

Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы

© А.П. Пузырь, И.О. Позднякова, В.С. Бондарь

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук,
660036 Красноярск, Россия

E-mail: apuzyr@mail.ru

Сообщается о создании на плоской подложке надмолекулярной структуры окисная пленка алюминия–адгезионный слой–наноалмаз–люцифераза. Показано, что фермент сохраняет каталитическую активность в данной структуре и она может рассматриваться как прототип люминесцентного биочипа для использования в биолюминесцентном анализе.

В последние годы возрос интерес к исследованиям по созданию новых технологий для решения прикладных задач в области биологии, белковой химии, биофизики, молекулярной биологии, экологии и т.д. Например, представляется перспективным создание различных индикаторных систем регистрации, основанных на применении белковых молекул, обладающих маркерными свойствами. К белкам-маркерам относятся, в частности, светоизлучающие белки, способные в процессе их функционирования генерировать кванты света в видимом диапазоне спектра. Перспективность разработки таких методов тестирования определяется их высокой чувствительностью, быстротой анализа, простотой регистрации светового сигнала, широтой применений и т.д. [1–4].

Недавно нами был создан прототип люминесцентного биочипа с использованием частиц детонационных наноалмазов (НА) и светоизлучающего белка обелина [5]. Используемый белок генерирует кванты видимого света при взаимодействии с ионами Ca^{2+} , поэтому биочип может применяться для их регистрации в различных жидкостях, включая биологические [5]. В то же время представляет интерес создание аналогичных индикаторных тест-систем с использованием других светоизлучающих белков. С одной стороны, это позволяет развить представления о механизмах взаимодействия белковых молекул с поверхностью частиц НА, с другой — расширить спектр возможных приложений таких биолюминесцентных датчиков. Например, в этих целях могут использоваться люциферазы морских бактерий, широко применяемые в биолюминесцентном анализе как моноферменты, в составе биферментной (люцифераза — НАДН:ФМН-оксидоредуктаза) и сопряженных систем [6]. Белки этой группы имеют молекулярную массу около 80 kDa, являются гетеродимерами (состоят из α - и β -субъединиц) и содержат в своей структуре флавины в качестве кофактора.

Настоящая работа посвящена созданию прототипа люминесцентного биочипа на основе детонационных НА и бактериальной люциферазы.

1. Материалы и методы

В экспериментах использовались НА, синтезированные в Отделе физики высокодисперсных материалов Красноярского научного центра и очищенные газофаз-

ным методом в присутствии борного ангидрида [7]. Гидрозоли из частиц НА готовились по технологии, предложенной ранее [5]. Препараты люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы получались известными методами [8,9]. Активность люциферазы измерялась с помощью биферментной реакции и с использованием фотовосстановленного ФМН [9]. Измерения проводились на биолюминометре (БЛИМ 8801) производства СКТБ „Наука“ (Красноярск), калиброванном по радиоактивному стандарту Гастингса–Вебера [10]. Одна люминесцентная единица соответствовала 10^7 photon/s. При определении активности люциферазы с помощью биферментной реакции в измерительную кювету вносились $450 \mu\text{l}$ 4 mM Трис-НСI буфера (pH 7.0), $10 \mu\text{l}$ $4.7 \cdot 10^{-6}$ M C_{14} альдегида, $10 \mu\text{l}$ $7.8 \cdot 10^{-5}$ M ФМН, $1-3 \mu\text{l}$ препарата НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (активность фермента 1 E/ml), $5-50 \mu\text{l}$ исследуемого образца. Реакция запускалась при добавлении $5 \mu\text{l}$ 10^{-2} M НАДН. При определении активности люциферазы с помощью фотовосстановленного ФМН реакционная смесь включала $450 \mu\text{l}$ указанного выше буфера, $50 \mu\text{l}$ $4.7 \cdot 10^{-6}$ M C_{14} альдегида, $5-50 \mu\text{l}$ исследуемого образца. Реакция запускалась при введении $500 \mu\text{l}$ $7.8 \cdot 10^{-5}$ M восстановленного ФМН.

2. Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований было показано, что добавление водного раствора люциферазы к суспензии частиц НА и последующее перемешивание смеси приводит к быстрой и полной адсорбции фермента на поверхности частиц. После осаждения НА центрифугированием смеси при $16\,000g$ в течение $1-3$ min в супернатанте не обнаруживается активности люциферазы. Соотношение белок:НА для полной адсорбции фермента из раствора можно рассчитать, исходя из адсорбционной емкости наночастиц. С помощью маркерных белков (бычий сывороточный альбумин и цитохром C) было показано, что 1 mg частиц НА может адсорбировать на поверхности $0.3-0.5$ mg белка. После адсорбции люцифераза прочно удерживается на поверхности НА и не смывается при многократной промывке осадка частиц водой и буфером 20 mM Трис-НСI (pH 7.0). Фермент, адсорбированный на частицы способен проявлять свою каталитическую активность как в ходе биферментной реакции,

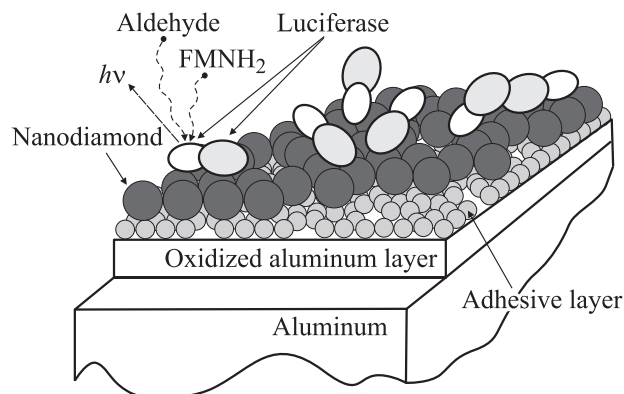


Рис. 1. Гипотетическая схема надмолекулярной структуры окисная пленка алюминия–адгезионный слой–наноалмаз–люцифераза при расположении применяемых компонентов в монослое.

так и с фотовосстановленным ФМН. Однако в обоих случаях наблюдается частичная десорбция люциферазы с поверхности частиц НА. После проведения реакции и удаления частиц из реакционной смеси в ней регистрируется люциферазная активность. В то же время частицы продолжают удерживать на своей поверхности еще значительное количество молекул фермента. После отмывки частиц НА от компонентов реакционной смеси и продуктов реакции их снова можно использовать для измерения люминесценции. В экспериментах показано, что с одним образцом частиц НА можно выполнить десять и более измерений. Причем каждый раз наблюдается десорбция части фермента. Вероятнее всего, это обусловлено конформационными изменениями молекул фермента, которые происходят в момент осуществления каталитической функции. В пользу этого предположения свидетельствует то, что отдельные компоненты биолюминесцентной реакции (C_{14} альдегид, ФМН, НАДН) и их различные комбинации, а также отдельная добавка оксидоредуктазы не вызывали десорбции люциферазы с поверхности НА.

На следующем этапе была исследована возможность создания прототипа люминесцентного биочипа, элементом которого является комплекс НА–люцифераза. Для этих целей была использована алюминиевая подложка. Установлено, что окисная пленка алюминия не адсорбирует из белкового раствора молекулы люциферазы, а из суспензий — частицы НА и частицы с адсорбированным ферментом. Поэтому, как и при создании биочипа на основе НА и обелина [5], комплекс НА–люцифераза закреплялся на подложке с помощью адгезионного слоя, предварительно нанесенного на окисную пленку алюминия. Полученная надмолекулярная структура представлена в виде гипотетической схемы (рис. 1). Данная структура, индикаторным элементом которой является комплекс НА–люцифераза, не смывается с подложки водой и 20 мМ Трис-НСI буфером (рН 7.0). Это указывает на достаточно высокую ее устойчивость и прочность сцепления с поверхностью подложки. Проверка

активности люциферазы на полученной подложке также проводилась двумя способами (биферментной реакцией и с использованием фотовосстановленного ФМН). Для этого подложка помещалась в буфер, находящийся в измерительной кювете, и добавкой необходимых ингредиентов запускалась реакция. В обоих случаях наблюдалось развитие люминесцентного сигнала. После получения светового ответа подложка вынималась из измерительной кюветы и повторно проводилась регистрация сигнала. Несмотря на отсутствие подложки, в реакционной смеси обнаруживалась люциферазная активность. Этот факт указывает на то, что, как и в экспериментах с суспензиями, в ходе реакции происходила десорбция части фермента с поверхности чипа. Подложка промывалась струей дистиллированной воды для удаления продуктов реакции и остатков десорбированного белка, помещалась в чистую измерительную кювету с буфером, затем снова проводилось измерение. Выяснилось, что интенсивность люминесцентных сигналов с подложки снижалась при каждом последующем измерении (рис. 2). Наблюдаемое изменение не является серьезным препятствием для использования полученных тест-систем в люминесцентном анализе. Интенсивность световых импульсов подложек достаточно велика, что позволяет проводить их регистрацию, несмотря на снижение количества фермента на поверхности чипа.

Таким образом, в работе показана возможность создания прототипа люминесцентного биочипа, основным элементом которого являются частицы детонационных НА, несущие на своей поверхности светоизлучающий белок люциферазу. Полученная тест-система может использоваться в биолюминесцентном анализе. Более прочная фиксация фермента на поверхности подложки, вероятно, может быть осуществлена как химическими (например, ковалентные сшивки с использованием химических реагентов), так и биологическими

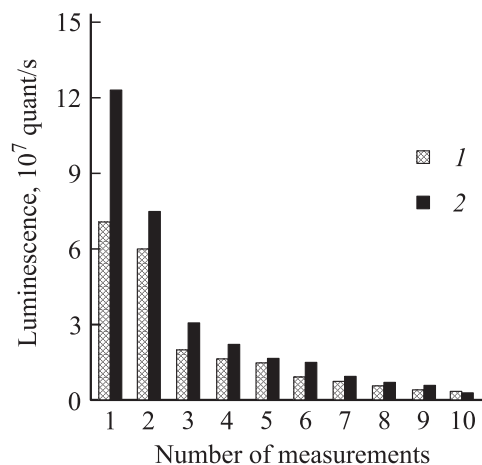


Рис. 2. Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании плоской подложки, содержащей надмолекулярную структуру, индикаторным элементом которой является комплекс НА–люцифераза. 1 — подложка находится в реакционной смеси измерительной кюветы, 2 — реакционная смесь после удаления подложки.

методами (в частности, белок-белковые взаимодействия с использованием дополнительных молекул). Проверка таких возможностей является предметом дальнейших исследований.

Список литературы

- [1] J.R. Blinks, W.G. Wier, P. Hess, F.G. Prendergast. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **40**, 1 (1982).
- [2] В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон. *Успехи микробиологии* **21**, 3 (1987).
- [3] В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, О.М. Рожманова, С.Г. Воронина. *Биохимия* **56**, 806 (1991).
- [4] В.А. Illarionov, L.A. Frank, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks. *Meth. Enzymol.* **305**, 223 (2000).
- [5] К.В. Пургов, В.С. Бондарь, А.П. Пузырь. *ДАН* **380**, 3, 411 (2001).
- [6] И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.И. Медведева, Г.А. Примакова, С.И. Барцев, Г.А. Кратасюк, В.Н. Петушков, В.В. Межевикин, Е.С. Высоцкий, В.В. Заворуев, В.А. Кратасюк. *Свящиеся бактерии*. Наука, Новосибирск (1984). 278 с.
- [7] Г.А. Чиганова, С.А. Чиганов. *Неорган. материалы* **35**, 5, 581 (1999).
- [8] В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, В.В. Заворуев, В.В. Межевикин, А.А. Райбекас. *Прикл. биохимия и микробиология* **24**, 6, 745 (1988).
- [9] В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, Н.С. Родионова, А.М. Фиш, П.И. Белобров. *Биохимия* **49**, 4, 692 (1984).
- [10] J.W. Hastings, G. Weber. *J. Opt. Soc. Am.* **53**, 1410 (1963).