

УДК 577.158.54

СТАБИЛИЗАЦИЯ АТФ-РЕАГЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЛЮЦИФЕРАЗУ СВЕТЛЯКОВ *L. mingrelica*, В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИОЛОВ

Н.А. Мороз, Д.Я. Гурский, Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии; e-mail: nam69@mail.ru)

Получены АТФ-реагенты, содержащие 2–20% этиленгликоля, глицерина и ПЭГ-8000. Полиолы ингибировали активность АТФ-реагентов на 20–40%, а добавки 0,75 мМ Тритона X-100 предотвращали это ингибирование. Оптимальная концентрация полиолов составила 10%. Исследование кинетики термoinактивации АТФ-реагентов в растворе при 37, 20 и 4°C показало, что при всех изученных температурах полиолы повышали стабильность АТФ-реагентов в растворе в 2–5 раз. Раствор АТФ-реагентов при хранении (4°C) в течение 180 ч сохранял 100%-ю активность, а период полуинактивации составил 15 сут.

Люцифераза светляков катализирует реакцию окисления субстрата (люциферина) кислородом воздуха в присутствии аденозин-5-трифосфата (АТФ) и ионов магния. Эта реакция сопровождается эмиссией видимого света – биолюминесценцией [1]. Интерес к данному биолюминесцентному процессу связан не только с изучением механизмов перехода энергии биохимической реакции в световую, но и с его большим практическим значением. Высокая чувствительность люциферазы светляков к АТФ, близкий к единице квантовый выход реакции и простота регистрации ферментативной активности обусловили возможность создания эффективного и быстрого метода определения ультрамалых количеств АТФ. Биолюминесцентная АТФ-метрия находит все более широкое применение в биохимии, медицине, биотехнологии и при мониторинге окружающей среды [2].

Для биоаналитического применения используются так называемые АТФ-реагенты, представляющие собой лиофилизированные многокомпонентные смеси, содержащие растворимую рекомбинантную люциферазу светляков, люциферин, компоненты буферного раствора, необходимые для протекания биолюминесцентной реакции, и стабилизирующие добавки [3]. Источником АТФ для данной системы является тестируемый образец. В последнее время в биотехнологии наблюдается тенденция к использованию реагентов в растворе. Это позволяет не только упростить процедуру проведения анализа, но и исключить из процесса получения АТФ-реагента дорогостоящую, энергоемкую и длительную стадию – лиофилизацию. Довольно высокое содержание гидрофобных амино-

кислотных остатков и преобладание β -слоев во вторичной структуре люциферазы определяют ее низкую стабильность в водных растворах особенно при повышенных температурах [4]. Инактивация люциферазы происходит в основном за счет агрегации молекул фермента [5] и адсорбции на поверхности [6, 7]. Известно, что наиболее часто и успешно в качестве стабилизаторов ферментов в растворе используют олигосахариды [8], альбумин [7], неионные детергенты и полиолы [9].

Цель настоящей работы состояла в следующем: изучить возможность использования различных полиолов для увеличения длительности хранения АТФ-реагентов в растворе с максимальным сохранением ферментативной активности люциферазы и оптимизировать состав водорастворимой стабилизирующей композиции, содержащей полиолы.

Материалы и методы

Использованные вещества и растворы. Использовали D-люциферин (“Люмтек”, Россия), аденозин-5-трифосфат (АТФ), дитиотреитол (ДТТ), трис-(оксиметил)-аминометан, сульфат магния (“MP Biomedicals”, США); динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), бычий сывороточный альбумин (БСА), полиэтиленгликоль (ПЭГ-8000) (“Sigma”, США); Тритон X-100 (“Merck”, Германия); свежеперегнанные этиловый спирт, этиленгликоль, глицерин (“Химмед” Россия), деионизованную воду, полученную на установке “Milli-Q” (“Millipore”, Франция).

Рекомбинантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* выделяли из клеток *E. coli* (штамм

LE392), несущих плазмиду pLR, очищали до гомогенного состояния по методу [10] и хранили при -70°C .

Получение АТФ-реагентов. Исходный концентрированный раствор люциферазы разбавляли до концентрации фермента 0,1 мг/мл 0,1 М Трис-ацетатным буферным раствором (рН 7,8), содержащим 20 мМ MgSO_4 , 2 мМ ЭДТА, 1 мМ LH_2 , 5 мМ ДТТ, 180 мг/мл сахарозы (контрольный АТФ-реагент) и различные полиолы – этиленгликоль, ПЭГ-8000, глицерин (2–20 об.%). Медленно перемешивали, не допуская образования пены, затем фильтровали через стерильный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Полученные АТФ-реагенты выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч для выгорания фонового сигнала до 5–10 усл. ед. В каждой серии экспериментов использовали свежеприготовленные АТФ-реагенты.

Измерение активности люциферазы в растворе. В кювету помещали 0,4 мл 0,05 М Трис-ацетатного буферного раствора (рН 7,8), содержащего 2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO_4 , 0,3 мл 4 мМ раствора АТФ в том же буфере и 0,1 мл раствора люциферазы. Измеряли фоновое свечение, затем быстро с помощью инжектора вводили 0,3 мл 1 мМ раствора D-люциферина в том же буфере и регистрировали на люминометре “Femtomaster FB 12” (“Zylyx Corp.”, Германия) максимальную интенсивность биолюминесценции, пропорциональную скорости ферментативной реакции. Активность люциферазы выражали в условных единицах (1 усл. ед./мл = 1 мВ = 10^9 квант/с).

Измерение сигнала биолюминесценции для АТФ-реагентов. Люминометрическую микрокювету объемом 0,3 мл при помощи пинцета помещали в кюветное отделение микролюминометра “3560” (“New Horizons Diagnostic Corp.”, США) и вносили в нее по 50 мкл раствора АТФ-реагента и 10^{-8} М раствора АТФ в воде. Содержимое кюветы быстро и тщательно перемешивали, кюветное отделение закрывали и измеряли сигнал биолюминесценции. Измерения повторяли не менее двух раз.

Термоинаktivация АТФ-реагентов. Растворы АТФ-реагентов инкубировали при температуре 37, 20 и 4°C на термостате “Гном” (НПФ “ДНК-Технология”, Россия). Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (100 мкл) раствора АТФ-реагента и измеряли сигнал биолюминесценции, как описано выше. Измерения сигнала биолюминесценции для АТФ-реагентов, инаktivированных при 37°C , проводили после дополнительной инкубации отобранных аликвот на льду в течение 10 мин.

Результаты и их обсуждение

Влияние полиолов на активность АТФ-реагентов. Были получены образцы АТФ-реагентов, в состав которых наряду со стандартными компонентами буферной системы (люцифераза, D-люциферин, сульфат магния и сахароза) входили такие полиолы, как этиленгликоль, глицерин и ПЭГ-8000. Концентрация активной люциферазы в составе изученных АТФ-реагентов составляла 0,1 мг/мл. Концентрацию полиолов варьировали от 2 до 20%. Биолюминесцентную реакцию инициировали добавлением к раствору АТФ-реагента 10^{-8} М раствора АТФ в воде. В присутствии полиолов активность АТФ-реагентов снижалась на 20–40% по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). Известно [12], что активность люциферазы повышается в присутствии неионных мицеллообразующих ПАВ за счет включения люциферазы и ее субстрата – люциферина – в мицеллы, что увеличивает эффективность их взаимодействия. Действительно, удельная активность АТФ-реагентов, содержащих в качестве дополнительного компонента 0,75 мМ Тритон X-100, увеличивалась на 15–20 % независимо от типа используемого полиола (рис. 1). Кроме того, добавки полиолов на ~20% увеличили стабильность сигнала биолюминесценции (рис. 2), что повышает точность анализа.

Через 70 мин инкубации при 37°C самая высокая остаточная активность (более 70%) наблюдалась у АТФ-реагентов, содержащих полиолы в концентрации 10% (таблица), в то время как активность контрольного АТФ-реагента составляла всего 13%. При увеличении концентрации этиленгликоля и глицерина до 20% активность АТФ-реагентов уменьшалась в 2 раза, а 20% ПЭГ-8000 практически полностью инаktivировал АТФ-реагент. По-видимому, при высоких концентрациях полиолов возрастает вязкость раствора, вследствие чего уменьшается доступность активного центра люциферазы для обоих субстратов. Наблюдаемое уменьшение скорости ферментативной реакции может происходить как за счет затруднения диффузии, так и за счет замедления конформационных переходов фермента, которые необходимы при образовании фермент-субстратного комплекса [13]. Таким образом, для изучения кинетики термоинаktivации были выбраны АТФ-реагенты, содержащие 10% этиленгликоля, глицерина или ПЭГ-8000.

Кинетика термоинаktivации АТФ-реагентов при различных температурах. Кинетические кривые термоинаktivации АТФ-реагентов при температу-

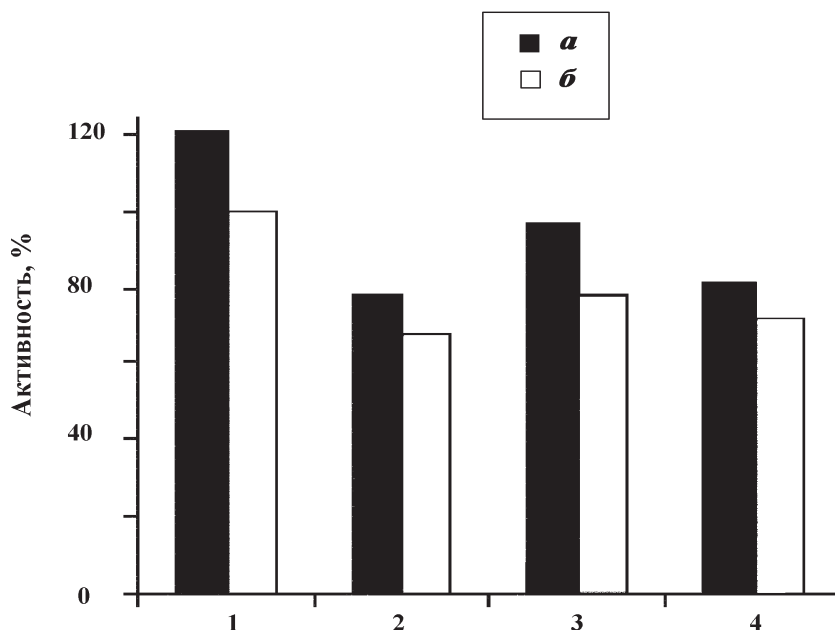


Рис. 1. Удельная активность АТФ-реагентов при 20°C в отсутствие (а) и в присутствии (б) Тритона X-100: 1 – контрольный; 2, 3, 4 – АТФ-реагенты, содержащие этиленгликоль, глицерин и ПЭГ-8000 соответственно

рах 37, 20 и 4°C представлены на рис. 3. Форма кинетических кривых не подчиняется первому порядку и изменяется в зависимости от температуры инкубирования. При 37°C на всех кинетических кривых наблюдаются две стадии инактивации – быстрая и медленная (рис. 3, а). В присутствии полиолов снижалась скорость инактивации на быстрой стадии, а скорость медленной стадии инактивации практически не изменялась. Наибольший стабилизирующий эф-

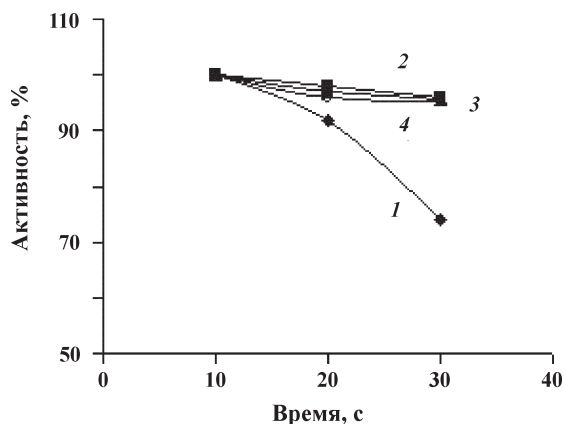


Рис. 2. Стабильность биоломинесцентного сигнала в процессе измерения для АТФ-реагентов различного состава: 1 – контрольный АТФ-реагент; 2, 3, 4 – АТФ-реагенты, содержащие этиленгликоль, глицерин и ПЭГ-8000 соответственно

фект проявился в присутствии этиленгликоля. Через 1 ч сохранялось 80% активности, тогда как для контрольного АТФ-реагента – всего 20%. При 20°C в течение 18 ч в присутствии ПЭГ и этиленгликоля сохранялось 90% активности по сравнению с 60% для контрольного АТФ-реагента (рис. 3, б). После индукционного периода инактивация ускорялась, тем не менее через 40 ч АТФ-реагенты, содержащие полиолы, сохраняли 40–70% активности, а контрольный АТФ-реагент – только 25%. При 4°C период индукции со 100%-м сохранением активности АТФ-реагентов в присутствии полиолов увеличивался до 200 ч, тогда как для контрольного АТФ-реагента этот период был в 2 раза короче (рис. 3, в). Через неделю хранения исследуемые АТФ-реагенты сохраняли 40% активности, что в 5 раз превышает остаточную активность контрольного АТФ-реагента в аналогичных условиях.

Таким образом, проведенные исследования показали перспективность использования в качестве стабилизаторов рекомбинантной люциферазы светлячков в растворе полиолов (этиленгликоля, глицерина и ПЭГ-8000), позволяющих повысить эффективность метода биоломинесцентной АТФ-метрии. Наиболее выгодным с экономической точки зрения является применение этиленгликоля.

Остаточная активность АТФ-реагентов после инкубирования при 37°C в течение 70 мин

Концентрация полиола, %	% от исходной активности			
	контроль	этиленгликоль	глицерин	ПЭГ-8000
0	13	–	–	–
2	–	66	54	53
5	–	74	61	67
10	–	76	71	75
20	–	47	46	3

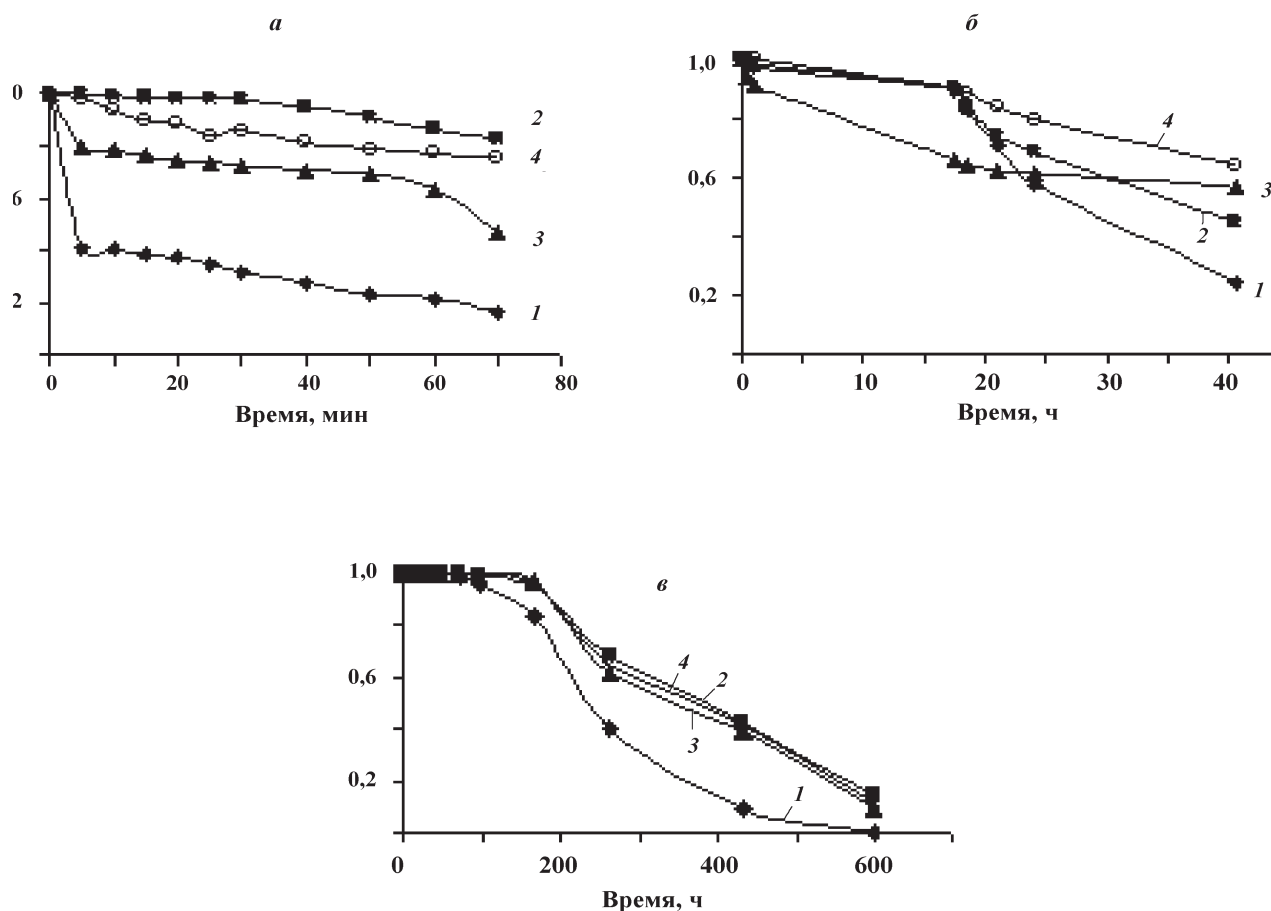


Рис. 3. Термоинактивация АТФ-реагентов, содержащих 10% полиолов при 37°C (*a*), 20°C (*б*) и 4°C (*в*): 1 – контрольный АТФ-реагент; 2, 3, 4 – АТФ-реагенты, содержащие этиленгликоль, глицерин и ПЭГ-8000 соответственно

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seliger H.H., McElroy W.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1960. **88**. P. 136.
2. Угарова Н. Н., Фрунджян В. Г. // Применение биолюминесценции АТФ-метрии в биоаналитических целях. М., 2003.
3. Угарова Н.Н., Малошенок Л.Г., Мороз Н.А., Ломакина Г.Ю. Пат. № 2268943. М., 27.01.2006.
4. Herbst R., Gast K., Seckler R. // Biochemisrty. 1998. **37**. P. 6586.
5. Shimomura O., Goto T., Johnson F.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. **74**. P. 2799.
6. Hlady V., Yeh P.-Y., Andrade J.D. // J. Fluorescence. 1991. **1**. P. 47.
7. Suelter C.H., DeLuca M. // Anal. Biochem. 1983. **135**. P. 112.
8. Kaushik J. K., Bhat R. // J. Biol. Chem. 2003. **278**. P. 26458.
9. Back J. F., Oakenfull D., Smith M.B. Biochemistry. 1979. **18**. N 23. P. 5191.
10. Lundovskikh I.A., Leontieva O.V., Dementieva E.I., Ugarova N.N. // Proc. of the 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. "Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for the 21 Century". 1998. Chichester / Eds. A.K. Campbell, L.J. Kricka, P.I. Stanley / 1998. P. 420.
11. Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1980. **45**. № 5. С. 794.
12. Kricka L. G., DeLuca M. // Arch. Biochem. Biophys. 1982. **217**. N 2. P. 674.
13. DeLuca M., Marsh M. // Arch. Biochem. Biophys. 1967. **121**. N 1. P. 233.

Поступила в редакцию 23.11.07

STABILIZATION OF ATP-REAGENTS CONTAINING FIREFLY LUCIFERASE *LUCIOLA MINGRELICA* BY POLYOLS

N.A. Moroz, D.Ya. Gursky, N.N. Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

ATP-reagents containing 2–20 % of ethylene glycol, glycerol, or PEG-8000 were prepared. The 20–40 % decrease of the ATP-reagent's activity in the presence of polyols was demonstrated, it was prevented by adding of 0.75 mM Triton X-100. Concentration of polyols 10 % was found to be optimal. Kinetics of thermoinactivation of ATP-reagents in the presence of polyols at 37, 20 and 4°C was investigated. At all temperatures, the stability of ATP-reagents in the presence of polyols was increased 2–5 times in comparison with that of standard ATP-reagent. The solutions of the stabilized ATP-reagents may be stored at 4°C for 180 h without loss of activity. The ATP-reagents activity half-life under these conditions was higher then two weeks.