

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



На правах рукописи

СМИРНОВА ДАРЬЯ ВАСИЛЬЕВНА

**ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ И КОНЪЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ
СВЕТЛЯКОВ *LUCIOLA MINGRELICA* И ИХ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ**

Специальности:

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук,
профессор Н.Н. Угарова

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1. Люциферин-люциферазная система светляков и ее биоаналитических применение ..	11
2.1.1. Применение люциферазы в методах анализа, основанных на детекции ее субстратов (АТФ и люциферин)	14
2.1.2. Применение люциферазы в методах анализа, основанных на ее детекции как маркера	15
2.2. Методы получения бифункциональных молекул на основе люциферазы и фотопротеинов	18
2.2.1. Методы химической конъюгации. Основные подходы.....	19
2.2.2. Химически полученные конъюгаты на основе люцифераз и фотопротеинов.....	21
2.2.3. Методы генетической инженерии по созданию гибридных белков на основе люциферазы	25
2.2.4. Гибридные белки, полученные на основе люцифераз светляков.....	26
2.3. Применение конъюгатов и гибридных белков на основе люциферазы светляков в биоспецифическом анализе.....	32
2.3.1. Применение конъюгатов и гибридных белков на основе люциферазы светляков в гетерогенном ИФА	33
2.3.2. Применение гибридных белков на основе люциферазы светляков для определения ДНК или РНК.....	36
2.4. Биоаналитические системы на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы.	39
2.4.1. Основные принципы BRET	39
2.4.2. BRET-системы на основе <i>Renilla</i> люциферазы.....	41
2.4.3. BRET-системы на основе люциферазы светляков.....	42
2.4.4. Аналитическое применение BRET на основе люциферазы	46
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	50
3.1. Вещества и реагенты.....	50

3.2. Штаммы и плазмиды	53
3.3. Аппаратура	53
3.4. Методики проведения экспериментов	54
3.4.1. Методы работы с ДНК	54
3.4.2. Конструирование плазмид	55
3.4.3. Получение гибридных белков Luc-бссп, Luc-SA и термостабильной люциферазы <i>L. mingrelica</i> , содержащих His ₆ -последовательность	57
3.4.4. Изучение свойств гибридных белков Luc-бссп, Luc-SA	58
3.4.5. Применение гибридных белков Luc-бссп и Luc-SA в иммуноферментном анализе для детекции клеток <i>Salmonella</i>	60
3.4.6. Применение гибридного белка Luc-SA для детекции биотинилированной ДНК клеток <i>E. coli</i>	63
3.4.7. Иммуноанализ прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i>	65
3.4.8. Гетерогенный конкурентный иммуноанализ прогестерона с использованием биолюминесцентного метода детекции	70
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	72
4.1. Получение и свойства гибридного белка люциферазы с биотинсвязывающим доменом (бссп).....	72
4.1.1. Конструирование плазмиды	72
4.1.2. Свойства гибридного белка люцифераза-бссп	73
4.2. Получение и свойства гибридных белков люциферазы со стрептавидином	76
4.2.1. Конструирование плазмид	76
4.2.2. Получение гибридных белков люцифераза-стрептавидин	77
4.2.3. Свойства гибридных белков люцифераза-стрептавидин	78
4.3. Применение гибридных белков Luc-SA и Luc-бссп в биоспецифическом анализе	81
4.3.1. Специфическая детекция клеток <i>Salmonella</i> с использованием гибридных белков Luc-бссп и Luc-SA	82

4.3.2. Гибридизационный анализ ДНК с использованием гибридного белка Luc-SA	85
4.4. Иммуноанализ прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i>	96
4.4.1. Конструирование системы для эффективного BRET	96
4.4.2. Получение и свойства конъюгатов люцифераза-прогестерон.....	100
4.4.3. Получение и свойства конъюгатов антитело-краситель.....	106
4.4.4. Оптимизация условий регистрации BRET-сигнала и анализа прогестерона	111
4.4.5. Гетерогенный иммуноанализ прогестерона с использованием биолюминесцентного метода детекции.....	122
5. ВЫВОДЫ.....	127
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГА	–	глутаровый альдегид
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДМФА	–	диметилформаид
ДТТ	–	1,4-дителиотреитол
ДЦК	–	дициклогексилкарбодиимид
ИФА	–	иммуноферментный анализ
КОЕ	–	колониеобразующая единица
ПААГ	–	полиакриламидный гель
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
Трис	–	трис(гидроксиметил)аминометан
ТМБ	–	тетраметилбензидин
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
A, A ₆₀₀	–	поглощение, поглощение при 600 нм
Ab	–	антитела
AMP	–	аденозин-5'-монофосфат
ATP	–	аденозин-5'-трифосфат
b	–	биотин
BSA	–	бычий сывороточный альбумин
bccp	–	биотин-связывающий домен
His ₆	–	гексагистидиновая последовательность
I _{max}	–	максимальная интенсивность сигнала биолюминесценции или флуоресценции
I	–	интенсивность сигнала биолюминесценции
Fl	–	краситель Alexa-fluor
Fl-Ab	–	конъюгат антитело-краситель
k _{cat}	–	каталитическая константа
K _m	–	константа Михаэлиса
K _m ^{ATP}	–	константа Михаэлиса по АТР

K_m^{LH2}	–	константа Михаэлиса по люциферину
LH ₂	–	люциферин
Luc	–	люцифераза
GLuc	–	зеленая форма люциферазы
RLuc	–	красная форма люциферазы
Luc-Pg	–	конъюгат люциферазы с прогестероном
Luc-SA	–	гибридный белок люциферазы со стрептавидином
Luc-bccp	–	гибридный белок люциферазы с биотин-связывающим доменом
MW		молекулярный вес
NHS	–	N-гидроксисукцинимидный эфир
PDS	–	пиридил-дисульфидная группа
Pg	–	прогестерон
PPi	–	неорганический пирофосфат
PS	–	полистирол
PVP	–	поливинилпирролидон
RLU	–	относительные световые единицы, 1 RLU = 10 ⁹ квант/с
SA	–	стрептавидин
SDS	–	додецилсульфат натрия
SPDP	–	N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат
TS	–	термостабильный мутант люциферазы
$\lambda_{max}; \lambda_{max\ em}$	–	длина волны, при которой наблюдается максимум спектра биолюминесценции (флуоресценции)
λ_{ex}	–	длина волны, при которой наблюдается максимум возбуждения красителя
ATP-LH ₂	–	субстратная смесь для измерения люциферазной активности

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время актуальной задачей является создание новых биоаналитических высокочувствительных и высокоспецифичных реагентов для определения нанокolicеств различных физиологически активных веществ и патогенных микроорганизмов. Одним из способов получения таких реагентов является создание бифункциональных молекул либо генноинженерными методами, либо методами химической конъюгации. Такие молекулы совмещают в себе высокую чувствительность белка-детектора с высокой селективностью компонента, способного связываться с изучаемой мишенью. Использование люциферазы светляков в качестве белка-детектора обладает рядом преимуществ: высокой чувствительностью регистрации метки вследствие высокого квантового выхода биолюминесцентной реакции (окисление люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и Mg^{2+}), низким фоновым сигналом, который определяется стабильностью субстрата и отсутствием люциферазы в анализируемых биологических системах, а также простой процедурой наработки и выделения белка в необходимых количествах. Приоритетным направлением получения бифункциональных молекул на основе люциферазы светляков является экспрессия генноинженерных конструкций. Среди гибридных белков на основе люциферазы наибольший интерес представляют биотин- и стрептавидин-люциферазы, позволяющие фиксировать молекулу люциферазы на поверхности мишени путем высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий. В литературе описаны биотинилированные гибридные белки на основе люцифераз светляков *P. pyralis* и *L. lateralis*, однако они запатентованы. По получению стрептавидин-люциферазы опубликована лишь одна работа, в которой было показано, что синтезированный гибридный белок обладал низкой биолюминесцентной активностью. В связи с этим актуальной задачей является создание новых генно-инженерных систем для получения биотинилированной люциферазы и стрептавидин-люциферазы с высокой люциферазной и специфической активностью на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica*.

Целью работы является получение специфических реагентов на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, изучение их свойств, и их применение в биоспецифическом анализе. В рамках исследования были поставлены следующие **задачи**:

1) Получение на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica* гибридных белков: биотинилированной люциферазы и стрептавидин-люциферазы, - изучение их каталитических и биохимических свойств.

- 2) Применение полученных гибридных белков в биоспецифическом анализе на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий на примере гетерогенного иммуноанализа клеток *Salmonella* и гибридизационного анализа специфических фрагментов ДНК клеток *E. coli*.
- 3) Создание новой системы для высокоэффективного биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) на основе конъюгатов различных мутантных форм термостабильной люциферазы *Luciola mingrelica* с низкомолекулярным антигеном и конъюгатов красителя Alexa-Fluor с антителами.
- 4) Разработка метода гомогенного иммуноанализа низкомолекулярного антигена (прогестерона) на основе BRET с использованием конъюгатов люцифераза-прогестерон и конъюгатов антител к прогестерону с красителем.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы впервые получены плазмиды, кодирующие гибридные белки люцифераза-биотин-связывающий домен (*Luc-bccp-His₆*) и люцифераза-стрептавидин: *SA-Luc-His₆*, *SA-Luc-His₆M/G*, *His₆-SA-Luc*, *Luc-SA-His₆* с использованием гена высокоактивного и термостабильного мутанта люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Впервые получен гибридный белок люцифераза *Luciola mingrelica* - биотин-связывающий домен (*Luc-bccp*), биотинилированный *in vivo*, обладающий высокой биолюминесцентной активностью и способностью связывать стрептавидин. Показано, что каталитические свойства, термостабильность и спектры биолюминесценции гибридного белка *Luc-bccp* и исходной люциферазы идентичны. Впервые получены гибридные белки люцифераза-стрептавидин, для которых показано, что олигомерный состав, люциферазная активность и сродство к биотину зависят от взаимного расположения доменов люциферазы, стрептавидина и *His₆* последовательности. Показано, что гибридный белок *His₆-SA-Luc* образуется преимущественно в тетрамерной форме, обладающей высокой люциферазной активностью и высоким сродством к биотину. Показана эффективность применения полученных гибридных белков в биоспецифическом анализе на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий на примере гетерогенного иммуноанализа клеток *Salmonella* и гибридизационного анализа специфических фрагментов ДНК клеток *E. coli*. Разработан метод значительного снижения неспецифической сорбции гибридного белка люцифераза-стрептавидин с использованием плуроника, приводящий к увеличению чувствительности анализа.

Разработан высокоэффективный метод получения конъюгатов люциферазы с прогестероном (*Luc-Pg*) и антител к прогестерону с красителем Alexa-Fluor 610-х (*Fl-Ab*). Конъюгаты обладают высокой активностью и сохраняют биохимические и физикохимические свойства исходных реагентов. Оптимизирован состав конъюгатов *Luc-Pg* и *Fl-Ab* для

регистрации высокоэффективного биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET). Для повышения эффективности регистрации BRET-сигнала методом генетической инженерии получен новый термостабильный мутант люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (GLuc) с максимумом биолюминесценции при 550 нм и конъюгаты с прогестероном на его основе. Разработан высокочувствительный метод гомогенного иммуноанализа прогестерона на основе BRET с использованием конъюгатов GLuc-Pg и Fl-Ab. По сравнению с гетерогенным ИФА на основе биолюминесцентного метода детекции с использованием тех же конъюгатов GLuc-Pg, метод на основе BRET позволяет сократить время проведения анализа и обладает меньшей трудоемкостью.

Практическая ценность работы. В результате проведенного исследования разработана методология использования люциферазы светляков *L. mingrelica* в биоспецифическом анализе. Синтезированы высокоактивные рекомбинантные белки, которые являются перспективными реагентами для создания новых высокочувствительных биоаналитических систем на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий. На ряде примеров показано, что гибридный белок стрептавидин-люцифераза является высокоэффективным реагентом для специфической детекции клеток микроорганизмов на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий как с использованием иммуноанализа, так и с использованием гибридизационного анализа специфических последовательностей ДНК клеток микроорганизмов. Показана высокая эффективность использования люциферазы и ее мутантных форм в качестве донора в биоаналитических системах на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии совместно с флуоресцентными красителями нового поколения в качестве акцепторов, что открывает новые перспективы использования люциферазы для скрининга различных аналитов с высокой пропускной способностью.

Положения, выносимые на защиту:

- ✓ Генноинженерные конструкции, использованные для получения гибридных белков на основе люциферазы светляков *L. mingrelica* с биотин-связывающим доменом (Luc-bcsp) и со стрептавидином (Luc-SA), а также результаты по изучению их структуры, физико-химических и биохимических свойств.
- ✓ Методы иммуноанализа клеток *Salmonella* и детекции ДНК клеток *E. coli* с использованием полученных гибридных белков.
- ✓ Получение нового термостабильного мутанта люциферазы *L. mingrelica* (GLuc) с максимумом биолюминесценции в «зеленой» области спектра и результаты по его использованию в качестве донора в биолюминесцентном резонансном переносе энергии на акцептор (краситель).

- ✓ Условия получения химических конъюгатов люциферазы *L. mingrelica* с низкомолекулярными соединениями на примере прогестерона и данные об их составе, стабильности, люциферазной активности и способности связывать антитела.
- ✓ Метод гомогенного иммуноанализа прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии с использованием конъюгатов люцифераза-прогестерон и антител к прогестерону с красителем Alexa-Fluor 610-х.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на международных и всероссийских конференциях: VI съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, Россия, 2011); VI Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2011); 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (Гуэльф, Канада, 2012); IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012); VII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2013); 15th JCF Spring Symposium (Берлин, Германия, 2013); международной конференции "Biocatalysis-2013. Fundamentals & Applications" (Москва, Россия, 2013); Chemistry Conference for Young Scientists (ChemCYS 2014), (Бланкенберге, Бельгия, 2014); 16th JCF Spring Symposium (Йена, Германия, 2014 г); VII съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, Россия, 2014); 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (Уппсала, Швеция, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 статьи в реферируемых научных журналах (входящих в перечень научных изданий, рекомендуемых ВАК РФ) и 10 тезисов докладов на научных конференциях.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Люциферин-люциферазная система светляков и ее биоаналитическое применение

Люцифераза светляков – фермент, катализирующий окисление люциферина светляков под действием кислорода воздуха в присутствии АТФ и Mg^{2+} [1-3]. Данная реакция сопровождается излучением света видимой области спектра (540-600 нм). Квантовый выход данной реакции составляет по разным данным от 41% [4] до 90% [5] и является одним из наиболее высоких среди других биолюминесцентных систем. Кинетический механизм реакции окисления люциферина был подробно изучен [3, 6]. Краткая схема реакции приведена на Рис. 1

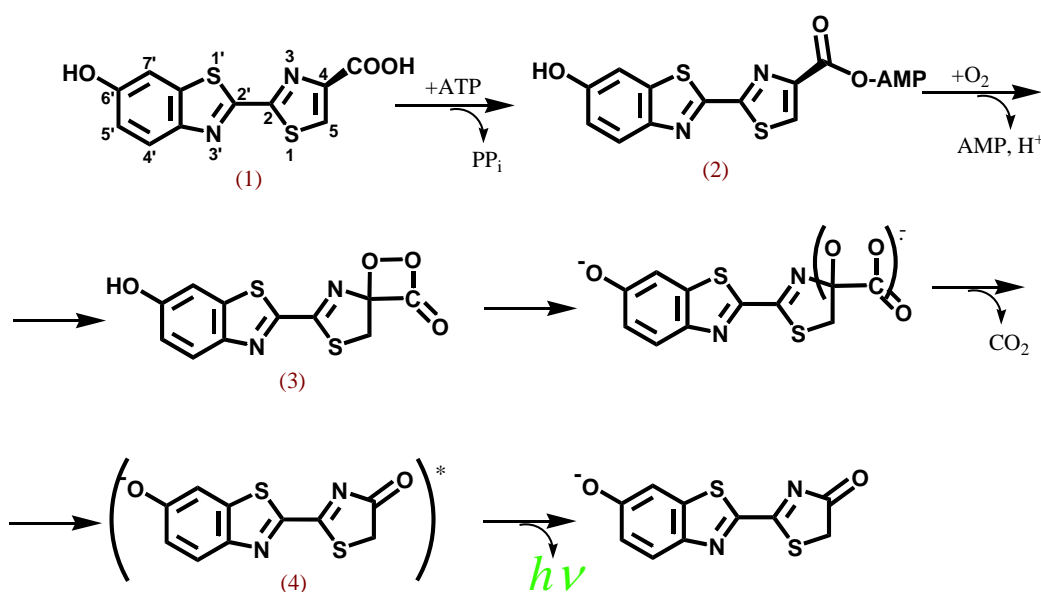


Рис. 1. Схема реакции окисления люциферина в присутствии люциферазы светляков и АТФ [3]

Реакция состоит из двух основных этапов – аденилирования и окисления. На первой стадии фермент связывается с субстратами – люциферин (1) и аденозин-5'-трифосфатом (АТФ). В тройном фермент-субстратном комплексе люциферин ковалентно взаимодействует с АТФ, и в результате образуются смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот – люциферил-аденилат (2) и пиррофосфат. Далее люциферил-аденилат через ряд промежуточных стадий окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диокситанон (3). Трансформация диокситанона приводит к образованию бирадикала, в результате декарбоксилирования которого образуется продукт реакции – оксилуциферин (4) в синглетном электронно-возбужденном состоянии. Затем электронно-возбужденный оксилуциферин дезактивируется с излучением кванта света.

Люцифераза состоит из двух доменов: большого N-домена (1-436 остатки) и малого С-домена (443-544 остатки), соединенных подвижной петлей (337-442 остатки). В свою очередь, в N-домене можно выделить два явно выраженных субдомена [7]: А (1-190) и В (191-436), образующих между собой прочный гидрофобный контакт (Рис. 2).

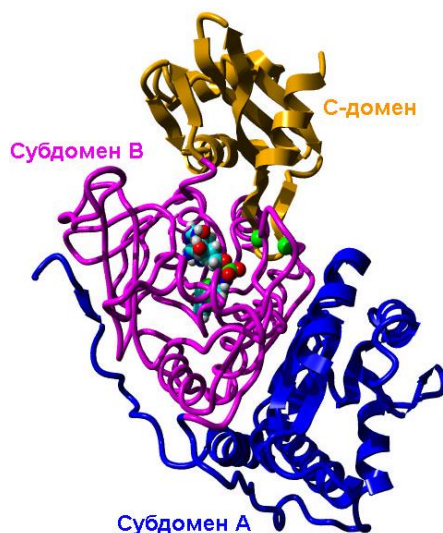


Рис. 2. Структура люциферазы светлячков *L. cruciata* в комплексе с DLSA [8].

При связывании фермента с субстратом на стадии аденилирования происходит поворот С-домена примерно на 90° относительно N-домена, что приводит к переходу от открытой конформации люциферазы к закрытой, при которой оба домена находятся в тесном контакте. При этом Thr529 образует водородные связи с β - и γ - фосфатами АТФ, а Lys531, расположенный на равном расстоянии между карбоксильной группой люциферина и α -фосфатной группой АТФ способствует их сближению, что является лимитирующей стадией в реакции образования аденилат-люциферина [9, 10]. Таким образом, консервативный остаток Lys531 обеспечивает правильную ориентацию и взаимодействие карбоксильной группы люциферина с АТФ, стабилизируя переходное состояние (Рис. 3) в то время как множественные контакты между АТФ и белковыми остатками N-домена (317-320, Ile436, Gly341, Gln340) объясняют абсолютную специфичность люциферазы по отношению к АТФ [11]. За связывание иона Mg^{2+} на первом этапе реакции отвечают консервативные остатки Ser200, Thr345 и Glu346 [12].

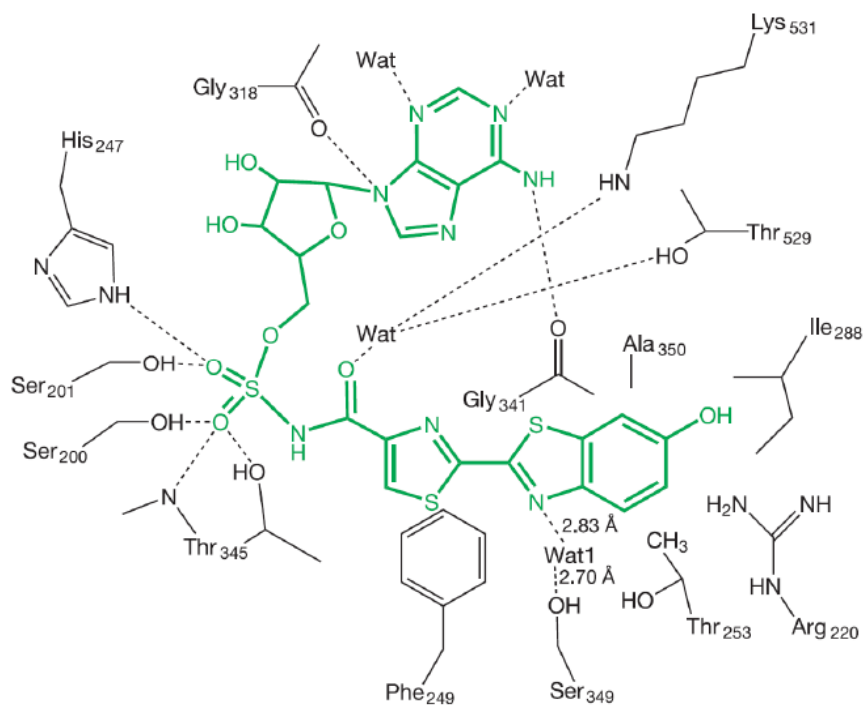


Рис. 3. Активный центр люциферазы светляков *L. cruciata* в присутствии DLSEA – аналога промежуточного продукта стадии аденилирования. Пунктиром обозначены водородные связи [8]

Положение молекулы люциферина жестко фиксировано благодаря большому количеству остатков Gly (230, 248, 317, 318, 341), содержащихся на люциферин-связывающем участке [13]. На второй стадии (окисление люциферина) происходит поворот С-домена дополнительно ~ на 140° по сравнению с его расположением в комплексе люцифераза - LH₂ - АТФ. Справедливость этой модели была подтверждена экспериментами по замене ряда остатков с помощью сайт - направленного мутагенеза. При этом было показано, что в то время как для протекания первой стадии реакции важную роль играет остаток Lys531, на стадии окисления его функцию выполняет Lys443, находящийся с противоположной стороны С-домена [14]. Тем самым, структура люциферазы обеспечивает ее абсолютную специфичность к субстратам.

Таким образом, высокий квантовый выход биолюминесценции в люциферин-люциферазной системе светляков, высокая специфичность фермента к его субстратам (люциферину и АТФ), легкость регистрации биолюминесцентного сигнала в видимой области спектра обусловили широкое применение люциферазы светляков в различных вариантах биоспецифического анализа, основанного на определении ее субстратов и реакций, сопровождающихся их образованием или деградацией в присутствии изучаемых аналитов, а

также самой люциферазы в качестве маркера, при исследовании многих биохимических и молекулярнобиологических процессов.

2.1.1. Применение люциферазы в методах анализа, основанных на детекции ее субстратов (АТФ и люциферин)

Методы «быстрой микробиологии». Это чувствительные, и универсальные методы детекции бактерий на основе экспресс-определения ультрамалых количеств АТФ в образце [15], которые находят применение для определения биологической загрязненности различных объектов, тестировании антибиотиков и определении цитотоксичности. В стандартном варианте АТФ-метрии предел обнаружения составляет $10^4 - 10^5$ КОЕ/мл [16-20]. Для повышения специфичности метода используют специфические лизирующие агенты, предварительное обогащение образца в специфической среде, а также комбинацию данного метода с методом иммуномагнитного осаждения, что позволяет дифференцировать различные клеточные штаммы и серотипы [18-20]. Улучшенной модификацией этого метода является сочетание иммуномагнитного осаждения и АТФ-метрии с аденилат-киназным усилением, либо с использованием предварительного концентрирования микроорганизмов путем фильтрации образца через мембранный фильтр (0,45 мкм) [21]. В этих модификациях метод позволяет определять 10^2 КОЕ/мл *E.coli* в течение 1 часа [22]. В настоящее время активное развитие получила так называемая локальная АТФ-метрия [23, 24], основанная на иммобилизации люциферазы на поверхности мишени с последующей детекцией АТФ в режиме реального времени. Данный метод находит применение при изучении межклеточной пуринергической передачи сигнала, опосредованной пуриновыми нуклеотидами и нуклеозидами, активации иммунных клеток и регуляции других сложных физиологических процессов [25-27].

Методы, основанные на детекции люциферина. Эта группа методов основана на использовании производного люциферина, содержащего пептидную последовательность, распознаваемую протеазами, которое в нерасщепленной форме не является субстратом люциферазы. В присутствии протеаз наблюдается селективное расщепление этого производного с образованием люциферина, способного вступать в биолюминесцентную реакцию. Эта группа методов используется в основном для анализа цитотоксичности и детекции живых и мертвых клеток в клеточных культурах. Живые клетки генерируют слабый фоновый сигнал. В случае повреждения клеток происходит высвобождение протеаз и, как следствие, увеличение биолюминесцентного сигнала [28, 29]. На основании этого принципа разработаны высокочувствительные миниатюрные системы в 1536-луночном формате для скрининга библиотеки цитотоксичных соединений [28], а также системы для изучения активности протеасом (мультиплексное определение активности протеаз) [30, 31].

Полиферментные системы. Еще одним направлением использования люциферазы является ее применение в полиферментных системах, в которых анализируется либо вещество, вступающее в реакцию, сопряженную с синтезом АТФ под действием киназ, либо сама киназная активность [32]. Одним из первых примеров таких систем стал анализ неорганического пирофосфата (PPi), разработанный П. Ниреном и А. Лундиным в 1985 году [33]. В основе анализа лежала реакция превращения PPi в АТФ под действием АТФ-сульфуриказы, который затем вступал в люциферазную реакцию. Этот метод лег в основу пиросеквенирования [34] и успешно используется в наше время в технологии нового поколения секвенирования ДНК [35]. Полиферментная система для изучения киназной активности была создана в 1978 году А. Лундиным и его коллегами, для изучения активности креатин-киназы, катализирующей перенос фосфатной группы с креатинфосфата на АДФ с образованием АТФ, который в свою очередь детектировали с использованием люциферазы (Рис. 4) [36].

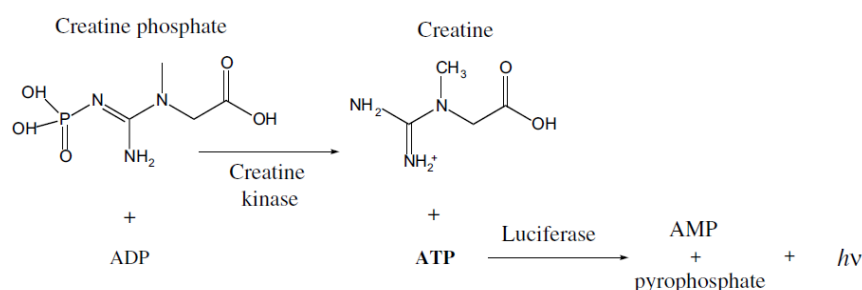


Рис. 4. Схема детекции креатинкиназной активности с использованием люциферазы [36]

Данный метод нашел продолжение для определения цитотоксичности (1997 г), и включал в себя измерение вытекания глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы из мертвых или поврежденных клеток, которая катализировала синтез АТФ, концентрацию которого измеряли с использованием люциферазы [37]. В настоящее время создаются более сложные полиферментные системы, например, португальскими учеными была разработана трех-ферментная система, позволяющая детектировать монооксид азота ($\cdot\text{NO}$). В основе метода лежала реакция, катализируемая глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназой (GAPDH), продукт которой являлся субстратом фосфоглицерат киназы, генерирующей АТФ, детектируемый с использованием люциферазы. В присутствии $\cdot\text{NO}$, наблюдалось ингибирование GAPDH и, как следствие, биолюминесцентный сигнал снижался [38].

2.1.2. Применение люциферазы в методах анализа, основанных на ее детекции как маркера

Применение гена люциферазы в качестве гена-маркера. Ген люциферазы может быть использован для изучения уровня экспрессии белка в клетке, активности различных промоторов, анализа действия различных эффекторов на рецепторы [39], а также для

выяснении локализации клеток-мишеней в организме и других веществ [40, 41]. В качестве примеров можно привести конструкцию, в которой ген люциферазы находился под контролем мультифункционального промотора, которая была использована для идентификации лигандов к рецептору с семью трансмембранными доменами (7ТМ) [42]. В другой генноинженерной конструкции перед геном люциферазы поместили специфическую регуляторную последовательность, влияющую на экспрессию биолюминесцентного белка в присутствии аналита. Данная конструкция позволяла проводить анализ веществ, нарушающих работу эндокринной системы (хлорированных бифенолов и различных пестицидов) путем изучения их эстрогенной и андрогенной активности [43-45]. В работе [46] был разработан анализ киназной активности ДНК метилтрансферазы. Принцип анализа заключался в том, что ДНК-мишень, кодирующая люциферазу и необходимые регуляторные элементы, в присутствии активной ДНК метилтрансферазы метилируется по аденинам и устойчива к воздействию эндонуклеазы. Это приводит к экспрессии люциферазы *in vitro* и появлению биолюминесцентного сигнала. При отсутствии или низкой активности ДНК метилтрансферазы ДНК-мишень подвергается полному или частичному расщеплению, что приводит к отсутствию или низкому уровню экспрессии люциферазы и, как следствие, к низкому биолюминесцентному сигналу, который пропорционален активности ДНК метилтрансферазы. Данный метод обладал низким пределом обнаружения (0,08 ед/мл) и широким линейным диапазоном (0,2-100 ед/мл) [46].

Применение гена люциферазы в иммуноэкспрессионном анализе основано на включении его в состав последовательности ДНК, образующей специфический иммунокомплекс с мишенью (Рис. 5).

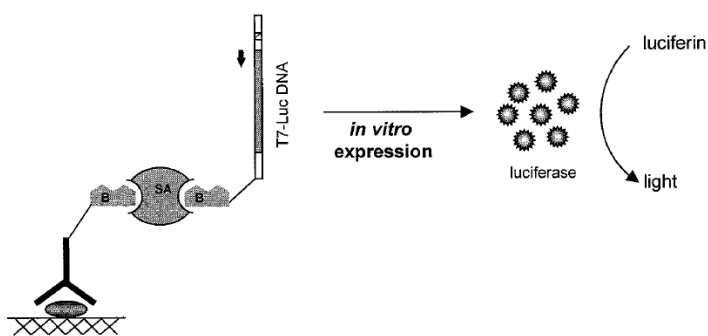


Рис. 5. Иммуноэкспрессионный анализ с использованием гена люциферазы светляков [47]

Антиген, иммобилизованный на поверхности микроюветы, связывается с антиген-специфическими биотинилированными антителами. Полученный комплекс детектируется с использованием комплекса стрептавидин-ДНК, кодирующая люциферазу и регуляторные элементы, необходимые для ее транскрипции/трансляции (Т7-Лус DNA), при этом структура комплекса стрептавидин-ДНК может варьироваться. В данном случае Т7-Лус DNA выступает

как молекула–репортер. После стадии транскрипции/трансляции, происходящей *in vitro*, нарабатываются молекулы люциферазы, генерирующие биолюминесцентный сигнал [47-49].

Применение гена люциферазы в гибридизационном анализе нуклеиновых кислот основано на включении его в состав последовательности ДНК, образующей специфический комплементарный комплекс с ДНК-мишенью. ДНК-мишень перед проведением анализа денатурируется и гибридизуется с двумя пробами, одна из которых отвечает за иммобилизацию ДНК-мишени на поверхности планшета, другая проба отвечает за связывание молекулой репортером. После гибридизации, экспрессии люциферазы и добавления субстратов детектируется биолюминесцентный сигнал, пропорциональный концентрации ДНК-мишени [50]. Например, в работе [50] проба, отвечающая за иммобилизацию ДНК на поверхности планшета содержала дигоксигенин (D) (Рис. 6), образующий специфический комплекс с антителами к дигоксигенину, а биотинилированная проба образовывала специфический комплекс с биотинилированной ДНК, кодирующей люциферазу путем биотин-стрептавидиновых взаимодействий. Диапазон определяемых концентраций ДНК составил от 5 до 5000 аттомоль. Данный подход позволяет проводить одновременное мультиплексное определение нескольких последовательностей ДНК-мишеней [51] с использованием двух репортерных молекул, кодирующих люциферазу светляков и люциферазу *Renilla*, содержащие на концах разные специфические участки (биотин или поли dA последовательность соответственно) [51].

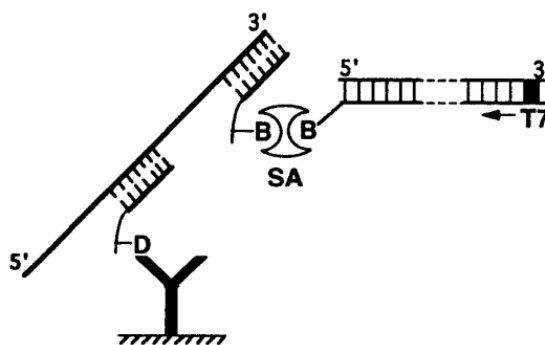


Рис. 6. Схемы специфических комплексов для гибридизационного анализа нуклеиновых кислот с использованием гена люциферазы светляков [50]

Описанные выше методы основаны на использовании люциферазы без специфических участков, а селективность анализа обеспечивают другие компоненты, входящие в состав аналитической системы. Получение гибридных молекул люциферазы со специфическими участками в течение длительного времени было весьма затруднительно вследствие ее термической нестабильности и инактивации при химической модификации, а также длительной

процедуры выделения и очистки белка, что существенно ограничивало области применения люциферазы, особенно в качестве ферментативной метки в иммуноанализе [32, 52, 53].

Возможность получения бифункциональных молекул люцифераза-специфический участок появилась с развитием методов генной инженерии. Были получены термостабильные мутантные формы люциферазы, экспрессионные системы, позволяющие получать фермент, содержащий в своем составе полигистидиновую последовательность, позволяющую проводить быструю очистку фермента в мягких условиях методом металлохелатной хроматографии и тем самым минимизировать инактивацию и потерю фермента/конъюгата в процессе очистки. В ряде работ были созданы мутантные формы люциферазы с добавленными или удаленными химически-активными группами, обеспечивающими минимальные потери биoluminesцентной активности фермента в процессе модификации и однородность состава полученных конъюгатов. Также широкое распространение получили методы генетического конструирования по получению гибридных белков, позволяющие добавлять к молекуле люциферазы белковый фрагмент, способный связываться с определенной мишенью.

Таким образом, стало доступно получение бифункциональных молекул, совмещающих в себе высокую чувствительность белка-детектора с высокой селективностью специфического участка (белкового домена, пептида или небольшой органической молекулы), способного связываться с изучаемой мишенью. Полученные таким способом гибридные белки и конъюгаты люциферазы используются в различных вариантах иммуноферментного анализа для определения самых разнообразных антигенов [54]; для изучения механизмов межбелковых взаимодействий при помощи биoluminesцентного резонансного переноса энергии [55]; гибридационном анализе нуклеиновых кислот [56-59] для поиска биомаркеров.

Таким образом, в настоящее время актуальной задачей является создание новых биоаналитических высокочувствительных и высокоспецифичных реагентов для определения ультранизких количеств различных физиологически активных веществ и патогенных микроорганизмов, изучения межмолекулярных взаимодействий.

2.2. Методы получения бифункциональных молекул на основе люциферазы и фотопротеинов

Среди методов получения бифункциональных молекул люцифераза-специфическая молекула можно выделить химическую конъюгацию, сайт-направленную химическую конъюгацию и экспрессию генноинженерных конструкций.

2.2.1. Методы химической конъюгации. Основные подходы

Химические конъюгаты получают в основном по amino- или сульфогидрильным группам белков с использованием сукцинимидных и малеимидных производных конъюгируемых веществ, соответственно. Данный метод универсален благодаря большому разнообразию сшивающих агентов, что позволяет выбрать функциональные группы, длину и подвижность линкера, растворитель для проведения реакции конъюгации. Особенно следует отметить сульфопроизводные сшивающих агентов, обладающие лучшей растворимостью в воде и позволяющие избежать присутствия органической фазы во время проведения конъюгации.

Стоит отметить, что данный метод используется для конъюгации люцифераз как с большими молекулами, такими как белки, так и с пептидами, олигонуклеотидами и низкомолекулярными соединениями, такими как гормоны. Полученные конъюгаты применяют для любых видов традиционного иммуноанализа и анализа межмолекулярных взаимодействий на основе резонансного переноса энергии. Несмотря на свою «универсальность», данный метод обладает рядом недостатков: 1) снижение биолюминесцентной активности люциферазы в составе конъюгата в случае большого количества реакционных групп, задействованных в процессе конъюгации, 2) неоднородность состава конъюгата, 3) воспроизводимость зависит от многих факторов, поэтому данный метод требует серьезной оптимизации.

Направленная конъюгация, модификация аминок групп. Для улучшения эффективности конъюгации в ряде работ вводили дополнительную реакционноспособную сульфогидрильную группу путем модификации аминок групп с использованием реагента Траута (2-иминотиолан). Данный подход применяют в двух случаях: 1) если химическая конъюгация белка по аминок группам не оказывает существенного влияния на биолюминесцентную активность, а модификация $-SH$ групп, например, N-этилмалеимидом существенно ингибирует биолюминесцентную активность белка [60]; 2) для получения возможности использования гетеробифункциональных сшивающих агентов. Например, модифицированный таким образом акворин, конъюгировали с малеимид-активированным иммуноглобулином к тиреотропному гормону. Активность полученного в этом случае комплекса была на порядок выше, чем в случае синтеза с использованием не тионилированного акворина [61]. Для обелина такой подход использовали при конъюгации с активированными малеимидом (sulfo-SMCC) аминок группами антител. Полученный конъюгат позволил проводить как конкурентный для тироксина, так и сэндвич иммуноанализ для тиротропина с чувствительностью, сопоставимой с радиоиммуноанализом [62].

В работе [63] для введения дополнительной -SH группы в молекулу акворина авторы использовали другой тионилирующий агент – N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA). Вводимая при этом тиогруппа защищена от преждевременного окисления ацетоэфирной группировкой, которая отщепляется с помощью гидросиламина. Полученный SH-акворин использовали для конъюгирования с малеимид-активированным стрептавидином. Конъюгат стрептавидин-акворин является чувствительной универсальной меткой при обнаружении любых биотинилированных мишеней.

Использование мутантных форм. Для получения конъюгатов с заданным стехиометрическим соотношением и минимизации инактивации метки в ходе реакции конъюгации используют сайт-направленную химическую конъюгацию. Например, для акворина в работе [64] был получен мутант, в котором сайт-направленным мутагенезом были заменены все нативные остатки цистеина на серин и введен уникальный цистеин [65], по которому происходило присоединение тиреоидного гормона тироксина, предварительно модифицированного малеимидной группой. В результате был синтезирован конъюгат акворин-тироксин для гомогенного ИФА постоянного состава 1:1, предел обнаружения тироксина составил 10^{-12} М, что на 3 порядка ниже, чем для коммерчески доступных иммуносистем [66]. В статье [67] описан мутантный вариант акворина, с активным цистеином, введенным мутагенезом, так называемый cys-акворин, и проведена его конъюгация с активированными малеимидом (Sulfo-SMCC) антителами к α -фетопротину, стрептавидином и биотином [68] без существенной потери люминесцентной активности. В работе [68] для облегчения получения конъюгатов в состав акворина была дополнительно введена полигистидиновая последовательность. Для люциферазы светляков подобное введение цистеинов было проведено в 2010 году Бранчини с соавторами. Несмотря на то, что люцифераза светляков *Photinus pyralis* содержит четыре остатка цистеина, анализ структуры показал, что все они недоступны для растворителя. Для введения доступного для растворителя реакционноспособного цистеина на поверхности люциферазы были выбраны остатки Thr169, Ser185, Ser307, Phe368, Ser399 и проведена их замена на Cys. Была получена и охарактеризована серия мутантов с единичными заменами, на основании которых был создан мутант RE10 с двойной заменой T169C и S399C, содержащий два активных цистеина. При этом замены не повлияли на биолюминесцентную активность фермента, термостабильность и спектры люминесценции, а специфичность к субстратам возросла в 1,4 раза. Для RE10 была успешно проведена реакция конъюгации с красителем, и полученный конъюгат был использован для последовательного резонансного переноса, как описано ниже [69].

2.2.2. Химически полученные конъюгаты на основе люцифераз и фотопротеинов

Конъюгаты с гормонами и низкомолекулярными веществами. В литературе практически не встречается работ по конъюгации люциферазы светлячков с гормонами и низкомолекулярными веществами, такими как кортизол, тироксин, метилированный тироксин, дигоксин, поэтому ниже будут рассмотрены основные подходы, использованные в работах по получению таких конъюгатов для фотопротеинов акворина и обелина. Так, для мутантной формы акворина без цистеинов (мутант-S) была проведена конъюгация по NH₂-группам с использованием N-гидроксисукцинимидных эфиров производного 3-О-карбоксиметилоксима кортизола [70] и 3-О-метилкарбонил-ε-аминокапроновой кислоты дигоксина [71]. При этом люминесцентная активность первого конъюгата составила 56% от активности исходного фотопротеина при соотношении фотопроtein:кортизол 1:250 в реакционной смеси, во втором случае активности составили 90, 14, 3,5 % для конъюгатов состава фотопроtein:дигоксин 1:1, 1:2, 1:4 соответственно. При попытке конъюгации того же мутанта по NH₂-группам с тироксином с использованием в качестве сшивающего реагента глутарового альдегида активность фотопротеина уменьшилась в 10000 раз [66].

По SH-группам проводили конъюгацию мутантов акворина, содержащих единственный цистеин [64] и обелина, модифицированного иминотиолоном [62], с тироксином. При этом использовали гетеробифункциональные реагенты Sulfo-GMBS (N-γ-малеимидобутирил-оксисукцинимидный эфир) и SMCC (сукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат) соответственно. Люминесцентная активность фотопротеинов в составе гибридных белков полностью сохранялась. В первом случае получены конъюгаты состава 1:1, во втором случае точный состав идентифицировать не удалось.

Конъюгаты с биотином. Среди конъюгатов люцифераз и фотопротеинов с низкомолекулярными соединениями отдельно стоит отметить конъюгаты с биотином, используемые в системах на основе высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий. Конъюгаты с биотином получают в основном по аминогруппам с использованием биотина, активированного N-гидроксисукцинимидом с различными линкерами, либо по SH-группам мутантных форм белков с использованием малеимидпроизводных производных биотина (Таблица 1) с различными линкерами.

Стоит отметить, что проблема получения конъюгатов однородного состава с использованием аминогрупп остается не решенной. Так, для акворина, молекула которого содержит 16 доступных для реакции аминогрупп [72], был проведен поиск наиболее реакционноспособных остатков. Биотинилированный акворин, полученный с использованием NHS-LC-биотина, который менее реакционноспособен, чем его сульфопроизводное был

проанализирован методом масс-спектрометрии, однако выявить наиболее реакционноспособные группы и получить конъюгаты однородного состава не удалось. [72-74]. Поэтому в работе [68] был использован мутантный вариант акворина, позволяющий проводить биотинилирование по единственной доступной SH-группе, в результате чего был получен конъюгат с сохранением биолюминесцентной активности строго определенного состава, который был подтвержден методом масс-спектрометрии.

Таблица 1. Конъюгаты люцифераз и фотопротеинов с биотином

Биолюминесцентный белок	Группа	Лиганд	Биолюминесцентная активность конъюгата, %	Ссылка
Люцифераза светляков <i>L. cruciate</i>	NH ₂	NHS-биотин	1	[52]
Люцифераза светляков <i>P. pyralis</i>	NH ₂	NHS-биотин	100	[75]
Люцифераза светляков <i>Cypridina</i>	NH ₂	NHS-LC-биотин, NHS-PEO ₄ -биотин TFP-PEO-биотин	28 16 1.6	[76]
Акворин	NH ₂	NHS-LC-биотин	70	[77]
			~100	[72]
Cys-акворин	SH	Малеимидное производное PEO ₂ -биотина	~100	[68]

Обозначения: NHS-биотин – N- гидроксисукцинимидный эфир биотинил-ε-амино-капроновой кислоты, NHS-LC-биотин – сукцинимидил 6-(биотинамидо)гексаноат, TFP – тетрафторфениловый эфир PEO- полиэтиленгликоль, Cys-акворин- мутантный вариант акворина, с активным цистеином, введенным мутагенезом.

Для люциферазы светляков *L. cruciate* первые конъюгаты с биотином были получены в 1992 году Arakawa с соавторами, однако процесс конъюгации был связан с существенной потерей активности люциферазы в составе конъюгата (Таблица 2)

Таблица 2. Свойства конъюгатов люцифераза-биотин

Состав конъюгата, молярное отношение биотин:люцифераза в реакционной смеси	Биолюминесцентная активность, %	Ингибирование авидином
0	100,0	5,6
0,9	19,7	5,2
3,7	10,0	44,2
18,7	1,6	96,7
37,4	0,4	97,6

Как показано в Таблице 2, конъюгат, полученный при молярном отношении люцифераза:биотин в реакционной смеси 18,7, обладающий наилучшей способностью связывать авидин, сохранял всего 1,6 % от активности исходной люциферазы. Несмотря на это,

авторы показали возможность его использования в гомогенном иммуноанализе биотина, в основе которого лежало ингибирование биолюминесцентной активности конъюгата, добавление свободного биотина предотвращало ингибирование люциферазы в составе конъюгата. Диапазон определяемых концентраций составил 15-500 пг/лунка [52].

В 2007 году [75] был создан и запатентован более успешный метод получения конъюгатов люцифераза светляков-биотин по NH_2 -группам люциферазы с использованием 2,3-диметил малеинового ангидрида, обратимо модифицирующего аминокруппы люциферазы [78] и предохраняющего аминокруппы активного центра от модификации в процессе конъюгации. Стоит отметить, что при использовании этого модифицирующего агента, количество групп, способных вступить в реакцию конъюгации уменьшается, что существенно снижает эффективность конъюгации, однако способствует сохранению активности фермента.

Конъюгаты с белками: стрептавидином, антителами. Распространенными реагентами для ИФА являются конъюгаты с белками, такими как стрептавидин, образующий высокоаффинный комплекс с биотинилированными мишенями, и антитела, позволяющие получать простой специфический реагент для детекции заданного анализата.

Известно большое количество работ по получению таких конъюгатов для различных вариантов фотопротеинов, некоторые примеры приведены в Таблице 3. Конъюгацию проводят по $-\text{SH}$ и $-\text{NH}_2$ группам с использованием в основном гетеробифункционального реагента SMCC и его более активного сульфо-производного. При этом используют термостабильные мутантные формы люцифераз/фотопротеинов или формы со специально введенными SH -группами с использованием химической модификации $-\text{NH}_2$ групп ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{SH}$) или сайт-направленным мутагенезом.

В отличие от фотопротеинов, для люцифераз светляков описаны лишь единичные работы по получению конъюгатов с антителами, и стрептавидином или его аналогом (авидином). Присутствие субстратов люциферазы в реакционной смеси во время конъюгации способствует стабилизации люциферазы и сохранению биолюминесцентной активности от 11% (в присутствии LH_2) до 40% (в присутствии Mg^{2+} и АТФ). Защита аминокрупп с использованием DMMA способствует полному сохранению биолюминесцентной активности, но снижает эффективность конъюгации. Для термостабильной люциферазы *L. mingrelica* была показана возможность конъюгации с антителами и авидином, модифицированными бифункциональным сшивающим агентом SPDP по двум нативным поверхностным остаткам цистеина в позиции 62 и 164, удаленным от активного центра. После проведения реакции конъюгации сохранилось около 80% активности, однако, стоит отметить неоднородность состава полученных конъюгатов - около 17% конъюгата составляют олигомерные продукты [79, 80].

Таблица 3. Примеры конъюгатов люцифераз и фотопротеинов с белками и их свойства

Биолюминесцентный белок	Группа	Сшивающий агент	Белок	Биолюминесцентная активность конъюгата, %	Ссылка
Акворин + SATA	NH ₂ -> SH	Sulfo-SMCC	SA	50-60	[81]
Сус-акворин	SH	Sulfo-SMCC	SA	нет данных	[67]
Сус-акворин	SH	Sulfo-SMCC	Ab к α-фетопротеину	нет данных	[67]
Обелин + 2-иминотиолан	NH ₂ -> SH	SMCC	Ab к гормонам	~100	[62]
Люцифераза <i>P. pyralis</i>	NH ₂	SMCC	Ab к ризицу	11-40	[82, 83]
Люцифераза <i>P. pyralis</i> + 2-иминотиолан	NH ₂ -> SH	sulfo SMCC	Ab к креатинкиназе	~100	[75]
Люцифераза <i>L. mingrelica</i>	SH	SPDP	Авидин	70-80	[79]
Люцифераза <i>L. mingrelica</i>	NH ₂ -> SH	SPDP	антивидовые Ab, Ab к клеткам <i>Salmonella</i>	80	[80]

SMCC- сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклошексан-1-карбоксилат, SATA- N-сукцинимидил S-ацетилацетат, SPDP- N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)-пропионат, Сус-акворин- мутантный вариант акворина, с активным цистеином, введенным мутагенезом.

Конъюгаты с ДНК. Помимо иммуноферментного анализа, фотопротеины и белки находят применение в гибридизационном анализе ДНК и РНК для определения и дифференциации патогенных микроорганизмов. Для этих целей получают конъюгаты фотопротеинов с олигонуклеотидами с использованием описанных выше подходов. Олигонуклеотиды представляют собой либо последовательности, комплементарные целевой последовательности ДНК/РНК [63], либо универсальные поли dT последовательности комплементарные промежуточному ДНК-зонду (аналог вторичных антивидовых антител) [81]. Следует отметить, что подобные конъюгаты были успешно получены для акворина по NH₂-группам (сохранялось 90-100% люминесцентной активности) [63, 81] и позволяли детектировать ДНК в диапазоне 0.3- 500 пМ [81], или 2- 2000 пМ [63] в зависимости от схемы анализа и сшивающего агента. Для люциферазы светляков (*P. pyralis*) высокоактивного конъюгата с олигонуклеотидами получить не удалось, при попытке конъюгации по SH-группам с использованием 2-амино-6-винилпиридин нуклеозида сохранялось лишь 0,1 % активности исходной люциферазы даже после обработки стабилизирующим агентом (ПЭГ-малеимидом) [84].

На основании проанализированных литературных данных можно сделать вывод, что, несмотря на большое разнообразие модифицирующих и сшивающих реагентов и возможность получения необходимых мутантных форм для стабилизации и введения необходимых функциональных групп в молекулу белка, для люцифераз светлячков получение бифункциональных молекул методом химической конъюгации не является характерным, и разработанные методики имеют свои ограничения.

2.2.3. Методы генетической инженерии по созданию гибридных белков на основе люциферазы

Альтернативным способом получения бифункциональных молекул на основе люцифераз является генноинженерный метод. С развитием биотехнологии стали доступны рекомбинантные белки, экспрессируемые в бактериальных системах, что позволяет получать их в неограниченных количествах, а также появилась возможность получать генноинженерные конструкции, кодирующие аминокислотную последовательность белка-детектора с доменами, способными селективно связываться с различными мишенями.

Преимущества такого подхода заключаются в: 1) постоянном стехиометрическом отношении люцифераза:целевой белок (обычно 1:1); 2) постоянной структуре гибридного белка (положение специфического домена относительно люциферазы); 3) возможности получения гибридного белка в неограниченных количествах путем экспрессии его гена, наработки в клетках бактерий и дальнейшей очистки; 4) отсутствии необходимости в дорогостоящих химических реагентах; 5) лучшем сохранении биолюминесцентной активности люциферазы в составе гибридного белка по сравнению с методами химической конъюгации.

Ограничения данного метода заключаются в возможности получать экспрессионные вектора только для белковых молекул. При этом выбор белковых доменов ограничен их свойствами и выбором экспрессионной системы, пригодной для их наработки в комплексе с люциферазой, поэтому часто получают гибридные белки люцифераза - универсальный белковый домен специфичный к целому классу соединений: белок А [23, 85-88], белок G [89], ДНК-связывающий домен [57, 58, 90] и далее используют специфические антитела или фрагменты ДНК/РНК, в результате получается нековалентно связанный детектирующий комплекс люцифераза-антитело/ДНК(РНК) связывающий домен или люцифераза-специфический олигонуклеотидный зонд [91].

Несмотря на широкое распространение «универсальных гибридных белков», в литературе можно встретить отдельные работы по получению гибридных белков люциферазы с фрагментами антител и отдельными антителами: рецептором эстрогена (с люциферазой *Renilla*) [92], различными пептидами: октапептид-обелин [93], белок С-акворин [94], *Renilla*-домен

гиалуронан-связывающего белка человека [95], акворин-ангиотензин (олигопептидный гормон) [96] и др.

Также активно развивается новое направление по созданию гибридных белков для BRET анализа, содержащих расщепляемые специфическими протеазами линкеры [97, 98], гибридных белков на основе сплит люциферазы [99, 100], люциферазы с суперскрученными белковыми фрагментами [101-103], а также гибридных белков, биолюминесцентный сигнал которых зависит от конформационных изменений, индуцируемых аналитом [104].

2.2.4. Гибридные белки, полученные на основе люцифераз светляков

Гибридный белок люцифераза-белок А и люцифераза-белок G . Важнейшей составной частью белка А (28кДа), выделенного из стафилококка, служит домен, способный образовывать связь с Fc-фрагментом IgG человека и мыши [86]. При его гибридизации с молекулой люциферазы появляется возможность получения нековалентно связанного комплекса люцифераза-антитело.

Гибридные белки люцифераза-белок А были получены сначала для бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi* в 1991 г с сохранением 50% активности исходной люциферазы [88], а в 1993 г. и для люциферазы светляков *L. Lateralis* [86]. Для *L. Lateralis* была получена серия гибридных белков на основе ее мутантных форм: с удаленным 12-м аминокислотным остатком, люциферазы без делеции [87] и термостабильной формы с заменой Glu/Lys 354 [85]. Гибридные белки получали путем встраивания гена люциферазы в вектор pMALU, содержащий ген белка А, который помещали на N-конец люциферазы. Белок, наработанный в клетках *E. coli* штамма JM109, отделяли при помощи аффинной хроматографии. Активность очищенного гибридного белка для люциферазы с удаленным 12-м остатком составила 20% [23], при этом наблюдалась очень низкая стабильность гибридного белка при очистке. Аналогичный гибридный белок, полученный для люциферазы с возвращенным 12-м аминокислотным остатком, был так же нестабилен при очистке, а его биолюминесцентная активность составила лишь 10% от активности исходной люциферазы без белка А [87]. В работе [85] была получена улучшенная модификация гибридного белка, с использованием мутантной формы люциферазы с заменой Glu/Lys 354 , обладающей высокой термостабильностью и стабильностью при очистке, в результате люциферазная активность гибридного белка была в 6 раз выше, чем у гибридного белка без мутации. В работе [89] был получен гибридный белок: люцифераза-белок G, способный связываться с более широким спектром антител: Fc фрагментами антител мыши, кролика, козла, овцы. Преимущество данной конструкции заключалось в использовании высокоэффективной экспрессионной системы рЕТ и полигистидиновой последовательности,

помещенной на N-конец гибридного белка, которая позволяла использовать простой и быстрый метод очистки белка с использованием металлохелатной хроматографии [89].

Гибридные белки стрептавидин-люцифераза. Гибридные белки со стрептавидином получены для некоторых люцифераз и фотопротеинов. Так гибридный белок акворин-стрептавидин в клетках *E.coli* экспрессировался в виде телец включения, что требовало проводить процедуру рефолдинга [105]. Нативные гибридные белки стрептавидина с зеленым флуоресцентным белком [106] и люциферазой *P. plagiophthalmus* [107] были получены в клетках насекомых *S. Frugiperda* с использованием экспрессионной системы бакуловируса. В клетках *E.coli* были получены гибридные белки для зеленого флуоресцентного белка [108] и люциферазы светляков *Luciola lateralis* [109]. Однако отсутствие *His₆* в упомянутых конструкциях значительно усложняло процедуру выделения и очистки гибридных белков. Гибридный белок люциферазы светляков со стрептавидином, содержащий *His₆*, описан в статье [110], однако активность гибридного белка составляла всего 10% от активности исходной люциферазы, хотя кинетические характеристики гибридного белка сходны с люциферазой дикого типа [24, 111]. Известно, что стрептавидин образует тетрамеры, которые обладают высоким сродством к биотину [112], однако для полученных гибридных белков отсутствуют данные об их олигомерном составе, а это может быть важно для правильной интерпретации аналитических данных, полученных с использованием данных белков. Таким образом, можно сделать вывод о том, что, по-видимому, получение стрептавидин-люциферазы сопряжено со сложностью процесса его получения, поэтому широкое распространение получили нековалентные комплексы биотинилированная люцифераза-стрептавидин, описанные ниже.

Гибридные белки люцифераза-биотин. Получение стрептавидин-люциферазы с высокой биолюминесцентной активностью возможно с использованием биотинилированной люциферазы в комплексе со стрептавидином. Для получения биотинилированной люциферазы генноинженерным методом часто используется биотин-связывающий белковый фрагмент, в качестве которого может выступать либо биотин-связывающий домен ацетил-CoA карбоксилазы клеток *E. coli* [24] размером 87 а.к., транскарбоксилазы клеток *Propionobacterium shermanii* [113] или оксалоацетат декарбоксилазы клеток *Klebsiella pneumonia* [114], либо полученный методом молекулярного конструирования биотин-связывающий пептид [115, 116]. В работе [116] проведен скрининг различных биотинсвязывающих пептидов.

Методом генетической инженерии гибридные молекулы люцифераза-биотин-связывающий домен были получены для люциферазы светляков *Photinus pyralis* [117, 118], и *Luciola lateralis* [119, 120], а также для люциферазы *Cypridina noctiluca*, модифицированной красителем HiLyte Fluor™ 647 и фотопротеинов, например, акворина [113]. Биотин связывающие домены или пептиды клеток *E.coli* добавляли как на N-, так и на C-концы

люциферазы: bssr-84 [120] и bssr-87 [117-120] соответственно. В работе [114] биотинсвязывающий домен оксалоацетат декарбоксилазы *Klebsiella pneumoniae* добавлен на N-конец люциферазы.

Для наработки гибридного белка клетки *E.coli* штамма JM101 (*lac-pro*) [119], JM109 [113] либо BL21 (DE3) [24] были трансформированы полученными плазмидами. Очистку гибридных белков проводили либо с использованием аффинной хроматографии на колонке, покрытой мономерным стрептавидином (для акворина) [113], либо анионообменную хроматографию на гидроксипатитовой колонке (для люциферазы *L. lateralis*) [120]. В работах [24], [118], [114] для очистки использовали металлохелатную хроматографию, поскольку в структуру белков были введены полигистидиновые последовательности.

Процент биотинилирования гибридного белка варьировался в зависимости от условий экспрессии и от природы люциферазы. Так для, люциферазы *P. pyralis* без добавления биотина в питательную среду процент биотинилирования составлял 55-58%, в присутствии биотина в питательной среде возрастал до 95% [118], в то время как гибридный белок на основе люциферазы *L. lateralis* степень биотинилирования составила 95 % без дополнительного введения биотина в питательную среду [120]. Для акворина процент биотинилирования составлял всего 12%, и добавление биотина в питательную среду не увеличивало выход биотинилированного белка. Для улучшения биотинилирования в плазмиду, кодирующую гибридный белок акворин-биотинсвязывающий домен, был введен ген биотинлигазы, его коэкспрессия увеличила процент биотинилирования белка до 85-95% [113].

В случае люциферазы *P. pyralis* выход белка полученного трансформацией плазмиды *pRSET-BCCP-Luc* составил 9,1 мг с 200 мл клеточной культуры, что составило 72% от экспрессируемого белка [118]. Для плазмиды *pET-His-KPBT-Luc* на основе той же люциферазы выход составил 8 мг с 250 мл среды [114]. Для гибридного белка на основе акворина выход составил всего 1 мг с 1000 мл среды, что объяснялось большим количеством телец включения.

Было показано, что добавление биотин-связывающего домена не влияет на термостабильность [118] и pH- стабильность люцифераз *P. pyralis* и *L. lateralis* при 50 °C и 37 °C (2-е суток) [120].

Полученные гибридные белки обладали высокой стабильностью при хранении. Так биолюминесцентная активность гибридного белка при хранении в течение 4 недель при -20 °C в 50% глицерине составляла 93% [118], а для гибридного белка, описанного в работе [114], сохранялось 90% от исходной активности после хранения в течение недели при +4 °C.

Для полученных гибридных белков было проанализировано влияние стрептавидина на их биолюминесцентную активность. Так для гибридного белка на основе люциферазы *P. pyralis* связывание bssr-Luc со стрептавидином уменьшало его биолюминесцентную активность до

42% [118], в то время как для гибридного белка на основе люциферазы *L. lateralis* с использованием короткого биотинсвязывающего пептида билюминесцентная активность уменьшалась до 80 %, а для гибридного белка той же формы люциферазы, но с полным биотинсвязывающим доменом оставалась неизменной [120].

В работе [121] было изучено влияние иммобилизации на свойства люциферазы *P. pyralis* в составе гибридного белка с биотинсвязывающим доменом, выделенным из *E. coli*, иммобилизованного через авидин-биотиновые взаимодействия на 6%-е агарозные частицы. Было показано, что иммобилизованный и свободный гибридные белки не различались по термостабильности; оба сохранили около 90% активности после инкубации при 4°C и 25°C в течение 22 ч, однако инкубация при 37°C в течение 22 ч привела к значительной потере активности. Иммобилизация не повлияла на величину K_m , однако привела к трехкратному уменьшению величины k_{cat} .

В Таблице 4 приведены примеры гибридных белков биотинилированной люциферазы, системы экспрессии и их некоторые свойства.

Таблица 4. Гибридные белки биотинилированной люциферазы

Состав гибридного белка			Свойства гибридного белка (люциферазная активность, содержание биотина, влияние SA на билюминесцентную активность)	Ссылки
Источник люциферазы	Специфический домен	Плазмида, штамм-продуцент, способ хроматографической очистки		
<i>L. lateralis</i>	MAFSLRSILE AGKMELRN TPGGS	pHLf203-bccp-Luc	95% исходной активности; 95% биотинилировано; 80% в присутствии SA	[120]
		<i>E. coli</i> JM101		
		анионообменная		
<i>L. lateralis</i>	bccp	pHLf248-Luc-bccp	83% исходной активности 95% биотинилировано; SA не влияет на активность	[120]
		<i>E. coli</i> JM101		
		анионообменная		
<i>L. lateralis</i>	MAFSLRSILE AGKMELRN TPGGS	pETNHis-BAP-Luc	Нет данных	[24]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		
		металлохелатная		
<i>P. pyralis</i>	bccp	pRSET-BCCP-Luc	55-58% биотинилировано, 42% в присутствии SA	[118]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		
		металлохелатная		
<i>P. pyralis</i>	биотин-связывающий домен KPBT	pET-His-KPBT-Luc	Нет данных	[114]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		
		металлохелатная		
<i>Cypridina noctiluca</i>	SGLNDIFEA QKIEWHE (avitag)	Нет данных	Нет данных	[122]

Обозначения: bccp - биотин-связывающий домен ацетил-СоА карбоксилазы клеток *E. coli*; KPBT- *Klebsiella pneumoniae oxaloacetate decarboxylase*

Таким образом, использование биотин связывающих доменов открывают возможности получения биотинилированной люциферазы *in vivo* с сохранением высокого уровня биолюминесцентной активности и стабильности люциферазы. В системах на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий в основном используются биотинилированные компоненты, что приводит к необходимости использования биотинилированной люциферазы в составе нековалентного комплекса со стрептавидином. Это требует дополнительного введения стрептавидина, что приводит к экономическим затратам, а также к необходимости оптимизации получения стабильного комплекса люцифераза-стрептавидин. В настоящее время стабильный комплекс биотинилированной люциферазы со стрептавидином получен японской фирмой Киккоман на основе биотинилированной люциферазы *L. lateralis*, получение которой запатентовано [123] и, как следствие, доступность данного комплекса для использования весьма ограничена.

Гибридные белки люцифераза – антитела. Получение аналитического реагента для иммуноанализа на основе люциферазы связано с получением комплекса антитело-люцифераза. Описанные выше гибридные белки люциферазы с белком А, биотин-связывающим доменом, стрептавидином позволяют получать сложный нековалентный комплекс с антителами в несколько стадий, и порой его стабильность зависит от условий и выбора участников этого комплексообразования, что оказывает влияние на чувствительность метода. Гибридные белки, в которых люцифераза ковалентно связана с антителами, позволяют избежать многостадийности процедуры проведения биоанализа на их основе, однако данный метод позволяет получать гибриды только с рекомбинантными антителами, точнее их фрагментами, а для каждого антитела требуется создание своей плазмиды. Данный тип гибридных белков пока не нашел широкого распространения для люцифераз светлячков. Первый гибридный белок был получен в 1997 году для люциферазы *P. pyralis* с одноцепочечными антителами scFv к Ff1 субъединице гемоцианина скорпионов *Androctonus australis* состава VH-(Gly4Ser)3-VL-линкер(16 аминокислот)-Luc [124], в данной работе был проведен поиск оптимального штамма продуцента, среди HB2151, XL1 Blue, Торр 1 и Торр3 штамм Торр1 оказался оптимальным. Полученный гибридный белок обладал бифункциональной активностью - в присутствии антигена наблюдалось ингибирование биолюминесцентной активности. В качестве примера гибридных белков фрагментов антител с другими люциферазами можно привести гибридные белки на основе люцифераз *Renilla* [125] и *Gaussia* [126], [127] с димеризованными фрагментами переменных участков антител (scFv, диабоды) к карциноэмбриональному антигену (CEA), которые успешно были использованы для имиджинга опухолей *in vivo*. Помимо имиджинга подобные гибридные белки могут быть использованы в системах с переносом энергии, основные принципы которого описаны ниже. Так для *Renilla* люциферазы

был получен гибридный белок с фрагментами антител: тяжелыми цепями вариабельных участков антител, для улучшения растворимости гибридных белков в цитоплазме клеток *E. coli*. в структуру гибридов был добавлен домен тиоредоксина. В данной работе были использованы векторные конструкции на основе системы рЕТ под контролем T7 промотора, наработку белка проводили в клетках *E. coli*, который затем очищали методом металлохелатной хроматографии [128]. Уровень экспрессии был невысок, всего 0,4 мг/1,5 литр клеточной культуры для Trx-VH-Luc, однако люминесцентная активность полностью сохранялась.

Гибридные белки для связывания с ДНК или РНК. Помимо иммуноанализа гибридные белки на основе люцифераз используются для гибридного анализа ДНК или РНК. Для этого в состав гибридного белка добавляют белковый фрагмент, способный узнавать определенные последовательности ДНК/РНК. Примеры таких белков: люцифераза - ДНК-связывающий белок (ssb, Sp1, Zif268), люцифераза - РНК-связывающий белок (Таблица 5).

В работе [129] 1995 года для детекции РНК был сконструирован гибридный белок T7tag-D12H-Luc на основе люциферазы светляков с минимальным РНК-связывающим белком D12H клеток HeLa, распознающим гН4 последовательность (UUAGGG)₄. Экспрессию гибридного белка проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3) с использованием векторной системы рЕТ. Для упрощения выделения и очистки использовали глутатион S-метил трансферазу (GST), которую после аффинной хроматографии отщепляли. Недостатком данной экспрессионной конструкции являлась сложная система очистки гибридного белка, которую проводили в несколько стадий: аффинная хроматография, ионообменная хроматография, гель-фильтрация [129].

Аналогичный подход был использован в работе 2012 года [58] для получения гибридного белка люциферазы светляков *L. lateralis* с ДНК-связывающим белком. В качестве ДНК-связывающего белка были использованы различные варианты транскрипционных факторов, содержащих домен «цинковые пальцы»: Sp1, Zif268, B2, специфически распознающие двухцепочечные последовательности ДНК 5' -GGGGCGGGG-3', 5' -GCGTGGGCG-3' [57] и 5' -GТАААТGАТ-3' [56] соответственно. Для увеличения растворимости гибридного белка и возможности использования аффинной хроматографии для его очистки на N-конец гибридного белка была добавлена, как и в работе [129] глутатион S-метил трансфераза (GST). Экспрессию гена гибридного белка проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3), однако выход белка был невысок, а люциферазная активность гибридного белка составила всего 10%. Несмотря на существенное снижение люциферазной активности, полученный гибридный белок все же позволял селективно определять бактериальный геном [58]. В следующей работе для увеличения выхода гибридного белка и люциферазной активности была создана плаزمид на основе той же векторной системы, кодирующая Luc-

Zif268 в виде гибридного белка со стрептавидином, при этом люциферазная активность составила около 55 % от исходной [56]. Более удачный вариант гибридного белка люциферазы светляков с ДНК-связывающим белком (His₆-SSB-Luc) был предложен японскими учеными с использованием той же экспрессионной системы и штамма-продуцента. В качестве ДНК-связывающего белка был использован домен, способный связываться с одноцепочечной ДНК, выделенный из клеток *E. coli* штамма JM109, к которому на N-конце была добавлена His₆ последовательность, обеспечивающая простой способ очистки белка методом металлохелатной хроматографии. При этом люциферазная активность гибридного белка полностью сохранялась, а SSB-домен проявлял специфическую активность [91].

Таблица 5. Гибридные белки на основе люциферазы светляков, способные связывать ДНК

Гибридный белок	Экспрессионная система	Метод очистки гибридного белка	Люциферазная активность	Ссылка
GST-Zif268– Luc	pGEX, <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	аффинная хроматография	10%	[58, 59]
GST-Sp1– Luc	pGEX, <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	аффинная хроматография	10%	[58]
GST- B2– Luc	pGEX, <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	аффинная хроматография	7,5%	[56]
SA- Zif268– Luc	pGEX, <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	аффинная хроматография	55 %	[56]
His ₆ -SSB-Luc	pET-His-SSB-Luc, <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	металлохелатная хроматография	100%	[91]

2.3. Применение конъюгатов и гибридных белков на основе люциферазы светляков в биоспецифическом анализе

Среди большого количества возможных применений конъюгатов и гибридных белков на основе люцифераз наиболее востребованным направлением является иммуноанализ, основанный на реакции взаимодействия антиген-антитело, позволяющий с высокой чувствительностью и селективностью проводить детекцию физиологически активных веществ. Быстрота, возможность автоматизации и высокая пропускная способность проведения анализа – открывают возможности его применения в клинических, фармакологических областях, в особенности в иммуногистохимии для чувствительной и специфической локализации аналита в отдельных участках тканей или клетках.

Преимущество биолюминесцентного метода детекции иммунокомплексов заключается в более высокой чувствительности регистрации биолюминесцентной метки по сравнению с колориметрическим методом детекции на основе пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы и

хемилюминесцентным метода детекции вследствие низкого квантового выхода (0,01) хемилюминесцентной реакции [130].

По способу регистрации метки можно выделить следующие основные типы систем:

1) Системы, в которых происходит фиксация люциферазы на поверхности мишени, после чего образовавшийся специфический комплекс отделяется, и детектируется биолюминесцентный сигнал. К таким системам в основном относится гетерогенный иммуноанализ [131-135].

2) Системы на основе резонансного переноса энергии, в которых специфические взаимодействия приводят к изменению спектра люминесценции (тушение, появление дополнительной полосы в области испускания акцептора) [55].

3) Системы, в которых под действием аналита изменяется реакционная способность люциферазы. Это могут быть системы, на основе гибридных белков/конъюгатов, в составе которых люцифераза находится в неактивном состоянии, а в присутствии аналита происходит расщепление гибридного белка или конформационные изменения, в результате которых люциферазная активность восстанавливается, либо наоборот, что встречается гораздо реже, в присутствии аналита активность люциферазы уменьшается [92]. Вторым вариантом таких систем – сплит-системы, в которых изначально люцифераза разделена на две части таким образом, что в отсутствие аналита биолюминесцентная реакция не протекает. Специфические взаимодействия в присутствии аналита приводят к восстановлению целостности молекулы люциферазы, а, следовательно, появлению биолюминесценции. Частным случаем являются системы с использованием гибридных белков суперскрученных белков и люциферазы с циклической перестановкой, которые в основном используются для детекции протеазной активности [101]

2.3.1. Применение конъюгатов и гибридных белков на основе люциферазы светляков в гетерогенном ИФА

В данном разделе рассмотрены системы первого типа, в которых специфические домены, связанные с люциферазой, приводят к ее фиксации на поверхности мишени (антигена, антитела, ДНК, РНК) без изменения ее физико-химических свойств и измерения ее биолюминесцентного сигнала. В основном это различные варианты гетерогенного иммуноанализа (одностадийный или двухстадийный, конкурентный или неконкурентный).

Среди реагентов для иммуноанализа на основе люциферазы наибольшее распространение получил универсальный гибридный белок биотинилированной люциферазы b1 248 фирмы Киккоман [120] в виде нековалентно-связанных комплексов, образованных биотин-стрептавидиновыми взаимодействиями, с антителами (Рис. 7 А, В) или их фрагментами (Рис. 7 С), либо антигенами [131].

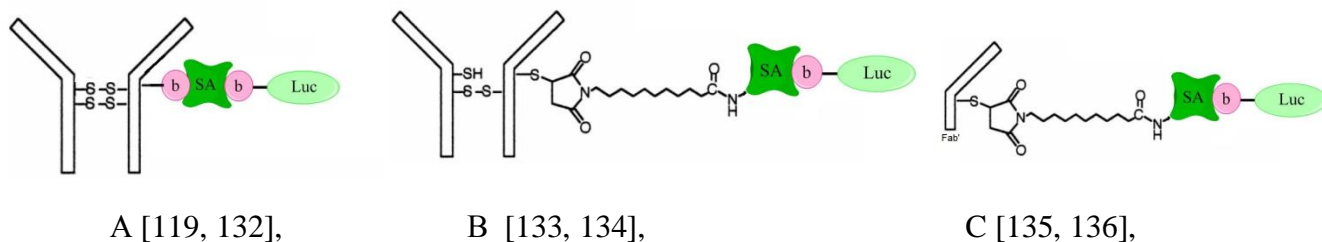


Рис. 7. Возможные нековалентные комплексы антител с биотинилированной люциферазой.

Были получены различные варианты комплексов люцифераза-антитела, стабильность которых зависела от структуры. Так комплекс (Рис. 7 А), описанный в работах [119, 132], все компоненты которого связаны через биотин, отличался невысокой стабильностью - менее 30% люциферазной и иммунологической активности комплекса сохранялось после инкубации при 37 °С в течение недели [133]. Использование ковалентной связи между антителом и стрептавидином (Рис. 7 В), привело к значительному повышению стабильности комплекса [133, 134]. При тех же условиях инкубации сохранялось до 70% от исходной люциферазной и иммунологической активности комплекса. Стоит отметить, что только 4,7% биотинилированной люциферазы диссоциировало при инкубации в течение недели, такая высокая стабильность характерна для химически полученных конъюгатов антител с пероксидазой и фосфатазой. При хранении в течение 6 месяцев при 4°С в концентрации 1 нМ комплекс сохранял 100% активности [133].

Рассмотренные выше комплексы находят применение для определения широкого спектра аналитов: различные гормоны [131], белки [119, 132], вирусы [136], патогенные микроорганизмы и их поверхностные антигены (Таблица 6). Для сравнения в таблице приведены данные и для конъюгатов люциферазы и фотопротеинов с биотином [68] в составе нековалентных комплексов с антителами, а также конъюгатов люциферазы [75] и пероксидазы с антителами.

Согласно литературным данным, анализ на основе биолюминесцентного метода детекции обладает более высокой чувствительностью (предел обнаружения в 50-100 раз ниже) по сравнению с иммунохроматографическим методом [137] и ИФА с использованием пероксидазы [136], однако, уступает радиоиммунологическому анализу (предел обнаружения тиреотропного гормона в 20 раз ниже [134]) и РТ-ПЦР (предел обнаружения 10⁴ копий ДНК/г образца) [138, 139]. При этом структура комплекса Luc-Ab, полученного с использованием биотинилированной люциферазы или фотопротеина (Luc-bssr-b--SA--Ab), стрептавидин-люциферазы (Luc-SA--Ab) или конъюгата с антителами (Luc-Ab) не оказывает существенного влияния на чувствительность [68]. Была получена хорошая корреляция результатов,

полученных при использовании различных методов. Использование магнитных частиц значительно сокращает время проведения анализа. Стоит отметить, что в работах [119], [132] использование двух биотинилированных люцифераз, излучающих в различных областях спектра позволило провести одновременное определение концентрации двух аналитов в одной смеси с использованием соответствующих фильтров, что открывает возможности использования люцифераз в мультиплексном анализе.

Таблица 6. Использование биотинилированной люциферазы в комплексе со стрептавидином в гетерогенном ИФА

Метод	Детектирующий комплекс	Антиген	Время анализа	Диапазон определяемых концентраций	Ссылка
Конкурентный ИФА на магн. ч	S- эквол- -SA- b-бср-Лус	Эквол (фитоэстроген)	45 мин	960-3700 нМ	[131]
2-х стадийный сэндвич ИФА на планшете	Ab-b-SA-b-Акворин	Альфафето-протеин	1,5 ч	0,15-1500 пМ	[68]
	<i>Cypridina</i> -b-SA	α -интерферон	3,5 ч	0,4–25 пМ	[76]
	HRP -Ab	α -интерферон	3,5 ч	1,25-50 пМ	[76]
Одностадийный сэндвич ИФА	Рис. 7В	Тиреотропный гормон	15 мин	0,0025–200 мкед./мл	[134]
	Ab-SA- b-Лус	Тропонин	15 мин	0,25-8 пМ	[75]
	Ab-Лус	Креатинкиназа	15 мин	0,07-1,2 нМ	[75]
2-х стадийный сэндвич ИФА на магнитных частицах	Рис. 7А	PG I и PG II	15 мин	0,05–5 нМ PG I, 0,025–2,5 нМ PG II	[119], [132]
	Рис. 7В	ПСА	15 мин	0.01 пМ– 3,6 нМ	[133]
	Рис. 7С	Вирусный антиген гепатита В	30 мин	0,0025-125 ед/мл	[136]
	HRP -Ab		1,5 ч	12,5 мед/мл	[136]
	Рис. 7С	Капсидный антиген норовируса	30 мин	0,25-10000 пкг/мл, $7,1 \times 10^5$ копий/г, $1,5 \times 10^4$ частиц/мл	[135]
ИФА на планшете	HRP -Ab	Капсидный антиген норовируса	1,5 ч	10^6 - 10^7 копий/г	[140]
Имунохроматография	HRP -Ab		20 мин	4.5×10^6 копий/мл	[137, 141]

Обозначения: HRP - пероксидаза хрена, b - биотин, PG I и PG II - сывороточный пепсиноген I и II типов, ПСА- простатаспецифичный антиген.

Особенно стоит отметить использование биотинилированной люциферазы для специфического определения патогенных микроорганизмов в суспензии клеток, основанного на детекции их антигенов (белок А, белок G [142], липополисахариды [143] и др.) с использованием гетерогенного иммуноанализа, и для дифференциации штаммов, устойчивых и восприимчивых к действию антибиотиков. В качестве примера можно привести

дифференциацию метициллин-резистентного и метициллин-восприимчивого штамма *Staphylococcus aureus*, путем детекции пенициллин-связывающего белка 2 и 2' (уникального маркера), экстрагированных из мембраны *Staphylococcus aureus*, с использованием сэндвич иммуноанализа. Предел обнаружения пенициллин-связывающего белка 2 составил 50 пг/мл, а белка 2'-500 пг/мл [144].

Методы детекции патогенных микроорганизмов или их поверхностных антигенов с использованием биотинилированных антител и комплекса биотинилированной люциферазы со стрептавидином не отличаются высокой чувствительностью - минимальная детектируемая концентрация клеток составляет $\sim 5 \times 10^4$ - 5×10^5 КОЕ/мл. Для определения более низких концентраций требуется предварительное культивирование клеток в селективной среде, что увеличивает длительность анализа. Так, Фукуда с соавторами [16] детектировали присутствие в образце ~ 50 КОЕ/мл клеток *Staphylococcus aureus* после 7 ч культивации [142]. Авторы работы [17] разработали метод 24-часового биолюминесцентного иммуноанализа клеток *Salmonella* в смывах тушек цыплят, а в работе [143] был оптимизирован состав среды для культивирования и улавливающий агент, иммобилизованный на поверхности планшета (вместо моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток *Salmonella* был использован полимиксин В), однако предел обнаружения после культивации оставался довольно высоким (5×10^5 КОЕ/мл с использованием антител и 5×10^4 КОЕ/мл с использованием полимиксина В) [143].

2.3.2. Применение гибридных белков на основе люциферазы светляков для определения ДНК или РНК

Альтернативным методом детекции патогенных микроорганизмов являются методы на основе ПЦР, позволяющие амплифицировать целевую ДНК в необходимое количество раз, однако их использование в некоторых случаях затруднено ингибированием полимеразы компонентами, которые входят в состав образца. Кроме того, для дифференциации специфического и неспецифического ПЦР-продукта требуются дополнительные стадии разделения [145] или использование специфической метки, способной связываться только с целевым участком ДНК, в частности, гибридных белков на основе люциферазы светляков с ДНК или РНК-связывающими доменами, свойства которых описаны выше.

Принцип анализа заключается в детекции специфических комплексов, образованных фрагментами целевой ДНК, амплифицированными методом ПЦР, и гибридным белком на основе люциферазы, распознающим специфический участок в ее составе. В некоторых случаях на стадии ПЦР-амплификации вводят биотин для возможности иммобилизации амплифицированной ДНК на поверхности планшета или магнитных частиц, покрытой стрептавидином (Рис. 8).

Данный метод позволяет селективно определять такие патогены как *Legionella pneumophila*, *Salmonella*, *E. coli O157* и другие *coli*-формы в присутствии посторонних геномов, а также вирусы, например, *Norovirus* с пределом обнаружения от 10 копий геномной ДНК/проба перед реакцией ПЦР. При этом предел обнаружения для анализа на основе люциферазы в 100 раз ниже, по сравнению с таким же анализом, но с использованием пероксидазной метки [58] (Таблица 7).

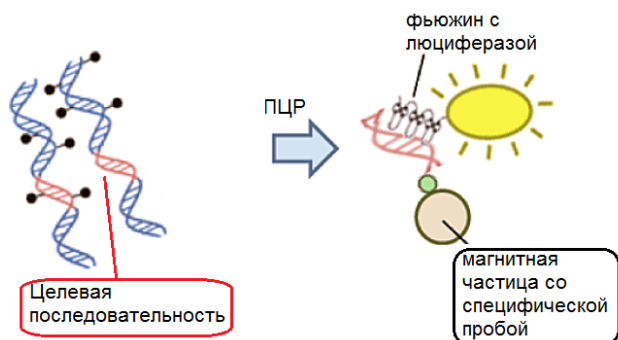


Рис. 8. Схема детекции целевой ДНК с использованием гибридного белка на основе люциферазы.

Таблица 7. Использование гибридных белков на основе люциферазы светлячков для детекции патогенных микроорганизмов.

Гибридный белок	Аналит	Предел обнаружения, количество ДНК до и после ПЦР	Ссылка
D12H-Luc	PHK (UUAGGG) ₄	3·10 ¹³ копий	[129]
GST-Zif268– Luc	<i>Escherichia coli O157</i>	100 копий, 100-10 ⁴ 10 ¹⁰ -10 ¹³ копий после ПЦР	[58]
SA-Zif268– Luc	<i>Escherichia coli</i>	10 копий 10-10 ⁶ копий после ПЦР	[56]
SA-Zif268– Luc	<i>Salmonella</i>	10 копий 10-10 ⁶ копий после ПЦР	[56]
GST-Sp1– Luc	<i>Legionella pneumophila</i>	10 копий 10 ¹⁰ (1,7 пМ) копий после ПЦР	[58]
GST - Sp1---антитела к GST-пероксидаза	<i>Influenza A virus</i>	10 ¹² (170 пмоль) копий после ПЦР	[57, 58]
GST- B2– Luc	<i>Norovirus</i>	нет данных	[56]

Обозначения: GST-глутатион S-метилтрансфераза, см. Таблица 5

Альтернативными методами детекции ДНК с использованием люциферазы являются полиферментные системы и гибридизационный анализ с использованием гена люциферазы. В качестве примера можно привести методику детекции ДНК ВИЧ с использованием конъюгата стрептавидин-пируваткиназа, синтезирующего АТФ, который детектируется с использованием

люциферазы светляков [146]. Методика включала в себя ПЦР специфического участка, гибридизацию с зондом, иммобилизованным на поверхности и биотинилированными зондами, используемыми для детекции, иммобилизацию конъюгата стрептавидин-пируваткиназа на биотинилированных зондах и биолюминесцентную детекцию АТР-продукта. Предел обнаружения был в два раза ниже, чем для методов с использованием гибридного белка люцифераза-«цинковые пальцы»: 5 копий плазмиды, что эквивалентно $7 \cdot 10^{-18}$ моль/лунка [146]. Такой же предел обнаружения характерен и для гибридизационного анализа [50, 51]. Однако измерение люминесценции занимало довольно долгий промежуток времени: 60 мин в первом случае, и 90 минут во втором [50].

Гибридные белки на основе люциферазы могут быть использованы не только для детекции патогенной или вирусной ДНК, но и для анализа ее модификаций: метилирования и др. Например, идентификация модификации гистонов и определение уровня метилирования промоторных регионов генов-супрессоров опухолей используются при поиске биомаркеров, и позволяет проводить диагностику на ранних стадиях развития опухолей. Для этого в представленную выше схему анализа могут быть добавлены дополнительные стадии отделения целевой (модифицированной) ДНК иммуномагнитным или иммуноосаждением с последующим ее высвобождением (плавлением) из иммунокомплекса перед стадией ПЦР. В качестве примера можно привести определение уровня метилирования андрогенного рецептора [59]. В работе [59] на первой стадии проводили осаждение метилированной ДНК путем иммобилизации на магнитных частицах, содержащих на своей поверхности CpG-связывающие домены (MBD), специфичные к метилированной ДНК. Несвязавшуюся ДНК удаляли. Иммобилизованную на частицах ДНК отделяли от частиц и проводили 27 циклов ПЦР, при которых помимо амплификации вводили биотин. Затем биотинилированную ДНК иммобилизовали на частицах покрытых стрептавидином и детектировали с использованием гибридного белка GST-Zif268–Luc. Суммарную концентрацию ДНК (метилированной и неметилированной), принимаемую за 100% определяли по аналогичной схеме, но без стадии иммуномагнитного осаждения. Аналитические характеристики системы представлены в Таблице 8. Данный метод позволяет получить результат уже через 3,5 часа, в то время как традиционный метод: секвенирование дисульфитом натрия занимает около 12 часов, поскольку требует превращения неметилированных цитозиновых остатков в урацил. В альтернативном методе определения метилирования ДНК [46] используются рестриктазы, расщепляющие только неметилированную ДНК, однако данный метод не может быть использован для всех регионов генома вследствие ограниченного числа сайтов узнавания рестриктаз [147].

Аналогичный подход был использован для детекции модификации гистонов [90]. В работе [90] авторы предложили использовать гомогенный метод детекции ПЦР-продуктов

(вместо гетерогенного с использованием магнитных частиц) с использованием биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), который возникал при связывании люциферазы с целевой ДНК, меченой интеркалирующим красителем BOBO-3. Стоит отметить, что данный метод существенно увеличивает специфичность анализа по сравнению с методом, предложенным ранее на основе сочетания иммунопреципитации с количественным ПЦР и детекцией ПЦР-продукта с использованием красителя SYBR Green, который не позволял различать специфический и неспецифический ПЦР-продукт. Для повышения специфичности широко используют метод ПЦР в режиме реального времени с использованием taqMan-проб [148], однако примеси, присутствующие в реальных образцах, в некоторых случаях могут оказывать влияние на активность ДНК-полимераз и, как следствие, на результаты анализа и выбор аналитической системы [149].

Таблица 8. Системы для анализа модификации ДНК

Люцифераза	Аналит	Специфический реагент для отделения ДНК	Детекция специфического комплекса	Чувствительность	Ссылка
GST-Zif268-Luc	модификация гистонов андрогенного рецептора,	Специфические антитела к модификации гистонов	BRET между гибридным белком и красителем BOBO-3	25 нМ ДНК 10-10 ⁸ копий ДНК до ПЦР	[90]
GST-Zif268-Luc	Метилирование андрогенного рецептора	Метил-SpG-связывающий белок - частица	Интенсивность биолюминесценции на магнитных частицах, покрытых SA	10 ⁶ -10 ¹¹ копий ДНК до ПЦР уровень метилирования 1-100%	[59]

2.4. Биоаналитические системы на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы

2.4.1. Основные принципы BRET

Резонансный перенос энергии (RET) - это безызлучательный перенос энергии от донора к акцептору, наблюдаемый только при их сближении на расстояние менее 10 нм. Для наблюдения RET также необходимо перекрытие спектра эмиссии донора со спектром поглощения акцептора и ориентация диполей донора и акцептора не должна составлять угол 90°.

При этом эффективность переноса описывается следующим уравнением:

$$E_{RET} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6},$$

Где r -расстояние между донором и акцептором, R_0 - ферстеровский радиус – характеристическое расстояние, при котором эффективность переноса составляет 50% (20 - 50 Å), который определяется по формуле:

$$R = [2.8 \times 10^{17} \kappa^2 Q_D \varepsilon_A J(\lambda)]^{1/6}$$

Где J -интеграл перекрытия спектров испускания донора и поглощения акцептора, κ - параметр, зависящий от ориентации диполей, Q_D -квантовый выход донора, ε - коэффициент экстинкции акцептора ($M^{-1} \text{ см}^{-1}$) [150].

На практике RET проявляется в изменении регистрируемого спектра испускания: уменьшении интенсивности испускания донора и появлении спектра испускания акцептора. В случае гибридизации молекулы донора с одним участником и молекулы акцептора с другим участником изучаемого взаимодействия открывается возможность мониторинга межмолекулярных, например, межбелковых взаимодействий в живых клетках, а также конформационных изменений в молекуле, если донор и акцептор локализованы на разных ее концах, расстояние между которыми изменяется при конформационных изменениях. Соотношение интенсивности излучения акцептора к интенсивности излучения донора (RET сигнал) открывает возможности использования RET и для количественного анализа.

Если функцию донора выполняет люцифераза, то резонансный перенос называют биолюминесцентным (BRET). В природе BRET встречается в морских организмах, таких как морские анютины глазки *Renilla reniformis* и медуза *Aequorea victoria*. В этих случаях функцию акцептора выполняет зеленый флуоресцентный белок, а донора - *Renilla* люцифераза (Rluc) или акворин соответственно [130].

Использование люциферазы в качестве донора имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным флуоресцентным резонансным переносом энергии (FRET), с использованием в качестве донора флуоресцентного белка. В случае BRET нет необходимости во внешнем источнике света, поэтому весь свет, излучаемый акцептором - это результат переноса энергии, что приводит к снижению фонового сигнала, при длине волны испускания флуорофора-акцептора. Отсутствие необходимости в возбуждающем свете также препятствует фотообесцвечиванию образца и открывает возможность использования в системах, где требуется работать с фоточувствительными клетками, а также клетками со значительной автофлуоресценцией при возбуждающем свете, необходимом для FRET (близкий УФ). Более высокая чувствительность регистрации BRET-сигнала позволяет работать с более низкими

концентрациями белков, что помимо экономического преимущества приводит к минимизации неспецифических взаимодействий между изучаемыми белками.

Например, в работе [151] в качестве донора и акцептора были использованы тяжелые и легкие цепи вариабельных участков антител, меченые люциферазой и флуоресцентным белком, соответственно, вместо используемых в системе с FRET голубого и зеленого флуоресцентных белков. При этом концентрации реагентов удалось снизить в 40 раз для донора и в 3 раза для акцептора [151]. Это привело к снижению предела детекции антигена на два порядка (с 0,8 мМ для FRET до 7 нМ для BRET) [128]. Наконец, оборудование, необходимое для детекции BRET проще и дешевле, нежели для FRET, где требуется источник для создания возбуждающего излучения.

Основной задачей при разработке BRET систем является правильный выбор пар донор-акцептор с хорошо разделяемыми спектрами испускания донора и акцептора, хотя максимальное перекрытие спектра испускания донора со спектром поглощения (возбуждения) акцептора необходимо для высокой эффективности переноса энергии.

2.4.2. BRET-системы на основе *Renilla* люциферазы

Первое применение BRET было описано в 1999 году. В данной работе Ху с коллегами изучали взаимодействия белков (гомодимеризации), кодируемых циркадными генами KaiA и KaiB в цианобактериях [152]. В качестве донора была использована *Renilla* люцифераза ($\lambda_{\text{max em}} = 480$ нм), в качестве акцептора - желтый флуоресцентный белок (мутант зеленого флуоресцентного белка, $\lambda_{\text{ex}} = 511$ нм, $\lambda_{\text{max em}} = 525$ нм) [152]. С этого момента количество публикаций с использованием *Renilla* люциферазы стремительно возрастало [153]. Были синтезированы новые субстраты для люциферазы, различные мутантные формы как *Renilla* люциферазы, так и желтых флуоресцентных белков с улучшенными характеристиками. В зависимости от пары донор/акцептор сформировались следующие версии BRET: BRET¹ - классическая версия с использованием коэлюциферазина в качестве субстрата для *Renilla* люциферазы (MW = 36 кДа и $\lambda_{\text{max em}} = 480$ нм) в паре с желтым флуоресцентным белком ($\lambda_{\text{max em}} = 530$ нм) и различными его модификациями [152]; BRET² – версия с использованием субстрата DeepBlueC - химического производного коэлюциферазина, смещающего спектр биолюминесценции *Renilla* люциферазы в синюю область ($\lambda_{\text{max em}} = 395$ нм) и различных вариантов зеленого флуоресцентного белка, используемого в качестве акцептора ($\lambda_{\text{ex}} = 400$ нм, $\lambda_{\text{max em}} = 510$ нм) [154]. BRET² обладает лучшим спектральным разрешением пиков люминесценции и эмиссии акцептора по сравнению с BRET¹, что играет важную роль для скринингового анализа, когда требуется высокое соотношение сигнал/шум. Недостатком BRET² является то, что, что интенсивность биолюминесценции уменьшается в 300 раз при

использовании в качестве субстрата DeepBlueC. Это частично удалось преодолеть получением мутантной формы RLuc8 (eBRET²) [155], квантовый выход которой был в 32 раза выше по сравнению с исходной люциферазой, однако сигнал остался по-прежнему ниже, чем в BRET¹.

2.4.3. BRET-системы на основе люциферазы светляков

Несмотря на неослабевающий интерес к *Renilla* люциферазе, она обладает рядом недостатков, таких как: низкий квантовый выход и менее стабильное свечение по сравнению с люциферазой светляков; максимум спектра биолюминесценции наблюдается в зеленой области длин волн, что затрудняет регистрацию сигнала в тканях, что связано с низкой проникающей способностью зеленого света. Кроме того стоит отметить, что уровень автофлуоресценции клеток при длинах волн, характерных для эмиссии *Renilla* люциферазы выше, чем для люцифераз светляков, для которых максимум биолюминесценции находится в области 540-630 нм в зависимости от структуры фермента [156].

Первые работы с использованием люциферазы светляков ($\lambda_{\max \text{ em}} = 560\text{-}580 \text{ нм}$) в качестве донора для BRET (такие системы получили название BRET³ [157]) были опубликованы в 2002 году [55]. Это было связано с появлением красных флуоресцентных белков ($\lambda_{\text{ex}} = 558$ и $\lambda_{\max \text{ em}} = 583 \text{ нм}$), спектральные характеристики которых, позволяли наблюдать BRET для люцифераз светляков [158]. Для анализа межбелковых взаимодействий *in vivo* предпочтительнее использовать флуоресцентные белки в качестве акцепторов из-за возможности получения их гибридных белков с одним из участников изучаемого взаимодействия. Так, первый гибридный белок для BRET-системы на основе люциферазы светляков был получен Arai с соавторами [55] и представлял гибридный белок люцифераза-глутатион-S-трансфераза, в качестве акцептора использовали гибридный белок красного флуоресцентного белка с белком G. Спектральные характеристики донора и акцептора представлены на Рис. 9.

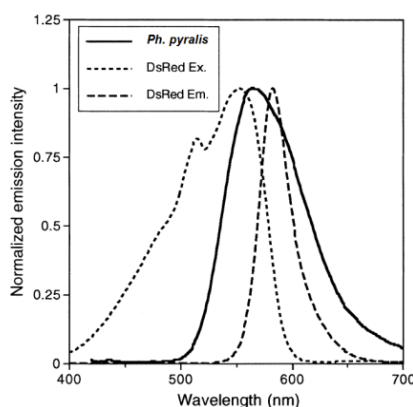


Рис. 9. Спектры биолюминесценции для люциферазы светляков *Photinus pyralis*, спектры поглощения и эмиссии для красного флуоресцентного белка (DsRED) [55]

Достичь существенной чувствительности с использованием данной BRET-системы не удалось из-за высокого фонового сигнала, обусловленного недостаточным разрешением спектров биолюминесценции люциферазы и эмиссии красного флуоресцентного белка и небольшого значения BRET-сигнала на этом фоне. Данный метод требовал значительного усовершенствования, которое осуществил Бранчини с соавторами только в 2011 году, предложив метод с последовательным резонансным переносом энергии, который будет описан ниже [159].

Другим семейством акцепторов для люциферазы светляков являются красители, отличающиеся по спектральным характеристикам, коэффициенту экстинкции, квантовому выходу и возможности их модификации функциональными группами. Для эффективной регистрации BRET акцептор должен обладать высоким коэффициентом экстинкции, максимальным интегралом перекрытия спектра поглощения красителя и эмиссии люциферазы, а так же растворимостью в реакционной среде, пригодной для конъюгации со специфической молекулой и возможностью биоконъюгации.

В качестве акцепторов могут быть использованы кумариновые и родаминовые красители, однако их коэффициенты экстинкции, как правило, невысоки ($\epsilon = 20000-60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), а также цианиновые красители, обладающие более высоким коэффициентом экстинкции ($\epsilon = 150000-250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В частности, красители Alexa fluor, которые являются производными перечисленных красителей, содержащими сульфогруппу и отличаются более высоким квантовым выходом, стабильностью и растворимостью в воде [160].

Несмотря на большое разнообразие доступных красителей, известны лишь единичные работы с их использованием в качестве акцептора для BRET. Одной из возможных причин является необходимость их химической конъюгации с одним из участников изучаемого взаимодействия, которая имеет свои ограничения, такие как неоднородность состава полученных конъюгатов и в некоторых случаях частичная потеря специфической активности. Так японскими учеными [161] для конкурентного анализа тус пептида была получена пара донор/акцептор: гибридный белок глутатион-S трансфераза-антиген (тус пептид)-люцифераза светляков, выступающий в качестве донора и антитела меченые цианиновыми красителями (акцептор). В данной работе были использованы цианиновые красители с различными интегралами перекрытия спектров поглощения красителей со спектром биолюминесценции люциферазы светляков ($\lambda_{\text{max em}} = 550 \text{ nm}$): Cy3 ($\lambda_{\text{max em}} = 570 \text{ nm}$), Cy3.5 ($\lambda_{\text{max em}} = 596 \text{ nm}$), Cy5 ($\lambda_{\text{max em}} = 672 \text{ nm}$). Было проанализировано влияние взаимного перекрытия спектров биолюминесценции донора и поглощения/испускания акцептора на чувствительность анализа. Для калибровочных кривых с использованием красителя Cy3 был характерен узкий динамический диапазон и высокий фоновый сигнал. Для Cy5 наблюдалось только тушение

биолюминесценции без изменения формы спектра. Краситель Cy3.5 оказался оптимальным, поскольку наблюдался меньший фоновый сигнал и более широкий динамический диапазон изменения BRET-сигнала по сравнению с красителем Cy3. При изменении BRET- сигнала, рассчитанного как соотношение интенсивностей излучения при 596 нм к 550 нм (I_{596}/I_{550}), от 0,2 до 0,8, диапазон измеряемых концентраций составил 0,2 - 2 мкМ.

Системы на основе BRET с использованием люциферазы светляков можно разделить на два типа.

Первый тип - межмолекулярный BRET (классический вариант), где расстояние между донором и акцептором изменяется под действием изучаемых факторов: а) донор и акцептор находятся в составе двух разных молекул, которые под действием изучаемого фактора ассоциируют [55] или диссоциируют; б) донор и акцептор, находятся в составе одной молекулы, но разделены расщепляемым линкером, либо участком, отвечающим за конформационные изменения [162]. Такой вариант используется для анализа межмолекулярных взаимодействий.

Второй тип - внутримолекулярный BRET, примером которого служит перенос энергии возбужденного состояния люминофора (продукта люциферазной реакции) на молекулу красителя или флуоресцентного белка, ковалентно иммобилизованного на поверхности люциферазы, в результате чего происходит сдвиг спектра биолюминесценции в область больших длин волн. Последний подход находит применение при фундаментальных исследованиях различных факторов, влияющих на BRET, для создания высокоэффективных реагентов для имиджинга в условиях *in vivo*, поскольку, как уже было сказано, красный свет обладает большей проникающей способностью по сравнению с зеленым [163].

Конъюгаты люцифераза-краситель были получены для люцифераз *Cypridina* [163] и для мутантной термостабильной формы люциферазы *P. pyralis* [69], а также для биотинилированных гибридных белков на их основе.

Так для люциферазы *Cypridina* реакцию конъюгации проводили по ОН-группам (гликолевые цепочки люциферазы), с активацией перйодатом и последующим использованием индоцианового производного красителя HiLyte Fluor™ 647-гидразид. В результате был получен конъюгат состава 1:2 (люцифераза:краситель), для которого наблюдался бимодальный спектр, не зависящий от физиологических условий, с двумя максимумами испускания при 460 нм, 675 нм, соответствующими биолюминесценции люциферазы и флуоресценции красителя, однако эффективность переноса BRET-переноса была невысокой: интенсивность испускания красителя при $\lambda_{\max \text{ em}} = 675$ нм составляла 30% от интенсивности испускания люциферазы $\lambda_{\max \text{ em}} = 460$ нм [163].

В работе [69] для люциферазы *P. pyralis* была значительно улучшена эффективность переноса, изучено влияние расстояния, ориентации диполей и квантового выхода красителя на эффективность внутримолекулярного BRET. Для этого были получены мутантные формы фермента, содержащие на поверхности один и два остатка цистеина, по которым проводили конъюгацию с красителями Alexa Fluor® nIR dyes AF, содержащими малеимидную группу. Было показано, что при сближении красителя с активным центром люциферазы всего на 15 ангстрем (мутанты с одним цистеином в положении 399 или 169) эффективность BRET возрастала в 5-9 раз до 1:4. При введении обоих цистеинов T169C и S399C соотношение $I_{\lambda_{\max \text{ em Luc}}} / I_{\lambda_{\max \text{ em Dye}}$ увеличилось до 1:34, что в 8,5 раз эффективнее, чем для квантовых точек (1:4) [69]. Другой фактор, влияющий на эффективность переноса – это ориентация диполей красителей и квантовый выход их флуоресценции. Так, для AF680 с квантовым выходом 0.36, эффективность BRET была в 8,5 раз больше по сравнению с AF750, для которого квантовый выход в 3 раза меньше. Конъюгат с красителем AF680 был получен и для гибридного белка люциферазы *P. pyralis* (T169C, S399C) с биотинилированным биотинсвязывающим доменом, содержащим 12-аминокислотный линкер, расщепляемый протеазами, позволяющий измерять активность фактора Ха в крови в физиологических концентрациях. Для окрашенного гибридного белка эффективность BRET ($I_{\lambda_{\max \text{ em Luc}}} / I_{\lambda_{\max \text{ em Dye}}}$) составила 1:14, однако биолюминесцентная активность снизилась до 70% от активности того же окрашенного фермента без домена.

Последовательный резонансный перенос энергии на основе люциферазы светляков.

Как уже упоминалось выше, использование люциферазы светляков в качестве донора и красного флуоресцентного белка в качестве акцептора затруднено из-за высокого биолюминесцентного сигнала при длине волны испускания акцептора. Способ улучшения разрешения максимумов биолюминесценции и эмиссии акцептора впервые был предложен Бранчини с соавторами [159] и был назван последовательный резонансный перенос энергии (SRET), сочетающий в себе две последовательных стадии переноса- BRET, затем FRET (Рис. 10).

Суть метода сводилась к модификации акцептора в паре BRET (красного флуоресцентного белка mKate S158A, $\lambda_{\text{ex}} = 585$, $\lambda_{\max \text{ em}} = 625$) красителем (Alexa Fluor 680, $\lambda_{\text{ex}} = 680$, $\lambda_{\max \text{ em}} = 705$). При этом добавлялась дополнительная стадия FRET-переноса возбужденного состояния красного флуоресцентного белка на краситель, после чего регистрировалось испускание от красителя ($\lambda_{\max \text{ em Luc}} = 560$, $\lambda_{\max \text{ em Dye}} = 705$ нм), спектр эмиссии которого был существенно смещен в красную область и не перекрывался со спектром биолюминесценции люциферазы (Рис. 10). Таким образом, наблюдалось практически полное разрешение пиков эмиссии донора и акцептора. Стоит отметить высокую эффективность FRET,

(практически полное отсутствие эмиссии красного флуоресцентного белка), обусловленную минимальным расстоянием между флуоресцентным белком и ковалентно связанным с ним красителем.

При введении специфических сайтов узнавания протеаз между донором и акцептором BRET, были получены высокочувствительные сенсоры для детекции активности протеаз и их количественного определения. Пределы детекции составили 0,41 нМ для каспазы-3, 1 нМ для тромбина, 58 нМ для фактора Ха [159].

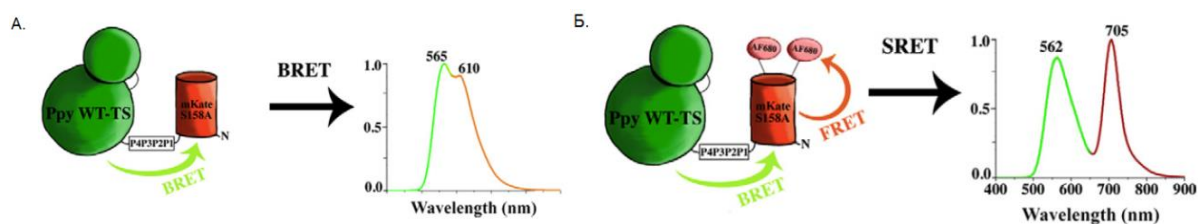


Рис. 10. Схема переноса энергии и спектр испускания, полученный для данной схемы. А. BRET- перенос энергии люциферазы *P. pyralis* (Ppy WT-TS) на красный флуоресцентный белок (mKate S158A), В. SRET- перенос энергии люциферазы *P. pyralis* (Ppy WT-TS) на красный флуоресцентный белок (mKate S158A) с последующим переносом энергии на краситель Alexa Fluor 680, иммобилизованный на его поверхности [159].

2.4.4. Аналитическое применение BRET на основе люциферазы

Системы для количественного анализа на основе BRET можно разделить на два типа. Первый тип, наиболее распространенный и широко используемый, включает в себя системы, в которых происходит необратимое пространственное разделение пары донор/акцептор в присутствии аналита. Как правило, такие системы характерны для измерения протеазной активности, где донор и акцептор соединены линкером, содержащим специфическую последовательность. Под действием протеаз происходит уменьшение BRET сигнала. Подавляющее большинство таких систем было создано на основе люцифераз *Renilla* и ее мутантных форм [164], для люцифераз светлячков известны лишь единичные работы [159].

Ко второму типу, можно отнести системы, в которых наоборот происходит ассоциация донора и акцептора в присутствии аналита, которое сопровождается появлением или увеличением BRET-сигнала. К таким системам можно отнести изучение посттрансляционной модификации [97], детекцию различных эффекторов, индуцирующих взаимодействие между донором и акцептором, и лигандов, связывающихся с рецепторами и индуцирующих внутриклеточную передачу сигнала (инсулиновый рецептор) [165, 166] и многие другие, среди которых можно выделить иммуноанализ [167].

Иммуноанализ на основе BRET. Одним из перспективных и малоизученных направлений использования биоломинесцентного резонансного переноса энергии (BRET) является гомогенный ИФА

Иммуноанализ на основе BRET обладает рядом преимуществ перед классическим гетерогенным иммуноанализом: 1) отсутствие стадий разделения и отмывания несвязавшихся компонентов, 2) значительное сокращение времени анализа за счет условий его проведения в гомогенном растворе, что приводит к снижению диффузионных ограничений.

Как и гетерогенный иммуноанализ, иммуноанализ на основе BRET можно разделить на конкурентный и неконкурентный. Принцип неконкурентного анализа заключается в следующем: в отсутствие антител (антигена) белки BRET-системы (донор и акцептор) находятся в несвязанном состоянии и переноса энергии не наблюдается. При добавлении антител (антигена) в систему происходит образование тройного комплекса: донор-акцептор-антитело (антиген). При этом донор и акцептор сближаются настолько, что становится возможен резонансный перенос энергии, и появляется флуоресцентный сигнал (Рис. 11. А, В). При этом BRET-сигнал пропорционален концентрации антител (антигена), что и используется для количественного определения аналита [128].

Принцип конкурентного иммуноанализа заключается в использовании аналита, конъюгированного с донором/акцептором и антител, конъюгированных с акцептором/донором биоломинесценции. В отсутствие аналита наблюдается максимальный BRET-сигнал, который уменьшается пропорционально концентрации определяемого аналита, вводимого в систему [161].

Примером пары донор/акцептор для неконкурентного иммуноанализа являются гибридные белки легких и тяжелых цепей переменных участков антител к лизоциму куриного яйца с люциферазой *Renilla* Trx-VH-Luc (донор) и флуоресцентным белком Trx-VL-EYFP (акцептор). В структуру гибридных белков был добавлен тиоредоксин (Trx), улучшающий их растворимость при экспрессии (Рис. 11.А.). Данная система позволяет определять 7 -700 нМ лизоцима куриного яйца, что в 10 раз лучше, чем для аналогичного FRET [151].

Еще одним примером, где в качестве донора используется уже люцифераза светляков *Notaria parvula* (HpL) является пара люцифераза-глутатион-S-трансфераза (GST-HpL) и флуоресцентный белок-белок G (DsRed-PG), где белок G (PG) - это IgG-связывающий домен ситафилококка, способный связываться с Fc-фрагментами антител [55]. Донор и акцептор были получены генноинженерным путем в клетках *E. coli*, очищены аффинной хроматографией. Данная пара была использована для определения концентрации антител к глутатион-S-трансферазе (Ab) в диапазоне 0,1 нМ - 1 мкМ (Рис. 11.В). В случае добавления пептидного антигена между глутатион S-трансферазой и люциферазой, появляется возможность

использования данного гибридного белка для конкурентного анализа этого пептида. Эта идея была воплощена в работе [161] для определения с-туса пептида (онкогена) с использованием гибридного белка GST-туса-Luc в качестве донора и антител, меченых цианиновым красителем Cy 3 в качестве акцептора (Рис. 11.С). Диапазон измеряемых концентраций с-туса пептида составил 0,2 - 2 мкМ.

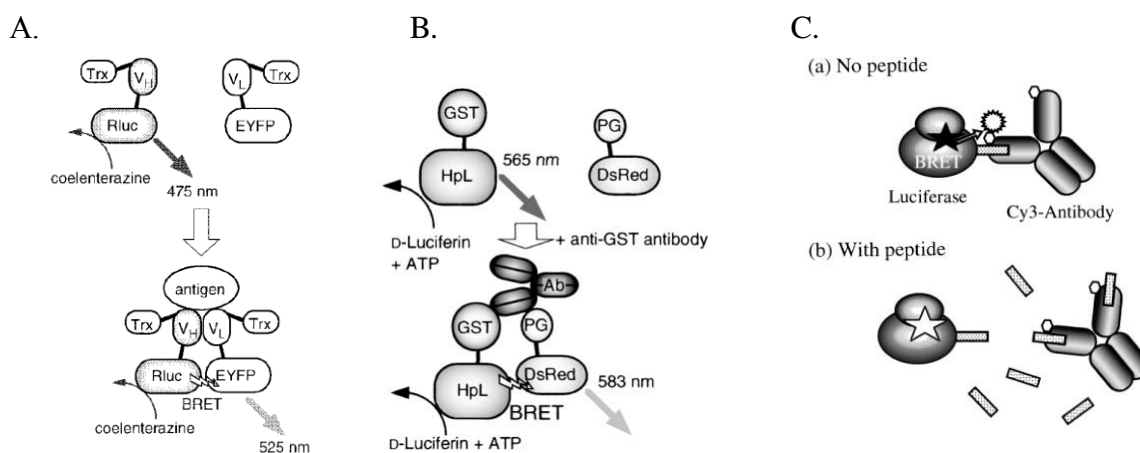


Рис. 11. Схемы иммуноанализа с использованием биолуминесцентного резонансного переноса энергии. **А.** В отсутствие антигена гибридные белки находятся в форме мономеров и BRET не наблюдается, добавление антигена индуцирует гетеродимеризацию легких (V_L) и тяжелых (V_H) цепей антител, что сопровождается появлением BRET от RLuc к EYFP [128]. **В.** В отсутствие антител гибридные белки находятся в форме мономеров и BRET не наблюдается, добавление антител индуцирует формирование тройного комплекса GST-HpL/Ab/DsRed-PG, что сопровождается появлением BRET от HpL к DsRed [55]. **С.** В присутствии гибридного белка GST-туса пептид-люцифераза и окрашенных антител (Cy 3-Antibody) наблюдается BRET от люциферазы к красителю Cy3, который уменьшается при добавлении туса пептида пропорционально его концентрации [161].

Важно отметить, что BRET в иммуноанализе может наблюдаться лишь в том случае, если расположение эпитопов, распознаваемых антителами обеспечивает необходимое сближение центра биолуминесценции люциферазы и центра поглощения акцептора при специфической реакции антиген-антитело, то есть в первую очередь метод подходит для детекции небольших молекул. Ohno с соавторами адаптировали метод на основе RET и для детекции таких относительно больших молекул как сывороточный антиген человека, но с использованием FRET [168]. Модификация метода заключалась в искусственном введении димеризационных лейциновых мотивов (с-Jun или FosB) на С-концы FRET-пары, способствующих более плотному сближению пары при иммунореакции, и, следовательно, улучшению эффективности FRET. Этот подход был использован для гомогенного сэндвич-иммуноанализа сывороточного антигена человека, но для BRET пока похожего подхода предложено не было.

Стоит отметить, что в литературе известны лишь отдельные работы, посвященные использованию люциферазы светляков в BRET-системах, особенно в иммуноанализе, однако преимущества люцифераз светляков перед другими люциферазами, описанные выше, показывают, что это направление весьма перспективно. Поэтому создание новых высокочувствительных биоаналитических систем на основе BRET с использованием люциферазы светляков является актуальной задачей

Анализ литературы показывает, что люцифераза светляков по своим физико-химическим свойствам имеет большой потенциал для применения в биоспецифическом анализе, который к настоящему времени недостаточно реализован. В связи с этим в настоящей работе поставлена задача создания новых реагентов на основе люциферазы светляков, для их дальнейшего применения в создании биоаналитических систем. Использование для этих целей люциферазы светляков *L. mingrelica* обусловлено тем, что сконструированы мутантные формы фермента с улучшенными свойствами по сравнению с люциферазой дикого типа: высокой каталитической активностью, термостабильностью; разработаны высокоэффективные методы экспрессии, экономичные и быстрые методы очистки препаративных количеств фермента. Эти особенности люциферазы светляков *L. mingrelica* позволяют получать реагенты (бифункциональные молекулы) на ее основе для создания высокочувствительных биоаналитических систем.

В связи с этим в настоящем исследовании были поставлены следующие задачи. Создание новых генноинженерных конструкций, позволяющих получать биотинилированную люциферазу и стрептавидин-люциферазу путем их экспрессии в клетках *E. coli*. Применение полученных гибридных белков в биоспецифическом анализе на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий на примере различных вариантов гетерогенного анализа для детекции клеток микроорганизмов. Разработка метода получения высокоактивных конъюгатов люциферазы с низкомолекулярными аналитами на примере прогестерона и создание на их основе новой системы для высокоэффективного биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET). Применение разработанной BRET-системы, позволяющей проводить иммуноанализ низкомолекулярного антигена (прогестерона) в гомогенных условиях.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Вещества и реагенты

Для работы с ДНК были использованы следующие реагенты: рестриктазы *AsuNI*, *ApaI*, *SaII*, *KpnI*, *Bgl II* («СибЭнзим», Россия), *PstI*, *XhoI* («Boehringer Mannheim», Германия); Pfu ДНК-полимераза, TaqSE ДНК-полимераза («СибЭнзим», Россия); смесь дезокси-нуклеотидтрифосфатов («СибЭнзим», Россия); T4 ДНК-лигаза, лигазный буфер, Taq ДНК-полимераза («Силекс», Россия); минеральное масло (mineral oil, PCR Reagent) («ICN», США); агароза (Type I-A: Low EEO) («Sigma», США); бромидистый этидий («Amresco», США); ДНК-маркеры для электрофореза («СибЭнзим», Россия); полилизин («Sigma», США). Олигонуклеотиды для проведения ПЦР были синтезированы в компании «Синтол», Россия. В работе использовали магнитные частицы покрытые стрептавидином Streptavidin C1 («Invitrogen», США), стрептавидин («Sigma», США), 3-О-карбоксиметилоксим прогестерона («Sigma», США), ДЦК («Sigma», США), N-гидроксисукцинимид («Pierce», США), глутаровый альдегид («Sigma», США), полистирольные частицы диаметром 240 нм 10%-ная суспензия в деионизованной воде («Bangs Laboratories, Inc.», США), плюроник F108-PDS («Allvivo Vascular», США); 2-иминотиолан гидрохлорид (реагент Траута), бычий сывороточный альбумин (BSA), тритон X-100, неонол-10, дитиотреитол (ДТТ), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), натриевую соль ампициллина («ICN», США); Твин-20, бакто-агар («Ferak», Германия); дитиотреитол («Fluka», Швейцария); дрожжевой экстракт, лактоза моногидрат («Panreac», Испания); имидазол, NiSO₄ («Sigma», США); MgSO₄·7H₂O, NaCl, NaH₂PO₄·H₂O, Na₂HPO₄·7H₂O, KCl, MgCl₂ додецилсульфат натрия, глюкоза моногидрат («Хеликон», Россия); (NH₄)₂SO₄ («BDH Laboratory Supplies», Англия); бакто-триптон («Becton Dickinson», Франция); уксусную кислоту, соляную кислоту, ацетат аммония; перегнанные этиловый спирт, глицерин и диметилсульфоксид («Реахим», ос. ч.); NaHCO₃, прочие неорганические соли («Союзхимреактив», Россия). Были использованы моноклональные биотинилированные и небитинилированные антитела SB:1B10B к сальмонелле серогруппы В, любезно предоставленные д.б.н. С.Г. Аббасовой (ИБХ РАН, Пушкино, Россия). Поликлональные кроличьи антитела к прогестерону, конъюгат вторичных антивидовых антител с пероксидазой, белок А любезно предоставленные к.х.н., с.н.с. Ж.В. Самсоновой, конъюгат стрептавидин-пероксидаза («Иммунотех», Россия). Были использованы субстраты люциферазы: динатриевая соль АТФ («Sigma», США); люциферин светляков («Люмтек», Россия). Были использованы следующие носители для хроматографии и колонки: сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция); 1 мл колонки HiTrap FF с IDA-сефарозой («GE HealthCare», Швеция); колонка SUPEROSE 12

10/300 GL («GE HealthCare», США). В Таблице 9 указан состав сред и растворов, применявшихся для выращивания клеток *E. coli*.

Таблица 9. Использованные среды и растворы.

Среда или раствор	Состав
LB	1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, pH 7.0
SOB	2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.0
SOC	SOB + дополнительно 20 mM глюкозы
ZY	1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, pH 7.0
20xNPS	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 M KH ₂ PO ₄ , 1 M Na ₂ HPO ₄
50x5052	25% глицерин, 2,5% глюкоза, 10% лактоза моногидрат
1000xMg	1 M MgSO ₄

1 M раствор сульфата магния и 2 M раствор глюкозы стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм. Растворы LB, SOB, ZY, 20xNPS, 50x5052 стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм. в течение 30 мин при температуре 121°C. После автоклавирования к средам SOB и SOC добавляли стерильные растворы MgCl₂ и глюкозы соответственно до необходимой концентрации. В работе использовали следующие буферные растворы (Таблица 10). Все растворы готовили с использованием высокоочищенной дистиллированной деионизованной воды, полученной на установке WaterPro Plus («LabConco», США).

Таблица 10. Состав буферных растворов

Буферный раствор	pH, (25°C)	Состав
Для измерения люциферазной активности		
AB	7,8	0,05 M Трис-ацетат, 10 mM MgSO ₄ , 2 mM ЭДТА
ATP	7,8	4 mM ATP, 0,05 M Трис-ацетат, 10 mM MgSO ₄ , 2 mM ЭДТА
LH ₂	7,8	0,5 mM люциферин, 0,05 M Трис-ацетат, 10 mM MgSO ₄ , 2 mM ЭДТА

Субстратная смесь АТФ-LH ₂	7,8	0,025 М KH ₂ PO ₄ , 0,025 М K ₂ HPO ₄ , 2 мМ ЭДТА, 7,5 мМ MgSO ₄ , 1 мМ АТФ, 0,15 мМ LH ₂ , 1 % Неонол-10, 50 мкМ Na ₄ P ₂ O ₇
Для очистки люциферазы		
НВ1	7,5	20 мМ имидазол, 20 мМ Na-фосфат, 500 мМ NaCl
НВ3	7,5	300 мМ имидазол, 20 мМ Na-фосфат, 500 мМ NaCl
НВ4	7,5	500 мМ имидазол, 20 мМ Na-фосфат, 500 мМ NaCl
GF2	7,3	50 мМ Трис-ацетат, 100 мМ Na ₂ SO ₄ , 2 мМ ЭДТА
1М DTT	5,2	1М DTT в 10 мМ Na-ацетатном буфере
Для изучения термоинактивации люциферазы		
ТВ1	7,8	0,05 М Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO ₄ .
Для приготовления компетентных клеток		
ТВ	6,7	10 мМ Pipes (или Hepes), 75 мМ CaCl ₂ , 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl ₂
ТВ + глицерин	6,7	Аналогично ТВ, но дополнительно 20 % глицерин
Для электрофореза ДНК		
50xTAE	8,5	2 М Трис-ацетат, 50 мМ ЭДТА
Для конъюгации		
В1	7,5	0,02 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 1 мМ ЭДТА
В2	7,5	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 10 мМ ЭДТА
PBSS	7,8	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 10 мМ MgSO ₄ , 2 мМ АТФ
Для иммуноферментного анализа		
NCA	9,6	0,01 М NaHCO ₃
PBS	7,4	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl
PBST	7,4	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 0,05% Твин-20
PBS-BSA	7,4	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 1% BSA
PBST-BSA	7,4	0,01 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, 0,05% Твин-20, 1% BSA
Для гибридизационного анализа		
1×SpB		0,31 М Na ₂ SO ₄ , 0,25 М Na ₂ HPO ₄
2 x SSPE	7,4	0,02 М NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 0,3 М NaCl, 0,002 М ЭДТА,

3.2. Штаммы и плазмиды

Для генно-инженерных работ использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacI^f ZAM15 Tn10 (Tet^r)*] («Stratagene», США). Для наработки и выделения ферментов, содержащих His₆ на С-конце, использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus (*E. coli* В *F' ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm^{*}Tet^rgal λ (DE3) endA Hte*) («Stratagene», США). Для конструирования плазмид были использованы следующие плазмиды: pETL7, pET23b [169], pETL4 [170], плаزمида, содержащая ген люциферазы дикого типа с мутациями G216N/A217L/S398M [171], плазмида MT3 [172]. Минимальный участок гена стрептавидина (119 ам.о.) из полного гена стрептавидина был любезно предоставлен к.х.н., с.н.с. В. Г. Григоренко. Для проведения иммуноферментного анализа были использованы клетки *Salmonella typhimurium* CRIFS № С1058, которые были получены из коллекции Канадского Исследовательского Института по Безопасности Пищи (CRIFS).

3.3. Аппаратура

Интенсивность биолюминесценции в отдельных лунках стрипованного планшета и пробирках регистрировали на люминометре FB 12 Femtomaster «Zylyx Corp» («Bertold», Германия), в отдельных лунках стрипованного планшета на люминометре ЛЮМ-1 (ООО «Люмтек», Россия). Спектры биолюминесценции и флуоресценции снимали на люминесцентном спектрометре LS 50B («Perkin-Elmer», Англия) и планшетном спектрометре Spectramax M5 («Molecular Devices», США). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV-1202 («Shimadzu», Япония) и Lambda 35 («Perkin-Elmer», Англия).

Измерения pH проводили на pH-метре MP-220 («Mettler Toledo», Англия) с точностью до 0,01 ед. pH. Микробиологические эксперименты проводили под ламинаром GS («Babcock», Германия). Чашки Петри с клетками инкубировали в термостатах Certomat H («Sartorius-BBI», Германия). Культуру клеток *E. coli* выращивали на термостатируемой качалке SI-300R («JEIO TESH», Южная Корея). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторах Терцик (ДНК-Технология, Россия) или Mastercycler Gradient («Eppendorf», Германия). Электрофорез ДНК проводили в камере HE-33 («Serva», Германия) с источником питания EPS 2A200 («Hoefel», США). Визуализацию ДНК в геле проводили на трансиллюминаторе TM-36 (302 nm) («UVP», США).

При очистке люцифераз использовали хроматографические колонки (Pharmacia, Швеция), перистальтический насос и коллектор фракций Ultrac-1000, холодильную камеру MiniColdlab («LKB», Швеция). Анализ олигомерного состава белков проводили на хроматографической системе АКТАpurifier 10 («GE», США). Электрофорез белков осуществляли на приборе Mini-Protean II Cell («BioRad», Австрия). Центрифугирование

проводили на центрифугах J2-21 (роторы JA-20 для пробирок на 50 мл и JA-14 для пробирок на 250 мл) («Beckman», США) и Centrifuge 5415 C («Eppendorf», Германия). Для термостатирования образцов использовали водяной термостат 2209 Multitemp («LKB», Швеция) или твердотельный термостат «Гном» («ДНК-Технология», Россия). Для иммуноферментного анализа использовали стрипованные 96-луночные иммунологические планшеты средней и высокой сорбции («Greiner», Германия), а также белые 96-луночные иммунологические планшеты средней сорбции Microlite 2+ («Thermo», США). Ячейки инкубировали при перемешивании в термостатируемом шейкере-инкубаторе ES-20 («Biosan», Латвия-Англия), либо термомиксере comfort («Eppendorf», Германия). Эппендорфы с растворами и суспензиями перемешивали на мини-ротаторе Bio RS-24 («Biosan», Латвия-Англия). Имобилизацию зондов проводили в гибридизационной печи HM-4000 («UVP», Великобритания). Оптическую плотность в ИФА с использованием пероксидазы измеряли на планшетном фотометре Epsom LQ-1050 («Molecular devices», США)

3.4. Методики проведения экспериментов

3.4.1. Методы работы с ДНК

Выделение плазмид. Выделение и очистку плазмидной ДНК из клеток *E. coli* проводили согласно модифицированному варианту метода щелочного лизиса [173].

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез проводили в 1 или 1,5% агарозном геле с концентрацией этидиум бромид 0,5 мкг/мл в буферном растворе TAE. Образцы для электрофореза готовили, добавляя пробы ДНК объемом от 1-5 мкл (качественный форез) до 18 мкл (препаративный форез) к 2 мкл 10x буфера для нанесения пробы (0,25% бромфенолового синего, 50% глицерина, 0,1М ЭДТА). Электрофорез проводили при 80 мА в течение 30-40 минут при комнатной температуре.

Элюция образцов ДНК из геля и их очистка. Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора QiaexII фирмы Qiagen согласно инструкции производителя, либо методом заморозки-разморозки [174], что упрощало процедуру, но приводило к низкому выходу ДНК. Второй способ применяли для лигирования и ПЦР, когда не было необходимости очищать ДНК от буфера TAE и микропримесей агарозы. Фрагмент ДНК в агарозном геле помещали в пробирку, замораживали при -80°C и после этого размораживали, повторяли эту операцию ещё два раза. Затем гель осаждали на центрифуге при 12000 g в течение 2 минут и отбирали жидкость над гелем, содержащую ДНК.

Секвенирование ДНК. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM®

BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant.

Приготовление компетентных клеток *E. coli*.

Компетентные клетки готовили согласно методике, описанной в работе [175]. С помощью стерильной петли отбирали свежую колонию клеток *E. coli* диаметром 2-3 мм с чашки Петри с агаризованной средой SOB (1,5% агара) и инокулировали в колбу со средой SOB (объем среды – не более 100 мл на колбу объемом 1 л). Клеточную культуру растили на термостатируемой качалке при 37°C, 180 об/мин в течение 2,5-3 ч до $A_{600} \approx 0,2-0,4$. Клетки осаждали центрифугированием (2700g, 10 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в буфере, объем которого составлял 1/2 от исходного объема клеточной культуры. Полученный раствор инкубировали во льду в течение 25 мин, затем вновь осаждали клетки центрифугированием (2700g, 10 минут, 4°C). Полученный осадок растворяли в буфере ТВ, содержащем 20% глицерина. Объем буфера составлял 1/10 исходного объема клеточной суспензии. Инкубировали во льду 15 минут. Затем разливали в микропробирки типа эппендорф по 100 мкл и хранили при -80°C.

Трансформация компетентных клеток *E. coli*. К 100 мкл (или 25-50 мкл с соответствующим пересчетом) компетентных клеток добавляли 0,5÷4 мкл раствора ДНК. Добавляли 1 мкл 40% раствора PEG-8000, перемешивали. Инкубировали во льду 30 мин. Помещали пробирки в водяную баню с температурой 42°C на 90 с, быстро охлаждали во льду (2 мин). Добавляли 400 мкл среды SOC, инкубировали при 37°C при умеренном перемешивании в течение 45 мин. Затем клетки высевали на чашки со средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали 12-16 ч при 37°C.

3.4.2. Конструирование плазмид

Конструирование плазмиды, кодирующей гибридный белок *Luc-bssr*. Ген термостабильного мутанта люциферазы *Luciola mingrelica* [176], выделяли из плазмиды pETL7 [176] при помощи рестрикции по сайтам Pst I, Apa I. Фрагмент ДНК, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков биотин-связывающего белка (bssr) [177], выделяли из генома клеток *E. coli* и модифицировали сайтами рестрикции SalI и ApaI при помощи ПЦР с использованием следующих праймеров:

прямой праймер bssr: 5'- TCGGGCCCATTTGGAAGCGCCAGCAGC -3' (26 bp)

обратный праймер bssr: 5'- GTGGTTCGACACCCTCGATGACGACCAGCGG -3' (30 bp)

После очистки оба фрагмента лигировали в вектор pET23b («Novagen», США), разрезанный по сайтам PstI и XhoI [178]. «Липкие концы» сайтов SalI и XhoI совместимы, и

после лигирования оба сайта исчезают. Клетки XL1-blue были трансформированы полученной плазмидой, которая была наработана в необходимом количестве.

Получение плазмид, кодирующих гибридные белки стрептавидин-люцифераза. Для получения плазмид использовали ген TS люциферазы *Luciola mingrelica* [176] и минимальный участок гена стрептавидина (119 ам.о.) *Streptomyces avidinii*, любезно предоставленного В. Г. Григоренко. При этом к С-концу стрептавидина был добавлен полипептид *SGGGS*. В начале и конце нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции *NdeI* и *NcoI*, с использованием следующих праймеров:

прямой 5'- TTATATTAACATATGGGCATCACCGGCACCTGGTAC -3' и
обратный 5'- TTCCATGGAACCGCCACCAGACACCTTGGTGAAGGTGTCG -3'.

ПЦР продукт был обработан по соответствующим сайтам рестрикции. Далее из плазмиды *pJGtrc* [179], был вырезан начальный участок гена люциферазы по сайтам *NcoI* и *BamHI*. Фрагменты *NdeI-NcoI* и *NcoI-BamHI* субклонировали в вектор *pETL7* (GenBank No. HQ007050), содержащий ген TS люциферазы [180], по сайтам *NdeI* и *BamHI*. В результате получили плазмиду, кодирующую белок *SA-Luc-His₆*. На основании этой плазмиды была получена плазида *SA-Luc-His₆M/G* с заменой в гене люциферазы стартового кодона *Met* на *Gly*. Для этого фрагмент плазмиды *SA-Luc-His₆*, содержащий ген стрептавидина и регуляторный участок *t7*-промотора, амплифицировали методом ПЦР с использованием следующих праймеров:

прямой 5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3'
обратный 5'- CAAAAGCTTGGAACCGCCACTAGACACC -3'

При этом был введен сайт рестрикции *Hind III* (подчеркнут). Полученный ПЦР-фрагмент разрезали по сайтам рестрикции *NdeI* и *Hind III* и субклонировали в вектор *BsAp 4TS-Lml-pETL7* [181]. Для получения плазмиды *His₆-SA-Luc* из плазмиды *SA-Luc-His₆* вырезали фрагмент *Nde-BglIII*, содержащий ген стрептавидина и часть гена люциферазы. Из плазмиды *pETL4* [172] вырезали фрагменты *BglIII-Pst*, *PstI-NdeI*, которые лигировали с фрагментом *Nde-BglIII*.

Для получения плазмиды *Luc-SA-His₆* ген стрептавидина амплифицировали методом ПЦР со следующими праймерами:

прямой 5'- TCGGGCCCATCTGGTGGAGGTGGCAGTGCAGGCATCACCGGCACCTGG -3'
обратный 5'- GTGCTCGAGACCCACCTTGGTGAAGGTGTCGTGG -3'.

В начале и конце нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции *ApaI* и *XhoI*, соответственно (подчеркнуты). С N-конца стрептавидина был добавлен полипептид *GPSGGGSA*, а с С-конца – полипептид *GVE*. ПЦР продукт обработали по соответствующим сайтам рестрикции (*ApaI* и *XhoI*). Далее из плазмиды *pETL7* вырезали ген TS люциферазы по сайтам рестрикции *NheI* и *ApaI*. Фрагменты *NheI-ApaI* и *ApaI-XhoI* субклонировали в вектор

pETL7 по сайтам *NheI* и *XhoI*. В результате получили плазмиду, кодирующую белок *Luc-SA-His₆*, который содержит линкер *SGGGGSA* между генами люциферазы и стрептавидина, а также полипептид *GVEHHHHHH* на C-конце (*His₆*).

Для всех полученных плазмид был проведен анализ нуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридные белки методом секвенирования.

Получение плазмиды, кодирующей зеленый мутант люциферазы *GLuc*. Для получения плазмиды, кодирующей зеленую форму термостабильной люциферазы в ген люциферазы TS были введены две замены S398M и Y35N. Для этого использовали следующие плазмиды: 1) плазида, содержащая ген «люциферазы дикого типа» с мутациями G216N/A217L/S398M [171], 2) плазида *MT3* [172], кодирующая ген «люциферазы дикого типа» с заменой Y35N, 3) *pETL4* [172], кодирующая ген термостабильной люциферазы.

Мутацию S398M вводили следующим образом: фрагмент *Bpu 14I-Bgl II* плазмиды *pETL4* [172], кодирующий участок гена люциферазы с мутациями, отвечающими за термостабильность, лигировали с фрагментом *Bgl II-Bpu 14I*, плазмиды с мутациями G216N/A217L/S398M [171], содержащим фрагмент гена люциферазы с заменой S398M и регуляторные элементы. Полученную плазмиду разрезали по сайтам *Bpu 14I* и *Ara I* и клонировали в вектор *MT3* по тем же сайтам рестрикции, содержащим мутацию Y35N в гене люциферазы дикого типа. Из полученной плазмиды TS+S398M+ Y35N вырезали ген люциферазы по сайтам *Ara I* и *Nhe I* и клонировали в вектор *pETL4* по тем же сайтам рестрикции.

3.4.3. Получение гибридных белков *Luc-bcsp*, *Luc-SA* и термостабильной люциферазы *L. mingrelica*, содержащих *His₆*-последовательность

Выделение гибридных белков и люциферазы. Нарботку фермента проводили в среде ZYP-5052 по методу автоиндукции с лактозой, разработанному Стадьером [182]. Для получения 200 мл среды ZYP-5052 непосредственно перед использованием в 1 л колбу помещали ~186 мл среды ZY, добавляли 200 мкл 1М MgSO₄ и 4 мл и 10 мл растворов 50x5052, 20xNPS соответственно. На чашку со средой LB, содержавшей 100 мкг/мл ампициллина и 1,5% бакто-агара, высевали клетки *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus, несущие одну из вышеуказанных плазмид, и инкубировали в течение ночи при 37°C. 2-3 колонии инокулировали в бакпечатку с 3 мл среды LB со 200 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы, растили 3 - 6 часов на качалке при 37°C, 180 об/мин, пока суспензия клеток не становилась мутной ($A_{600} = 0,4 \div 1$). Разбавляли культуру до $A_{600} \sim 0,0024$, внося рассчитанный объем клеточной культуры в 1 л колбу с 200 мл среды ZYP-5052, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Инкубировали на качалке ~2 ч при 37°C, 180 об/мин, пока суспензия не становилась слегка мутной ($A_{600} = 0,2 \div 0,5$). Затем растили

ещё 15-18 часов при 23°C до $A_{600} = 5 \div 9$. Клетки осаждали центрифугированием (5500 g, 10 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в 18-20 мл буфера HB I, содержащего 20 mM имидазол и 0,5% Тритон X-100, разрушали клетки ультразвуком (6 циклов по 30 с через 1 мин), центрифугировали (39000 g, 30 мин, 4°C).

Надосадочную жидкость (~20 мл) при 4°C наносили на 1 мл Ni-IDA колонку, промывали 20-40 мл буферного раствора HB1. Фермент элюировали буфером HB3. В полученный раствор люциферазы добавляли ЭДТА до концентрации 2 mM и раствор дитиотреитола в 10 mM Na-ацетатном буфере, pH 5.2 до концентрации 1 mM. Хранили при 0°C.

Электрофорез гибридных белков и исходной люциферазы в ПААГ по Лэмли [183] проводили в денатурирующих условиях. В 4%-ном концентрирующем и 7%-ном разделяющем гелях. Подаваемое напряжение составляло 60 В и 120 В в концентрирующем и разделяющем гелях соответственно. Проявление белковых полос проводили с помощью красителя бромфенолового синего.

3.4.4. Изучение свойств гибридных белков Luc-bcsp и Luc-SA

Определение активности гибридных белков и исходной люциферазы определяли на люминометре по величине максимальной интенсивности света (I_{max}), излучаемого в процессе ферментативной реакции, при насыщающих концентрациях субстратов путем добавления 5 мкл раствора люциферазы или гибридного белка в буфере АВ в кювету, содержащую 350 мкл 1,7 mM раствора АТФ в том же буфере. Далее инжестировали 150 мкл 0,5 mM раствора люциферина в буфере АВ и регистрировали интенсивность биолюминесценции. Активность выражали в относительных единицах, RLU. Одна RLU = 10^9 квант/с.

Концентрацию гибридных белков и исходной люциферазы определяли по поглощению раствора при 280 нм на спектрофотометре Shimadzu UV 1202. В качестве коэффициентов поглощения $A_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}}$ использовали значения 0,55 для исходной люциферазы, 0,51 для гибридного белка люцифераза-bcsp, 1,0 для гибридных белков люцифераза-стрептавидин. Коэффициенты были рассчитаны на основе аминокислотной последовательности с помощью программы ProtParam сервера ExPASy [184] $A_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}} = 0,509$. <http://web.expasy.org/protparam/>

Определение констант Михаэлиса по люциферину и АТФ. Величину K_m^{LH2} определяли из зависимости максимальной интенсивности биолюминесценции (I_{max}) от концентрации люциферина (8-300 мкМ) при постоянной концентрации АТФ (1,2 mM), а K_m^{ATP} – из зависимости I_{max} от концентрации АТФ (96-1900 мкМ) при постоянной концентрации люциферина (0,15 mM). Эти диапазоны концентраций находятся в районе 0,3-10 K_m^{LH2} и 0,4-7 K_m^{ATP} соответственно. Значения K_m для люциферина и АТФ рассчитывали с помощью программы OriginPro 7.5

(«OriginLab», США) методом нелинейной регрессии с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Чтобы не прибегать к последовательным разбавлениям раствора фермента при измерении активности, световой поток уменьшали с помощью светофильтра, помещённого на разделительное стекло в кюветном отделении люминометра FB12. Концентрация раствора гибридного белка люциферазы при определении значений K_m , составляла 0,01 мг/мл.

Спектры биолюминесценции регистрировали на спектрометре Spectramax M5 в режиме «биолюминесценция». В лунки белого стрипованного полистирольного планшета помещали 10 мкл раствора, содержащего 10^{-9} М гибридного белка и 90 мкл субстратной смеси АТФ-LH₂ предварительно разбавленной в 1,8 раз буфером PBST, быстро перемешивали и регистрировали спектры биолюминесценции в интервале 480-700 нм.

Изучение термостабильности гибридных белков и исходной люциферазы. Готовили раствор гибридного белка (0,01 мг/мл) в охлажденном 50 мМ трис-ацетатом буферном растворе (рН 7,8), содержащем 20 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл BSA. По 50 мкл приготовленного раствора фермента вносили в 8-12 тонкостенных 0,5 мл микропробирок и инкубировали в водном термостате при температуре 47°С. Через определенные промежутки времени отбирали одну пробирку, инкубировали в снегу не менее 15 мин и определяли активность фермента путем добавления 10 мкл пробы к 90 мкл предварительно разбавленной в 1,8 раз буфером PBST субстратной смеси АТФ-LH₂ с последующей регистрацией биолюминесцентного сигнала на приборе Spectramax M5 («Molecular devices», США).

Определение степени биотинилирования гибридного белка Luc-бссп. Использовали сорока кратный по отношению к концентрации гибридного белка избыток магнитных частиц, модифицированных стрептавидином в буфере PBS. В пробирку типа эппендорф с частицами (0,1 мг) помещали раствор Luc-бссп (100 мкл), предварительно разбавленный в 10^5 раз в буфере PBS до концентрации $6,02 \times 10^{-5}$ мг/мл, удобной для измерения. Для предотвращения сорбции фермента на стенках пробирки добавляли раствор BSA до концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали 40 минут при интенсивном перемешивании на орбитальном шейкере. После инкубации измеряли активность раствора Luc-бссп контрольного образца (без частиц) и супернатанта после отделения магнитных частиц магнитом. Для определения неспецифического связывания параллельно проводили аналогичный эксперимент с использованием люциферазы без биотинсвязывающего домена.

Изучение олигомерного состава гибридных белков стрептавидин-люцифераза. Олигомерный состав гибридных белков определяли с использованием колонки SUPEROSE 12 10/300 GL на хроматографической системе ÄKTApurifier 10. 100 мкл раствора фермента в буферном растворе, НВЗ наносили на колонку, уравновешенную буферным раствором,

содержащим 50 мМ Трис-ацетат, 100 мМ Na₂SO₄, pH 7,8, и элюировали тем же раствором со скоростью 0,3 мл/мин. Отбирали фракции объемом 0,5 мл. Затем 10 мкл разбавленной фракции гибридного белка в буферном растворе для элюции вносили в микрокювету, добавляли 90 мкл субстратной смеси АТФ-LH₂, предварительно разбавленной в 1,8 раз буфером PBS, перемешивали и регистрировали биолюминесцентный сигнал на люминометре ЛЮМ-1.

Способность гибридных белков связывать биотин. Биотинилированный BSA получали с использованием реагента для биотинилирования фирмы Силекс согласно инструкции производителя, разбавляли до концентрации 5 мкг/мл в буфере NCA. Параллельно готовили раствор небитинилированного BSA в такой же концентрации и в том же растворе. По 100 мкл полученных растворов BSA вносили в лунки планшета для ИФА и инкубировали в течение ночи при 4 °С при постоянном перемешивании. Затем планшет 3 раза промывали порциями по 200 мкл буферного раствора PBST, свободную поверхность блокировали PBS-BSA в течение 2 часов при 37 °С и перемешивании (250 об/мин), затем три раза промывали порциями по 200 мкл буферного раствора PBST. В лунки подготовленного планшета вносили по 100 мкл раствора гибридного белка в PBST, инкубировали 1 час при 37°С и перемешивании (250 об/мин), затем 4 раза промывали порциями по 200 мкл PBST. Затем в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси АТФ-LH₂, предварительно разбавленной в 2 раза буфером PBST и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для определения исходной активности гибридного белка к 20 мкл его раствора добавляли 80 мкл субстратной смеси АТФ-LH₂ предварительно разбавленной в 1,6 раз буфером PBST, перемешивали и измеряли биолюминесцентный сигнал.

3.4.5. Применение гибридных белков Luc-bccr и Luc-SA в иммуоферментном анализе для детекции клеток *Salmonella*

Определение предела обнаружения люциферазы и гибридных белков на ее основе.

Готовили серию растворов гибридных белков и люциферазы с различными концентрациями в буферном растворе PBS, активность фермента измеряли путем добавления 100 мкл субстратной смеси АТФ-LH₂ к 100 мкл раствора белка с последующей регистрацией биолюминесцентного сигнала на приборе ЛЮМ-1.

Получение комплекса гибридного белка Luc-bccr---SA. Готовили раствор, содержащий 10⁻⁸ М стрептавидина и 10⁻⁸ М гибридного белка в 1%-ном буфере PBST-BSA, инкубировали в течение 30 минут (37 °С, 250 об/мин), разбавляли в необходимое количество раз и использовали в дальнейших экспериментах.

Детекция клеток *Salmonella* иммуобиолюминесцентным методом. По 200 мкл раствора моноклональных мышинных антител против липополисахаридных антигенов клеток *Salmonella* (5 мкг/мл в буфере NCA) вносили в лунки стрипованного планшета, инкубировали 2

часа при 37°C и перемешивании (250 об/мин), затем 4 раза промывали порциями по 200 мкл PBST, блокировали свободную поверхность буфером PBS-BSA в течение 2 часов при 37°C, промывали 3 раза порциями по 200 мкл PBST и использовали для детекции клеток.

Готовили серию последовательных разведений исходной суспензии клеток (10^8 КОЕ/мл в PBS) буфером PBS с концентрациями клеток от 10^7 до 10^3 КОЕ/мл. По 100 мкл полученных растворов вносили в лунки планшета с сорбированными на его поверхности антителами и инкубировали в течение 2 ч при 37°C и перемешивании (250 об/мин). Планшеты с иммобилизованными клетками 3 раза промывали 200 мкл PBST. Затем в лунки с иммобилизованными клетками вносили по 100 мкл раствора биотинилированных антител (5 мкг/мл в PBST), инкубировали 1,5 ч при 37°C и перемешивании (250 об/мин). Несвязавшиеся антитела удаляли четырехкратным промыванием порциями по 200 мкл буфера PBST. После удаления остатков буфера в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора комплекса Luc-bcsp--SA, либо гибридного белка Luc-SA с концентрацией 10^{-8} М, инкубировали 1 ч при 37°C, при перемешивании (250 об/мин). Несвязавшиеся компоненты реакционной смеси удаляли пятикратным промыванием планшета по 200 мкл PBST. После удаления остатков буфера в лунки вносили по 50 мкл буфера PBS и 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂ и измеряли интенсивность биолюминесценции в отдельных лунках стрипа на люминометре FB 12 Femtomaster.

Адсорбция плюроника на полистирольных частицах. 10 мг активированного плюроника F-108-PDS, содержащего пиридилдисульфидные группы, растворяли в 800 мкл деионизированной воды. К полученному раствору аккуратно приливали 200 мкл суспензии полистирольных частиц, диаметром 240 нм и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После этого частицы были отделены от избытка плюроника центрифугированием (12000 g, 20 мин). Супернатант отбрасывали, частицы ресуспендировали в PBS. Процедуру промывания повторяли 3 раза.

Химическая иммобилизация моноклональных антител с введенными SH-группами на полистирольные частицы, активированные плюроником. Для введения поверхностных тиоловых групп в антитела использовали реагент Траута (2-иминотиолан), реакция которого протекает по доступным аминогруппам. К 250 мкл антител (4 мг/мл) в буфере В2, прибавляли 20-кратный избыток 2-иминотиолана (свежеприготовленный раствор в том же буфере) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Избыток реагента отделяли на колонке PD SpinTrap G-25, уравновешенной буфером В2. Полученные тиолированные моноклональные антитела сразу же добавляли к суспензии полистирольных микрочастиц (500 мкл, $\approx 1,3 \cdot 10^{12}$ частиц), покрытых плюроником F-108, содержащим пиридилдисульфидные группы и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Частицы с иммобилизованными

антителами отделяли от избытка антител центрифугированием (12000 g, 20 мин). Супернатант отделяли и спектрофотометрически определяли концентрацию непрореагировавших антител. Осажденные частицы ресуспендировали в буфере В2. Процедуру промывания повторяли 3 раза.

Биолюминесцентный иммуоферментный анализ клеток *Salmonella* с использованием полистирольных микрочастиц с иммобилизованными антителами. К 30 мкл полистирольных частиц с иммобилизованными антителами, полученных по методике, описанной выше ($\approx 7 \cdot 10^{10}$ частиц, PBS) добавляли 50 мкл инактивированных клеток *Salmonella* в буфере PBS ($10^6 - 10^3$ клеток/мл), инкубировали 1 час при комнатной температуре при перемешивании, и промывали, как описано выше. Затем частицы ресуспендировали в 100 мкл (50 мкг/мл) биотинилированных антител в буфере PBST, инкубировали 1 час при 37°C при перемешивании, промывали 3 раза как описано ранее. После промывки частицы ресуспендировали в 100 мкл раствора гибридного белка Luc-SA (40 нМ) в буфере PBS, инкубировали 30 минут при 37°C при перемешивании, промывали 3 раза как описано ранее. Затем, частицы ресуспендировали в 50 мкл PBS и переносили суспензию в ячейку стрипованного планшета, добавляли субстратную смесь ATP-LH₂ (50 мкл) и измеряли интенсивность биолюминесценции.

При получении всех калибровочных кривых измерения аналитического сигнала для каждой точки проводили не менее трех раз, на основании которых рассчитывали среднее значение и погрешность измерения.

Предел обнаружения (C_{min}) клеток в исследуемых образцах рассчитывали по формулам

$$x_{cp} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$
$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{cp})^2}$$
$$C_{min} = \frac{3s_0}{S},$$

где x_i – сигнал фона, s_0 – стандартное отклонение фонового сигнала, S – коэффициент чувствительности, который определяется как производная аналитического сигнала от концентрации определяемого компонента. Измерения аналитического сигнала проводили минимум 8 раз.

3.4.6. Применение гибридного белка Luc-SA для детекции биотинилированной ДНК клеток *E. coli*

Выделение бактериальной ДНК методом температурного лизиса клеток в ТЕ-буфере. Отбирали 1 мл среды, содержащей ночную культуру микроорганизмов. Микробные клетки осаждали центрифугированием в течение 1 минуты при 10000 g. Супернатант удаляли, добавляли 100 мкл ТЕ-буфера и ресуспендировали осадок с помощью шейкера. Суспензию клеток инкубировали в термостате 20 минут при 99°C. После термостатирования образцы центрифугировали в течение 1 минуты при 10000 g. Супернатант переносили в новые пробирки и использовали для ПЦР (по 1 мкл на одну реакцию)

Для амплификации консервативного фрагмента гена *gadB* клеток *E. coli* использовали следующие праймеры:

прямой- CACGTTTTGGTGCG AAGTCT

обратный- GACGACGAAAATGTCCACAA.

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл в 0,2 мл тонкостенных пробирках. Реакционная смесь, содержала:

Реагент	Количество
Вода дистиллированная	10,7 мкл
ПЦР-буфер: 10×кратный буфер Taq с (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 мкл
Раствор хлорида магния (25 мМ)	1,0 мкл
Рабочий раствор dATP (2,5 мМ)	1,0 мкл
Рабочий раствор dGTP (2,5 мМ)	1,0 мкл
Рабочий раствор dCTP (2,5 мМ)	1,0 мкл
Рабочий раствор dTTP (1 мМ)	1,5 мкл
Рабочий раствор dUTP-биотин (1 мМ)	1,0 мкл
Рабочий раствор прямого праймера (20 пкмоль/мкл)	1,0 мкл
Рабочий раствор обратного праймера (20 пкмоль/мкл)	1,0 мкл
Раствор Taq ДНК-полимеразы (активность 5 е.а./мкл)	0,3 мкл
Образцы ДНК клеток <i>E. coli</i>	1,0 мкл

В пробирку, помеченную как отрицательный контроль, вместо образца ДНК вносили 1 мкл дистиллированной воды. Проводили 30 циклов ПЦР, температура отжига составляла 55 °С, время отжига – 30с.

Концентрацию амплифицированной ДНК определяли спектрофотометрически после удаления низкомолекулярных компонентов ПЦР-смеси с использованием био-спин колонки G-25, уравновешенной буферным раствором ТЕ (объем пробы составлял 120 мкл). Коэффициент экстинкции и молекулярный вес ДНК рассчитывали с использованием <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Для определяемой ДНК $\epsilon_{260} = 1096400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, MW= 35 кДа.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов на полистирольный планшет. В работе использовали стрипованные полистирольные планшеты высокой сорбционной емкости. Иммобилизацию зондов проводили из буферного раствора $1 \times \text{SpB}$. Объем раствора, содержащего иммобилизуемый зонд, составлял от 1 до 30 мкл. Нанесенные олигонуклеотиды высушивали в течение 30-60 минут при 60°C в зависимости от объема раствора, содержащего зонд. Затем в лунки планшета вносили по 200 мкл раствора PBS, содержащего 1% BSA, 1% казеин и инкубировали в течение ночи при 4°C . Для контроля неспецифической сорбции использовали планшет не обработанный блокирующим раствором.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов на полистирольный планшет с использованием полилизина. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл раствора полилизина с концентрацией 100 мкг/мл в PBS. Инкубировали 1 час при 37°C и перемешивании со скоростью 700 об/мин. Дважды промывали буфером PBS (200 мкл) по 10 мин. Затем добавляли в лунки по 100 мкл 1%-го раствора глутарового альдегида в буфере NCA. Инкубировали 1 час при 37°C , 700 об/мин, промывали по 10 мин PBS (200 мкл), затем 10 мин раствором PBS, разбавленным в 10 раз и высушивали в термостате при 60°C . Затем в подготовленные лунки вносили по 1 мкл раствора олигонуклеотидного зонда в буферном растворе $1 \times \text{SpB}$ с содержанием $0,32 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$, $0,25 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ и инкубировали в течение 30 минут при 60°C . Свободные альдегидные группы и иминные связи восстанавливали раствором NaBH_4 . Для этого в лунки вносили по 100 мкл раствора NaBH_4 с концентрацией 7 мг/мл в буфере PBS и инкубировали в течение 15 мин при 37°C , 700 об/мин. Остатки раствора NaBH_4 удаляли и лунки промывали 3 раза по 200 мкл PBS. Затем в лунки планшета вносили по 200 мкл раствора PBS, содержащего 1% BSA, 1% казеин и инкубировали в течение ночи при 4°C .

Модификация полистирольной поверхности плюронином. В лунки планшета вносили по 200 мкл водного раствора плюроника с концентрацией 10 мг/мл и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали 3 раза по 200 мкл H_2O . Планшет высушивали при 60°C в течение 10 минут. Далее на модифицированную поверхность иммобилизовали зонды по методике, описанной для полистирольного планшета.

Гибридизация амплифицированной ДНК с иммобилизованным зондом. Раствор определяемой ДНК в буфере $2 \times \text{SSPE}$ объемом 70 мкл вносили в лунки планшета с иммобилизованными зондами и инкубировали при 45°C в течение часа при перемешивании 1000 об/мин. Несвязавшуюся ДНК удаляли промыванием буфером PBST два раза по 15 минут, 1 раз при температуре гибридизации, 2-й раз - при 37°C .

Образование комплекса Luc-SA с иммобилизованной биотинилированной ДНК и измерение интенсивности биолюминесценции. В лунки планшета с иммобилизованной ДНК

вносили 100 мкл Luc-SA в буфере PBST-BSA, инкубировали при 37, 23 либо 4°C, при перемешивании со скоростью 120 об/мин. Затем раствор удаляли из лунок и 4 раза промывали буферным раствором PBST по 200 мкл на лунку. Для определения интенсивности биолюминесценции планшет разделяли на отдельные ячейки. В каждую вносили по 100 мкл субстратной смеси ATP-LH₂ и регистрировали биолюминесцентный сигнал.

3.4.7. Иммуноанализ прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы светляков *Luciola mingrelica*

Регистрацию спектров флуоресценции красителя проводили на люминесцентном спектрометре LS 50B в режиме «флуоресценция» при ширине щели 10 нм. Во флуориметрическую кювету помещали 200 мкл раствора красителя Alexa-fluor в PBS в концентрации 100 мМ и регистрировали спектры флуоресценции в интервале от 600 до 700 нм при $\lambda_{ex} = 612$ нм. Анализ спектров красителей проводили с использованием данных, полученных с использованием Fluorescence SpectraViewer <http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.

Получение конъюгатов люцифераза-прогестерон (Luc-Pg)

Стабильность люциферазы в присутствии ДМФА. К 5 мкл RLuc, с концентрацией 3 мг/мл добавляли 7,5; 5; 3; 1,5; 0 мкл ДМФА и буферный раствор PBS до 15 мкл, инкубировали в течение 120 минут при +4 °C и умеренном перемешивании. Полученные после инкубации растворы разбавляли в 300 раз, отбирали аликвоты объемом 50 мкл, добавляли 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂ и измеряли интенсивность биолюминесценции на люминометре FB 12 Femtomaster с использованием нейтрального светофильтра с пропусканием 0,14 %.

Кинетика инактивации люциферазы в присутствии ДМФА. Готовили растворы, содержащие 1 мг/мл люциферазы в буфере PBS и 10, 5, 0 % по объему ДМФА. Полученные растворы инкубировали при 4 °C и умеренном перемешивании, через 0, 10, 20, 40, 120 минут инкубации отбирали аликвоты объемом 5 мкл и разбавляли в 200 раз буферным раствором PBS. К 50 мкл полученных растворов добавляли 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂ и измеряли интенсивность биолюминесценции как описано выше.

Активация прогестерона. В 100 мкл ДМФА растворяли 3,1 мг 3-о-карбоксиметилосим прогестерона (Pg), добавляли 0,95 мг дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и 1,7 мг N-гидроксисукцинимидного эфира (NHS). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 4-х часов при умеренном перемешивании (100 об/мин) и далее в течение ночи при 4 °C без перемешивания. О степени прохождения реакции судили по образованию осадка мочевины. Образовавшуюся мочевины отделяли центрифугированием в

течение 5 минут при 12000 g. Супернатант, содержащий активированное карбокси-производное прогестерона, разбавляли ДМФА в необходимое количество раз и использовали в реакции конъюгации с люциферазой.

Конъюгация прогестерона с люциферазой. К 100 мкл Luc с концентрацией 1 мг/мл в буферном растворе добавляли 10 мкл раствора активированного производного прогестерона различной концентрации в ДМФА. Молярные соотношения Luc:Pg в реакционной смеси составляли: 1:60, 1:40, 1:20, 1:10, 1:5. Для инкубации использовали буферные растворы следующего состава: 1) 0,01 М боратный буфер, pH=8,6; 2) буфер PBS, pH=7.8; 3) буфер PBSS: PBS +10 мМ MgSO₄+ 2 мМ АТР, pH=7.8. Реакцию проводили в течение двух часов во льду при умеренном перемешивании (100 об/мин). Полученный продукт центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g. Избыток прогестерона и компоненты буферного раствора отделяли на спин-колонке G-25, уравновешенной буфером GF2, используемым для хранения люциферазы согласно инструкции производителя. Полученные конъюгаты хранили при 0°C.

Измерение биолюминесцентной активности конъюгатов. Раствор конъюгата объемом 5 мкл разбавляли в 200 раз буфером PBS, отбирали 5 мкл полученного раствора конъюгата, добавляли 50 мкл субстратной смеси АТР-LH₂, разбавленной в два раза буфером PBS и регистрировали биолюминесцентный сигнал на люминометре FB 12 Femtomaster с использованием нейтрального светофильтра с пропусканием 1,25 %.

Изучение способности прогестерона в составе конъюгата образовывать специфический комплекс с антителами. По 150 мкл растворов Luc-Pg или Luc в концентрации 1 мкг/мл в PBS помещали в лунки полистирольного планшета и инкубировали в течение ночи при +4 °С, затем лунки планшета промывали 5 раз по 200 мкл PBST. Далее в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора первичных поликлональных кроличьих антител к прогестерону в буферном растворе PBST с концентрациями от 35 мкг/мл до 0,5 мг/мл с шагом разбавления 3, инкубировали в течение 1 часа при 37 °С без перемешивания с последующей промывкой планшета 3 раза по 200 мкл PBST. Далее в лунки планшета помещали 100 мкл конъюгата вторичных антител (козел против кролика) с пероксидазой хрена, разбавленных в 1000 раз в буферном растворе PBST, инкубировали в течение 1 часа при 37 °С, без перемешивания с последующей промывкой планшета 3 раза по 200 мкл PBST. Затем вносили 100 мкл тетраметилбензидина (ТМБ), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, в темноте, добавляли 100 мкл стоп-реагента (1М H₂SO₄) и измеряли A₄₅₀ за вычетом фона (A₆₅₀).

Определение состава конъюгатов Luc-Pg. Для определения количества молекул Pg, связанных с молекулой Luc, были измерены спектры поглощения прогестерона, люциферазы и

конъюгатов Luc-Pg в интервале длин волн 240-300 нм. При анализе спектров поглощения конъюгатов использовали разложение спектра конъюгата на нормированные спектры поглощения прогестерона и люциферазы, умноженные на соответствующие коэффициенты, найденные путем решения системы уравнений:

$$\begin{cases} A_{280Pg} * x + A_{280Luc} * y = A_{280набл} \\ A_{250Pg} * x + A_{250Luc} * y = A_{250набл} \end{cases}$$

Где $A_{280Pg} = 0.006$, $A_{280Luc} = 1$; $A_{250Pg} = 1$, $A_{250Luc} = 0,37$

$A_{280набл}$ и $A_{250набл}$ - наблюдаемые значения оптической плотности изучаемого раствора конъюгата при 280 и 250 нм. Коэффициент экстинкции прогестерона при 250 нм определяли путем измерения его спектра поглощения при концентрации 15 нМ. Отношение Pg:Luc рассчитывали по уравнению:

$$Pg:Luc = \frac{x}{\epsilon_{Pg}} : \frac{y}{\epsilon_{Luc}}$$

Где ϵ_{Pg} и ϵ_{Luc} - коэффициенты экстинкции прогестерона и люциферазы, равные $1,6 \cdot 10^4$ и $3,4 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ соответственно.

Получение конъюгатов FI-Ab на основе красителя Alexa- fluor 610-х

Навеску красителя (FI) растворяли в 15 мкл ДМСО и спектрофотометрически определяли его концентрацию по A_{610} , исходя из $\epsilon=138000 M^{-1}cm^{-1}$, MW= 1284.

Реакцию проводили по аминок группам антител с использованием сукцинимидного эфира красителя. Раствор поликлональных кроличьих антител, концентрацией 35 мг/мл разбавляли до концентрации 4 мг/мл в буфере PBS, добавляли раствор красителя Alexa-fluor в ДМСО таким образом, чтобы молярные соотношения Ab: FI в реакционной смеси составляли 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30. Реакционную смесь инкубировали при 37°C при перемешивании со скоростью 250 об/мин в течение 1,5 часов. Окрашенные антитела отделяли от избытка красителя с помощью микро-био-спин-колонки, заполненной носителем Sephadex G-25, уравновешенной буфером PBS, согласно инструкции производителя. Количество связавшегося красителя определяли по A_{610} .

Способность окрашенных антител связывать антиген определяли по той же схеме, что и способность прогестерона в составе конъюгата Luc-Pg связывать антитела. При этом вместо неокрашенных первичных антител использовали антитела с различным содержанием красителя.

Зависимость эффективности BRET сигнала от молярного соотношения краситель/антитело для окрашенных антител. Реакционную смесь объемом 50 мкл, содержащую $3,3 \cdot 10^{-8}$ M RLuc-Pg (конъюгат состава RLuc:Pg = 1:10) или $3,3 \cdot 10^{-8}$ M RLuc (контроль) и $3 \cdot 10^{-7}$ M FI-Ab различной степени окрашивания или Ab (контроль) инкубировали

при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте, затем добавляли 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂, перемешивали, регистрировали интенсивности биолюминесценции при 630 нм к 590 нм на спектрометре Spectramax M5 и рассчитывали BRET-сигнал как отношение I₆₃₀ к I₅₉₀. Все инкубации с окрашенными антителами в дальнейших экспериментах проводили в темноте при перемешивании со скоростью 250 об/мин.

Оптимизация условий регистрации BRET-сигнала

Измерение интенсивности биолюминесценции и BRET-сигнала. В лунки стрипованного планшета вносили по 50-120 мкл изучаемого раствора, содержащего Luc или Luc-Pg, добавляли 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂, регистрировали общую интенсивность биолюминесценции и интенсивности при 550 и 630 нм, на приборе Spectramax M5. BRET-сигнал рассчитывали как отношение I₆₃₀ к I₅₅₀.

Изучение влияния ПАВ на неспецифический сигнал. Реакционную смесь объемом 50 мкл, содержащую 1,3 нМ Luc и 130 нМ Fl-Ab в буферном растворе, содержащем 1% BSA и соответствующие добавки ПАВ, инкубировали при 37°C в течение 45 минут и измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал

Оптимизация концентраций реагентов GLuc-Pg и Fl-Ab. К 40 мкл растворов GLuc-Pg различной концентрации объемом добавляли 10 мкл раствора Fl-Ab, в качестве контроля использовали растворы с теми же концентрациями компонентов, но вместо GLuc-Pg использовали GLuc. Полученные смеси инкубировали при +37°C в течение 30 минут в буфере PBST-BSA и измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

Изучение влияния длительности инкубации на биолюминесцентный сигнал и BRET. 60 мкл раствора GLuc-Pg с концентрацией 2 нМ или 60 мкл смеси, содержащей 2 нМ GLuc-Pg и 50 нМ Fl-Ab, инкубировали при 37 °C в течение 30, 60, 90 и 120 минут и измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

Влияние температуры на биолюминесцентный и BRET сигналы и кинетику образования специфических и неспецифических взаимодействий изучали с использованием растворов следующего состава:

№ р-ра		Концентрация люциферазы, нМ	Концентрация Fl-Ab, нМ	Время инкубации, мин
1	GLuc-Pg	2	-	10
2	GLuc-Pg+ Fl-Ab	2	50	30
3	GLuc+ Fl-Ab	2	50	30

Влияние температуры на биолюминесцентный сигнал изучали с использованием раствора № 1, влияние температуры на образование специфических и неспецифических

взаимодействий изучали с использованием растворов № 2 и № 3. Полученные растворы объемом 60 мкл вносили в лунки белого стрипованного планшета, инкубировали в течение указанных промежутков времени при 4 °С, 23 °С, 37 °С. При изучении кинетики взаимодействия GLuc-Pg с Fl-Ab раствор №2 инкубировали в течение 2, 5, 10, 15, 20 и 30 минут при этих же температурах. Затем измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

Зависимость биолюминесцентного и BRET-сигнала от объема реакционной смеси. К 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 нМ GLuc-Pg и 150 нМ Fl-Ab в PBST-BSA, добавляли 40, 60, 80 и 100 мкл PBST-BSA, перемешивали, затем измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

На каждом этапе оптимизации получали ***градуировочные зависимости изменения BRET-сигнала от концентрации прогестерона.*** Готовили серию растворов прогестерона в диапазоне концентраций от 0,3 до 100000 нг/мл в буферном растворе PBST-BSA. К 40 мкл каждого из полученных растворов прибавляли по 10 мкл раствора Luc-Pg и 10 мкл Fl-Ab в различных концентрациях, инкубировали в темноте от 2 до 30 минут при 4, 23 или 37 °С в зависимости от условий эксперимента. При изучении влияния объема пробы, содержащей прогестерон, на чувствительность анализа к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 нМ GLuc-Pg и 150 нМ Fl-Ab в PBST-BSA, добавляли 40, 60, 80 и 100 мкл раствора Pg с различной концентрацией и инкубировали при 23 °С в течение 20 минут. Затем измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

Влияние порядка смешения реагентов на градуировочные зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона. При одновременном смешении реагентов к 20 мкл смеси, содержащей 6 нМ GLuc-Pg и 150 нМ Fl-Ab, добавляли 40 мкл раствора Pg в различной концентрации, инкубировали при 23°С в течение 20 минут и измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

При последовательном добавлении реагентов использовали два варианта смешения. В первом варианте к 40 мкл раствора Pg прибавляли по 10 мкл 300 нМ раствора Fl-Ab, инкубировали при 23°С в течение 10, 15 и 19 минут, затем добавляли 10 мкл 12 нМ раствора GLuc-Pg в PBST-BSA и продолжали инкубацию еще 10, 5 или 2 минуты. Затем измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал.

Во втором варианте к 10 мкл 300 нМ раствора Fl-Ab в PBST-BSA добавляли 10 мкл 12 нМ раствора GLuc-Pg в PBST-BSA. Полученную смесь инкубировали 10 или 15 минут, затем добавляли 40 мкл раствора Pg с концентрацией от 1 до 1000 нг/мл и продолжали инкубацию еще 10 или 5 минут. Затем измеряли интенсивность биолюминесценции и BRET-сигнал. Во

всех трех случаях суммарное время инкубации составляло 20 минут. Схема инкубации представлена в Таблице 11.

Таблица 11. Схема инкубации GLuc-Pg, Pg и Fl-Ab

Первый вариант смешения	
1) Инкубация Fl-Ab с Pg, мин	2) Инкубация полученной смеси с GLuc-Pg, мин
10	10
15	5
19	1
Второй вариант смешения	
1) Инкубация Fl-Ab с GLuc-Pg, мин	2) Инкубация полученной смеси с Pg, мин
10	10
15	5

Получение калибровочных кривых в оптимизированных условиях для определения содержания прогестерона в пробе. Готовили серию растворов Pg в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг/мл в буферном растворе PBST-BSA. К 100 мкл каждого из полученных растворов добавляли 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 нМ GLuc-Pg и 150 нМ Fl-Ab или 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 нМ GLuc и 150 нМ Fl-Ab (контрольный раствор). Полученные смеси инкубировали при 23 °С в течение 20 минут и измеряли интенсивности биолюминесценции и BRET-сигнал.

3.4.8. Гетерогенный конкурентный иммуноанализ прогестерона с использованием биолюминесцентного метода детекции

Сорбция антител на полистирольный планшет с использованием белка А. Раствор белка А в концентрации 2 мкг/мл в буфере NCA (200 мкл) вносили в лунки планшета, инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, 250 об/мин, затем промывали 3 раза 200 мкл буфером PBST. Далее, вносили по 150 мкл раствора поликлональных антител в различных концентрациях в буфере PBS, инкубировали в течение ночи при 4 °С и промывали 3 раза по 200 мкл PBST.

Прямая сорбция антител на полистирольную поверхность. По 200 мкл раствора антител в буфере NCA вносили в лунки планшета, инкубировали в течение ночи при 4°С и промывали 3 раза по 200 мкл PBST.

После иммобилизации антител в обоих случаях свободную поверхность блокировали раствором PBST-BSA в течение 2 часов при 37 °С, промывали 3 раза 200 мкл PBST и использовали для анализа прогестерона.

Определение концентрации свободного прогестерона. В лунки планшета с иммобилизованными антителами вносили 100 мкл раствора Luc-Pg в PBST-BSA, добавляли 10 мкл Pg в буфере PBST-BSA и инкубировали в течение часа при комнатной температуре и умеренном перемешивании (120 об/мин). Затем промывали 4 раза по 200 мкл PBST, добавляли 100 мкл субстратной смеси АТР-LH₂, предварительно разбавленной в 2 раза буфером PBST и регистрировали биолюминесцентный сигнал на приборе Spectramax M5 в режиме биолюминесценция.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей данной работы являлось создание высокоспецифических реагентов на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, позволяющих существенно расширить области ее применения в биоспецифическом анализе. Были разработаны как генноинженерные конструкции, в которых к молекуле люциферазы методами генетического конструирования был присоединен белковый фрагмент, способный связываться с изучаемой мишенью [86, 117-120], так и химические конъюгаты люциферазы с молекулами, обладающими специфической активностью.

Среди систем, в которых можно использовать подобные реагенты, содержащие в качестве метки люциферазу светляков, особый интерес представляют системы на основе высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий, которые выступают в качестве мостика между изучаемой мишенью и молекулой люциферазы. Для этих целей были созданы плазмиды, кодирующие гибридные белки стрептавидин-люциферазы и люциферазу с биотинсвязывающим доменом (бсср) [177], позволяющим получать биотинилированную люциферазу *in vivo*.

4.1. Получение и свойства гибридного белка люциферазы с биотинсвязывающим доменом (бсср)

4.1.1. Конструирование плазмиды

Как было описано в литературном обзоре, гибридные белки люциферазы светляков с бсср известны для *Photinus pyralis* и *Luciola lateralis*. В данной работе была получена плазида, кодирующая гибридный белок люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, содержащий на С-конце дополнительно 87 С-концевых аминокислотных остатков биотин-связывающего домена *E. coli* (бсср), которые достаточны для биотинилирования гибридного белка *in vivo* [120]. В качестве люциферазы был использован высокоактивный термостабильный мутант TS люциферазы светляков *L. mingrelica* [176].

Для получения плазмиды, кодирующей гибридный белок Luc-бсср, были использованы три фрагмента ДНК:

- 1) экспрессионный вектор pET23b, позволяющий проводить экспрессию гена гибридного белка с помощью высокоэффективной системы pET [178] и добавляющий шестигистидиновую последовательность на С-конец фермента для его последующей очистки методом металлохелатной хроматографии;
- 2) ген термостабильного мутанта люциферазы TS, полученный из плазмиды pETL7 [176];

3) фрагмент ДНК, кодирующий 87 С-концевых аминокислотных остатков *bccp* [177], выделенный из генома клеток *E. coli* и модифицированный введением сайтов рестрикции *Sall* и *ApaI* при помощи ПЦР.

При конструировании гибридного белка стартовый кодон метионина в начале гена *bccp* был заменен на лейцин, чтобы удалить возможную рамку считывания. Этот остаток находится в неконсервативной подвижной петле до начала структурированной части *bccp*, поэтому его замена не оказывает существенного влияния на свойства белка [185]. Следует отметить, что в полученной конструкции (Рис. 12 Б) последовательность *SGPLEAPAAA* выполняет роль подвижного линкера между структурированными частями люциферазы и *bccp* [186].

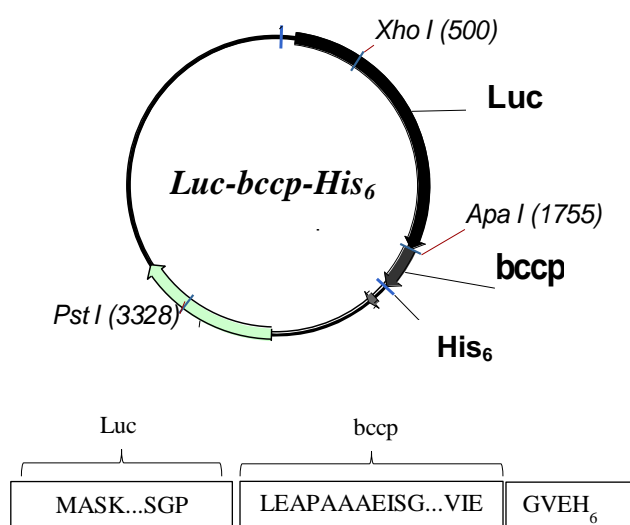


Рис. 12. А. Плазмида, кодирующая ген биотинилированной люциферазы. Б. Схема аминокислотной последовательности *Luc-bccp*

Для наработки полученной плазмидой *Luc-bccp-His₆* (Рис. 12) были использованы клетки XL1-blue. Секвенирование подтвердило отсутствие мутаций на участке, кодирующем гибридный белок.

4.1.2. Свойства гибридного белка люцифераза-*bccp*

Для наработки целевого белка клетки *E. coli* штамма 21(DE3) были трансформированы полученной плазмидой. Количество белка во фракциях определяли спектрофотометрически ($\lambda=280$). Удельная активность очищенной гибридной люциферазы составила $3,5 \times 10^{12}$ RLU/мг, а активность мутанта TS, не содержащего домен *bccp*, - $6,8 \times 10^{12}$ RLU /мг. Таким образом, активность белка, содержащего *bccp*-домен, составила 52% или 60% с учетом увеличения массы гибридного белка до 71 кДа по сравнению с 62 кДа у исходной люциферазы. Уровень экспрессии сохранился на том же уровне, что и у исходной люциферазы $23 \pm 0,5$ мг/мл.

Определение степени биотинилирования гибридного белка. Для определения степени биотинилирования гибридного белка использовали магнитные частицы, покрытые стрептавидином. Содержание SA на поверхности частиц рассчитывали согласно инструкции производителя, исходя из того, что 1 мг частиц способно связать 400 пмоль биотинилированного белка. Соотношение Luc-бсср:SA на поверхности частиц составило 1:40. Для контроля неспецифического связывания использовали исходную люциферазу Luc, не содержащую бсср-домен. Полученные данные представлены в Таблице 12.

Таблица 12. Определение степени биотинилирования. Состав реакционной смеси: $6,02 \times 10^{-5}$ мг/мл Luc-бсср или Luc, 0,1 мг/мл BSA, 0,1 мг/мл частиц.

	Luc-бсср	Luc
Исходная биолюминесцентная активность, %	100 ± 6	100 ± 6
Биолюминесцентная активность супернатанта после инкубации с частицами, %	38 ± 2	94 ± 5
Биолюминесцентная активность связавшегося с частицами фермента, %	62 ± 3	5 ± 0,7

Согласно полученным данным, если предположить, что гибридный белок удерживается в комплексе с частицами за счет биотин-стрептавидиновых взаимодействий, то биотинилирование гибридного белка составляет порядка $60 \pm 5\%$ с учетом 5% неспецифической сорбции. В нашем случае наблюдалось неполное биотинилирование, поскольку выращивание клеток велось без добавления экзогенного биотина. Для увеличения выхода биотинилированного гибридного белка в работе [120] было предложено добавление биотина в питательную среду для выращивания клеток в концентрации 10 мкг/мл, что увеличивало выход биотинилированного гибридного белка с 55 до 95%, однако в нашем случае, добавление биотина в той же концентрации не увеличило процент биотинилированной формы. Это можно объяснить высоким уровнем экспрессии гибридного белка и более низким уровнем экспрессии биотинлигазы [113].

Белковый электрофорез для Luc-бсср, проведенный в денатурирующих условиях (Рис. 13) показал наличие бсср-домена в молекулах гибридного белка, которое проявляется в появлении полосы, соответствующей белку с массой около 75 кДа и отсутствии полосы с массой, характерной для исходной люциферазы без бсср-домена (62 кДа). Из представленного рисунка можно также сделать вывод и о высокой степени чистоты белка, полученного после металлохелатной хроматографии.

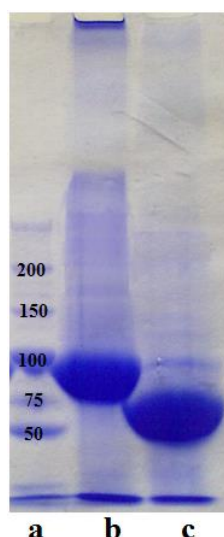


Рис. 13. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях. а-маркер, b-Лус-бсср, с-исходная люцифераза Лус.

Кинетические характеристики, термостабильность гибридного белка и спектры биолюминесценции. Были измерены константы Михаэлиса по каждому из двух субстратов в буфере АВ (рН 7,8) при концентрации белка 0,01 мг/мл. При определении K_m^{LH2} концентрация АТФ составляла 1,2 мМ, а при определении K_m по АТФ концентрация люциферина составляла 0,15 мМ. Кинетика термоинактивации гибридного белка, в концентрации 0,01 мг/мл была изучена при 47°C рН 7,8 в буфере ТВ1. Из зависимости I_{max} от времени инкубации, был определен период полуинактивации ($\tau_{1/2}$) для Лус-бсср и Лус. Были сняты спектры биолюминесценции и определены λ_{max} . Полученные данные представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Физико-химические свойства исходной люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (Лус) и гибридного белка Лус-бсср.

Фермент	K_m , мкМ		Максимум биолюминесценции, (рН 7.8) λ_{max} , нм	Полупериод инактивации при 47°, (рН 7.8) $\tau_{1/2}$, мин
	по LH ₂	по АТФ		
Лус	60 ± 5	41 ± 8	590±5	12 ± 3
Лус-бсср	66 ± 6	41 ± 7	590±5	12 ± 3

Результаты, представленные в Таблице 13, показывают, что введенный бсср-домен не оказывает влияния на кинетические свойства, спектры биолюминесценции и термостабильность люциферазы.

Таким образом, была впервые сконструирована плаزمида клонированием гена высокоактивного и термостабильного мутанта люциферазы *Luciola mingrelica*, содержащего полигистидиновую последовательность, с биотинсвязывающим доменом. Был впервые получен и охарактеризован гибридный белок указанного мутанта люциферазы с биотинсвязывающим

доменом, биотинилированным *in vivo*, обладающий высоким уровнем экспрессии, высокой люциферазной активностью и способностью связывать стрептавидин. Таким образом, полученный гибридный белок Luc-bssr может быть использован для детекции аналитов, содержащих стрептавидин, либо для анализа биотинилированных анализируемых веществ в составе нековалентного комплекса гибридного белка Luc-bssr со стрептавидином.

4.2. Получение и свойства гибридных белков люциферазы со стрептавидином

4.2.1. Конструирование плазмид

Для получения стрептавидин-люциферазы были сконструированы четыре плазмиды. Использовали ген термостабильной люциферазы TS *Luciola mingrelica* (Luc) [176] и минимальный участок гена стрептавидина (119 а.к.), который клонировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы ДНК *Streptomyces avidinii*. При этом либо к С-концу, либо к N-концу стрептавидина, в зависимости от структуры получаемой плазмиды, были добавлены последовательности, кодирующие полипептиды, которые в данном случае выполняли функцию подвижных линкеров. Плазмиды различались взаимным расположением генов Luc и SA. Так плазмиды 1, 2, 3 содержат ген SA на N-конце гена Luc, а плаزمид 4 - на С-конце. Плазмиды различались также положением полигистидиновой последовательности: плазмиды 1 и 2 содержат полигистидиновую последовательность на С-конце гена Luc, а 3 и 4 на N- и С-конце SA. Плазмиды 1 и 2 отличались тем, что в плазмиде 2 в гене люциферазы стартовый кодон *Met* был заменен на *Gly* во избежание возможной коэкспрессии свободной люциферазы без стрептавидина. Структуры плазмид, подтвержденные методом секвенирования, показаны на Рис. 14.

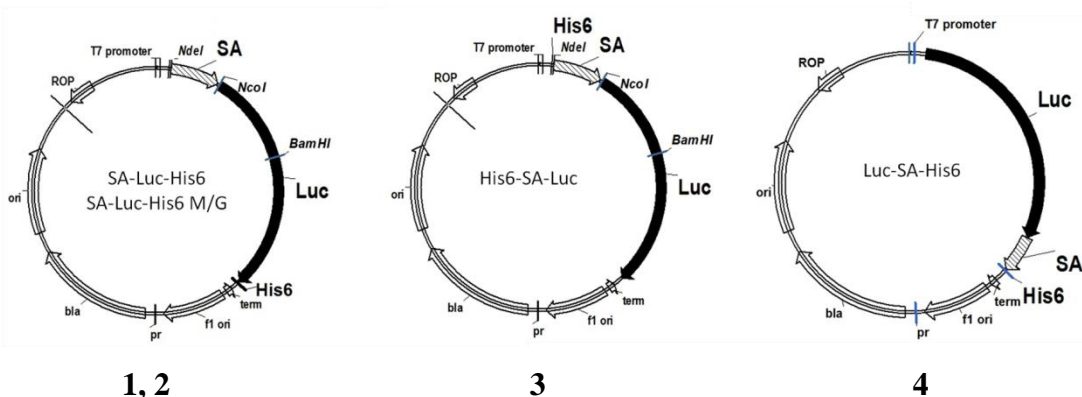


Рис. 14. Структуры плазмид, кодирующих гибридные белки люцифераза-стрептавидин. Обозначения: 1- *SA-Luc-His₆*, 2- *SA-Luc-His₆ M/G*, 3- *His₆-SA-Luc*, 4- *Luc-SA- His₆*

4.2.2. Получение гибридных белков люцифераза-стрептавидин

Полученные плазмиды были наработаны в клетках *E.coli XL1 Blue*. Экспрессию полученных плазмид проводили в клетках *E.coli BL21(DE3)*. Выращивание и лизис биомассы клеток проводили по методу [172]. Гибридные белки очищали методом металлохелатной хроматографии. Результаты представлены в Таблице 14.

Таблица 14. Свойства препаратов гибридных белков люцифераза-стрептавидин

Свойства очищенных препаратов	Гибридные белки				Люцифераза
	SA-Luc-His ₆	SA-Luc-His ₆ M/G	His ₆ -SA-Luc	Luc-SA-His ₆	Luc
Активность $\times 10^{-12}$, RLU/мг	3,2 \pm 0,8	2,2 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	6,8 \pm 0,1
Выход, мг/200 мл среды	3,8 \pm 0,7	2,9 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	22,5 \pm 0,3
Связывание с колонкой, %	96 \pm 3	86 \pm 4	77 \pm 1	35 \pm 5	89

Высокий процент связывания белков с Ni-сефарозой при очистке указывает на доступность His₆ для связывания с сорбентом. Существенное снижение связывания Luc-SA-His₆ может быть объяснено особенностями структуры данного гибридного белка, снижающими доступность His₆ для связывания с колонкой. Значительное снижение выхода гибридных белков по сравнению с выходом исходной люциферазы (Таблица 14), может объясняться токсичным влиянием стрептавидина на клетки *E. coli*. Тем не менее, белки нарабатывались в достаточном для их дальнейшего исследования количестве, и для их экспрессии не требовалось использования шаперонов в отличие от работы [110], где экспрессию проводили в присутствии последних. Удельные активности препаратов гибридных белков SA-Luc-His₆, SA-Luc-His₆M/G и His₆-SA-Luc составили 30-50% от активности исходной люциферазы и были в два раза выше, чем активность Luc-SA-His₆.

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле очищенных гибридных белков (Рис. 15) показал, что для SA-Luc-His₆ и SA-Luc-His₆M/G наблюдалось две полосы: гибридного белка и люциферазы, что свидетельствовало о наличии в препарате свободного фермента (Рис. 15, образцы (1) и (2)). Гибридные белки His₆-SA-Luc и Luc-SA-His₆ не содержали свободной люциферазы, поскольку His₆ был связан с доменом стрептавидина (Рис. 15, образцы (3) и (4)).

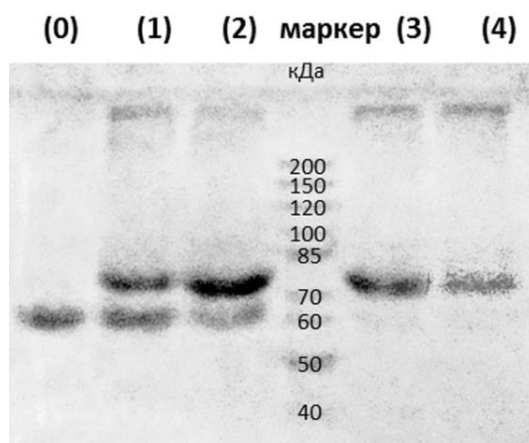


Рис. 15. SDS-электрофорез в 10% полиакриламидном геле для исходной люциферазы и гибридных белков люцифераза-стрептавидин. Проявление гелей выполняли с помощью красителя бромфенолового синего. Обозначения: (0) - люцифераза, (1) - SA-Luc-His₆, (2) - SA-Luc-His₆ M/G, (3) -His₆-SA-Luc, (4) - Luc-SA- His₆

4.2.3. Свойства гибридных белков люцифераза-стрептавидин

Известно [187], что стрептавидин может существовать в форме различных олигомеров (димеров, тетрамеров, октамеров), обладающих способностью связывать биотин. Опубликованы лишь единичные работы, в которой изучался олигомерный состав гибридных белков (стрептавидин-антитело), содержащих стрептавидин [188]. Важно было выяснить, с одной стороны, влияние домена люциферазы на олигомеризацию стрептавидина и его биотин связывающую активность, а с другой стороны, влияние структуры олигомера на ферментативную активность люциферазы. Выяснение взаимосвязи между структурой и свойствами гибридных белков люцифераза-стрептавидин было необходимо и для выбора гибридного белка с наилучшими характеристиками по активности люциферазы и стрептавидина.

Эксклюзионная хроматография очищенных металлохелатной хроматографией препаратов гибридных белков люцифераза-стрептавидин (Рис. 16) показала, что препараты содержат несколько фракций: мономеры, димеры, тетрамеры и высокомолекулярные олигомеры, а в некоторых случаях наблюдается присутствие и свободной люциферазы.

Для каждой из полученных фракций были определены относительное содержание каждой олигомерной формы в составе белкового препарата (Рис. 17А), удельная люциферазная активность (Рис. 17Б) и способность связывать биотин (Рис. 17В)

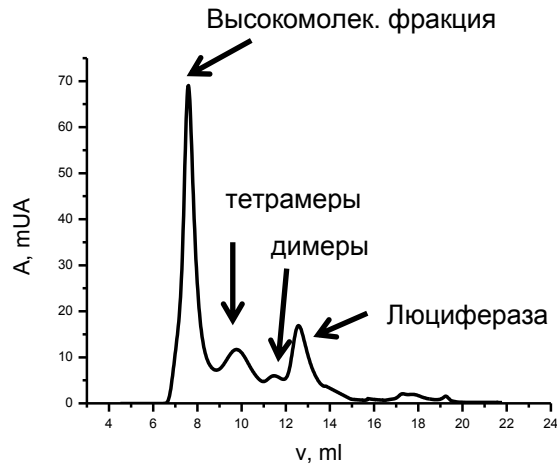


Рис. 16. Пример хроматограммы, полученной для SA-Luc-His₆ M/G на колонке Superose 12 10/30 GL. Условия: скорость потока 0,3 мл/мин, объем пробы 100 мкл, $\lambda=280$ нм, подвижная фаза 50 mM Tris-ацетат, 100 mM Na₂SO₄, pH 7,8

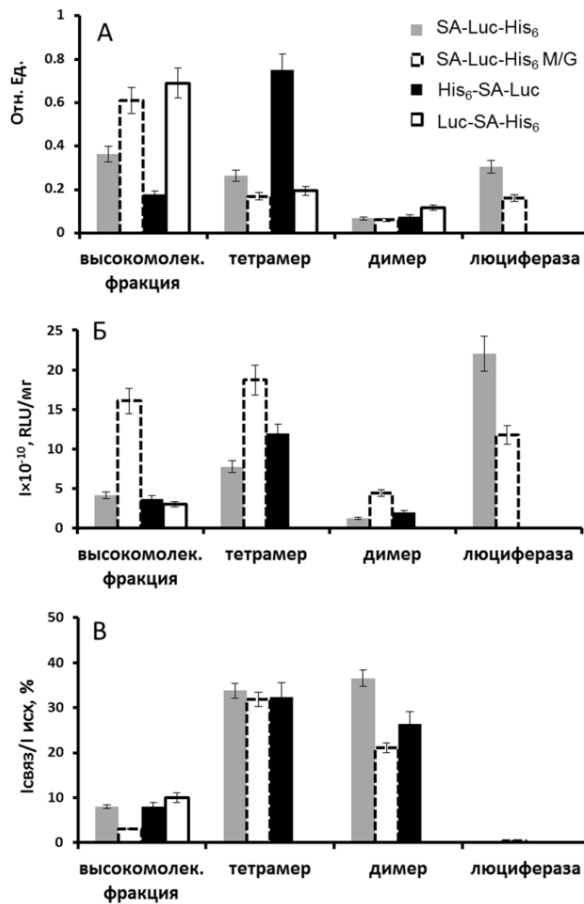


Рис. 17. Свойства различных форм гибридных белков люцифераза-стрептавидин: А – относительное содержание (отношение интегральной оптической плотности данной формы к суммарному интегралу оптической плотности для данного гибридного белка); Б - удельная люциферазная активность (отношение максимальной интенсивности биolumинесценции к концентрации соответствующей формы белка, RLU/mg); В – способность связываться с биотином (отношение интенсивности биolumинесценции олигомерной формы, связанной с иммобилизованным биотинилированным BSA, к интенсивности биolumинесценции исходного раствора данной формы, %).

Оказалось, что SA-Luc-His₆ M/G и Luc-SA-His₆ преимущественно образуют высокомолекулярные фракции. Для SA-Luc-His₆ относительное содержание высокомолекулярных олигомеров и тетрамеров близко, а His₆-SA-Luc преимущественно образует тетрамеры. Для гибридных белков SA-Luc-His₆, His₆-SA-Luc, SA-Luc-His₆M/G максимальной удельной активностью люциферазы обладают тетрамеры, а для Luc-SA-His₆ – высокомолекулярные олигомеры. Содержание и удельная активность свободной люциферазы максимальны для SA-Luc-His₆, а для SA-Luc-His₆ M/G эти величины в ~2 раза ниже. Способность связываться с биотинилированным BSA, иммобилизованным на поверхности лунок планшета, была определена как отношение люциферазной активности гибридного белка, удерживаемого на поверхности за счет высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий, к люциферазной активности исходного раствора гибридного белка. В качестве контроля использовали планшеты с иммобилизованным небитинилированным BSA (в данном случае связывание составляло менее 0,1 %). Показано, что максимальной способностью связываться с биотином обладают фракции димеров и тетрамеров. Высокомолекулярные фракции связываются с биотином в 4 раза хуже, чем тетрамеры и димеры гибридных белков.

Влияние структуры плазмид на состав и свойства гибридных белков. Структура линкера между стрептавидином и люциферазой должна обеспечивать сохранение свойств двух соединяемых белков. Ранее в качестве линкеров для связывания легких и тяжелых цепей антител были использованы последовательности (GGGGS)₃ [189] и SSA(DDAKK)₄DG [190]. В данной работе мы использовали более короткие подвижные линкеры SGGGS и SGGGGSA. Как показал хроматографический анализ продуктов, очищенных металлохелатной хроматографией (рис. 4), при использовании плазмиды SA-Luc-His₆ около 30% белка, обладающего биолюминесцентной активностью, находилось в форме свободной люциферазы, причем именно люцифераза определяла активность полученного препарата. Присутствие свободной люциферазы может быть связано с коэкспрессией свободной люциферазы и/или с деградацией гибридного белка в процессе его получения. Замена стартового кодона Met на Gly в начале гена люциферазы (плазида SA-Luc-His₆M/G) привела к снижению содержания свободной люциферазы в 2 раза по сравнению с SA-Luc-His₆. В плазмиде (His₆-SA-Luc) последовательность His₆ была перемещена с C-конца гена люциферазы на N-конец гена стрептавидина. В этом случае при металлохелатной хроматографии гибридный белок отделялся от всех компонентов, не содержащих His₆, в том числе и от свободной люциферазы, если даже она и экспрессировалась. Белок Luc-SA-His₆, который кодировался плазмидой, содержащей ген стрептавидина на C-конце люциферазы и His₆ на C-конце стрептавидина, также не содержал свободной люциферазы.

Тетрамерные формы гибридных белков обладали наибольшей биолюминесцентной и биотинсвязывающей активностью (Рис. 17Б и В), поэтому для них были получены спектры биолюминесценции, и была измерена термостабильность. Добавление домена стрептавидина, как оказалось, не повлияло на спектры биолюминесценции, однако снизило термостабильность в два раза (Рис. 18).

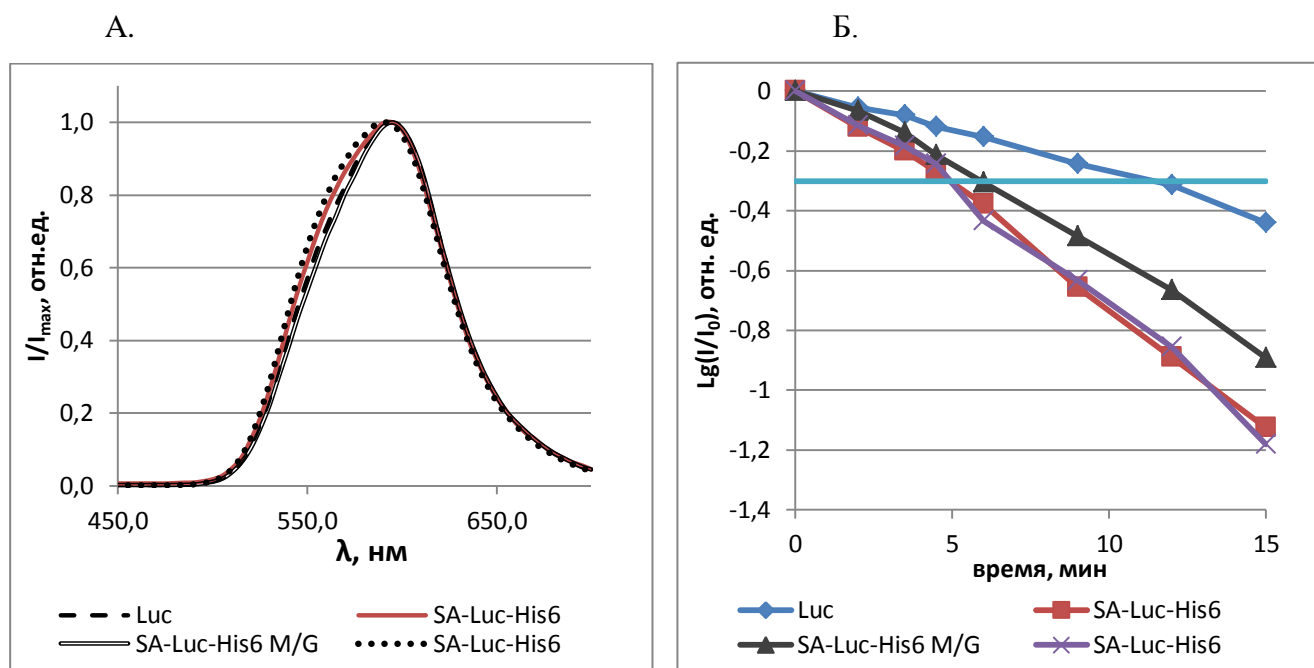


Рис. 18. Спектры биолюминесценции и кривые инактивации для тетрамерных форм гибридных белков. Условия инактивации: концентрация Luc-SA или Luc 0,01 мг/мл в буфере ТВ1 при 47°C

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что структура плазмиды существенно влияет на соотношение олигомерных форм, а также на активность люциферазы и стрептавидина в составе гибридного белка. Плазмида *His₆-SA-Luc* является оптимальной для экспрессии гибридного белка люцифераза-стрептавидин (Luc-SA), который образуется преимущественно в высокоактивной тетрамерной форме с высоким сродством к биотину, не содержит примесей активной свободной люциферазы и, следовательно, может быть использован в разработке аналитических систем, основанных на биолюминесцентной детекции.

4.3. Применение гибридных белков Luc-SA и Luc-бссп в биоспецифическом анализе

В биоаналитических системах на основе неконкурентной схемы иммуноанализа чувствительность определяется значением фонового сигнала и минимальной детектируемой концентрацией метки, которая определяет величину отклика системы на изменение концентрации аналита. Для определения люциферазной активности была разработана специальная субстратная смесь АТФ-LH₂, включающая в себя 0,025 М КН₂РО₄, 0,025 М

K_2HPO_4 , 2 мМ ЭДТА, 7,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ АТФ, 0,15 мМ LH_2 , 1 % Неонол-10, 50 мкМ $Na_4P_2O_7$, рН 7,8, которая позволяла наблюдать стабильный во времени биолюминесцентный сигнал, величина которого была пропорциональна концентрации фермента в интервале 10^{-13} - 10^{-9} М. Для определения предела обнаружения люциферазы в составе гибридных белков, были построены градуировочные зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации гибридных белков (Рис. 19).

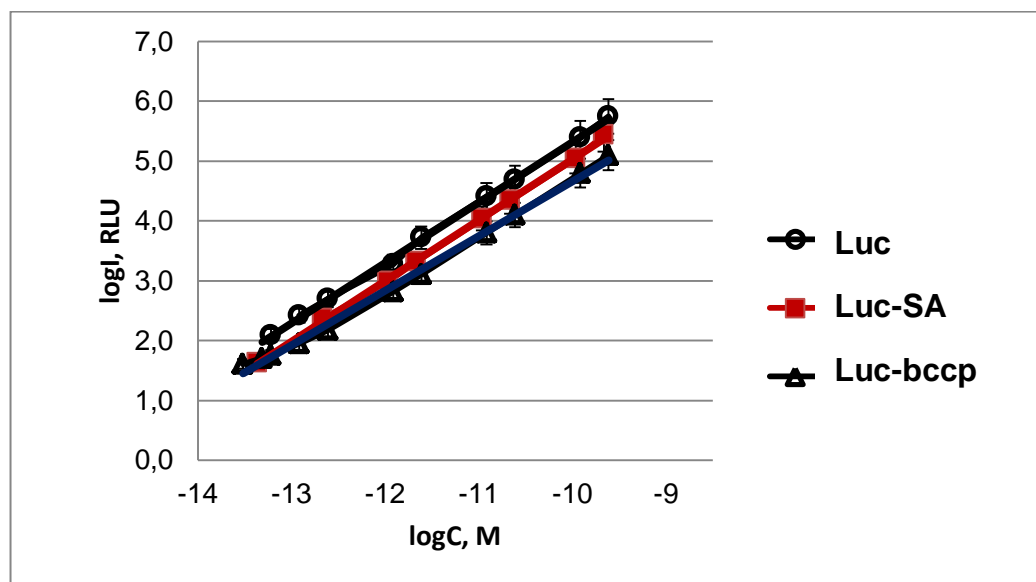


Рис. 19. Зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации гибридного белка в реакционной смеси. Условия: буфер PBS, регистрация биолюминесцентного сигнала на приборе ЛЮМ-1.

Белок	Уравнение	Предел обнаружения, М
Luc	$\text{LogI}=(15,3\pm 0,2)+(1,00\pm 0,02)\cdot\text{LogC}$	$5\cdot 10^{-14}$
Luc-SA	$\text{LogI}=(15,1\pm 0,1)+(1,00\pm 0,01)\cdot\text{LogC}$	$10\cdot 10^{-14}$
Luc-bccp	$\text{LogI}=(13,8\pm 0,1)+(0,91\pm 0,01)\cdot\text{LogC}$	$10\cdot 10^{-14}$

Зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации гибридных белков, полученные для Luc-bccp и Luc-SA, иллюстрируют высокую чувствительность анализа при использовании люциферазы в качестве метки. Предел обнаружения в данном случае составляет 50-100 фМ белка.

4.3.1. Специфическая детекция клеток *Salmonella* с использованием гибридных белков Luc-bccp и Luc-SA

Полученные гибридные белки Luc-bccp и Luc-SA могут быть использованы в различных вариантах биоспецифического анализа на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий: для детекции различных биотинилированных мишеней (белков, олигонуклеотидов, ДНК), а

также детекции нековалентных комплексов микроорганизмов с биотинилированными антителами. В данной работе мы показали возможность применения гибридных белков для детекции инактивированных клеток *Salmonella* с использованием схемы двухстадийного сэндвич-анализа, представленной на Рис. 20 с использованием физической сорбции улавливающих антител на поверхность полистирольного планшета.

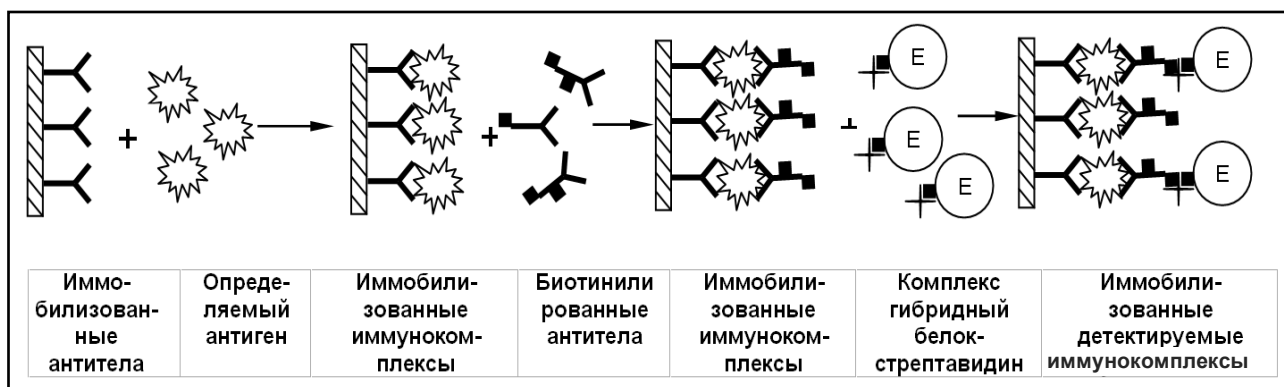


Рис. 20. Схема детекции клеток *Salmonella* с использованием биотинилированных и небитинилированных антител и комплекса люцифераза-стрептавидин.

Образующиеся специфические иммунокомплексы антитело-антиген-биотинилированное антитело детектировали либо с использованием гибридного белка Luc-SA, либо, нековалентного комплекса Luc-bcsp со стрептавидином (Luc-bcsp---SA). Было показано, что для получения Luc-bcsp---SA оптимальное молярное соотношение реагентов Luc-bcsp:SA составляет 1:1 [191].

Помимо физической адсорбции антител на поверхность полистирольного планшета, для получения иммуносорбента мы применили химическую иммобилизацию антител. В этом случае вместо полистирольного планшета мы использовали монодисперсные полистирольные частицы ($d=240$ нм) покрытые плуроником [80], модифицированным пиридилдисульфидными группами, позволяющими проводить химическую иммобилизацию антител. Преимущества данного подхода заключались в увеличении рабочей поверхности на 2 порядка, снижении неспецифических гидрофобных взаимодействий благодаря способности плуроника, тройного блок-сополимера с двумя концевыми относительно гидрофильными полиоксиэтиленовыми блоками и гидрофобным полиоксипропиленовым блоком, отвечающим за адсорбцию на полистироле, «покрывать» собой гидрофобную поверхность частиц, предотвращая тем самым неспецифическую сорбцию белков, а также их денатурацию и инактивацию, которая имеет место при прямой адсорбции белков на гидрофобной поверхности частиц [192-194]. Кроме того, при химической иммобилизации на плуронике антитела оказываются соединенными с

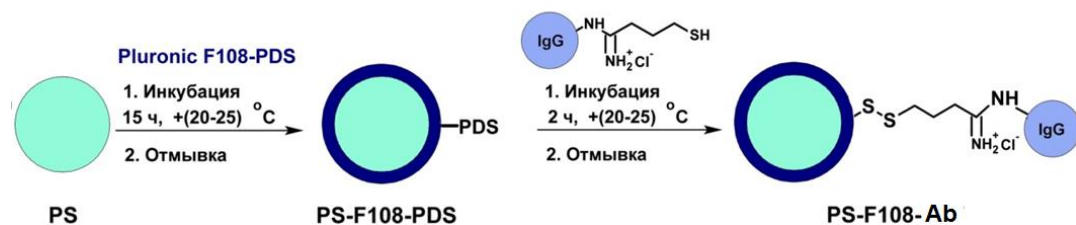
полистирольной частицей через спейсер, позволяющий им сохранять подвижность в пространстве, что увеличивает доступность антител для аналита.

Схема химической иммобилизации антител на поверхности полистирольных частиц представлена ниже.

А. Схема активации антител с использованием реагента Траута



Б. Схема химической иммобилизация активированных антител на полистирольные частицы, модифицированные плуронином, содержащим пиридилдисульфидные группы



Обозначения: Ab- антитело, PS- полистирольные частицы, F108-PDS- плуроник содержащий пиридилдисульфидные группы.

Результаты детекции клеток *Salmonella* с использованием комплекса Luc-бссп---SA и гибридного белка Luc-SA на планшете, а также гибридного белка Luc-SA на частицах представлены на Рис. 21. Согласно полученным результатам, при проведении анализа на планшете с использованием Luc-бссп---SA и Luc-SA минимально определяемая концентрация клеток составила $5 \cdot 10^4$ и 10^4 КОЕ/мл соответственно, при проведении анализа на частицах с использованием Luc-SA - 10^5 КОЕ/мл. При проведении анализа на планшете использование комплекса Luc-бссп---SA лишь незначительно увеличило чувствительность анализа по сравнению с Luc-SA, поэтому применение Luc-SA является приоритетным, так как не требует дополнительного использования SA. Использование полистирольных частиц с химически иммобилизованными антителами при концентрации клеток более 10^5 КОЕ/мл способствовало значительному увеличению чувствительности (в 9 раз), что обусловлено описанными выше преимуществами химической иммобилизации антител на частицы.

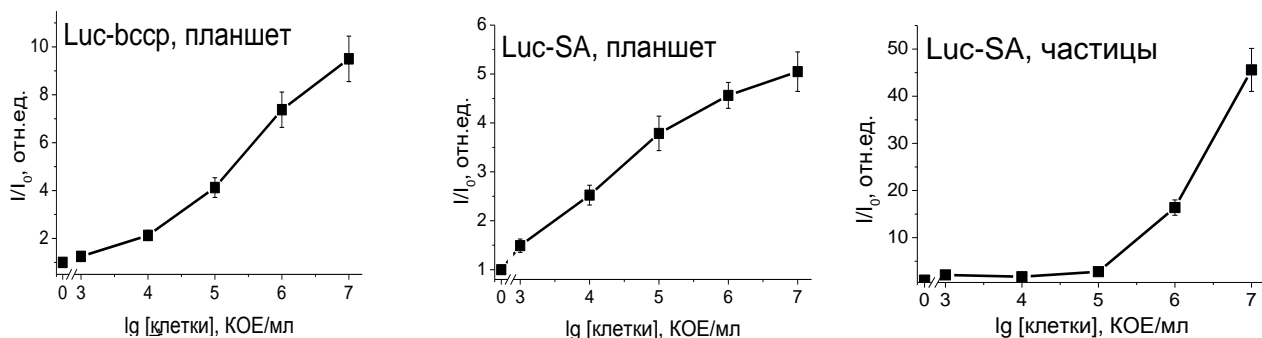


Рис. 21. Зависимость отношения I/I_0 от концентрации клеток *Salmonella* с использованием гибридных белков Luc-SA и Luc-bcsp при различных способах иммобилизации улавливающих антител: физическая сорбция на полистирольный планшет («планшет») и химическая иммобилизация антител на поверхность полистирольных частиц («частицы»)

На примере разработанного метода показано успешное применение гибридов Luc-bcsp и Luc-SA в иммуноанализе микроорганизмов с использованием биотинилированных антител. Чувствительность метода сопоставима с чувствительностью как традиционных иммунометодов с использованием пероксидазы в качестве метки [173, 195, 196], так и методов на основе люцифераз светлячков, в которых предел обнаружения варьируется от $7,3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл до $2,3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в зависимости от состава селективной среды и природы улавливающего агента [143, 197]. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования гибридных белков Luc-bcsp и Luc-SA в качестве универсальных реагентов для разработки новых высокочувствительных систем иммуноферментного анализа микроорганизмов с использованием соответствующих биотинилированных антител.

4.3.2. Гибридизационный анализ ДНК с использованием гибридного белка Luc-SA

Гибридный белок Luc-SA был применен для специфической детекции клеток *E. coli* с использованием метода амплификации фрагмента гена *gadB* (174 bp), кодирующего в клетках *E. coli* глутаматдекарбоксилазу [198]. Для внедрения биотина в состав амплифицируемых участков ДНК использовали dUTP-11-биотин. Схема анализа представлена ниже (Рис. 22). ДНК клеток *E. coli* выделяли методом температурного лизиса клеток в ТЕ-буфере, и амплифицировали специфический участок ДНК методом ПЦР с использованием специфических праймеров. На поверхности лунок стрипованного полистирольного планшета иммобилизовали олигонуклеотидные зонды, комплементарные участкам определяемой ДНК. Свободные центры связывания белков блокировали раствором, содержащим 1% BSA, 1% казеин. Затем проводили гибридизацию амплифицированного участка ДНК с иммобилизованными зондами, после чего удаляли не связавшуюся ДНК. Далее в лунки

планшета вносили гибридный белок Luc-SA в буфере PBST-BSA, инкубировали, удаляли остатки свободного гибридного белка, добавляли субстратную смесь ATP-LH₂ для определения активности люциферазы и регистрировали биолюминесцентный сигнал.

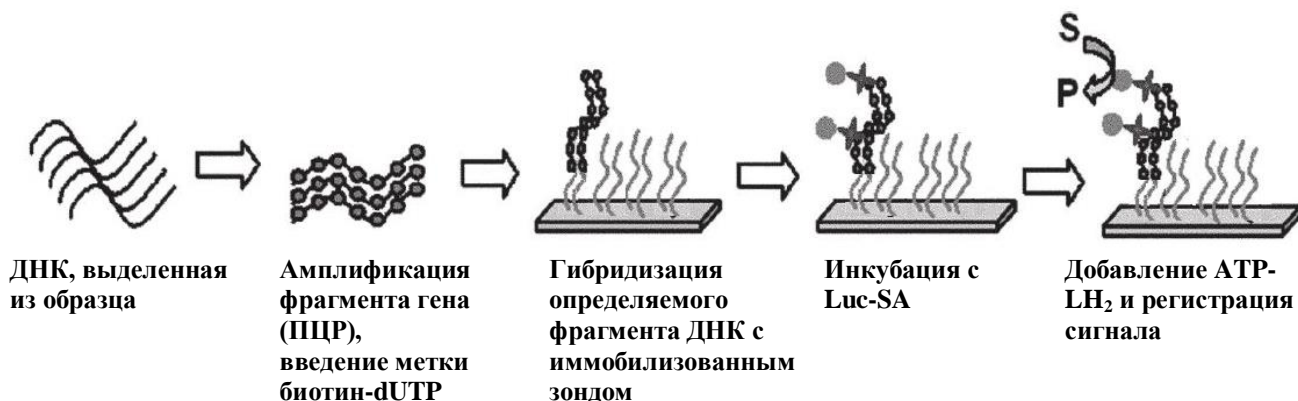


Рис. 22. Схема анализа ДНК с использованием биолюминесцентного метода детекции

Для подтверждения подлинности результатов, получаемых при гибридизации целевой ДНК, были использованы следующие контроли:

1) НС-негативный контроль. Эксперимент выполняли согласно схеме на Рис. 22, но вместо олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам определяемой ДНК, на поверхности лунок полистирольного планшета иммобилизовали олигонуклеотидные зонды, последовательность которых была некомплементарна целевой ДНК. Их связывание с целевой ДНК показывало уровень фонового сигнала, обусловленного неспецифическими взаимодействиями зонд-ДНК.

2) SC-положительный контроль иммобилизации. Олигонуклеотидные зонды длиной в 31 основание (NH₂-TTTTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-биотин), модифицированные на 5'-конце аминогруппой, а на 3'-конце – биотином, иммобилизовали на поверхности лунок планшета, инкубировали с раствором гибридного белка Luc-SA и измеряли интенсивность биолюминесценции. Наблюдаемый сигнал биолюминесценции указывал на способность гибридного белка Luc-SA образовывать комплекс с биотином и на эффективность иммобилизации зондов на поверхности планшета.

3) РС-положительный контроль гибридизации. На поверхности лунок иммобилизовали ДНК-зонд, комплементарный к РС-олигонуклеотидной последовательности содержащей биотин:



Проводили гибридизацию, инкубировали с раствором гибридного белка Luc-SA и измеряли биолюминесцентный сигнал. Наличие высокого биолюминесцентного сигнала показывало, что соблюдены условия иммобилизации зонда и гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом, необходимые для детекции целевой ДНК.

На Рис. 23 показаны результаты выполненных контрольных экспериментов. Для ННС-контроля регистрируется наименьший биолюминесцентный сигнал, который обусловлен лишь неспецифическим связыванием гибридного белка Luc-SA с поверхностью и некомплементарным зондом. Для SC- и PNC-контролей биолюминесцентный сигнал заметно превышает фоновый сигнал ННС-контроля. Следовательно, с использованием данной гибридизационной системы можно достоверно определять специфические взаимодействия между иммобилизованным зондом и комплементарным к нему олигонуклеотидом.

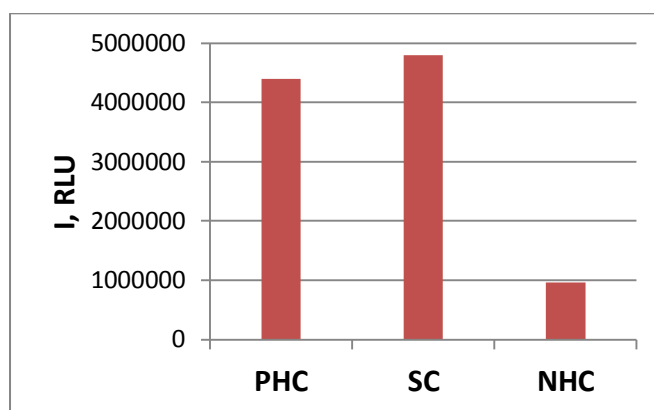


Рис. 23. Биолюминесцентный сигнал для контролей. Условия: 1 мкл 10 мкМ раствора зонда в буфере SpB иммобилизовали на поверхности лунок полистирольного планшета, 100 мкл 16 нМ раствора Luc-SA использовали для инкубации в течение 60 мин при 37 °С.

Выбор метода иммобилизации олигонуклеотидных зондов. Мы сравнили три метода иммобилизации олигонуклеотидного зонда на поверхности лунок полистирольного планшета:

- 1) сорбция зонда на полистирольную поверхность планшета;
- 2) сорбция зонда на полистирольную поверхность, предварительно обработанную полилизинном [199], когда связывание зонда с поверхностью происходит за счет электростатических взаимодействий положительно заряженных аминогрупп полилизина с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК-зонда;
- 3) сорбция зонда на полистирольную поверхность, обработанную полилизинном с последующей обработкой поверхности глутаровым альдегидом (ГА), который образует иминную связь с аминогруппой лизина и концевой аминогруппой ДНК-зонда, и восстановлением до амина путем добавления NaBH_4 .

Биотинилированный SC-зонд (см. выше) иммобилизовали тремя описанными выше способами, затем инкубировали с раствором гибридного белка Luc-SA и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для определения фонового сигнала параллельно проводили аналогичные эксперименты с использованием планшетов, обработанных так же, как и перед иммобилизацией зондов, но без последующей иммобилизации зондов.

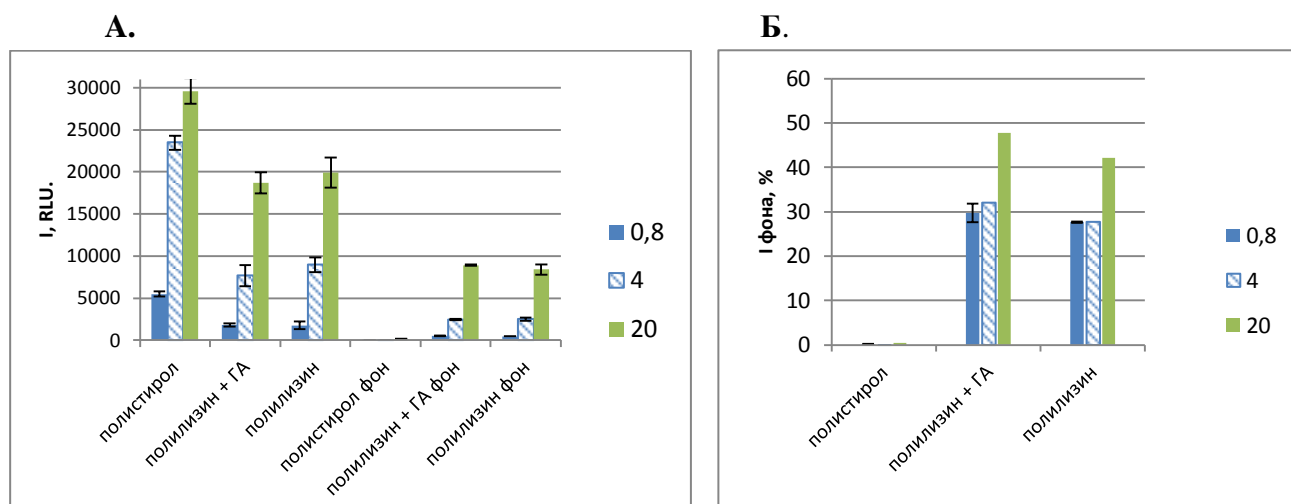


Рис. 24. А. Зависимость биолюминесцентного и фонового сигнала от способа иммобилизации биотинилированного SC-зонда при различных концентрациях Luc-SA 0,8; 4; 20 нМ. Фоновый сигнал, получен при той же обработке планшета, но без добавления SC- зонда. Условия гибридизации: 1 мкл 5 мкМ раствора SC-зонда; условия инкубации с Luc-SA: 100 мкл раствора Luc-SA, инкубация 60 мин при 37 °С. Б. Вклад (%) фонового сигнала в общий сигнал биолюминесценции для данных, показанный на Рис. 24 А.

Согласно полученным данным (Рис. 24), предварительная обработка поверхности полилизинном и последующая обработка глутаровым альдегидом не увеличивают, а, наоборот, уменьшают наблюдаемый биолюминесцентный сигнал по сравнению с биолюминесцентным сигналом, регистрируемым при сорбции зонда на необработанную полистирольную поверхность. Кроме того, неспецифическая сорбция Luc-SA на поверхности, обработанной полилизинном, в 150 раз превышает величину неспецифической сорбции Luc-SA на поверхности необработанного полистирольного планшета. Таким образом, дальнейшие эксперименты мы проводили при иммобилизации зонда непосредственно на поверхность полистирольного планшета.

Оптимизация условий детекции амплифицированной ДНК. В неконкурентных методах анализа чувствительность определяется чувствительностью регистрации сигнала и значением фонового сигнала. Следовательно, при использовании биолюминесцентного метода детекции, который отличается высокой чувствительностью регистрации метки, снижение фонового сигнала является основной задачей. Для выявления условий анализа, при которых соотношение сигнал/фон будет максимальным, мы провели оптимизацию используемой

системы по следующим параметрам: концентрация ДНК-зонда, объем ДНК-зонда, концентрация Luc-SA, время и температура инкубации с Luc-SA. Для определения насыщающей концентрации ДНК-зонда и оптимальной концентрации Luc-SA были получены зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации иммобилизуемого зонда при нескольких концентрациях гибридного белка Luc-SA. 1 мкл раствора зонда в буфере SPB иммобилизовали на полистирольном планшете, добавляли в каждую лунку по 40 нг амплифицированной ДНК в буфере SSPE. После гибридизации вводили по 100 мкл раствора Luc-SA в буфере PBST-BSA, инкубировали в течение 60 мин при 37 °С и перемешивании (180 об/мин) и измеряли биолюминесцентный сигнал. Параллельно те же эксперименты выполняли в отсутствие амплифицированной ДНК, чтобы измерить величину фонового сигнала.

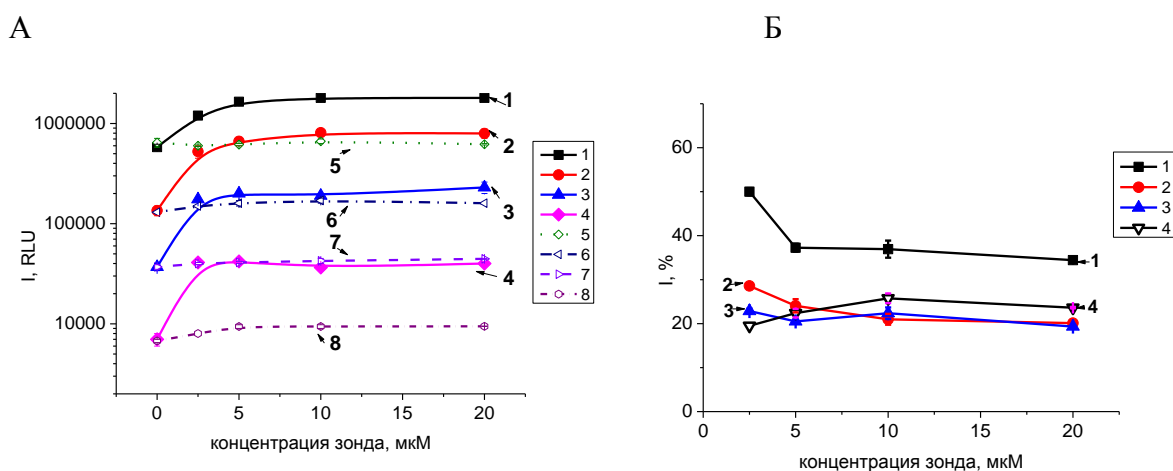


Рис. 25. Зависимость биолюминесцентного сигнала (А) и неспецифического сигнала в % (Б) от концентрации иммобилизованного олигонуклеотидного зонда в присутствии (кривые 1-4) и в отсутствие определяемой ДНК (кривые 5-8) при различных концентрациях Luc-SA. Обозначения: [Luc-SA], нМ = 10 (кривые 1 и 5), 3,3 (кривые 2 и 6), 1 (кривые 3 и 7), 0,2 (кривые 4 и 8).

Результаты (Рис. 25А) показывают, что зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации зонда при изменении концентрации Luc-SA от 0,2 до 10 нМ описывается кривой с насыщением. При концентрации Luc-SA 10 и 3,3 нМ насыщающая концентрация зонда составила 10 мкМ, а при концентрации Luc-SA 1 и 0,2 нМ - 2,5 мкМ. Неспецифическая сорбция, рассчитанная как отношение биолюминесцентных сигналов в отсутствие ДНК (фон) и в присутствии ДНК (Рис. 25Б), была наиболее высокой при 10 нМ Luc-SA и достигала 50 % при уменьшении концентрации зонда до 2,5 мкМ. При других концентрациях Luc-SA (от 0,2 до 3,3 нМ) значения фонового сигнала не превышали 20- 30 %. Таким образом, из полученных данных следует, что концентрация Luc-SA должна быть не более 3,3 нМ. Для дальнейших экспериментов использовали следующие условия: количество зонда 10 пикомоль на лунку, а концентрация Luc-SA составляла 3,3 или 1 нМ.

Далее мы изучили влияние объема иммобилизуемого зонда (от 1 до 40 мкл) на специфический и неспецифический сигналы при постоянном количестве зонда в лунке. Согласно полученным данным (Рис. 26, кривая 1), биолюминесцентный сигнал возрастает пропорционально увеличению объема иммобилизованного олигонуклеотида до 30 мкл при постоянном его количестве в лунке, что можно объяснить увеличением доступности центров связывания зондов с молекулами комплементарной ДНК и Luc-SA. При объеме зонда 30 мкл зонд занимает максимальную площадь (полностью покрывает дно микроюветы). При этом фоновый сигнал, полученный в отсутствие определяемой ДНК, определяется неспецифическими взаимодействиями гибридного белка Luc-SA с поверхностью лунок полистирольного планшета, остается на постоянном уровне и не зависит от объема зонда.

Чтобы минимизировать свободную поверхность, на которую возможна неспецифическая сорбция гибридного белка Luc-SA, мы использовали обработку поверхности планшета некомплементарным олигонуклеотидом ННС. Условия эксперимента были те же, что и в предыдущем пункте, при этом растворы для гибридизации содержали дополнительно 10 мкМ ННС.

Согласно полученным данным (Рис. 26) добавление ННС (кривая 4) не влияет на неспецифический биолюминесцентный сигнал, но заметно снижает специфический сигнал, что можно объяснить ухудшением доступности специфических зондов (кривая 3), поэтому данный олигонуклеотид как агент блокирующий свободную поверхность в дальнейших экспериментах не использовали. Таким образом, для дальнейших экспериментов объем олигонуклеотидного зонда составлял 30 мкл в буфере SpB.

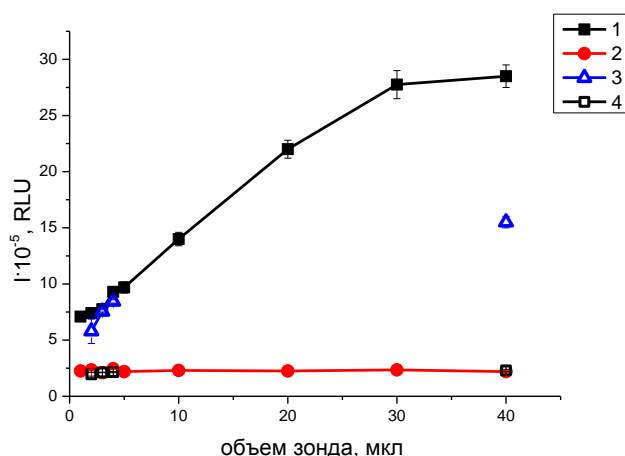


Рис. 26. Зависимость биолюминесцентного сигнала от объема наносимого зонда при иммобилизации в отсутствие (кривые 1 и 2) и в присутствии некомплементарных олигонуклеотидов (кривые 3 и 4). Условия: 20 нг/лунка определяемой ДНК в буфере SSPE (кривые 1 и 3) и без ДНК (кривые 2 и 4). Другие условия те же, что и на Рис. 25, концентрация Luc-SA 3,3 нМ.

Далее было изучено влияние объема раствора Luc-SA на величину неспецифической сорбции. В предыдущих экспериментах объем Luc-SA составлял 100 мкл. Поскольку зонд иммобилизовали на дне лунки, то уменьшение объема Luc-SA могло способствовать снижению неспецифической сорбции на стенках лунки. При уменьшении объема раствора Luc-SA от 100 до 50 мкл биолюминесцентный сигнал уменьшился в 1,5 раза, и неспецифическая сорбция при этом тоже уменьшилась. Однако соотношение сигнал/фон практически не изменилось. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали 100 мкл раствора Luc-SA.

Было изучено влияние температуры и длительности инкубации образца с раствором Luc-SA на время установления равновесия и соотношение сигнал/фон. Как показано на Рис. 27А, при 37 °С равновесие устанавливается через 1 час, в то время как при 25 °С для этого требуется 90 минут, а при 4 °С более 90 минут. При этом отношение фонового сигнала к специфическому не зависит от времени и температуры инкубации (Рис. 27Б), поэтому для дальнейших экспериментов инкубацию проводили при 37 °С в течение часа.

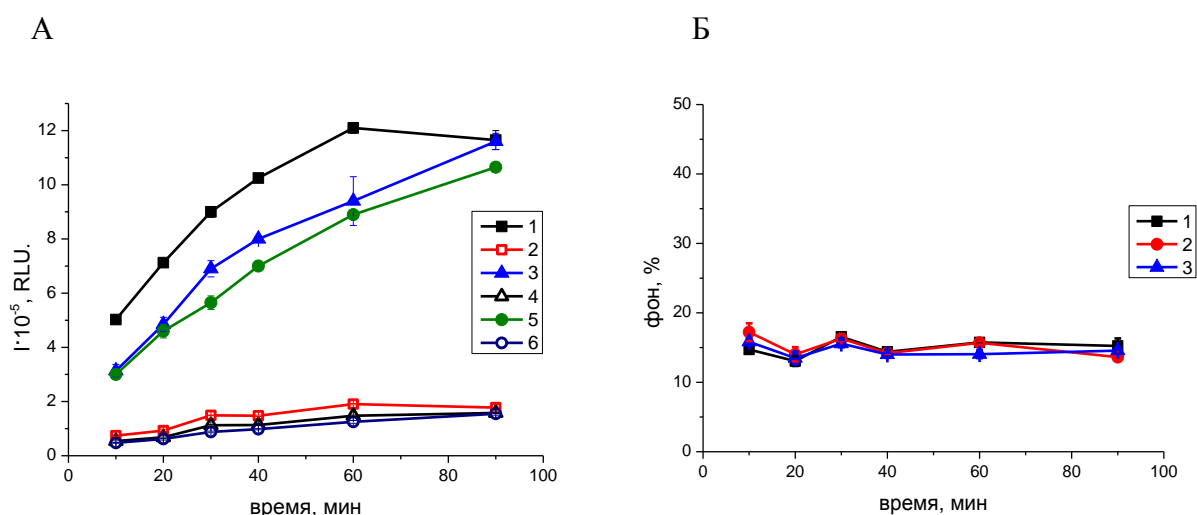


Рис. 27. Зависимость биолюминесцентного сигнала в присутствии (рис. А. кривые 1-3) и отсутствии определяемой ДНК (рис. А. кривые 4-6) и сигнала фона в % (рис. Б.) от времени инкубации образца с раствором Luc-SA при различных температурах. 1- 37 °С, 2 - 25 °С, 3 - 4 °С. Условия: Luc-SA 1 нМ

В разработанных оптимизированных условиях (указаны в подписи к Рис. 28) была получена зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации определяемой ДНК в диапазоне концентраций от 1,4 до 26 нг /лунка при концентрациях Luc-SA 3,3 и 1 нМ.

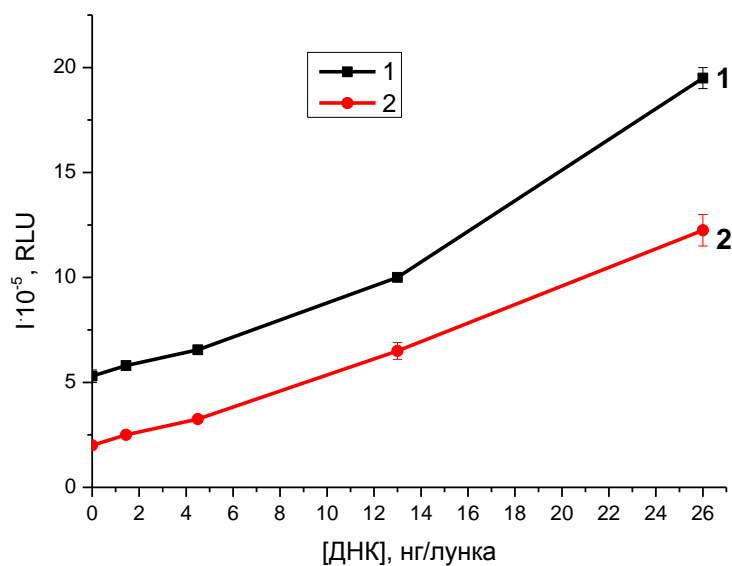


Рис. 28. Зависимость билюминесцентного сигнала от концентрации определяемой ДНК при концентрациях Luc-SA, нМ 3,3 (кривая 1) и 1 (кривая 2). Условия: 30 мкл раствора зонда с концентрацией 0,3 мкМ, 100 мкл Luc-SA в буфере PBST-BSA, инкубация с Luc-SA 60 мин при 37 °С и перемешивании 180 об/мин.

Согласно данным, представленным на Рис. 28, минимальная определяемая концентрация ДНК в оптимизированных условиях составила ~ 4 нг/лунку при обеих концентрациях Luc-SA. Несмотря на оптимизированные условия проведения анализа, наблюдается довольно высокое значение фонового сигнала, обусловленного неспецифической сорбцией Luc-SA. Для снижения неспецифической сорбции, возникающей за счет гидрофобных взаимодействий между молекулами гибридного белка и полистиролом, был использован плуроник, преимущества которого описаны выше.

Поверхность полистирольного планшета покрывали плуроником, иммобилизовали контрольные ДНК-зонды и проводили анализ ДНК в условиях описанных выше.

Согласно полученным данным (Рис. 29), использование плуроника с последующей обработкой планшета с иммобилизованными зондами раствором BSA-казеин снижает неспецифическую сорбцию в присутствии некомплементарного нуклеотида в 5 раз, а без обработки BSA-казеином в 10 раз. При этом наблюдается лишь незначительное уменьшение билюминесцентного сигнала (в 1,6 раза).

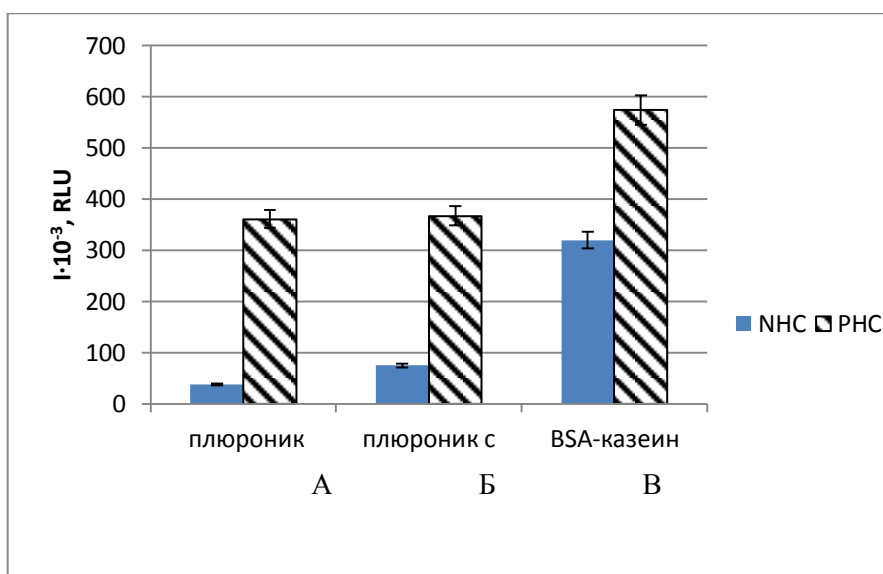


Рис. 29. Билюминесцентный сигнал для ДНК-контролей, иммобилизованных на поверхности полистирола, обработанной плюроником (А, Б) и не обработанной плюроником (В). После иммобилизации зондов поверхность была обработана BSA-казеином в случае Б и В. Условия те же, что на Рис. 28, концентрация Luc-SA 1 нМ.

Далее в идентичных условиях были получены калибровочные кривые зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации определяемой ДНК при двух концентрациях Luc-SA 1 и 3 нМ при различных способах обработки планшета: 1) обработка раствором BSA-казеин, 2) раствором плюроника, 3) раствором плюроника и раствором BSA-казеин после иммобилизации олигонуклеотидных зондов.

Сравнение кривых 1-3 на Рис. 30, показывает, что для полистирольной поверхности, обработанной раствором BSA-казеин, в указанном диапазоне концентраций наблюдается высокий фоновый сигнал, и билюминесцентный сигнал практически не зависит от концентрации определяемой ДНК (кривая 3). Для поверхности, обработанной плюроником и раствором BSA-казеин, фоновый сигнал снижается в 4,5 раза, а для поверхности обработанной плюроником в 10 раз. При этом значительно возрастает чувствительность анализа. Форма кривых для концентрации Luc-SA 1 и 3 нМ была практически идентична.

Таким образом, при использовании плюроника нет необходимости в дополнительной обработке раствором BSA-казеином, что значительно сокращает время подготовки планшета. Для дальнейших экспериментов использовали только обработку плюроником.

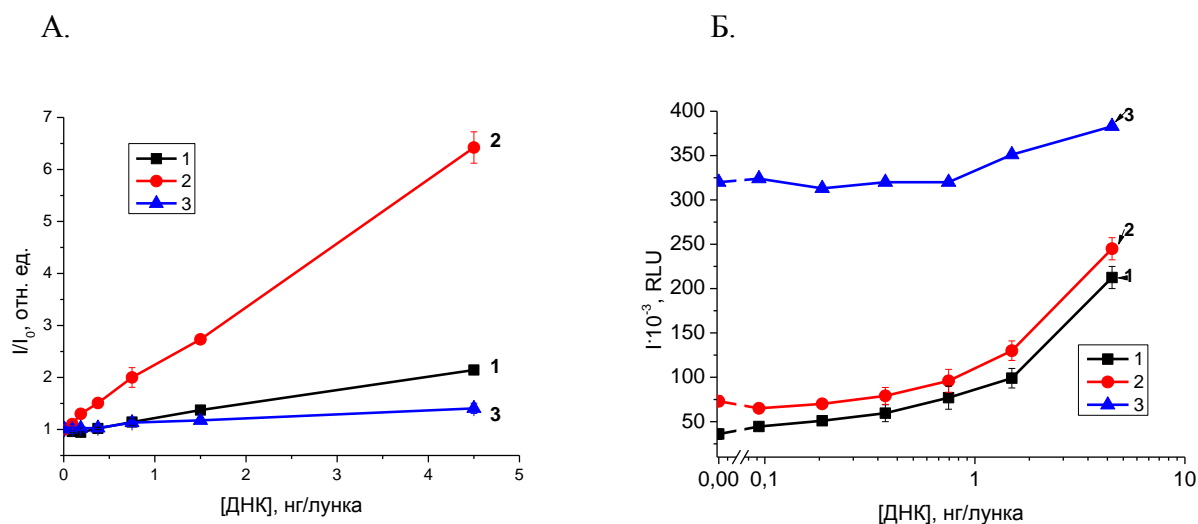


Рис. 30. Зависимости отношения специфического к фоновому биoluminesцентного сигнала (в отсутствие определяемой ДНК) (А.) или интенсивности биoluminesценции (Б.) от количества ДНК. Использовали полистирольный планшет, обработанный растворами плюроника и BSA-казеин (кривая 1), плюроником (кривая 2) раствором BSA-казеин (кривая 3) при концентрации Luc-SA 3 нМ.

Далее мы оптимизировали концентрацию Luc-SA для достижения наилучшей чувствительности анализа. Для этого получили зависимости биoluminesцентного сигнала (Рис. 31) в зависимости от концентрации определяемой ДНК при различных концентрациях Luc-SA (0,1; 0,3; 1 или 3нМ). Согласно полученным данным (Рис. 31), калибровочные кривые имеют практически идентичную чувствительность при концентрациях ДНК ниже 1,5 нг/лунка. При более высоких концентрациях максимальной чувствительностью обладает кривая, полученная при концентрации Luc-SA 3 нМ, для которой наблюдается линейная зависимость сигнала от содержания определяемой ДНК в интервале от 0 до 4,5 нг/лунка. Важно отметить, что предел обнаружения ДНК при использовании планшета, обработанного плюроником, снизился в 10 раз по сравнению с результатами, полученными с использованием планшета, обработанного раствором BSA-казеин, и составил ~0,4 нг/лунку. Таким образом, использование плюроника позволило увеличить чувствительность и специфичность анализа за счет минимизации неспецифических взаимодействий между гибридным белком и поверхностью планшета.

В результате проведенной оптимизации методики были разработаны следующие условия детекции ДНК, меченой биотином, с использованием гибридного белка Luc-SA: зонд иммобилизовали на поверхности планшета, обработанного раствором, содержащим 10 мг/мл плюроника; объем раствора зонда составлял 30 мкл с концентрацией 0,3 мкМ; объем раствора Luc-SA - 100 мкл с концентрацией 3 нМ в буфере PBST-BSA, время инкубации с Luc-SA 60 мин при 37 °С и перемешивании (180 об/мин).

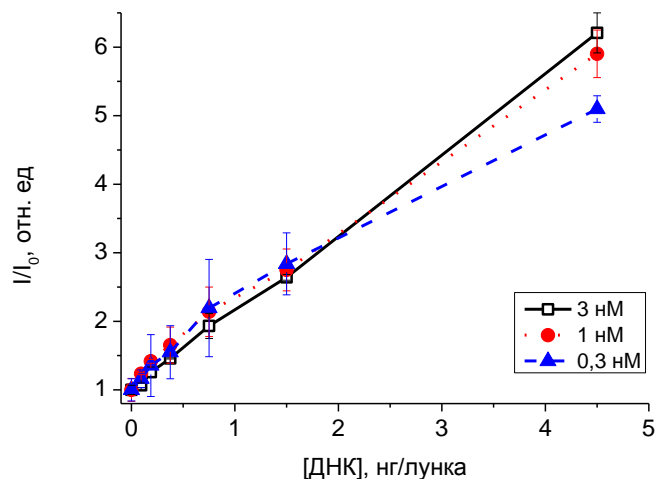


Рис. 31. Зависимости отношения специфического к неспецифическому сигналу I_0 (I_0 – сигнал, полученный в отсутствие ДНК) от содержания ДНК при различных концентрациях Luc-SA. Использовали полистирольный планшет, обработанный плуронином. Концентрации Luc-SA составили 3; 1; 0,3 нМ соответственно.

В оптимизированных условиях мы сравнили калибровочные кривые, полученные в одинаковых условиях с использованием люциферазной и пероксидазной меток. Для этого использовали конъюгат пероксидазы со стрептавидином.

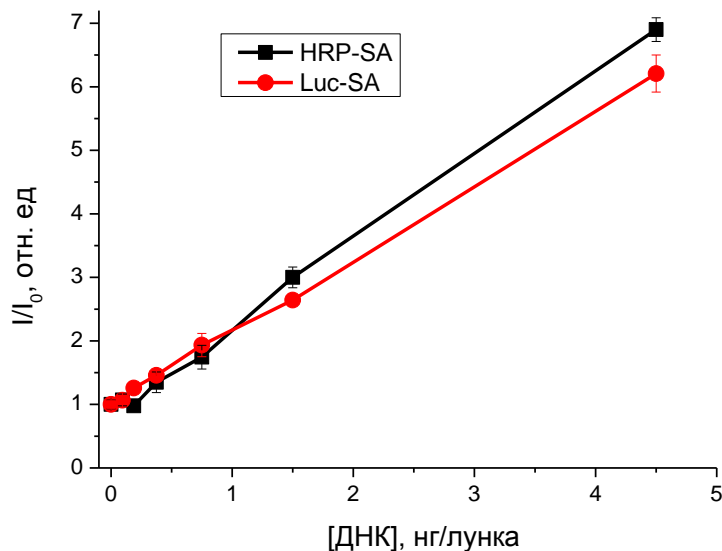


Рис. 32. Зависимости отношения специфического сигнала к фоновому сигналу от количества определяемой ДНК с использованием конъюгата пероксидазы со стрептавидином (кривая HRP-SA) и люциферазы (кривая Luc-SA).

Как показано на Рис. 32, методы определения ДНК с использованием колориметрического и биолюминесцентного методов детекции имеют практически одинаковую чувствительность. Предел обнаружения с использованием обоих меток составляет 0,4 нг/лунка.

Тем не менее, использование гибридного белка Luc-SA предпочтительно по сравнению с химическими конъюгатами HRP-SA.

Таким образом, была разработана методика определения ДНК клеток *E. coli* биолюминесцентным методом, была показана возможность успешного использования гибридного белка люцифераза-стрептавидин для анализа ДНК. Показано, что обработка полистирольной поверхности плуроником способствует снижению неспецифической сорбции гибридного белка Luc-SA и увеличению чувствительности анализа.

4.4. Иммуноанализ прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с использованием люциферазы светляков *Luciola mingrelica*

В данной главе рассмотрены результаты, показывающие возможность использования люциферазы светляков *L. mingrelica* в гомогенном иммуноанализе на основе BRET для определения низкомолекулярных антигенов. В качестве модельного антигена был использован прогестерон.

Система включала термостабильную люциферазу, химически конъюгированную с прогестероном (донор), и антитела, ковалентно связанные с красителем (акцептор).

В отсутствие антител наблюдался спектр биолюминесценции люциферазы. При добавлении окрашенных антител, происходило образование специфического комплекса конъюгата люцифераза-прогестерон с окрашенными антителами, в котором реализовался BRET, сопровождающийся уменьшением интенсивности биолюминесценции люциферазы и появлением спектра флуоресценции красителя. В связи с этим BRET-сигнал рассчитывали как отношение интенсивности свечения в максимуме спектра флуоресценции акцептора к интенсивности в максимуме биолюминесценции донора. При добавлении свободного прогестерона, конкурирующего с конъюгатами люциферазы за центры связывания антител, BRET-сигнал уменьшался пропорционально увеличению концентрации прогестерона.

4.4.1. Конструирование системы для эффективного BRET

Как было описано в литературном обзоре, для высокой эффективности резонансного переноса энергии в первую очередь необходим высокий квантовый выход донора. Этому требованию всецело отвечает люцифераза светляков *L. mingrelica*, которая, как и другие люциферазы светляков, обладает наиболее высоким квантовым выходом среди биолюминесцентных систем, а также немаловажное значение имеет доступность люциферазы *L. mingrelica* в препаративных количествах, ее высокая каталитическая активность и термостабильность [172, 180]. Поэтому в качестве донора биолюминесценции были использованы два термостабильных мутанта люциферазы *L. mingrelica*: «красная» форма

(RLuc) с максимумом биолюминесценции при 590 нм и «зеленая» форма (GLuc) с максимумом биолюминесценции при 550 нм (Рис. 33). Люцифераза RLuc была получена и охарактеризована в нашей лаборатории по методу, описанному в [180]. Для получения люциферазы GLuc в структуру RLuc были введены две дополнительные мутации Y35N и S398M, что привело к смещению максимума биолюминесценции в зеленую область. Ранее были получены мутантные формы люциферазы дикого типа с единичной мутацией Y35N [172] и с мутацией S398M [171], для которых наблюдался спектр биолюминесценции с $\lambda_{\text{max}} = 550$ нм. Мы ввели эти мутации в RLuc и получили термостабильный мутант люциферазы с λ_{max} в желто-зеленой области спектра.

При выборе акцептора мы руководствовались следующими критериями: высокий коэффициент экстинкции, высокий квантовый выход, максимальный интеграл перекрытия спектра поглощения красителя и эмиссии люциферазы, а также растворимость в воде и возможность биоконъюгации. Среди большого количества красителей мы рассмотрели те, которые обладают высоким значением интеграла перекрытия со спектрами биолюминесценции люциферазы (Рис. 33). В основном это производные родамина, такие как Texas-Red и ROX, либо их более новые аналоги (Alexa Fluor, DyLight, HiLyte Fluor), обладающие улучшенной стабильностью, меньшей рН-чувствительностью и более высоким квантовым выходом флуоресценции. Их спектральные характеристики представлены в Таблице 15.

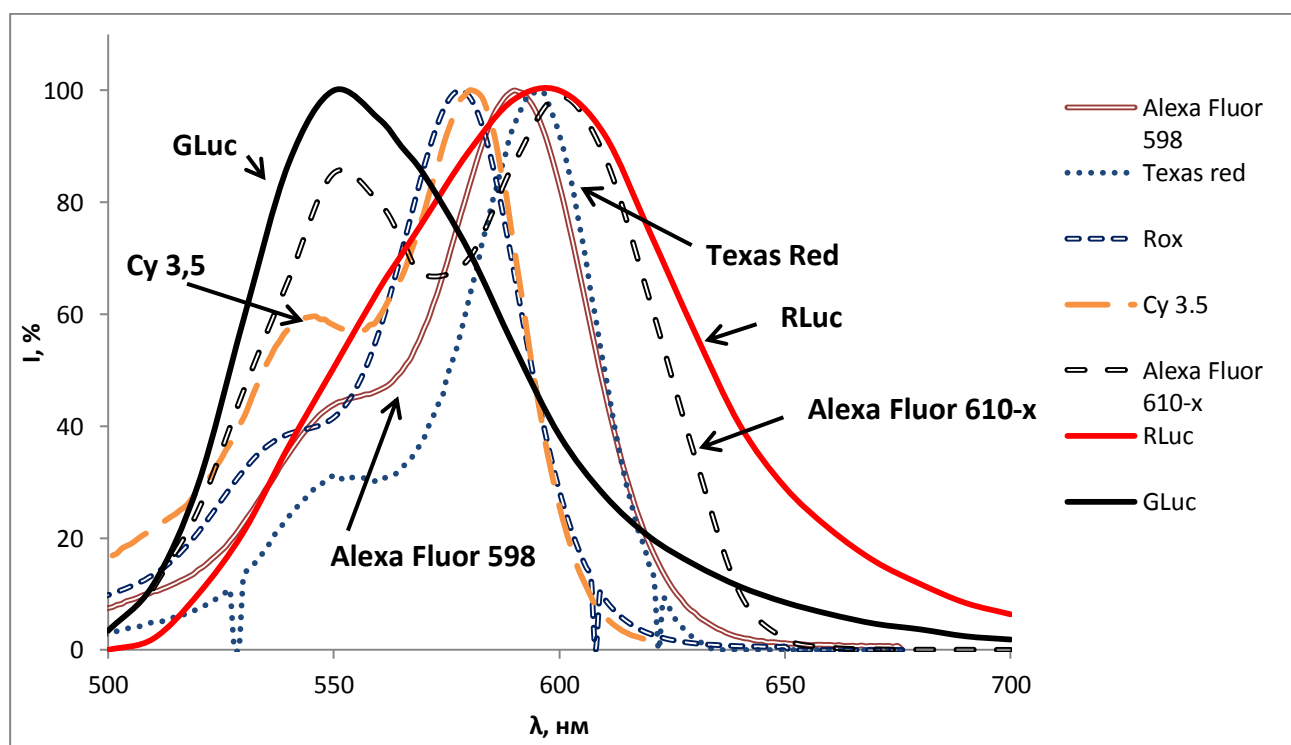


Рис. 33. Спектры биолюминесценции «красной» (GLuc) и «зеленой» (RLuc) форм люциферазы и спектры поглощения красителей

Среди представленных красителей в особенности стоит отметить краситель Alexa Fluor 610-х, который имеет два максимума поглощения при 550 и 612 нм, близкими к максимумам биолюминесценции для GLuc и RLuc соответственно, что обеспечивает оптимальный интеграл перекрывания спектров биолюминесценции и поглощения красителя для обеих форм люциферазы.

Таблица 15. Характеристики акцепторов для BRET- переноса

	Краситель	λ_{max} поглощения	λ_{max} флуоресценции и	ϵ	Квантовый выход	Растворимость
1	Texas red	592	610	85 000	0.9	Вода, ДМСО, ацетонитрил
2	HiLyte™ Fluor 594	593	616	80 000	0.9	ДМФА, ДМСО
3	DyLight 594	593	618	80 000	0.5	ДМФА
4	Alexa Fluor 594	590	617	92 000	0.66	Вода, ДМСО
5	Cy3.5	580	594	116 000	0.15	ДМФА, ДМСО
6	ROX-6	575	602	107 000	1	ДМСО, ДМФА, метанол, хлороформ
7	Bodipy 581/591	580	590	136 000	-	ДМСО, ДМФА
8	Alexa Fluor 610-х	612	628	144 000	0.66	Вода, ДМСО

Согласно данным, приведенным в Таблице 15 можно сделать вывод, что красители 1-4 при практически идентичных спектральных характеристиках обладают более низким коэффициентом экстинкции, по сравнению с красителями 5-8. Все перечисленные красители растворимы в органических растворителях, и только красители Alexa Fluor, содержащие в своей структуре сульфогруппу, растворимы в воде, что в нашем случае является преимуществом, поскольку для антител реакцию конъюгации предпочтительнее проводить в водной среде.

Таким образом, в качестве акцептора был выбран краситель Alexa Fluor 610-х (Рис. 34) обладающий оптимальным интегралом перекрывания спектров биолюминесценции обеих форм люциферазы и поглощения красителя, необходимый для эффективного BRET, высоким коэффициентом экстинкции и более высоким квантовым выходом флуоресценции по сравнению с цианиновыми красителями, использованными в работе [161].

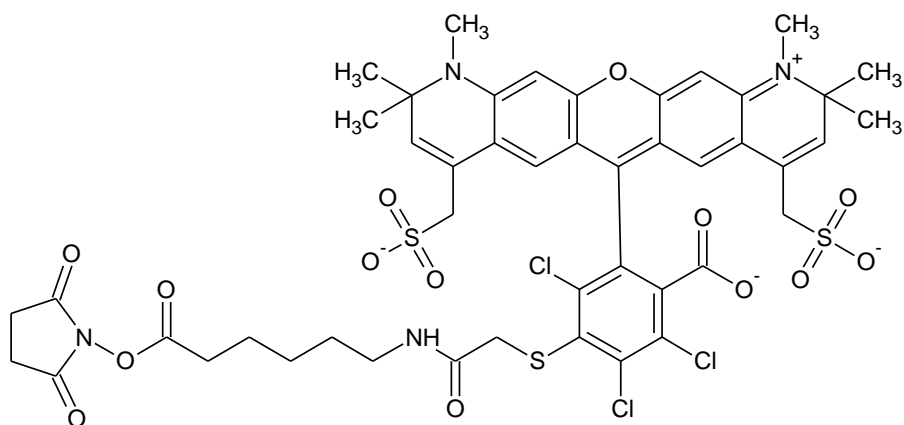


Рис. 34. Структурная формула красителя Alexa Fluor 610-х

Спектры поглощения и флуоресценции красителя, а также спектры биолюминесценции GLuc и RLuc показаны на Рис. 35

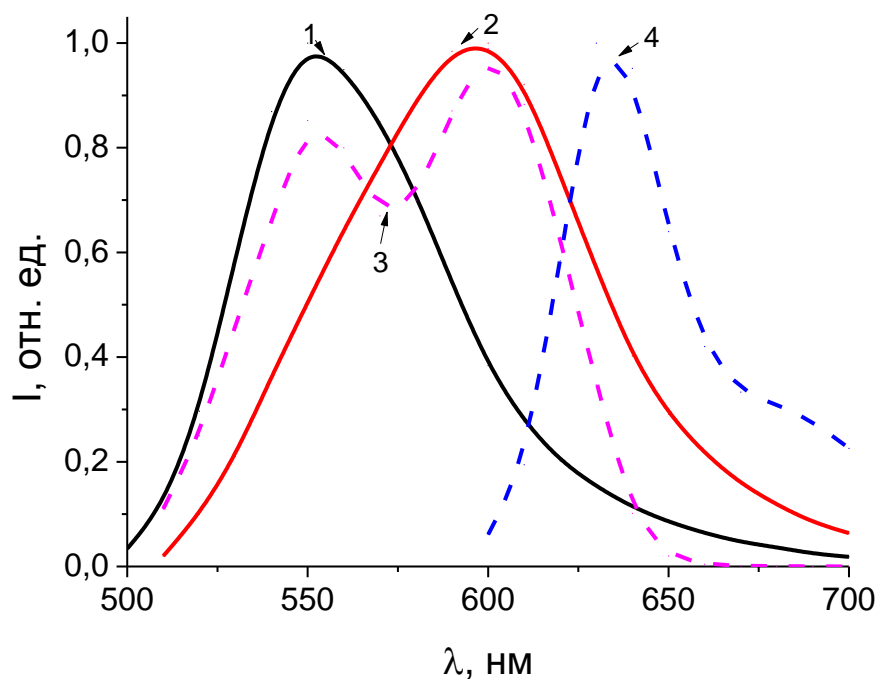


Рис. 35. Нормированные спектры: 1- спектр биолюминесценции люциферазы GLuc, 2- спектр биолюминесценции люциферазы RLuc, 3- спектр поглощения красителя Alexa fluor 610-х, 4- спектр флуоресценции красителя Alexa fluor 610-х при $\lambda_{\text{возб}}$ 610 нм

Поскольку величина BRET-сигнала определяется как отношение интенсивности свечения в максимуме спектра флуоресценции акцептора к интенсивности в максимуме биолюминесценции донора, для RLuc величину BRET-сигнала находили как I_{630}/I_{590} , а для GLuc как I_{630}/I_{550} . Для правильного определения величины BRET- сигнала немаловажное значение имеет величина остаточной биолюминесценции донора в максимуме флуоресценции акцептора, которая в данном случае выступает как фоновый сигнал. Для мутанта RLuc характерно высокое

значение биолюминесцентного сигнала в максимуме флуоресценции акцептора (57% от максимального сигнала), а для мутанта GLuc биолюминесцентный сигнал при 630 нм составляет всего 15% от максимальной интенсивности биолюминесценции люциферазы. Следовательно, для мутанта GLuc фоновая интенсивность биолюминесценции при 630 нм, почти в 4 раза меньше (Таблица 16).

Таблица 16. Спектральные характеристики мутантов люциферазы *L. mingrelica*.и красителя

Люцифераза	λ_{\max} , нм	$I_{630}/I_{\lambda_{\max}}$	$S_{\text{перекр}}/S_{\text{биолюм люц}}$, %
RLuc	590	0.57	78.5%
GLuc	550	0.15	83.7%

Где λ_{\max} - длина волны, при которой наблюдается максимум биолюминесценции люциферазы, $I_{630}/I_{\lambda_{\max}}$ - отношение интенсивности биолюминесценции при длине волны испускания красителя Alexa fluor 610-х (630 нм) к максимальной интенсивности, $S_{\text{перекр}}/S_{\text{биолюм}}$ - отношение интеграла перекрытия спектра биолюминесценции люциферазы со спектром поглощения красителя к интегралу спектра биолюминесценции.

4.4.2. Получение и свойства конъюгатов люцифераза-прогестерон

Получение конъюгатов люцифераза-прогестерон (Luc-Pg) проводили путем взаимодействия аминокрупп люциферазы и карбоксильной группы производного 3-О-карбоксиметилокси прогестерона (3-СНО-Pg), активированного дициклогексилкарбодиимидом и гидроксисукцинимидом. Схема синтеза представлена на Рис. 36

На первой стадии проводили активацию 3-О-карбоксиметилокси прогестерона в диметилформамиде (ДМФА) путем добавления дициклогексилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимидом с последующей инкубации реакционной смеси в течение 4 ч при комнатной температуре и умеренном перемешивании, затем в течение ночи при +4°C. [200].

На второй стадии получали конъюгаты Luc-Pg. Для этого к 100 мкл Luc (1 мг/мл) в буферном растворе добавляли 10 мкл активированного прогестерона в ДМФА (различные концентрации), инкубировали, отделяли конъюгат Luc-Pg от низкомолекулярных компонентов на микро-биоспин-колонке с носителем G-25.

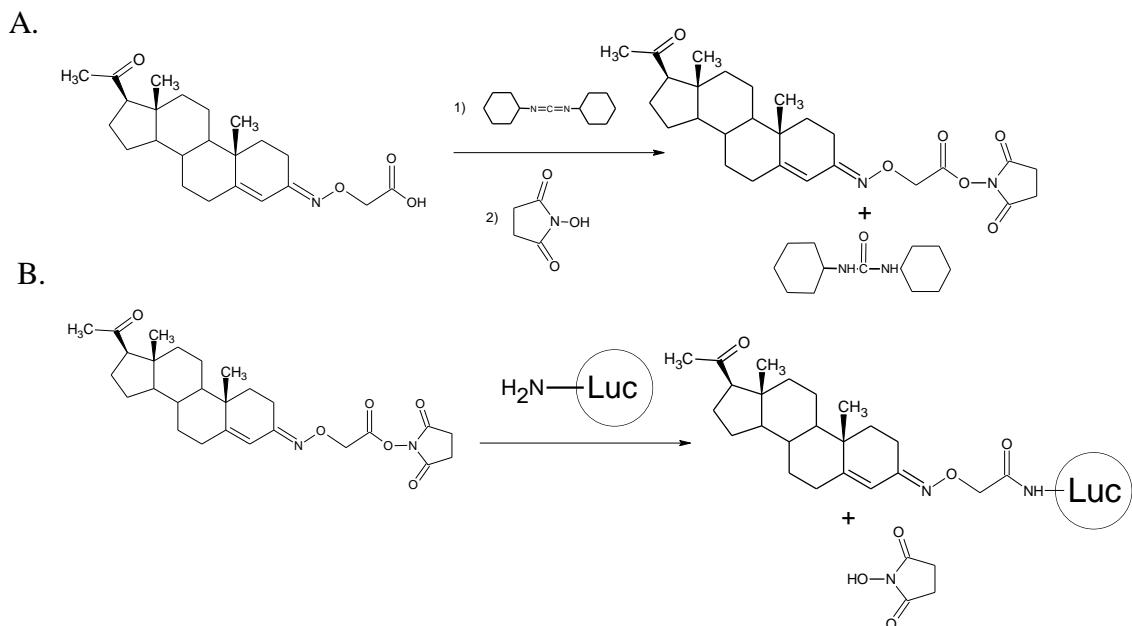


Рис. 36. Схема синтеза конъюгатов Luc-Pg

3-О-карбоксиметил оксим прогестерона плохо растворим в воде, поэтому реакцию конъюгации проводили в водно-органической среде (ДМФА/буферный раствор PBS). Предварительный эксперимент показал, что при содержании ДМФА 10% по объему и менее биолюминесцентная активность люциферазы практически не изменяется, в то время как в присутствии 30% ДМФА активность фермента уменьшается более чем в два раза (Рис. 37)

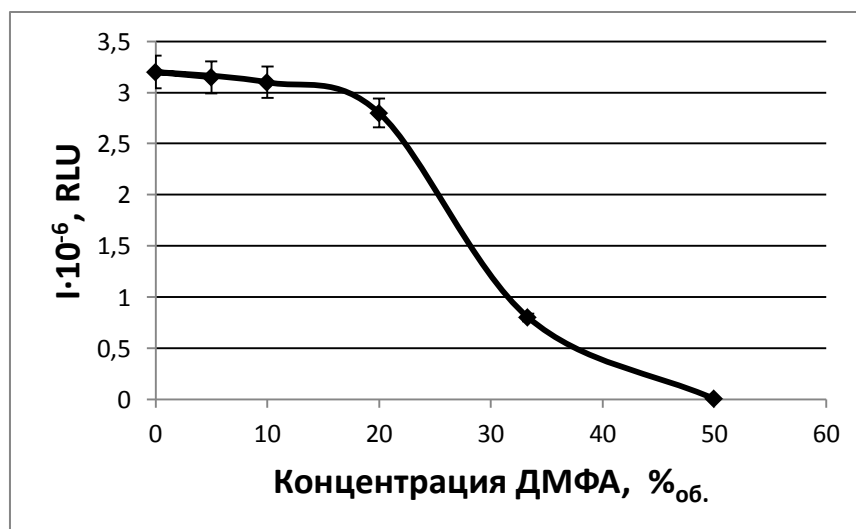


Рис. 37. Активность люциферазы после инкубации в буферном растворе PBS, pH 7,8 при +4°C в течение 2 ч в присутствии различных концентраций ДМФА. Концентрация фермента 1 мг/мл.

Таким образом, для конъюгации был использован буферный раствор люциферазы с концентрацией 1 мг/мл, содержащий 10 %-й ДМФА, для которого было показано, что за 120 минут инкубации (время проведения реакции) при +4 °С, инактивации люциферазы, вызванной присутствием ДМФА, не происходит.

На поверхности молекулы люциферазы находится около 12 доступных аминогрупп. При использовании различного соотношения Luc:Pg в реакционной смеси могут образовываться конъюгаты, содержащие различное количество молекул Pg, связанных с одной молекулой люциферазы и обладающие различной биолуминесцентной активностью. Для определения условий получения конъюгатов оптимального состава конъюгацию проводили при различных молярных соотношениях люцифераза: прогестерон (Luc:Pg = 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60).

Согласно литературным данным, для конъюгации прогестерона с пероксидазой хрена использовали 0,01 М боратный буфер (pH 8,6) [200], однако конъюгация люциферазы в боратном буфере приводила к значительной потере биолуминесцентной активности фермента. При соотношениях Luc:Pg в реакционной смеси 1:10, 1:20, 1:40 сохранялось $30 \pm 5\%$, $20 \pm 5\%$ и $10 \pm 5\%$ от активности исходной люциферазы соответственно. Замена боратного буфера на 0,01 М PBS (pH =7,8) привела к сохранению более высокой биолуминесцентной активности люциферазы в составе конъюгатов Luc-Pg. Для этих же соотношений биолуминесцентная активность конъюгатов составила $40 \pm 5\%$, $35 \pm 5\%$, $25 \pm 3\%$ соответственно (Рис. 38).

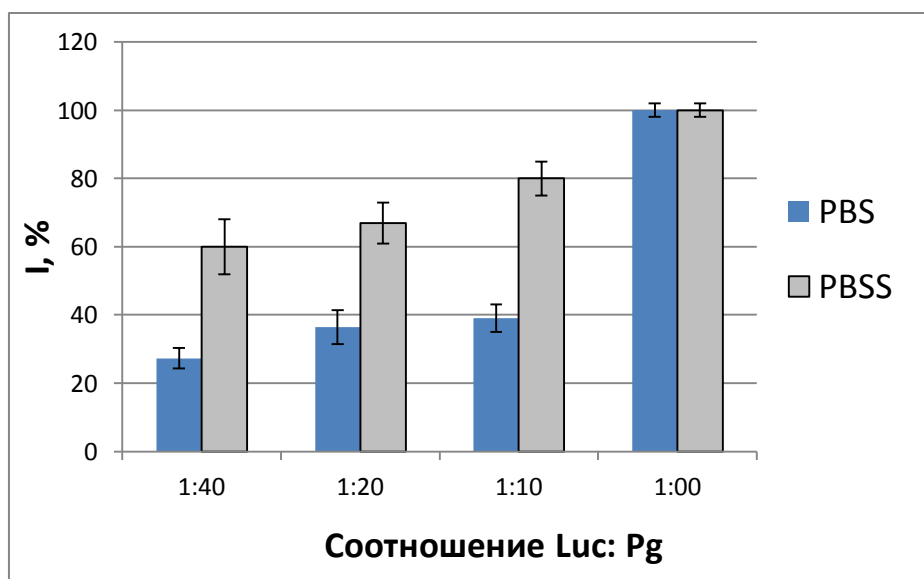


Рис. 38. Зависимость активности конъюгатов GLuc-Pg от молярного соотношения Luc:Pg в реакционной смеси в отсутствие и в присутствии субстратов. Условия конъюгации: буферный раствор PBS или PBSS (PBS+10 мМ MgSO₄+ 2 мМ ATP), pH 7,8, 1 мг/мл GLuc, 0°C, 2 ч инкубации.

Согласно литературным данным, добавки субстратов в процессе конъюгации предохраняют активный центр фермента от химической модификации [75]. В нашем случае, добавление субстрата ATP и MgSO₄ в насыщающих концентрациях (2 мМ ATP 10 мМ MgSO₄ в реакционной смеси), позволило почти в 2 раза увеличить биолуминесцентную активность конъюгатов по сравнению с конъюгатами, полученными без добавления ATP и MgSO₄ (Рис. 38). Для дальнейших исследований конъюгаты получали в присутствии субстратов в

реакционной смеси. Таким образом, были разработаны следующие оптимальные условия получения конъюгатов Luc-Pg: буферный раствор PBSS, pH 7,8, 1 мг/мл люциферазы, 0°C, 2 ч инкубации

Для RLuc и GLuc были получены конъюгаты при различном избытке прогестерона и измерены биолюминесцентная активность и способность прогестерона в составе конъюгатов связываться с антителами. Как показано на Рис. 39, биолюминесцентная активность конъюгатов убывает с возрастанием избытка Pg в реакционной смеси, как для мутанта GLuc, так и для мутанта RLuc. При соотношении Luc:Pg = 1:10 и 1:5 конъюгаты сохраняли 80% биолюминесцентной активности, при соотношении 1:20 - около 70%, при соотношении 1:40 и 1:60 - 60% и 55% соответственно.

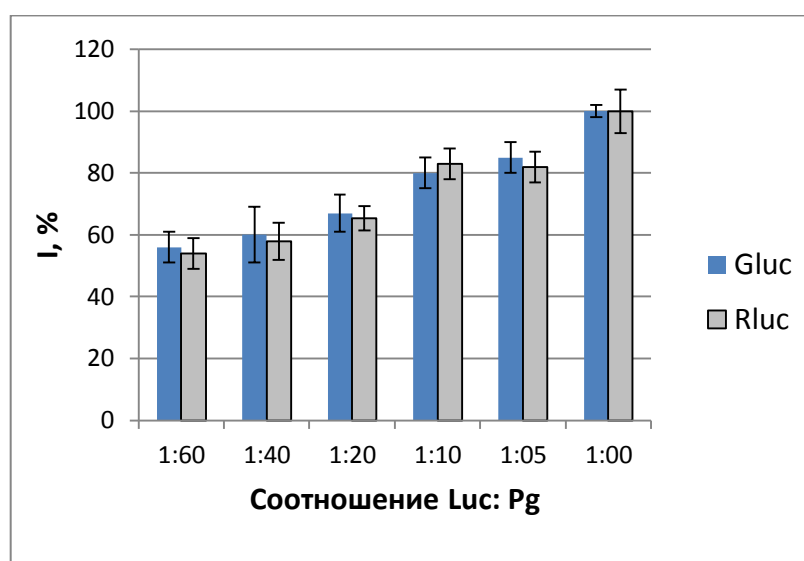


Рис. 39. Зависимость биолюминесцентной активности конъюгатов GLuc-Pg и RLuc-Pg от молярного соотношения Luc:Pg в реакционной смеси. Условия конъюгации: буферный раствор PBSS (PBS+10 mM MgSO₄+ 2 mM ATP), pH 7,8, 1 мг/мл люциферазы, 0 °C, 2 ч инкубации

Полученные конъюгаты были проанализированы на способность прогестерона в их составе образовывать специфический комплекс с антителами методом гетерогенного ИФА. Анализ включал в себя следующие стадии: 1) адсорбция конъюгатов на поверхности полистирольного планшета, 2) инкубация адсорбированного конъюгата с антителами к прогестерону, 3) инкубация с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена, 4) колориметрическая детекция полученного специфического комплекса. Результаты, представленные на Рис. 40, показывают, что способность конъюгатов Luc-Pg связываться с антителами возрастает с увеличением отношения Luc:Pg от 1:5 до 1:20. Конъюгаты GLuc-Pg и RLuc-Pg с одинаковым отношением Luc:Pg обладают идентичной способностью связывать антитела.

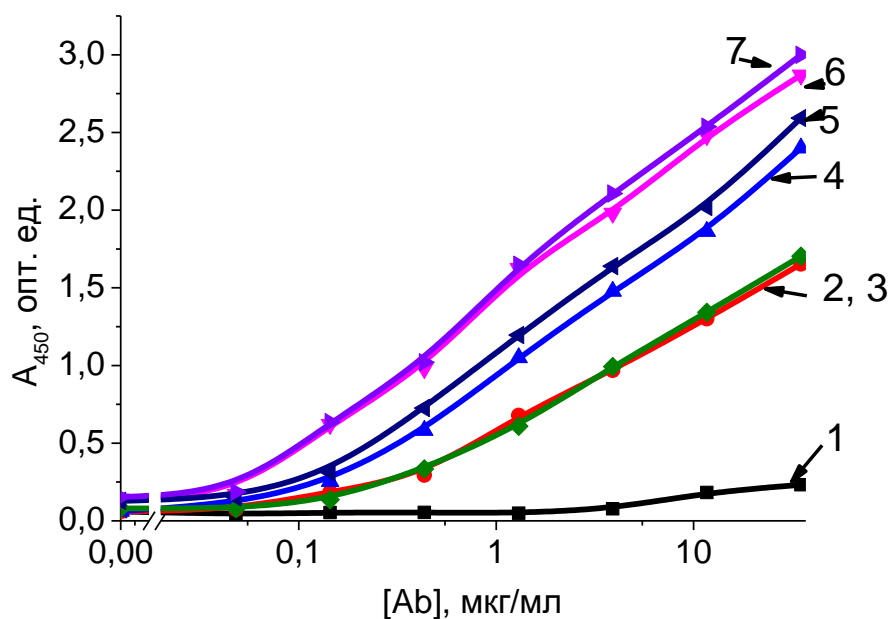


Рис. 40. Зависимость оптической плотности от концентрации первичных антител к прогестерону для конъюгатов с различным соотношением Luc:Pg в реакционной смеси. Обозначения: 1 - исходная люцифераза GLuc; 3, 5, 7 - конъюгаты на основе GLuc с молярным соотношением Luc:Pg 1:5, 1:10, 1:20 соответственно; 2, 4, 6 - конъюгаты на основе RLuc с молярным соотношением Luc:Pg 1:5, 1:10, 1:20 соответственно.

При отношении Luc:Pg 1:40 и 1:60 наблюдаются кривые идентичные кривым 7, 6 (Рис. 40) что свидетельствует о том, что уже при отношении 1:20 все доступные для реакции конъюгации аминокруппы люциферазы связаны с прогестероном.

Для определения количества молекул Pg, связанных с молекулой Luc, были измерены спектры поглощения прогестерона, люциферазы и конъюгатов в интервале длин волн 240-300 нм. При анализе спектров поглощения конъюгатов использовали разложение спектра конъюгата на нормированные спектры поглощения прогестерона и люциферазы, умноженные на соответствующие коэффициенты (см. главу методы). Пример разложения спектра поглощения конъюгата Luc-Pg, полученного при соотношении Luc:Pg 1:20, представлен на Рис. 41.

Анализ спектров поглощения конъюгатов подтвердил, что GLuc-Pg, полученные при соотношении Luc:Pg = 1:20, 1:40 и 1:60, имеют одинаковый состав и содержат по 3 молекулы прогестерона на одной молекуле люциферазы. Таким образом, конъюгат, полученный при соотношении Luc:Pg = 1:20, содержал максимальное количество прогестерона, приходящееся на одну молекулу люциферазы (3:1), обладал максимальной способностью связывать антитела и высокой биолюминесцентной активностью (около 70% от активности исходной люциферазы) и был использован в дальнейшей работе.

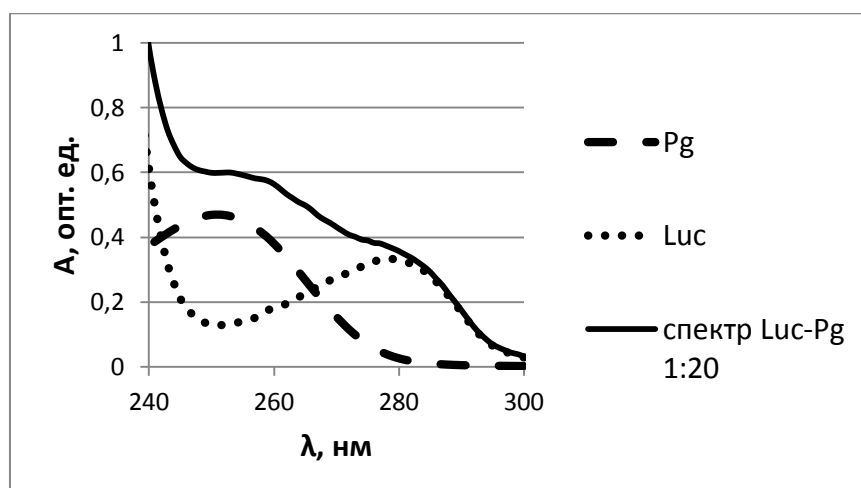


Рис. 41. Разложение спектра поглощения конъюгата Luc-Pg, полученного при соотношении Luc:Pg 1:20. Обозначения: Pg - нормированный спектр прогестерона, умноженный на рассчитанный коэффициент x , Luc - нормированный спектр люциферазы, умноженный на рассчитанный коэффициент y , спектр Luc-Pg 1:20 – реальный спектр конъюгата.

Далее для выбранного конъюгата GLuc-Pg была исследована стабильность люциферазы в его составе и влияние температуры на биолюминесцентный сигнал во время инкубации и его измерения.

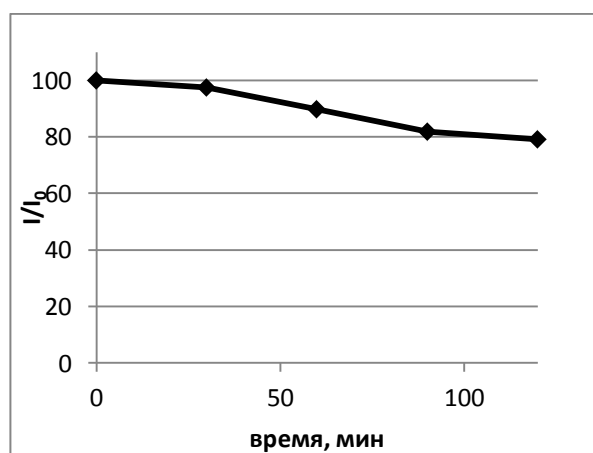


Рис. 42. Зависимость интенсивности биолюминесценции GLuc-Pg в % от длительности инкубации при 37°C. Условия: 2 нМ GLuc-Pg, буферный раствор PBST-BSA.

Как показано на Рис. 42, после инкубации при 37 °C в течение двух часов Luc-Pg сохраняет около 80% активности, а за 30 минут инкубации уменьшение активности не превышает 5%, при этом изменение активности не влияет на форму спектра.

Как известно из литературных данных [180], люцифераза светляков (Rluc) обладает максимальной активностью при 37 °C, поэтому мы изучили влияние температуры на биолюминесцентную активность конъюгата GLuc-Pg. Для этого мы измерили интенсивность биолюминесценции при двух длинах волн, используемых для расчета BRET-сигнала (Рис. 13)

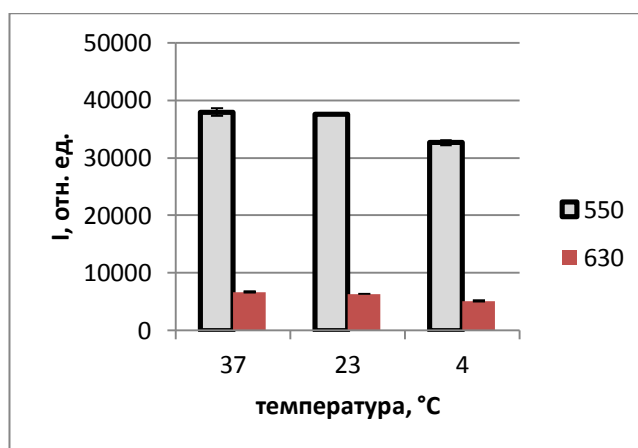


Рис. 43. Зависимость биолуминесцентного сигнала GLuc-Pg от температуры при 550 нм и 630 нм. Условия: 2 нМ GLuc-Pg, буферный раствор PBST-BSA, время инкубации 10 мин.

Из Рис. 43 следует, что при 37 °C для конъюгата GLuc-Pg, так же как и для люциферазы RLuc наблюдается наиболее высокая биолуминесцентная активность. При 23 °C интенсивность биолуминесценции сохраняется на 95-99% в зависимости от длины волны измерения биолуминесценции, а при переходе к 4 °C снижается на 15-25%.

Таким образом, был разработан эффективный метод получения конъюгатов люциферазы с прогестероном, которые обладали высокой биолуминесцентной активностью, стабильностью и способностью связывать антитела к прогестерону.

4.4.3. Получение и свойства конъюгатов антитело-краситель

В работе использовали поликлональные антитела кролика к прогестерону. Конъюгаты антител с красителем получали по реакции взаимодействия аминогрупп антител с сукцинимидным производным красителя Alexa Fluor 610-х (Fl).

Конъюгаты получали при различных молярных соотношениях антитело: краситель от 1:5 до 1:30. После удаления непрореагировавшего красителя измеряли оптическую плотность при характеристической для красителя длине волны A_{610} . На основании этих измерений мы рассчитали количество молекул красителя, связанных с 1 молекулой антитела ($[Fl]/[Ab]$), используя коэффициент экстинкции красителя равный $138000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Таблица 17).

Таблица 17. Зависимость количества молекул красителя (Fl), конъюгированных с одной молекулой антител (Ab), от состава реакционной смеси.

	Молярное соотношение Fl: Ab в реакционной смеси				
	5	10	20	25	30
A_{610}	$1,19 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,02$	$4,77 \pm 0,03$	$5,77 \pm 0,05$	$6,00 \pm 0,05$
[Fl], мМ	$43,0 \pm 1,0$	$86,0 \pm 0,9$	173 ± 1	209 ± 2	217 ± 2
[Ab], мМ	17,4	17,4	17,4	17,4	17,4
[Fl] / [Ab]	$2,5 \pm 0,05$	$4,9 \pm 0,1$	$9,9 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$	$12,5 \pm 0,1$

В зависимости от состава реакционной смеси конъюгаты антител с красителем (Fl-Ab) содержали от 2 до 12 молекул красителя на одну молекулу антитела.

Полученные конъюгаты были проверены на способность связывать прогестерон с использованием метода гетерогенного ИФА. На поверхность планшета иммобилизовали конъюгат RLuc-Pg, добавляли антитела с различной степенью окрашивания и детектировали полученный специфический комплекс с использованием антивидовых антител, меченых пероксидазой.

Как показано на Рис. 44, с увеличением количества красителя, приходящегося на одну молекулу антитела, связывание антиген-антитело ухудшается.

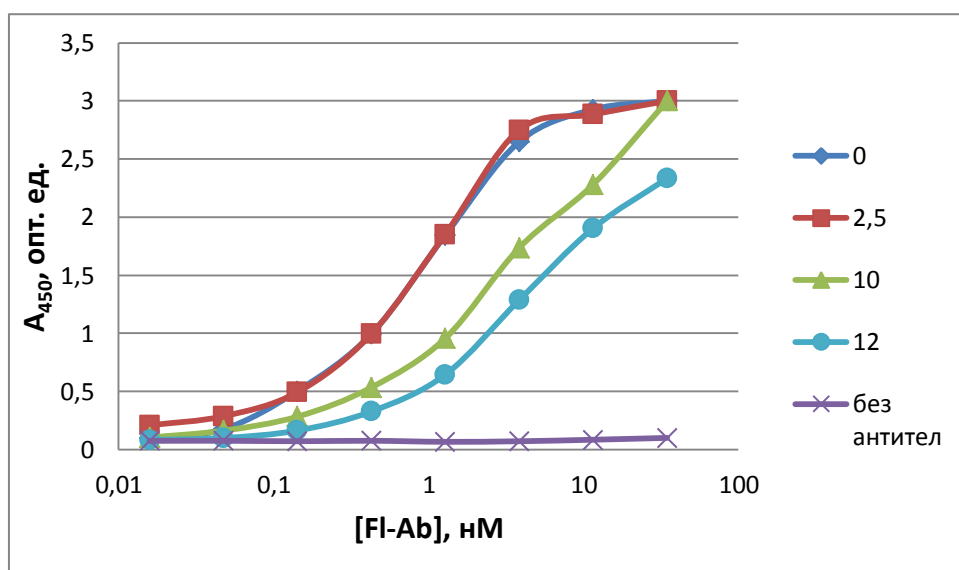


Рис. 44. Способность окрашенных антител связывать прогестерон в зависимости от состава конъюгата ($[Fl]$ / $[Ab]$). Кривая «без антител» показывает величину неспецифической сорбции конъюгата пероксидазы с вторичными антителами на поверхности полистирола.

Из представленного графика следует, что лишь при соотношении ~ 2 молекулы красителя на одну молекулу антитела, антитела проявляют ту же способность связывать прогестерон, что и не окрашенные антитела. Для конъюгатов Fl-Ab, содержащих 10 молекул красителя на одну молекулу антитела, связывающая способность уменьшается почти в два раза. С другой стороны, использование антител с низкой степенью окрашивания может привести к низкому BRET- сигналу.

Далее полученные конъюгаты краситель-антитело (Fl-Ab) были проверены на способность выступать в качестве акцептора в BRET-системе. Для этого смесь, содержащую RLuc-Pg и Fl-Ab, инкубировали в течение 15 минут в темноте, затем добавляли субстратную смесь ATP-LH₂, регистрировали спектр в области 520-700 нм и рассчитывали BRET- сигнал как отношение I_{630}/I_{590} . В качестве контроля использовали исходную RLuc люциферазу в той же

концентрации. В Таблице 18 приведено отношение I_{630}/I_{590} (BRET-сигнал) в зависимости от количества молекул красителя связанного с одной молекулой антитела.

Таблица 18. Зависимость I_{630}/I_{590} для системы RLuc-Pg (или RLuc)---Fl-Ab в зависимости от состава конъюгата Fl-Ab

	Среднее содержание красителя на одну молекулу антитела					
	0	2,5	5	10	12	12,5
RLuc-Pg	0,5176	0,6969	0,8265	1,3224	1,3477	1,3470
RLuc	0,5184	0,6256	0,6761	0,9645	0,9873	0,9731

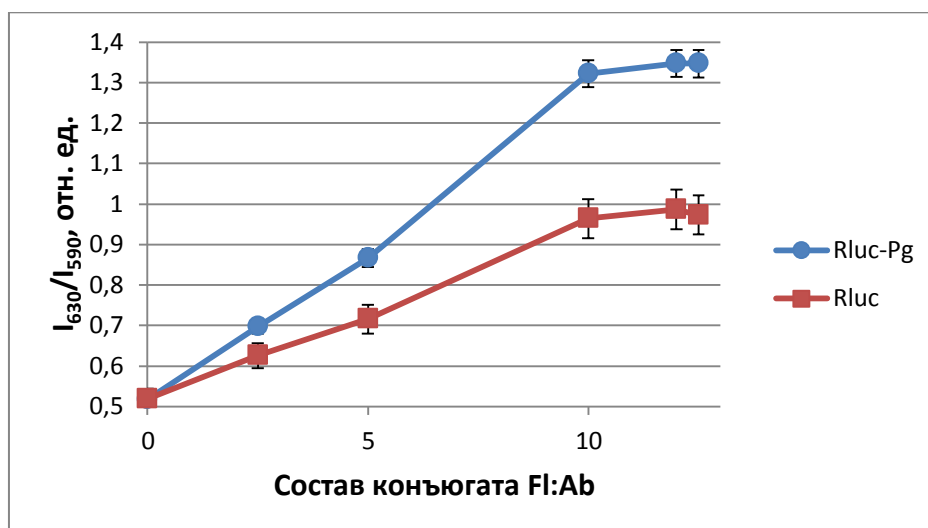


Рис. 45. Зависимость соотношения интенсивностей при 630 и 590 нм от количества красителя, связанного с одной молекулой антител для RLuc-Pg и RLuc. Условия инкубации: 30 нМ RLuc-Pg или RLuc, 300 нМ Ab или Fl-Ab, инкубация 15 мин при 37°C

Из полученных зависимостей (Рис. 45) следует, что при отношении Fl:Ab более 10 BRET-сигнал выходит на плато, что можно объяснить максимальным сближением молекул красителя и электронно-возбужденного продукта люциферазной реакции - оксильюциферина. Следовательно, конъюгат Fl-Ab состава 10:1, полученный при соотношении Fl:Ab=1:20 в реакционной смеси, является оптимальным для регистрации BRET.

Как показано на Рис. 45, наблюдается высокая неспецифической сорбция антител, меченных красителем, на поверхности люциферазы без прогестерона (кривая для RLuc). Для снижения неспецифической сорбции Fl-Ab мы изучили влияние состава буфера на комплексообразование пары донор-акцептор.

Оптимизация состава буфера реакционной смеси для снижения неспецифического сигнала и стабилизации сигнала биолюминесценции. Из литературы [201] известно, что присутствие поверхностно-активных веществ (ПАВ) снижает неспецифическую сорбцию гидрофобных молекул, а также может оказывать влияние на интенсивность биолюминесцентного сигнала [202]. Мы проанализировали влияние различных неионных ПАВ,

таких как Тритон х-100, поливинилпирролидон (PVP), Твин-20 и плюроник в различных концентрациях, на величину неспецифического сигнала, и интенсивность биолюминесценции. В этой серии экспериментов мы использовали конъюгат прогестерона с «зеленой» формой люциферазы (GLuc-Pg) и исходную люциферазу GLuc. Неспецифический сигнал ($I_{\text{неспец}}$) рассчитывали как отношение

$$\frac{I_{630}/I_{550}(GLuc, Fl - Ab) - I_{630}/I_{550}(GLuc, Ab)}{I_{630}/I_{550}(GLuc - Pg, Fl - Ab) - I_{630}/I_{550}(GLuc - Pg, Ab)}$$

В скобках указаны компоненты реакционной смеси.

Влияние ПАВ на интенсивность биолюминесценции изучали с использованием растворов, содержащих GLuc, Ab и соответствующие добавки ПАВ. Как показано на Рис. 46, наименьшее значение неспецифического (фонового) сигнала наблюдалось в присутствии 2% Тритона х-100, 0,05% PVP или Твина-20. Однако при использовании PVP наблюдалось существенное уменьшение биолюминесцентного сигнала, присутствие же 2% тритона х-100 или 0,05% Твина-20 способствовало высокому биолюминесцентному сигналу с минимальным значением фона. В дальнейших экспериментах при комплексообразовании использовали буфер PBST, содержащий 0,05% Твин-20.

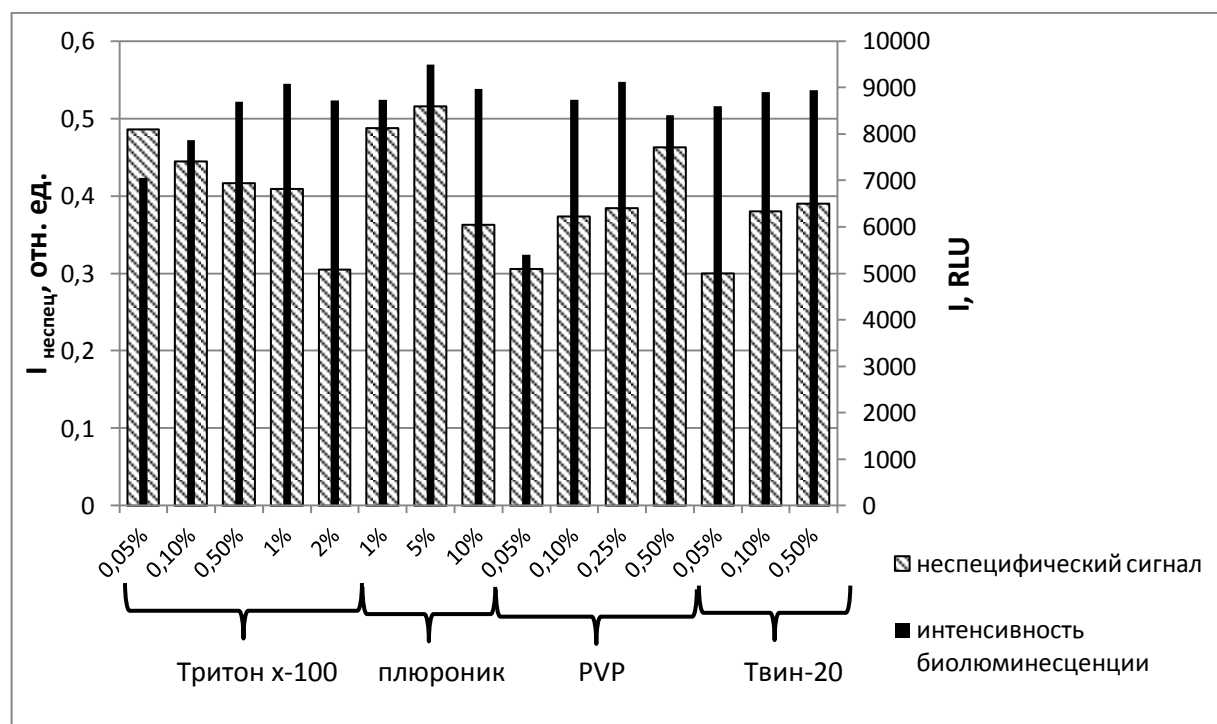


Рис. 46. Зависимость неспецифического сигнала и интенсивности биолюминесценции GLuc-Pg от концентрации и структуры ПАВ. Условия: 1,3 нМ GLuc-Pg или GLuc, 130 нМ Fl-Ab, буферный раствор PBS с содержанием 1% BSA с соответствующими добавками ПАВ, инкубация в течение 45 мин при 37°C.

Было проанализировано также влияние BSA на неспецифическое взаимодействие люциферазы с антителами к прогестерону с использованием гетерогенного ИФА. На поверхность полистирольного планшета иммобилизовали Luc, добавляли антитела к прогестерону, полученный неспецифический комплекс Luc-Ab детектировали с использованием антивидовых антител, меченых пероксидазой.

Как показано на Рис. 47А, добавление 0,1 % BSA не оказывает влияния на неспецифические взаимодействия при концентрациях антител выше 0,05 мкМ, а при меньших концентрациях снижает неспецифическую сорбцию в 1,5-2 раза. В присутствии BSA в концентрации 0,5% и более неспецифическая сорбция снижается в 1,5-2 раза в широком диапазоне изменения концентрации антител (до 1 мкМ). Большее снижение неспецифической сорбции наблюдается при одновременном присутствии Твина-20 и BSA (Рис. 47В). Так при содержании BSA 0,5% и более в присутствии 0,05% Твина-20 неспецифическая сорбция снижается в 2,5 раза по сравнению с PBS. Большее снижение неспецифической сорбции наблюдается при одновременном присутствии 0,05% Твин-20 и BSA (Рис. 47В). Так при содержании BSA более 0,5% в присутствии 0,05% Твин-20 неспецифическая сорбция снижается в 2,5 раза по сравнению с PBS.

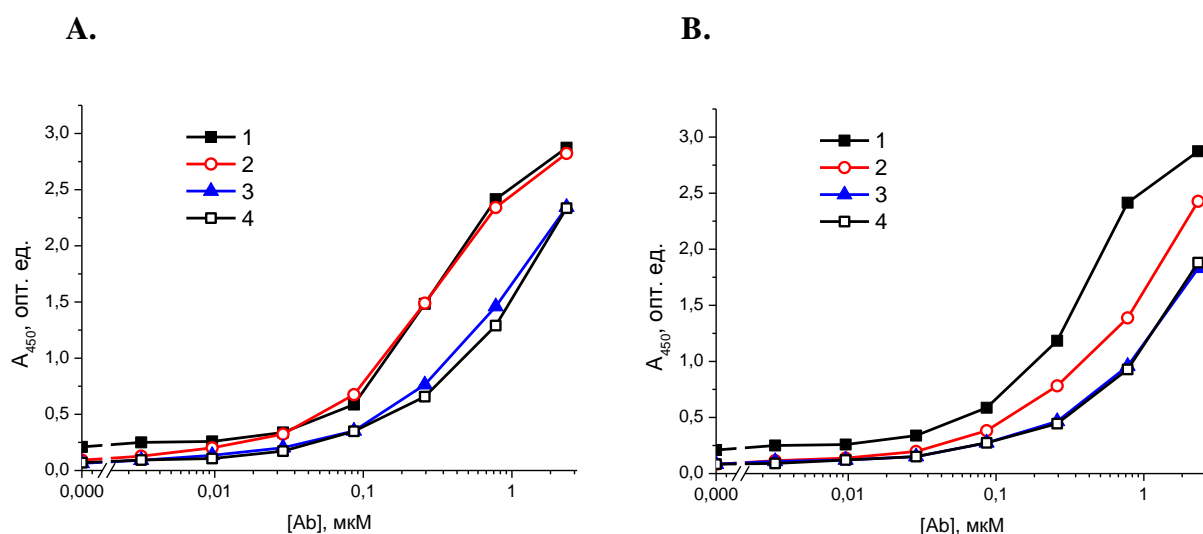


Рис. 47. Зависимость величины неспецифического сигнала, полученного в результате взаимодействия люциферазы с иммобилизованными антителами к прогестерону от их концентрации в реакционной смеси при различных концентрациях BSA в отсутствие (А) и в присутствии 0,05% Твин-20 (В). Содержание BSA, %: 1-0; 2- 0,1; 3- 0,5; 4- 1. Концентрация люциферазы 1 мкг/мл.

Согласно литературным данным [203], добавление BSA предотвращает инактивацию люциферазы в растворе обусловленную ее неспецифической сорбцией на поверхности реакционного сосуда, которая вносит существенный вклад в уменьшение биолуминесцентного сигнала при работе с наномолярными концентрациями фермента. Добавки BSA стабилизируют

люциферазу в растворе, сохраняя биолюминесцентный сигнал постоянным во времени (Рис. 48). Мы изучили зависимость активности люциферазы от состава буферного раствора. Для этого раствор Luc в концентрации 1 нМ инкубировали в различных буферных растворах при 37°C, затем добавляли субстратную смесь АТФ- LН₂ и регистрировали активность фермента.

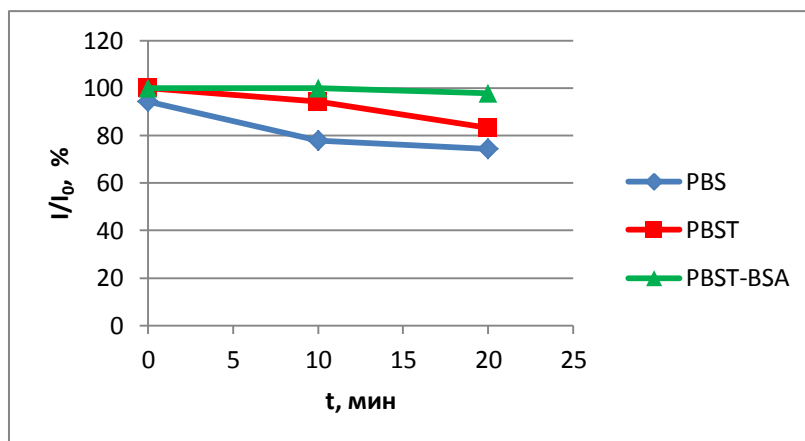


Рис. 48. Зависимость активности люциферазы от продолжительности ее инкубации в буферных растворах PBS, PBST, PBST-BSA. Условия: 1нМ люциферазы, 37°C. I₀-биолюминесцентный сигнал Luc в буфере PBST-BSA в начальный момент времени.

Как показано на Рис. 48, в буфере PBST-BSA после 20 минут инкубации сохраняется более 97% исходной активности люциферазы, в PBST - 83%, а в PBS всего 75%. В последующих экспериментах для инкубации конъюгатов Luc-Pg с Fl-Ab использовали буфер PBST-BSA, содержащий 0,05 % Твин-20 и 1% BSA.

Таким образом, разработаны методы синтеза конъюгатов люцифераза-прогестерон и конъюгатов антител с красителем Alexa-Fluor 610-х. Показана высокая биолюминесцентная активность Luc-Pg и способность к взаимодействию с конъюгатами Fl-Ab, содержащими от 2 до 12 молекул красителя на 1 молекуле антитела, обладающими способностью специфически связывать прогестерон. На примере конъюгатов RLuc-Pg и Fl-Ab продемонстрирован резонансный перенос энергии. Однако для «красной» формы люциферазы наблюдался большой вклад фоновой интенсивности при 630 нМ, что затрудняло его применение в BRET- анализе, поэтому дальнейшие исследования мы проводили с использованием «зеленой» формы люциферазы (GLuc) с максимумом биолюминесценции при 550 нм.

4.4.4. Оптимизация условий регистрации BRET-сигнала и анализа прогестерона

Зависимость величины BRET-сигнала от концентрации донора и акцептора. Для определения оптимальных условий регистрации BRET-сигнала, были получены зависимости величины BRET-сигнала от концентрации пары донор/акцептор. В качестве донора использовали конъюгат GLuc-Pg, полученный при соотношении 1:20 в реакционной смеси. В

качестве контроля была использована исходная люцифераза GLuc. В качестве донора использовали конъюгат Fl-Ab состава 10:1.

Согласно литературным данным [156], неспецифические взаимодействия донора с акцептором описываются линейной зависимостью BRET от концентрации акцептора, а специфические взаимодействия - зависимостью с насыщением. Таким образом, при измерениях BRET фоновый сигнал необходимо вычитать из общего регистрируемого сигнала BRET. На Рис. 49 показаны зависимости BRET-сигнала для GLuc-Pg и GLuc от концентраций Fl-Ab. На кривой для GLuc увеличение BRET-сигнала при росте концентраций акцептора является следствием неспецифических взаимодействий (фонового сигнала), а для кривой GLuc-Pg увеличение BRET-сигнала - результат суммы специфических взаимодействий антитело-прогестерон в составе конъюгата и неспецифической сорбции окрашенных антител на поверхности люциферазы.

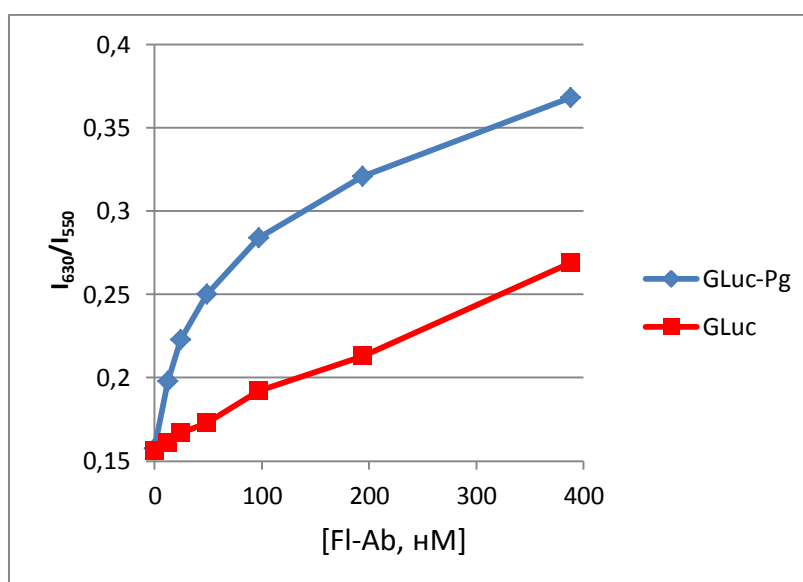


Рис. 49. Зависимость BRET-сигнала от концентрации антител, меченных красителем, для конъюгата GLuc-Pg и исходной люциферазы GLuc. Условия: 2 нМ Luc или Luc-Pg, 37 °С, время инкубации – 30 мин.

На Рис. 50 представлены зависимости BRET-сигнала от концентрации пары донор/акцептор с вычетом фонового сигнала, из которых следует, что с уменьшением концентрации GLuc-Pg максимальная величина BRET-сигнала наблюдается при меньших концентрациях Fl-Ab. Так при увеличении концентрации конъюгата GLuc-Pg от 2 нМ до 200 нМ при постоянной концентрации Fl-Ab (100 нМ) BRET-сигнал уменьшается в 9 раз.

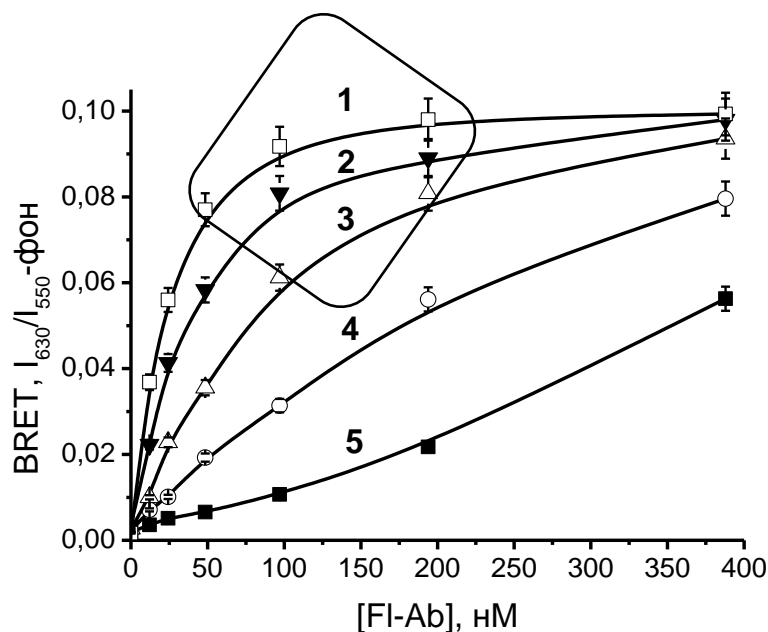


Рис. 50. Зависимость BRET-сигнала от концентрации FI-Ab при различных концентрациях Luc-Pg, нМ: 2 (1), 7 (2), 20 (3), 70 (4), 200 (5), 37°C, время инкубации – 30 мин. BRET рассчитан как I_{630}/I_{550} для Luc-Pg- I_{630}/I_{550} для Luc.

Из полученных данных Рис. 50 можно сделать вывод, что при низких концентрациях донора и акцептора, BRET-сигнал составляет 60 - 90% от максимального, следовательно, именно при этих концентрациях (выделенная область) наблюдается минимальный фон при максимальном значении специфического сигнала:

[GLuc- Pg], нМ	[FI- Ab], нМ
2	50, 100, 200
7	100, 200
20	100

Для концентраций донора и акцептора, указанных выше, были получены градуировочные зависимости изменения BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона. Для этого в лунки планшета вносили 10 мкл раствора GLuc-Pg, добавляли 40 мкл раствора, содержащего свободный прогестерон и 10 мкл раствора FI-Ab. Полученную смесь инкубировали, добавляли субстратную смесь ATP-LH₂, регистрировали интенсивность люминесценции при 550 и 630 нм и рассчитывали BRET-сигнал (I_{630}/I_{550}). В данном случае величина BRET-сигнала обратно пропорциональна концентрации свободного прогестерона, образующего специфический комплекс Pg---FI-Ab без переноса энергии. За 100 % сигнал принимали максимальное значение BRET-сигнала в отсутствие свободного прогестерона (Рис. 51, Рис. 52).

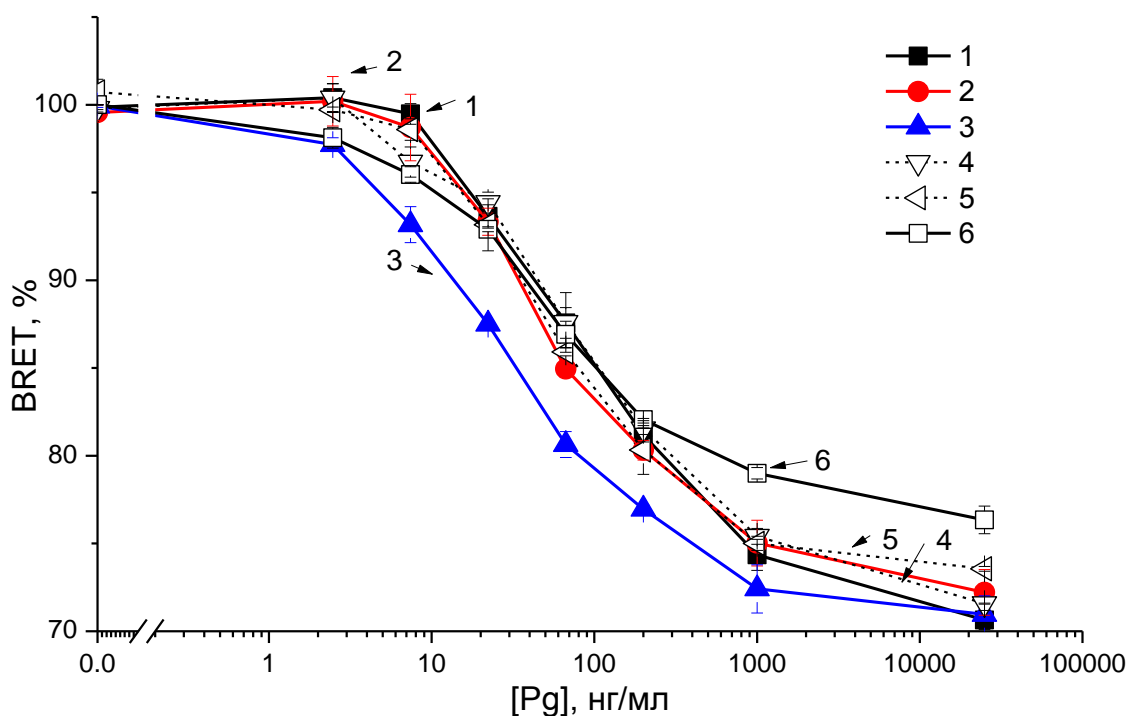


Рис. 51. Градуировочные зависимости для свободного прогестерона при различных концентрациях пары донор-акцептор, нМ: [GLuc-Pg] = 2 (кривые 1-3), 7 (кривые 4,5), 20 (кривая 6); [Fl-Ab]=50 (кривая 3), 100 (кривые 2,5,6), 200 (кривые 1,4). Условия: время инкубации 30 мин при 37°C.

Как показано на Рис. 51, при 100 нМ Fl-Ab и высокой концентрации донора (20 нМ) (кривая 6) сужается динамический диапазон изменения BRET-сигнала при анализе свободного прогестерона по сравнению с кривыми 1, 2, 4, 5, для которых концентрация донора составляют 2 и 7 нМ. Кроме того, с уменьшением концентрации донора, уменьшается концентрация акцептора, необходимая для обеспечения максимального динамического диапазона определения прогестерона, и, как следствие, снижается фоновый сигнал. Для дальнейших экспериментов использовали минимальную концентрацию Luc-Pg (2 нМ), при которой биолюминесцентный сигнал в 10 раз превышает сигнал фона прибора.

Для нахождения оптимальной концентрации Fl-Ab при концентрации GLuc-Pg 2 нМ были получены градуировочные кривые для определения прогестерона при концентрациях Fl-Ab от 12 до 200 нМ в реакционной смеси. Как показано на Рис. 52, при уменьшении концентрации Fl-Ab чувствительность определения прогестерона увеличивается, но динамический диапазон изменения BRET-сигнала уменьшается.

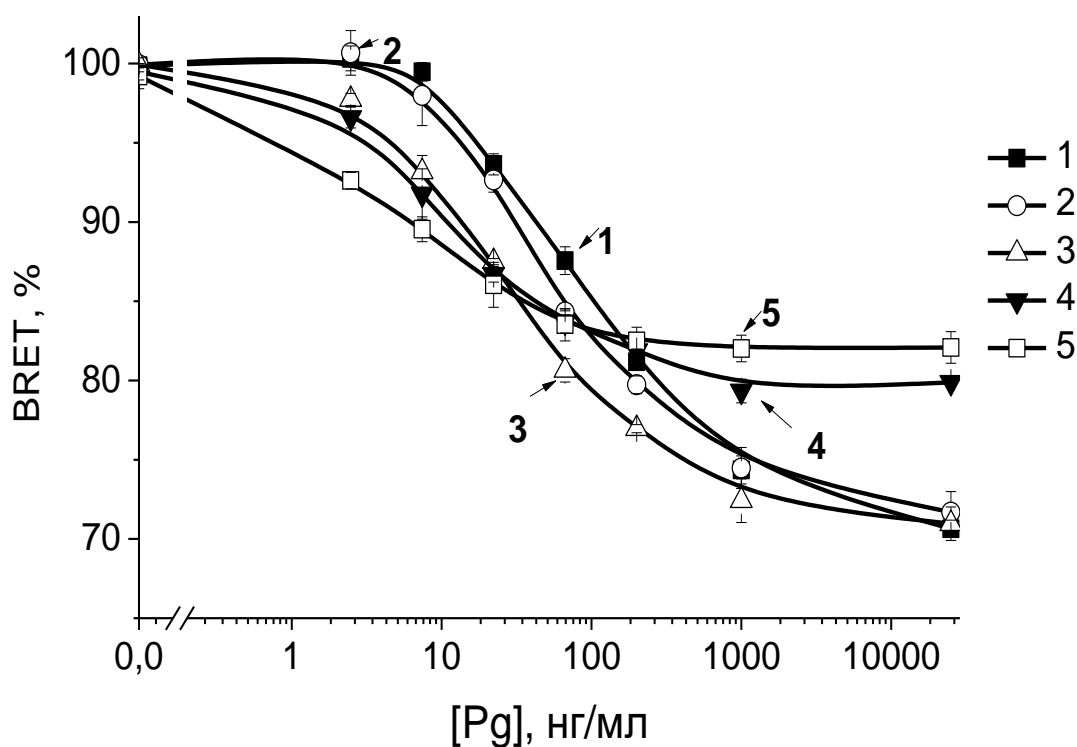


Рис. 52. Градуировочные кривые для определения свободного прогестерона при различных концентрациях F1-Ab, нМ: 1- 200, 2 - 100, 3 - 50, 4 - 25, 5 - 12, Условия: 2 нМ GLuc-Pg, инкубация 30 мин при 37 °С

Анализ данных на Рис. 51 и Рис. 52, показал, что оптимальные концентрации донора и акцептора для достижения высокой чувствительности и приемлемого динамического диапазона составили 2 нМ и 50 нМ соответственно. Полученные концентрации в 5 и 10 раз соответственно меньше, чем в работе японских ученых, где описан гомогенный конкурентный иммуноанализ тус пептида на основе BRET [161] (см. обзор литературы). В работе [161] концентрация донора (гибридный белок глутатион-S трансфераза-тус пептид-люцифераза светляков) составляла 10 нМ, а антител, меченых цианиновыми красителями - 500 нМ.

Влияние температуры и длительности инкубации на BRET-сигнал и чувствительность определения прогестерона. Далее было изучено влияние температуры на соотношение I_{630}/I_{550} для пары донор-акцептор (кривая GLuc-Pg) и на фоновый сигнал, обусловленный неспецифическим взаимодействием GLuc и F1-Ab (кривая GLuc). Согласно полученным данным (Рис. 53 А), при повышении температуры соотношение I_{630}/I_{550} увеличивается как для пары донор-акцептор, так и для GLuc. BRET- сигнал специфического взаимодействия (BRET*) вычисленный как разность кривых для GLuc-Pg и GLuc, приведен на Рис. 53 В. При 23°С наблюдается максимальный BRET* сигнал с минимальной неспецифической сорбцией.

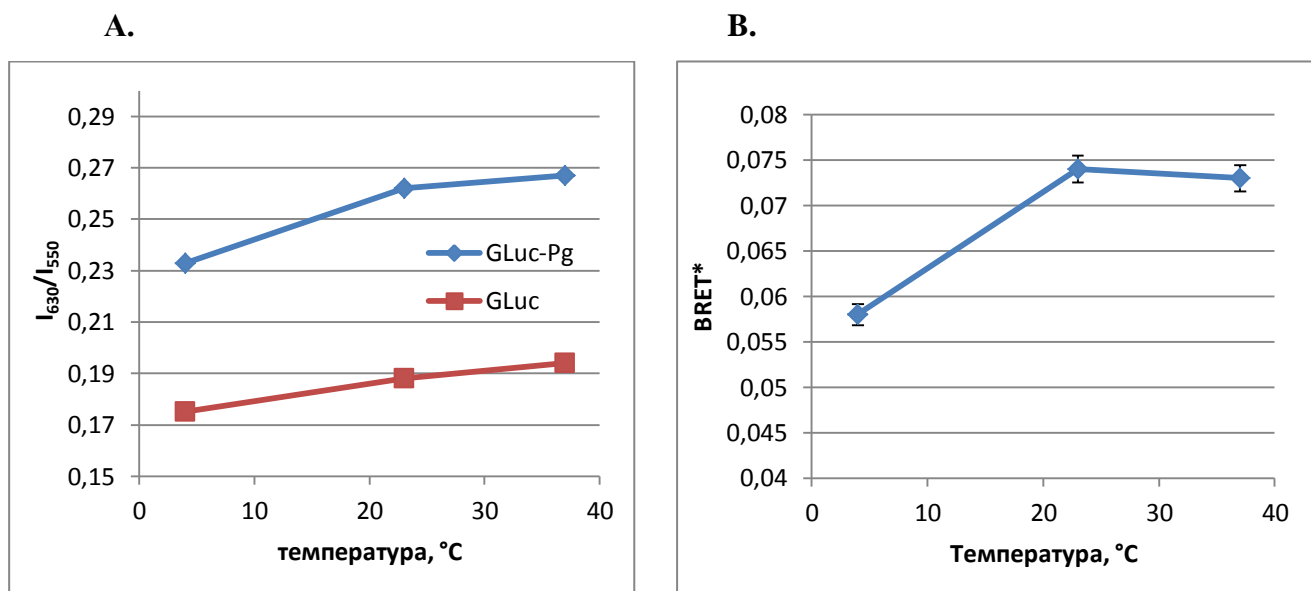


Рис. 53. А. Зависимость отношения интенсивности билюминесценции при 630 и 550 нм для GLuc-Pg и GLuc от температуры в присутствии антител Fl-Ab. В. зависимость BRET*-сигнала, рассчитанного как разность кривых для GLuc-Pg и GLuc, от температуры. Условия: 2 нМ GLuc-Pg или GLuc, 50 нМ Fl-Ab, буферный раствор PBST-BSA, инкубация 30 мин. Спектры снимали при температуре инкубации.

Зависимость BRET-сигнала от длительности инкубации пары донор - акцептор определяется скоростью образования комплекса донор - акцептор. В связи с этим мы изучили влияние температуры на скорость достижения равновесия в реакции комплексообразования донора и акцептора. Для этого были получены зависимости величины BRET-сигнала от длительности инкубации реакционной смеси, содержащей донор и акцептор.

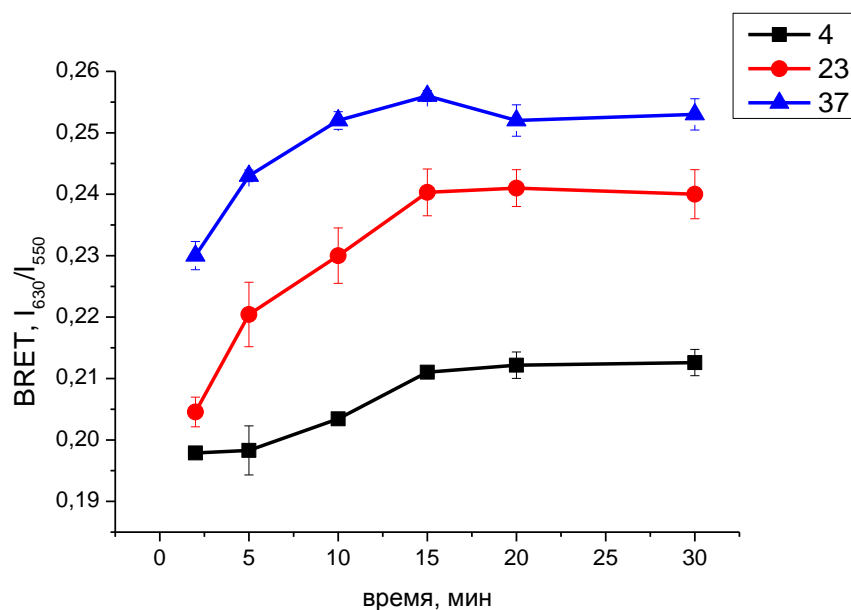


Рис. 54. Кинетика комплексообразования донор-акцептор при различных температурах: 4, 23, 37 °C. Условия: 2 нМ GLuc-Pg, 50 нМ Fl-Ab, буферный раствор PBST-BSA.

Согласно полученным данным (Рис. 54), время достижения равновесия реакции комплексообразования донор - акцептор составляет от 10 мин для 37 °С до 15 мин для 23 °С и 4 °С. При 4 °С наблюдается очень узкий динамический диапазон изменения BRET-сигнала, поэтому проводить анализ при указанной температуре нецелесообразно, хотя в работе [128], где была использована пара донор/акцептор люцифераза *Luciola lateralis*/краситель Cy3.5, комплексообразование проводили при 0°С.

Для выявления влияния температуры и времени инкубации на чувствительность анализа свободного прогестерона и на динамический диапазон изменения сигнала, были получены зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона в реакционной смеси при 23 и 37 °С при двух временах инкубации 10 минут, когда равновесие еще не установилось, и 20 минут (в равновесных условиях). За 100% принимали величину BRET-сигнала, полученную в отсутствие свободного прогестерона.

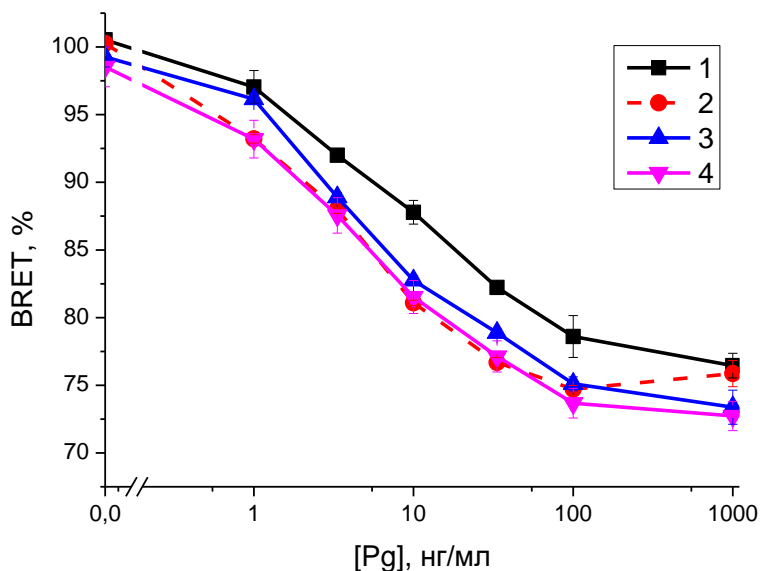


Рис. 55. Зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона в реакционной смеси при 23 (кривые 2, 4) и 37°С (кривые 1, 3) временах инкубации 10 (кривые 1, 2) и 20 минут (кривые 3, 4) Условия: 2 нМ Luc-Pg, 50 нМ Fl-Ab, буферный раствор PBST-BSA.

Из данных, приведенных на Рис. 55, следует, что кривые, полученные при 23 °С (кривые 2, 4) идентичны в диапазоне концентраций свободного Pg от 1 до 100 нг/мл, при этом наблюдается большая чувствительность анализа Pg по сравнению с данными, полученными при 37 °С. Кроме того, при 23 °С наблюдается меньшая неспецифическая сорбция (Рис. 53 В). Таким образом, дальнейшие исследования по оптимизации условий проведения гомогенного иммуноанализа прогестерона на основе BRET проводили при 23 °С (комнатная температура)

Влияние порядка добавления реагентов на чувствительность анализа прогестерона. В основе конкурентного гомогенного иммуноанализа лежит конкуренция двух процессов: образование комплекса Luc-Pg---Fl-Ab, в котором осуществляется перенос энергии и комплекса антител со свободным прогестероном Pg---Fl-Ab, в котором переноса энергии не наблюдается.

Согласно полученным кинетическим данным (Рис. 54), равновесие достигается при 20-и минутной инкубации реакционной смеси. Мы изучили влияние порядка смешения реагентов на чувствительность анализа до момента установления равновесия. Для трех серий экспериментов были получены зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона в реакционной смеси при различном порядке смешения реагентов:

- 1) Смешивали растворы GLuc-Pg, Fl-Ab, Pg и инкубировали при 20 минут (кривая 1)
- 2) Смешивали растворы Pg и Fl-Ab, инкубировали в течение 10 мин (кривая 2), 15 мин (кривая 3) или 19 минут (кривая 4), затем добавляли раствор GLuc-Pg и продолжали инкубацию до 20 минут.
- 3) Смешивали растворы GLuc-Pg, Fl-Ab, инкубировали 10 мин (кривая 5) или 15 мин (кривая 6), затем добавляли раствор Pg и продолжали инкубацию до 20 минут.

При добавлении окрашенных антител к смеси Luc-Pg и Pg с последующей инкубацией в течение 20 минут наблюдалось уменьшение BRET-сигнала в 1,3 раза при увеличении концентрации Pg от 1 до 1000 нг/мл (Рис. 56 кривая 1). В случае предварительной инкубации Pg с Fl-Ab с последующим добавлением Luc-Pg (Рис. 56 кривые 2,3,4) динамический диапазон уменьшался с увеличением длительности предварительной инкубации. Кроме того, наблюдалось снижение BRET-сигнала с уменьшением длительности инкубации с Luc-Pg при тех концентрациях прогестерона, которые меньше концентрации антител. В этом случае в первоначально образовавшемся комплексе без переноса энергии после добавления Luc-Pg происходило замещение свободного прогестерона на конъюгат, и концентрация образовавшегося комплекса с переносом энергии была пропорциональна длительности инкубации с Luc-Pg (1-10 минут). В присутствии высоких концентраций прогестерона соизмеримых с концентрацией антител в реакционной смеси (более 100 нг/мл) и недостатка конъюгата (концентрации конъюгата на два порядка меньшей, чем концентрация Fl-Ab) наблюдалось преимущественное образование комплекса без переноса энергии, которое не зависело от времени инкубации. Уменьшение времени инкубации с конъюгатом не оказывало существенного влияния на чувствительность (Рис. 56 кривые 1-4) (однако небольшое увеличение чувствительности все же наблюдалось).

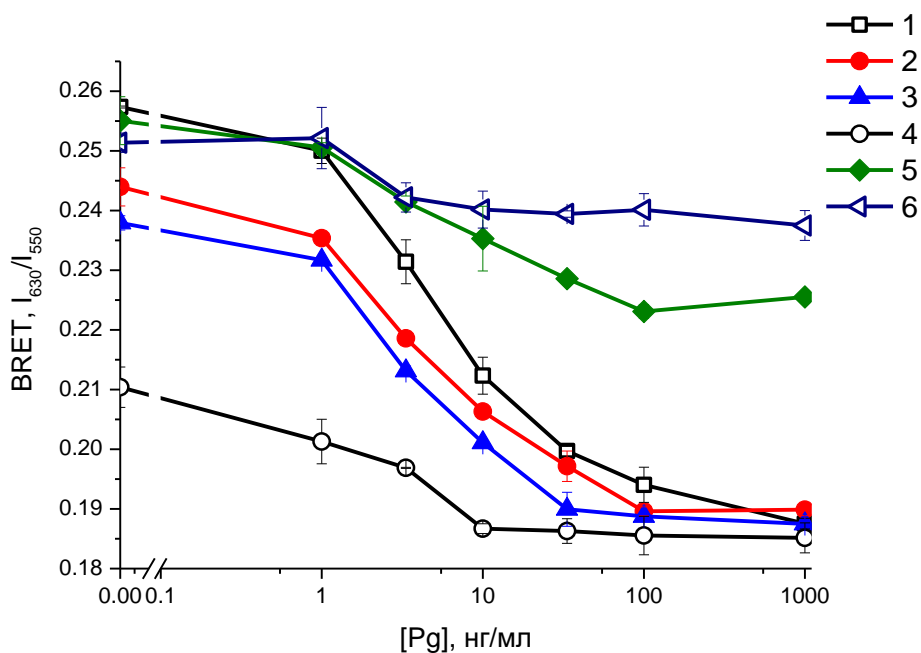


Рис. 56. Зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона в реакционной смеси в присутствии Fl-Ab при различном порядке смешения Luc-Pg и Pg: 1-серия 1; 2, 3, 4 –серия 2; 5, 6- серия 3. Условия: 2 нМ Luc-Pg, 50 нМ Fl-Ab, буферный раствор PBST-BSA, 23°C.

При предварительной инкубации Luc-Pg с Fl-Ab с последующим добавлением свободного прогестерона (серия 3), наблюдался высокий BRET сигнал, который слабо зависел (Рис. 56 кривая 5) или почти не зависел (Рис. 56 кривая 6) от концентрации свободного прогестерона при небольшой продолжительности инкубации с Pg. В данном случае наблюдалось вытеснение конъюгата из комплекса, в котором наблюдался BRET.

Наиболее широкий линейный диапазон изменения BRET-сигнала с высокой чувствительностью (Рис. 56, В кривая 1) наблюдается при инкубации в течение 20 минут реакционной смеси, содержащей все необходимые реагенты. В этом случае устанавливается равновесие двух конкурирующих процессов: взаимодействия с антителами свободного Pg и прогестерона в составе GLuc- Pg. В дальнейших экспериментах была использована именно эта схема инкубации: одновременное смешение Luc-Pg и Pg с антителами, меченными красителем, с последующей инкубацией в течение 20 минут при комнатной температуре.

Влияние объема вносимой пробы, содержащей прогестерон на чувствительность анализа. Еще одним фактором, влияющим на предел обнаружения аналита во вносимой пробе, является ее объем. При увеличении объема вносимой пробы, концентрация определяемого вещества в реакционной смеси разбавляется в меньшее количество раз, при этом предел обнаружения аналита во вносимой пробе может снижаться.

Чтобы выяснить, насколько можно увеличить объем вносимой пробы при сохранении биолюминесцентного сигнала на высоком уровне, был проведен следующий эксперимент: в лунки планшета вносили 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 нМ GLuc-Pg и 150 нМ Fl-Ab, и добавляли 40, 60, 80 и 100 мкл буферного раствора PBST-BSA. Полученную смесь инкубировали, добавляли 50 мкл субстратной смеси ATP-LH₂, измеряли интенсивность биолюминесценции (Рис. 57 А) и величину BRET-сигнала (Рис. 57 В).

При изменении объема добавляемого буферного раствора от 40 до 100 мкл биолюминесцентный сигнал уменьшается всего на 15-20% (Рис. 57 А). При этом, как BRET-сигнал (Рис. 57 В, столбцы 2), так и фоновый сигнал (Рис. 57 В, столбцы 1), не зависели от разбавления. Такое небольшое изменение биолюминесцентного сигнала можно объяснить тем, что количество GLuc-Pg и Fl-Ab в лунке при различных добавках буфера не изменялось. Следовательно, можно увеличить объем вносимой пробы свободного прогестерона, тем самым увеличив концентрацию последнего в реакционной смеси.

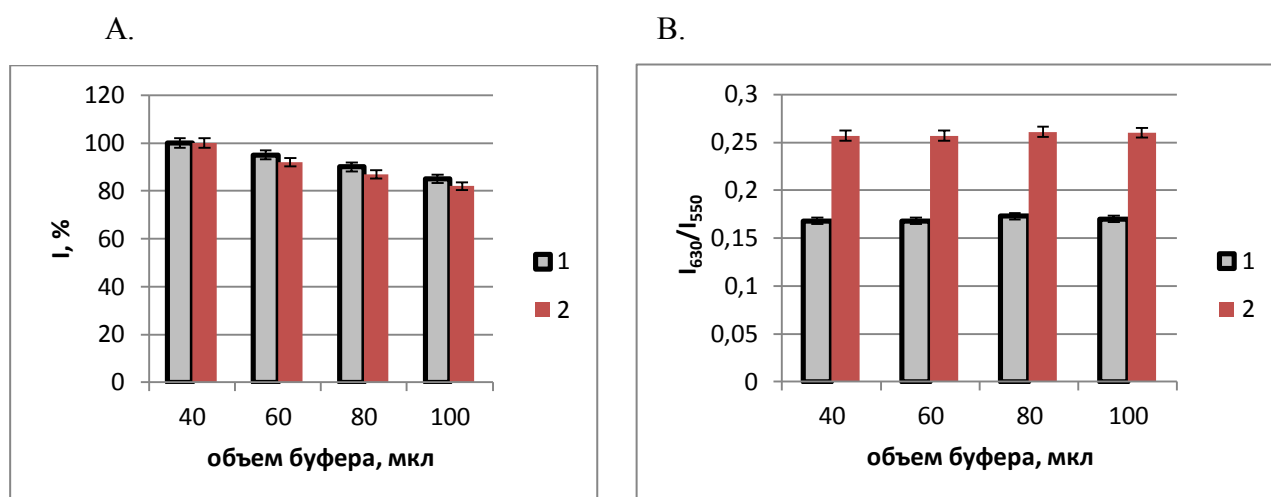


Рис. 57. Зависимость интенсивности биолюминесценции I (А) и соотношения I_{630}/I_{550} (В) от объема добавок буферного раствора PBST-BSA в отсутствие (1) и присутствии (2) Fl-Ab. Условия: 20 мкл раствора, содержащего 6 нМ GLuc-Pg в отсутствие Fl-Ab (столбцы 1) или в присутствии 150 нМ Fl-Ab (столбцы 2) в буферном растворе PBST-BSA, инкубация при 23°C в течение 20 минут. Где I- относительный биолюминесцентный сигнал, рассчитанный исходя из того, что биолюминесцентный сигнал при объеме добавки буфера 40 мкл составлял 100%.

Для получения градуировочных зависимостей BRET-сигнала (%) от концентрации свободного прогестерона во вносимой пробе (Рис. 58) при объемах пробы от 40 до 100 мкл, к которой добавляли по 10 мкл раствора, содержащего 12 нМ GLuc-Pg и 300 нМ Fl-Ab. Из полученных данных следует, что увеличение объема вносимой пробы прогестерона с 40 до 60 мкл не влияет на чувствительность анализа, а при увеличении объема пробы до 80 и 100 мкл способствует увеличению чувствительности анализа.

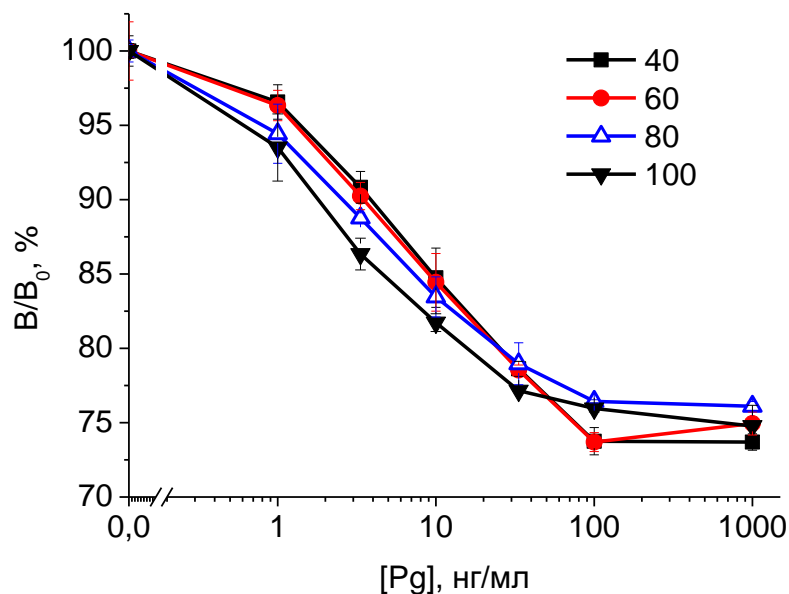


Рис. 58. Зависимости BRET-сигнала в % от концентрации свободного прогестерона в водимой пробе при ее различных объемах: 40, 60, 80, 100 мкл соответственно. Условия те же, что на Рис. 57.

Стоит отметить, что за счет увеличения объема пробы прогестерона с 40 до 100 мкл оптимизированные концентрации Luc-Pg и Fl-Ab в реакционной смеси после добавления пробы уменьшились в 2,5 раза, хотя их количество в реакционной смеси осталось неизменным. Таким образом, были установлены оптимальные условия проведения гомогенного конкурентного иммуноанализа: 1 нМ Luc-Pg, 25 нМ Fl-Ab в реакционной смеси после добавления пробы, буферный раствор PBST-BSA, инкубация при 23°C в течение 20 минут при одновременном смешении компонентов реакционной смеси, объем пробы прогестерона 100 мкл, соотношение объемов GLuc-Pg: Fl-Ab: Pg= 1:1:10. В оптимизированных условиях был проведен гомогенный иммуноанализ прогестерона. Полученные данные представлены Рис. 59.

Согласно полученным данным, минимальная определяемая концентрация прогестерона в пробе составляет 0,5 нг/мл, что эквивалентно 1,7 нМ, это в 6 раз меньше, чем в работе [161], в которой Yamakawa с соавторами использовали похожую схему гомогенного конкурентного иммуноанализа низкомолекулярного тус-пептида с использованием антител, меченых цианиновым красителем Cy 3.5 и гибридного белка люциферазы светляков *Luciola lateralis* с тус пептидом, описанную ранее.

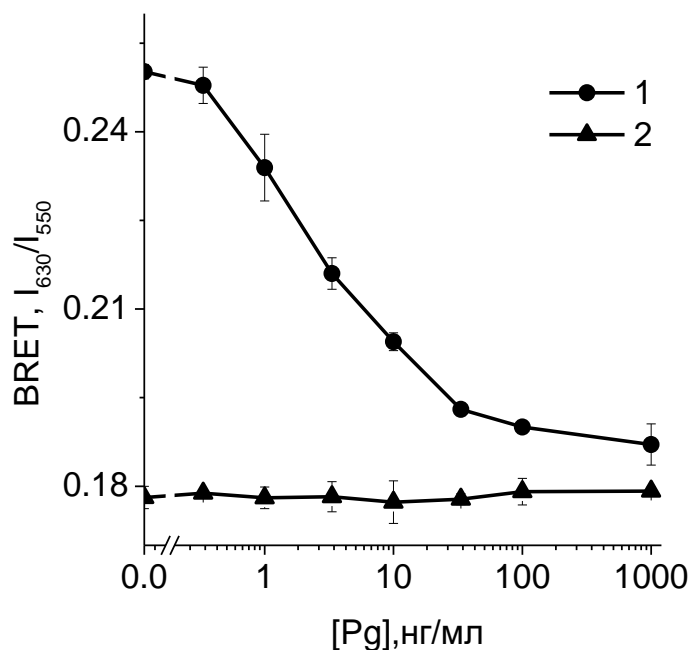


Рис. 59. Зависимости BRET-сигнала от концентрации свободного прогестерона для конъюгата GLuc-Pg (1), и исходной люциферазы GLuc (2).

4.4.5. Гетерогенный иммуноанализ прогестерона с использованием билюминесцентного метода детекции

В этом разделе проведено сравнение чувствительности гомогенного иммуноанализа на основе BRET с традиционным гетерогенным конкурентным иммуноанализом с использованием тех же конъюгатов люцифераза-прогестерон.

Традиционный иммуноанализ с использованием конъюгатов GLuc-Pg проводили по следующей схеме. На поверхность полистирольного планшета иммобилизовали кроличьи поликлональные антитела к прогестерону, обрабатывали раствором PBS-BSA и наносили смесь, содержащую GLuc-Pg и Pg. После удаления несвязавшихся компонентов добавляли субстратную смесь ATP-LH₂ и регистрировали интенсивность билюминесценции, которая была пропорциональна количеству связавшегося с антителами конъюгата и обратно пропорциональна концентрации свободного Pg.

Из литературы известно, что для эффективной иммобилизации антител используется белок А [204], который образует связь с Fc-фрагментами антител, способствуя упорядоченной ориентации антител и тем самым увеличению доступности переменных фрагментов, отвечающих за связывание с антигеном. В связи с этим было проведено сравнение эффективности специфической иммобилизации антител из буфера PBS на белок А, предварительно нанесенный на планшет, и неспецифической иммобилизации антител на полистирольный планшет из карбонатного буфера. Для выявления комплекса Ab-белок А

использовали GLuc-Pg в концентрации от 8 до 32 нМ, на Рис. 60 представлены кривые, полученные при 8 и 32 нМ GLuc-Pg.

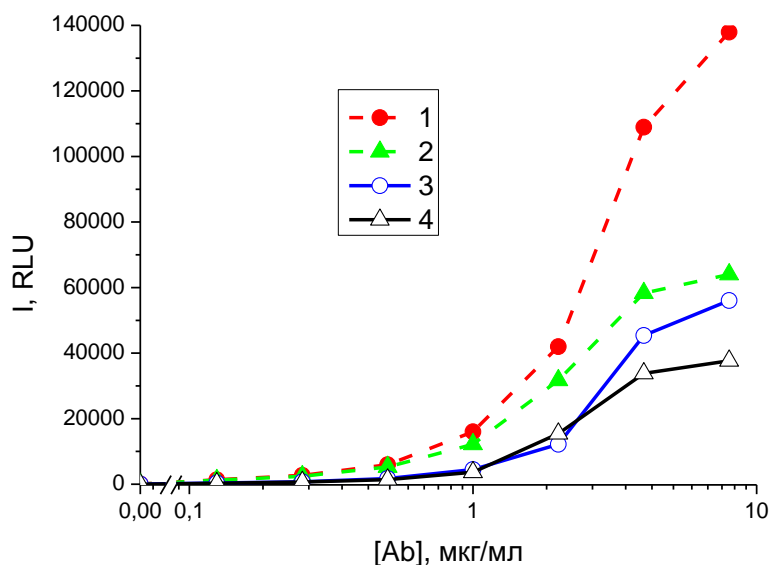


Рис. 60. Зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации антител, иммобилизованных на поверхность полистирольного планшета, обработанную (кривые 1, 2) и необработанную белком А (кривые 3, 4), полученные при различных концентрациях GLuc-Pg: 32 нМ (кривые 1, 3) и 8 нМ (кривые 2, 4). Условия: 2 мкг/мл белок А, в буфере NCA, инкубация с GLuc-Pg в течение 1 ч при 37°C

Согласно полученным результатам, при использовании белка А билюминесцентный сигнал возрастает в 2 - 2,5 раза, поэтому для дальнейших экспериментов проводили направленную иммобилизацию антител на поверхность, обработанную белком А.

Для конкурентного иммуноанализа максимальной чувствительностью обладает система, в которой концентрация антител, за центры связывания с которыми идет конкуренция, значительно меньше, чем концентрация антигена (аналита) и меченого (конкурирующего) антигена. При этом концентрация меченого антигена должна позволять детектировать достоверный воспроизводимый сигнал и быть соизмерима с концентрацией антигена. С другой стороны, кривая титрования активных центров антигена антителами - кривая с насыщением, поэтому максимальная чувствительность анализа будет наблюдаться при концентрациях пары антиген/антитело, попадающих в диапазон изменения сигнала 20 - 80% от максимального.

Для выявления концентраций Ab и GLuc-Pg, удовлетворяющих перечисленным критериям проводили шахматное титрование. Растворы антител с концентрациями в диапазоне 0,1-10 мкг/мл наносили на планшет с иммобилизованным белком А, несвязавшиеся компоненты удаляли, и вносили растворы содержащие GLuc-Pg в концентрациях 2, 4, 8 нМ и инкубировали; непрореагировавший GLuc-Pg удаляли, после чего регистрировали билюминесцентный сигнал. Полученные данные представлены на Рис. 61.

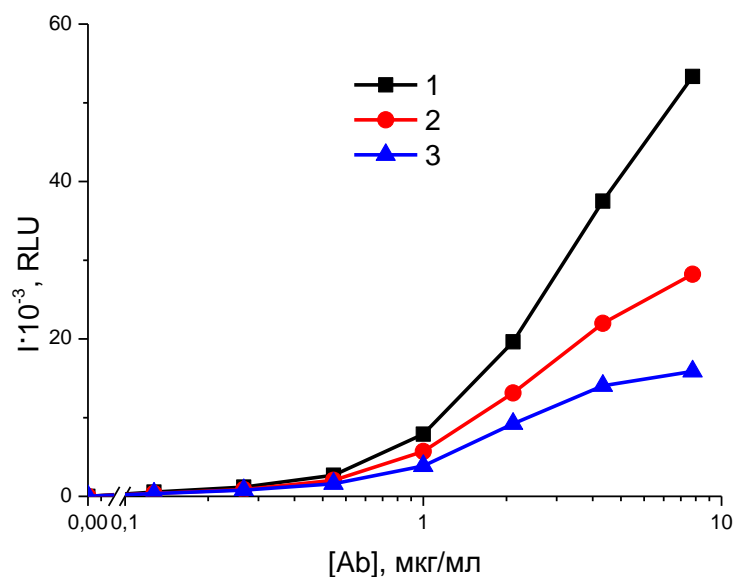


Рис. 61. Зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации антител, иммобилизованных на полистирольном планшете при различных концентрациях GLuc-Pg, нМ: 8 (кривая 1), 4 (кривая 2), 2 (кривая 3)

Как показано на Рис. 61, при использованных концентрациях антител насыщение наблюдается только при концентрации GLuc-Pg равной 2 нМ. При данной концентрации наблюдается билюминесцентный сигнал, достаточный для проведения анализа, поскольку уже при концентрации антител 0,5 мкг/мл специфический сигнал более чем в 100 раз превышает сигнал фона. При концентрациях GLuc-Pg 4 и 8 нМ насыщение наблюдается при концентрации антител более 10 мкг/мл. При таких высоких концентрациях антител можно ожидать значительное снижение чувствительности анализа. Поэтому в дальнейших экспериментах по оптимизации методики анализа была использована концентрация GLuc-Pg 2 нМ и концентрации антител 4, 2, 0,7, 0,5 мкг/мл. Были получены градуировочные кривые для определения Pg в диапазоне концентраций от 0 до 1000 нг/мл (Рис. 62).

Как показано на Рис. 62 снижение концентрации иммобилизованных антител до 0,7 мкг/мл при одной и той же концентрации GLuc-Pg приводит к уменьшению билюминесцентного сигнала (Рис. 62 А кривые 0,7 и 0,5). При этом увеличивается чувствительность анализа. Так при концентрации Pg 1 нг/мл и Ab 4 мкг/мл билюминесцентная интенсивность составляет 100 % от интенсивности в отсутствие прогестерона, при концентрации антител 0,7 мкг/мл и той же концентрации прогестерона билюминесцентная интенсивность снизилась до 88 %. Дальнейшее снижение концентрации антител до 0,5 мкг/мл не приводит к увеличению чувствительности метода.

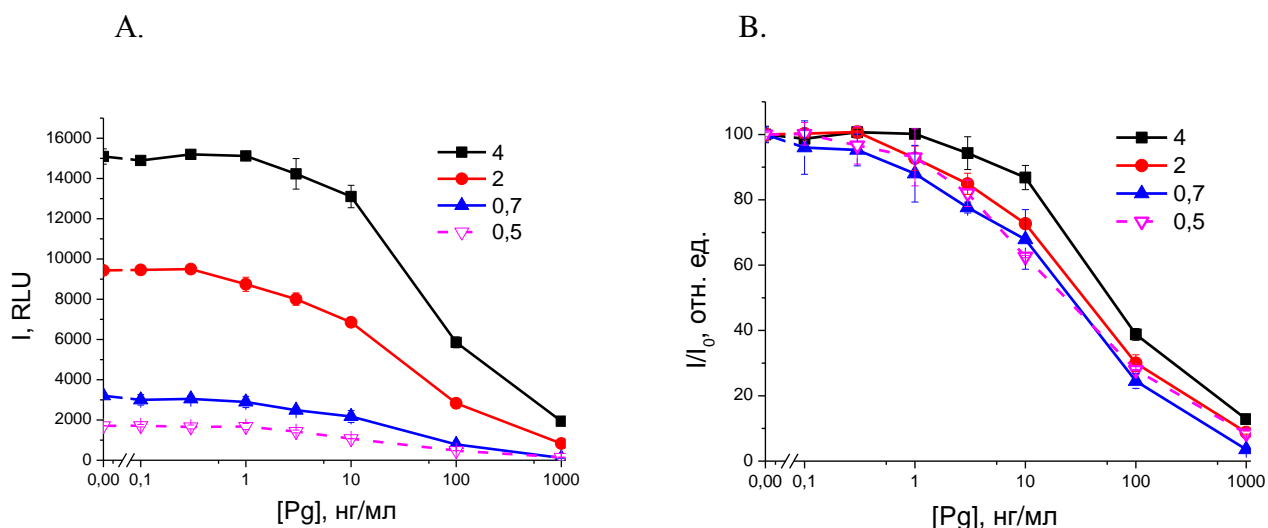


Рис. 62. Градуировочные зависимости билюминесцентного сигнала в RLU (A) или в % (B) от концентрации прогестерона при различных концентрациях иммобилизованных антител 4, 2, 0,7, 0,5 мкг/мл и 2 нМ конъюгата GLuc-Pg

Для дополнительного увеличения чувствительности анализа был увеличен объем вводимой пробы свободного прогестерона в 10 раз при сохранении концентрации GLuc-Pg в инкубационной смеси, что позволило снизить порог обнаружения с 3 до 0,3 нг/мл.

На Рис. 63 показано сравнение чувствительности двух методов анализа, проведенных в оптимизированных для каждого метода условиях. В Таблице 19 приведены их аналитические характеристики.

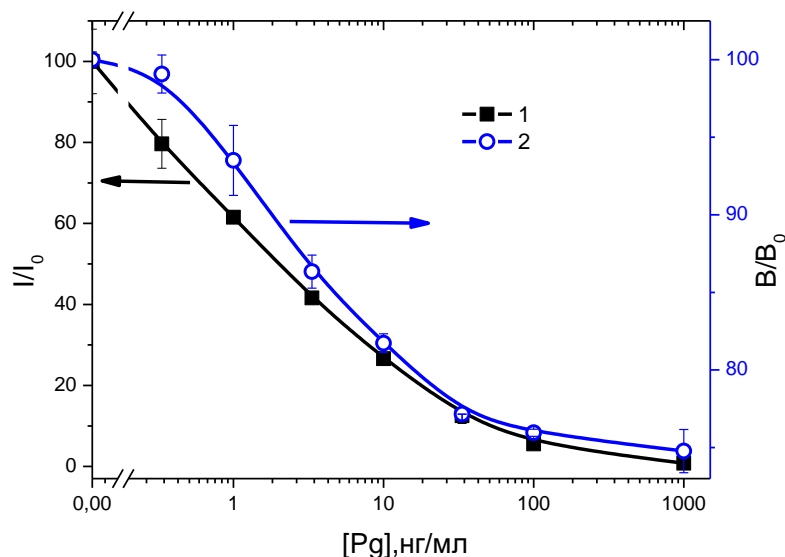


Рис. 63. Градуировочные зависимости относительного билюминесцентного (I/I_0) или BRET (B/B_0) сигналов от концентрации прогестерона для гетерогенного (кривая 1) и гомогенного (кривая 2) иммуноанализа прогестерона с использованием конъюгатов GLuc-Pg. Условия гомогенного иммуноанализа: состав реакционной смеси 1 нМ GLuc-Pg, 25 нМ FI-Ab, объем пробы прогестерона 100 мкл, буферный раствор PBST-BSA, инкубация при 23°C 20 мин. Условия гетерогенного иммуноанализа: 0,7 мкг/мл нМ Ab, 2 нМ GLuc-Pg в инкубационной смеси после добавления пробы, 100 мкл раствора пробы

Таблица 19. Аналитические характеристики гомогенного и гетерогенного иммуноанализа.

	Гомогенный	Гетерогенный
Линейный диапазон	0,3-30 нг/мл	0,1-100 нг/мл
Уравнение	$V/V_0 = -4,913\ln(C) + 93,465$	$I/I_0 = -15,24\ln(C) + 62,824$
R^2	0,992	0,995
Предел обнаружения	0,5 нг/мл	0,3 нг/мл

Согласно полученным данным, метод, разработанный на основе BRET, обладает практически идентичной чувствительностью, что и гетерогенный конкурентный иммуноанализ с использованием тех же конъюгатов с незначительным увеличением предела обнаружения с 0,3 до 0,5 нг/мл. При этом время анализа сокращается с 1 часа до 15 минут, значительно уменьшается трудоемкость анализа. Анализ проводится при комнатной температуре и не требует специальной обработки планшета по сравнению с гетерогенным иммуноанализом, где требуются стадии сорбции белка А, антител и промывания планшета после специфической реакции.

Таким образом, разработан метод гомогенного иммуноанализа прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии с использованием конъюгатов на основе люциферазы светляков *L. mingrelica* в качестве донора. Показано, что его применение сокращает время анализа и трудоемкость по сравнению с традиционным гетерогенным иммуноанализом с использованием люциферазы в качестве метки.

5. ВЫВОДЫ

1) Сконструирована плазмида, кодирующая гибридный белок высокоактивного термостабильного мутанта люциферазы *Luciola mingrelica* с биотин-связывающим доменом (*Luc-bccp-His₆*), при экспрессии которой в клетках *E. coli* с высоким выходом получен гибридный белок Luc-bccp, биотинилированный *in vivo*, обладающий высокой биолюминесцентной активностью и способностью связывать стрептавидин. Показано, что каталитические свойства, термостабильность и спектры биолюминесценции гибридного белка Luc-bccp и исходной люциферазы идентичны.

2) Сконструированы плазмиды, кодирующие гибридные белки высокоактивного термостабильного мутанта люциферазы *Luciola mingrelica* со стрептавидином (*SA-Luc-His₆*, *SA-Luc-His₆ M/G*, *His₆-SA-Luc*, *Luc-SA-His₆*). Показано, что олигомерный состав, люциферазная активность и сродство к биотину гибридных белков, полученных при экспрессии сконструированных плазмид, зависят от взаимного расположения доменов люциферазы, стрептавидина и His₆ последовательности. Показано, что гибридный белок His₆-SA-Luc образуется преимущественно в тетрамерной форме, обладающей высокой люциферазной активностью и высоким сродством к биотину. Эти свойства определяют перспективность его использования в биоаналитических системах на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий.

3) Показано, что гибридный белок His₆-SA-Luc является высокоэффективным реагентом при специфической детекции клеток микроорганизмов на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий как с использованием иммуноанализа, так и с использованием гибридизационного анализа специфических последовательностей сегментов ДНК клеток микроорганизмов.

7) Создана новая система для эффективного биолюминесцентного резонансного переноса энергии на основе конъюгатов термостабильного мутанта люциферазы с антигеном и конъюгатов красителя Alexa-Fluor с антителами. Показано, что эффективность переноса энергии значительно зависит от состава конъюгатов и состава реакционной среды.

8) Методом генетической инженерии получен новый термостабильный мутант люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с заменами Tyr35Asn, Ser398Met, которые приводят к смещению максимума биолюминесценции с 590 до 550 нм. Показана более высокая эффективность регистрации BRET-сигнала с использованием полученного мутанта по сравнению с исходной формой люциферазы.

9) Разработан высокочувствительный метод гомогенного иммуноанализа прогестерона на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии с использованием конъюгатов

люцифераза-прогестерон и конъюгатов антител к прогестерону с красителем. Показано, что данный метод обладает меньшей трудоемкостью и позволяет значительно сократить длительность проведения анализа по сравнению с гетерогенным иммуноанализом.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deluca, M. Firefly luciferase / M. Deluca // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* – 1976. – V. 44. – P. 37-68.
2. Fraga, H. Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments / H. Fraga // *Photochemical & Photobiological Sciences.* – 2008. – V. 7. – P. 146-158.
3. Ugarova, N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. / N.N. Ugarova // *J Biolumin Chemilumin.* – 1989. – V. 4. – P. 406-418.
4. Ando, Y. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission / Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya, H. Akiyama // *Nat Photon.* – 2008. – V. 2. – P. 44-47.
5. Seliger, H.H. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence / H.H. Seliger, W.D. McElroy // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 1960. – V. 88. – P. 136-141.
6. DeLuca, M. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions / M. DeLuca, W.D. McElroy // *Biochemistry.* – 1974. – V. 13. – P. 921-925.
7. Wang, W.-Q. Probing Local Conformational Changes during Equilibrium Unfolding of Firefly Luciferase: Fluorescence and Circular Dichroism Studies of Single Tryptophan Mutants / W.-Q. Wang, Q. Xu, Y.-F. Shan, G.-J. Xu // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2001. – V. 282. – P. 28-33.
8. Nakatsu, T. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence / T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata, H. Kato // *Nature.* – 2006. – V. 440. – P. 372-376.
9. Branchini, B.R. The role of Lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase / B.R. Branchini, M.H. Murtiashaw, R.A. Magyar, S.M. Anderson // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 5433-5440.
10. Ayabe, K. The role of firefly luciferase C-terminal domain in efficient coupling of adenylation and oxidative steps / K. Ayabe, T. Zako, H. Ueda // *FEBS Letters.* – 2005. – V. 579. – P. 4389-4394.
11. Чудинова, Е.А. Флуоресценция триптофановых остатков в люциферазах светляков и в фермент - субстратном комплексе / Е.А. Чудинова, Е.И. Дементьева, Л.Ю. Бровко, А.П. Савицкий, Н.Н. Угарова // *Биохимия.* – 1999. – V. 64. – P. 1097-1103.
12. Сандалова, Т.П. Модель активного центра светляковой люциферазы / Т.П. Сандалова, Н.Н. Угарова // *Биохимия.* – 1999. – V. 64. – P. 962-967.
13. Gandelman, O.A. Investigation of the interaction between firefly luciferase and oxyluciferin or its analogues by steady state and subnanosecond time-resolved fluorescence / O.A. Gandelman, L.Y. Brovko, A.Y. Chikishev, A.P. Shkurinov, N.N. Ugarova // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 1994. – V. 22. – P. 203-209.
14. Branchini, B.R. Mutagenesis evidence that the partial reactions of firefly bioluminescence are catalyzed by different conformations of the luciferase C-terminal domain / B.R. Branchini, T.L. Southworth, M.H. Murtiashaw, S.R. Wilkinson, N.F. Khattak, J.C. Rosenberg, M. Zimmer // *Biochemistry.* – 2005. – V. 44. – P. 1385-1393.
15. Lundin, A. Use of firefly luciferase in atp-related assays of biomass, enzymes, and metabolites // *Methods in Enzymology* Academic Press, 2000. – С. 346-370.
16. Угарова, Н.Н. Применение билюминесцентной АТФ-метрии в биоаналитических целях / Н.Н. Угарова, В.Г. Фрунджян // М.: МГУ. – 2003. – V. – P.
17. Hunter, D.M. Rapid detection and identification of bacterial pathogens by using an ATP bioluminescence immunoassay / D.M. Hunter, D.V. Lim // *Journal of Food Protection.* – 2010. – V. 73. – P. 739-746.
18. Gracias, K.S. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food / K.S. Gracias, J.L. McKillip // *Canadian Journal of Microbiology.* – 2004. – V. 50. – P. 883-890.

19. Griffiths, M.W. ATP bioluminescence in Detecting Pathogens in food. / M.W. Griffiths, L.Y. Brovko // Под ред. McMeekin, T.A. Cambridge, UK. CRC Woodhead Publishing.– 2003. – P. 165-180.
20. Kutter, E. Phage for the detection of pathogenic bacteria / Kutter, E., Sulakvelidze, A. // CRC Press. – 2005. – P.267-284.
21. Lee, J. Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence / J. Lee, R.A. Deininger // Luminescence. – 2004. – V. 19. – P. 31-36.
22. Squirrell, D.J. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence / D.J. Squirrell, R.L. Price, M.J. Murphy // Analytica Chimica Acta. – 2002. – V. 457. – P. 109-114.
23. Beigi, R. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase / R. Beigi, E. Kobatake, M. Aizawa, G.R. Dubyak // Am J Physiol. – 1999. – V. 276. – P. 267-278.
24. Nakamura, M. Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase / M. Nakamura, M. Mie, H. Funabashi, K. Yamamoto, J. Ando, E. Kobatake // Analytical Biochemistry. – 2006. – V. 352. – P. 61-67.
25. Yamamoto, K. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells / K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, J. Ando // Journal of Cell Science. – 2011. – V. 124. – P. 3477-3483.
26. Furuya, K. Real-time luminescence imaging of cellular ATP release / K. Furuya, M. Sokabe, R. Grygorczyk // Methods. – 2014. – V. 66. – P. 330-344.
27. Ledderose, C. Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation / C. Ledderose, Y. Bao, J. Zhang, W.G. Junger // Acta Physiologica. – 2015. – V. 213. – P. 334-345.
28. Cho, M.-H. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker / M.-H. Cho, A. Niles, R. Huang, J. Inglese, C.P. Austin, T. Riss, M. Xia // Toxicology in Vitro. – 2008. – V. 22. – P. 1099-1106.
29. Niles, A.L. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers / A.L. Niles, R.A. Moravec, P. Eric Hesselberth, M.A. Scurria, W.J. Daily, T.L. Riss // Analytical Biochemistry. – 2007. – V. 366. – P. 197-206.
30. Liggett, A. Methods for measuring proteasome activity: Current limitations and future developments / A. Liggett, L.J. Crawford, B. Walker, T.C.M. Morris, A.E. Irvine // Leukemia Research. – 2010. – V. 34. – P. 1403-1409.
31. Moravec, R.A. Cell-based bioluminescent assays for all three proteasome activities in a homogeneous format / R.A. Moravec, M.A. O'Brien, W.J. Daily, M.A. Scurria, L. Bernad, T.L. Riss // Analytical Biochemistry. – 2009. – V. 387. – P. 294-302.
32. Murakami, S. Bioluminescent enzyme immunoassay using thermostable mutant luciferase and acetate kinase as a labelled enzyme / S. Murakami, K. Ito, T. Goto, S. Kamada, M. Maeda // Analytica Chimica Acta. – 1998. – V. 361. – P. 19-26.
33. Nyrén, P. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis / P. Nyrén, A. Lundin // Analytical Biochemistry. – 1985. – V. 151. – P. 504-509.
34. P. Nyrén. The History of Pyrosequencing // Pyrosequencing® Protocols / Walker, J., Marsh, S. Humana Press, 2007. – C. 1-13.
35. Tang, F. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell / F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B.B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao, M.A. Surani // Nat Meth. – 2009. – V. 6. – P. 377-382.
36. Lundin, A. Sensitive assay of creatine kinase isoenzymes in human serum using M subunit inhibiting antibody and firefly luciferase / A. Lundin, I. Styrélius // Clinica Chimica Acta. – 1978. – V. 87. – P. 199-209.
37. Corey, M.J. A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated lysis / M.J. Corey, R.J. Kinders, L.G. Brown, R.L. Vessella // Journal of Immunological Methods. – 1997. – V. 207. – P. 43-51.

38. Marques, S.M. A nitric oxide quantitative assay by a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/phosphoglycerate kinase/firefly luciferase optimized coupled bioluminescent assay / S.M. Marques, J.C.G. Esteves da Silva // *Analytical Methods*. – 2014. – V. 6. – P. 3741-3750.
39. Manning, G.E. A luciferase reporter gene assay and aryl hydrocarbon receptor 1 genotype predict the LD50 of polychlorinated biphenyls in avian species / G.E. Manning, R. Farmahin, D. Crump, S.P. Jones, J. Klein, A. Konstantinov, D. Potter, S.W. Kennedy // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2012. – V. 263. – P. 390-401.
40. Massoud, T.F. Reporter gene imaging of protein–protein interactions in living subjects / T.F. Massoud, R. Paulmurugan, A. De, P. Ray, S.S. Gambhir // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2007. – V. 18. – P. 31-37.
41. Paley, M.A. Bioluminescence: a versatile technique for imaging cellular and molecular features / M.A. Paley, J.A. Prescher // *MedChemComm*. – 2014. – V. 5. – P. 255-267.
42. Kotarsky, K. Optimized reporter gene assays based on a synthetic multifunctional promoter and a secreted luciferase / K. Kotarsky, L. Antonsson, C. Owman, B. Olde // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – V. 316. – P. 208-215.
43. Zhang, Q. Characterization of estrogen receptor α activities in polychlorinated biphenyls by in vitro dual-luciferase reporter gene assay / Q. Zhang, M. Lu, C. Wang, J. Du, P. Zhou, M. Zhao // *Environmental Pollution*. – 2014. – V. 189. – P. 169-175.
44. Viviani, V.R. Beetle Luciferases: Colorful Lights on Biological Processes and Diseases / V.R. Viviani, Y. Ohmiya. // *Photoproteins in Bioanalysis* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. – C. 49-63.
45. Greer, L.F. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review / L.F. Greer, A.A. Szalay // *Luminescence*. – 2002. – V. 17. – P. 43-74.
46. Jiang, C. A bioluminescence assay for DNA methyltransferase activity based on methylation-resistant cleavage / C. Jiang, C.-Y. Yan, C. Huang, J.-H. Jiang, R.-Q. Yu // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – V. 423. – P. 224-228.
47. White, S.R. Expression Immunoassay / S.R. White, N.H.L. Chiu, T.K. Christopoulos // *Methods*. – 2000. – V. 22. – P. 24-32.
48. Chiu, N.H.L. Two-Site Expression Immunoassay Using a Firefly Luciferase-coding DNA Label / N.H.L. Chiu, T.K. Christopoulos // *Clinical Chemistry*. – 1999. – V. 45. – P. 1954-1959.
49. Tannous, B.A. Heterobifunctional linker between antibodies and reporter genes for immunoassay development / B.A. Tannous, N.H.L. Chiu, T.K. Christopoulos // *Analytica Chimica Acta*. – 2002. – V. 459. – P. 169-176.
50. Chiu, N.H.L. Hybridization Assays Using an Expressible DNA Fragment Encoding Firefly Luciferase as a Label / N.H.L. Chiu, T.K. Christopoulos // *Analytical Chemistry*. – 1996. – V. 68. – P. 2304-2308.
51. Laios, E. Expression Hybridization Assays Combining cDNAs from Firefly and Renilla Luciferases as Labels for Simultaneous Determination of Two Target Sequences / E. Laios, P.J. Obeid, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos // *Analytical Chemistry*. – 2000. – V. 72. – P. 4022-4028.
52. Arakawa, H. Bioluminescent Homogeneous Enzyme Binding Assay for Biotin Using Luciferase as a Label. / H. Arakawa, M. Maeda, T. A // *Anal. Lett.* – 1992. – V. 25. – P. 1055-1063.
53. Kricka, L.J. Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins / L.J. Kricka // *Analytical Biochemistry*. – 1988. – V. 175. – P. 14-21.
54. Roda, A. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence / A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Micheli, M. Guardigli // *Trends in Biotechnology*. – 2004. – V. 22. – P. 295-303.
55. Arai, R. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein / R. Arai, H. Nakagawa, A. Kitayama, H. Ueda, T. Nagamune // *J. Biosci. Bioeng.* – 2002. – V. 94. – P. 362-364.
56. Yoshida, W. Automatic polymerase chain reaction product detection system for food safety monitoring using zinc finger protein fused to luciferase / W. Yoshida, A. Kezuka, Y. Murakami, J.

- Lee, K. Abe, H. Motoki, T. Matsuo, N. Shimura, M. Noda, S. Igimi, K. Ikebukuro // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V. 801. – P. 78-83.
57. Osawa, Y. Zn finger-based direct detection system for PCR products of Salmonella spp. and the Influenza A virus / Y. Osawa, K. Ikebukuro, K. Sode // *Biotechnol Lett*. – 2009. – V. 31. – P. 725-733.
 58. Abe, K. Detection of Pathogenic Bacteria by Using Zinc Finger Protein Fused with Firefly Luciferase / K. Abe, T. Kumagai, C. Takahashi, A. Kezuka, Y. Murakami, Y. Osawa, H. Motoki, T. Matsuo, M. Horiuchi, K. Sode, S. Igimi, K. Ikebukuro // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – P. 8028-8032.
 59. Hiraoka, D. Development of a Method To Measure DNA Methylation Levels by Using Methyl CpG-Binding Protein and Luciferase-Fused Zinc Finger Protein / D. Hiraoka, W. Yoshida, K. Abe, H. Wakeda, K. Hata, K. Ikebukuro // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – P. 8259-8264.
 60. Shimomura, O. Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin / O. Shimomura, F.H. Johnson, H. Morise // *Biochemistry*. – 1974. – V. 13. – P. 3278-3286.
 61. Frank, L.A. Ca²⁺-Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters / L.A. Frank // *Sensors*. – 2010. – V. 10. – P. 11287-11300.
 62. Frank, L.A. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label / L.A. Frank, A.I. Petunin, E.S. Vysotski // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – V. 325. – P. 240-246.
 63. Glynou, K. Affinity Capture-Facilitated Preparation of Aequorin– Oligonucleotide Conjugates for Rapid Hybridization Assays / K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos // *Bioconjugate Chemistry*. – 2003. – V. 14. – P. 1024-1029.
 64. Lewis, J.C. Site-Specifically Labeled Photoprotein-Thyroxine Conjugates Using Aequorin Mutants Containing Unique Cysteine Residues: Applications for Binding Assays (Part II) / J.C. Lewis, L.C. Cullen, S. Daunert // *Bioconjugate Chemistry*. – 2000. – V. 11. – P. 140-145.
 65. Bioluminescence and Secondary Structure Properties of Aequorin Mutants Produced for Site-Specific Conjugation and Immobilization / J.C. Lewis, J.J. López-Moya, S. Daunert // *Bioconjugate Chemistry*. – 1999. – V. 11. – P. 65-70.
 66. Lewis, J.C. Bioluminescence Immunoassay for Thyroxine Employing Genetically Engineered Mutant Aequorins Containing Unique Cysteine Residues / J.C. Lewis, S. Daunert // *Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 73. – P. 3227-3233.
 67. Inouye, S. Recombinant aequorin with a reactive cysteine residue for conjugation with maleimide-activated antibody / S. Inouye, J.-i. Sato // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – V. 378. – P. 105-107.
 68. Inouye, S. Purification of histidine-tagged aequorin with a reactive cysteine residue for chemical conjugations and its application for bioluminescent sandwich immunoassays / S. Inouye, J.-i. Sato // *Protein Expression and Purification*. – 2012. – V. 83. – P. 205-210.
 69. Branchini, B.R. Chemically Modified Firefly Luciferase Is an Efficient Source of Near-Infrared Light / B.R. Branchini, D.M. Ablamsky, J.C. Rosenberg // *Bioconjugate Chemistry*. – 2010. – V. 21. – P. 2023-2030.
 70. Mirasoli, M. Bioluminescence Immunoassay for Cortisol Using Recombinant Aequorin as a Label / M. Mirasoli, S.K. Deo, J.C. Lewis, A. Roda, S. Daunert // *Analytical Biochemistry*. – 2002. – V. 306. – P. 204-211.
 71. Shrestha, S. Cysteine-Free Mutant of Aequorin as a Photolabel in Immunoassay Development / S. Shrestha, I.R. Paeng, S. Daunert // *Bioconjugate Chem*. – 2002. – V. 13. – P. 269.
 72. Inouye, S. Identification of biotinylated lysine residues in the photoprotein aequorin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide mapping after lysine-specific endopeptidase digestion / S. Inouye, M. Nakamura // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – V. 316. – P. 216-222.
 73. Zatta, P.F. A solid-phase assay for β -1,4-galactosyltransferase activity in human serum using recombinant aequorin / P.F. Zatta, K. Nyame, M.J. Cormier, S.A. Mattox, P.A. Prieto, D.F. Smith, R.D. Cummings // *Analytical Biochemistry*. – 1991. – V. 194. – P. 185-191.

74. Inouye, S. Comparison of Luminescent Immunoassays Using Biotinylated Proteins of Aequorin, Alkaline Phosphatase and Horseradish Peroxidase as Reporters / S. Inouye, J.-i. Sato // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2008. – V. 72. – P. 3310-3313.
75. Alagic, A. Covalent modification and conjugation of luciferase / A. Alagic, P. Zhelev, Y. Gawad // US Patent 20070254311. – 2007.
76. Wu, C. Preparation of Biotinylated Cypridina Luciferase and Its Use in Bioluminescent Enzyme Immunoassay / C. Wu, K. Kawasaki, Y. Ogawa, Y. Yoshida, S. Ohgiya, Y. Ohmiya // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 79. – P. 1634-1638.
77. Stults, N.L. Use of recombinant biotinylated aequorin in microtiter and membrane-based assays: Purification of recombinant apoaequorin from *Escherichia coli* / N.L. Stults, N.F. Stocks, H. Rivera, J. Gray, R.O. McCann, D. O'Kane, R.D. Cummings, M.J. Cormier, D.F. Smith // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – P. 1433-1442.
78. Escalera, S. Dimethylmaleic anhydride, a specific reagent for protein amino groups / S. Escalera, E. Palacián // *Biochemistry and Cell Biology*. – 1989. – V. 67. – P. 63-66.
79. Lomakina, G.Y. Conjugation of *Luciola mingrelica* firefly luciferase with biospecific proteins through the enzyme SH-groups / G.Y. Lomakina, N.N. Ugarova // *Luminescence*. – 2012. – V. 27. – P. 134-135.
80. Lomakina, G.Y. Synthesis and application of firefly luciferase antibody conjugates in a bioluminescent immunoassay of *Salmonella* cells / G.Y. Lomakina, A. Istrate, N.V. Rudenko, N.N. Ugarova // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2014. – V. 69. – P. 49-55.
81. Zerefos, P.G. Method for rapid conjugation of recombinant photoprotein aequorin with streptavidin and application as a universal detection reagent for binding assays / P.G. Zerefos, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos // *Analytica Chimica Acta*. – 2006. – V. 558. – P. 267-273.
82. Murphy, M.J. Covalent coupling of firefly luciferase to antibodies / M.J. Murphy, D.J. Squirrell // *Bioluminescence and Chemiluminescence*. – 1994. – V. – P. 312.
83. Squirrell, D.J. Luciferase labelling method / D.J. Squirrell, M.J. Murphy // US Patent 5837465. – 1998.
84. Nagatsugi, F. Synthesis and Evaluation of the Luciferase-Oligodeoxynucleotide for the Sequence-Selective Detection of Nucleic Acids / F. Nagatsugi, R. Nakahara, K. Inoue, S. Sasaki // *Archiv der Pharmazie*. – 2008. – V. 341. – P. 562-567.
85. Ebihara, T. Thermostabilization of protein A-luciferase fusion protein by single amino acid mutation / T. Ebihara, H. Takayama, Y. Yanagida, E. Kobatake, M. Aizawa // *Biotechnol Lett.* – 2002. – V. 24. – P. 147-149.
86. Kobatake, E. Bioluminescent Immunoassay with a Protein A-Luciferase Fusion Protein / E. Kobatake, T. Iwai, Y. Ikariyama, M. Aizawa // *Analytical Biochemistry*. – 1993. – V. 208. – P. 300-305.
87. Zhang, X. Genetically Fused Protein A-Luciferase for Immunological Blotting Analyses / X. Zhang, E. Kobatake, K. Kobayashi, Y. Yanagida, M. Aizawa // *Analytical Biochemistry*. – 2000. – V. 282. – P. 65-69.
88. Lindbladh, C. Preparation of a genetically fused protein A/luciferase conjugate for use in bioluminescent immunoassays / C. Lindbladh, K. Mosbach, L. Bülow // *Journal of Immunological Methods*. – 1991. – V. 137. – P. 199-207.
89. Akerström, B. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies / B. Akerström, T. Brodin, K. Reis, L. Björck // *The Journal of Immunology*. – 1985. – V. 135. – P. 2589-92.
90. Yoshida, W. Detection of Histone Modification by Chromatin Immunoprecipitation Combined Zinc Finger Luciferase-Based Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assay / W. Yoshida, A. Kezuka, K. Abe, H. Wakeda, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Ikebukuro // *Analytical Chemistry*. – 2013. – V. 85. – P. 6485-6490.
91. Akter, F. Aptamer-based protein detection using a bioluminescent fusion protein / F. Akter, M. Mie, E. Kobatake // *Analyst*. – 2012. – V. 137. – P. 5297-5301.

92. Huovinen, T. A simple heterogeneous one-step assay for screening estrogenic compounds / T. Huovinen, K. Rytönen, U. Lamminmäki, T. Pellinen // *Biotechnol Lett.* – 2013. – V. 35. – P. 47-53.
93. Ramanathan, S. Heterogeneous bioluminescence binding assay for an octapeptide using recombinant aequorin / S. Ramanathan, J.C. Lewis, M.S. Kindy, S. Daunert // *Analytica Chimica Acta.* – 1998. – V. 369. – P. 181-188.
94. Desai, U.A. Using Epitope–Aequorin Conjugate Recognition in Immunoassays for Complex Proteins / U.A. Desai, J.A. Winger, J.C. Lewis, S. Ramanathan, S. Daunert // *Analytical Biochemistry.* – 2001. – V. 294. – P. 132-140.
95. Chang, T.-S. Fusion protein of the hyaluronan binding domain from human TSG-6 with luciferase for assay of hyaluronan / T.-S. Chang, H.-M. Wan, C.-C. Chen, R. Giridhar, W.-T. Wu // *Biotechnol Lett.* – 2003. – V. 25. – P. 1037-1040.
96. Qu, X. Bioluminescence immunoassay for angiotensin II using aequorin as a label / X. Qu, S.K. Deo, E. Dikici, M. Ensor, M. Poon, S. Daunert // *Analytical Biochemistry.* – 2007. – V. 371. – P. 154-161.
97. Yoon, H. Recent development of highly sensitive protease assay methods: Signal amplification through enzyme cascades / H. Yoon, S. Jung, J.-H. Kim, T. Yoo // *Biotechnol Bioproc E.* – 2012. – V. 17. – P. 1113-1119.
98. Wigdal, S.S. A Novel Bioluminescent Protease Assay Using Engineered Firefly Luciferase / S.S. Wigdal, J.L. Anderson, G.J. Vidugiris, J. Shultz, K.V. Wood, F. Fan // *Curr Chem Genomics.* – 2008. – V. 2. – P. 16–28.
99. Hattori, M. Analysis of temporal patterns of GPCR-[small beta]-arrestin interactions using split luciferase-fragment complementation / M. Hattori, M. Tanaka, H. Takakura, K. Aoki, K. Miura, T. Anzai, T. Ozawa // *Molecular BioSystems.* – 2013. – V. 9. – P. 957-964.
100. Leng, W. Novel Split-Luciferase-Based Genetically Encoded Biosensors for Noninvasive Visualization of Rho GTPases / W. Leng, X. Pang, H. Xia, M. Li, L. Chen, Q. Tang, D. Yuan, R. Li, L. Li, F. Gao, F. Bi // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8. – P. e62230.
101. Shekhawat, S.S. A Comprehensive Panel of Turn-On Caspase Biosensors for Investigating Caspase Specificity and Caspase Activation Pathways / S.S. Shekhawat, S.T. Campbell, I. Ghosh // *ChemBioChem.* – 2011. – V. 12. – P. 2353-2364.
102. Ataei, F. A novel luminescent biosensor for rapid monitoring of IP3 by split-luciferase complementary assay / F. Ataei, M. Torkzadeh-Mahani, S. Hosseinkhani // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2013. – V. 41. – P. 642-648.
103. Jester, B.W. A Coiled-Coil Enabled Split-Luciferase Three-Hybrid System: Applied Toward Profiling Inhibitors of Protein Kinases / B.W. Jester, K.J. Cox, A. Gaj, C.D. Shomin, J.R. Porter, I. Ghosh // *Journal of the American Chemical Society.* – 2010. – V. 132. – P. 11727-11735.
104. Fan, F. Novel Genetically Encoded Biosensors Using Firefly Luciferase / F. Fan, B.F. Binkowski, B.L. Butler, P.F. Stecha, M.K. Lewis, K.V. Wood // *ACS Chemical Biology.* – 2008. – V. 3. – P. 346-351.
105. Inouye, S. Streptavidin-aequorin fusion protein for bioluminescent immunoassay / S. Inouye, J.-i. Sato, S. Sasaki, Y. Sahara // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* – 2011. – V. 75. – P. 568-571.
106. Oker-Blom, C. Highly efficient production of GFP and its derivatives in insect cells for visual in vitro applications / C. Oker-Blom, A. Orellana, K. Keinanen // *FEBS Letters.* – 1996. – V. 389. – P. 238-243.
107. Karp, M. Identification of biotinylated molecules using a baculovirus-expressed luciferase-streptavidin fusion protein / M. Karp, C. Lindqvist, R. Nissinen, S. Wahlbeck, K. Akerman, C. Oker-Blom // *Biotechniques.* – 1996. – V. 20. – P. 452-6, 458-9.
108. Lamla, T. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins / T. Lamla, V.A. Erdmann // *Protein expression and purification.* – 2004. – V. 33. – P. 39-47.

109. Tatsumi, H. Novel recombinant DNA of streptavidin fusion protein with firefly luciferase / H. Tatsumi, M. Fukuda // JP Patent 7289264 – 1994.
110. Nakamura, M. Construction of streptavidin-luciferase fusion protein for ATP sensing with fixed form / M. Nakamura, M. Mie, H. Funabashi, E. Kobatake // *Biotechnol Lett.* – 2004. – V. 26. – P. 1061-1066.
111. Ito, K. Highly sensitive and rapid tandem bioluminescent immunoassay using aequorin labeled Fab fragment and biotinylated firefly luciferase / K. Ito, W. Nishimura, M. Maeda, K. Gomi, S. Inouye, H. Arakawa // *Analytica Chimica Acta.* – 2007. – V. 588. – P. 245-251.
112. Bayer, E.A. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin / E.A. Bayer, S. Ehrlich-Rogozinski, M. Wilchek // *Electrophoresis.* – 1996. – V. 17. – P. 1319-1324.
113. Verhaegen, M. Bacterial Expression of in Vivo-Biotinylated Aequorin for Direct Application to Bioluminometric Hybridization Assays / M. Verhaegen, T.K. Christopoulos // *Analytical Biochemistry.* – 2002. – V. 306. – P. 314-322.
114. Zhang, Y. Imaging Localized Astrocyte ATP Release with Firefly Luciferase Beads Attached to the Cell Surface / Y. Zhang, G.J. Phillips, Q. Li, E.S. Yeung // *Analytical Chemistry.* – 2008. – V. 80. – P. 9316-9325.
115. Beckett, D. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation / D. Beckett, E. Kovaleva, P. Schatz // *Protein Sci.* – 1999. – V. 8. – P. 921-929.
116. Schatz, P.J. Use of Peptide Libraries to Map the Substrate Specificity of a Peptide-Modifying Enzyme: A 13 Residue Consensus Peptide Specifies Biotinylation in *Escherichia coli* / P.J. Schatz // *Nat Biotech.* – 1993. – V. 11. – P. 1138- 1143.
117. Karp, M. A streptavidin–luciferase fusion protein: comparisons and applications / M. Karp, C. Oker-Blom // *Biomolecular Engineering.* – 1999. – V. 16. – P. 101-104.
118. Wang, C.-Y. Specific Immobilization of Firefly Luciferase through a Biotin Carboxyl Carrier Protein Domain / C.-Y. Wang, Sam Hitz, J.D. Andrade, R.J. Stewart // *Anal. Biochem.* – 1997. – V. 246. – P. 133-139.
119. Ohkuma, H. Simultaneous assay of pepsinogen I and pepsinogen II in serum by bioluminescent enzyme immunoassay using two kinds of *Luciola lateralis* luciferase / H. Ohkuma, K. Abe, Y. Kosaka, M. Maeda // *Analytica Chimica Acta.* – 1999. – V. 395. – P. 265-272.
120. Tatsumi, H. Construction of Biotinylated Firefly Luciferases Using Biotin Acceptor Peptides / H. Tatsumi, S. Fukuda, M. Kikuchi, Y. Koyama // *Analytical Biochemistry.* – 1996. – V. 243. – P. 176-180.
121. Eu, J. Properties of firefly luciferase immobilized through a biotin carboxyl carrier protein domain / J. Eu, J. Andrade // *Luminescence.* – 2001. – V. 16. – P. 57-63.
122. Wu, C. Rapid methods of detecting the target molecule in immunohistology using a bioluminescence probe / C. Wu, K.-Y. Wang, X. Guo, M. Sato, M. Ozaki, S. Shimajiri, Y. Ohmiya, Y. Sasaguri // *Luminescence.* – 2013. – V. 28. – P. 38-43.
123. Tatsumi, H. Biotinated firefly luciferase, a gene for biotinated firefly luciferase, a recombinant DNA, a process for producing biotinated luciferase and a bioluminescent analysis method / H. Tatsumi, S. Fukuda, M. Kikuchi, Y. Koyama // US Patent 5814465. – 1998.
124. Billiald, P. Engineering of a bioluminescent antigen-binding protein / P. Billiald, M. Mousli, M. Goyffon, D. Vaux // *Biotechnol Lett.* – 1997. – V. 19. – P. 1037-1041.
125. Venisnik, K.M. Bifunctional antibody-Renilla luciferase fusion protein for in vivo optical detection of tumors / K.M. Venisnik, T. Olafsen, A.M. Loening, M. Iyer, S. Gambhir, A. Wu // *Protein Engineering, Design & Selection.* – 2006. – V. 19. – P. 453–460.
126. Venisnik, K. Fusion of Gaussia Luciferase to an Engineered Anti-carcinoembryonic Antigen (CEA) Antibody for In Vivo Optical Imaging / K. Venisnik, T. Olafsen, S. Gambhir, A. Wu // *Mol Imaging Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 267-277.
127. Patel, K.G. Cell-free production of Gaussia princeps luciferase – antibody fragment bioconjugates for ex vivo detection of tumor cells / K.G. Patel, P.P. Ng, C.-C. Kuo, S. Levy, R. Levy, J.R.

- Swartz // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – V. 390. – P. 971-976.
128. Arai, R. Demonstration of a Homogeneous Noncompetitive Immunoassay Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer / R. Arai, H. Nakagawa, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, H. Ueda, T. Nagamune // *Analytical Biochemistry*. – 2001. – V. 289. – P. 77-81.
 129. Kajita, Y. Bioluminescent detection of RNA with sequence-specificity using RNA binding protein-luciferase fusion protein / Y. Kajita, E. Kobatake, F. Ishikawa, M. Aizawaa // *Journal of Biotechnology*. – 1995. – V. 43. – P. 63-70.
 130. A. Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, P. Pasini. Luminescent Proteins in Binding Assays // *Protein Science Encyclopedia* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
 131. Minekawa, T. Development of Bioluminescent Enzyme Immunoassay for S-Equol Using Firefly Luciferase and Its Application to the Assessment of Equol-Producer Status / T. Minekawa, A. Kambegawa, K. Shindome, H. Ohkuma, K. Abe, H. Maekawa, H. Arakawa // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2011. – V. 59. – P. 84-87.
 132. Ohkuma, H. Detection of luciferase having two kinds of luminescent colour based on optical filter procedure: application to an enzyme immunoassay / H. Ohkuma, K. Abe, Y. Kosaka, M. Maeda // *Luminescence*. – 2000. – V. 15. – P. 21-27.
 133. Seto, Y. Development of ultra-high sensitivity bioluminescent enzyme immunoassay for prostate-specific antigen (PSA) using firefly luciferase / Y. Seto, T. Iba, K. Abe // *Luminescence*. – 2001. – V. 16. – P. 285-290.
 134. Seto, Y. Development of highly sensitive bioluminescent enzyme immunoassay with ultra-wide measurable range for thyroid-stimulating hormone using firefly luciferase / Y. Seto, H. Ohkuma, S. Takayasu, T. Iba, A. Umeda, K. Abe // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – V. 429. – P. 19-26.
 135. Sakamaki, N. Bioluminescent Enzyme Immunoassay for the Detection of Norovirus Capsid Antigen / N. Sakamaki, Y. Ohiro, M. Ito, M. Makinodan, T. Ohta, W. Suzuki, S. Takayasu, H. Tsuge // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – V. 19. – P. 1949-1954.
 136. Minekawa, T. Development of ultra-high sensitivity bioluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B virus surface antigen using firefly luciferase / T. Minekawa, H. Ohkuma, K. Abe, H. Maekawa, H. Arakawa // *Luminescence*. – 2009. – V. 24. – P. 394-399.
 137. Kim, H.S. Evaluation of the SD Bioline Norovirus rapid immunochromatography test using fecal specimens from Korean gastroenteritis patients / H.S. Kim, J. Hyun, J.-S. Kim, W. Song, H.J. Kang, K.M. Lee // *Journal of Virological Methods*. – 2012. – V. 186. – P. 94-98.
 138. Nordgren, J. Novel Light-Upon-Extension Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection, Quantification, and Genogrouping of Group A Rotavirus / J. Nordgren, F. Bucardo, L. Svensson, P.-E. Lindgren // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – V. 48. – P. 1859-1865.
 139. Kageyama, T. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR / T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F.B. Hoshino, N. Takeda, K. Katayama // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – V. 41. – P. 1548-1557.
 140. Costantini, V. Diagnostic Accuracy and Analytical Sensitivity of IDEIA Norovirus Assay for Routine Screening of Human Norovirus / V. Costantini, L. Grenz, A. Fritzing, D. Lewis, C. Biggs, A. Hale, J. Vinjé // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – V. 48. – P. 2770-2778.
 141. Takanashi, S. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II / S. Takanashi, M. Okame, T. Shiota, M. Takagi, F. Yagyū, P.G. Tung, S. Nishimura, N. Katsumata, T. Igarashi, S. Okitsu, H. Ushijima // *Journal of Virological Methods*. – 2008. – V. 148. – P. 1-8.
 142. Fukuda, S. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using bioluminescent enzyme immunoassay / S. Fukuda, H. Tatsumi, H. Igarashi, S. Igimi // *Letters in Applied Microbiology*. – 2000. – V. 31. – P. 134-138.
 143. Fukuda, S. Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken meat samples / S. Fukuda, H. Tatsumi, S. Igimi, S. Yamamoto // *Letters in Applied Microbiology*. – 2005. – V. 41. – P. 379-384.

144. Shiga, K. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci by detection of penicillin-binding protein 2 and penicillin-binding protein 2' using a bioluminescent enzyme immunoassay / K. Shiga, K. Gomi, M. Nishimura, M. Watanabe, F. Nomura, N. Kajiyama // *Journal of Immunological Methods*. – 2013. – V. 388. – P. 40-45.
145. Wang, C.-H. A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification / C.-H. Wang, K.-Y. Lien, J.-J. Wu, G.-B. Lee // *Lab on a Chip*. – 2011. – V. 11. – P. 1521-1531.
146. Zammattéo, N. DNA probe hybridisation in microwells using a new bioluminescent system for the detection of PCR-amplified HIV-1 proviral DNA / N. Zammattéo, P. Moris, I. Alexandre, D. Vaira, J. Piette, J. Remacle // *Journal of Virological Methods*. – 1995. – V. 55. – P. 185-197.
147. Van der Ploeg, L.H.T. DNA methylation in the human $\gamma\delta\beta$ -globin locus in erythroid and nonerythroid tissues / L.H.T. Van der Ploeg, R.A. Flavell // *Cell*. – 1980. – V. 19. – P. 947-958.
148. Yang, N. Prevalence and diversity of norovirus genogroups I and II in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR / N. Yang, H. Qi, M.M.L. Wong, R.S.S. Wu, R.Y.C. Kong // *Marine Pollution Bulletin*. – 2012. – V. 64. – P. 164-168.
149. Al-Soud, W.A. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells / W.A. Al-Soud, P. Rådström // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – V. 39. – P. 485-493.
150. Alvarez-Curto, E. Applications of fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein coupled receptors / E. Alvarez-Curto, J. Padiani, G. Milligan // *Anal Bioanal Chem*. – 2010. – V. 398. – P. 167-180.
151. Arai, R. Fluorolabeling of antibody variable domains with green fluorescent protein variants: application to an energy transfer-based homogeneous immunoassay / R. Arai, H. Ueda, K. Tsumoto, W.C. Mahoney, I. Kumagai, T. Nagamune // *Protein Engineering*. – 2000. – V. 13. – P. 369-376.
152. Xu, Y. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins / Y. Xu, D.W. Piston, C.H. Johnson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96. – P. 151-156.
153. Prinz, A. Application of Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) for Biomolecular Interaction Studies / A. Prinz, M. Diskar, F.W. Herberg // *ChemBioChem*. – 2006. – V. 7. – P. 1007-1012.
154. Bertrand, L. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS) / L. Bertrand, S. Parent, M. Caron, M. Legault, E. Joly, S. Angers, M. Bouvier, M. Brown, B. Houle, L. Ménard // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2002. – V. 22. – P. 533-541.
155. Loening, A.M. Consensus guided mutagenesis of *Renilla luciferase* yields enhanced stability and light output / A.M. Loening, T.D. Fenn, A.M. Wu, S.S. Gambhir // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2006. – V. 19. – P. 391-400.
156. Bacart, J. The BRET technology and its application to screening assays / J. Bacart, C. Corbel, R. Jockers, S. Bach, C. Couturier // *Biotechnology Journal*. – 2008. – V. 3. – P. 311-324.
157. De, A. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals / A. De, P. Ray, A.M. Loening, S.S. Gambhir // *The FASEB Journal*. – 2009. – V. 23. – P. 2702-2709.
158. Matz, M.V. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species / M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, S.A. Lukyanov // *Nat Biotech*. – 1999. – V. 17. – P. 969-973.
159. Branchini, B.R. Sequential bioluminescence resonance energy transfer–fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein / B.R. Branchini, J.C. Rosenberg, D.M. Ablamsky, K.P. Taylor, T.L. Southworth, S.J. Linder // *Analytical Biochemistry*. – 2011. – V. 414. – P. 239-245.

160. Sapsford, K.E. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations / K.E. Sapsford, L. Berti, I.L. Medintz // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2006. – V. 45. – P. 4562-4589.
161. Yamakawa, Y. Rapid homogeneous immunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase / Y. Yamakawa, H. Veda, A. Kitayama, T. Nagamune // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2002. – V. 93. – P. 537-542.
162. Audet, N. Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in preformed signalling complexes / N. Audet, G. Piñeyro // *Signal Transduction Protocols*. – 2011. – V. – P. 149-163.
163. Wu, C. In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye / C. Wu, K. Mino, H. Akimoto, M. Kawabata, K. Nakamura, M. Ozaki, Y. Ohmiya // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106. – P. 15599-15603.
164. Dacres, H. Comparison of enhanced bioluminescence energy transfer donors for protease biosensors / H. Dacres, M. Michie, S.C. Trowell // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – V. 424. – P. 206-210.
165. Shigeto, H. A BRET-Based Homogeneous Insulin Assay Using Interacting Domains in the Primary Binding Site of the Insulin Receptor / H. Shigeto, T. Ikeda, A. Kuroda, H. Funabashi // *Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 10.1021/ac504063x – P.
166. Kulahin, N. A BRET assay for monitoring insulin receptor interactions and ligand pharmacology / N. Kulahin, S.J. Sanni, R. Slaaby, J. Nøhr, S. Gammeltoft, J.L. Hansen, R. Jorgensen // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2012. – V. 32. – P. 57-64.
167. Ozawa, T. Advances in Fluorescence and Bioluminescence Imaging / T. Ozawa, H. Yoshimura, S.B. Kim // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 85. – P. 590-609.
168. Ohiro, Y. A Homogeneous and Noncompetitive Immunoassay Based on the Enhanced Fluorescence Resonance Energy Transfer by Leucine Zipper Interaction / Y. Ohiro, R. Arai, H. Ueda, T. Nagamune // *Analytical Chemistry*. – 2002. – V. 74. – P. 5786-5792.
169. Кокшаров, М.И. Повышение термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с помощью направленной эволюции *in vivo* / М.И. Кокшаров, Н.Н. Угарова // *Генетика микроорганизмов и биотехнология*. – 2008. – V. 20. – P. 142.
170. Alcaraz-Perez, F. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos / F. Alcaraz-Perez, V. Mulero, M. Cayuela // *BMC Biotechnology*. – 2008. – V. 8. – P. 81.
171. Koksharov, M.I. Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase / M.I. Koksharov, N.N. Ugarova // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2011. – V. 10. – P. 931-938.
172. Koksharov, M.I. Random mutagenesis of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. Mutant enzymes with bioluminescence spectra showing low pH sensitivity / M.I. Koksharov, N.N. Ugarova // *Biochemistry Moscow*. – 2008. – V. 73. – P. 862-869.
173. Lee, S.Y. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA / S.Y. Lee, S. Rasheed // *BioTechniques*. – 1990. – V. 9. – P. 676-679.
174. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels / R.W.J. Thuring, J.P.M. Sanders, P. Borst // *Anal. Biochem.* – 1975. – V. 66. – P. 213-220.
175. Tu, Z. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains / Z. Tu, G. He, K.X. Li, M.J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D.P. Liu, H. Ye, J. Shi // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2005. – V. 8. – P. 113-120.
176. Кокшаров, М.И. Повышение термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* случайным мутагенезом / М.И. Кокшаров, Н.Н. Угарова // *Вестн. Моск. Ун-та*. – 2009. – V. 50. – P. 23-28.
177. Chapman-Smith, A. Molecular biology of biotin attachment to proteins / A. Chapman-Smith, J.E. Cronan // *The Journal of nutrition*. – 1999. – V. 129. – P. 477S-484S.

178. Sorensen, H.P. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* / H.P. Sorensen, K.K. Mortensen // *Journal of biotechnology*. – 2005. – V. 115. – P. 113-128.
179. Devine, J.H. Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme / J.H. Devine, G.D. Kutuzova, V.A. Green, N.N. Ugarova, T.O. Baldwin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. – 1993. – V. 1173. – P. 121-132.
180. Koksharov, M.I. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution / M.I. Koksharov, N.N. Ugarova // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2011. – V. 24. – P. 835-844.
181. Koksharov, M. *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase IV acquires activity only late at the stationary phase when produced in *Escherichia coli*. Overexpression and characterization of the recombinant enzyme / M. Koksharov, C. Lv, X. Zhai, N. Ugarova, E. Huang // *Protein expression and purification*. – 2013. – V. 90. – P. 186-194.
182. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F.W. Studier // *Protein expression and purification*. – 2005. – V. 41. – P. 207-234.
183. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
184. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server // *The proteomics protocols handbook* Springer, 2005. – C. 571-607.
185. Cronan, J.E. Interchangeable enzyme modules functional replacement of the essential linker of the biotinylated subunit of acetyl L-CoA carboxylase with a linker from the lipoylated subunit of pyruvate dehydrogenase / J.E. Cronan // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P. 22520-22527.
186. Li, S.-J. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase / S.-J. Li, J. Cronan // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – P. 855-863.
187. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin / E.A. Bayer, S. Ehrlich-Rogozinski, M. Wilchek // *ELECTROPHORESIS*. – 1996. – V. 17. – P. 1319-1324.
188. Schultz, J. A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy / J. Schultz, Y. Lin, J. Sanderson, Y. Zuo, D. Stone, R. Mallett, S. Wilbert, D. Axworthy // *Cancer research*. – 2000. – V. 60. – P. 6663-6669.
189. Huston, J.S. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* / J.S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.-S. Tai, J. Novotný, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – V. 85. – P. 5879-5883.
190. Pantoliano, M.W. Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli* / M.W. Pantoliano, R.E. Bird, S. Johnson, E.D. Asel, S.W. Dodd, J.F. Wood, K.D. Hardman // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30. – P. 10117-10125.
191. Koksharov, M.I. A fusion protein of *Luciola mingrelica* luciferase with a biotin-binding domain: Production, properties, and application / M.I. Koksharov, D.V. Smirnova, S.G. Abbasova, N.N. Ugarova // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2011. – V. 66. – P. 241-246.
192. Fromell, K. Nanoparticle decorated surfaces with potential use in glycosylation analysis / K. Fromell, M. Andersson, K. Elihn, K.D. Caldwell // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2005. – V. 46. – P. 84-91.
193. T. Basinska, D. Caldwell Karin. Colloidal Particles as Immunodiagnostics: Preparation and FFF Characterization // *Chromatography of Polymers* American Chemical Society, 1999. – C. 162-177.
194. Fry, A.K. Synthesis and anticoagulant activity of heparin immobilized “end-on” to polystyrene microspheres coated with end-group activated polyethylene oxide / A.K. Fry, K.F. Schilke, J.

- McGuire, K.E. Bird // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2010. – V. 94. – P. 187-195.
195. Moreira, Â.N. Monoclonal antibodies against serogroup B salmonellae: production, characterisation and use in a sandwich ELISA / Â.N. Moreira, F.R. Conceição, R.d.C.S. Conceição, F.L. Goularte, J.B. Carvalho, O.A. Dellagostin, J.A.G. Aleixo // *Food and agricultural immunology*. – 2008. – V. 19. – P. 1-10.
196. Monoclonal antibodies against serogroup B salmonellae: production, characterisation and use in a sandwich ELISA / Â.N. Moreira, F.R. Conceição, R.d.C.S. Conceição, F.L. Goularte, J.B. Carvalho, O.A. Dellagostin, J.A.G. Aleixo // *Food and Agricultural Immunology*. – 2008. – V. 19. – P. 1 - 10.
197. Valdivieso-Garcia, A. Evaluation of a 24-Hour Bioluminescent Enzyme Immunoassay for the Rapid Detection of *Salmonella* in Chicken Carcass Rinses / A. Valdivieso-Garcia, A. Desruisseau, E. Riche, S. Fukuda, H. Tatsumi // *Journal of Food Protection*. – 2003. – V. 66. – P. 1996-2004.
198. Smith, D.K. Escherichia coli has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci / D.K. Smith, T. Kassam, B. Singh, J.F. Elliott // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – V. 174. – P. 5820-5826.
199. Li, W. high speed quantitative analysis of DNA methylation, by immobilization of DNA on the plastic carrier coated with polylysine, then incubating at a two-phase temperature and immunodetection of 5-methylcytosine structures as markers of DNA methylation / W. Li, J. Li // *US Patent 7785793*. – 2010.
200. Safronova, V.A. Lateral flow immunoassay for progesterone detection / V.A. Safronova, J.V. Samsonova, V.G. Grigorenko, A.P. Osipov // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2012. – V. 67. – P. 241-248.
201. Brogan, K.L. Influence of Surfactants and Antibody Immobilization Strategy on Reducing Nonspecific Protein Interactions for Molecular Recognition Force Microscopy / K.L. Brogan, J.H. Shin, M.H. Schoenfish // *Langmuir*. – 2004. – V. 20. – P. 9729-9735.
202. Moroz, N.A. Stabilization of ATP reagents containing firefly *L. mingrelica* luciferase by polyols / N.A. Moroz, D.Y. Gurskii, N.N. Ugarova // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2008. – V. 63. – P. 67-70.
203. A. Lundin. Optimization of the Firefly Luciferase Reaction for Analytical Purposes // *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 2* / Thouand, G., Marks, R. Springer Berlin Heidelberg, 2014. – C. 31-62.
204. Schramm, W. Surface modification with protein A for uniform binding of monoclonal antibodies. / W. Schramm, T. Yang, A. Midgley // *Clin Chem*. – 1987. – V. 33. – P. 1338-1342.