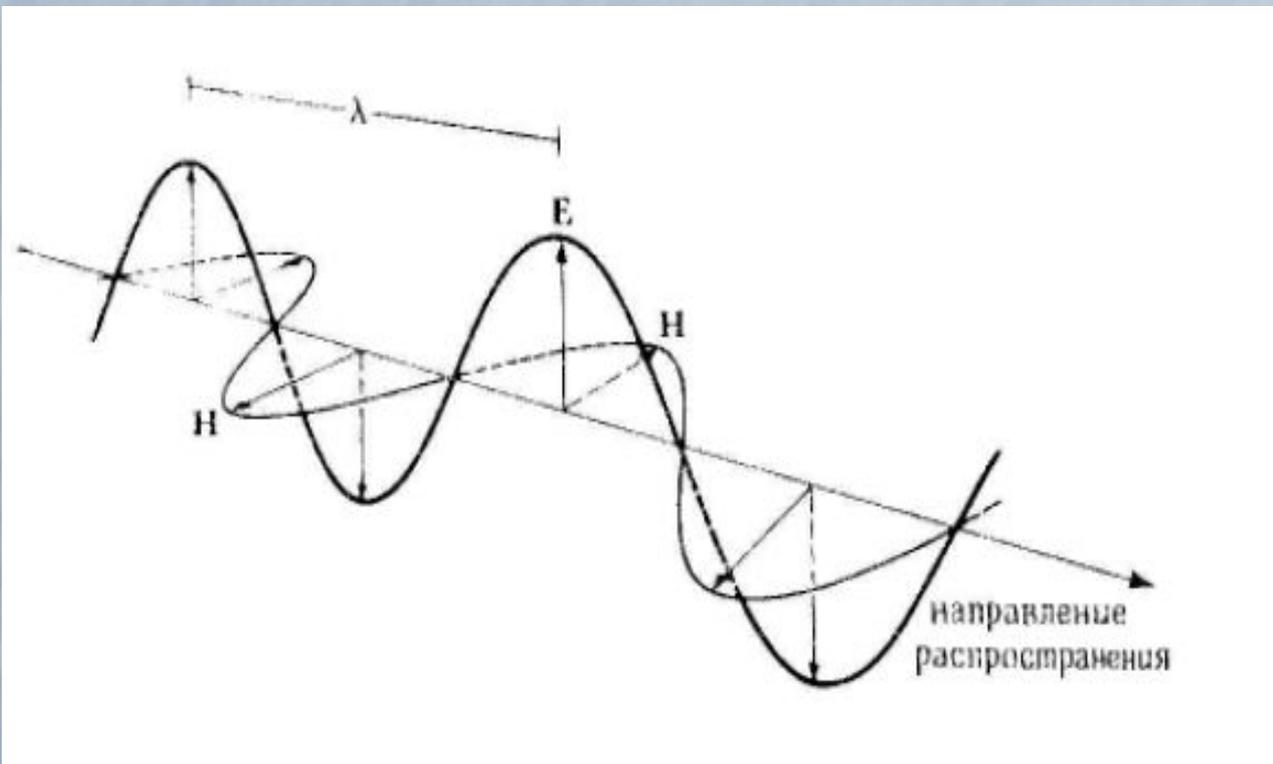


**Методы
спектроскопии в
исследовании
биополимеров**

1. Спекроскопия



Распространение электромагнитной волны в пространстве. Векторы E и H все время взаимно перпендикулярны.

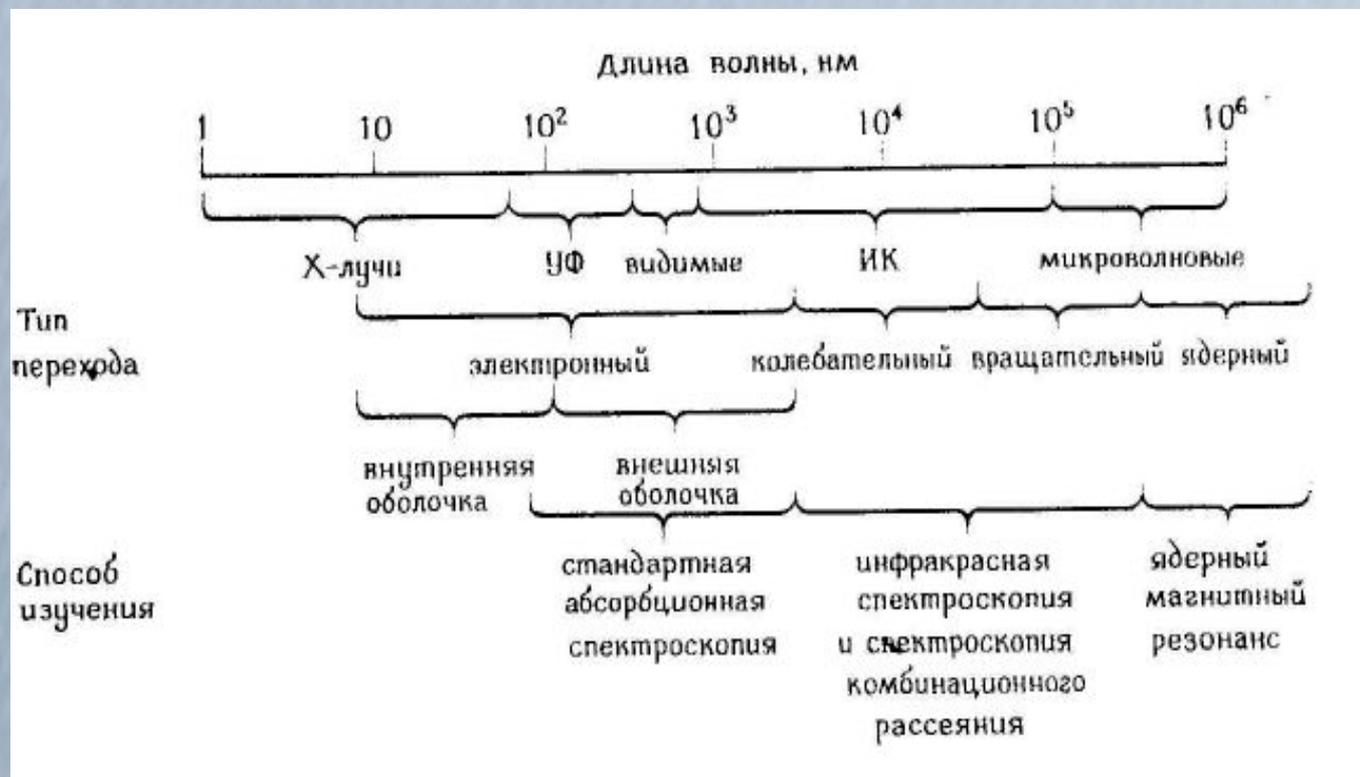
1. Спекроскопия

Спектральный анализ - совокупность методов качественного и количественного определения состава объекта, основанная на изучении спектров взаимодействия материи с излучением, включая спектры электромагнитного излучения, акустических волн, распределения по массам и энергиям элементарных частиц и др.

Оптическая спектроскопия - спектроскопия в оптическом (видимом) диапазоне длин волн с примыкающими к нему ультрафиолетовым и инфракрасным диапазонами (от нескольких сотен нанометров до единиц микрон).

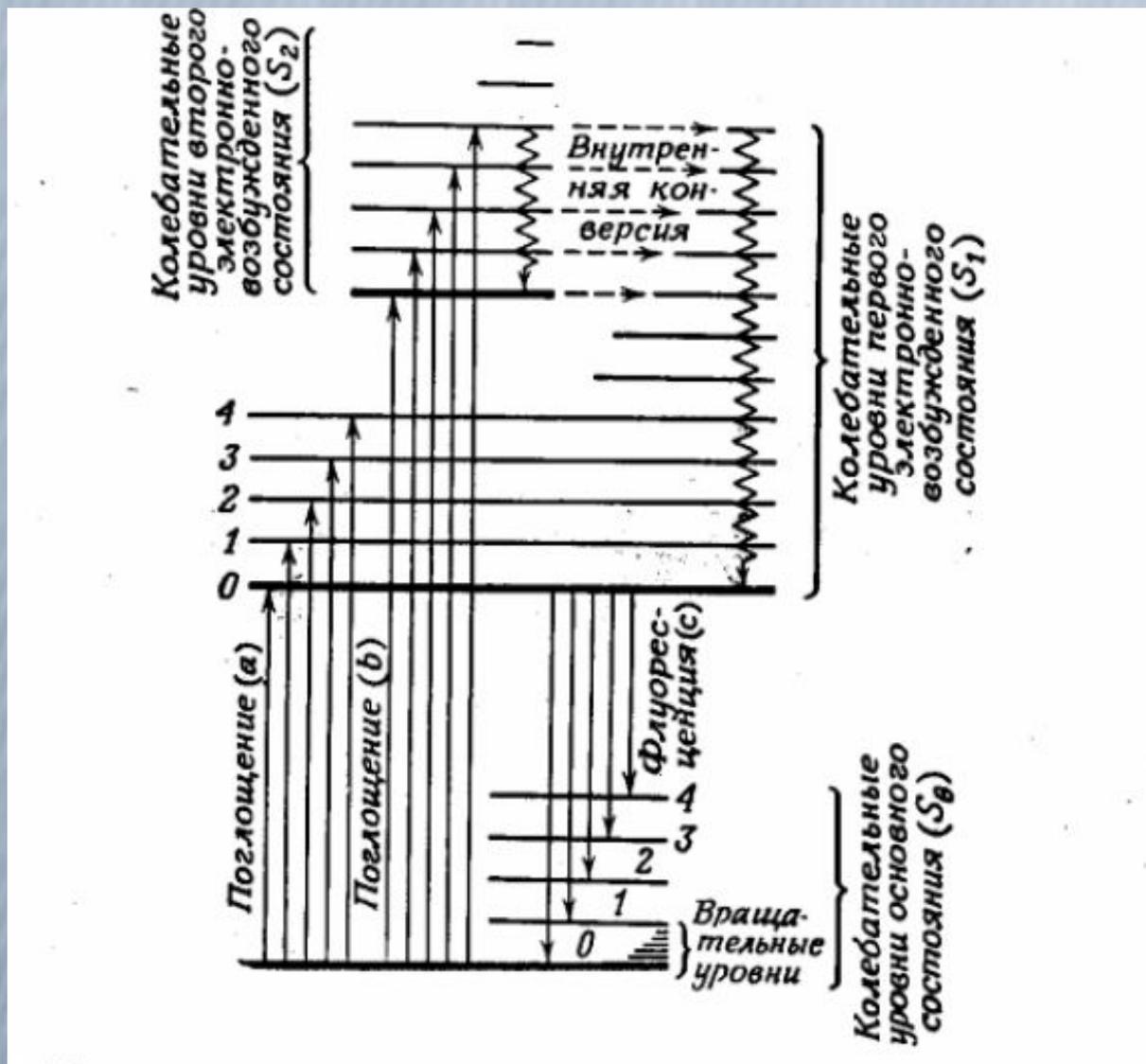
1. Спекроскопия

Шкала электромагнитных излучений, используемая для исследований в области биологии



- 1) γ – спектроскопия
- 2) Рентгеновская спектроскопия
- 3) Оптическая спектроскопия:
 - УФ-спектроскопия (электронные переходы)
 - Спектроскопия видимого диапазона (электронные переходы)
 - ИК-спектроскопия (колебательные и вращательные переходы)
- 4) Радиочастотная спектроскопия:
 - ЯМР
 - ЭПР

1. Спекроскопия



Переходы, при которых возникают спектры поглощения и спектры испускания флуоресценции.

$$\nu_{ij} = \frac{E_i - E_j}{h}$$

1. Спекроскопия

Характерная длина волны, см	Характерная энергия, ккал · моль ⁻¹	Вид излучения	Метод
10 ⁻¹¹	3 · 10 ⁸	γ-Излучение	Мёссбауэровская спектроскопия
10 ⁻⁸	3 · 10 ⁵	Рентгеновское излучение	Рассеяние и дифракция рентгеновских лучей
10 ⁻⁵	3 · 10 ²	Вакуумное ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
3 · 10 ⁻⁵	10 ²	Ближнее ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
6 · 10 ⁻⁵	Энергия углерод-углеродной связи	Видимый свет	Электронные спектры
10 ⁻³	5 · 10 ³ 3 · 10 ⁰ <i>RT</i> при комнатной температуре	Инфракрасный свет	Колебательные спектры
10 ⁻²	3 · 10 ⁻¹	Свет в дальней инфракрасной области	Колебательные спектры
10 ⁻¹	3 · 10 ⁻²	Микроволновое излучение	Вращательные спектры
10 ⁰	3 · 10 ⁻³	Микроволновое излучение	ЭПР
10	3 · 10 ⁻⁴	Излучение в радиочастотном диапазоне	ЯМР

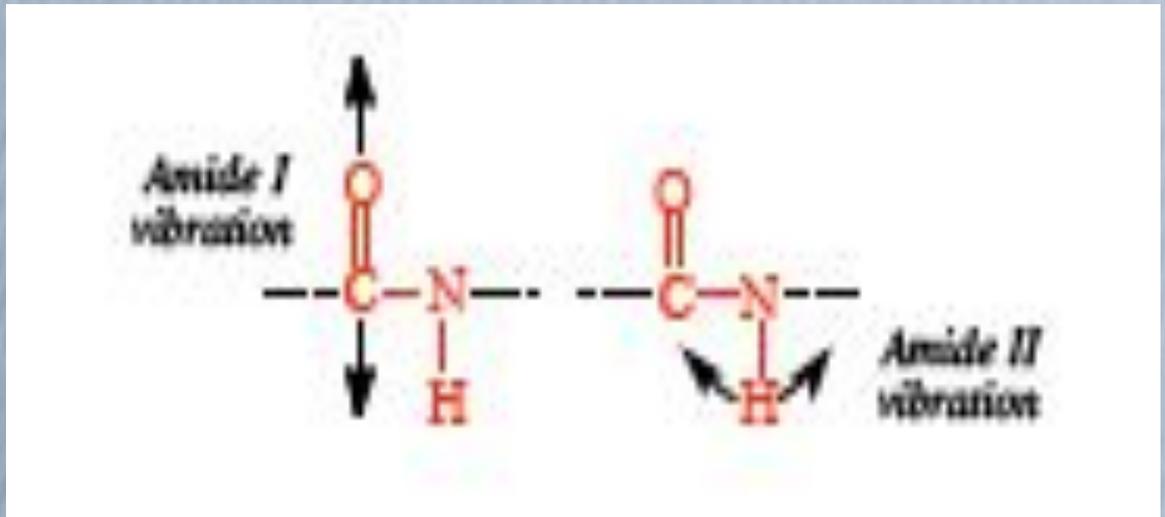
2. Методы исследования вторичной структуры

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, IR-spectroscopy)

Исследует колебания атомов в молекуле

2 основных типа колебаний атомов в молекуле:

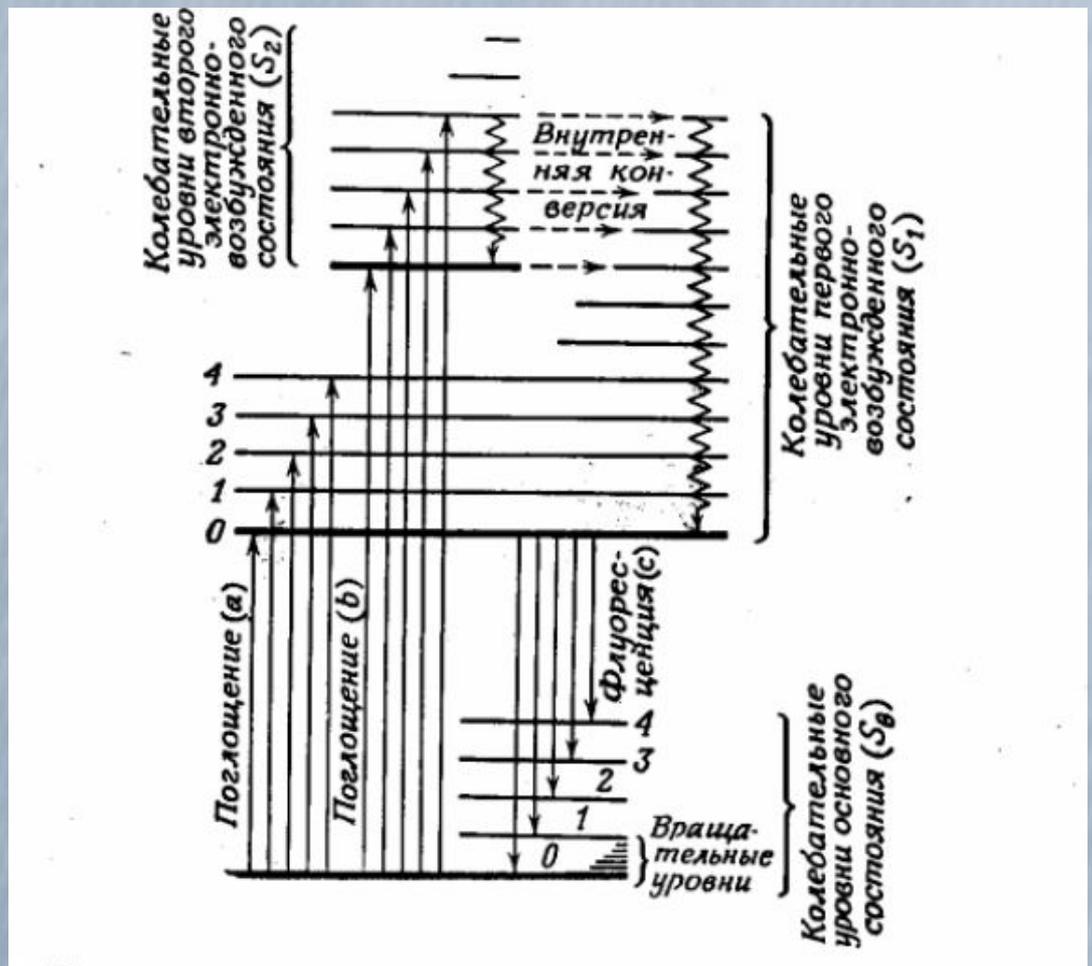
- валентные колебания, при которых расстояние между атомами увеличивается или уменьшается, но атомы остаются на оси валентной связи;
- деформационные колебания – при которых атомы отклоняются от оси связи



2. Методы исследования вторичной структуры

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, IR-spectroscopy)

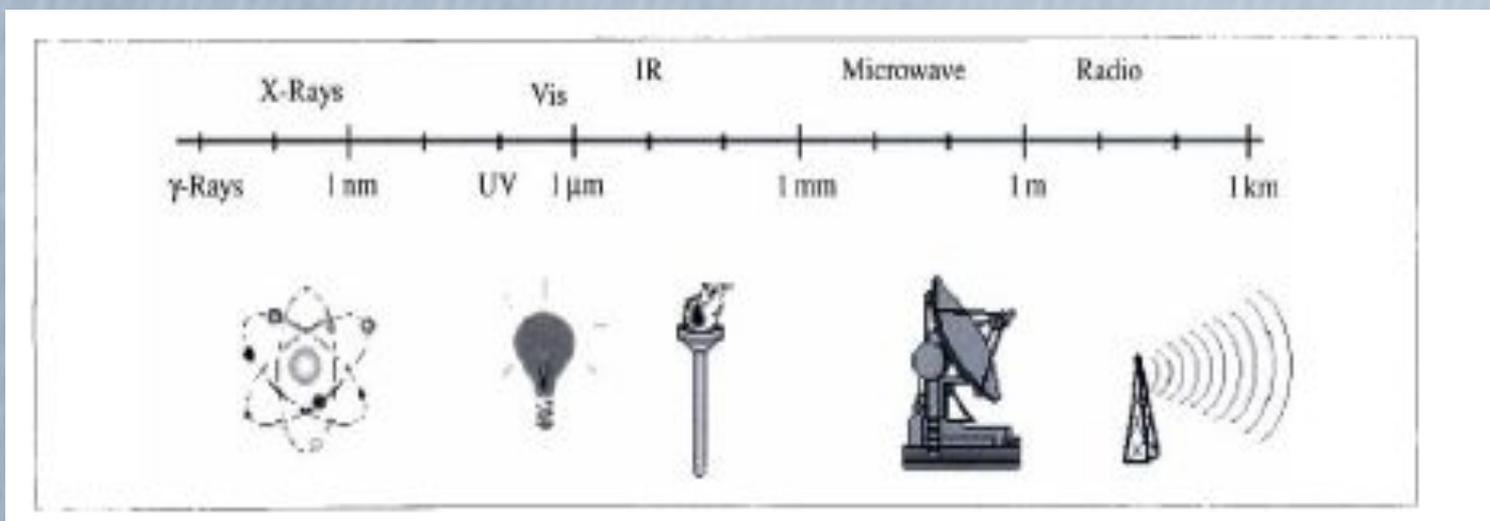
ИК-спектр поглощения связан с переходами на различные колебательные уровни основного состояния



2. Методы исследования вторичной структуры

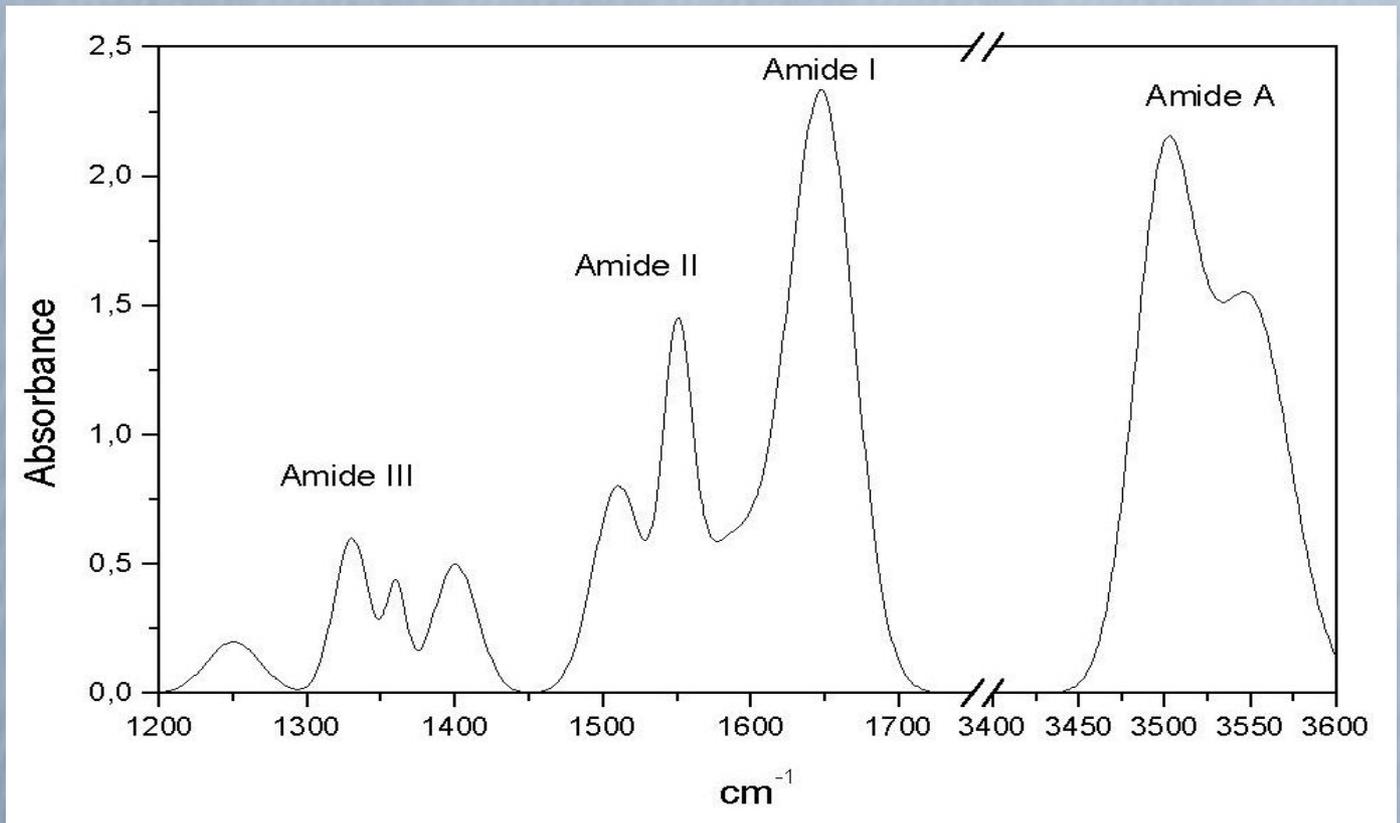
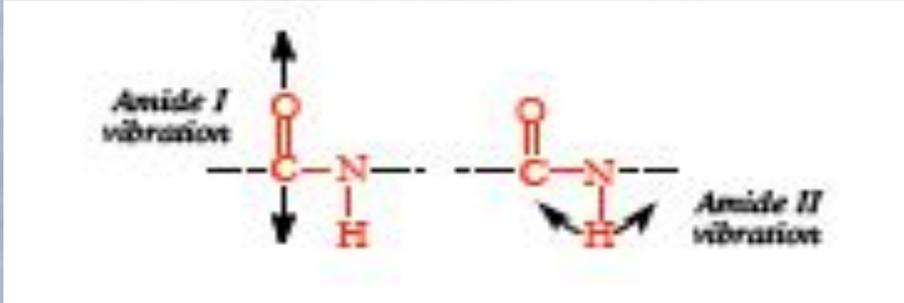
Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, IR-spectroscopy)

ИК-диапазон электромагнитного излучения – 750-100000 нм



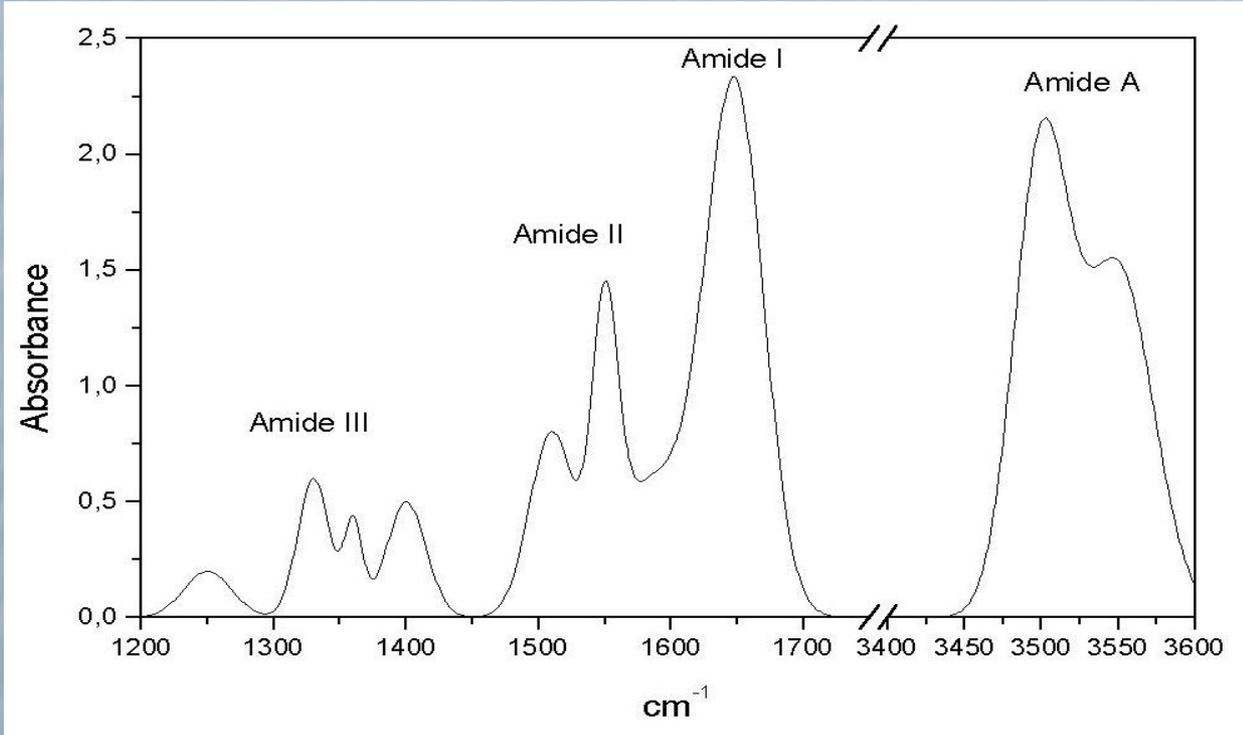
2. Методы исследования вторичной структуры

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, IR-spectroscopy)



2. Методы исследования вторичной структуры

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, IR-spectroscopy)



ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ ИНФРАКРАСНЫХ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ¹⁾

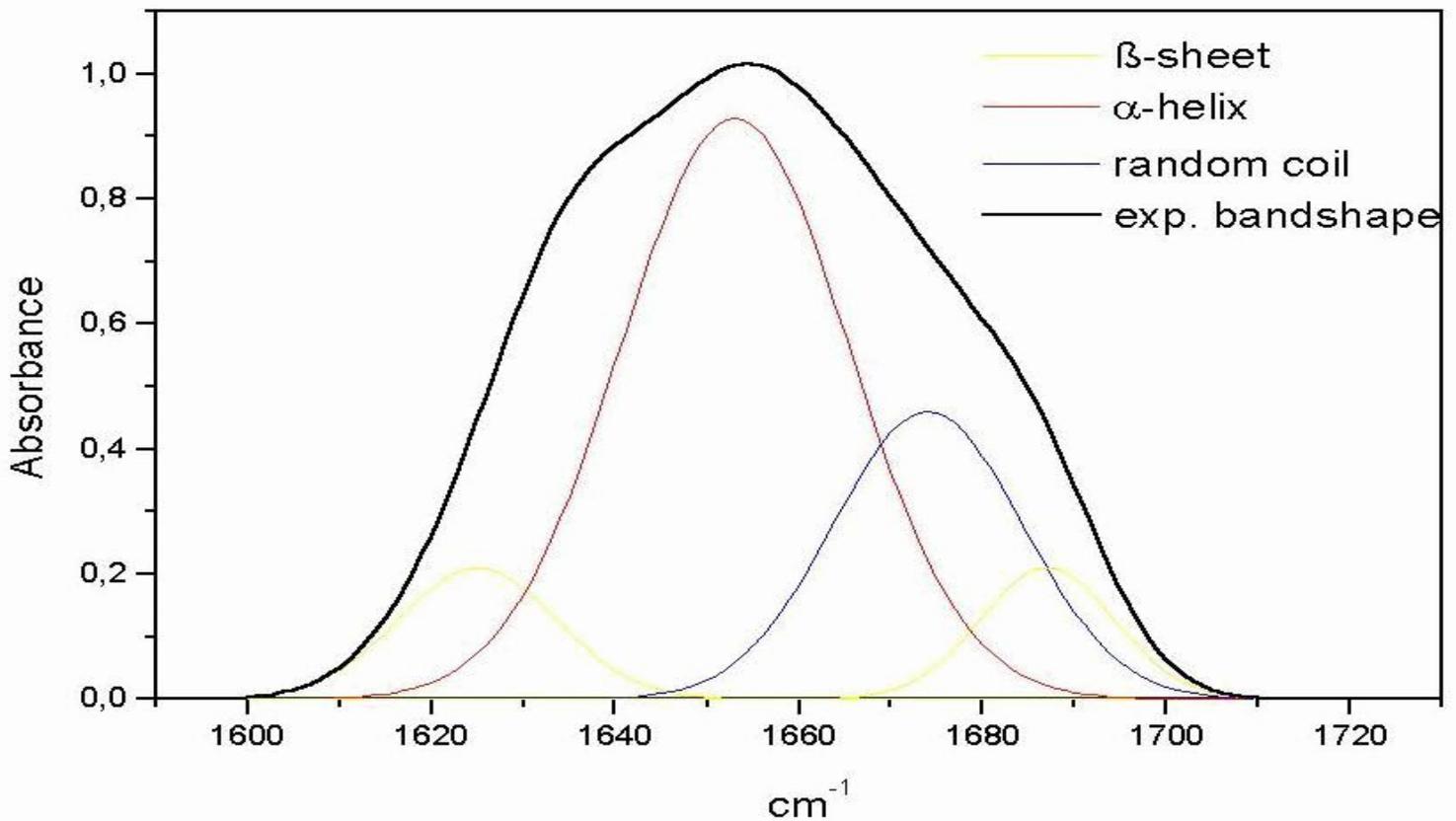
Колебание	$\frac{\partial \mu}{\partial R}$	Структуры с водородными связями				Структуры без водородных связей
		α -спираль		β -слой		частота, см ⁻¹
		частота, см ⁻¹	дихроизм	частота, см ⁻¹	дихроизм	
Растяжение связи N—H	— N—H — ↔	3290—3300		3280—3300	⊥	~ 3400
Амид I (растяжение связи C=O)	— C=O — ↔	1650—1660		1630	⊥	1680—1700
Амид II	$\begin{array}{c} \\ \text{H} \\ \\ \text{— C — N —} \\ \end{array}$	1540—1550	⊥	1520—1525		< 1520?

¹⁾ J.A.Schellman, C.Schellman. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H.Neurath, New York, Academic Press, 1962, p 1.

2. Методы исследования вторичной структуры

Исследование вторичной структуры белка методом ИК-спектроскопии

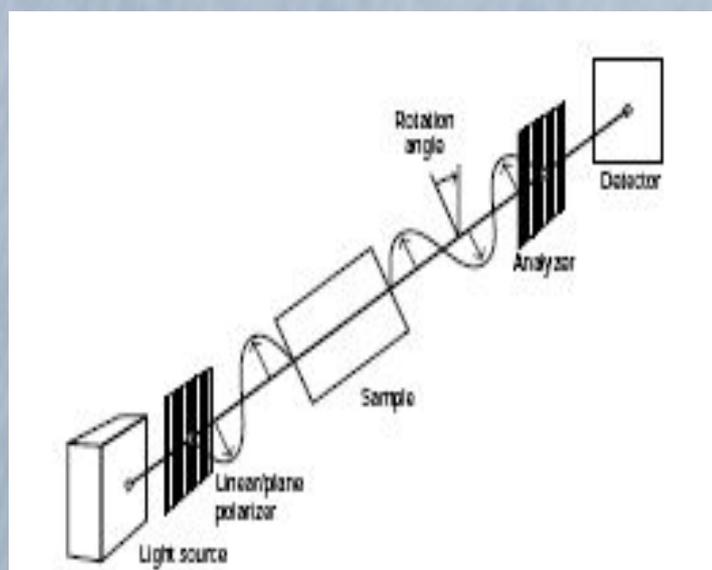
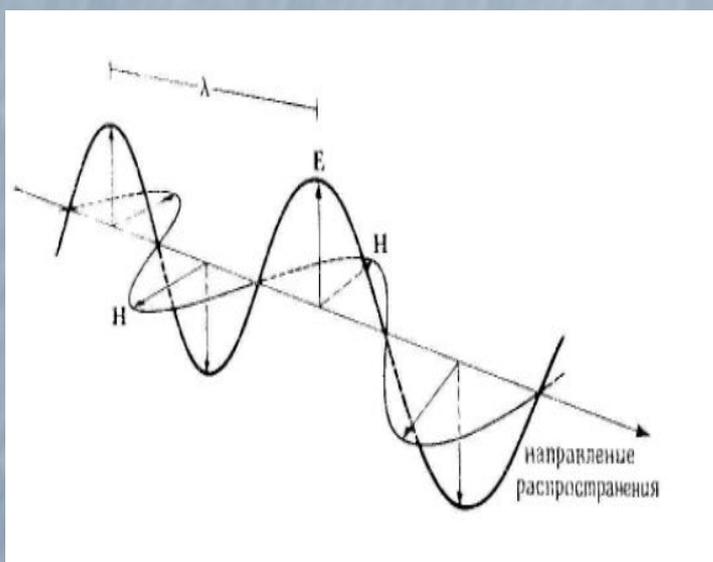
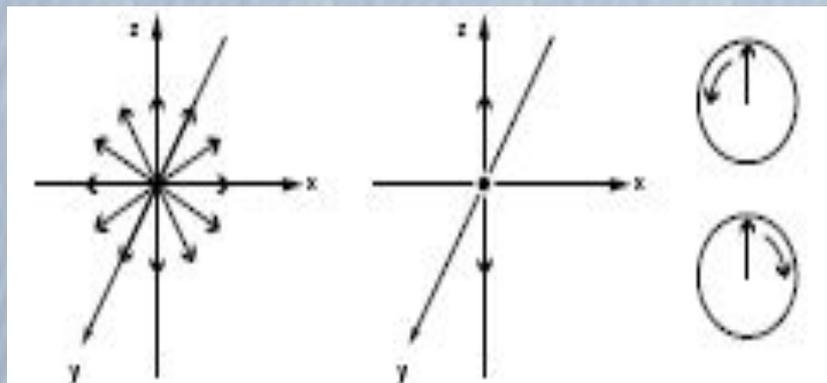
Амид I



2. Методы исследования вторичной структуры

Круговой дихроизм (КД-спектроскопия, CD-spectroscopy)

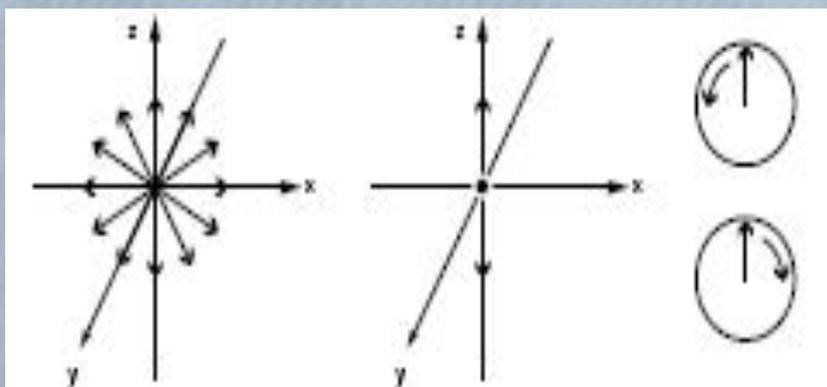
Исследует взаимодействие плоскополяризованного света с оптически активными молекулами



2. Методы исследования вторичной структуры

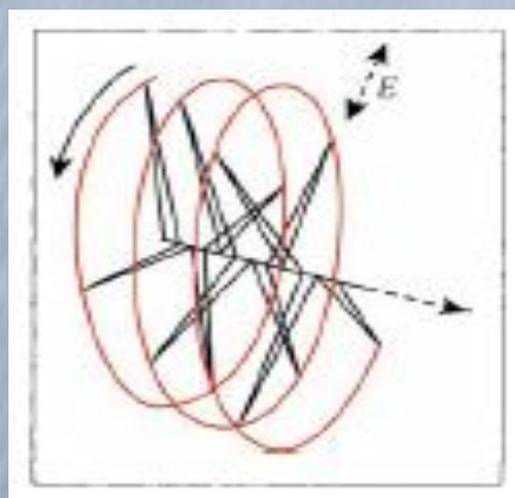
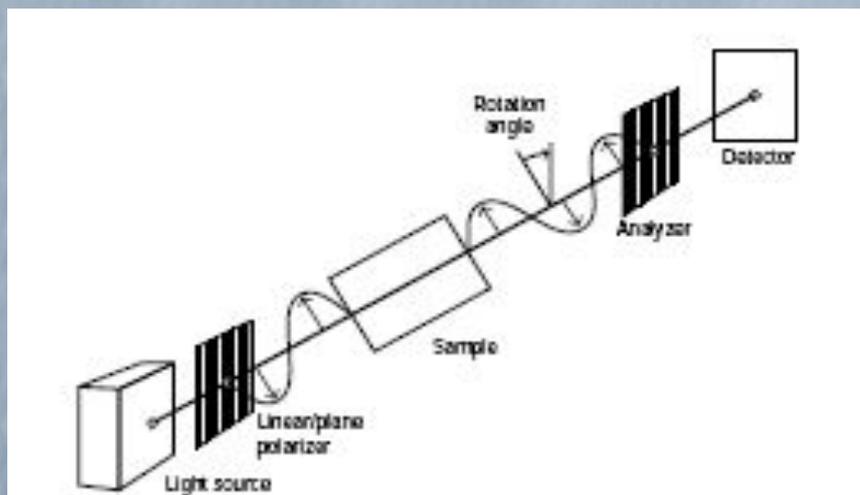
Круговой дихроизм (КД-спектроскопия, CD-spectroscopy)

Исследует взаимодействие плоскополяризованного света с оптически активными молекулами



волна, поляризованная по кругу влево

волна, поляризованная по кругу вправо

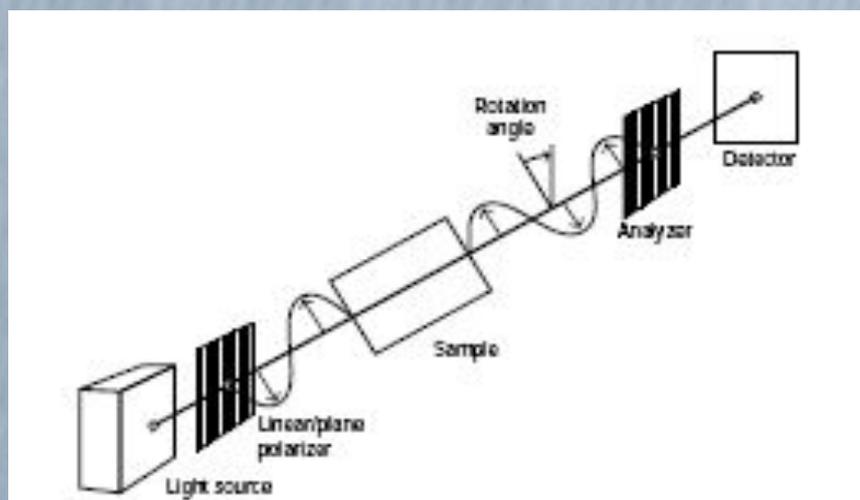


2. Методы исследования вторичной структуры

Круговой дихроизм (КД-спектроскопия, CD-spectroscopy)

Оптически активные вещества – вещества, имеющие хиральный центр (атом углерода, связанный с четырьмя различными группами)

Оптически активные вещества по-разному поглощают свет, поляризованный по кругу влево и вправо.



$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

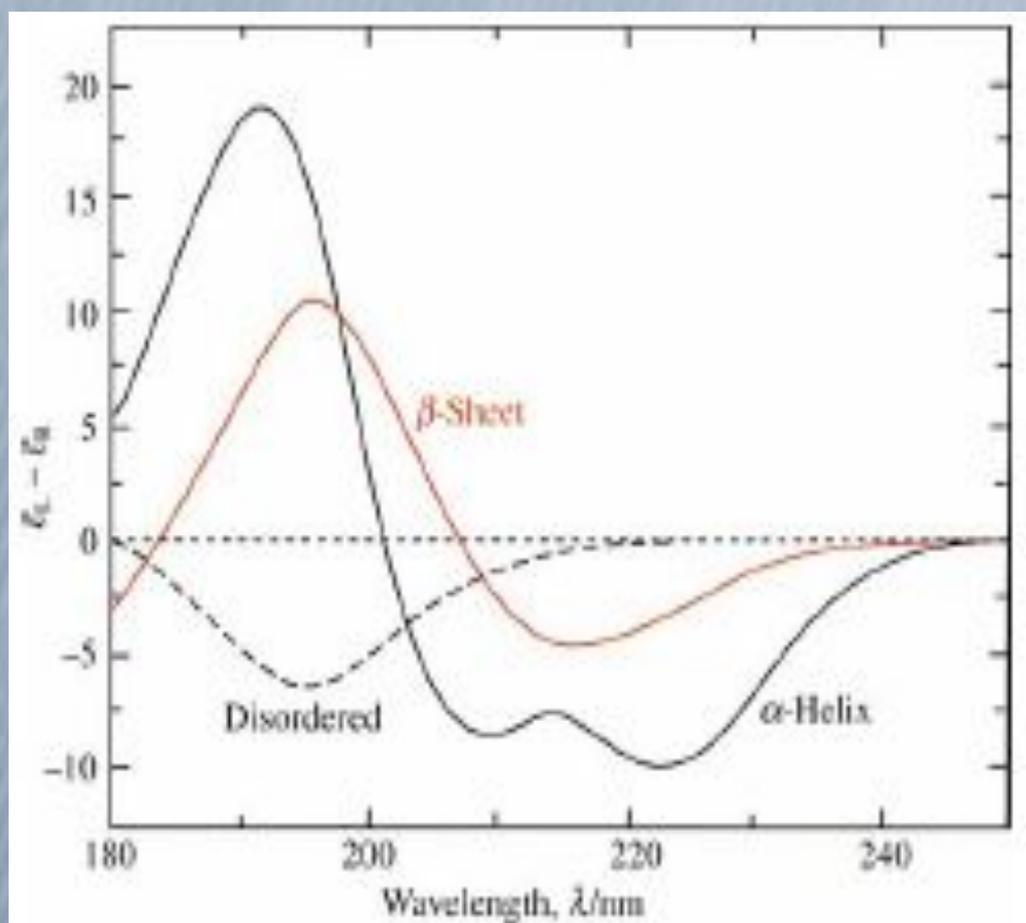
круговой дихроизм

2. Методы исследования вторичной структуры

Круговой дихроизм (КД-спектроскопия, CD-spectroscopy)

КД-спектр – зависимость кругового дихроизма от длины волны поглощаемого света

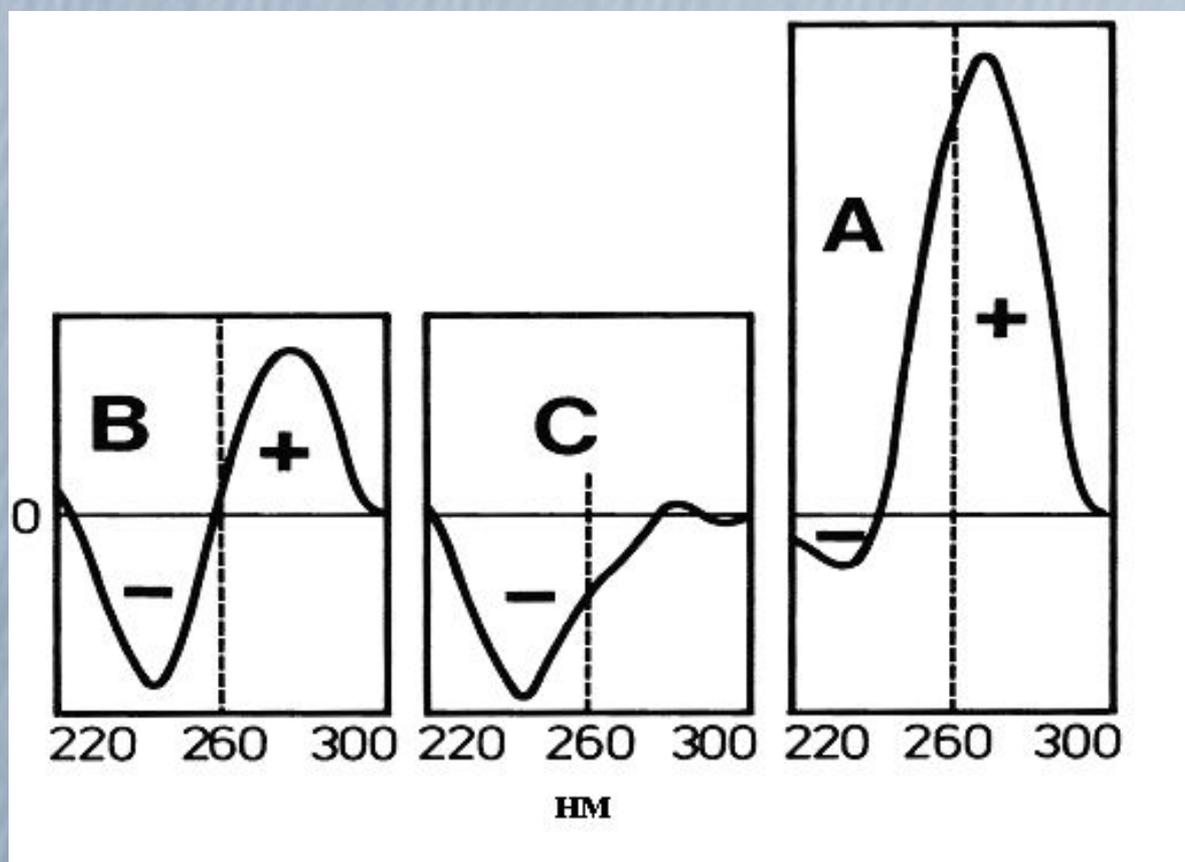
КД-спектр различных конформаций полипептидной цепи



2. Методы исследования вторичной структуры

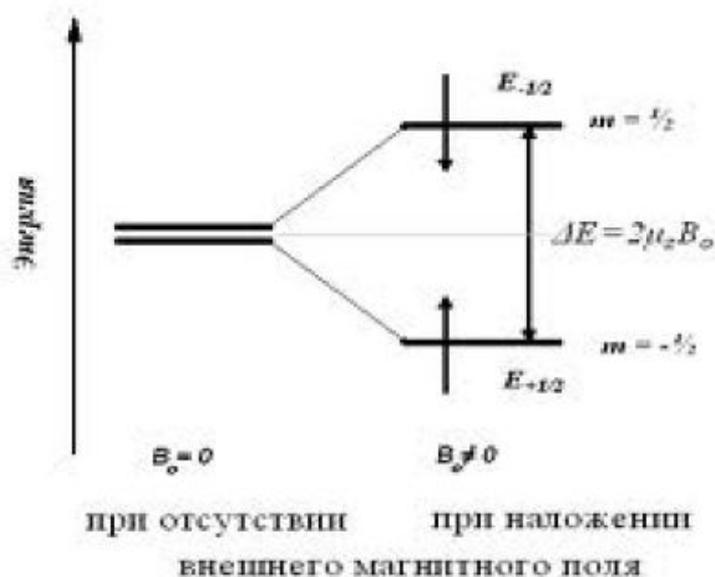
Круговой дихроизм (КД-спектроскопия, CD-spectroscopy)

КД-спектр – зависимость кругового дихроизма от длины волны поглощаемого света



3. Методы исследования третичной структуры белка

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)



Исследуются ядра атомов, имеющих непарное число протонов и нейтронов.

Такие ядра имеют несимметричное распределение заряда и ориентируются в магнитном поле

B_0 – магнитная индукция магнитного поля, выражаемая в единицах СИ – Тесла (Тл),

ν_0 – резонансная частота поглощения.

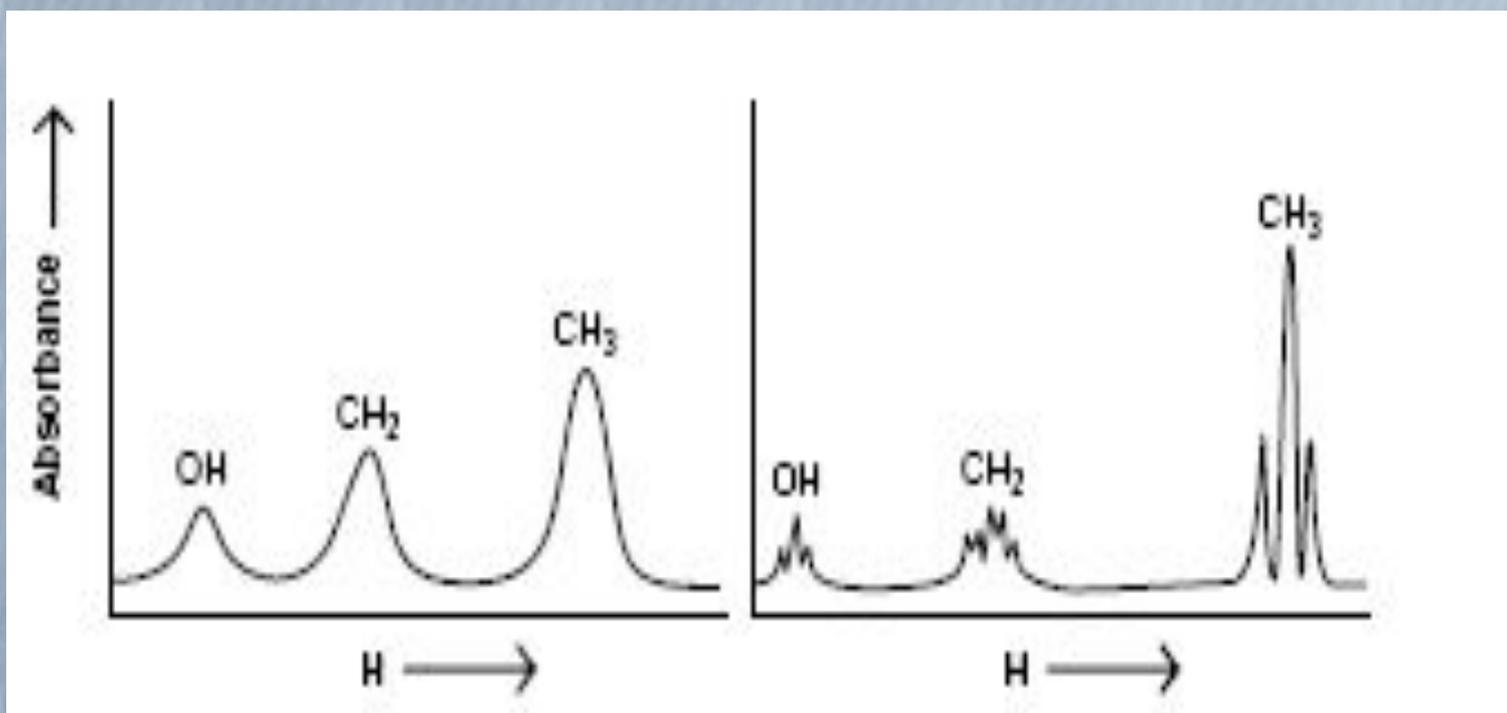
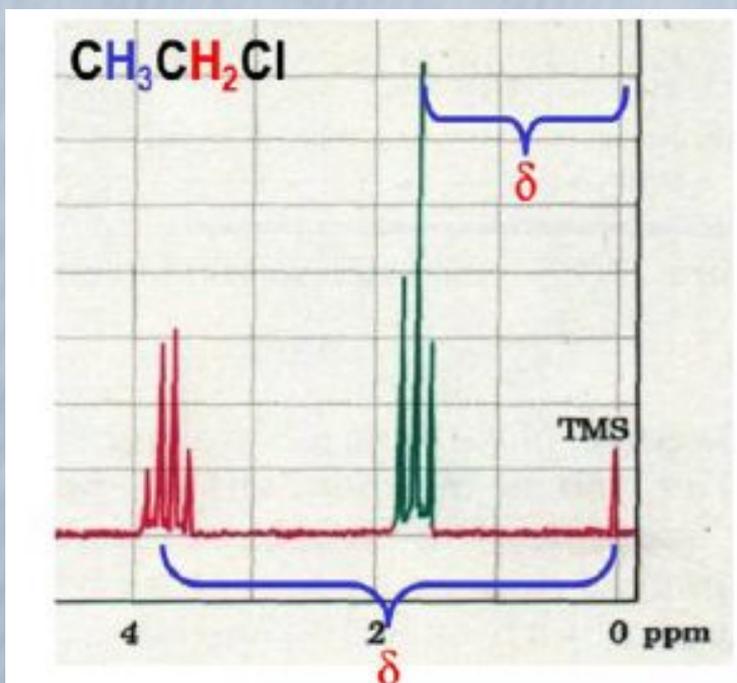
Для протона, находящегося в магнитном поле с индукцией 1,41 Тл, резонансная частота поглощения составляет ~ 60 МГц (радиочастотный диапазон).

$$\Delta E = 2 \mu_z B_0 = \gamma B_0 \hbar / 2\pi = \hbar \nu_0$$

3. Методы исследования третичной структуры белка

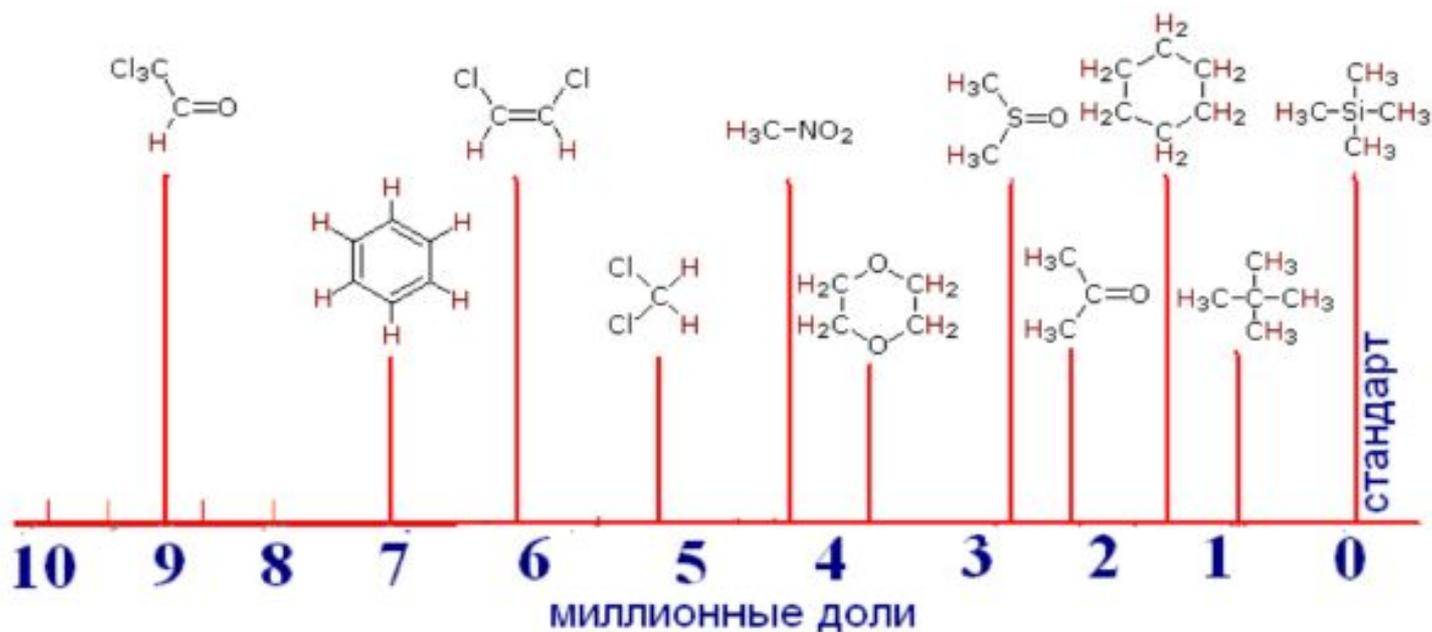
Химический сдвиг

$$\delta = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{ЭТ}}}{\nu_{\text{ЭТ}}} \cdot 10^6 \text{ [м. Д.]}$$



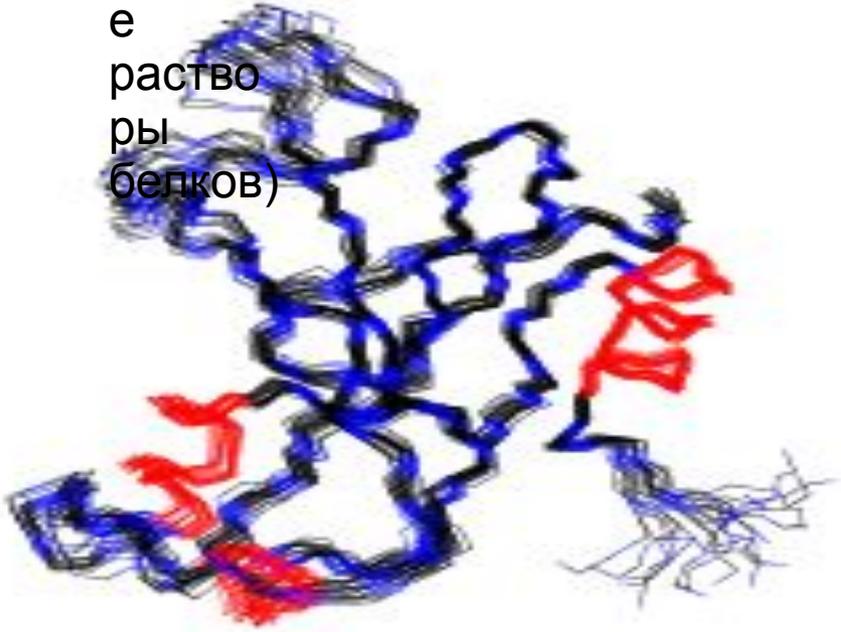
3. Методы исследования третичной структуры белка

Химические сдвиги сигналов различных протонов в спектрах протонного магнитного резонанса.



3. Методы исследования третичной структуры белка

ЯМР
(водные
растворы
белков)

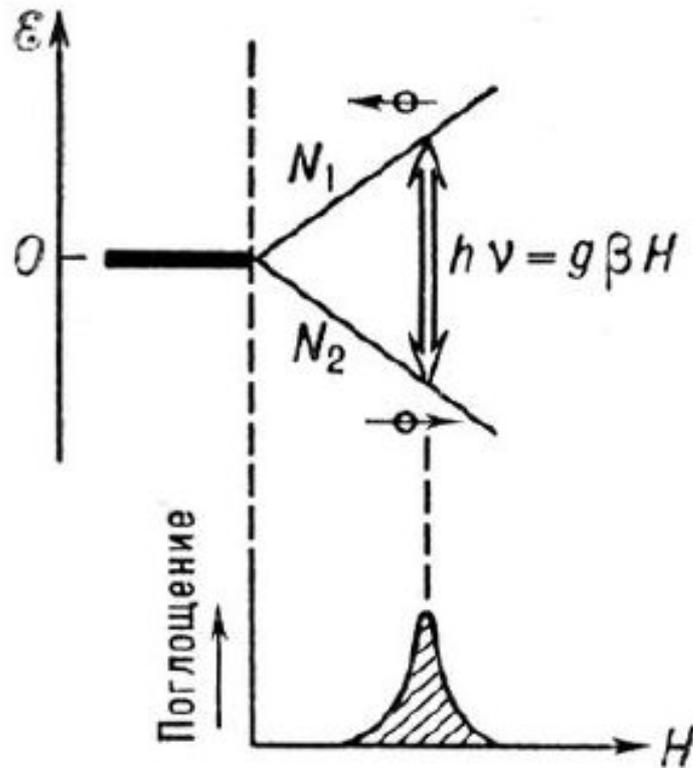


Рентгеноструктурный анализ (кристаллы)



4. Методы исследования мембран клеток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)



4. Методы исследования мембран клеток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

ЭПР-спектрометр



4. Методы исследования мембран клеток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

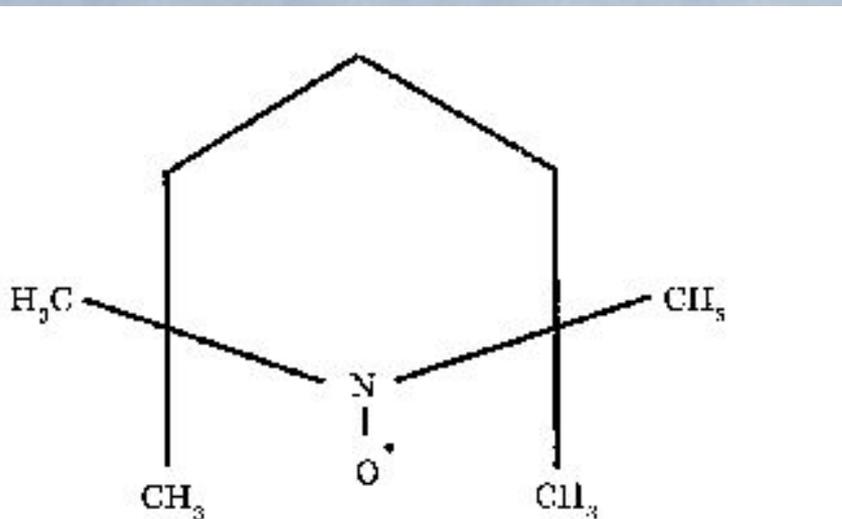
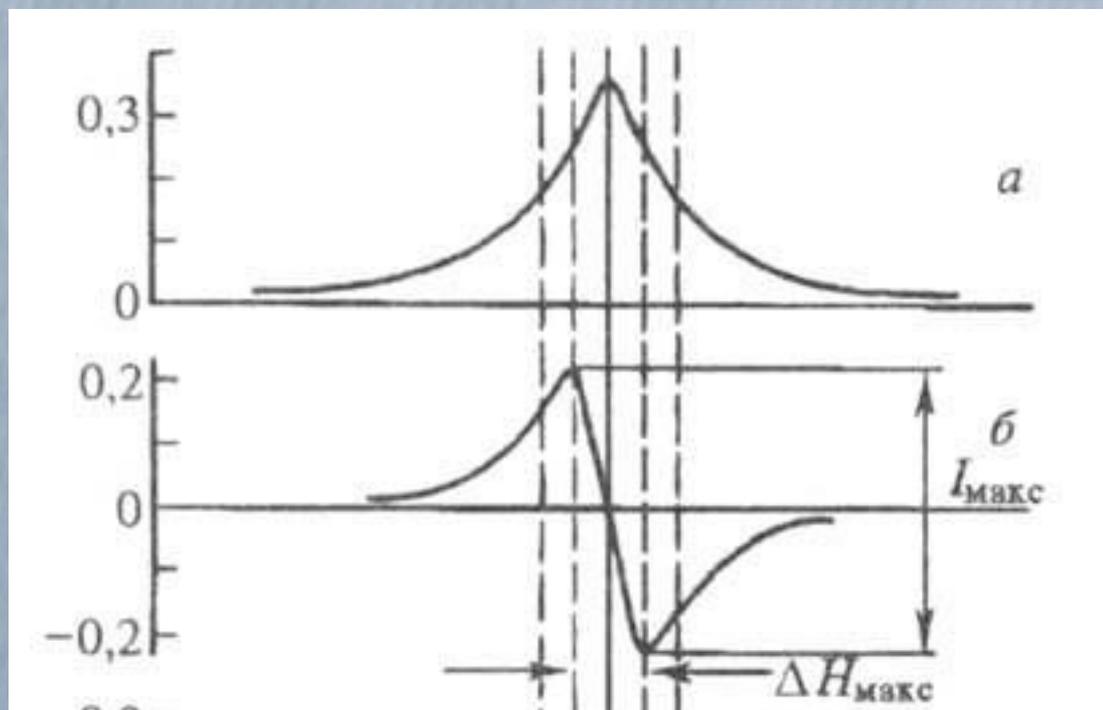


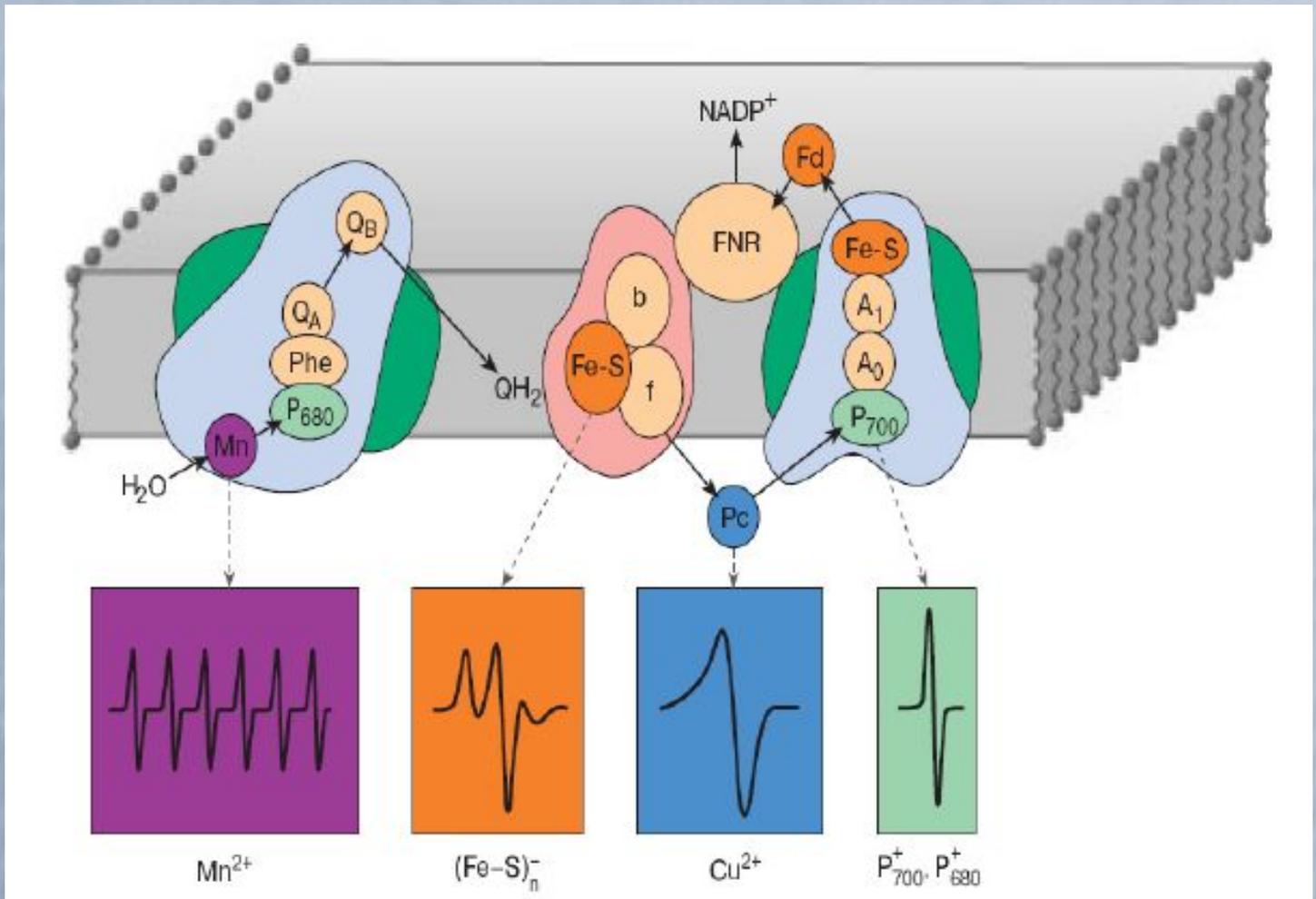
Рис. 1.7. Формула спицевого зонда ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидил-1-оксил)

Спектр ЭПР



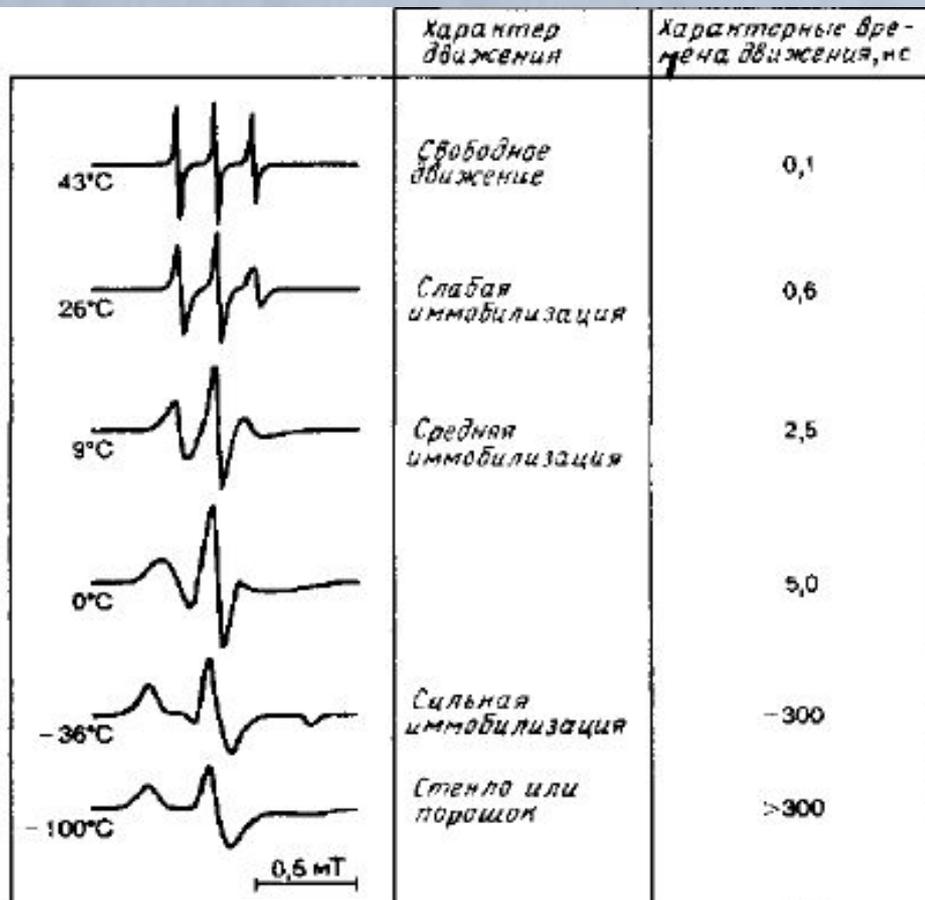
4. Методы исследования мембран клеток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)



4. Методы исследования мембран клеток

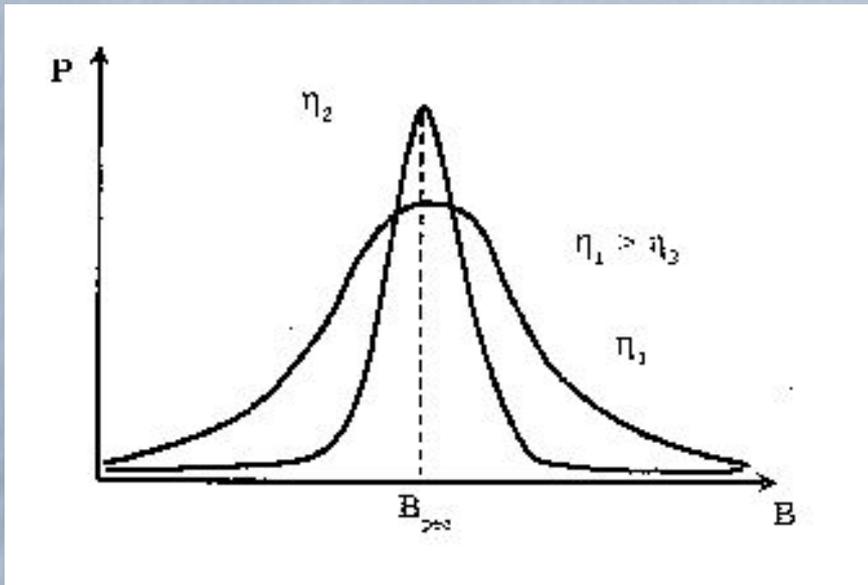
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)



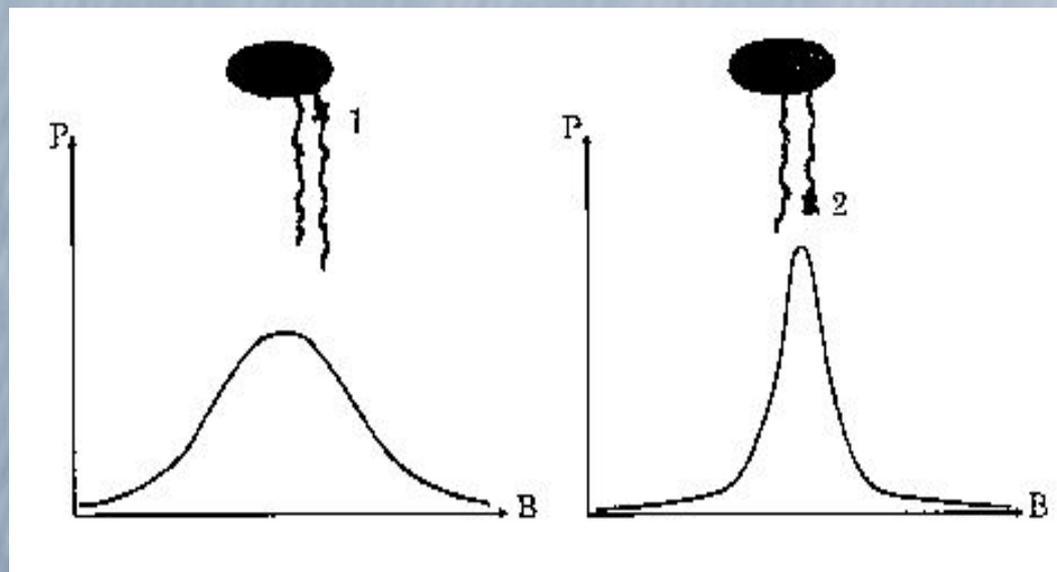
Зависимость ЭПР-спектров нитроксидной спиновой метки от скорости молекулярного вращения. Спектры, представляющие собой первую производную сигнала, получены при разных температурах и, следовательно, при разной вязкости среды [182].

4. Методы исследования мембран клеток

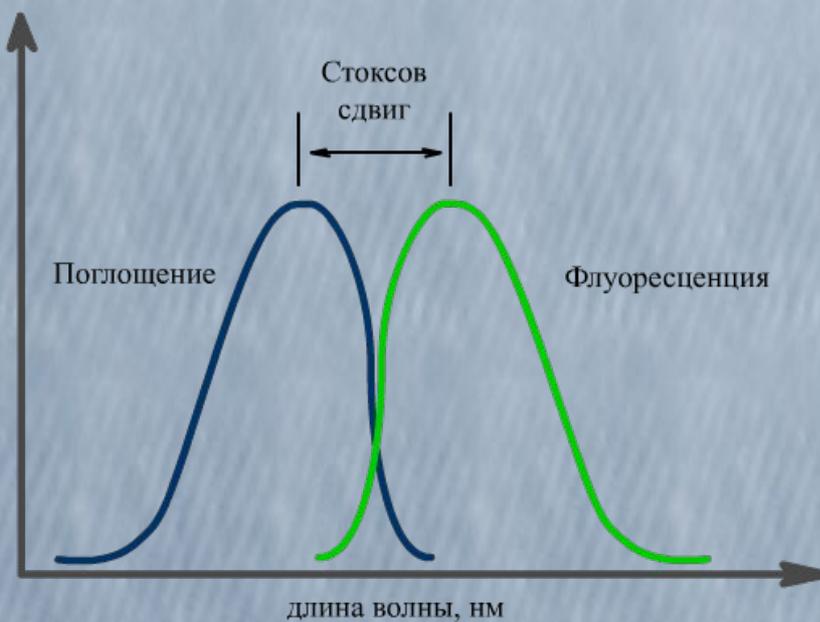
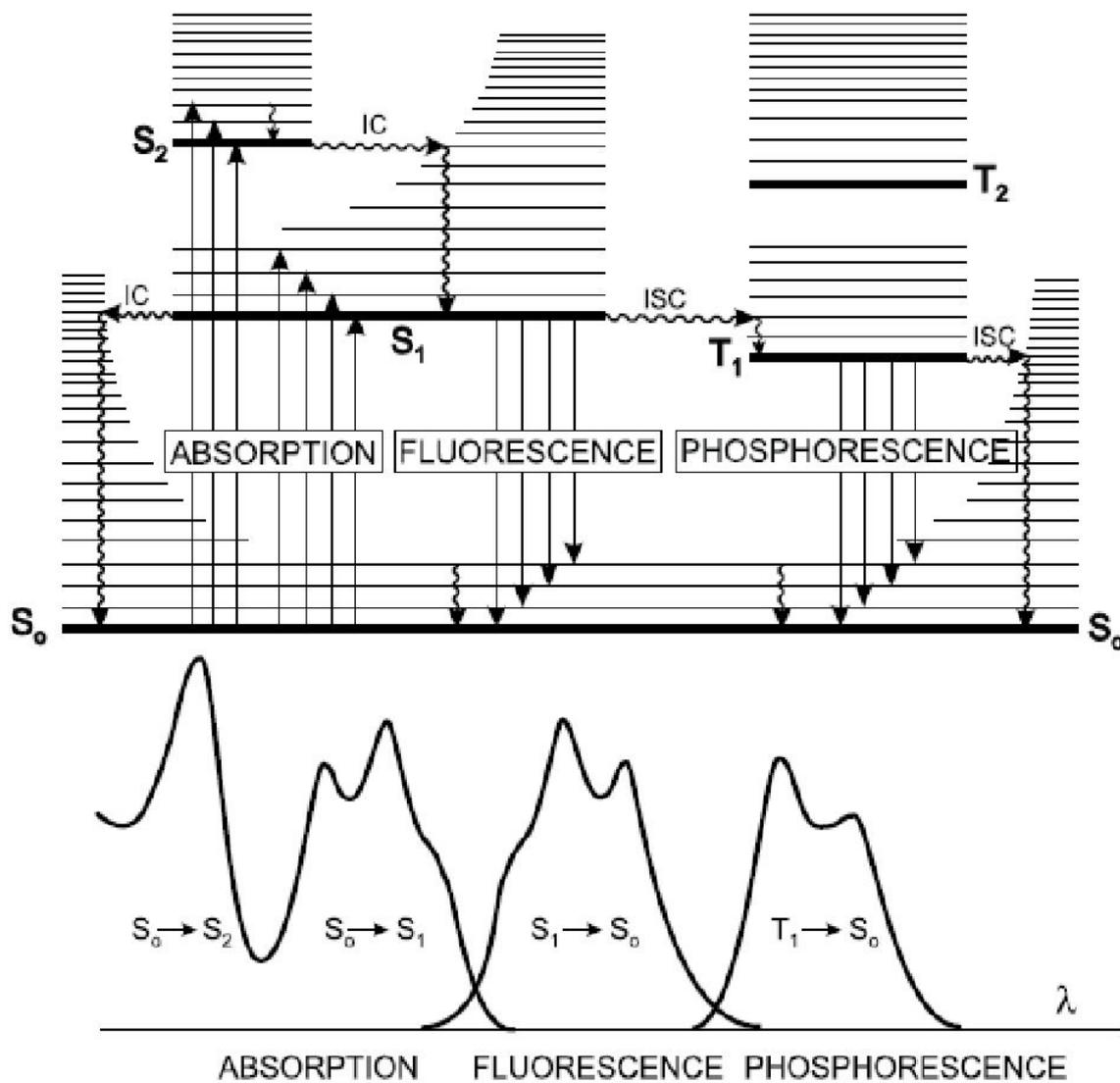
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)



Зависимость формы сигнала подвижности группы



5. Флуоресцентный анализ



Спектр люминесценции – зависимость интенсивности люминесценции от длины волны при постоянной длине волны возбуждающего излучения.

Спектр возбуждения люминесценции – зависимость интенсивности люминесценции от длины волны возбуждающего света.

Квантовым выходом люминесценции (η) называют вероятность перехода возбужденной молекул в основное состояние с испусканием кванта излучения.

Законы люминесценции

- Закон Стокса: спектр люминесценции лежит в более длинноволновой области, чем спектр поглощения того же соединения.
- Правило Каши: спектр люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения (способа возбуждения).
- Закон Вавилова: квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения (способа возбуждения).
- Правило Левшина: спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения, если они построены в шкале частот (энергий).

5. Флуоресцентный анализ

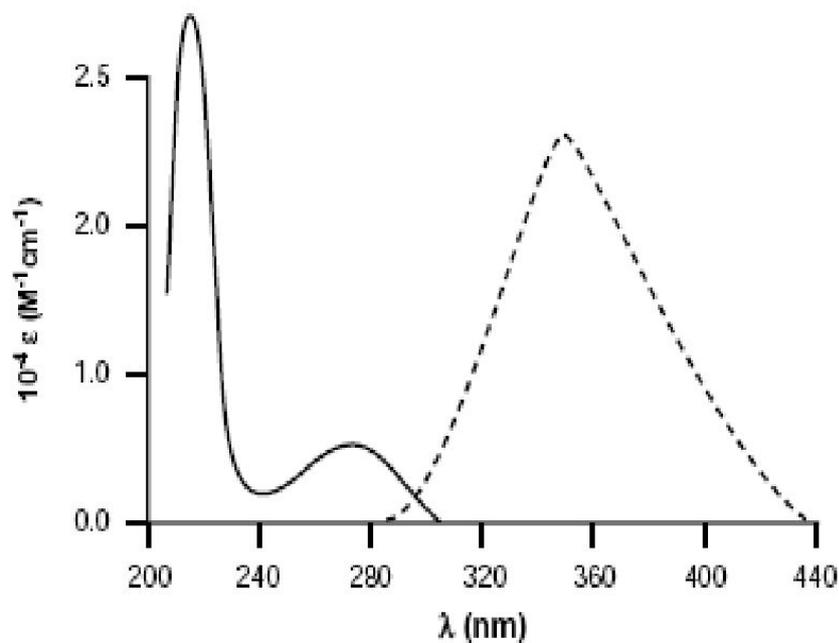


Figure 3-12. Absorption and fluorescence spectrum of tryptophan. The solid line is the extinction coefficient, and the dashed line is the fluorescence emission in arbitrary units with excitation at approximately 275 nm. D. Freifelder, *Physical Biochemistry*, 2nd edition, W. H. Freeman, New York, 1982, p. 539. © 1976, 1982 by W. H. Freeman and Company. Used with permission.

5. Флуоресцентный анализ

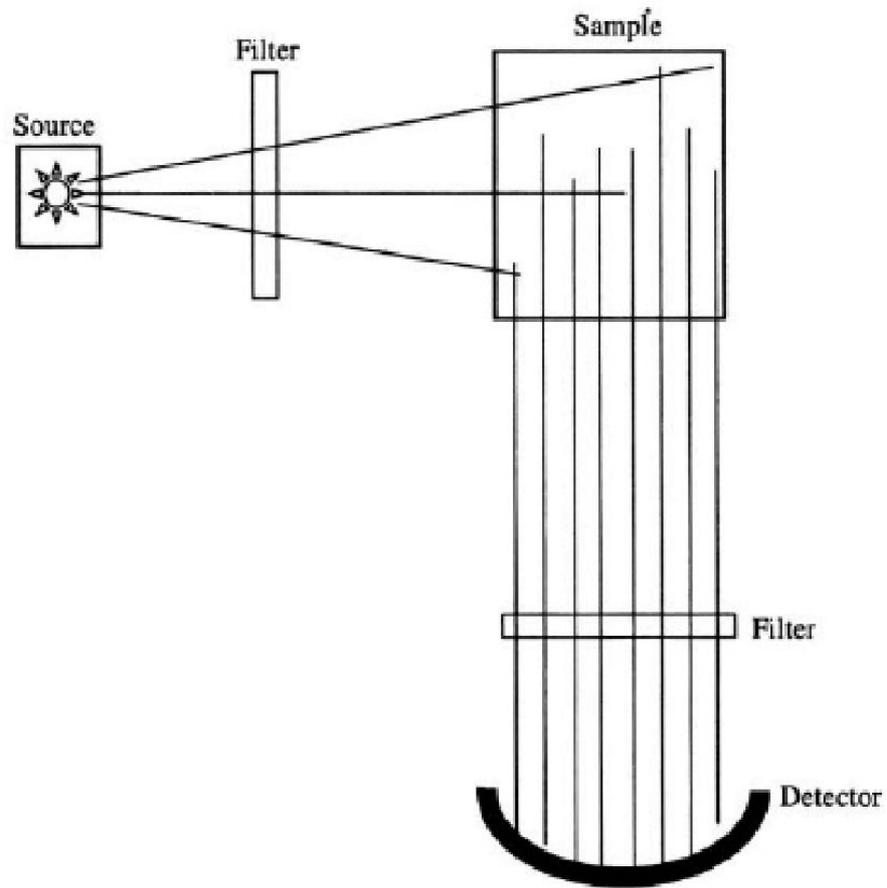
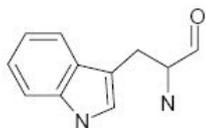


Fig. 4.8 A schematic sketch of the experimental setup used in fluorescence spectroscopy

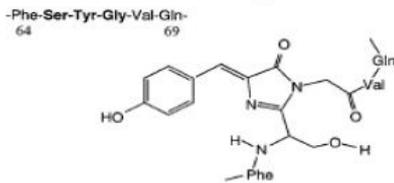
5. Флуоресцентный анализ

typical fluorophores



tryptophane

$\lambda = 280 \text{ nm}$



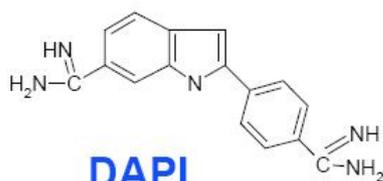
eGFP

$\lambda = 488 \text{ nm}$



TDI

$\lambda = 630 \text{ nm}$



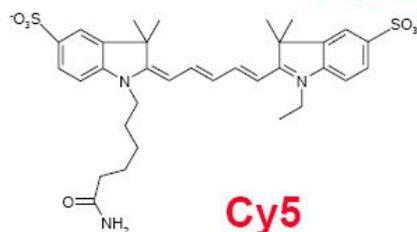
DAPI

$\lambda = 355 \text{ nm}$



TMR

$\lambda = 514 \text{ nm}$



Cy5

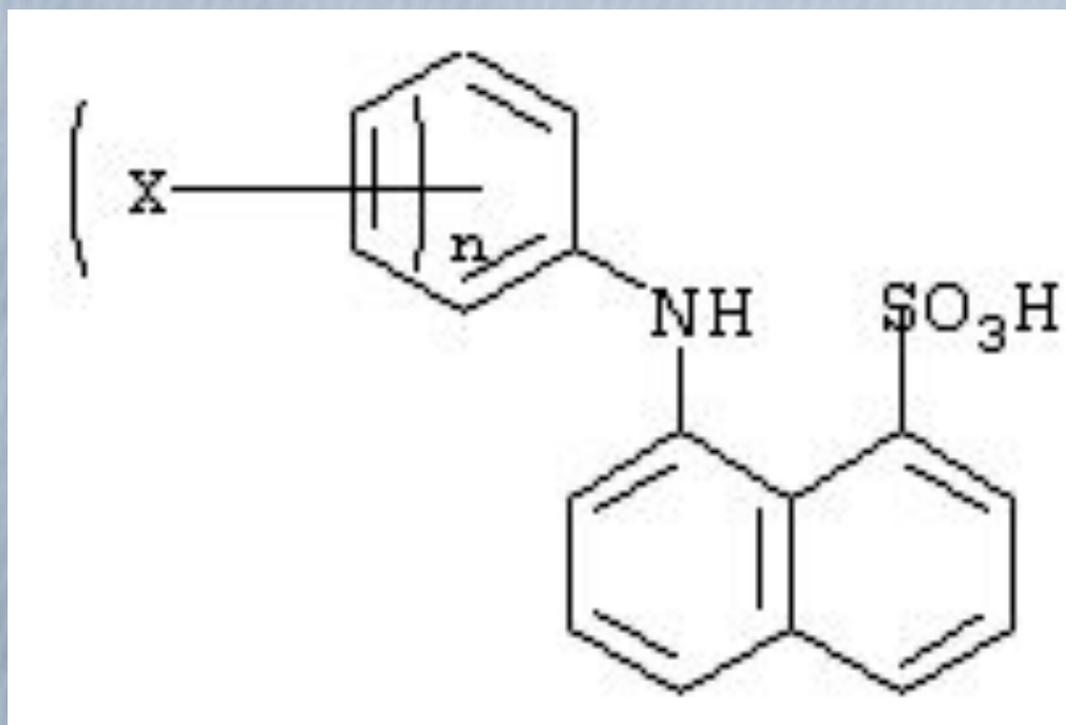
$\lambda = 630 \text{ nm}$

Влияние микроокружения на спектры и квантовый выход флуоресценции

- Зависимость максимума спектра флуоресценции диметиламинохалкона (ДМХ) от полярности растворителя

Растворитель	Диэл. Проницаемость (ϵ)	λ (нм)
Гептан	1,9	436
Толуол	2,4	472
Бутанол	17,7	545
Метанол	32,7	547
Вода	80	560

Флуоресцентный анализ мембран



АНС

(встраивание и свечение)
определяется разницей потенциалов
на поверхностях мембраны

Флуоресцентный анализ мембран

Пирен

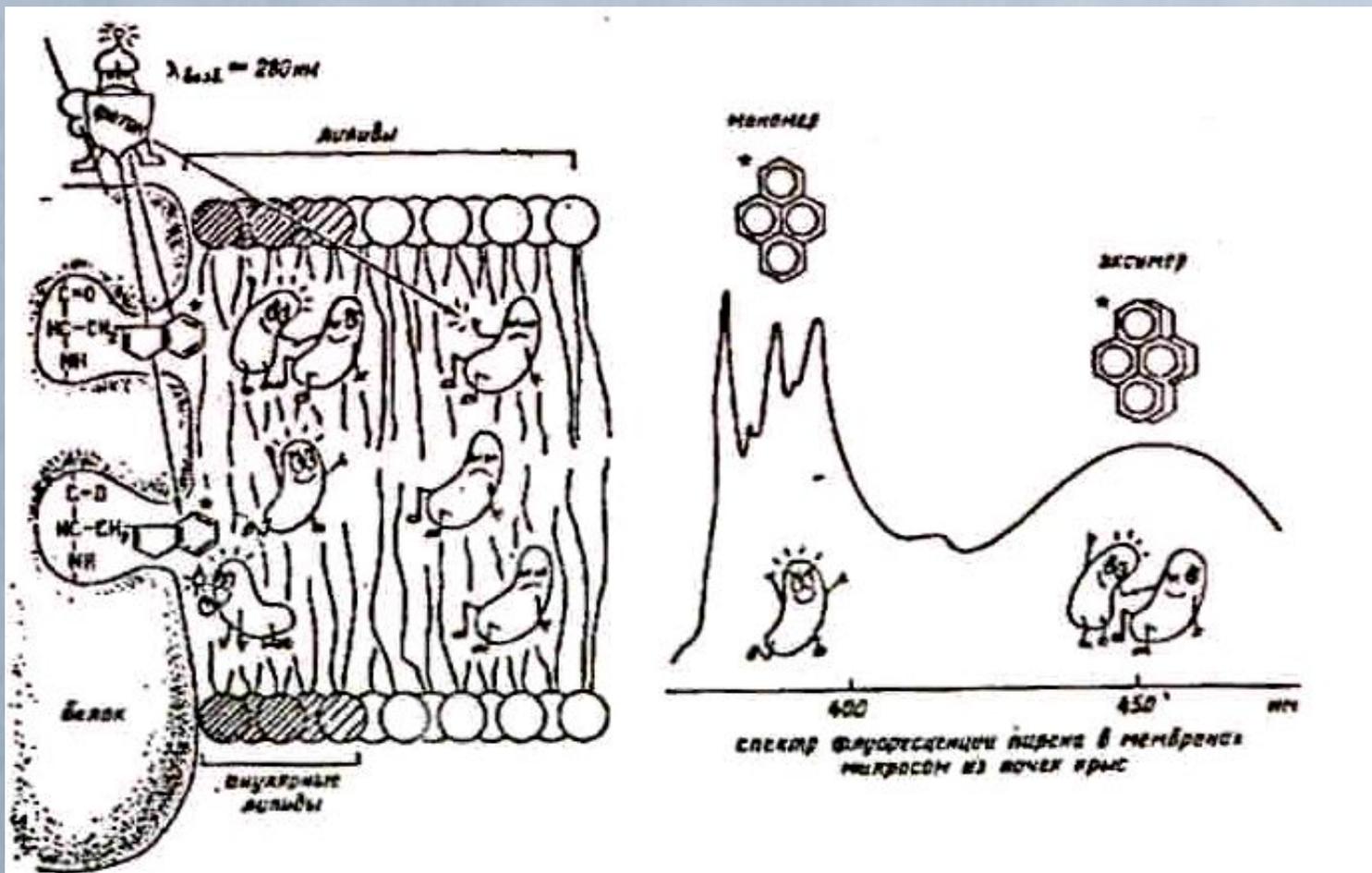
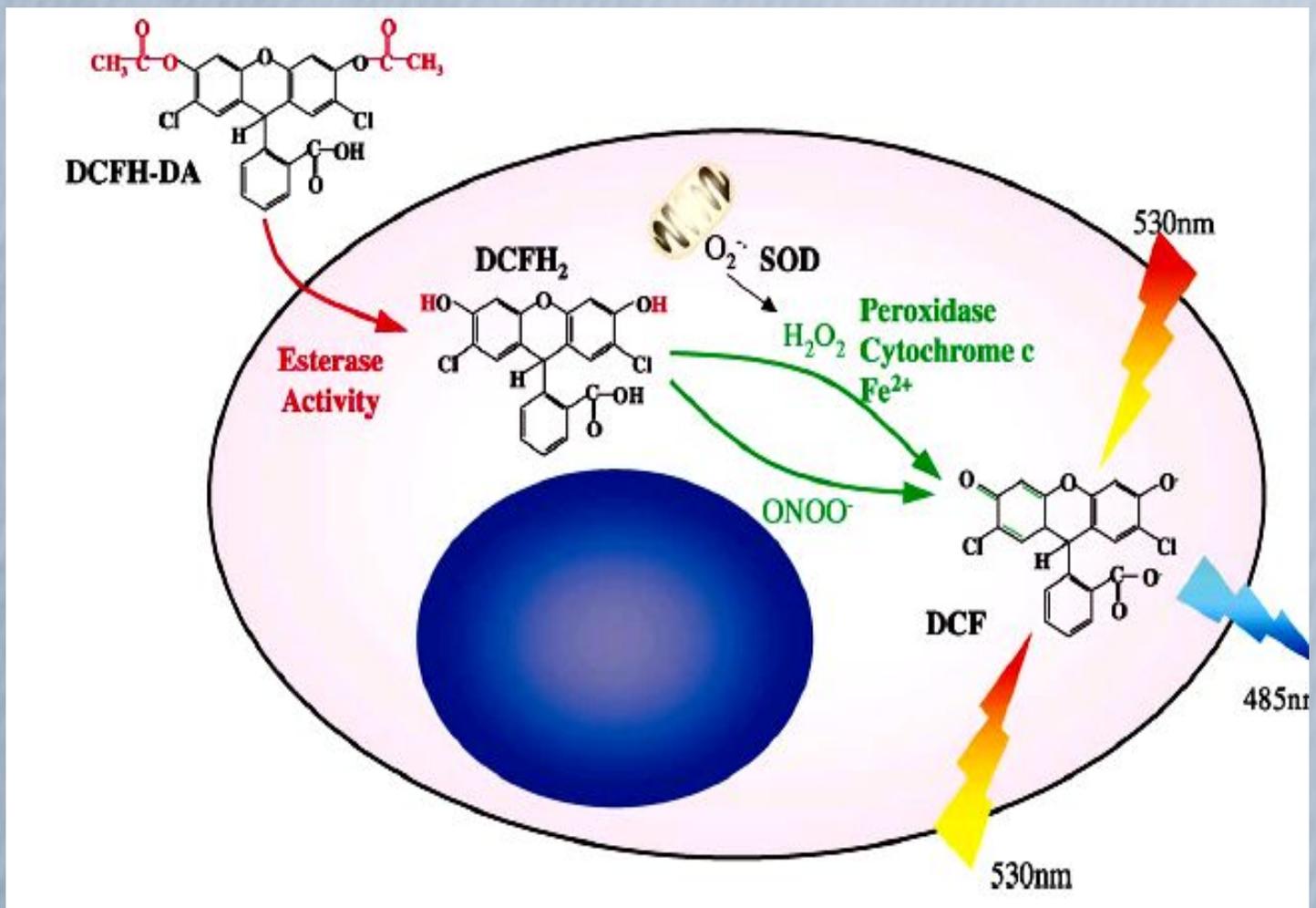


Рис. 10. Схема, иллюстрирующая собственную и вызванную флуоресценцию пирена и образование его эксимеров в мембранном бислое.

Флуоресцентный анализ мембран



Флуоресцеиндиацетат

Т

Свечение определяется диффузией зонда в клетку, активностью эстераз и pH среды в цитоплазме

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ



БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Биолюминесценцией называют свечение живых организмов. Оно происходит за счет специфических химических реакций с выделением света.

Светящиеся виды встречаются как среди одноклеточных организмов (бактерии, радиолярии и др.), так и среди многоклеточных (грибы, медузы, кальмары, рыбы, рачки, жуки, комары и др.). Не найдены биолюминесцентные организмы среди рептилий, высших растений, млекопитающих.

В настоящее время известно более 800 видов светящихся организмов, из них простейших – около 50, кишечнополостных – примерно 100, моллюсков – более 200 и рыб – около 300 видов.

Биолюминесцентные организмы

Таксон	Роды	Особенности свечения (максимум излучения)	Функции свечения
Бактерии	Photobacterium Vibrio Xenorhabdus	Стабильное яркое свечение (475-540 нм)	Симбиоз, паразитизм
Грибы	Panus, Armillaria, Pleurotus	Стабильное тусклое свечение (533 нм)	Для привлечения насекомых
Динофлагелляты (жгутиконосные водоросли)	Gonyaulax, Pyrocystis, Noctiluca	В ответ на раздражение возникают короткие яркие вспышки (470 нм)	Средство отпугивания или дезориентации хищников
Стрекающие кишечнорастворимые: медузы, гидроиды, морские перья	Aequorea, Obellia, Renilla	Яркая вспышка или серия вспышек (460-510 нм)	Средство отпугивания или устрашения
Нестрекающие: гребневки	Mnemiopsis, Beroe	Яркие вспышки (460 нм)	Средство отпугивания или устрашения
Кольчатые черви: земляные, многощетинковые, одонтосилис, ахолоэ	Diplocardia, Chaetopterus, Odontosyllis, Achloe	Клеточные выделения или внутриклеточные вспышки, временами очень яркие (465-530 нм)	Средство отпугивания или устрашения, ухаживание
Моллюски: двустворчатые, головоногие (кальмары)	Latia, Pholas, Heteroteuthis	Свечение секреторного типа, фотофоры с симбиотическими бактериями у некоторых кальмаров (490 нм)	Отвлечение, приманка, маскировка
Ракообразные: ракушковые, рачки, креветка, веслоногие	Vargula, Cypridina, Meganctiphanes, Gaussia	Выделение (выброс) светящегося облака (465-470 нм)	Отвлечение, приманка, ухаживание, маскировка, устрашение хищника
Насекомые: Жесткокрылые (жуки), светляки, жуки-щелкуны, железнодорожный червь	Photinus, Luciola, Pyrophorus, Arachnocampa	Импульсы видово-специфичной формы (480-580 нм)	Устрашение хищника, ухаживание, приманка для привлечения жертвы
Иглокожие (офиуры)	Phiopsila	Серия быстрых вспышек	Устрашение, отпугивание
Хордовые (оболочники)	Pyrosoma	Серии ярких вспышек, стимулируются механически, светом и другими факторами (480-500 нм)	Функция неизвестна
Рыбы: хрящевые, костные (сребробрюшковые, рогатые удильщики, рыба-мичман), морские среднеглубинные	Isistius, Leiognathus, Photoblepharon, Cryptopsaras, Porichthys, Cyclothone, Neoscopelus, Tarletonbeania	Вентральное маскирующее свечение, фотофоры латерально и на язык (490 нм)	Привлечение и захват жертвы, ухаживание, устрашение хищников, внутривидовая коммуникация

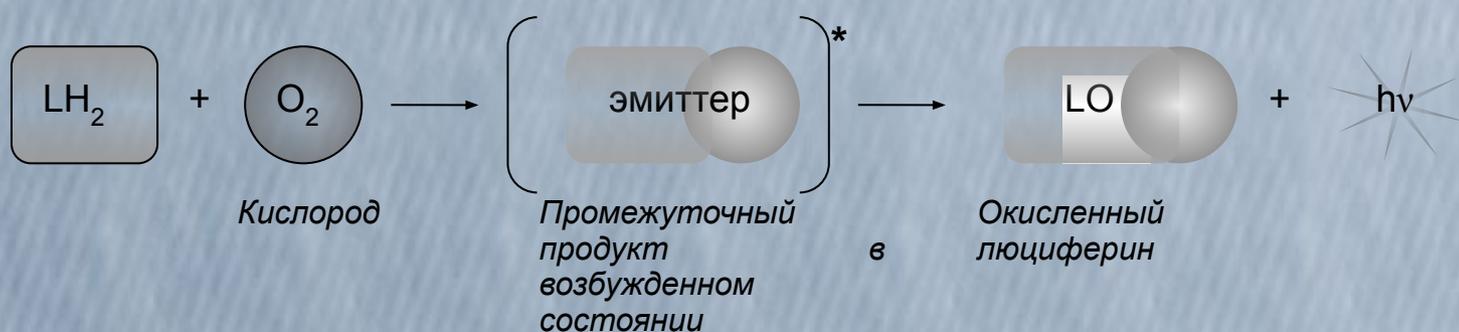
БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Многоклеточные животные обычно излучают свет не всем телом, а только специальными клетками *фотоцитами*, часто сгруппированными в особые органы свечения – *фотофоры*. Иногда фотофоры светятся непрерывно благодаря обитающим в них симбиотическим фотобактериям. Но обычно свечение происходит в виде коротких вспышек и контролируется нервной системой.

Биолюминесценция бывает *внутриклеточная* или *секреторного типа*. В последнем случае компоненты биолюминесцентной реакции «выбрасываются» из организма в виде покрывающей его слизи или расплываются вокруг него в воде, как большое световое облако.

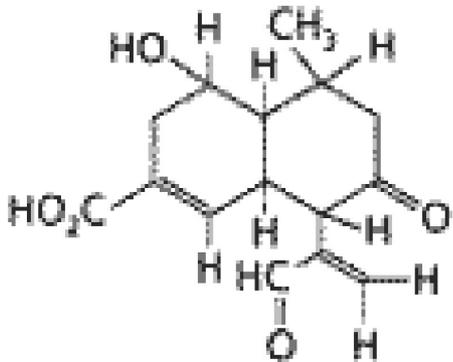
Общий механизм биолюминесценции

Биолюминесценция наблюдается вследствие дезактивации возбужденных молекул – эмиттеров. Эмиттеры возникают в организмах в ходе биохимических реакций. Биолюминесцентные реакции представляют собой, как правило, окисление некоторого вещества, называемого **люциферин**ом, кислородом воздуха, катализируемое специальным ферментом **люциферазой** (названия образованы от латинского *luciferos* – «несущий свет»). Во время такого ферментативного окисления люциферина выделяется большое количество энергии (40-80 ккал/моль), переводящее промежуточный продукт этой реакции в возбужденное состояние.

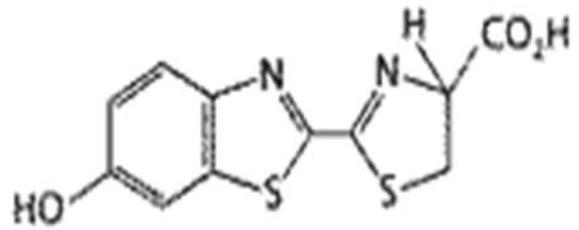


Общий механизм биолюминесценции

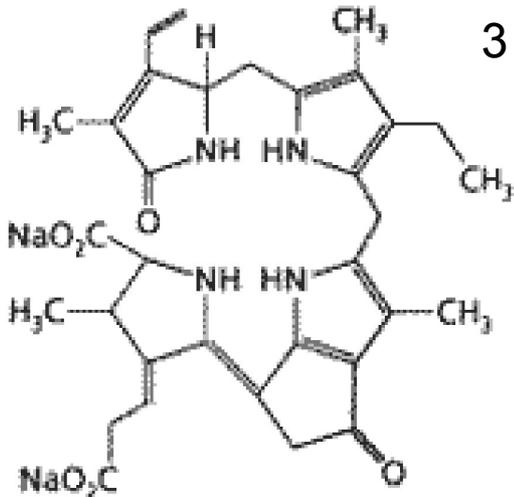
1



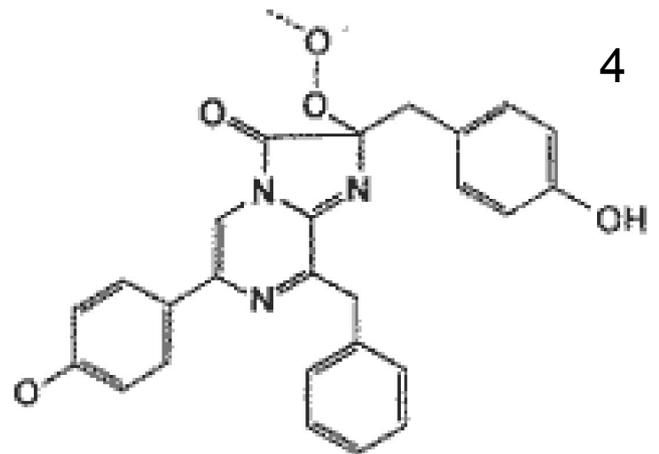
2



3



4



Люциферины разных светящихся организмов:

- (1) агариковых грибов
- (2) жуков-светляков
- (3) динофлагеллят
- (4) кишечнорастворимых, радиолярий, гребневиков и др.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Химически разные билюминесцентные реакции объединяет несколько характерных черт.

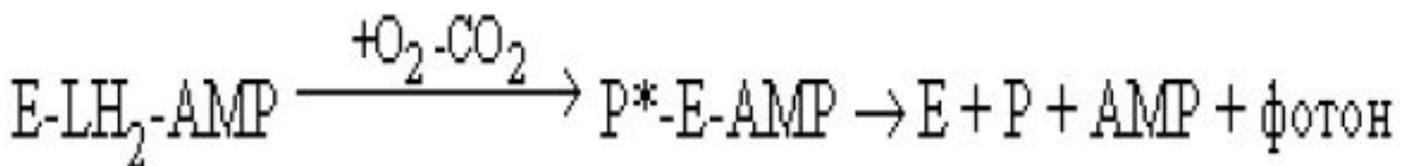
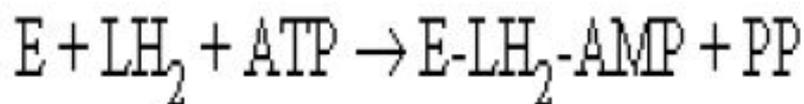
1. Всем этим реакциям абсолютно необходим кислород.
2. Люциферины, как правило, представляют собой хорошо флуоресцирующие соединения. Все они характеризуются сходными спектрально-люминесцентными свойствами.
3. В подавляющем большинстве случаев обязательным участником реакции является специфический белковый компонент – фермент люцифераза. Считается, что именно благодаря этому компоненту билюминесцентные реакции излучают яркий свет: белок прикрепляет к себе реагирующие вещества и образовавшиеся возбужденные эмиттеры и защищает их от вмешательства «посторонних» молекул, способных помешать акту излучения кванта света.
4. Излучение билюминесценции происходит с возбужденного промежуточного фермент-субстратного комплекса (эмиттера).

Биolumинесцентная реакция светляков

Различные виды светляков (насекомые семейства *Lampyridae*) встречаются на юге Северной Америки, в Японии, Юго-Восточной Азии, а также на Черноморском побережье Кавказа и в Приморском крае.

Люциферазы разных видов светляков немного отличаются по строению и составу аминокислот, максимуму длины волны излучаемого света (554-582 нм) и другим параметрам. Но, не смотря на это, все они катализируют один и тот же химический процесс - реакцию окисления кислородом воздуха люциферина (LH_2) в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и ионов Mg^{2+} .

- Здесь АМР – аденозинмонофосфат, РР – пирофосфат, Е – люцифераза, LH_2 – люциферин, P^* и Р – продукт реакции (оксилуциферин) в возбужденном и основном состояниях, соответственно.



Биолюминесцентная реакция светляков

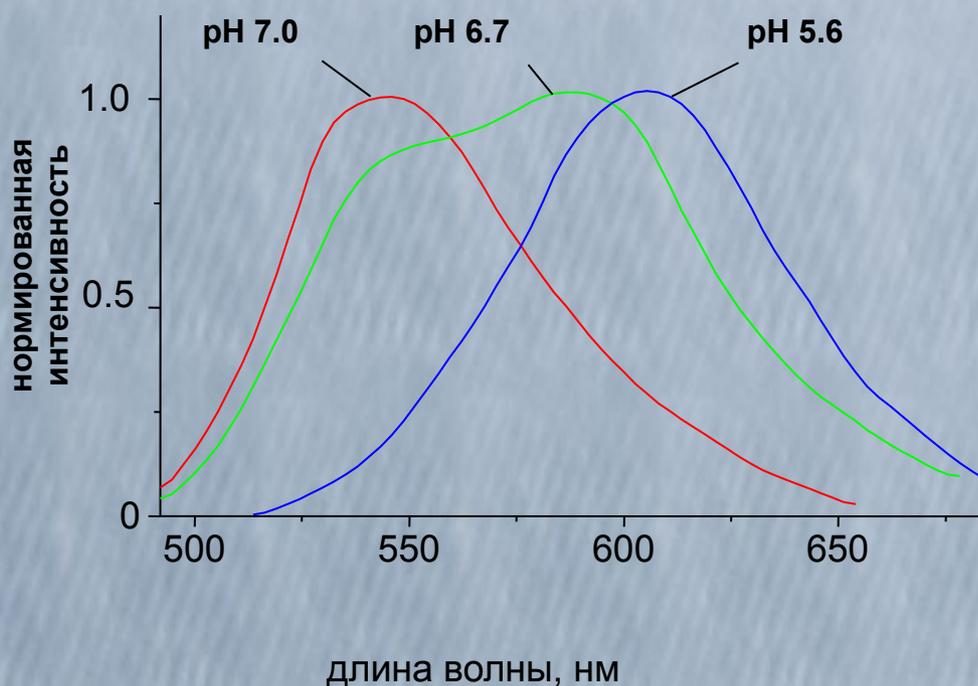
Люцифераза светляков состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 50000 каждая и не содержит простетических групп. В состав молекулы люциферазы входит большое количество гидрофобных аминокислот, что объясняет высокую склонность люциферазы к образованию агрегатов, особенно при низких значениях ионной силы. Люцифераза светляков содержит, по крайней мере, одну SH-группу, существенную для проявления активности, и имеет высокую специфичность к своим субстратам: люциферину и АТФ. Уровень свечения с аналогами АТФ обычно в 50 –100 раз ниже по сравнению с АТФ; при этом во многих случаях происходит изменение положения максимума излучения.

Сравнение аминокислотных последовательностей люцифераз светляков и жуков показывает, что все эти ферменты имеют сходный аминокислотный состав. Более половины аминокислотных остатков люцифераз - неполярные и амбивалентные. Общее число заряженных остатков практически одинаково для всех люцифераз. Основное отличие состоит в числе остатков цистеина (Cys) и триптофана (Trp). Люцифераза *P. pyralis* имеет четыре остатка Cys, люциферазы светляков рода *Luciola* - 7-8 остатков Cys, а люциферазы жуков - по 13 остатков Cys. Люциферазы светляков рода *Luciola* содержат по одному остатку Trp (для *Luciola mingrelica* это Trp 419), а другие по 2-3 остатка Trp (для *Photinus pyralis* это Trp 417 и Trp 426). Один из триптофановых остатков является консервативным во всем семействе люцифераз: Trp 419 *Luciola mingrelica* и Trp 417 *Photinus pyralis*.

Люциферазы светляков и жуков имеют довольно высокую гомологию в аминокислотной последовательности. Для люцифераз светляков рода *Luciola* гомология составляет 80%. Люцифераза светляков *Luciola mingrelica* гомологична на 43% с люциферазой жуков и на 67% с люциферазой светляков *Photinus pyralis*.

Биолюминесцентная реакция светляков

Максимумы биолюминесценции разных видов светляков лежат в интервале от 540 до 590 нм. Так, например, люциферазы из *Luciola mingrelica* и *Luciola cruciata*, имеют максимум биолюминесценции, лежащий в интервале от 562 до 570 нм, в то время как максимум биолюминесценции для *Luciola lateralis* равен 552 нм. Спектры биолюминесценции для люцифераз из различных источников, снятые в одинаковых условиях, имеют одинаковую форму, а отличаются лишь по положению максимума. Многие светляковые люциферазы демонстрируют зависимость спектра биолюминесценции от рН среды.



Спектры излучения биолюминесцентной реакции светляков *L. mingrelica* при различных значениях рН

Биолюминесценция кишечнополостных

Биолюминесценция среди кишечнополостных (*Coelenterata*) распространена довольно широко. Известно несколько десятков видов гидромедуз, излучающих свет в ответ на раздражение. В группе сцифомедуз достоверно известны четыре светящихся рода. Наиболее распространена в океане *Pelagia noctiluca*, диаметр колокола которой достигает 25 см, а протяженность щупалец – 2 м. Свечение кишечнополостных внутриклеточное.

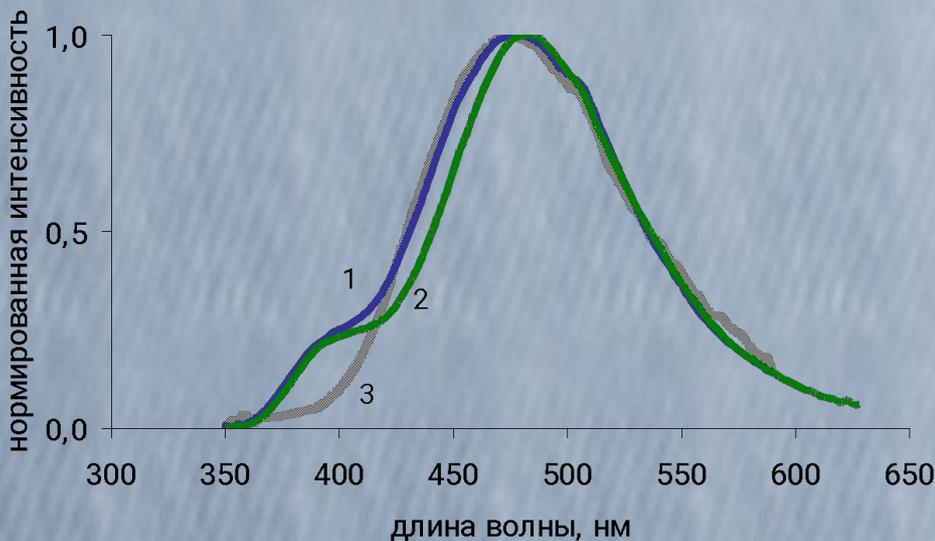
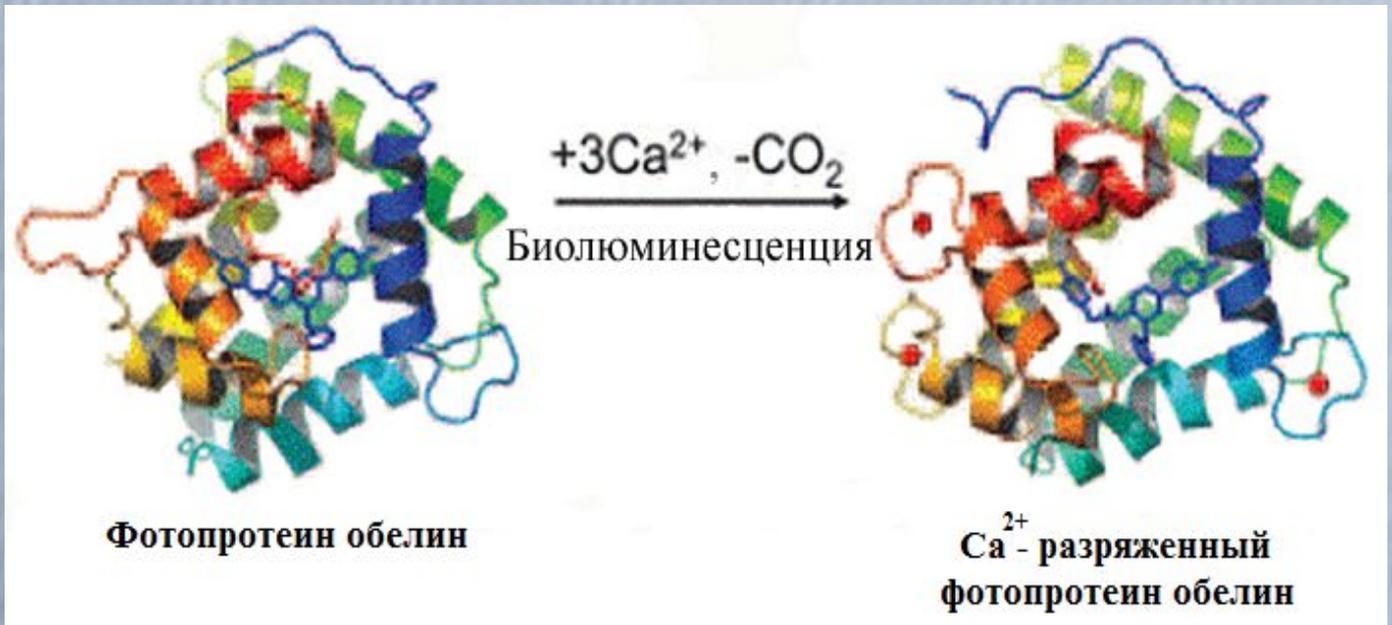
Биолюминесценция многих видов морских кишечнополостных обусловлена специфическими белками, представляющими собой устойчивый комплекс люциферазы с люциферинном. Эти белки называют Ca^{2+} -активируемыми (или кальций-зависимыми) *фотопротеинами*. Фотопротеины состоят из небольшого (20-30 кДа) одноцепочного полипептида - апопротеина, люциферина и молекулы кислорода. Люциферинном кишечнополостных является целентеразин. Целентеразин окисляется молекулярным кислородом до состояния гидроперекиси при присоединении к апопротеину). Биолюминесценция такой системы возникает при появлении ионов кальция, изменяющих конформацию белка так, что он утрачивает связь с перекисью люциферина. Перекись при этом теряет стабильность и превращается в окисел, попутно отделяя CO_2 и испуская синий свет. Фотопротеины в отличие от люцифераз способны совершать только один каталитический акт: при взаимодействии с ионами кальция вся аккумулированная в комплексе энергия излучается в виде квантов света.

Следует заметить, что целентеразин выполняет функцию люциферина не только у кишечнополостных, но также у радиолярий, гребневиков, щетинкочелюстных червей, некоторых рыб и кальмаров, креветок и, наконец, веслоногих и ракушковых планктонных рачков.

В настоящее время известно до 25 видов люминесцирующих морских кишечнополостных, включающих семейства *Cnidaria* и *Stenophora*, и обладающих фотопротеиновым типом люминесцентной системы. Однако только 7 из известных фотопротеинов выделены и частично охарактеризованы.

Биолюминесценция кишечнорастных

Наиболее изученными фотопротеинами являются обелин из гидроидных полипов рода *Obelia* и акворин из гидромедуз рода *Aequorea*. Обелин – мономерный белок с молекулярной массой 30000. Для обелина характерен спектр люминесценции с максимумом при 469 нм, что находится в хорошем соответствии со спектральными характеристиками биолюминесценции *in vitro*. Оптимум pH люминесценции обелина приходится на интервал 9,0-10,5. По основным физико-химическим свойствам обелин сходен с акворином.



Биолюминесцентные спектры Ca^{2+} -регулируемых реакций с участием разных фотопротеинов: 1 – обелин, дикий тип; 2 – мутантная форма обелина Y138F, 3 – акворин.

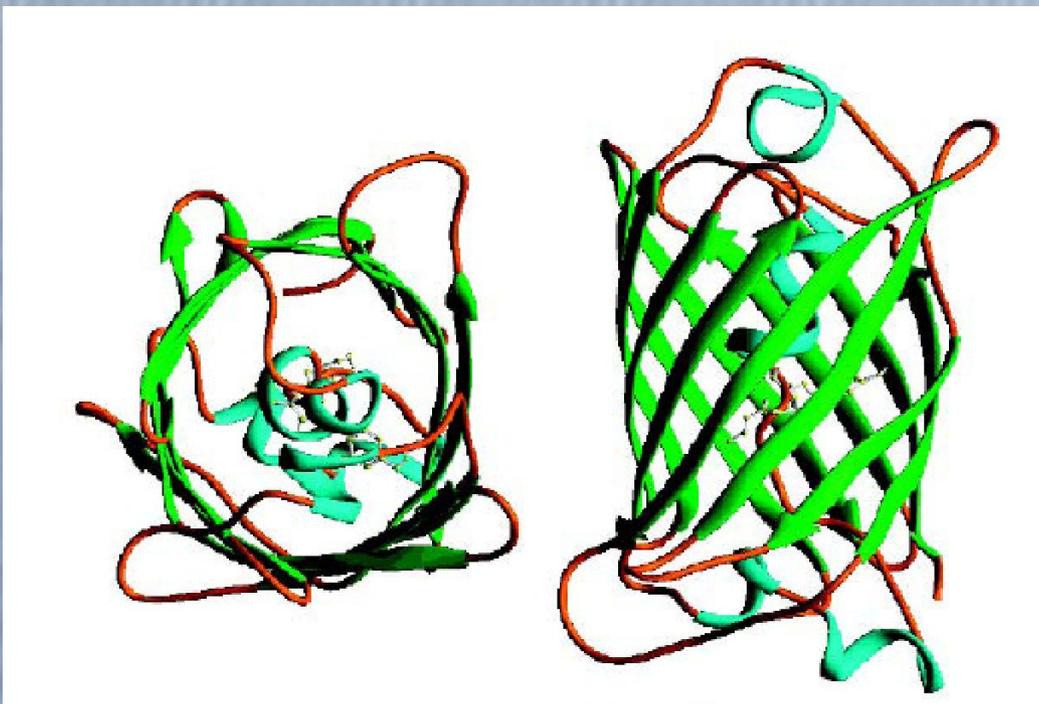
Биолюминесценция кишечнополостных

Для люминесценции морских перьев *Renilla* характерна стадия предварительной активации люциферина. На этой стадии неактивный люциферилсульфат взаимодействует с 3,5-дифосфоаденозином (PAP) в присутствии люциферилсульфокиназы и переходит в активный люциферин, который окисляется люциферазой с образованием кванта света, оксилюциферина и CO_2 . Механизмы образования возбужденного комплекса – фотопротеина у *Renilla* сходны с аналогичными процессами у *Aequorea* и *Obelia*. Однако полученный в ходе реакции фотопротеин последних отличается высокой стабильностью и способен в течение долгого времени находиться в возбужденном состоянии, не диссипируя энергию до тех пор, пока в системе не появятся двухвалентные металлы (Ca^{2+} , Sr^{2+}).

Биолюминесценция кишечнорастных

GFP – green fluorescent protein

В 1962 г. О. Шимомура, Ф. Джонсон и Ю. Сайга отметили разницу между цветом биолюминесценции живой эквореи (биолюминесценция *in vivo*) и выделенного из нее комплекса светящегося вещества с экворином (биолюминесценция *in vitro*). У живой медузы свечение зеленое с максимумом 508 нм. А чистый комплекс, реагируя с ионами кальция, испускает синий свет (максимум 465 нм). Оказалось, в светящихся энтодермальных клетках эквореи присутствует, кроме экворина, еще и другой - зеленый флуоресцирующий белок. Если облучить его синим или ближним ультрафиолетовым светом (в спектре возбуждения максимум 395 нм, второй пик - 475 нм), он излучает зеленый свет с максимумом 508 нм. Была установлена аминокислотная последовательность зеленого белка (его молекулярная масса составляет 28 кДа) и выяснилось, что он состоит из 238 остатков. Квантовый выход флуоресценции GFP оказался фантастически велик: около 0.8. Следует отметить, что энергия возбуждения экворина отчасти мигрирует на GFP безызлучательно благодаря непосредственному контакту с двумя молекулами GFP (он и существует в виде димера при одной молекуле экворина).



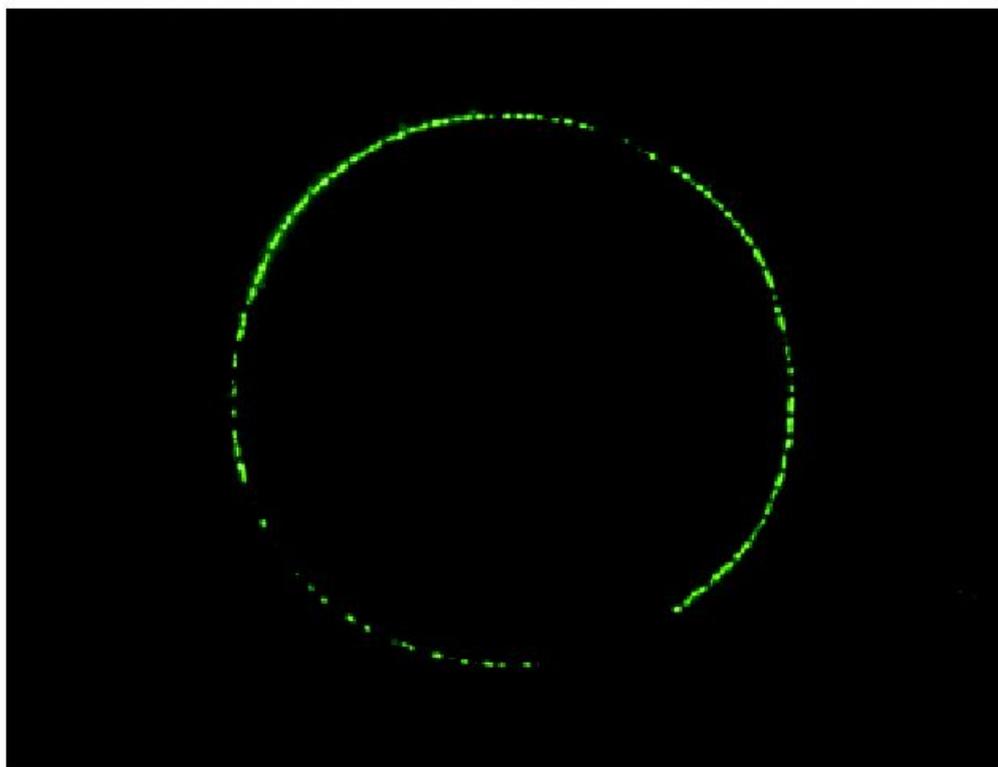
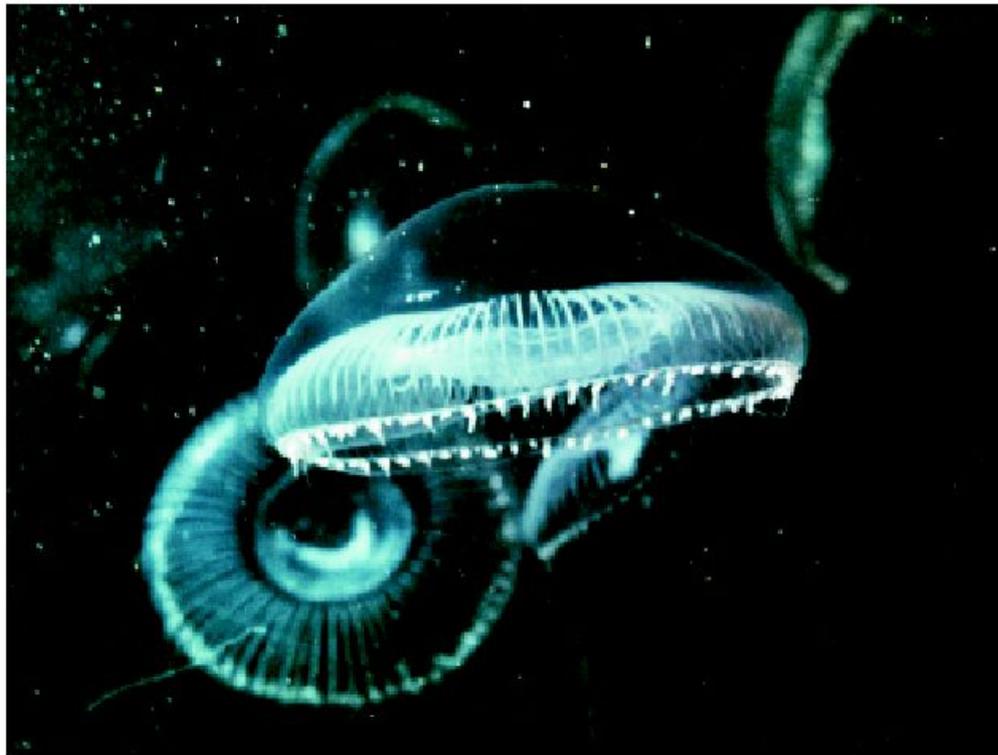


Figure 1.1. Mid-summer specimens of *Aequorea aequorea* photographed in natural environment (top) and in seawater supplemented with KCl in darkroom (bottom), both at the University of Washington's Friday Harbor Laboratories.

The Bioluminescence of Green Fluorescent Protein in *Aequorea victoria*

Aequorea victoria is known for its naturally occurring green fluorescence around the ring of its bell, in large thanks to the presence of two fluorescent proteins: Aequorin and Green Fluorescent Protein (GFP).

The process begins when calcium ions bind to the chemiluminescent Aequorin, a protein with lu in the middle of each of its two subunits. Once the calcium is bound, the chromophores begin to emit blue light at 470nm.

Aequorin:



Chromophore



The light emitted by Aequorin's chromophore causes the chromophore of GFP to become excited.

Blue light is emitted at 470 nm



GFP Chromophore



GFP contains a naturally built chromophore consisting of a special sequence of 3 amino acids: Serine, Tyrosine, and Glycine. When the chromophore receives blue light from aequorin, it becomes excited and emits its very own green light.

GFP - excited state



Dipaa

GFP – green fluorescent protein

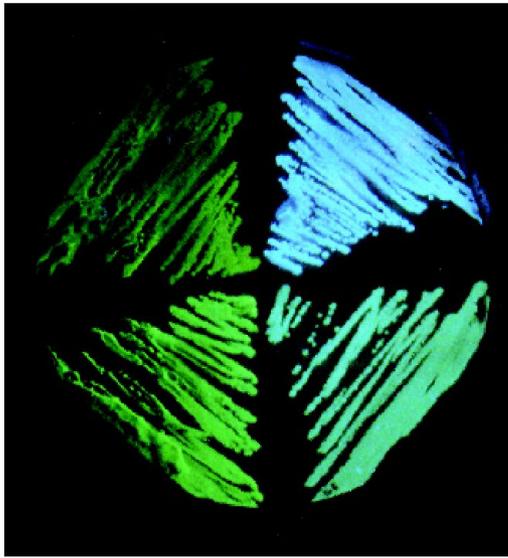
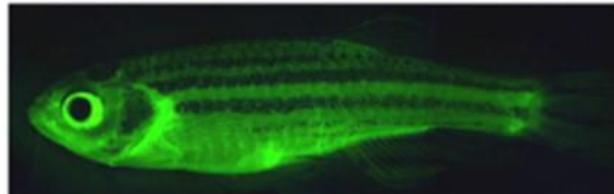
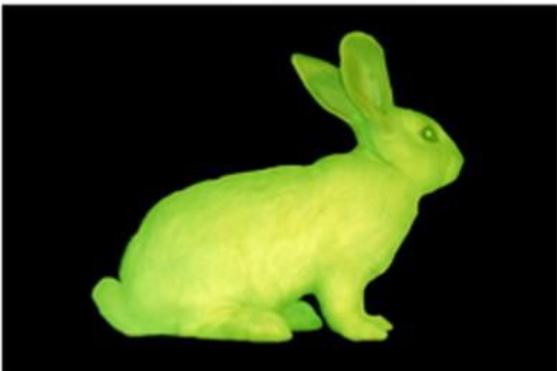
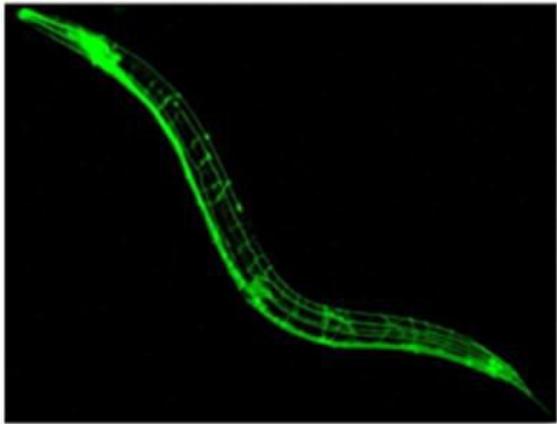


Figure 5.3. Visual appearance of *E. coli* expressing four differently colored mutants of GFP.



БиOLUMиНесценция бактерий

Все известные в настоящее время светящиеся бактерии делятся на две группы: морские и пресноводные. Известно три рода морских светящихся бактерий: *Photobacterium*, *Vibrio*, *Alteromonas*. Среди светящихся бактерий имеются свободноживущие, сапрофитные и паразитирующие формы. Они живут в водах морей от тропиков до высоких широт, редко встречаются в поверхностном слое, в основном их ареал приурочен к зонам повышенной концентрации планктона. По численности светящиеся бактерии могут составлять до 60-70% от свободно живущих сапрофитов морских вод. Весьма регулярно они встречаются в качестве симбионтов, живущих факультативно в кишечнике, реже в других органах морских рыб, моллюсков, губок.

Кислород играет очень важную роль в жизненном цикле светящихся бактерий. Эти бактерии являются облигатными аэробами по свечению. Очень малых концентраций кислорода оказывается достаточно, чтобы бактерии начали светиться, поэтому их даже используют как один из самых чувствительных индикаторов следовых количеств кислорода (от 10^{-10} М до 10^{-5} М). Синтез люциферазы в клетках светящихся бактерий зависит также от концентраций в среде O_2 . Да и сама люцифераза обладает высоким сродством к кислороду.

Второй метаболический процесс, на который светящиеся бактерии расходуют кислород – дыхание. Причем распределение потребления O_2 между процессами свечения и дыхания зависит от условий роста бактерий. Так, в фазе замедленного роста бактерий наблюдается их максимальное свечение благодаря тому, что на свечение идет почти весь поглощаемый кислород.

Обнаружена также критическая (пороговая) концентрация O_2 , ниже которой наступает полное гашение свечения бактерий. При концентрациях O_2 , выше критической свечение возрастает гиперболически. По-видимому, распределение O_2 между свечением и биоэнергетическими процессами у светящихся бактерий идет по пути конкуренции между ними за электроны. Однако механизм конкуренции за электроны между свечением и дыханием до сих пор окончательно не ясен.

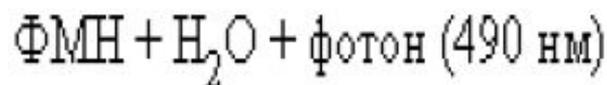
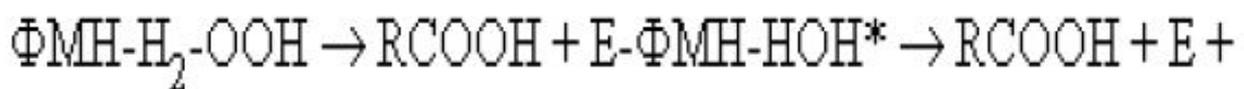
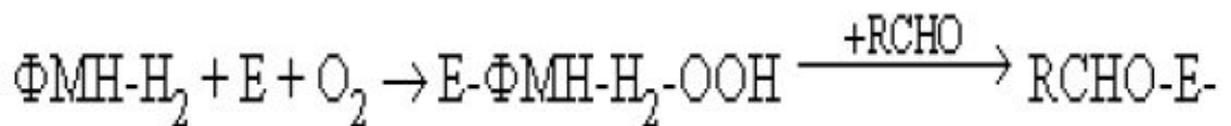
Биолюминесценция бактерий

Химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление восстановленного флавиномононуклеотида ФМН·Н₂ и длинноцепочечного альдегида RCHO кислородом воздуха. Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с молекулярной массой приблизительно 80 кДа. Фермент не содержит металлов, неаминокислотных остатков и простетических групп. Каталитической активностью обладает только димер. Роль субъединиц в катализе различна. Опыты по химической модификации и гибридизации, изучению протеолиза люциферазы показали, что активный центр локализован на большой субъединице, тогда как меньшая определяет температурную стабильность фермента и важна для поддержания конформации фермента. На бактериальной люциферазе расположен один центр связывания для ФМНН₂ и один - для альдегида.

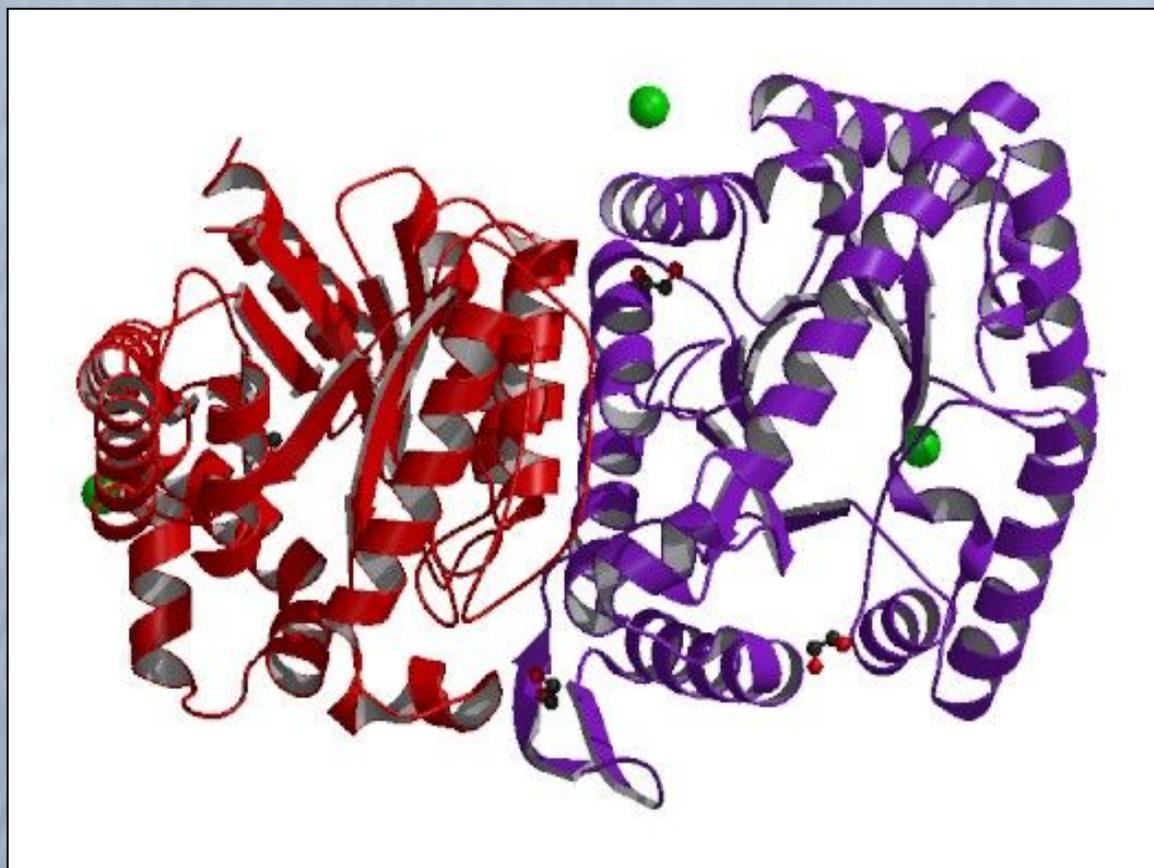
Компоненты биолюминесцентной реакции способны реагировать и в отсутствие фермента, но эффективность хемилюминесценции такого процесса на 10 порядков ниже. С этой точки зрения некоторые исследователи называют бактериальную люциферазу самым каталитически сильным ферментом из всех известных.

Биолюминесценция светящихся бактерий

- Здесь E – люцифераза, -OOH – гидроперекисная группа, RCOOH - алифатический альдегид, RCOOH – жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида.



Биолюминесценция бактерий



Биолюминесценция динофлагеллят

Динофлагелляты или жгутиконосцы являются основными продуцентами света в море, по крайней мере в его пелагической, удаленной от берегов части. Жгутиконосцы распространены почти во всех частях Мирового океана и встречаются во все времена года. Изученность светящихся динофлагеллят неодинакова. Относительно хорошо исследованы представители двух родов – *Noctiluca* и *Gonyaulax*.

Излучают динофлагелляты импульсами. Возбужденная клетка через несколько миллисекунд после воздействия раздражителя вспыхивает на 100-300 мс и снова угасает. Излучающими органоидами этих одноклеточных служат так называемые сцинтиллоны, представляющие собой заполненные цитоплазмой кармашки в мембране клеточного вакуоля. Сцинтиллоны содержат люциферазу динофлагеллят и связанный со специальным белком люциферин. Высвобождение люциферина происходит при сдвиге рН в сцинтиллоне от 8 до 6. Этот сдвиг рН является результатом открытия ионных каналов в мембране вакуоля.

Люцифераза жгутиконосцев представляет собой одноцепочный полипептид массой 140 кДа. Каждая молекула люциферазы имеет три центра связывания люциферина.



Свечение червей

Среди кольчатых червей много биолюминесцентных видов, как морских, так и наземных.

Морские полихеты *Chaetopterus* обитают в U-образных тоннелях, которые они вырывают в донном песке. Биолюминесценция этих червей носит экзогенный характер: под воздействием раздражения они выделяют светящуюся жидкость. Химическая основа такого свечения пока не установлена.

Более изученной является биолюминесцентная система земляных червей. Светящиеся земляные черви (олигохеты) найдены повсюду в мире. Их существует, по крайней мере, 33 вида из 16 родов. В ответ на раздражение земляные черви также выделяют экстракт со специальными клетками, которые разрушаются и испускают свет в сине-зеленой области спектра. Максимумы спектров биолюминесценции земляных червей разных видов лежат в диапазоне 500-550 нм. Установлено, что люциферин земляных червей является простой алифатический альдегид (N-изовалерил-3-амино-1-пропаналь). Биолюминесцентная реакция начинается с образования гидропероксидного аддукта люциферина вследствие взаимодействия альдегида с перекисью водорода. Люцифераза земляных червей представляет собой медьсодержащий фермент с молекулярной массой около 300 кДа. Она катализирует распад гидропероксидного аддукта люциферина с выделением кванта света. Таким образом, светоизлучающая реакция некоторых видов земляных червей является примером вовлечения в биолюминесцентный процесс не молекулярного кислорода, а перекиси водорода.

В лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (Красноярск) в настоящее время проводят сравнительное исследование биолюминесценции *in vivo* и *in vitro* сибирских кольчатых червей - почвенных энхитреид *Henlea sp.* и *Fridericia heliota*. Для первого вида характерно внеклеточное, экзогенное светоизлучение, а для второго – внутриклеточное. Установлено, что биолюминесцентная система *Henlea sp.* включает четыре компонента: люциферазу (72 кДа), люциферин, ион кальция - активатор люциферазы и кислород. Для биолюминесцентной реакции *F. heliota* необходимо пять компонентов: люцифераза (60 кДа), люциферин (0.5-0.7 кДа), АТФ - косубстрат люциферазы, ион магния – активатор люциферазы и кислород. По другим параметрам биолюминесценция этих двух видов червей также отличается друг от друга и от остальных известных науке. Максимумы спектров биолюминесценции этих олигохет располагаются при длине волны 478 нм (*F. heliota*) и 464 нм (*Henlea sp.*). Химическая структура люциферинов пока не установлена.

Биолюминесценция грибов

К настоящему времени описано более 40 разновидностей люминесцентных грибов. Из них большинство принадлежит ко всем известному типу шляпных грибов, состоящих из ножки (пенька) и шляпки (семейство *Agaricaceae*, подрод *Pleurotus*). Среди сумчатых грибов светящиеся грибы существуют в роде *Xylaria*.

У одних грибов светятся плоды, особенно нижняя поверхность шляпки, у других только вегетативные, служащие для питания гриба органы, так называемый *мицелий*. Грибы первой категории живут лишь на юге - в южной Европе, еще больше их в странах жарких и тропических. В нашем климате встречаются лишь такие, у которых светится мицелий. Примером такого рода грибов служат опенки (*Armillaria mellea Vahl.*). Мицелий имеет вид светлых и темных нитей или лент, которые пронизывают дерево, вызывая или способствуя его разрушению. Как сила, так и окраска испускаемого грибами света различна. Интенсивность биолюминесценции меняется не только с видом гриба, но неодинакова у одного и того же в разное время жизни. У некоторых, например у *Pleurotus Gardneri*, свет так силен, что при нем легко можно читать. Светящийся *Polyporus annosus* заметен в темноте на расстоянии 20 метров. Биолюминесценция опенка обыкновенного имеет ежедневный ритм испускания с максимальной интенсивностью около 7:30 и минимальной интенсивностью около 19:30.

Могут светиться старые, гнилые грибы, например, сыроежки и грузди, но не сами собой, а благодаря живущим на них маленьким шляпным грибкам из рода *Collybia* (*C. tuberosa Bull.* и *C. cirrhata Pers.*).

Изучение биолюминесценции грибов проходит сейчас на этапе каталогизации. Составление каталога биолюминесцентных грибов - трудная задача, так как некоторые грибы в пределах одной разновидности имеют радикально различные биолюминесцентные свойства или вообще не светятся.

Физико-химические основы свечения грибов пока еще изучены мало. Одни исследователи видят в нем строго внутриклеточный процесс, другие считают, что гриб выделяет особые вещества, которые легко окисляются кислородом воздуха и при этом светятся. На настоящий момент считается, что биолюминесцентная реакция грибов происходит без участия люциферазы, что отличает эти светящиеся организмы от всех других.

Максимум спектра излучения грибов приходится, как правило, на 520-530 нм.

Биолюминесцентный анализ

Биолюминесценция *in vivo* и *in vitro* нашла широкое применение в качестве аналитических методов и биотестов для решения проблем охраны окружающей среды, в научных исследованиях, в образовании. Биолюминесцентные методы используются для анализа метаболитов, ключевых ферментов, токсинов, мутагенов и других веществ, воздействующих на живые организмы.

Три основных обстоятельства определяют перспективность применения биолюминесценции для анализа:

1. Высокая чувствительность современных методов детектирования излучения в оптическом диапазоне.

В приложении к биолюминесценции это означает теоретическую возможность измерять единичные молекулярные события. Реальному достижению такой чувствительности препятствуют различного рода шумы, но есть данные об экспериментально достигнутой чувствительности при биолюминесцентном анализе для некоторых веществ (АТФ, НАДН) до 0,1-0,001 фемтомоля, т.е. всего 10^5 - 10^6 молекул.

2. Возможность использования цепей сопряжения других ферментов с люциферазой.

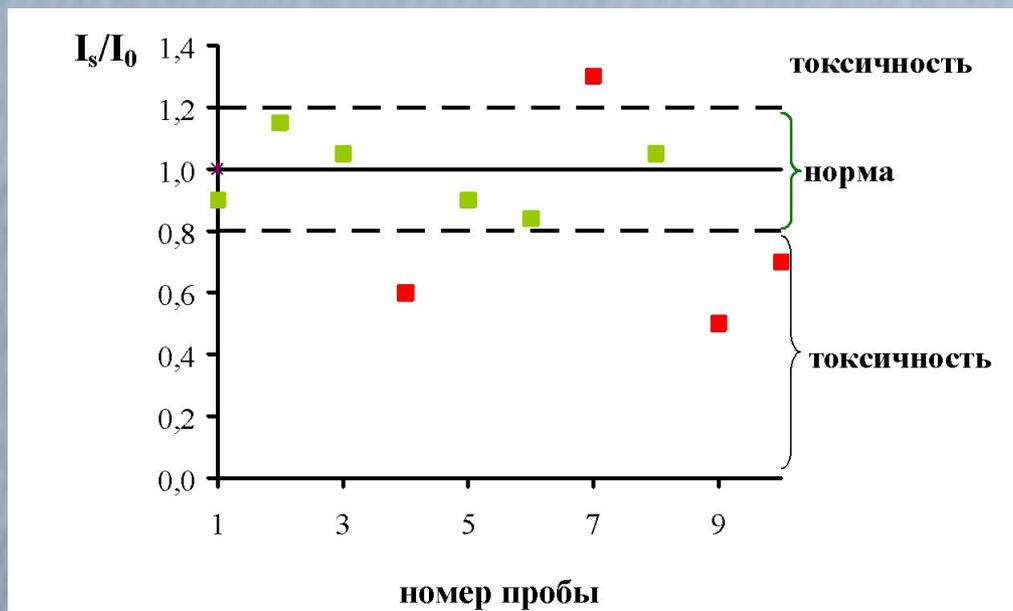
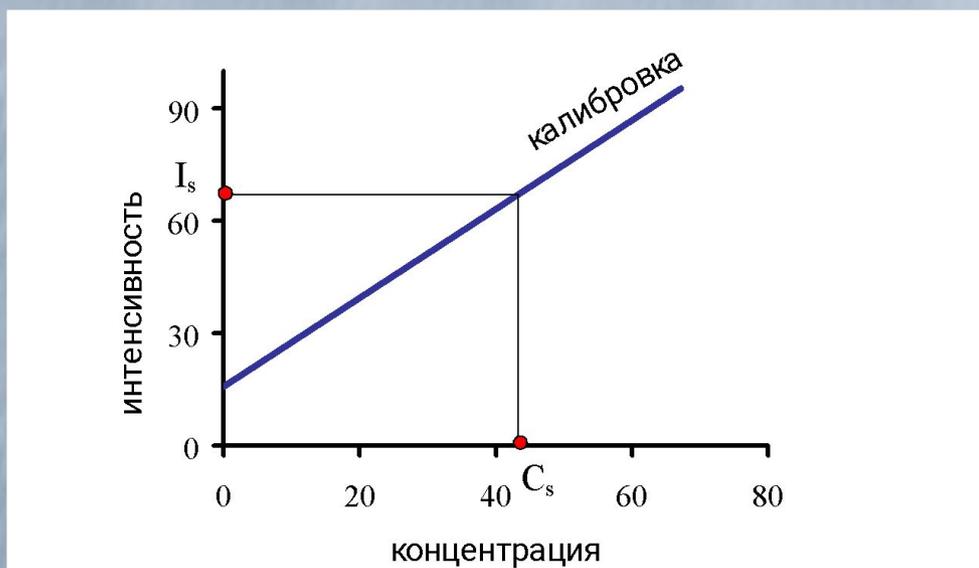
Поскольку энергетическое обеспечение биолюминесценции осуществляется через общие метаболические пути клетки, то появляется возможность искусственно строить цепи сопряженных ферментов таким образом, что концентрация большинства ключевых метаболитов (и соответственно антиметаболитов) может быть измерена через биолюминесценцию.

3. Высокая специфичность и чувствительность биолюминесцентных методов определяется фермент-субстратным взаимодействием.

Биолюминесцентный анализ

В настоящее время развиваются два направления биолюминесцентного анализа: *методы избирательного анализа* и *биолюминесцентные интегральные биотесты*. В первом случае по интенсивности биолюминесценции судят о концентрации какого-то конкретного вещества в анализируемом объекте. Во втором – по свечению делают вывод об общей токсичности исследуемого образца для живых организмов. Количество разработанных биолюминесцентных методов превышает 1000.

При проведении анализа в качестве биолюминесцентной системы используются как светящиеся организмы в целом (главным образом бактерии), так и выделенные из них ферментативные реакции.



Биолюминесцентный анализ

Светящиеся бактерии применяются в различных областях в трех основных видах: природном (интактном), мутантном и рекомбинантном.

Биолюминесцентные биотесты с использованием природных светящихся бактерий основаны на исключительной чувствительности этих микроорганизмов к разнообразным веществам. При действии этих веществ на целые живые бактерии исключается их прямое влияние на люциферазу, так как клеточные мембраны препятствуют проникновению ксенобиотиков в клетку. Тем не менее, токсичные вещества влияют на важные жизненные процессы клетки, такие как, например, дыхание, которые тем или иным образом связаны с биолюминесценцией.

Природные светящиеся бактерии очень чувствительны к изменению концентрации кислорода, что позволяет их использовать для определения содержания этого газа в смесях газов и жидкостях. Как следствие, были разработаны биолюминесцентные методы исследования оксигенирования миоглобинов и гемоглобинов, активности цитохромоксидазы митохондрий и других кислород-зависимых процессов и явлений.

Среди мутантных форм светящихся бактерий практическую ценность имеют те, у которых нарушен синтез компонентов биолюминесцентной реакции или их предшественников. Такие бактерии отвечают увеличением светоизлучения на добавление вещества, обеспечивающего образование недостающего компонента. Примером могут служить темновые штаммы *V. harveyi* и *P. fischeri*, свечение которых стимулируется только при введении в среду длинноцепочечных альдегидов и жирных кислот. Чувствительность такого биолюминесцентного метода достигает для альдегида 1 нмоля.

Биолюминесцентный анализ

Бактериальные биолюминесцентные биотесты

Биотест	Действующие вещества
Загрязнение пищевых продуктов микотоксинами (7,53-31,79 мкг/мл)	Рубратоксин В, зеараленон, пенициллин, патулин, цитринин, ократоксин А, РР-токсин, афлатоксин В1
Присутствие в среде антибиотиков (0,2 мкг/мл)	Тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин, неомицин, гентамицин, канамицин
Токсичность сточных вод и водной среды	Ароматические углеводороды, дыхательные яды, фенольные соединения и продукты их деструкции, сульфатный лигнин, окрашенные фракции стоков, фенолоксидазы, детергенты, пестициды, тяжелые металлы, кобальт, отходы производства стабилизаторов
Токсичность в воздушной среде (компоненты ракетного топлива)	Диметилгидразин, альдегиды, спирты, ацетон, HCN, SO ₂ , H ₂ S, Cl ₂ , продукты облучения смеси NO ₂ и цис-2-бутена
Загрязнение среды гербицидами	Монурон, диурон, нефурон, атразин
Определение бактерицидной активности в сыворотке человека	Иммуноглобулины, комплементы
Модельное изучение влияния химических и физических факторов	Температура, давление, лекарственные препараты, анестетики (галотан), глицерин, сахароза
Тест на мутагенность	
Продукты окисления керогена сланцев	Высокомолекулярные кислоты
Токсичность для рыб	Органические вещества

Биолюминесцентный анализ

Прогресс в области генной инженерии позволил создать новые светящиеся организмы. Было проведено клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы (так называемого *lux*-гена) светящихся бактерий *Vibrio harveyi*, *V.fischeri* и *Photobacterium leiognati* в плазмидном векторе клеток различных микроорганизмов. Таким образом были созданы биолюминесцентные рекомбинантные штаммы *E.coli*, *Pseudomonas*, *Rysobium* и других бактерий.

Введение *lux*-гена позволяет создавать люминесцентные биосенсоры, обладающие высокой специфичностью. Под термином «биосенсор» понимают устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал (ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК), непосредственно реагирует на присутствие определяемого компонента и генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента.

Например, на основе *E.coli* создан биосенсор, с помощью которого можно определять наличие в среде (и в смесях тяжелых металлов) ртути. Принцип действия этого биосенсора заключается в увеличении экспрессии *lux*-генов при наличии в среде ионов ртути. Чувствительность метода выше, чем в атомной абсорбционной спектроскопии.

Подобный биосенсор на основе бактерий *Pseudomonas putida* сконструирован и для определения в среде нафталина, толуола, ксилола. Бактерии рода *Rysobium* использованы в биосенсоре, чувствительном к загрязнению почвы.

Некоторые штаммы бактерий рода *Salmonella* применяются в биотесте, позволяющем оценить распределение бактерий на поверхности различных пищевых продуктов.

Биolumинесцентный анализ

Можно выделить семь основных направлений применения биolumинесцентных реакций, полученных из различных светящихся организмов:

- 1. Анализ субстратов люцифераз**
- 2. Мониторинг АТФ**
- 3. Определение содержания ионов кальция**
- 4. Иммуноанализ**
- 5. Биolumинесцентные репортерные гены**
- 6. Биolumинесцентная визуализация**

Биолюминесцентный анализ

Анализ субстратов люцифераз

Как уже упоминалось, люциферазы проявляют высокую специфичность к своим субстратам. Интенсивность светоизлучения в реакциях с аналогами люциферинов во много раз ниже интенсивности природных реакций, катализируемых люциферазами. На основе этого свойства биолюминесценции *in vitro* разработано много методов определения содержания субстратов люцифераз в разных средах.

Например, чувствительность анализа алифатических альдегидов разной длины цепи с помощью биолюминесцентной реакции бактерий достигает порядка 0,5 пмоль альдегида в пробе. Этим методом анализируют половые феромоны некоторых насекомых, которые по своей структуре являются альдегидами. Исключительная чувствительность метода позволяет исследовать регуляцию уровня феромонов и их синтез у одной особи, а также определить концентрацию феромона в воздухе для многих видов насекомых.

БиOLUMиНесцентный анализ

Мониторинг АТФ

БиOLUMиНесцентный анализ - наиболее специфичный, чувствительный и быстрый метод определения АТФ. В его основе лежит биOLUMиНесцентная реакция, катализируемая люциферазой светляков. Интенсивность излучения этой реакции пропорциональна концентрации АТФ в реакционной смеси в широких пределах. Благодаря высокому квантовому выходу данной реакции, с помощью несложной аппаратуры можно определять ультрамалые количества АТФ.

АТФ содержится во всех живых клетках: растительных, животных, микробных и человека. Чем больше клеток в образце, тем выше в нем содержание АТФ. Предел обнаружения клеток по содержанию внутриклеточного АТФ составляет менее 1000 клеток в 1 мл/г образца.

Измерение АТФ биOLUMиНесцентным методом занимает 1 мин. А полный анализ образца на предмет содержания в нем микроорганизмов, в зависимости от длительности пробоподготовки, требует от 2 минут до 6 часов. Именно поэтому биOLUMиНесцентная АТФ-метрия является основой одного из методов так называемой «быстрой микробиологии». Для сравнения - традиционный микробиологический анализ требует от 24 до 72 и более часов. Кроме того, в отличие от большинства индикаторных методов, используемых в «быстрой микробиологии», биOLUMиНесцентный метод позволяет определять только живые клетки, т.к. при гибели клетки концентрация внутриклеточного АТФ очень быстро снижается практически до нуля.

Биolumинесцентный анализ

Мониторинг АТФ

Области применения АТФ-метрии:

1. Медицина:

- обнаружение микробных инфекций в крови, моче и других биологических образцах;
- быстрый подбор антибиотика, определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика;
- контроль жизнеспособности спермы, качества донорских материалов и органов при трансплантации;
- оценка иммунного статуса (вместо радиоактивного метода).

2. Пищевая, фармацевтическая, парфюмерная промышленность:

- экспресс-анализ уровня микробных загрязнений для контроля качества на всех этапах производства - от исходного сырья до готовой продукции;
- микробиологическая чистота мясомолочных продуктов, соков и напитков, лекарств и косметики - основное условие их длительной сохранности и высоких потребительских качеств.

3. Экология

- контроль стерильности в особо чистых помещениях медицинских и промышленных учреждений;
- контроль микробных загрязнений питьевой и технологической воды;
- оценка состояния активного ила в водоочистных сооружениях;
- подбор биоцидов и штаммов-биодеструкторов для разрушения отходов.

4. Технология и биотехнология

- определение активности штаммов-продуцентов;
- оценка биостойкости полимеров, пластмасс, герметиков, смазочных материалов, лакокрасочных покрытий;
- оценка активности биокатализаторов на основе клеток микроорганизмов;
- определение бактериальных загрязнений в технологических, горюче-смазочных жидкостях.

Биолюминесцентный анализ

Определение содержания ионов кальция

Концентрация ионов кальция является внутриклеточным сигналом, ответственным за контролирование многочисленных клеточных процессов. Клетки в состоянии покоя имеют концентрацию кальция 100 нМ, но при активации повышение его уровня может достигать 1000 нМ. Универсальность кальция в качестве внутриклеточного посредника определяется его огромной изменчивостью. Эта изменчивость возникает из-за использования клетками громадного набора сигнальных компонентов, которые могут быть смешаны и подобраны таким образом, чтобы создать широкий диапазон пространственных и временных сигналов, обеспечивающих разнообразие механизмов кальциевой сигнализации. Эта изменчивость используется для контроля процессов оплодотворения, размножения, развития, обучаемости и памяти, мышечного сокращения и секреции. При этом необходимо учитывать высокую токсичность кальция. Превышение его нормальных концентраций во времени и пространстве может привести к гибели клеток, как в результате некроза, так и путем апоптоза.

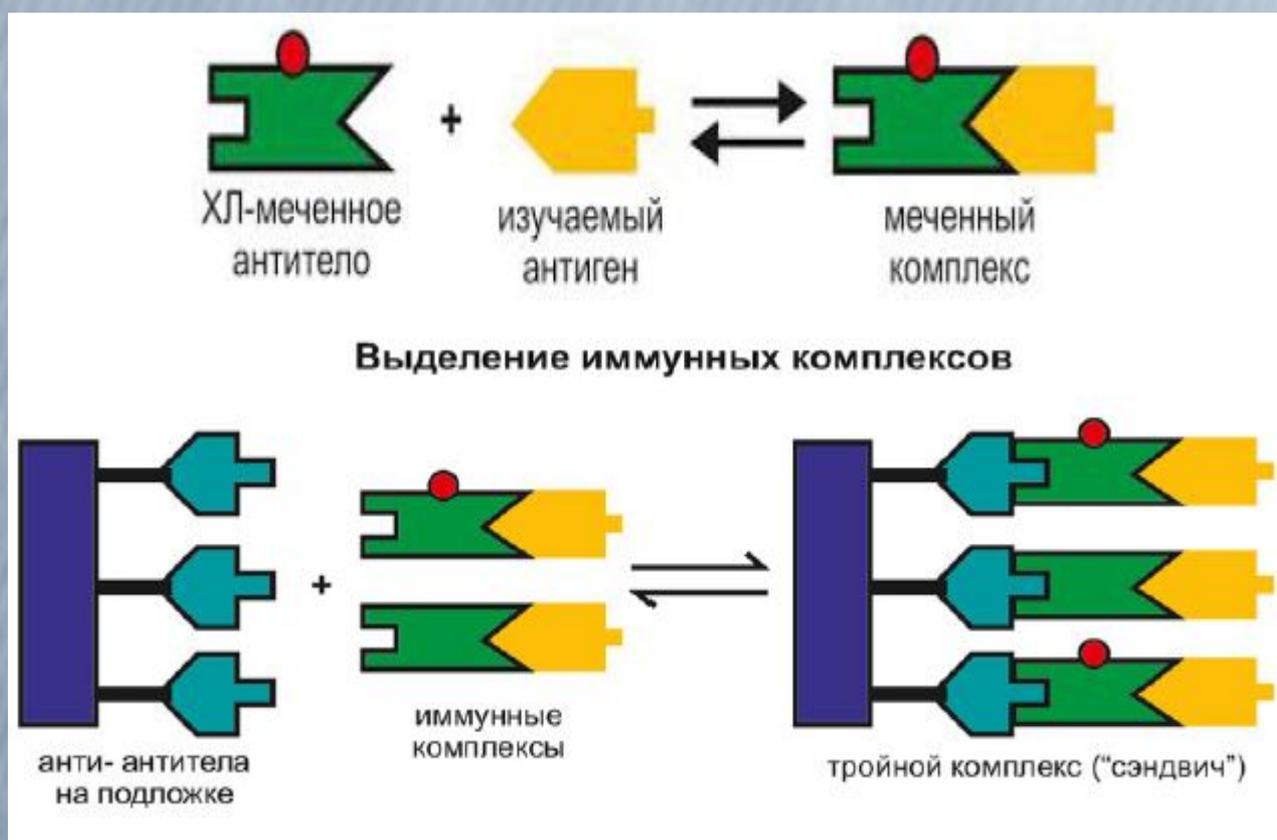
Для обнаружения малых количеств ионов кальция широко используются биолюминесценция фотопротеинов кишечнорастворимых (главным образом, акворина). Вследствие малой инерционности и высокой чувствительности биолюминесцентный метод весьма эффективен при изучении высвобождения и связывания Ca^{2+} в биологических системах, например, во время мышечного сокращения. При этом акворин добавляют прямо к изучаемому объекту и по интенсивности биолюминесценции следят за динамикой изменения содержания свободного кальция. Интенсивность биолюминесценции акворина растет монотонно при увеличении концентрации ионов кальция от 10^{-7} М до 10^{-4} М. Нормированная на максимум интенсивность пропорциональна концентрации кальция в степени 2,5 в области микромолярных концентраций.

Биолюминесцентные процессы не требуют возбуждения светом в отличие от флуоресцентных зондов или цветных белков, и, таким образом, регистрации сигнала не мешает собственная флуоресценция клеток. Кроме того, акворин не токсичен, не связывает другие двухвалентные катионы в физиологическом диапазоне концентраций и не взаимодействует с внутриклеточными Ca^{2+} буферными системами, даже при микроинъекциях в достаточно высоких концентрациях для получения интенсивного сигнала. Преимуществом фотопротеинов является также их устойчивость к фотообесцвечиванию.

Детекция взаимодействия биомолекул. Иммуноанализ

Люциферазы применяются в качестве ферментов-маркеров в иммуноанализе наряду с пероксидазой хрена и щелочной фосфотазой.

Обелин представляет собой удобную биолюминесцентную метку при разработке тестовых систем для иммуноферментного анализа, поскольку соответствует основным требованиям, предъявляемым к такого рода маркерам: стабильность, доступность, высокая чувствительность регистрации, низкий уровень фонового шума, простота аппаратуры, используемой для регистрации. Иммунобиолюминесцентные методы на основе обелина по чувствительности не уступают традиционному радиоизотопному методу.



Биолюминесцентный анализ

Биолюминесцентные репортерные гены

Технология репортерных генов – одно из главных новых достижений молекулярной биологии последних лет. *Репортерный ген* (reporter gene) представляет собой часть ДНК, кодирующую легко детектируемый, нейтральный для клеток белок. Он может быть искусственно вставлен в клетку с целью мониторинга экспрессии генов, для получения клеточного биосенсора или для определения локализации клетки.

Наиболее используемыми в настоящее время биолюминесцентными репортерными генами являются *lux*-ген (кодирует бактериальную люциферазу), *luc*-ген (кодирует люциферазу светляков) и *rus*-ген (кодирует люциферазу из кишечнораотового *Renilla*). Появляются новые биолюминесцентные репортерные гены: выделенные из ДНК железнодорожного червя (ген люциферазы, катализирующей излучение красного и зеленого света), а также кодирующие многоцветные мутанты светляковой люциферазы.

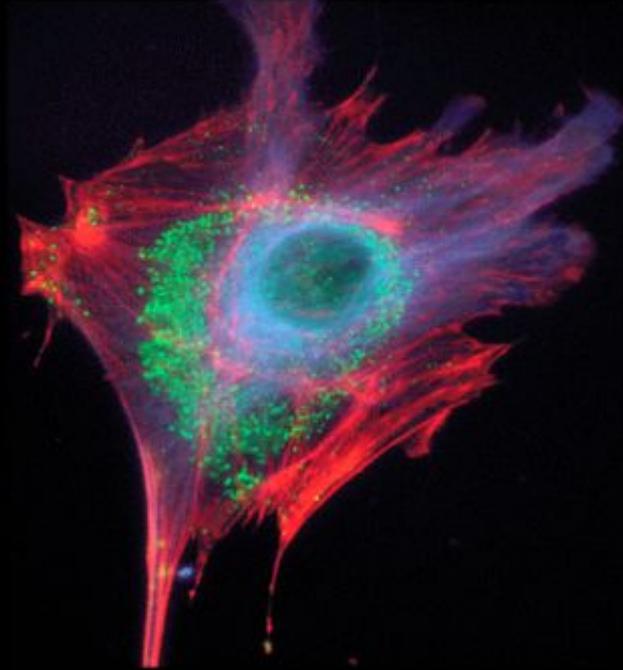
Биолюминесцентный анализ

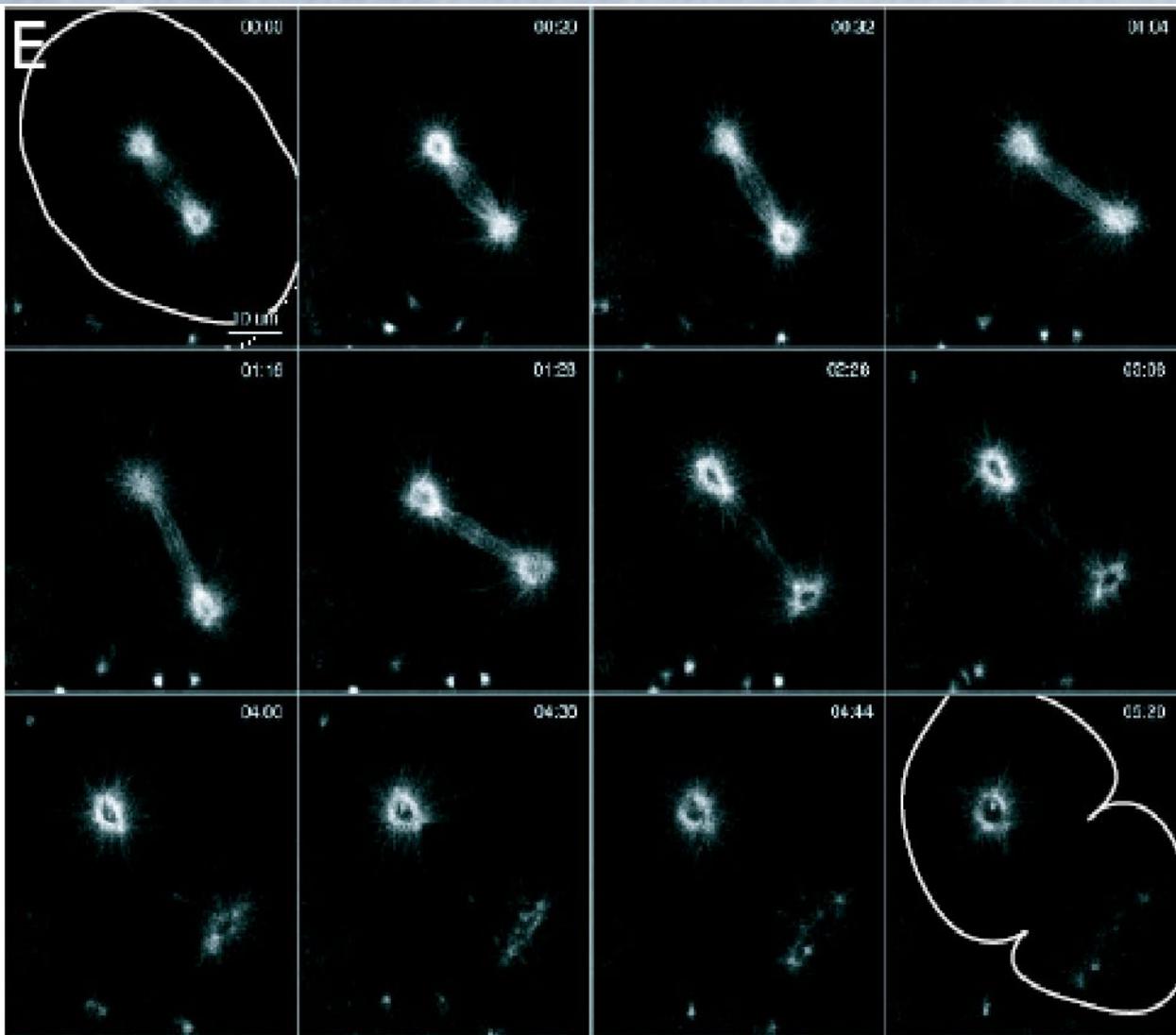
Биолюминесцентная визуализация

Визуализация биологических процессов *in vitro* и *in vivo* стала возможной благодаря созданию сверхчувствительных видеокамер, способных не только регистрировать сигнал интенсивностью в считанные фотоны, но и определять локализацию этого сигнала на исследуемой поверхности.

Визуализация биологических процессов начинается с того, что биолюминесцентные системы внедряются в клетки, ткани, органы исследуемых объектов. Затем с помощью видеокамеры следят за развитием пространственного распределения свечения, его спектрального состава. Таким образом наблюдают за развитием вирусных инфекций и опухолей, за приживлением трансплантированных тканей.

fluorescence microscopy





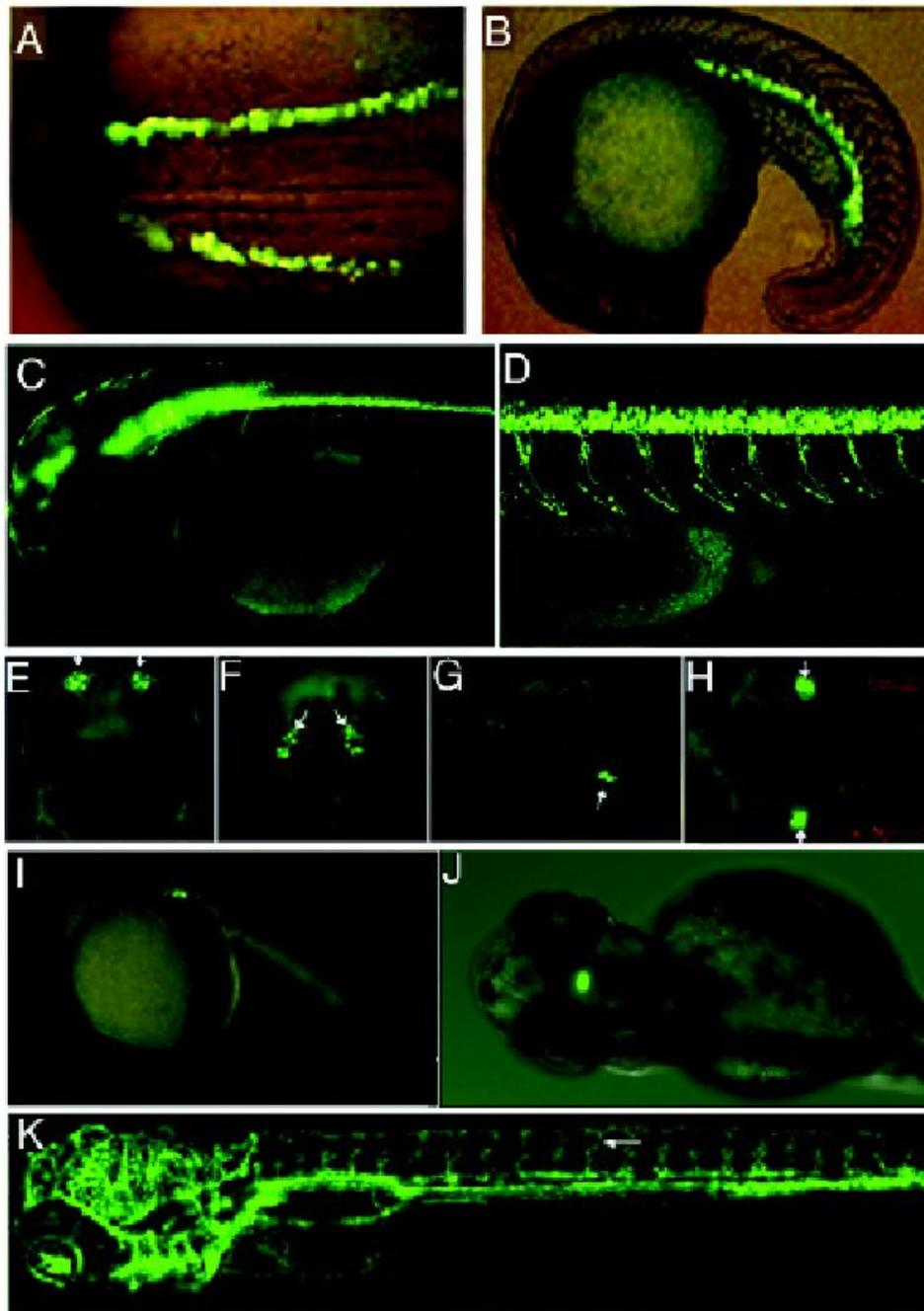


Figure 13.1. Stable transgenic zebrafish expressing GFP in specific tissues. (A, B) GATA-1 GFP expression in hematopoietic cells (Long et al., 1997). (C, D) GATA-2 BAC GFP expression in neuronal cells (Shuo Lin, unpublished). (E, F) Rag-1 GFP expression in olfactory sensory neurons (Jessen et al., 1999). (G, H) Rag-1 BAC GFP expression in thymus (Jessen et al., 1999). (I) Insulin GFP expression in pancreatic beta cells (Huang et al., 2001). (J) POMC GFP expression in pituitary cells (Liu et al., 2003). (K) FLK GFP expression in vascular cells (Cross et al., 2003).