

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Выделение фермента гидроксилазы биолуминесцентной системы гриба  
*Neonothopanus nambi*

Руководитель

к.б.н.

К.В. Пуртов

Выпускник

В.В. Колесник

Красноярск 2016

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Выделение фермента гидроксилазы билюминесцентной системы гриба *Neonothopanus nambi*» содержит 37 страниц текстового документа, 26 использованных источников, 15 рисунков.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ВЫСШИЕ ГРИБЫ, ГИДРОКСИЛАЗА, ЛЮЦИФЕРАЗА, NEONOTHOPANUS NAMBI, ХОЛОДНЫЙ ЭКСТРАКТ, ГОРЯЧИЙ ЭКСТРАКТ.

Объектом исследования является светящийся гриб *Neonothopanus nambi*. Предмет исследования – фермент гидроксилаза, входящий в состав билюминесцентной системы гриба *N. nambi*.

Цель работы: Получение высокоочищенного препарата фермента гидроксилазы, входящей в состав билюминесцентной системы *Neonothopanus nambi*.

В соответствии с целью работы поставлены следующие задачи:

1. Разделить ферментативную часть билюминесцентной системы гриба *Neonothopanus nambi*.
2. Разработать схему очистки фермента гидроксилазы гриба *N. nambi*.
3. Выделить препарат фермента гидроксилазы из гриба *N. nambi*.

В результате проделанной работы с помощью хроматографических методов впервые удалось разделить ферменты билюминесцентной системы гриба *N. nambi*. Была разработана схема очистки гидроксилазы, позволяющая получить высокоочищенный препарат этого фермента. Впервые удалось установить нативную молекулярную массу фермента гидроксилазы.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1 Основные сведения .....	6
1.1.1 Биолюминесценция высших грибов.....	6
1.1.1.1 <i>Neonothopanus nambi</i> .....	7
1.2 История изучения биолюминесценции высших грибов .....	8
1.2.1 Современные данные о биолюминесцентной системе грибов .....	12
1.3 Практическое применение биолюминесценции грибов.....	15
1. Материалы и методы.....	17
2.1 Объект исследования .....	17
2.2 Методика получения холодного экстракта .....	17
2.3 Методика получения горячего экстракта .....	18
2.4 Реакционная смесь .....	18
2.5 Определение условий для увеличения интенсивности свечения мицелия <i>N. nambi</i> .....	18
2.5.1 Влияние вымачивания в дистиллированной воде на интенсивность биолюминесценции .....	18
2.6 Получение фракции люциферазы.....	19
2.7 Выделение и очистка гидроксилазы из мицелия гриба <i>N. nambi</i> .....	19
2.8 Концентрирование препарата гидроксилазы .....	19
2.9 Методика проведения электрофореза .....	20
2. Результаты и обсуждение .....	21
2.1 Влияние дистиллированной воды на интенсивность свечения мицелия <i>N. nambi</i> .....	21
2.2 Разделение ферментативной части биолюминесцентной системы гриба <i>N. nambi</i> .....	22
2.3 Получение высокоочищенного препарата гидроксилазы.....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	34

## ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция высших грибов на данный момент является малоизученным явлением, механизм свечения грибов не раскрыт полностью. Ферментативная часть биолюминесцентной системы до сих пор не выделена и не охарактеризована. Данная работа в области биолюминесценции высших грибов направлена на прояснение некоторых свойств ферментативной системы светящихся грибов.

Целью работы является получение высокоочищенного препарата фермента гидроксилазы, входящей в состав биолюминесцентной системы *Neonothopanus nambi*.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Разделить ферментативную часть биолюминесцентной системы гриба *Neonothopanus nambi*.
2. Разработать схему очистки фермента гидроксилазы гриба *N. nambi*.
3. Выделить препарат фермента гидроксилазы из гриба *N. nambi*.

Актуальность работы: Исследование биолюминесцентной системы грибов несет в себе фундаментальное и прикладное значение. Прежде всего, фундаментальной задачей является раскрытие механизма свечения грибов, прикладное значение заключается в применении полученных знаний в области биотехнологии и биоинженерии.

Один из путей применения полученных знаний о биолюминесцентной системе грибов – создание высокочувствительных биотестов. В настоящее время распространены биотесты с использованием светящихся бактерий, например, Microtox®. Однако биотесты с использованием биолюминесцентных грибов имеют ряд преимуществ. Светящиеся бактерии, в отличие от грибов, являются в основном морскими организмами, следовательно, эти организмы имеют различные среду обитания, защитные механизмы и чувствительность к токсичным веществам. Разумно предположить, что биолюминесцентные грибы являются наиболее подходящими организмами для анализа загрязнений

почвенных образцов, чем светящиеся бактерии. Бiotесты на основе светящихся грибов способны отразить более точный ответ именно на почвенные загрязнения, так как являются наземными организмами. С этой точки зрения светящиеся бактерии подходят для оценки водных образцов [1].

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Основные сведения

Биолюминесценция – свечение живых организмов, которое является результатом хемилюминесцентной реакции. Механизм реакции включает в себя химическое превращение определенного низкомолекулярного субстрата – люциферина. На данный момент наиболее изучены биолюминесцентные системы бактерий, кишечнополостных, светляков. Различные компоненты биолюминесцентной системы выделены, описаны, получены рекомбинантные белки с теми или иными свойствами. Сейчас люциферазы, ферменты биолюминесцентной реакции, нашли широкое применение в аналитике. Например, как репортерные белки для визуализации различных клеточных процессов.

Биолюминесцентная система высших грибов до сих пор остается малоизученной, не смотря на достаточную распространенность объектов исследования и продолжительную историю их изучения.

#### 1.1.1 Биолюминесценция высших грибов

Известно более 80 видов грибов, обитающих преимущественно в южных широтах, которые способны излучать зеленый свет [2]. Все известные на данный момент светящиеся грибы являются сапротрофами, реже патогенами растений. Принадлежат к порядку Агариковых (*Agaricales*) отдела Базидомицет (*Basidiomycota*), за исключением представителей отдела Актиномицетов (*Actinomyces*) в частности, род Ксилария (*Xylaria*) [3]. Пять видов светящихся грибов принадлежат к роду Опят (*Armillaria*). Около двенадцати видов принадлежат к роду Омфалот (*Omphalotus*). Род Мицена (*Mycena*) включает в себя 52 вида светящихся грибов [3]. Светящиеся грибы обнаружены в Европе, Азии, Австралии, Северной и Южной Америке, Африке. В большинстве своем биолюминесцентные виды грибов приурочены к субтропической и тропической зонам. Список светящихся грибов постоянно пополняется, поскольку открываются все новые виды. К примеру, в Бразилии в 2010 году было

обнаружено еще семь видов, которые были отнесены к семейству Мицена (*Mycena*) [4].

Плодовые тела биолюминесцентных грибов обладают ярким постоянным свечением, хорошо заметным в темноте не вооруженным взглядом. При культивировании на подходящем субстрате светящиеся грибы испускают свет, с максимумом в области 520–530 нм, на стадиях активного роста мицелия. Однако даже при незначительном изменении условий культивирования грибы могут перестать испускать свечение. Как правило, наиболее ярким свечением обладают молодые быстрорастущие мицелии грибов, чем полностью созревшие и старые части гриба, но, как уже говорилось ранее, большей частью, интенсивность биолюминесценции зависит от конкретного вида и условий окружающей среды. Более того, некоторые виды, такие как *Panellus stipticus* и *Mycena polygramma* существуют в двух различных разновидностях, биолюминесцирующая и несветящаяся форма. Из-за чего долгое время предполагалось, что штамм *P. stipticus*, обитающий в Северной Америке способен испускать свечение, в то время как Европейский штамм не светится. В настоящее время в Северной Америке также найдены несветящиеся штаммы этого гриба. Свечение, испускаемое светящимися грибами, безусловно, уступает по интенсивности свечению большинства других светящихся организмов. Однако грибы обладают способностью испускать свет достаточно долгое время, иногда на протяжении нескольких дней. Так, в течение своей жизни, небольшой по размерам люминесцентный гриб испускает количество квантов света, сопоставимое с количеством, продуцируемым более яркими светлячками [5].

#### 1.1.1.1 *Neonothopanus nambi*

Данный вид встречается в тропических лесах Южного Вьетнама, в основном на погибших стволах гевеи (*Hevea brasiliensi*), иногда на древесине ореха кешью (*Anacardium occidentale*), а также лагерстремии (*Lagerstroemia spp.*) [6,7]. Впервые данный вид был обнаружен исследователем Дао Тхи Ван [8]. Отличительными особенностями данного вида светоизлучающего гриба и

преимуществами как объекта исследований являются продолжительное свечение, культивируемость и сравнительно быстрый рост в лабораторных условиях. В зависимости от вида светящиеся грибы могут люминесцировать на стадии плодового тела или мицелия, *N. nambi* обладает свечением на обеих стадиях, что также является преимуществом.

В работах Бондаря с соавторами в 2011-2012 годах были описаны некоторые свойства этого светящегося гриба [7,8]. Например, при изучении биолюминесценции высшего гриба *N. nambi* было выяснено, что механическое разрушение мицелия грибов различными методами ведет к необратимой потере активности люминесценции. В связи с чем, авторы сделали предположение, что биолюминесцентная система *N. nambi* может быть локализована на клеточной стенке или в структурных элементах клеточной стенки грибов.

Приведенные выше данные о некоторых свойствах биолюминесцентной системы светящегося гриба *N. Nambi* могут быть справедливы не только для этого вида, но и для светоизлучающих грибов в целом. Так, по мнению Оливейры с соавторами биолюминесцентная система имеет идентичное устройство среди всех известных видов светящихся грибов [3].

## 1.2 История изучения биолюминесценции высших грибов

Свечение высших грибов было известно еще с древних времен. Впервые свечение грибов было описано Аристотелем в четвертом веке до нашей эры и Плинием Старшим в первом веке до нашей эры [9]. Аристотель называл видимое им явление биолюминесценции грибов – «сияющим лесом», так как чаще всего свечение наблюдалось на гниющих деревьях. По этой причине долгое время исследователи фокусировались на свечении гнилых деревьев, а не самих грибов. На основе получаемых знаний о функционировании биолюминесцентных систем различных организмов были проведены исследования и биолюминесцентной системы грибов. Наиболее значимые открытия в области биолюминесценции грибов можно отнести к XX веку. Различные исследования в области биолюминесценции грибов, направленные на выяснение структуры люминесцентной системы и механизма



светоизлучения, проводятся уже более ста лет. Долгое время, из-за недостаточной изученности биолюминесцентной системы грибов, исследователи принимали два альтернативных представления о механизме свечения. В первом случае, свечение грибов происходит по классической фермент-субстратной системе – люциферин-люцифераза. Согласно второму представлению, в свечении грибов принимают участие оксидазы, окисляя органические субстраты.

Первые попытки продемонстрировать люциферин-люциферазную реакцию в светящихся грибах предпринимались еще в начале прошлого века. В своих исследованиях ученые опирались на работы Дюбуа, который по праву считается пионером в исследовании механизмов биолюминесценции. Дюбуа изучал биолюминесцентные системы двустворчатого моллюска *Pholas dactylus* и Индийского жука-щелкуна *Pyrophorus sp.* В ходе исследования он выяснил, что в экстрактах, полученных с помощью холодной воды – сохранялась ферментативная активность, в то время как в экстрактах обработанных высокой температурой люцифераза инактивировалась, что позволяло предотвратить ферментативное окисление люциферина. При смешивании двух полученных экстрактов осуществлялась реакция светоизлучения по типу люциферин-люциферазной системы. Таким образом, в 1885 году Дюбуа предложил термины «холодный и горячий экстракты» [10].

Эварт в 1907 году и Кавамура в 1915 году проводили эксперименты с холодными и горячими экстрактами из грибов *Pleurotus candescens* и *Pleurotus japonicus* [11]. Но, к сожалению, усилия исследователей не увенчались успехом. Харвей в 1922 году изучал биолюминесценцию грибов *Armillaria mellea*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* [11]. В своей работе автор отметил, что отрицательный результат исследования был возможен из-за низкой концентрации люциферазы и (или) люциферина в экстрактах. Большое значение также имеет возможное присутствие ингибиторов.

Впервые свечение бесклеточных экстрактов из светящихся грибов удалось получить Мак-Элрой и Аэрту в 1959 году [12,13]. Система Аэрта и

Мак-Элрой состояла из экстрактов, полученных с помощью холодной воды – холодный экстракт (из гриба *Collybia velutipes*) и горячей воды – горячий экстракт (из гриба *Armillarie mellea*), а также восстановленных пиридиннуклеотидов. Аэрт и Мак-Элрой доказали возможность получить свечение билюминесцентной системы грибов *in vitro*. В дальнейших своих работах Аэрт в сотрудничестве с Фозрстером предложили схему билюминесцентной реакции грибов, которая была основана на известной, на тот момент схеме билюминесцентной реакции бактерий [13]. Схема билюминесцентной реакции грибов представлена на рисунке 1.

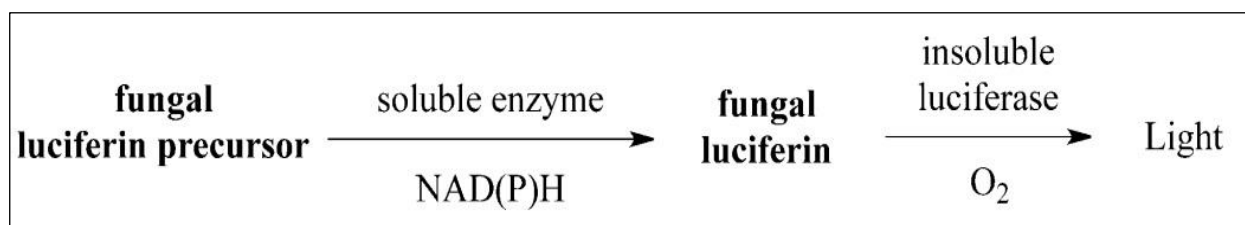


Рисунок 1 – Двухстадийная схема билюминесцентной реакции грибов, предложенная Аэртом и Фозрстером [13].

Согласно предложенной схеме реакция билюминесценции грибов двухстадийна. На первом этапе грибная редуктаза (*soluble enzyme*) осуществляет преобразование предлюциферина в люциферин, используя NAD(P)H. На втором этапе получившийся люциферин с помощью люциферазы (*insoluble luciferase*) и кислорода окисляется с излучением кванта света.

Однако ни один из компонентов билюминесцентной реакции грибов не был выделен и охарактеризован. Сам механизм билюминесценции также не установлен. Схема реакции оставалась гипотетической, основанной на косвенных признаках схожести системы билюминесценции бактерий и грибов.

Неоднократно предпринимались попытки выделить и установить структуру люциферина светящихся грибов. Так, Кувабара и Вассинк в 1966 году экстрагировали люциферин из гриба *Omphalia flavida*, а также получили люциферин в кристаллическом виде [14]. Полученный люциферин излучал свет

с максимумом 524 нм в присутствии препарата люциферазы. Однако авторы не представили никакой информации о химической структуре выделенного вещества. Эндо с соавторами в 1970 году выделили из гриба *Pleurotus japonicus* вещество, обладающее флуоресценцией в области 530 нм (максимум спектра биолюминесценции грибов), названное иллудином-S, однако биолюминесцентной активностью оно не обладало [11]. Позднее Исобе с соавторами в 1987 году выделил из того же гриба рибофлавин и ламптерофлавин в качестве предполагаемого люциферина, однако участие этих веществ в биолюминесцентной реакции также не было подтверждено [15]. Шимомура с соавторами в 1988-1998 годах выделили и охарактеризовали вещество паналь и его O-ацилированные производные PS-A и PS-B (Рисунок 2). Ими было обнаружено, что паналь, PS-A и PS-B реагируют с первичными аминами с образованием производных неустановленной структуры, способных окисляться кислородом с излучением видимого света.

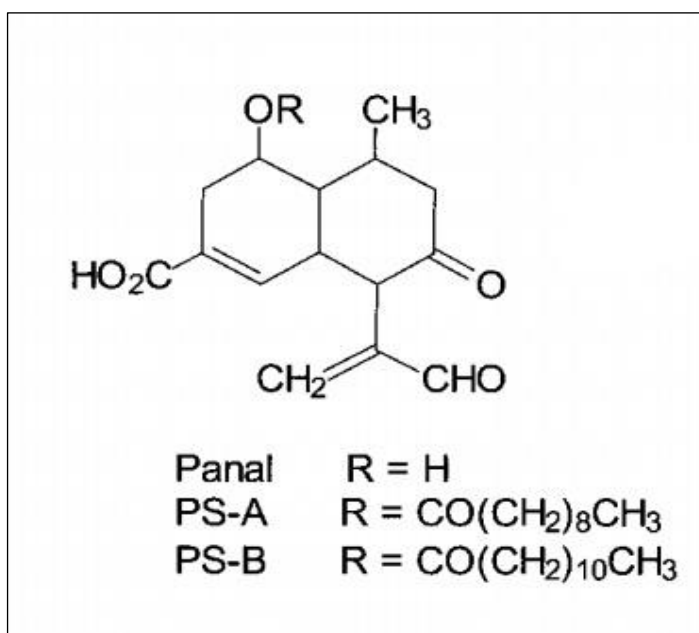


Рисунок 2 – Химическая структура паналья (Panal) из гриба *Panellus stipticus* и его O-ацилированные производные PS-A и PS-B [5].

В статьях этой группы исследователей паналю, PS-A и PS-B, представленных на рисунке 2, приписывается роль люциферин (или их

предшественников), однако в чем именно состоит их роль в люминесцентных реакциях, до сих пор не установлено [5,16].

### 1.2.1 Современные данные о биолюминесцентной системе грибов

Раскрытие механизма свечения высших грибов, а также выделение всех компонентов биолюминесцентной системы до сих пор остается первостепенной задачей для исследователей. К настоящему времени сформировались следующие общие представления о биолюминесцентной системе грибов [17,3]:

- 1) ферментативная часть данной системы представлена, по меньшей мере, двумя ферментами;
- 2) субстратная часть включает в себя, как, собственно, люциферин, так и его предшественник предлюциферин;
- 3) предлюциферин под воздействием первого фермента в присутствии восстановленных пиридиннуклеотидов превращается в люциферин, который затем подвергается окислению, катализируемым люциферазным компонентом, в ходе которого испускается квант света;
- 4) субстратные компоненты (предлюциферин и люциферин) обладают крайне низкой стабильностью, что затрудняет их выделение в чистом виде.

В 2009 году Оливейра и Стевани попытались выделить компоненты люминесцентной системы из грибов *Gerronema viridilucens*, *Muscena lucentipes* и *Muscena luxaeterna*, используя подход, предложенный Аэртом и Мак-Элрой, однако также не преуспели [17]. Помимо работы с люциферином Оливейра и Стевани предпринимали попытки выделить NAD(P)H-редуктазу из гриба *Neonothopanus gardneri*. По словам авторов кофактором NAD(P)H-редуктазы является FMN, который отвечает за каталитическую активность, потеря FMN на стадиях очистки фермента ведет к инактивации редуктазы. Однако авторы не приводят никакой информации о том, удалось ли им выделить фермент в чистом виде [17,18].

Несмотря на многочисленные попытки выделить и структурно охарактеризовать люциферин из светящихся грибов [14,16,19,20], химическая основа грибной биолюминесценции остается невыясненной. Основным препятствием для изучения люминесцентных грибов является сложность получения чистых компонентов биолюминесцентной системы, пригодных для структурного анализа, в виду их нестабильности и низкого содержания в биомассе. В результате так и не было получено достоверных данных о химической природе биолюминесценции высших грибов.

Наиболее значимые данные о природе компонентов биолюминесцентной системы высших грибов были получены в 2015 году группой исследователей из Института Биофизики СО РАН (г. Красноярск) в сотрудничестве с Институтом Биоорганической химии РАН (г. Москва) [21]. В отличие от прошлых работ по выделению люциферина авторы сфокусировались на нелюминесцентных видах грибов *Pholiota squarrosa*, *Phellinus sp.*, *Tricholoma sp.*. По данным исследования в плодовых телах несветящихся грибов прекурсор люциферина содержится в сто раз больше, чем в мицелии светящихся грибов, таких как *Neonothopanus nambi* и *Mycena citricolor* (Рисунок 3).

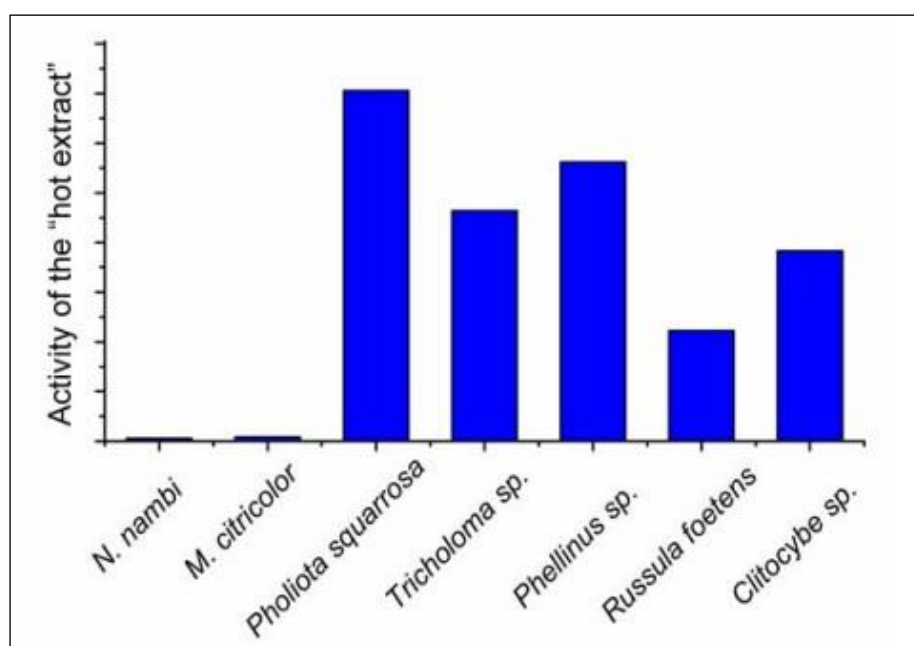


Рисунок 3 – Содержание прекурсора люциферина в горячих экстрактах из люминесцентных и нелюминесцентных видов [21].

В результате авторам удалось идентифицировать прекурсор люциферина – гиспидин. Гиспидин является известным представителем стирилпронов – вторичных метаболитов растений и грибов [19]. Чтобы подтвердить роль гиспидина как прекурсора люциферина биoluminesцентной системы грибов, авторы предприняли удачные попытки выделить его из мицелия светящегося гриба *Neonothopanus nambi*. Однако как уже говорилось, содержание гиспидина в мицелиях светящихся грибов намного ниже, чем в нелюминесцентных видах. Это объясняет тот факт, почему предыдущие попытки выделить люциферин и его прекурсор из светящихся грибов были unsuccessful. Далее авторам удалось установить химическую структуру люциферина грибов, им является 3-гидрокси-гиспидин. Авторы предложили схему биoluminesцентной реакции высших грибов с учетом полученных результатов (Рисунок 4).

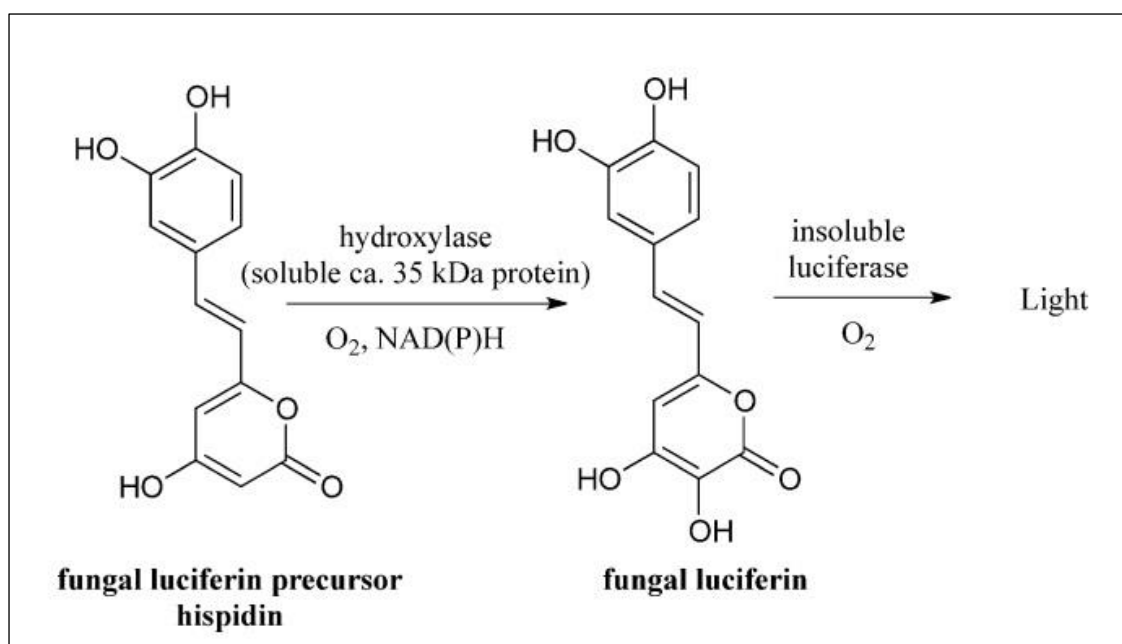


Рисунок 4 – Схема биoluminesцентной реакции высших грибов [21].

Согласно результатам, полученными Пуртовым с соавторами, NAD(P)H-зависимый фермент, ответственный за биосинтез люциферина участвует в реакции гидроксилирования. Таким образом, фермент получил название гидроксилаза (hydroxylase). Вопреки гипотезе, просуществовавшей более 50

лет, в биолюминесцентной реакции грибов принимает участие не редуктаза, а гидроксилаза [12,5].

Приведенные результаты в этом разделе дают новое представление о структурно-функциональной организации компонентов биолюминесцентной реакции грибов, а также системы в целом. Но, несмотря на современные данные все же биолюминесцентная система высших грибов остается не до конца изученной. На данный момент перед исследователями стоит задача выделить ферменты, участвующие в реакции свечения грибов, установить их структуру, тем самым раскрыв молекулярный механизм биолюминесценции грибов. После расшифровки механизма излучения, биолюминесцентная система грибов, вероятно, найдет широкое применение в биологии и медицине.

В заключение стоит обобщить все рассмотренные данные. Так, стало известно, что люциферин биолюминесцентной системы грибов является – 3-гидроксигиспидин, а его прекурсором – гиспидин. Ферментативную часть биолюминесцентной системы грибов составляют два фермента: гидроксилаза и люцифераза.

### 1.3 Практическое применение биолюминесценции грибов

Многие биолюминесцентные системы светящихся организмов уже нашли свое применение в аналитике, в свою очередь биолюминесцентные грибы также представляет интерес в качестве биомаркеров для методов микроанализа.

Светящиеся грибы обладают рядом преимуществ как биолюминесцентные биомаркеры: длительное свечение (до нескольких недель) в широком температурном диапазоне (4–50°C), Возможность культивирования в искусственных условиях. Не смотря на не полноту данных о биолюминесцентной системе грибов, многие исследователи уже сейчас проводят исследования, используя светящиеся грибы как биомаркеры. К примеру, такие виды светящихся грибов как *Armillaria mellea*, *Mycena citricolor*, *Gerronema viridilucens* были использованы для разработки тестов на токсичность. С использованием светящихся грибов проводилось определение токсичности солей тяжелых металлов, 3,5-дихлорфенола, пентахлорфенолов,

хинонов, так как данные соединения ингибируют люминесценцию [22–25]. Авторы Мендес и Стевани в 2010 году использовали гриб *Gerronema viridilucens* в качестве биомаркера для определения ионов тяжелых металлов (Pb, Cd, Al) [26]. Авторы приведенных выше работ отмечали, что величина EC50 для грибного свечения при действии различных токсичных веществ составляла тот же порядок, что и при использовании бактериальных биотестов [1,22–25]. Но пока неизвестны механизм свечения грибов и структурно-функциональная организация биолюминесцентной системы остается затруднительным корректно оценить потенциал использования биолюминесцентной системы грибов в аналитике.



## 1. Материалы и методы

### 2.1 Объект исследования

В работе была использована биомасса мицелия гриба *Neonothopanus nambi*. Культура была предоставлена вьетнамским исследователем Дао Тхи Ван из частной коллекции штаммов BIOLUMI Co., Ltd., Ho Chi Minh City, Vietnam. Мицелий был культивирован в чашках Петри на жидкой питательной картофельно-сахарозной среде (200 г картофеля, 20 г сахарозы, 1 л дистиллированной воды) при температуре 26°C в темноте в течение 10 суток.

### 2.2 Методика получения холодного экстракта

Выращенный мицелий гриба *N. nambi* извлекали из чашек Петри и производили вымачивание мицелия в дистиллированной воде 15 часов. Дальнейшие стадии выделения холодного экстракта из мицелия были проведены при температуре 0–4°C. После вымачивания к биомассе был добавлен 5 мМ фосфатный буфер (pH 7.0) и дистиллированная холодная вода, общий объем не должен превышать 200мл. Далее биомасса была разрушена с помощью гомогенизатора. Затем биомасса была помещена в ледяную баню (для поддержания определенной температуры, во избежание потери активности ферментов при их перегреве) и проведена ультразвуковая обработка при мощности 200 Вт, пять раз по 1 минуте с интервалами 1 минута, с помощью ультразвукового дезинтегратора “Волна” (Россия). Полученный гомогенат был центрифугирован при 10 000 g в течение 20 минут на центрифуге Avanti® J E (“BeckmanCoulter”, США). После центрифугирования супернатант был отфильтрован через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм (“Millipore”, Франция). Полученный экстракт либо сразу использовался для исследований при температуре 4°C, либо был заморожен при -20°C. Свечение экстракта гриба *N. nambi in vitro* было получено с помощью классического люциферин-люциферазного теста. Для контроля уровня свечения холодного экстракта люминесценция регистрировалась на билюминометре GloMax, (“Promega”, США).

### 2.3 Методика получения горячего экстракта

Для получения горячего экстракта, мицелий гриба *N. nambi* был инкубирован в дистиллированной воде в течение 3 ч при 28°C. Далее биомасса мицелия была помещена в термостойкий стакан и добавлялась дистиллированная вода в соотношении 1 : 1 (вес сырой биомассы : объем воды). Далее образец был доведен до кипения в микроволновой печи, после чего было произведено быстрое охлаждение в ледяной бане. Затем образец был отцентрифугирован при 30000 g в течение 20 мин при 4°C на центрифуге Avanti® J-E ("Beckman-Coulter", США). Полученный супернатант содержал предлюциферин и был использован для измерения активности ферментов биолюминесцентной системы.

### 2.4 Реакционная смесь

Люминесценция измерялась на биолюминометре, общий объем реакционной смеси составлял 200 мкл и содержал: 153 мкл буфера, 20 мкл холодного экстракта, горячий экстракт 5 мкл (субстрат), 20 мкл NAD(P)H, 2 мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Реакционная смесь для измерения активности гидроксилазы состояла из: 148 мкл буфер, фракция гидроксилазы 20 мкл, фракция люциферазы 5 мкл, горячий экстракт 5 мкл, NAD(P)H 20 мкл, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 мкл.

В свою очередь раствор буфера в расчете на 5 мл состоял из: 200 мМ фосфатный буфер (7,5 рН), лецитин 62,5 мкл, 7 мкл 0,1 М ДТТ, 2 мкл 10% Triton X-100.

### 2.5 Определение условий для увеличения интенсивности свечения мицелия *N. nambi*

#### 2.5.1 Влияние вымачивания в дистиллированной воде на интенсивность биолюминесценции

Были взяты образцы мицелия примерно одинакового размера с 16ти чашек Петри и помещены в дистиллированную воду для дальнейшего вымачивания. Был получен горячий и холодный экстракт из вымачивающихся мицелиев через временной интервал в один час. При добавлении в

реакционную смесь NAD(P)H было зарегистрировано свечение на биолюминометре GloMax (“Promega”, США).

## 2.6 Получение фракции люциферазы

Для измерения активности гидроксилазы была использована фракция люциферазы, полученная путем гель-фильтрационной хроматографии холодного экстракта на колонке с сорбентом AcA 34 с пределом исключения 20–350 кДа. Свечение фракции люциферазы было зарегистрировано на биолюминометре. Люцифераза была очищена до отсутствия фона гидроксилазной активности.

## 2.7 Выделение и очистка гидроксилазы из мицелия гриба *N. nambí*

Разделение ферментативной части биолюминесцентной системы гриба *N. nambí* было проведено по методике описанной выше, полученная фракция люциферазы использовалась для измерения активности гидроксилазы. Фракция гидроксилазы подвергалась дальнейшей очистке путем последовательных этапов хроматографирования. Первый этап очистки включал в себя анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом DEAE-Sepharose, гидроксилаза была снята градиентом NaCl. Для последующей очистки фермента препарат гидроксилазы был нанесен на колонку гидрофобной хроматографии с сорбентом PhenylSepharose CL-4B, препарат гидроксилазы был снят обратным градиентом. Завершающим этапом очистки была анионообменная хроматография высокого разрешения на колонке с сорбентом MonoQ. Для контроля степени очистки фермента после каждого типа хроматографии был проведен белковый электрофорез.

## 2.8 Концентрирование препарата гидроксилазы

Концентрирование препарата гидроксилазы после гидрофобной хроматографии производилось с помощью метода высаливания белков. Для чего препарат гидроксилазы обрабатывался сульфатом аммония (насыщение 50%), и с последующим центрифугированием при 20000g в течение 10 минут при 4°C был получен видимый белковый осадок. Далее был проведен диализ препарата гидроксилазы, диализная мембрана с растворенным белковым

осадком помещалась в стакан с холодной дистиллированной водой. Диализ проводился при температуре 4°C на магнитной мешалке 6 часов. После чего препарат был отцентрифугирован при 16000g в течение 5 минут при 4°C. Уровень свечения регистрировался на биолюминометре.

## 2.9 Методика проведения электрофореза

В работе использовался метод SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для контроля уровня концентрирования препарата гидроксилазы после диализа, образец наносился по 10 мкл, 5 мкл, 2 мкл и 1 мкл. Для контроля степени очистки препарата после этапов хроматографирования образец гидроксилазы наносился по 2 мкл. Смесь маркерных белков включала: БСА - 67 кДа, овальбумин – 43 кДа, β-лактоглобулин – 25 кДа, рибонуклеазу А – 13.7 кДа. Результат электрофореза регистрировался с помощью гель-документирующей системы Gel Doc XR+ (“Bio-Rad”, США).

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1 Влияние дистиллированной воды на интенсивность свечения мицелия *N. nambi*

Было выявлено, что при вымачивании в дистиллированной воде мицелия *N. nambi* интенсивность свечения гриба увеличивается на несколько порядков.

На рисунке 5 представлена зависимость интенсивности свечения *N. nambi* от времени вымачивания мицелия.

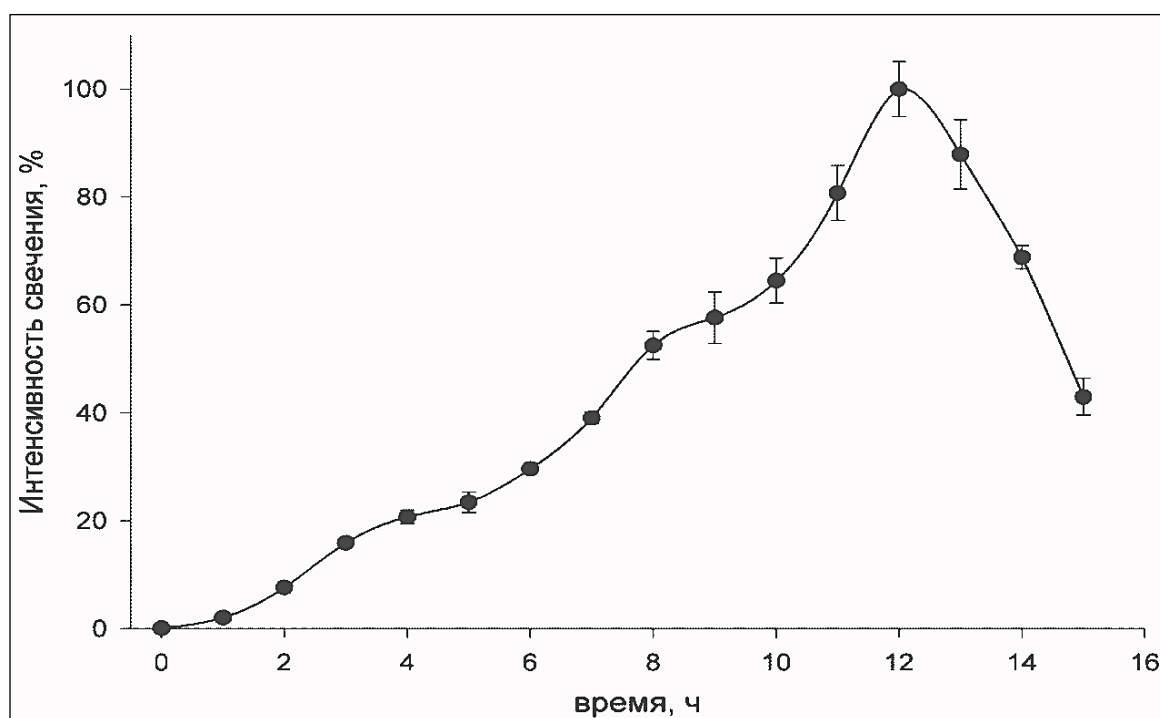


Рисунок 5 – Интенсивность свечения *N. nambi* от времени вымачивания мицелия.

Исходя из полученных данных видно, что пик интенсивности свечения гриба приходится на 12 часов. Отсюда был сделан вывод, что при вымачивании мицелия гриба происходит накопление ферментов биоломинесцентной системы гриба, за счет чего и достигается увеличение интенсивности свечения.

Было проведено повторное вымачивание мицелия *N. nambi* по описанной методике. С интервалом в один час из мицелиев гриба был получен холодный экстракт и зарегистрировано свечение с добавлением ранее выделенного

горячего экстракта и NAD(P)H в реакционную смесь. Данные приведены на рисунке 6. Было выяснено, что пик накопления ферментов билюминесцентной системы гриба приходится на 16 часов, за счет чего увеличивается интенсивность свечения. Благодаря проведенной работе удалось увеличить интенсивность свечения гриба *N. nambi* на несколько порядков. Дальнейшая работа проводилась с учетом полученных данных о вымачивании.

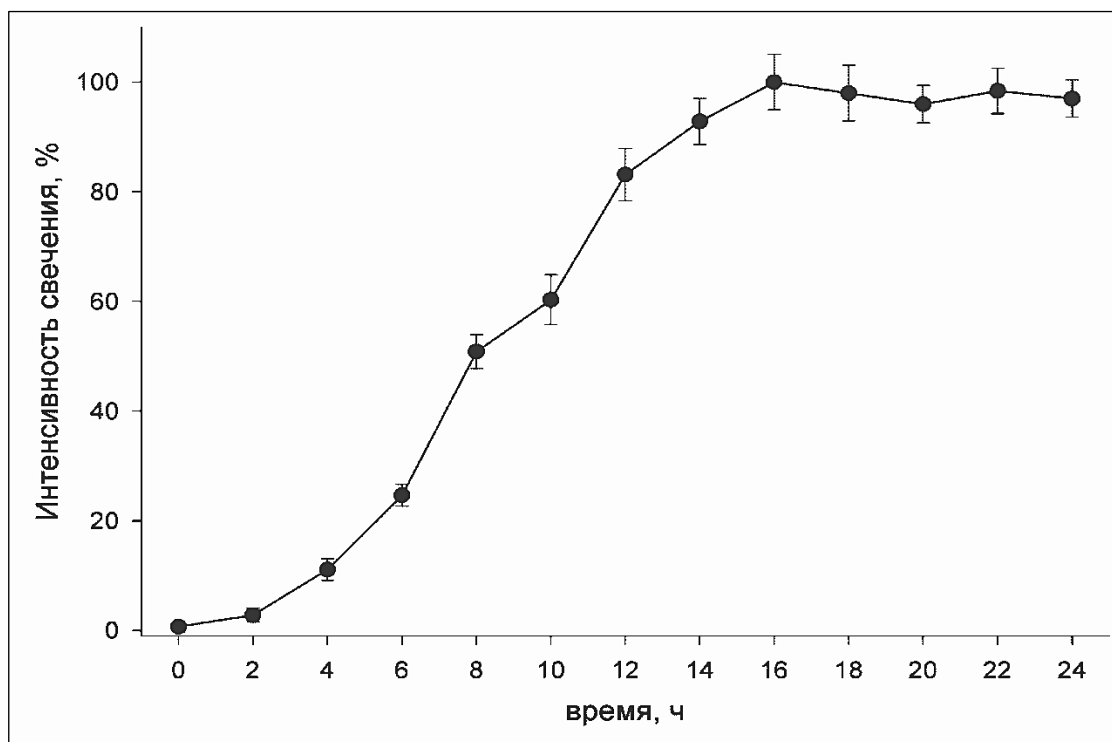


Рисунок 6 – Зависимость накопления ферментов билюминесцентной системы от времени вымачивания мицелия.

## 2.2 Разделение ферментативной части билюминесцентной системы гриба *N. nambi*

По описанной ранее методике был получен холодный экстракт из мицелия гриба *Neonothopanus nambi*. Экстракт был нанесен на колонку гель-фильтрационной хроматографии для разделения ферментативной части билюминесцентной системы на люциферазу и гидроксилазу. По результатам полученной хроматограммы, представленной на рисунке 7, было установлено, что ферментативная часть билюминесцентной системы гриба *N. nambi*

включает в себя два фермента люциферазу и гидроксилазу. Так как в полученных фракциях люциферазы и гидроксилазы по отдельности активности не было выявлено. Но при объединении фракций и добавлении ранее полученного горячего экстракта и NAD(P)H активность регистрировалась биолюцинометром. Таким образом, удалось экспериментально подтвердить наличие двухкомпонентной ферментативной системы, участвующей в биолюминесцентной реакции гриба *Neonothopanus nambi*, а также отделить фракцию гидроксилазы для дальнейшей очистки фермента.

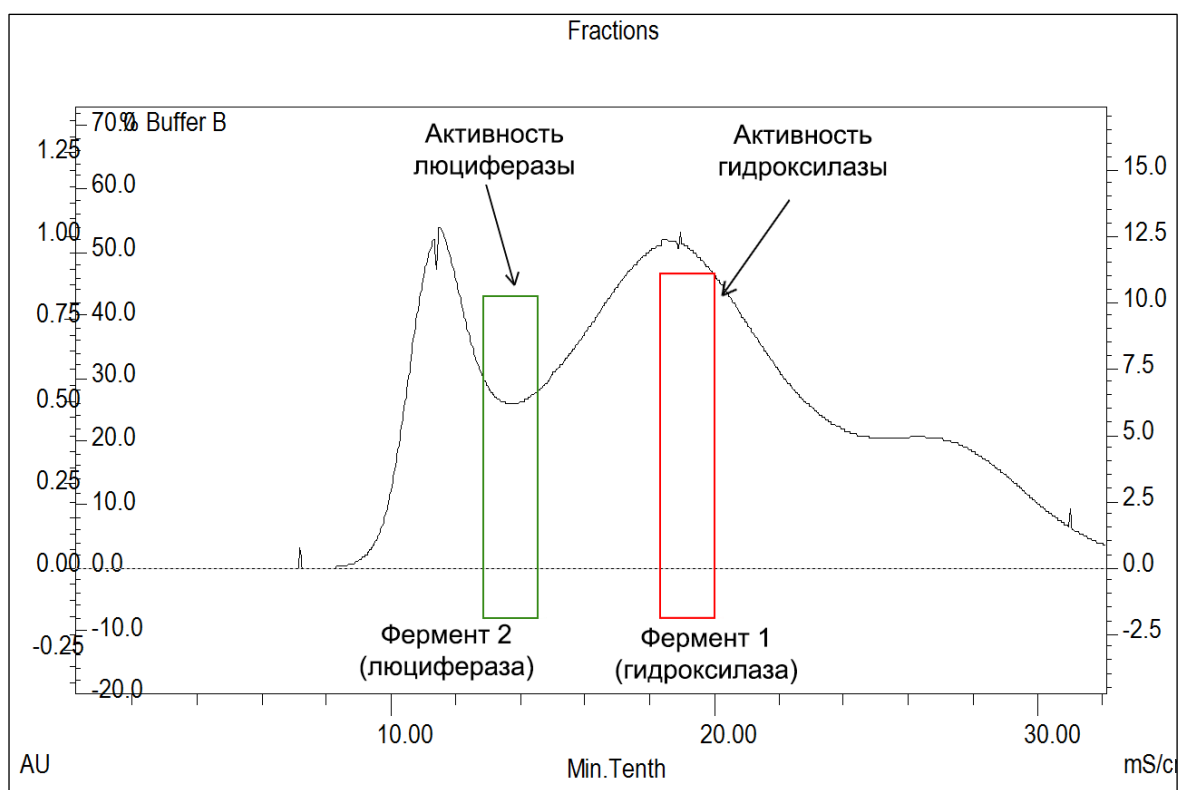


Рисунок 7 – Гель-фильтрационная хроматография холодного экстракта на колонке с AcA 34.

На хроматограмме первый высокий пик соответствует люциферазе. Исходя из предела исключения хроматографической колонки (20–350 кДа), был сделан вывод о том, что люцифераза представляет собой ферментативный комплекс с молекулярной массой более 350 кДа. Следующий пик соответствует небольшому растворимому ферменту гидроксилазе, с препаратом которого

было проведено дальнейшее исследование. Стрелками указаны фракции гидроксилазы и люциферазы, в которых наблюдалась активность.

### 2.3 Получение высокоочищенного препарата гидроксилазы

Так как холодный экстракт содержит помимо исследуемой гидроксилазы люциферазу, соответственно одной из задач очистки гидроксилазы было разделить ферменты без потери их активности. Первым этапом очистки гидроксилазы является анионообменная хроматография. Для оптимизации условий выделения фермента также необходимо было подобрать сорбент, который позволял бы осуществить выделение и очистку гидроксилазы. Поэтому для анионообменной хроматографии были протестированы два сорбента: Cellulose DEAE-52 и DEAE-Sepharose. Однако при хроматографировании на сорбенте с целлюлозой, скорее всего гидроксилаза прочно связывалась с сорбентом, в результате чего во фракции не наблюдалось активности. Таким образом, в дальнейшей работе был использован более слабый ионообменник, такой как DEAE-Sepharose. Данный тип сорбента позволил получить фракцию гидроксилазы без потери ее активности. На рисунке 8 представлены результаты анионообменной хроматографии.

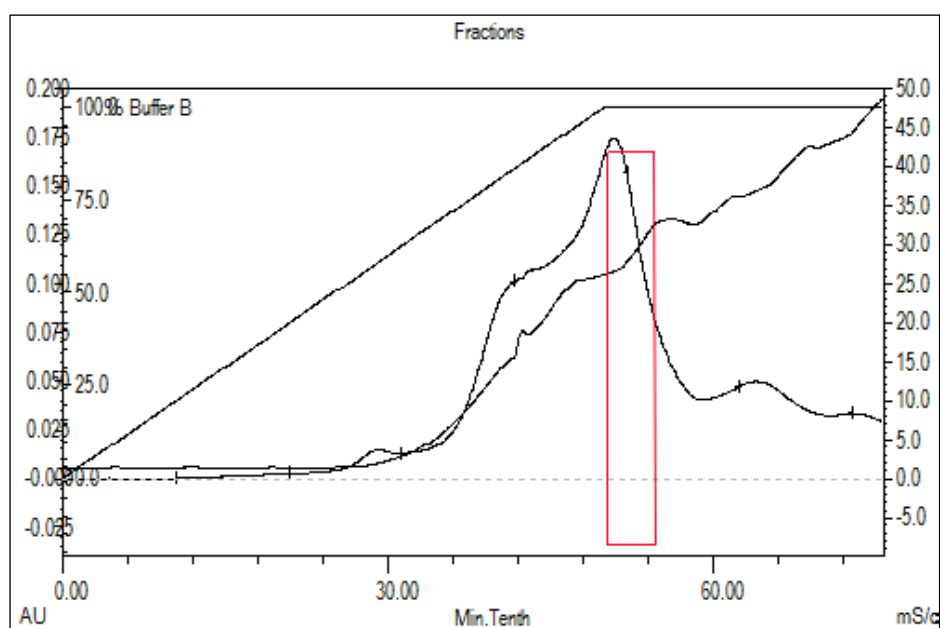


Рисунок 8 – Анионообменная хроматография холодного экстракта на колонке с сорбентом DEAE-Sepharose.



На хроматограмме высокий пик соответствует препарату гидроксилазы, красным цветом указаны фракции, в которых наблюдалась активность. После хроматографирования препарата гидроксилазы фракции, в которых наблюдалась активность, были объединены вместе. Далее объединенные фракции гидроксилазы были нанесены на колонку гидрофобной хроматографии с сорбентом PhenylSepharose CL-4B, результаты хроматографии представлены на рисунке 9.

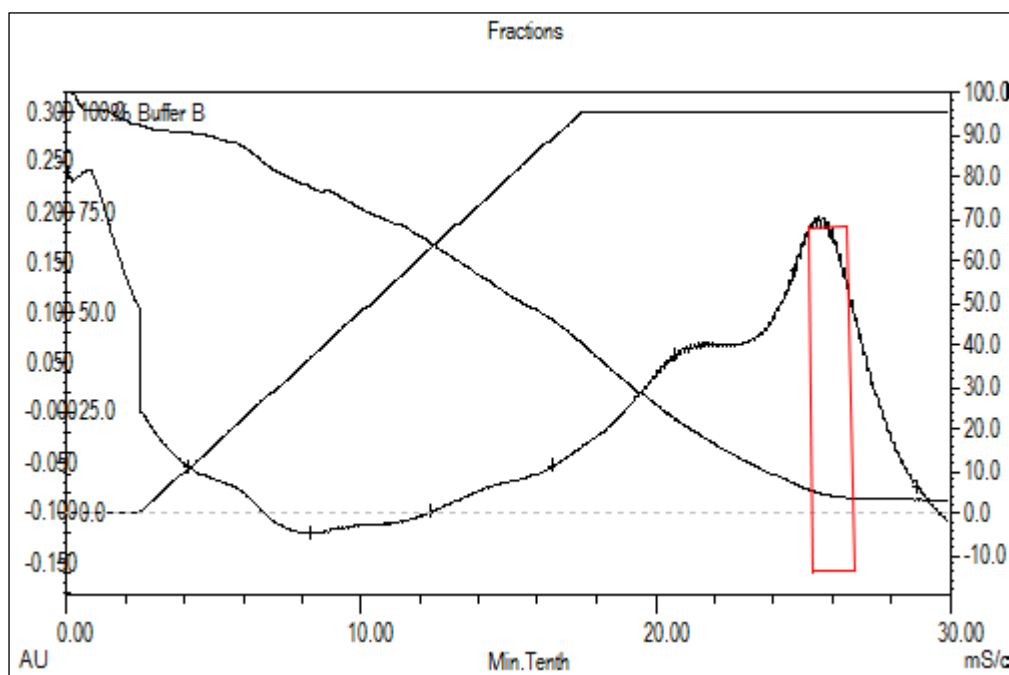
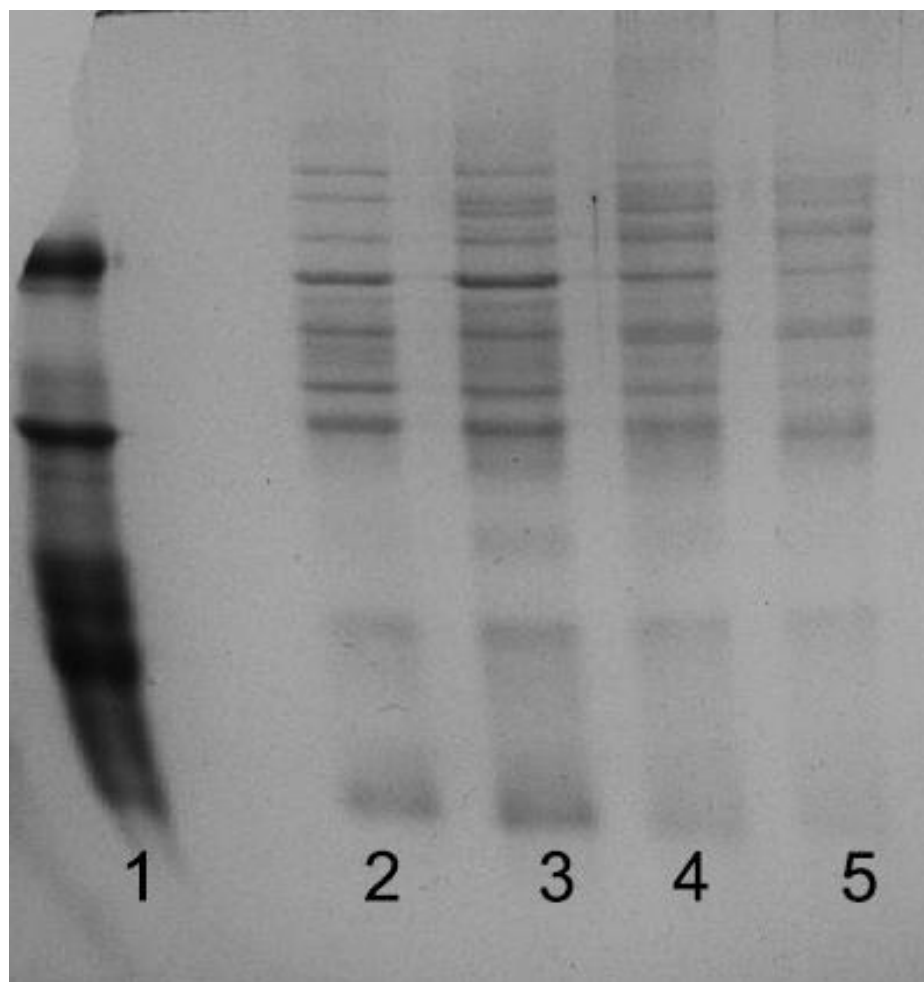


Рисунок 9 - Гидрофобная хроматография препарата гидроксилазы на колонке с сорбентом PhenylSepharose CL-4B.

Препарат гидроксилазы был снят обратным градиентом, красным цветом на хроматограмме обозначены фракции, в которых, при измерении на биолуминометре, регистрировалась активность. Полученные фракции с зарегистрированной активностью были использованы в дальнейшей работе. Для контроля степени очистки фермента гидроксилазы, с полученными фракциями был проведен белковый электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE). Результат представлен на рисунке 10.



1 – Калибровочные белки

2 – Фракция гидроксилазы №17

3 – Фракция гидроксилазы №18

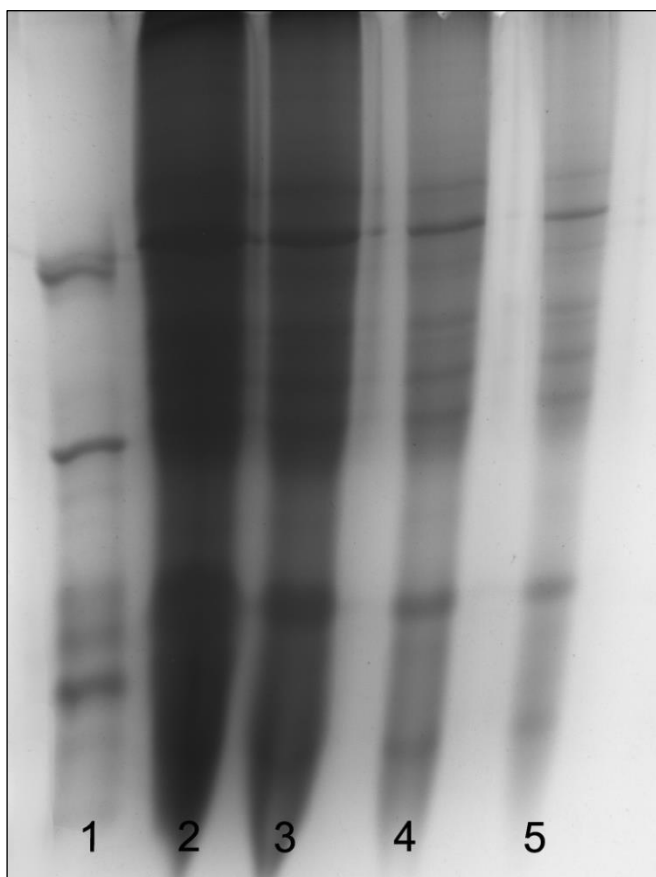
4 – Фракция гидроксилазы №19

5 – Фракция гидроксилазы №20

Рисунок 10 – Результаты белкового электрофореза (SDS-PAGE) фракций гидроксилазы после гидрофобной хроматографии.

На рисунке 10 электрофорезные дорожки 2–5 соответствуют фракциям с зарегистрированной активностью, собранным после гидрофобной хроматографии на колонке с сорбентом PhenylSepharose CL-4B. Данный результат белкового электрофореза представляет промежуточный результат очистки фермента гидроксилазы. Так препарат гидроксилазы прошедший два этапа очистки необходимо было сконцентрировать для анионообменной хроматографии, которая бы завершала процесс очистки фермента. Поэтому

после анионообменной и гидрофобной хроматографий препарат гидроксилазы был сконцентрирован методом высаливания и диализа, для контроля образца был проведен белковый электрофорез (SDS-PAGE). Результаты представлены на рисунке 11.



1 – Калибровочные белки

2 – Препарат гидроксилазы 10 мкл

3 – Препарат гидроксилазы 5 мкл

4 – Препарат гидроксилазы 2 мкл

5 – Препарат гидроксилазы 1 мкл

Рисунок 11 – Результаты белкового электрофореза (SDS-PAGE) препарата гидроксилазы после концентрирования.

По результатам белкового электрофореза видно, что после высаливания был получен концентрированный препарат гидроксилазы, который можно использовать для конечного этапа очистки фермента. Также по результатам, представленным на рисунке 11, была определена оптимальная концентрация

препарата гидроксилазы для нанесения на электрофоретическую дорожку равная 1-2 мкл. Сконцентрированный препарат гидроксилазы был нанесен на колонку анионообменной хроматографии высокого разрешения с сорбентом MonoQ. Результаты хроматографии представлены на рисунке 12.

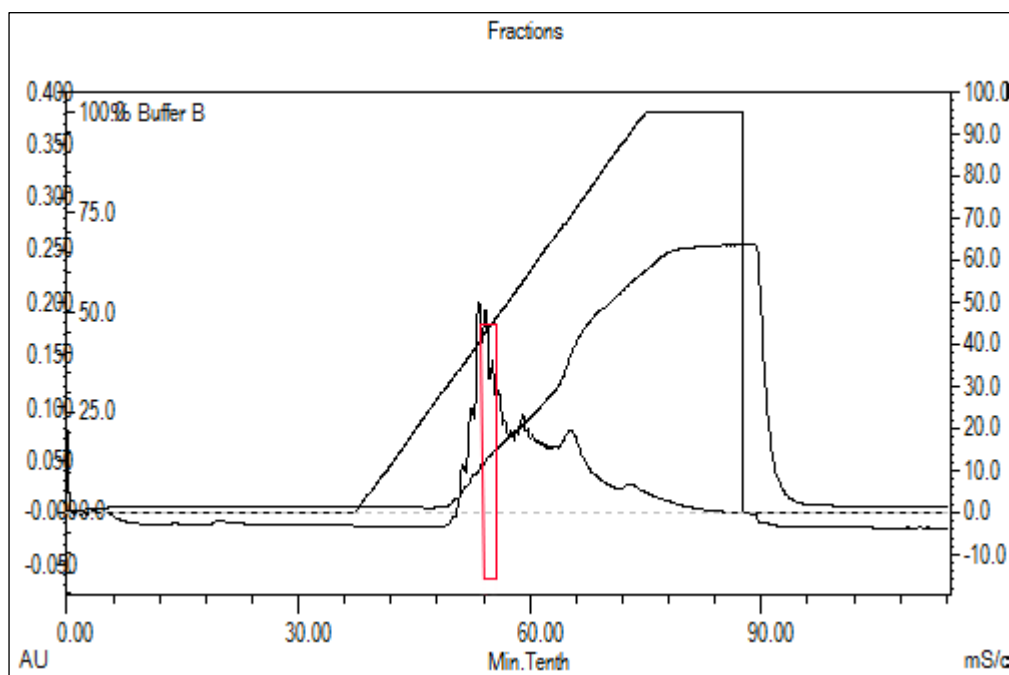


Рисунок 12 – Анионообменная хроматография высокого разрешения холодного экстракта на колонке с сорбентом MonoQ.

Красным на хроматограмме отмечены фракции, в которых регистрировалась активность билюминометром, далее эти фракции были объединены вместе. Анионообменная хроматография высокого разрешения на колонке с сорбентом MonoQ являлась завершающим этапом очистки фермента гидроксилазы.

В результате проделанной работы была предложена схема очистки фермента гидроксилазы включающая в себя получение холодного экстракта и последующее его последовательное хроматографирование. Схема представлена на рисунке 13.

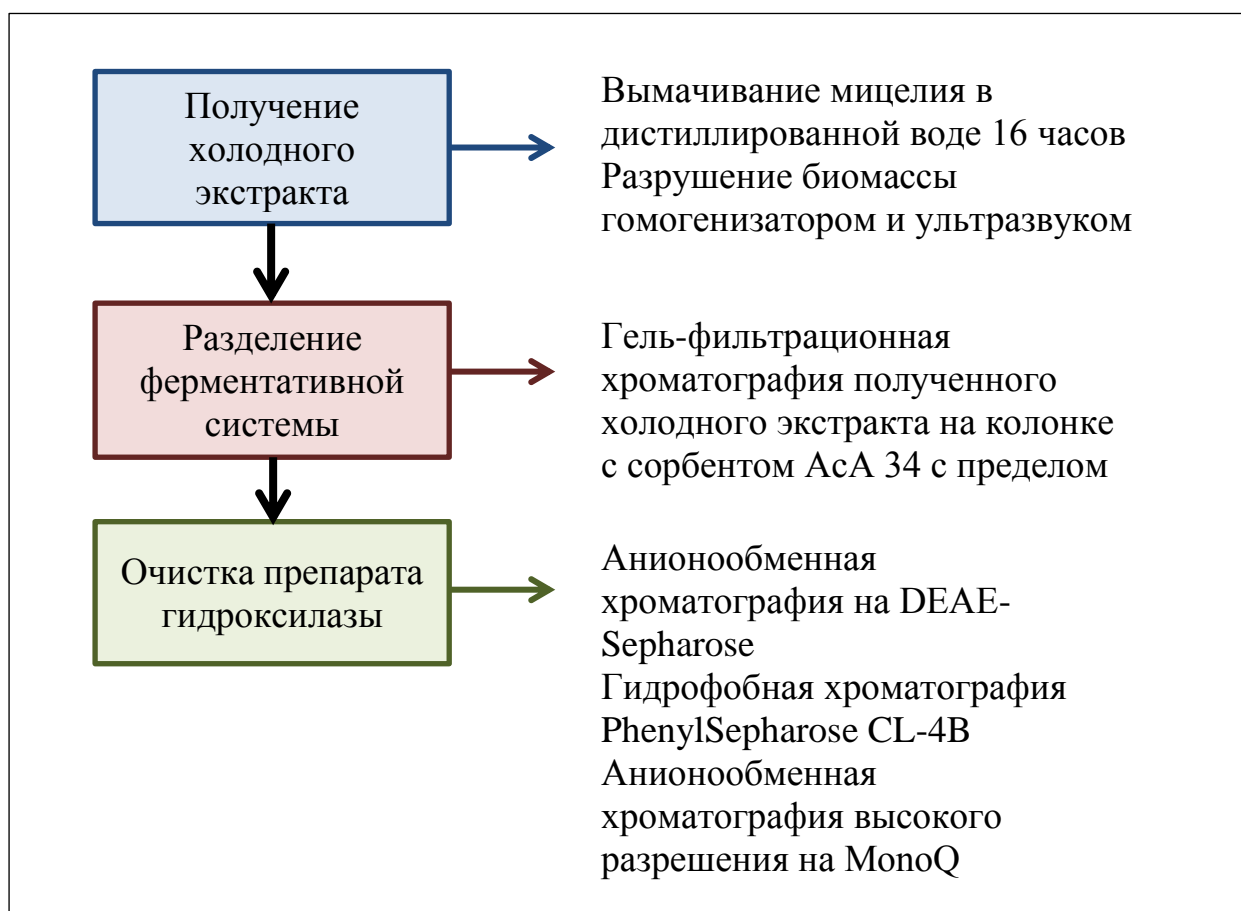
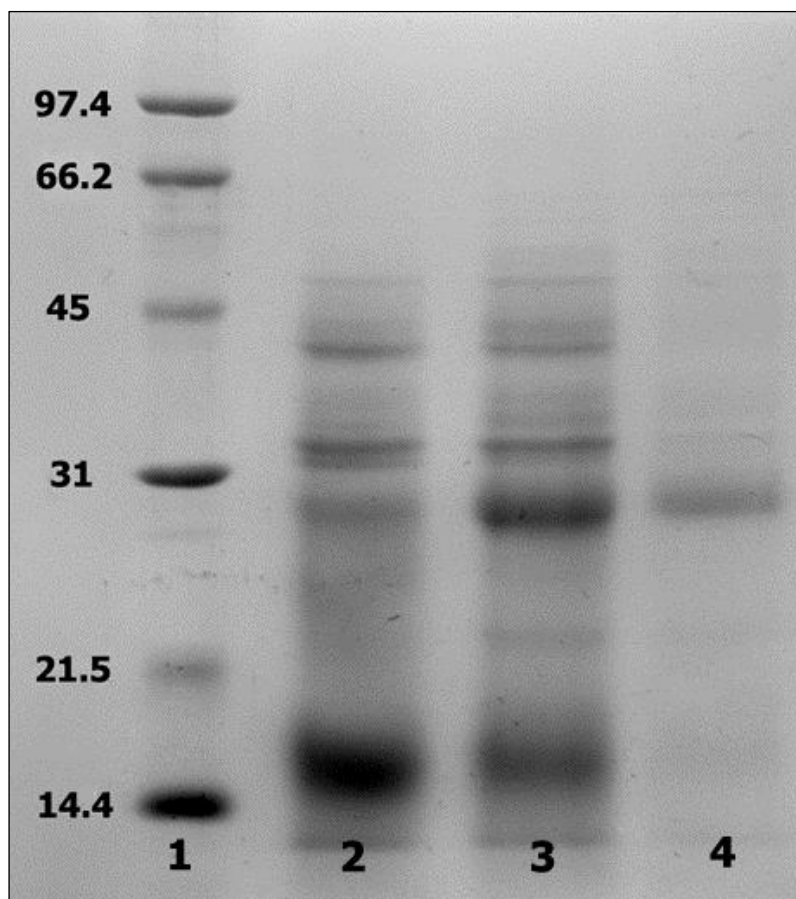


Рисунок 13 – Схема выделения и очистки фермента гидроксилазы из биолюминесцентной системы гриба *N. nambi*.

Данная схема (Рисунок 13) представляет собой разработанную методику выделения из мицелия гриба *Neonothopanus nambi* холодного экстракта, который сохраняет свою ферментативную активность. Также методика позволяет разделить ферментативную часть, и получить высокоочищенный препарат гидроксилазы биолюминесцентной системы гриба *N. nambi*.

По разработанной методике, представленной выше, было проведено контрольное выделение холодного экстракта из мицелия гриба *N. nambi*, была разделена ферментативная часть биолюминесцентной системы на гидроксилазу и люциферазу, была проведена контрольная очистка фермента гидроксилазы с учетом всех полученных данных. После каждого типа хроматографии для контроля степени очистки фермента гидроксилазы был проведен белковый электрофорез (SDS-PAGE), результаты которого представлены на рисунке 14.



1 – Калибровочные белки с указанными молекулярными массами.

2 – Анионообменная хроматография на DEAE-Sepharose.

3 – Гидрофобная хроматография PhenylSepharose CL-4B.

4 – Анионообменная хроматография высокого разрешения на MonoQ.

Рисунок 14 – Результаты контрольного белкового электрофореза (SDS-PAGE) после всех этапов очистки препарата гидроксилазы.

По результатам белкового электрофореза (Рисунок 14) был сделан вывод о том, что разработанная схема (Рисунок 13) действительно позволяет провести очистку фермента гидроксилазы. А также завершающий этап анионообменной хроматографии высокого разрешения на колонке с сорбентом MonoQ позволяет получить высокоочищенный препарат гидроксилазы. Таким образом, цель работы была достигнута, все сопутствующие задачи выполнены.

Также помимо получения высокоочищенного препарата гидроксилазы были установлены некоторые свойства этого фермента, а именно нативная молекулярная масса. Для чего была проведена гель-фильтрационная

хроматография препарата гидроксилазы на откалиброванной колонке с сорбентом Superdex 75. На рисунке 15 представлены полученные результаты.

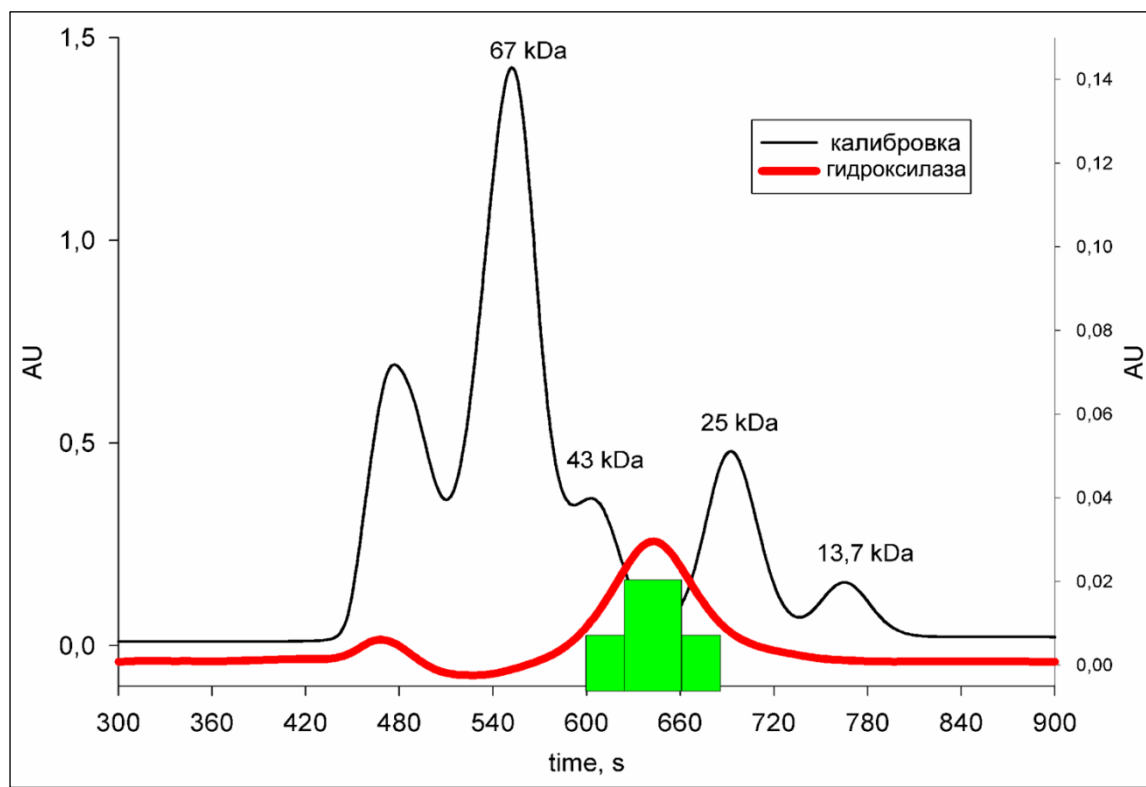


Рисунок 15 – Гель-фильтрационная хроматография препарата гидроксилазы на колонке с сорбентом Superdex 75.

Чтобы откалибровать колонку, через нее были пропущены белки с известными молекулярными массами и по времени удержания установлена нативная молекулярная масса гидроксилазы, равная 30-35 кДа. На рисунке 15 красная линия соответствует ферменту гидроксилазы, зеленым отмечена фракция с зарегистрированной на биOLUMинометре активностью.

Таким образом, была разработана не только схема очистки фермента гидроксилазы, но также впервые была установлена нативная молекулярная масса этого фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биолюминесценция высших грибов до сих пор остается не до конца раскрытым явлением. В настоящее время выделен и охарактеризован люциферин биолюминесцентной реакции грибов, однако так и не получено никаких данных о ферментативной части биолюминесцентной системы грибов. В результате проделанной работы были получены данные о некоторых свойствах ферментативной части биолюминесцентной системы гриба.

Впервые из мицелия светящегося гриба *Neonothopanus nambi* был получен высокостабильный и высокоактивный препарат содержащий ферменты биолюминесцентной системы гриба. Было установлено, что полученный ферментативный препарат гриба содержит две ферментные фракции, совместно принимающие участие в биолюминесцентной реакции, но не проявляющие этой активности по отдельности. С помощью хроматографических методов впервые удалось разделить ферменты биолюминесцентной системы гриба (гидроксилазу и люциферазу). Удалось установить функциональную активность этих ферментов. Были разработаны способы тестирования ферментов биолюминесцентной системы гриба по отдельности. Была разработана схема очистки гидроксилазы, позволившая получить высокоочищенный препарат этого фермента. По результатам белкового электрофореза можно предположить, что полученный препарат гидроксилазы, после анионообменной хроматографии высокого разрешения на колонке с сорбентом MonoQ, представляет собой высокоочищенный препарат, который можно использовать в дальнейшей работе по выявлению природы фермента.

Помимо разработанной методики выделения и очистки фермента гидроксилазы были также получены некоторые свойства этого фермента. Методом гель-фильтрационной хроматографии удалось установить нативную молекулярную массу фермента гидроксилазы, равную 30 – 35 кДа.

Поставленная цель работы была достигнута, сопутствующие задачи также выполнены. Полученные результаты в ходе исследования представляют



собой сравнительно новые данные о ферментативной части билюминесцентной системы гриба *Neonothopanus nambi*, а именно о ферменте гидроксилазе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stevani, C. V. Current Status of Research on Fungal Bioluminescence: Biochemistry and Prospects for Ecotoxicological Application / C. V. Stevani, A. G. Oliveira, L. F. Mendes, F. F. Ventura, T. A. Pereira // *Photochemistry and Photobiology*. – 2013. №89. – P. 1318–1326.
2. Desjardin, D. E. Fungi bioluminescence revisited / D. E. Desjardin, A. G. Oliveira, C. V. Stevani // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2008. – №7. – P. 170–182.
3. Oliveira, A. G. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages / A. G. Oliveira, D. E. Desjardin, B. A. Perry, C. V. Stevani // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2012. – №11. – P. 848-852.
4. Desjardin, D. E. Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species / D. E. Desjardin, B. A. Perry, D. J. Lodge, C. V. Stevani, E. Nagasawa // *Mycologia*. – d 2010. – №102. – P. 459–477.
5. Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* / O. Shimomura. – Singapore : World Scientific Publishing, 2006. – P. 278–280.
6. Бондарь, В. С. Выделение люминесцентной системы из светящегося гриба *Neonothopanus nambi* / В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов, А. И. Петунин, А. Е. Буров, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева, Б. А. Шпак, А. Б. Тяглик, О. Шимомура, академик И. И. Гительзон // *Доклады Академии наук*. – 2014. – № 3. – С. 346–348.
7. Бондарь, В. С. О люминесцентной системе светящегося гриба *Neonothopanus nambi* / В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, К. В. Пуртов, С. Е. Медведева, Э. К. Родичева, И. И. Гительзон // *Доклады Академии наук*. – 2011. – Т.438. – С.705-707.

8. Бондарь, В. С. О механизме свечения гриба *Neonothopanus nambi* / В. С. Бондарь, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева, Н. А. Тюлькова, А. Б. Тяглик, Б. А. Шпак, И. И. Гительзон // Доклады Академии наук. – 2013. –Т.449. – С.223-227.
9. Harvey, E. N. A history of luminescence from the earliest times until 1900 / E. N. Harvey. – Philadelphia : Memoir of the American Philosophical Society, 1957. – P. 27–59.
10. Dubois, R. Note sur la fonction photogénique chez la *Pholas dactylus* / R. Dubois // Soc. Biol. – 1887. – №39. – P 564-566.
11. Физика и химия биолюминесценции : учебное пособие / Бондарь В. С. [и др.]. – Красноярск : СФУ, 2012. – с. 194–197.
12. Airth, R. L. Light emission from extracts of luminous fungi / R. L. Airth, W. D. McElroy // Journal of Bacteriology. – 1959. – №77. – P. 249–250.
13. Airth, R. L. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence / R. L. Airth, G. E. Foerster // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1962. – №97. – P. 567–573.
14. Kuwabara, S. Purification and properties of the active substance of fungal luminescence / S. Kuwabara, E. Wassink // In Bioluminescence in Progress. – 1966. – №8. – P. 233–245.
15. Isobe, M. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom *L. japonicas* / M. Isobe, D. Uyakul, T. Goto // Tetrahedron Lett. – 1988. – №44. – P. 1169.
16. Nakamura, H. Panal: A possible precursor of fungal luciferin / H. Nakamura, Y. Kishi, O. Shimomura // Tetrahedron. – 1988. – V. 44. – I. 6. – P.1597-1602.

17. Oliveira, A. G. The enzymatic nature of fungal bioluminescence / A. G. Oliveira, C. V. Stevani // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2009. – №8. – P. 1416-1421.

18. Oliveira, A. G. On the purification of the NAD(P)Hdependent reductase involved in fungal bioluminescence / A. G. Oliveira, R. P. Carvalho, H. E. Waldenmaier, V. R. Viviani, C. V. Stevani // *Luminescence*. – 2012. – №27. – P. 151.

19. Lee, I. K. Styrylpyrone – class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance / I. K. Lee, B. S. Yun // *The Journal of Antibiotics*. – 2011. – №64. – P.349–359.

20. Oliveira, A. G. On the purification of the fungal luciferin / A. G. Oliveira, R. P. Carvalho, C. V. Stevani // *Luminescence*. – 2012. – №27. – P. 150.

21. Purto, K.V. The chemical basis of fungal bioluminescence / K. V. Purto, V.N Petushkov, M.S. Baranov, K.S. Mineev, N.S. Rodionova, Z.M. Kaskova, A.S. Tsarkova, A.I. Petunin, V.S. Bondar, E.K. Rodicheva, S.E. Medvedeva, O. Yuichi, O. Yomiko, A.S. Arseniev, S. Lukyanov, J.I. Gitelson, I.V. Yampolsky // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2015. – №54. – P. 8124–8128.

22. Mendes, L. F. Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens* / L. F. Mendes, E. L. Bastos, D. E. Desjardin, C. V. Stevani // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – №282. – P. 132–139.

23. Weitz, H. J. Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing / H. J. Weitz, C. D. Campbell, K. Killham // *Environ. Microbiol.* – 2002. – №4. – P. 422–429.

24. Horswell, J. Impact of heavy metal amended sewage sludge on forest soils as assessed by bacterial and fungal biosensors / J. Horswell, H. Weitz, H. Percival, T. Speir // *Biol. Fert. Soils*. – 2012. – №42. – P. 569–576.

25. Anahid, S. Heavy metal tolerance of fungi / S. Anahid, S. Yachmaei, Z. Ghobadinejad // *Sci. Iran.* – 2011. – №18. – P. 508–508.

26. Mendes, L. F. Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus *Gerronema viridilucens* bioluminescence in agar medium / L. F. Mendes, C. V. Stevani // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2010. – №29. – P. 320–326.