

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
заведующий кафедрой

Т.Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

«_____» _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Высокоактивные делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa*:
получение и характеристика репортерных свойств

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Руководитель

подпись, дата

в.н.с., канд. биол. наук

должность, ученая степень

С. В. Маркова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

И. А. Коротов

инициалы, фамилия

Рецензент

подпись, дата

с.н.с., канд. биол. наук

должность, ученая степень

М.Ю. Трусова

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

Реферат

Магистерская диссертация по теме «Высокоактивные делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa*: получение и характеристика репортерных свойств» содержит 47 страниц текстового документа, 13 рисунков, 1 таблицу и 54 использованных источника литературы.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИФЕРАЗА, *METRIDIA LONGA*, МУТАНТНЫЙ БЕЛОК, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР.

Целью данной работы было получить и охарактеризовать делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa* Mluc7-28G, укороченный на 10 аминокислотных остатков, и Mluc7-28G4, укороченный на 14.

Данная работа имеет фундаментальное и прикладное исследовательское значение. Укороченные варианты облегчат исследования структуры каталитического домена люциферазы *Metridia longa* и гомологичных ей люцифераз. Полученные делеционные мутанты могут быть использованы в качестве биолюминесцентных репортеров: их малые размеры помогут снизить стерический эффект при исследовании межмолекулярного взаимодействия; повысить эффективность при использовании в BRET-системах за счет уменьшения расстояния между активными центрами донора и акцептора; кроме того, уменьшить метаболическую нагрузку на клетку-хозяина в исследованиях *in vivo*.

В ходе работы были получены высокочистые активные белковые препараты Mluc7-28G и Mluc7-28G4. Усовершенствован метод экстракции целевого белка из телец включения путем растворения в 4М гуанидине. Были определены основные люминесцентные свойства: удельная активность; зависимость активности от температуры, pH и концентрации солей; термостабильность и спектр эмиссии.

Удельная активность мутанта Mluc7-G28 составляла 72% от исходной люциферазы; активность Mluc7-28G4 – 18% от исходной люциферазы. Также было установлено, что исследуемые делеционные мутанты обладают высокой термостабильностью. Оптимум pH и оптимум концентрации NaCl соответствует дикому типу. Температурный оптимум для делеционных мутантов смещается к 7-10 °C, тогда как для дикого типа составляет 12-15 °C. Показано, что активность варианта Mluc7-28G4 падает в два раза уже при 15°C. Тогда как у варианта Mluc7-G28 и дикого типа такое снижение активности происходит только при 23°C. Определены спектры биолюминесценции. Пик эмиссии для исследуемых люцифераз имеет ~485-490 нм. Вариант Mluc7-G28 более перспективен в качестве биолюминесцентного репортера, чем Mluc7-28G4, за счет более высокой удельной активности и лучшего сохранения активности при повышении температуры.

Оглавление

Реферат.....	1
Введение.....	4
1 Литературный обзор	6
1.1 Биолюминесценция: типы и механизм явления	6
1.2 Люциферазы копепод	8
1.3 Характеристика люциферазы <i>Metridia longa</i>	10
1.4 Биолюминесцентные репортеры и их применение в биоимиджинге.	13
1.4.1 Биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET) ...	16
1.5 Использование MLuc в качестве репортерного белка.	17
2 Материалы и методы	20
2.1 Получение компетентных клеток <i>E.coli</i>	20
2.2 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	20
2.3 Получение MLuc7 и ее делеционных мутантов в клетках <i>E. coli</i> штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	21
2.4 Получение телец включения <i>E.coli</i>	21
2.5 Отмывка и растворение телец включения <i>E. coli</i>	21
2.6 Растворение телец включения	22
2.7 Фолдинг люцифераз	22
2.8 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы	22
2.9 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли	23
2.10 Измерение биолюминесцентной активности.....	23
2.11 Характеризация делеционных мутантов	24
2.12 Снятие спектров биолюминесценции.....	25
2.13 Определение концентрации белка методом BSA.....	25
3 Результаты	26
3.1 Получение и очистка белковых препаратов.	26
3.2 Характеризация свойств люцифераз.....	33

Выводы.....	37
Заключение	38
Список сокращений	40
Список литературы	42

Введение

Широко распространенное в природе явление биолюминесценции нашло свое применение в биомедицинских исследованиях. Репортерные люциферазы применяют *in vivo* и *in vitro* для визуализации различных внутриклеточных процессов, межмолекулярных взаимодействий, анализах цитотоксичности и многого другого. Люциферазы – это собирательное наименование группы ферментов, катализирующих окисление субстрата «люциферина» кислородом с образованием квантов света. Данные ферменты независимо эволюционировали у представителей различных таксонов, вследствие чего структура, свойства и механизм их действия крайне разнообразны. Известны десятки природных биолюминесцентных систем, и на их основе разработано множество репортеров. Вместе с тем поиск новых люцифераз и улучшение репортерных свойств уже существующих продолжается. Новые открытия позволяют расширить области применения и получить широкий спектр репортеров с различными характеристиками, подходящих для решения конкретных задач.

Среди основных требований, предъявляемых к большинству биолюминесцентных репортеров, независимо от особенностей применения, можно выделить высокую яркость и малые размеры репортерной молекулы. В этом плане перспективными оказываются люциферазы копепод, в частности люцифераза MLuc7, выделенная из морских копепод *Metridia longa*, на сегодняшний день имеет наименьшие размеры, но не уступает в активности другим люциферазам.

Данная работа имеет фундаментальное и прикладное исследовательское значение. Укороченные варианты облегчат исследования структуры каталитического домена люциферазы *Metridia longa* и гомологичных ей люцифераз. Создание укороченных вариантов люцифераз позволит расширить их область применения в медицинских и биологических исследованиях. В частности, уменьшение размеров биолюминесцентного репортера поможет снизить стерический эффект при исследовании межмолекулярного взаимодействия; повысит эффективность при использовании в BRET-системах за счет уменьшения расстояния между активными центрами донора и акцептора; кроме того, уменьшит метаболическую нагрузку на клетку-хозяина в исследованиях *in vivo*.

Целью данной работы является получение и характеристика высокоактивных минимальных каталитических вариантов люциферазы MLuc7 для определения оптимального варианта для дальнейшего использования в качестве биолюминесцентного репортера.

Объектами исследования выступали полученные ранее высокоактивные укороченные варианты 16.5 кДа MLuc7 люциферазы: MLuc7-G28, укороченный на 10 аминокислот с N-конца (без учета природного сигнального пептида) и MLuc7-28G4C, укороченный на 10

аминокислот с N-конца и 4 аминокислоты с C-конца, с молекулярным весом 15,4 кДа и 15 кДа соответственно.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка процедуры получения, очистки и фолдинга чистых белковых препаратов Mluc7-G28 и Mluc7-28G4C при использовании бактериальной системы экспрессии.
2. Получение высокочистых активных белковых препаратов рекомбинантных люцифераз: MLuc7 дикого типа, MLuc7-G28 и MLuc7-28G4C
3. Характеризация олигомеризации белка.
4. Определение основных физико-химических свойств делеционных мутантов: удельной активности, температурного оптимума биолюминесцентной реакции, оптимума pH, оптимум концентрации NaCl.
5. Определение спектров биолюминесценции.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на конференциях «Перспектив Свободный» (2020 и 2021 гг) и конференции молодых ученых ИБФ СО РАН (2021 год).

1 Литературный обзор

1.1 Биolumинесценция: типы и механизм явления

Явление, при котором живые организмы испускают свет, широко распространено в природе, и называется биolumинесценцией. Свечение происходит в результате химической реакции, катализируемой ферментами люциферазами [1,2]. Самый известный пример такого явления - это свечение светляков. Кроме них биolumинесценция обнаружена у представителей самых разнообразных таксонов: от бактерий и простейших до разнообразных кишечнорастворимых и моллюсков. Насчитывается несколько тысяч биolumинесцентных видов среди представителей более чем 700 родов [3]. Шире биolumинесценция распространена у морских животных. При этом у глубоководных организмов и планктонных явление встречается чаще, чем у бентосных или мелководных. Визуальная открытость толщи океана, в которой отсутствуют укрытия, вероятно способствует распространенности биolumинесценции в этих условиях. В открытом океане численность биolumинесцентных видов обычно достигает 50% и может превышать 90% [4].

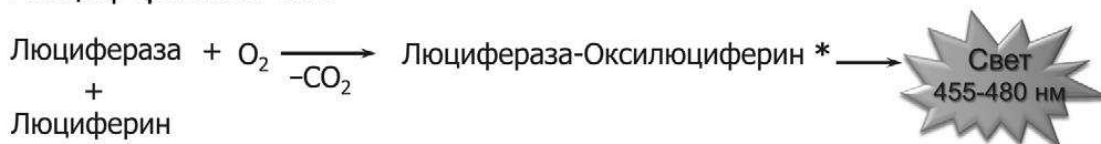
В пресном водоеме свечение организмов почти отсутствует, за редким исключением, например, личинок некоторых насекомых. На суше способность излучать свет имеют уже упомянутые светляки, грибы, многоножки, улитки и дождевые черви. Биolumинесценция имеет различное значение для живых организмов. В одних случаях ее используют для охоты, защиты или привлечения особей противоположного пола. В других – значение этого явления не столь очевидно [1].

Для описания биolumинесцентной реакции применимы такие названия, как «люцифераза», фермент катализирующий реакцию, и «люциферин», субстрат реакции. Однако данные термины носят скорее собирательное и функциональное понятие, чем структурно-химическое, так как механизмы свечения, ферменты и субстраты очень разнообразны и у разных таксонов могут сильно различаться. [3]. Среди морских обитателей наиболее распространены люциферины, относящиеся к имидазолпиразиновому типу. Одним из таких субстратов является целентеразин [2].

Выделяют два основных типа биolumинесцентной реакции: люциферазная и фотопротеиновая (рисунок 1). Для люциферазного типа реакции характерно прямое и быстрое окисление субстрата люциферина с образованием возбужденного оксилуциферина, переход в основное состояние которого приводит к испусканию квантов света [2]. К этому типу относятся биolumинесцентные системы копепод, креветок рода *Oplophorus*, остракод, сцифоидных медуз, коралла *Renilla* [1, 2, 3]. Второй тип характеризуется наличием устойчивого фермент-субстратного комплекса, существующего длительное время. Фотопротеин в этом случае

«предварительно заряжен». Биolumинесценция вызывается внутримолекулярной реакцией окисления, запускаемой определенным внешним фактором [2]. В роли таких кофакторов могут выступать ионы Ca^{2+} у медуз, Mg^{2+} и АТФ у светлячков, H^+ у динофлагеллят, H_2O_2 у дождевых червей, FMNH₂ и NADH у бактерии, цианид-ионы у бермудских огненных червей и ионы двухвалентного железа у пергаментных трубчатых червей [4, 5].

Люциферазный тип



Фотопротеиновый тип (Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин)

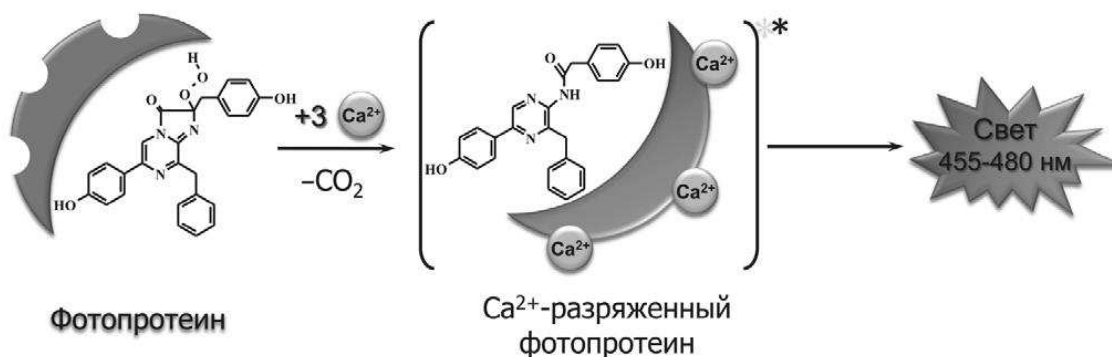


Рисунок 1. Общая схема люциферазного и фотопротеинового типов биolumинесцентных реакций [2].

Химический механизм реакции для всех биolumинесцентных белков, использующих люциферины имидазопиразинового типа в качестве субстрата, представляется общим и имеет следующий механизм. Первой стадией реакции является депротонирование N7 целентеразина с основанием, дающим анион C2(-). Затем посредством единственного переноса электрона генерируются радикалы целентеразина и аниона супероксида кислорода. Их дальнейшее взаимодействие приводит к образованию аниона пероксида целентеразина. Его циклизация дает промежуточный диоксетанон, быстрое разложение которого вызывает выделение CO₂ и создание синглетного возбужденного состояния продукта, целентерамида [6].

В качестве примеров Ca^{2+} -регулируемых биolumинесцентных систем можно привести фотопротеины обелин, акворин, фиалидин и халистаурин, выделенные из медуз *Obelia*, *Aequorea*, *Phialidium* (*Clytia*) и *Halistaura* (*Mitrocoma*), соответственно. Субстратом для этих ферментов является «преактивированный» кислородом целентеразин, а именно 2-гидропероксицелентеразин. Биolumинесценция протекает при наличии кофактора – ионов кальция. Связывание кофактора с Ca^{2+} -связывающими сайтами на поверхности белка ведет к изменению конформации в субстрат-связывающем сайте белка. Это приводит к дестабилизации молекулы субстрата и запуску реакции окислительного декарбоксилирования, которая

и приводит к образованию целентерамида в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света [1, 2, 7]. Спектр излучения определяется различными факторами, такими как структура биолюминесцентного субстрата, являющегося собственно эмиттером, конформацией активного сайта люциферазы и условиями протекания биолюминесцентной реакции [8].

Также существуют фотопротеины, представляющие собой комплекс из белка и ковалентно связанного с ним целентеразина. К таким фотопротеинам относятся симплектин из кальмара *Symplectoteuthis oualaniensis*, реакция которого инициируется кислородом и ионами калия, и фолазин из моллюска *Pholas dactylus*, инициируемого активными формами кислорода [2].

1.2 Люциферазы копепод

Копеподы, или веслоногие рачки, являются доминирующей группой представителей зоопланктона в океане. Далеко не все способны к свечению, но биолюминесценция некоторых из них известна уже более 100 лет. Свечение рачки могут использовать в защитных целях. Например, эпидермальные железы морской копеподы *Metridia longa* выделяют в окружающую среду люциферазу и субстрат в ответ на различные раздражители, тем самым образуя свечение вдали от рачка. Это вполне может служить отвлекающим механизмом защиты от хищников [9, 10, 11].

Первые люциферазы MLuc и GrLuc из копепод *Metridia longa* и *Gaussia princeps*, соответственно, были клонированы методом функционального скрининга кДНК библиотек генов, а кДНК гены, кодирующие остальные гомологичные люциферазы, были изолированы с помощью дегенеративных праймеров, сконструированных по уже известным последовательностям. [3, 10]. GrLuc была клонирована в 2002 году [12], а MLuc – в 2004 году [10]. Их успешно применяют в качестве биолюминесцентных репортеров как *in vitro*, так и *in vivo*. Люциферазы копепод являются целентеразин-зависимыми [2, 3] и представляют собой небольшие секретируемые белки размером ~18,4–24,3 кДа. Эти белки можно условно разделить на три части: отщепляемый сигнальный пептид для секреции, вариабельный N-конец и С-концевую консервативную часть длиной около 70 аминокислотных остатков. Консервативная часть богата цистеином и предполагает наличие до пяти S–S связей на каждую молекулу [3]. Биолюминесцентный сигнал для этих люцифераз характеризуется быстрой кинетикой – в самом начале свечения наблюдается яркая вспышка, которая со временем быстро затухает [2, 3, 10, 12,]. Для протекания биолюминесцентной реакции не требуется АТФ [3, 10, 12]. При исследовании кинетики GLuc было выявлено, что затухание светового сигнала связано не с истощением субстрата, а скорее вызвано необратимой инактивацией фермента. Вероятно, продукты реакции необратимо связываются с ферментом, чем и обусловлена кинетика «вспышки» [13].

Из нескольких видов светящихся копепод было изолировано сразу несколько генов, кодирующих 2–3 изоформы люциферазы, причем различия между некоторыми изоформами одного вида оказались сопоставимы с таковыми между люциферазами таксономически далеких видов копепод. [10]. Филогенетическое дерево *Metridia* построено на основе анализа аминокислотных последовательностей 25 люцифераз веслоногих. Филогенетический анализ этих белковых последовательностей позволил предположить, что гены люциферазы I и II типа из *Metridia* и *Pleuromamma* были получены путем дупликации генов в узле с после разделения суперсемейств *Metridinidae* и *Lucicutiidae* в узле a (рисунок 2). аСорLuc43 (позиция в узле a) является общим предком для суперсемейств *Metridinidae* и *Lucicutiidae*, тогда как аСорLuc48 (узел b) является общим предком для суперсемейства *Heterorhabdidae*. Обе линии люцифераз содержат высококонсервативные аминокислотные остатки С-х (3) –С-Л-х С –Л-х (4) – С-х (8) –Р-х-Р-С в последовательностях tandemных повторах [14], отчетливо видно это на рисунке 3 (мотив 1).

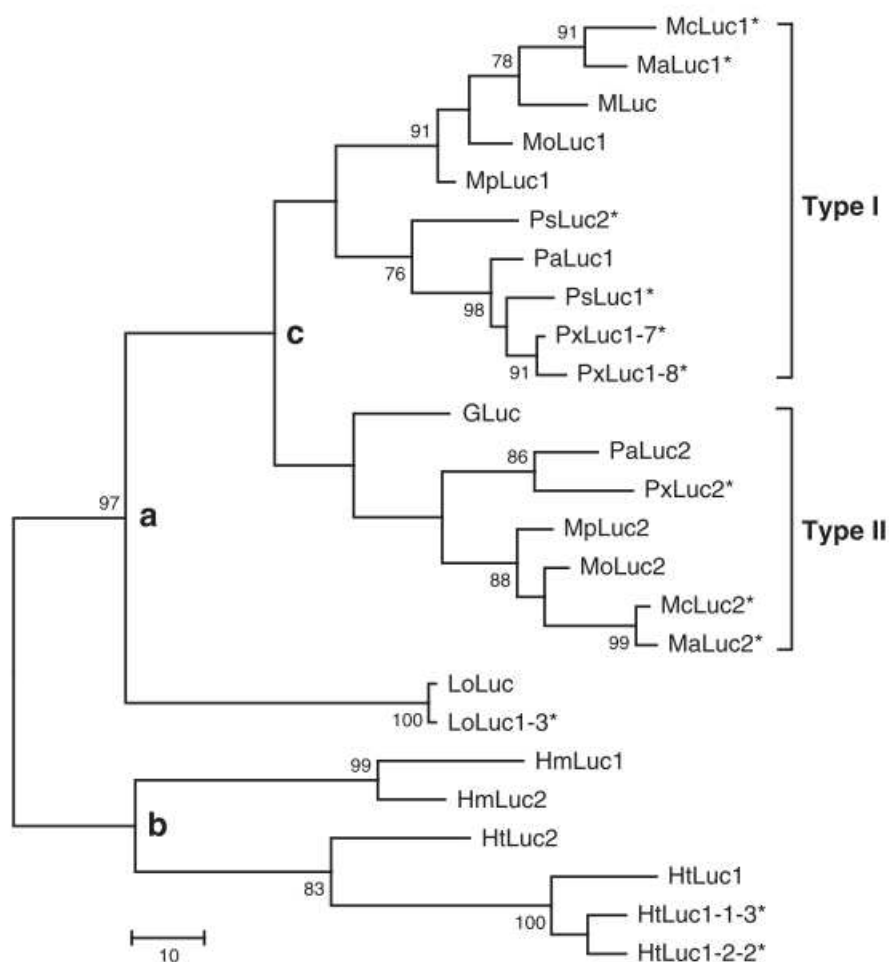


Рисунок 2 Молекулярный филогенетический анализ 25 люцифераз копепод по методу ML, проведенный в MEGA5. Проценты дублированных деревьев, в которых связанные таксоны, сгруппированные вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показаны только на узлах с высокой или умеренной поддержкой (N74%) рядом с ветвями. Дерево построено в масштабе, длина ветвей измеряется числом замен на сайт. аСорLuc43 и аСорLuc48, предполагаемые наследственные люциферазы веслоногих ракообразных, расположены в узлах a и b соответственно [14].

Люциферазы копепод обладают высокой биолюминесцентной активностью и экстремально высокой термостабильностью, которая может быть обусловлена большим количеством S-S-связей, стабилизирующих пространственную структуру молекулы [3].

В то время как многие животные получают люциферин целентеразин с пищей, исследования показывают, что представители рода *Metridia* (в частности *M. lucens* и *M. pacifica*), по-видимому, являются одними из немногих известных животных, продуцирующих целентеразин *de novo*. Однако метаболические пути, которые приводят к получению целентеразина внутри копепод, в настоящий момент не известны [15].

1.3 Характеристика люциферазы *Metridia longa*

Люцифераза *Metridia longa* представляет собой секретируемый фермент, субстратом для которого является целентеразин [16]. В естественных условиях выделяется во внешнюю среду из эпидермальных желез, расположенных на голове и брюшке рачка [3, 9, 10]. Излучение света происходит в голубой области спектра, максимальная длина волны составляет 485 нм [2, 3, 10].

На сегодняшний день для люциферазы *Metridia longa* клонированы несколько типов неаллельных изоформ различной длины (17-24 кДа) MLuc164, MLuc39, MLuc 2 и MLuc7, которые охарактеризованы с использованием чистых рекомбинантных белков, полученных при секреции в клетках насекомых. Две изоформы люциферазы *Metridia longa* – MLuc164 и MLuc7 были успешно использованы в качестве секретируемых репортеров в клетках млекопитающих *in vivo*, а MLuc39 – *in vitro*. Температурный оптимум ферментов различается, что обеспечивает адаптацию к мгновенным изменениям температуры воды во время суточных вертикальных миграций копепод [21]. Изоформа MLuc7 является самой маленькой люциферазой на сегодняшний день (168 аминокислот и 16,5 кДа). Малые размеры репортерной молекулы позволяют снизить стерический эффект при исследовании межмолекулярных взаимодействий и уменьшить метаболическую нагрузку на клетки. А также повышают эффективность использования в BRET системах. Немаловажным преимуществом люциферазы *Metridia longa* является наибольшая удельная активность по сравнению с другими известными изоформами [17]. На рисунке 3 приведены аминокислотные последовательности люцифераз MLuc2 и MLuc7 в сравнении с люциферазой GrLuc.

Как показывает недавнее исследование люциферазы GrLuc, три из пяти цистеиновых связей образованы между аминокислотами двух идентичных повторов (C59/C120, C52/C127 и C56/C123). Тогда как оставшиеся две пары цистеинов образуют связи внутри повторов (C65/C77, и C136/C148). Такие результаты были получены на основании данных ЯМР [18].

клетках прокариот, так как окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы препятствует правильному созреванию белка [20]. Также в бактериальных клетках MLuc экспрессируется в виде нерастворимых телец включения, в которых белок находится в денатурированном виде [10, 20, 21]. Правильный фолдинг белка может обеспечить эукариотическая клетка. Как, например, при использовании бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых линии Sf9. В клетках насекомых происходит посттранскрипционная модификация, и правильно формируются дисульфидные связи [21]. Возможно также получение секретируемой люциферазы, что предполагает выделение белка из культуральной жидкости. Но применение прокариотических систем экспрессии является более выгодным и более простым решением даже при низком выходе белка, если получается разработать систему фолдинга. Люциферазы (например, изоформы MLuc164 и MLuc39) были выделены в форме телец включений в клетках *E. coli* и растворены в 6 М гуанидин хлориде. Далее производился фолдинг в специальных условиях, разработанных для белков, содержащих внутримолекулярные дисульфидные связи. Было показано, что после проведения фолдинга люциферазы и её дальнейшей очистки с помощью хроматографии и гель-фильтрации, у MLuc7 из телец включения *E.coli* правильно формируются дисульфидные связи. Такой белок обладает теми же свойствами что и люцифераза из культуральной жидкости клеток насекомых. Они обладают одинаковым спектром биолюминесценции и оптимумом pH около 7,3-7,4. Также оба образца показали одинаковую зависимость биолюминесцентной активности от температуры; температурный оптимум лежит в пределах 15°C. Оба образца обладают высокой термостабильностью и сохраняют до 70% первоначальной активности даже после инкубации при 100°C в течение часа. Также они сохраняли первоначальную активность после хранения в буфере при 4°C в течение месяца [21, 22].

Отдельный интерес представляет психрофильный клон MLuc, названный MLuc2. Оптимум биолюминесценции этой изоформы отличается от других люцифераз *Metridia longa*, и составляет 5°C и 1 М NaCl. Для сравнения, MLuc7 проявляет наибольшую активность при 12-17°C и в 0,5 М NaCl. Эта изоформа сильно отличается от других типов и по составу. Сходство аминокислотных последовательностей составляет всего лишь 54-64%, что указывает на принадлежность к отдельной группе паралогических генов люциферазы *Metridia longa*. Также было показано, что в этой психрофильной люциферазе присутствуют вставки глицина в двух местах и отсутствует одна дисульфидная связь. Изоформа MLuc2 была получена с использованием генетической конструкции на основе бакуловируса и системы экспрессии насекомых – фермент экспрессировался клетками мотыльков *Spodoptera frugiperda* Sf9. MLuc2 демонстрирует очень высокую биолюминесцентную активность, высокую термостойкость, низкую температуру плавления, меньшее сродство к субстрату по сравнению с другими изоформами [17].

Люциферазы MLuc оказались чрезвычайно привлекательны для использования в качестве биолюминесцентного репортера. Они обладают высокой активностью, а для протекания реакции необходимо только присутствие субстрата – целентеразина – и кислорода. Именно поэтому эти люциферазы, наряду со светляковой и бактериальной люциферазами, а также фотобелками, часто используются в научных исследованиях.

1.4 Биолюминесцентные репортеры и их применение в биоимиджинге.

Под биоимиджингом понимается визуализация молекулярных процессов *in vivo*. Молекулярная визуализация – это быстроразвивающееся биомедицинское направление, которое позволяет получать визуальное представление, характеристику и количественную оценку биологических процессов на клеточном и субклеточном уровнях в живых организмах [23]. Клетки или животные, экспрессирующие люциферазу, можно визуализировать с использованием чувствительных камер с зарядовой связью (CCD) для обнаружения света после инъекции субстрата [5].

Биолюминесцентный имиджинг на данный момент являются наиболее перспективным по сравнению с аналогичными методами. Так, использование биолюминесценции не требует внешних источников света, в отличие от флуоресценции, реакции биолюминесценции протекают с высоким квантовым выходом и отсутствием фонового свечения. Еще одним немаловажным преимуществом биолюминесцентных репортеров является их биосовместимость: ферменты и их субстраты синтезируются живыми организмами и, следовательно, нетоксичны. К преимуществам относится также и быстрая детекция, которая позволяет осуществлять мониторинг сигнала в реальном времени. Биоимиджинг не требует изоляции тканей и органов и их химической фиксации для изучения [2, 23, 24,25]. Обычно люцифераза вводится в качестве генетически-кодируемого репортера в интересующую клетку. Для исследований рака, метаболических путей и мультимодальной визуализации, разрабатываются светопродуцирующие трансгенные животные, позволяющие проводить мониторинг транскрипционной активности *in vivo* [5]. В зависимости от поставленной цели, экспрессия может быть конститутивной либо индуцибельной [19]. Биолюминесцентные репортерные системы полезны для мониторинга экспрессии и регуляции генов в различных областях, начиная от развития эмбрионов и прогрессирования заболеваний.

Большое разнообразие люцифераз, каждая из которых имеет свой уникальный набор характеристик, и, соответственно, свой набор преимуществ и недостатков, приводит к тому, что для каждой исследовательской задачи требуется индивидуальный подбор репортера [26, 27]. Изучение природных биолюминесцентных систем с целью поиска и разработки новых люцифераз и люциферинов ведет к расширению области их применения, а это в свою очередь стимулирует работу по дальнейшему

изучению биолюминесценции, расширению спектра методов и улучшению уже существующих инструментов анализа. Примеры биомедицинских исследований, ключевую роль в которых играют различные биолюминесцентные репортеры, приведены ниже.

Фотопротеины как репортерные молекулы могут использоваться в качестве маркера для гибридизационного анализа. В основе этого метода лежит способность спаривания комплементарных последовательностей ДНК: ДНК-мишени и ДНК-зонда. Например, ДНК-мишень представляет собой меченные биотином ампликоны, которые иммобилизируют на активированной стрептавидином поверхности планшет. Стрептавидин – белок, обладающим высоким сродством к биотину. ДНК-зонд содержит метку, в зависимости от метода это могут быть молекулы гаптен, наличие которых выявляют конъюгантами гаптен-специфичных антител с акворином. В качестве метки может быть фермент, например, фотопротеин акворин [7].

Биолюминесцентные репортерные системы позволяют анализировать экспрессию и регуляцию генов. Это осуществляется путем использования различных сайтов связывания транскрипционных факторов, связанных с минимальным промотором, для управления экспрессией люциферазы. Биолюминесцентные репортеры позволяют визуализировать пост-транскрипционные события на уровне мРНК [24]. Так, например, в работе [28] проводится исследование ингибирования трансляции фактора апоптоза - Mcl-1. Создавалась генетическая конструкция Mcl-1–люциферазы. Трансляция мРНК этого комплекса подавлялась в присутствии мРНК-связывающего белка CUGBP2. В работе [29] показано использование гена люциферазы *Gaussia* в анализе экспрессии гена GADD45a в клетках млекопитающих. Экспрессия этого гена увеличивается в ответ на действие канцерогенов. При этом анализ с использованием люциферазы показал большую эффективность метода, нежели с применением GFP.

Таким же образом проводились исследования циркадных ритмов растений. Для этого использовали люциферазу NanoLuc (NLuc), полученную искусственно из люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* после трех раундов случайного мутагенеза и последующего внесения 16 аминокислотных замен [26]. В исследовании ген NLuc связывали с генами циркадных ритмов, что позволило отслеживать их экспрессию [30].

В работе [31] был описан анализ Malibu-Glo на основе морской люциферазы Nluc для обнаружения антигенов. Реагент включает комплекс люциферазы и одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) подходящего антитела. Анализ позволяет детектировать антигены на поверхности клеток, избегая трудоемких этапов очистки и мечения белков.

Для исследования регуляции транскрипции также был разработан метод с использованием люциферазы. Исследователи модифицировали дрожжевую двухгибридную систему, адаптированную для клеток млекопитающих, сделав ее индуцибельной. Система состояла из двух слитых белков (VP16-MyoD и GAL4-ID), один из которых имел ДНК-связывающий домен, а второй - активирующий домен, который непосредственно вызывает

экспрессию гена люциферазы. Таким образом, экспрессия люциферазы светлячка определяется взаимодействием MyoD и ID. Наблюдаемая биолюминесценция позволяет обнаруживать это индуцированное межбелковое взаимодействие в клеточной культуре и у живых организмов [24, 32]. Для тех же целей используется анализ с *Gaussia* люциферазой и красным флуоресцентным белком mCherry, где первый белок использовался для анализов активации транскрипции, а второй – в качестве внутреннего контроля [33]. Подробнее об использовании люцифераз совместно с флуоресцентными белками будет изложено ниже. В другой работе использовалась система двойных репортерных генов, которая включает интересующий и контрольный ген для мониторинга неспецифических эффектов, влияющих на экспрессию генов. Синтетический промотор гена γ -глобина был сконструирован непосредственно перед геном люциферазы светлячка, после чего следовал синтетический промотор гена γ -глобина перед геном люциферазы *Renilla*. Таким образом, экспрессия этих генов шла совместно [34].

Благодаря различной субстратной специфичности у разных люцифераз, возможно одновременно использовать несколько ферментов. Так для измерения дисрегуляции кальция ЭПР и активации UPR – развернутого белкового ответа (the unfolded protein response) использовались люциферазы GLuc и NLuc. Измерение активности люцифераз позволяет отслеживать протекание двух клеточных событий в одном биологическом образце. [35]. Для анализа цитотоксичности комбинирование двух различных люцифераз также может повысить точность метода, если один из ферментов выступает в роли внутреннего контроля [36].

Понимание того, как взаимодействуют белки, имеет решающее значение и очень востребовано в биологических и медицинских применениях. Так называемый анализ на основе комплементации фрагментов белка, или система с разделенным репортером, также является распространенным методом мониторинга белок-белкового взаимодействия. Репортер в этом случае разделяется на N- и C-концевые неактивные фрагменты, которые при стерическом сближении способны восстановить функцию фермента. Каждый из этих фрагментов соединяется с исследуемой парой белков. При взаимодействии этих белков N- и C-концевые фрагменты репортера пространственно сближаются, происходит восстановление структуры репортера и восстановление его активности. Эта система позволяет визуализировать взаимодействие белков в реальном времени, даже на субклеточном уровне в культивируемых клетках [37].

Биолюминесцентные системы также позволяют наблюдать развитие инфекционных заболеваний *in vivo*. Так в одном эксперименте мышей заражали модифицированными бактериями *Salmonella typhimurium*, содержащими ген бактериальной люциферазы. Благодаря биолюминесценции удалось локализовать бактерии в определенных тканях животного, и определить эффективность антибиотика *in vivo* [38]. Схожим образом производится изучение стволовых и опухолевых клеток [24].

Гибридный белок светлячковой люциферазы *Luciola mingrelicaco* и стрептавидина (His6–SA–Luc) может использоваться для исследования микроорганизмов. Детекция клеток микроорганизмов осуществляется с использованием иммунобиоломинесцентного метода. Показано, что гибридный белок His6-SA-Luc является высокочувствительным реагентом на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий как с использованием иммуноанализа, так и с использованием гибридизационного анализа специфических фрагментов ДНК клеток микроорганизмов. Гибридные белки стрептавидин-люциферазы могут быть получены либо методами химической конъюгации, либо генно-инженерными методами [39, 40].

В качестве биоломинесцентных репортеров выступают различные люциферазы и фотопротеины. Часто в качестве репортеров используются фотопротеин акворин, бактериальные люциферазы, светлячковые люциферазы, люцифераза из коралла *Renilla reniformes*, ципридиновые люциферазы, субстратом для которых является *Cypridina* люциферин, люцифераза декаподной креветки *Oplophorus*, а также GLuc и MLuc [3, 24]. Несмотря на такое разнообразие люцифераз, ведутся работы по улучшению их основных характеристик: активности, термостабильности, кинетики и др. [8, 41, 42].

1.4.1 Биоломинесцентный резонансный перенос энергии (BRET)

BRET - это явление, встречающееся в природе у некоторых морских кишечнорастворимых, например, у *Renilla reniformis* и *Aequorea victoria*. Так фотопротеины медузы *Aequorea victoria* излучают синий свет, который поглощает зеленый флуоресцентный белок GFP (green fluorescent protein) и переизлучает в зеленом свете [43]. Окисление целентеразина люциферазой в этих организмах приводит к появлению целентерамида в возбужденном состоянии, который участвует в качестве донора в безызлучательном переносе энергии на зеленый флуоресцентный белок (GFP) (акцептор), который, в свою очередь, излучает зеленый свет. В исследовательских целях, например, для количественной оценки взаимодействия двух молекул, одна из них должна быть слита с донорным биоломинесцентным белком, в то время как другая – с акцепторным флуоресцентным. Ассоциация донора и акцептора приводит к уменьшению люминесценции первого и увеличению флуоресценции второго. Эффективность такого анализа напрямую зависит от расстояния между молекулами [44, 5]. Возможен и обратный вариант, при котором фиксируется диссоциация донора и акцептора. Так был разработан метод определения протеазы плазмينا в молоке. Последовательность мишени окружена доменами трансдукции биоломинесцентного резонансного переноса энергии (BRET): зеленым флуоресцентным белком (GFP2) на N-конце и вариантом люциферазы *Renilla* (RLuc2) на C-конце. Детектируемый фермент плазмин расщепляет мишень, разъединяя донор и акцептор BRET, препятствуя тем самым эффективной передачи энергии

между ними. Что позволяет определять концентрацию фермента в образце [45].

Еще одна интересная разработка – химерный вариант акворина (Ca^{2+} + регулируемый фторопротейн), связанного с красным флуоресцентным белком dTomato. Комплекс получил название Redquorin. Акворин испускает синий свет, который хорошо поглощается живыми тканями, однако флуоресцентный белок переизлучает энергию фторопротейна в красном спектре, который хорошо проходит через ткани. В дополнение высокая эффективность метода достигнута путем уменьшения расстояния между люциферазой и флуоресцентным белком. Redquorin уже успешно используется для визуализации колебаний Ca^{2+} в развивающихся эмбрионах рыбок данио [46].

Для изучения роли коричневой жировой ткани (BAT) в метаболизме была сконструирована генетическая конструкция luciferase2-T2A-tdTomato. Получили трансгенную мышь ThermoMouse, у которой кассета была вставлена в кодон инициации гена *Ucp1*. Соответственно активность люциферазы повторяет паттерн экспрессии митохондриального разобщающего белка 1 (UCP1 - Uncoupling Protein 1) *in vivo*. BAT рассеивает энергию в форме тепла благодаря UCP1. И повышение его активности может быть потенциальным решением в борьбе с ожирением [47].

В альтернативном варианте этого метода флуоресцентный белок заменяется красителем. Биолюминесценция из меченного фторопотеином анализируемого вещества переносится в краситель, который выбирается на основе способности гасить биолюминесцентную эмиссию [48].

Биолюминесцентные квантовые точки (quantum dots) представляют собой альтернативные люциферазные зонды для визуализации *in vivo*, основанные на феномене BRET. Биолюминесцентные белки ковалентно связаны с подходящим расстоянием до квантовых точек, которые являются эффективными акцепторами энергии с высокой эмиссией квантового выхода [5].

1.5 Использование MLuc в качестве репортерного белка.

Люциферазы копепод – природные секретлируемые белки, и поэтому наиболее эффективны при использовании именно в качестве секретлируемых репортеров, так как это позволяет оценивать внутриклеточные процессы *in vivo* многократно, в реальном времени и без разрушения объекта исследования в случае и клеточных культур, и мелких лабораторных животных. Люцифераза *Metridia longa* кроме этого имеет еще ряд преимуществ. Во-первых, реакция проста, включает только целентеразин и молекулярный кислород и не задействует АТФ. Во-вторых, анализ очень чувствителен, поскольку люцифераза реагирует на незначительную концентрацию целентеразина. В-третьих, биолюминесцентная активность в среде культуры клеток или крови животных линейно коррелирует с количеством клеток, секретлирующих репортер, в диапазоне ~5 порядков, что,

к примеру, позволяет производить оценку функционального состояния раковой опухоли по уровню биолуминесцентной активности небольшого образца крови (5 мкл) вне зависимости от локализации клеток в организме. И в-четвертых, низкая молекулярная масса люциферазы, в несколько раз меньше, например, люциферазы *Vargula* [3, 9, 10, 49].

Изучение малых интерферирующих РНК (миРНК) возможно с использованием MLuc. В исследовании [50] эту люциферазу использовали для мониторинга активности miR-15/miR-16, которая может подавлять экспрессию антиапоптотического белка BCL-2. Репортерная система состояла из MLuc и последовательности на 3'-некодирующем конце (3' UTR), являющейся мишенью для миРНК. Таким образом проводится мониторинг репрессивной активности данной миРНК. Этот же метод использовался для изучения гена miR-155, экспрессия которого наблюдается в различных типах иммунных клеток, таких как В-клетки, Т-клетки, макрофаги [51]. Репортерная система на основе люциферазы MLuc позволяет отслеживать изменения активности миРНК в режиме реального времени в пределах одной популяции клеток путем отбора проб культуральной среды. Метод менее трудоемкий по сравнению с его аналогами.

Шведские ученые использовали люциферазу *Metridia* в качестве репортерной молекулы для определения экспрессии «поздних» генов вируса папилломы человека (HPV16) в культуре клеток рака шейки матки человека C33A. С помощью биолуминесцентного анализа было показано, что ингибирование протеинкиназы В в этих клетках ингибирует полиаденилирование «поздних» генов HPV16 и индуцирует их экспрессию [52].

В работе [53] было показано применение люцифераз из морских рачков, в частности люциферазы MLuc7, в анализе Toranga, для определения экспрессии CAR в CAR-T-клеточной терапии (Chimeric Antigen Receptor T-Cell, или Т-клетки с химерным антигенным рецептором). В анализе используется рекомбинантный белок, называемый реагентом Топанга, который представляет собой внеклеточный домен CAR-мишени соединенный люциферазой. Анализ включает инкубацию клеток, экспрессирующих CAR, с реагентом Toranga, несколько промывок и измерение люминесценции.

Люцифераза MLuc7 может использоваться для анализа цитотоксичности. Анализ Матадора, описанный в работе [54], основан на экспрессии люциферазы в клетках-мишенях таким образом, чтобы она высвобождалась из мертвых и умирающих клеток или ее активность могла быть измерена только в мертвых и умирающих клетках.

В работе [49] было показано, что за счет экспрессии предварительно гуманизированного гена MLuc в сочетании с промотором и энхансером β -актина можно эффективно количественно определять жизнеспособность и цитотоксичность клеток в широком динамическом диапазоне.

Из всего вышесказанного можно заключить следующее: люцифераза копепод *Metridia longa* является многообещающим репортерным белком. Она

устойчива к высоким температурам, высокочувствительна, секретируема, что позволяет проводить различные исследования динамических процессов внутри клеток без их разрушения, а также с использованием крови и других биологических жидкостей.

2 Материалы и методы

2.1 Получение компетентных клеток *E. coli*

Клетки *E.coli* вносили в пробирку с 6 мл LB-среды и инкубировали ночь при 37°C в шейкер-инкубаторе с качанием 225 об/мин. Затем 250 мкл ночной культуры переносили в колбу с 50 мл LB-среды и 20мМ раствором MgSO₄. Клетки инкубировали в шейкер-инкубаторе при тех же параметрах до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0.6. Колбу выдерживали во льду в течение 15 минут, затем содержимое разливали в 2 мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали на скорости 3500 об/мин в течение 3 минут при 4°C. Супернатант отбирали досуха и вносили по 700 мкл холодного трансформирующего буфера TFB в каждую пробирку, пробирки мягко переворачивали до растворения осадка, инкубировали еще 15 минут на льду, и снова центрифугировали при тех же параметрах. Осадок осушали и добавляли по 200 мкл буфера TFB.

Состав буфера TFB: 10 mM KCl, 45 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 3 mM [Co(NH₃)₆]Cl₃, 10 mM K-MES, pH 6,2

2.2 Трансформация клеток *E. coli*

Для трансформации бактерий штаммов BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL и XL1-Blue использовали 50 мкл клеточной суспензии и 0,5 мкл плазмиды. После внесения плазмид клетки инкубировались во льду в течение 30 минут. По истечению времени проводилась процедура heat-shock: клетки помещали в водяную баню, нагретую до 42°C, на 25 сек, затем сразу же переносили обратно в лед на 2 минуты. К клеточной суспензии добавляли пятикратный объем SOC-среды и инкубировали 1 час в термостате при температуре 37°C.

В состав SOC входят следующие компоненты: 2% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5 KCl, 10 mM 2M MgCl₂, 10 mM MgSO₄, глюкоза 20 mM.

Для дальнейшего культивирования клеток подготавливали чашки Петри с LB-средой и 40 мкл ампициллина в стерильных условиях.

Для приготовления LB-среды использовались: 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 130 mM NaCl, 1,5% агар.

После инкубирования в термостате клеточную суспензию помещали на чашки со средой, растирали шпателем до полного высыхания среды в стерильных условиях ламинарного шкафа. После посева чашки убрали в термостат с температурой 37°C до появления отчетливо различимых клонов.

2.3 Получение MLuc7 и ее делеционных мутантов в клетках *E. coli* штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

Для получения рекомбинантных люцифераз MLuc7 и ее делеционных мутантов в клетках *E. coli* использовали штамм BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащий дополнительные гены транспортных РНК для редких в *E. coli* кодонов. Совершали посев контрольной и опытных колоний в 6 мкл жидкой LB-среды с содержанием ампициллина 200 нг/мл. Клетки инкубировали в шейкер-инкубаторе при температуре 37°C, качании 225 об/мин ночь.

В колбу с широким горлом вносили 200 мл LB-среды и 400 мкл ампициллина (конечная концентрация 200нг/мл), затем в колбу внесли 3мл ночной культуры микроорганизмов (разведение 1:100). Наращивание клеточной культуры проводили в шейкер-инкубаторе при тех же параметрах до достижения оптической плотности $OD_{590}=1-1,3$. Инкубирование длилось около 2,5 часов.

После достижения нужной оптической плотности в каждую колбу добавили ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, инкубировали клетки в шейкер-инкубаторе при тех же параметрах еще час. Затем измеряли оптическую плотность клеточной суспензии.

После завершения инкубации из колб отбирали по 500 мкл в пробирку для белкового электрофореза. Центрифугировали 5000 об/мин в течение 2 мин и затем осушали садок. Добавляли лизирующий буфер для ПААГx2 в объеме, в 100 раз превышающем показания оптической плотности после индукции ИПТГ.

Денатурирующий (лизирующий буфер) для образцов белкового электрофореза состоит из 10% раствора SDS, 10 мМ раствора DDT, 20% раствора глицерина, 0,2 М раствора Tris-HCl pH 6,8, 5 мкл бромфенолового синего.

2.4 Получение телец включения *E. coli*

Клеточный осадок 200 мл культуры ресуспендировали в 10 мл буфера (20мМ Tris -HCl pH 8.0, 1 мМ ЭДТА) и разрушали при 0°C с использованием ультразвукового дезинтегратора «Q700 Sonicator» (QSonica) (10 сек x 6 раз с перерывами по 1,5 мин во льду). Тельца включения собирали центрифугированием (14000g, 20 мин).

2.5 Отмывка и растворение телец включения *E. coli*.

Осадок, содержащий тельца включения, последовательно промывали в растворах, содержащих 20 мл 0,9% NaCl, Tris-HCl pH 8.0; 20 мл 0,1% Тритон

X-100 (20 мкл) 20 мМ, Tris-HCl pH 8.0, 1 мМ ЭДТА. При этом суспендировали осадок ультразвуком до однородной суспензии при 0°C (10 сек x 6 раз с перерывами по 1 мин во льду). Все процедуры очистки телец включения проводились при центрифугировании (14000g, 20 мин). Содержание белка в тельцах включения и в супернатантах оценивали белковым электрофорезом в полиакриламидном геле.

2.6 Растворение телец включения

Очищенные тельца включения растворялись в 1 мл 4 М гуанидин-HCl, 1 мМ ЭДТА в течение часа при постоянном помешивании и комнатной температуре. Затем добавляли 20 мМ Tris-HCl pH 8.0 и 50 мМ DTT в течение 3-х часов при постоянном помешивании и комнатной температуре.

2.7 Фолдинг люцифераз

Процедуру восстановления белка проводили путем медленного разведения денатурированных препаратов MLuc7 в 30 мл растворах фолдинга при 4°C, в условиях постоянного перемешивания в течение ночи. Через час вносили 0,2 мМ CuCl₂ для катализации процесса.

Раствор для фолдинга: 300 мМ Аргинин, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NP-40, 5мМ GSH, 0.5мМ GSSG, 20 мМ Tris-HCl pH 8.0.

2.8 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы

Для дальнейшей очистки образец фолдированной люциферазы пропустили через 0,22 мкм (Millipore), концентрировали с помощью Amicon Ultra Centrifugal Filter, проводили обессоливание концентрированного образца на колонке 5 ml HiTrap desalting (GE Healthcare), уравновешенной буфером А (20 мМ ВТР pH 9,3, 0,02% NP-40, 5% глицерол, 50 мМ NaCl). Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке 5 ml HiTrap Q HP в том же буфере. В данных условиях MLuc7 и делеционные мутанты проходят через колонку, а загрязняющие белки связываются с анионообменной смолой. Фракцию, содержащую пик активной люциферазы, концентрировали с помощью центрифужного фильтра Amicon Ultra Centrifugal Filter и пропускали через гель-фильтрационную колонку Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенную 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,02% NP-40, 5% глицерол, 20 мМ Tris-HCl pH 7.5. Фракции элюата анализировали гель-электрофорезом в нередуцирующих условиях.

2.9 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли

Состав белковых препаратов определяли с помощью белкового электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле по методу Лэммли. После приготовления кассеты для геля, заливали гель-пробку между пластин и оставляли до полного застывания. Затем заливали разделяющий гель, сверху сразу наслаивали деионизованную воду, которую сливали после образования явного раздела фаз и застывания геля. Следом заливали концентрирующий гель и сразу вставляли гребенку. Гребенку вытаскивали через 15 минут, карманы геля промывали водой.

Для проведения электрофореза готовили трис-глициновый буфер, разведенный в 4 раза: брали 50 мл стокового раствора и добавляли 150 мл деионизованной воды. В состав трис-глицинового буфера для белкового электрофореза входят 25 мМ раствора Tris-HCl, 200 мМ раствора глицина, 0,1% раствора SDS.

Образцы в денатурирующем (лизирующем) буфере перед нанесением кипятили 3 минуты. Образцы в неденатурирующем (нативном) буфере не кипятили, электрофорез в этом случае проводили с охлаждением.

Гель устанавливали в прибор PowerPac™ (Bio-Rad, США), фиксировали, заливали буфером для электрофореза нижнюю и верхнюю камеры так, чтобы гель контактировал с буфером. Образцы вносили в полном объеме в каждую лунку специальным шприцом Hamilton (Hamilton Company, США, Швейцария), промывая его в деионизованной воде после каждого образца. Рабочее напряжение составляло 250 В.

После завершения электрофореза гель помещали в цилиндр, заливали красителем Кумасси и ставили на водяную баню при температуре 80°C на 30 минут. После окрашивания проводили промывку геля 10% уксусной кислотой 2 раза в течение 10-15 минут. Фотографирование геля проводили в видимом свете с помощью системы AlfaImager HP System (Protein Simple, США).

Гели для белкового электрофореза имели следующий состав:

Гель-пробка: 500 мкл акриламида, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA.

Разделяющий гель (12,5%): 769 мкл деионизованной воды, 1407 мкл раствора В (Tris-HCl, 1 М, pH 9.0), 1500 мкл акриламида, 37,5 мкл SDS, 7,5 мкл TEMED, 15 мкл PSA.

Концентрирующий гель: 500 мкл деионизованной воды, 250 мкл раствора С (Tris-HCl, 0,5 М, pH 6.8), 150 мкл акриламида, 20 мкл SDS, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA.

2.10 Измерение биолюминесцентной активности

Определение биolumинесцентной активности проводили в объеме 500 мкл в кюветах, куда сначала вносили ML-буфер и помещали их в термошейкер ThermoMixer C (Eppendorf, Германия) для поддержания необходимой температуры. Измерения биolumинесцентной активности проводили с использованием люминометра БЛМ-003 (СКБ Наука, Красноярск) со стабилизацией температуры. Для запуска биolumинесцентной реакции в кювету впрыскивалось 5 мкл раствора 1 мкМ целентеразина. За биolumинесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум двух параллельных измерений.

Состав ML буфера: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0.01% желатин.

2.11 Характеризация делеционных мутантов

Для характеристики белка были исследованы его температурная стабильность и определены его удельная активность, температурный оптимум, оптимум pH и оптимум концентрации NaCl. Биolumинесцентную активность измеряли с использованием люминометра БЛМ-003 (СКБ Наука, Красноярск) с использованием ослабляющих светофильтров.

Для определения удельной активности и температурного оптимума белка измеряли его биolumинесцентную активность в 12 температурных точках: 5°C, 7°C, 10°C, 12°C, 15°C, 18°C, 20°C, 23°C, 28°C, 32°C, 37°C и 40°C. Образцы белков разводили в 500 раз в стабилизирующем буфере (ML буфера с добавлением 0,02% NP-40). Для измерения биolumинесцентной активности, в кюветы вносили 500 мкл ML-буфера и 5 мкл образца. Для запуска биolumинесцентной реакции в кювету впрыскивалось 5 мкл раствора 1 мкМ целентеразина.

Для определения зависимости биolumинесцентной активности от концентрации NaCl образцы белков также разводили в 500 раз в стабилизирующем буфере. Измерения проводили при температуре 23°C в 50 mM Tris-HCl pH 7,5 буфере с добавлением NaCl в концентрациях: 0, 0.15, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4M куда вносили 5 мкл разведенного образца. Запускали биolumинесцентную реакцию впрыскиванием 5 мкл 1мкМ раствора целентеразина.

Аналогично определяли оптимум pH. В этом случае 5 мкл разведенного в 500 раз образца вносили в 50 mM Bis-Tris-HCl буферах с NaCl 0.5 M и pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.25, 7.5, 7.8, 7.8, 8.0, 8.25, 8.5, 9.0.

Чтобы оценить температурную стабильность, люциферазы в течение 1 часа инкубировали при разных температурах, измеряя биolumинесцентную активность в конце инкубации. Белок инкубировали при следующих температурах: 0°C, 15°C, 23°C, 40°C, 60°C, 80°C, 100°C. Люциферазы предварительно разводили в 500 раз в стабилизирующем буфере. Для запуска

биолюминесцентной реакции в кювету также впрыскивалось 5 мкл 1мкМ раствора целентеразина.

Для сравнения использовали дикий тип люциферазы MLuc7, также фолдированный и очищенный.

2.12 Снятие спектров биолюминесценции

Определение спектра биолюминесценции проводили на спектрофлуориметре Varian. В кювету вносили 200 мкл ML-буфера и 10 мкл концентрированного образца. Реакцию запускали 5 мкл 1мкМ раствора целентеразина.

2.13 Определение концентрации белка методом BSA.

Фотоколориметрический метод определения белка в пробе. Приготавливали рабочий реагент, смешивая 50 частей BSA реагента А с 1 частью BSA реагента В общим объемом 1 мл. Образец белка в SEC буфере в объеме 50 мкл смешивали с рабочим реагентом. В качестве отрицательного контроля разводили 50 мкл SEC буфера в 1 мл рабочего реагента. Инкубировали образцы в течение 30 минут при 37°C. В пробе с белком развивалась характерная окраска. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 562 нм, предварительно обнулив прибор с помощью отрицательного контроля. Далее данные по исследуемому образцу сравнивались со стандартной кривой и высчитывалась концентрация белка в пробе.

3 Результаты

Изъято 11 страниц

Выводы

- Усовершенствована методика очистки люциферазы *Metridia* при экспрессии в клетках *E. coli*. В частности, модифицирован метод растворения телец включения в гуанидине.
- Получены чистые высокоактивные белковые препараты рекомбинантных люцифераз путем фолдинга при использовании бактериальной системы экспрессии: MLuc7 дикого типа, MLuc7-G28 и MLuc7-28G4.
- Выход чистого белка в среднем составил ~400-500 мкг с 200 мл культуры. Потери при очистке ~ 60-70%.
- Определены значения удельной активности для данных белков. Активность мутанта MLuc7-G28 составляет 72% от исходной люциферазы; активность MLuc7-28G4 – 18% от исходной люциферазы.
- Исследуемые делеционные мутанты обладают высокой термостабильностью. Оптимум pH и оптимум концентрации NaCl соответствует дикому типу. Температурный оптимум для делеционных мутантов смещается к 7-10°C, тогда как для дикого типа составляет 12-15°C. Также установлено, что вариант MLuc7-28G4 показывает снижение активности в два раза уже при 15°C. Тогда как у варианта MLuc7-G28 и дикого типа активность падает в два раза только при 23°C.
- Определены спектры биолюминесценции. Пик эмиссии для исследуемых люцифераз имеет ~485-490 нм.
- Вариант MLuc7-G28 более перспективен в качестве биолюминесцентного репортера, чем MLuc7-28G4, из-за более высокой удельной активности и лучшего сохранения активности при повышении температуры.

Заключение

В настоящий момент существует множество люцифераз, обладающих различными свойствами, нашедших свое применение в качестве биолюминесцентных репортеров. Биолюминесцентные технологии позволяют изучать рост опухолей, их метастатическую активность, ответ опухолевых клеток на терапию, миграцию Т-лимфоцитов, мониторинг экспрессии генов, белок-белковые взаимодействия в клетке с помощью технологии BRET (bioluminescence resonance energy transfer), метаболическую активность и многое другое. При этом каждая люцифераза обладает своими преимуществами и недостатками, что стимулирует поиск новых и усовершенствование уже известных люцифераз для расширения спектра методов и улучшения уже существующих инструментов анализа.

Копеподные люциферазы, в частности люцифераза *Metridia longa*, высоко ценятся за малые размеры, высокую яркость и термостабильность. Кроме того, она является секретлируемой, что облегчает исследования с использованием живых клеток. Они нашли применение в исследованиях цитотоксичности, мониторинге экспрессии генов и активности мРНК и пр. Таким образом, люцифераза *Metridia longa* является перспективным биолюминесцентным репортером.

Данная работа посвящена получению и характеристике делеционных вариантов люциферазы MLuc7: MLuc7-G28, укороченному на 10 аминокислотных остатков, и MLuc7-28G4, укороченному на 14. Эти варианты могут иметь перспективы использования в качестве биолюминесцентных репортеров, самых маленьких на сегодняшний момент.

Целью работы является определение основных люминесцентных свойств высокоактивных минимальных вариантов люциферазы MLuc7. Успешно получены высокочистые препараты исследуемых белков. Охарактеризована степень очистки и концентрация целевого белка в финальном препарате. Усовершенствован метод экстракции целевого белка из телец включения путем растворения в незабуференном 4М гуанидине, где большая часть кислых клеточных белков не растворялась, что позволило уже на данном этапе очистить получаемый препарат от части загрязняющих веществ. В ходе текущей работы были определены: удельная активность делеционных мутантов; зависимость активности от температуры, pH и концентрации солей; термостабильность и спектр эмиссии.

Было установлено, что укороченные варианты имеют меньшую удельную активность по сравнению с исходной люциферазой. По остальным вышеперечисленным параметрам, свойства делеционного мутанта MLuc7-G28 не уступают свойствам исходного белка и сохраняет порядка 72% активности от активности дикого типа, что позволяет утверждать, что этот

вариант имеет перспективы использования его в качестве биолюминесцентного репортера, самого маленького на сегодняшний момент. Делеционный мутант MLuc7-28G4 обладает меньшей удельной активностью, составляющей лишь 18% от активности исходной люциферазы. Кроме того этот вариант показывает сильное снижение активности при повышении температуры. Активность падает в 2 раза уже при достижении 15°C, тогда как активность люциферазы дикого типа и MLuc7-28G падает в 2 раза только при 23°C. Все это затрудняет использование варианта MLuc7-28G4 в качестве биолюминесцентного репортера, однако возможно улучшение данного варианта посредством мутагенеза.

Список сокращений

BRET – резонансный перенос энергии биолюминесценции
BTP – Бис-Трис Пропан
DDT – дитиотритол
bp – пара нуклеотидных оснований
dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат
GFP – зеленый флуоресцентный белок
GLuc (GpLuc) – люцифераза копеподы *Gaussia princeps*
GSH – глутатион
GSSG – Дисульфид глутатиона
kb – тысяча пар нуклеотидных оснований
IB – тельца включения
MLuc – люцифераза копеподы *Metridia longa*
NLuc (NanoLuc) – искусственно созданная на основе *Oplophorus gracilirostris* люцифераза
OD – оптическая плотность
PSA – персульфат аммония
rlu – мера биолюминесценции, относительные световые единицы
rlu/ μ M – удельная биолюминесцентная активность, относительные световые единицы на микромоль
SEC – гель-проникающая хроматография
SDS – додецилсульфат натрия, натриевая соль лаурилсерной кислоты
У/мкл – концентрация, единицы вещества в микролитре
АТФ – аденозинтрифосфат
В – вольт
г – грамм
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИПТГ – изопропилтиогалактозид
кГц – килогерц, 1000 Герц
кДа – килодальтон, 1000 а.е.м
кДНК – ДНК, комплементарная матричной РНК
М – концентрация, моль/литр
мМ – концентрация, миллимоль/литр, 10^{-3} моль
мкл – микролитр, 10^{-6} литра
мл – миллилитр, 10^{-3} литра
нг – нанограмм, 10^{-9} грамма
нг/мкл – концентрация, нанограмм в микролитре
нг/мл - концентрация, нанограмм в миллилитре
нм – нанометр, 10^{-9} метра
об/мин – скорость, обороты в минуту
отн. ед. – относительные единицы биолюминесцентной активности
ПААГ – полиакриламидный гель, используемый в белковом электрофорезе.
ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список литературы

- 1 Haddock, S. H.D. Bioluminescence at sea /S. H.D. Haddock, M. A. Moline, J. F. Case // The Annual Review of Marine Science. – 2010. – V. 2. – P.443-493
- 2 Физика и химия биолюминесценции: учеб. пособие / В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, Е.Н. Есимбекова [и др.]: под общ. ред. О. Шимомуры, И.И. Гительзона. – Красноярск: СФУ. – 2015. – 268 с.
- 3 Markova, S.V. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V. Markova, E.S. Vysotski // Biochemistry. – Moscow, 2015 – V.80(6). – С. 714-732.
- 4 Widder, E. A. Review of Bioluminescence for Engineers and Scientists in Biophotonics/; E. A. Widder, B. Falls // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2014. – V.20(2).
- 5 Mezzanotte, L. In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. / L. Mezzanotte, M. van 't Root, H. Karatas, E. A. Goun, C. W. G. M. Löwik. // Trends in Biotechnology. – 2017 – V.35(7), – P.640–652.
- 6 Markova, SV. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications / SV Markova, MD Larionova, ES Vysotski // Photochemistry and photobiology. – 2019. – V.95 (3). – P. 705-721.
- 7 Высоцкий, Е. С., Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнополостных / Е. С. Высоцкий, С. В. Маркова, Л. А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – №3. – С. 404-417.
- 8 Bevilaqua, V.R. *Phrixotrix* luciferase and 6'-aminoluciferins reveal a larger luciferin phenolate binding site and provide novel far-red combinations for bioimaging purposes. / V.R. Bevilaqua, T. Matsuhashi, G. Oliveira, // Scientific Reports – 2019. – V.9, 8998
- 9 Takenaka, Y. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods / Y. Takenaka, A. Yamaguchi, N. Tsuruoka, M. Torimura, T. Gojobori, Y. Shigeri // Molecular Biology and Evolution. – 2012. – P. 1-13.
- 10 Markova, S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 5. – P. 3212-3217.
- 11 Tzertzinis, G, Substrate Cooperativity in Marine Luciferases. / G. Tzertzinis, E. Schildkraut, I. Schildkraut // PLoS ONE. – 2012. – V. 7(6). - e40099.
- 12 Verhaegen, M. Recombinant *Gaussia* luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegen, T. Christopoulos // Analytical Chemistry. – 2002. – V.74. – P. 4378-4385.
- 13 Dijkema, FM. Flash properties of *Gaussia* luciferase are the result of covalent inhibition after a limited number of cycles. / FM. Dijkema, MK.

Nordentoft, AK. Didriksen, AS. Corneliussen, M. Willemoës, JR. Winther // Protein Sci. – 2021. – 30(3). – P. 638-649

14 Akenaka, Y. Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase. / Y. Akenaka, A. Noda-Ogura, T. Imanishi, A. Yamaguchi, T. Gojobori, Y. Shigeri. // Gene. – 2013. – V.528(2). – P. 201–205.

15 Tessler, M. Luciferin production and luciferase transcription in the bioluminescent copepod *Metridia lucen.* / M. Tessler, JP. Gaffney, JM. Crawford, E. Trautman, NA. Gujarati, P. Alatalo, VA. Pieribone, DF. Gruber. // PeerJ. – 2018. – V.6 – e5506

16 Larionova, M.D. Tyr72 and Tyr80 are involved in the formation of an active site of a luciferase of copepod *Mertidia longa* / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // Photochemistry and Photobiology. – 2017. – V.93. – P. 503-510.

17 Markova, S.V. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, M.D. Larionova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2015. – V. 457. – P. 77-82.

18 Wu, N. Solution structure of *Gaussia* Luciferase with five disulfide bonds and identification of a putative coelenterazine binding cavity by heteronuclear NMR. / N. Wu, N. Kobayashi, K. Tsuda, S. Unzai, T. Saotome, Y. Kuroda, T. Yamazaki // Sci Rep. – 2020. - V. 10, - 20069.

19 Larionova, M. D. Bioluminescent and structural features of native folded *Gaussia* luciferase. / M. D. Larionova, S. V. Markova, E. S. Vysotski // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. - 2018. – V.183. P. - 309-317.

20 Borisova, V.V. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay / V.V. Borisova, L.A. Frank, S.V. Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – V.7. – P. 1025-1031.

21 Larionova, M. D. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2017. – V. 483, № 1. – C. 772-778.

22 Markova, S.V. The disulfide-rich *Metridia* luciferase refolded from *E.coli* inclusion bodies reveals the properties of a native folded enzyme produced in insect cells / S.V. Markova, M.D. Larionova, D.A. Gorbunova, E.S. Vysotski // Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology. – 2017. – V. 175. – P. 51-57.

23 Kim, JE. In vivo cell tracking with bioluminescence imaging. / JE. Kim, S. Kalimuthu, BC. Ahn // Nucl Med Mol Imaging. – 2015. – V. 49(1). - P. 3-10.

24 Badr CE, Tannous BA. Bioluminescence imaging: progress and applications. / CE. Badr, BA. Tannous // Trends Biotechnol. – 2011. – V. 29(12). – P. 624-633.

25 Saito, K. Recent progress in luminescent proteins development./ K. Saito, T. Nagai. // Current Opinion in Chemical Biology. – 2015. – V. 27, - P. 46–51.

26 Котлобай, А. А. Палитра люцифераз: природные инструменты для новых методов в биомедицине / А. А. Котлобай, З. М. Каськова, И. В. Ямпольский // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2020. – Т. 12. – № 2(45). – С. 15-27.

27 Neefjes, M. Reporter gene comparison demonstrates interference of complex body fluids with secreted luciferase activity. / M. Neefjes, B. A. C. Housmans, G. G. H. van den Akker, L. W. van Rhijn, T. J. M. Welting, P. M. van der Kraan // Scientific Reports. – 2021. – V. 11(1359).

28 Subramaniam, D. Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. / D. Subramaniam, G. Natarajan, S. Ramalingam, I. Ramachandran, R. May, L. Queimado, CW. Houchen, S. Anant. // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2008. – V. 294(4) P. 1025-1032.

29 Hughes, C. Development of a High-Throughput Gaussia Luciferase Reporter Assay for the Activation of the GADD45a Gene by Mutagens, Promutagens, Clastogens, and Aneugens / C. Hughes, A. Rabinowitz, M. Tate, L. Birrell, J. Allsup, N. Billinton, RM. Walmsley. // Journal of Biomolecular Screening – 2012. – V.17(10). – P. 1302–1315.

30 Urquiza-García, U. Expanding the bioluminescent reporter toolkit for plant science with NanoLUC. / U. Urquiza-García, A.J. Millar, // Plant Methods – 2019 – V.15(68).

31 Natarajan, V. A fast and sensitive luciferase-based assay for antibody engineering and design of chimeric antigen receptors. / V. Natarajan, R. Gopalakrishnan, H. Matta, S. Choi, S. Gong, A. Jeronimo, P. Smruthi Keerthipati, A. Morales, H. Venkatesh, P. M. Chaudhary // Scientific Reports. – 2020. - V. 10 - 2318.

32 Ray, P. Noninvasive quantitative imaging of protein-protein interactions in living subjects. / P. Ray, H. Pimenta, R. Paulmurugan, F. Berger, M. E. Phelps, M. Iyer, and S. S. Gambhir // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V. 99. - P. 3105–3110.

33 Wider, D. Secreted dual reporter assay with *Gaussia* luciferase and the red fluorescent protein mCherry / D. Wider, D. Picard // PLOS ONE – 2017. – V.12(12). – e0189403.

34 Xie, W. A Luciferase Reporter Gene System for High-Throughput Screening of γ -Globin Gene Activators / W. Xie, R. Silvers, M. Ouellette, Z. Wu, Q. Lu, H. Li, K. Gallagher, K. Johnson, M. A. Montoute // Methods Mol Biol – 2016. – V.1439 – P.207-26.

35 Wires, ES. Longitudinal monitoring of Gaussia and Nano luciferase activities to concurrently assess ER calcium homeostasis and ER stress in vivo / ES. Wires, MJ. Henderson, X. Yan, S. Bäck, KA. Trychta. // PLOS ONE. – 2017. – V.12(4) – e0175481.

36 Wakuri, S. Correlation between luminescence intensity and cytotoxicity in cell-based cytotoxicity assay using luciferase / S. Wakuri, K. Yamakage, Y.

Kazuki, K. Kazuki, M. Oshimura, S. Aburatani, Y. Nakajima, // Analytical Biochemistry. – 2017. – V.522. – P. 18–29.

37 Ozawa, T. Detection of protein-protein interactions in vivo based on protein splicing. / T. Ozawa, Y. Umezawa // Curr Opin Chem Biol. – 2001. – V.5(5) - P.578-83

38 Contag, CH. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. / CH. Contag, PR. Contag, JI. Mullins, SD. Spilman, DK. Stevenson, DA. Benaron. // Mol Microbiol. – 1995. – V.18(4) – P. 593-603.

39 Смирнова, Д.В. БиOLUMИнесцентная специфическая детекция микроорганизмов с использованием гибридного белка стрептавидин-люцифераза, / Д.В Смирнова, М.Ю. Рубцова, Н.Н. Угарова // Биоорганическая, биофизическая и медицинская химия. – 2016. - с 137-141.

40. Koksharov, M.I. A fusion protein of *Luciola mingrelica* luciferase with a biotin-binding domain: Production, properties, and application, / M.I. Koksharov, D.V. Smirnova, S.G. Abbasova, N.N. Ugarova. // Vestnik Moskovskogo Universiteta. Khimiya. – 2011. - V. 4. - P. 291–297.

41 Pozzo, T. Firefly Luciferase Mutant with Enhanced Activity and Thermostability / T. Pozzo, F. Akter, Y. Nomura, A. Y. Louie, Y. Yokobayashi // ACS Omega – 2018. – V.3. – P. 2628–2633

42 Dale, R. Non-Steady State Analysis of Enzyme Kinetics in Real Time Elucidates Substrate Association and Dissociation Rates: Demonstration with Analysis of Firefly Luciferase Mutants // R. Dale, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ueda, N. Kato. // Biochemistry – 2019. – V.58(23). – P. 2695-2702

43 Aldo Roda. Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: the 2008 Nobel Prize / Aldo Roda // Anal Bioanal Chem – 2010 – V.396. – P.1619–1622

44 Gorokhovatsky, A.Y. Homogeneous assay for biotin based on Aequorea victoria bioluminescence resonance energy transfer system. / A.Y. Gorokhovatsky, N.V. Rudenko, V.V. Marchenkov, V.S. Skosyrev, M.A. Arzhanov, N. Burkhardt, M.V. Zakharov, G.V. Semisotnov, L.M. Vinokurov, Y.B. Alakhov. // Anal. Biochem. – 2003. – V. 313. P. 68–75.

45 Dacres, H. A rapid and sensitive biosensor for measuring plasmin activity in milk / H. Dacres, J. Wang, A. Anderson, C. S. Trowell, // Sensors and Actuators B: Chemical – 2019. – V. 301.

46 Bakayan, A. Imaging Ca(2+) activity in mammalian cells and zebrafish with a novel red-emitting aequorin variant / A. Bakayan, B. Domingo, A. Miyawaki, J. Llopis. // European journal of physiology – 2015. – V.467(9). – P. 2031–2042.

47 Galmozzi, A. ThermoMouse: an in vivo model to identify modulators of UCP1 expression in brown adipose tissue / A Galmozzi, SB Sonne, S Altshuler-Keylin, Y Hasegawa, K Shinoda, IHN Luijten, JW Chang, LZ Sharp, BF Cravatt, E Saez, S Kajimura. // Cell reports. – 2014. – V.9(5). – P. 1584–1593.

48 Adamczyk, M. Quenching of biotinylated aequorin bioluminescence by dyelabeled avidin conjugates: application to homogeneous bioluminescence

resonance energy transfer assays. / M. Adamczyk, J.A. Moore, K. Shreder // Organic Lett. – 2001. – V.3 – P. 1797–1800.

49 Lupold, SE. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the b-actin promoter and enhance / SE. Lupold, T. Johnson, WH. Chowdhury, R. Rodriguez // PLOS ONE – 2012. – V.7(5). – e36535.

50 Huang, P.-C. A Multisampling Reporter System for Monitoring MicroRNA Activity in the Same Population of Cells. / P.-C. Huang, C.-Y. Chen, F.-Y. Yang, L.-C Au, // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2009. P - 1–5.

51 Lee, H.-C. Systemic comparison of repression activity for miRNA and siRNA associated with different types of target sequences. / H.-C. Lee, C.-Y. Chen, L.-C. Au, // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011 – V. 411(2), - P. 393–396.

52 Kajitani, N. hnRNP controls HPV16 RNA polyadenylation and splicing in an Akt kinase-dependent manner // N. Kajitani, J. Glahder, C. Wu, N. Yu, K. Nillson, S. Schwartz // Nucleic Acids Research. – 2017. – V.45(16). – P. 9654-9678.

53 Gopalakrishnan, R. A novel luciferase-based assay for the detection of Chimeric Antigen Receptors / R. Gopalakrishnan, H. Matta, S. Choi. // Scientific Reports – 2019. – V. 9 (1957)

54 Matta, H. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay / H. Matta, R. Gopalakrishnan, S. Choi // Scientific Reports – 2018 – V.8 (199).

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова
подпись инициалы, фамилия

« 18 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Высокоактивные делеционные мутанты люциферазы *Metridia longa*:
получение и характеристика репортерных свойств

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Руководитель		в.н.с., канд. биол. наук	С. В. Маркова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник			И. А. Коротов
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент		с.н.с., канд. биол. наук	М.Ю. Трусова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2021