Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего профессионального образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

**РЕФЕРАТ**

**Разработка ферментативного реагента для комплексного анализа токсического и микробного загрязнений**

 Преподаватель И.Е. Суковатая

 Студент ФБ13-01М М.А. Кириллова

Красноярск 2014

Оглавление

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc377311559)

[ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 3](#_Toc377311560)

[1.1. Способы определения бактериального загрязнения 3](#_Toc377311561)

[1.1.1. Метод определения бактериального загрязнения, основанный на биолюминесцентной системе светляков 4](#_Toc377311562)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 8](#_Toc377311563)

# ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для анализов химических или биологических загрязнений применяются биосенсоры на основе биолюминесцентных организмов и выделенных из них ферментов [[[1]](#endnote-2), [[2]](#endnote-3), [[3]](#endnote-4)]. Созданы биосенсоры, включающие в качестве биомодуля как люциферазу светляков для анализа бактериального загрязнения, так и биолюминесцентную систему светящихся бактерий для анализа химического загрязнения, однако, биосенсора, способного анализировать как бактериальное так и химическое загрязнения в настоящий момент не существует. Возникает вопрос, возможна ли разработка такого реагента, использование которого позволит проводить комплексный анализ как токсического, так и бактериального загрязнений.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Способы определения бактериального загрязнения

Традиционными методами анализа микробного загрязнения в микробиологии являются чашечный метод Коха, методы кратных и предельных разведений [[[4]](#endnote-5)].

*Чашечный метод Коха* заключается в последовательном разведении исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50°С), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Подсчетом числа колоний узнают изначальное число клеток в исследуемом образце.

*Метод кратных разведений* проводят следующим образом. При исследовании плотных субстратов навеску измельчают в гомогенизаторе или растирают в ступке с кварцевым песком и готовят исходную взвесь в разведении 1:10. Из полученной взвеси или исходного жидкого материала готовят ряд последующих разведений с таким расчетом, чтобы при посеве двух последних разведений на чашке Петри в агаре выросло от 50 до 300 колоний. Из последних двух разведений по 1 см3 вносят в чашку и заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45°С мясо-пептонного агара (МПА). Чашки инкубируют при 37°С 48 ч, подсчитывают количество выросших колоний. Общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г (см3) продукта определяют с учетом разведения исследуемого материала.

При использовании *метода предельных разведений (титр)* из исходного жидкого материала готовят ряд десятикратных разведений до тех пор, пока в последней пробирке можно будет предположить наличие одной бактериальной клетки. Посев делают в жидкую селективную среду с последующим выделением микроорганизмов на твердой питательной среде и изучением их характеристики. За титр принимают, то наименьшее количество субстрата, в котором обнаружена одна особь искомого микроорганизма [2].

Данные методы занимают достаточно много времени (24-72 часов). В клинических тестах результаты должны быть получены быстро, чтобы начать необходимое лечение. В пищевой гигиене также важно определить уровень микробного загрязнения сырых продуктов, чтобы защитить потребителя и предотвратить порчу продуктов. Поэтому были предложены более быстрые методы подсчета колонии.

### 1.1.1. Метод определения бактериального загрязнения, основанный на биолюминесцентной системе светляков

Помимо описанных методов анализа микробного загрязнения разработаны биолюминесцентные методы анализа качества продуктов питания, использующие, главным образом, биолюминесценцию светляков.

Люцифераза светляков относится к классу монооксигеназ (EC 1.13.12.7) [[[5]](#endnote-6)]. Субстратом данного фермента является люциферин (LH2), помимо которого для проведения реакции требуется присутствие АТР, кислорода и катиона металла. Кристаллографические исследования показали, что белок состоит из двух доменов - N-терминального домена и С-терминального домена меньшего размера, соединенных гибким пептидным линкером, который создает широкую щель между двумя доменами (рис. 1).



Рисунок 1 - Люцифераза *Photinus pyralis* [[[6]](#endnote-7)]

Предполагаемый активный центр, включает аминокислотные остатки на поверхности обоих доменов, поэтому в ходе реакции два домена сходятся вместе, что приводит к значительным конформационным изменениям. Основная часть аминокислотных остатков важных для биолюминесцентной активности расположены в N-терминальной части и только одна аминокислота - на С-терминальном домене. С-терминальная часть несет трипептид лизин-серин-лейцин, ответственный за пероксисомальное нацеливание.

Исследования мутантной люциферазы из *Luciola Cruciata* показали, что нативная люцифераза принимает закрытую форму во время формирования высокоэнергического интермедиата, ответственного за излучение света, образуя гидрофобный карман вокруг активного центра, а открытую форму образует в комплексе с реагентами и продуктами.

Также было показано, что люцифераза может производить свет, имея в составе только N-домен, однако выход люминесценции в этом случае будет только 0.03% от люминесценции полного фермента.

Спектр излучения люциферазы светляков лежит в желто-зеленой области (550–570 нм), с максимумом в 562 нм при pH 7.5–7.8. Однако люцифераза является рН-зависимым ферментом и кислая среда (pH 5–6) может сдвигать спектр в красную область (максимум в 620 нм), также на спектр могут влиять температура и катионы тяжелых металлов. Считается, что именно конформационные изменения, которые влияют на микроокружение активного центра, ответственны за различный цвет свечения [3].

Поскольку хемилюминесценция светляков происходит в результате биохимической реакции окисления люциферина светляков кислородом воздуха в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты (ATP), принцип методов с использованием люциферазы светляков состоит в определении количества АТР, пропорционального содержанию микробных клеток.

Реакция, катализируемая люциферазой светляков, проходит в две стадии [[[7]](#endnote-8)]:

люциферин + АТР → люцифериладенилат + PPi (1)

люцифериладенилат + O2 → оксилюцеферин + АМР + свет (2)

Интенсивность биолюминесценции, возникающей в люциферин -люциферазной системе светляков в присутствии АТР, пропорциональна концентрации АТР в широком диапазоне.

При анализе бактериального загрязнения для экстрагирования АТР из клеток используют различные экстрагенты, такие как поверхностно активные вещества (ПАВ), органические растворители или неорганические кислоты [], которые разрывают одиночные клетки. Однако, разрыв клеточной мембраны также позволяет высвобождаться ферментам, которые могут препятствовать дальнейшему анализу нуклеотидов. Ранее были предложены методы с использованием ионных и неионных детергентов (октилфеноксиполиэтоксиэтил, терпеноидные сапонины, стероидные сапонины, гликозиды сульфосукцината) для разрыва клеток [5]. Некоторые из них действуют на проницаемость мембраны микробной клетки и высвобождают из нее нуклеотиды (АТР и др.) и другие малые молекулы. Это выборочное высвобождение нуклеотидов выполняется без высвобождения ферментов из клеток, и анализ нуклеотидов может быть проведен без нежелательного ферментативного гидролиза.

К образцу с высвободившимися нуклеотидами добавляют АТР - реагент, включающий люциферин, люциферазу светляков, ионы магния и стабилизаторы [[[8]](#endnote-9), [[9]](#endnote-10)], и измеряют биолюминесцентный сигнал (Iмакс). Рассчитывают концентрацию микробного ATP по калибровочной зависимости (зависимость интенсивности свечения от концентрации АТР), а затем по зависимости количества микробных клеток от концентрации АТР определяют степень загрязненности.

Несмотря на данные о недостаточной чувствительности АТР-метода для определения бактериального загрязнения вне исследовательских лабораторий [[[10]](#endnote-11)], метод определения качества пищевых продуктов и напитков по показателю их бактериологического загрязнения весьма популярен и используется в различных областях пищевой индустрии. Так, например, разработаны методы оценки качества молока [[[11]](#endnote-12)], пива [[[12]](#endnote-13)], питьевой воды [[[13]](#endnote-14)]. Разработан метод, позволяющий оценивать содержание соматических клеток в молоке, как диагностический показатель мастита коров [[[14]](#endnote-15)]. Причем в данном случае используется специальный агент, осуществляющий лизис только соматических, но не бактериальных клеток, что позволяет измерять содержание ATP соматических клеток, пропорциональное их количеству. Предложены методы оценки гигиенической чистоты рабочих поверхностей и оборудования для разделки мяса и овощей на заводах [[[15]](#endnote-16)], молокоперерабатывающих предприятиях [[[16]](#endnote-17)]. Благодаря развитому техническому воплощению идеи определения бактериальной загрязненности по количеству АТР, **возможно использование подобных методов и в домашних условиях, например, для определения чистоты рук, столов [**[[17]](#endnote-18)**]**. В работе [[[18]](#endnote-19)] показана возможность определения до 10-18 моль АТР, что эквивалентно количеству АТР в одной бактериальной клетке.

Однако, несмотря на преимущества использования биолюминесцентных тестов широкое распространение существующих биолюминесцентных методов анализа ограничивают такие факторы как: нестабильность ферментативной системы во время использования, ограниченный срок хранения реагентов для анализа, необходимость создания микроокружения для ферментов (pH, температура и др.). В то же время биолюминесцентные ферментативные методы обладают возможностью варьирования микроокружения ферментов для получения ферментативных препаратов, обладающих высокой каталитической активностью, сохраняющих стабильное свечение при длительном хранении и обеспечивающих возможность автоматизации анализов путем использования стабилизированных препаратов ферментов. Из литературных данных известно множество способов стабилизации ферментов, однако наиболее популярным является иммобилизация [[[19]](#endnote-20)].

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. . Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells/ editor: J. M. Guisan; Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2nd ed, 2006. 449 p. [↑](#endnote-ref-2)
2. . Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга // Вестник ОГУ. 2005. №5. С. 96 -100 [↑](#endnote-ref-3)
3. . Медведева С.Е., Тюлькова Н.А., Кузнецов А.М., Родичева Э.К. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий // Журнал Сибирского федерального униыверситета. 2009. №4. С. 418 - 452 [↑](#endnote-ref-4)
4. . Экология микроорганизмов / сайт кафедры микробиологии СибГМУ. Г.Томск. 2005. URL: [http://www.ssmu.ru/ofice/f4/micro/guide/Content/ ecology/Eco10.html](http://www.ssmu.ru/ofice/f4/micro/guide/Content/%20ecology/Eco10.html) (дата обращения: 19.09.2013). [↑](#endnote-ref-5)
5. . Inouye S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions // Cellular and Molecular Life Sciences. 2010. № 67. Р. 387–404. [↑](#endnote-ref-6)
6. . Белковый банк данных http://www.rcsb.org (дата обращения: 22.12.2013) [↑](#endnote-ref-7)
7. . Samkutty P.J. Gough R.H., Adkinson R.W. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence // McGrew Food Prot. 2001. V.64. N 2. P.208-212. [↑](#endnote-ref-8)
8. . Chemiluminescence and bioluminescence: past, present and future / editor: A. Roda; RSC Publishing, 2010. 590 p. [↑](#endnote-ref-9)
9. . Пат. WO2010134850 A1 Российская Федерация. Реагент для определения aдeнoзин-5'-тpифocфaтa / Н.Н. Угарова, М.И. Кокшаров, Г.Ю. Ломакина; заявл. 20.05.10; опубл. 25.11.10, 9 с. [↑](#endnote-ref-10)
10. . Aiken Z.A., Wilson M., Pratten J.Evaluation of ATP bioluminescence assays for potential use in a hospital setting // Infection control and hospital epidemiology may. 2011. V. 32, N. 5. P. 507-509 [↑](#endnote-ref-11)
11. . Samkutty P.J. Gough R.H., Adkinson R.W. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence // McGrew Food Prot. 2001. V.64. N 2. P.208-212. [↑](#endnote-ref-12)
12. . Takahashi T., Nakakita Y., Watari J., Shinotsuka K. Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStar-RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. Rapid Microbe Detection System // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000. V.64. N 5. P.1032-1037. [↑](#endnote-ref-13)
13. . Frundzhyan V., Ugarova N. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water // Luminescence. 2007. V.22. N 3. P.241-244. [↑](#endnote-ref-14)
14. . Frundzhyan V.G, Parkhomenko I.M., Brovko L.Y., Ugarova N.N. Improved bioluminescent assay of somatic cell counts in raw milk // J Dairy Res. 2008. V.75. N 3. P.279-283. [↑](#endnote-ref-15)
15. . Corbitt A.J., Bennion N., Forsythe S.J. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry // Lett. Appl. Microbiol. 2000. V.30. N 6. P.443-447. [↑](#endnote-ref-16)
16. . Vilar M.J., Otero J.L., Diéguez F.J., Sanjuán M.L., Rodríguez E.Yus Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment //Int. J Food Microbiol. 2008. V. 125 N 3. P. 357-361. [↑](#endnote-ref-17)
17. . Larson E.L., Aiello A.E., Gomez-Duarte C., Lin S.X., Lee L., Della-Latta P., Lindhardt C. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home // Food Microbiology. 2003. V.20. N 6. P. 735-739. [↑](#endnote-ref-18)
18. . [Noda](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Kenichi+Noda%22) K.,  [Matsuno](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Tadahiro+Matsuno%22) T.,  [Fujii](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Hiroya+Fujii%22) H., [Kogure](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Tomonari+Kogure%22) T.,  [Urata](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Masaaki+Urata%22) M.,  [Asami](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Yasuo+Asami%22) Y., [Kuroda](http://link.springer.com/search?facet-author=%22Akio+Kuroda%22) A. Single bacterial cell detection using a mutant luciferase // [Biotechnology letters](http://link.springer.com/journal/10529). 2008. V 30, [Issue 6](http://link.springer.com/journal/10529/30/6/page/1). P. 1051-1054 [↑](#endnote-ref-19)
19. . Бондарь В.С., Высоцкий Е.С., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А., Кудряшева Н.С. и др. Физика и химия биолюминесценции // Учебное пособие, под ред. О. Шимомуры, И. И. Гительзона. Красноярск : Сиб. федер. ун-т. 2012. 218 с. [↑](#endnote-ref-20)