

ББК 28.071.1

УДК 577.3

*О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк***Влияние вязкости реакционной среды на кинетику биферментной билюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза\****O.S. Sutormin, I.E. Sukovataya, V.A. Kratasyuk***The Effect of Viscosity on the Kinetic Parameters of Coupled Bioluminescent Enzyme System NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase**

Получены данные о влиянии вязкости реакционной среды на кинетические параметры ферментов биферментной системы светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Показано, что в экспериментальной модели билюминесцентной биферментной системы с сахарозой в меньшей степени по сравнению с глицерином ингибируется скорость билюминесцентной реакции; в сахарозе наблюдается стабилизация долгоживущего интермедиата реакции и, как следствие, увеличение квантового выхода. Величина общего выхода свечения и константа спада биферментной системы не зависят от вязкости реакционной смеси.

**Ключевые слова:** биферментная система светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, билюминесценция, кинетические параметры, глицерин, сахароза.

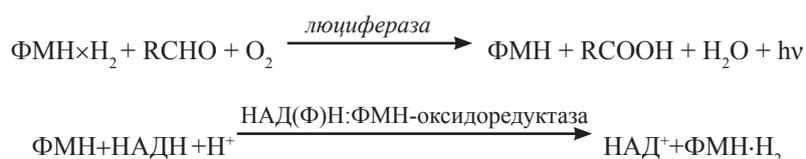
DOI 10.14258/izvasu(2013)3.2-08

Билюминесценция светящихся бактерий — это продукт хемилюминесцентной реакции, в которой происходит окисление субстрата — люциферина, катализируемое специфическим ферментом — люциферазой, в результате чего энергия химических связей трансформируется в световую. Важным преимуществом билюминесцентных реакций является не только высокий квантовый выход, достигающий в некоторых случаях 90%, но и тот факт, что свет излучается в видимом диапазоне и делает билюминесценцию уникальным объектом фундаментальных исследований и весьма полезным методом исследования дру-

The influence of the viscosity of the reaction medium on the kinetic parameters of the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase was investigated. It was shown that in an experimental model of coupled bioluminescent enzyme system with sucrose the reaction rate inhibited to a lesser extent compared with glycerol. The value of the total yield of luminescence and a constant decay of coupled bioluminescent enzyme system do not depend on the viscosity of the reaction media.

**Key words:** coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase; kinetic parameters; glycerol; sucrose.

гих объектов, инструментом для визуализации многих процессов. Известно, что светящиеся бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению флавиномононуклеотида (ФМН) и карбоновой кислоты исключительно для нужд билюминесценции [1; 2], но связь люминесценции с общим метаболизмом клетки все еще не до конца изучена. Уникальным объектом для решения этой задачи является сопряженная биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, реакция которой представляет собой два сопряженных процесса:



\* Работа выполнена при поддержке мегапроекта «Билюминесцентные биотехнологии» (договор № 11. G34.31.0058) в рамках Постановления Правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования», Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14. А18.21.1911.

В результате первой реакции, катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой, происходит восстановление ФМН с помощью восстанавливающего реагента НАДН. Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является билюминесцентной. В этой реакции восстановленный флаavin и алифатический альдегид окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, а также испускается квант света в сине-зеленой области спектра. Следует отметить, что интерес к данному билюминесцентному процессу связан не только с изучением механизмов перехода энергии биохимической реакции в световую, но и с его все более расширяющимся применением в биохимии, медицине, биотехнологии и при мониторинге окружающей среды [3].

Для решения фундаментальной задачи понимания механизмов сопряжения и функционирования ферментативных метаболических цепей в клетке светящихся бактерий разрабатываются экспериментальные подходы для создания экспериментальной модели, которая позволит реконструировать цепь сопряжения люциферазы с другими ферментами светящихся бактерий в клетке. Имитация вязкого микроокружения ферментов, а также связь с мембранными структурами и оптимизация микроокружения могут быть достигнуты, в том числе, и за счет увеличения вязкости микроокружения ферментов по сравнению с растворами. Поэтому для понимания процессов поведения описанной выше ферментативной люминесцентной системы светящихся бактерий в условиях, близких к *in vivo*, целесообразно изучение влияния специально подобранной гетерогенной среды на биферментную систему НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, моделирование увеличенной вязкости реакционной среды, в которой можно достигать за счет подбора соответствующих реакционных сред, например, органических растворителей с высоким значением вязкости [4].

Целью данной работы было исследование влияния вязкости реакционной среды на кинетические параметры ферментов биферментной системы светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза.

**Материалы и методы.** Для регистрации кинетических параметров биферментной билюминесцентной системы использовали лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов, произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и билюминесценции Института биофизики СО РАН [5]. Один флакон лиофилизованного препарата (КРАБ) содержит 0,4 мг/мл люциферазы (L) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *E. coli* и 0,18 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (R) ЕС 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*). Перед измерениями лиофилизированные ферменты растворяли в 0,05 М калий фосфатном буфере (pH 6,8). В работе использовали следующие реактивы: НАДН и ФМН фирмы Serva (Германия), тетрадеканаль фирмы Merck (Германия). Для регистрации кинетических параметров

биферментной билюминесцентной системы проводили реакцию в смеси следующего состава: 10 мкл КРАБА; 50 мкл алифатического альдегида; 200 мкл 0,05 М фосфатного буфера; 10 мкл флаvинмононуклеотида (ФМН); 50 мкл 0,1М НАДН. Все вязкие растворы готовили с использованием фосфатного буфера, концентрацию вещества выражали в молях и объемных процентах. Кинетические параметры биферментной системы изучали в присутствии разных концентраций глицерина (5, 10, 25, 50 об.%), сахарозы (20, 25, 30, 40 об.%) и без них (контроль). Величину динамической вязкости билюминесцентной системы в исследуемом диапазоне температур брали из химического справочника. Измерения проводили на люминометре GloMax®-20/20 фирмы Turner BioSystems (Sunnyvale, USA). Температуру растворов поддерживали с помощью жидкостного циркуляционного ультратермостата VT-8 (Термэкс-2, Россия). Все измерения проводили при температуре 25 °С. В кювету билюминометра вносили последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в билюминометр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения и время спада билюминесценции. Билюминесцентная реакция растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза представляют собой длительное свечение с монотонным спадом билюминесценции. Максимум интенсивности свечения ( $I_0$ ) характеризует начальную скорость реакции и концентрацию фермент-субстратных комплексов, образуемых в ходе реакции. Спад билюминесценции определяет скорость распада фермент-субстратного комплекса во времени и подчиняется экспоненциальному закону. Константа спада билюминесценции ( $k_{cat}$ ) вычисляется по спаду свечения от 80 до 20% от максимальной интенсивности:  $k_{cat} = (\ln I_{80} - \ln I_{20})/t$ . Общее число квантов  $Q = I_0/k_{cat}$  пропорционально общему числу молекул фермент-субстратного комплекса, распавшихся с излучением [6]. Как правило, проводили не менее 5 измерений. Статистическая обработка полученных экспериментальных результатов осуществляется методом наименьших квадратов с использованием пакета программ Microsoft Excel 1998.

**Результаты и обсуждение.** Экспериментальное изучение кинетических параметров функционирования ферментов билюминесцентной биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза при добавлении в реакционную среду увеличивающих вязкость органических растворителей сахарозы и глицерина показали, что увеличение вязкости реакционной среды для катализа изменяет кинетику биферментной билюминесцентной реакции. На рисунке 1 представлена зависимость интенсивности свечения от времени, из которой видно, что моделирование вязкости реакционной среды для катализа разными по природе растворителями с одинаковым значением вязкости приводит к существенно разным профилям билюминесцентной вспышки

ки. В сахарозе данный профиль практически совпадает с контролем по форме спада биолюминесценции, отличаясь лишь временем выхода на максимум интенсивности свечения, тогда как в глицерине длительность биолюминесцентной вспышки и время выхода на максимум свечения увеличиваются на порядок, что говорит об увеличении числа оборота ферментативного процесса. Подобную зависимость наблюдали для всех исследуемых концентраций глицерина и сахарозы.

Показано, что глицерин и сахароза ингибируют интенсивность свечения биолюминесценции: при постепенном увеличении концентрации вязкого растворите-

ля в реакционной смеси наблюдается спад максимума интенсивности свечения, который зависит не только от вязкости растворителя, но от его природы (рис. 2). При этом глицерин является более сильным ингибитором биферментной биолюминесцентной реакции по сравнению с сахарозой при оптимальной температуре для водно-буферных смесей, который равен 25 °С, как показано в работах [6; 7]. Следовательно, увеличенная вязкость реакционной среды препятствует образованию фермент-субстратных комплексов, образуемых в ходе катализа, и зависит от природы используемого вязкого растворителя.

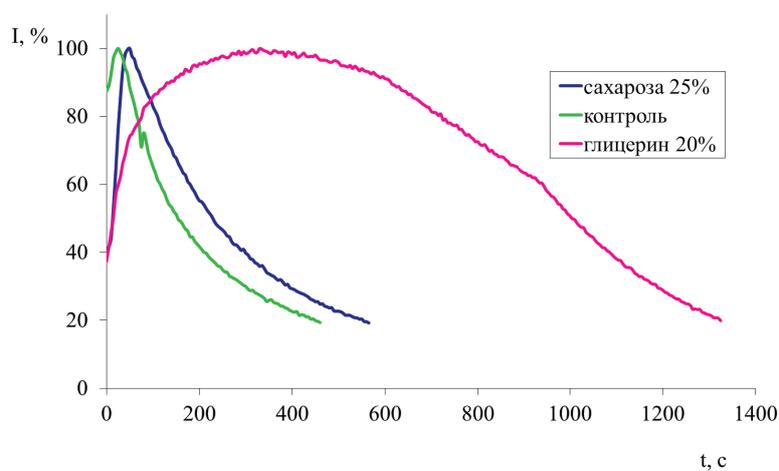


Рис. 1. Зависимость интенсивности свечения биолюминесценции от времени в глицерине и сахарозе, моделирующих одинаковое значение вязкости

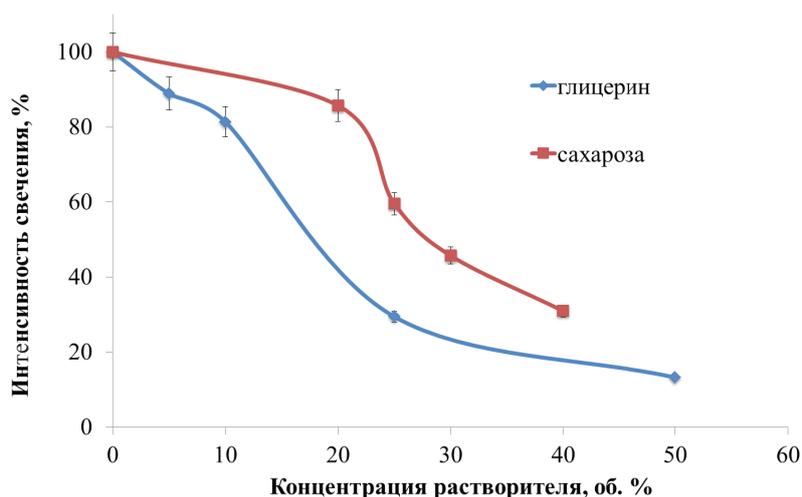


Рис. 2. Зависимость максимальной интенсивности свечения биолюминесцентной реакции  $I_0$  от концентрации растворителя

Экспериментальные модельные среды с различной вязкостью оказывают существенное влияние не только на интенсивность светоизлучения биферментной

биолюминесцентной системы, но и на константу спада биолюминесценции ( $k_{cat}$ ) (рис. 3) и общий выход светоизлучения (рис. 4).

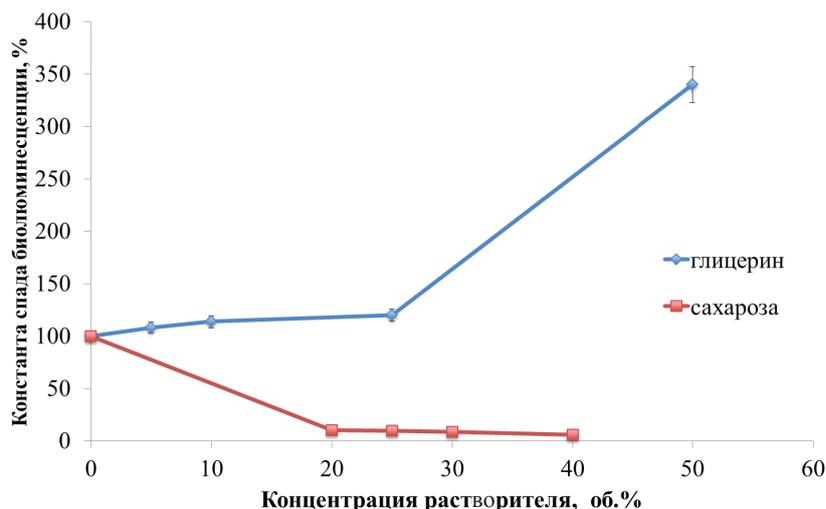


Рис. 3. Зависимость константы спада светоизлучения от концентрации глицерина и сахарозы

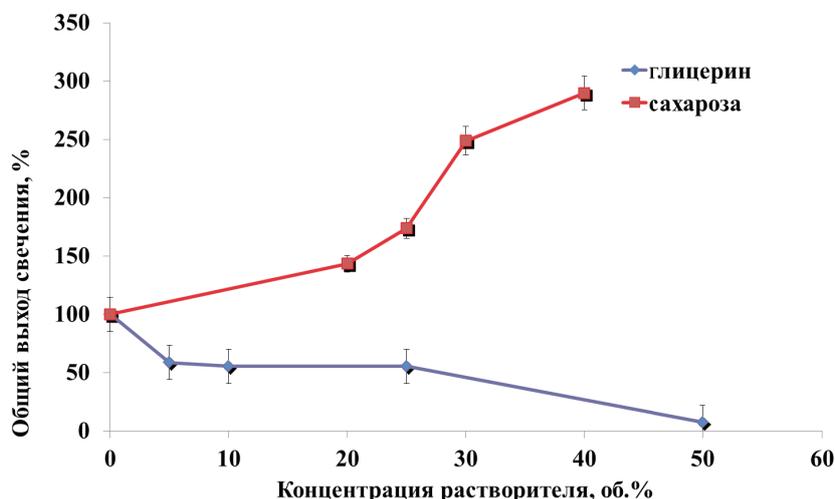


Рис. 4. Зависимость общего выхода светоизлучения от концентрации глицерина и сахарозы

Из полученных результатов видно, что величины  $k_{cat}$  и  $Q$  не зависят от вязкости реакционной среды, а определяются только природой эффекторов, которыми варьируется вязкость. Показано, что в экспериментальной модели реакционной среды для биолюминесцентного катализа с глицерином  $k_{cat}$  увеличивается существенно при высоких концентрациях глицерина в реакционной среде (50%), следовательно, происходит уменьшение времени светоизлучения биолюминесцентной реакции, что, вероятно, связано с уменьшением времени жизни долгоживущего интермедиата реакций. В реакционной среде, моделируемой сахарозой, происходит уменьшение величины  $k_{cat}$ , что может свидетельствовать о стабилизации долгоживущего интермедиата сопряженных ферментативных реакций биферментной биолюминесцентной системы.

Общий выход свечения ( $Q$ ) биферментной системы изменяется в соответствии с изменениями интенсивности свечения и константы спада светоизлучения ( $k_{cat}$ ). В экспериментальной модели с сахарозой  $Q$  увеличивается, тогда как с глицерином — уменьшается.

Таким образом, показано, что экспериментальная модель реакционной среды для биолюминесцентной биферментной системы с сахарозой характеризуется рядом параметров, улучшающих характеристики данной ферментативной системы: сахароза в меньшей степени по сравнению с глицерином ингибирует скорость биолюминесцентной реакции; в сахарозе наблюдается стабилизация долгоживущего интермедиата реакции и, как следствие, увеличение квантового выхода. Величина общего выхода свечения и константа спада биферментной системы не зависят от вязкости реакционной смеси.

### Библиографический список

1. Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. Светящиеся бактерии. — Новосибирск, 1984.
2. Tu SC. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2007. — № 7.
3. Kratasyuk V. A., Esimbekova E. N., Gladyshev M. I., Khromichek E. B., Kuznetsov A. M., Ivanova E. A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems // *Chemosphere.* — 2001. — № 42.
4. Kratasyuk V., Esimbekova E., Nemtseva E., Sviderskaya I. Sukovataya I. Models of enzymes' functioning inside the luminous bacteria: new approach // *Luminescence.* — 2010. — Т. 25, № 2.
5. Tjulkova N. A. Purification of bacterial luciferase from *Photobacterium leiognathi* with use FPLS-system // Jezowska-Trzebiatowska B., ed. *Biological luminescence.* — 1989.
6. Tyulkova N. A., Sandalova T. P. Comparative study of temperature effects on bacterial luciferases // *Biochemistry.* — 1996. — V. 2, № 61.
7. Sutormin O. S., Sukovataya I. E., Kratasyuk V. A. Thermal stability of coupled enzyme system NAD(p) H:FMN-oxidoreductase-luciferase in solvents of different viscosity // *Luminescence.* — 2012. — V. 27, № 2.