

УДК 577.152.1

ВЛИЯНИЕ ЖЕЛАТИНЫ НА СВОЙСТВА ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica*

Г.Ю. Ломакина, А.Е. Безруких, Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии; e-mail: lomakinagalina@yahoo.com)

Работа посвящена изучению АТФ-реактанта, который содержит мутантную термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelica*, люциферин, $MgSO_4$, компоненты буферного раствора и стабилизаторы и широко используется для определения нано- и пикомолярных концентраций аденозин-5'-фосфата (АТФ) в различных биологических образцах. Проведена оценка активности, стабильности и аналитических характеристик АТФ-реактанта в растворе в присутствии и в отсутствие 5%-й желатины и в желатиновом геле. При концентрации желатины 5% и температуре $\geq 30^\circ$ получен раствор АТФ-реактанта, а ниже 30° происходит гелеобразование. Растворы АТФ-реактанта изучены при 30° , а тонкие желатиновые пленки с АТФ-реактантом – при 22° . Добавки желатины несколько снижают активность и стабильность люциферазы. Чувствительность определения АТФ (выше 0,96) не зависела от присутствия желатины и агрегатного состояния дисперсной системы. Пределы обнаружения составляли $2 \cdot 10^{-12}$, $7 \cdot 10^{-13}$, $7 \cdot 10^{-14}$ М АТФ при использовании АТФ-реактанта в желатиновых пленках и в растворе в присутствии 5%-й желатины и в ее отсутствие соответственно. Показано, что хранение АТФ-реактанта при 22° в желатиновом геле не только сохраняет ферментативную активность, но и защищает фермент от бактериального загрязнения, следствием чего является потеря активности люциферазы.

Ключевые слова: люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, АТФ-реактант, стабильность, термоинактивация, активность, желатина, гель.

Люцифераза светляков катализирует реакцию окисления субстрата (люциферина) кислородом воздуха в присутствии аденозин-5'-фосфата (АТФ) и ионов магния, которое сопровождается эмиссией видимого света – биолюминесценцией [1]. Фермент имеет большое биоаналитическое значение, в частности, широко используется для быстрого количественного определения АТФ в интервале концентраций от микро- до пикомолярных [2]. Анализируемые образцы помимо АТФ могут содержать различные белковые и небелковые компоненты, и очень важно установить, насколько эти компоненты влияют на свойства, стабильность и аналитические характеристики люциферазы. В этой связи представляло интерес выяснить влияние такого белка как желатина на активность и стабильность люциферазы светляков. Желатина – это смесь природных линейных полипептидов, образующихся в результате частичного гидролиза коллагена. Она способна образовывать термообратимые гидрогели [3], в пространственную структуру которых можно включить высоко- и низкомолекулярные компоненты, участвующие в биолюминесцентной реакции. Цель данной

работы состояла в изучении влияния желатины в концентрации, превышающей критическую концентрацию гелеобразования, на физико-химические свойства и аналитические характеристики люциферазы в составе АТФ-реактанта.

Материалы и методы

Использованные вещества и растворы. Использовали АТФ-реактант («Люмтек», Россия), желатину «Medium gel strength 48722, 180 Bloom» («Fluka», Германия), аденозин-5'-трифосфат (АТФ), динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), («Sigma», США), трис-(оксиметил)-аминометан (трис), сульфат магния («MP Biomedicals», США). Деионизованную воду получали с помощью системы очистки воды («Labconco», США).

Раствор АТФ (10^{-7} М) готовили в 0,05 М трис-ацетатном буферном растворе, содержащем 2 мМ ЭДТА, 10 мМ $MgSO_4$, pH 7,8 (далее – буфер), непосредственно перед использованием. Раствор желатины (5%) готовили в том же буфере. Навеску желатины вносили в буфер, инкубировали

при комнатной температуре в течение 15 мин для набухания, нагревали до 80° при перемешивании до полного растворения желатины. Полученный прозрачный раствор охлаждали до 30°. Использовали АТФ-реагент («Люмтек») – коммерческий препарат, в состав которого входят термостабильная мутантная люцифераза светляков *Luciola mingrelica*, люциферин, соли магния, компоненты буферного раствора, белковые и небелковые стабилизаторы [4]. При приготовлении раствора во флакон с лиофилизированным АТФ-реагентом вносили 4 мл буфера или 4 мл 5%-го раствора желатины в буфере, предварительно нагретых до 30°, и инкубировали при 30° до тех пор, пока фоновая интенсивность биолюминесценции ($I_{\text{фон}}$) не снижалась до 100 усл. ед./с и менее. Для включения АТФ-реагента в желатиновые пленки 25 мкл АТФ-реагента в 5%-м растворе желатины, полученного, как описано выше, вносили на дно полистирольной микрокюветы (диаметр 5 мм) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Приготовленные желатиновые пленки хранили при комнатной температуре под крышкой.

Определение активности АТФ-реагентов в растворе проводили при 30°. В люминометрическую микрокювету объемом 0,3 мл вносили 50 мкл раствора АТФ-реагента, добавляли 50 мкл 10^{-7} М раствора АТФ и измеряли интегральную интенсивность биолюминесценции в видимой области спектра (370–630 нм) каждые 0,2 с на люминиметре «Femtomaster FB 12» («Zylix corp.», США) в течение 1 мин. Линейный диапазон измерения составлял от 1 до 10^7 усл. ед./с. При определении величины $I_{\text{фон}}$ раствора АТФ-реагента измерения проводили, как описано выше, но вместо раствора АТФ вносили 50 мкл высокоочищенной воды. Активность АТФ-реагента, включенного в желатиновые пленки, измеряли при комнатной температуре. На пленку наслаивали 50 мкл 10^{-7} М раствора АТФ и измеряли интенсивность биолюминесценции в течение 5 мин. За меру активности люциферазы принимали величину максимальной интенсивности биолюминесценции ($I_{\text{макс}}$, усл. ед./с). Измерения повторяли не менее трех раз.

Термоинаktivация АТФ-реагентов в растворе желатины. По 0,2 мл раствора АТФ-реагента вносили в микропробирки, которые помещали в ячейки твердотельного термостата «Гном» («ДНК-технология», Россия) и инкубировали при температуре 45, 47 и 50°. Через определенные промежутки времени отбирали по одной микропробирке. Про-

бирки центрифугировали на центрифуге «Minispin» («Eppendorf», Германия), затем охлаждали до температуры 30° в течение 15 мин и определяли активность АТФ-реагентов, как описано выше. Константу термоинаktivации ($k_{\text{ин}}$) рассчитывали по тангенсу угла наклона кинетической кривой термоинаktivации в координатах $(\ln I/I_0)-(t)$. Энергию активации процесса термоинаktivации ($E_{\text{акт}}$) находили по тангенсу угла наклона прямой, построенной в координатах Аррениуса $(\ln k_{\text{ин}})-(1/T)$.

Стабильность АТФ-реагентов при хранении в геле желатины. По 0,15 мл растворов АТФ-реагентов с температурой 30° вносили в микропробирки вместимостью 1,5 мл и инкубировали при 0 и 22° в течение 10 сут. Через определенные промежутки времени отбирали микропробирку с АТФ-реагентом, нагревали 20 мин при 30° для плавления геля и измеряли активность АТФ-реагента. Микрокюветы с желатиновыми пленками хранили при 22°. Через определенные промежутки времени отбирали по две микрокюветы и измеряли активность люциферазы.

Построение градуировочных зависимостей. Исходный раствор АТФ последовательно разбавляли буфером, получая растворы АТФ с концентрацией в интервале от $5 \cdot 10^{-8}$ до 10^{-11} М. Для каждого раствора АТФ величину $I_{\text{макс}}$ определяли по три раза, как описано выше для определения активности АТФ-реагента. Градуировочную зависимость $I_{\text{макс}}$ от концентрации АТФ строили в логарифмических координатах.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Origin 6. Чувствительность метода оценивали по тангенсу угла наклона зависимости $I_{\text{макс}}$ от концентрации АТФ. Специфичность метода характеризовали коэффициентом корреляции r , предел обнаружения $c_{\text{нижн}}$ рассчитывали по значениям фонового сигнала (для $n = 5$). Предел обнаружения АТФ и нижнюю границу определяемого содержания вычисляли по формулам:

$$c_{\text{мин}} = \frac{3 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^5 (x_i - x_{\text{ср}})^2}{4}}}{\text{tg } \alpha},$$

$$c_{\text{нижн}} = 3 \cdot c_{\text{мин}},$$

где $x_{\text{ср}}$ – среднее значение фонового сигнала, $\text{tg } \alpha$ – угол наклона градуировочного графика в координатах $I_{\text{макс}}-c_{\text{АТФ}}$.

Результаты и их обсуждение

В данной работе мы использовали лиофилизированный коммерческий препарат – АТФ-реагент, в состав которого входит термостабильная мутантная люцифераза светляков *L. mingrelica* [5], что позволило проводить измерения при 30°. Кроме того, АТФ-реагент содержит все компоненты, необходимые для биолюминесцентной реакции, за исключением АТФ. Перед использованием во флакон с лиофилизированным препаратом АТФ-реагента добавляли 4 мл жидкости, чтобы получить раствор АТФ-реагента, готовый для измерения концентрации АТФ в анализируемом образце. В данной работе для растворения АТФ-реагента мы использовали буфер, состав которого указан выше, и тот же буфер, но содержащий еще 5% желатины, для выявления того, как введение в раствор АТФ-реагента достаточно высокой концентрации белка может изменить его свойства. Тем самым мы моделировали ситуацию, когда АТФ-реагент используется для определения АТФ в гомогенатах клеток с высоким содержанием белка [6]. Получаемый раствор АТФ-реагента содержал 1,6 мкМ люциферазы, 0,5 мМ люциферина и 20 мМ сульфата магния.

Предварительно было изучено влияние концентрации желатины на реологические характеристики образующегося геля. Концентрацию желатины варьировали от 0,2 до 5%. Оказалось, что при температуре ниже 30° уже при концентрации 5% образуется нетекучий желатиновый гель, который плавится при повышении температуры и сохраняется в виде раствора при $\geq 30^\circ$, поэтому повышение концентрации желатины было нецелесообразным. Процессы плавления и гелеобразования не оказывали существенного влияния на активность АТФ-реагента, поэтому дальнейшую работу проводили с использованием 5%-й желатины.

Активность АТФ-реагента в растворе. Для свежеприготовленных растворов АТФ-реагента в буфере и в растворе желатины наблюдали высокую фоновую интенсивность биолюминесценции ($I_{\text{фон}}$). Это было обусловлено примесями АТФ как в буфере, так и в желатине. Величина $I_{\text{фон}}$ соответствовала концентрации примесного АТФ в образце желатины 10^{-13} моль/мг. Для снижения величины $I_{\text{фон}}$ растворы АТФ-реагента инкубировали при 30° до тех пор, пока величина $I_{\text{фон}}$ не становилась ниже 100 усл. ед./с. Для раствора АТФ в буфере такая величина достигалась через ~20 мин, а для растворов АТФ-реагента в желатине – только через 3 ч.

За это время инактивация АТФ-реагента в буфере составила всего 8%. Таким образом, длительная инкубация АТФ-реагента при 30°, необходимая для снижения величины $I_{\text{фон}}$, не приводит к ощутимой потере его активности.

Далее были получены зависимости величины $I_{\text{макс}}$ для растворов АТФ-реагента при различных концентрациях АТФ. Для одной и той же концентрации АТФ величины $I_{\text{макс}}$ для АТФ-реагента в буфере были на $25 \pm 2\%$ выше, чем для АТФ-реагента в буфере с желатиной. Следовательно, высокие концентрации желатины несколько ингибируют активность люциферазы. За 1 мин падение интенсивности биолюминесценции независимо от концентрации АТФ составило 18% в отсутствие желатины и 8% в ее присутствии. Таким образом, присутствие желатины значительно увеличивает стабильность регистрируемого светового сигнала.

Активность АТФ-реагента в желатиновых пленках. Достоинством использования желатинового геля является возможность формирования тонких пленок, содержащих АТФ-реагент. Эти пленки можно применять в тест-системах для определения АТФ, что существенно упрощает процедуру анализа. Для того чтобы сформировать желатиновые пленки, содержащие АТФ-реагент, вносили по 25 мкл АТФ-реагента с желатиной в микрокуветы из полистирола с плоским дном, которые затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. При измерении активности АТФ-реагента на поверхность пленки наносили 50 мкл раствора АТФ и регистрировали интенсивность биолюминесценции при 22°. Для желатиновых пленок зависимости интенсивности биолюминесценции от времени имели вид кривой с насыщением, характерной для гетерогенных систем. Максимальная величина интенсивности ($I_{\text{макс}}$) достигалась через ~3 мин. Это время требуется, по-видимому, для смачивания поверхностного слоя желатины и диффузии АТФ к иммобилизованной люциферазе. После достижения $I_{\text{макс}}$ интенсивность биолюминесценции остается неизменной по крайней мере в течение последующих 20 мин. Для пленок абсолютные величины $I_{\text{макс}}$ были в ~5 раз ниже, чем для растворов АТФ-реагента. Это объясняется тем, что не весь иммобилизованный фермент доступен для контакта с АТФ и измерения проводили при более низкой (22°) температуре, чем при работе с растворами АТФ-реагента.

Градуировочные зависимости $I_{\text{макс}}$ от концентрации АТФ были получены в интервале концентраций

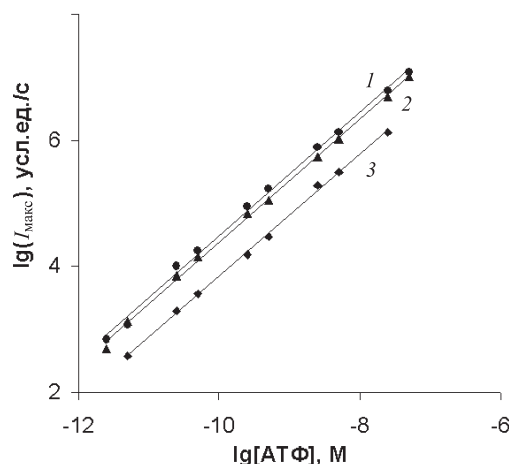


Рис. 1. Градуировочные зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации АТФ для АТФ-реагентов в буферном растворе при 30° в отсутствие желатины (1), в присутствии 5% желатины (2) и при 22° в составе желатиновых пленок (3). Состав буфера: 0,05 М трис-ацетатный буферный раствор, содержащий люциферин (0,5 мМ) и сульфат магния (20 мМ), ЭДТА (3 мМ), рН 7,8

АТФ в реакционной смеси от 10^{-12} до $0,5 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 1). Для получения градуировочных зависимостей $I_{\text{макс}}$ от [АТФ] регистрировали значение биолюминесцентного сигнала ($I_{\text{макс}}$) после добавления 50 мкл раствора АТФ различной концентрации к 50 мкл АТФ-реагента в растворе или на поверхность пленки. Для растворов АТФ-реагента и для желатиновых пленок полученные зависимости описывались линейным уравнением:

$$\lg(I_{\text{макс}}) = a + b \cdot \lg[\text{АТФ}, \text{М}].$$

Значения коэффициентов уравнения для $n = 10$ представлены в табл. 1. Чувствительность АТФ-реагентов, характеризуемая значением коэффициента

b , высока (свыше 0,96) и мало зависит от присутствия желатины в реакционной смеси и агрегатного состояния дисперсной системы. Предел обнаружения АТФ, зависящий от величины фонового свечения, составил $2 \cdot 10^{-12}$ М АТФ для желатиновых пленок, $7 \cdot 10^{-13}$ М АТФ для АТФ-реагента в буфере, содержащем 5% желатины, и $7 \cdot 10^{-14}$ М АТФ для АТФ-реагента в буфере. Следовательно, добавка желатины в раствор АТФ-реагента и иммобилизация АТФ-реагента в желатиновых пленках не оказывают существенного влияния на аналитические характеристики АТФ-реагента и позволяют эффективно его использовать для количественного определения АТФ вплоть до фемтомолярных концентраций.

Термостабильность АТФ-реагентов была изучена при температурах 45, 47 и 50°. Кинетические кривые инактивации показывают (рис. 2), что во всех случаях процесс протекает по первому порядку. При 45° в присутствии желатины на кинетических кривых наблюдался индукционный период длительностью 0,75 ч (рис. 3). Это можно объяснить существованием активных промежуточных форм комплекса люциферазы и желатины, которые образуются в результате разрыва многоточечных межмолекулярных нековалентных связей между молекулами фермента и желатины. Далее инактивация протекает по первому порядку. Для АТФ-реагента в присутствии желатины величины $k_{\text{ин}}$ увеличились в ~1,3 раза, значения энергий активации практически не различались (табл. 2).

Стабильность АТФ-реагентов при хранении была изучена при 4 и 22°. В этих условиях АТФ-реагент в буфере находился в виде раствора, а АТФ-реагент в буфере, содержащем 5% желатины, – в виде геля. Перед измерением активности

Таблица 1

Коэффициенты уравнения градуировочных зависимостей для определения АТФ в логарифмических координатах для АТФ-реагентов в присутствии и в отсутствие желатины: $\lg(I_{\text{макс}}) = a + b \cdot \lg[\text{АТФ}, \text{М}]$ ($n = 10, P = 0,95$)

Количественные характеристики	АТФ-реагент в буфере при 30°С		АТФ-реагент в желатиновой пленке, 22°С
	в отсутствие желатины	в присутствии 5 % желатины	
a	14,29±0,02	14,14±0,03	13,51±0,01
b	0,98±0,01	0,97±0,01	0,96±0,01
r	0,999	0,998	0,999

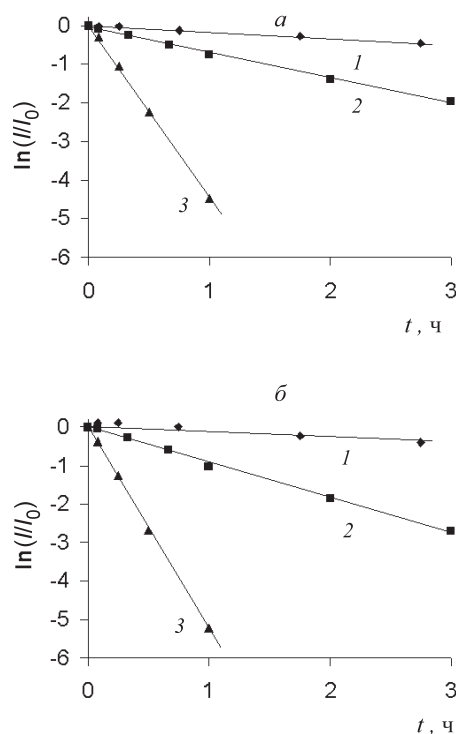


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации АТФ-реагента в полулогарифмических координатах в отсутствие желатины (а) и в присутствии 5% желатины (б) при температуре, °С: 1 – 45, 2 – 47 и 3 – 50. Концентрация люциферазы $1,6 \cdot 10^{-6}$ М. Состав буферного раствора тот же, что приведен в подписи к рис. 1

АТФ-реагенты нагревали до 30° и измеряли активность, как описано выше. Через 15 сут хранения при 4° остаточная активность АТФ-реагентов в геле и в растворе была одинаковой ($78 \pm 2\%$ от начальной) при среднесуточной потере активности $1,5 \pm 0,2\%$. Инактивация фермента при 4° протекала по первому порядку и не зависела от того, находится фермент в буферном растворе или включен в желатиновый гель.

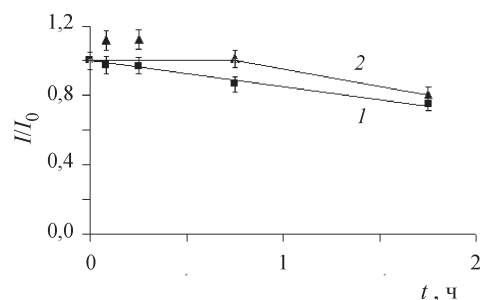


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации в отсутствие желатины (1) и в присутствии 5% желатины (2) при 45° . Концентрация люциферазы $1,6 \cdot 10^{-6}$ М. Состав буферного раствора тот же, что приведен в подписи к рис. 1

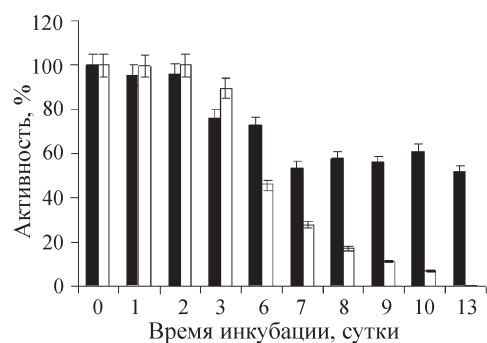


Рис. 4. Стабильность АТФ-реагентов при хранении (22°) в 5%-м желатиновом геле (темный фон) и в буферном растворе (светлый фон). Состав буферного раствора тот же, что приведен в подписи к рис. 1

При 22° наблюдалась иная картина (рис. 4). В течение первых трех суток инкубации оба АТФ-реагента полностью сохраняли ферментативную активность. В последующие дни активность АТФ-реагента резко снижалась в растворе и плавно – в геле желатины. Через 13 сут хранения растворимый АТФ-реагент полностью терял активность, в то

Таблица 2

Константы скорости термоинактивации ($k_{ин}$) АТФ-реагента в буферном растворе в присутствии и в отсутствие желатины при разных температуре и энергии активации

АТФ-реагент в буфере	$k_{ин}, \text{ч}^{-1}$ при температуре, °С			$E_{акт}$ кДж/моль
	45	47	50	
В отсутствие желатины	$0,17 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,05$	$4,45 \pm 0,10$	556 ± 18
В присутствии 5% желатины	$0,19 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,07$	$5,22 \pm 0,12$	561 ± 21

время как АТФ-реагент, включенный в желатиновый гель, сохранял 50% активности. Таким образом, включение АТФ-реагента в желатиновый гель способствует сохранению активности фермента при комнатной температуре. Возможно, жесткая структура матрикса, образуемого линейными цепями желатины, ограничивает подвижность молекул фермента и способствует поддержанию его активной конформации [7]. Кроме того, большое значение, как мы показали, имеет защитное действие геля желатины от микробного загрязнения, которое приводит к разрушению молекул люциферазы под действием микроорганизмов. Действительно, инку-

бация при комнатной температуре АТФ-реагента в растворе приводит к росту фоновой интенсивности свечения, которая обусловлена ростом микробных клеток в растворе. Через трое суток величина $I_{\text{фон}}$ увеличилась в 20 раз. Хранение АТФ-реагента в желатиновом геле в течение двух недель не приводит к увеличению фонового свечения, что свидетельствует об отсутствии размножения микроорганизмов в образце. Таким образом, хранение АТФ-реагента в составе желатинового геля не только способствует сохранению ферментативной активности, но и обеспечивает защиту фермента от бактериального заражения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-00698-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seliger H.H., McElroy W.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1960. **88**. P. 136.
2. Угарова Н. Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 1993. **29**. С. 180.
3. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. // Структурообразование в белковых системах. М., 1976.
4. Ugarova N. N., Koksharov M. I., Lomakina G. Y. // PCT Patent Appl. WO 2010/134850.
5. Кошкиаров М.И., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. № 1. С. 23.
6. Allie I., Gandelman O., Dementieva E., Ugarova N., Cobbold P. // Biochem. J. 1996. **319**. P. 463.
7. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашиов А.В. и др. // Иммуобилизованные ферменты. М., 1987.

Поступила в редакцию 20.09.11

EFFECT OF GELATIN ON PROPERTIES OF *Luciola mingrelica* FIREFLY LUCIFERASE

G.Yu. Lomakina, A.E. Bezrukih, N.N. Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

The ATP-reagent, including mutant thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase, luciferin, MgSO_4 , buffer components and stabilizers are widely used to assay nano- and picomolar concentrations of adenosine-5'-triphosphate (ATP) in various biological samples. The aim of this study was to estimate activity, stability and analytical characteristics of the ATP-reagent in water and gelatin solutions and in gelatin gel. At 5% gelatin, we had ATP-reagent solution at temperatures $\geq 30^\circ$. Below 30° the gelatin gel was formed, and thin films with ATP-reagent were prepared. So, the ATP-reagent solutions were studied at 30° , whereas in gelatin films it was assayed at 22° . The gelatin additives were shown to decrease slightly activity and stability of luciferase. The sensitivity of ATP assay (over 0.96) did not depend on gelatin presence and aggregate state of the disperse system. The detection limits were $2 \cdot 10^{-12}$, $7 \cdot 10^{-13}$, $7 \cdot 10^{-14}$ M ATP for ATP-reagent in gelatin films, in solution in the presence of 5% gelatin and in its absence, correspondently. The storage of ATP-reagent at 22° in gelatin gel not only conserved the enzyme activity but protected the enzyme from bacterial contamination.

Key words: firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, ATP-reagent, stability, thermal inactivation, activity, gelatin, gel.

Сведения об авторах: Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com); Безруких Анна Евгеньевна – студентка 5 курса ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»; Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (ugarova@gmail.com).