

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Оптимизация состава многокомпонентного иммобилизованного реагента» содержит 51 страницу текстового документа, 11 иллюстраций, 1 таблицу, 53 литературных источника.

ЛЮЦИФЕРАЗА, NAD(P)H:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, БИФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА NAD(P)H:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА И ЛЮЦИФЕРАЗА, ИММОБИЛИЗАЦИЯ, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.

Цель работы: установить оптимальный состав многокомпонентного иммобилизованного реагента для достижения его высокой чувствительности к действию токсических веществ разных классов и стабильности при длительном хранении и использовании.

Актуальность данного исследования заключается в том, что такой биологический метод экотоксикологического анализа, как биотест на основе многокомпонентного иммобилизованного реагента на основе биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза является эффективным и экспрессным для определения токсичности анализируемых сред. Однако данный реагент имеет короткий срок хранения, что ограничивает его применение.

Итогом данного исследования стал подобранный оптимизированный состав многокомпонентного иммобилизованного реагента на основе биолюминесцентной ферментативной системы светящихся бактерий, содержащий 0,12 мкг люциферазы и 0,8 mU NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, 0,09 mM NADH и 0,0003% миристинового альдегида, отличающийся длительным сроком хранения при высокой чувствительности к токсическим веществам.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|--|
| РЕФЕРАТ | 2 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 7 |
| 1. Ферментативные биотесты и способы конструирования ферментативных реагентов | 7 |
| 1.1. Использование ферментов в методах биодиагностики | 7 |
| 1.2. Биолюминесцентные ферментативные тесты | 11 |
| 1.3. Стабилизация ферментов | 14 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 20 |
| 2.1. Реактивы и приборы | 20 |
| 2.2. Метод получения многокомпонентного иммобилизованного реагента | 21 |
| 2.3. Методика измерения активности многокомпонентного иммобилизованного реагента | 22 |
| 2.4. Исследование чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента к действию токсикантов..... | 22 |
| 2.5. Статистическая обработка результатов экспериментов | 23 |
| 3.1. Оценка активности многокомпонентного реагента в зависимости от состава дисков и режима высушивания..... | Ошибка! Закладка не определена. |
| 3.1.1. Оценка активности многокомпонентного реагента в зависимости от количества ферментов в дисках и режима высушивания .. | Ошибка! Закладка не определена. |
| 3.1.2. Оценка активности многокомпонентного реагента в зависимости от концентрации NADH | Ошибка! Закладка не определена. |
| 3.1.3. Оценка активности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от концентрации тетрадеканала | Ошибка! Закладка не определена. |
| 3.2. Оценка чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от состава дисков ... | Ошибка! Закладка не определена. |
| 3.2.1. Оценка чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от количества фермента | Ошибка! Закладка не определена. |

3.2.2. Оценка чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от концентрации NADH**Ошибка! Закладка не определена.**

3.2.3. Оценка чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от концентрации тетрадеканала ..**Ошибка! Закладка не определена.**

3.3. Анализ кинетических характеристик многокомпонентного иммобилизованного реагента **Ошибка! Закладка не определена.**

3.4. Определение активности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от времени хранения.....**Ошибка! Закладка не определена.**

3.5. Оценка активности многокомпонентного иммобилизованного реагента в зависимости от количества FMN в реакционной смеси**Ошибка! Закладка не определена.**

3.6. Оценка вариабельности многокомпонентных иммобилизованных реагентов внутри партии в зависимости от состава диска **Ошибка! Закладка не определена.**

| | |
|--|----|
| ВЫВОДЫ..... | 25 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 26 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 27 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 28 |

ВВЕДЕНИЕ

Экологическое состояние Земли испытывает огромный ущерб вследствие антропогенного и техногенного факторов загрязнения. Количество видов токсических веществ ежегодно возрастает и, как следствие, губительно отражается на различных видах организмов и экологической обстановке в целом. Поэтому одной из важнейших задач последних десятилетий является мониторинг загрязнения окружающей среды. Традиционно для мониторинга загрязнения окружающей среды применяются химические методы, однако данные методы не могут оценить токсическое влияние на объекты живой природы. Поэтому для предупреждения загрязнения и предотвращения его последствий мировое научное сообщество развивает различные биологические методы тестирования токсичных веществ, но они довольно длительны и затратны.

Актуальным остаётся поиск быстрых методов оценки состояния окружающей среды. Таким методом является анализ токсичности образцов на основе билюминесцентной биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза (R + L), катализирующей последовательность реакций, в которых энергия химических связей трансформируется в световую. Для более широкого применения ферментов светящихся бактерий в методах экологического биотестирования (оценки качества воды, воздуха и почвы) необходимо получение на их основе стабильных реагентов, при сохранении чувствительности к действию токсических веществ на уровне ПДК.

На данный момент известно несколько способов стабилизации ферментов, из которых наиболее оптимальным является их иммобилизация. Несомненно, иммобилизация ферментов позволяет получать стабильные при хранении и использовании реагенты, удобные для проведения билюминесцентного анализа. Разработаны коммерческие препараты, представляющие собой биферментную систему R + L, иммобилизованную совместно с субстратами в крахмальный гель, но их чувствительность к

действию разным классам токсических веществ значительно ниже в сравнении с растворимыми ферментами. Ещё одной нерешённой проблемой является проблема сохранения активности реагента при хранении.

Цель работы состояла в оптимизации состава многокомпонентного иммобилизованного реагента для достижения его высокой чувствительности к действию токсических веществ и стабильности при длительном хранении и использовании.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить характеристики многокомпонентных иммобилизованных реагентов, различающихся по содержанию ферментов и субстратов.
2. Провести анализ чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента к токсикантам в зависимости от его состава.
3. Оценить стабильность многокомпонентных иммобилизованных реагентов, различающихся по составу, при хранении и использовании.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ферментативные биотесты и способы конструирования ферментативных реагентов

1.1. Использование ферментов в методах биодиагностики

Ферменты – соединения белковой природы, которые катализируют реакции организма. Ферменты высокоактивны, а также чувствительны к воздействию токсических веществ разных классов, что послужило основанием для их использования в качестве биомаркеров при биодиагностике [1]. Благодаря методу биоиндикации имеется возможность оперативно оценить токсичность анализируемых сред не только по таким характеристикам организма как выживаемость, размножение, рост и др. на живые организмы в условиях реального пребывания, но и по активности ферментов живых организмов [2]. Так, по уровню каталазы и глутатион-S-трансферазы в жабрах, печени и почках карася установили высокий уровень окислительного стресса, который был вызван загрязнителями в сточных водах Кореи [3]. Одним из применений ферментов стало активное использование их в биодиагностике различных сред. Так для оценки влияния антибиотиков на почву и их токсичность для культурных растений исследовали почвогрунт по семенам *Raphanus sativus* и *Triticum aestivum*. Установлено, что исследованные антибиотики подавляют активность ферментов растений и наиболее опасны для фермента целлюлазы [4].

К сожалению, данный метод биодиагностики имеет свои недостатки. Самым главным недостатком является вариабельность измеряемых параметров у исследуемого объекта. Наряду с этим ограничено количество ферментов, определяемых при помощи биомаркирования. Однако, точность и воспроизводимость современных биологических тестов, основанных на изменении активности ферментов живых организмов под влиянием токсических соединений окружающей среды, невысока, что делает их ненадёжными для экспрессной оценки загрязнения. Данные различия

выступают результатом различий самих организмов, различий в получении и хранении тест-организмов. Наряду с этим, использование живых организмов как тест-объектов обеспечивает длительный и труднореализуемый процесс в связи с необходимостью обеспечивать постоянство характеристик для культивирования культур микроорганизмов и многоклеточных тест-организмов.

Решить данные проблемы помогает метод биотестирования. Под биотестированием понимают недорогие и быстрые методы обнаружения и определения вещества на культивируемых в лаборатории организмах, не требующие длительных и сложных приёмов пробоподготовки в стандартизированных условиях. За его основу взята методология скрининга, используемая для оценки анализируемого компонента большого числа исследуемых проб [5]. Результаты таких тестов исключают ошибки при отрицательных тестах, но могут иметь ошибочные положительные результаты, которые отправляют на детальное изучение. Благодаря такому методу удаётся значительно сократить количество образцов, анализируемых впоследствии химическими методами.

В ферментативном биотестировании используют выделенные ферменты и ферментные системы [6]. Они, благодаря своим преимуществам перед классическими биотестами, широко и успешно используются в различных отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве, химическом и биологическом анализе. Принцип применения ферментов в качестве тест-объектов при биотестировании основан на ускорении или замедлении скорости биохимических реакций при изменении внутренней среды организма. После проведения биологического тестирования, результаты анализируют на основании таких показателей, как активация или ингибирование ферментативных процессов при добавлении анализируемого вещества.

Принцип активации ферментов используют для обнаружения тех токсикантов, которые одновременно являются субстратами данного фермента. Большая часть ферментативных тестов основана на принципе ингибирования

активности ферментов токсическими веществами, при этом уменьшение активности фермента пропорционально токсическому эффекту [7]. Определяют эффект ингибирования отношением активности фермента в отсутствие и присутствии токсического вещества, рассчитывая константу ингибирования (K_i), а также IC_{20} и IC_{50} , представляющие собой концентрации токсиканта, ингибирующие активность фермента на 20 и 50 процентов соответственно [8, 9].

В ферментных биотестах, как правило, в качестве тест-объектов используют основные или лимитирующие ферменты [10]. Известно, что при усилении действия ацетилхолина, в частности накоплении его в организме, ингибируется ключевой фермент, разрушающий ацетилхолин в организме, – ацетилхолинэстераза. Этот фермент широко используется для направленного поиска лекарственных препаратов широкого спектра действия, в том числе для лечения болезни Альцгеймера [11]. Для исследования токсичности тяжёлых металлов разработан биотест на основе щелочной фосфатазы *Chlamydomonas reinhardtii* [12]. Другим примером является разработка избирательной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы, которая определяет противомикробную и антиоксидантную активность биологически активных веществ, а также биотест на основе NAD(P)H-оксидазы для выявления веществ с иммуномодулирующей активностью [13]. В работе Бабича и др. было проведено исследование токсичности ферментного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы при лечении фенилкетонурии [14]. О применении ферментов в иммуноферментных и биосенсорных методах, позволяющих определять содержания лекарственных препаратов, применяемых в ветеринарии, в составе кормовых добавок подробно написано в работе Попова П. А и др. [15]. Был выявлен потенциал применения эффекта ингибирования α -амилазы гидролизатами белков сушёных морских водорослей [16].

Широкое применение ферменты получили в качестве биологического селективного элемента в биосенсорах. Биосенсоры – это устройства, включающие биологически активный элемент и использующие биохимические

реакции с целью обнаружения концентрации или активности вещества в исследуемом образце и преобразовывающие результат в удобный сигнал. Биосенсорные системы, созданные на основе применения ферментов, культур растительных и животных клеток, позволяют эффективно и быстро выявлять в изучаемых пробах биологическую активность или отклик на действие исследуемого объекта. Так по отклонениям физико-химических показателей оптимального действия ферментов определяют токсичное воздействие на исследуемую среду. [17].

История развития ферментных биосенсоров началась в 1960-х годах благодаря открытию Кларка и Лайонса [17]. Был создан прибор, определяющий содержание кислорода в биологических тканях. С каждым годом количество тест-систем многократно увеличивается и к настоящему времени точное количество ферментных биотестов уже трудно подсчитать.

Существует множество примеров применения ферментативных биосенсоров в пищевой промышленности, в том числе биосенсор на основе лактатоксидазы для мониторинга L-молочной кислоты. Фермент в данной биотест-системе размещается между слоями хитозана, нанесёнными на многослойные углеродные нанотрубки [18]. Для непрерывной оценки количества алкоголя разработали минимально инвазивную матрицу датчиков с микроиглами, которую можно прикрепить к кончику пальца [19]. Также известен биосенсор на основе фермента пеницилазы, который продуцируется бактериями, устойчивыми к β -лактамным антибиотикам для их обнаружения в молочной продукции [20].

Активно применяются биосенсоры и в экологическом мониторинге. Примером может служить биосенсор на основе лакказы для определения содержания фенольных соединений в сточных водах [21]. Так, для обнаружения афлотоксина, используют новый ферментативный биосенсор, основанный на ингибировании ацетилхолинэстеразы [22].

Таким образом, приведённые выше исследования подтверждают, что тесты на основе выделенных ферментов позволяют получить результаты с

высокой воспроизводимостью и быстрым откликом на наличие широкого круга анализируемых веществ в исследуемом образце. Также немаловажным является то, что при работе с выделенными ферментами сократилось время биотестирования, а методику проведения анализа удалось упростить. Благодаря ферментным реактивам появилась возможность варьировать количество компонентов реакционной смеси, что позволяет изучить критические дозы и механизмы ингибирования активности ферментов токсическими веществами.

Несмотря на вышеперечисленные достоинства ферментов как тест-объектов для мониторинга состояния природных сред, у современных ферментных тестов есть определённые недостатки. Одним из главных ограничивающих факторов считается обеспечение оптимальных условий для хранения ферментов [17].

1.2. Билюминесцентные ферментативные тесты

Билюминесценция – это излучение организмом видимого глазом света в результате протекания естественной биохимической хемилюминесцентной реакции [23]. Билюминесцентными системами обладают различные организмы: бактерии, одноклеточные водоросли, грибы, беспозвоночные, насекомые, ракообразные, медузы, рыбы и другие. Но, несмотря на разнообразие организмов, у всех в основе хемилюминесцентной реакции лежит реакция окисления субстрата (люциферина) под действием кислорода воздуха. Катализатором этой реакции является фермент – люцифераза. Свет, излучаемый интермедиатом окисленного люциферина, принадлежит видимой области спектра [24, 25]. Билюминесцентная реакция была активно применена в биотестировании для обнаружения и оценки токсичности анализируемых сред, поскольку она напрямую связана с клеточным дыханием и любое ингибирование клеточного метаболизма в связи с действием токсичного вещества приводит к уменьшению светового излучения пораженных клеток [12, 26 – 30]. В работе [31] для оценки токсичного влияния электромагнитного поля

низкой интенсивности на токсичность бытовых стоков применялась тест-система «Эколюм», основанная на лиофилизированных светящихся бактериях. Обнаружено, что при меньшей очистке сточных вод наблюдается увеличенное влияние электромагнитного излучения и увеличивает токсичность вод [31]. Также биолюминесцентный анализ на основе препарата «Эколюм» применили для анализа токсичности вод и выяснили, что образцы воды из реки Сакмара чрезвычайно токсичны [32].

В 1990-м году были представлены разработки нового биодиагностического метода на основе ферментов, выделенных из светящихся бактерий. Принцип действия таких биотестов заключается в обнаружении токсических свойств тестируемых образцов по их влиянию на параметры биолюминесцентной реакции.

При проведении биотестов используются ферментативные реакции, катализируемые либо только люциферазой (L) (моноферментная система – реакция 1), либо люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой (R+L) (биферментная система - реакции 1 и 2) [33]:

L



R



Люцифераза катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавинмоноклеотида (FMNH₂). Продуктами этой реакции являются окисленный флавинмоноклеотид (FMN), жирная кислота (RCOOH) и излучение квантов света в сине-зеленой области спектра. Для обеспечения люциферазы FMNH₂ применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией, катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой (реакция 2), что позволяет наблюдать длительное свечение [34].

Ферменты светящихся бактерий обладают высокой чувствительностью к ингибирующему влиянию токсических веществ различной природы. Созданы и уже успешно используются тест-системы на основе ферментов светящихся бактерий для определения содержания в образцах различных антибиотиков, пестицидов и тяжёлых металлов. Так, с использованием биферментной системы R + L провели оценку биотоксичности наноматериалов, наиболее токсичными из которых оказались наночастицы на основе меди и её оксида [35].

В настоящее время для определения интегральной токсичности различных сред активно применяется именно биферментная система R + L. Основными показателями результатов анализа являются параметры указанных биолюминесцентных реакций, в том числе интенсивность свечения, регистрируемая биолюминометром, время выхода свечения на максимум, константа спада свечения, общий квантовый выход излучения света, рассчитываемый при обработке экспериментальных данных.

Также биферментную систему R + L используют для обнаружения искомого компонента в пробе, постоянного контроля состояния различных сред, наличия и оценки влияния токсических веществ в исследуемых объектах. Оценку токсичности проводят по таким параметрам, как IC₂₀ и IC₅₀ [36].

С развитием биолюминесцентного ферментативного тестирования были сконструированы ферментативные тесты, основанные на использовании трех сопряжённых реакций [37]. Примером может служить работа Сутормина с соавторами [36], где при исследовании загрязнения почв применяли триферментную систему R+L+LDH. В работе было показано, что при удлинении цепи сопряжения ферментативных реакций увеличивается чувствительность ферментативного теста к токсическим веществам.

В заключении можно сказать, что биотесты на основе ферментов светящихся бактерий являются наиболее предпочтительными для разнообразных анализов благодаря своим преимуществам [33], таким как простота и экспрессность выполнения биотеста, его точность, воспроизводимость, избирательность и высокая чувствительность. Однако

имеются некоторые недостатки биоломинесцентных ферментативных методов, ограничивающие их применимость в аналитических исследованиях. К одному из главных недостатков следует отнести нестабильность используемых препаратов ферментов при хранении и использовании.

1.3. Стабилизация ферментов

Для сокращения влияния негативных факторов на ферменты и сохранения их активности на данный момент в энзимологии используют методы стабилизации ферментов [38-40]. Основными стратегиями стабилизации ферментов являются добавление стабилизирующих веществ, химическая модификация боковых групп фермента, генетическая модификация, применение высокого гидростатического давления (ННР) и иммобилизация [17, 41].

В настоящее время всё чаще увеличение срока сохранения активности ферментов достигается путём внесения дополнительных веществ в состав реагента. К примеру, для минимизации инактивации ферментов в биферментной системе люцифераза + NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза дополнительно вводили стабилизаторы SH-групп ферментов, такие как ДДТ и меркаптоэтанол, и бычий сывороточный альбумин для увеличения вязкости раствора. Внесение данных добавок в состав сопряженной ферментной системы улучшает характеристики реагента, т.к. позволяет увеличить их активность на 150%, а также увеличивает срок хранения ферментов без значительной потери активности [42].

При попытках инактивировать ферменты, приносящие вред качеству пищевых продуктов с помощью нетепловых технологий, обнаружили, что высокое гидростатическое давление (ННР) способно активировать и стабилизировать некоторые пищевые ферменты. ННР влияет на слабые молекулярные взаимодействия (гидрофобные, ионные и водородные белковые связи). Влияние ННР ниже 1000-1500 Мпа на активность и стабильность

ферментов объясняется изменениями нековалентных молекулярных взаимодействий. Однако, на примере таких ферментов как пектинэстераза, полифенолоксидаза и α -химотрипсин, было показано, что ННР может оказывать и негативное влияние на активность ферментов или не оказывать никакого влияния [17, 43].

Наиболее перспективным методом стабилизации ферментов является иммобилизация на различных носителях. Иммобилизация – это способ перевода фермента в нерастворимое состояние, основывающийся на изолировании фермента веществом, способным обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора и ингибитора [44]. Иммобилизация позволяет не только сохранить, но и улучшить производительность ферментов (в оптимальных условиях реакции процесса). Все имеющиеся к настоящему моменту методы иммобилизации можно разделить на две группы: химические и физические.

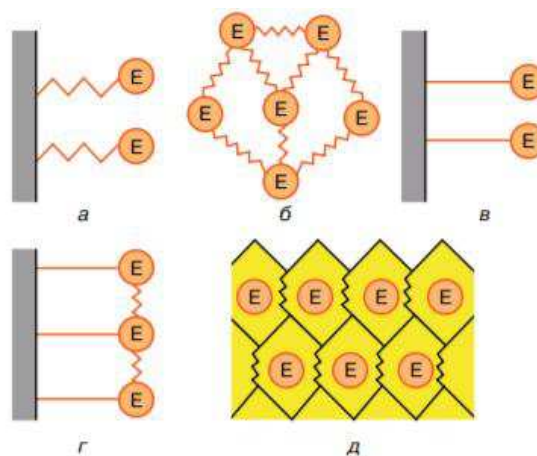


Рис. 1 – Схематическое изображение способов иммобилизации ферментов в биосенсорах: а – ковалентное связывание с поверхностью носителя; б – сшивание; в – адсорбция на носителе; г – ковалентное связывание и пришивание к подложке; д – захват носителем (в плёнке полимера) [1].

К химическим методам иммобилизации относится иммобилизация при помощи ковалентных связей. Она зависит от многих факторов (активность ферментов, материал, условия проведения реакции) и имеет большую вероятность нарушения ковалентных связей, что приводит к низкому выходу активности. Также существенными недостатками являются сложность

процедуры иммобилизации и её высокая стоимость. В работе Чжоу описывается создание биосенсора для измерения уровня глюкозы путём иммобилизации глюкозооксидазы посредством физической адсорбции на нанотрубках оксида цинка. Стабильность описанного биосенсора измерялась экспериментально, и доказано, что при хранении при 4 °С в течение 20 дней биосенсор сохранил 81% своей первоначальной активности [45].

Ко второй группе методов относятся включение ферментов в гели различной природы и адсорбция. Второй тип иммобилизации часто приводит к утечке ферментов при изменении температуры или pH, поэтому адсорбция используется в сочетании с другими методами иммобилизации. Оба метода достаточно эффективны и позволяют иммобилизовать не только отдельные ферменты, но и ферментные системы [17].

В зависимости от желаемых характеристик, имеется возможность выбора носителя, варьирования условий иммобилизации, количества ферментов и субстратов и других параметров. Важным преимуществом иммобилизованных ферментов является возможность управления устойчивостью ферментов к действию физических и химических факторов среды путём выбора соответствующего микроокружения [44].

Чрезвычайно важным для получения стабильных иммобилизованных препаратов является выбор носителя для иммобилизации. Ранее было показано, что наиболее подходящими для иммобилизации биферментной системы R + L являются природные полимерные гели на основе крахмала или желатина [45]. Реагенты, полученные на основе крахмального и желатинового гелей, отличаются высоким выходом активности, устойчивостью к воздействию физических и химических факторов среды [46]. Являясь природными биополимерами, гели нетоксичны, биоразлагаемы и обеспечивают среду, аналогичную среде фермента в клетке. Кроме того, преимуществами выбранных гелей является их дешёвая себестоимость и простота методики иммобилизации.

В работе Гульнова было экспериментально установлено, что микровязкость для растворов крахмала значительно выше, чем у растворов желатина, что говорит о хорошей текучести раствора [47].

Характеристики носителя иммобилизации в значительной степени определяют текстуру и стабильность конечного продукта. Поэтому является необходимым понимать механизмы образования пасты и геля из крахмала картофеля, учитывать все преимущества и недостатки.

Картофельный крахмал – это полимер, имеющий в своём составе молекулы линейной амилозы и разветвлённого амилопектина. В отличие от зерновых культур, крахмал из картофеля имеет большой фактор набухания (гранула картофельного крахмала способна увеличиваться в 100 раз без разрушения структуры вещества).

При добавлении к крахмалу водного раствора образуется крахмальная суспензия. При нагревании картофельного крахмала более 30 °С в условиях избытка воды, крахмальная суспензия подвергается желатинизации, при которой по мере набухания гранул разрушаются водородные связи амилозы и амилопектина в аморфных областях гранул крахмала [48]. С повышением температуры суспензии увеличивается выщелачивание амилозы из набухших гранул и гидратирующая способность крахмала, приводящая, в конечном счёте, к плавлению нерастворённых кристаллитов амилопектина.

Процесс клейстеризации происходит при дальнейшем непрерывном нагревании гранул крахмала в присутствии избытка воды и включает продолжающееся набухание гранул, дополнительное вымывание растворенных молекул крахмального полимера и разрушение хрупких набухших гранул, приводящее к переходу полисахаридов в раствор. В результате получается вязкоупругая масса, состоящая из непрерывной фазы. Достигается пиковая вязкость, в первую очередь, из-за набухших гранул. На этом этапе получается так называемая горячая паста [49].

При остывании крахмальная паста становится более эластичной и приобретает отчётливые твёрдые свойства, что называют гелеобразованием. В

геле образуются сети между молекулами амилозы. По мере охлаждения геля увеличивается образование сетки и движение частиц амилозы, что приводит к разделению фаз при иммобилизации и создаёт препятствия для доступа субстрата к ферменту. Этим объясняется снижение каталитической активности в сравнении с растворимой системой [49].

Гель из картофельного крахмала увеличивает стабильность фермента за счёт своей химической, физической и тепловой стойкости. Именно 3%-ный крахмальный гель позволяет избежать ингибирования системы связанных ферментов NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы. Также известно, что суспензии крахмала имитируют среды с неоднородной полярностью и вязкостью, что характерно для клетки [50].

После охлаждения геля наступает процесс ретроградации крахмала, происходящий при образовании двойной спирали амилозы в течение 48 часов. Рекристаллизации амилозы и амилопектина способствуют низкие температуры, но рекристаллизованная структура отличается от нативного крахмала и становится менее устойчивой.

Гелевое окружение расширяет возможность использования иммобилизованного фермента в биотестировании, т.к. появляется возможность анализировать среды с увеличенным диапазоном температуры, pH, концентрацией токсических веществ.

Таким образом, путем включения ферментов в гели появляется возможность изменения свойств иммобилизованных реагентов: увеличение термостойкости, расширение рабочего диапазона pH, изменение чувствительности к действию токсических веществ и др.

Разработаны многокомпонентные реагенты, включающие совместно иммобилизованные в гели ферменты и субстраты биферментной системы R + L [51]. Эти реагенты содержат все необходимые составляющие для проведения одного измерения, а набор реагентов представляет собой комплект дозированных на одно измерение сухих дисков [42, 52, 53]. Многокомпонентные иммобилизованные реагенты позволили повысить

точность измерений, упростить процедуру анализа, сократить время проведения и уменьшить его стоимость. Благодаря своей легкодоступной форме, проведение анализов возможно даже в полевых условиях, так как для хранения фермента и выполнения эксперимента не требуется создания специальных условий.

Существенные успехи использования в биотестировании подобных многокомпонентных реагентов практически достигнуты, однако остается нерешенной проблема сохранения их активности во времени при обеспечении необходимой чувствительности реагентов к воздействию токсических веществ. В работе проблема решается путем подбора оптимального содержания ферментов и субстратов в многокомпонентном иммобилизованном реагенте.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы и приборы

В данной работе для проведения экспериментальной части были использованы лиофилизированные препараты КРАБ (комплекс реактивов аналитической биолюминесценции), содержащие высокоочищенные ферменты люциферазу (L) из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NAD(P)H:FMN - оксидоредуктазу (R) из *Vibrio fischeri*, произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон препарата КРАБ содержал 0,5 мг люциферазы из рекомбинантного штамма *E.coli* и 0,3 единиц активности (U) NADH:FMN-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri*.

В качестве реактивов в данной работе были использованы: растворимый картофельный крахмал («Sigma», Германия), NADH («Gerbu», Германия), тетрадеканаль («Merck», Германия) и FMN («Serva», Германия). Для приготовления растворов ферментов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер, pH 6,8. Для анализа чувствительности в качестве токсикантов использовали медный купорос CuSO_4 и пестицид «Ликвидатор», в котором в качестве действующего вещества использован глифосат («Евро-Семена», Россия).

Во флакон КРАБа вносили 1 мл калий–фосфатного буфера, полученный раствор выдерживали на льду в течение 1 – 2 часов, затем хранили в морозильной камере. За час до начала экспериментов раствор выдерживали на льду.

Раствор 0,0025 % миристинового альдегида готовили добавлением к 50 мкл 0,25%-ного спиртового раствора альдегида 5 мл 0,05 М буфера.

На основе буфера готовили 16 мМ буферный раствор NADH, разбавляя 2,83 мг NADH 250 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера.

Интенсивность свечения растворимой биферментной системы и многокомпонентного иммобилизованного реагента измеряли с помощью люминометра Glomax E5321 (Promega GloMax 20/20 Luminometer, США).

2.2. Метод получения многокомпонентного иммобилизованного реагента

Для иммобилизации ферментов и субстратов биферментной системы R + L использовали 3,15% крахмальный гель. Для приготовления крахмального геля 0,4725 г крахмала вносили в 20 мл буфера. Полученную смесь нагревали до кипения и кипятили в течение 2-х минут. В полученную суспензию вносили 175, 350 или 700 мкл 0,019% спиртового раствора миристинового альдегида, тщательно перемешивали с помощью вакуумного смесителя. Остужали гель до 25 °С и последовательно вносили 55, 110 или 220 мкл 1,6 мМ NADH, перемешивая в течение 50 с на вакуумной мешалке. После этого добавляли ферменты 100, 200 или 300 мкл буферного раствора люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, вновь перемешивали с помощью вакуумного смесителя. Дозировали полученную смесь с помощью многоканального автоматического дозатора по 25 мкл на гидрофобную поверхность. Высушивали получившиеся капли в термостате при температуре 4-5 °С в течение 24 часов, либо в холодильнике «Haier» (Китай) при температуре 8 °С. Многокомпонентный иммобилизованный реагент представляет собой высушенный диск диаметром 6 мм, сухой вес 1,5 мг.

В реагенте варьировали содержание ферментов и его субстратов (NADH и тетрадеканал). Количество люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в дисках составляло: 0,06 мкл, 0,12 мкл или 0,19 мкл и 0,04, 0,08 или 0,11 mU соответственно. Концентрацию NADH изменяли в диапазоне от 0,04 мМ до 0,2 мМ, тетрадеканал в диапазоне от 0,00015% до 0,0006%.

2.3. Методика измерения активности многокомпонентного иммобилизованного реагента

Об активности многокомпонентного иммобилизованного реагента судили по величине максимальной интенсивности свечения (I_{\max} , усл.ед.), выраженной в условных единицах. Для активации иммобилизованных реагентов необходимо формирование реакционной смеси следующего состава: 1 иммобилизованный диск; 300 мкл дистиллированной воды; 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN.

Активность многокомпонентного иммобилизованного реагента определяли по кинетическим характеристикам, таким как константа спада (k_d , мин⁻¹) и время выхода свечения на максимум (T , с). Константу спада рассчитывали по формуле:

—————

где I_1 – максимум интенсивности свечения, I_2 – интенсивность свечения через определённое время после I_1 , Δt – время (мин), за которое значение интенсивности свечения меняется от I_1 до I_2 .

2.4. Исследование чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента к действию токсикантов

Для анализа чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента к действию токсических веществ использовали в качестве токсикантов медный купорос CuSO_4 и пестицид «Ликвидатор». Для приготовления растворов разных концентраций токсических веществ использовали дистиллированную воду.

Первоначально определяли максимальную интенсивность свечения реагента в присутствии контрольного образца (I_k). Далее, в другую кювету последовательно вносили 1 диск; 300 мкл CuSO_4 или пестицида заданной концентрации (опыт); 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN, измеряли максимальную интенсивность свечения реагента в присутствии опытного образца (I_0).

Действие токсиканта определяли по остаточному свечению, рассчитанному по формуле:

—

где I_0 и I_k – максимальная интенсивность свечения многокомпонентного иммобилизованного реагента в присутствии анализируемого и контрольного образца.

О чувствительности многокомпонентного иммобилизованного реагента к токсическим веществам судили по значениям IC_{20} и IC_{50} , представляющим собой концентрации токсикантов, ингибирующие максимальную интенсивность свечения на 20% и 50% соответственно.

2.5. Статистическая обработка результатов экспериментов

Измерение каждой экспериментальной точки проводили не менее чем в 5 повторностях. При статистической обработке результатов и расчете стандартной ошибки измерений пользовались программой Microsoft Office Excel.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ХАРАКТЕРИСТИК МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РЕАГЕНТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СОСТАВУ И РЕЖИМУ ВЫСУШИВАНИЯ

Изъято с 24 по 43 страницы в связи с авторскими правами.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован состав многокомпонентного иммобилизованного реагента: 0,12 мкг люциферазы и 0,08 mU NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, 0,09 mM NADH, 0,0003 % тетрадеканала.

2. Реагент оптимизированного состава характеризуется высокой чувствительностью к действию разных классов токсических веществ: значение IC_{50} сульфата меди составляет 1 мг/л, что соответствует ПДК данного токсиканта, значение IC_{50} глифосата составляет 8,7 г/л, что в 2 раза превышает значение IC_{50} для растворимой биферментной системы.

3. Внесение 0,12 мкг L и 0,08 mU R, 0,09 mM NADH и 0,0003 % тетрадеканала в состав иммобилизованных дисков позволяет увеличить срок хранения реагента: активность реагента снизилась в 2 раза за пять месяцев хранения при 4 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано влияние состава многокомпонентного иммобилизованного реагента на характеристики биферментной системы R+L, иммобилизованной совместно с субстратами в крахмальный гель. Был выбран оптимальный режим высушивания реагентов для достижения меньшей вариабельности значений максимального свечения.

Иммобилизованный реагент оптимизированного состава отличается наибольшей чувствительностью к действию CuSO_4 , соответствуя чувствительности растворимой системе R+L. Данный реагент позволяет определять концентрацию медного купороса на уровне ПДК. Чувствительность реагента к глифосату не соответствует ПДК пестицида и в 2 раза превышает значения IC_{50} растворимой R+L системы.

Установлено, что положение планшетов при высушивании реагентов не влияют на конечную активность дисков.

Оптимизация состава позволила увеличить срок хранения многокомпонентного иммобилизованного реагента, что способствует расширению применения биOLUMИнесцентного иммобилизованного реагента в качестве тест-системы для экологического мониторинга.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

L – фермент люцифераза

R – фермент NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза

R+L – биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза

FMN, FMNH₂ – окисленная и восстановленная формы флавинмононуклеотида,

NAD⁺, NADH – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида

КРАБ – комплект реактивов аналитической биолюминесценции

IC₂₀ и IC₅₀ – концентрации загрязняющего вещества, вызывающие снижение активности системы на 20 и 50% соответственно

ПДК – предельно допустимая концентрация

ННР – высокое гидростатическое давление

ЭМИ – электромагнитное излучение

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Будников Г. К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств //Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №. 12. – С. 26-32.
2. Чуйко Г. М. Методы биодиагностики в комплексной оценке качества воды и экотоксикологического состояния водных объектов //Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии. – 2019. – С. 285-289.
3. Samanta P. et al. Ecological risk assessment of a contaminated stream using multi-level integrated biomarker response in *Carassius auratus* //Environmental Pollution. – 2018. – Т. 233. – С. 429-438.
4. Трифонова Т. А., Чеснокова С. М., Космачева А. Г. Оценка влияния антибиотиков ампициллина и тилозина на ферментативную активность дерново-подзолистой почвы и их токсичности для культурных растений //Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – №. 2. – С. 150-156.
5. Евгеньев М. И. Тест-методы и экология //Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №. 11. – С. 29-34.
6. Kolosova E. M. et al. Set of enzymatic bioassays for assessment of soil pollution //Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 489. – №. 1. – С. 103-107.
7. Трутнева А. С. Применение метода биолюминесценции для оценки качества воды //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – №. 5 (205).
8. Bag A., Ghorai P. K. Development of quantum chemical method to calculate half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) //Molecular informatics. – 2016. – Т. 35. – №. 5. – С. 199-206.
9. Järv L. M. et al. Status of persistent organic pollutants and heavy metals in perch (*Perca fluviatilis* L.) of the Port of Muuga impact area (Baltic Sea) //Sustainable Maritime Transportation and Exploitation of Sea Resources. – ROUTLEDGE in association with GSE Research, 2011. – Т. 951. – №. 957. – С. 951-957.
10. Дубинская В. А., Володина Т. В. Ферментные тест-системы *in vitro* для первичного скрининга биологически активных веществ //Качество и жизнь. – 2016. – №. 1. – С. 67-69.
11. Дубинская В.А., Минеева М.Ф., Вахнина Е.В. и др. Ферментная тест-система *in vitro* для направленного поиска холинергических веществ и изучения их механизма действия. // Вопр. биол., мед. и фарм. химии – 2007. – № 2. – С. 32–37.
12. Islam M. S. et al. Determination of heavy metal toxicity by using a micro-droplet hydrodynamic voltammetry for microalgal bioassay based on alkaline phosphatase //Chemosphere. – 2017. – Т. 188. – С. 337-344.

13. Лупанова И. А. и др. Биотестирование в экспериментальной фармакологии: применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – №. 1.
14. Бабич О. О., Иванова С. А., Сухих С. А. Изучение токсикологических показателей безопасности капсулированного ферментного препарата L-фенилаланин-аммоний -лиазы // Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения. – 2020. – С. 154-156.
15. Попов П. А. и др. Методы ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов убоя животных на остаточные количества лекарственных веществ в составе кормовых добавок // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2019. – №. 3. – С. 272-280.
16. Admassu H. et al. Evaluation of the *in vitro* α -amylase enzyme inhibition potential of commercial dried laver (*Porphyra* Species) seaweed protein hydrolysate // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2018. – Т. 18. – №. 4. – С. 547-556.
17. Reyes-De-Corcuera J. I., Olstad H. E., García-Torres R. Stability and stabilization of enzyme biosensors: the key to successful application and commercialization // Annual review of food science and technology. – 2018. – Т. 9. – С. 293-322.
18. Monošík R. et al. A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite // Food Control. – 2012. – Т. 23. – №. 1. – С. 238-244.
19. Mohan A. M. V. et al. Continuous minimally-invasive alcohol monitoring using microneedle sensor arrays // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – Т. 91. – С. 574-579.
20. Попов П. А. Обнаружение остаточных концентраций антибиотиков в молоке с помощью биочиповой технологии // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2020. – №. 3. – С. 304-312.
21. Campaña A. L. et al. Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater // Biosensors. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 41.
22. Chrouda A. et al. An Acetylcholinesterase Inhibition-Based Biosensor for Aflatoxin [B. sub. 1] Detection Using Sodium Alginate as an Immobilization Matrix // Toxins. – 2020. – Т. 10. – №. 3.
23. Haddock S. H. D., Moline M. A., Case J. F. Bioluminescence in the sea. – 2009.
24. Hou C. et al. Understanding bacterial bioluminescence: a theoretical study of the entire process, from reduced flavin to light emission // Chemistry—A European Journal. – 2014. – Т. 20. – №. 26. – С. 7979-7986.

25. Завильгельский Г. Б., Шакулов Р. С. Механизмы и происхождение бактериальной биолюминесценции // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52. – №. 6. – С. 935-947.
26. Zm O., As S., Iv Y. A bioluminescent system of fungi: prospects for application in medical research // Bulletin of Russian State Medical University. – 2018. – №. 1.
27. Алекперов И. Х., Мамедова В. Ф. Биотестирование степени органического загрязнения почв Азербайджана с помощью инфузорий педобионтов // Юг России: экология, развитие. – 2017. – №. 2.
28. Woutersen M. et al. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2011. – Т. 400. – №. 4. – С. 915-929.
29. Roda A. et al. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2009. – Т. 28. – №. 3. – С. 307-322.
30. Трутяева А. С. Применение метода биолюминесценции для оценки качества воды // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – №. 5 (205).
31. Зарубина А. П. и др. Биотестирование тест-системой "Эколюм" влияния электромагнитного поля низкой интенсивности на токсичность бытовых стоков // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2012. – №. 3.
32. Макаева А. М., Трутяева А. С. Использование люминесцентного анализа для токсичности вод // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – 2017. – С. 1816-1817.
33. Medvedeva S. E. et al. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2009. – Т. 2. – №. 4. – С. 418-452.
34. Kirillova M. A. et al. Bioluminescent system of luminous bacteria for detection of microbial contamination // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2018. – Т. 11. – №. 2.
35. Есимбекова Е. Н. и др. Биолюминесцентный метод токсикологической оценки наноматериалов // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2017. – Т. 472. – №. 5. – С. 596-599.
36. Сутормин О. С. и др. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и триферментной систем // Цитология. – 2018. – Т. 60. – №. 10. – С. 826-829.
37. Есимбекова Е.Н. Исследование чувствительности трехферментных систем с бактериальной люциферазой при биотестировании водных экосистем:

- Автореф. дис. канд. биолог. наук / Е.Н. Есимбекова. – Красноярск, 2000. – С. 17.
38. Сутормин О. С., Суковатая И. Е., Кратасюк В. А. Стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы на биферментную систему светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – №. 10 (159).
39. Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. Understanding enzyme immobilisation // Chemical Society Reviews. – 2009. – Т. 38. – №. 2. – С. 453-468.
40. Brady D., Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation // Biotechnology letters. – 2009. – Т. 31. – №. 11. – С. 1639-1650.
41. Lonshakova-Mukina V., Esimbekova E., Kratasyuk V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – Т. 213. – С. 244-247.
42. Eisenmenger M. J., Reyes-De-Corcuera J. I. High pressure enhancement of enzymes: a review // Enzyme and microbial technology. – 2009. – Т. 45. – №. 5. – С. 331-347.
43. Есимбекова Е. Н. и др. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение " Российская академия наук", 2015. – Т. 461. – №. 4. – С. 472-472.
44. Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kratasyuk V. A. Comparative study of immobilized and soluble NADH: FMN-oxidoreductase-luciferase coupled enzyme system // Biochemistry (Moscow). – 2009. – Т. 74. – №. 6. – С. 695-700.
45. Zhou F. et al. Effects of the surface morphologies of ZnO nanotube arrays on the performance of amperometric glucose sensors // Materials Science in Semiconductor Processing. – 2016. – Т. 56. – С. 137-144.
46. Lonshakova-Mukina V. I., Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A. Thermal Inactivation of Butyrylcholinesterase in Starch and Gelatin Gels // Catalysts. – 2021. – Т. 11. – №. 4. – С. 492.
47. Gulnov D. V., Nemtseva E. V., Kratasyuk V. A. Contrasting relationship between macro-and microviscosity of the gelatin-and starch-based suspensions and gels // Polymer Bulletin. – 2016. – Т. 73. – №. 12. – С. 3421-3435.
48. Appelqvist I. A. M., Debet M. R. M. Starch- biopolymer interactions—a review // Food Reviews International. – 1997. – Т. 13. – №. 2. – С. 163-224.
49. BeMiller J. N. Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations // Carbohydrate polymers. – 2011. – Т. 86. – №. 2. – С. 386-423.
50. Ягофаров Д. Ш. и др. Физико-химические свойства картофельного крахмала // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – №. 12.

51. Fritsler Y. V., Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzyme inhibition based assay of metal nanoparticles. – 2017.
52. Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A., Torgashina I. G. Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: correlation between activity and composition //Enzyme and microbial technology. – 2007. – T. 40. – №. 2. – C. 343-346.
53. Esimbekova E. N., Kondik A. M., Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity //Environmental monitoring and assessment. – 2013. – T. 185. – №. 7. – C. 5909-5916

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой

В.А. КРАТАСЮК В.А. КРАТАСЮК

«21» июня 2021г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Оптимизация состава многокомпонентного иммобилизованного реагента

Руководитель Е.Н. Есимбекова 21.06.21 доцент, кан. биол. наук Е.Н. Есимбекова
подпись, дата

Выпускник Т.Д. Помыткина 21.06.21 Т.Д. Помыткина
подпись, дата

Красноярск 2021