

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
заведующий кафедрой

подпись

инициалы, фамилия

«_____» _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Локализация С-концевой последовательности, критичной для
активности люциферазы *Metridia longa*

Руководитель

подпись, дата

с.н.с., канд. биол. наук

должность, ученая степень

С. В. Маркова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

И. А. Коротов

инициалы, фамилия

Красноярск 2019

Содержание

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1 Явление билюминесценции	7
1.2 Люциферазы копепод	9
1.3 Люцифераза <i>Metridia longa</i>	9
1.4 Биоимиджинг и билюминесцентные репортеры	12
1.5 Преимущества MLuc в качестве репортерного белка.....	15
Глава 2. Материалы и методы	17
2.1 Сайт-направленный мутагенез QCSDM: укорачивание ML7 с С-конца.....	17
2.2 ПЦР-синтез укороченных вариантов гена <i>mluc7</i>	18
2.3 Аналитический ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле	18
2.4 Очистка укороченных вариантов гена <i>mluc7</i>	19
2.5 Рестрикция укороченных вариантов гена <i>mluc7</i>	19
2.6 Препаративный ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле	20
2.7 Выделение ДНК из агарозного геля.....	20
2.8 Создание рекомбинантных ДНК на основе плазмидного вектора pET22b+.....	20
2.9 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i>	21
2.10 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	21
2.11 Выделение плазмидной ДНК щелочным лизисом на колонках QIAGEN	22
2.12 Секвенирование укороченных вариантов гена <i>mluc7</i>	22
2.13 Наращивание MLuc7 и ее делеционных мутантов в клетках <i>E. coli</i> штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	22
2.14 Разрушение клеток <i>E. coli</i> штамма BL21-CodonPlus(DE3) - RIPL	23
2.15 Белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли	24
2.16 Измерение билюминесцентной активности грубых лизатов	25
Глава 3. Результаты.....	26
3.1 Создание укороченных вариантов гена MLuc7.....	26
3.2 Характеризация экспрессии мутантных люцифераз.....	30
3.3 Сравнение активности мутантных люцифераз	32
Заключение	35
Выводы.....	37
Список сокращений	38
Список литературы	39

Список изъятых страниц

Реферат – стр. 2 и 3.

Введение - стр. 6.

Глава. 3. Результаты - стр.33 и 34.

Заключение - стр. 35 и 36.

Выводы: стр. 37.

Введение

Биолюминесценция – излучение видимого света организмом в результате естественной химической реакции, в которой происходит окисление низкомолекулярного субстрата – люциферина, катализируемое специфическим ферментом — люциферазой. Как теперь уже не подвергается сомнению, биолюминесценция у живых организмов в процессе эволюции возникала много раз независимо в различных таксонах. На сегодняшний день известно не менее 40 таких биолюминесцентных систем. Поэтому люциферин и люцифераза являются собирательными терминами, обозначающими только функцию, и представляют собой совершенно разные классы соединений и различных белков, соответственно.

На сегодняшний день активно развивается направление биотехнологии, связанное с разработкой методов, позволяющих визуализировать молекулярные процессы, как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*. Для этих решения задач как нельзя лучше подходят биолюминесцентные репортеры, поэтому постоянно проводятся поиски новых биолюминесцентных природных белков и улучшение уже известных ферментов.

Перед этими репортерами стоит ряд требований: белок должен иметь минимальный размер, реакция должна быть проста, то есть не требовать специфических кофакторов, и люциферазы должны обладать высокой активностью.

Природные секретируемые целентеразин-зависимые люциферазы копепод – *Gaussia princeps* и *Metridia longa* как нельзя лучше соответствуют этим требованиям. А изоформа MLuc7 люциферазы *Metridia longa* имеет наименьшие размеры при наибольшей активности из всех изоформ, клонированных ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ ФИЦ КНЦ СО РАН. Поэтому MLuc7 имеет большие перспективы для использования в качестве биолюминесцентного репортера.

Однако пространственная структура люциферазы *Metridia longa* до сих пор не известна, также остаются неясными и структурно-функциональные взаимосвязи. Известно, что многие белки построены по доменному принципу, где различные домены могут выполнять различные функции. Конкретный каталитический домен может быть много меньше самого фермента. Одним из путей исследования таких структурно-функциональных взаимосвязей белка является получение его делеционных мутантов и изучение их свойств. Минимизация люциферазы перспективна как с точки зрения использования ее в качестве генетически-кодируемой репортерной молекулы для минимизации метаболической нагрузки на клетку, так и способна облегчить получение кристаллов для определения пространственной структуры. Изучение самой маленькой на сегодняшний день люциферазы MLuc7, в перспективе, позволит добиться еще меньших размеров и повысить эффективность в качестве биолюминесцентного репортера.

Целью данной работы было получение и исследование активности C-концевых делеционных мутантов люциферазы *Metridia longa* укороченных на

Глава 1. Обзор литературы

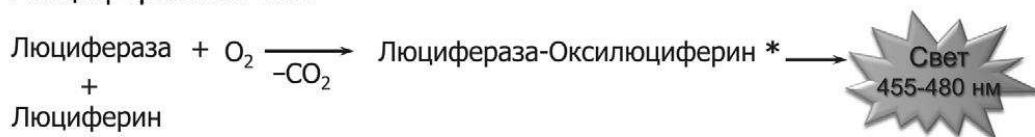
1.1 Явление биолюминесценции

Биолюминесценция – это излучение видимого света живыми организмами в результате химической реакции [1,2]. Такое явление широко распространено в природе. В настоящее время насчитывается несколько тысяч биолюминесцентных видов среди представителей более чем 700 родов [3]. Встречается у самых разнообразных таксонов: от бактерий и простейших до разнообразных кишечнорастворимых и моллюсков. Однако она чаще встречается у глубоководных организмов и планктонных, чем у бентосных или мелководных. В пресном водоеме свечение организмов почти отсутствует, за редким исключением, например, личинок некоторых насекомых. На суше способность излучать свет имеют некоторые насекомые, например, светляки, грибы, многоножки, улитки и дождевые черви. Биолюминесценция имеет различное значение для живых организмов. В одних случаях ее используют для охоты или привлечения особей противоположного пола. В других – значение этого явления не столь очевидно [1].

Механизмы свечения очень разнообразны и у разных таксонов могут сильно различаться: субстраты для реакции, кофакторы и даже ферменты, катализирующие реакцию биолюминесценции, также различны. Термины «люцифераза» и «люциферин» скорее понятие собирательное и функциональное, чем структурно-химическое [3]. Среди морских обитателей наиболее распространены люциферины, относящиеся к имидазолпиразиновому типу. Одним из таких субстратов является целентеразин [2].

Выделяют два основных типа биолюминесцентной реакции: люциферазная и фотопротеиновая. (рисунок 1) Люциферазный тип реакции – прямое быстрое окисление субстрата люциферина, приводящее к образованию возбужденного оксилуциферина, который переходит в основное состояние с испусканием квантов света [2]. К этому типу относятся биолюминесцентные системы копепод, креветок рода *Oplophorus*, остракод, сцифоидных медуз, коралла *Renilla* [1, 2, 3]. Во втором случае энзим «предварительно заряжен», то есть фотопротеин образует с субстратом устойчивый фермент-субстратный комплекс, существующий длительное время. Биолюминесценция в этом случае вызвана внутримолекулярной реакцией окисления, запускаемой неким внешним фактором [2, 4]. Кофактором для биолюминесцентной реакции кишечнорастворимых, гребневиков и радиолярий служит Ca^{2+} . Фотопротеины двустворчатых моллюсков и червячного червя включают супероксидные радикалы, и O_2 необходим для их светоизлучающих реакций. У многоножки *Luminodesmus* для протекания биолюминесцентной реакции требуется АТФ и Mg^{2+} [5].

Люциферазный тип



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

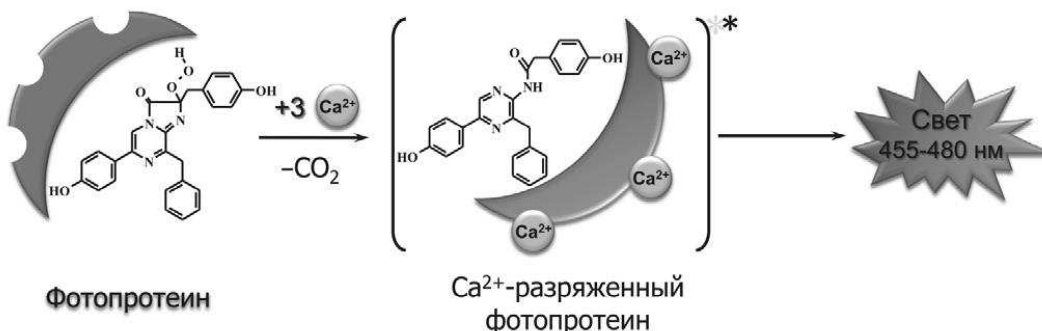


Рисунок 1 – Общая схема люциферазного и фотопротеинового типов билюминесцентных реакций [2].

В качестве примеров Ca^{2+} -регулируемых билюминесцентных систем можно привести фотопротеины акворин, халистаурин, фиалидин и обелин выделенные из медуз *Aequorea*, *Halistaura (Mitrocoma)*, *Phialidium (Clytia)* и *Obelia* соответственно. Субстратом для этих ферментов является «преактивированный» кислородом целентеразин, а именно 2-гидропероксицелентеразин. Билюминесценция 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, 6]. Также существуют фотопротеины, представляющие собой комплекс из белка и ковалентно связанного с ним целентеразина. К таким фотопротеинам относятся симплектин из кальмара *Symplectoteuthis oualaniensis*, который инициируется кислородом и ионами калия, и фолазин из моллюска *Pholas dactylus*, который инициируется активными формами кислорода [2].

Билюминесцентные и флуоресцентные белки могут быть связаны друг с другом. Органы свечения эвфаузиевых рачков – фотофоры – излучают свет только в присутствии специального флуоресцентного соединения [5]. В роли такого соединения может выступать GFP (green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок). Излучаемый фотопротеином синий свет поглощается GFP, а затем повторно излучается в зеленом спектре [7].

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. Эпидермальные железы морского 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 [8, 9, 10].

Сам рачок *Metridia longa* встречается в субарктических, арктических, североатлантических и тихоокеанских районах вдоль побережья Америки и Азии [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, 9]. GLuc была клонирована в 2002 году [12], а MLuc – в 2004 году [9]. Их успешно применяют в качестве биолюминесцентных репортеров как *in vitro*, так и *in vivo*. Люциферазы копепод являются целентеразин-зависимыми [1, 2, 3] и представляют собой небольшие секретлируемые 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, 9, 12,]. Для протекания биолюминесцентной реакции не требуется АТФ [2, 3, 9, 12].

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. [9].

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

1.3 Люцифераза *Metridia longa*

Люцифераза *Metridia longa* представляет собой секретлируемый фермент, катализирующий окислительное декарбоксилирование целентеразина с испусканием света [13]. В естественных условиях выделяется во внешнюю среду из эпидермальных желез, расположенных на голове и брюшке рачка [3, 8, 9]. Излучение света происходит в голубой области спектра, максимальная

длина волны составляет 485 нм [2, 3, 9]. Наличие дисульфидных мостиков в люциферазе затрудняет ее экспрессию в клетках прокариот, так как окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы препятствует правильному созреванию белка [14]. Также, в бактериальных клетках MLuc экспрессируется в виде нерастворимых телец включения, в которых белок находится в денатурированном виде [9, 14, 15]. Поэтому в настоящий момент в качестве одного из методов получения рекомбинантных эукариотических белков с множественными дисульфидными связями успешно применяется бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых, что позволяет обойти вышеперечисленные трудности. В клетках насекомых происходит посттранскрипционная модификация и правильно формируются дисульфидные связи [15].

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* [15]. Температурный оптимум ферментов также различается. Наличие таких изоформ, по-видимому, обеспечивает адаптацию к мгновенным изменениям температуры воды во время суточных вертикальных миграций копепод [15]. Изоформа MLuc7 является самой маленькой люциферазой на сегодняшний день (168 аминокислот и 16,5 кДа). И по сравнению с другими известными изоформами люциферазы *Metridia longa* является наиболее активной [16]. На рисунке 2 приведены аминокислотные последовательности люцифераз MLuc2 и MLuc7 в сравнении с люциферазой GpLuc.

В отличие от других биолюминесцентных белков, содержащих много ароматических аминокислотных остатков, С-концевая консервативная часть MLuc содержит только 4 остатка фенилаланина, 2 остатка тирозина, 2 остатка гистидина и 1 остаток триптофана. Остатки тирозина в 72 и 80 положении расположены в полости связывания с субстратом. При замене этих остатков тирозина на фенилаланин в белке MLuc7 были получены мутанты с меньшей активностью – у мутанта с заменой тирозина в 80 положении она составила всего 5% от уровня удельной активности MLuc7, а у второго мутанта с заменой тирозина в положении 72 – 10%. Это говорит о снижении эффективности окисления целентеразина. Понизился и температурный оптимум до 7°C по сравнению с оптимумом в 12°C для MLuc7. Однако биолюминесцентная активность сохранилась и спектр излучения не изменился [14].

A)		Signal peptide		↓ Repeat 1		
GpLuc	1	MGVKVLFALICIAVAEAKPT-ENNEDFNIVAVASN FATTDLDA	DRG---	KLPGKKLPL		
MLuc2	1	MGVKLIFAVVCVAVAQAATIQENFEDIDLVAIGGSFA-SDVDANRGGHGGHPGKKMPK				
MLuc7	1	MDIKFIFALVCIALVQANPT-VNN-----	DVNRG---	KMPGKKLPL		
		Motif 1				
GpLuc	55	EVLKEMEANARKAG	TRGCLICLSHIKCTPKMKKFI	PGRCHTYEGDKESAQGGIG-EA		
MLuc2	58	EVLMEANEANARKAG	HRGCLVCLSHIKCTAQMQKFI	PGRCHSYAGDKDSAQGGIAGGA		
MLuc7	38	EVLIEMEANAFKAG	TRGCLICLSKIKCTAKMKQYI	PGRCHDYGGDKKTGQAGIV-GA		
		↓ Repeat 2	Motif 2			
GpLuc	113	IVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDL	QVDC	TTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQR	CATFA	
MLuc2	116	IVDIPEIAGFKEMKPEMEQFIAQVDL	QEDC	TTGCLKGLANVHCSDLLKKWLP	PSRCKTFA	
MLuc7	96	IVDIPEISGFKEMEPEMEQFIAQVDL	QAD	TTGCLKGLANVKCS	SELLKKWLPDR	CASFA
			Seq	Identity		
GpLuc	170	SKIQQQVDKIKGAGGD-	185	100.0%		
MLuc2	174	SKIQSQVDTIKGLAGDR	190	71.1%		
MLuc7	153	DKIQKEAHNIKGLAGDR	169	67.2%		

Рисунок 2 – Сравнение аминокислотных последовательностей люцифераз GpLuc, MLuc2 и MLuc7. Красными буквами указаны идентичные аминокислотные остатки, синие буквы представляют собой аналогичные остатки, а черные буквы - неидентичные остатки. Предполагаемые отщепляемые сигнальные пептиды находятся в сером прямоугольнике. Два наиболее похожих мотива в неидентичных повторах отмечены желтыми, консервативные остатки Cys выделены зеленым цветом. Предполагаемые дублированные домены в люциферазе GpLuc отмечены стрелками (Repeats 1 & 2). Аминокислотный остаток, затененный голубым цветом, указывает положение, соответствующее усечению высокоактивных мутантов ML164M5 изоформы MLuc164. Переменная N-концевая последовательность между сигнальным пептидом и наиболее консервативной частью последовательности люциферазы подчеркнута синим цветом [17].

При использовании люцифераз копеподы *in vitro* всегда встает вопрос об эффективном получении препарата белка. Наиболее выгодным является выделение люциферазы из трансформированной *Escherichia coli*. Однако среда цитоплазмы клеток препятствует образованию дисульфидных связей и, следовательно, правильному фолдингу люциферазы. Правильный фолдинг белка может обеспечить эукариотическая клетка. Как, например, при использовании бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых линии Sf9, в том числе в секретлируемом варианте. Белок в таком случае выделяют из культуральной среды этих клеток. Но применение прокариотических систем экспрессии, является более выгодным и более простым решением даже при низком выходе белка, если получается разработать систему рефолдинга. Люциферазы (например, изоформы MLuc164 и MLuc39) были выделены в форме телец включений в клетках *E. coli* и растворены в 6 М гуанидиния хлориде. Далее производился фолдинг в специальных условиях, разработанных для белков, содержащих внутримолекулярные дисульфидные связи. Было показано, что после

проведении рефолдинга люциферазы и дальнейшей очисткой ее 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 [15, 18].

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 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. [16].

Люциферазы *MLuc* оказались чрезвычайно привлекательна 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 Биоимиджинг и биолюминесцентные репортеры

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 [19].

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 билюминесцентных 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, 19, 20,21]. Обычно люцифераза вводится в качестве репортерного гена в качестве генетически-кодируемого репортера в интересующую клетку. В зависимости от поставленной цели, экспрессия может быть конститутивной либо индуцибельной [17]. Билюминесцентные репортерные системы полезны для мониторинга экспрессии и регуляции генов в различных областях, начиная от развития эмбрионов и прогрессирования заболеваний.

Фотопротеины как репортерная молекула 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 акворин. В качестве метки может быть фермент, например фотопротеин акворин [6].

Билюминесцентные 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 клетки и организма в целом, процесс метилирования гистонов, циркадные ритмы у животных [19, 20].

BRET - это явление, встречающееся в природе у некоторых морских кишечнорастворимых, например, у *Renilla reniformis* и *Aequorea victoria*. Окисление целентеразина люциферазой в этих организмах приводит к появлению состоянию 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. Чтобы проследить взаимодействия двух исследуемых белков, каждый из них должен быть слит с донорным или акцепторным белком. Ассоциация приводит к уменьшению люминесценции донора и увеличению флуоресценции акцептора. [22] В альтернативном варианте этого метода флуоресцентный белок заменяется красителем Билюминесценция из меченого фотопротеином анализируемого вещества переносится в краситель, который выбирается на основе способности гасить билюминесцентную эмиссию. [23]

Билюминесцентные репортерные системы позволяют анализировать экспрессию и регуляцию генов. Это осуществляется либо путем генерации точечных мутаций или делеций в промоторной области интересующего гена, либо с использованием различных сайтов связывания транскрипционных

факторов, связанных с минимальным промотором, для управления экспрессией люциферазы. Биолюминесцентные репортер позволяют визуализировать пост-транскрипционные события на уровне мРНК [20]. Так, например, в работе [24] проводилось исследование ингибирование трансляции фактора апоптоза - Mcl-1. Создавалась генетическая конструкция, кодирующая экспрессию гибридного белка Mcl-1–люцифераза. Трансляция мРНК этого комплекса подавлялась в присутствии мРНК связывающего белка CUGBP2, который связывался с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR).

Для исследования регуляции транскрипции также было предложено использование 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. [20, 25].

Понимание того, как взаимодействуют белки, имеет решающее значение и очень востребовано в биологических и медицинских применениях. Так называемый структурный анализ 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 находятся в непосредственной близости, и поэтому репортер проявляет активность. Эта система позволяет визуализировать взаимодействие белков в реальном времени, даже на субклеточном уровне в культивируемых клетках [26].

Биолюминесцентные системы также позволяют наблюдать развитие инфекционных заболеваний *in vivo*. Так в одном эксперименте мышей заражали модифицированными бактериями *Salmonella typhimurlum*, содержащими ген бактериальной люциферазы. Благодаря биолюминесценции удалось локализовать бактерии в определенных тканях животного, и определить эффективность антибиотика *in vivo* [27]. Схожим образом производится изучение стволовых и опухолевых клеток [20]

Гибридный белок люциферазы Luciferingrelicaso и стрептавидина (His6-SA-Luc) может использоваться для исследования микроорганизмов. Детекции клеток микроорганизмов осуществляется с использованием иммунобиолюминесцентного метода. Показано, что гибридный белок His6-SA-Luc является высокочувствительным реагентом при специфической на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействиях как с использованием иммуноанализа, так и с использованием гибридного анализа специфических фрагментов ДНК клеток микроорганизмов. Гибридные белки

стрептавидин-люциферазы могут быть получены либо методами химической конъюгации, либо генно-инженерными методами [28, 29].

В качестве биолюминесцентных репортеров выступают различные люциферазы и фотопротеины, причем как дикого типа, так и мутанты с улучшенными свойствами. Часто в качестве репортеров используются фотопротеин акворин, бактериальные люциферазы, светляковые люциферазы, люцифераза из коралла *Renilla reniformes*, ципридиновые люциферазы, субстратом для которых является *Cypridina* люциферин, люцифераза декаподной креветки *Oplophorus*, а также GLuc и MLuc [3, 20].

1.5 Преимущества 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 биолюминесцентной 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, 8, 9].

Изучение миРНК возможно с использованием MLuc. В исследовании [30] 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 [31]. 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.

В работе [32] было показано применение люцифераз из морских рачков, в частности люцифераза MLuc7, в анализе Toranga, для определения экспрессии CAR в CAR-T-клеточная 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 [33], 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.

Из всего вышесказанного можно заключить следующее: копеподные люциферазы являются многообещающими репортерными белками. Они устойчивы к высоким температурам, высокочувствительны, являются секретлируемыми, что позволяет проводить различные исследования динамических процессов внутри клеток без их разрушения, а также с использованием крови и других биологических жидкостей.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Сайт-направленный мутагенез QCSDM: укорачивание ML7 с С-конца

Укороченные варианты гена *mluc7* получали с использованием набора «Quick Change site-directed mutagenesis kit». (QCSDM), «Stratagene». В качестве матрицы использовали плазмиду pET22b-ML7 (200 нг/мкл), несущую этот ген. Для синтеза укороченных фрагментов ДНК использовали следующие праймеры:

838dL7-16Xh5: 5'-GTGCAAGTTTTGCTGACTAATGACTCGAGCACCC-3' – олигонуклеотид для QCSDM с XhoI сайтом и дополнительным TGA стоп-кодоном для укорочения С-конца люциферазы *mluc7* на 16 аминокислотных остатков

839dL7-16Xh3: 5'-GTGGTGCTCGAGTCATTAGTCAGCAAAACTTGCAC-3' – обратный олигонуклеотид QCSDM для синтеза укороченной на 16 аминокислотных остатков люциферазы *mluc7*

840dL7-18Xh5: 5'-GACAGATGTGCAAGTTTTTAATGACTCGAGCACCA-3' – олигонуклеотид для QCSDM с XhoI сайтом и дополнительным TGA стоп-кодоном для укорочения С-конца люциферазы *mluc7* на 18 аминокислотных остатков

841dL7-18Xh3: 5'-TGGTGGTGCTCGAGTCATGAAAACTTGCACATCTGTC-3' – обратный олигонуклеотид QCSDM для синтеза укороченной на 18 аминокислотных остатков люциферазы *mluc7*.

842dL7-14Xh5: 5'-AGTTTTGCTGACAAAATTTAATGACTCGAGCACCA-3' – олигонуклеотид для QCSDM с XhoI сайтом и дополнительным TGA стоп-кодоном для укорочения С-конца люциферазы *mluc7* на 14 аминокислотных остатков

843dL7-14Xh3: 5'-TGGTGGTGCTCGAGTCATGAAATTTTGTTCAGCAAA-3' – обратный олигонуклеотид QCSDM для синтеза укороченной на 14 аминокислотных остатков люциферазы *mluc7*.

Общий объем реакции составил 20 мкл. В каждую ПЦР-пробирку вносили 15.2 мкл деионизованной воды, 0,5 мкл матрицы, 2мкл QCSDM буфера, 0,8 мкл 20мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 0,6 мкл 3'праймера, 0,6 мкл 5'праймера и 1 мкл PfuTurbo-полимеразы (2,5 U/мкл).

Всего проводили 16 циклов амплификации ДНК. Температурные параметры данной реакции представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Температурные параметры для синтеза укороченных фрагментов ДНК

Температура, °С	Время, сек	} 16 циклов
95	30	
94	14	
55	30	
68	60	

Качество синтеза фрагментов ДНК и их размер оценивался методом аналитического ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле. Для рестрикции матрицы в пробирки с образцами добавили 0.5мкл DpnI. Инкубировали 2 часа при 37°C.

2.2 ПЦР-синтез укороченных вариантов гена *mluc7*

Укороченные варианты гена *mluc7*, который кодирует Mluc7, получали посредством направленного мутагенеза и синтезировали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду рЕТ22b-ML7 (200 нг/мкл), несущую этот ген. Для синтеза укороченных фрагментов ДНК использовали следующие праймеры.

857dL7-20Xh3: 5'-AGTCTCGAGTCA TTATGCACATCTGTCTGGCAG-3 – 3'-обратный олигонуклеотид с XhoI сайтом и дополнительным TGA стоп-кодом для ПЦР-синтеза ML7-C20 – мутанта гена *mluc7*, укороченного на 20 аминокислотных остатков 20 с С-конца.

T7pro: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGГG-3' T7 Прямой олигонуклеотид, промоторный праймер.

Общий объем ПЦР-реакции составил 50 мкл. В каждую ПЦР-пробирку вносили 40 мкл деионизованной воды, 100 нг матрицы (что при концентрации ДНК 200 нг/мкл составило по 0,5 мкл на реакцию), 5мкл 10x Pfu буфера, 0,5 мкл 20 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 1,5мкл 10 мкМ раствора 3'праймера, 1,5 мкл 10 мкМ раствора 5'праймера и 1 мкл PfuSE-полимеразы (5 U/мкл).

Всего проводили 17 циклов амплификации ДНК. Температурные параметры данной ПЦР представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Температурные параметры ПЦР-синтеза укороченных фрагментов ДНК

Температура, °С	Время, сек	
95	45	
94	20	} 17 циклов
51	30	
72	60	
72	360	

Для оценки качества синтеза фрагментов ДНК и их размера проводили аналитический ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле.

2.3 Аналитический ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле

Для проведения аналитического ДНК-электрофореза использовали 1% агарозный гель в буфере ТАЕх50. В состав ТАЕ входят 0,04 М Tris-HCl pH 8,0, 0,02 М EDTA, pH 8,0 В гель и буфер добавляли интеркалирующий краситель – бромистый этидий, по 2,5 мкл на 100 мл и 12,5 мкл на 500 мл соответственно. Гель заливали на подложку для геля слоем толщиной 5 мм. После остывания гель переносили в камеру для электрофореза, затем наливали буфер. Для

нанесения в лунки образцы подготавливали следующим образом: смешивали некоторое количество буфера, 0,5 мкл бромфенолового синего и необходимое количество исследуемого образца ДНК. Образцы сравнивали со стандартными маркерами молекулярного веса: 100 bp DNA Ladder и 1 kb DNA Ladder (NEB, США) в объеме 2 мкл. Рабочее напряжение составляло 100В. Концентрацию ДНК оценивали визуально по флуоресценции бромистого этидия после воздействия ультрафиолетовым светом. По пройденному расстоянию определяли размер образца в сравнении со стандартными маркерами. Фотографирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью системы AlfaImager HP System (Protein Simple, США).

2.4 Очистка укороченных вариантов гена *mluc7*

Очистку полученных укороченных вариантов гена *mluc7* от нежелательных примесей и контаминантов (нуклеотидов, детергентов, солей, праймеров) проводили по специальному протоколу с использованием реактивов из набора QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Нидерланды).

Вносили связывающий буфер PB из расчета 5 объемов буфера на 1 объем. Смесь перемешивали на Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США). Затем раствор переносили на специальную колонку с фильтром из силикагеля, входящую в набор, центрифугировали в течение минуты на максимальных оборотах (14000 об/мин), проходящий сквозь колонку раствор сливали. Далее для промывки ДНК на колонку наносили 500 мкл промывочного буфера PE, инкубировали в течение 3 минут, затем центрифугировали минуту, проходящий сквозь колонку раствор сливали. Промывку повторяли, во второй раз, но наносили уже 250 мкл буфера PE, фильтрат также сливали, образцы дополнительно центрифугировали еще минуту.

ДНК переносили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки следующим образом. В 1,5 мл пробирку помещалась колонка. На колонку наносились 50 мкл элюирующего буфера EB, чтобы элюировать ДНК с поверхности фильтра. Образец инкубировали 3 минуты, а затем центрифугировали в течение минуты.

2.5 Рестрикция укороченных вариантов гена *mluc7*

Рестрикцию укороченных вариантов гена *mluc7* проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции NdeI (NEB, 20 U/мкл) и XhoI (NEB, 20 U/мкл).

Рестрикционную смесь готовили следующим образом: к 50 мкл очищенной ДНК в пробирку добавляли деионизованную воду в объеме 6 мкл, затем добавляли буферы: 7 мкл NEB2x10 и 1,4 мкл BSAx50. Ферменты вносили в объеме 2 мкл NdeI и 4 мкл XhoI.

Рестрикционную смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 часов.

2.6 Препаративный ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле

Препаративный ДНК-электрофорез проводится для разделения фрагментов ДНК от компонентов рестрикционной смеси. Электрофорез проводится в 1% агарозном геле в буфере TAEх50 без добавления бромистого этидия. В геле делали одну лунку на всю длину геля. В лунку наносили 70 мкл рестрикционной смеси, предварительно смешанной с 40 мкл буфера и 10 мкл бромфенолового синего. Рабочее напряжение составляло 40 В.

2.7 Выделение ДНК из агарозного геля

После завершения электрофореза от геля по краям отрезали две полосы так, чтобы в них попали края лунки. Полосы помещали в буфер TAEх1 с добавлением 12,5 мкл бромистого этидия на 500 мл буфера и инкубировали 20 минут. Затем полосы подсвечивали ультрафиолетовым светом в системе AlfaImager HP System (Protein Simple, США) и вырезали те участки, которые светились под действием ультрафиолетового света. Полосы возвращали на место и по нанесенным вырезкам на них вырезали участок с ДНК уже из основной массы геля.

Из агарозного геля ДНК выделяли с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды) по протоколу следующим образом. Определили массу агарозного геля с помощью электронных весов и вносили двукратный объем буфера QG, который растворяет гель и связывает ДНК. Инкубировали пробирки с раствором до полного растворения агарозного геля, периодически встряхивая на Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США). Затем добавили четвертую часть изопропанола и хорошо перемешали. В несколько подходов перенесли весь объем в колонки с сорбционным фильтром, центрифугировали после каждого переноса нового объема раствора в течение минуты, фильтрат сливали. Добавили 500 мкл буфера QG, центрифугировали минуту, проходящий сквозь колонку раствор сливали, затем добавили 500 мкл промывочного буфера PE, инкубировали 3 минуты, центрифугировали в течение минуты, фильтрат сливали. Вносили 250 мкл буфера PE и повторяли процедуру. Дополнительно центрифугировали еще минуту, переносили колонки в чистые 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и вносили 30 мкл буфера EB. Инкубировали 5 минут, центрифугировали в течение минуты.

Проводили аналитический ДНК-электрофорез для оценки количества выделенной ДНК, образцы вносили в объеме 3 мкл, стандартные маркеры 100 bp DNA Ladder и 1 kb DNA Ladder (NEB, США) наносили в объеме 2 мкл.

2.8 Создание рекомбинантных ДНК на основе плазмидного вектора pET22b+

Для получения генетической конструкции с включенным в нее мутантом гена *mluc7* проводили лигирование плазмиды pET22b+ и исследуемого гена. Реакцию проводили следующим образом. В каждую ПЦР-пробирку вносили 14

мкл деионизованной воды, 2 мкл буфера T4-LigBufx10, 1 мкл плазмиды pET22b+(100 нг/мкл), подверженную действию рестриктаз NdeI и XhoI и имеющую сайты для встраивания фрагментов ДНК, и 0,5 мкл T4-ДНК-лигазы(2000 U/мкл). Затем в пробирки добавляли полученные укороченные варианты гена *mluc7* в объеме 6 мкл (2 нг/мкл) инкубировали строго при 16°C в амплификаторе в течении 12 часов. Инактивацию лигазы производили нагреванием лигазной смеси до 64°C и инкубированием при этой температуре в течение 10 минут. Полученная конструкция использовалась для трансформации *E.coli* штаммов BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL и XL1-Blue.

2.9 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 мМ KCl, 45 мМ MnCl₂·4H₂O, 10 мМ CaCl₂·2H₂O, 3 мМ [Co(NH₃)₆]Cl₃, 10 мМ K-MES, pH 6,2

2.10 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 мМ 2M MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, глюкоза 20 мМ.

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, 130мМ 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 убирали в термостат с температурой 37°C до появления отчетливо различимых клонов.

2.11 Выделение плазмидной ДНК щелочным лизисом на колонках QIAGEN

Далее было проведено полуаналитическое выделение плазмидной ДНК щелочным лизисом с последующей очисткой на колонках при использовании набора QIAprep Spin Miniprep Kit.

Клетки выращивали в 6 мл жидкой LB-среде, содержащей антибиотик, до оптической плотности $OD_{590} = 1.5$ при 37°C в течение ночи.

Клеточную суспензию центрифугировали при 8000 об/мин 2 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера P1 до однородной суспензии. Далее добавляли 500 мкл буфера 2 (lisis solution) и быстро перемешивали, после чего нейтрализовали 700 мкл буфера N3 (neutralization buffer). Центрифугировали 10 минут на максимальных оборотах.

Супернатант пропускали через колонку для очистки плазмидной ДНК. После этого производили 4 промывание сорбированной ДНК. Сначала вносили 500 мкл буфера PB. Инкубировали в течение 1 мин, центрифугировали 1 мин и удаляли супернатант. После первого промывания вносили 500 мкл буфера PE. Инкубировали на этот раз 3 мин, затем также центрифугировали и удаляли прошедшую через колонку жидкость. Далее снова вносили буфер PE, на этот раз 250 мкл. После 3-х минутной инкубации, центрифугировали 2 мин и удаляли супернатант. В четвертом промывании использовали 200 мкл 70% этанола. Центрифугировали в течение 3 мин и удаляли раствор.

Колонку с промытой ДНК поместили в чистую 1.5 мл пробирку и сушили 10 мин. Далее внесли в центр фильтра 80 мкл элюционного буфера с 1 мМ EB. Инкубировали 3 мин и центрифугировали 2 мин.

Количество выделенной ДНК оценивали по аналитическому ДНК-электрофорезу в 1% агарозном геле. Образцы вносились в объеме 1 мкл, стандартный маркер 1 kb DNA Ladder (NEB, США) в объеме 2 мкл.

2.12 Секвенирование укороченных вариантов гена *mluc7*

Для подтверждения структуры укороченных вариантов гена *mluc7*, кодирующих делеционные мутанты M_{Luc7}, образцы были секвенированы в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН, город Новосибирск.

2.13 Нарращивание M_{Luc7} и ее делеционных мутантов в клетках *E. coli* штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

Совершали посев контрольной и опытных колоний в 6 мкл жидкой LB-среды с содержанием ампицилина 200 нг/мл. Клетки инкубировали в шейкер-инкубаторе при температуре 37°C, качении 225 об/мин ночь.

В колбу с широким горлом вносили 20 мл LB-среды и 40 мкл ампициллина (конечная концентрация 200нг/мл), затем в колбу внесли 200 мкл ночной культуры микроорганизмов (разведение 1:100). Нарращивание клеточной культуры проводили в шейкер-инкубаторе при тех же параметрах до достижения оптической плотности $OD_{590}=1-1,3$. Инкубирование длилось около 2,5 часа.

Оптическую плотность измеряли во всех колбах на фотоколориметре против дистиллированной воды. В кювету вносили 2 мкл клеточной суспензии.

После достижения нужной оптической плотности в каждую колбу добавили по 20 мкл 1 мМ ИПТГ (изопропилтиогалактозид), инкубировали клетки в шейкер-инкубаторе при тех же параметрах еще час. Затем измеряли оптическую плотность клеточной суспензии.

После завершения инкубации из колб отбирали по 3 аликвоты:

1) 500 мкл в пробирку для белкового электрофореза. Центрифугировали 5000 об/мин в течение 2 мин и затем осушили садок. Добавили лизирующий буфер для ПААГх2 в объеме, в 100 раз превышающем показания оптической плотности после индукции ИПТГ.

2) 500 мкл в пробирку для определения растворимости. Центрифугировали 5000 об/мин в течение 2 мин и затем осушили садок. Добавить ОБ буфер (20мМ Трис-НСl рН 7.0, 2 мМ EDTA) в объеме в 100 раз превышающем показания оптической плотности после индукции.

3) 2 мл для определения биолюминесцентной активности в грубых лизатах. Центрифугировали 5000 об/мин в течение 2 мин, после чего осушили садок. Добавить стабилизирующий буфер в объеме также в 100 раз превышающем показания оптической плотности после индукции.

Лизирующий буфер для образцов белкового электрофореза состоит из 10% раствора SDS, 10 мМ раствора DDT, 20% раствора глицерина, 0,2 М раствора Tris-НСl рН 6,8, 5 мкл бромфенолового синего.

Стабилизирующий буфер для разведения белков для измерения их активности состоит из ML буфера с добавлением 0,02% NP-40

ML буфер для измерения биолюминесцентной активности белков. В состав буфера входят следующие компоненты: 50 мМ Tris-НСl рН 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄, 0.01% желатин

2.14 Разрушение клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus(DE3) – RIPL

Разрушение проводили на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (СССР). Программа была следующей: амплитуда обработки 22 кГц, время – 3-5 секунды, промежуточное охлаждение между озвучиванием– 15 секунд. Процедуру повторяли трижды, обработку ультразвуком производили во льду. Затем клетки центрифугировали при комнатной температуре на скорости 8000 об/мин в течение 5 минут для удаления нерастворимой клеточной фракции.

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

Белковый электрофорез применяли для оценки общего уровня синтеза белка клетками штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL до индукции ИПТГ и после индукции ИПТГ в целых клетках, клеточном осадке после озвучивания, супернатанте. Белки перед проведением электрофореза не подвергались очистке.

Состав белковых препаратов определяли с помощью белкового электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле по методу Лэммли. Сперва заливали гель-пробку между пластин, оставляли до полного застывания. Затем заливали разделяющий гель, сверху сразу заливали деионизованную воду, которую сливали после образования явного раздела фаз и застывания геля. Следом заливали концентрирующий гель, сразу вставляли гребенку. Гребенку вытаскивали через 15 минут, карманы 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 были следующими: целые клетки до индукции в объеме 6 мкл; целые клетки, не подверженные озвучиванию в объеме 6 мкл; супернатант (грубый лизат) после озвучивания в объеме 12 мкл; клеточный осадок после озвучивания в объеме 6 мкл. Все образцы кипятили 3 минуты.

Гель устанавливали в прибор The 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 9% 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:

1. Гель-пробка: 500 мкл акриламида, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA.
2. Разделяющий гель (12,5%): 769 мкл деионизированной воды, 1407 мкл раствора В (Tris-HCL, 1 М, рН 9.0), 1500 мкл акриламида, 37,5 мкл SDS, 7,5 мкл TEMED, 15 мкл PSA.
3. Концентрирующий гель: 500 мкл деионизованной воды, 250 мкл раствора С (Tris-HCL, 0,5 М, рН 6.8), 150 мкл акриламида, 20 мкл SDS, 5 мкл TEMED, 10 мкл PSA
- 4.

2.16 Измерение биолюминесцентной активности грубых лизатов

В кюветы для измерения биолюминесцентной активности вносили по 500 мкл ML-буфера и помещали их в термошейкер ThermoMixer C (Eppendorf, Германия) для поддержания необходимой температуры буфера. Измерения биолюминесцентной активности проводили с использованием люминометра БЛМ-003 (СКБ Наука, Красноярск) при температурах 5°C, 15°C и 23°C. В кювету вносили 5 мкл образца. Для запуска биолюминесцентной реакции в кювету впрыскивалось 5 мкл раствора 1 мкМ целентеразина. За биолюминесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум двух параллельных измерений. Данные заносили в таблицу и строили график.

Глава 3. Результаты

3.1 Создание укороченных вариантов гена *MLuc7*.

Для определения минимального каталитического домена люциферазы *Metridia longa* была использована изоформа *MLuc7*, обладающая минимальными размерами. Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН были уже получены укороченные на 4, 8 и 12 аминокислот с С-конца мутанты *MLuc7* люциферазы, но не потерявшие каталитической активности. Для дальнейшей локализации С-конца каталитического домена необходимо было получить новые делеционные мутанты *MLuc7* с большими делениями С-конца белка. Для этого были синтезированы варианты гена *mluc7*, укороченные с 3'-конца. Необходимые фрагменты ДНК были получены с использованием набора QCSDM (QuikChange Site-Directed Mutagenesis) и экспрессионной плазмиды pET22-*MLuc7*-WT в качестве матрицы. В настоящей работе были получены гены, кодирующие укороченные на 14, 16, 18 и 20 аминокислотных остатков люциферазы *MLuc7*-C14, *MLuc7*-C16, *MLuc7*-C18 и *MLuc7*-C20 соответственно. Далее делеционные мутанты были охарактеризованы в сравнении с диким типом и другим укороченным мутантом *MLuc7*-C12, короче исходной люциферазы на 12 аминокислот, который был получен в лаборатории ранее [34].

Количество и размер синтезированных мутантных плазмидных ДНК мутагенеза оценивали по электрофорезу в 1% агарозном геле (рисунок 3). Образец вносился в объеме 5 мкл, стандартный маркер молекулярного веса – в объеме 1 мкл. Ниже приведены электрофореграммы полученных в ультрафиолетовом свете синтезированных генов *MLuc7*-C14, *MLuc7*-C16 и *MLuc7*-C18.

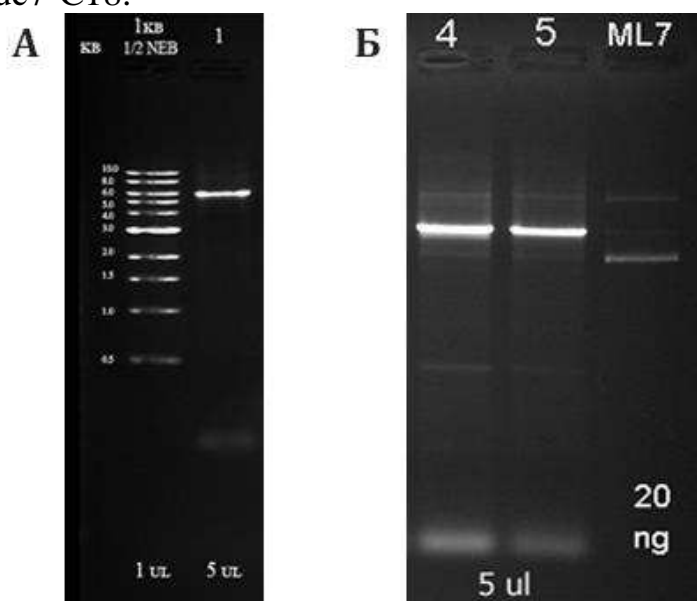


Рисунок 3 – Электрофореграммы синтезированных укороченных вариантов гена *mluc7*. Изображение а: 1 – ген *MLuc7*-C16. Сравнивался с 1 мкл

1kb маркером молекулярного веса NEB. Изображение б: 4 – ген MLuc7-C14; 1 – ген MLuc7-C18; ML7 – плазида p22-ML7 MLuc7.

Полученные гены MLuc7-C14, MLuc7-C16, MLuc7-C18 трансформировали в клетки *E.coli* штамм XL1-Blue методом heat-shock для клонирования плазмид перед секвенированием. Трансформированные клетки высевались на чашки Петри с плотной питательной средой LB и инкубировались при температуре 37 °C до появления отчетливо различимых колоний. В чашку со средой также добавляли ампициллин. Так как введенные плазмиды помимо гена MLuc7 содержали селективный маркер, а именно ген устойчивости к ампициллину, то только трансформированные клетки могли дать начало колониям. Плазмидная ДНК из некоторых была выделена посредством щелочного лизиса на колонках QIAGEN.

Ген MLuc7-C20, являющийся укороченным с С-конца на 20 аминокислотных остатков вариантом гена *mluc7*, был получен методом PCR-синтез укороченного фрагмента с использованием специфических праймеров. Матрицей служил оригинальный ген *mluc7*. Результат реакции оценивали с помощью аналитического гель-электрофореза в 1% агарозном геле (рис. 4а). Далее производили очистку ПЦР-реакции на колонке QIAGEN-PCR. После образец подвергли рестрикции с использованием рестриктаз NdeI (NEB) и XhoI (NEB). Для отделения полученного гена от различных примесей проводили препаративный ДНК-электрофорез в 1% агарозном геле. Из агарозного геля ДНК выделяли с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды). После этого снова проводили аналитический гель-электрофорез для оценки количества ДНК и качества ее выделения (рис. 4б).

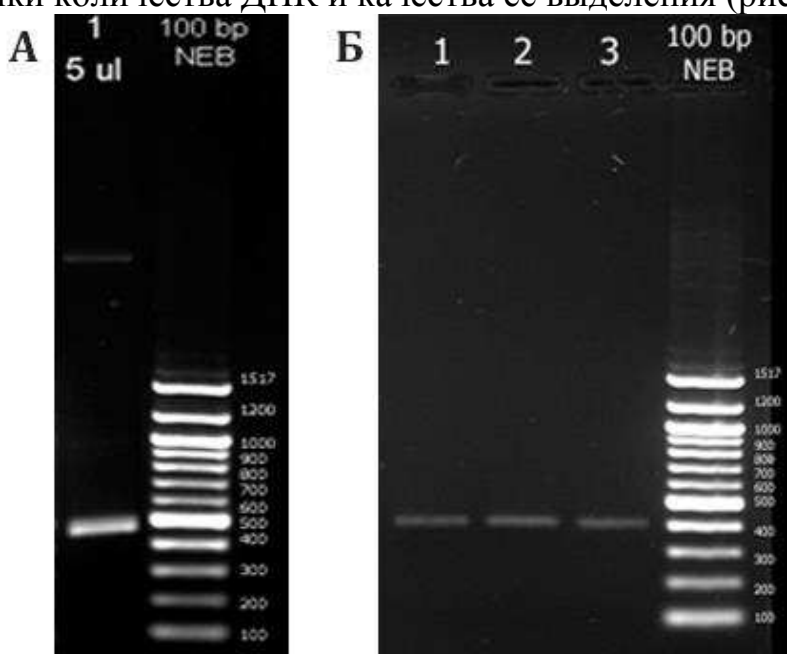


Рисунок 4 – Электрофореграммы синтезированного гена MLuc7-C20.Изображение а: после ПЦР-синтеза. Под цифрой 1 – исследуемый ген. Сравнивался с 1 мкл 100kb маркером молекулярного веса NEB. Изображение б: после очистки от агарозного геля. 1, 2 и 3 – непосредственно выделенная ДНК. Сравнивался с 1 мкл 100kb маркером молекулярного веса NEB.

Далее очищенные фрагменты ДНК укороченных вариантов были лигированы с вектором pET22b+ (NdeI, XhoI), который несет в себе ген устойчивости к антибиотику ампициллину, а также имеет в своем составе лактозный оперон и две точки начала репликации – *ori* и *fl origin*. Полученная генетическая конструкция была использована для трансформации клеток *E. coli* штамма XL1-Blue методом heat-shock. Культура высевалась на чашки Петри с плотной питательной средой LB и ампициллином, инкубировалась при температуре 37°C. Впоследствии ДНК была выделена из 6-ти колоний посредством щелочного лизиса на колонках QIAGEN. Часть полученных образцов подверглась рестрикции ферментами NdeI и XhoI для оценки успешности сборки вектора (рис. 5) Дальнейшему изучению подверглись только ДНК выделенные из колоний 1 и 6.

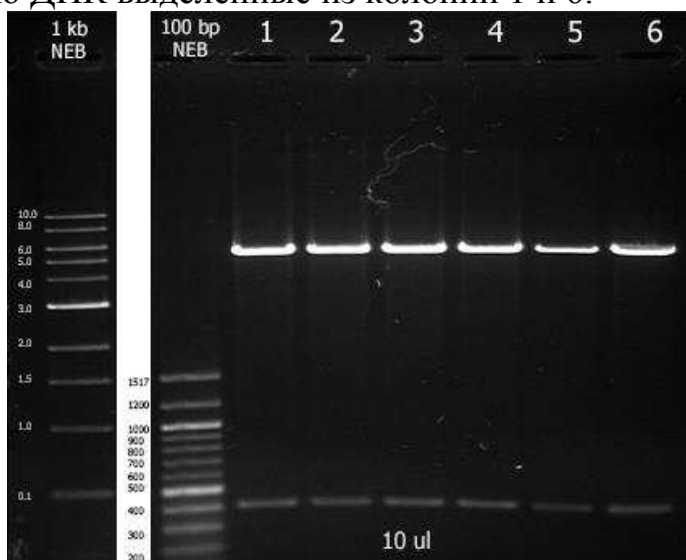


Рисунок 5 – Электрофореграмма, полученная после рестрикции по сайтам клонирования генетической конструкции из плазмиды pET22b+ и гена MLuc7-C20. На рисунке отчетливо видно 2 фрагмента: плазида и исследуемый ген.

Все полученные генетические конструкции, содержащие гены MLuc7-C14, MLuc7-C16, MLuc7-C18 и MLuc7-C20 были отправлены на секвенирование для подтверждения нуклеотидной структуры каждого гена. Предварительно оценивалось качество выделения посредством проведения электрофореза в 1% агарозном геле (рисунок 6). Образцы брали в объеме 2 мкл. Важно отметить, что для исследования гена MLuc7-C16 были отобраны ДНК из 2-х колоний, в дальнейшем C16-1 и C16-2 (рисунок 6а). Также изучались 2 образца гена MLuc7-C20: C20-1 и C20-6 (рисунок 6в). Концентрация ДНК была определена визуально, исходя из сравнения с известным количеством ДНК в каждой полосе ДНК-маркера.

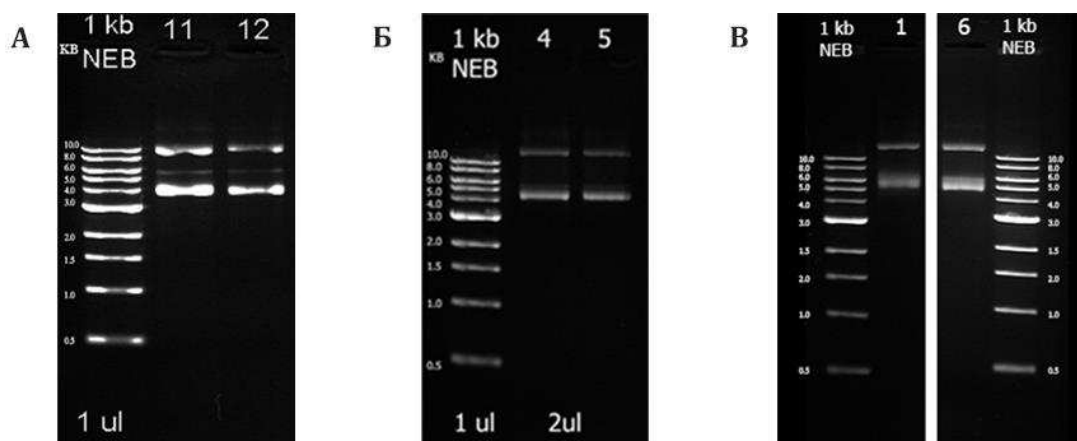


Рисунок 6 – Электрофореграммы выделенных плазмид, содержащие гены *mluc7*. а) 11 и 12 – гены MLuc7-C16, выделенные из двух разных колоний. б) 4 и 5 – гены MLuc7-C14 и MLuc7-C18, соответственно. в) 1и 6 – гены MLuc7-C20, выделенные из колоний под номером 1 и 6. Все образцы сравнивались с 1 мкл 1kb маркером молекулярного веса NEB.

Секвенирование проводилось в Новосибирск, в Центр коллективного пользования «Геномика». Структура каждого гена подтверждена секвенированием. Полученные хроматограммы были откорректированы визуально с помощью программы Chromas 2.5.1 для выяснения спорных прочтений (рисунок 7). Нуклеотидные последовательности выделенных ДНК С-16 1 и С-16-2, как и ожидалось, совпадают, и в дальнейшем будут рассматриваться как один образец С16. Образцы С20-1 и С20-6, напротив, отличаются. Так в образце С20-6 обнаружилась праймерная мутация, приведшая к замене консервативного цистеина на аланин в экспрессируемом белке. Аминокислотная последовательность С-конца полученных мутантов представлена на рисунке 8.

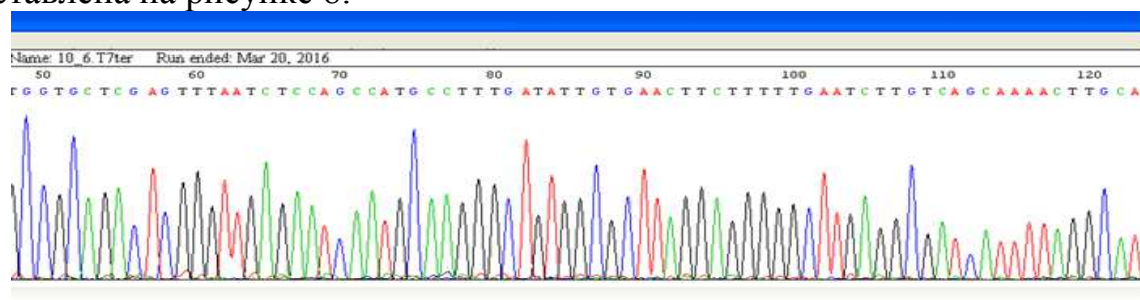


Рисунок 7 – пример анализа хроматограммы в программе Chromas 2.5.1.

MLuc7 WT	142	---KWL PDR CAS FAD KIQ KEAH NIK GLAGD
MLuc7 C12	142	---KWL PDR CAS FAD KIQ K
MLuc7 C14	142	---KWL PDR CAS FAD KI
MLuc7 C16	142	---KWL PDR CAS FAD
MLuc7 C18	142	---KWL PDR CAS F
MLuc7 C20 (1)	142	---KWL PDR CA
MLuc7 C20 (6)	142	---KWL PDR AA

Рисунок 8 – аминокислотная последовательность С-конца мутантов люциферазы MLuc7. Цифры обозначают номер аминокислоты, с которой начинаются данные фрагменты на представленном изображении. Желтым

цветом отмечен консервативный мотив. Зеленым цветом отмечено положение высококонсервативного цистеина, а голубым – замена его на аланин.

3.2 Характеризация экспрессии мутантных люцифераз.

Для получения результатов с высокой достоверностью, одновременно анализировали 2 одинаковых клона. Дальнейшим этапом работы была оценка уровня синтеза укороченных рекомбинантных люцифераз в клетках *E.coli* и их растворимости. Уровень синтеза укороченных белков ΔML7, а также распределение белка по растворимой и нерастворимой клеточным фракциям оценивали с помощью электрофореза в 12% ПААГ. Для этого клетки *E. coli* штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, экспрессирующего штамма, трансформировали плазмидами, содержащими укороченные и исходный варианты гена MLuc7 (MLuc7-C12, MLuc7-C14, MLuc7-C16, MLuc7-C18 MLuc7-C20 (1), MLuc7-C20 (6) и MLuc7-WT) согласно протоколу. Также были использованы плазмиды укороченных с N-конца вариантов гена MLuc7. А именно MLuc7-41I укороченный на 41 аминокислоту, 37L – на 37 аминокислот, 32G – на 33 аминокислоты и 28G - на 28 аминокислоты (рисунок 9). Это проводилось для подтверждения полученных в лаборатории ранее данных о биолюминисцентной активности [34].



Рисунок 9 – аминокислотная последовательность N-конца мутантов люциферазы MLuc7. Голубым цветом показан сигнальный пептид.

Все трансформированные клетки высевали на плотные питательные среды LB с добавлением ампициллина. Полученную бактериальную биомассу наращивали в шейкер-инкубаторе до определенных значений оптической плотности. Затем в среду добавляли 1мМ индуктора – ИПТГ (изопропилтиогалактозид), который запускал экспрессию генов, кодирующих укороченные люциферазы. Результаты измерений оптической плотности до индукции и через час после представлены в таблице 3. Измерения оптической плотности (OD) производились при $\lambda=500$.

Таблица 3 – Результаты измерений оптической плотности образцов, содержащих мутанты люциферазы MLuc7, до индукции ИПТГ и через час после нее.

	C20 (1)	C20 (6)	C18	C16	C14	C12	WT	41I	37L	32G	28G
OD до индукции	10	11	14	12	12	11	12	11	12	12	11
OD после индукции	14	14	17	16	16	15	17	15	15	16	14

Общий уровень синтеза люцифераз бактериями *E. coli* штамма BL21-codonPlus(DE3)-RIPL оценивали по белковому электрофорезу в полиакриламидном геле. В качестве положительного контроля выступал исходный тип – MLuc7-WT. А в качестве отрицательного – суспензия клеток, содержащих плазмиду p22-ML164, отобранную до индукции ИПТГ и биомасса нетрансформированных клеток. Чтобы исследовать отдельные клеточные фракции на присутствие делеционных вариантов MLuc7, для электрофореза использовали несколько образцов клеток: целые клетки, клеточный осадок после озвучивания и центрифугирования и супернатант после озвучивания клеточной суспензии (рисунок 10 и 11).

Было показано, что синтез необходимого белка происходит только после индукции клеток ИПТГ. После индукции уровень клеточной плотности возрастал незначительно, что говорит о том, что клетки практически переставали расти и делиться, и переключались на синтез белка. Также возможно, что синтезируемые люциферазы имеют некоторую токсичность для клеток *E. coli*. Как можно видеть из рис. 10 и 11 уровень синтеза укороченных вариантов был сопоставим с уровнем синтеза люциферазы дикого типа. Также совпадало их распределение по растворимой и нерастворимой частями клеточных белков. Одинаковый уровень синтеза и растворимости при синтезе полученных делеционных мутантов и люциферазы дикого типа позволяет сравнивать между собой полученных мутантов по активности в грубых клеточных лизатах клеток *E. coli* и предполагать аналогичные результаты на очищенных белках. Все исследуемые белки большей частью находятся в нерастворимой фракции (тельца включения), так как в грубом клеточном лизате явных следов люцифераз не обнаружено.

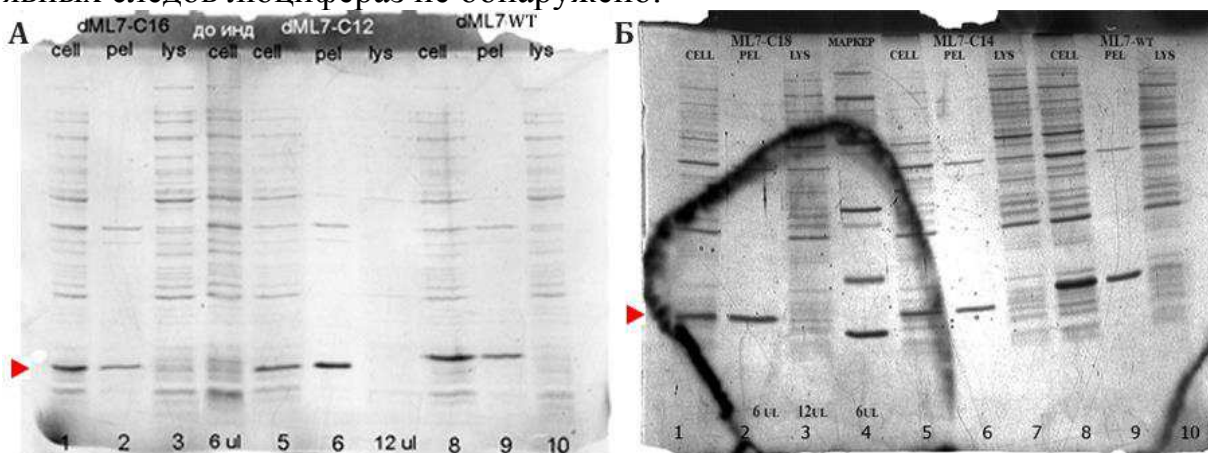


Рисунок 10 – Электрофореграмма белков MLuc7, выделенных из клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. На рисунках последовательно показаны образцы белка в целых клетках после индукции ИПТГ (cell), в клеточном осадке после озвучивания клеток и центрифугирования (pel) и супернатанте после озвучивания клеток и центрифугирования под цифрами (lys). На изображении а) 1, 2, 3 – MLuc7-C16; 4 – отрицательный контроль, MLuc164 в целых клетках до индукции; под цифрами 5, 6, 7 – MLuc7-C12; под цифрами 8, 9, 10 – MLuc7-WT. На рисунке б) представлены образцы MLuc7-C18 (1,2,3); образцы MLuc7-C14 (5,6,7); образцы MLuc7-WT (7,8,9). Под 4

представлен маркер молекулярного веса (NEB) в объеме 6 мкл. Клеточный лизат брали в объеме 12 мкл, остальные образцы по 6 мкл. Стрелкой обозначены фракции люцифераз. Все укороченные белки большей частью находятся в тельцах включения, так как в лизате следов исследуемых белков не обнаружено.

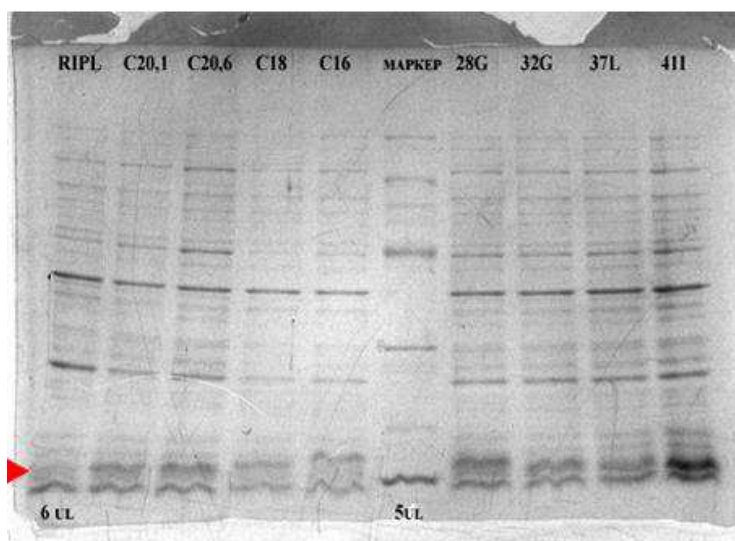


Рисунок 11 – Электрофореграмма белков MLuc7, выделенных из клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. На электрофореграмме последовательно представлены образцы белка в целых клетках после индукции ИПТГ: клетки *E. coli* штамма BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, в качестве отрицательного контроля; MLuc7-C20 (1); MLuc7-C20 (6); MLuc7-C18; MLuc7-C16; маркер молекулярного веса (NEB); MLuc7-28G; MLuc7-32G; MLuc7-37L и MLuc7-41I. Стрелкой отмечены фракции люцифераз. Как и ожидалось, отрицательный контроль не содержит этой фракции.

3.3 Сравнение активности мутантных люцифераз

Биолюминесцентную активность определяли для всех полученных делеционных вариантов MLuc7 и сравнивалась с активностью исходной люциферазы MLuc7-WT, которая выступала в роли положительного контроля, и биомассой клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, в качестве отрицательного контроля. Биолюминесцентная активность биомассы клеток, не содержащих люциферазу, находится на уровне шума. В качестве образцов использовали грубые клеточные лизаты. При сравнении люцифераз предполагали одинаковую растворимость сравниваемых белков, исходя из анализа уровней экспрессии по клеточным фракциям. Измерения проводились при температурах 5, 15 и 23°C поскольку мутации могли привести к нарушениям с структуре люцифераз и изменениям в температурном оптимуме биолюминесцентной реакции. Результаты измерения представлены на графиках 12 и 13.

Список сокращений

bp – пара нуклеотидных оснований
dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат
GFP – зеленый флуоресцентный белок
GLuc (GpLuc) – люцифераза копеподы *Gaussia princeps*
kb – тысяча пар нуклеотидных оснований
MLuc – люцифераза копеподы *Metridia longa*
OD – оптическая плотность
U/мкл – концентрация, единицы вещества в микролитре
В – вольт.
г – грамм.
ИПТГ – изопропилтиогалактозид
кГц – килогерц, 1000 Герц
кДа – килодальтон, 1000 а.е.м
кДНК – ДНК, комплементарная матричной РНК
М – концентрация, моль/литр
миРНК – малая интерферирующая РНК
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
ПЦР – полимеразная цепная реакция

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. – № 2. – С.443-493
- 2 Физика и химия биоллюминесценции: 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 Буракова, Л. П. Светочувствительный фотопротейн беровин ктенофор *Beroe abyssicola*: клонирование и свойства рекомбинантного белка: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.02 / Буракова Людмила Петровна. – Красноярск, 2017. - 142 с.
- 5 O Shimomura, Bioluminescence in the sea: photoprotein systems, Symposia of the Society for Experimental Biology, 39:351-72, 1985
- 6 Высоцкий Е. С., Маркова С. В., Франк Л. А. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечноротовых / Молекулярная биология, 2006, том 40, №3, с. 404-417.
- 7 Chalfie, M Green fluorescent protein Department of Biological Sciences, 1012 Fairchild, Columbia University, New York, 1995
- 8 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. – С. 1-13.
- 9 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. - № 5. – С. 3212-3217.
- 10 Tzertzinis G, Schildkraut E, Schildkraut I (2012) Substrate Cooperativity in Marine Luciferases. PLoS ONE 7(6): e40099.
- 11 Razouls C.; de Bovee F.; Kouwenberg J.; Desreumaux N. "Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods" //. Sorbonne Universite, 2018.
- 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. – №74. – С. 4378-4385.
- 13 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. – №93. – С. 503-510.
- 14 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. – №7. – С. 1025-1031.]

-
- 15 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.
- 16 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. – C. 77-82.
- 17 Larionova, Marina & Markova, Svetlana & Vysotski, Eugene. Bioluminescent and structural features of native folded Gaussia luciferase. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2018.
- 18 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. – № 175. – C. 51-57.
- 19 Kim, Jung Eun, Senthilkumar Kalimuthu, and Byeong-Cheol Ahn. “In Vivo Cell Tracking with Bioluminescence Imaging.” Nuclear Medicine and Molecular Imaging 49.1 (2015): 3–10.
- 20 Badr, Christian E., and Bakhos A. Tannous. “BIOLUMINESCENCE IMAGING: PROGRESS AND APPLICATIONS.” Trends in biotechnology 29.12 (2011): 624–633.
- 21 Saito, K., & Nagai, T.. Recent progress in luminescent proteins development. Current Opinion in Chemical Biology, (2015), 27, 46–51.
- 22 Gorokhovatsky A.Y., Rudenko N.V., Marchenkov V.V., Skosyrev V.S., Arzhanov M.A., Burkhardt N., Zakharov M.V., Semisotnov G.V., Vinokurov L.M., Alakhov Y.B. 2003. Homogeneous assay for biotin based on Aequoreavictoriabioluminescence resonance energy transfer system. Anal. Biochem. 313, 68–75.
- 23 Adamczyk M., Moore J.A., Shreder K.. Quenching of biotinylated aequorin bioluminescence by dyelabeled avidin conjugates: application to homogeneous bioluminescence resonance energy transfer assays. Organic Lett 2001, 3, 1797–1800.
- 24 Subramaniam D, et al. Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008; 294:G1025–G1032.
- 25 Ray P, et al. Noninvasive quantitative imaging of protein-protein interactions in living subjects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99:3105–3110.
- 26 Ozawa T, Umezawa Y. Detection of protein-protein interactions in vivo based on protein splicing. Curr Opin Chem Biol. 2001; 5: 578–583.
- 27 Contag CH, et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. Mol Microbiol. 1995;18:593–603
- 28 Д.В Смирнова, М.Ю. Рубцова, Н.Н. Угарова Билюминесцентная специфическая детекция микроорганизмов с использованием гибридного белка стрептавидин-люцифераза, Биоорганическая, биофизическая и медицинская химия 2016, с 137-141

-
- 29 M.I. Koksharov, D.V. Smirnova, S.G. Abbasova, N.N. Ugarova, A fusion protein of *Luciola mingrelica* luciferase with a biotin-binding domain: Production, properties, and application, Vestnik Moskovskogo Universiteta. Khimiya, 2011, No. 4, pp. 291–297.
- 30 Huang, P.-C., Chen, C.-Y., Yang, F.-Y., & Au, L.-C. A Multisampling Reporter System for Monitoring MicroRNA Activity in the Same Population of Cells. // Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, 1–5.
- 31 Lee, H.-C., Chen, C.-Y., & Au, L.-C. Systemic comparison of repression activity for miRNA and siRNA associated with different types of target sequences. // Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011 – 411(2), 393–396.
- 32 Ramakrishnan Gopalakrishnan, Hittu Matta and ather A novel luciferase-based assay for the detection of Chimeric Antigen Receptors Scientific Reports 9, Article number: 1957, 2019.
- 33 Hittu Matta, Ramakrishnan Gopalakrishnan, Sunju Choi and ather Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay Scientific Reports 8, Article number: 199, 2018.
- 34 Бадиева, Т.В. Локализация последовательности с каталитической активностью у люциферазы *Metridia longa*: магистерская диссертация: 06.04.01 – Красноярск, 2018. – 62с.


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
заведующий кафедрой


подпись


инициалы, фамилия

« 5 » июля 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Локализация С-концевой последовательности, критичной для
активности люциферазы *Metridia longa*

Руководитель


подпись, дата

с.н.с., канд. биол. наук
должность, ученая степень

С. В. Маркова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

И. А. Коротов
инициалы, фамилия

Красноярск 2019