

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
В.А. Кратасюк

/_____
«__» _____ 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

**СОЗДАНИЕ УЛУЧШЕННОЙ κДНК-БИБЛИОТЕКИ ГЕНОВ *METRIDIA LONGA* И ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ В ОТНОШЕНИИ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ**

Руководитель _____ к.б.н., доцент С.В., Маркова

Выпускник _____ О.Ю., Конева

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Создание улучшенной кДНК-библиотеки генов *Metridia longa* и ее функциональный скрининг в отношении биолюминесцентных белков» состоит из 37 страниц, 10 рисунков, 1 таблицы, 26 использованных источников.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИФЕРАЗА, ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК, *METRIDIA LONGA*, кДНК – БИБЛИОТЕКА.

Цель исследования – создание улучшенной кДНК – библиотеки и ее функциональный скрининг в отношении биолюминесцентных белков.

Для выполнения данной работы требовалось решить ряд задач:

- 1) Очистить тотальную кДНК *Metridia longa* от низкомолекулярных фрагментов;
- 2) Получить и охарактеризовать экспрессионную кДНК-библиотеку;
- 3) Провести функциональный скрининг кДНК-библиотеки в отношении биолюминесцентных белков.

Знания о механизме биолюминесцентной реакции и клонирование новых генов биолюминесцентных белков дали толчок развитию новых подходов и методов в биологии, медицине и биотехнологии. Применение биолюминесцентных белков возможно в качестве генетически-кодируемых маркеров в широком спектре методов, например в биолюминесцентном имиджинге *in vivo* и *in vitro*. Однако все имеющиеся репортерные белки имеют те или иные недостатки и ограничения. Поэтому для дальнейшего развития данных технологий необходимы поиски новых биолюминесцентных белков в природе, а также улучшение известных форм с помощью методов белковой инженерии.

Для получения высококачественной кДНК-библиотеки генов рачка *Metridia longa* имеющаяся тотальная кДНК была очищена от низкомолекулярных примесей и клонирована в экспрессионный вектор pTriplEx2, обеспечивающий синтез рекомбинантов во всех трех рамках считывания одновременно. Полученная электропорацией клеток *E. coli* Top10

экспрессионная кДНК – библиотека *M. longa* имела средний размер вставки равный 918 bp и 100% рекомбинантность. Функциональный скрининг библиотеки выявил 21 клон, гены которых кодируют психрофильный вариант люциферазы и два клона теплолюбивый. Целентеразин-связывающий белок использованным методом не обнаружен.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1. 1 Целентеразин- зависимые биолюминесцентные системы.....	7
1. 2 Субстрат- связывающий белок.....	9
1. 3 Выявление новых биолюминесцентных белков.....	11
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	13
2. 1 Материалы.....	13
2. 2 Методы.....	14
2. 2. 1 Реаплификация кДНК-библиотеки.....	14
2. 2. 2 Гель-хроматография кДНК смеси.....	15
2. 2. 3 Приготовление вектора для клонирования.....	15
2. 2. 4 Гель-электрофорез ДНК.....	15
2. 2. 5 Выделение ДНК из геля.....	16
2. 2. 6 Выделение ДНК щелочным лизисом.....	16
2. 2. 7 Лигирование с вектором.....	17
2. 2. 8 Приготовление электрокомпетентных клеток.....	17
2. 2. 9 Электропорация клеток <i>E. coli</i>	18
2. 2. 10 Быстрый скрининг колоний ПЦР.....	18
2. 2. 11 Функциональный скрининг.....	19
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	21
3. 1 Удаление низкомолекулярных фрагментов из смеси кДНК.....	21
3. 2 Очистка тотальной кДНК перед клонированием.....	23
3. 3 Приготовление вектора для клонирования.....	24
3. 4 Создание и анализ экспрессионной кДНК-библиотеки.....	25
3. 5 Функциональный скрининг кДНК-библиотеки.....	27
3. 6 Результаты скрининга кДНК-библиотеки.....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	32
ВЫВОДЫ.....	33
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	35

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция встречается везде, будь то толщи земли, наземная территория или же глубины океана, большая часть обитателей которого способны светиться сами или же использовать свечение других организмов в своих целях. Биологический смысл биолюминесценции напрямую связан со зрительным восприятием сигналов. Свечение используется в качестве коммуникационного агента, как маскировка или как инструмент для отпугивания хищников резкими всплесками света. Некоторые особи используют свет в качестве приманки жертв [25]. Однако, все же свечение живых организмов является прекрасным и загадочным явлением до сих пор до конца неизученным.

Наиболее часто светящиеся организмы встречаются среди морских обитателей. Среди них широко представлены виды, использующие целентеразин как субстрат биолюминесцентных реакций [19]. Наиболее изученными биолюминесцентными белками, использующими целентеразин как субстрат, являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины [23]. Фотопротеины характеризуются наличием субстрат-связывающего белка. Изучение которого открывает нам представление о самом механизме биолюминесцентной реакции.

Человек находит применение явления биолюминесценции для удовлетворения своих потребностей, как пример, в фундаментальных исследованиях клеточных процессов, анализа белок – белковых процессов, а также в биоимиджинге *in vivo* и *in vitro*.

Технологии биоимиджинга направлены на прижизненное исследование процессов в биологических объектах. Проведение масштабных прикладных и фундаментальных исследований в области медицины, фармакологии и биотехнологии требует развития данных технологий визуализации процессов живой клетки.

Большое разнообразие целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков, что предоставляет нам природа, позволяет выбрать оптимальный

репортер для определенных задач и предоставляет материал для дальнейшего совершенствования биоимиджинговых репортеров [5].

На сегодняшний день все имеющиеся репортерные биолюминесцентные системы имеют те или иные недостатки и ограничения. Поэтому для дальнейшего развития данных технологий необходимы поиски новых биолюминесцентных белков в природе, а также улучшение известных форм с помощью методов белковой инженерии.

Целью данной исследовательской работы являлось создание улучшенной кДНК библиотеки генов *Metridia longa* и ее функциональный скрининг в отношении биолюминесцентных белков, в частности целентеразин-связывающего белка.

Выполнение данной работы требовало решения ряда экспериментальных задач, в список которых входило:

- 4) Очистить тотальную кДНК *Metridia longa* от низкомолекулярных фрагментов;
- 5) Получить экспрессионную кДНК-библиотеку *Metridia longa*;
- 6) Охарактеризовать кДНК-библиотеку по степени рекомбинантности и среднему размеру вставки;
- 7) Провести функциональный скрининг кДНК-библиотеки в отношении биолюминесцентных белков;
 - a) Разработать метод скрининга и поиск гена кодирующего целентеразин-связывающий белок (ЦСБ);
 - b) Дополнительно найти новые люциферазные гены с потенциально улучшенными свойствами.

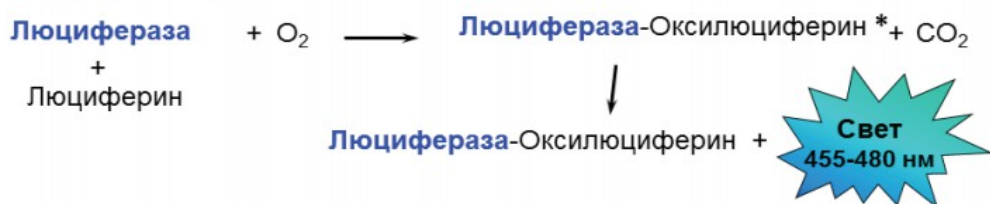
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1 Целентеразин- зависимые биолюминесцентные системы

Целентеразин и его производные относятся к группе имидазолпиразиновых соединений [25]. Он является наиболее распространенным субстратом у морских биолюминесцентных организмов. Назван он так, потому что был впервые обнаружен при изучении биолюминесценции кишечнорастворимых, однако впоследствии открыто, что целентеразин и его производные идентифицированы как субстрат реакции в таких таксономически далеких друг от друга светящихся организмах, как мягкий коралл *Renilla* [8], копеподы [13], рыба *Ventrosema pterotum*, кальмары *Watasenia* и многие другие виды [12].

Несмотря на наличие единого субстрата, в целентеразин-зависимых биолюминесцентных системах представлены оба типа биолюминесцентных реакций: люциферазный и фотопротеиновый. Люциферазный тип реакции – прямое быстрое окисление субстрата люциферина, приводящее к образованию возбужденного оксилуциферина, который переходит в основное состояние с излучением света. Во втором случае фермент способен образовывать с субстратом и кислородом устойчивый фотопротеиновый фермент-субстратный комплекс, существующий длительное время, внутримолекулярная реакция окисления в котором запускается неким внешним фактором. Таким фактором могут быть ионы Ca^{2+} , у Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов [25]. Общий вид механизма двух типов биолюминесцентной реакции схематично изображен на рисунке 1.

1. Люциферазная



2. Фотопротеиновая: Ca²⁺-регулируемые фотопротеины

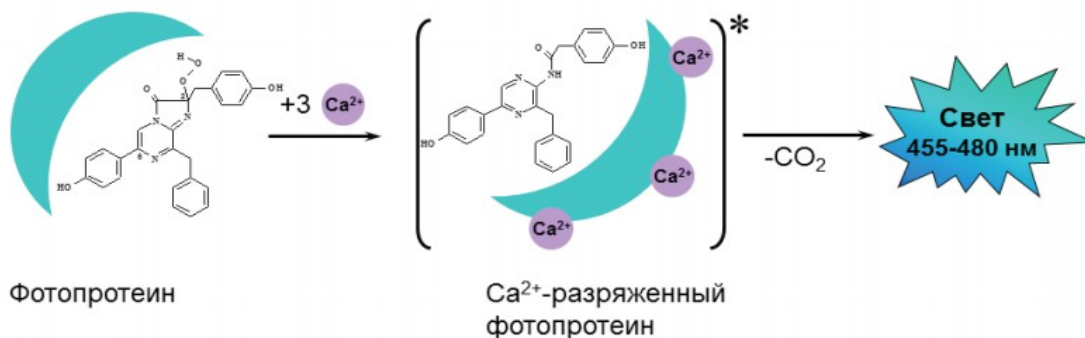


Рисунок 1 – Общая схема двух основных типов билюминесцентной реакции: люциферазной (1) и фотопротеиновой (2) [25]

К целентеразин-зависимому типу билюминесцентной реакции относится и билюминесценция организма *Metridia longa*. Это небольшие, размером около 1,5 мм, холодноводные копеподные рачки. Они способны испускать свечение в голубом спектре за счет секреции эпидермальной железы, локализованной в головной и брюшинной частях тела, в ответ на механическое, электрическое или химическое симулирование реакции [1]. Билюминесценция *Metridia longa* может служить защитным механизмом против хищников, выпуск светящегося комка отвлекает от рачка внимание, что позволяет ему быстро сбежать от опасности [2, 4].



Рисунок 2 – *Metridia longa* [7]

Ранее уже были изучены люциферазы выделенные из *Metridia longa* [11, 13], которые при относительно небольшой молекулярной массе имеют достаточно высокий квантовый выход. Все это в сочетании с его способностью к секреции и высокой стабильностью делает его весьма перспективным для создания на его основе биолюминесцентных репортеров.

Секретируемые репортерные белки являются наиболее перспективными для технологий биоимиджинга, так как их идентификацию можно осуществлять без необходимости разрушения исследуемых клеток. Биолюминесцентный сигнал при использовании секретируемых репортеров возможно регистрировать в межклеточных жидкостях, крови, лимфе и других жидких средах [18].

1. 2 Субстрат- связывающий белок

Функция люциферин-связывающего белка заключается в том, что он связывает субстрат – люциферин, препятствуя его окислению люциферазой. Например, у мягкого коралла *Renilla* высвобождение люциферина для окисления люциферазой инициируется ионами Ca^{2+} , отчего люциферин-связывающий белок *Renilla* получил название Ca^{2+} -зависимого люциферин-связывающего белка. Кальций может связываться с белком по трем сайтам, имеющим высокую степень сродства к нему. Еще один участок используется для присоединения люциферина [10].

На данный момент уже изучены субстрат-связывающие белки наиболее распространенных протист, способных к биолюминесценции – динофлагеллят [21] и коралла *Renilla reniformis* [20].

В биолюминесцентную систему коралла *Renilla* вовлечено, по меньшей мере, три белка: люцифераза, Ca^{2+} -регулируемый целентеразин-связывающий белок и зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), являющийся вторичным эмиттером света [20].

Присоединение Ca^{2+} делает целентеразин доступным для люцифераза-катализируемого окисления молекулярным кислородом [3, 14]. Еще в 70-х биолюминесцентная система *R. reniformis* по большей части была изучена. Все три белка (люцифераза, ЗФБ и ЦБП) вовлеченные в биолюминесценцию *in vivo*, были очищены и охарактеризованы [3, 14, 24].

СВР принадлежит к семейству Ca^{2+} -связывающих белков «EF-hand»-типа и подобно Ca^{2+} -регулируемым фотопротеинам содержит три Ca^{2+} -связывающих петли [9]. СВР содержит одну молекулу связанного целентеразина, которая становится доступной для реакции с люциферазой и O_2 только после связывания Ca^{2+} с СВР. Предполагается, что индуцированные кальцием конформационные изменения в СВР не приводят к высвобождению целентеразина из молекулы белка в среду, а делают субстрат доступным для реакции с ферментом и, скорее всего, это происходит за счет образования белок-белкового комплекса между люциферазой и СВР [3].

В фотопротеиновую биолюминесцентную систему динофлагеллят также входят люциферин, люцифераза и люциферин-связывающий белок. Как полагают, субстрат-связывающий белок необходим для защиты люциферина от самоокисления [15, 22]. Вспышка света инициируется потенциалом действия вдоль мембраны вакуоли, который индуцируется механическим воздействием на клетку, с возможным участием протонных каналов, открывающихся при деполяризации, как у ранее изученных динофлагеллят [17].

Изучение субстрат-связывающего белка дает понимание о самом механизме биолюминесцентной реакции, что, несомненно, важно для

накопления фундаментальных знаний о биолюминесценции и природе в целом.

1. 3 Выявление новых биолюминесцентных белков

Клонирование новых биолюминесцентных белков всегда было нетривиальной задачей. Прежде всего, проводятся исследования биолюминесцентной системы светящегося организма в целом, определяется субстрат реакции свечения, тип реакции и условия ее протекания. Далее делаются попытки очистить люциферазу из природного источника для секвенирования. Развитие современных методов геномного секвенирования позволяет получить полную информацию о последовательности всех кДНК-генов организма и идентифицировать новый ген по частично установленной аминокислотной последовательности, используя компьютерный поиск.

Для клонирования новых биолюминесцентных белков требуется значительное количество органического материала, однако изоляция светящихся организмов, особенно обитающих на большой глубине, очень сложный процесс, поэтому используется метод функционального скрининга клонов экспрессионной кДНК-библиотеки, который возможен, если биолюминесцентную реакцию удалось воспроизвести *in vitro*, и если есть достаточное количество субстрата для поиска. Благодаря современным методам, основанным на полимеразной цепной реакции, можно приготовить экспрессионную кДНК-библиотеку из малых количеств исходного материала.

Ниже, на рисунке 3, изображена общая схема функционального скрининга экспрессионной кДНК-библиотеки. Исследуемую кДНК-библиотеку рассеивают и анализируют группами. Свечение активируют при добавлении субстрата в требуемых условиях для протекания реакции *in vitro*. Далее группу с положительным сигналом делят до индивидуальных клонов, которые несут в себе ген люциферазы или фотопротеина.

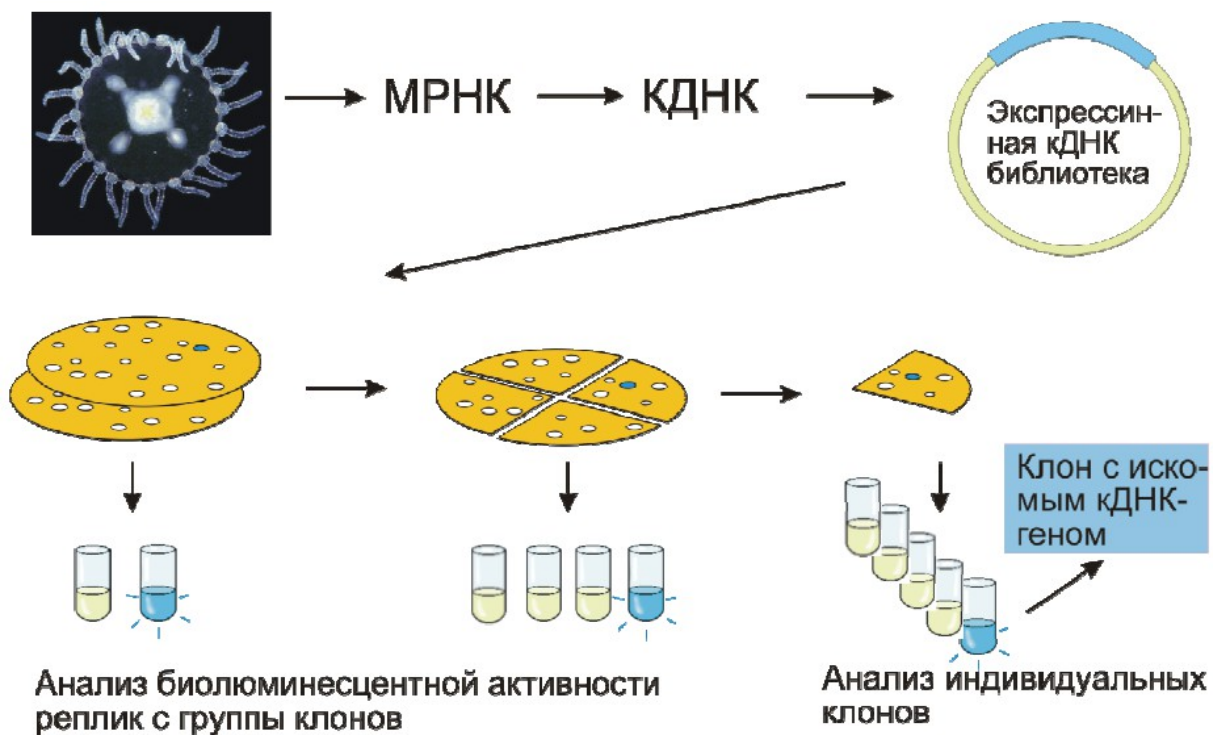


Рисунок 3 – Схема функционального скрининга кДНК-библиотеки [25]

Поскольку очистка протеинов из природного источника – крайне трудоемкий и сложный процесс, функциональный скрининг в настоящее время становится основным методом для поиска новых биолюминесцентных белков [25].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В качестве основы генетической конструкции использовалась плазида pTriplEx2.

Генотип использованного штамма *E. Coli* Top10 – (F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -).

Состав праймеров, использованных для реамплификации:

557 – 5'-CTCCGACCTCTCACAGCGTACAAGCAGTGGTATCAACGC-3';

558 – 5'-CTCCGACCTCTCACAGCGTACATTCTAGAGGCCGAGGC-3'.

Антибиотики: ампициллин, стрептомицин.

При горизонтальном электрофорезе ДНК в агарозном геле применяли:

1% агарозный гель –H₂O (деионизованная), TAE x50 (Трис-ацетатный буфер), агароза, бромистый этидий;

буфер – бромистый этидий, ЕДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота), TAE x50;

маркеры молекулярного веса для анализа ДНК, белков «1 kV DNALadder», «100bp» («NEB»).

Культуральные среды:

LB-среда – на 1 л: 10 г бакто-триптона («Difco»); 5 г дрожжевого экстракта («Sigma»); 7.5 г NaCl; pH 7.0;

LB-агар – на 1 л LB -среды 15 г агара («Difco»);

SOC-среда – на 1 л: 20 г бакто-триптона («Difco»), 5 г дрожжевого экстракта («Sigma»), 0.585 г NaCl, 2.5 мл KCl, дистиллированная вода – до 1 л. После автоклавирования добавили по 10 мл 1М MgCl₂ и 1М MgSO₄, добавили глюкозу до концентрации 20 мМ.

В качестве индуцирующего агента был использован ИПТГ (Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид).

Буферы:

ЦСБ буфер – (50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 0.01% желатин);

LM буфер – (50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 500 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄, 0.01% желатин);

буфер TAE – (0.04 М Tris-HCl pH 8.0, 0.02 М EDTA, pH 8.0).

Наборы для очистки ДНК: «QIAquick PCR Purification Kit» и «QIAquick Gel Extraction Kit» («Qiagen»).

В качестве активатора биолюминесцентной реакции использовали целентеразин («Nanolite»).

Для выявления ЦСБ использовали 100 мМ Дитиотреитол (ДТТ).

Для проведения реакции рестрикции использовали бис(триметилсилил)ацетамид (БСА).

Также были использованы ферменты: SfiI («NEB»), XhoI («NEB»), NdeI («NEB») рестриктазы, ДНК-лигаза («NEB») и Taq полимеразы («NEB»).

2. 2 Методы

2. 2. 1 Реамплификация кДНК-библиотеки

Реамплификацию кДНК-библиотеки проводили на основе метода селективной супрессии ПЦР [26]. В состав реакционной смеси на объем 100 мкл входили 73 мкл деионизованной воды, 10 мкл десятикратного Taq буфера, 5 мкл 4 мМ дНТФ, по 2 мкл оригинальных комплементарных праймеров 558 и 557, 2 мкл Taq полимеразы и 8 мкл кДНК *Metridia longa*. Далее проводили реакцию амплификации в 7 циклов по следующей схеме:

95°C – 1 мин

95°C – 10 сек

68°C – 5 мин

Продукты реакции анализировали гель-электрофорезом. После чего проводили очистку ПЦР-продуктов по протоколу набора «QIAquick PCR Purification Kit».

2. 2. 2 Гель-хроматография кДНК смеси

Очистка кДНК смеси проведена на колонке CHROMA SPIN-400 («Clontech») по протоколу набора «SMART cDNA Library Construction Kit». Фильтрационная смесь собиралась по каплям ~90 мкл в 0.5 мл пробирки. Результат гель-хроматографии оценивали гель-электрофорезом собранных фракций.

2. 2. 3 Приготовление вектора для клонирования

Для приготовления вектора была проведена трансформация клеток E.coli, для чего 0.5 мкл раствора плазмид pTriplEx2 добавили к 25 мкл суспензии клеток E. coli Top10, поместили пробирку с клетками в лед на 30 минут. Затем трансформировали клетки методом теплового шока при температуре 42°C на протяжении 30 секунд и сразу поместили в лед, добавили 250 мкл SOC-среды и оставили на час в термостате при 37°C. Высеяли клетки на чашки с LB-агаром и ампициллином и оставили в инкубаторе при 37°C на ночь.

Колонию с чашки перенесли в 8 мл LB-среды и выращивали в течение ночи при 30°C. 6 мл суспензии клеток, осадили центрифугированием и провели выделение плазмидной ДНК щелочным лизисом.

Далее провели рестрикцию в течение двух часов при 50°C. В реакционную смесь для рестрикции входило 10 мкл деионизованной воды, 5 мкл десятикратного NEB2, 5 мкл пятидесятикратного БСА, 30 мкл плазмидной ДНК pTriplEx2 и 4 мкл SfiI рестриктазы. Смесь после рестрикции разделяли препаративным электрофорезом, и из участка геля, содержащего вектор, провели выделение ДНК по протоколу набора «QIAquick Gel Extraction Kit».

2. 2. 4 Гель-электрофорез ДНК

Образцы ДНК разделяли в 1% агарозном геле с использованием TAE-буфера при рабочем напряжении 100 мВ, при препаративном электрофорезе 30 мВ. В гель и буфер добавляли интеркалирующий краситель – бромистый

этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл, при проведении препаративного электрофореза бромистый этидий не добавляли. На гель наносили также стандартные маркеры молекулярного веса («BioLabs»). Концентрацию ДНК в каждой из фракций оценивали визуально, в сравнении с маркерами, по расстоянию, пройденному фрагментом в геле, определяли его размер. Фотографирование гелей проводили с использованием системы видеодокументации «AlfaImager».

2. 2. 5 Выделение ДНК из геля

Для выделения ДНК из геля после препаративного электрофореза лезвием бритвы отрезали полосы по бокам геля, при этом захватываются по 2 мм от лунки с образцом. ДНК в полосках красили в буфере с бромистым этидием 15 минут, далее смотрели их под УФ и сделали отметки там, где находится полоса с образцом. После сопоставления полос с основным гелем, полоса с образцом вырезается и помещается в пробирку, в которой образец замораживается и размораживается два раза. Далее выделяли ДНК по протоколу набора «QIAquick Gel Extraction Kit» [16]. Элюировали рTriplEx2 в 30 мкл элюционного буфера с 1 mM EDTA в 1,5 мл пробирку.

2. 2. 6 Выделение ДНК щелочным лизисом

6 мл клеток *E.coli*, выращенных в 8 мл LB-среды с добавлением антибиотика в течение ночи при 30°C, осадил центрифугированием в 2 мл пробирке при 8000 об/мин по 2 мин, после чего клеточный осадок осушили. Осадок тщательно ресуспендировали в 500 мкл буфера P1 на вортексе до однородной суспензии. Добавили 500 мкл лизисного буфера P2 и мягким переворачиванием перемешали до полной прозрачности раствора. Добавили 700 мкл нейтрализующего буфера, мягко перемешали и центрифугировали три раза при 14000 об/мин, общее время центрифугирования 10 минут. Супернатант по частям перенесли на колонку для очистки плазмидной ДНК и 1 мин

центрифугировали. Для промывания сорбированной на колонке ДНК нанесли 500 мкл буфера РВ, инкубировали 3 мин, затем центрифугировали 1 мин. Второе промывание проводили добавлением 500 мкл РЕ буфера, инкубировали 3 мин и центрифугировали 1 мин, раствор вылили и повторили то же самое с добавлением 250 мкл РЕ буфера. Далее ДНК промывали 500 мкл 70% этанола, центрифугировали 2 мин, после чего колонку с промытой ДНК поставили в чистую 1.5 мл пробирку и сушили на воздухе 10 мин. Ровно в центр фильтра с ДНК наносили 80 мкл элюционного буфера с 1 мМ ЕДТА, инкубировали 3 мин и центрифугировали 2 мин. Концентрацию ДНК оценивали методом геле-электрофореза.

2. 2. 7 Лигирование с вектором

Для получения экспрессионной кДНК-библиотеки провели лигирование в течение ночи при 16°C. В состав реакционной смеси на два образца входили 2 мкл десятикратного T4 лигазного буфера, 2 мкл рTriplEx2, 2 мкл ДНК лигазы и 13 мкл деионизованной воды. После приготовления смеси 9.5 мкл переместили в пробирку, добавили 2 мкл кДНК *Metridia longa*.

2. 2. 8 Приготовление электрокомпетентных клеток

Для приготовления электрокомпетентных клеток взяли 1 мл свежей клеточной культуры *E. coli* Top10 в 100 мл SOB-среды и инкубировали в качалке при 37°C, до оптической плотности равной 0.7 – 0.8. Держали клетки во льду в течение 20 мин. Перенесли клетки в 4 пробирки по 50 мл и осадили в охлажденной центрифуге до 4°C при 4 Kg 5 мин. Слили супернатант и ресуспендировали клетки в 20 мл 10% охлажденного глицерола. И центрифугировали в тех же условиях 10 мин. Осадок ресуспендировали в 5 мл 10% глицерола и все перенесли в одну 50 мл пробирку. Суспензию клеток центрифугировали 10 мин при 3.5 Kg. Удалили супернатант и ресуспендировали в 20 мл глицерола, повторили осаждение. Повторили

последние действия в 6 мл глицерола. Жидкость удалили, а клетки ресуспендировали в 400 мкл глицерола, в целом получили около 550 мкл клеточной суспензии. Пипеткой перенесли клетки в 4 1.5 мл пробирки и поставили в холод при -70°C .

2. 2. 9 Электропорация клеток *E. coli*

Лигазную смесь инкубировали 10 мин при 72°C для инактивации ДНК-лигазы. Электропорацию проводили в двух вариантах. В две пробирки расфасовали по 85 мкл электрокомпетентных клеток *E. coli*, в одну добавили 1 мкл, в другую 0.5 мкл лигазной смеси. Все перемешали и перенесли в охлажденную ячейку электропоратора («Bio-Rad»). Параметры электропорации: 1.8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом, зазор ячейки 0.1 см, время импульса ~ 4 мсек. После электропорации переместили клетки в 2.5 SOC-среды и поставили в инкубатор при 30°C 150 об/мин на 1.5 часа, затем высевали по 2 чашки от каждого из вариантов электропорации, по 20 и 2 мкл на чашку.

2. 2. 10 Быстрый скрининг колоний ПЦР

Стерильной петлей для точечного забора сняли колонию среднего размера с агара, затем перенесли ее в пробирку с 20 мкл деионизованной воды. Инкубировали пробирки в термоциклере при 96°C , после чего сразу поместили пробирки в лед. Далее поставили ПЦР реакцию на 26 пробирок по 12 мкл, в состав реакционной смеси входили 192.4 мкл деионизованной воды, 52 мкл десятикратного Taq буфера, 20.8 мкл 20 мМ дНТФ, по 16.2 мкл 3'- и 5'-праймеров, 6.2 мкл Taq полимеразы. После смешения реакционной смеси, ее расфасовали по 12 мкл в 0.5 мл пробирки и в каждую добавили по 8 мкл образцов. Результат анализировали гель-электрофорезом, размер вставки узнавали путем сравнения с маркером.

2. 2. 11 Функциональный скрининг

2. 2. 11. 1 Визуализация люцифераз по свечению на уровне колоний

Включили камеру за 15 минут до начала регистрации сигнала, для ее охлаждения. Расположенную вертикально чашку с рассевом кДНК-библиотеки опрыскивали 2 раза целентеразином разведенным в DMSO до 10^{-5} порядка разведения. Быстро поставили чашку под камеру с плотно закрытой дверкой бокса и сделали снимок с нужной выдержкой для полноценного фиксирования сигнала (~30 – 60 сек). Не сдвигая чашку, сделали фотографию при тусклом освещении.

2. 2. 11. 2 Снятие реплик колоний

Снятие реплик колоний с целой чашки, сектора чашки или группы клеток провели следующим образом. Брали соразмерный кусочек нитроцеллюлозного фильтра, прикладывали к чашке Петри с колониями, после того, как фильтр плотно приклеился к чашке, резким движением сняли фильтр.

Если делали анализ целой чашки, то фильтр помещали на чистую чашку Петри с агаром колониями вверх, далее чашку ставили в инкубатор на два часа для доращивания колоний. Далее делали смыв с фильтра в 4 мл SOC-среды, путем растирания колоний стерильным шпателем до однородной суспензии. Часть суспензии клеток брали для наращивания клеток на функциональный скрининг. То же самое делали в случае анализа сектора чашки.

При анализе группы колоний, численностью в 10 колоний на группу, также использовали кусочек фильтра, который помещали на группу колоний, аккуратно и быстро снимали, после чего фильтр помещали в пробирку с 5 мл LB-среды с 100 мг/мл ампициллина и проводили наращивание клеток на скрининг.

2. 2. 11. 3 Выращивание клеток

Сделали смыв клеток с чашки в 4 мл SOC путем растирания шпателем до

однородной суспензии. Отобрали для библиотеки 300 мкл в пробирку и добавили к ним 200 мкл 80% глицерола и 500 мкл SOC-среды, все перемешали и поставили на хранение на -70°C . Для наращивания клеток на функциональный скрининг отобрали 100 мкл в 5 мл LB-среды с 100 мг/мл ампициллина, наращивали 1.5 часа при 37°C до оптической плотности равной 1. Индукцию проводили в течение 1.5 часов 1 мМ ИПТГ.

2. 2. 11. 4 Подготовка образцов на анализ

3 мл клеточной культуры, индуцированной 1.5 часа ИПТГ из оптической плотности $OD \sim 1$, осадил в 2 мл пробирку центрифугированием при 6000 об/мин 2 мин. Осадок осушили, ресуспендировали в 300 мкл ЦСБ буфера и разрушили с помощью УЗ-дезинтегратора при 22 кГц 3 раза по 6 сек с паузами по 15 секунд между озвучиваниями. Между образцами щуп тщательно очищали.

2. 2. 11. 5 Анализ функциональной активности

Все измерения люциферазной и ЦСБ активности проводили, используя люминометр БЛМ-8812. Измерение люциферазной активности проводили в 450 мкл LM буфера, добавляя 50 мкл образца, после вставления кюветы в люминометр, реакцию запускали добавлением 5 мкл целентеразина концентрации 10^{-4} порядка разведения.

Зарядку образцов без люциферазной активности проводили в течение 5-24 часов путем добавления ДТТ 1 М и 3 мкл целентеразина 10^{-6} или 10^{-7} порядка разведения.

Измерение активности целентеразин-связывающего белка проводили в 450 мкл ЦСБ буфера, не содержащего Ca^{2+} , добавляя 50 мкл образца. Сначала, реакцию запускали добавлением 10 мкл разведенной 1:30 люциферазы, затем запускали вторую часть реакции добавлением 100 мкл 50 мМ CaCl_2 .

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Удаление низкомолекулярных фрагментов из смеси кДНК

За основу для работы взята смесь кДНК выделенная из двухсот взрослых особей копеподных рачков *Metridia longa* в 1999 году сотрудниками лаборатории фотобиологии Института Биофизики СО РАН.

Создание улучшенной кДНК-библиотеки заключалось в очистке смеси кДНК фрагментов от низкомолекулярной фракции. Очистку провели на основе метода селективной супрессии полимеразной цепной реакции [26]. ПЦР была проведена с использованием оригинальных комплементарных друг другу праймеров, сконструированных старшим научным сотрудником Марковой С.В.

Суть реакции заключалась в том, что в ходе реакции взаимокплементарные части праймеров связывались друг с другом, образуя структуру типа “сковородка”, при этом с большей вероятностью такую структуру образуют именно короткие фрагменты. А хвосты более длинных последовательностей не успевают соединиться в ходе реакции, либо связи быстро разрушаются, не в силах удержать высокомолекулярные фрагменты в подобном положении.

Для подбора условий проведения реакции сделали забор образца на 5, 8 и 11 циклах и определили, что наилучшее качество наработки кДНК получается при 7 циклах реамплификации. После чего провели электрофорез для сравнения полученных результатов. Ниже представлен снимок геля после электрофореза образцов отобранных через 5, 7, 8 и 11 циклов реакции.

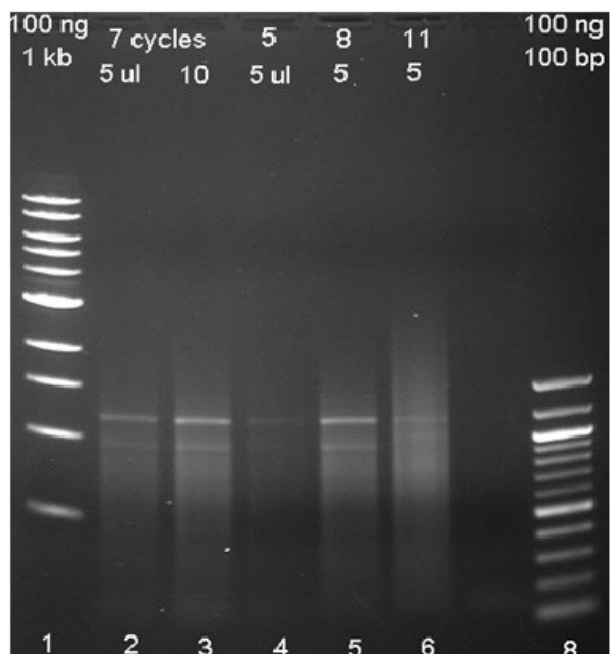


Рисунок 4 – Сравнительный 1% гель-электрофорез образцов взятых на разных циклах реамплификации: 1,8 – маркеры молекулярного веса; 2-3 – 7 циклов (5 и 10 мкл), 4 – 5 циклов, 5 – 8 циклов, 6 – 11 циклов

Очистка ПРЦ продуктов проведена по протоколу набора «QIAquick PCR Purification Kit». Результат очистки оценили методом гель-электрофореза, для сравнения привели очищенный продукт и кДНК до очистки на колонке. Можно отметить, что на рисунке 3, представленном ниже, на дорожке с кДНК до проведения очистки, видна низкомолекулярная фракция внизу полосы, чего не наблюдается в очищенном образце.

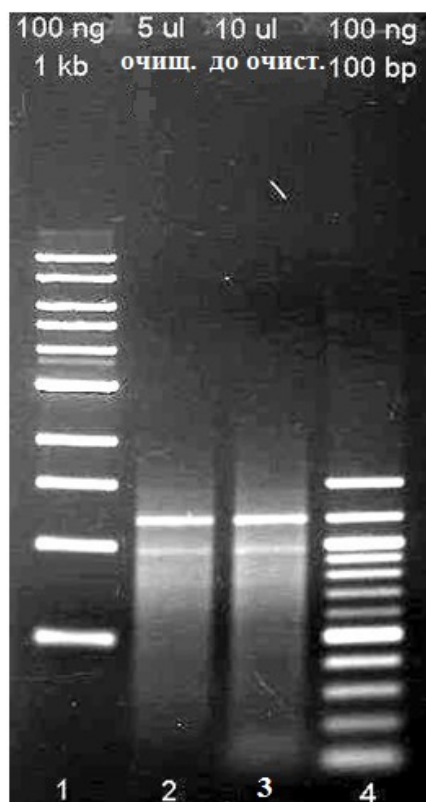


Рисунок 5 – 1% гель-электрофорез. Очистка кДНК по ПЦР-колонке: 1,4 – маркеры молекулярных масс, 2 – кДНК после очистки, 3 – кДНК до очистки

3. 2 Очистка тотальной кДНК перед клонированием

Завершающим этапом очистки тотальной кДНК перед клонированием была гель-фильтрационная или эксклюзионная хроматография на колонке CHROMA SPIN-400 по протоколу набора «SMART cDNA Library Construction Kit». Продукт хроматографии собирали по каплям в пробирки, в первых 10 каплях ничего нет, потому что с ними выходит колоночный буфер. Через колонку сначала проходят высокомолекулярные фрагменты за счет того, что большие фрагменты не проходят через поры гранулы, а проскальзывают между ними. Целевая фракция кДНК была сконцентрирована в первых двух пробирках, что соответствуют 11-14 собранным каплям. Очищенную тотальную кДНК переместили в одну пробирку для последующего лигирования. Хранится кДНК при -20°C . На рисунке 6 отображен снимок геля после электрофореза образцов фракций, полученных при проведении гель-хроматографии.

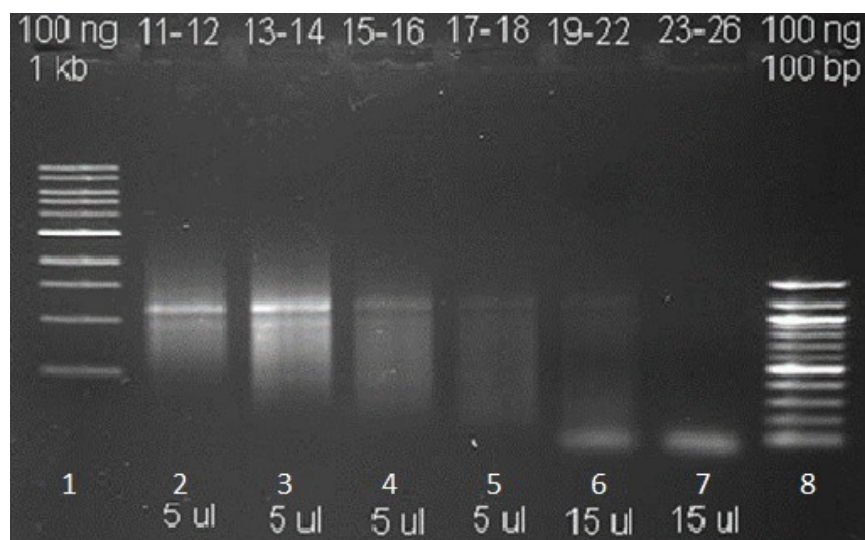


Рисунок 6 – 1% гель-электрофорез. Гель-хроматография: 1,8 – маркеры молекулярного веса; 2-7 – фракции, отобранные в ходе гель-хроматографии (по каплям)

3. 3 Приготовление вектора для клонирования

Приготовление вектора состояло из наработки плазмидной ДНК самого вектора в культуре клеток *E. coli* Top10, выделения ДНК щелочным лизисом и ее рестрикции. Рестрикцию плазмидного вектора проводили в течение двух часов при 50°C SfiI рестриктазой. Результат рестрикции анализировали методом гель-электрофореза. На снимке геля, рисунок 7 (А) еще можно увидеть интактные плазмиды. Для очистки фракции с расщепленным вектором, продукт рестрикции разделили методом препаративного электрофореза, и из участка геля, содержащего вектор, провели выделение ДНК.

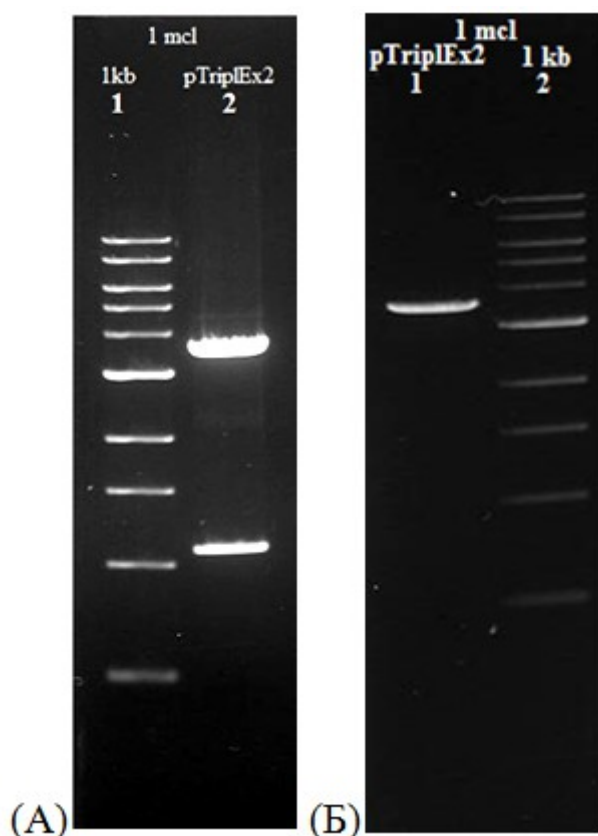


Рисунок 7 – 1% гель-электрофорез. Продукт рестрикции pTriplEx2 (А): 1 – маркер молекулярных масс, 2 – pTriplEx2; Очищенный вектор pTriplEx2 (Б): 1 – маркер молекулярных масс, 2 – pTriplEx2

3. 4 Создание и анализ экспрессионной кДНК- библиотеки

Очищенную кДНК смесь лигировали с вектором в двух вариантах с разным соотношением вектор:вставка, после чего провели трансформацию методом электропорации: с 0,5 (I) и с 1 мкл (II) кДНК на 85 мкл электрокомпетентных клеток.

Анализ качества библиотеки был проведен методом быстрого ПЦР-скрининга колоний векторными праймерами, результат которого анализировали методом гель-электрофореза. От каждого варианта библиотеки были взяты на анализ 12 образцов от I библиотеки и 13 образцов II библиотеки.

Для вычисления среднего размера вставки, положение образцов на дорожках геля сравнили с маркерами молекулярного веса, и, узнав относительную массу образцов, вычислили среднее между образцами

библиотеки, это и есть средний размер вставки. Получили, что средний размер вставки I библиотеки равен 918 bp, а II библиотеки – 807 bp. Примерная оценка рекомбинантности проводилась путем вычисления процентного содержания пустых клонов, а так как пустых клонов не обнаружено, то ориентировочная рекомбинантность обеих библиотек равна 100%. Для дальнейшей работы выбрали I библиотеку, основываясь на том, что у нее больший размер вставки.

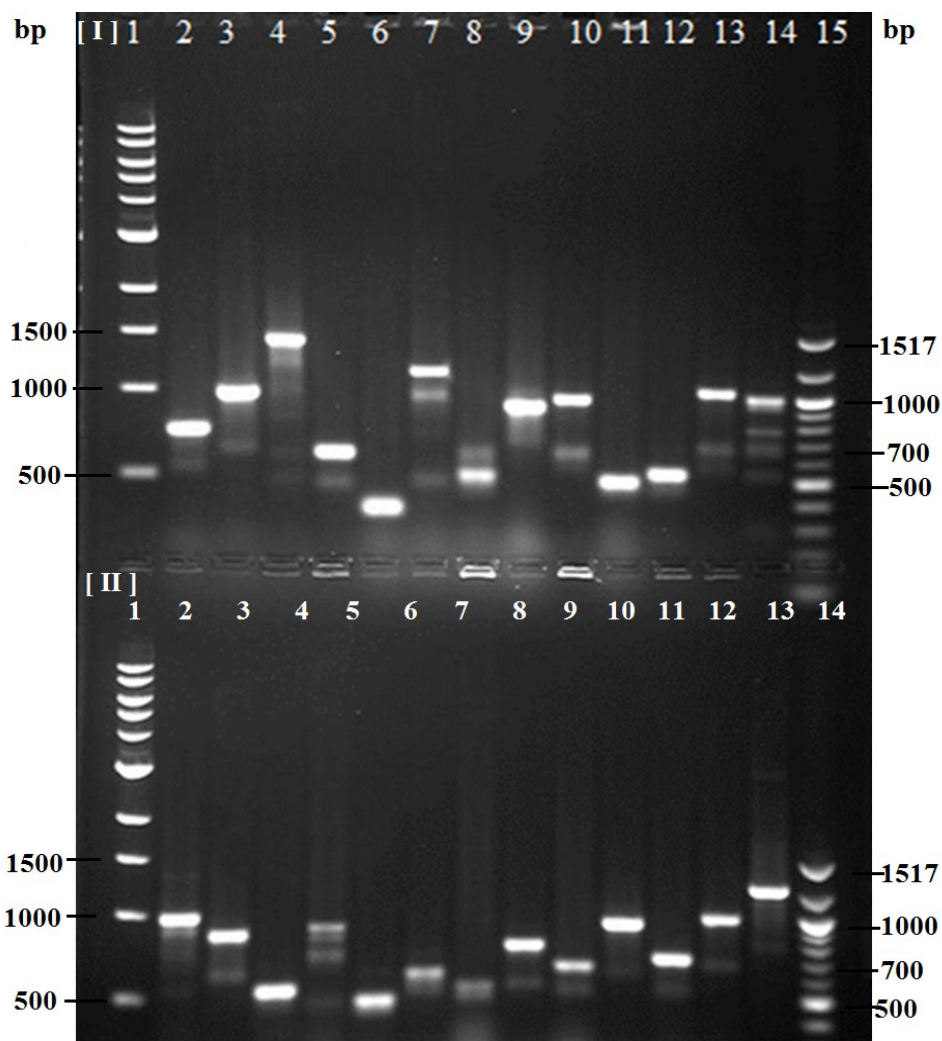


Рисунок 8 – 1% гель-электрофорез образцов полученных при быстром ПЦР скрининге колоний: [I]: 1,15 – маркеры молекулярной массы, 2-13 – образцы I библиотеки, 14 – образец II библиотеки; [II]: 1,15 – маркеры молекулярной массы, 2-13 – образцы II библиотеки, 14 – pTriplEx2

3. 5 Функциональный скрининг кДНК- библиотеки

Скрининг провели двумя путями: путем снятия реплик и имиджингом чашек с рассевом библиотеки. Первый вариант провели с многоступенчатым анализом чашек с рассеянной на них библиотекой, со снятием реплик. Анализировали, начиная со снятия реплик с целой чашки, после чего сужали диапазон поиска до сектора, до групп по 10 клонов и наконец, до индивидуального клона.

Второй путь анализа библиотеки подразумевает использование имиджинговой системы, которая предназначена для проведения исследований биолюминесценции и флуоресценции биологических объектов. На рисунке 7 отображен процесс выявления светящихся колоний на самой чашке. Мы брали чашку, активировали реакцию свечения опрыскиванием чашки субстратом и фотографировали ее в темноте, далее не меняя ее положения, фотографировали ее при свете, так мы смогли напрямую идентифицировать светящиеся колонии, избегая трудоемкого процесса анализа, используя реплики чашек.

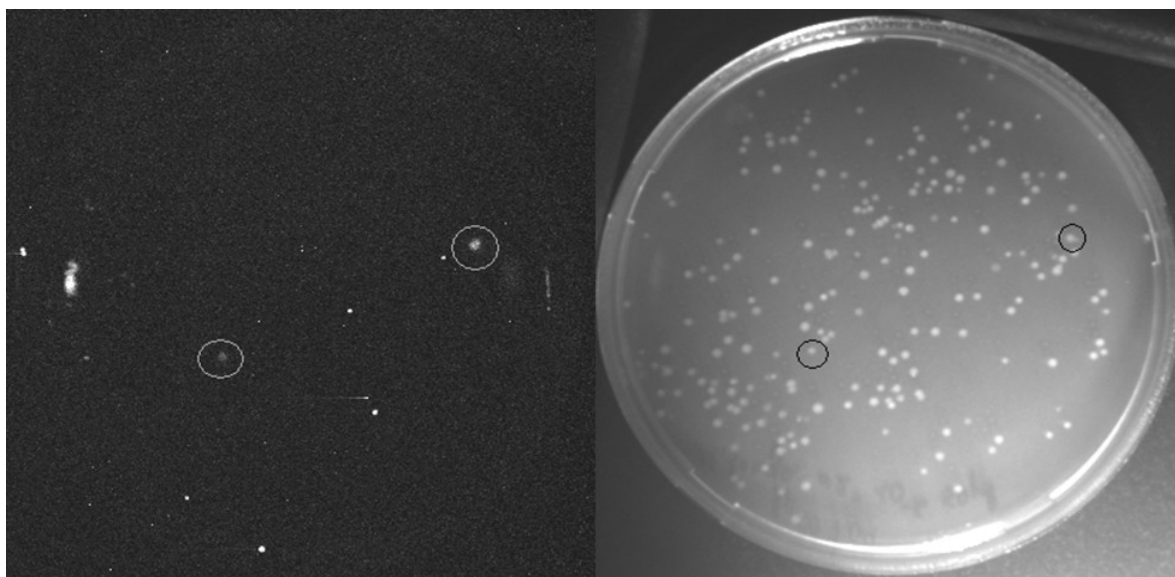


Рисунок 9 – Анализ свечения чашек рассева кДНК-библиотеки при комнатной температуре (~25°C) на имиджинговой системе «BFI System»

Изначально, делали снимки чашек взятых из холодильника, “холодных” чашек, на которых выявляли много светящихся колоний. Впоследствии было

уточнено, что эти колонии имели прирост активности при пониженных температурах ($\sim 6^{\circ}\text{C}$) и почти все являлись аналогами ранее клонированной психрофильной люциферазы. Кроме того, была идентифицирована новая изоформа, психрофильной люциферазы *MLuc1*, отличающаяся от *MLuc2* мутацией S158T, которая характеризуется большей активностью при низких температурах $\sim 6^{\circ}\text{C}$ и резким падением активности при комнатной температуре, более 20 раз. Такой вариант люциферазы может быть лучшим биолюминесцентным репортером для психрофильных организмов, чем уже известная *MLuc2*.

Анализ чашек при комнатной температуре, начали делать много позже. Однако, после того как сделали снимки “теплых” чашек, мы смогли получить образец с приростом активности в тепле.

И в случае снятия реплик и при использовании имиджинговой системы, для поиска индивидуальных биолюминесцентных клонов, сам анализ люциферазной активности поводили на биолюминометре, активируя реакцию свечения 5 мкл целентеразина 10^{-4} порядка разведения.

Образцы, в которых люциферазного сигнала обнаружено не было, инкубировали в течение ночи с целентеразином 10^{-7} порядка разведения в соотношении 1:100 к клеточному лизату. Скрининг в отношении ЦСБ также был сделан на биолюминометре, однако схема анализа отличалась.

Схема измерения активности целентеразин-связывающего белка была выстроена на основании уже изученного ЦСБ *Renilla muelleri* [1, 20]. Было предположено, что ЦСБ *M. longa* также является Ca^{2+} -зависимым белком, а значит, что если проинкубировать ЦСБ с целентеразином, то сможем зарегистрировать сигнал на впрыск Ca^{2+} при условии предварительного добавлении люциферазы. На рисунке 10 приведен пример поиска активности ЦСБ на биолюминометре. Первое измерение проведено на образце, который не содержит ЦСБ, добавление люциферазы к которому продуцирует пик квантового выхода, за счет окисления субстрата, а при добавлении Ca^{2+} активность свечения ингибируется, что свидетельствует об отсутствии

субстрат-связывающего белка. Во втором измерении, при анализе образца с целентеразин-связывающим белком, добавление люциферазы не дало сигнала, а впрыск Ca^{2+} дает высокий пик активности свечения.

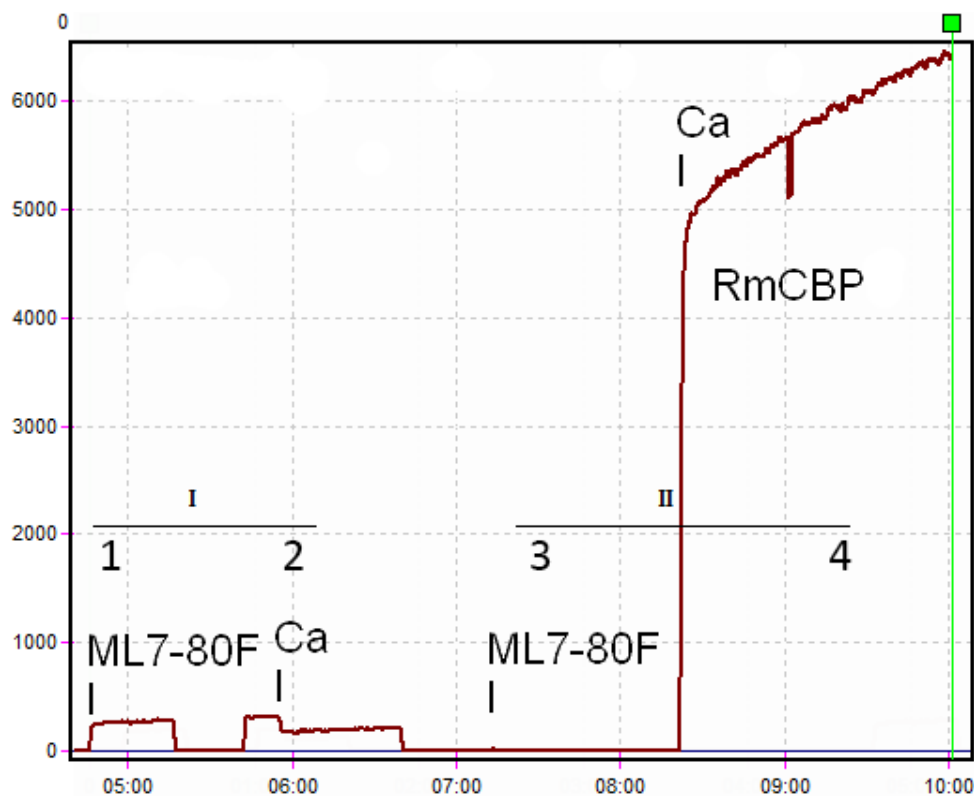


Рисунок 10 – Пример скрининга в отношении целентеразин-связывающего белка: 1, 3 – добавление люциферазы; 2, 4 – добавление Ca^{2+}

3. 6 Результаты скрининга кДНК- библиотеки

Было проанализировано, по меньшей мере, 4706 клонов, среди которых обнаружено и очищено до индивидуальных клонов 23 образца с люциферазной активностью. Из них у 21 выявлен прирост активности в холоде. А у двух люцифераз, найденных с помощью биоимиджинговой системы – в тепле. Это говорит о преобладании в смеси кДНК генов, кодирующих психрофильные люциферазы, иными словами, холодолюбивые люциферазы, имеющие оптимум активности при низких температурах, это соотносится с образом жизни *Metridia longa*, который днем обитает преимущественно в холодных водах. Однако взрослый копеподный рачок совершает вертикальные миграции к

поверхности воды для питания, где температура воды гораздо выше, даже в ночное время суток [2, 6]. Ниже представлена таблица индивидуальных люциферазных клонов, где указаны их значения люциферазной активности, измеренные при комнатной температуре 24°C и при 6°C.

Все значения были рассчитаны на 1 мкл клеточного лизата. Также в таблице 1 приведены значения прироста активности при 6°C, которые рассчитали путем деления активности полученной при 6°C на значение при 24°C.

Таблица 1 – Выделенные индивидуальные люциферазные клоны

	Активность, мВ/мкл		Прирост активности при 6°C
	24°C	6°C	
1	8800	130000	15
2	4200	78000	19
3	6800	208000	31
4	12000	236000	19
5	11000	163000	15
6	8800	190000	22
7	7300	246000	34
8	10000	225000	22
9	5100	190000	37
10	17000	140000	8
11	17000	180000	11
12	14000	122000	9
13	3400	39000	11
14	52000	33000	0
15	9000	158000	18
16	3600	170000	47
17	33000	215000	6

Окончание таблицы 1.

	Активность, мВ/мкл		Прирост активности при 6°C
	24°C	6°C	
18	34000	204000	6

19	25000	209000	8
20	740000	315000	0
21	123000	224000	2
22	77000	180000	2
23	79000	153000	2

Скрининг в отношении целентеразин-связывающего белка не позволил изолировать аналог Са-регулируемого целентеразин-связывающего белка, однако методика его поиска еще разрабатывается, с предположением, что возможно ЦСБ *M. longa* не является Са-регулируемым и требуется иной путь для выявления его активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной исследовательской работы являлось создание улучшенной кДНК библиотеки генов *Metridia longa* и ее функциональный скрининг в отношении биолуминесцентных белков, в частности целентеразин-связывающего белка.

Создание улучшенной кДНК-библиотеки заключалось в очистке смеси кДНК фрагментов от низкомолекулярной фракции, что требовало проведения реакции на основе метода селективной супрессии ПЦР с использованием оригинальных праймеров. Это дало возможность в дальнейшем избавиться от низкомолекулярных фрагментов методом гель-фильтрации.

Функциональный скрининг в отношении биолуминесцентных белков в первую очередь был направлен на поиск целентеразин-связывающего белка, а люциферазы представляют собой побочный продукт поиска. Однако это не снижает значимость проделанной работы в этом направлении.

При проведении скрининга было использовано два метода для регистрации свечения и выявления клонов, проявляющих люциферазную активность: многоступенчатый анализ рассеянной библиотеки, начиная с целой чашки и оканчивая индивидуальной колонией и биолуминесцентный имиджинг чашек с точечным отбором люциферазных клонов. Данные методы позволили проанализировать, по меньшей мере, 4706 клонов и выделить 21 клон, имеющий оптимум свечения при низких температурах.

На следующем этапе невозможность выделения люцифераз, пик активности свечения которых наблюдается при комнатной температуре, привела к адаптации метода визуализации люцифераз по свечению на уровне колоний с использованием биоимиджинговой системы применимо к данной работе. Благодаря этому выявили и очистили две предположительно новые люциферазы. Все выделенные люциферазы были отправлены на секвенирование в ЦКП «Геномика» СО РАН в город Новосибирск.

ВЫВОДЫ

1. Очищена кДНК-библиотека *Metridia longa* от низкомолекулярных фрагментов.
2. Получена экспрессионная кДНК-библиотека *Metridia longa*, при использовании вектора для клонирования pTriplEx2. Средний размер вставки библиотеки составил 918 bp, а рекомбинантность – 100%.
3. Проведен функциональный скрининг кДНК-библиотеки в отношении биолюминесцентных белков.
4. Выявлено 23 люциферазы, из которых 21 имеет пик активности свечения при низких температурах и две – при комнатной температуре. Целентеразин-связывающий белок примененным методом не обнаружен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

bp – пара нуклеотидов;

ЗФБ – зеленый флуоресцентный белок;

ИПТГ – изопропилтиогалактозид, индуктор лактозного промотора;

кДНК – ДНК комплементарная матричной РНК;

М – концентрация, моль на литр;

мВ – милливольт, 10^{-3} В;

мМ – миллимоль / литр, 10^{-3} М;

мл – миллилитр, 10^{-3} л;

мкл – микролитр, 10^{-6} л;

мс – миллисекунда, 10^{-3} сек;

ЦСБ – целентеразин-связывающий белок.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Borisova, V. V Recombinant Metridia luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for in vitro assay / V. V Borisova, L. A. Frank, S. V Markova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – Т. 7, № 9 – P. 1025–1031.
2. Buskey, E.J. Behavioral responses of oceanic zooplankton to simulated bioluminescence / E. J. Buskey, E. Swift // Biol. Bull. – 1985. – Т. 168 – P. 263–275.
3. Charbonneau, H. Ca²⁺-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein // J. Biol. Chem. – 1979. – Т. 254, № 3. – P. 769–780.
4. Clarke, G.L. Comparative studies of luminescence in copepods and other pelagic marine animals / G. L. Clarke, R. J. Conover, C. N. David, J. C. Nicol // J. Mar. Biol. Ass. U. K. – 1962. – №42 – P. 541–564.
5. Close, D.M. In vivo bioluminescent imaging (BLI): Noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals // Sensors. – 2011. – Т. 11, № 1. – P. 180–206.
6. Hays, G.C. Ontogenetic and seasonal variation in the diel vertical migration of the copepods *Metridia lucens* and *Metridia longa* / G. C. Hays // Limnol. Oceanogr. – 1995. – Т. 40, № 8 – P. 1461–1465.
7. Hopcroft, R. *Metridia longa* [Электронный ресурс] / R. Hopcroft // Census of Marine Life. - United States of America, 2009. - Режим доступа : http://www.arcodiv.org/watercolumn/copepod/Metridia_longa.html.
8. Hori, K. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin / K. Hori, H. Charbonneau, R. C. Hart, M. J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1977. – Т. 74, № 10 – P. 4285–4287.
9. Kumar, S. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. / S. Kumar, B. Ma, C. J. Tsai, H. Wolfson, R. Nussinov // Cell Biochem. Biophys. – 1999. – Т. 31, № 2 – P. 141–164.
10. Lorenz, W.W. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis*

- luciferase / W. W. Lorenz, R. O. McCann, M. Longiaru, M. J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1991. – T. 88, № 10 – P. 4438–4442.
11. Markova, S. V The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S. V Markova, M. D. Larionova, L. P. Burakova, E. S. Vysotski // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2015. – T. 457, № 1 – P. 77–82.
12. Markova, S. V Coelenterazine-Dependent Luciferases / S. V Markova, E. S. Vysotski // Biochem. Biokhimiia – 2015. – T. 80, № 6 – P. 714–732.
13. Markova, S. V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*: A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S. V. Markova, S. Golz, L. A. Frank, B. Kalthof, E. S. Vysotski // J. Biol. Chem. – 2004. – T. 279, № 5 – P. 3212–3217.
14. Matthews, J.C. Substrate and substrate analogue binding properties of Renilla luciferase / J. C. Matthews, K. Hori, M. J. Cormier // Biochemistry – 1977. – T. 16, № 24 – P. 5217–5220.
15. Morse, D. Role of a luciferin-binding protein in the circadian bioluminescent reaction of *Gonyaulax polyedra* / D. Morse, A. M. Pappenheimer, J. W. Hastings // J. Biol. Chem. – 1989. – T. 264, № 20 – P. 11822–11826.
16. QIAquick Purification Handbook. – QIAGEN. – №7, 1997.
17. Smith, M.E. Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate / M. E. Smith, D. Morgan, B. Musset, V. V Cherny, A. R. Place, J. W. Hastings, T. E. Decoursey // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2011. – T. 108, № 44 – P. 18162–18167.
18. Tannous, B.A. Secreted blood reporters: Insights and applications // Biotechnol. Adv. – 2011. – T. 29, № 6. – P. 997–1003.
19. Thomson, C.M. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins / C. M. Thomson, P. J. Herring, a K. Campbell // J. Biolumin. Chemilumin. – 1997. – T. 12 – P. 87–91.
20. Titushin, M.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M. S. Titushin, S. V Markova, L. A. Frank, N. P. Malikova, G. A. Stepanyuk, J. Lee, E. S. Vysotski //

Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – Т. 7, № 2 – P. 189–196.

21. Valiadi, M. Diversity of the luciferin binding protein gene in bioluminescent dinoflagellates - Insights from a new gene in *Noctiluca scintillans* and sequences from gonyaulacoid genera / M. Valiadi, M. D. Iglesias-Rodriguez // J. Eukaryot. Microbiol. – 2014. – Т. 61, № 2 – P. 134–145.

22. Valiadi, M. Diversity of the luciferin binding protein gene in bioluminescent dinoflagellates - Insights from a new gene in *Noctiluca scintillans* and sequences from gonyaulacoid genera / M. Valiadi, M. D. Iglesias-Rodriguez // J. Eukaryot. Microbiol. – 2014. – Т. 61, № 2 – P. 134–145.

23. Vysotski, E.S. Calcium-regulated photoproteins of marine coelenterates / E. S. Vysotski, S. V Markova, L. a Frank // Mol. Biol. – 2006. – Т. 40, № 3 – P. 404–417.

24. Ward, W.W. Energy transfer via protein-protein interaction in *Renilla* bioluminescence / W. W. Ward, M. J. Cormier // Photochem. Photobiol. – 1978. – Т. 27 – P. 389–396.

25. Бондарь, В.С. Физика и химия биолюминесценции : учеб. пособие / В. С. Бондарь, Е. С. Высоцкий, Е. Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк, Н. С. Кудряшева, С. В. Маркова, С. Е. Медведева, Е. В. Немцева, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, И. Е. Суковатая, Л. А. Франк – Красноярск: СФУ, 2012.– 218 с.

26. Лукьянов, К.А. Селективная супрессия полимеразной цепной реакции / К. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская, Е. А. Богданова, С. А. Лукьянов // Биоорганическая химия – 1999. – Т. 25, № 3 – С. 163–170.