

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ В ЖЕЛАТИНОВЫЙ ГЕЛЬ ФЕРМЕНТЫ СВЕТЯЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Безруких А. Е.

Научный руководитель – Есимбекова Е. Н.

Сибирский федеральный университет

Явление биолюминесценции имеет широкий спектр применения в науке, медицине, экологическом мониторинге и других областях человеческой деятельности. Сопряжённая биферментная система светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза является, в частности, хорошим индикатором при биотестировании воды и воздуха на наличие загрязнений. Люцифераза светляков, в свою очередь, входит в состав АТФ-реагента, используемого для экспрессного определения ультрамалых количеств АТФ и широко применяемого в методах «быстрой микробиологии» для определения биологической загрязнённости различных объектов.

Одним из основных способов получения стабильных и удобных в использовании ферментных препаратов является иммобилизация ферментов с применением разного рода носителей. При этом наиболее перспективными носителями для создания иммобилизованных препаратов ферментов светящихся организмов, как основы ферментативных биосенсоров, являются нейтральные полисахаридные гели и гель на основе желатина. В работах, проведённых в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, была продемонстрирована возможность получения чувствительного и высокоактивного реагента для биолюминесцентного анализа путём иммобилизации биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в крахмальную желатину с последующим высушиванием. Однако данный иммобилизованный реагент теряет часть своей активности в процессе хранения. Также ранее было показано, что помещение ферментов светящихся бактерий в гидрогелевое окружение желатина способствует их стабилизации и увеличению выхода активности. Целью данной работы было получить иммобилизованные реагенты путём включения ферментов светящихся организмов в желатиновый гель с последующим высушиванием, изучить свойства полученных реагентов и их характеристики в процессе хранения.

В ходе работы были получены иммобилизованные реагенты двух видов: на основе АТФ-реагента, содержащего термостабильную мутантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* (4TS), и на основе комплекта реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), содержащего бактериальную люциферазу *P. leiognathi* и NADH:FMN-оксидоредуктазу *Vibrio fischeri*. Для иммобилизации ферменты вносили в раствор желатина, перемешивали, дозировали и затем высушивали. Иммобилизованный реагент на основе АТФ-реагента готовили путём нанесения тонким слоем 25 мкл АТФ-реагента, реконструированного в желатине, на дно полистирольных микрокювет с последующим формированием геля и высушиванием при комнатной температуре. При этом полученный иммобилизованный реагент был прочно связан с носителем (кюветой) и представлял собой тонкую прозрачную плёнку. Иммобилизованный реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий готовили путём аликвотирования желатинового раствора с ферментами по 25 мкл на

полиэтиленовую подложку. После высушивания реагент хорошо отделялся от подложки и представлял собой прозрачные диски размером 6 мм и весом 0,5 мкг.

Кинетические кривые биолюминесценции иммобилизованного реагента на основе АТФ-реагента, в отличие от кинетических кривых для жидкого АТФ-реагента (как содержащего, так и не содержащего желатин), которые характеризуются монотонным падением сигнала с течением времени, представляют собой кривые с экстремумом. В случае иммобилизованного реагента первые 5-6 минут после запуска реакции происходит увеличение интенсивности свечения, после чего свечение выходит на плато и начинается медленное падение интенсивности биолюминесценции. Показано, что 15%-ое снижение биолюминесцентного сигнала в иммобилизованном реагенте наблюдается только через 20 минут, в то время как интенсивность свечения в жидком АТФ-реагенте падает на 15% менее чем за 2 минуты. Полученные образцы иммобилизованного реагента на основе АТФ-реагента отличались высокой степенью воспроизводства биолюминесцентного сигнала, что даёт повод для рассмотрения возможности использования данного иммобилизованного реагента в качестве некоторого стандартного тест-объекта для биолюминесцентного анализа.

Также была исследована стабильность при хранении в условиях комнатной температуры иммобилизованного реагента на основе АТФ-реагента (Рис. 1). Первые 4-5 суток биолюминесцентный сигнал иммобилизованного реагента не изменялся, далее наблюдалось постепенное снижение активности, объясняющееся испарением воды с поверхности реагента и уменьшением размера пор желатиновой гелевой сетки, и через 14 суток ферментативная активность упала в 8 раз. Однако, как было показано, процесс испарения воды из желатинового геля можно замедлить путём хранения иммобилизованного реагента при -70°C .

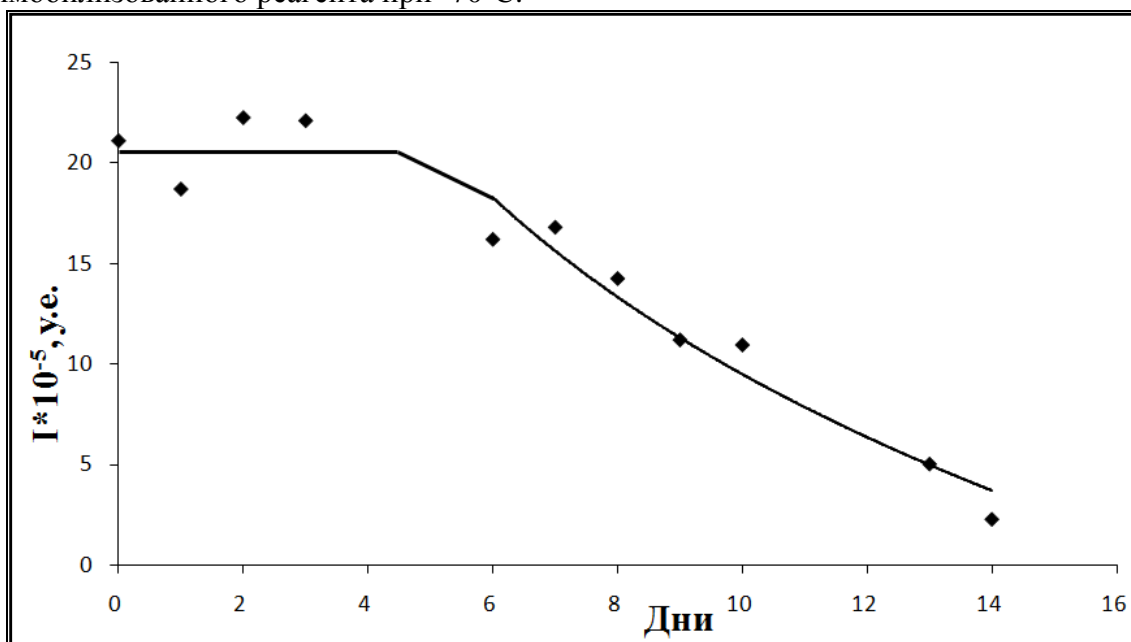


Рис. 1. Изменение интенсивности свечения иммобилизованного реагента на основе АТФ-реагента в процессе хранения при комнатной температуре

Для создания желатинового иммобилизованного реагента на основе биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза на первом этапе был выбран материал, используемый в качестве подложки для высушивания реагента. Для этого оценивали прочность, правильность формы и легкость отлипания реагента от

следующих материалов: стекло, пластмасса, лавсан, полиэтилен и фольга. Наилучший результат был достигнут при использовании в качестве подложки полиэтилена.

Кинетические кривые биолюминесценции как иммобилизованной, так и растворимой биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза представляют собой кривые с экстремумом, однако в случае иммобилизованной системы существенно увеличивается время выхода биолюминесцентного сигнала на максимум: для иммобилизованного реагента оно составляет 8 мин, в то время как интенсивность свечения растворимой биферментной системы достигает своего максимального значения менее чем за минуту (Рис. 2). При этом разброс полученных значений максимальной интенсивности биолюминесценции иммобилизованного реагента оказался достаточно велик и в некоторых случаях составил 30%. Тем не менее, этот факт не исключает возможности получения впоследствии стандартизированного иммобилизованного реагента данным способом.

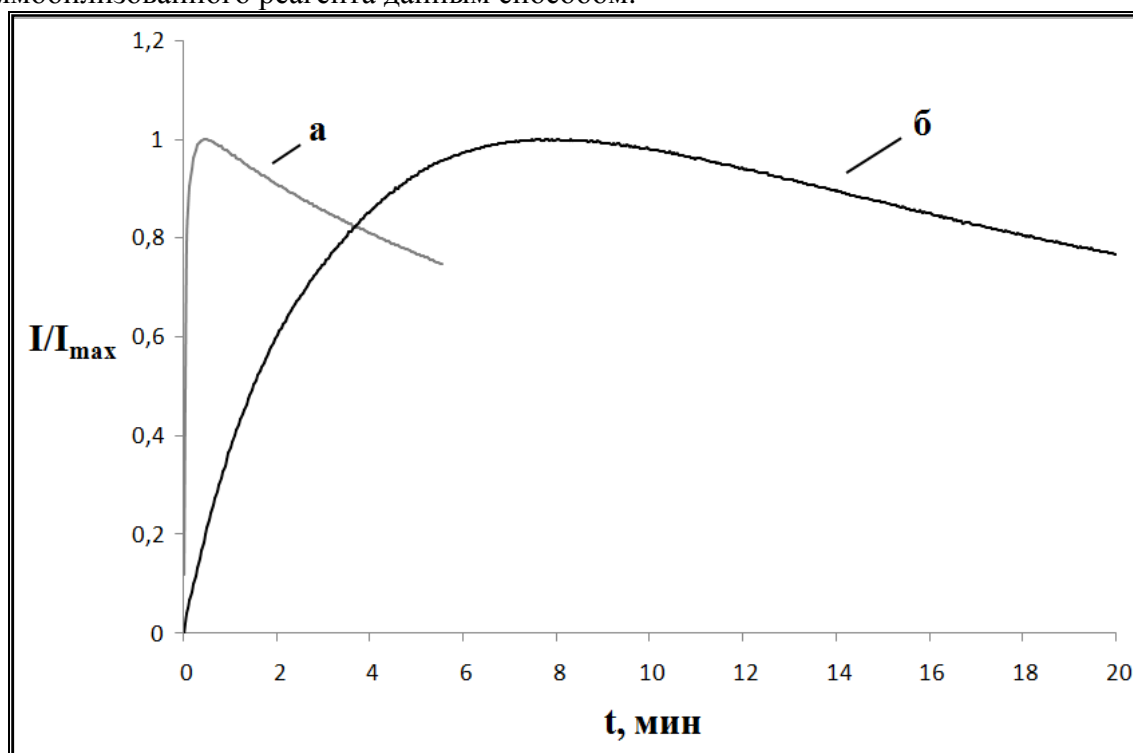


Рис. 2. Вид кинетических кривых свечения растворимой (а) и иммобилизованной в желатиновый гель (б) биферментной системы светящихся бактерий

Далее была изучена стабильность иммобилизованного реагента, полученного при разных температурах высушивания (комнатной температуре и 4⁰С), а также хранящегося при разных температурах (комнатной температуре и 4⁰С). Было выявлено, что непосредственно после высушивания иммобилизованный реагент, высушенный при температуре 4⁰С, обладает большей ферментативной активностью, чем реагент, высушенный в условиях комнатной температуры (Рис. 3). При этом в обоих случаях интенсивность свечения оказалась выше, чем интенсивность свечения эквивалентного количества растворимой биферментной системы (на рисунке обозначена горизонтальной прямой). В процессе хранения наблюдалось снижение ферментативной активности иммобилизованного реагента, высушенного при 4⁰С, через 30 дней остаточная активность составила 40 % от первоначальной активности. Ферментативная активность иммобилизованного реагента, высушенного при комнатной температуре и хранящегося при 4⁰С, по истечении 30 дней не изменилась,

активность реагента, высушенного и хранящегося при комнатной температуре, снизилась лишь на 25 %. Необходимо отметить, что в последнем случае интенсивность свечения иммобилизованного реагента по-прежнему не ниже, чем интенсивность свечения эквивалентного количества растворимой биферментной системы.

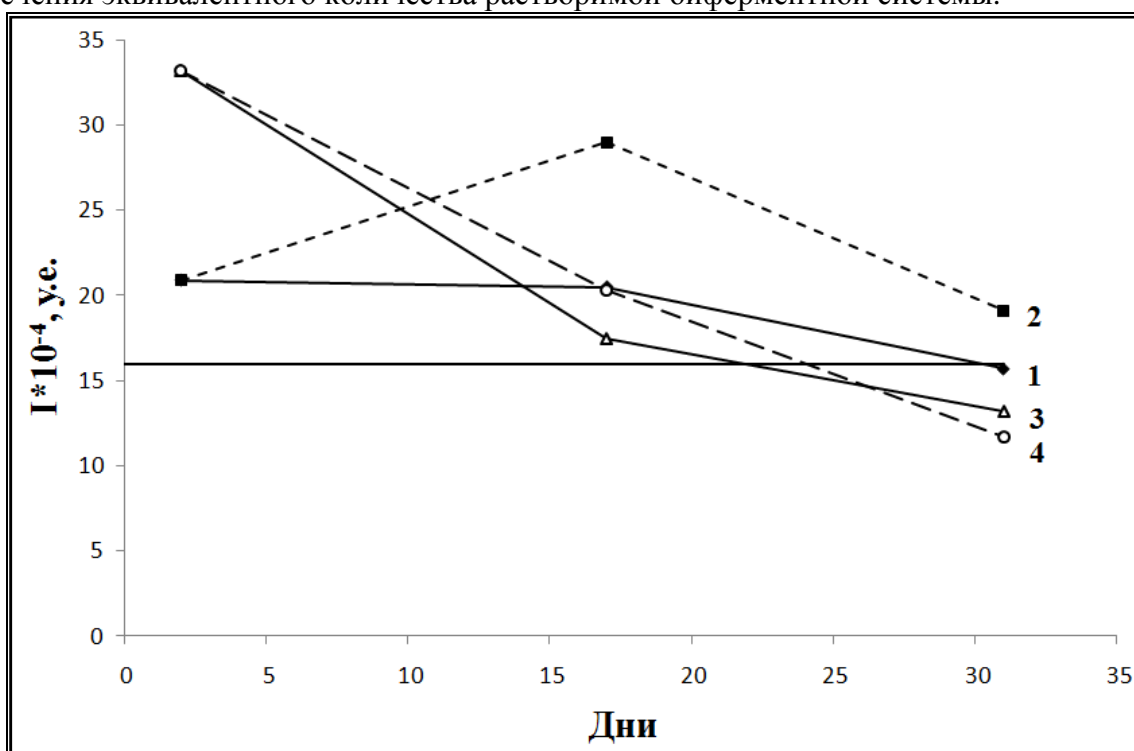


Рис. 3. Изменение интенсивности свечения иммобилизованного реагента на основе биферментной системы светящихся бактерий, полученного при разных температурах высушивания: комнатной (1,2) и 4⁰С (3,4), в процессе хранения при комнатной температуре (1,3) и при 4⁰С (2,4)

Таким образом, в результате проделанной работы на основе ферментов светящихся организмов были получены иммобилизованные реагенты путём включения ферментов в желатиновый гель с последующей процедурой высушивания. Кинетические характеристики полученных иммобилизованных реагентов значительно отличаются от характеристик ферментов в растворе. Наилучшей стабильностью в процессе хранения обладает иммобилизованный реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт № 02.740.11.0766), Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития (гранты № 2.2.2.2/5309 и RUX0-002-KR-06/BR4M02), Российской Академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология»), а также Президента РФ (грант НШ 64987.2010.4).