

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

« ____ » _____ 2020г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**Оптимизация температурного режима высушивания
иммобилизованной биферментной системы NADH: FMN –
оксидоредуктаза – люцифераза для обеспечения максимальной
интенсивности свечения и точности иммобилизованных реагентов.**

Руководитель _____ доцент каф. ИБФ, канд. био. наук И.Г. Торгашина
подпись, дата

Выпускник _____ О.А. Цигельник
подпись, дата

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Оптимизация температурного режима высушивания иммобилизованной биферментной системы NADH: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза для обеспечения максимальной интенсивности свечения и точности иммобилизованных реагентов» содержит: 31 страницу текстового документа, 12 иллюстраций, 22 литературных источника.

ЛЮЦИФЕРАЗА, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ИММОБИЛИЗАЦИЯ, ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ, ФЕРМЕНТЫ, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ЭКОЛОГИЯ, БИФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА.

Цель работы: Определить оптимальный температурный режим высушивания и хранения реагентов на основе совместно иммобилизованной с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза для обеспечения максимальной интенсивности свечения и минимального разброса значений интенсивности свечения.

Актуальность исследования обусловлена тем, что биотесты на основе иммобилизованных ферментов являются стабильными и используются для определения токсичности различных объектов окружающей среды и для целей мониторинга качества окружающей среды большой интерес представляет разработка и использование совместно иммобилизованных ферментов и субстратов светящихся бактерий. На сегодняшний день реагент на основе совместно иммобилизованной с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза характеризуется высоким разбросом значений активности при многократных измерениях, что может объясняться влиянием различных условий иммобилизации.

Результаты исследования показали, что температурный режим высушивания иммобилизованной совместно с тетрадеканалем и NADH биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза оказывает влияние на интенсивность свечения.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1. Биферментная система светящихся бактерий NAD(P)H:FMN - оксидоредуктаза-люцифераза – тест- объект для биолюминесцентного анализа.....	6
1.1.1. Характеристика биферментной системы NAD(P)H:FMN – оксидоредуктаза-люцифераза	6
1.1.2. Применение биферментной системы NAD(P)H:FMN - оксидоредуктаза-люцифераза	8
1.2. Определение метода иммобилизации ферментов светящихся бактерий	10
1.3. Физико-химические характеристики иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN -оксидоредуктаза-люцифераза.....	14
1.3.1. Влияние pH при иммобилизации ферментов.....	14
1.3.2. Температурное влияние на активность ферментативных реагентов биолюминесценции.....	16
2. Материалы и методы.....	20
2.1. Материалы.....	20
2.2. Методы.....	21
3. Результаты и обсуждение.....	23
3.1. Оценка влияния температурного режима высушивания иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза.....	23
3.2. Оценка влияния режима хранения иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза.....	26
ВЫВОДЫ.....	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Современные аналитические методы, основанные на биолюминесцентных реакциях, катализируемых различными люциферазами, могут обеспечить широкий спектр задач, от мониторинга окружающей среды в человеческой среде (интегральные биологические анализы) до анализа метаболитов и ключевых ферментов необходимых для определения состояния различных заболеваний. Использование биолюминесцентных методов может позволить создать систему, которая включает в себя биологические анализы, основанные на разных уровнях живой организации: биохимический (ферментативный) и биотесты, которые основаны на живых организмах (бактериях и грибах) [1].

Для решения различных задач экологического мониторинга используется большое количество методов биологического тестирования. В том числе широко используются не только живые организмы, но и их ферментативные системы. Однако при использовании ферментов возникает ряд затруднений, таких как: необходимость обеспечения специальных условий для сохранения стабильности препаратов ферментов, неточность дозирования реагентов и т. д. Решением вышеизложенных проблем может быть использование препаратов иммобилизованных ферментов. Иммобилизация является способом фиксирования ферментов внутри специализированного носителя посредством физико-химических преобразований.

Биотесты на основе иммобилизованных ферментов являются стабильными и используются для определения токсичности различных объектов окружающей среды. Для целей мониторинга качества окружающей среды большой интерес представляет разработка и использование совместно иммобилизованных ферментов и субстратов светящихся бактерий. На сегодняшний день реагент на основе совместно иммобилизованной с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза характеризуется высоким разбросом значений активности при

многократных измерениях, что может объясняться влиянием различных условий иммобилизации: температура геля, режим перемешивания компонентов реагента, режим дозирования, температурный режим высушивания реагентов. Влияние условий температурного режима высушивания иммобилизованных совместно с субстратами ферментов светящихся бактерий на активность реагентов и точность результатов анализа изучено мало.

Цель исследования заключалась в определении оптимального температурного режима высушивания и хранения реагентов на основе совместно иммобилизованной с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза для обеспечения максимальной интенсивности свечения и минимального разброса значений интенсивности свечения.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние температурного режима высушивания иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза на активность реагентов и разброс значений максимальной интенсивности свечения.
2. Оценить влияние режима хранения иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза на активность реагентов и разброс значений максимальной интенсивности свечения.

1.Обзор литературы

1.1. Биферментная система светящихся бактерий NAD(P)H:FMN - оксидоредуктаза-люцифераза – тест- объект для биолюминесцентного анализа.

1.1.1. Характеристика биферментной системы NAD(P)H:FMN - оксидоредуктаза-люцифераза.

Для того, чтобы решить различные задачи в области биолюминесцентного анализа очень часто используются бактерии, обладающие свойствами свечения, а также и выделенные из этих бактерий ферментативные системы, в том числе биферментная система НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза.

Биферментная система светящихся бактерий представляет собой реакцию, которую катализируют НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза.

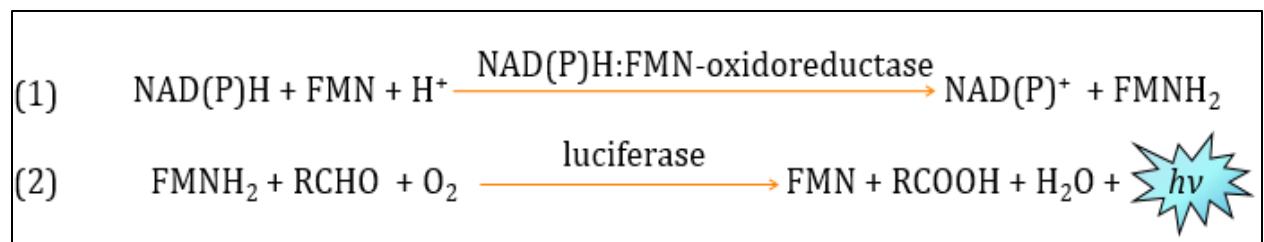


Рисунок 1.1.1.Ход реакции биферментной системы.

Конечными продуктами являются окисленный flavinmononukleotid, жирная кислота, вода и кванты света. NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза является катализатором для реакции (1), в которой происходит восстановление flavinmononukleotida, т.е. присоединение водорода. Люцифераза катализирует реакцию (2), где происходит окисление восстановленного flavина и длинноцепочечного альдегида.

Величина излучаемого света пропорциональна количеству люциферазы и каждого из субстратов биферментной системы. Длинноцепочечный алифатический альдегид и восстановленная форма flavinmononukleotida

являются субстратами бактериальной люциферазы. Излучение света находится в зеленой области видимого спектра.

Когда в анализируемой смеси присутствует токсическое вещество, способное участвовать в процессах восстановления, тем самым конкурируя с флавинмононуклеотидом, происходит снижение интенсивности свечения. Молекула люциферазы просто расположена и не содержит металлов, протезных групп, не аминокислотных остатков и дисульфидных связей. Бактериальная люцифераза представляет собой флавопротеин и, с небольшими межвидовыми различиями, представляет собой гетеродимер с молекулярной массой 79 кДа, который состоит из двух неидентичных субъединиц. Субъединицы индивидуально неактивны, но могут рекомбинировать с активной люциферазой. В настоящее время известно, что бактериальная люцифераза имеет один сайт связывания для мононуклеотида флавина и альдегида. Сродство люциферазы к ее субстратам является высоким.

Впервые NAD (P) H: FMN-оксидоредуктаза была выделена и получена в гомогенном состоянии из *P.hosphoreum* [2]. Впоследствии несколько разновидностей этого фермента были выделены из разных штаммов легких бактерий.

Использование ферментов в биоанализах может повысить уровень точности результатов таковых анализов за счет перехода от живого организма к реагенту, упростить анализ, выразить его, автоматизировать с помощью иммобилизованных реагентов, регулировать чувствительность физико-химических биоанализов, а также создать систему биоанализа для мониторинга окружающей среды с использованием цепи конъюгации ферментов с бактериальной люциферазой.

Чувствительность ферментативных анализов варьируется путем изменения условий анализа, в частности, с использованием ферментативных реакций с другим механизмом конденсации с реакцией, катализируемой бактериальной люциферазой; изменение состава реакционной смеси

(количество ферментов и субстратов, количество добавленной токсичной смеси); изменение последовательности добавления реагентов; использование различных ферментных препаратов (например, ферментов с различной степенью очистки, а также лиофилизированных или иммобилизованных ферментных препаратов и т. д.) [3].

Использование ферментов для мониторинга окружающей среды является оптимальным вариантом, но осложняется отсутствием соответствующего требованиям и высокочувствительного реагента. При использовании лиофилизированного препарата ферментов светящихся бактерий возникают проблемы с точной дозировкой реагента, что снижает точность измерений токсичности. Значительной причиной создания нового реагента также является повышение его стабильности при последующем хранении и превосходство в использовании по сравнению с растворимыми составами.

1.1.2. Применение биферментной системы NAD(P)H:FMN - оксидоредуктаза-люцифераза.

Использование ферментов, ассоциированных с ферментами оксидоредуктазой и люциферазой, для мониторинга окружающей среды использовалось в большом количестве исследований [4].

Биоаналитическую реакцию изучали путем анализа питьевой и поверхностной воды на Алтае, подверженной Семипалатинскому взрыву, и поверхностных вод реки Енисей в зоне сброса радиоактивных отходов горно-химического комбайна (Красноярск) [5]. Было проанализировано более 100 проб поверхностных вод и 170 проб воды из скважин и систем водоснабжения. Результаты анализа биолюминесценции сравнивались с интегрированными тестами для оценки качества поверхностной воды по ее окислительно-восстановительным характеристикам, включая концентрацию перекиси водорода, окислительно-восстановительное состояние водной среды, а также скорость образования радикала OH и время жизни. Анализ

позволяет охарактеризовать качество воды в трех классах чистоты в соответствии с ПД 53.18.24.83-89 и определить причины загрязнения (химическое или биологическое) [6].

Результаты анализа биолюминесценции вод во всех районах Алтая были подтверждены химическими и спектральными исследованиями. Было установлено, что в большинстве образцов результаты биолюминесцентного анализа коррелируют с интегральным анализом, основанным на окислительно-восстановительных характеристиках анализируемой воды [4]. Ветрова и соавторы [7] использовали биолюминесцентный биоанализ на основе бактерий (*Photobacterium fosfhopreum*) и модифицированной ферментативной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза для мониторинга состояния соленой воды озера Шира (Хакасия, Сибирь). Соленое озеро Шира стало очень популярным курортом в южной Сибири, и экологические проблемы озера в настоящее время серьезно обеспокоены. Было выявлено, что различия в биолюминесцентных реакциях связаны с солевым составом и окислительно-восстановительными характеристиками воды. Определены параметры кинетики биолюминесценции, наиболее восприимчивые к загрязнению в условиях соленой воды. Карта неоднородности была создана на основе биолюминесцентных параметрах проб воды, отобранных на анализ вдоль берега в разных местах и на разных уровнях глубины озера. Таким образом, было исследовано влияние представителя класса хинонов, изомера бензохинона (1,4 – бензохинона). Система в его присутствии была более чувствительна к окислительно - восстановительным характеристикам солевого раствора, чем в его отсутствие. Поэтому такое вещество может быть представлено для оценки анализа свойств соленой воды. Используя вышеописанный способ и полученные результаты исследования можно сформировать карту разнородности, определяющую состояние воды озера Шира в пространстве и времени.

Карта показывает корреляцию между влиянием проб воды на интенсивность биолюминесценции и их химическими и физико-химическими характеристиками, и было показано, что измерения анализа биолюминесценции должны быть сделаны в течение 2 часов после отбора проб.

Преимуществами ферментативных анализов, основанных на системе ферментов с бактериальной оксидоредуктазой и связыванием люциферазы, являются их скорость (время анализа не превышает 3–5 минут), высокая чувствительность, простая процедура измерения, возможность автоматизировать процедуры мониторинга окружающей среды, доступность и безопасность реагентов и широкий рынок для биолюминометров [8, 20-22]. Их так легко и удобно использовать, что они стали использоваться в учебном процессе, особенно на практических курсах по экологии [9-11].

1.2 Определение метода иммобилизации ферментов светящихся бактерий.

В литературе существует множество способов стабилизации ферментов, но наиболее популярным среди них является процесс иммобилизации. Данный метод есть включение молекулы фермента в некоторую фазу, отделенную от фазы свободного раствора, но при этом, она может заменить как субстрат, так и эффектор или ингибирующую молекулу. Производство иммобилизованных реагентов для аналитических целей является одним из наиболее перспективных направлений прикладной энзимологии.

Существуют следующие основные группы методов иммобилизации ферментов: химические методы (образование ковалентных связей) или же физические методы: адсорбция, включение в гель, микрокапсулирование. Также возможно комбинирование этих методов. Преимущество метода химической иммобилизации заключается в том, что фермент не растворяется даже при очень длительном использовании. Существует два основных

подхода к химической иммобилизации: иммобилизация на полимерной подложке и сшивание белковых молекул. Активность фермента, ковалентно иммобилизованного, зависит от многих факторов, таких как свойства фермента и матрицы, способ образования ковалентной связи, условия реакции и т. д. Следует иметь в виду, что во многих случаях ферменты инактивируются во время ковалентной иммобилизации, что приводит к низкому выходу их активности.

Методы физической иммобилизации включают в себя способы, основанные на возможности белков адсорбироваться на различных поверхностях посредством электростатического, гидрофобного и дисперсионного эффектов, например, методы введения в гель или полупроницаемую капсулу. Эти методы подходят для иммобилизации комплексов ферментных комплексов и даже целых клеток.

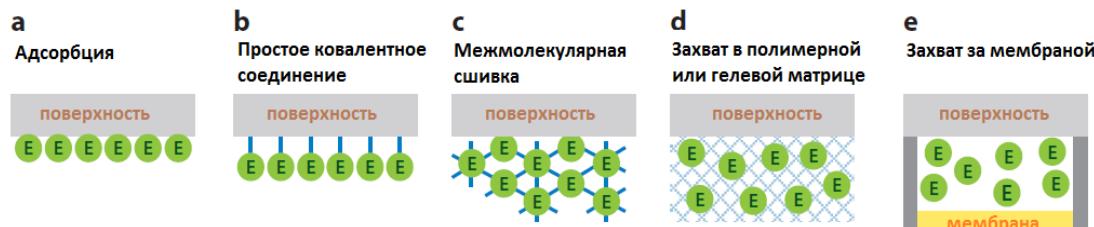


Рисунок 1.1.2. Схематическое изображение различных методов иммобилизации.

Матрица для иммобилизации может иметь различную природу состава, таким образом бывают как натуральные, так и синтетические, используются органические или неорганические материалы, а также может варьироваться молекулярная масса вещества. Однако таковые носители должны соответствовать установленным правилам, чтобы обладать наибольшей эффективностью в использовании, а именно: высокая устойчивость (химическая и биологическая), высокая механическая стойкость (необходимая для создания формы), а также высокая растворимость, для связывания фермента в растворе.

Выбор матрицы для иммобилизации значительно влияет на свойства иммобилизованных ферментов. На практике показано, что иммобилизация способствует улучшению свойств иммобилизованных ферментных препаратов, она меняет их физико-химические свойства: термостабильность, оптимальный pH - уровень, изменение чувствительности к солевым ионам и т. д. [12]. На сегодняшний день разработано более 40 различных методов иммобилизации организмов и выделенных из них ферментов [13 – 15].

Таблица 1.2. Методы иммобилизации и ферментативных систем.

Полиакрил (polyacrylic hydrazide, epoxy methacrylate-Eupergite, Enzacryls)	Светляковая люцифераза, бактериальная люцифераза, NADH:FMN-оксидоредуктаза	Глюкозо-б-фосфатдегидрогеназа, ATP, ионы магния, NADH
Бычий сывороточный альбумин (гель)	Бактериальная люцифераза, NADH:FMN - оксидоредуктаза	NADH, NAD(P)H, креатинкиназа
Коллаген (полоски, мембранны)	Светляковая люцифераза	ATP, АДР, AMP
Нейлон	Светляковая люцифераза, бактериальная люцифераза и NADH:FMN-оксидоредуктаза, 7-а-гидрокистероиддегидрогеназа, лактатдегидрогеназа	ATP, АДР, NADH, D- и L-лактат, желчные кислоты в сыворотке, этанол, глицерол, аминокислоты (фенилаланин, аланин), оксалат, альдегид, D- и L-лактатдегидрогеназа и ионы магния
Крахмал (гель)	Бактериальная люцифераза и NADH:FMN - оксидоредуктаза	Экологический мониторинг, медицинские исследования, определение качества зерновых
Желатин (гель)	Светляковая люцифераза, бактериальная люцифераза и NADH:FMN-оксидоредуктаза	ATP

Очень часто стабильность иммобилизованных препаратов не сочетается с возможностью высокого выхода активности системы, несмотря на широкий выбор методов процесса иммобилизации ферментов.

Для того, чтобы люцифераза связалась с матрицей носителя, необходимо наличие активных групп ферментов, существующих для катализа, после чего происходит инактивация фермента и сбой результата количественного анализа. Очень важно, чтобы иммобилизованные препараты

при биотестировании обладали стабильностью при хранении и применении. Активные центры фермента не должны взаимодействовать при процессе иммобилизации, но в итоге люцифераза должна быть специфичной для субстрата.

Чтобы создать эффективный реагент для анализа биолюминесценции, необходимо осознание механизмов воздействия микроокружения иммобилизованной среды на ферменты. С помощью фиксирования фермента в микроокружение реагента подобно микроокружению в клетке, можно добиться устойчивости с высокой каталитической эффективностью, возможности неоднократного использования, минимальной комплектации и высокой чувствительности [16].

Подобные требования определяет иммобилизация ферментов с помощью включения их в полимерные гели. Примечательность такого метода заключается в стабилизации ферментов благодаря свойству механической и тепловой устойчивости полимерного геля. Эта характеристика особенна при использовании в системах, где pH, температура, высокие концентрации ПАВ (поверхностно-активные вещества) обладает различными значениями. Метод включения в полимерные гели хорош тем, что он может быть полезен для иммобилизации буквально всех ферментов, полиэнзимных систем, клеточных фрагментов и в том числе и клеток [17].

Ферменты, иммобилизованные в крахмальный или коллагеновый гель, на практике проявляют наибольшую эффективность и долгосрочность хранения. Однако такие полимерные гели препятствуют проникновению субстрату в фермент, что является недостатком, потому как происходит понижение каталитической активности иммобилизованного препарата.

Нейтральный крахмал и желатиновые гели, вероятно, следует считать наиболее оптимальной микроокружающей средой для люциферазы. Коиммобилизация 2 ферментов (NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза) обеспечивает вспомогательные выдающиеся качества: субстрат

для люциферазы появляется именно в пространстве, где находится данный фермент, т.е. на плоскости полимера, и, значит, фактическое сосредоточение субстрата FMNH₂ вокруг люциферазы всякий раз выше, чем его средняя сосредоточенность во всем растворе, собственно что более подходит для критерия *in vivo* и, таковым образом, может помочь добиться предельного значения люминесценции. Крахмал и желатин считаются сравнительно дешевыми агентами, и процесс иммобилизации ферментов на крахмальных и желатиновых гелях несложен [3], эти выдающиеся качества определяют конкурентоспособность реагентов, приобретенных из крахмальных или же желатиновых гелей.

Обширное внедрение биолюминесцентного аналитического способа на базе ферментов светящихся бактерий имеет место быть ограничено различными причинами: непостоянство ферментной системы во время применения, узкий срок сбережения реагентов для анализа, надобность создания условий в фазе (рН, температура), наличие примесей в образце. Возможность менять микроокружение ферментов с целью получения ферментативных веществ с наибольшей каталитической активностью и поддержания размеренного свечения при долгом хранении является основным преимуществом биолюминесцентных методов.

Чрезвычайно важно то, что использование биолюминесцентных методов в биотестировании могло повысить точность анализов и автоматизировать их переход от живых организмов к иммобилизованным реагентам.

1.3. Физико-химические характеристики иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN -оксидоредуктаза-люцифераза.

1.3.1 Влияние рН при иммобилизации ферментов.

На сегодняшний день, было неоднократно продемонстрировано влияние иммобилизации на каталитическую активность в зависимости от рН,

влияние на ионный состав, стабильность ферментов и т.д. На рисунке 1.3.1. показана зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза. РН – оптимум для растворимой системы соответствует значению 6.8, в то время как для иммобилизованных систем происходил сдвиг рН – оптимума в щелочную область. При иммобилизации в крахмальный гель, наблюдалась высокая напряженность люминесценции на всем рассматриваемом диапазоне от 5.8 до 7.8. Исследования иммобилизации в желатиновый гель, определили уровень рН, который находился в области от 6.6 до 7.3.

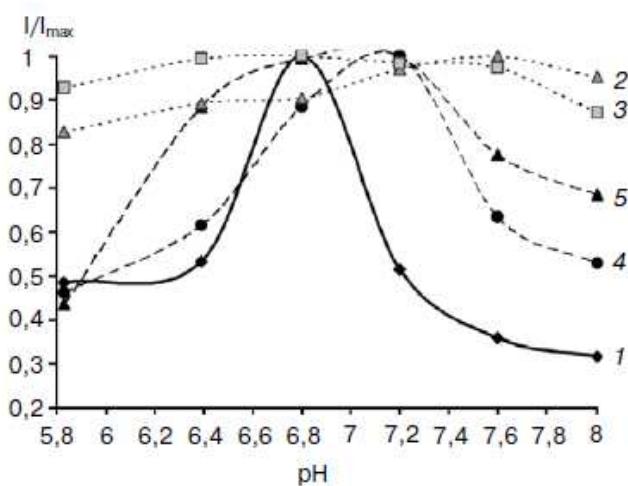


Рисунок 1.3.1. pH-зависимость интенсивности свечения: 1 – растворимые ферменты; 2 – ферменты, иммобилизированные в крахмальный гель; 3 – ферменты, иммобилизированные совместно с субстратами в крахмальный гель; 4 – ферменты, иммобилизированные в желатиновый гель; 5 - ферменты, иммобилизированные совместно с субстратами в желатиновый гель.

Сложно понять механизмы действия, однако влияние pH на активность иммобилизованных ферментов можно обосновать некоторыми заключениями. Наличие в матрице носителя заряженных групп распределяет частица протонов в fazу иммобилизованного реагента. Это подтверждается при иммобилизации ферментов в желатиновый гель с заряженными группами. Можно сделать вывод об иммобилизации ферментов в крахмальный гель, где демонстрируется незначительную зависимость pH (обуславливается электронейтральностью вещества носителя). Вязкость среды, которую продуцирует полимерная матрица, необходима для

свободной диффузии протонов в готовом иммобилизованном ферменте. При возрастании значения рН аналогичном сокращению сосредоточению протонов в реакционной смеси происходит важное изменение катализитической активности, также, вероятна возможность снижения способности диффузии в комплексе с эффектом распространения протонов [18, 19].

Понимание влияния рН для выбранного иммобилизованного препарата способствует стабилизации молекул фермента посредством включения субстратов в активные центры фермента при иммобилизации.

1.3.2. Температурное влияние на активность ферментативных реагентов биолюминесценции.

При воздействии температур в рассматриваемом спектре системы с иммобилизованными ферментами демонстрируют наибольшую катализитическую активность. Так, при иммобилизации в крахмальный гель светимость достигалась больше половины от наибольшего значения, а при иммобилизации в желатиновый гель примерно равна половине (Рисунок 1.3.2.).

Исследована была интенсивность свечения в растворимых системах для полного понимания и описания биферментной системы. Растворимая биферментная система в диапазоне от 15 до 30 градусов Цельсия могла сохранять более половины от наибольшей активности, когда инактивация полностью достигалась уже при температуре 40 градусов Цельсия. Интенсивное свечение растворимой биферментной системы происходило в диапазоне от 20 до 25 градусов Цельсия.

Для ферментов, иммобилизованных отдельно, а также совместно с субстратами уровень температур оказался увеличен, поэтому для крахмального геля она возросла от 5 до 50 градусов Цельсия, а для желатинового геля от 15 до 50 градусов Цельсия.

Важно понять, что является причиной данного эффекта. Возрастание уровня термостабильности при процессе иммобилизации объясняется снижением подвижности ферментов и коферментов в гелевой матрице. Можно сделать вывод о том, что иммобилизация в полимерных гелях оказывает стабилизирующий эффект биферментной системы, однако он лимитируется с повышением температур.

Анализируя имеющиеся результаты, можно сказать о значительной стабилизации системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза при иммобилизации в крахмальный и желатиновые гели по сравнению к денатурирующим агентам. Из всего этого следует, что высокоактивный и стабильный препарат для биолюминесценции может быть получен и оптимизирован с учетом данных способов.

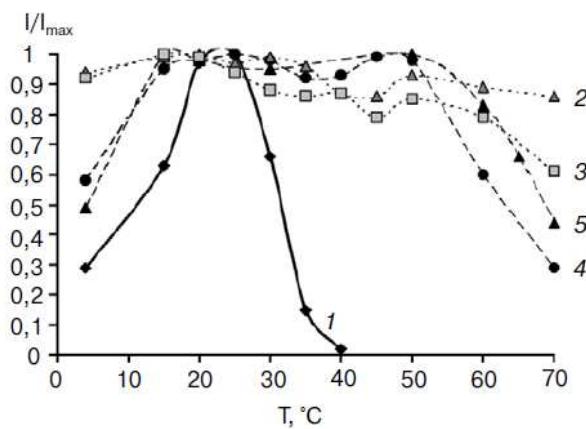


Рисунок 1.3.2. Зависимость интенсивности свечения от температуры инкубирования: 1 – растворимые ферменты; 2 – ферменты, иммобилизованные в крахмальный гель; 3 – ферменты, иммобилизованные совместно с субстратами в крахмальный гель; 4 – ферменты, иммобилизованные в желатиновый гель; 5 - ферменты, иммобилизованные совместно с субстратами в желатиновый гель.

Ранние исследования флуоресценции люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и NAD(P)H: FMN-оксидоредуктазы в присутствии вязких растворителей при нагревании до 35 ° С может понять влияние вязких растворителей и температуры на третичные и вторичные структурные изменения люциферазы и NAD (P) H: FMN-оксидоредуктазы.

Флуоресцентные исследования теплового воздействия на ферменты связанный биферментной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в вязких средах показали отсутствие конформационных изменений люциферазы и NAD (P) H: FMN-оксидоредуктазы третичной и вторичной структуры ферментов. Таким образом, результаты, представленные в этих работах, показывают, что глицерин и сахароза снижают скорость инактивации люциферазы и NAD(P)H: FMN-оксидоредуктазы и сохраняют ее конформацию против термического разворачивания.

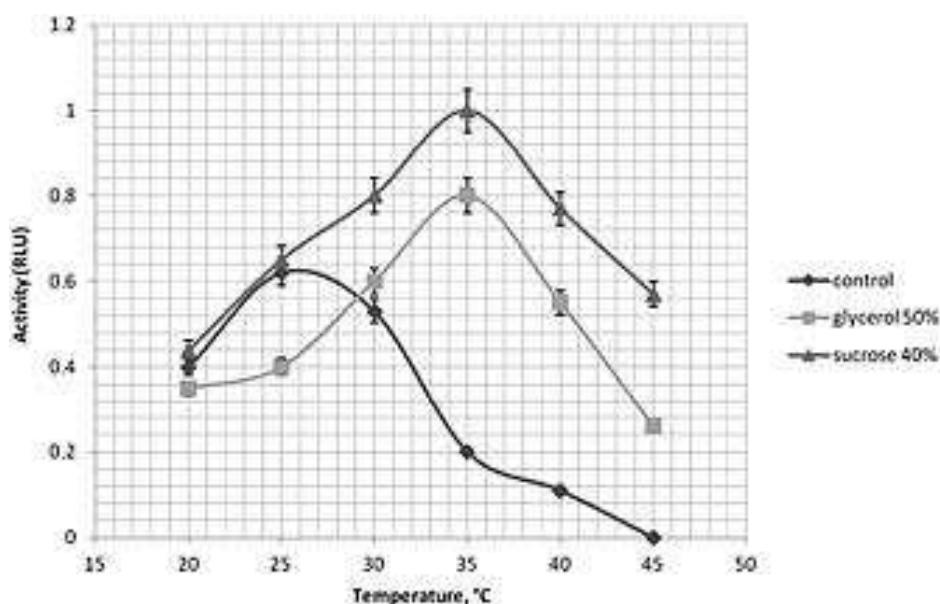


Рисунок 1.3.3.Оптимальная температура связанный ферментной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в отсутствие (◆) и в присутствии 40% сахарозы (вязкость 6,16 мПа) (▲) и 50% глицерина (вязкость 6,05 мПа) (■).

В оптимальных состояниях люциферазы проявляют кинетику свечения «flash» - типа с быстрым затуханием в течение нескольких минут, оптимум температуры такой биолюминесцентной реакции лежит в диапазоне 10-15 градусов Цельсия и, следовательно, далек как от температуры культивирования клеток млекопитающих, так и температуры их тканей. Эта характеристика может оказывать влияние при процессе иммобилизации на дальнейшие биолюминесцентные параметры.

Несмотря на изученность температурного влияния на ферменты, субстраты и микроокружение, воздействие температурного режима высушивания и хранения иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза на активность реагентов и точность результатов анализа осталась не изученной.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

На сегодняшний день в лаборатории Института биофизики СО РАН, совместно с лабораторией биолюминесцентных технологий ФГАОУ ВО «СФУ» разработан реагент «Энзимолюм». Это диски высушенного крахмального геля, который содержит ферменты и субстраты биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза. Изменяя концентрацию ферментов и субстратов, время и способ сушки иммобилизованных реагентов, можно изготавливать реагенты с различной ферментативной активностью и чувствительностью.

В работе использовались следующие приборы: люминометр GloMax 20/20 производства Promega Corporation (США). Активность ферментативной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в растворимом и иммобилизованном состоянии определяли по максимальной светимости.

В этой работе мы используем набор аналитических биолюминесцентных реагентов (CRAB), которые включают люциферазу (L) из рекомбинантного штамма *E.coli* и NADH: FMN - оксидоредуктазу (R) из *Photobacterium leiognathi*, произведенную в Институте биофизики СО РАН (Красноярск). Каждый флакон CRAB содержит 0,5 мг / мл люциферазы, 0,15 ед. NADH: FMN - оксидоредуктазы.

Картофельный крахмал используется в качестве носителя для фотобактериальных ферментов.

Использовались следующие приборы: люминометр GloMax 20/20 производства Promega Corporation (США); терmostат электрический с охлаждением ТСО-1/80 СПУ; электронная пипетка Sartorius; вакуумный смеситель Averon; лабораторные весы.

Чувствительность реагентов оценивали по изменению интенсивности излучения в присутствии раствора соли металла CuSO₄.

Процедура получения иммобилизованных фотобактериальных ферментов заключается в следующем: образец 0,425 г картофельного

крахмала помещают в 20 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 6,8, смесь нагревают до кипения и кипятят в течение 2 минут. 350 г 0,019% миристинового альдегида добавляют к горячему крахмальному гелю и смесь перемешивают в вакуумном смесителе в течение 50 секунд, затем добавляют 110 мкл $1,6 \times 10^{-2}$ М раствора NADH и смесь снова перемешивают. После перемешивания гель охлаждают до 25 ° С. Затем добавляют 300 мкл CRAB, разведенного в 500 мкл буфера, и гель снова перемешивают. Затем гель с включенными ферментами и субстратами наносят на пленку в объеме 25 мкл. Дозированный гель сушат в холодильнике.

2.2 Методы

Прибор регистрации свечения представляет собой хемилюминометр, где внутри него в кювете, содержащую реакционную смесь, происходит реакция с выделением молекул продуктов реакции и выделения световой энергии (лучистая дезактивация) при возвращении их в основное состояние:

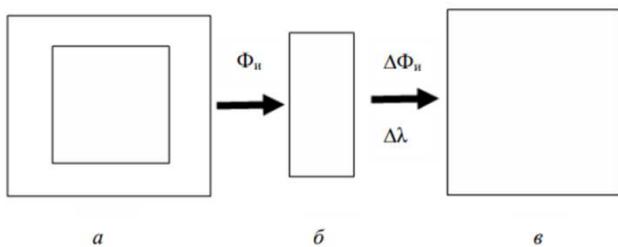


Рисунок 2.2. Направление света в хемилюминометре: а – кювета с исследуемой средой; б – полосовой фильтр, пропускающий поток излученной световой энергии в полосе длин волн λ_1 ; в – фотоприемник; Φ_{ii} – поток световой энергии, излучаемый исследуемой средой; $\Delta\Phi_{ii}$ – поток световой энергии излучения в полосе длин волн.

Авторы: И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин, И. В. Свидерская, Е. Н. Есимбекова, Е. В. Немцева.

Регистрация свечения происходит с помощью прибора GloMax. Динамический диапазон GloMax более чем достаточен, чтобы охватить

обычные люминесцентные применения, тем самым уменьшая необходимость разбавления образцов.

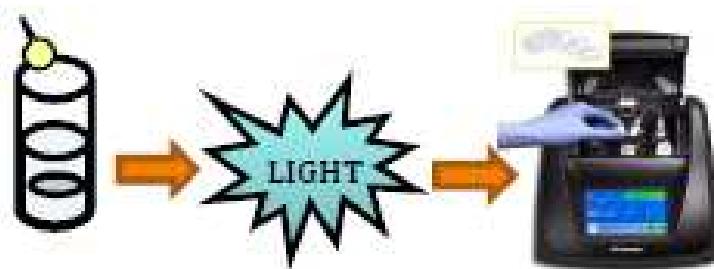


Рисунок 2.3. Схема измерения активности иммобилизованной биферментной системы.

Авторы: Торгашина И.Г., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А.

Активность ферментов, иммобилизованных вместе с субстратами, измеряли в реакционной смеси следующего состава: диск с иммобилизованными ферментами и субстратами (реагент энзимолюм), 300 мкл дистиллированной воды, 10 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М FMN.

Кювету с реакционной смесью помещали в прибор GloMax 20/20 люминометр. Максимальное биолюминесцентное свечение было зафиксировано в Excel 2010.

Активность ферментов, иммобилизованных вместе с субстратами в присутствии соли металла CuSO₄, измеряется в реакционной смеси следующего состава: ферментный реагент, 300 мкл раствора CuSO₄, 10 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М FMN.

Чувствительность реагента оценивают по концентрации полумаксимального ингибирования активности в присутствии модельного токсического агента, сульфата меди.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Оценка влияния температурного режима высушивания иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза.

Для ответа на поставленные задачи первостепенно необходимо было принципиально ответить на вопрос «влияют ли условия высушивания иммобилизованных в крахмальный гель ферментов биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза на их активность»?

Для этого проведено сравнение характеристик иммобилизованной биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза совместно с субстратами NADH и тетрадеканаль в зависимости от различных условий высушивания (Рисунок 3.1.). В данном случае для высушивания реагентов использовали следующие условия: «комнатные» - 30% влажности и температура 25 °C; условия холодильной камеры - 47% влажности и 7 °C температуры, и условия холодильной камеры с вентиляцией - 64% влажности и 5 °C температуры.

Показано, что интенсивность свечения иммобилизованных реагентов зависит от режима высушивания. Так, максимальная интенсивность свечения наблюдалась у реагентов, высущенных при значениях влажности 30% и температуре 25 °C (комнатные условия). В этом случае интенсивность свечения была на 30% больше, чем в случае использования для высушивания холодильных камер. Вероятно, этот результат обусловлен меньшим временем высушивания. При высушивании реагентов в условиях низкой влажности (30%) и температуре 25 °C высыхание происходило менее чем за 5 часов, в то время как при условиях высушивания в холодильных камерах с обдувом воздухом реагентов и без обдува (64% влажность / 5 °C температура и 47% влажность / 7 °C температура соответственно) для высыхания потребовалось более 12 часов.

Однако, во всех случаях разброс значений максимальной интенсивности свечения во всех случаях составил более 25 % и не зависел от температуры высушивания.

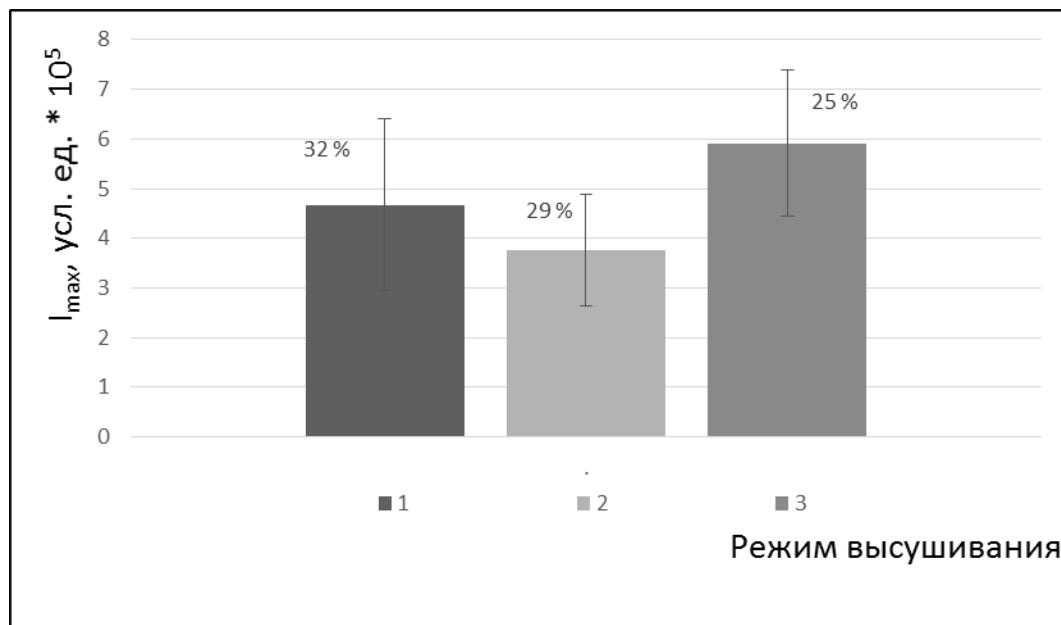


Рисунок 3.1. Зависимость максимальной интенсивности свечения иммобилизованной биферментной системы NAD(P)H: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза от температурного режима высушивания: 1 – (64% влажность, 5°C температура); 2 – (47% влажность, 7 °C температура); 3 – (30% влажность, 25 °C температура).

Таким образом, показано, что температурный режим, а также вероятно режим влажности влияет на время высушивания реагентов биферментной системы NAD(P)H:FMN – оксидоредуктаза – люцифераза и на их активность. Однако указанные режимы не повлияли на разброс значений максимальной интенсивности свечения.

Кроме того, была исследована зависимость чувствительности иммобилизованной биферментной системы NAD(P)H:FMN – оксидоредуктаза – люцифераза к действию сульфата меди от условий высушивания реагента (Рисунок 3.2.).

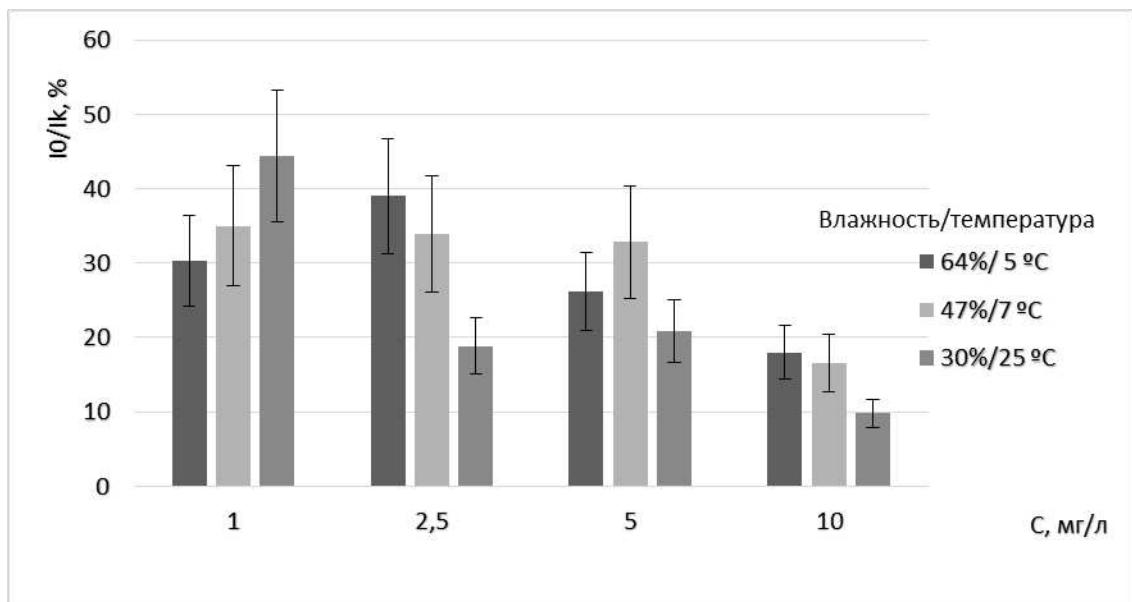


Рисунок 3.2. Остаточная интенсивность свечения иммобилизованной совместно с субстратами NADH и тетрадеканаль NAD(P)H: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза от концентрации сульфата меди.

Показано, что чувствительность реагентов зависит от режима высушивания. Таким образом, методика иммобилизации биферментной системы NAD(P)H:FMN – оксидоредуктаза – люцифераза может быть оптимизирована путем изменения режима высушивания без потери активности и чувствительности.

Для дальнейшего исследования влияния температурного режима высушивания реагентов биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза в работе использовали термостат электрический с охлаждением ТСО-1/80 СПУ. Были исследованы характеристики иммобилизованной биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в зависимости от температур высушивания: 5, 10, 15 и 25 °C. (Рисунок 3.3.). Контролировать влажность в данном эксперименте не представлялось возможным, однако уровень влажности на всем промежутке времени высушивания составил не более 45%. Показано, что интенсивность свечения иммобилизованных реагентов зависит от режима высушивания.

Таким образом, максимальная интенсивность свечения наблюдалась у реагентов, высушенных при значении температуры 10 °С. При увеличении температуры высушивания максимальная интенсивность свечения снижалась, что вероятно обусловлено термоинактивацией ферментов в процессе высушивания.

Вместе с тем, разброс значений максимальной интенсивности свечения во всех случаях составил более 20 % и не зависел от температуры высушивания.

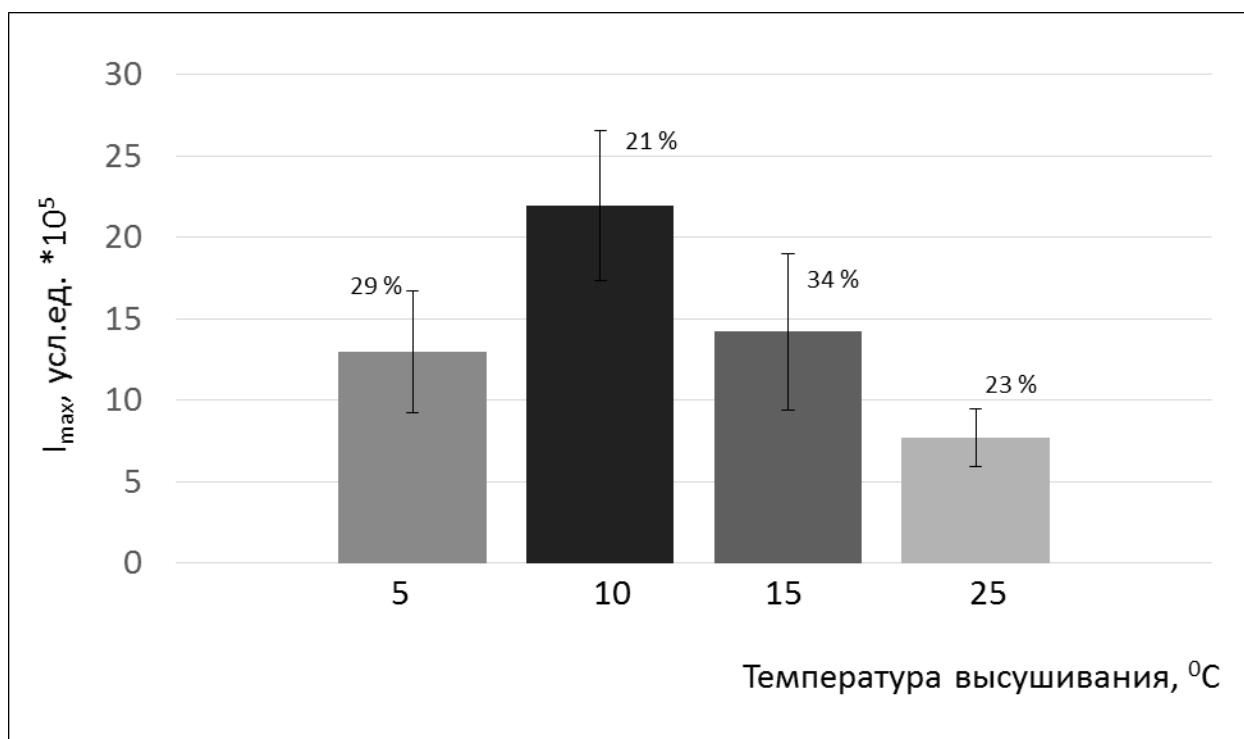


Рисунок 3.3. Зависимость выхода активности связанной ферментной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза от температуры высушивания.

3.2 Оценка влияния режима хранения иммобилизованной совместно с субстратами биферментной системы NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза–люцифераза.

Для полного исследования температурных характеристик биферментной системы NAD(P)H: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза был проведен анализ максимальной интенсивности свечения в зависимости от условий хранения иммобилизованных дисков при определенных

значениях температуры окружающей среды. Диски с иммобилизованными ферментами и субстратами хранили в закрытых флаконах. Для хранения использовали следующие условия: «комнатные» - температура 25 °C; условия холодильной камеры -5 °C температуры, и условия холодильной камеры с вентиляцией 10 °C температуры.

На первой неделе хранения максимальная интенсивность свечения наблюдалась при хранении реагентов в условиях -5 °C температуры, однако уже через 2 недели хранения при этой температуре активность уменьшилась приблизительно в 3 раза (Рисунок 3.4.). При хранении в течение недели в комнатных условиях, активность реагентов была существенно ниже и далее наблюдалось падение активности, что также может быть связано с термоинактивацией ферментов.

Таким образом, оптимальным значением является темепратура 10 градусов Цельсия, при таких условиях потеря активности через 2 недели хранения оказалась минимальной. Влияния на разброс значений максимальной интенсивности свечения рассмотренные условия хранения не оказали.

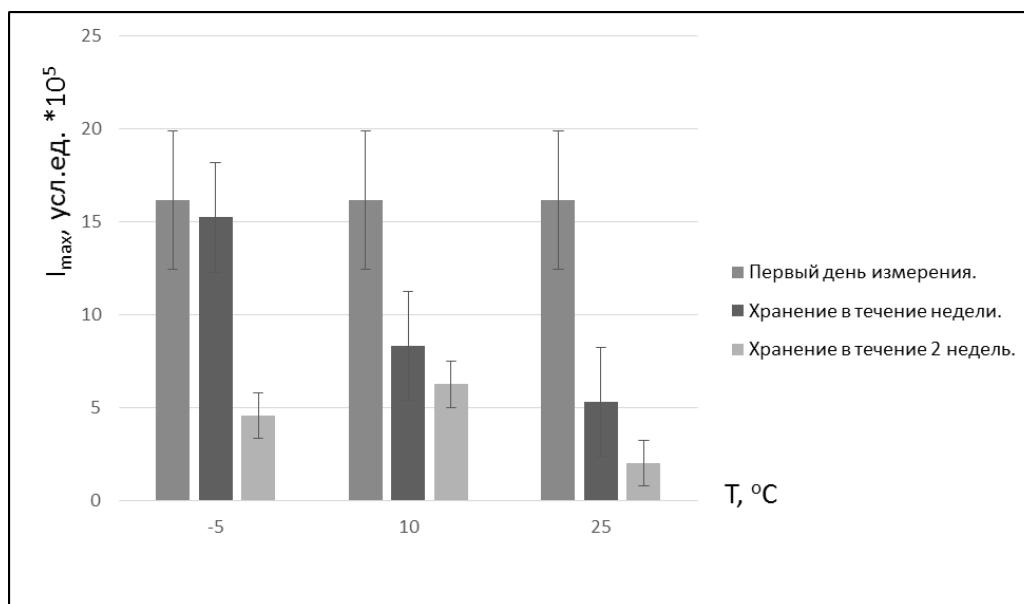


Рисунок 3.4. Зависимость максимальной интенсивности свечения иммобилизованной биферментной системы NAD(P)H: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза от условий хранения.

ВЫВОДЫ

В результате работы были сделаны следующие выводы:

1. Оптимальная температура высушивания и хранения для обеспечения максимальной интенсивности свечения и стабильности активности иммобилизованной совместно с тетрадеканалем и NADH биферментной системы NAD(P)H: FMN – оксидоредуктаза – люцифераза 10 °C.
2. Температурный режим высушивания и хранения иммобилизованной совместно с тетрадеканалем и NADH биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза не оказывает влияние на разброс значений максимальной интенсивности свечения в диапазоне от 5 до 25 °C и от -5 до 25 °C соответственно.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hasan A., Nurunnabi M., Morshed M. Recent Advances in Application of Biosensors in Tissue Engineering.//BioMed Res Int. 2014.
2. Puget K. Studies in bioluminescence. Bacterial NADH: FMN - oxidoreductase / K. Puget, A.M. Michelson, S. Adrameas // Anal. Biochem., 1977. -V.79.-P. 447-456.
3. Esimbekova E.N., Kondik A.M., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity. – Environ Monit Assess. – 2013. – V. 185. – I 7. – P. 5909–5916.
4. Vetrova EV, Kudryasheva NS, Kratasyuk VA (2007) Redox compounds influence on theNAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase bioluminescent system. Photoch Photobiol Sci 6:35–40.
5. Kratasyuk VA, Kuznetsov AM, Rodicheva EK et al (1996) Problems and prospects of bioluminescence assays in ecological monitoring. Sib J Ecol 5:397–40.
6. PD 53.18.24.83-89 (1990) Methods of estimation of kinetic indices of surface water quality/ Gidrometeoizdat, Moscow.
7. Vetrova EV, Kratasyuk VA, Kudryasheva NS (2002) Bioluminescent characteristics of Shira Lake water. Aquat Ecol 36:309–315.
8. Deryabin DG (2009) Bacterial bioluminescence: base and applied aspects. Science, Moscow.
9. Gitelson JI, Kratasyuk VA (2002) Bioluminescence as an educational tool. In: Kricka LJ, Stanley PE (eds) Bioluminescence and chemiluminescence: progress and current applications. World scientific publishing, River Edge, pp 175–182.
10. Kratasyuk VA, Gusev SM, Remmel NN et al (2007) Bioluminescence in the spaceflight and life science training program at Kennedy space center. In: Szalay A, Hill P, Kricka L, Stanley P (eds) Bioluminescence and

- chemiluminescence: chemistry, biology and applications. World scientific publishing, San Diego, pp 257–260.
11. Kratasyuk VA, Kuznetsov AM, Gitelson LI (1997) Bacterial bioluminescence in ecological education. In: Hastings JW, Kricka ZJ, Stanley PE (eds) Bioluminescence and chemiluminescence (molecular reporting with photons). Wiley, Chichester, pp 177–180.
 12. Жеребцов, Н.А. О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала/ Н.А. Жеребцов, И.Д. Руадзе, А.Н. Яковлев // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. - том 31, № 6. - С.599-603.
 13. Ugarova, N., and Lebedeva, O. (1987) Appl. Biochem. Biotechnol., 15, 35-51.
 14. Kratasyuk, V., and Esimbekova, E. (2003) in Polymeric Biomaterials. The PBM Series, vol. 1 (Arshady, R., ed.), Citus Books, London, pp. 301–343.
 15. Esimbekova, E., and Kratasyuk, V. (2005) in Bioluminescence & chemiluminescence: progress & perspectives, (Tsuiji, A., Matsumoto, M., Maeda, M., Kricka, L., Stanley, P., eds), World Scientific Publishing Co., Singapore, pp. 237–240.
 16. Кратасюк В.А., Абакумова В.В., Ким Н.Б. (1994) Биохимия, 59, 1020–1026.
 17. Березин, И.В. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашев, К. Мартинек, В.В. Можаев, Ю.Л. Хмельницкий. – М.: Высшая школа, 1987. – 160 с.
 18. Esimbekova, E. N. Application of enzyme bioluminescence in ecology. / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, O. Shimomura. // Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk. – 2015. Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology. – V. 1. – p. 67 – 109.
 19. Лениндже А. Биохимия / А. Лениндже // М.: Мир, 1974. - 960 с.
 20. Кудряшева Н.С. Закономерности ингибирования бактериальной биолюминесценции *in vitro* хинонами и фенолами - компонентами

- сточных вод / Н.С. Кудряшева, Е.В. Шалаева, Е.Н. Задорожная, В.А. Кратасюк // Биофизика, 1994. - Т.39, N3. - С. 455-464.
21. Кудряшева Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова; Краснояр. гос. ун-т. - Красноярск, 2002. -154 с.
22. Esimbekova E.N. Bioluminescent method non-specific endotoxicosis in therapy / E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, V.V. Abakumova // Luminescence, 1999. - N 14. - P. 197-198.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Рыжкова Ю. А. Краснод.
подпись инициалы, фамилия
• 22 июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

Оптимизация температурного режима высушивания иммобилизованной
биоферментной системы NADH: FMN - оксидоредуктаза - люцифраза для
обеспечения максимальной интенсивности свечения и точности
иммобилизованных реагентов

Научный руководитель *Чайковская Елена Георгиевна* И. Г. Торганина
имени Григория Аркадьевича Торганина, степень кандидата наук, фамилия
Выпускник *Рыжкова Юлия Олеговна* О. А. Ципельник
имени Ольги Александровны Ципельник, фамилия

Красноярск 2020