancroft, U.E. Schaible, S. Wiles, B.D. Robertson // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68. – N. 9. – P. 2118–2127.

28. Ashutosh. Use of Leishmania donovani field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening / Ashutosh, S. Gupta, Ramesh, S. Sundar, N. Goyal // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – N. 9. – P. 3776–3783.

29. Li, X. High-sensitive detection of organophosphate and carbamate pesticide residues in milk based on bioluminescence method / X.Li, J. Zhang, J. Chen, X. Pang, L. Yang, Y. Fan, Q. Yang, A. Chen // *Food Control*. – 2025. – Vol. 168. – P. 110933.

30. Trajkovska, S. Bioluminescence determination of enzyme activity of firefly luciferase in the presence of pesticides / S. Trajkovska, K. Tosheska, J.J. Aaron, F. Spirovski, Z. Zdravkovski // *Luminescence*. – 2005. – Vol. 20. – P. 192–196.31.

Murakami, S.; Sakakibara, T.; Eisaki, N. Bioluminescent adenosine phosphate ester assay and reagent // United States patent 5,891,659.1999 Apr. 6

31. Murakami, S.; Sakakibara, T.; Eisaki, N. Bioluminescent adenosine phosphate ester assay and reagent // United States patent 5,891,659.1999 Apr. 6

32. Crouch, S.P.M.; Slater, K.J. Method for determining cytolysis and cytotoxicity // United Kingdom patent GB 2 370 113. 19.06.2002

33. Murakami, S. Bioluminescent enzyme immunoassay using thermostable mutant luciferase and acetate kinase as a labelled enzyme / S. Murakami, K. Ito, T. Goto, S. Kamada, M. Maeda // *Analytica Chimica Acta*. – 1998. – Vol. 361. – N.1. – P. 19.

34. Luker, K.E. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation / K.E. Luker, M. Gupta, G.D. Luker // *The FASEB Journal* 2009. – Vol. 23. – N.5. – P. 823–834.

35. Gabriel, G.V.M. Novel application of pH-sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene

expression/location/ G.V.M. Gabriel, V.R.Viviani // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2014. – Vol. 13. – N. 12. – P. 1661–1670.

36. Roda, A. A portable bioluminescence engineered cell-based biosensor for on-site applications / A. Roda, L. Cevenini, E. Michelini, B.R. Branchini // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26. – 3647–3653.

37. Аль Ибрахим, Р.Н. Lux -биосенсоры для анализа внутриклеточного пула макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов / Р.Н. Аль Ибрахим, С.В. Баженов, М.Ю. Высоких, Ю.Э. Лю, А.Д. Власова, С.М. Бухалович, И.В. Манухов // *Биотехнология*. – 2024. – Т. 40. – № 4. – С. 19–26.

38. Nguyen, D.T. The development of paper discs immobilized with luciferase/D-luciferin for the detection of ATP from airborne bacteria / D.T. Nguyen, H.R. Kim, J.H.Jung, K.-B. Lee, B.C. Kim // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 260. – P. 274–281.

39. Zako, T. Monitoring of the refolding process for immobilized firefly luciferase with a biosensor based on surface plasmon resonance / T. Zako, K. Harada, T. Mannen, S. Yamaguchi, A. Kitayama, H. Ueda, T. Nagamune // *Journal of Biochemistry*. – 2001. – Vol. 129. – N.1. – P. 1–4.

40. Campbell, Z.T. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit / Z.T. Campbell, A. Weichsel, W.R. Montfort, T.O. Baldwin // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – N. 26. – P. 6085–6094.

41. Fisher, A.J. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution / A.J. Fisher, F.M. Raushel, T.O. Baldwin, I. Rayment // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – P. 6581–6586.

42. Deeva, A.A. The role of electrostatic interactions in complex formation between bacterial luciferase and NADPH:FMN-oxidoreductase / A.A. Deeva, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2017. – Vol. 20. – P. 1–14.

43. Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles and methods / O. Shimomura. – World Scientific, 2006. – P. 500.

44. Hastings, J.W. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J.W. Hastings, Q.H. Gibson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1963. – Vol. 238. – N. 7. – P. 2537–2554.

45. Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М.:Наука, 2009. – 245 с.

46. Суковатая, И.Е. Кинетические методы исследования биологических процессов. 2. Определение кинетических параметров и типов взаимодействия ферментов с эффекторами: метод. указания / И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк . – Сибирский федеральный университет: Красноярск, 2007. – 25 с.47.

47. Wall L. Subunit structure of the fatty acid reductase complex from *Photobacterium phosphoreum* / L. Wall, E.A. Meighen // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25. – N. 15. – P. 4315–4321.

48. Tu, S.-C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / S.-C. Tu // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2008. – Vol. 7. – N. 2. – P. 183–188.

49. Koike, H. 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio Fischeri*: Overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins1 / H. Koike, H. Sasaki, T. Kobori, S. Zenno, K. Saigo, M.E.P. Murphy, E.T. Adman, M. Tanokura // *Journal of Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 280. – N. 2. – P. 259–273.

50. Roda, A. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence / A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Guardigli // *Trends in Biotechnology*. – 2004. – Vol. 22. – N. 6. – P. 295–303.

51. Esimbekova, E.N. Current and prospective trends in the application of bioluminescent analysis in experimental brain studies / E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, N.A. Rozanova, V.I. Lonshakova-Mukina, I.G. Torgashina, Y.K. Komleva, M.R. Saridis, S.A. Korsakova, S.O. Yurchenko, A.B. Salmira // *Talanta*. – 2026. – Vol. 296. – P. 128510.

52. Esimbekova, E.N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E.N. Esimbekova, A.M. Kondik, V.A. Kratasyuk // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2013. – Vol. 185. – N. 7. – P. 5909–5916.

53. Kratasyuk, V.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova, M.I. Gladyshev, E.B. Khromichek, A.M. Kuznetsov, E.A. Ivanova // *Chemosphere*. – 2001. – Vol. 42. – N. 8. – 909–915.

54. Vetrova, E. Bioluminescence characteristics of lake Shira water. / E. Vetrova, V. Kratasyuk, N. Kudryasheva // *Aquatic Ecology*. – 2002. – Vol. 36. – N.2. – P. 309–315.

55. Esimbekova, E.N. Enzyme inhibition-based assay to estimate the contribution of formulants to the effect of commercial pesticide formulations / E.N. Esimbekova, V.P. Kalyabina, K.V. Kopylova, V.I. Lonshakova-Mukina, A.A. Antashkevich, I.G. Torgashina, K.A. Lukyanenko, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 2268.

56. Esimbekova, E.N. The effects of commercial pesticide formulations on the function of in vitro and in vivo assay systems: A comparative analysis / E.N. Esimbekova, V.P. Kalyabina, K.V. Kopylova, V.I. Lonshakova-Mukina, A.A. Antashkevich, I.G. Torgashina, K.A. Lukyanenko, V.A. Kratasyuk // *Chemosensors*. – 2022. – Vol. 10. – N. 8. – P. 328.

57. Kalyabina, V.P. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review / V.P. Kalyabina, E.N. Esimbekova, K.V. Kopylova, V.A. Kratasyuk // *Toxicology Reports*. – 2021. – Vol. 8. – P. 1179–1192.

58. Vetrova, E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Rimmel, S. Kotova, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // *Luminescence*. – 2007. – Vol. 22. – N.2. – P. 206–214.

59. Rimashevskaya, A.A. Bioluminescence inhibition bioassay for estimation of snow cover in urbanised areas within boreal forests of Krasnoyarsk city / A.A. Rimashevskaya, E.Y. Muchkina, O.S. Sutormin, D.E. Chuyashenko, A.R. Gareev, S.A. Tikhnenko, N.V. Rimatskaya, V.A. Kratasyuk // *Forests*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1325.

60. Kolosova, E.M. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay for the prediction of toxicity of pollutants in urban soils / E.M. Kolosova, O.S. Sutormin, L.V. Stepanova, A.A. Shpedt, N.V. Rimatskaya, I.E. Sukovataya, V.A. Kratasyuk // *Environmental Technology & Innovation*. – 2021. – Vol. 24. – P. 101842.

61. Kratasyuk, V. Bioluminescent enzyme assay for the indication of plant stress in enclosed life support systems / V. Kratasyuk, E. Esimbekova, M. Correll, R. Bucklin // *Luminescence*. – 2011. – Vol. 26. – N. 6. – P. 543–546.

62. Esimbekova, E.N. Design of bioluminescent Biosensors for assessing aontamination of aomplex matrices / E.N. Esimbekova, V.P. Kalyabina, K.V. Kopylova, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // *Talanta*. – 2021. – Vol. 233. – P. 122509.

63. Morales, M.A. Guide to selecting a biorecognition element for biosensors / M.A. Morales, J.M. Halpern // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – Vol. 29. – N.10. – P. 3231–3239.

64. Nelson, D.L. Lehninger principles of biochemistry; 4th ed. / D.L. Nelson, M.M. Cox // W.H. Freeman and Company: New York, 2005. – P. 1216.

65. Kalyabina, V.P. Principles for construction of bioluminescent enzyme biotests for analysis of complex media / V.P. Kalyabina, E.N. Esimbekova, I.G. Torgashina, K.V. Kopylova, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Vol. 485. – N. 1. – P. 107–110.

66. Ford, S.R. Improvements in the application of firefly luciferase assays / R.S. Ford, F.R. Leach // In *Bioluminescence Methods and Protocols*; Humana Press: New Jersey, 1998. – Vol. 102. – P. 3–20.

67. Lundin, A. Optimization of the firefly luciferase reaction for analytical purposes. In *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 2* / A. Lundin // Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014. – Vol. 145. – P. 31–62.

68. Zhukova, G.V. Bioluminescent-triple-enzyme-based biosensor with lactate dehydrogenase for non-invasive training load monitoring / G.V. Zhukova, O.S. Sutormin, I.E. Sukovataya, N.V. Maznyak, V.A. Kratasyuk // *Sensors*. – 2023. – Vol. 23. – P. 2865.

69. Altamash, T. Intracellular ionic strength sensing using NanoLuc / T. Altamash, W. Ahmed, S. Rasool, K.H. Biswas // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – N.2. – P. 677.
70. Biswas, K. Buffer NaCl concentration regulates Renilla luciferase activity and ligand-induced conformational changes in theBRET-based PDE5 sensor / K. Biswas, S. Visweswariah // *Matters*. – 2017. –Vol. 3. – N. 5. – P. 1-7.
71. Gilles, R. Effect of various ions on ATP determinations using the “luciferine-luciferase” system / R. Gilles, A. Pequeux, J.J. Saive, A.C. Spronck, G. Thome-Lentz // *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. – 1976. – Vol. 84. – N.4. – P. 807–817.
72. Zhang, H. Quenching the firefly bioluminescence by various ions / H. Zhang, H. Bai, T. Jiang, Z. Ma, Y. Cheng, Y. Zhou, L. Du, M. Li // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2016. – Vol. 15. – N. 2. – P. 244–249.
73. Esimbekova, E.N. Immobilization of firefly bioluminescent system: development and application of reagents / E.N. Esimbekova, M.A. Kirillova, V.A. Kratasyuk // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 13. – N. 1. – P. 47.
74. Gul, I. State-of-the-art signal amplification strategies for nucleic acid and non-nucleic acid biosensors / I. Gul, M.A. Raheem, Md. Reyad-ul-Ferdous, X. Yuan, Z. Chen, C. Lv, M. Chen, J. Ji, D. Wu, Q. Zhao, C.Yan, D. Yu // *Sensors and Actuators Reports*. – 2025. – Vol. 9. – P. 100268.
75. Auld, D.S. Interferences with luciferase reporter enzymes / D.S. Auld, J. Inglese // *Assay Guidance Manual*. – 2016.
76. Leitão, J.M.M. Firefly luciferase inhibition / J.M.M. Leitão, J.C.G. Da Silva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2010. – Vol. 101. – N.1. – P. 1–8.
77. Da Silva, L.P. Kinetics of inhibition of firefly luciferase by dehydroluciferyl-coenzyme A, dehydroluciferin and 1-luciferin / L.P. Da Silva, J.C.G.E. Da Silva // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2011. – Vol. 10. – N. 6. – P. 1039–1045.

78. Kim, T. Serendipitous discovery of two highly selective inhibitors of bacterial luciferase / T. Kim, D.A. Spiegel // *Tetrahedron*. – 2013. – Vol. 69. – N. 36. – P. 7692–7698.

79. Watanabe, H. Inhibition of bioluminescence in *Photobacterium phosphoreum* by sulfamethizole and its stimulation by thymine / H. Watanabe, J.W. Hastings // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1990. – Vol. 1017. – N. 3. – P. 229–234.

80. Francisco, W.A. Interaction of bacterial luciferase with aldehyde substrates and inhibitors / W.A. Francisco, H.M. Abu-Soud, T.O. Baldwin, F.M. Raushel // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – P. 24734–24741.

81. Tinikul, R. Bacterial luciferase: Molecular mechanisms and applications. In *The Enzymes* / R. Tinikul, P. Chunthaboon, J. Phonbuppha, T. Paladkong. – Elsevier, 2020. – Vol. 47. – P. 427–455.

82. Tinikul, R. Structure, mechanism, and mutation of bacterial luciferase. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / R. Tinikul, P. Chaiyen. – Springer International Publishing, 2014. – Vol. 154. – P. 47–7483.

83. Auton, M. Osmolyte effects on protein stability and solubility: A balancing act between backbone and side-chains / M. Auton, J. Rösgen, M. Sinev, L.M.F. Holthauzen, D.W. Bolen // *Biophysical Chemistry*. – 2011. – Vol. 159. – N. 1. – P. 90–99.

84. Khatibi, S.M.H. Osmolytes resist against harsh osmolarity: Something old something new / S.M.H. Khatibi, F.Z. Vahed, S. Sharifi, M. Ardalan, M.M. Shoja, S.Z. Vahed // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 158. – P. 156–164.

85. Rabbani, G. Roles of osmolytes in protein folding and aggregation in cells and their biotechnological applications / G. Rabbani, I. Choi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 109. – P. 483–491.

86. Sukovatyi, L.A. The effect of osmolytes on the bioluminescent reaction of bacteria: Structural and dynamic properties / L.A. Sukovatyi, A.E. Lisitsa, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // *Biophysics*. – 2020. – Vol. 65. – N.6. – P. 966–971.

87. Rasouli, S. Effects of sucrose and trehalose on stability, kinetic properties, and thermal aggregation of firefly luciferase / S. Rasouli, S. Hosseinkhani, P. Yaghmaei, A. Ebrahim-Habibi // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 165. – N. 2. – P. 572–582.

88. Ataei, F. Luciferase protection against proteolytic degradation: A key for improving signal in nano-system biology / F. Ataei, S. Hosseinkhani, K. Khajeh // *Journal of Biotechnology*. – 2009, . – Vol. 144. – N. 2. – P. 83–88.

89. Moroz, N.A. Stabilization of ATP reagents containing firefly *L. mingrelica* luciferase by polyols / N.A. Moroz, D.Ya. Gurskii, N.N. Ugarova // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2008. – Vol. 63. – N. 2. – P. 67–70.

90. Eriksson, J. Method enabling firefly luciferase-based bioluminometric assays at elevated temperatures / J. Eriksson, T. Nordström, P. Nyren // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – Vol. 314. – N. 1. – P. 158–161.

91. Singh, L.R. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin / L.R. Singh, N.K. Poddar, T.A. Dar, R. Kumar, F. Ahmad // *Life Sciences*. – 2011. – Vol. 88. – N 3-4. – P. 117–125.

92. Getz, E.B. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry / E.B.A. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P.R. Selvin, P.R. // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 273. – N. 1. – P. 73–80.

93. Krężel, A. Coordination of heavy metals by dithiothreitol, a commonly used thiol group protectant / A. Krężel, W. Leśniak, M. Jeżowska-Bojczuk, P. Młynarz, J. Brasuń, H. Kozłowski, W. Bal // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2001. – Vol. 84. – N. 1-2. – P. 77–88.

94. Imani, M. Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity / M. Imani, S. Hosseinkhani, S. Ahmadian, M. Nazari // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2010. – Vol. 9. – N. 8. – P. 1167–1177.

95. Lomakina, G.Yu. Enhancement of thermostability of the *Luciola mingrelica* firefly luciferase by site-directed mutagenesis of nonconservative cysteine residues

Cys62 and Cys146 / G.Yu. Lomakina, Yu.A. Modestova, N.N. Ugarova // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2008. – Vol. 63. – N.2. – P. 63–66.95.

96. Lonshakova-Mukina, V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors / V. Lonshakova-Mukina, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2015. – Vol. 213. – P. 244–247.

97. Peters, T. Practical Aspects: Albumin in the Laboratory. In *All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* / T. Peters. – New York: Academic Press, 1995. – P. 285–318.

98. Bujacz, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin / A. Bujacz // *Acta Cryst D Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2012. – Vol. 68. – N. 10. – P. 1278–1289.

99. Muthukumaran, T. Isolation and characterization of luciferase from Indian firefly, *Luciola praeusta* / T. Muthukumaran, N.V. KrishnaMurthy, N. Sivaprasad, T. Sudhakaran // *Luminescence*. – 2014. – Vol. 29. – N. 1. – P. 20–28.

100. Makemson, J.C. Bovine serum albumin interacts with bacterial luciferase / J.C. Makemson, J.W. Hastings // *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. – 1991. – Vol. 6. – N. 2. – P. 131–136.

101. Tomoyasu, T. Small heat shock protein AgsA: An effective stabilizer of enzyme activities / T. Tomoyasu, A. Tabata, Y. Ishikawa, R.A. Whiley, H. Nagamune // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2013. – Vol. 115. – N. 1. – P. 15–19.

102. Yin, W. Nanoparticle core size and spacer coating thickness-dependence on metal-enhanced luminescence in optical oxygen sensors / W. Yin, J. Sui, G. Cao, D. Dabiri // *Talanta*. – 2023. – Vol. 259. – P. 123690.

103. Eltzov, E. Metal-enhanced bioluminescence: An approach for monitoring biological luminescent processes / E. Eltzov, D. Prilutsky, A. Kushmaro, R.S. Marks, C.D. Geddes // *Applied Physics Letters*. – 2009. – Vol. 94. – P. 083901.

104. Golberg, K. Increased bioassay sensitivity of bioactive molecule discovery using metal-enhanced bioluminescence / K. Golberg, A. Elbaz, R. McNeil, A. Kushmaro, C.D. Geddes, R.S. Marks // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2014. – Vol. 16. – N. 12. – P. 2770.

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

106. Eustis, S. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes / S. Eustis, M.A. El-Sayed // *Chemical Society Reviews* 2006. – Vol. 35. – N. 3. – P. 209–217.

107. Morozova, E.P. Metal-enhanced bioluminescence by detergent stabilized Ag and Au nanoparticles / E.P. Morozova, T.E. Smoliarova, K.A. Lukyanenko, M.A. Kirillova, M.N. Volochaev, M.N.; A.S. Kichkailo, R. Ranjan, V.A. Kratasyuk // *Talanta*. – 2023. – Vol. 254. – P. 124157.

108. Noori, A.R. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids improve firefly luciferase properties / A.R. Noori, S. Hosseinkhani, P. Ghiasi, J. Akbari, A. Heydari // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 172. – N. 6. – P. 3116–3127.

109. Karimi, E. Label-free and bioluminescence-based nano-biosensor for ATP detection / E. Karimi, M. Nikkhah, S. Hosseinkhani // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12. – N. 11. – P. 918.

110. Willets, K.A. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing / K.A. Willets, R.P. Van Duyne // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 2007. – Vol. 58. – N. 1. – P. 267–297.111.

111. Cao, J. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review / J.Cao, T. Sun, K.T.V. Grattan // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – Vol. 195. – P. 332–351.

112. Maier, S.A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications* / S.A. Maier // New York: Springer Science+Business Media LLC, 2007. – P. 223.

113. Sun, G. Plasmon enhancement of luminescence by metal nanoparticles / G.Sun, J.B. Khurgin // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2011. – Vol. 17. – N. 1. – P. 110–118.

114. Zhao, W. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays / W. Zhao, M.A. Brook, Y. Li // *ChemBioChem*. – 2008. – Vol. 9. – N.15. – P. 2363–2371.
115. Бычковский, П.М. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение П.М. Бычковский, А.А. Кладиев, С.О. Соломевич, С.Ю. Щеголев // *Российский Биотерапевтический Журнал*. – 2011. – Т. 10. – № 3. – С. 37–46.
116. Belletti, E. Synthesis of bioluminescent gold nanoparticle–luciferase hybrid systems for technological applications / E. Belletti, V.R. Bevilaqua, A.M.M. Brito, D.A. Modesto, A.J.C. Lanfredi, V.R. Viviani, I.L. Nantes-Cardoso // *Photochemical & Photobiological Sciences* 2021. – Vol. 20. – N. 11. – P. 1439–1453.
117. Engelbrekt, C. Complexity of gold nanoparticle formation disclosed by dynamics study / C. Engelbrekt, P.S. Jensen, K.H. Sørensen, J. Ulstrup, J. Zhang // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2013. – Vol. 117. – P. 11818–11828.
118. Wuithschick, M. Illustrating the formation of metal nanoparticles with a growth concept based on colloidal stability / M. Wuithschick, S. Witte, F. Kettemann, K. Rademann, J. Polte // *Physical Chemistry Chemical. – Physics* 2015. – Vol. 17. – P. 19895–19900.
119. Berti, L. Nucleic acid and nucleotide-mediated synthesis of inorganic nanoparticles / L. Berti, G.A. Burley // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 3. – N. 2. – P. 81–87.
120. Zhao, W. Highly stabilized nucleotide-capped small gold nanoparticles with tunable size / W. Zhao, F. Gonzaga, Y. Li, M.A. Brook // *Advanced Materials*. – 2007. – Vol. 19. – N. – P. 1766–1771.
121. Green, M. Directed growth of gold nanostructures using a nucleoside/nucleotide / M. Green, D. Smyth-Boyle // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – Vol. 17. – N. 34. . – P. 3588.
122. Samadi, E. Decrease of catalytic efficiency of *Photinus pyralis* firefly luciferase in the presence of graphene quantum dots / E. Samadi, M. Javanmardi, S.J.

Porzani, S. Hosseinkhani // *Nanomedicine Journal*. – 2020. – Vol. 7. – N. 4. – P. 308–314.

123. Kim, Y.-P. Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle–luciferase conjugates / Y.-P. Kim, W.L. Daniel, Z. Xia, H. Xie, C.A. Mirkin, J. Rao // *Chemical Communication*. – 2010. – Vol. 46 N. 1. – P. 76–78.

124. Biebl, M.M. Structure, function, and regulation of the Hsp90 machinery / M.M. Biebl, J. Buchner // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2019. – Vol. 11. – N. 9. – P. a034017.

125. Trepel, J. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer / J. Trepel, M. Mollapour, G. Giaccone, L. Neckers // *Nature Reviews Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – N. 8. – P. 537–549.

126. Li, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones / J. Li, J. Soroka, J. Buchner // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2012. – Vol. 1823. – N. 3. – P. 624–635.

127. Schopf, F.H. The HSP90 chaperone machinery / G.H. Schopf, M.M. Biebl, J. Buchner // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – Vol. 18. – P. 345–360.

128. Taipale, M. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights / M. Taipale, D.F. Jarosz, S. Nature reviews Molecular cell biology. – 2010. – Vol. 11. – N. 7. – P. 515–528.

129. Banerjee, M. Assay design and development strategies for finding Hsp90 inhibitors and their role in human diseases / M. Banerjee, I. Hatial, B.M. Keegan, B.S.J. *Pharmacology & Therapeutics*. – 2021. – Vol. 221. – P. 107747.

130. Zhao, Z. Heat shock protein 90 facilitates SARS-CoV-2 structural protein-mediated virion assembly and promotes virus-induced pyroptosis / Z. Zhao, L.-D. Xu, F. Zhang, Q.-Z. Liang, Y. Jiao, F.-S. Shi, B. He, P. Xu, Y.-W. Huang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2023. – Vol. 299. – N. 5. – P. 104668.

131. Xiang, Y. The development of cancers research based on mitochondrial heat shock protein 90 / Y. Xiang, X. Liu, Q. Sun, K. Liao, X. Liu, Z. Zhao, L. Feng, Y. Liu, B. Wang // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1296456.

132. Sharma, S.K. Probing the different chaperone activities of the bacterial HSP70-HSP40 system using a thermolabile luciferase substrate / S.K. Sharma, P. De Los Rios, P. Goloubinoff // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 79. – N. 6. – P. 1991–1998.133.

133. Imamoglu, R. Bacterial Hsp70 resolves misfolded states and accelerates productive folding of a multi-domain protein / R. Imamoglu, D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F.U. Hartl, F.U. *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – N. 1. – P. 365.

134. Esimbekova, E.N. Design of multicomponent reagents for enzymatic assays / E.N. Esimbekova, V.I. Lonshakova-Mukina, A.E. Bezrukikh, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – Vol. 461. – N.1. – P. 102–105.

135. Bezrukikh, A. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase / A. Bezrukikh, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk, O. Shimomura // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 406. – N.23. – P. 5743–5747.

136. Carrea, G. Bioluminescent continuous-flow assay of adenosine 5'-triphosphate using firefly luciferase immobilized on nylon tubes / G. Carrea, R. Bovara, G. Mazzola, S. Girotti, A. Roda, S. Ghini // *Analytical Chemistry*. – 1986. – Vol. 58. – N. 2. – P. 331–333.

137. Roda, A. Compact miniaturized bioluminescence sensor based on continuous air-segmented flow for real-time monitoring: Application to bile salt hydrolase (BSH) activity and ATP detection in biological fluids / A. Roda, P. Greco, P. Simoni, V. Marassi, G. Moroni, A. Gioiello, B. Roda // *Chemosensors*. – 2021. – Vol. 9. – N. 6. – P. 122.

138. Yousefi-Nejad, M. Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B / M. Yousefi-Nejad, S. Hosseinkhani, K. Khajeh, B. Ranjbar // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – Vol. 40. – N. 4. – P. 740–746.

139. Ugarova, N.N. Immobilization of luciferase from the firefly *Luciola mingrelica* — Catalytic properties and stability of the immobilized enzyme /N.N.

Ugarova, L.Yu. Brovko, N.V. Kost // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1982. – Vol. 4. – N. 4. – P. 224–228.

140. Wang, W. Immobilization of firefly luciferase on PVA-co-PE nanofibers membrane as biosensor for bioluminescent detection of ATP / W. Wang, Q. Zhao, M. Luo, M. Li, D. Wang, Y. Wang, Q. Liu // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – N. 36. – P. 20046–20052.

141. Rodriguez, O. Immobilized bacterial luciferase for microscale analysis of creatine kinase activity / O. Rodriguez, G.G. Guilbault // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1981. – Vol. 3. – N. 1. – P. 69–72.

142. Bezrukikh, A.E. Thermoinactivation of coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in gelatin / A.E. Bezrukikh, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2011. – Vol. 1. – P. 64–74.

143. Chittock, R.S. Modulation of firefly luciferase bioluminescence at bioelectrochemical interfaces / R.S. Chittock, A. Glidle, C.W. Wharton, N. Berovic, T.D. Beynon, J.M. Cooper // *Analytical Chemistry*. – 1998. – Vol. 70N. 19. – P. 4170–4176.

144. Esimbekova, E.N. Gelatin and starch: What better stabilizes the enzyme activity? / E. Esimbekova, A.E. Govorun, V.I. Lonshakova-Mukina, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 491. – N.1. – P. 151–154.

145. Lomakina, G.Y. Effect of gelatin on properties of *Luciola mingrelica* firefly luciferase / G.Y. Lomakina, A.E. Bezrukikh, N.N. Ugarova // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2012. – Vol. 67. – N. 1. – P. 8–12.

146. Esimbekova, E.N. Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: Correlation between activity and composition / E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, I.G. Torgashina // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. – Vol. 40. – N.2. – P. 343–346.

147. Esimbekova, E.N. Enzymes immobilized into starch- and gelatin-based hydrogels: properties and application in inhibition assay / E.N. Esimbekova, I.G.

Torgashina, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *Micromachines*. – 2023. – Vol. 14. – N. 12. – P. 2217.

148. Nowroozi-Nejad, Z. Efficient immobilization of firefly luciferase in a metal organic framework: Fe-MIL-88(NH₂) as a mighty support for this purpose / Z. Nowroozi-Nejad, B. Bahramian, S. Hosseinkhani // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2019. – Vol. 121. – P. 59–67.

149. Nowroozi-Nejad, Z. A fast and efficient stabilization of firefly luciferase on MIL-53(Al) via surface adsorption mechanism / Z. Nowroozi-Nejad, B. Bahramian, S. Hosseinkhani // *Research on Chemical Intermediates*. – 2019. – Vol. 45. – N. 4. – P. 2489–2501.

150. Martínez-Pérez-Cejuela, H. Super-stable metal–organic framework (MOF)/luciferase paper-sensing platform for rapid ATP detection / H. Martínez-Pérez-Cejuela, M.M. Calabretta, V. Bocci, M. D’Elia, E. Michelini // *Biosensors*. – 2023. – Vol. 13. – P. 451.151.

151. Abhijith, K.S. Facile synthesis of gold–silver alloy nanoparticles for application in metal enhanced bioluminescence / K.S. Abhijith, R. Sharma, R. Ranjan, M.S. Thakur // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2014. – Vol. 13. – N. 7. – P. 986–991.

152. Chappelle, E.W. Assay of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) using the bacterial luciferase reaction / E.W. Chappelle, G.L. Picciolo // *Methods in enzymology*. – 1971. – Vol. 18. – P. 381-385.

153. Meighen, E.A. Determination of the release rate of aldehyde pheromones from insect lures by cold trapping and direct bioluminescence analysis / E.A. Meighen, R.B. Szittner, G.G. Grant // *Analytical Biochemistry*. – 1983. – Vol. 133. – N. 1. – P. 179–185.

154. Khlyntseva, S.V. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides / S.V. Khlyntseva, Ya.R. Bazel’, A.B. Vishnikin, V. Andrush // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 64. – N.7. – P. 657–673.

155. 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. – Vol. 17. – N. 5. – P. 1511–1527.
156. Ranjan, R. Ethylene diamine functionalized citrate-capped gold nanoparticles for metal-enhanced bioluminescence / R. Ranjan, M.A. Kirillova, V.A. Kratasyuk // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2020. – Vol. 13. – N. 3. – P. 322–330.
157. Remant Bahadur, K.C. Stabilization of gold nanoparticles by hydrophobically-modified polycations / K.S. Remant Bahadur, S. Aryal, S.R. Bhattarai, N. Bhattarai, C.H. Kim, H.Y. Kim // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2006. – Vol. 17. – N.5. – P. 579–589.
158. 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. – Vol. 20. – N. 4. – P. 107.
159. Dichello, G.A. Preparation of liposomes containing small gold nanoparticles using electrostatic interactions / G.A. Dichello, T. Fukuda, T. Maekawa, R.L.D. Whitby, S.V. Mikhalovsky, M. Alavijeh, A.S. Pannala, D.K. Sarker // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 105, . – P. 55–63.
160. Piella, J. Size-controlled synthesis of sub-10-nanometer citrate-stabilized gold nanoparticles and related optical properties / J. Piella, N.G. Bastús, V. Puntes // *Chemistry of Materials*. – 2016. – Vol. 28. – N. 4. – P. 1066–1075.
161. Kim, T. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling / T. Kim, C.-H. Lee, S.-W. Joo, K. Lee // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. – Vol. 318. – N. 2. – P.238–243.
162. Han, X. Role of salt in the spontaneous assembly of charged gold nanoparticles in ethanol / X. Han, J. Goebel, Z. Lu, Y. Yin // *Langmuir*. – 2011. – Vol. 27. – N.9. – P. 5282–5289.
163. Du, J. Gold-nanocrystal-enhanced bioluminescent nanocapsules / J. Du, J. Jin, Y. Liu, J. Li, et al. // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8. – N. 10. – P. 9964-9969.

164. He, C.-K. Improving pesticide detection sensitivity via metal-enhanced bioluminescence in *Aliivibrio fischeri* / C.-K. He, C.-Y. Chen, M.-C.Hung, C.-H. Hxu, Y.-H. Hsieh, Y.-S. Lin // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2026. – Vol. 183. – P. 115715.

165. McDowell, C.L. Expression of Hsp90 chaperone proteins in human tumor tissue / C.L. McDowell, R.B. Sutton, W.M.J. Obermann // *Journal of Biological Macromolecules*. – 2009. – Vol. 45. – N.3. – P. 310–314.

166. Priya, S. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides / S. Priya, S.K. Sharma, P. Goloubinoff // *FEBS Letters*. – 2013. – Vol. 587. – N.13. – P. 1981–1987.

167. Wang, H.-Y. Hyperthermia stress activates heat shock protein expression via propyl isomerase 1 regulation with heat shock factor 1 / H.-Y. Wang, J.C.-M. Fu, Y.-C. Lee, P.-J. Lu // *Molecular and Cellular Biology*. – 2013. – Vol. 33. – N. 24. – P. 4889–4899.

168. Osada, T. In Vivo detection of HSP90 identifies breast cancers with aggressive behavior / T. Osada, K. Kaneko, W.R. Gwin, M.A. Morse, A. Hobeika, B.W. Pogue, Z.C. Hartman, P.F. Hughes, T. Haystead, H.K. Lyerly // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23. – N.24. – P. 7531–7542.

169. Siegelin, M.D. Inhibition of the Mitochondrial Hsp90 Chaperone Network: A Novel, Efficient Treatment Strategy for Cancer? / M.D. Siegelin // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 333. – N. 2. – P. 133–146.

170. Goode, K.M. Targeting the Hsp90 C-terminal domain to induce allosteric inhibition and selective client downregulation / K.M. Goode, D.P. Petrov, R.E. Vickman, S.A. Crist, P.E. Pascuzzi, T.L. Ratliff, V.J. Davisson, T.R. Hazbun // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2017. – Vol. 1861. – N. 8. – P. 1992–2006.

171. Murano, H. A purine-type heat shock protein 90 inhibitor promotes the heat shock response in *Arabidopsis* / H.A. Murano, T. Matsubara, I. Takahashi, M. Hara // *Plant Biotechnology Reports*. – 2017. – Vol. 11. – N.2. – P. 107–113.

172. Wisén, S. Identification of small molecules that modify the protein folding activity of heat shock protein 70 / S. Wisen, J.E. Gestwicki // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – Vol. 374. – N. 2. – P. 371–377.173.

173. Galam, L. High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase / L. Galam, M.K. Hadden, Z. Ma, Q.-Z. Ye, B.-G. Yun, B.S.J. Blagg, R.L. Matts // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 15. – N. 5. – P. 1939–1946.

174. Yamamoto, S. Gentamicin inhibits HSP70-assisted protein folding by interfering with substrate recognition / S. Yamamoto, S. Nakano, K. Owari, K. Fuziwara, N. Ogawa, M. Otaka, K. Tamaki, S. Watanabe, A. Komatsuda, H. Wakui, et al. // *FEBS Letters*. – 2010. – Vol. 584. – N. 4. – P. 645–651.

175. Cassel, J.A. Novel inhibitors of heat shock protein Hsp70-mediated luciferase refolding that bind to DnaJ / J.A. Cassel, S. Ilyin, M.E. McDonnell, A.B. Reitz // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – N. 11. – P. 3609–3614.

176. Ong, L.-C. Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) inhibit heat shock protein 90 (HSP90) signaling in human lung fibroblasts and keratinocytes / L.-C. Ong, Y.-F. Tan, B.S. Tan, F.F.-L. Chung, S.-K. Cheong, C.-O. Leong // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2017. – Vol. 329. – P. 347–357.

177. Minami, Y. Hsc70/Hsp40 chaperone system mediates the Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase / Y. Minami, M. Minami // *Genes to Cells*. – 1999. – Vol. 4. – N. 12. – P. 721–729.

178. Minami, Y. A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding / Y. Minami, H. Kawasaki, M. Minami, N. Tanahashi, K. Tanaka, I.A. Yahara // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – N. 12. – P. 9055–9061.

179. Minami, M. Both the N- and C-terminal chaperone sites of Hsp90 participate in protein refolding / M. Minami, M. Nakamura, Y. Emori, Y. Minami // *Journal of Biochemistry*. – 2001. – Vol. 268. – N. 8. – P. 2520–2524.

180. Ishida, M. Biochemical characterization and cooperation with co-chaperones of heat shock protein 90 from *Schizosaccharomyces pombe* / M. Ishida, T. Tomomari, T. Kanzaki, T. Abe, T. Oka, M. Yohda // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2013. – Vol. 116. – N. 4. – P. 444–448.
181. 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. – Vol. 131. – P. 691–696.
182. McLaughlin, S.H. Stimulation of the weak ATPase activity of human Hsp90 by a client protein / S.H. McLaughlin, H.W. Smith, S.E. Jackson // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 315. – P. 787–798.
183. Lohrasbi-Nejad, A. Hydrophobin-1 promotes thermostability of firefly luciferase / A. Lohrasbi-Nejad, M. Torkzadeh-Mahani, S. Hosseinkhani // *The FEBS Journal*. – 2016. – Vol. 283. – N. 13. – P. 2494–2507.
184. Mehrabi, M. Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes / M. Mehrabi, S. Hosseinkhani, S. Ghobadi // *Journal of Biological Macromolecules*. – 2008. – Vol. 43. – N.2. – P. 187–191.
185. Nathan, D.F. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone / D.F. Nathan, M.H. Vos, S. Lindquist // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – N. 24. – P. 12949–12956.
186. Schneider, C. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90 / C. Schneider, L. Sepp-Lorenzino, E. Nimmesgern, O. Ouerfelli, S. Danishefsky, N. Rosen, F.U. Hartl // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – N. 25. – P. 14536–14541.
187. Miyata, Y. The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity / Y. Miyata, I. Yahara // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267. – N. 10. – P. 7042–7047.
188. Jakob, U. Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase: implications for heat shock in vivo / U. Jakob, H. Lilie, I. Meyer, J.

Buchner // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – N. 13. – P. 7288–7294.

189. Müller, L. Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures / L. Müller, A. Schaupp, D. Walerych, H. Wegele, J. Buchner // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – N. 47. – P. 48846–48854.

190. Pavankumar, A.R. Bioanalytical advantages of a novel recombinant apyrase enzyme in ATP-based bioluminescence methods / A.R. Pavankumar, S. Zelenin, A. Lundin, T. Schulte, K. Rajarathinam, P. Rebellato, S. Ardabili, J. Salas, A. Achour, A. Russom // *Analytica Chimica Acta*. – 2018. – Vol. 1025. – P. 118–123.

191. Wegele, H. Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90 / H. Wegele, S.K. Wandinger, A.B. Schmid, J. Reinstein, J. Buchner // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 356. – N. 3. – P. 802–811.

192. 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. – Vol. 11. – N.2. – P. 174–180.

193. Fritsler, Y.V. Bioluminescent enzyme inhibition based assay of metal nanoparticles / Y.V. Fritsler, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2017. – Vol. 10. – N. 2. – P. 187–198.

194. Esimbekova, E.N. Comparative study of immobilized and soluble NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase coupled enzyme system / E.N. Esimbekova, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // *Biochemistry Moscow*. – 2009. – Vol. 74. – N.6. – P. 695–700.

195. Lonshakova-Mukina, V.I. A multicomponent butyrylcholinesterase preparation for enzyme inhibition-based assay of organophosphorus pesticides / V.I. Lonshakova-Mukina, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12. – N. 6. – P. 643–652.

196. Calabretta, M.M. Nano-lantern on paper for smartphone-based ATP detection / M.M. Calabretta, R. Álvarez-Diduk, E. Michelini, A. Roda, A. Merkoçi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2020. – Vol. 150. – P. 111902.