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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ _____

« _____» _____ 20 ___ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

03.04.02.01 - Биофизика

РАЗРАБОТКА РЕАГЕНТА ДЛЯ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Научный руководитель _____ н.с. ИБФ СО РАН,
к.б.н., доцент Е.Н. Есимбекова

Выпускник _____ М.А. Кириллова

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Разработка реагента для анализа бактериального загрязнения» содержит 79 страниц текстового документа, 77 использованных источников, 43 рисунка.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, МИКРОБНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ, БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА, NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА, ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ, СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ, ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.

Цель данной работы - разработка иммобилизованного ферментного препарата для анализа бактериального загрязнения.

[изъят 1 абзац]

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....5
Введение.....6
Глава 1. Обзор литературы.....9

1.1. Способы определения бактериального загрязнения.....9
1.2. Роль аденозинтрифосфата в биологических процессах.....10
1.3. Методы обнаружения ATP.....11
1.4. Метод обнаружения количества бактериальных клеток по содержанию ATP……18
1.5. Биолюминесцентная ферментативная система светящихся бактерий.....19
1.6. Методы стабилизации ферментов.....24

Глава 2. Материалы и методы.....34

2.1. Реактивы и материалы.....34
2.2. Модельный микробный образец.....35
2.3. Методики измерения количества FMN и NADH с использованием биферментной системы светящихся бактерий.....35
2.4. Методики измерения количества ATP с использованием люминесцентной системы светляков.....36
2.5. Получение иммобилизованных реагентов.....36
2.6. Измерение активности иммобилизованных реагентов.....37
2.7. Приборы.....37
2.8. Статистическая обработка.....38

Глава 3. Результаты и обсуждения.....39

3.1. Определение чувствительности ферментативной системы светящихся бактерий к микробному загрязнению.....39

3.1.1. Подбор условий проведения анализа, обеспечивающих максимальную чувствительность биферментной системы к FMN.....39
3.1.2. Подбор условий проведения анализа, обеспечивающего максимальную чувствительность биферментной системы к NADH.....41
3.1.3. Подбор условий пробоподготовки для анализа количества бактерий в исследуемом образце.....45

3.2. Разработка дозированного реагента на основе люциферазы светляков. .49
Выводы.....69

Список используемой литературы.....70

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADP - аденозиндифосфат,
AMP - аденозинмонофосфат,
ATP - аденозинтрифосфат,
C_{14} – тетрадеканаль,
FMN, $FMNH_2$ – окисленная и восстановленная формы флавинмононуклеотида,
I – максимальная интенсивность свечения биолюминесцентной системы,
I_k - интенсивность свечения биолюминесцентной системы в присутствии контрольного образца
I_o - интенсивность свечения биолюминесцентной системы в присутствии анализируемого образца,
$I_{фон}$ - фоновая интенсивность свечения биолюминесцентной системы,
L – люцифераза,
L+R – биферментная система NADH–FMN-оксидоредуктаза и люцифераза,
LH_2 – люциферин светляков,
LH_2-AMP – люцифериладенилат,
NAD^+, NADH – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида,
R – NADH:FMN–оксидоредуктаза,
БСА – бычий сывороточный альбумин,
ДТТ – дитиотреитол,
КРАБ - комплект реактивов аналитической биолюминесценции

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время для анализов химических или биологических загрязнений все чаще применяются биосенсоры, в состав биомодулей которых входят ферментативные биолюминесцентные системы. Для анализа бактериального загрязнения распространенным является метод, основанный на определении количества аденозинтрифосфата (ATP) в исследуемом образце с помощью биолюминесцентной системы светляков. Также для такого анализа может быть использована ферментативная система светящихся бактерий, в этом случае анализ основан на определении таких маркеров как флавинмононуклеотид (FMN) или никотанамидадениндинуклеотид (NADH), абсолютная величина которых или ее изменение пропорциональны концентрации КОЕ (колониеобразующих единиц) в анализируемом образце. Несмотря на существующие методы, создание стабильного дозированного реагента, пригодного для анализов биологических загрязнений, остается нерешенной задачей.

Цель и задачи работы. Целью работы было получить иммобилизованный ферментный препарат для анализа бактериального загрязнения.

Были поставлены следующие задачи:

1. оценить возможность применения ферментной системы светящихся бактерий для анализа микробного загрязнения;
2. разработать иммобилизованный дозированный реагент, обеспечивающий максимальную чувствительность к маркерам микробного загрязнения;
3. определить стабильность полученного реагента в зависимости от состава и условий хранения.

Научная новизна. [изъят 1 абзац]

Практическая значимость. Полученные реагенты могут быть использованы для анализа микробного загрязнения воды и других образцов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Возможность использования биферментной системы светящихся бактерий NADH–FMN-оксидоредуктаза и люцифераза для анализа бактериального загрязнения.
2. [изъят 1 абзац]

Апробация работы. Результаты работы были представлены на X Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука» (г. Красноярск, 2014), XX Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» МЭСК-2015 (г. Новосибирск, 2015), V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), 19-ом международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (г. Цукуба, 2016). По теме диссертации получен грант Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК» (г. Красноярск, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 1 статья в журнале Биология внутренних вод (2016), 5 тезисов и материалов конференций.

Содержание и объем работы. Диссертационная работа изложена на 79 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов исследования, выводов и списка литературы (77 источников, в том числе 60 – зарубежных). Диссертация иллюстрирована 43 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Способы определения бактериального загрязнения

Традиционными методами анализа микробного загрязнения в микробиологии являются чашечный метод Коха, методы кратных и предельных разведений [[1], [2]].

Чашечный метод Коха заключается в последовательном разведении исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50°С), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Подсчетом числа колоний узнают изначальное число клеток в исследуемом образце.

Метод кратных разведений проводят следующим образом. При исследовании плотных субстратов навеску измельчают в гомогенизаторе или растирают в ступке с кварцевым песком и готовят исходную взвесь в разведении 1:10. Из полученной взвеси или исходного жидкого материала готовят ряд последующих разведений с таким расчетом, чтобы при посеве двух последних разведений на чашке Петри в агаре выросло от 50 до 300 колоний. Из последних двух разведений по 1 см^3 вносят в чашку и заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45°С мясо-пептонного агара (МПА). Чашки инкубируют при 37°С 48 ч, подсчитывают количество выросших колоний. Общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г (см^3) продукта определяют с учетом разведения исследуемого материала.

При использовании *метода предельных разведений (титр)* из исходного жидкого материала готовят ряд десятикратных разведений до тех пор, пока в последней пробирке можно будет предположить наличие одной бактериальной клетки. Посев делают в жидкую селективную среду с последующим выделением микроорганизмов на твердой питательной среде и изучением их характеристики. За титр принимают, то наименьшее количество субстрата, в

котором обнаружена одна особь искомого микроорганизма [Error: Reference source not found].

Данные методы занимают достаточно много времени (24-72 часов). В клинических тестах результаты должны быть получены быстро, чтобы начать необходимое лечение. В пищевой гигиене также важно определить уровень микробного загрязнения сырых продуктов, чтобы защитить потребителя и предотвратить порчу продуктов. Поэтому были предложены более быстрые методы подсчета колонии, основанные на определении в образце какого-либо компонента, концентрация которого прямо пропорциональна количеству бактериальных клеток. В большинстве случаев в качестве такого параметра выступает молекула аденозинтрифосфата.

1.2. Роль аденозинтрифосфата в биологических процессах

Аденозинтрифосфат (ATP) является естественным компонентом тканей организма человека и животных. Основной функцией ATP является поставка энергии для биохимических реакций.

Хорошо известно, что энергетический уровень клетки зависит от соотношения аденозинфосфатов (ATP, аденозиндифосфата (ADP) и аденозинмонофосфата (AMP)). Существует фундаментальный параметр контроля метаболизма - энергетический заряд (ЭЗ), который представляет собой мольную долю адениновой кислоты, полученную при преобразовании ATP:

$$ЭЗ = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \qquad (1)$$

Значения ЭЗ могут варьироваться от нуля (в случае присутствия только AMP) до 1 (в случае полного превращения молекул AMP в ATP). На этом основании можно сделать два важных заключения. Когда ЭЗ выше 0,5, система, использующая ATP, повышает свою эффективность. Однако когда ЭЗ опускается до 0,5, в системе преобладает регенерация ATP. Поэтому, например,

в клетках растущих бактерий ЭЗ поддерживается на уровне 0,8, в то время как в старых клетках он близок к 0,5. При еще более низких значениях ЭЗ клетки погибают. Такой подход позволяет использовать АТР в качестве индикатора жизнеспособности клеток.

Кроме того, по концентрации АТР в пробе можно судить о количестве бактерий, живой биомассы и микробиологической активности. Поэтому измерение концентрации АТР часто используют для контроля состояния здоровья [3].

1.3. Методы обнаружения АТР

В настоящее время существует несколько основных методов обнаружения АТР – методы хроматографии, флуоресцентные, биолюминесцентные, спектрофотометрические методы и сенсоры. Каждый из методов применяется в различных областях медицины, экологии и пищевой промышленности.

Методы хроматографии обычно применяются для одновременного обнаружения нескольких нуклеотидов. Анализируемые вещества разделяются с помощью ионно-обменной хроматографии и обращено-фазовой или ионо-парной на обращенной фазе высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), также применяется и тонкослойная хроматография. Преимущество хроматографических методов состоит в возможности раздельного и одновременного быстрого обнаружения не только нуклеотидов, но также и нуклеозидов, азотистых оснований, креатина и креатин фосфата.

Флуоресцентные методы обнаружения АТР основаны на анализе изменений спектров испускания тех или иных комплексов (редкоземельные металлы [4], полимеры [Error: Reference source not found]), связанных с АТР. На этом принципе, например, разработаны также сенсоры на основе комплекса дипиколиламина с цинком для обнаружения АТР в нейтральных водных растворах. Также существует флуоресцентный хемосенсор с

иммобилизованными группами антрилметиламина, который в присутствии небольших количеств ATP показывает тушение флуоресценции.

Из спектрофотометрических методов известен метод, основанный на реакции взаимодействия ортофосфата и молибдена с образованием молибдофосфорной сини. Для гидролиза ATP применяется апираза, которая катализирует превращение ATP в AMP и два ортофосфатных иона. Чувствительность данного метода составляет 0,15 мкМ ATP.

Наиболее часто для количественного анализа ATP применяют биосенсоры, основанные на использовании иммобилизованных ферментов. В настоящее время разработаны чувствительные к H_2O_2 электроды с иммобилизованными гликозидазой и гексокиназой. Принцип действия такого сенсора основан на следующих реакциях:

Глюкоза + O_2 → глюконовая кислота + H_2O_2, (2)

Глюкоза + ATP → глюкозо-6-фосфат + ADP. (3)

Первая реакция происходит при участии глюкозооксидазы, в то время как для второй реакции необходимо присутствие гексокиназы и ионов Mg^{2+}, которые выступают в качестве кофактора. Количество полученной перекиси водорода уменьшается в присутствии ATP, что дает возможность судить о его концентрации.

Кроме того, существуют оптические и потенциометрические сенсоры измерения ATP, последние из которых основаны на встроенной в двухслойную липидную мембрану ATPазе [5].

Очень распространены сенсоры, содержащие иммобилизованную люциферазу светляков. Первые попытки иммобилизовать люциферазу были проведены еще в 1970-х годах, для иммобилизации использовали полиамидную мембрану, стекло, нейлон, метакрилат, фильтровальную бумагу, коллаген и другие носители. Также существуют многофункциональные оптико-волоконные

сенсоры для одновременного обнаружения ATP и NAD^+ [Error: Reference source not found].

Биолюминесцентные методы являются наиболее чувствительными (предел обнаружения ATP может достигать 10^{-14} M), по этой причине они широко применяются для анализа различных образцов. Такие методы позволяют обнаруживать также внутриклеточный ATP. Поэтому они в первую очередь используются для анализа микробиологических загрязнений и определения количества бактерий в пищевой промышленности [6], клинических диагностиках [7] и др. [8]. По чувствительности биолюминесцентный метод сравним со стандартными микробиологическими методами обнаружения бактерий (КОЕ методы). Однако биолюминесцентный метод позволяет проводить анализ намного быстрее, что является его несомненным преимуществом.

В основе биолюминесцентного анализа микробного загрязнения лежит реакции, катализируемая ферментом люциферазой светляков. Люцифераза светляков относится к классу монооксигеназ (EC 1.13.12.7) [9], субстратом данного фермента является люциферин (LH_2), помимо которого для проведения реакции требуется присутствие ATP, кислорода и катиона металла. Кристаллографические исследования показали, что фермент состоит из двух доменов - N-терминального домена и C-терминального домена меньшего размера, соединенных гибким пептидным линкером [Error: Reference source not found], который создает широкую щель между двумя доменами (рис. 1).

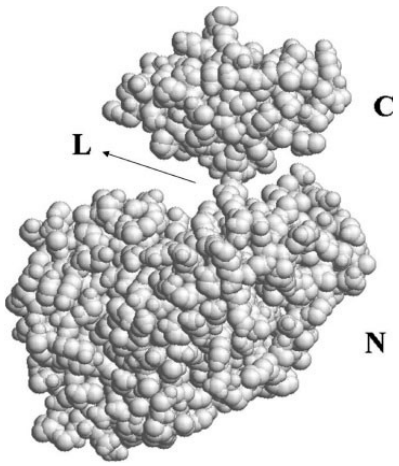


Рисунок 1 - Люцифераза *Photinus pyralis* [Error: Reference source not found]

Предполагаемый активный центр, включает аминокислотные остатки на поверхности обоих доменов, поэтому в ходе реакции два домена сходятся вместе, что приводит к значительным конформационным изменениям. Основная часть аминокислотных остатков важных для биолюминесцентной активности расположена в N-терминальной части и только одна аминокислота - на С-терминальном домене. С-терминальная часть несет трипептид лизин-серин-лейцин, ответственный за пероксисомальное нацеливание.

Исследования мутантной люциферазы из *Luciola Cruciata* показали, что нативная люцифераза принимает закрытую форму во время формирования высокоэнергического интермедиата, ответственного за излучение света, образуя гидрофобный карман вокруг активного центра, а открытую форму образует в комплексе с реагентами и продуктами.

Также было показано, что люцифераза может производить свет, имея в составе только N-домен, однако выход люминесценции в этом случае будет только 0,03% от люминесценции полного фермента.

Спектр излучения люциферазы светляков лежит в желто-зеленой области (550–570 нм), с максимумом на 562 нм при pH 7,5–7,8. Однако люцифераза является pH-зависимым ферментом и кислая среда (pH 5–6) может сдвигать спектр в красную область (максимум в 620 нм), также на спектр могут влиять

температура и катионы тяжелых металлов. Считается, что именно конформационные изменения, которые влияют на микроокружение активного центра, ответственны за различный цвет свечения [10].

Реакция, катализируемая люциферазой светляков, проходит в две стадии [11]:

люциферин + ATP → люцифериладенилат + PPi, (4)

люцифериладенилат + O_2 → оксилюцеферин + AMP + CO_2 + свет (5)

Первая стадия реакции (4) проходит в присутствии ионов Mg^{2+}. Потребность в двухвалентных катионах объясняется образованием комплекса ATP-Mg^{2+}, который частично защищает отрицательные заряды и влияет на конформацию фосфатных групп [Error: Reference source not found], что облегчает присоединение субстрата к активному центру фермента [12]. На второй стадии - стадии оксигенации (5) - происходит образование возбужденного оксилюциферина, аденозин монофосфата (AMP) и диаксида углерода (CO_2). Испускание света происходит при переходе возбужденного состояния оксилюциферина в основное состояние [Error: Reference source not found].

Химическая структура основного субстрата данной реакции – D-люциферина, представлена на рисунке 2. Люциферин состоит из двух принципиальных частей – бензотиазольной и тиазол карбоновой кислоты [13].

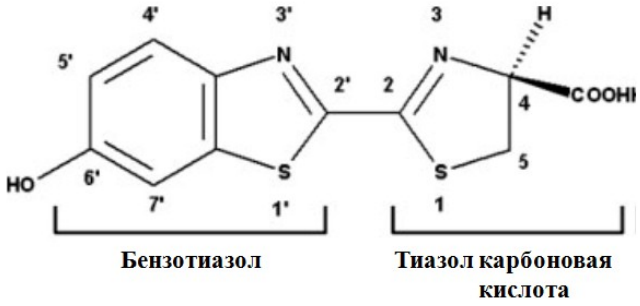


Рисунок 2 – Химическая структура люциферина светляков [Error: Reference source not found].

Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светляков, изображен на рисунке 3. Более подробно первая стадия реакции - реакция аденилирования люциферина, представлена на рисунке 4. На этом этапе происходит отщепление неорганического пирофосфата (PPi) от молекулы ATP, что приводит к формированию интермедиата D-люцифериладенилата (D-LH_2-AMP).

На второй стадии люминесцентной реакции (рис.3) происходит формирование интермедиата – диоксетана, образование которого было подтверждено экспериментально методом мечения изотопом кислорода ^{18}O [14]. При этом атомы кислорода встраиваются в оксилюциферин и молекулу CO_2. Распад диоксетана приводит к испусканию света возбужденным состоянием оксилюциферина благодаря механизму химически инициированной электронно-обменной люминесценции [Error: Reference source not found].

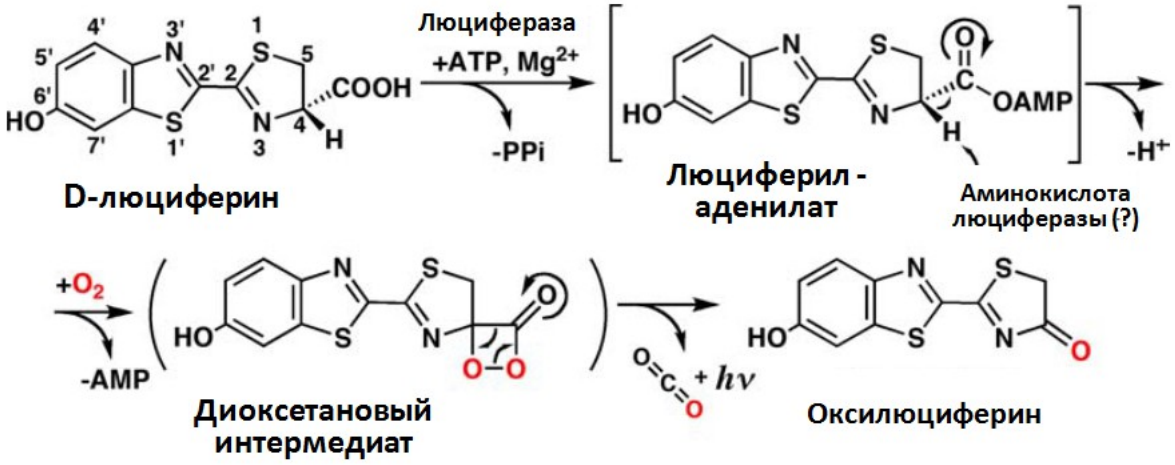


Рисунок 3 - Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светляков [Error: Reference source not found]

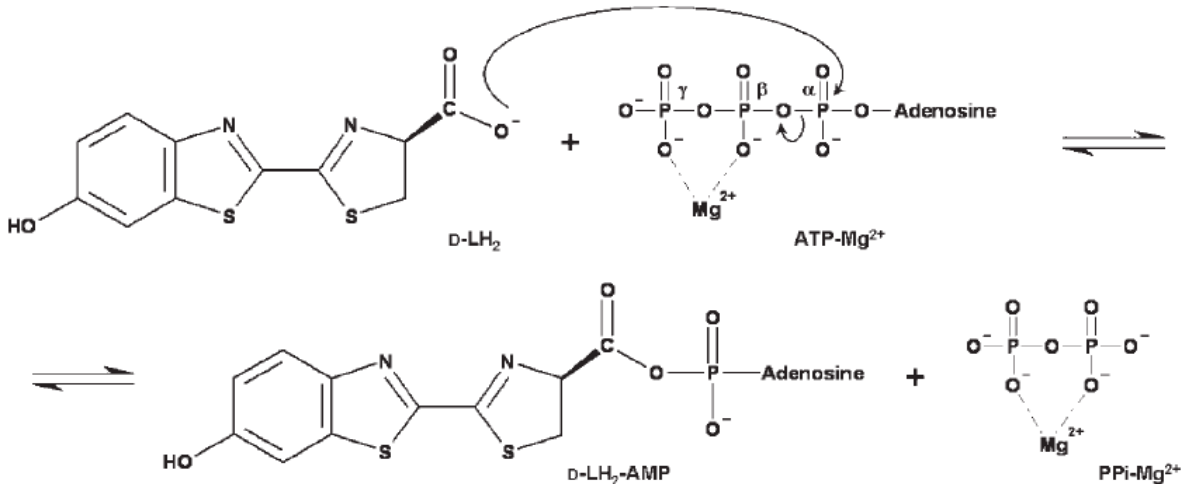


Рисунок 4 – Химический механизм аденилирования D-люциферина [Error: Reference source not found]

Квантовый выход реакции составляет примерно 90%. Уравнение Михаэлиса-Ментон данной реакции выглядит следующим образом:

$$I = (V_{max} \cdot [ATP])/(K_m + [ATP]), \quad (6)$$

где I – интенсивность свечения, V_{max} – максимальная скорость реакции, K_m – константа Михаэлиса, [ATP] – концентрация ATP.

При малых концентрациях ATP уравнение принимает следующий вид:

$$I = (V_{max} \cdot [ATP])/K_m \quad (7)$$

Из уравнения следует, что количество света прямо пропорционально концентрации ATP ([ATP]) и зависит от количества люциферазы (V_{max}), участвующей в катализе [15].

Поскольку хемилюминесценция светляков происходит в результате биохимической реакции окисления люциферина светляков кислородом воздуха в присутствии ATP, принцип методов анализа бактериальной обсемененности с использованием люциферазы светляков состоит в определении количества ATP, пропорционального содержанию микробных клеток [15,16]. Интенсивность биолюминесценции, возникающей в люциферин - люциферазной системе светляков в присутствии ATP, пропорциональна концентрации ATP в широком диапазоне [17].

1.4. Метод обнаружения количества бактериальных клеток по содержанию АТР

Очень часто обнаружение АТР проводят для анализа микробного загрязнения, при этом АТР экстрагируют из клеток физическими (сонификация, растирание) или химическими методами, например с помощью поверхностно активных веществ (ПАВ) [Error: Reference source not found], которые разрушают одиночные клетки. Однако, разрыв клеточной мембраны также позволяет высвобождаться ферментам, которые могут препятствовать дальнейшему анализу нуклеотидов. Ранее был предложен метод с использованием ионных и неионных детергентов (октилфеноксиполиэтоксиэтил, терпеноидные сапонины, стероидные сапонины, гликозиды сульфосукцината и др.) для лизиса клеток [Error: Reference source not found, [18]]. Некоторые из них действуют на проницаемость мембраны микробной клетки и высвобождают из нее нуклеотиды (АТР и др.) и другие малые молекулы. Это выборочное высвобождение нуклеотидов выполняется без высвобождения ферментов из клеток, и анализ нуклеотидов может быть проведен без нежелательного ферментативного гидролиза.

К образцу с высвободившимися нуклеотидами добавляют АТР - реагент, состоящий из люциферина и люциферазы светляков, и измеряют биолюминесцентный сигнал (I). Рассчитывают концентрацию микробного АТР по калибровочной зависимости (зависимость интенсивности свечения от концентрации АТР), а затем по зависимости количества микробных клеток от концентрации АТР определяют степень загрязненности.

Метод определения качества пищевых продуктов и напитков по показателю их бактериологического загрязнения весьма популярен и используется в различных областях пищевой индустрии [[19]]. Так, например, разработаны методы оценки качества молока [[20], [21], [22], [23]], пива [[24]], питьевой воды [[25], [26]], мяса [[27]]. Разработан метод, позволяющий оценивать содержание соматических клеток в молоке, как диагностический показатель мастита коров

[28]. Причем в данном случае используется специальный агент, осуществляющий лизис только соматических, но не бактериальных клеток, что позволяет измерять содержание АТР соматических клеток, пропорциональное их количеству. Предложены методы оценки гигиенической чистоты рабочих поверхностей и оборудования для разделки мяса и овощей на заводах [29], в пищеблоках больниц [30], молокоперерабатывающих предприятиях [31]. Благодаря развитому техническому воплощению идеи определения бактериальной загрязненности по количеству АТР, возможно использование подобных методов и в домашних условиях, например, для определения чистоты рук, столов [32].

Кроме люциферин-люциферазной системы светляков существует принципиальная возможность проводить анализ микробного загрязнения с помощью биолюминесцентной системы светящихся бактерий [33]. В этом случае анализ будет основан на определении содержания в живых клетках таких метаболитов как флавинмононуклеотид (FMN) или никотинамидадениндинуклеотид (NADH).

1.5. Биолюминесцентная ферментативная система светящихся бактерий

Биолюминесценция светящихся бактерий осуществляется в результате ферментативного окисления восстановленного флавинмононуклеотида ($FMNH_2$) и длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) кислородом воздуха в присутствии люциферазы (L) [Error: Reference source not found].

Несмотря на незначительные различия в структуре люцифераз различных видов бактерий все они представляют собой αβ-гетеродимер, состоящий из двух гомологичных субъединиц (α и β), молекулярная масса которых составляет 40 и 35 кДа соответственно (Рис. 5). α- и β-субъединицы очень похожи и принимают форму скрученного бочонка ($[\beta/\alpha]_8$) [34, 35, 36]. Две субъединицы связаны большой соприкасающейся поверхностью. Активный центр фермента

расположен, главным образом, на α-субъединице. При этом в активном центре либо в непосредственной близости от него содержатся реакционноспособные сульфгидрильные группы [37].

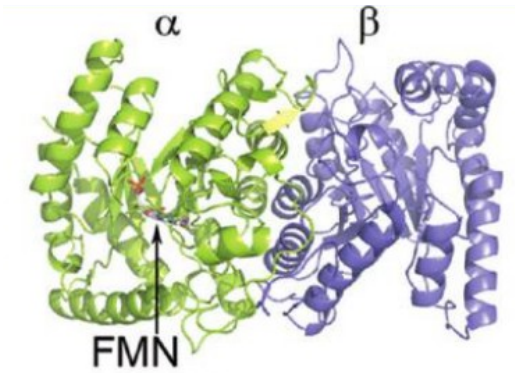


Рисунок 5 – Структура бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi* [Error: Reference source not found]

Ранее было установлено, что β-субъединица участвует во взаимодействии восстановленного флавина с люциферазой и существенна для высокого квантового выхода. В результате исследований кристаллической структуры люциферазы в комплексе с FMN было обнаружено, что между субъединицами существует специфический контакт, в который вовлечены аминокислотные остатки, входящие в состав подвижной петли α-субъединицы, и остаток тирозина, расположенный в 151-ом положении β-субъединицы. Подвижная петля граничит непосредственно с активным центром, и её связь с β-субъединицей объясняет эффект стабилизации активной формы фермента [Error: Reference source not found].

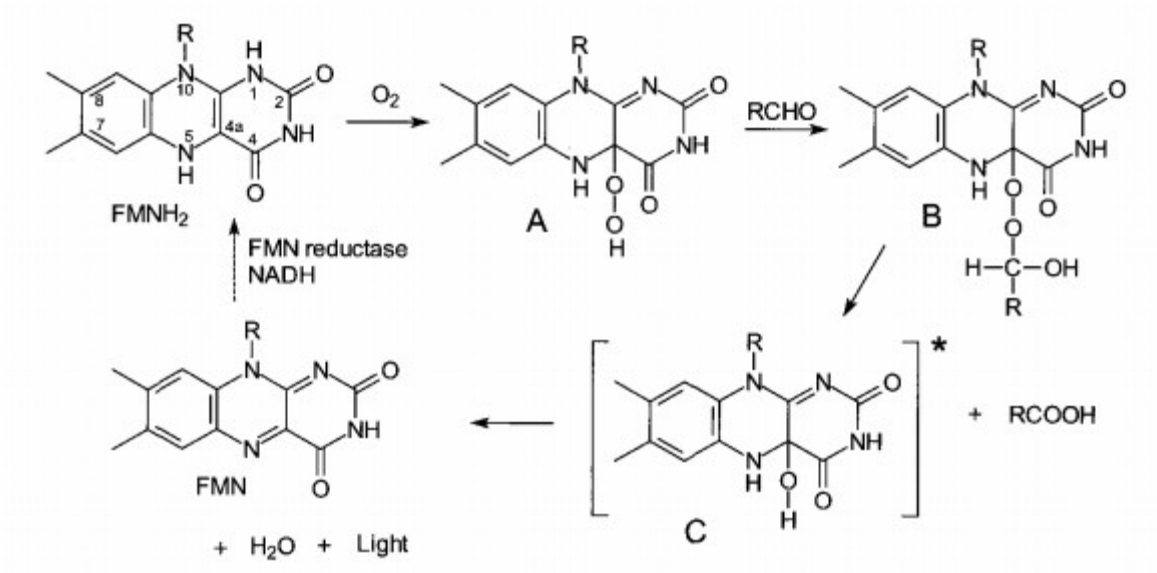


Рисунок 6 – Механизм биолюминесцентной реакции бактерий [Error: Reference source not found]

На рисунке 6 представлен механизм биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой [38]. На первом этапе реакции после связывания люциферазы с восстановленным флавинмононуклеотидом ($FMNH_2$) под действием молекулы кослорода происходит отщепление протона от N1 атома и пероксидное окисление четвертого атома углерода (C4) с образованием интермедиата A (пероксифлавин). Интермедиат A взаимодействует с длинноцепочечным альдегидом, образуя интермедиат B. На следующем этапе происходит окисление альдегида до жирной кислоты с одновременным образованием возбуждённого гидроксифлавина (интермедиат C), при переходе которого в основное состояние образуется FMN и вода и происходит испускание света. Все три переходные формы (интермедиаты) связанны с люциферазой [39, 40]. Обобщённая схема данной реакции имеет следующий вид:

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \xrightarrow{\text{люцифераза}} FMN + RCOOH + H_2O + h\nu, \qquad (8)$$

где FMN и $FMNH_2$ – флавинмононуклеотид в окисленной и восстановленной форме соответственно, RCHO и RCOOH длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая карбоновая кислота.

Фотоэффективность реакции светоизлучения бактерий около 10 %, pH оптимум ферментов биолюминесцентной системы составляет 7.0, максимальное излучение света наблюдается на длине волны 490 нм [41].

Поскольку автоокисление $FMNH_2$ происходит очень быстро (менее 1 с [42]), в клетке существует сопряжение люциферазной реакции с реакцией восстановления FMN, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой (R):

$$FMN + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза}} NAD^+ + FMNH_2, \qquad (9)$$

где NADH и NAD^+ - восстановленная и окисленная формы никотинамидадениндинуклеотида.

NADH:FMN-оксидоредуктаза является флавопротеином, состоящим из двух одинаковых полипептидных цепей длиной 218 аминокислотных остатков (Рис. 7) [43]. Молекулярная масса NADH:FMN-оксидоредуктазы 50 кДа. Фермент катализирует реакцию восстановления FMN, путем переноса электронов с донора NADH или NADPH по пинг-понг механизму [Error: Reference source not found].

В мировой практике биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза - люцифераза используется для разработки специфических методов анализа различных метаболитов и активности ферментов [44]. Помимо этого, ферментативные системы светящихся бактерий используют в качестве тест-объекта для определения интегральной токсичности различных сред [45, 46]. На данный момент создана сигнальная система ферментативных тестов, т.е. комплекс ферментативных тестов, чувствительных к различным группам поллютантов, который включает сопряженные системы алкогольдегидрогеназа - NADH:FMN-оксидоредуктаза - люцифераза и трипсин - NADH:FMN-оксидоредуктаза - люцифераза, применяющиеся для мониторинга природных и

лабораторных водных экосистем [47], а также анализа токсичности ряда пестицидов [48]. Помимо этого биолюминесцентные ферментативные системы используют для мониторинга радиационной токсичности, оценки эффективности детоксикации природными гуминовыми веществами, для решения спектра аналитических задач в медицине, анализа стресса в растениях по содержанию пиридиновых нуклеотидов, а также являются весьма перспективными для анализа качества пищевых продуктов [49]

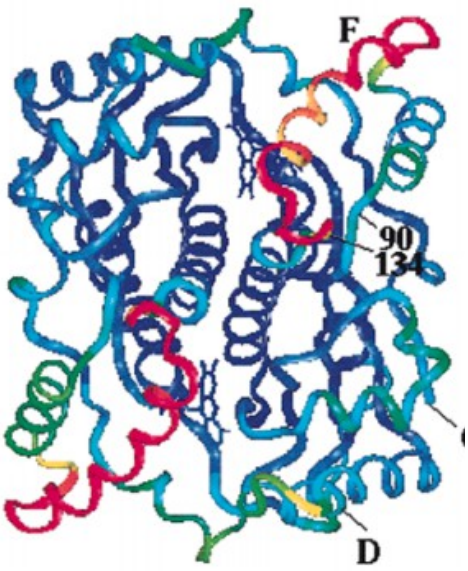


Рисунок 7 – Структура NADH:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio fischeri* [Error: Reference source not found]

Анализ микробного загрязнения с использованием биферментной системы светящих бактерий может быть основан на определении концентрации FMN или NADH, поскольку они являются одними из основных метаболитов живых клеток и их содержание пропорционально количеству бактерий в образце.

Аналогично методу, основанному на измерении ATP, при определении FMN к образцу необходимо будет добавить компоненты реакционной смеси – ферменты (L + R), альдегид, NADH и измерить биолюминесцентный сигнал (I). Концентрацию микробного FMN можно определить по калибровочной зависимости, а затем по зависимости количества микробных клеток от

концентрации FMN определить степень загрязненности. Анализ микробного загрязнения, основанный на определении NADH, будет отличаться от предыдущего лишь составом реакционной смеси, которая будет включать ферменты (L + R), альдегид и FMN.

1.6. Методы стабилизации ферментов

Несмотря на преимущества использования биолюминесцентных тестов широкое распространение существующих биолюминесцентных методов анализа ограничивают такие факторы как нестабильность ферментативной системы во время использования, ограниченный срок хранения реагентов для анализа, необходимость создания микроокружения для ферментов (pH, температура и др.). В то же время биолюминесцентные ферментативные методы обладают возможностью варьирования микроокружения ферментов для получения ферментативных препаратов, обладающих высокой каталитической активностью, сохраняющих стабильное свечение при длительном хранении и обеспечивающих возможность автоматизации анализов путем использования стабилизированных препаратов ферментов. Из литературы известно множество способов стабилизации ферментов, однако наиболее популярным является иммобилизация [Error: Reference source not found].

Иммобилизованными называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ по сравнению со свободными молекулами. Прежде всего, такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Все перечисленное обеспечивает высокую экономичность,

эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты [50].

Выделяют три традиционных метода иммобилизации ферментов: связывание с носителем, инкапсулирование и сшивка (рис.8).

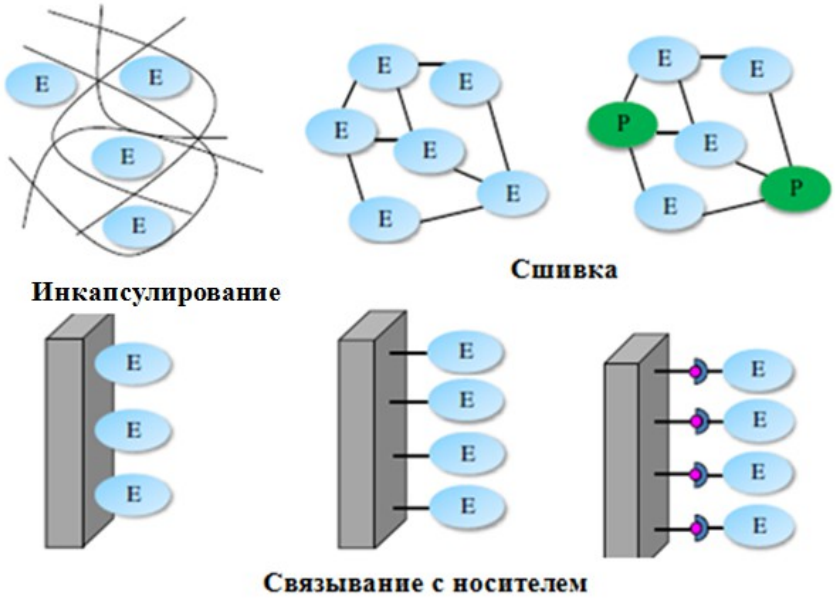


Рисунок 8 – Методы иммобилизации ферментов [51]

Связывание с носителем может быть физической (гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса), ионной или ковалентной природы. Физическое связывание достаточно слабое, чтобы удержать фермент на носителе. Однако адсорбция люциферазы и поли-L-лизина на непористые стеклянные палочки позволяет проводить последовательно десять измерений, с сохранением 90% активности фермента [52]. Ионное и ковалентное связывания более сильные. В качестве носителей используют синтетическую смолу, биополимеры или неорганические полимеры, например кремния или цеолита. Существенным недостатком подобных методов является довольно часто встречающееся необратимое ингибирование ферментов в результате взаимодействия с носителем. В этом случае фермент и носитель становятся непригодными для использования. Так, часто используют агарозу или сефарозу, активированные цианоген бромидом. Иммобилизованные рекомбинантные

люциферазы *P pyralis* и *L Mingrelica* сохраняют свою активность, при этом иммобилизация не влияет на спектр биолюминесценции, однако происходит снижение K_m как для люциферина, так и для ATP. Недостатком метода с использованием активированного цианоген бромидом носителя является его высокая токсичность.

Перекрестное связывание (сшивку) ферментных агрегатов или кристаллов с бифункциональным реагентом используют для подготовки микрочастиц, не связанных с носителем. Использование носителя неизбежно ведет к изменению активности, в связи с введением большой части некаталитического балласта (от 90 до 99%), что приводит к снижению пространственно-временной продуктивности. Кроме того, иммобилизация на носителе часто приводит к потере более 50 % активности фермента. Поэтому существует возможность проводить иммобилизацию ферментов без носителя, например сшитые ферментные кристаллы (CLECs), и сшитые ферментные агрегаты (CLEAs). Такой подход дает некоторые преимущества: высокую концентрацию фермента при катализе, высокую стабильность и низкую стоимость производства. Однако этот метод имеет и ряд недостатков: низкая активность, плохая воспроизводимость и низкая механическая стабильность. Поэтому его часто совмещают с другими методами [[53]].

Инкапсулирование представляет собой включение фермента в полимерную сетку (гелиевую решетку), созданную, например, органическим полимером. Для инкапсулирования ферментов используют также силиконовый золь-гель и мембранные устройства, такие как полые волокна или микрокапсулы. Существует различие между методами иммобилизации путем инкапсулирования: в одном случае фермент связывается с уже готовым носителем, причем неважно на внешней или внутренней поверхности располагается фермент, второй способ требует синтеза полимерной сети в присутствии фермента [Error: Reference source not found]. Основными преимуществами данного метода являются его простота, универсальность для многих ферментов и даже клеток, значительная стабилизация ферментов.

Фермент, включенный в гель, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения. Однако из-за гелевой структуры носителя может быть затруднена диффузия субстрата к ферменту.

Для иммобилизации люцифераз используют преимущественно полисахаридные или белковые полимеры. В качестве полисахаридных носителей чаще выбирают агарозу [Error: Reference source not found,[54]] или крахмал [[55],[56]]. Использование белков в качестве носителей для иммобилизации представляет интерес, поскольку многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с другими ее компонентами (липидами, белками). Предполагают, что изучение поведения ферментов в белковых матрицах позволяет понять закономерности функционирования ферментов *in vivo*. В качестве белковых носителей используют альбуминовый [[57]] или желатиновый [[58], [59], [60]] гели.

Производство иммобилизованных реагентов для аналитических целей – одно из наиболее перспективных направлений в прикладной энзимологии. Важным преимуществом иммобилизованных ферментов является возможность управления устойчивостью ферментов к действию физических и химических факторов среды путем выбора соответствующего микроокружения.

В биосенсорах иммобилизация не только позволяет биологическому катализатору тесно взаимодействовать с преобразователем, но также помогает в стабилизации биологической системы, тем самым повышая ее работоспособность и увеличивая время ее хранения.

Другим способом стабилизации ферментов является внесение в ферментативные препараты дополнительных специализирующих компонентов [[61]].

Добавки, действующие как стабилизаторы, различаются по механизму действия на ферменты, каталитическую активность которых они направлены сохранить. В основном используются:

— стабилизаторы SH-групп ферментов, например дитиотреитол (ДТТ);

— стабилизаторы, регулирующие гидратную оболочку фермента (осмолиты);

— стабилизаторы, увеличивающие вязкость раствора за счет увеличения общей концентрации белка, например альбумины.

Дитиотреитол (ДТТ) является очень сильным восстанавливающим агентом, который используют для того, чтобы «защитить» SH-группы белков от неконтролируемого окисления и восстановления дисульфидных связей в молекулах белков [62]. ДТТ предотвращает образование неправильных внутримолекулярных и межмолекулярных -S-S- связей, приводящих к формированию димеров и полимеров, биологическая активность которых значительно ниже, чем у мономерных молекул.

При pH 7 ДТТ имеет восстановительный потенциал −0,33 В. Восстановление дисульфидных связей осуществляется путем двух последовательных тиол-дисульфидных обменов. Интермедиат реакции нестабилен, так как вторая тиоловая группа имеет склонность к закрытию кольца и образованию окисленного ДТТ, при этом образуются две восстановленные дисульфидные связи (рис. 9).

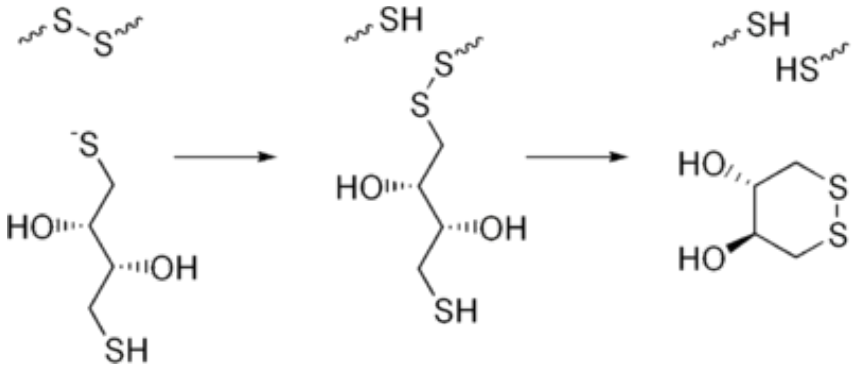


Рисунок 9 - Восстановление дисульфидных связей путем двух последовательных реакций тиол-дисульфидного обмена

Осмолиты – это малые органические молекулы, регулирующие клеточный объем при водном стрессе, который вызван высокой температурой, давлением, изменениями внеклеточных осмотических условий или обезвоживанием. Такие стрессовые условия обычно ставят под угрозу поддержание клеточного объема

путем уменьшения или увеличения количества клеточной воды. Для поддержания объема клеток, существуют механизмы контроля, увеличивающие или уменьшающие внутриклеточные концентрации малых органическх молекул, которые осмотически возвращают объем клетки в нормальное состояние. Помимо осмотического стресса многие причины недостатка воды, перечисленные выше, приводят к денатурации белков, поэтому осмолиты, обеспечивают дополнительную защиту организма или клеточной системы путем предотвращения денатурации белков [63].

Осмолиты, выступающие стабилизаторами, разделяют главным образом на три класса: полиолы (сорбитол, гицерол, сахароза и трегалоза), аминокислоты и их производные (глицин, таурин, пролин, бетаин) и метиламины (ТМАО, холин-О-сульфат, саркозин) (рис.10) [64].

Соединения всех классов взаимодействуют как с пептидным оставом так и с аминокислотными остатками боковых цепей. Осмолиты меняют функции белков путем изменения их стабильности при физиологических условиях за счет повышения температуры плавления и свободной энергии Гиббса, отвечающей за равновесие нативного и денатурированного состояний. Термодинамические расчеты и экспериментальные результаты подтверждают, что мощные сольвофобных эффекты осмолитов на пептидной цепи преобладают, таким образом, что относительная свободная энергия Гиббса развернутого состоянии является менее благоприятной, по сравнению со свернутым состоянием [65].

Гидрофобность белка возрастает с изменением значения pH в кислую сторону в связи с присоединением протона к COO- группам. Осмолиты на основе полиолов, однако, преимущественно отстраняются от гидрофобных поверхностей благодаря сольвофобным взаимодействиям между гидрофобными и OH- группами присутствующих в полиолах [Error: Reference source not found, 66].

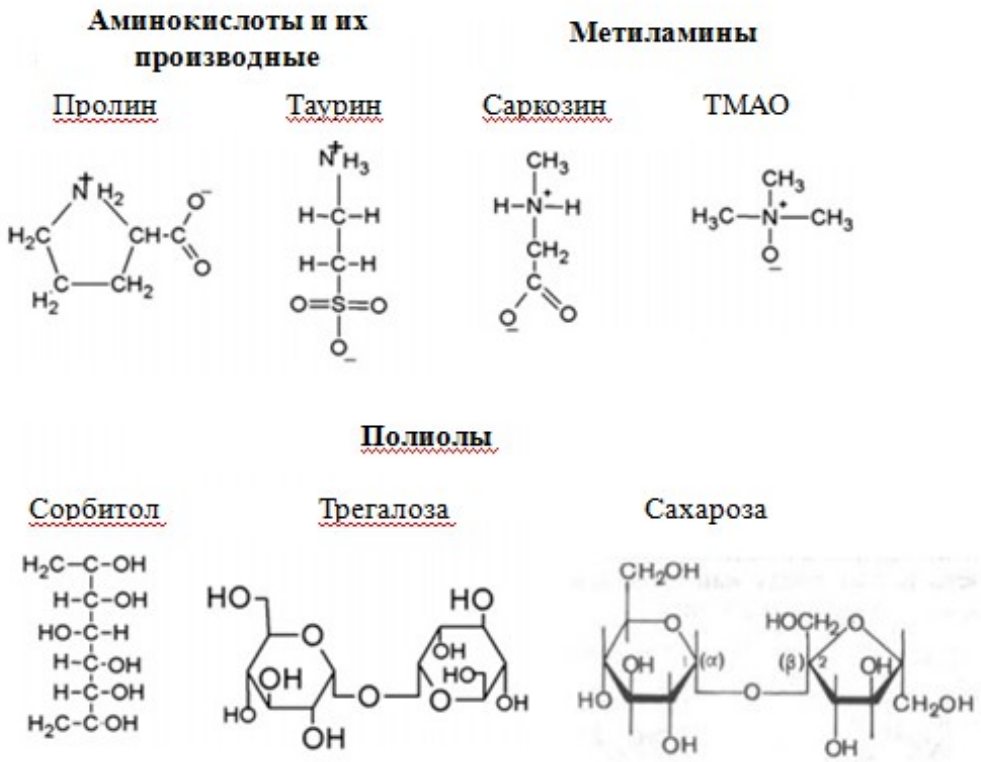
Одним из наиболее часто используемых осмолитов является сахароза. Она относится к классу низко молекулярных соединений, вырабатываемых

клетками с целью защитить белки против вредного воздействия жестких условий окружающей воды, солей, холода и теплового стресса. Она широко применяется *in vitro* в качестве добавки к белковым составам, чтобы защитить лабильные белки от вредного воздействия высокой температуры, заморозки и сушки [[67]].

Люцифераза является нестабильным ферментом и теряет свою активность довольно быстро, особенно при высоких температурах. Однако ранее было показано, что сахароза и трегалоза влияют на стабильность фермента, его кинетические свойства и структуру [Error: Reference source not found]. Так активность фермента при высоких температурах увеличивается в присутствии сахарозы и трегалозы, при этом температурный оптимум изменятся с 25 до 30°C, что может быть связано с увеличением поверхностного натяжения и жесткости белка. Присутствие молярных концентраций сахаров повышает жесткость белка путем увеличения вязкости среды. Более того, в присутствии стабилизаторов снижается скорость спада, которая связана с агрегационным ингибированием, одним из основных механизмов необратимой термоинактивации [[68]].

Еще один метод стабилизации, который предотвращает термоинактивацию и способствует увеличению времени хранения ферментов - стабилизация за счет увеличения общей концентрации белка, путем добавления альбуминов. В организме альбумин играет роль универсального переносчика различных веществ, таких как жирные кислоты, метаболиты, ионы и др. [[69], [70]].

Рисунок 10 – Химические структуры представителей трех классов осмолитов:



аминокислоты, метиламины, полиолы

Молекула сывороточного альбумина состоит из трех доменов, состоящих преимущественно из α-спиралей [71], и имеет сердцеобразную форму с несколькими сайтами связывания (рис. 11). Высокая стабильность молекулы обеспечивается за счет наличия 17 дисульфидных мостиков.

Среди альбуминов наиболее часто используют бычий сывороточный альбумин (БСА) [72], представляющий собой нейтральный белок с молекулярной массой 64 кДа [73]. В лабораторной практике БСА используют в качестве стандарта для многих процедур, включая изготовление вакцин, антигенные тесты, иммунологические тесты ELISA и др., а также как стандарт молекулярного веса [Error: Reference source not found]. Кроме того БСА используют в качестве стабилизатора других белков, в частности люцифераз [74]. Так, было показано, что БСА помогает сохранить высокую активность люциферазы светляков *Luciola praeusta* в течение 90 дней [75]. А иммобилизованная совместно с БСА люцифераза светящихся бактерий сохраняет 90% активности после 6 месяцев хранения [76].

Рисунок 11 - Структура бычьего сывороточного альбумина [Error: Reference source not found]

Помимо стабилизации за счет увеличения вязкости раствора, предполагается, что альбумины являются «переносчиками» ферментов и/или субстратов, так как при использовании веществ небелковой природы для увеличения вязкостных свойств реакционных смесей наблюдаемый выход активности ферментов ниже по сравнению с растворами, содержащими альбумины. Так же известно, что действие веществ, влияющих на активность фермента, при их совместном присутствии складывается неаддитивно.

Таким образом, для сохранения активности ферментативных реагентов следует обращать особое внимание на метод стабилизации. Известно, что для анализа бактериального загрязнения используют препараты, содержащие биолюминесцентную систему светляков в присутствии стабилизирующих добавок [Error: Reference source not found, [77]]. Действительно, чувствительность люциферин-люциферазной системы светляков к бактериальным клеткам достаточно высока и составляет 1000 кл/мл [Error: Reference source not found]. Однако существует принципиальная возможность для использования в анализе степени бактериального загрязнения ферментативной системы светящихся бактерий, что обусловлено тем, что субстратами биолюминесцентной системы бактерий являются такие ключевые метаболиты как NADH и FMN. В данном случае интенсивность свечения биферментной системы светящихся бактерий пропорциональна концентрации данных веществ в реакционной смеси.

Определяя содержание NADH или FMN в исследуемых образцах, возможно сделать вывод о количестве микробных клеток, т.е. степени бактериального загрязнения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы и материалы

В работе использовали лиофилизированные высокоочищенные ферменты люциферазу и NADH:FMN-оксидоредуктазу, а также препарат, содержащий оба фермента (комплект реактивов аналитической биолюминесценции, КРАБ), произведённые в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон лиофилизированного препарата люциферазы (L) содержал 0,5 мг фермента EC 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*), флакон с лиофилизированным препаратом NADH:FMN-оксидоредуктазы (R) содержал 0,15 ед. активности фермента EC 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*), один флакон КРАБ включал в себя оба фермента в таких же количествах. Во флаконы с NADH:FMN-оксидоредуктазой, люциферазой и КРАБ вносили 1, 2 и 4 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера соответственно. Растворы хранили на льду и использовали в течение 8 часов после приготовления. Лиофилизированные ферменты хранились в морозильной камере при температуре от -20 до -60°С.

В работе использовали высокоочищенную мутантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* производства «Люмтек», Россия. Один флакон препарата содержал 1,088 мг фермента в буферном растворе, активность фермента составляла $5{,}5 \cdot 10^{12}$ усл.ед./мг. Препарат хранили при 0°С. Для проведения анализа к 5 мкл раствора фермента добавляли 125 мкл буфера.

Помимо этого использовали следующие реактивы: NADH и FMN («Serva», Германия), тетрадеканаль («Merck», Германия), D-люциферин высокой очистки («Люмтек», Россия), АТР («Sigma», США), крахмал («Sigma», США), желатин («Fluka», Германия), БСА («Sigma», США), ДТТ («Sigma», США), сахароза («Gerbu», Германия).

Для приготовления растворов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,8; буфер, содержащий 0,1 М трис(гидроксиметил)аминометана,

0,002 М ЭДТА и 0,01 М $MgSO_4$ pH 7,8. Для иммобилизации также использовали 0,1 М трис-HCl буфер pH 7.

2.2. Модельный микробный образец

Для анализа чувствительности биолюминесцентных методов к бактериальному загрязнению в качестве модельного объекта использовали клетки *Escherichia coli* (BL21 codon Plus (DE3) RIPL) в стационарной фазе роста, выращенные в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН на среде LB без антибиотиков в течение 18 часов при 30ºС в инкубаторе Excella E25. Титр клеток *E. coli* в исходной культуре определяли по светорассеянию при 590 нм, принимая, что 1 единица оптической плотности соответствует $5 \cdot 10^8$ кл/мл.

2.3. Методики измерения количества FMN и NADH с использованием биферментной системы светящихся бактерий

Зависимость интенсивности свечения биферментной системы от количества FMN определяли следующим образом. В кювету биолюминометра последовательно вносили все компоненты реакционной смеси: 300 мкл 0,05 М буфера, 5 мкл раствора ферментов (КРАБ), 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканаля, 50 мкл 0,25 мМ раствора NADH и 10 мкл раствора FMN различной концентрации; быстро перемешивали, помещали кювету в биолюминометр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (I). Для определения количества FMN в модельном микробном образце вместо раствора FMN добавляли 10 мкл бактериальной суспензии.

Зависимость интенсивности свечения биферментной системы от количества NADH определяли путем последовательного смешивания в кювете биолюминометра всех компонентов реакционной смеси: 300 мкл буфера, 40 мкл раствора люциферазы, 10 мкл раствора NADH:FMN-оксидоредуктазы, 20 мкл 0,0025% раствора тетрадеканаля, 10 мкл 0,1 мМ раствора FMN; измеряли

величину фонового свечения ($I_{фон}$), через 6 минут добавляли 100 мкл NADH различной концентрации, регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (I). Для определения количества NADH в модельном микробном образце вместо раствора NADH добавляли 10 мкл бактериальной суспензии.

2.4. Методика измерения количества ATP с использованием люминесцентной системы светляков

Зависимость интенсивности свечения люминесцентной системы от количества ATP определяли следующим образом. В эппендорфы вносили реакционную смесь на несколько измерений (из расчета 290 мкл буфера, 20 мкл люциферазы, 20 мкл люциферина на одно измерение). Эппендорфы выдерживали в термостате при температуре 25°C в течение различных промежутков времени (от 20 минут до 25 часов). После чего реакционную смесь перемешивали и вносили 330 мкл в кювету биолюминометра. Кювету помещали в биолюминометр и регистрировали величину фоновой интенсивности свечения ($I_{фон}$). Затем в кювету добавляли 20 мкл раствора ATP, перемешивали и регистрировали максимальную интенсивность свечения (I).

2.5. Получение иммобилизованных реагентов

[изъято 2 абзаца]

2.6. Измерение активности иммобилизованных реагентов

[изъят 1 абзац]

2.7. Приборы

Интенсивность биолюминесценции регистрировали на биолюминометре Lumat LB 9507 («Berthold Technologies», Германия). Реакционную смесь выдерживали в термостате «Гном» (НПО «ДНК-технологии», Россия). Приготовление гелей проводили на магнитной мешалке с подогревом («Экрос»,

Россия). Разрушение бактериальных клеток осуществляли с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (Россия).

2.8. Статистическая обработка

Определение каждой экспериментальной точки проводили не менее чем в трёх параллельных измерениях. Ошибку измерения рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2007 методом Т-критерия Стьюдента при уровне значимости равном 0,8.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для создания реагента, позволяющего проводить анализ биологического загрязнения в первую очередь необходимо определить компонентный состав такого реагента, обеспечивающий необходимую чувствительность к бактериальным клеткам.

3.1. Определение чувствительности ферментативной системы светящихся бактерий к микробному загрязнению

Для определения возможности применения сопряженной системы светящихся бактерий для создания дозированного реагента, была определена чувствительность биолюминесцентной системы к нуклеотидам FMN и NADH, являющихся возможными маркерами наличия микробных клеток. Были подобраны оптимальные условия проведения анализа, основанного на определении содержания NADH или FMN в анализируемых образцах.

3.1.1. Подбор условий проведения анализа, обеспечивающих максимальную чувствительность биферментной системы к FMN

Были найдены концентрации компонентов реакции (ферментов и субстратов), позволяющие определять минимальное содержание FMN в анализируемом образце. Для этого варьировали содержание NADH и ферментов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание FMN (5 мкМ). На рисунке 12 представлена зависимость нормированной интенсивности свечения от концентрации NADH и количества люциферазы в реакционной смеси.

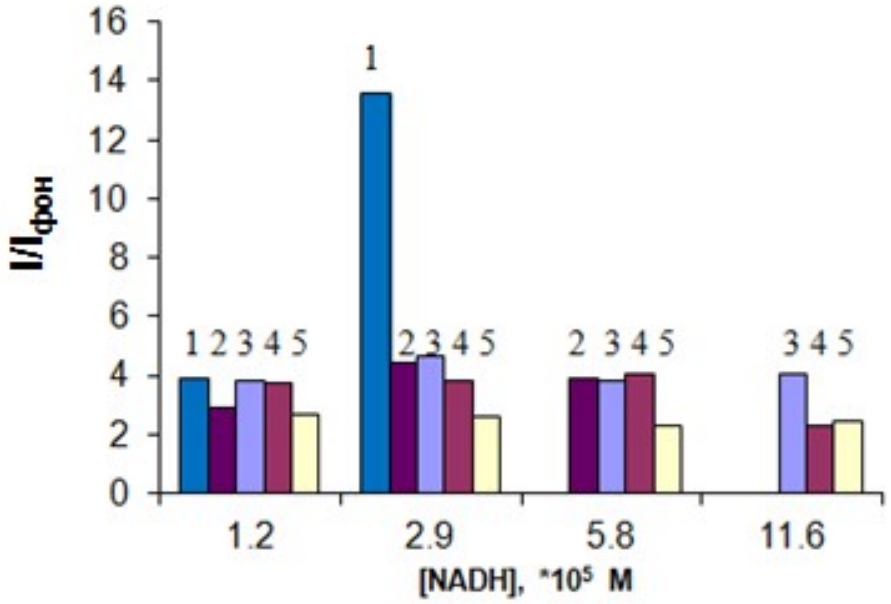


Рисунок 12 - Зависимость нормированной интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN -оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации NADH и количества люциферазы в реакционной смеси: 1 – 0,63 мкг L, 2 – 1,25 мкг L, 3 – 2,5 мкг L, 4 – 3,75 мкг L, 5 – 6,25 мкг L. Концентрация FMN в реакционной смеси составляла 5 мкМ.

Из рисунка видно, что наибольшее значение интенсивности свечения системы достигается при концентрации NADH равной $2{,}9 \cdot 10^{-5}$ М и количестве фермента 0,63 мкг.

На рисунке 13 показана калибровочная зависимость интенсивности свечения биферментной системы от концентрации FMN в реакционной смеси, используемая в дальнейшей работе.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что максимальная чувствительность биферментной системы составляет 1,2 нМ FMN. Линейный отклик системы находится в диапазоне от 1,2 нМ до 10 мкМ. При сравнении полученных результатов с известными из литературы данными о биолюминесцентной системе светляков, чувствительность которой к ATP составляет 0,01 пМ [Error: Reference source not found], чувствительность биферментной системы светящихся бактерий к FMN ниже чувствительности системы светляков к ATP на пять порядков.

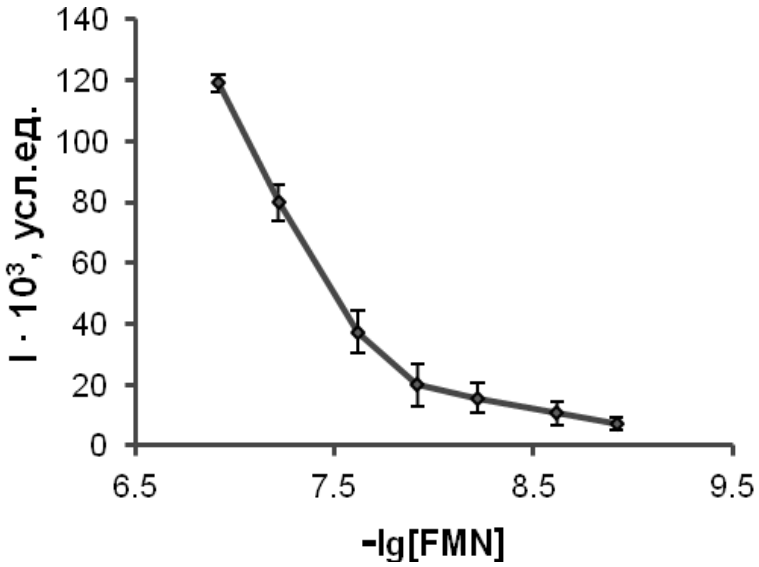


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации FMN в реакционной смеси

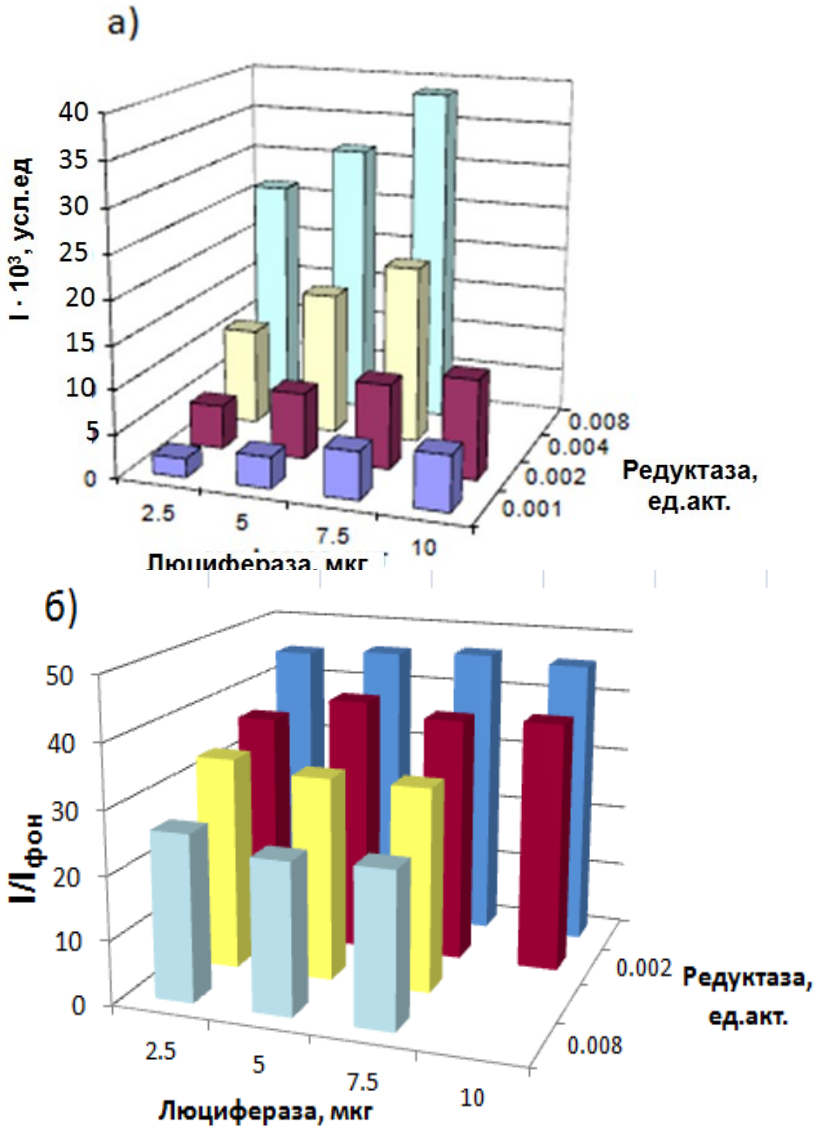
3.1.2. Подбор условий проведения анализа, обеспечивающего максимальную чувствительность биферментной системы к NADH

Для обеспечения максимальной чувствительности биферментной системы к NADH были найдены концентрации ферментов и субстратов, позволяющие определять минимальное содержание NADH в анализируемом образце. Для этого измеряли биолюминесцентный сигнал при добавлении 100 мкл 5 нМ раствора NADH при последовательном варьировании содержания FMN, тетрадеканаля или ферментов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание других компонентов. На рисунке 14 представлены зависимости интенсивности свечения биферментной системы в присутствии NADH от количества люциферазы и оксидоредуктазы. Из полученных данных было выбрано такое соотношение ферментов в реакционной смеси, которое обеспечивает наибольшее свечение: 10 мкг люцферазы и 0,002 ед. акт. оксидоредуктазы.

При проведении данных исследований наблюдалось фоновое свечение, то есть значительный биолюминесцентный сигнал даже в случае отсутствия NADH в реакционной смеси. В дальнейшем для уменьшения фонового

свечения, реакционную смесь предварительно выдерживали в течение 6 минут, после чего запускали реакцию добавлением NADH различных концентраций.

Рисунок 14 – а) Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от количества ферментов в реакционной смеси;



б) зависимость соотношения интенсивности свечения биферментной системы в присутствии NADH и фонового свечения (сигнал/фон) от количества ферментов в реакционной смеси

Путем варьирования концентрации FMN и количества тетрадеканаля в реакционной смеси, были подобраны концентрации этих веществ, обеспечивающие наибольшую интенсивность свечения к NADH (рис. 15, 16). Показано, что для достижения наибольшей чувствительности биферментной системы к NADH концентрация тетрадеканаля в реакционной смеси должна составлять 10^{-4} % ед., концентрация FMN - 1 мкМ.

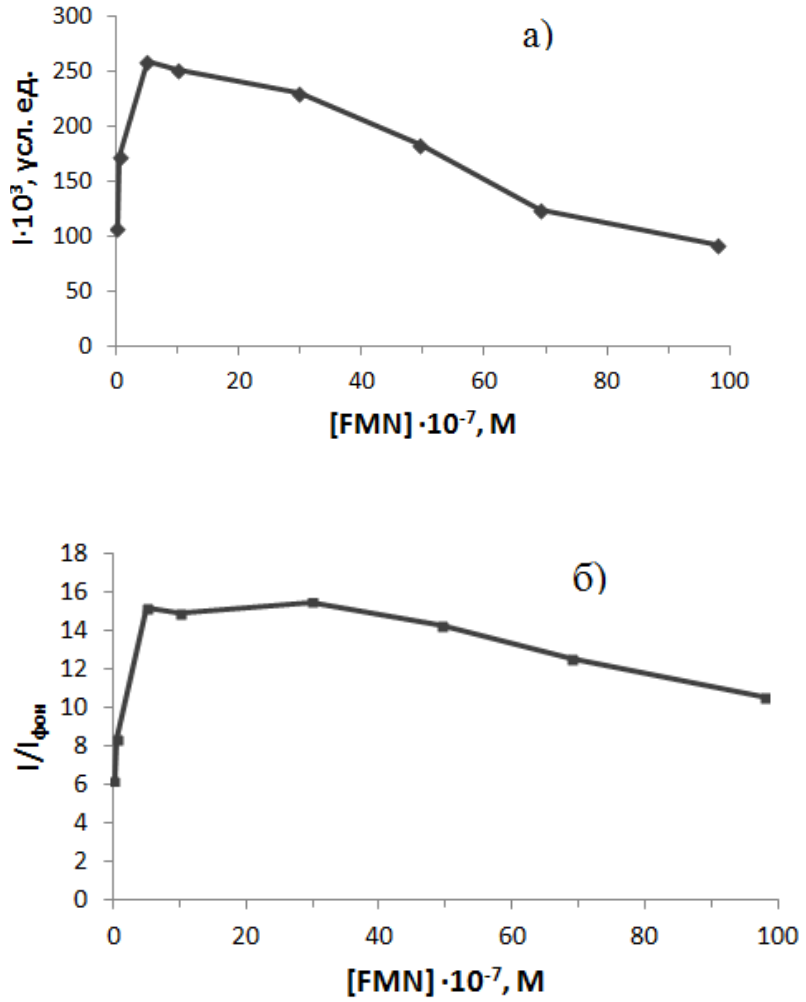


Рисунок 15 – а) Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации FMN в реакционной смеси; б) зависимость нормированной интенсивности свечения биферментной системы (сигнал/фон) от концентрации FMN в реакционной смеси. Концентрация NADH в реакционной смеси составляла 1нМ

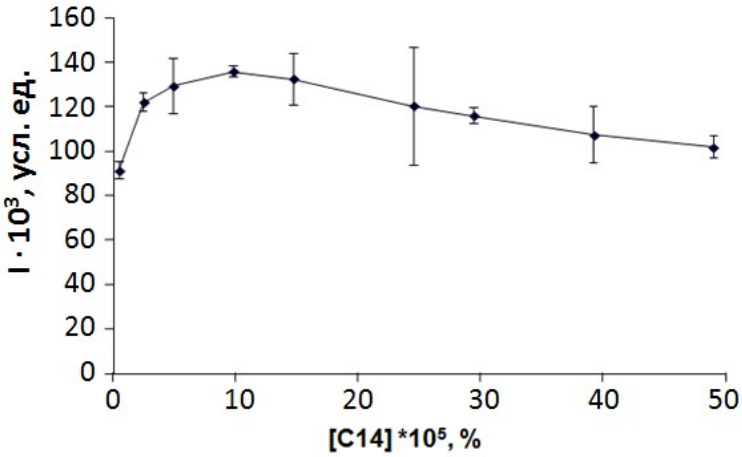
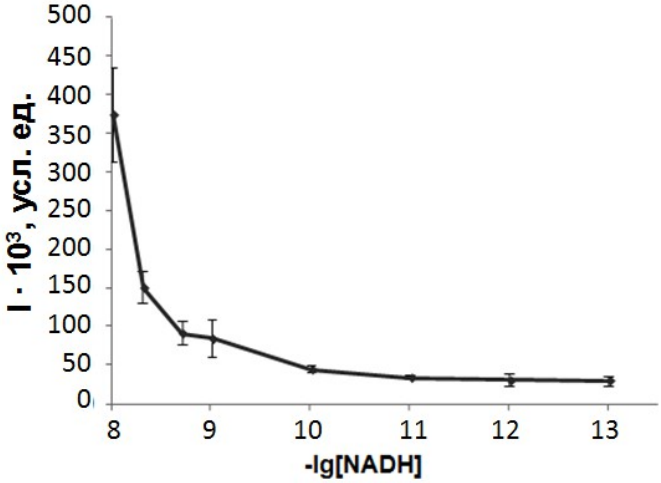


Рисунок 16 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN -оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации тетрадеканаля в реакционной смеси. Концентрации NADH и FMN в реакционной смеси составляли 1 нМ и 2 мкМ соответственно

На рисунке 17 показана калибровочная кривая - зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации NADH в реакционной смеси.

Рисунок 17 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы



NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от концентрации NADH в реакционной смеси

Из рисунка видно, что максимальная чувствительность биферментной системы составляет 0,1 пМ NADH. Линейный отклик системы находится в диапазоне от 0,1 пМ до 1 нМ. Таким образом, чувствительность биферментной

системы светящихся бактерий к NADH ниже чувствительности ферментативной системы светляков к ATP в 10 раз.

3.1.3. Подбор условий пробоподготовки для анализа количества бактерий в исследуемом образце

В качестве модельного микробного образца для определения возможности использования биолюминесцентной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в анализе степени биологического загрязнения использовали клетки *Escherichia coli*. Были подготовлены 3 образца:

- образец №1 - интактные клетки;
- образец №2 - клетки, разрушенные ультразвуковым дезинтегратором при частоте 44 кГц;
- образец №3 - надосадочная жидкость после центрифугирования разрушенных клеток (5000 об/сек, 12 мин).

Образцы добавляли по 10 мкл в реакционную смесь вместо раствора FMN или NADH, согласно методикам описанным выше.

Для построения зависимости интенсивности свечения от количества клеток в образце клеточные суспензии разбавляли в 2, 3, 4, 5, 8, 10, 16 раз. Каждый раз перед добавлением анализируемого образца измерялось фоновое свечение.

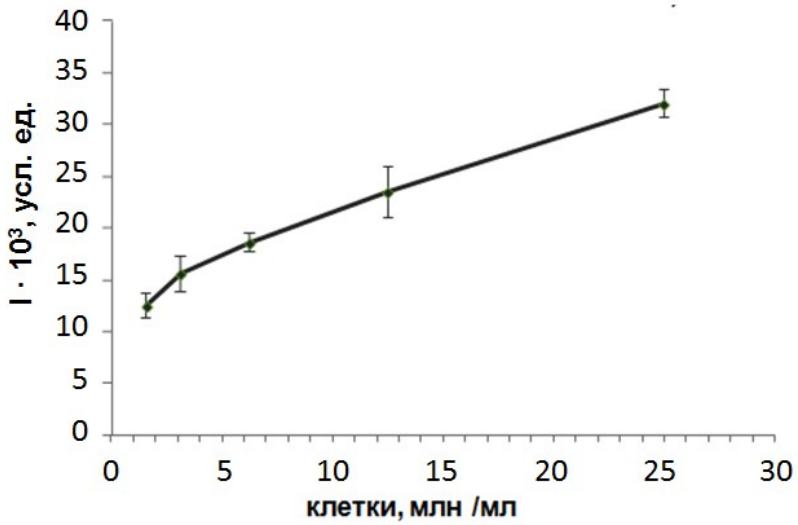
При добавлении в реакционную смесь, адаптированную для анализа количества FMN, образца № 1 (неразрушенных бактериальных клеток) интенсивность свечения биферментной системы не превышала фонового значения, то есть значения интенсивности свечения в отсутствие FMN в реакционной смеси. Таким образом, для анализа микробного загрязнения по количеству FMN в анализируемой среде нельзя использовать неразрушенные клетки, поскольку внеклеточное содержимое не содержит FMN.

При добавлении образца № 1 в реакционную смесь, адаптированную для анализа количества NADH наблюдалась зависимость интенсивности свечения от количества добавляемых бактериальных клеток (рис. 18). Это можно

объяснить наличием внеклеточного NADH или, скорее всего, других восстановителей FMN в среде, что и приводит к появлению биолюминесцентного сигнала.

При добавлении в реакционную смесь образца № 2 интенсивность свечения зависела от количества бактериальных клеток в обоих случаях (рис. 19). Предел чувствительности определяли как количество клеток, при котором интенсивность свечения биферментной системы в присутствии образца в 3 раза превышала интенсивность фонового свечения.

Рисунок 18 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы



NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от количества бактериальных клеток (образец №1) при использовании методики, основанной на количественном анализе содержания NADH

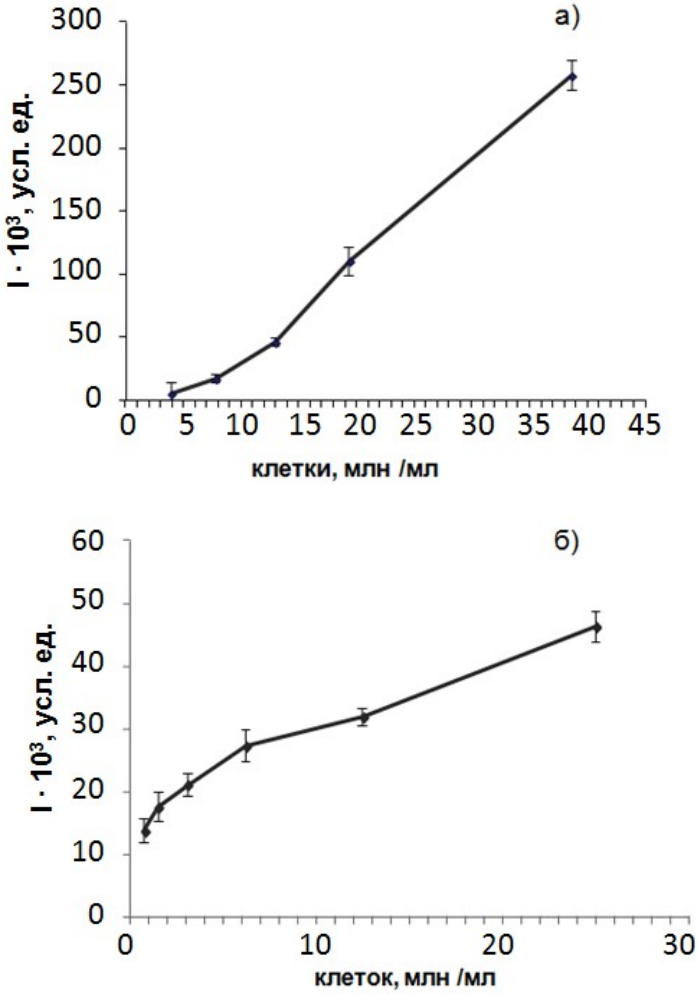
Максимальная чувствительность биолюминесцентной системы составляет 3,9 млн. и 800 тыс. бактериальных клеток при анализах, основанных на определении содержания FMN и NADH соответственно.

Введение в пробоподготовку дополнительной процедуры центрифугирования образца не привела к увеличению чувствительности методов. Максимальная чувствительность биолюминесцентной системы при анализе образца № 3 составила примерно 5 млн. бактериальных клеток (рис. 20).

Таким образом, можно сделать заключение, что для проведения анализа микробного загрязнения с использованием биферментной системы пробоподготовка должна включать разрушение бактериальных клеток ультразвуковым дезинтегратором.

По сравнению с биолюминесцентной системой светляков, предел обнаружения которой составляет 1000 клеток/мл, система светящихся бактерий слабее по чувствительности на три и два порядка при использовании методик, основанных на количественном анализе содержания FMN и NADH соответственно.

Рисунок 19 - Зависимость интенсивности свечения биферментной системы



NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от количества бактериальных клеток в образце № 2 а) при использовании методики, основанной на количественном анализе содержания FMN, б) при использовании методики, основанной на количественном анализе содержания NADH

Поэтому при создании дозированного иммобилизованного реагента для анализа бактериального загрязнения в качестве компонентов реагента была выбрана биолюминесцентная система светляков.

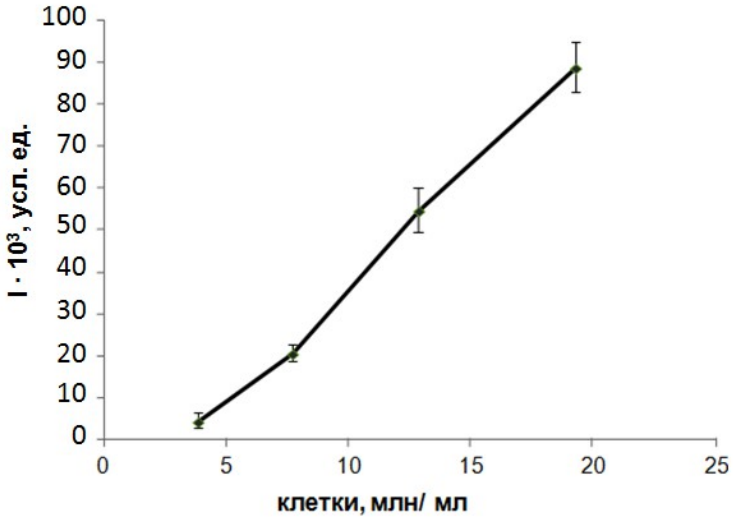


Рисунок 20 - Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза от количества бактериальных клеток в образце № 3 (при использовании методики, основанной на количественном анализе содержания FMN)

3.2. Разработка дозированного реагента на основе люциферазы светляков

[изъято 20 страниц]

Выводы

1. Предел обнаружения количества бактериальных клеток путем определения в исследуемых образцах содержания FMN и NADH ниже чувствительности метода, основанного на определении количества ATP на 3 и 2 порядка и составляет 3,9 млн. кл /мл и 800 тыс.кл/мл соответственно
2. [изъято 2 абзаца]

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Сакович, Г.С. Физиология и количественный учет микроорганизмов: Учебное электронное текстовое издание / Г.С. Сакович, М.А. Безматерных – Уральский гос. тех. ун-т - Екатеринбург. 2005. 40 с.

[2] Копылова, Г.Е. Санитарная микробиология: учебно-методическое пособие / Г.Е. Копылова, Г.А. Кравченко - Нижегор. гос. ун-т. им. Н.И. Лобачевского - Нижний Новгород, 2014. - 43 с.

[3] Khlyntseva, S. V. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides / S. V. Khlyntseva, Ya. R. Bazel, A. B. Vishnikin, V. Andruch // Journal of Analytical Chemistry. - 2009. - V. 64. - N. 7. - P. 657–673.

[4] Lee, D.H. A fluorescent pyrophosphate sensor with high selectivity over ATP in water / D.H. Lee, S.Y. Kim, J.I. Hong //Angewandte Chemie. - 2004. - N 43. - P. 4777–4780.

[5] **Bücking**, W. An electrochemical biomimetic ATP-sensor / **W.Bücking** G.A. **Urban**, T. **Nann** // **Sensors and Actuators B: Chemical**. - 2005. - **V. 104. – I. 1**. - P. 111–116.

[6] Miyamoto, T. Rapid detection and counting of viable bacteria in vegetables and environmental water using a photon-counting TV camera / T. Miyamoto, YI. Kuramitsu, A. Ookuma, S. Trevanich, KI. Honjoh, S. Hatano // Journal of Food Protection. - N. 10. - 1998. - P. 1312-1316(5).

[7] Shama, G. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays / G. Shama, D.J. Malik // International Journal of Hygiene and Environmental Health. - V. 216. – I. 2. - 2013. - P. 115–125.

[8] Venkateswaran, K. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities / K. Venkateswaran, N. Hattori, MT. La Duca, R. Kerna //Journal of Microbiological Methods. – V. 52. – I. 3. – 2003. – P. 367–377.

[9] Inouye, S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions // Cellular and Molecular Life Sciences. - 2010. – N. 67. - P. 387–404.

[10] Marques, S.M. Firefly Bioluminescence: A Mechanistic Approach of Luciferase Catalyzed Reaction s / S.M. Marques, J.C.G Esteves da Silva // IUBMB Life. 2009. - № 61(1). - P. 6–17.

[11] Белковый банк данных [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.rcsb.org

[12] Северин, Е.С. Биохимия: учеб. для вузов. - 2003. - 779 с.

[13] Day, J. C. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin / J. C. Day, L. C. T isi, M. J. Bailey // Luminescence. – 2004. – N. 19. – P. 8–20.

[14] Shimomura, O. Source of oxygen in the CO2 produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin /O. Shimomura, T. Goto, F.H. Johnson // Proc Natl Acad Sci USA. – 1977. – N. 74. – P. 2799–2802.

[15] Pat. 3745090 United States of America. Method of detecting and counting bacteria / G. L. Picciolo, E. W. Chappelle. - № 05/555641; filed 05.03.1975; published 27.07.1976. – 6 p.

[16] ATP Bioluminescence Assay Kit HS II [Электронный ресурс]. – Режим доступа http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11699709001?lang =en&region=RU

[17] Lundovskikh, I. Recombinant Firefly Luciferase in Escherichia coli. Properties and Immobilization / I. Lundovskikh, E. Dementieve, N. Ugarova // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2000. - V. 88. - P. 127-136.

[18] Pat 7422868 United States of America, IPC C12Q 1/02 (20060101) C12N 1/06 (20060101). Microbial ATP extraction and detection system / F. Fan, B. Butler, K. V. Wood; assignee Promega corporation. – № 11/173092; filed 1.07.05; published 9.09.08.

[19] Bottari, B. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP / B.Bottari, M. Santarelli, E. Neviani // Trends in Food Science & Technology. – 2015. - N. 44. – P. 36-48.

[20] Samkutty, P.J. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence / P.J. Samkutty, R.H. Gough, R.W. Adkinson // McGrew Food Prot. - 2001. - V.64. - N 2. - P. 208-212.

[21] Фрунджян, В. Г. Биолюминесцентное определение общей бактериальной обсемененности сырого молока / В. Г. Фрунджян, Н. Н. Угарова // Вестн. Моск. ун-та. Сер . 2. Химия. - 2000. - Т. 41. - № 6. – С. 407-

410.

[22] Li, C. Research on rapid detecting microbial count in raw milk with ATP bioluminescence / C. Li,G.Huo, D.Wang, F. Wang // Journal of Northeast Agricultural University. – 2008. – N. 07.

[23] Lian, Yz. Research of rapid detecting microbial count in raw milk with ATP bioluminescence technique / Yz.Lian, J. An, Y. Li, Y. Li, Y. Hou, N. Liu // Chinese Journal of Health Laboratory Technology. – 2009. – N.04.

[24] Takahashi, T. Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStar-RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. Rapid Microbe Detection System / T. Takahashi, Y. Nakakita, J. Watari, K. Shinotsuka // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2000. - V.64. - N 5. - P.1032-1037.

[25] Frundzhyan, V. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water / V. Frundzhyan, N. Ugarova // Luminescence. - 2007. - V.22. – N. 3. - P. 241-244.

[26] Wu, Hq. Rapid detection of total bacterial amount in drinking water by ATP biolumincent method / Hq. Wu, C. Li, Jm. Zhang Ju-mei,Qp.Wu //Chinese Journal of Health Laboratory Technology. – 2009. – N. 09.

[27] Wu, Hq., Study on the detection of meat fresh degree by ATP bioluminescence / Qp. Wu, Jm. Zhang, Cs. Li // Chinese Journal of Health Laboratory Technology. - 2006. – N. 08.

[28] Frundzhyan, V.G. Improved bioluminescent assay of somatic cell counts in raw milk / V.G. Frundzhyan, I.M. Parkhomenko, L.Y. Brovko, N.N. Ugarova // J Dairy Res. - 2008. - V.75. - N 3. - P.279-283.

[29] Corbitt A.J., Bennion N., Forsythe S.J. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry // Lett. Appl. Microbiol. 2000. - V.30. N 6. - P.443-447.

[30] Zambrano, A.A. Assessment of hospital daily cleaning practices using ATP bioluminescence in a developing country / A.A. Zambrano, A. Jones, P. Otero, M.C. Ajenjo, J.A. Labarca // Braz J Infect Dis. – 2014. – N. 18(6). – P. 675-677.

[31] Vilar, M.J. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment / M.J. Vilar, J.L. Otero, F.J. Diéguez, M.L.

Sanjuán, E.Yus. Rodríguez //Int. J Food Microbiol. - 2008. - V. 125. - N 3. - P. 357-361.

[32] Larson, E.L. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home / E.L. Larson, A.E. Aiello, C. Gomez-Duarte, S.X. Lin, L. Lee, P. Della-Latta, C. Lindhardt // Food Microbiology 2003. - V.20. N 6. - P. 735-739.

[33] Mei, C. Quantitative detection of NADH by in vitro bacterial luciferase bioluminescent / C. Mei, J. Wang, H. Lin, J. Wang // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2009. – N. 49(9). - P.1223-1228.

[34] Fisher, A.J. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from Vibrio harveyi at 2.4 Å resolution / A.J. Fisher, F.M. Raushel, T.O. Baldwin, I. Rayment // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – P. 6581-6586.

[35] Fisher, A.J. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions / A.J. Fisher, T.B. Thompson, J.B. Thoden, T.O. Baldwin, I. Rayment // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 21956-21968.

[36] Campbell, Z.T. Crystal structure of the bacterial luciferase / Flavin complex provides insight into the function of the β subunit / Z.T. Campbell, A.W. Weichsel, W.R. Montfort, T.O. Baldwin // Biochemistry. – 2009. – V. 48. – P. 6085-6094.

[37] Петушков, В.Н. Термоинактивация бактериальной люциферазы / В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, В.А. Кратасюк, П.И. Белобров // Биохимия. – 1982. – Т. 47. – Вып. 11. – С. 1773-1777.

[38] Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical principles and methods // World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012. – 470 p.

[39] Hastings, J.W. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J.W. Hastings, Q.H. Gibson // J. Biol. Chem. – 1963. – V. 238. – P. 2537-2554.

[40] Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009.

[41] Суковатая, И.Е. Кинетические методы исследования биологических процессов. 2. Определение кинетических параметров и типов взаимодействия

ферментов с эффекторами: метод. Указания / И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк. - Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2007. - 25 с.

[42] Lee, J. Structure and spectra in bioluminescence [Электронный ресурс] / J. Lee, E.S. Vysotski. – Режим доступа: http://photobiology.info

[43] Koike, H. 1.8 A crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins / H. Koike, H. Sasaki, T. Kobori, S. Zenno, K. Saigo, M.E. Murphy, E.T. Adman, M. Tanokura // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 280(2). – P. 259-273.

[44] Roda, A. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence / A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Guardigli // Trends Biotechnol. – 2004. – V. 22. – P. 295-303.

[45] Кратасюк, В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. - № 21. – С. 3–30.

[46] Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environmental Monitoring and Assessment. - 2012. - V. 185. – I. 7. - P. 5909-5916.

[47] Kratasyuk, V.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova, M.I. Gladyshev, E.B. Khromichek, A.M. Kuznetsov, E.A. Ivanova // Chemosphere. -2001. - V. 42. – I. 8. - P. 909–915.

[48] Vetrova, E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Remmel, S. Kotova, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // Luminescence. - 2007. - V. 22. – I. 3. – P. 206–214.

[49] Физика и химия биолюминесценции : Учебное пособие / В.С. Бондарь [и др.] ; ред. О. Шимомура, И. И. Гительзон. - Красноярск : Сиб. федер. ун-т. - 2012. - 218 с.

[50] Биотехнология : учеб. пособие. Иммобилизованные ферменты / Березин И.В. [и др.]; М.: Высшая шкю - 1987. -159 с.

[51] Sassolas, A. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors / A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier // Biotechnology Advances. - 2012. – N. 30.

– P. 489–511

[52] Kratasyuk, V.A. Polymer immobilized bioluminescent systems for biosensors and bioinestigations / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova // Introduction to polymeric biomaterials. Chapter 9. / R. Arshady. – 2003. – P. 301-343.

[53] Sheldon, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance / R. A. Sheldon // Advanced Synthesis and Catalysis. - 2007. – 349. - P. 1289-1307

[54] Пат. 2164241 Российская Федерация, МПК C12Q1/66, C12N11/12. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата / заявитель и патентообладатель Е.И. Дементьева, Г.Д. Кутузова, И.А. Лундовских, Н.Н. Угароваю - № 99108831/13; заявл. 22.04.1999 ; опубл. 20.03.2001.

[55] Esimbekova, E. N. Design of Multicomponent Reagents for Enzymatic Assays / E. N. Esimbekova. V. I. Lon.shakovaMukina, A. E. Bezrukikh, V. A. Kratasyuk // Biochemistry, biophysics and molecular biology. – 2015. - V. 461. - N. 4. - P. 472–475.

[56] Bezrukikh, A. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN–oxidoreductase–luciferase / A. Bezrukikh, E. Esimbekova , E. Nemtseva, V. Kratasyuk, O.Shimomura // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2014. – V. 406. – I. 23, P. 5743-5747.

[57] Rodriguez, O. Immobilized bacterial luciferase for microscale analysis of creatine kinase activity / O. Rodriguez, G. G. Guilbault // Enzyme and Microbial Technology. -1981. – V. 3. – I. 1.- P. 69-72.

[58] Ломакина, Г.Ю. Влияние желатины на свойства люциферазы Luciola mingrelica / Г.Ю. Ломакина, А Е. Безруких, Н.Н. Угарова // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. - 2012. - Т. 53. - № 1. – С.12-17.

[59] Chittock, R.S. Modulation of Firefly Luciferase Bioluminescence at Bioelectrochemical Interfaces / R.S. Chittock , A. Glidle , C. W. Wharton , N. Berovic , T. D. Beynon, J. M. Cooper //Anal. Chem. – 1998. – N. 70 (19). – P. 4170–4176.

[60] Bezrukikh, A. Thermoinactivation of coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in gelatin / A. Bezrukikh, E.

Esimbekova, V. Kratasyuk // Journal of SibFU. Biology. – 2011. - V. 4. – N. 1. – P. 64-74.

[61] Есимбекова, Е.Н. Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, И.Г. Торгашина, В.А. Кратасюк // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – Вып. 6. – С. 853-859.

[62] Lukesh, J. C. A potent, versatile disulfide-reducing agent / J. C. Lukesh, M. J. Palte, R. T. Raines. // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – N.134 (9). – P. 4057–4059.

[63] Auton, M. Osmolyte effects on protein stability and solubility: A balancing act between backbone and side-chains / M. Auton, J. Rösgen, M. Sinev, L. M. F. Holthauzen, D. W. Bolen // Biophysical Chemistry. – 2011. – N. 159. – P. 90–99.

[64] Singh, L. R. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin / L. R. Singh, N. K. Poddar, T. A. Dar, R. Kumar, F. Ahmad. – 2011. – V. 88. – I. 3-4. – P. 117-125.

[65] Kumar, R. Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability / R. Kumar // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2009. – N. 491. P. 1–6.

[66] Мороз, Н. А. Стабилизация АТФ-реагентов, содержащих люциферазу светляков L. mingrelica, в присутствии полоиолов / Н. А. Мороз, Д. Я. Гурский, Н. Н. Угарова // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. - 2008. – Т. 49, № 2. – С. 86-90.

[67] Cioni, P. Effects of sucrose on the internal dynamics of azurin / P. Cioni, E. Bramanti, G.B. Strambini // Biophysical Journal. – 2005. – V.88. – I. 6. – P. 4213-4222.

[68] Rasouli, S. Effects of sucrose and trehalose on stability, kinetic properties, and thermal aggregation of firefly luciferase / S. Rasouli, S. Hosseinkhani, P. Yaghmaei, A. Ebrahim-Habibi // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – N. 165. – P. 572–582.

[69] Bujacz, A. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen / A. Bujacz, K. Zielinski, B. Sekula // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. - 2014. – V. 82. – I. 9. – P .2199–2208.

[70] Sekula, B. Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid / B. Sekula, K. Zielinski, A. Bujacz // International Journal of Biological Macromolecules. - 2013. – V. 60. – P. 316–324.

[71] Majoreka, K. A. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins / K. A. Majoreka, P. J. Porebskia, A. Dayala, M. D. Zimmermana, K. Jablonskaa, A. J. Stewartd, M. Chruszcza, W. Minor // Molecular Immunology. – 2012. – V. 52. – I. 3–4. – P. 174–182.

[72] Bujacz, A.Structures of bovine, equine and leporine serum albumin / A. Bujacz // Acta Cryst. -2012. – D 68. – P. 1278-1289.

[73] Holowachuk, E.W. Bovine serum albumin: cDNA sequence and expression / E.W. Holowachuk, J.K. Stoltenborg , R.G. Reed, T. Peters // 1991. – №4. – P. 235-240

[74] Пат. WO2010134850 A1 Российская федерация, МПК C12N15/66, C12N15/70, C12Q1/66. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата / Н.Н. Угарова, М.И. Кокшаров, Г.Ю. Ломакина - № PCT/RU2010/000254; заявл. 20.05.2010; опубл. 25.11.10. – 9 с.

[75] Muthukumaran, T. Isolation and characterization of luciferase from Indian firefly, Luciola praeusta / T. Muthukumaran, N. V. KrishnaMurthy, N. Sivaprasad, T. Sudhaharan // Luminescence. – 2014. - V. 29. – I. 1. – P. 20–28.

[76] Lonshakova-Mukina, V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors / V. Lonshakova-Mukina, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – N. 213. – P. 244–247.

[77] Фрунджян, В.Г. Биолюминесцентное определение микробной загрязненности сырого рубленного мяса / В.Г. Фрунджян, Бабунова В.С., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2002. - Т.43. - С. 389-392.