

УДК 577.332.23

Биоаналитическое применение биолюминесцентных тест-систем на основе люциферазы светляка *Luciola mingrelica*

Ломакина Галина Юрьевна^(*)

lomakinagalina@yahoo.com

SPIN-код: 8571-9657

Угарова Наталья Николаевна

nugarova@gmail.com

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. Рассмотрены теоретические аспекты функционирования биолюминесцентной системы светляков и предложена методология для создания универсальных биолюминесцентных тест-систем на основе люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее модифицированных форм для биоаналитических целей. Приведены примеры быстрого количественного определения жизнеспособности микроорганизмов по содержанию АТФ. Описаны тест-системы для быстрой оценки эффективности и механизма действия внешних стимулов на живые организмы. Показана возможность использования активных конъюгатов люциферазы с биоспецифичными белками в различных схемах биолюминесцентного ИФА.

Ключевые слова: люцифераза светляков, биолюминесценция, микроорганизмы, химическая модификация

Bioanalytical application of bioluminescent test systems based on *Luciola mingrelica* firefly luciferase

Lomakina Galina Yurievna^(*)

lomakinagalina@yahoo.com

SPIN-code: 8571-9657

Ugarova Natalia Nikolaevna

nugarova@gmail.com

Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Abstract. Theoretical aspects of the functioning of the firefly bioluminescent system are considered and a methodology for creating universal bioluminescent test systems based on firefly luciferase *L. mingrelica* and its modified forms for bioanalytical purposes is proposed. Examples of rapid quantitative determination of microorganism viability by the content of ATP are given. Test systems for studying the effect of external stimuli on living organisms are described. The possibility of using active luciferase conjugates with biospecific proteins in various schemes of bioluminescent ELISA is shown.

Keywords: firefly luciferase, bioluminescence, microorganisms, chemical modification

Введение. Биолюминесцентная реакция окисления D-люциферина кислородом воздуха, катализируемая люциферазой светляков протекает в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) открывает широкие возможности для быстрого количественного определения АТФ [1] и люциферазы [2, 3]. Цель данной работы продемонстрировать различные области применения биолю-

минесцентной системы люциферин — люцифераза светляков для решения сложных аналитических научно-практических задач.

Методы и материалы; результаты. Биолуминесцентная АТР-метрия — это быстрый метод количественного определения численности клеток и их метаболической активности. Предложен и успешно валидирован метод быстрого количественного определения жизнеспособности медленно растущей вакцины БЦЖ на основе живого штамма *Micobacterium bovis*, позволивший сократить время анализа с 28 суток до 10–60 мин.

Приведены примеры тест-систем на основе живых прокариотических и эукариотических клеток, продуцирующих термостабильную люциферазу для изучения кинетики изменения содержания АТР и люциферазы внутри и вне клеток в присутствии внешних стимулов уже на начальной стадии действия эффектора для определения жизнеспособности, проницаемости клеточной мембраны, активности АТР-синтазы и рибосом.

Разработанный универсальный метод получения конъюгатов люциферазы с биоспецифичными белками успешно использован в различных схемах иммуноферментного анализа. Для специфического выявления клеток *Salmonella* разработан псевдо-гомогенный биолуминесцентный иммуноферментный анализ с использованием новой матрицы для захвата аналита.

Обсуждение. Высокая активность термостабильность различных мутантных форм люциферазы позволяет создавать различные высокочувствительные тест-системы для биоаналитических применений.

Заключение. Эндогенные АТР и люцифераза, мгновенно реагирующие на любые внешние воздействия — удобный инструмент для мониторинга различных внутриклеточных процессов, таких как изменение метаболической активности и жизнеспособности, проницаемости клеточной мембраны, скорости трансляции белков и клеточной гибели. Содержание АТР внутри клетки (ATP_{in}) — важный высокочувствительный количественный индикатор метаболической активности и жизнеспособности клетки, люцифераза светляков (Luc_{in}), экспрессируемая клетками — индикатор активности рибосом и скорости трансляции белков. Обнаружение АТР (ATP_{ex}) и люциферазы вне клеток (Luc_{ex}) вне клетки свидетельствует о различной степени повреждения клеточной мембраны и гибели клеток.

Список источников

- [1] Ефременко Е.Н., Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Асланлы А.Г., Лягин И.В. *Биолуминесцентная АТФ-метрия: практические аспекты*. Москва, Научная библиотека, 2022, с. 376.
- [2] Lomakina G.Yu., Ugarova N.N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells. *Biophysical Reviews*, 2022, vol. 14, pp. 887–892. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00978-y>
- [3] Lomakina G.Y., Ugarova N.N. *Luciola mingrelica* firefly luciferase as a marker in bioluminescent immunoassays. *Biophysical Reviews*, 2023, vol. 15, pp. 955–962. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01115-z>