

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

---

На правах рукописи

Котлобай Алексей Анатольевич

**Поиск, клонирование и экспрессия гена  
люциферазы грибов**

Специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель

д.х.н. Ямпольский Илья Викторович

Москва – 2019

## Оглавление

Введение.....	6
ГЛАВА I. Обзор литературы.....	9
1.1 Введение.....	9
1.2 Люциферазы билюминесцентных систем, использующих люциферин светлячка ..	10
1.2.1 Люциферазы светлячков.....	11
1.2.2 Люциферазы жуков-шелкунов.....	17
1.2.3 Люциферазы железнодорожных червей.....	20
1.3 Люциферазы билюминесцентных систем, использующих целентеразин.....	22
1.3.1 Люцифераза коралла <i>Renilla</i> .....	23
1.3.2 Люциферазы веслоногих ракообразных <i>Copepoda</i> .....	26
1.3.3 Люцифераза глубоководных креветок семейства <i>Oplophoridae</i> .....	29
1.4 Люциферазы билюминесцентных систем, использующих люциферин <i>Cypridina</i> ...	31
1.4.1 Люциферазы <i>Cypridina</i> .....	32
1.5 Люциферазы билюминесцентных систем динофитовых водорослей (динофлагеллят).....	34
1.5.1 Люцифераза <i>Gonyaulax polyedra</i> (сейчас <i>Lingulodinium polyedrum</i> ).....	36
1.5.2 Люцифераза <i>Pyrocystis lunula</i> .....	38
1.5.3 Люцифераза <i>Noctiluca scintillians</i> .....	38
1.6 Билюминесцентная система бактерий.....	40
1.6.1 Люциферазы бактерий.....	41
ГЛАВА II. Материалы и методы.....	46
2.1 Методы генной инженерии.....	46
2.1.1 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий.....	46
2.1.2 Экстракция ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения ..	46
2.1.3 Секвенирование ДНК.....	46
2.1.4 Реакции рестрикции и лигирования.....	46
2.1.5 Амплификация ДНК.....	47
2.2 Методы работы с клетками дрожжей.....	47

2.2.1 Создание вектора для клонирования библиотеки кДНК из гриба <i>Neonothopanus nambi</i> в клетки дрожжей <i>Pichia pastoris</i> .....	47
2.2.2 Клонирование библиотеки кДНК из гриба <i>N. nambi</i> в клетки дрожжей <i>P. pastoris</i> и идентификация гена люциферазы грибов .....	47
2.2.3 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках дрожжей <i>P. pastoris</i> .....	48
2.2.4 Выделение микросомальной фракции из дрожжей <i>P. pastoris</i> .....	49
2.2.5 Трансформация клеток <i>P. pastoris</i> методом электропорации .....	49
2.3 Методы работы с бактериями .....	49
2.3.1 Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> методом электропорации .....	49
2.3.2 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках <i>E. coli</i> .....	50
2.3.3 Ренатурация люциферазы грибов из телец включения .....	51
2.3.4 Клонирование в клетки <i>E. coli</i> функциональных фрагментов люциферазы грибов .....	51
2.4 Методы работы с культурами клеток млекопитающих .....	52
2.4.1 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках культур НЕК293NT, HeLa и СТ26 .....	52
2.4.2 Разрушение клеток культур НЕК293NT и HeLa .....	52
2.5 Экспрессия гена люциферазы грибов в эмбрионах <i>Xenopus laevis</i> .....	52
2.6 Экспрессия гена люциферазы грибов в клетках СТ26, инъецированных под кожу живой мыши .....	53
2.7 Выделение микросомальной фракции из биомассы <i>N. nambi</i> .....	53
2.8 Солюбилизация люциферазы грибов из микросомальной фракции .....	54
2.9 Хроматографические методы .....	54
2.9.1 Анионообменная хроматография DEAE-Sepharose и Q-Sepharose .....	54
2.9.2 Гель-фильтрационная хроматография .....	55
2.9.3 Обессоливание белка на Sephadex® G25 .....	55
2.10 Электрофоретические методы .....	55
2.10.1 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях .....	55

2.10.2 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях .....	55
2.10.3 Двумерный ПААГ электрофорез в нативных условиях .....	56
2.10.4 Окраска геля серебром .....	57
2.10.5 Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	57
2.11 Вестерн блот .....	57
2.12 Масс-спектрометрическое секвенирование. Метод LC-MS.....	58
2.13 Метод измерения биолюминесцентной активности .....	59
2.14 Получение спектров люминесценции .....	59
ГЛАВА III. Результаты и обсуждение .....	61
3.1 Получение очищенного препарата люциферазы гриба <i>N. nambi</i> для проведения масс-спектрометрического секвенирования .....	61
3.1.1 Выделение микросомальной фракции из биомассы гриба <i>N. nambi</i> .....	62
3.1.2 Подбор условий солюбилизации люциферазы <i>N. nambi</i> .....	63
3.1.3 Хроматографическая очистка люциферазы <i>N. nambi</i> .....	66
3.1.4 Электрофорез в нативных условиях .....	70
3.1.5 Масс-спектрометрическое секвенирование образцов из гелей .....	73
3.2 Клонирование библиотеки кДНК гриба <i>N. nambi</i> и поиск последовательности гена люциферазы .....	75
3.2.1 Клонирование библиотеки кДНК гриба <i>N. nambi</i> в дрожжи <i>P. pastoris</i> и определение последовательности гена грибной люциферазы .....	75
3.2.3 Экспрессия люциферазы <i>N. nambi</i> в клетках <i>P. pastoris</i> .....	77
3.2.4 Определение спектра биолюминесценции рекомбинантной люциферазы и его сравнение со спектром биолюминесценции мицелия гриба <i>N. nambi</i> .....	79
3.2.5 Люциферазы из различных видов грибов .....	80
3.2.6 Получение функциональных фрагментов люциферазы <i>N. nambi</i> в клетках <i>E. coli</i> .....	84
3.2.7 Экспрессия рекомбинантной люциферазы <i>N. nambi</i> в клетках <i>E. coli</i> .....	85
3.2.8 Ренатурация рекомбинантной люциферазы <i>N. nambi</i> .....	87
3.3 Примеры применения рекомбинантной люциферазы <i>N. nambi</i> .....	88

3.3.1 Использование люциферазы <i>N. nambi</i> для мечения клеток .....	88
3.3.2 Использование люциферазы <i>N. nambi</i> для мечения клеток внутри целого организма.....	90
Выводы .....	93
Список сокращений.....	94
Приложение 1.....	95
Приложение 2.....	96
Приложение 3.....	100
Список использованной литературы .....	104

## Введение

С момента появления человека на нашей планете его окружали различные светившиеся в темноте ночи живые существа. Во все времена они интересовали человечество, и еще со времен Аристотеля люди пытались выяснить и понять природу свечения живых организмов. В случае светящихся насекомых, светлячков и жуков, или крупных грибов, у которых светится мицелий или шляпка, или и то, и другое, люди понимали, что это живые организмы. Однако, в случае свечения микроскопических организмов, обуславливающих, к примеру, свечение морской воды по ночам, или гниющих деревьев в лесу (у некоторых грибов «гнилушек», к примеру *Armillaria mellea*, светится только мицелий, а плодовые тела - нет, так что связь свечения с грибами была не очевидна), этот факт стал ясен только после изобретения различных приборов, таких как микроскоп, и достижения наукой определенного уровня развития. До сих пор биолюминесценция является одним из самых красивых и завораживающих явлений природы. В некоторых странах, как например, в Японии, в период, когда светлячки активно летают и размножаются, многие люди приходят вечерами в парки и в леса, чтобы просто полюбоваться этим природным явлением. Это хотаругари – период любования светлячками, – явление, сравнимое по популярности со знаменитым периодом цветения сакуры.

Биолюминесценция – это явление, обусловленное способностью некоторых живых организмов испускать свет. В процессе химической реакции молекула субстрата, люциферина, окисляется кислородом. Процесс катализируется белком люциферазой, способствующей превращению люциферина с помощью кислорода в молекулу оксилуциферина в возбужденном состоянии, которая затем переходит в нормальное состояние, испуская при этом квант видимого света.

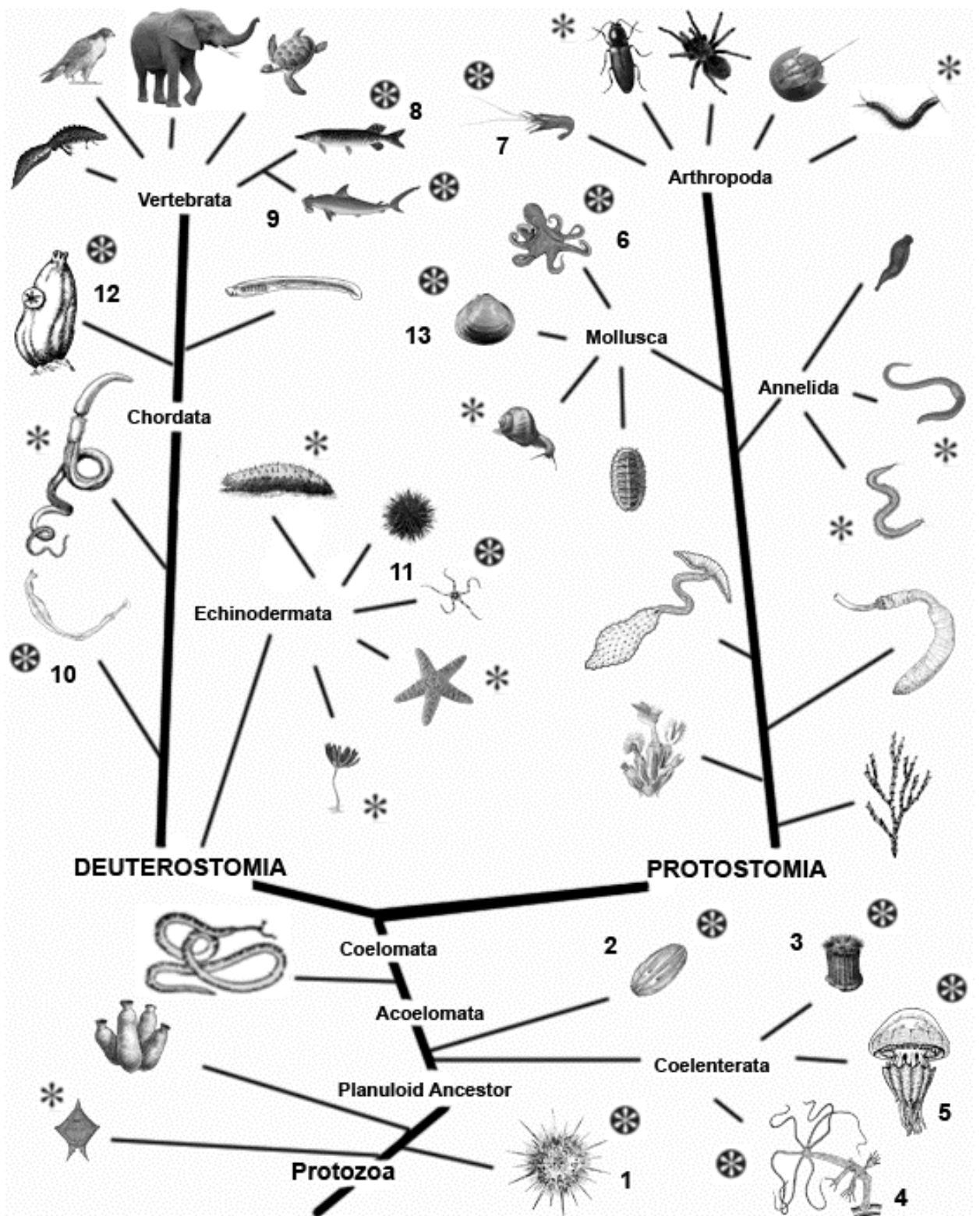
В настоящее время известно несколько типов биолюминесцентных систем и показано, что у различных организмов они возникали независимо в процессе эволюции более сорока раз [Haddock, Moline, Case, 2010; Herring, 1987]. Пример филогенетического древа царства животных, с указанием таксонов, имеющих биолюминесцентные виды, показан на Рисунке 1.

Свечение некоторых видов грибов в лесах было известно с древнейших времен. Первые упоминания о них, а так же о свечении гниющих деревьев можно найти в работах Аристотеля [Aristotle 350 BCE], написанных еще до нашей эры. Эксперименты Бойля в 17-м веке показали необходимость присутствия воздуха для биолюминесценции, в том числе

и у грибов [Boyle, 1668], но лишь в 20-м веке была доказана непосредственная связь этого свечения с мицелием грибов [Harvey, 1952, 1957]. На данный момент известно около 100 видов светящихся грибов, все они относятся к классу базидиомицетов [Oliveira и др., 2012; Wassink, 1978]. Яркость люминесценции грибов ощутимо уступает этому же показателю у большинства других организмов. Так чем же вызван интерес именно к свечению грибов, над изучением которого ученые бьются уже столько лет? Очень важно, что люминесценция грибов – это процесс, способный идти сутками без внесения дополнительных компонентов. К примеру, 0.2 г плодовых тел гриба *P. stipticus* испускают  $1-2 \times 10^{10}$  фотонов в секунду в течение многих дней [Shimomura, 1989, 1992]. Таким образом, люциферин-люциферазная система грибов обладает огромным потенциалом для ее применения в различных практических приложениях, в первую очередь, для биологии и медицины, сравнимым с аналогичным применением люциферин-люциферазной системы светлячка.

Методы биологических и медицинских исследований, различные анализы и технологии, основанные на люциферин-люциферазных реакциях, играют существенную роль в современной науке и прочно вошли в нее. Спектр их применения огромен. От аналитических методов *in vitro* и *in vivo*, включающих тесты на различные вещества, до биоимиджинга живых систем в режиме реального времени [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016]. Однако, наличие различных недостатков и ограничений, сужающих возможности использования и применения этих методик, стимулирует дальнейшее изучение природных биолюминесцентных систем с целью поиска новых люциферин-люцифераз для расширения спектра методов и улучшения уже существующих инструментов анализа.

Целью настоящей работы был поиск и клонирование гена люциферазы грибов – нового неизвестного белка, возможно, имеющего лучшие характеристики по сравнению с уже известными люциферазами, с целью его дальнейшего изучения и оптимизации работы для последующего применения в практических приложениях различных направлений науки.



**Рисунок 1.** Филогенетическое дерево. Таксоны, содержащие биolumинесцентные виды, отмечены черной звездочкой. Те же группы, чьи представители используют люциферин имидазопиразиногового типа, отмечены белой звездочкой. Цифрами обозначены следующие группы: 1 – радиолярии, 2 – гребневники, 3 – коралловые полипы, 4 – гидроидные, 5 – сцифоидные медузы, 6 – головоногие, 7 – ракообразные, 8 – костные рыбы, 9 – акулы, 10 – щетинкочелюстные, 11 – офиуры, 12 – оболочники, 13 - моллюски.



## ГЛАВА I. Обзор литературы

### 1.1 Введение

На данный момент открыты и находятся на различной стадии исследования несколько десятков билюминесцентных систем [Shimomura, 2006]. Однако, для большинства из них как минимум один из компонентов – или люциферин, или люцифераза – до сих пор не известны. На момент написания работы описаны структуры 9 природных люциферинов. Интересно, что зачастую в билюминесцентных системах даже эволюционно далеко расположенных друг от друга видов используется один и тот же люциферин, например, у динофлагеллят и рачков криля. Однако разнообразие люцифераз, судя по всему, гораздо выше, чем люциферинов. К примеру, на данный момент известны последовательности нескольких люцифераз, использующих целентеразин в качестве люциферина, аминокислотные последовательности которых совершенно не похожи друг на друга.

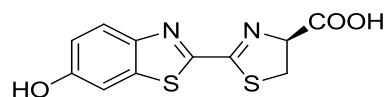
Данный обзор будет посвящен рассмотрению различных известных на настоящий момент люцифераз с целью сравнения основных принципов их работы, структур, биохимических свойств, и выявления уникальных черт, позволяющих использовать их в различных методиках и технологиях.

Стоит отметить также тот факт, что помимо люциферин-люциферазных билюминесцентных систем существуют так же фотопротеины – билюминесцентные белки, представляющие собой стабильные фермент-субстратные комплексы. Люминесценция большинства фотопротеинов не требует присутствия кислорода и активируется ионами металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ). Это особый тип белков-участников билюминесцентных систем, и в данном обзоре мы не будем их касаться.

## 1.2 Люциферазы биолюминесцентных систем, использующих люциферин светлячка

Среди представителей класса насекомых виды, обладающие биолюминесценцией, присутствуют в четырех отрядах: полужесткокрылые (Hemiptera), жесткокрылые (Coleoptera), двукрылые (Diptera) и ногохвостки (Collembola), классификационная принадлежность которых в настоящее время уточняется. Однако на данный момент биохимические и молекулярно-биологические исследования сосредоточены в основном на представителях отрядов жесткокрылых и двукрылых. Среди жесткокрылых это насекомые семейств светлячков (Lampyridae), жуков-щелкунов (Elateridae), а также железнородожные черви (Phengodidae). Имеет смысл рассматривать люциферазы представителей перечисленных выше семейств в рамках одного подраздела данной работы, поскольку все они используют один и тот же люциферин. Биолюминесцентная же система двукрылых насекомых значительно отличается от таковой у жесткокрылых.

Исторически все началось с изучения люциферин-люциферазной реакции светлячка и именно биолюминесцентная система светлячка является на данный момент одной из самых изученных. Первые опыты с ней были описаны в работах Харви в начале двадцатого века [Harvey, 1917a, 1917b]. Затем группой под руководством МакЭлроя был сделан ряд важных открытий (таких как необходимость кофакторов АТФ и  $Mg^{2+}$  для люциферин люциферазной реакции у светлячков), приведших к значительным сдвигам в понимании как химии самой биолюминесцентной реакции, так и структур отдельных ее компонентов [McElroy, 1947; McElroy, Hastings, 1955]. Впоследствии были получены первые препараты очищенного люциферина и его кристалл [Bitler, McElroy, 1957], что в свою очередь привело к расшифровке структуры люциферина светлячка и к разработке метода его химического синтеза [White и др., 1961; White, McCapra, Field, 1963]. Структура D-люциферина светлячка показана на Рисунке 2. Примечательным и полезным для последующего понимания работы люциферазы светлячка является тот факт, что активный люциферин является именно D-изомером, тогда как L-изомер, хоть и вступает в реакцию с люциферазой, однако дает очень мало света и фактически является конкурентным ингибитором [Lembert, 1996].



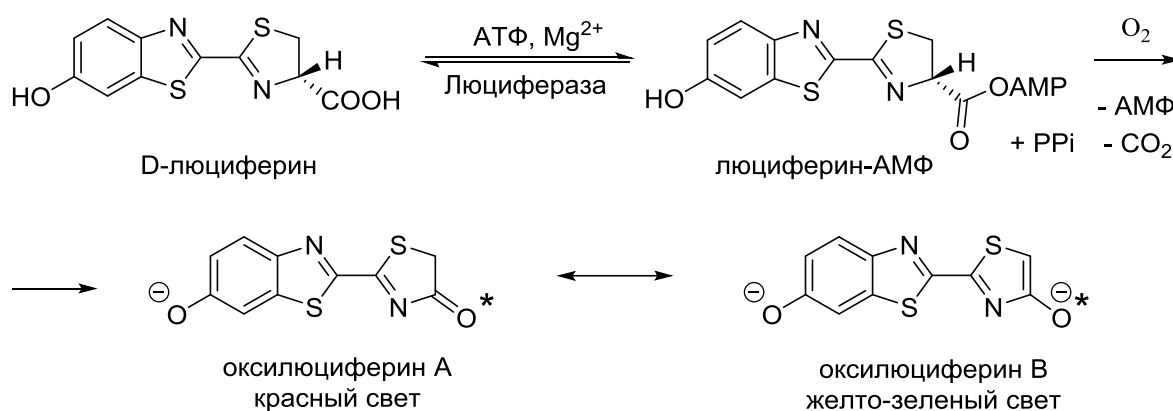
**Рисунок 2.** Структура D-люциферина светляка ((S)-2-(6'-гидрокси-2'-бензотиазолил)тиазолин-4-карбоновая кислота.

### 1.2.1 Люциферазы светлячков

Первые частично очищенные препараты люциферазы светлячка были получены из американского светлячка *Photinus pyralis* [Green, McElroy, 1956]. Позднее удалось клонировать и экспрессировать ген люциферазы данного вида в системе *in vitro* трансляции [Wood и др., 1984] и в *Escherichia coli* [Wet de и др., 1985, 1986]. На момент же написания данного обзора известны последовательности ДНК генов довольно большого количества люцифераз из разных видов светлячков. Они приведены ниже в Таблице 1. В целом, люциферазы светлячков представляют собой мономерные эуглобулины с массой около 60 кДа, которые могут димеризоваться в концентрированных растворах [Hannah, McCaslin, Wood, 1999; Ugarova, 1989; Wood, 1995]. Степень схожести люцифераз разных видов светлячков лежит в пределах 60%-80% идентичности по аминокислотной последовательности [Viviani, 2002]. Согласно данным исследований они имеют на своей поверхности два независимых друг от друга сайта связывания для АТФ и люциферина, а также сайт для связывания аденилата люциферина [Ugarova, 1989].

Окисление люциферина в реакции со светлячковой люциферазой проходит в два этапа (Рисунок 3): сначала аденилирование люциферина, а затем окисление аденилата люциферина. Аденилирование люциферина требует присутствия АТФ и  $Mg^{2+}$  и проходит аналогично реакциям, катализируемым аминоксил-тРНК-синтетазами и ацетил-КоА-лигазами [McElroy, DeLuca, Travis, 1967; Wood, 1995]. Это сходство указывает на происхождение люцифераз светлячков. И действительно, среди них много гомологов различных лигаз, катализирующих аденилирование [Babbitt и др., 1992; Fujino, Yamamoto, 1992; Scholten и др., 1991; Schröder, 1989; Suzuki и др., 1990; Toh, 1990]. У некоторых несветящихся видов светлячков были даже найдены лигазы с люциферазноподобной активностью, хоть и очень слабой [Viviani, Vechara, 1996]. И, наконец, всего одна аминокислотная замена может превратить ацил-КоА-синтетазу жирных кислот в люциферазу [Oba, Iida, Inouye, 2009]. Важно, что, обладая структурными данными по конкретным участкам молекулы люциферазы светлячка, отвечающим за те или иные

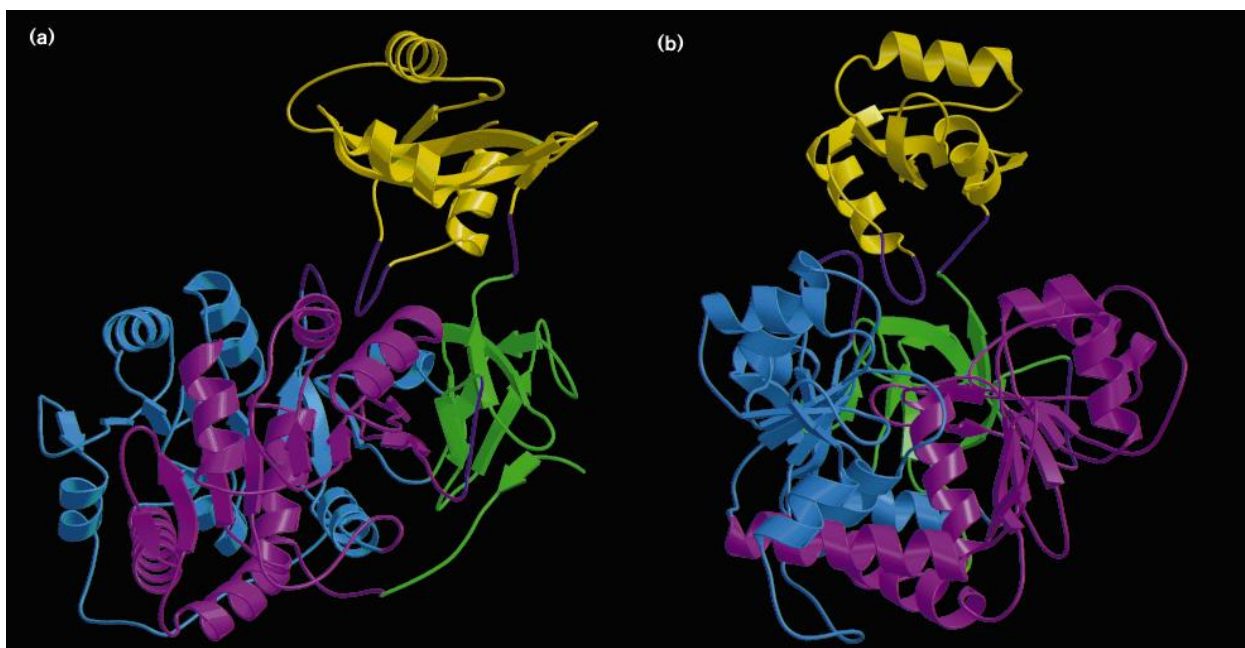
функции, можно с помощью молекулярно биологических методов усовершенствовать эти белки, сделав, возможно, из них полноценные люциферазы.



**Рисунок 3.** Механизм реакции между люциферином и люциферазой светлячка. Реакция протекает только при участии ионов  $\text{Mg}^{2+}$  и молекулы АТФ.

В 1996 году был получен кристалл и расшифрована пространственная структура люциферазы *Photinus pyralis* [Conti, Franks, Brick, 1996]. Она представлена на Рисунке 4. Именно этот факт дал толчок к детальному изучению молекулы люциферазы, и именно этим обусловлено огромное количество информации по ее структуре, гораздо большее, чем по любой другой люциферазе. Как видно из рисунка, белок состоит из двух глобулярных доменов, более крупного N-концевого и меньшего по размеру С-концевого. Структуру формируют два  $\beta$ -слоя, имеющие по краям  $\alpha$ -спирали и составляющие вместе  $\alpha\beta\alpha$  мотив, и  $\beta$ -бочонок. Обращенные друг к другу поверхности N- и С-концевых доменов образуют активный центр фермента, причем в процессе биолуминесцентной реакции положение этих доменов друг относительно друга изменяется [Conti, Franks, Brick, 1996]. Известно также, что С-концевой домен крайне важен для активности светлячковой люциферазы, а удаление последних 12 аминокислотных остатков от него приводит к полной потере биолуминесцентной активности [Waud и др., 1996]. Для выяснения же конкретных функциональных участков и ключевых аминокислотных остатков молекулы люциферазы был проведен ряд исследований, которые позволили с той или иной долей уверенности определить места связывания люциферина и участки, необходимые для каталитической активности [Branchini и др., 1997, 1998, 2000; Chang, Xiang, Dunaway-Mariano, 1997; Pavela-Vrancic и др., 1994; Saito и др., 1995; Sandalova, Ugarova, 1999; Stuible и др., 2000; Thompson и др., 1997]. Это позволило строить

предположения и успешно реализовывать работы по созданию генномодифицированных белков на основе светлячковой люциферазы с улучшенными свойствами.



**Рисунок 4.** Пространственная структура люциферазы *Photinus pyralis*, полученная с разрешением 2.0 Å (a) и она же, повернутая на 90° (b). Части N-концевого домена: β-слой А (голубой), β-слой В (розовый) и β-бочонок (зеленый). С-концевой домен показан желтым цветом. Структурно неупорядоченные петли показаны фиолетовым [Conti, Franks, Brick, 1996].

Важнейшим параметром для практического применения люцифераз является длина волны максимума биолюминесцентной эмиссии. У светлячков разных видов она лежит в пределах 538-582 нм [Seliger, McElroy, 1964]. Было установлено, что цвет биолюминесценции светлячковых люцифераз зависит от pH среды, в которой проходит реакция [McElroy, Seliger, 1961]. Понижение pH, повышение температуры и присутствие ионов тяжелых металлов приводят к сдвигу спектра в длинноволновую область [Viviani, Vecchra, 1995]. Для объяснения этого факта был предложен ряд теорий [DeLuca, 1969; McCarrn и др., 1994; White и др., 1971; White, Branchini, 1975], каждая из которых имеет свои сильные и слабые стороны, и на данный момент ни одна из них не признана единственно верной. Однако, последние данные говорят о том, что pH-чувствительность – это результат некоторой «гибкости» и подвижности аминокислотных остатков в активном центре фермента, обусловленной присутствием в нем основных остатков [Ohmiya и др., 1995]. Отсутствие же чувствительности к изменениям pH, возможно, объясняется более жесткой структурой активного центра, стабилизированного гидрофобными

взаимодействиями [Viviani и др., 2001]. Подробно природа рН-чувствительности и влияние на нее структуры люциферазы, а также возможная биологическая роль этого явления были описаны в работе [Viviani и др., 2008]. Примечательно, что такая рН-зависимость характерна только для светлячковых люцифераз. Люциферазы жука шелкуна и железнодорожного червя рН-стабильны. На спектр биолюминесценции в этих системах изменение рН влияния почти не оказывает. Сравнение аминокислотных последовательностей люцифераз светлячков, жуков-шелкунов и железнодорожных червей, а так же создание химерных белков позволили выявить участки, ответственные за цвет биолюминесценции и рН-чувствительность люцифераз [Viviani, Vecchiaro, Ohmiya, 1999]. Получение же кристалла светлячковой люциферазы в комплексе с аналогом природного люциферина позволило выявить конкретные аминокислотные остатки, отвечающие за цвет биолюминесценции, а также создать теоретическую базу для получения мутантных форм люциферазы светлячка с разными цветами биолюминесценции [Nakatsu и др., 2006]. Это было с успехом применено на практике и описано в работе [Kajiyama, Nakano, 1991]. Также, влияние определенных аминокислотных остатков на цвет биолюминесценции подробно описано в работе [Viviani и др., 2002].

Создание химических аналогов природного люциферина тоже позволяет влиять на длину волны максимума биолюминесцентной реакции. На данный момент существуют несколько аналогов D-люциферина, смещающих спектр люминесценции люциферинлюциферазной реакции как в коротковолновую, так и в длинноволновую часть спектра, о чем более подробно написано у [Branchini и др., 1989; White и др., 1966].

Важным фактором, ограничивающим использование природных люцифераз, является их ограниченная термостабильность. Большинство из них значительно деактивируется уже при повышении температуры до 30°C, что критично для методов исследования *in vivo*. Однако, на момент написания обзора более термостабильные люциферазы, чем природные формы, уже созданы; в основном, с помощью метода сайт-направленного мутагенеза. Различные подходы к созданию термостабильных люцифераз и люцифераз, устойчивых к действию различных реагентов, а также люцифераз с укороченным периодом полураспада в клетке, достаточно подробно описаны в обзоре [Koksharov, Ugarova, 2012]. Также предпринимались попытки создания более ярких аналогов природных люцифераз светлячка, что весьма важно для биомедицинских исследований, так как повышает чувствительность методов анализа. Так, к примеру, был создан аналог люциферазы светлячка для биоимиджинга, который дает сигнал в десять раз более яркий, чем природная люцифераза [Nakajima и др., 2010]. Различные химерные

конструкции с использованием люциферазы светлячка также нашли широкое применение, о чем более подробно можно узнать из [Smirnova, Ugarova, 2016].

На момент написания данного обзора создано огромное количество различных методик с использованием как природных люцифераз светлячка, так и их модифицированных аналогов и химерных белковых конструкций. Спектр задач варьирует от анализа бактериальной загрязненности в образцах почвы до биолюминесцентных тест-систем для скрининга химических соединений с ингибирующим действием на синтез белка. Применение люцифераз в различных тест-системах и методах биомедицинских исследований подробно описано в обзоре [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016].

Вид светлячка	Максимум излучения $\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
<i>Photinus pyralis</i>	560	гены <i>luc+</i> , <i>luc2</i> (Promega)
<i>Luciola mingrelica</i>	570	[Devine и др., 1993]
<i>Luciola lateralis</i>	552	[Tatsumi, Kajiyama, Nakano, 1992]
<i>Luciola cruciata LcLuc1</i>	554	[Tatsumi и др., 1989; Tsutomu, Hiroki, Eiichi, 1989]
<i>Luciola cruciata LcLuc2</i>	543	[Oba и др., 2010]
<i>Luciola italica</i>	566/614	[Branchini и др., 2006]
<i>Malaysian luciola</i>	580	[Ogo, Akiyoshi, Suzuki, 2014]
<i>Hotaria unmunsana</i>	-	[Choi и др., 2002]
<i>Hotaria tsushimana</i>	-	[Choi и др., 2003]
<i>Hotaria papariensis</i>	-	[Choi и др., 2003]
<i>Hotaria parvula</i>	568	[Ohmiya и др., 1995]
<i>Lampyris noctiluca</i>	550	[Sala-Newby, Thomson, Campbell, 1996]
<i>Lampyris turkestanicus</i>	-	[Alipour и др., 2004]
<i>Nyctophyla caucasica</i>	-	[Day и др., 2006]

<i>Pyrocoelia rufa</i>	-	[Lee и др., 2001]
<i>Pyrocoelia miyako</i>	550	[Ohmiya и др., 1995]
<i>Diaphanes pectinealis</i>	-	[Xueyan, Shuang, Xingcai, 2006]
<i>Cratomorphus distinctus</i>	550	[Viviani и др., 2004]
<i>Photirus pennsylvanica</i>	-	Ген <i>Ppe</i> (LY) [Ye и др., 1997]
	-	Ген <i>Ppe</i> J19 [Ye и др., 1997]
	560	Ген <i>Ppe</i> 1(KW) [Ye и др., 1997]
	538	Ген <i>Ppe</i> 2(KW) [Ye и др., 1997]
	538	[Viviani и др., 2011]
<i>Amydetes vivianii (fanestratus)</i>	538	[Viviani и др., 2011]
<i>Macrolampis sp</i>	569	[Viviani и др., 2007]
<i>Photonius scintillans</i>	578	[Branchini и др., 2006]

**Таблица 1.** Виды светлячков, для которых на настоящее время известны генетические последовательности люцифераз.



## 1.2.2 Люциферазы жуков-щелкунов

Биолюминесцентная система жука-щелкуна на сегодняшний день довольно хорошо изучена. Как уже упоминалось, данная система использует в качестве субстрата тот же самый люциферин, что и система светлячка. Сами люциферазы имеют молекулярную массу около 60 кДа. Найдено, клонировано и охарактеризовано несколько люцифераз из различных видов семейства Elateroidae (Таблица 2). У особей большинства видов имеется два «фонаря». Один светящийся орган расположен на голове и представляет собой пару овальных пятен, светящихся в темноте сильным зеленоватым светом, и второй светящийся орган расположен на брюшке в первом абдоминальном сегменте. Причем, если максимум эмиссии люминесценции пятен на голове лежит в диапазоне 525-560 нм, то у органа на брюшке он смещен на 20-40 нм в длинноволновую часть спектра [Colepicolo-Neto, Costa, Bechara, 1986]. В целом, биолюминесцентные реакции, катализируемые люциферазами жуков-щелкунов, имеют максимум эмиссии в диапазоне от 532 нм до 593 нм [Biggley, Lloyd, Seliger, 1967; Colepicolo-Neto, Costa, Bechara, 1986]. Интересно, что эта характеристика может отличаться даже у представителей одного вида, живущих в разных популяциях [Amaral и др., 2016; Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]. Этот факт дает возможность изучать эволюционную изменчивость и молекулярную эволюцию белков насекомых [Feder, Velez, 2009].

Первой была изучена биолюминесцентная система ямайского жука-щелкуна *Pyrophorus plagiophthalmus*. В результате работ были клонированы четыре типа люцифераз из одного организма, которые различались по цвету биолюминесценции в реакции с люциферинном: зеленая ( $\lambda_{\max}$  546нм), желто-зеленая ( $\lambda_{\max}$  560нм), желтая ( $\lambda_{\max}$  578нм) и оранжевая ( $\lambda_{\max}$  593нм) [Wood и др., 1989]. Таким образом у жуков-щелкунов была показана цветовая дифференциация люцифераз внутри одного организма. Все четыре люциферазы обладают высокой (от 95% до 99%) степенью гомологии между собой по нуклеотидной последовательности кодирующих их кДНК, однако их сходство с люциферазой светлячка менее значительно и составляет около 47% [Viviani и др., 1999; Wood и др., 1989]; при этом у них, как и у люциферазы светлячка, на С-конце присутствует сигнал локализации в пероксисомах.

Такая вариабельность в цвете сигнала, а также тот факт, что, как уже упоминалось выше, спектр биолюминесценции люцифераз жука-щелкуна практически не зависит от рН среды в физиологических пределах от 6 до 8, делают их весьма привлекательными для создания различных инструментов анализа на их основе, в том числе *in vivo*. Также стоит

отметить, что среди люцифераз насекомых люциферазы жуков-щелкунов самые короткие по аминокислотной последовательности (около 543 аминокислотных остатка). Однако они имеют склонность к агрегации в концентрированных растворах, образуя активные димеры [Ugarova, 1989], что стоит учитывать при планировании *in vivo* экспериментов с их участием.

С помощью методов мутагенеза и получения химерных белков было показано, что участок между 220 и 247 аминокислотами молекулы люциферазы отвечает за цвет биолюминесценции [Amaral, Prado, Viviani, 2012; Viviani и др., 1999; Wood, 1995; Wood и др., 1989]. Эти данные подтвердились при исследовании люцифераз *Pyrearinus termitelluminas* и *Fulgeochlizus bruchi* [Bechara, Colepicolo, 1987; Oba, Kumazaki, Inouye, 2010] и др. Впоследствии была показана критическая роль 247 аминокислоты у люциферазы *Pyrophorus angustus*: в зависимости от того, находится ли в этом положении цистеин, глицин или фенилаланин, можно наблюдать изменение цвета биолюминесценции на желто-зеленый, желтый или оранжевый соответственно [Amaral и др., 2016]. Также влияние различных аминокислотных остатков в ключевых позициях на цвет биолюминесценции для различных люцифераз было изучено в работе [Viviani и др., 2002].

Люциферазы жука щелкуна наряду со светлячковыми являются достаточно популярными для создания различных биологических и биомедицинских методик с их использованием. Например, их часто используют при исследованиях инфекционных заболеваний. Так, белковые конструкции на основе люциферазы *P. plagiophthalmus* применяли в ряде работ с использованием вирусных инфекций для анализа по генам-репортерам при изучении бакуловирусов [Karp и др., 1992, 1996; Oker-Blom и др., 1993]. Подробно применение данного типа люцифераз описано в обзоре [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016].

Вид жука-щелкуна	Максимум излучения $\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	540	ген CBG (Promega)
	615	ген CBR (Promega)
<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dYG)</i>	560	[Wood и др., 1989]
<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dGR)</i>	546	[Wood и др., 1989]
<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vOR)</i>	593	[Wood и др., 1989]
<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vYE)</i>	578	[Wood и др., 1989]
<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vYG)</i>	563	[Wood и др., 1989]
<i>Pyrearinus termitelluminas</i>	538	[Viviani и др., 1999]
<i>Pyrophorus mellifluus (dGR)</i>	549	[Stolz и др., 2003]
<i>Pyrophorus mellifluus (vGR)</i>	554	[Stolz и др., 2003]
<i>Pyrophorus angustus (vYG)</i>	566	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
<i>Pyrophorus angustus (vYG)</i>	536	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	540	[Amaral, Prado, Viviani, 2012]
<i>Photophorus jansonii</i>	559	[Mitani и др., 2013]

**Таблица 2.** Виды жуков-щелкунов, для которых на настоящее время известны генетические последовательности люцифераз.

### 1.2.3 Люциферазы железнодорожных червей

Биолюминесцентная система железнодорожного червя (*Phengodidae*) является наименее изученной из всех, использующих светлячковый люциферин. На момент написания обзора известны и клонированы люциферазы всего из четырех видов этих насекомых (Таблица 3), причем все они, так или иначе, защищены патентами, что ограничивает доступ к подробной информации о них. Наиболее изученной является система *Phrixothrix vivianii*. Представители этого вида имеют две разных люциферазы в рамках одного организма, значительно различающиеся по спектрам биолюминесценции. Кроме желто-зеленой люминесценции ( $\lambda_{\max}$  542нм) у одиннадцати дорсальных светящихся органов, они обладают красной люминесценцией ( $\lambda_{\max}$  620нм), испускаемой светящимися органами на голове. Таким образом, среди представителей светящихся насекомых, чьи люциферазы на данный момент клонированы, железнодорожные черви обладают люциферазой с наиболее длинноволновым спектром люминесценции [Viviani, Bechara, 1993, 1997; Viviani, Bechara, Ohmiya, 1999]. Самую же «красную» биолюминесценцию среди упомянутых выше систем имеет биолюминесцентная система *Phrixotrix hirtus* ( $\lambda_{\max}$  636нм) [Viviani, Ohmiya, 2007].

Биохимические свойства люцифераз железнодорожного червя изучены относительно слабо. Однако, точно известно, что, как и люцифераза жука шелкоуна, люцифераза железнодорожного червя не имеет батохромного сдвига при понижении pH реакционной смеси, характерного для люциферазы светлячков [Viviani, Bechara, 1993, 1995]. Из *Phrixothrix vivianii* было клонировано две люциферазы – P<sub>VGR</sub> ( $\lambda_{\max}$  542нм) и Ph<sub>RE</sub> ( $\lambda_{\max}$  622нм) [Viviani, Bechara, Ohmiya, 1999]. Молекулярный вес обеих составляет около 60 кДа. Аминокислотные последовательности этих люцифераз имеют довольно высокую степень гомологии между собой (71% гомологии) и с соответствующими люциферазами из японского вида железнодорожного червя *Rhagophthalmus ohbai* (соответственно 66.6% гомологии для P<sub>VGR</sub> и 56% гомологии для Ph<sub>RE</sub>), что является обычным показателем для родственных видов [Gruber, Kutuzova, Wood, 1997]. Однако, степень гомологии P<sub>VGR</sub> и Ph<sub>RE</sub> со светлячковыми люциферазами не высока (50-55% и 46-49% соответственно), так же как и с люциферазами жуков шелкоунов (47-49%), что говорит о том, что, несмотря на то, что железнодорожные черви используют светлячковый люциферин, люциферазы в них возникли эволюционно, скорее всего, независимым путем [Viviani, Bechara, Ohmiya, 1999]. Стоит отметить тот факт, что их последовательности также содержат на своем С-конце трипептид, отвечающий за локализацию в пероксисомах [Wood, 1995].

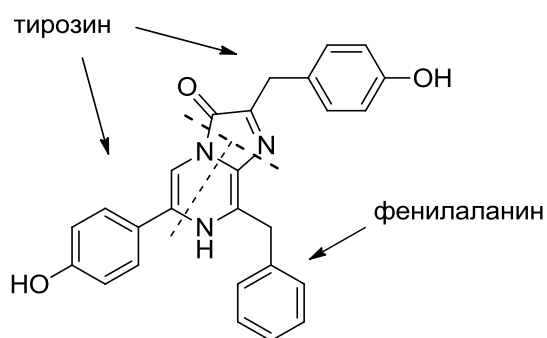
Использование люцифераз железнодорожных червей в биомедицинских исследованиях на данный момент достаточно ограничено, вероятно, из-за их значительного биохимического сходства с люциферазами светлячков и жуков-щелкунов, которые сейчас очень популярны. Однако данная группа люцифераз имеет потенциал для применения, например, в качестве репортеров в биоимаджинге из-за их «красного» спектра биолюминесценции, который попадает в «окно прозрачности биологических тканей» (часть спектра, где наблюдается самое низкое поглощение света).

Вид железнодорожного червя	Максимум излучения $\lambda_{\text{max}}$ (нм)	Источник
<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	550	[Viviani, Ohmiya, 2007]
	580	[Viviani, Ohmiya, 2007]
<i>Phrixotrix hirtus</i>	630	[Viviani, Ohmiya, 2007]
<i>Phrixothrix vivianii</i>	542	[Viviani, Ohmiya, 2007]
<i>Diplocladon</i>	557-562	[Akiyoshi, Ogo, Suzuki, 2014]

**Таблица 3.** Виды железнодорожных червей, для которых на настоящее время известны генетические последовательности люцифераз.

### 1.3 Люциферазы биolumинесцентных систем, использующих целентеразин

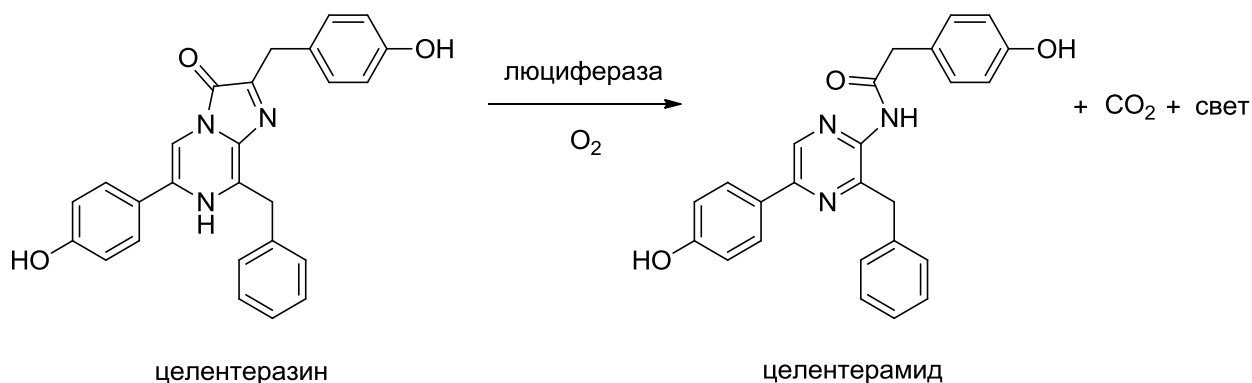
Среди всех биolumинесцентных видов живых организмов, известных на настоящее время, подавляющее большинство – это морские организмы, и большинство из изученных биolumинесцентных систем этих организмов используют в качестве субстрата целентеразин (Рисунок 5). Целентеразин является субстратом в биolumинесцентных системах организмов, принадлежащих к группам мягких кораллов (*Renilla*) [Hogi и др., 1977], веслоногих ракообразных (*Copepoda*) [Campbell, Herring, 1990; Markova и др., 2004], ракушковых ракообразных (*Conchoecia*) [Oba и др., 2004], головоногих моллюсков (*Vampyroteuthis*) [Robison и др., 2003], сцифоидных медуз (*Periphylla*) [Shimomura и др., 2001; Shimomura, Flood, 1998], десятиногих ракообразных (*Olophorus*) [Inouye, Shimomura, 1997; Shimomura и др., 1978] и др.



**Рисунок 5.** Структура целентеразина.

Примечательно, что несмотря на тот факт, что столь таксономически удаленные друг от друга группы используют одну и ту же молекулу в качестве субстрата в люциферин-люциферазной реакции, клонированные из них люциферазы показали очень низкую степень гомологии между собой, что говорит о независимых путях возникновения и развития этих биolumинесцентных систем. И, хотя все известные на данный момент целентеразин-зависимые люциферазы являются монооксигеназами и катализируют одну и ту же реакцию окисления целентеразина кислородом, это очень разные белки с различными биохимическими свойствами. Все целентеразин-зависимые люциферазы можно разделить на две группы. Истинные люциферазы, катализирующие типичную реакцию окисления люциферина кислородом, с получением оксилуциферина и испусканием квантов света (Рисунок 6), и фотопротеины – биolumинесцентные белки, представляющие собой стабильные фермент-субстратные комплексы. Люминесценция

большинства фотопротеинов не требует присутствия кислорода и активируется ионами металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ). В данном обзоре мы будем рассматривать только первую группу ферментов.



**Рисунок 6.** Биолуминесцентная реакция с участием целентеразина.

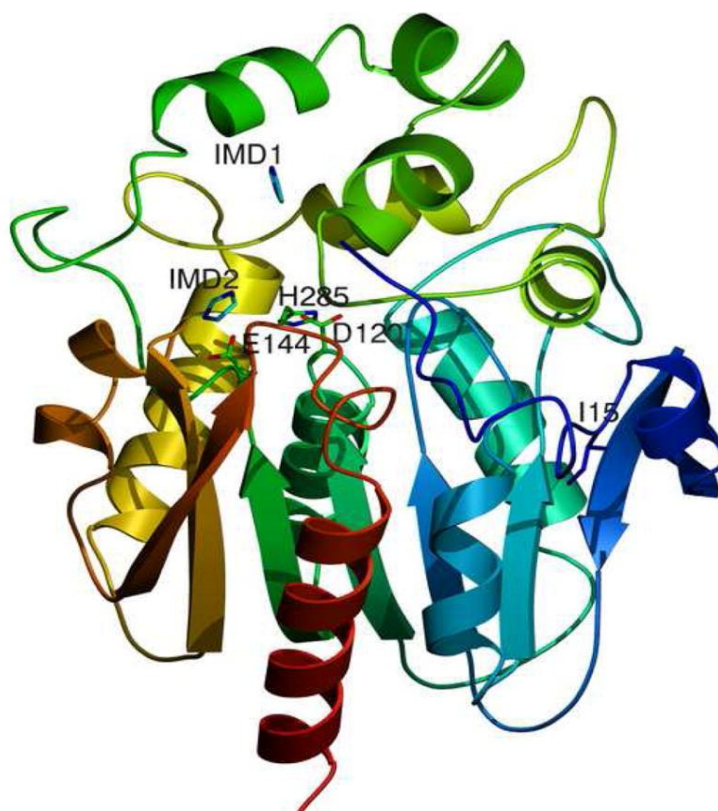
### 1.3.1 Люцифераза коралла *Renilla*

История изучения биолуминесценции *Renilla reniformis* насчитывает много лет. Еще в 1961 году вышла первая публикация с описанием некоторых свойств люминесцентной реакции этого коралла [Cormier, 1961]. А первые препараты люциферазы были получены и описаны в 70-е годы прошлого века [Karkhanis, Cormier, 1971; Matthews, Hori, Cormier, 1977]. В настоящее время известны последовательности люцифераз для *Renilla reniformis* и *Renilla muellerias* [Titushin и др., 2008]. Люцифераза коралла *Renilla reniformis* (RLuc) была клонирована в 1991 году [Lorenz и др., 1991]. Это белок с молекулярной массой 36 кДа. До сих пор она остается единственной внутриклеточной люциферазой среди всех целентеразин-зависимых люцифераз. В живом коралле биолуминесцентная система локализована в специальных клетках – фотоцитах, и люминесценция не является спонтанной, а контролируется нервной системой [Cormier, 1978]. Биолуминесцентная система *Renilla* помимо люциферазы, целентеразина и кислорода включает в себя еще два белка. Это целентеразинсвязывающий белок (СВР) и зеленый флуоресцентный белок (GFP) [Charbonneau, Cormier, 1979; Ward, Cormier, 1979]. СВР содержит нековалентно связанный целентеразин [Stepanyuk и др., 2008a], что не только защищает последний от неспецифического окисления кислородом [Stepanyuk и др., 2010], но и позволяет контролировать время и яркость свечения животного. Регуляция доступности связанного с СВР целентеразина осуществляется с помощью ионов кальция,

которые, связываясь с белком, вызывают небольшое изменение конформации последнего, что в свою очередь приводит к доступности целентеразина для окисления. GFP же в данной системе является «усилителем» люминесценции. Эксперименты показали, что RLuc *in vitro* способна окислять целентеразин с испусканием квантов света и без дополнительных белков. Однако, в присутствии GFP как *in vitro*, так и *in vivo*, данная реакция протекала с гораздо большим квантовым выходом, чем без него. Кроме того, было экспериментально показано образование белкового комплекса RLuc–GFP [Ward, Cormier, 1979]. Также эффективность люминесцентной реакции ощутимо возросла, если вместо целентеразина к люциферазе добавляли CBP [Titushin и др., 2008]. При этом наблюдалась люминесценция с  $\lambda_{\max}$  480 нм, и, как и в случае аналогичных экспериментов с GFP, было показано образование белкового комплекса RLuc–CBP [Stepanyuk и др., 2009]. В присутствии же GFP максимум люминесценции смещался ( $\lambda_{\max}$  509нм), что является следствием ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) с люциферазы (донор) на хромофор GFP (акцептор).

Попытки выяснить эволюционное происхождение люциферазы *Renilla* показали практически полное отсутствие гомологии ее аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями других, известных на данный момент целентеразин-зависимых люцифераз. Самый же высокий процент гомологии последовательности этой люциферазы наблюдается с последовательностями белков семейства  $\alpha/\beta$  гидролаз [Loening и др., 2006]. После получения кристалла и разрешения пространственной структуры RLuc [Loening, Fenn, Gambhir, 2007] (Рисунок 7) стало ясно, что сходство ее пространственной структуры с таковой  $\alpha/\beta$  гидролаз гораздо выше, чем с другими целентеразин-зависимыми люциферазами и фотобелками акворином и обелином [Deng и др., 2005; Stepanyuk и др., 2013]. Также установление пространственной структуры люциферазы *Renilla* позволило получить необходимые данные для создания мутантных форм данной люциферазы с улучшенными свойствами.





**Рисунок 7.** Пространственная структура молекулы люциферазы *Renilla reniformis* [Loening, Fenn, Gambhir, 2007].

Природная люцифераза RLuc обладает подходящими для ее использования в различных методиках и приложениях биохимическими свойствами. Температурный оптимум работы 18-37°C, pH-оптимум лежит в диапазоне 6.0-7.0, однако квантовый выход реакции довольно низкий [Matthews, Hori, Cormier, 1977]. В настоящее время с помощью методов случайного и сайт-направленного мутагенеза получен ряд мутантных форм RLuc с улучшенными свойствами: более устойчивые к воздействию сыворотки крови, более чувствительные, яркие, а также со спектрами биолюминесценции, смещенными в длинноволновую область, что важно для применения данной люциферазы в экспериментах на животных [Loening и др., 2006; Loening, Wu, Gambhir, 2007; Woo, Arnim von, 2008]. Также были созданы аналоги целентеразина, увеличивающие яркость реакции люминесценции и смещающие максимум длины волны ее спектра [Loening, Wu, Gambhir, 2007; Stepanyuk и др., 2010]. Эти достижения, а также тот факт, что люцифераза RLuc небольшая и легко экспрессируется практически в любом типе клеток, сделали эту люциферазу одной из самых часто используемых в биологических и медицинских исследованиях.

### 1.3.2 Люциферазы веслоногих ракообразных *Copepoda*

В группе веслоногих ракообразных (копепод) биоломинесцентные виды были найдены среди представителей различных отрядов этого подкласса. На момент написания данного обзора известны последовательности 28 люцифераз копепод, принадлежащих 12 различным видам (Таблица 4), причем у некоторых видов копепод присутствует по несколько генов, кодирующих 2-3 изоформы люциферазы. Интересный факт заключается в том, что степень гомологии изоформ люциферазы из одного вида копеподы между собой зачастую находится на том же уровне, что и гомология с люциферазами других, иногда довольно далеких друг от друга в эволюционном отношении, видов [Markova, Vysotski, 2015]. Несмотря на то, что относительно недавно открытые люциферазы копепод уже нашли широкое применение в различных экспериментах как *in vitro* [Borisova и др., 2008; Verhaegent, Christopoulos, 2002], так и *in vivo* [Markova и др., 2004; Tannous и др., 2005], нативная структура люциферазы копепод остается неизвестной.

Первыми были клонированы люциферазы видов *Gaussia princeps* [Bryan, Szent Gyorgyi, 1999] и *Metridia Longa* [Markova и др., 2004], GpLuc и MLuc, соответственно. Это небольшие, около 20 кДа, секретируемые белки. В молекуле люциферазы копепод можно выделить сигнальный пептид, необходимый для секреции, вариабельный N-концевой домен и консервативный C-концевой домен. Вариабельный домен люцифераз, судя по всему, не имеет отношения непосредственно к биоломинесцентной функции фермента, что подтверждается исследованиями различных мутантных форм MLuc, среди которых существуют мутанты с практически полностью отсутствующим N-концевым доменом, которые при этом обладают более высокой люминесцентной активностью, чем люцифераза дикого типа [Markova, Burakova, Vysotski, 2012]. Стоит, однако, отметить, что отсутствие вариабельного домена в люциферазе крайне негативно сказывается на кинетике люминесцентной реакции. Константный домен люцифераз копепод состоит из двух неидентичных тандемных повторов длиной 70 аминокислот, каждый из которых содержит крайне консервативный участок длиной в 32 аминокислоты [Inouye, Sahara, 2008; Markova и др., 2004]. По некоторым данным, при экспрессии одного такого тандемного повтора в системе бактерии *E. coli* проявлялась биоломинесцентная активность [Inouye, Sahara, 2008], однако эти данные не нашли подтверждения при постановке подобных экспериментов в эукариотических экспрессионных системах [Remy, Michnick, 2006].

В целом, получение рекомбинантных люцифераз копепод в экспрессионной системе бактерии *E. coli* весьма затруднено вследствие сильной агрегации рекомбинантного белка, что в свою очередь ведет к гетерогенности образца [Borisova и др., 2008; Stepanyuk и др., 2008b]. Кроме того, биолюминесцентная активность полученных таким образом рекомбинантных люцифераз в несколько раз ниже, чем у тех же люцифераз, но полученных с использованием системы экспрессии в клетках насекомых [Markova и др., 2015; Stepanyuk и др., 2008b].

Как уже говорилось, люциферазы веслоногих ракообразных нашли широкое применение в различных практических приложениях и методиках (более подробно см. [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016; Markova, Vysotski, 2015]). И, поскольку люциферазы копепод изначально являются секретлируемыми белками, они прекрасно подходят для изучения различных внеклеточных процессов, межклеточных взаимодействий и биоимиджинга. В работах нескольких коллективов авторов была показана линейная корреляция сигнала биолюминесценции в культуральной среде с количеством клеток, секретлирующих сигнал для GpLuc [Chung и др., 2009; Tannous и др., 2005] и MLuc [Lupold и др., 2012]. Более подробно области применения люцифераз копепод разобраны в обзоре [Tannous, Teng, 2011]. Для практического применения в различных методиках люциферазы копепод обладают несколькими очень полезными свойствами, главными из которых являются их высокая биолюминесцентная активность и невероятная термостабильность [Takenaka и др., 2008]. Даже после кипячения в течение часа одна из изоформ MLuc теряет всего 50% своей активности [Markova и др., 2015].

Люциферин-люциферазная реакция копепод имеет очень быструю кинетику [Borisova и др., 2008; Markova, Burakova, Vysotski, 2012; Tannous и др., 2005]. Однако для некоторых практических приложений это нежелательно. Тем не менее, поскольку кинетика данной реакции сильно зависит от буферного окружения, ее можно замедлять путем изменения условий реакции и добавления различных компонентов, например, детергентов [Degeling и др., 2013]. В то же время это не всегда возможно, если речь идет об экспериментальных приложениях, а тем более об экспериментах *in vivo*. Главным же ограничивающим их применение фактором для люцифераз копепод является «голубой» спектр их биолюминесценции, который не позволяет использовать их в экспериментах на тканях млекопитающих.

Для решения различных проблем, возникающих при практическом применении люцифераз копепод, было создано множество различных мутантных форм с

улучшенными характеристиками: с пониженной кинетикой реакции [Degeling и др., 2013; Kim и др., 2011], со спектром биолюминесценции, сдвинутым в более длинноволновую область, и более яркие [Kim и др., 2011; Kim, Izumi, 2014; Kim, Torimura, Tao, 2013]. Также недавно была клонирована самая маленькая на данный момент природная люцифераза. Это изоформа MLuc массой 16,5 кДа [Markova и др., 2015]. Советы и основные методы, используемые при создании искусственных люцифераз копепод, а также руководства по моделированию конкретных их свойств содержатся в работе [Kim, Fujii, 2016].

Вид копепод	Максимум излучения $\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
<i>Metridia longa</i>	485	[Markova и др., 2004]
<i>Metridia curticauda</i>	485	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Metridia asymmetrica</i>	485	[Takenaka и др., 2013]
<i>Metridia pacifica</i>	485	[Takenaka и др., 2008]
<i>Metridia okhotensis</i>	485	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Gaussia princeps</i>	473	[Bryan, Szent Gyorgyi, 1999]
<i>Pleuromamma scutullata</i>	490	[Takenaka и др., 2013]
<i>Pleuromamma xiphias</i>	490	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Pleuromamma abdominalis</i>	490	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Lucicutia ovaliformis</i>	493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Heterorhabdus tanneri</i>	-	[Takenaka и др., 2012, 2013]
<i>Heterostylites major</i>	-	[Takenaka и др., 2012]

**Таблица 4.** Виды веслоногих ракообразных, для которых на настоящее время известны генетические последовательности люцифераз.

### 1.3.3 Люцифераза глубоководных креветок семейства *Oplophoridae*

Изучение креветок рода *Oplophoridae* и, в частности, *Oplophorus gracilirostris* началось в семидесятые годы прошлого века. Эти креветки производят светящуюся слизь с помощью секреторных органов в основании антенн и ног, также на ногах имеются фотофоры. В 1976 году было показано, что в качестве люциферина их билюминесцентная система использует целентеразин [Inoue, Kakoï, Goto, 1976]. В то же время были получены и охарактеризованы первые, частично очищенные препараты люциферазы *O. gracilirostris* [Shimomura и др., 1978]. Яркость свечения данной билюминесцентной реакции подвержена значительному влиянию температуры, концентрации солей в реакционной смеси и ее pH. Температурный оптимум билюминесцентной реакции около 40°C, pH-оптимум в районе 9. Последующие исследования показали, что природная форма этой люциферазы обладает массой около 106 кДа [Inoue и др., 2000], склонна к агрегации и потере активности в растворах с pH меньше 7, имеет максимум билюминесценции 454 нм. Однако по данным гель электрофореза этот белковый комплекс состоит, по-видимому, из четырех субъединиц, двух с массой 19 кДа и двух с массой 35 кДа. Последовательности этих белков были клонированы в 2000 году [Inoue и др., 2000], но билюминесцентная активность была показана только для субъединицы 19 кДа [Inoue, Sasaki, 2007]. Стоит также отметить, что люминесцентная активность субъединицы 19 кДа, полученной в экспрессионных системах бактерий и клеток млекопитающих, значительно ниже, чем у природной люциферазы *O. gracilirostris*. Этот факт косвенно указывает на то, что субъединица с массой 35 кДа несет функцию стабилизации каталитической субъединицы в природной люциферазе [Inoue, Sasaki, 2007]. Также была показана широкая субстратная специфичность люциферазы *O. gracilirostris* [Inoue, Shimomura, 1997], позволившая в дальнейшем подбирать химически модифицированные аналоги целентеразина для улучшения спектральных характеристик и яркости билюминесцентной реакции.

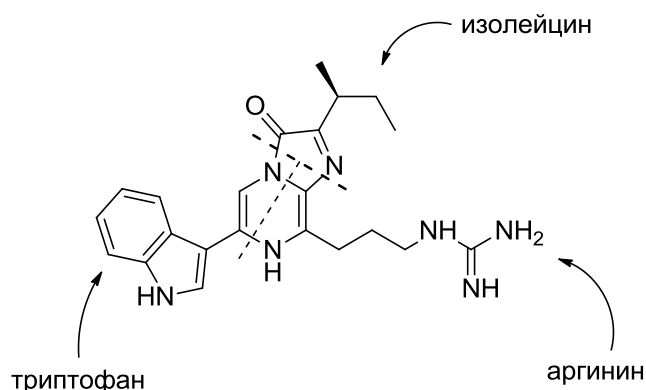
Никакой гомологии аминокислотной последовательности люциферазы *O. gracilirostris* с последовательностями других известных на данное время люцифераз обнаружено не было. Однако, с помощью компьютерных программ, моделирующих вторичную и пространственную структуры белков и белковых доменов, было установлено родство этой люциферазы с группой мембранных липид-связывающих белков. Это позволило с помощью всего одной аминокислотной замены в положении 166 последовательности субъединицы 19 кДа получить мутантную форму этого белка с в 3 раза более высокой билюминесцентной активностью и в 1.5 раза более высокой

стабильностью в сравнении с исходным белком [Hall и др., 2012]. В дальнейшем из этого мутанта методом случайного мутагенеза была получена мутантная форма, названная NanoLuc (NLuc). Данная мутантная форма субъединицы 19 кДа содержит 16 аминокислотных замен и обладает лучшими характеристиками по сравнению с белком дикого типа. Яркость свечения биолюминесцентной реакции NLuc в лизатах клеток HEK293 с фуримазином, аналогом целентеразина, в 2.5 миллиона раз выше, чем у субъединицы 19 кДа дикого типа с целентеразином в тех же условиях, и в 150 раз выше, чем у реакций светлячковой люциферазы и люциферазы Renilla в аналогичных условиях [Hall и др., 2012]. Стоит, однако, отметить тот факт, что прирост биолюминесцентной активности NLuc был существенно ниже в аналогичных экспериментах с лизатами клеток *E.coli* и СНО [Inoue и др., 2014]. Самое же главное обстоятельство, непосредственно влияющее на практическое применение NLuc и значительно ограничивающее его, – это то, что максимум спектра люминесценции реакции для данной люциферазы составляет 460 нм. Это значение лежит в диапазоне, практически полностью поглощаемом тканями млекопитающих.

Люцифераза NLuc нашла широчайшее применение в различных областях биологии и медицины. Ее малые размеры делают ее подходящим кандидатом для исследований, где размер гена имеет критически важное значение, к примеру, в исследованиях вирусов [Sun и др., 2014]. Как и исходная люцифераза *O. gracilirostris*, NLuc является секретлируемым белком, что в совокупности с ее яркостью делает ее прекрасным инструментом для биоимиджинга [Chen, Bagdasarian, Walker, 2015; Karlsson и др., 2015; Nishitsuji и др., 2015; Vinayak и др., 2015], а также маркерным белком в составе химерных белков [Demont и др., 2014; Deplus и др., 2013; He и др., 2014; Norisada и др., 2014; Picaud и др., 2015; Song и др., 2013]. Более подробно о практическом применении NLuc написано в [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016].

## 1.4 Люциферазы биолюминесцентных систем, использующих люциферин *Cypridina*

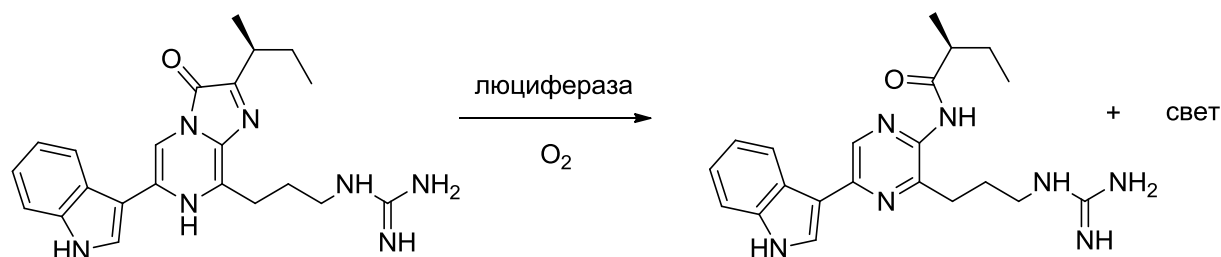
Биолюминесцентная система *Cypridina* изучается с давних времен. Впервые на нее обратил внимание профессор Ньютон Харви еще в 1916 году. Его привлекла яркость свечения животных, а также легкость хранения материала, собранного для изучения. Как выяснилось впоследствии, даже после хранения в течение десятилетий в помещении, где температура порой поднималась до 30 градусов, биоматериал все равно обладал способностью к биолюминесценции. Несмотря на это, люциферин из рачков *Cypridina* (*Vargula hilgendorfi*) был выделен в чистом виде и охарактеризован Осаму Шимомурой только в 1957 году [Shimomura, Goto, Hirata, 1957], но вследствие того, что он оказался исключительно нестабилен на воздухе, особенно в загрязненных растворах, выделение его из природного биоматериала крайне затруднительно. Предложенная методика после некоторых улучшений позволила все же получить кристаллы люциферина *Cypridina* и расшифровать его структуру [Kishi и др., 1966; Kishi, Goto, Hirata, 1966] (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Структура люциферина *Cypridina*.

Молекула имеет в своей основе три аминокислотных остатка: аргинин, изолейцин и триптофан. После установления структуры стало возможно разработать синтез данного люциферина, что и было сделано [Inoue и др., 1969; Nakamura и др., 2000; White, Karpetsky, 1971]. Все это дало возможность начать поиски люциферазы *Cypridina*. К тому моменту уже было установлено, что реакция биолюминесценции *Cypridina* требует только люциферин, кислород и люциферазу. Схема реакции (Рисунок 9) была предложена в 1967 году МакКапрой [McCapra, Chang, 1967] и впоследствии подтверждена в работах других ученых [Shimomura, Johnson, 1971]. Интересно, что биолюминесцентные виды других

семейств класса Ostracoda, например, Halocyprididae и Conchoecia, обладают целентеразин-зависимыми люциферазами, что, возможно, связано с тем, что их люциферазы не являются секретлируемыми [Oba и др., 2004].



**Рисунок 9.** БиOLUMИнесцентная реакция люциферина *Cypridina*.

#### 1.4.1 Люциферазы *Cypridina*

Работы по выделению и клонированию люциферазы *Cypridina* начались еще в 60-х годах прошлого века [Shimomura, 2006]. Первая клонированная люцифераза *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* была получена в 1989 году [Thompson, Nagata, Tsuji, 1989], и значительно позже была клонирована люцифераза *Cypridina noctiluca* [Nakajima и др., 2004]. Сравнение их аминокислотных последовательностей показало очень высокую степень гомологии этих люцифераз между собой (около 84%), но не выявило сколь-нибудь значимой гомологии при сравнении с другими известными на данный момент люциферазами. Тем удивительнее тот факт, что активность люциферазы *Cypridina noctiluca* гораздо выше, чем у *Cypridina hilgendorffii* [Nakajima и др., 2004]. Люциферазы *Cypridina* (CLuc) – это секретлируемые белки с молекулярной массой около 62 кДа, что делает их одними из самых больших известных люцифераз. Спектр биOLUMИнесценции *Cypridina* зависит от ионной силы раствора, в котором проходит реакция, и практически не зависит от его pH. Максимум биOLUMИнесценции лежит в пределах 448-463 нм. Отдельно стоит отметить, что квантовый выход реакции, катализируемой CLuc, – один из самых высоких среди всех известных люцифераз [Shimomura, Johnson, 1970]. Примечательно, что биOLUMИнесцентная реакция, катализируемая CLuc, сильно ингибируется добавлением этилендиаминтетраацетата натрия, что, по-видимому, связано с вовлеченностью в процесс ионов двухвалентных металлов, таких как кальций и магний. Однако никаких структурных мотивов, ответственных за связывание ионов кальция, не было обнаружено в аминокислотных последовательностях люцифераз *Cypridina*. Также



важно отметить тот факт, что наличие в их структуре большого числа дисульфидных связей (16 штук) делает практически невозможной экспрессию их генов в прокариотических экспрессионных системах.

Люциферазы *Cypridina* пока не нашли такого широкого применения в биотехнологии как, к примеру, люцифераза светлячка, но тем не менее различные группы ученых создают новые биомедицинские инструменты и приложения на их основе. Так, на основе люциферазы *C. hilgendorfi* были разработаны методы анализа по репортёрным генам [Nishide и др., 2006; Thompson, Nagata, Tsuji, 1990; Ura и др., 2001], так же данная люцифераза используется в качестве репортера в химерных конструкциях для биоимиджинга и иммунологических исследований [Maeda и др., 1996; Miesenböck, Rothman, 1997; Wu и др., 2007, 2009a]. На основе люциферазы *C. noctiluca* также разработаны различные методики [Yamada и др., 2013; Yamagishi, Enomoto, Ohmiya, 2006], а также созданы BRET-пары с HyLite Fluor™ [Wu и др., 2009b] и квантовыми точками [Wu и др., 2011]. Более подробно применение люцифераз *Cypridina* описано в обзоре [Kaskova, Tsarkova, Yampolsky, 2016].

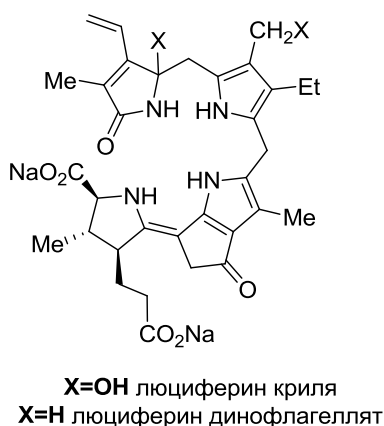
## 1.5 Люциферазы биолюминесцентных систем динофитовых водорослей (динофлагеллят)

Динофитовые водоросли (динофлагелляты) – большая группа простейших, играющих огромную роль в морских и пресноводных экологических системах [Gómez, 2012]. Именно они играют ключевую роль в так называемом вредоносном цветении водорослей, оно же красный прилив [Hallegraeff, 1993]. Однако гораздо больше они известны благодаря явлению, часто ошибочно называемому «фосфоресценцией морского прибоя». Динофлагелляты - это наиболее представительная группа биолюминесцентных организмов, наряду со светлячками [Haddock, Moline, Case, 2010]. На данный момент известно около трех с половиной тысяч видов динофитовых водорослей, для шестидесяти восьми из которых показано наличие биолюминесценции [Marcinko и др., 2013]. Исследования биолюминесцентной системы динофлагеллят начались в середине 20-го века с работы [Hastings, Sweeney, 1957]. Для экологов, изучающих морские экосистемы, биолюминесценция динофлагеллят является важным источником информации о загрязненности воды и состоянии экосистемы конкретного участка морской акватории [Camacho и др., 2007; Stauber и др., 2008; Tortorec Le и др., 2014].

Биолюминесценция динофлагеллят имеет сложную систему регуляции. Так, у некоторых динофлагеллят, к примеру, у *Gonyaulax polyedra*, внутри клеток есть специальные органеллы - сцинтиллионы, отвечающие за свечение организма в ответ на механическую или электрическую стимуляцию [Fogel, Schmitter, Hastings, 1972; Nicolas и др., 1987]. Регуляция осуществляется путем изменения pH внутри органеллы с 6.0 до 8.0 и наоборот. Биолюминесцентная система фотосинтезирующих динофлагеллят, за исключением группы *Pyrocystis*, состоит из люциферина, люциферазы и люциферин-связывающего белка [Fuller, Kreiss, Seliger, 1972; Henry, Hastings, 1974; Li, Hastings, 1998; Liu, Wilson, Hastings, 2004]. Люциферин-связывающий белок имеет сильное сродство к люциферину и защищает последний от спонтанного окисления кислородом; причем у *G. polyedra* при pH реакционной смеси выше 8.0 он связывает люциферин настолько сильно, что делает его недоступным для люциферазы, однако закисление раствора высвобождает люциферин и делает его снова доступным для реакции [Krieger, Njus, Hastings, 1974]. В биолюминесцентной системе *Pyrocystis lunula*, было показано отсутствие люциферин-связывающего белка [Knaust и др., 1998; Schmitter и др., 1976].

В большинстве известных биолюминесцентных систем возбужденный оксилюциферин является источником излучения света, однако у динофлагеллят

оксилюциферин не обладает флуоресценцией, в отличие от люциферина, флуоресценция которого имеет максимум 474 нм, что совпадает с максимумом биолюминесценции [Dunlap, Hastings, 1981; Nakamura и др., 1989]. Таким образом, несмотря на то, что химическая структура люциферина динофлагеллят была открыта в 1989 году [Nakamura и др., 1989] (Рисунок 10), вопрос о детальном механизме биолюминесцентной реакции остается открытым до сих пор [Valiadi, Iglesias-Rodriguez, 2013]. Также известно, что люциферин *Pyrocystis lunula* способен вступать в реакцию с люциферазами других видов динофлагеллят и, кроме того, с люциферазами рачков крыля (*Euphasia superba*), что позволяет сделать предположения о схожести люциферинов динофлагеллят и крыля, а также о том, что, по-видимому, биолюминесцентные системы всех динофлагеллят используют один и тот же люциферин [Hamman, Seliger, 1972; Schmitter и др., 1976]. На данный момент клонировано несколько люцифераз динофлагеллят (Таблица 5).



**Рисунок 10.** Структуры люциферинов динофлагеллят и рачков крыля.

Вид динофлагеллят	Максимум излучения $\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
<i>Gonyaulax polyedra</i> ( <i>Lingudolium polyedrum</i> )	475	[Bae, Hastings, 1994]
<i>Pyrocystis lunula</i>	474	[Okamoto и др., 2001]
<i>Noctiluca scintillians</i>		[Liu, Hastings, 2007]
<i>Alexandrium affine</i>		[Liu, Wilson, Hastings, 2004]
<i>Alexandrium tamarense</i>		[Liu, Wilson, Hastings, 2004]
<i>Pyrocystis fusiformis</i>		[Liu, Wilson, Hastings, 2004]
<i>Pyrocystis noctiluca</i>		[Liu, Wilson, Hastings, 2004]
<i>Protoceratium reticulatum</i>		[Liu, Wilson, Hastings, 2004]

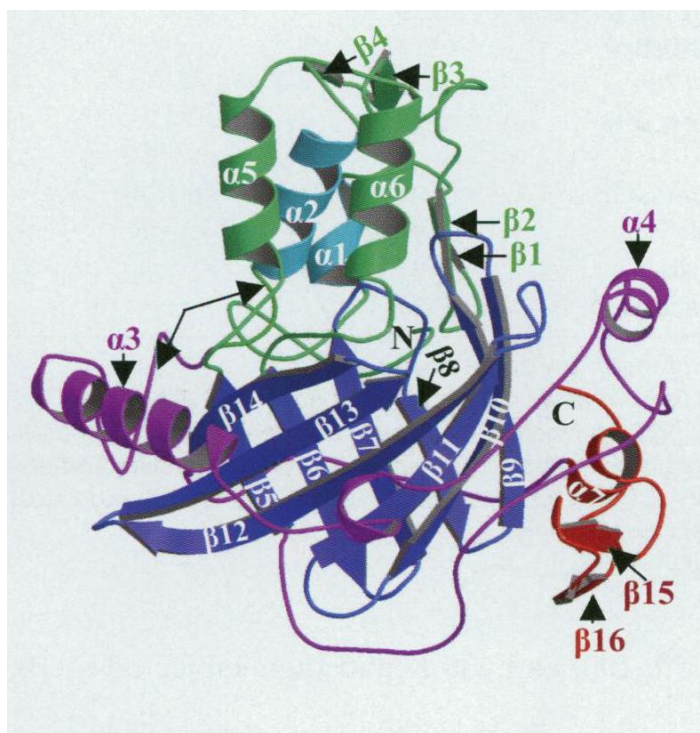
**Таблица 5.** Виды динофлагеллят, для которых на настоящее время известны генетические последовательности люцифераз.

### 1.5.1 Люцифераза *Gonyaulax polyedra* (сейчас *Lingulodinium polyedrum*)

Еще на ранних стадиях изучения биолюминесцентной системы динофлагеллят было показано, что свечение организмов может быть связано с циркадными ритмами. Впоследствии было показано, что уровень экспрессии люциферазы, люциферин-связывающего белка и количество сцинтилонов у *Gonyaulax polyedra* (ныне *Lingulodinium polyedrum*) находятся под контролем так называемых циркадных часов [Hastings, 2007; Mittag, Li, Hastings, 1998; Morse и др., 1989]. Первые данные о биолюминесцентной системе динофлагеллят, а также первые частично очищенные препараты люциферина и люциферазы были получены из *G. polyedra* во второй половине двадцатого века [Bode, Hastings, 1963; Dunlap, Hastings, 1981; Hastings, Sweeney, 1957]. Из того же вида была выделена, охарактеризована и клонирована первая люцифераза динофлагеллят [Bae, Hastings, 1994; Woodland Hastings, Dunlap, 1986]. Это белок с молекулярной массой 130 кДа, состоящий из трех гомологичных, но не одинаковых доменов, каждый из которых обладает люциферазной активностью [Li, Hong, Hastings, 1997; Schultz и др., 2005]. Ферменты с несколькими активными центрами в одной молекуле – довольно редкое явление. Примечательно также, что гомология аминокислотных последовательностей доменов разных люцифераз динофлагеллят между собой выше, чем у разных доменов одного полипептида [Liu, Wilson, Hastings, 2004]. И полноразмерная люцифераза *G. Polyedra*, и каждый из ее доменов в отдельности имеют рН-оптимум биолюминесцентной реакции около 6.3 и практически полностью теряют активность при повышении рН реакционной смеси уже до 8.0. Наличие сцинтилонов и рН-зависимой системы регуляции биолюминесценции у *G. polyedra* является причиной рН-чувствительности люциферазы этого вида.

В 2005 году был получен кристалл и установлена пространственная структура третьего домена люциферазы *G. polyedra* [Schultz и др., 2005]. Структурно он состоит из двух основных частей (Рисунок 11):  $\beta$ -бочонка, ответственного за связывание субстрата и катализ реакции люминесценции, и регуляторной части, состоящей в свою очередь из трех  $\alpha$ -спиралей.  $\beta$ -бочонок образует «карман» для связывания люциферина с системой водородных связей, в которую вовлечены различные, в первую очередь заряженные, аминокислотные остатки и молекулы воды. Регуляторная часть содержит, как уже говорилось, три  $\alpha$ -спирали, образующих «дверцу» перед входом в активный центр, доступ к которому регулируется при помощи изменения рН. В N-концевом регионе регуляторной части находятся четыре остатка гистидина, играющие ключевую роль в рН-зависимой регуляции работы люциферазы. Их замена на аланины приводит к появлению активности

у мутантной формы люциферазы при рН реакционной смеси 8.0 [Li и др., 2001]. Изменение заряда этих аминокислотных остатков гистидина при изменении рН реакционной смеси приводит к значительным внутримолекулярным перестройкам и движениям регуляторного домена, что в свою очередь либо открывает, либо закрывает доступ для люциферина в активный центр фермента [Schultz и др., 2005].



**Рисунок 11.** Пространственная структура третьего домена молекулы люциферазы *Gonyaulax polyedra* [Schultz и др., 2005].

Сравнение аминокислотной последовательности люциферазы *G. polyedra* с другими известными люциферазами выявило сходство лишь с люциферазами динофлагеллят [Liu, Wilson, Hastings, 2004]. Само по себе это не так уж и удивительно, учитывая тот факт, что за исключением процесса окисления субстрата кислородом, биохимические реакции, катализируемые люциферазами неродственных друг другу видов организмов, разные [Wilson, Hastings, 1998]. Эти факты в очередной раз говорят в пользу гипотезы о независимом происхождении биolumинесцентных систем различных групп организмов в ходе эволюции [Hastings, 1983].

### 1.5.2 Люцифераза *Pyrocystis lunula*

Люцифераза *Pyrocystis lunula* была клонирована в 2001 году [Okamoto и др., 2001]. Она имеет такую же трехдоменную структуру, что и люцифераза *G. polyedra*, где домены кодируются генами *lcfA*, *lcfB* и *lcfC*. Анализ аминокислотных последовательностей генов *lcfA*, *lcfB* и *lcfC* и их сравнение с последовательностью гена люциферазы *G. polyedra* показало высокую степень гомологии между ними. Это сходство отражает и схожесть структурной организации этих люцифераз. Люцифераза *P. lunula* представляет собой полипептид с молекулярной массой 145 кДа, состоящий из трех доменов, каждый из которых обладает люциферазной активностью [Okamoto и др., 2001]. Как уже упоминалось выше, в биoluminesцентной системе *P. lunula* люциферин-связывающий белок не был обнаружен. Этот факт, вместе с тем обстоятельством, что содержание люциферазы и люциферина в клетках *P. lunula* не зависит от времени суток [Colerico и др., 1993; Knaust и др., 1998], говорит о том, что циркадная регуляция биoluminesценции у этого организма осуществляется при помощи изменения внутриклеточной локализации компонентов люминесцентной системы, в отличие от *G. polyedra*. [Seo, Fritz, 2001; Widder, Case, 1982]. Это, в свою очередь, говорит об отсутствии необходимости в pH-чувствительности данного фермента.

В целом же, биохимические свойства люциферазы *P. lunula* схожи с таковыми *G. polyedra*. Рекомбинантный белок, представляющий из себя третий домен люциферазы *Pyrocystis lunula*, был клонирован в 2002 году [Morishita и др., 2002]. Этот рекомбинантный белок катализирует реакцию с максимумом биoluminesценции 474 нм, и его активность снижается при повышении pH реакционной смеси до 8.0.

Практическое применение люциферазы *P. lunula* и динофлагеллят в целом пока развито очень слабо. Это следствие того, что сама биoluminesцентная система этих организмов изучена недостаточно хорошо. Все же некоторые примеры применения активных доменов этих люцифераз в различных методиках существуют [Kato и др., 2011; Li и др., 2010; Suzuki и др., 2005].

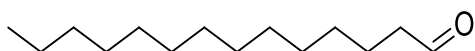
### 1.5.3 Люцифераза *Noctiluca scintillians*

*Noctiluca scintillians* - нефотосинтезирующий вид динофлагеллят, который, согласно анализу, выполненному по 18S рибосомальной ДНК, является более примитивным в эволюционном плане, чем другие виды, для которых известны последовательности

люцифераз [Edwardsen и др., 2003]. Люцифераза *Noctiluca scintillians* была клонирована в 2006 году [Liu, Hastings, 2007]. Структурная организация молекулы этой люциферазы существенно отличается от таковой других известных люцифераз динофлагеллят и не имеет обычной для них трехдоменной структуры. Люцифераза *N. scintillians* представляет собой полипептид с молекулярной массой около 100 кДа, содержащий в своем составе два структурных домена. N-концевой домен отвечает за биолюминесцентную функцию. Его аминокислотная последовательность гомологична последовательности индивидуального каталитического домена других люцифераз динофлагеллят, хотя и немного короче. Аминокислотная последовательность С-концевого домена гомологична последовательности люциферин-связывающего белка *G. polyedra*. Таким образом, белки, являющиеся двумя различными белками для одного вида динофлагеллят, объединены в один полипептид у другого. Также люцифераза *N. scintillians* имеет только один из четырех гистидинов, отвечающих за регуляцию рН у люциферазы *G. polyedra*. В экспериментах было показано слабое влияние рН реакционной смеси, в пределах от 6 до 8, на биолюминесценцию рекомбинантной люциферазы *N. scintillians* [Liu, Hastings, 2007].

## 1.6 Билюминесцентная система бактерий

Способность бактерий излучать свет была показана Харви в середине двадцатого века [Harvey, 1952]. В результате дальнейших исследований было установлено, что для билюминесценции бактерий необходим ряд факторов, а именно: ФМН-Н<sub>2</sub>, растворимые алифатические альдегиды, люцифераза и кислород [Cormier, Strehler, 1953; Strehler, Cormier, 1953, 1954]. Впоследствии ряд опытов показал, что альдегид, судя по всему, является люциферинном в данной реакции [McElroy, Green, 1955]. Примечательно, что при этом бактериальный люциферин – миристиновый альдегид (Рисунок 12) – окисляется в процессе реакции, но не является истинным источником света, им является гидроксифлавин. Миристиновый альдегид является люциферинном бактерий *in vivo*, однако *in vitro* реакция идет и в присутствии некоторых других алифатических альдегидов [Ulitzur, Hastings, 1979]. Многие научные коллективы изучали механизм люминесцентной реакции бактерий, и в результате была предложена схема реакции, считающаяся верной до сих пор, поскольку большинство ее стадий подтверждено экспериментально (Рисунок 13) [Balny, Hastings, 1975; Duane, Hastings, 1975; Vervoort и др., 1986; Watanabe и др., 1975; Ghisla и др., 1977; Hastings и др., 1973; Kurfuerst и др., 1987; Lee, O’Kane, Gibson, 1988; Lei, Ding, Tu, 2004; Macheroux, Ghisla, Hastings, 1993; Puget, Michelson, 1972; Tu, 1979].



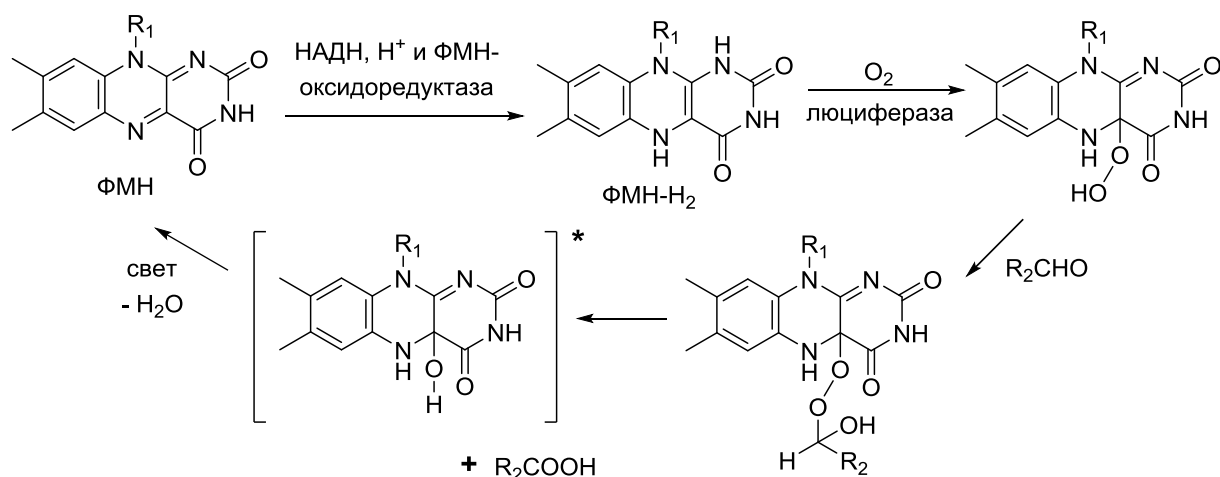
**Рисунок 12.** Люциферин бактерий, миристиновый альдегид.

Было показано, что в лабораторных условиях максимум эмиссии билюминесценции лежит в пределах 472-505 нм [Seliger, Morton, 1968]. Однако, одна из линий бактерий *P. fischery* Y-1 имеет максимум эмиссии 545нм [Ruby, Nealsen, 1977]. Последующие эксперименты показали, что очищенная люцифераза из этих бактерий катализирует реакцию с максимумом эмиссии 490нм. Было сделано предположение, что разница в максимуме эмиссии билюминесцентной реакции *in vivo* и *in vitro*, скорее всего, объясняется ферстеровским резонансным переносом энергии с гидроксифлавина на флуоресцентный белок.

И действительно, впоследствии были открыты, выделены и охарактеризованы YFP - желтые флуоресцентные белки, содержащие ФМН или рибофлавин в качестве хромофора, и сдвигающие максимум эмиссии билюминесценции в длинноволновую область спектра



(от максимума люминесценции 490 нм до 534 нм) [Daubner и др., 1987; Macheroux и др., 1987; Petushkov, Gibson, Lee, 1995]. Также были обнаружены белки LumPs - синие флуоресцентные белки с хромофором люмазинового типа, сдвигающие максимум излучения биолюминесценции в коротковолновую область (от максимума люминесценции 490 нм до 476 нм, сопровождающегося значительным увеличением яркости излучения) спектра [Gast, Lee, 1978; Koka, Lee, 1979; O'Kane, Karle, Lee, 1985].



**Рисунок 13.** Механизм бактериальной биолюминесценции.

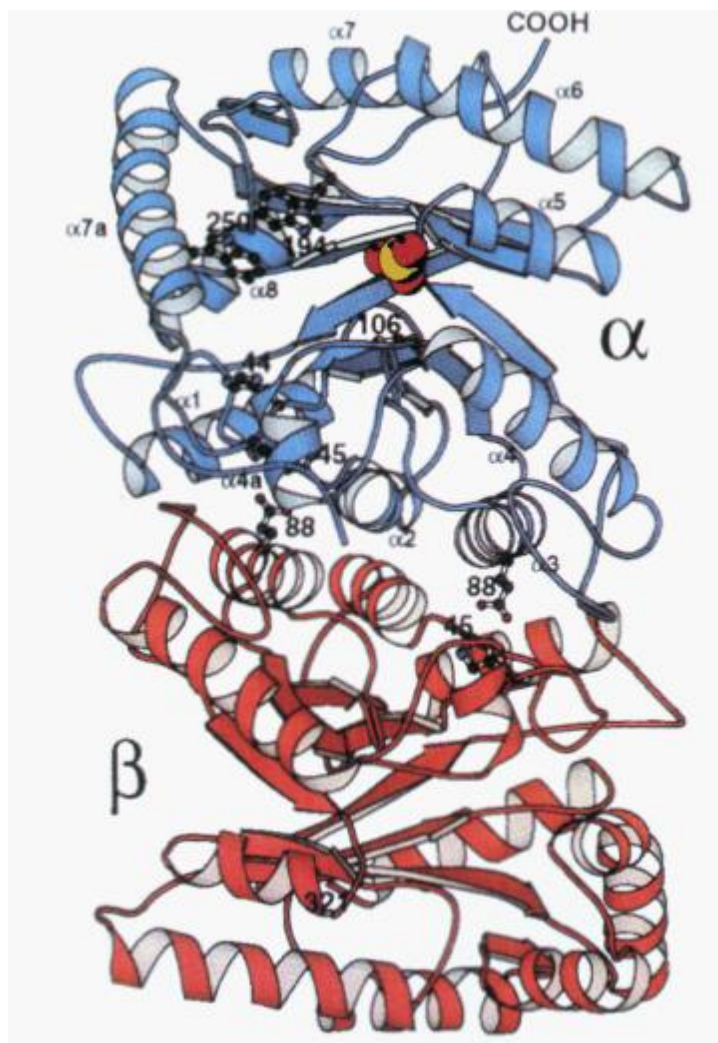
Число публикаций, так или иначе освещающих биолюминесцентную систему бактерий и их люциферазы, настолько велико, что охватить их в рамках одного обзора не представляется возможным, поэтому автор остановится лишь на самых важных из них. Подробнее об истории открытия и изучения биолюминесцентной системы бактерий можно прочитать у [Shimomura, 2006].

### 1.6.1 Люциферазы бактерий

Наиболее изученными являются биолюминесцентные системы бактерий *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* и *Photobacterium leiognathi* [Marquette, Blum, 2010]. Анализ показал отсутствие какого-либо эволюционного родства бактериальных люцифераз с другими известными люциферазами [Baldwin, Ziegler, 1992]. Все известные на данный момент люциферазы бактерий имеют схожее строение. Это гетеродимерный комплекс, состоящий из двух субъединиц – α-

субъединицы, массой около 40 кДа, и  $\beta$ -субъединицы, массой около 35 кДа [Friedland, Hastings, 1967]. Каждая субъединица люциферазы кодируется отдельным геном – *luxA* и *luxB*, соответственно. Эти гены впервые были клонированы в конце двадцатого века [Cohn и др., 1985; Haygood, Cohn, 1986; Johnston, Thompson, Baldwin, 1986; Meighen, 1991; Tu, Mager, 1995]. По отдельности субъединицы практически не обладают люциферазной активностью и простое смешивание растворов, содержащих каждую субъединицу в отдельности, активность не восстанавливает [Sinclair и др., 1993]. Однако, при совместной ренатурации рекомбинантных полипептидов обеих субъединиц активность восстанавливается [Baldwin и др., 1993]. Также было показано, что активный центр фермента, вероятнее всего, находится на  $\alpha$ -субъединице [Cline, Hastings, 1972].

Для люциферазы из *V. harveyi* был получен кристалл и расшифрована ее пространственная структура (Рисунок 14) [Fisher и др., 1995; Swanson и др., 1985]. Обе субъединицы имеют схожее строение. Каждая из них имеет один домен, содержащий мотив  $\beta/\alpha$  бочонка. Участок полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы от фенилаланина 272 до треонина 288 образует подвижную петлю, которая меняет конформацию при присоединении ФМН-Н<sub>2</sub> и защищает последний от посторонних взаимодействий [AbouKhair, Ziegler, Baldwin, 1985]. Интересно, что в бактериальной люциферазе отсутствует один из доменов, характерный практически для всех флавин-связывающих ферментов с подобной структурой  $\beta/\alpha$  бочонка, что объясняет, почему данный фермент использует ФМН-Н<sub>2</sub> в качестве субстрата, а не простетической группы, в отличие от других люцифераз [Wilmanns и др., 1991]. Также была показана критическая важность консервативных аминокислотных остатков гистидина 44, аспарагиновой кислоты 113 и аргинина 107 в  $\alpha$ -субъединице для связывания ФМН-Н<sub>2</sub> с ферментом и высокого квантового выхода реакции [Cline, Hastings, 1972; Fisher и др., 1995].



**Рисунок 14.** Структура бактериальной люциферазы *V. harveyi* [Fisher и др., 1995].

Люциферазы бактерий *P. phosphoreum* и *V. fischeri* проявляют активность в диапазоне pH реакционной смеси от 6.0 до 8.0 [Hastings, Baldwin, Nicoli, 1978; Nakamura, Matsuda, 1971]. Однако, свойства люцифераз бактерий различаются в зависимости от того, из какого организма они клонированы. Биохимические свойства бактериальных люцифераз могут быть существенно улучшены с помощью получения мутантных форм этих ферментов методами молекулярной биологии. В качестве примера рассмотрим термостабильность – одно из самых важных свойств ферментов для биотехнологии. Люцифераза *V. fischeri* стабильно работает при 30°C, однако ее активность падает практически до нуля при нагревании до 37°C [Friedland, Hastings, 1967]. Люцифераза *V. Harveyi*, напротив, имеет температурный оптимум работы около 37°C; а люцифераза из *P. luminescens* используется наиболее активно на сегодняшний день, поскольку она остается

стабильной при более высоких температурах, чем остальные, – вплоть до 42°C [Szittner, Meighen, 1990].

Главное достоинство биолюминесцентной системы бактерий по сравнению со всеми другими известными системами – это возможность полностью закодировать ее с помощью *lux* оперона. Оперон *luxCDABE* кодирует люциферазу (*lux A* и *luxB*) и белки (редуктазу, трансферазу и синтетазу) для синтеза самого субстрата (*luxCDE*) [Hamorsky и др., 2010]. На данный момент известны структуры множества *lux* оперонов (Таблица 6), и каждый из них может быть легко использован в биотехнологии.

Вид бактерии	Источник
<i>Aliivibrio fischeri</i>	[Engebrecht, Nealson, Silverman, 1983; Engebrecht, Silverman, 1984; Schaefer и др., 1996; Stevens, Dolan, Greenberg, 1994; Stevens, Greenberg, 1997]
<i>Aliivibrio logei</i>	[Khrulnova и др., 2010; Manukhov и др., 2011; Salykhova и др., 2016]
<i>Aliivibrio salmonicida</i>	[Manukhov и др., 2011; Nelson и др., 2007]
<i>Shewanella hanedai</i>	[Dunlap, 2014]
<i>Shewanella woodyi</i>	[Dunlap, 2014]
<i>Photobacterium aquimaris</i>	[Dunlap, 2014; Urbanczyk и др., 2012]
<i>Photobacterium kishitanii</i>	[Dunlap, 2014; Sato и др., 2010]
<i>Photobacterium leiognathi</i>	[DeLong и др., 1987; Dunlap, 2014; Illarionov и др., 1990; Raibekas, 1991]
<i>Photobacterium mandapamensis</i>	[Dunlap, 2014; Wada и др., 2006]
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	[Dunlap, 2014; Mancini и др., 1988; Prasher и др., 1990]
<i>Vibrio harveyi</i>	[Belas и др., 1982; Cohn и др., 1985; Johnston, Thompson, Baldwin, 1986; Miyamoto и др., 1985, 1988; Miyamoto, Graham, Meighen, 1988; Schmetterer, Wolk, Elhai, 1986]
<i>Vibrio cholerae</i>	[Dunlap, 2014; Grim и др., 2008; Kasai, 2006]
<i>Photodesmus katoptron</i>	[Dunlap, 2014]
<i>Photodesmus blepharon</i>	[Dunlap, 2014]
<i>Photorhabdus luminescens</i>	[Dunlap, 2014; Manukhov и др., 2000]

**Таблица 6.** Виды бактерий, для которых известны последовательности всех генов *lux* оперона.

Однако, несмотря на то, что гены были оптимизированы и для экспрессии в эукариотических клетках [Gupta и др., 2003], и, в частности, для клеток млекопитающих [Patterson и др., 2005], в основном *lux* оперон применяется в бактериальных клетках для создания биосенсоров (как ген-репортер), исследования развития бактериальных

заболеваний и экотоксических исследованиях. Так, свойство биолюминесценции с помощью *lux* оперона было успешно приобретено клетками *E. coli* [Demidova и др., 2005; Rocchetta и др., 2001], *C. rodentium* [Wiles и др., 2006], *P. aeruginosa* [Mulcahy и др., 2008; Riedel и др., 2007b], *S. typhimurium* [Contag и др., 1995; Riedel и др., 2007b], *L. monocytogenes* [Bron и др., 2006; Hardy и др., 2004; Riedel и др., 2007a], *S. aureus* [Francis и др., 2000; Qazi и др., 2001], *S. pneumoniae* [Francis и др., 2001], *S. pyogenes* [Park и др., 2003]. Примечательно, что удалось получить биолюминесцентные виды анаэробных бактерий *C. perfringens* и *B. breve*, свечение которых детектируется в кишечнике подопытных животных, в условиях крайне низкого содержания кислорода [Cronin и др., 2008; Phillips-Jones, 1993; Sleator и др., 2009; Wiles и др., 2006]. Более подробно применение бактериальной биолюминесцентной системы в биотехнологии описано в обзорах [Close и др., 2012; Gahan, 2012].

## **ГЛАВА II. Материалы и методы**

### **2.1 Методы генной инженерии**

#### **2.1.1 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий**

Для выделения плазмидной ДНК из клеток бактерий, часть отобранной колонии, содержащей рекомбинантную плазмиду, переносили из чашки Петри в пластиковую пробирку объемом 15 мл, содержащую 5-7 мл среды LB с селективным антибиотиком и инкубировали при 37°C в течение 12-36 ч при интенсивном перемешивании в термостатируемом шейкере. Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием коммерческого набора для выделения ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

#### **2.1.2 Экстракция ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения**

Экстракцию ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения проводили с помощью коммерческого набора Cleanup Standart (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

#### **2.1.3 Секвенирование ДНК**

Секвенирование фрагментов ДНК по методу Сенгера выполнялось компанией Евроген (Россия).

#### **2.1.4 Реакции рестрикции и лигирования**

Реакции рестрикции и лигирования проводились по стандартным протоколам, рекомендованным производителем используемых ферментов.

### 2.1.5 Амплификация ДНК

При клонированиях для амплификации ДНК и для тестирования полученных конструкций (скрининга) применяли стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием Encyclo PCR Kit и Taq PCR Kit (Евроген, Россия). Амплификацию проводили с помощью прибора PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, США). Синтез олигонуклеотидов, использованных для амплификации ДНК, заказывали в компании Евроген.

## 2.2 Методы работы с клетками дрожжей

### 2.2.1 Создание вектора для клонирования библиотеки кДНК из гриба *Neonothopanus nambi* в клетки дрожжей *Pichia pastoris*

Для клонирования и экспрессии библиотеки кДНК из гриба *Neonothopanus nambi* в клетках дрожжей *Pichia pastoris*, был сконструирован вектор GAP-pPic9K. Он был создан на базе вектора pPic9K (Invitrogen, США) с помощью замены последовательностей индуцибельного промотора алкоголь оксидазы (АОХ1) и сигнальной последовательности альфа фактора на последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP) дрожжей *P. pastoris*. Последовательность GAP промотора была получена из вектора pGAPZA (Invitrogen, США) при помощи реакции рестрикции по сайтам *BglII*, обработки фрагментом Кленова, и последующей реакции рестрикции по сайтам *EcoRI*. pPic9K был обработан рестриктазой *AatII*, «затуплен» фрагментом Кленова, затем обработан рестриктазой *EcoRI*, и был использован, как основа для клонирования в него последовательности GAP промотора. Уникальные сайты рестрикции *BamHI*, *Eco53kI*, *SacI* были введены в созданный вектор при помощи ПЦР с использованием праймеров 1 и 2 (Приложение 1) и клонированы по сайтам рестрикции *EcoRI* и *NotI*.

### 2.2.2 Клонирование библиотеки кДНК из гриба *N. nambi* в клетки дрожжей *P. pastoris* и идентификация гена люциферазы грибов

Общая РНК из мицелия *N. nambi* была выделена согласно протоколу [Chomzynski, Sacchi, 1987]. Библиотека кДНК была создана с помощью SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, США). Амплифицированная кДНК была клонирована в вектор GAP-pPic9K

по сайтам рестрикции *BamHI* и *NotI*. Полученная библиотека плазмид с кДНК была линейаризована с помощью эндонуклеазы рестрикции *AvrII* и использована для трансформации методом электропорации клеток *P. pastoris*. Десять параллельных трансформаций было проведено с использованием 1 мкг ДНК в каждой по протоколу, изложенному в [Wu, Letchworth, 2004]. Трансформированные клетки были рассеяны на 40 чашек, содержащих среду RDB (1 М сорбитол, 2% (w/v) глюкоза, 1.34% (w/v) дрожжевая основа азотного агара (YNB), 0.005% (w/v) незаменимые аминокислоты, 0.00004% (w/v) биотин, 2% (w/v) агар). Представленность полученной библиотеки кДНК составила приблизительно 1 млн клонов. Каждую чашку с трансформантами опрыскивали раствором люциферина грибов (6.5 мкг/мл) и детектировали биолюминесценцию с помощью прибора IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США). Геномная ДНК была выделена из обладающих люминесценцией клонов согласно протоколу, описанному в [Lõoke, Kristjuhan, Kristjuhan, 2011], амплифицирована с помощью праймеров 3 и 4 (Приложение 1) и секвенирована по Сенгеру. Согласно данным секвенирования, все обладающие люминесценцией клоны содержали одну и ту же последовательность ДНК, соответствующую последовательности гена люциферазы грибов.

### **2.2.3 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках дрожжей *P. pastoris***

Ген люциферазы амплифицировали с помощью ген-специфичных концевых праймеров 5 и 6 (Приложение 1) и клонировали в экспрессионный вектор pGAPZA (Invitrogen, США) с использованием сайтов рестрикции эндонуклеаз *BstBI* и *Sall*, в одну рамку считывания с последовательностью, кодирующей С-концевую гистидиновую метку. Клетки были *P. pastoris* трансформированы полученной плазмидой по протоколу, описанному в [Wu, Letchworth, 2004]. Трансформированные клетки рассеивали на чашки Петри, содержащие среду YPD (2% (w/v) пептона, 1% (w/v) дрожжевого экстракта, 2% (w/v) глюкозы, 2% (w/v) агара) и антибиотик зеоцин в концентрации 100 мкг/мл. Клоны *P. pastoris*, содержащие люциферазу, были идентифицированы с помощью опрыскивания колоний раствором люциферина грибов (6.5 мкг/мл). Люминесценция детектировалась приборами IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США), а так же гель-документирующей системой Vilber Lourmat Fusion (Vilber Lourmat, Франция). Самые яркие клоны изолировали и растили в колбах объемом 750 мл, заполненных 250 мл среды YPD, в течение 72 ч при температуре 30°C и перемешивании со скоростью 200 об/мин. Затем



клетки, экспрессирующие ген люциферазы, осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, США), 5000 g в течение 15 мин при 4°C. Полученную массу клеток использовали для получения микросомальной фракции, содержащей люциферазу.

#### **2.2.4 Выделение микросомальной фракции из дрожжей *P. pastoris***

Клетки были ресуспендировали в 100 мл лизирующего буфера (100 mM Na-фосфатный буфер, 100 mM KCl, 4 mM ЭДТА, 2 mM TCEP, 1 mM PMSF, pH 7.4) и разрушали пропусканием через гомогенизатор высокого давления APV2000 SPX (SPX FLOW, США) в течение 20 раз при давлении в 600 бар. Лизат центрифугировали на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, США), 5000 g в течение 15 мин при температуре 4°C. Полученный пост-ядерный супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге Beckman L8-M (Beckman, США), ротор Ti50.2, при 140 000 g в течение 1 ч при температуре 4°C. Полученный осадок (микросомальная фракция), содержащий люциферазу, ресуспендировали в 10 мл дистиллированной воды, аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C.

#### **2.2.5 Трансформация клеток *P. pastoris* методом электропорации**

Электропорацию клеток *P. pastoris* осуществляли по методу, описанному в [Wu, Letchworth, 2004], с использованием ацетата лития и дитиотреитола.

### **2.3 Методы работы с бактериями**

#### **2.3.1 Трансформация клеток *Escherichia coli* методом электропорации**

Компетентные клетки готовили по следующему протоколу. Свежую ночную культуру клеток *E.coli* штамма XL1Blue, выращенную на жидкой среде LB, разбавляли свежей средой в соотношении 1 к 100 и инкубировали до достижения при 37°C, до оптической плотности 0,6 ОЕ. Полученную суспензию клеток охлаждали на ледяной бане, переносили в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и подвергали короткому (8 с) центрифугированию при 12000 об/мин, 4°C в Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf, США). Все последующие центрифугирования проводили

при тех же параметрах. После центрифугирования пробирки охлаждали на льду. Клетки суспендировали в буфере RF1 (1.2% RbCl, 0.05 М  $MnCl_2 \times 4H_2O$ , 0.03 М ацетат калия, 0.01 М  $CaCl_2$ , 15% глицерин) и инкубировали на ледяной бане 15 мин. Вновь осаждали клетки центрифугированием. Супернатант отбрасывали, а клетки ресуспендировали в буфере RF2 (0.01 М MOPS-Na, 0.12% RbCl, 75 мМ  $CaCl_2$ , 15% глицерин) и инкубировали на ледяной бане 15 мин. Затем клетки расфасовывали по 40 мкл в отдельные пробирки и хранили при  $-70^\circ C$ . Для проведения процедуры электропорации фасовку компетентных клеток размораживали на льду и переносили в кюветы для электропорации с зазором 0,1 см (Eppendorf, США). К суспензии клеток добавляли 0,5 мкл трансформирующей ДНК, очищенной от солей, и подвергали электропорации на приборе MicroPulser (Bio-Rad, США). После электропорации в кювету добавляли 1 мл среды LB, клетки переносили в чистую пробирку и оставляли на 30 мин при  $37^\circ C$ , а затем рассеивали на чашки с селективной средой.

### **2.3.2 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках *E. coli***

Последовательность ДНК, кодирующая люциферазу грибов, была амплифицирована с использованием праймеров 7 и 8 (Приложение 1) и клонирована в вектор pET-23b (Novagen, США). Полученную плазмиду использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus (производного высокопроизводительного штамма Stratagene BL21-Gold). Трансформированные клетки *E. coli* высевали на чашки Петри со средой LB, содержащей 1.5% агар, ампицилин (200 мкг/мл) и хлорамфеникол (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при  $37^\circ C$ . Колонии *E. coli* затем переносили в жидкую среду LB с добавлением ампицилина (200 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл), инкубировали в течение ночи при покачивании при  $37^\circ C$ . 1 мл ночной культуры переносили в 100 мл среды LB, в которую были предварительно добавлены ампицилин и хлорамфеникол в необходимых концентрациях. Культуру растили при  $37^\circ C$  при интенсивном перемешивании до достижения оптической плотности 0,6 ОЕ при 600 нм, синтез люциферазы индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0.4 мМ, а затем растили температуре  $25^\circ C$  в течение 16 ч при интенсивном перемешивании. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4500 об/мин в течение 20 мин, при температуре  $4^\circ C$  в центрифуге Eppendorf 5810R (Eppendorf, США).

### 2.3.3 Ренатурация люциферазы грибов из телец включения

Экспрессия гена люциферазы грибов в клетках бактерий, приводила к накоплению рекомбинантного белка в нерастворимой фракции – тельцах включения. Для выделения и очистки люциферазы осадок клеток *E. coli* ресуспендировали в буфере (50 мМ Трис- HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 10 мМ меркаптоэтанол, pH 8.0). Суспензию бактериальных клеток подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин на ледяной бане с помощью дезинтегратора Sonics VibraCell (Sonics and Materials inc., США), диаметр зонда 13 мм, амплитуда 60 мкм, и подвергали центрифугированию при 10000 g в течение 20 мин. Полученный в результате центрифугирования осадок (тельца включения) растворяли в буфере А (8 М мочевины, 50 мМ Трис-HCl, 1 мМ ТСЕР, pH 8.0) в течение 12 часов при 25°C и перемешивании. После этого раствор телец включения центрифугировали 30 мин, 30000 g при 25°C, полученный супернатант наносили на колонку со смолой Ni Sepharose™ excel (GE Healthcare Bio-Science AB, США), предварительно уравновешенную буфером А. Далее колонку промывали двумя объемами буфера А, потом десятью объемами 0.5 М NaCl в буфере А, и двумя объемами буфера А, содержащего 10 мМ имидазола. Затем проводили элюцию люциферазы раствором 250 мМ имидазола в буфере А. После этого очищенная таким образом люцифераза переводилась в буфер В (10 мМ Na-ацетатный буфер, 6 М мочевины, pH 5.5) с помощью колонки PD-10 (GE Healthcare, США). Рефолдинг люциферазы *in vitro* осуществлялся путем 50-ти кратного разбавления полученного раствора буфером С (20 мМ MES-NaOH, 5% глицерин, 1 мМ DTT, pH 6.2) при 10°C. Полученный раствор люциферазы подвергали центрифугированию при 30000 g, 4°C в течение 30 мин. Люциферазу, содержащуюся в супернатанте, концентрировали при помощи ультрафильтрации на мембране 10 kDa membrane (Ultracel, Millipore) и хранили при -70°C.

### 2.3.4 Клонирование в клетки *E.coli* функциональных фрагментов люциферазы грибов

Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты люциферазы с делетированными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 и 40 аминокислотными остатками, были амплифицированы с помощью ген-специфичных концевых праймеров 9 - 20 (Приложение 1). Затем амплифицированные фрагменты клонировали в вектор pET-23 (Novagen, США) с помощью эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *HindIII*. Полученные в результате генетические конструкции использовали для трансформации бактерий.

## 2.4 Методы работы с культурами клеток млекопитающих

### 2.4.1 Клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов в клетках культур НЕК293NT, HeLa и СТ26

Ген люциферазы амплифицировали с помощью ген-специфичных концевых праймеров 21 и 22 (Приложение 1) (см. таблицу использованных в работе праймеров, Приложение 1), и клонировали в вектор pKatushka2S-C1 (Евроген, Россия), используя сайты рестрикции *NheI* и *BglIII*, вместо последовательности, кодирующий белок Katushka2S. Полученный вектор использовали для трансфекции клеток линий НЕК293NT (эмбриональной почки человека), HeLa (аденокарциномы шейки матки человека, изолят Kyoto) и СТ26 (клетки карциномы *Mus musculus*) при помощи трансфекционного реагента FuGENE HD transfection reagent (Promega, США) согласно протоколу производителя. Трансфецированные клетки культивировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде DMEM (Панэко) с 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США), 4 мМ L-глутамина, 10 Ед/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина (все - Панэко). Спустя 24 часа после трансфекции в среду добавляли раствор люциферина грибов (650 мкг/мл) и детектировали люминесценцию при помощи микроскопа Leica DM6000 microscope (Leica, Германия).

### 2.4.2 Разрушение клеток культур НЕК293NT и HeLa

Трансфецированные клетки спустя 24 ч после трансфекции смывали с чашек с помощью раствора Версена с добавлением 0.025% трипсина, меняли среду на фосфатно-солевой буфер с pH 8.0, ресуспендировали клетки, лизировали ультразвуком с помощью дезинтегратора Sonics VibraCell (Sonics and Materials inc., США), диаметр зонда 6 мм, амплитуда 40 мкм.

## 2.5 Экспрессия гена люциферазы грибов в эмбрионах *Xenopus laevis*

Инъецированные и трансгенные эмбрионы были получены в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ, рук. д. б. н. А.Г. Зарайский. Ген люциферазы грибов был клонирован в вектор pCS2+ по сайтам рестрикции *Sall* и *XhoI*. Полученную

таким образом плазмиду линейризовали с помощью эндонуклеазы рестрикции по сайту *Acc65* и использовали для получения мРНК гена люциферазы в системе *in vitro* транскрипции SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion, США). мРНК очищали с помощью набора CleanRNA Standard Kit (Евроген, Россия) и инъецировали в бластомеры, по 500 пг в каждый, на двухклеточной стадии развития эмбриона *Xenopus laevis*. В качестве контроля использовался родамин лизин декстран. Для визуализации, на стадии ранней гаструлы (стадия 10.5) в эмбрионы инъецировали раствор люциферина 660 мкг/мл в бластоцель. Свечение эмбриона детектировали во время нейруляции (стадии 16-17) при помощи микроскопа Leica DM6000 microscope (Leica, Германия).

## **2.6 Экспрессия гена люциферазы грибов в клетках СТ26, инъецированных под кожу живой мыши**

Клетки линии СТ26, содержащие ген люциферазы грибов были подкожно инъецированы в левую часть спины десятидневной самке мыши (линия BALB/c). В качестве контроля в правую часть спины были инъецированы клетки той же линии, но содержащие ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis*. Перед инъекцией мыши была дана ингаляционная анестезия смесью изофлурана с воздухом (2.5/97.5%). Спустя 10 мин после инъекции интраперинатально мыши была введена смесь растворов люциферина грибов (0.5 мг) и люциферина светлячка (0.5 мг). Люминесценция детектировалась с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США). Мыши содержались в стерильных условиях, с обычным циклом дня и ночи, получали полноценное питание и достаточно воды. Все эксперименты были проведены под контролем местного комитета по этическому обращению с лабораторными животными (РНИИМУ им. Пирогова) и согласно правилам, утвержденным EU Directive 2016/63/EU.

## **2.7 Выделение микросомальной фракции из биомассы *N. nambi***

Мицелий промывали дистиллированной водой на сетчатом капроновом фильтре (1 мм) и таблетировали биомассу, удаляя избытки воды водоструйным насосом. Полученные таким образом таблетки мицелия (10 г сырой массы) замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Затем замороженную массу мицелия *N. nambi* (10 г) перетирали в керамической ступе в жидком азоте до получения гомогенного порошка. Порошок

суспендировали в 100 мл буфера (100 мМ Na-фосфатный буфер, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ ТСЕР, 0.5 мМ PMSF, pH 7.4), содержащего ингибитор протеаз Complete™ (Roche, Швейцария). Суспензию инкубировали на льду в течение 30 мин и затем подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин на ледяной бане (дезинтегратор Sonics VibraCell (Sonics and Materials inc, США), диаметр зонда 13 мм, амплитуда 60 мкм).

Полученный лизат переносили в четыре пробирки и центрифугировали на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, США), ротор JA-20, при 7500 об/мин, 15 мин, при 4°C. Супернатант (безъядерный лизат) переносили в четыре ультрацентрифужные пробирки и ультрацентрифугировали на ультрацентрифуге Beckman L8-M (Beckman, США), ротор Ti50.2, при 35000 об/мин, 1 ч, 4°C. Полученный осадок (микросомальная фракция), содержащий люциферазу, суспендировали с помощью гомогенизатора Даунса в 5 мл раствора 1 мМ PMSF в воде, аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

## **2.8 Солюбилизация люциферазы грибов из микросомальной фракции**

Для солюбилизации люциферазы из микросомальной фракции 1 мл суспензии микросом инкубировали при перемешивании в 10 мл буфера (20 мМ Трис-SO<sub>4</sub>, 20% глицерин, 0.1 % DDM, 1 мМ ТСЕР, 1 мМ PMSF, pH 8.2 (24°C)) в течение 16 ч при 4°C. Суспензию центрифугировали на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, США), ротор JA-20, при 19000 об./мин.(40000 g), 90 мин, +4°C.

## **2.9 Хроматографические методы**

### **2.9.1 Анионообменная хроматография DEAE-Sepharose и Q-Sepharose**

При проведении ионообменной хроматографии применяли анионообменные носители DEAE-Sepharose (HiTrap DEAE HP 5мл, GE, США) и Q-Sepharose (HiTrap Q HP 5мл, GE, США). Анализ проводился на хроматографе Akta Prime (GE, США). Хроматографию проводили при 4°C. Пробу (4мл) наносили на колонку, уравновешенную буфером А (20 мМ Трис-SO<sub>4</sub> pH 8.5 (24°C), 20% глицерин, 0.02 % DDM, 0.1 мМ DTT), при скорости потока 4 мл/мин. Затем колонку промывали буфером А и элюировали

связавшиеся белки градиентом буфера В (0.5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в буфере А). Фракции, содержащие люциферазу, аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

### **2.9.2 Гель-фильтрационная хроматография**

Для гель-фильтрационной хроматографии использовали колонку Superdex200 (GE, США). Хроматографию вели в буфере (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02% DDM, pH 8.2), при 4°C. Хроматографию проводили на хроматографической системе Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Япония).

### **2.9.3 Обессоливание белка на Sephadex<sup>®</sup> G25**

Фракции, содержащие люциферазу, объединяли и наносили на колонку Sephadex<sup>®</sup> G25 medium (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную буфером (10 mM ацетат натрия, 6 M мочевины, pH 5.5), для обессоливания. Этим же буфером смывали образец и собирали высокомолекулярную фракцию.

## **2.10 Электрофоретические методы**

### **2.10.1 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях**

Белки анализировали ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях по методике описанной в [Laemmli, 1970]. Электрофорез проводили в течение 1 ч при плотности тока 37 мА/см<sup>2</sup>. После окончания электрофореза гель фиксировали раствором 3.5% хлорной кислоты в 50% этаноле в течение 10 мин, затем отмывали дистиллированной водой 10 мин, потом окрашивали 0.4% раствором Кумасси G-250, содержащим 3.5% хлорной кислоты в течение 20 мин. Избыток краски отмывали дистиллированной водой при покачивании до полного удаления фоновой окраски.

### **2.10.2 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях**

Электрофорез проводили в пластинах полиакриламидного геля (толщина 0.1 см, ширина 8.3 см, высота 6 см). Концентрирующий гель (4% акриламид, 3% бисакриламид) и

разделяющий гель (5-13% акриламид, 3% бисакриламид) полимеризовали в буфере (25 мМ Трис-НСl, 10% глицерин, рН 8.0). В качестве электродных буферов использовали растворы следующего состава: катодный буфер (12 мМ Трис-НСl, 96 мМ глицин буфер (рН 8.3), 0.02% DDM, 0.05% дезоксихолат-Na, 1 мМ тиогликолевой кислоты), анодный буфер (12 мМ Трис НСl, 96 мМ глицин буфер (рН 8.3)).

К образцам добавляли 0.05% пунцового красного и наносили в лунки. Электрофорез вели при 4°C и постоянном напряжении 50 В в течение 50 мин, затем при постоянной силе тока 5 мА в течение 2 ч.

После завершения элетрофореза гель инкубировали в 25 мл буфера (0.2 М Na-фосфатного буфера, 0.5 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% DDM рН 8.0) в течение 15 мин при 4°C. Затем буфер меняли на 3 мл раствора люциферина (15 мкМ люциферина, 0.1% DDM, 2 мМ муравьиной кислоты). Гель инкубировали в течение 3 мин и регистрировали биоллюминесценцию в гель-документирующей системе Vilber Lourmat Fusion (Vilber Lourmat, Франция).

### **2.10.3 Двумерный ПААГ электрофорез в нативных условиях**

После завершения электрофореза (первого направления) вырезали дорожку геля и инкубировали в буфере (25 мМ Трис-НСl, 10% глицерин, 0.05% SDS, рН 8.0), содержащем 0.05% пунцовый красный (буфер для образца) 15 мин при 4°C. Дорожку помещали между стеклом пластинки геля толщиной 1.5 мм, в слой буфера для образца поверх концентрирующего геля. Концентрирующий и разделяющий гели были полимеризованы так же, как для первого направления. В качестве электродных буферов использовали растворы следующего состава: катодный буфер (12 мМ Трис-НСl, 96 мМ глицин буфер (рН 8.3), 0.02% DDM, 0.05% SDS, 1мМ тиогликолевой кислоты), анодный буфер (12 мМ Трис НСl, 96 мМ глицин буфер (рН 8.3)). Электрофорез вели при 4°C и постоянном напряжении 50 В в течение 50 мин, затем при постоянной силе тока 5 мА в течение 2 ч.

Альтернативно в качестве второго направления использовали электрофорез в денатурирующих условиях с последующей окраской геля серебром.



#### 2.10.4 Окраска геля серебром

Окрашивание проводилось по методике, описанной в [Shevchenko и др., 1996]. Гель фиксировали 20 мин в растворе 50% этанола, содержащем 5% уксусной кислоты. Затем промывали 10 мин 50% этанолом и 10 мин в дистиллированной воде. После этого гель инкубировали в 0.03% растворе  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  в течение минуты, отмывали дистиллированной водой 2 мин и переносили в 0.1% раствор  $\text{AgNO}_3$  на 20 мин, при 4°C. Снова отмывали 2 мин дистиллированной водой и переносили гель в проявитель (0.014% формальдегид, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), до проявления полос. Реакцию останавливали 5% раствором уксусной кислоты.

#### 2.10.5 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле в ТАЕ - буфере (ТАЕ 50x: 2 М Трис ацетат, 0.1 М ЭДТА) при 10 В/см в течение 15 мин.

Для анализа ПЦР-продуктов и векторов использовали 1%-ный гель с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл.

#### 2.11 Вестерн блот

Белки после электрофоретического разделения в ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом влажного переноса с помощью установки Mini Trans-Blot<sup>®</sup> cell (BioRad, США). Нитроцеллюлозную мембрану смачивали метанолом и отмывали в буфере для переноса (192 мМ глицин, 25 мМ Трис-НСl, 20% этанол), затем в дистиллированной воде (5 мин при покачивании). Сборка кассеты от анода к катоду: три слоя фильтровальной бумаги, смоченной буфером для переноса, нитроцеллюлозная мембрана, ПААГ, три слоя фильтровальной бумаги, смоченной буфером для переноса. Перенос происходил в течение 60 минут при напряжении 130 В. После переноса проводили иммунодетекцию белков на мембране. Мембрану инкубировали 1 ч в 5% растворе сухого обезжиренного молока в буфере TBST (50 мМ Трис НСl, 500 мМ NaCl, 0,2% TWEEN20, pH 7,0) для ингибирования неспецифического связывания антител. Затем мембрану отмывали буфером TBST три раза по 5 мин при покачивании и инкубировали с антителами анти-HisTag, конъюгированными с пероксидазой хрена (Abcam, США) в 0,5%-ном растворе молока в TBST. Для визуализации полос

использовали набор Immobilon™ Western (Millipore, США). Сигнал регистрировали в гель-документирующей системе Vilber Lourmat Fusion (Vilber Lourmat, Франция).

## 2.12 Масс-спектрометрическое секвенирование. Метод LC-MS

Гидролиз белка в полиакриламидном геле проводили по описанной ранее методике [Shevchenko и др., 2006] с некоторыми изменениями.

Из белковой полосы или пятна окрашенного Кумасси или серебром полиакриламидного геля вырезали кусочек  $\sim 1 \times 1$  мм<sup>2</sup> и переносили в 200 мкл пробирку для ПЦР. Гель заливали 70 мкл буферного раствора 1 (50% ацетонитрил в 200 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) и инкубировали в течение 30 мин на шейкере. Супернатант отбрасывали, а гель заливали 70 мкл ацетонитрила; через 15 мин (когда гель становился матово белым) ацетонитрил отбирали и отбрасывали, а гель сушили на центрифужном испарителе SpeedVac в течение 15 мин.

Трипсин для масс-спектрометрии (Promega, США), растворенный в 50 мМ AcOH в концентрации 0,1 мкг/мкл, разводили в охлажденном на льду буферном растворе 2 (25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 10% ацетонитрил) до концентрации 0,01 мкг/мкл и добавляли 3 мкл раствора к высушенному кусочку геля. Пробирку инкубировали 90 мин на льду, а затем переносили в термостат и оставляли при 37°C на ночь. На следующее утро в пробирку добавляли 6 мкл буферного раствора 3 (50% ацетонитрил в 0,1% трифторуксусной кислоты) и инкубировали на шейкере в течение 2 ч.

Образец пептидной смеси, содержащий около 1 мкг пептидов, наносили на колонку длиной 25 см и внутренним диаметром 75 мкм, содержащую носитель Aeris Peptide XB-C16 2.6 мкм resin (Phenomenex, США). Образец наносили в буфере А (0.2% (v/v) муравьиной кислоты), элюцию осуществляли линейным градиентом буфера В (0.1% (v/v) муравьиной кислоты, 80% (v/v) ацетонитрил) от 4% до 55% в течение 2 ч, при скорости потока 350 нл/мин и температуре 40°C. Хроматография велась на приборе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с масспектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, США) через наноэлектроспрей (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные масспектрометрические данные обрабатывались оператором с помощью сервиса Mascot software (Matrix Science).

### 2.13 Метод измерения биолюминесцентной активности

Для измерения биолюминесцентной активности к образцу объемом 1-10 мкл в кювете люминометра Promega Glomax 20/20 (Promega, США) встроенным инжектором №1 добавляли 75 мкл раствора (200 мМ Na-фосфатный буфер, 0.5 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% DDM, pH 8.0), сразу после этого инжектором №2 добавляли 25 мкл водного раствора люциферина (15 мкМ люциферин, 0.1% DDM, 2 мМ муравьиной кислоты). Интенсивность светового сигнала измерялась в течение периода от 1 до 5 минут с интервалом в 1 секунду.

Для изучения pH зависимости люминесценции люциферазы грибов, 5 мкл раствора люциферазы добавляли к 100 мкл буфера с соответствующим pH и содержащим 0.1% DDM. Полученную смесь помещали в люминометр Promega Glomax 20/20 (Promega, США), сразу после этого инжектором №2 добавляли 25 мкл водного раствора люциферина (25 мкМ люциферин, 0.1% DDM, 2 мМ муравьиной кислоты).

Для изучения температурной зависимости люминесценции люциферазы грибов, 25 мкл раствора люциферазы (20 мМ MES-NaOH, 5% глицерин, 1 мМ DTT, pH 6.2) инкубировали при изучаемой температуре в течение 10 минут. Затем активность люциферазы измеряли с помощью люминометра Promega Glomax 20/20 (Promega, США). 5мкл раствора люциферазы после инкубации переносили в пробирку, содержащую 100 мкл буфера (200 мМ Na-фосфатный буфер, 0.5 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% додецилмальтозид (DDM), pH 8.0), сразу после этого инжектором №2 добавляли 25 мкл водного раствора люциферина (15 мкМ люциферин, 0.1% DDM, 2 мМ муравьиной кислоты).

### 2.14 Получение спектров люминесценции

Спектры биолюминесценции были получены с помощью спектрофотометра Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent, США). Для получения спектров биолюминесценции мицелия гриба *N. nambí*, кусочек агара содержащий гифы мицелия, площадью 1 см<sup>2</sup>, помещался в кювету для измерений в положении мицелия в сторону детектора. Непосредственно перед съемкой спектра в кювету добавляли 50 мкл водного раствора люциферина грибов (20 мкМ), так, чтобы раствор полностью смочил мицелий.

Для получения спектров люминесценции рекомбинантной люциферазы, использовалась микросомальная фракция дрожжей *P. pastoris*, содержащих люциферазу.

50 мкл микросомальной фракции добавляли в 1 мл буфера (100 мМ Na-фосфатный буфер, 0.1% DDM, pH 7.5). Непосредственно перед съемкой спектра в кювету добавляли 50 мкл водного раствора люциферина грибов (20 мкМ). Все полученные данные были скорректированы с учетом изменения кинетики люминесценции во время измерений.

## ГЛАВА III. Результаты и обсуждение

В качестве объекта исследований был выбран биолюминесцентный гриб *Neonothopanus nambi*, поскольку ранее нами был разработан протокол культивирования его мицелия, что давало нам доступ к неограниченному количеству материала для работы. Для поиска и клонирования люциферазы гриба *N. nambi* были параллельно использованы два подхода. Первый – биохимический подход: «классическое» выделение и очистка искомого белка из природной биомассы гриба с целью получения препарата люциферазы гриба *N. nambi* для проведения масс-спектрометрического секвенирования. Второй – молекулярно биологический подход: выделение РНК из биомассы мицелия для получения библиотеки кДНК, с последующим ее клонированием и анализом в клетках дрожжей с целью поиска клона, содержащего ген люциферазы.

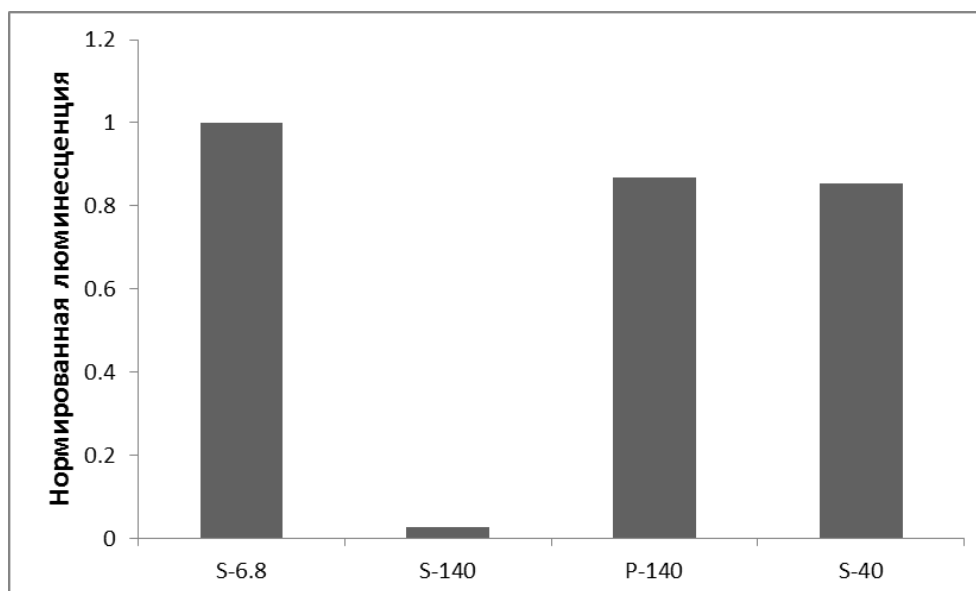
### **3.1 Получение очищенного препарата люциферазы гриба *N. nambi* для проведения масс-спектрометрического секвенирования**

Биолюминесцентную систему грибов изучают достаточно давно на примере различных видов, однако *N. nambi* является относительно новым объектом исследования, биолюминесцентная система которого ранее не изучалась, а потому требует *de novo* отработки методов работы с ним. Для определения аминокислотной последовательности люциферазы гриба *N. nambi* необходимо было получить очищенный препарат данного фермента, пригодный для проведения процедуры масс-спектрометрического исследования, позволяющей установить аминокислотную последовательность белка и, в конечном итоге, идентифицировать ген, кодирующий данную люциферазу. Для получения такого препарата необходимо было разработать ряд методов и подобрать условия для выделения и очистки искомого белка, а также разработать методику измерения биолюминесцентной активности в препаратах люциферазы. Данные работы проводились в тесном сотрудничестве с сотрудником группы синтеза природных соединений ИБХ РАН Андреем Гороховатским.

### 3.1.1 Выделение микросомальной фракции из биомассы гриба *N. nambi*

Вначале необходимо было разработать метод получения препарата неочищенной активной люциферазы из мицелия и подобрать условия хранения этого препарата, позволяющие минимизировать потери биолюминесцентной активности. По результатам наблюдений на предварительных этапах работы с мицелием гриба *N. nambi* нам стало ясно, что люминесцентная активность присуща именно клеточной фракции гриба и не является секретлируемой в среду культивации. Также было известно из литературы [Purtov и др., 2015], что предварительное вымачивание мицелия в дистиллированной воде приводит к многократному увеличению его биолюминесценции.

Основываясь на этих данных, был разработан метод получения препарата люциферазы из мицелия гриба *N. nambi*. Одной из основных проблем на данном этапе работы было то, что получение лизата биомассы грибного мицелия требует жестких методов клеточного разрушения, поскольку клеточная стенка грибов характеризуется большой прочностью. Вследствие этого была разработана методика многоступенчатого разрушения мицелия, включающая как этапы механического разрушения, так и воздействие ультразвуком. В конечном итоге была получена микросомальная фракция, содержащая биолюминесцентную активность (Рисунок 15).

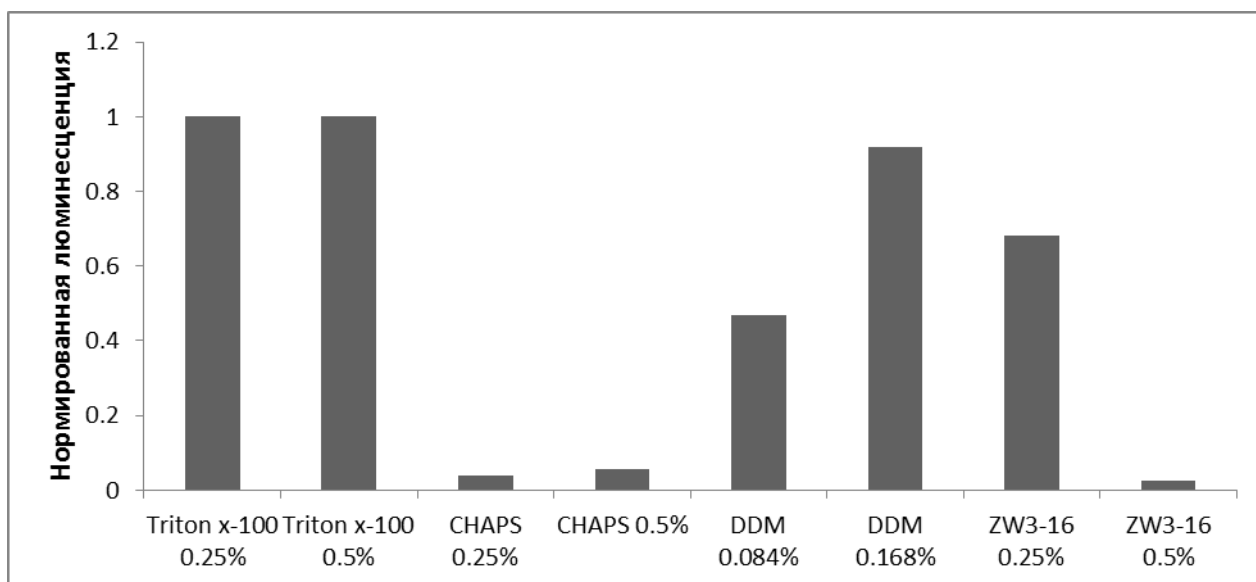


**Рисунок 15.** Биолюминесцентная активность препаратов люциферазы *N. nambi* на различных стадиях выделения из мицелия. S-6.8 - безъядерный супернатант, полученный низкоскоростным центрифугированием лизата. S-140 – супернатант после ультрацентрифугирования. P-140 - микросомальная фракция, полученная осаждением при 140000 g. S-40 – микросомы, солубилизированные буфером с DDM.

Безъядерный супернатант (S-6.8), полученный низкоскоростным (7500 об./мин, 6800 g) центрифугированием лизата, содержит люминесцентную активность, которая при последующем ультрацентрифугировании при 140000 g, почти количественно переходит в осадок (P-140, микросомальная фракция). Экстракция люциферазы из полученного осадка буфером, содержащим додецилмальтозид (DDM), позволяет солюбилизовать люциферазу в мицеллах детергента (фракция S-40).

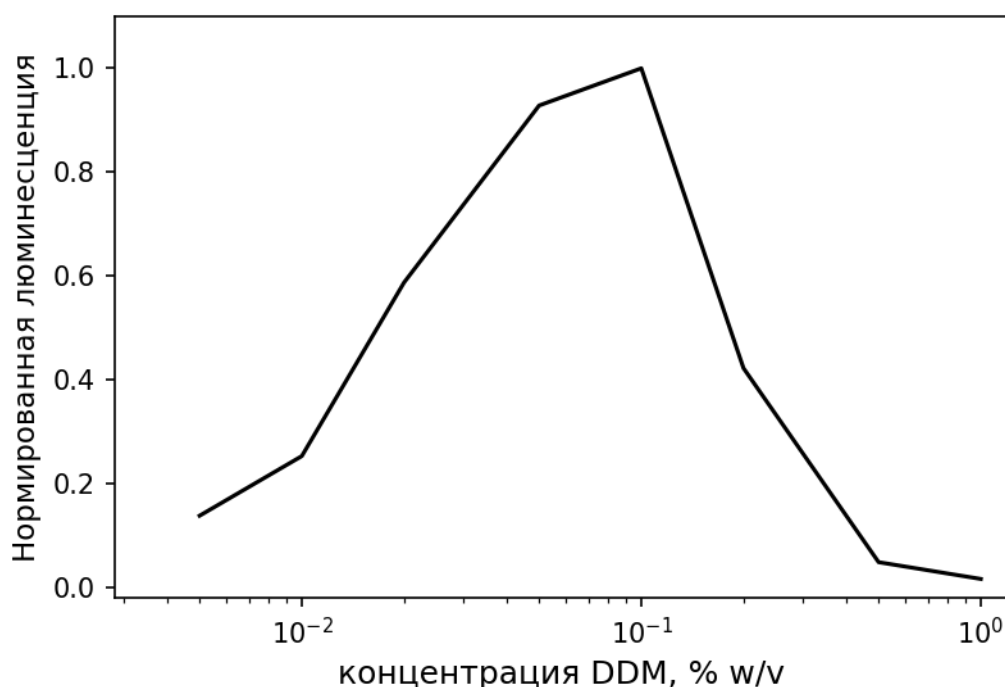
### 3.1.2 Подбор условий солюбилизации люциферазы *N. nambi*

Для дальнейшей работы необходимо было подобрать условия солюбилизации микросомальной фракции, что подразумевает, в первую очередь, подбор оптимального детергента. Для этого в буфер (20 mM MOPS pH 7.2, 50 mM NaCl) вносили аликвоту микросом с известной концентрацией белка в ней, и к полученной смеси добавляли различные детергенты. Пробы инкубировали при 4°C с перемешиванием в течение полутора часов. Затем пробы центрифугировали при 210000 g, 4°C, 2 ч. Аликвоты супернатанта использовали для измерения биолюминесценции, причем каждый детергент анализировали при различных его концентрациях в растворе, что обусловлено необходимостью определения оптимального соотношения с микросомальной фракцией. Пример результатов такого эксперимента можно видеть на Рисунке 16.



**Рисунок 16.** Пример эксперимента по подбору оптимального детергента для солюбилизации люциферазы *N. nambi*. По оси абсцисс - варианты использованных детергентов с указанием их содержания в смеси в процентах.

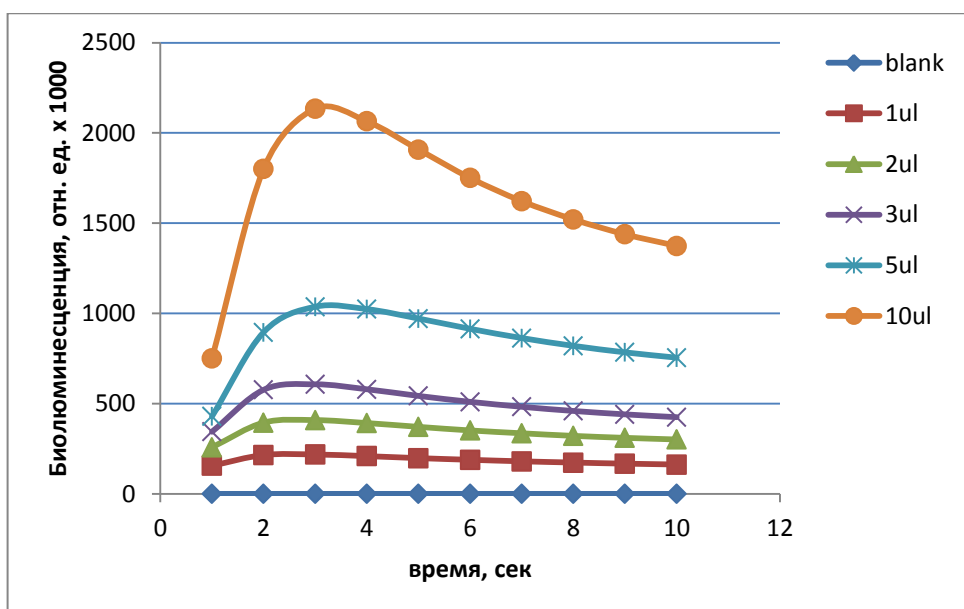
По результатам экспериментов лучшую способность к солюбилизации изучаемого фермента показал Triton X-100. Однако этот детергент обладает набором свойств (таких как очень большой размер мицелл, к примеру), затрудняющих применение некоторых хроматографических и электрофоретических методов при дальнейшей работе с солюбилизированной фракцией. Поэтому для дальнейших экспериментов был выбран следующий за ним по эффективности солюбилизации додецилмальтозид (DDM), и подобрано его соотношение с микросомальной фракцией для оптимальной солюбилизации люминесцентной активности (Рисунок 17). Для каждого образца микросомальной фракции необходимо было определять это соотношение индивидуально.



**Рисунок 17.** Солюбилизация люциферазной активности в зависимости от концентрации DDM.

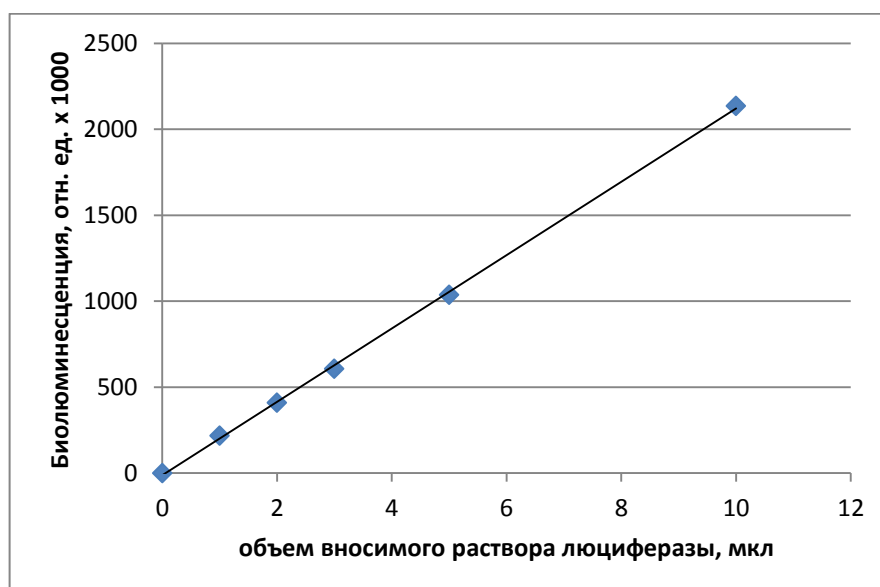
Также после подбора условий солюбилизации была исследована кинетика билюминесцентной реакции. Для этого различный объем фракции, содержащей люциферазу, вносили в реакционную смесь, помещали смесь в люминометр, и инициировали реакцию добавлением раствора люциферина через встроенный инжектор (Рисунок 18).





**Рисунок 18.** Кинетика билюминесцентной реакции с участием солюбилизированной микросомальной фракции *N. nambi*. Указанный объем фракции люциферазы вносили в кювету люминометра и инициировали билюминесценцию добавлением 25 мкл раствора люциферина 15 мкМ в воде, содержащей 0.1% DDM, 2 мМ муравьиной кислоты.

Было показано, что в условиях насыщения люциферинем максимальная интенсивность излучаемого в процессе реакции света линейно зависела от количества люциферазы в широком диапазоне концентраций (Рисунок 19).

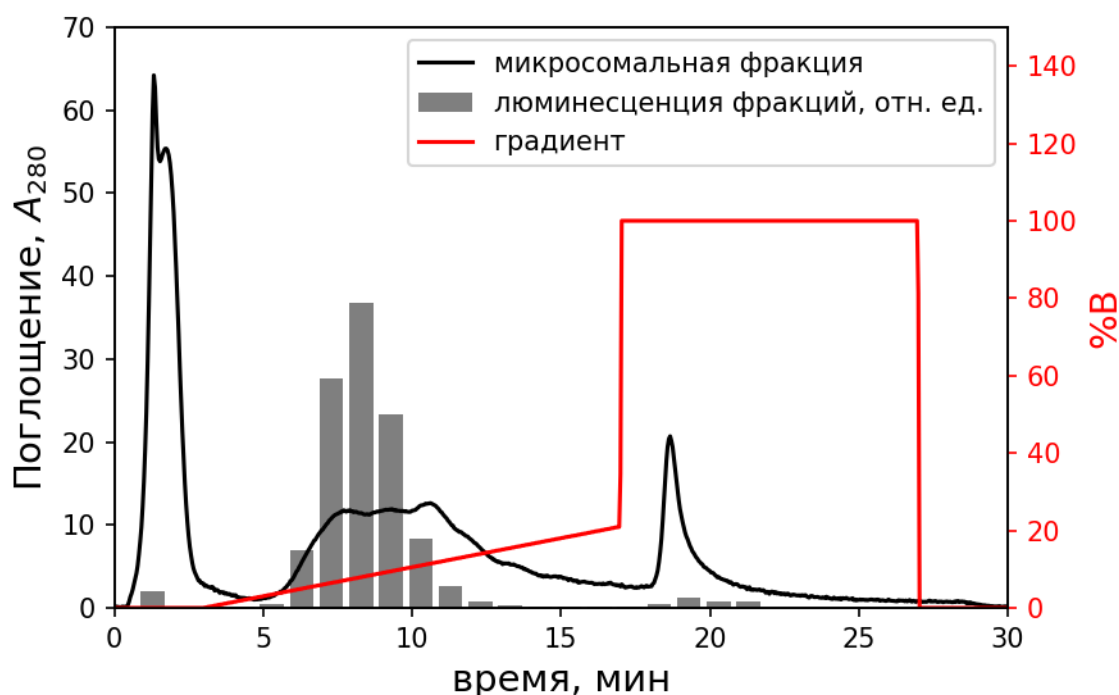


**Рисунок 19.** Зависимость максимальной интенсивности билюминесцентной реакции от количества люциферазы.

Полученную в результате выделения из мицелия микросомальную фракцию люциферазы использовали далее для хроматографической очистки исследуемого фермента.

### 3.1.3 Хроматографическая очистка люциферазы *N. nambi*

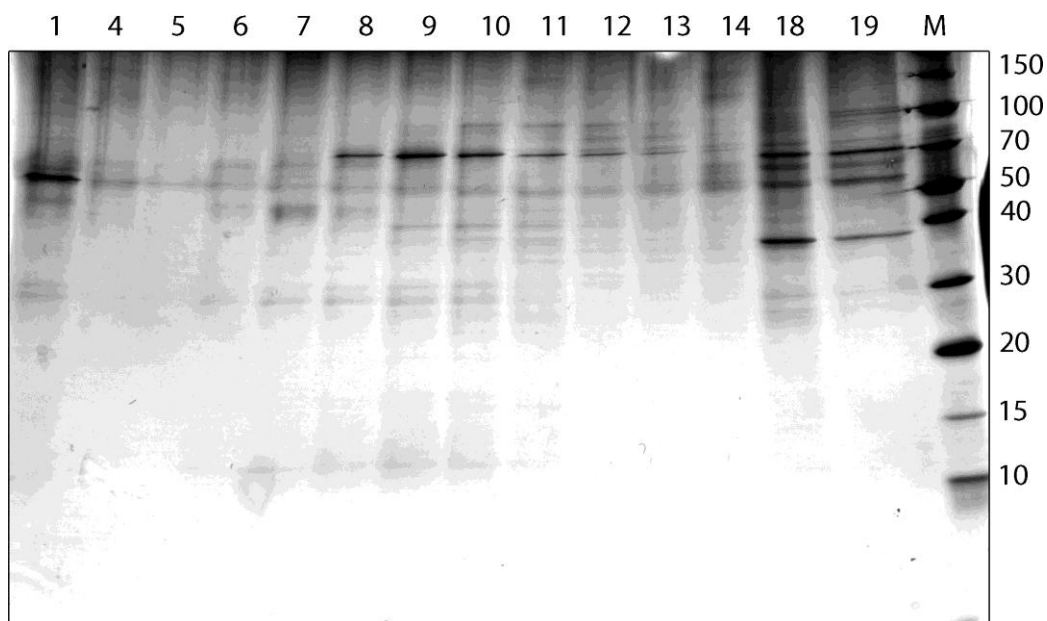
На первом этапе хроматографической очистки применяли анионообменный носитель DEAE-Sephарose. Из данных хроматографии следует (Рисунок 20), что биолюминесцентная активность связывается с колонкой и затем элюируется в начале градиента соли.



**Рисунок 20.** Хроматография препарата солюбилизированной микросомальной фракции на колонке DEAE-Sephарose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии.

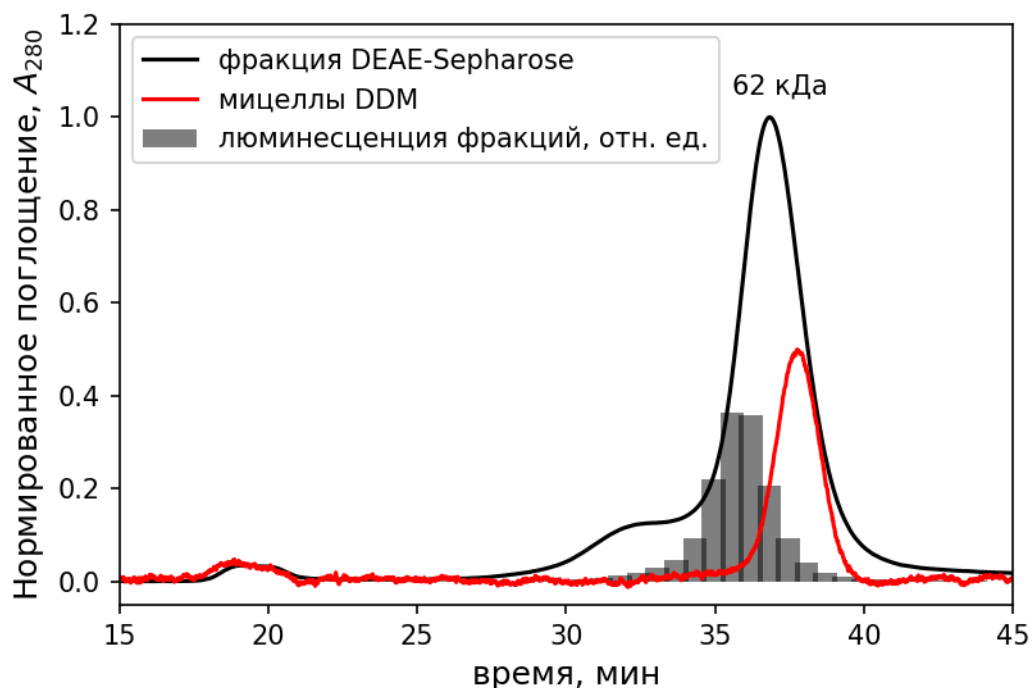
Фракции, полученные после ионообменной хроматографии, разделяли в денатурирующих восстанавливающих условиях SDS-PAGE, гель окрашивали серебром. Однако данные электрофореза активных фракций в денатурирующих условиях (Рисунок

21) не позволили с достаточной степенью определенности выявить полосу, соответствующую люциферазе.



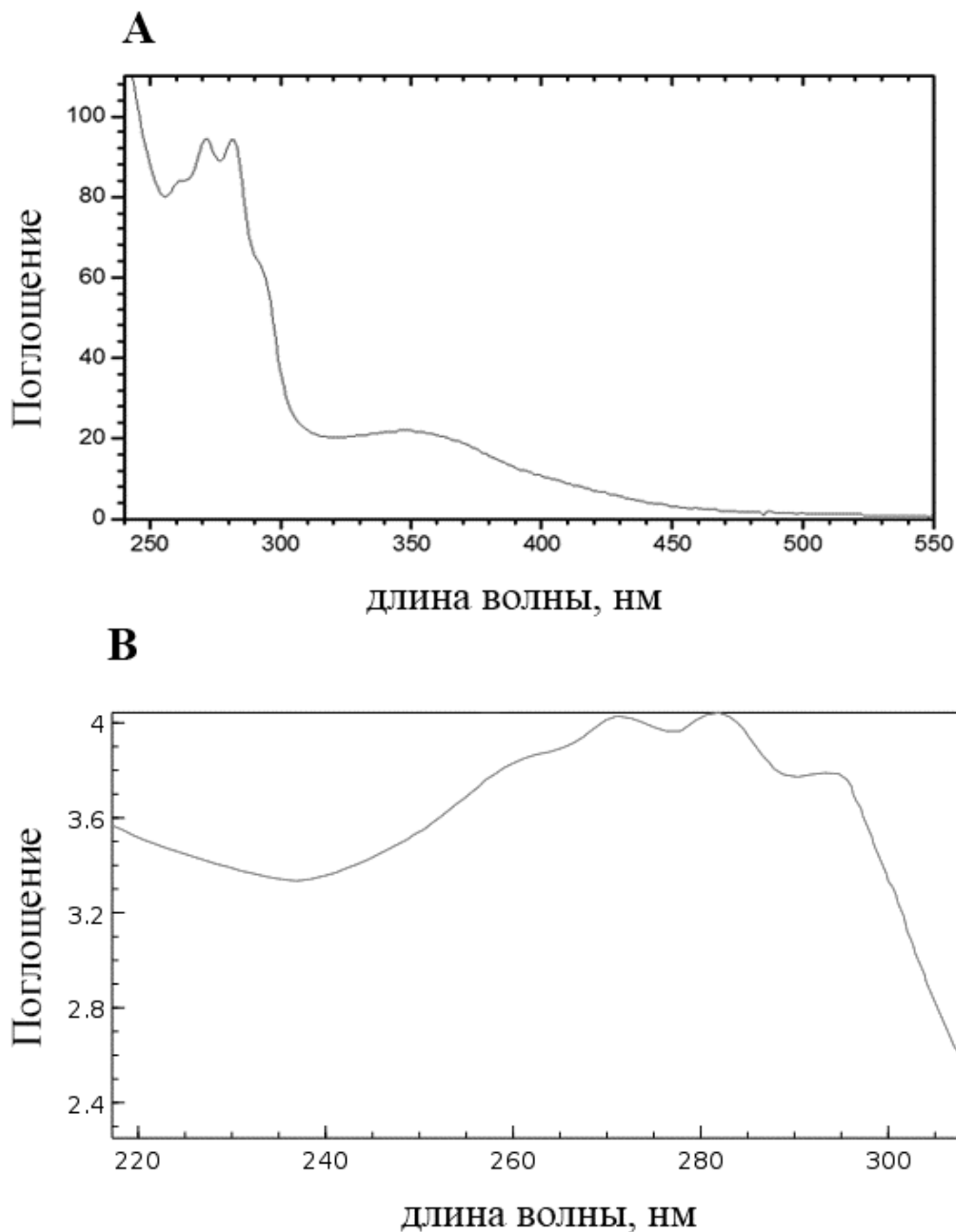
**Рисунок 21.** SDS-PAGE электрофорез фракций DEAE-Sepharose. Номера дорожек соответствуют номерам фракций. Максимальная биOLUMИнесцентная активность присутствовала во фракциях 6-11. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан справа. Гель окрашивали серебром.

В связи с этим было принято решение ввести дополнительную стадию очистки люциферазы с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex200. Как показано на Рисунке 22, в условиях гель-фильтрационной хроматографии мицеллы DDM элюируются со временем, соответствующим 52.3 кДа. При этом основной пик хроматограммы соответствует 62 кДа, а максимум биOLUMИнесцентной активности – 74.4 кДа. Вероятно, люцифераза солюбилизирована в мицеллах DDM, возможно смешанных с природными липидами мембран гриба.



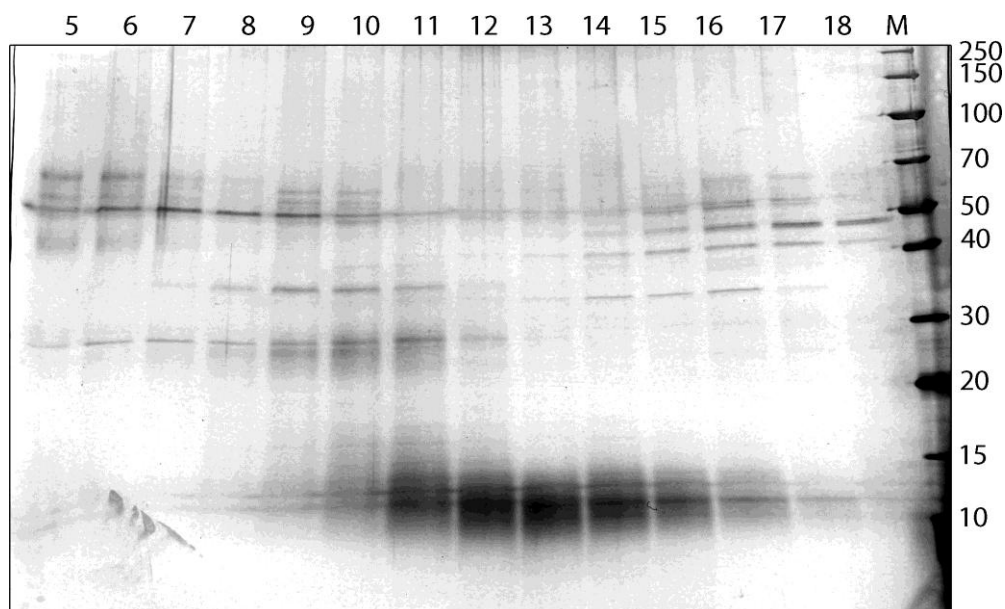
**Рисунок 22.** Гель-фильтрация фракции 8 DEAE-Sepharose на колонке Superdex200. Черная линия – хроматографический профиль фракции 8 DEAE-Sepharose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии. Красная линия – хроматографический профиль препарата мицелл DDM.

На смешанный характер мицелл DDM указывает спектр поглощения пика при 62 кДа (Рисунок. 23), содержащий пики, характерные для эргостерола – хорошо известного компонента мембран грибов.



**Рисунок 23.** Спектры поглощения. А – спектр поглощения элюата с колонки Superdex200, соответствующего 62 кДа. В – спектр поглощения эргостерола (взято с <http://webbook.nist.gov/chemistry>).

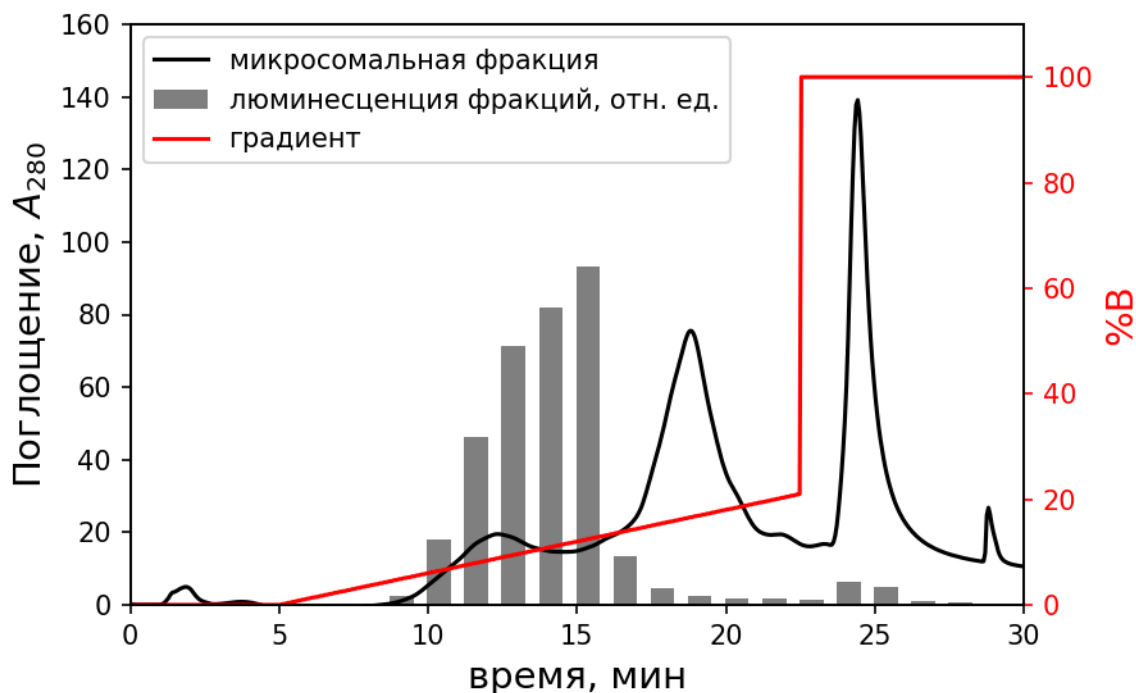
Данные электрофореза активных фракций гель-фильтрационной хроматографии в денатурирующих условиях (Рисунок 24) также не позволяли с достаточной степенью определенности выявить полосу, соответствующую люциферазе.



**Рисунок 24.** SDS-PAGE электрофорез фракций Superdex200. Номера дорожек соответствуют номерам фракций. Максимальная биOLUMИнесцентная активность присутствовала во фракциях 7-15. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан справа. Гель окрашивали серебром.

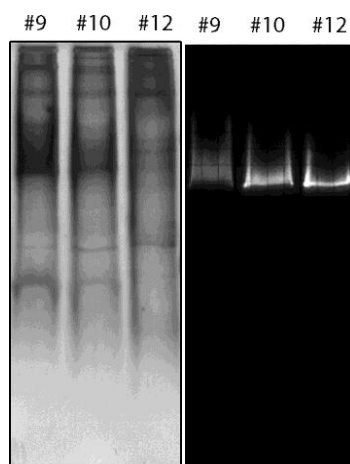
### 3.1.4 Электрофорез в нативных условиях

В связи с невозможностью выявления полосы, соответствующей люциферазе, по результатам электрофореза в денатурирующих условиях, была отработана методика проведения электрофореза в нативных условиях. Для этого микросомы солубилизировали в буфере с DDM и хроматографировали на колонке Q-Sepharose в тех же условиях, что и для колонки с DEAE-Sepharose. На электрофорез наносили фракции с наибольшей люминесцентной активностью (Рисунок 25). Проведение гель-электрофореза в нативных условиях позволило, после вымачивания геля в буфере, содержащем люциферин, идентифицировать полосу люциферазы с помощью гель-документирующей системы, затем гель был окрашен серебром (Рисунок 26).



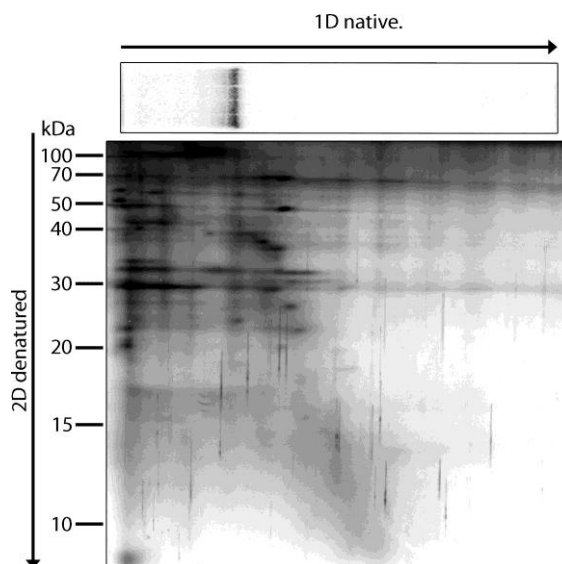
**Рисунок 25.** Хроматография препарата солюбилизированной микросомальной фракции на колонке Q-Sepharose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии.

Из данных, представленных на Рисунке 26, следует, что в использованных условиях люцифераза мигрирует одной полосой, а интенсивность люминесценции соответствует профилю активности, измеренному при помощи люцинометра. Вместе с тем, при окрашивании геля серебром идентифицировать полосу, соответствующую люциферазе, не удалось.



**Рисунок 26.** Электрофорез в нативных условиях. На электрофорез наносили указанные фракции после хроматографии на колонке Q-Sepharose. Слева: гель окрашен серебром. Справа: биолюминесцентная детекция в геле раствором люциферина.

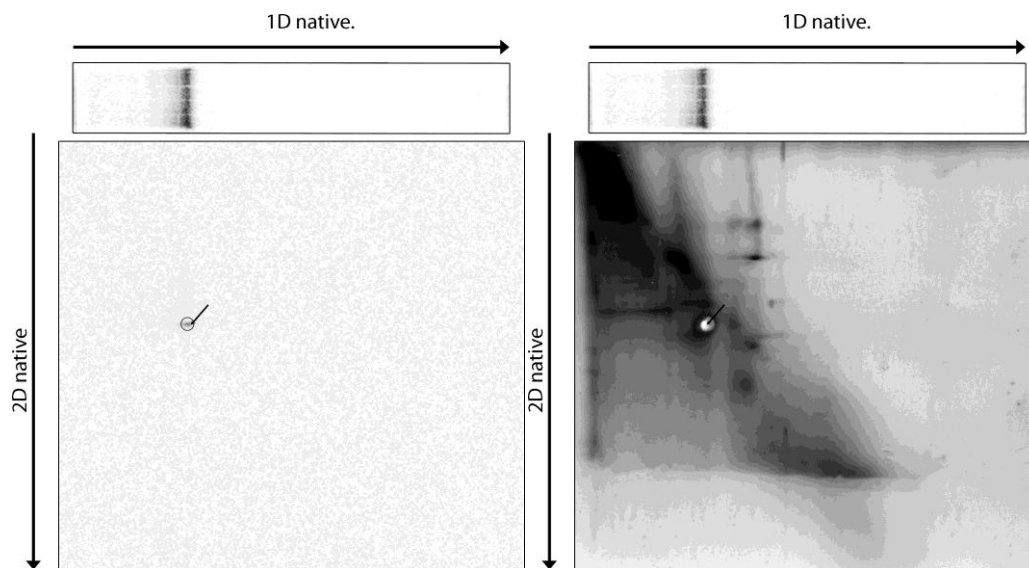
В связи с этим, был разработан формат двумерного электрофореза в нативных условиях. После проведения электрофореза в первом направлении, дорожка с образцом вырезалась и использовалась для второго направления. Причем, после первого направления параллельно проводились электрофорезы во втором направлении как в нативных, так и в денатурирующих условиях (Рисунок 27, Рисунок 28).



**Рисунок 27.** Двумерный электрофорез в денатурирующих условиях второго направления. Вверху показана дорожка геля после первого направления (детекция биолюминесценции в геле). Гель окрашивали серебром. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан слева.



Как показано на Рисунке 28, в результате двумерного электрофореза с детекцией биолюминесценции в геле надежно детектируется светящееся пятно. Последующая окраска геля серебром позволила вырезать пятно, соответствующее биолюминесцентному сигналу.



**Рисунок 28.** Двумерный электрофорез в нативных условиях. Вверху показана дорожка геля после первого направления (детекция биолюминесценции в геле). Слева: второе направление, биолюминесценция в геле. Справа: последующая окраска геля серебром. Стрелками указана зона, вырезанная из геля.

Аналогичные пятна, полученные в результате серии двумерных электрофорезов, были вырезаны из гелей и оказались пригодными для проведения масс-спектрометрического секвенирования.

### 3.1.5 Масс-спектрометрическое секвенирование образцов из гелей

Масс-спектрометрические исследования проводились при участии сотрудника лаборатории Протеомики ИБХ РАН Рустама Зиганшина, на приборе Q Exactive™ HF (Thermo Fisher Scientific, США). После обработки результатов с помощью сервиса Mascot (Matrix Science, США) был выполнен поиск соответствующих кандидатов в транскриптоме *N. nambi*, полученном нами ранее. В результате были идентифицированы несколько возможных генов-кандидатов (Таблица 7), которые были впоследствии клонированы в бактерии *E. coli*. Однако результаты проверки активности дали неоднозначные результаты, не позволяющие с уверенностью идентифицировать

люциферазу, что, как выяснилось впоследствии, было связано с неоптимальными условиями экспрессии белков, а также тем фактом, что люцифераза гриба *N. nambi* является мембранным белком, что затрудняет его правильное сворачивание в клетках прокариот. Забегая вперед, стоит отметить, что ген люциферазы грибов присутствовал среди генов кандидатов, но вышеперечисленные обстоятельства не позволили с уверенностью его идентифицировать. В связи с полученными данными, было принято решение создать библиотеку кДНК гриба *N. nambi* и клонировать ее в клетки дрожжей для последующей идентификации клона, экспрессирующего люциферазу.

Номер	Идентификатор транскрипта	Масса, Да	Ранг транскрипта
1	c19665_g2_i1	52592	208
2	c16895_g1_i1	58910	150
3	c20577_g2_i1	42426	119
4	c22554_g1_i1	47175	105
5	c15673_g1_i1	25835	105
6	c23057_g1_i1	55847	105
7	c137_g1_i1	35753	88
8	c29206_g1_i1	132056	72
9	c28205_g1_i1	33193	65
10	c27892_g1_i1	108900	55
11	c24673_g1_i3	247331	53
12	c25482_g1_i1	70800	51

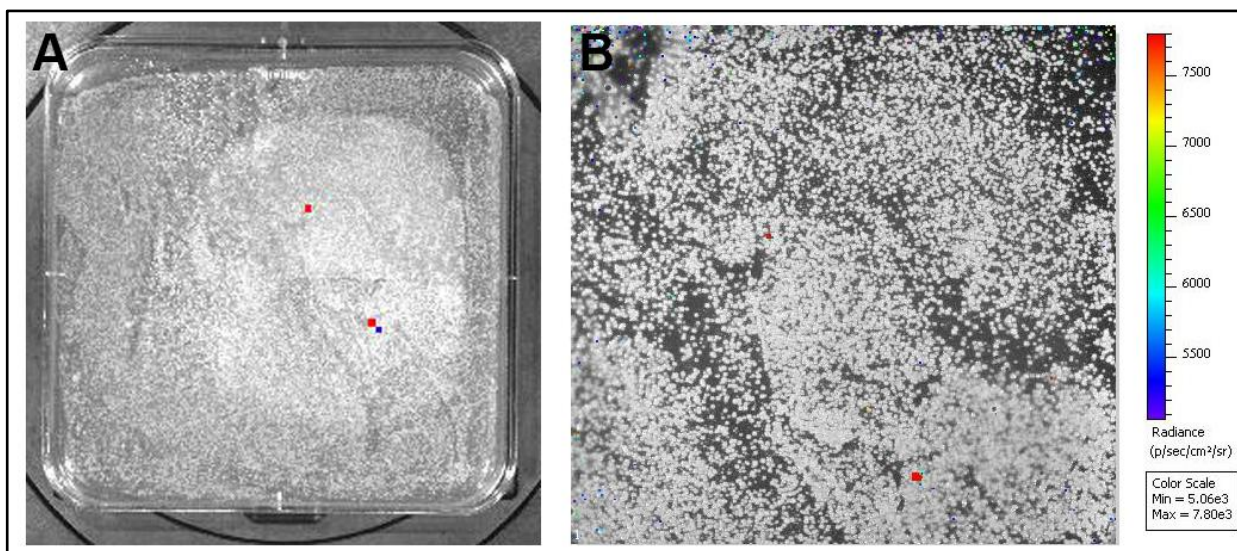
**Таблица 7.** Результаты масс-спектрометрического анализа образцов, вырезанных из геля после двумерного электрофореза в нативных условиях препарата очищенной люциферазы. Двенадцать наиболее вероятных кандидатов, с наибольшим рангом.

### **3.2 Клонирование библиотеки кДНК гриба *N. nambi* и поиск последовательности гена люциферазы**

Так как выделение и очистка препарата люциферазы из биомассы гриба *N. nambi* не дали однозначного ответа, какая из найденных с помощью масс-спектрометрического анализа последовательностей соответствует последовательности люциферазы, было принято решение о клонировании люциферазы с помощью библиотеки кДНК. В качестве организма для клонирования были выбраны дрожжи *P. pastoris*, так как они являются эукариотическими организмами, филогенетически наиболее близкими грибам, что давало основания надеяться на успешную экспрессию и правильное сворачивание исследуемой люциферазы. Данная часть работы проводилась в тесном сотрудничестве с Кареном Саркисяном и Екатериной Серебровской (лаб. Биофотоники ИБХ РАН), а также Иваном Смирновым и Юлианой Мокрушиной (лаб. Биокатализа ИБХ РАН).

#### **3.2.1 Клонирование библиотеки кДНК гриба *N. nambi* в дрожжи *P. pastoris* и определение последовательности гена грибной люциферазы**

Для создания библиотеки кДНК из мицелия *N. nambi* была выделена суммарная РНК, и кДНК была амплифицирована с помощью SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, США). Полученную библиотеку кДНК клонировали в вектор GAP-pPic9K, созданный на основе вектора pPic9K, путем замены последовательностей индуцибельного промотора алкоголь оксидазы (АОХ1) и сигнальной последовательности альфа фактора на последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP). После линейаризации по сайту рестрикции *AvrII*, данную библиотеку кДНК использовали для трансформации клеток *P. pastoris*. Трансформированные клетки рассеивали на чашки Петри со средой RDB medium и помещали в термостат, для последующего роста клеток. Разнообразие итоговой библиотеки кДНК *N. nambi* в дрожжах составило порядка одного миллиона клонов. Полученные колонии опрыскивали раствором 3-гидроксигиспидина (предоставлен Зинаидой Осиповой и Александрой Царьковой, гр. Синтеза природных соединений ИБХ РАН), для стимуляции реакции биолюминесценции. Испускаемый колониями свет детектировали с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) (Рисунок 29) в сотрудничестве с Максимом Абакумовым (РНИМУ им. Пирогова).



**Рисунок 29.** Клетки дрожжей *Pichia pastoris*, трансформированные библиотекой кДНК *Neonothoropus nambi* и опрысканные раствором люциферина. Представлено наложение изображений снятых с помощью IVIS Spectrum СТ в видимом свете и в биOLUMИнесцентном канале. А – изображение всей чашки. В – увеличенный участок со светящимися клонами.

Колонии, в которых детектировалось свечение в ответ на добавление 3-гидроксигиспидина, отбирали и выделяли из клеток геномную ДНК, которая в свою очередь использовалась для установления последовательности приобретенного в результате трансформации гена, методом секвенирования по Сэнгеру. Все отобранные в результате поиска клоны дрожжей несли один и тот же ген, идентифицированный как ген люциферазы *N. nambi*. Полученная нуклеотидная последовательность гена люциферазы *N. nambi* показана на Рисунке 30. Кодированная ею аминокислотная последовательность показана на Рисунке 31. Стоит отметить, что данная нуклеотидная последовательность соответствует последовательности открытой рамки считывания транскрипта *c137\_g1\_i1*. Данный транскрипт присутствовал среди тех, которые были выявлены в первой части работы (Таблица 7).

ATGCCATTAACATTAGCCTCTCGTCTCTCTTTCGAACGTCTCTCCAACTTAGCAGTC  
GCAGCATAGCGATTACATGTGGAGTTGTTCTCGCCTCCGCAATCGCCTTTCCCATCA  
TCCGCAGAGACTACCAGACTTTCCTAGAAGTGGGACCTCGTACGCTCCGCAGAACT  
TTAGAGGATACATCATCGTCTGTGTCTCTCGCTATTCCGCCAAGAGCAGAAAGGGC  
TCGCCATCTATGATCGTCTTCCCGAGAAACGCAGGTGGTTGGCCGACCTTCCCTTTC  
GTGAAGGAACCAGACCCAGCATTACCAGCCATATCATTCAGCGACAGCGCACTCAA  
CTGGTTCGATCAGGAGTTTGCCACCAGGGAGCTCATAGACAAGGTCATCCCTCGCGTG  
CAAGCACGACACACCGACAAAACGTTCTCAGCACATCAAAGTTCGAGTTTCATGC  
GAAGGCCATATTTCTCTTGCCTTCTATCCCAATCAACGACCCTCTGAATATCCCTAGC  
CACGACACTGTCCGCCGAACGAAGCGCGAGATTGCACATATGCATGATTATCATGA  
TTGCACACTTCATCTTGCTCTCGCTGCGCAGGATGGAAAGGAGGTGCTGAAGAAAG  
GTTGGGGACAACGACATCCTTTGGCTGGTCCTGGAGTTCCTGGTCCACCAACGGAAT  
GGACTTTTCTTTATGCGCCTCGCAACGAAGAAGAGGCTCGAGTAGTGGAGATGATC  
GTTGAGGCTTCCATAGGGTATATGACGAACGATCCTGCAGGAAAGATTGTAGAAAA  
CGCCAAG

**Рисунок 30.** Нуклеотидная последовательность гена люциферазы гриба *N. nambi*.

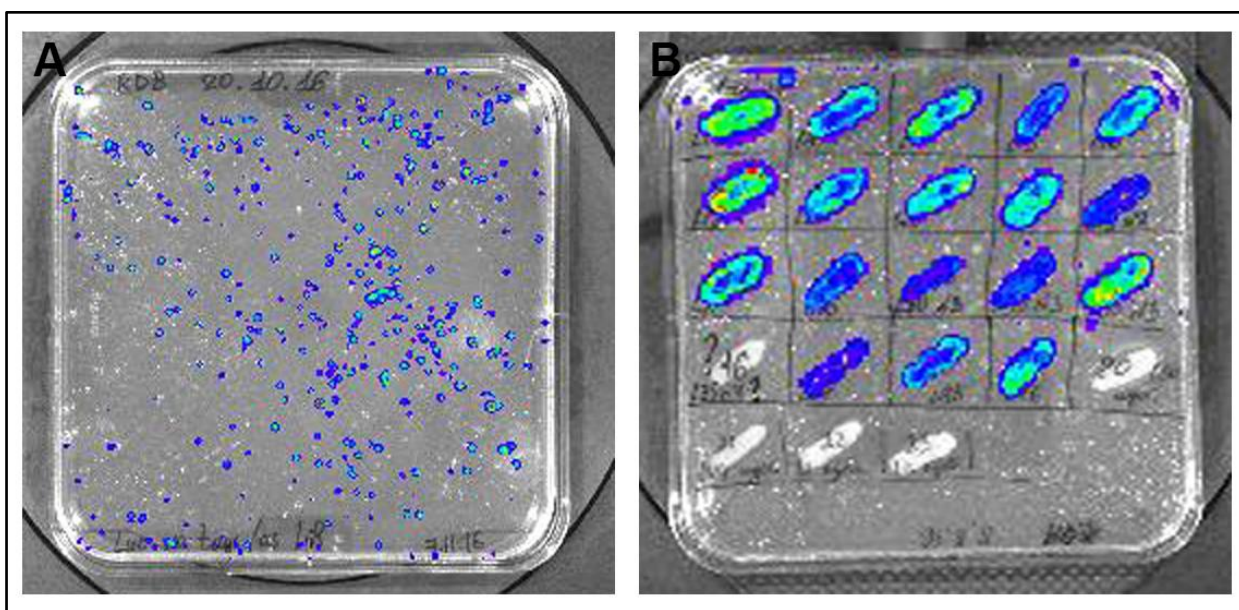
MRINISLSSLFERLSKLSRSIAITCGVVLASAIAPFIIRRDYQTFLEVGPSYAPQNFRGYIIV  
CVLSLFRQEQQGLAIYDRLPEKRRWLADLPFREGTRPSITSHIIQRQRTQLVDQEFATREL  
IDKVIPRVQARHTDKTFLSTSKFEFHAKAIFLLPSIPINDPLNIPSHDTVRRTKREIAHMHD  
YHDCTLHLALAAQDGKEVLKKGWGQRHPLAGPGVPGPTEWTFLYAPRNEEEARVVE  
MIVEASIGYMTNDPAGKIVENAK

**Рисунок 31.** Аминокислотная последовательность люциферазы гриба *N. nambi*.

### 3.2.3 Экспрессия люциферазы *N. nambi* в клетках *P. pastoris*

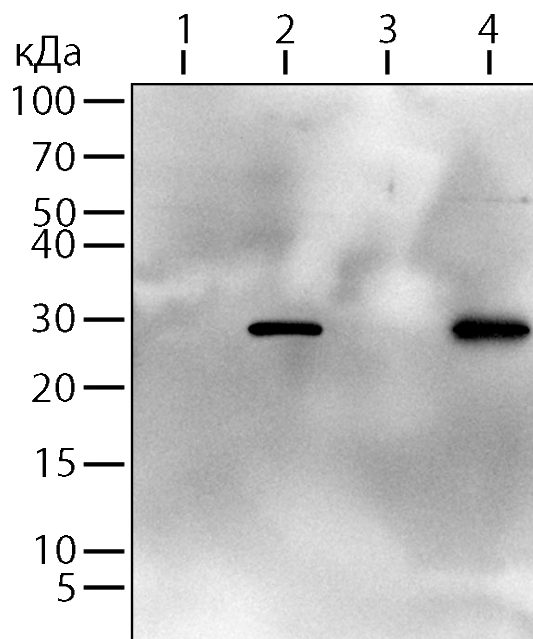
После установления последовательности гена люциферазы, необходимо было получить штамм-продуцент люциферазы *N. nambi*, который бы позволил обеспечить достаточное количество белка для проведения дальнейших экспериментов. Для создания такого штамма, ген люциферазы амплифицировали с помощью ген-специфичных концевых праймеров и клонировали в экспрессионный вектор pGAPZA (Invitrogen) в одну рамку считывания с последовательностью, кодирующей С-концевую гистидиновую метку. Полученную генетическую конструкцию использовали для трансформации в

клетки *P. pastoris*. Трансформированные клетки рассеивали на чашки со средой YPD, содержащей селективный антибиотик – зеоцин. Клоны *P. pastoris*, производящие люциферазу, идентифицировали опрыскиванием колоний раствором 3-гидроксигиспидина и визуализацией биолюминесценции (испускаемого света) с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer) (Рисунок 32). Были отобраны клоны, для которых интенсивность свечения была наибольшей. Самые яркие клоны изолировали и наращивали биомассу клеток для выделения из них рекомбинантного белка в виде препарата микросомальной фракции.



**Рисунок 32.** Изображения чашек с колониями дрожжей *P. pastoris*, полученные с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT. Представлено наложение изображений снятых в видимом свете и в биолюминесцентном канале. А – изображение чашки с колониями дрожжей, трансформированными вектором GAP-pPicZA, содержащим ген люциферазы *N. nambi*. В – отдельные клоны, содержащие ген люциферазы *N. nambi*, перенесенные на новую чашку, а также контрольные клоны, не содержащие исследуемый ген (не светятся).

Образцы анализировали с помощью денатурирующего электрофореза по Лэммли в полиакриламидном геле и использовали для вестерн-блота с конъюгатом антител на гистидиновую метку и пероксидазы хрена, с хемилюминесцентной детекцией сигнала (Рисунок 33). Вестерн-блот продемонстрировал специфическое окрашивание люциферазы, перемещающейся в геле в области белков с массой около 30 кДа, что примерно соответствует ожидаемой молекулярной массе люциферазы *N. nambi*. Также Вестерн-блот показал, что рекомбинантная люцифераза практически полностью находится в микросомальной фракции.

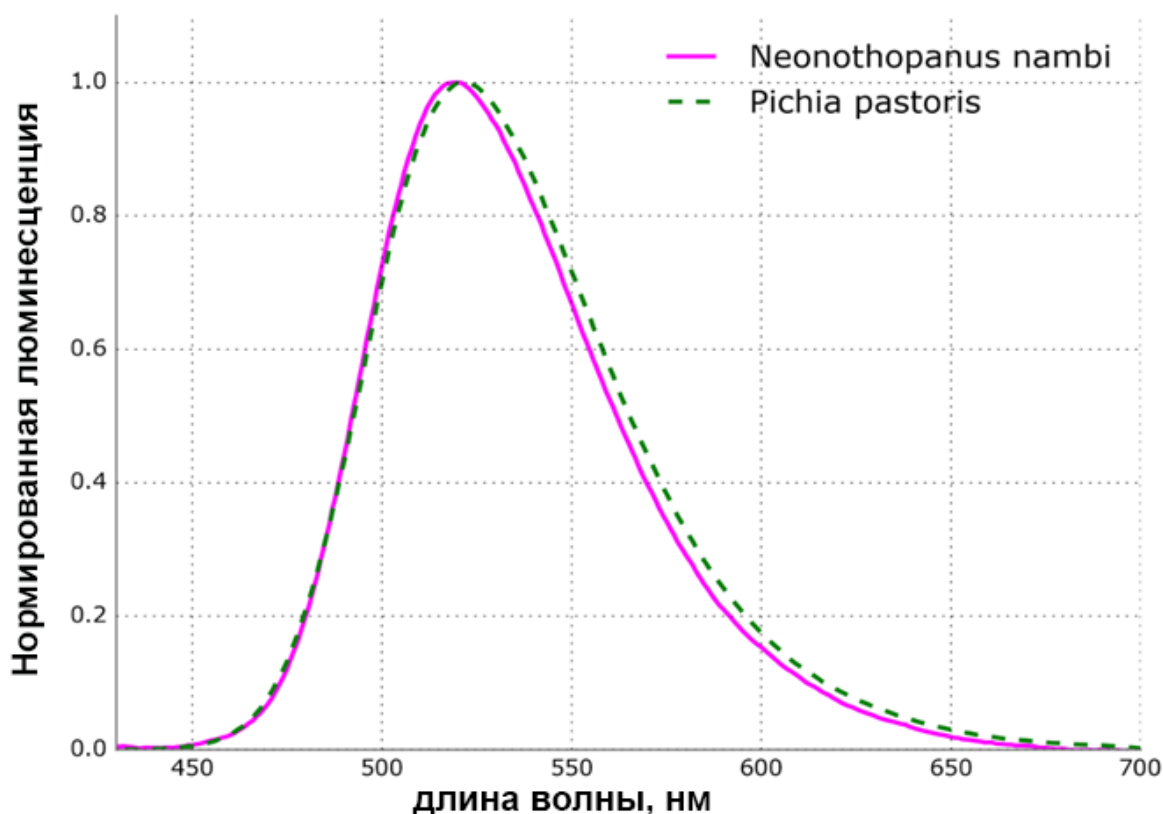


**Рисунок 33.** Вестерн-блот анализ экспрессии гена люциферазы грибов в клетках *Pichia pastoris*, проведенный с использованием антител к гистидиновой метке, конъюгированными с пероксидазой хрена. Дорожка 1: лизат клеток экспрессирующих ген люциферазы *Neonothopanus nambi*, не несущей гистидиновой метки. Супернатант после центрифугирования при 5,000 x g. Дорожка 2: лизат клеток экспрессирующих ген люциферазы *Neonothopanus nambi*, имеющей гистидиновую метку. Супернатант после центрифугирования при 5,000 x g. Дорожка 3: лизат клеток экспрессирующих ген люциферазы *Neonothopanus nambi*, имеющей гистидиновую метку. Супернатант после центрифугирования при 140,000 x g. Дорожка 4: лизат клеток экспрессирующих ген люциферазы *Neonothopanus nambi*, имеющей гистидиновую метку. Осадок после центрифугирования при 140,000 x g (микросомальная фракция). Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан справа.

### 3.2.4 Определение спектра биолюминесценции рекомбинантной люциферазы и его сравнение со спектром биолюминесценции мицелия гриба *N. nambi*

Для сравнения спектра биолюминесценции рекомбинантной люциферазы со спектром биолюминесценции мицелия гриба *N. nambi*, использовали микросомальную фракцию дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующих ген люциферазы, и препарат мицелия гриба *N. nambi*. Биолюминесценцию детектировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse Spectrofluorimeter (Agilent, США). Полученный спектр биолюминесценции рекомбинантной люциферазы в целом совпадал со спектром биолюминесценции мицелия *N. nambi* (Рисунок 34)





**Рисунок 34.** Спектры биолюминесценции люциферазы из *Neonothopanus nambi* при экспрессии в естественной и гетерологической системах. Розовая линия – спектр биолюминесценции мицелия *Neonothopanus nambi*. Зеленая пунктирная линия - спектр биолюминесценции препарата люциферазы из клеток *Pichia pastoris*.

### 3.2.5 Люциферазы из различных видов грибов

После выяснения нуклеотидной и аминокислотной последовательности люциферазы *N. nambi* была предпринята попытка поиска гомологов среди уже описанных белков с помощью программного обеспечения, предоставляемого National Center for Biotechnology Information. Однако ни одного гомологичного белка с известной функцией таким образом найдено не было, что подтверждает уникальность люциферазы грибов как белка и фермента. Тогда было принято решение проанализировать геномную ДНК из других светящихся видов грибов для поиска в них люциферазы.

Геномы грибов *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius* и *Panellus stipticus* были получены из базы данных U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (DOE JGI), а DOE Office of Science User Facility. Из гриба *Mycena citricolor* ранее была выделена геномная ДНК и проведено полногеномное секвенирование по технологии Illumina HiSeq (Illumina, США). Результаты



секвенирования были использованы для предсказания аминокислотных последовательностей гипотетических белков и использованы для поиска гомологов люциферазы из *N. nambi*. Поиск гомологов осуществлялся с помощью алгоритма для анализа последовательности, описанного в [Altschul и др., 1990], и программного обеспечения, предоставляемого National Center for Biotechnology Information. Был также проведен поиск аминокислотных последовательностей в результатах геномного секвенирования грибов в базе данных NCBI Genbank. При поиске использовали стандартные параметры поиска blastp.

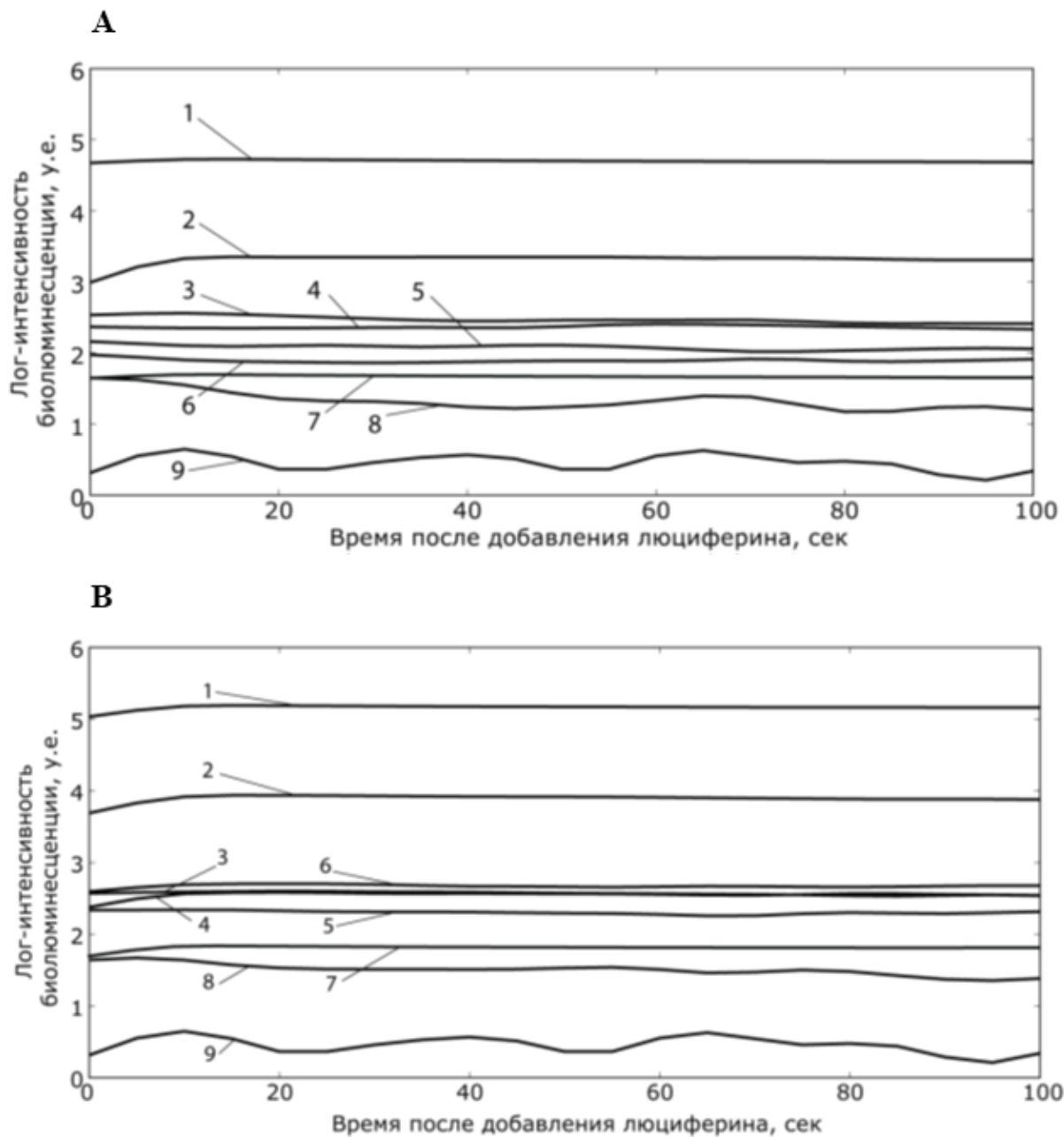
В результате были идентифицированы последовательности гипотетических белков – гомологов люциферазы из *Noeonothopanus nambi* в *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* и *Mycena citricolor*. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей показаны на Рисунке 35. На основании множественного выравнивания были синтезированы гены кандидаты люцифераз грибов *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius*, и *Panellus stipticus*. Кодированные последовательности кандидатов люцифераз оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих (гуманизировали). Гуманизированные нуклеиновые кислоты получали методом олигонуклеотидного синтеза по стандартным методикам. Полученные последовательности генов клонировали в вектор pmKate2-keratin (Евроген, Россия), используя сайты рестрикции *NheI* и *NotI* вместо последовательности, кодирующей белок слияния mKate2-keratin. Плазмидную ДНК очищали и трансфицировали в клетки HEK293NT и HeLa. Спустя 24 часа после трансфекции в среду добавляли 3-гидроксигиспидин, а свечение клеток детектировали с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США).

A.gallica	1	MSFIDSMKLDLVGHLFGIRNRGLAAACCALAVASTIAFPYIRRDYQTFLSGGPSYAPQNIIRGYF
A.mellea	1	MSFFDSVKLDLVGRLFGIRNRGLAVTCCAVAVASIIAFPYIRRDYQTFLSGGPSYAPQNIIRGYL
A.ostoyae	1	MSFIDSMKLDLVGHLFGIRNRGLATAACCAVAVASIAAFPYIRRDYQTFLSGGPSYAPQNIIRGYL
M.chlorophos	1	MVQLTRTSGFI.....AAAAIVAAIAFPYIRRDYQTFLRGGPSYAPQNIIRGYI
M.citricolor	1	MAYQLTWIQTLV.....LGALVAMAVAFPYIKKDYETFLKGGPSYAPQNIIRGYI
N.nambi	1	MRINISLSSFLERLSKLSRSIAIT.CGVVLASIAAFPYIRRDYQTFLEVGPSYAPQNIIRGYI
N.gardneri	1	MNLPSFVQRLSTASSRSIAIT.CVVVLASIAAFPYIRRDYQTFLEVGPSYAPQNIIRGYI
O.olearius	1	MLPAFIYK.....PRLVIT.CVFLVLSALAFPYIRKDYQTFLEVGPSYAPQNIIRGYI
P.stipticus	1	MNINLKALIGV.....CAVLITAAV.FPFVVKDYHTFLEGGPSYAPQNIIRGYI
A.gallica	65	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDPKFALEELK
A.mellea	65	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRDGPRPITTSHIIQRQRNQAPDLKFALEELK
A.ostoyae	65	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDSKFALEELK
M.chlorophos	49	IVLVLALFRQEQKGLAIYEPLEKRTWLPPELRRAGDRPKTTSHIIQRQLDQYDPDFVFKALK
M.citricolor	50	IVLVLALFRQEQKGLAIYDRMPEKRRWANLPQREGPRPKTTSHIIQRQLSQTDPAFGAAYLK
N.nambi	63	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDPKFALEELK
N.gardneri	59	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDPKFALEELK
O.olearius	52	IVCVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDPKFALEELK
P.stipticus	48	IVLVLALFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLPDLPPRNGPRPITTSHIIQRQRNQAPDPKFALEELK
A.gallica	129	ATVIPRVQARHTDLTHLSLSKFEFHAEAIFLLPSVPIDDPKNVPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
A.mellea	129	ATVIPRVQARHTDLTHLSLSKFEFHAEAIFLLPSVPIDDPKNVPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
A.ostoyae	129	ATVIPRVQARHTDLTHLSLSKFEFHAEAIFLLPSVPIDDPKNVPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
M.chlorophos	113	ATVIPRVQARHTDKTHLALSKEFHAEAIFVRFPEIAIDDPKHIPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
M.citricolor	114	DTVIPRVQARHAANTHIARSTFEFHAEAIFLNADVPL..PEGLPASETPVRRTKREIAHMHDYHD
N.nambi	127	DKVIPRVQARHTDKTFLSTKFEFHAQAIFLLPSIPINDPLNIPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
N.gardneri	123	GKVIPRVQARHTDKTFLSTKFEFHAQAIFLLPSIPINDPLNVPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
O.olearius	116	GKIVIPRVQARHTNTTFLSTKFEFHAQAIFLLPSIPINDPQNIIPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
P.stipticus	112	GSVIRRLQSRHQDITQLALSKEFHAEAIFLRFDAINDPKHVPSHDTPVRRTKREIAHMHDYHD
A.gallica	193	FTLHLALAAQDGKEVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRNEEELAVVEMIEASIGYM
A.mellea	193	YTLHLALAAQDGKEVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRNEEELAVVEMIEASIGYM
A.ostoyae	193	FTLHLALAAQDGKEVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRNEEELAVVEMIEASIGYM
M.chlorophos	177	CTLHLALAAQDAKQVLQKGWGQRHPLAGPGMPGPPTWTFIYAPRTEEEVQVVEVIVEASIAM
M.citricolor	176	FTLHLALAAADGKEVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPNEWTFVYAPRNEEEMGVVEQIVEAIGYM
N.nambi	191	CTLHLALAAQDGKEVLKKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRNEEELAVVEMIEASIGYM
N.gardneri	187	CTLHLALAAQDGKEVLKKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRNEEELAVVEMIEAIGYM
O.olearius	180	CTLHLALAAQDGKEVLEKGWGQRHPLAGPGVPGPPTWTFIYAPRSEEEVAVVEMIEASVVM
P.stipticus	176	YTLHLALAAQDGKQVIAKGWGQRHPLAGPGMPGPPTWTFIYAPRNEAEVQVLETIEASIGYM
A.gallica	257	TN.DPAGVVIA
A.mellea	257	TN.DPAGKTIA
A.ostoyae	257	TN.DPAGTVIV
M.chlorophos	241	TNAEKPVELVQ
M.citricolor	240	SN.VPALE
N.nambi	255	TN.DPAGKIVENAK
N.gardneri	251	TN.DPAGKVVEATGK
O.olearius	244	TN.DPADKIVEATVQGTTE
P.stipticus	240	SN.APALGGSE

**Рисунок 35.** Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей люцифераз различных видов грибов. На рисунке представлены люциферазы из следующего списка видов: *Neonothopanus nambi*, *Neonothopanus gardneri*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*.

Все проанализированные образцы испускали свет с интенсивностью на порядок и более превышающей сигнал, исходящий от нетрансфицированных контрольных клеток (Рисунок 36). Таким образом, было показано наличие гомологичных генов люциферазы у

различных видов грибов и показана функциональная активность этих люцифераз в реакции с люциферинном грибов.

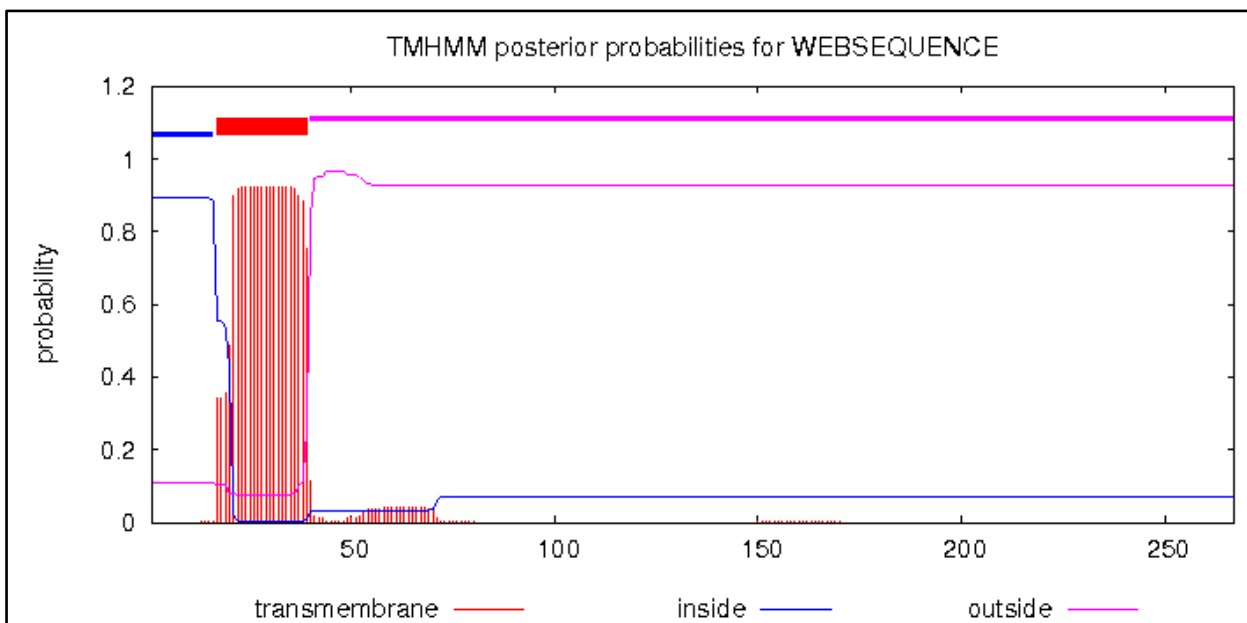


**Рисунок 36.** Иллюстрация характера изменения интенсивности биолуминесценции клетками линии HeLa Kyoto (А) и HEK293Т (В), экспрессирующими гены люцифераз *Neonothopanus nambi* (1), *Armillaria mellea* (2), *Mycena citricolor* (3), *Armillaria ostoyae* (4), *Mycena chlorophos* (5), *Armillaria gallica* (6), *Panellus stipticus* (7), *Omphalotus olearius* (8), а также нетрансфицированными контрольными клетками (9), со временем.

### 3.2.6 Получение функциональных фрагментов люциферазы *N. nambi* в клетках *E. coli*

Попытки клонировать полноразмерную грибную люциферазу в бактериальных клетках показали довольно низкую активность последней в лизатах бактерий экспрессионного штамма. Было сделано предположение, что синтез белка и его правильное сворачивание затруднены вследствие того, что грибная люцифераза является мембранным белком. Также этот факт затрудняет очистку данного белка, имеющего гистидиновую метку, поскольку белок находится в микросомальной фракции в нерастворимом виде и для перевода его в раствор требуется солубилизация в присутствии детергентов, образующих смешанные мицеллы с липидами мембран и другими белками, присутствующими в микросомальной фракции.

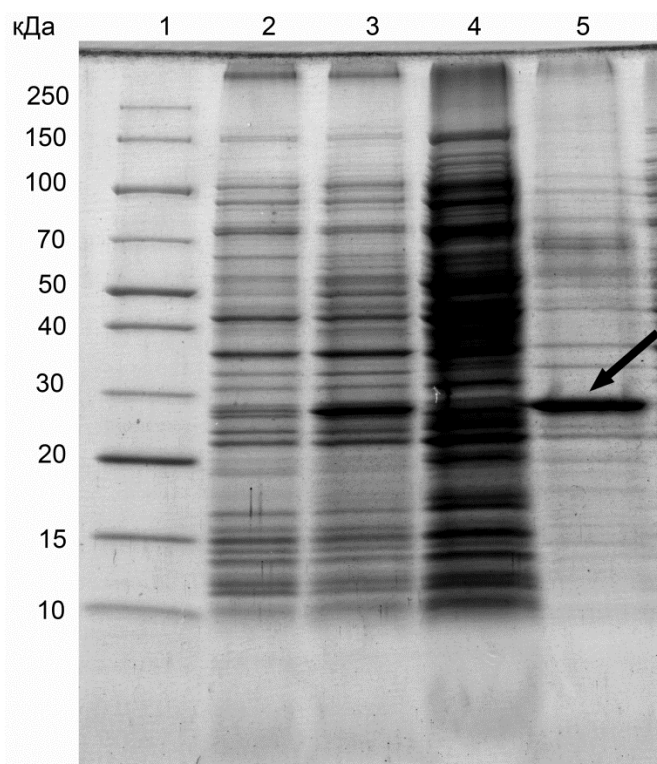
Анализ аминокислотной последовательности люциферазы из *N. nambi* с помощью программного обеспечения ТМНММ-server, приведенного в [<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/>] показал, что в состав первых 40 аминокислот предположительно входит трансмембранный домен (Рисунок 37). Было решено удалить трансмембранный домен, полностью или частично, постаравшись предотвратить потерю функциональной активности люциферазы. Открытые рамки считывания, кодирующие укороченные фрагменты люциферазы из *N. nambi*, получали с помощью ПЦР со специфических праймеров. Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты люциферазы с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 и 40 аминокислотными остатками, клонировали в вектор рЕТ-23b. Вектор использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus. Клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин и хлорамфеникол, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Колонии *E. coli* затем опрыскивали раствором люциферина и визуализировали в биоимиджере IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) для определения функциональности экспрессируемых фрагментов люцифераз. Было обнаружено, что колонии, содержащие фрагменты люцифераз с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 аминокислотными остатками, испускают свет при опрыскивании раствором люциферина. На основании полученных данных был сделан вывод, что удаление последовательности, содержащей гипотетический трансмембранный домен, не влияет на способность люциферазы *N. nambi* катализировать реакцию окисления 3-гидроксигиспидина, сопровождающуюся испусканием света.



**Рисунок 37.** Результаты компьютерного анализа вероятности наличия трансмембранного домена в люциферазе *Neonothopanus nambi* с помощью программного обеспечения TMHMM-server, приведенного в [<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>].

### 3.2.7 Экспрессия рекомбинантной люциферазы *N. nambi* в клетках *E. coli*

Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты люциферазы с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 и 40 аминокислотными остатками, клонировали в вектор pET-23b, который затем использовался для трансформации клеток бактерий штамма BL21-CodonPlus. Наличие ожидаемого рекомбинантного продукта в клетках подтверждали с помощью электрофореза. Пример подобного анализа для фрагмента люциферазы *N. nambi* с удаленными N-концевыми 37 аминокислотными остатками показан на Рисунке 38. Не смотря на удаление участка предсказанного трансмембранного домена, экспрессия гена люциферазы грибов в клетках бактерий приводила к накоплению рекомбинантного белка в нерастворимой фракции – тельцах включения.



**Рисунок 38.** Гель-электрофорез клеточных лизатов бактерий *E. coli*, трансформированных вектором PET-23b, содержащим нуклеотидную последовательность люциферазы *Neonothopanus nambi* с удаленными N-концевыми 37 аминокислотными остатками. Дорожка 1 – белковый маркер Page Ruller Broad Range Stained Protein Ladder, (Thermo Scientific, #26630). Дорожка 2 – лизат клеток до индукции IPTG экспрессии гена люциферазы. Дорожка 3 – лизат клеток после индукции IPTG и культивации в течение ночи при 25°C и интенсивном перемешивании. Дорожка 4 – лизат клеток после индукции IPTG и культивации в течение ночи при 25°C и интенсивном перемешивании. Супернатант после центрифугирования в течение часа при 140,000 x g. Дорожка 5 – тельца включения, растворенные в буфере с мочевиной. Гель окрашивали Coomassie Blue G-250. Полоса, соответствующая люциферазе, обозначена стрелкой.

На гель-электрофорезе на дорожках 3 и 5 хорошо заметна полоса в области 28 кДа, примерно соответствующая ожидаемой молекулярной массе люциферазы грибов. Соответствие данной полосы именно люциферазе подтверждено данными масс-спектрометрии (Рисунок 39). Однако, несмотря на наличие активной люциферазы в растворимой фракции (что подтверждается наличием биoluminesцентной активности в ней, детектируемой приборами), большая часть рекомбинантного белка находится в тельцах включения, что указывает на наличие проблем с правильным сворачиванием белковой глобулы данного фермента в прокариотических клетках.

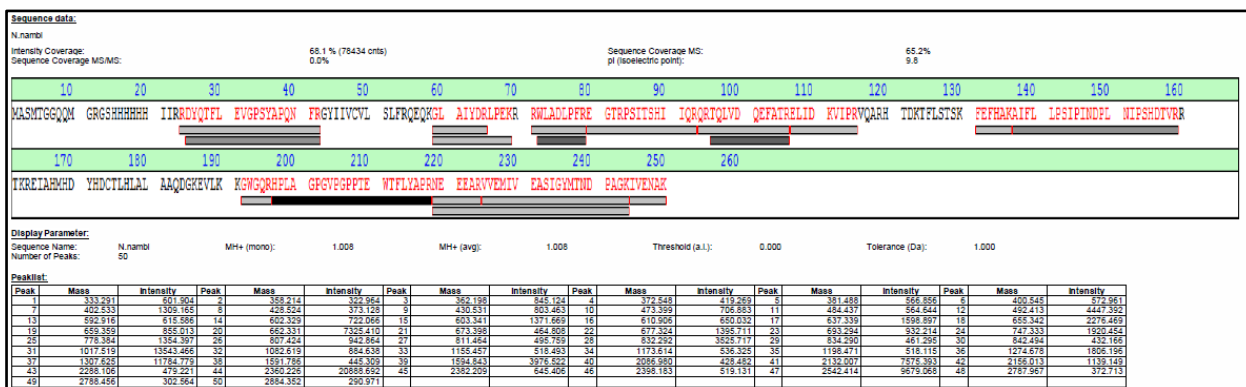
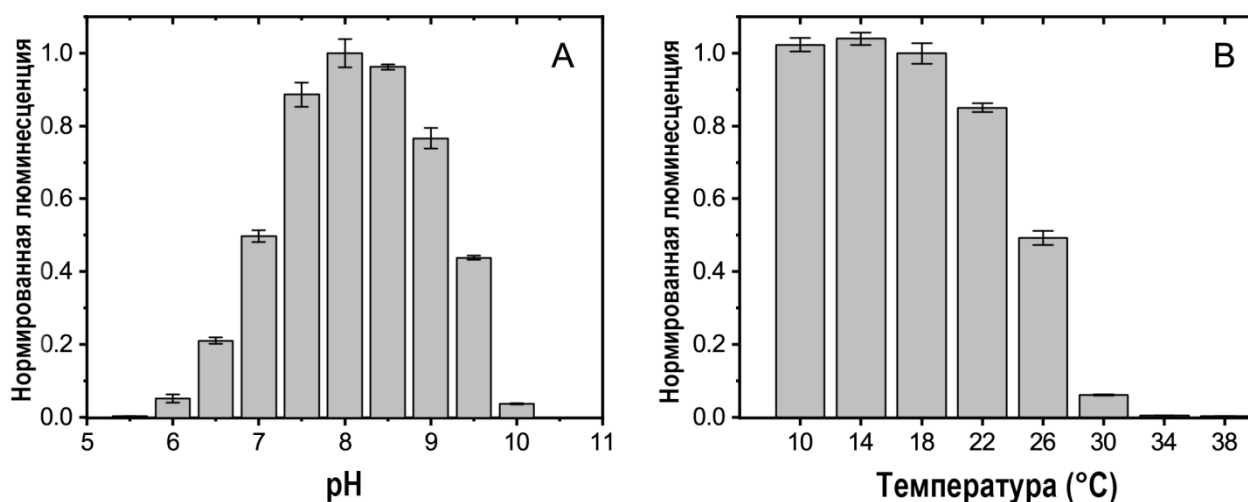


Рисунок 39. Данные масс-спектрометрии полосы 28 кДа вырезанной из ПААГ.

### 3.2.8 Ренатурация рекомбинантной люциферазы *N. nambi*

Поскольку при экспрессии люциферазы в клетках *E. coli* большая часть рекомбинантного белка находится в тельцах включения, было принято решение разработать метод ренатурации люциферазы. Оптимизированный метод содержал следующие стадии: растворение телец включения в денатурирующем буфере в течение ночи; металл-аффинная хроматография в денатурирующих условиях; непосредственно ренатурация фермента методом разбавления буфером, не содержащем денатурирующих агентов; и концентрирование препарата ренатурированной люциферазы. Полученные при помощи люминометра данные показали, что ренатурированная люцифераза обладает способностью к люминесценции в присутствии люциферина, и полностью функциональна, что дало возможность использовать препарат ренатурированной люциферазы в последующих экспериментах. Например, данный препарат был использован для экспериментов по определению зависимости активности люциферазы *N. nambi* от различных значений рН и температуры. (Рисунок 40).



**Рисунок 40.** Зависимость активности люциферазы *N. nambi* от различных значений pH и температуры. Суммарное световое излучение реакционной смеси за 100 сек в буферных системах с различными значениями pH (А) или после 10 мин предварительной инкубации люциферазы при различных температурах (В). Данные представлены с указанием стандартных отклонений не менее чем для трех измерений.

### 3.3 Примеры применения рекомбинантной люциферазы *N. nambi*

После установления аминокислотной последовательности люциферазы *N. nambi* был сделан ряд экспериментов по применению данного фермента в традиционных для люцифераз приложениях: в первую очередь таких, как мечение культуры клеток и мечение клеток внутри целого организма. Данные эксперименты были выполнены при участии сотрудницы группы синтеза природных соединений ИБХ РАН Надежды Маркиной, сотрудника РНИМУ им. Пирогова Максима Абакумова, а также сотрудника лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН Федора Ерошкина.

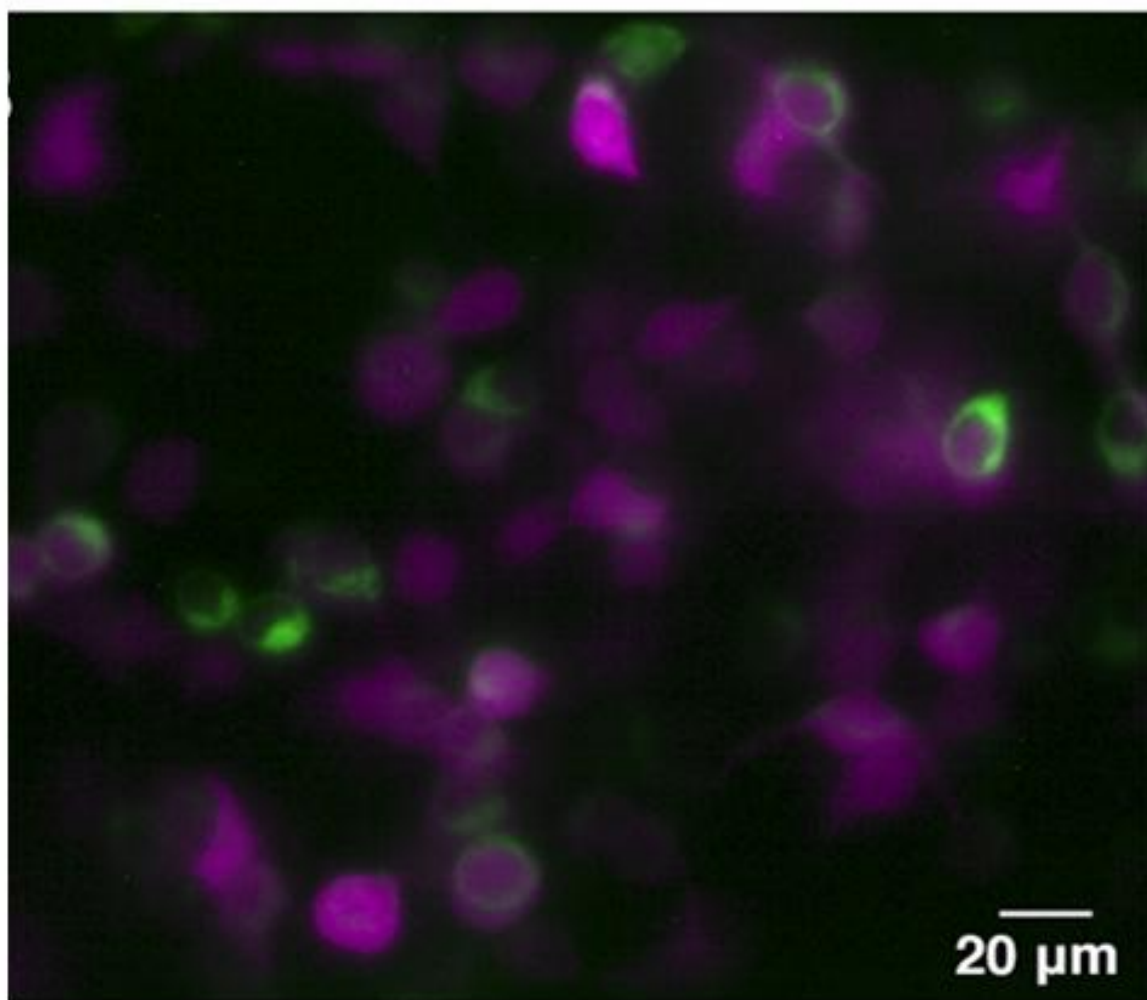
#### 3.3.1 Использование люциферазы *N. nambi* для мечения клеток

Кодирующую последовательность люциферазы оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих (гуманизировали). Гуманизированную нуклеиновую кислоту получали методом олигонуклеотидного синтеза по стандартным методикам. Полученную нуклеиновую кислоту клонировали в вектор pKatushka2S-C1 (Евроген, Россия), вместо последовательности, кодирующей белок Katushka2S.

Вектор, содержащий люциферазу *N. nambi* под контролем цитомегаловирусного промотора, котрансфицировали с вектором pTurboFP635-N (Евроген, Россия),



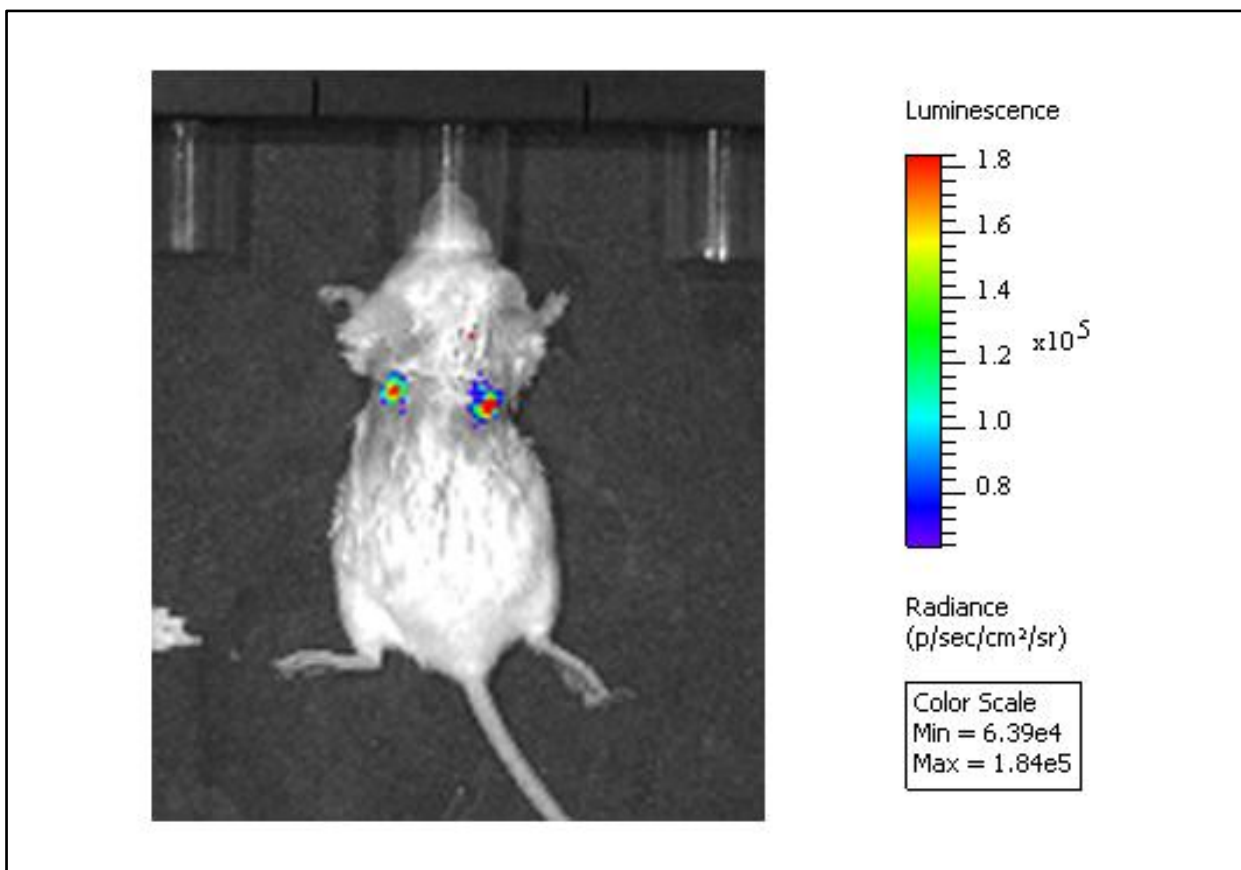
кодирующим красный флуоресцентный белок, в клетки линии HEK293NT. Спустя 24 ч после трансфекции в среду добавляли 3-гидроксигиспидин, а свечение клеток анализировали с помощью микроскопа Leica DM6000 с объективом 20х. Клетки визуализировали в проходящем свете, в канале для детекции зеленой флуоресценции и в канале для детекции красной флуоресценции (Рисунок 41). Экспрессия гена люциферазы *N. nambi* в клетках человека приводила к появлению отчетливого светового сигнала в зеленой области спектра. Никаких проявлений токсичности экспрессии гена люциферазы для клеток обнаружено не было.



**Рисунок 41.** Клетки линии HEK293NT, котрансфицированные вектором pTurboFP635-N и вектором, содержащим ген люциферазы, после добавления люциферина. Представлено наложение изображений, полученных в красном канале пропускания (TurboFP635), на изображения в зеленом канале пропускания при отсутствии возбуждающего облучения (люцифераза).

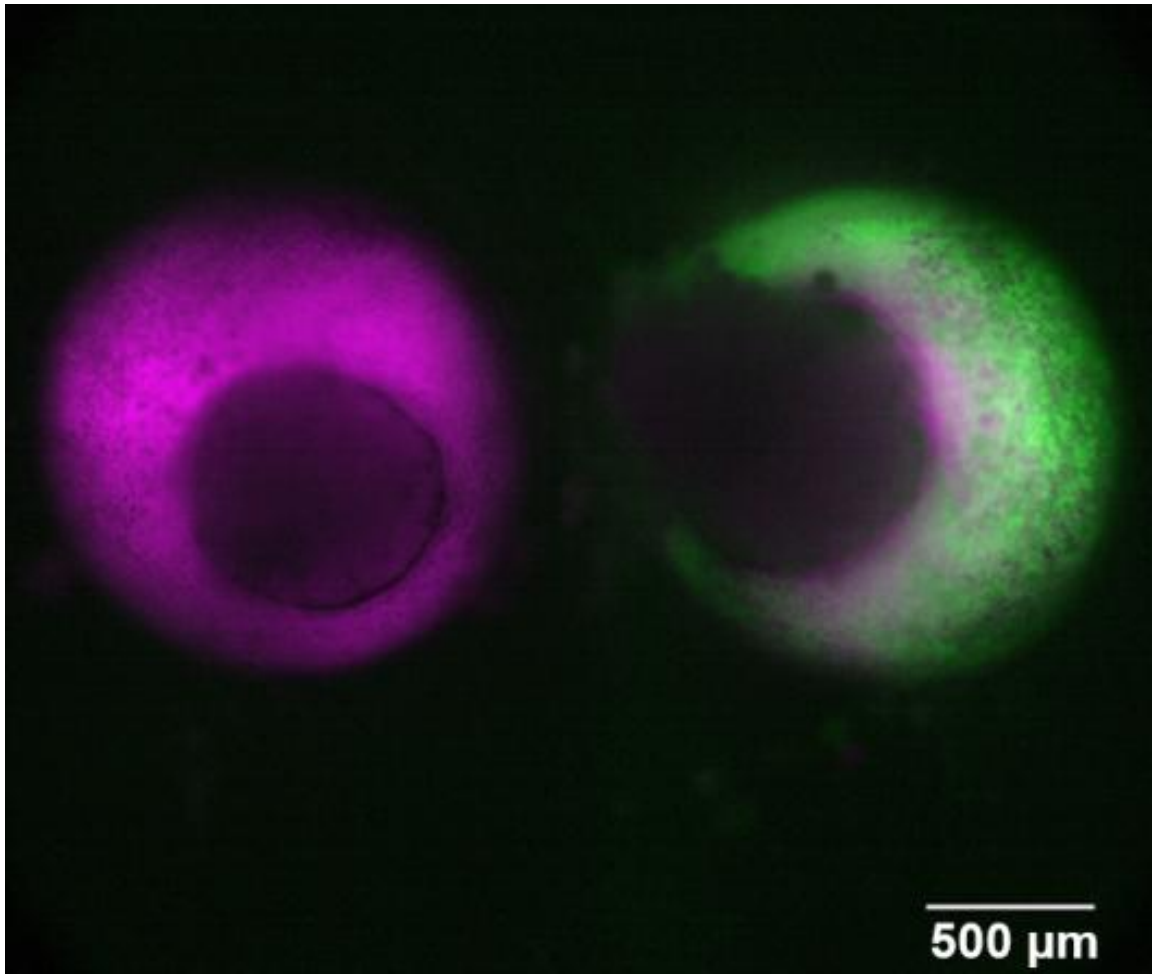
### 3.3.2 Использование люциферазы *N. nambi* для мечения клеток внутри целого организма

В качестве модельных организмов при проведении экспериментов по мечению клеток внутри целого организма были выбраны мышь и эмбрионы лягушки *Xenopus laevis*. Для проведения экспериментов на мышах использовался вектор, содержащий кодирующую последовательность люциферазы *N. nambi* под контролем цитомегаловирусного промотора. Дополнительно была синтезирована гуманизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая люциферазу светлячка *Photinus pyralis*, и клонирована в такой же вектор. Полученные конструкции использовали для трансфекции клеток линии СТ26 (клетки карциномы *Mus musculus*). Клетки, экспрессирующие ген люциферазы *N. nambi*, были инъецированы подкожно в левую часть спины мыши, в то время, как клетки, экспрессирующие ген люциферазы *P. pyralis*, инъецированы таким же образом в правую половину спины мыши. Спустя 10 минут после инъекции, смесь люциферина грибов (0.5 мг) и люциферина светлячка (0.5 мг) была введена мышам внутривентрально. Билюминесценция была затем визуализирована с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT (PerkinElmer). Интенсивность светового сигнала от обеих опухолей была практически идентична (Рисунок 43). Данный факт свидетельствует о том, что люцифераза грибов не уступает по эффективности люциферазе светлячка в данном типе приложений.



**Рисунок. 42.** Мышь с вживленными под кожу спины клетками линии CT26, экспрессирующими ген люциферазы *N. nambi* (левая сторона) и ген люциферазы *Photinus pyralis* (правая сторона) после интраперитонеального введения раствора, содержащего смесь люциферинов грибов и светлячка. Представлено наложение фотографий мыши при дневном свете и зарегистрированного светового сигнала от вживленных опухолей, полученных с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT. Цветовая шкала справа показывает интенсивность сигналов.

Для проведения эксперимента на эмбрионах лягушки *Xenopus laevis* получали мРНК люциферазы *N. nambi* методом транскрипции *in vitro* и инъектировали ее в эмбрионы *Xenopus laevis* на двухклеточной стадии в оба бластомера. Для визуализации на стадии ранней гаструлы (стадия 10.5) в эмбрионы инъектировали раствор люциферина в бластоцель. Свечение эмбриона после окрашивания родамином детектировали при помощи микроскопа Leica DM6000, в каналах микроскопа для детекции зеленой и красной флуоресценции (Рисунок 43).



**Рисунок 43.** Экспрессия гена люциферазы *N. nambi* в эмбрионе *Xenopus laevis*. Правый эмбрион был инъецирован смесью родамин лизин декстрана и мРНК люциферазы *N. nambi* на двухклеточной стадии развития, затем на стадии гаструлы в бластоцель вводили раствор люциферина. Левый эмбрион инъецировали только родамин лизин декстраном и использовали в качестве негативного контроля. Флуоресценция родамина показана розовым цветом, биолюминесценция – зеленым. Представлено наложение изображений эмбрионов в каналах микроскопа для детекции зеленой и красной флуоресценции, полученных с использованием микроскопа Leica DM6000.

## Выводы

1. Впервые установлены нуклеотидные последовательности генов люцифераз люминесцентных грибов на примере видов *Neonothopanus nambi*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius* и *Panellus stipticus*.
2. Впервые показана люминесцентная активность люцифераз грибов при гетерологической экспрессии в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих. Таким образом, найдено новое семейство белков – люциферазы грибов.
3. Люцифераза грибов впервые успешно применена в практических приложениях: люминесцентное мечение как отдельных клеток, так и клеток внутри целого организма (мышь, эмбрионы шпорцевой лягушки).
4. Методами генной инженерии получены, клонированы и экспрессированы функциональные укороченные варианты люциферазы *Neonothopanus nambi*.

### Список сокращений

DTT	дитиотреитол
PMSF	фенилметилсульфонилфторид
TCEP	трис(2-карбоксиэтил)фосфин
АТФ	аденозинтрифосфат
ДДМ/DDM	додецилмальтозид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЦР/PCR	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
ФМН	флаavinмоноклеотид
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
FRET	ферстеровский резонансный перенос энергии
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
IPTG	изопропилтиогалактозид
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
SDS	додецилсульфат натрия

## Приложение 1

**Таблица использованных в работе праймеров.**

1	5'-AATTGGATCCCAGAGGCTCGC-3'
2	5'-GGCCGCGAGCTCTGGGATCC-3'
3	5'-CCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGA-3'
4	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
5	5'-CCTCCTTCGAAATGCGCATTAACATTAGCCTCTC-3'
6	5'-TCTTTGTCGACCTTGGCGTTTTTCTACAATCTTTC-3'
7	5'-GGATCCCGCATTAACATTAGCCTCTC-3'
8	5'-AAGCTTTCACCTTGGCGTTTTTCTACAATCTTTC-3'
9	5'-TTTTGGATCCCTCTCGTCTCTCTTCGAACGT-3'
10	5'-TTTTGGATCCCTCTTCGAACGTCTCCTCAAAC-3'
11	5'-TTTTGGATCCCGTCTCTCCAACTTAGCAGTC-3'
12	5'-TTTTGGATCCAACTTAGCAGTCGCAGCATAG-3'
13	5'-TTTTGGATCCAGTCGCAGCATAGCGATTACAT-3'
14	5'-TTTTGGATCCATAGCGATTACATGTGGAGTTGT-3'
15	5'-TTTTGGATCCTGTGGAGTTGTTCTCGCCTCC-3'
16	5'-TTTTGGATCCGTTCTCGCCTCCGCAATCGC-3'
17	5'-TTTTGGATCCTCCGCAATCGCCTTCCCATC-3'
18	5'-TTTTGGATCCGCCTTCCCATCATCCGCAG-3'
19	5'-TTTTGGATCCATCATCCGCAGAGACTACCAG-3'
20	5'-TTTTAAGCTTTCACCTTGGCGTTTTTCTACAATCTTTC-3'
21	5'-AGTCGCTAGCACCGCCATATGCGCATTAACATTAGCCTCT-3'
22	5'-AGTCAGATCTTCACCTTGGCGTTTTTCTACAATCT-3'

## Приложение 2

### Кодирующие последовательности люцифераз из различных видов грибов.

#### *Neonothopanus nambi*

ATGCGCATTAAACATTAGCCTCTCGTCTCTCTTCGAACGTCTCTCCAAACTTAGCAGT  
CGCAGCATAGCGATTACATGTGGAGTTGTTCTCGCCTCCGCAATCGCCTTTCCCAT  
CATCCGCAGAGACTACCAGACTTTCCTAGAAGTGGGACCCTCGTACGCTCCGCAG  
AACTTTAGAGGATACATCATCGTCTGTGTCTCTCGCTATTCCGCCAAGAGCAGAA  
AGGGCTCGCCATCTATGATCGTCTTCCCGAGAAACGCAGGTGGTTGGCCGACCTT  
CCCTTTCGTGAAGGAACCAGACCCAGCATTACCAGCCATATCATTAGCGACAGC  
GCACTCAACTGGTTCGATCAGGAGTTTGCCACCAGGGAGCTCATAGACAAGGTCAT  
CCCTCGCGTGCAAGCACGACACACCGACAAAACGTTCCCTCAGCACATCAAAGTTC  
GAGTTTCATGCGAAGGCCATATTTCTCTTGCCCTTCTATCCCAATCAACGACCCTCT  
GAATATCCCTAGCCACGACACTGTCCGCCGAACGAAGCGCGAGATTGCACATATG  
CATGATTATCATGATTGCACACTTCATCTTGCTCTCGCTGCGCAGGATGGAAAGGA  
GGTGCTGAAGAAAGGTTGGGGACAACGACATCCTTTGGCTGGTCCTGGAGTTCCT  
GGTCCACCAACGGAATGGACTTTTCTTTATGCGCCTCGCAACGAAGAAGAGGCTC  
GAGTAGTGGAGATGATCGTTGAGGCTTCCATAGGGTATATGACGAACGATCCTGC  
AGGAAAGATTGTAGAAAACGCCAAG

#### *Armillaria gallica*

ATGTCCTTCATCGACAGCATGAAACTTGACCTCGTCCGACACCTCTTTGGCATCAG  
GAATCGCGGCTTAGCCGCCGCTTGTTGTGCTCTAGCAGTCGCCTCTACTATCGCC  
TTCCCTTACATTCGTAGGGACTACCAGACATTTTTATCTGGCGGTCCCTCTTACGCT  
CCCCAGAATATCAGAGGATATTTTCATCGTCTGCGTTCTGGCCTTGTTCCGTCAGGA  
GCAAAAGGGCCTTGCGATATATGATCGCCTTCCCGAGAAGCGCAGGTGGCT  
CTCTTCGACTTGCCCTCCTCGCAATGGCCCGCGGCCGATCACGACCAGCCATATAA  
TCCAAAGACAGCGCAACCAGGCGCCGGACCCCAAGTTCGCCCTCGAGGAACTCA  
AGGCCACGGTTATTCCACGGGTGCAGGCTCGCCATACTGACCTCACCCATCTCAG  
CCTATCCAAATTCGAGTTCATGCTGAAGCAATTTTCTGCTCCCTCTGTACCCAT  
CGATGATCCAAAAAATGTTCCAAGTCACGACACGGTGCGCAGGACGAAAAGGGAG  
ATCGCGCATATGCACGACTACCATGACTTCACGCTGCATCTTGCACTGGCCGCC



AAGACGGGAAGGAAGTCGTGTCGAAGGGATGGGGGCAGCGACACCCCCTAGCAG  
GCCCTGGCGTTCCTGGTCCACCTACGGAGTGGACATTTATTTATGCGCCACGTAA  
CGAAGAGGAAGTGGCAGTGGTGGAAATGATTATCGAGGCATCAATAGGCTATATG  
ACCAATGACCCTGCTGGAGTAGTTATCGCA

*Armillaria mellea*

ATGTCCTTCTTCGACAGCGTGAAACTTGACCTCGTCGGACGCCTCTTTGGCATCAG  
GAATCGCGGCTTAGCTGTTACTTGTTGTGCTGTGGCAGTCGCCTCTATCATCGCGT  
TCCCTTACATTCGTAGGGACTACCAGACATTTTTATCTGGGGGTCCCTCCTACGCT  
CCCCAGAACATCAGAGGATACCTCATTGTCTGCGTCCTGGCCTTGTTCCGTCAGG  
AGCAAAAAGGCCTTGCGATATACGACCGCCTTCCCGAGAAGCGCAGGTGGCTACC  
TGACTIONCCTCGCGATGGCCCACGGCCCATCACGACCAGCCATATAATCCAA  
AGACAGCGCAACCAGGCGCCGGACCTCAAGTTCGCCCTCGAGGAACTCAAGGCC  
ACGGTCATTCCACGGGTGCAGGCTCGCCACACTGACCTCACCCATCTCAGCCTAT  
CCAAGTTCGAGTTCCATGCTGAAGCAATCTTCTGCTCCCCTCTGTACCCATCGAT  
GATCCAAAGAATGTGCCAAGTCACGACACGGTGCGCAGGACGAAGAGGGAAATTG  
CGCATATGCACGACTACCATGACTACACGCTGCATCTTGCGTTGGCCGCCCAAGA  
CGGGAAGGAAGTCGTATCAAAGGGATGGGGGCAGCGACACCCGCTGGCAGGCC  
TGGCGTTCCTGGTCCACCGACGGAGTGGACGTTTATTTATGCGCCACGTAACGAA  
GAGGAGCTGGCAGTGGTGGAAATGATTATCGAGGCATCGATAGGCTATATGACCA  
ATGACCCTGCAGGAAAACTATCGCATAG

*Armillaria ostoyae*

ATGTCCTTCATCGACAGCATGAAACTTGACTTCGTTCGGACACCTCTTTGGCATCAG  
GAATCGCGGCTTAGCCACCGCTTGTTGTGCTGTGGCAGTCGCTTCTGCCATCGCC  
TTCCCTTACATTCGTAGGGACTACCAGACATTCTTATCTGGCGGTCCCTCTTACGC  
TCCCCAGAACATCAAAGGATATCTCATCGTCTGCGTCCTGGCCTTGTTCCGTCAGG  
AGCAAAAAGGCCTTGCGATATATGACCGCCTTCCCGAGAAGCGCAGGTGGCTACC  
TGACTIONCCTCGCAATGGCCCGCGGCCCATCACGACCAGCCATATAATCCAA  
AGACAGCGCAACCAGGCGCCAGACTCCAAGTTCGCCCTCGAGGAACTCAAGGCTA  
CGGTCATTCCACGGGTGCAGGCTCGCCACACTGACCTCACCCATCTCAGCCTATC  
CAAGTTCGAGTTCCATGCTGAAGCAATCTTCTGCTCCCCTCTGTACCCATCGATG  
ATCCAAAAAATGTTCCAAGTCATGACACGGTGCGCAGGACGAAGAGGGAGATCGC  
GCATATGCACGACTACCATGACTTTACGTTGCATCTTGCACTGGCCGCCCAAGACG  
GGAAGGAAGTCGTGGCGAAGGGATGGGGGCAGCGACACCCGCTGGCAGGCCCT

GGCGTTCCTGGTCCACCTACGGAGTGGACGTTTATTTATGCGCCACGTAACGAAG  
AGGAACTGGCAGTGGTGGAAATGATTATCGAGGCATCAATAGGCTATATGACCAAT  
GACCCTGCTGGAACAGTTATCGTATAG

*Mycena chlorophos*

ATGGTCCAACCTCACCCGAACCTCCGGATTCATCGCCGCTGCGGCCATTGTTGCTG  
CCATCGCCTTCCCCTTCATTCGTGCGAGACTACCAGACGTTCCCTTCGTGGTGGGCC  
GTCCTATGCCCCACAGAACATCCGCGGCTATATCATCGTCCTGGTTCTGTCCCTCT  
TCCGCGGCGAGGAGAAGGGTCTTGCAATCTACGAGCCCCTTCCTGAGAAGCGCA  
CATGGCTGCCGGAGCTTCCGCGGCGCGCGGGAGACCGGCCCAAGACGACGAGC  
CACATCATCCAACGGCAGCTCGACCAGTACCCCGACCCGGACTTTGTCCCTCAAAG  
CCCTGAAAGCGACGGTCATCCCGCGTGTCCAAGCCCGGCACACAGACAAGACTCA  
CCTCGCGCTGTCCAAGTTCGAGTTCCATGCTGAGGCCATCTTCGTGCGCCCGGAA  
ATCGCCATCGACGACCCGAAGCATATCCCAGCCACGACACGGTGGCAGCGGACG  
AAGCGCGAGATTGCGCACATGCACGACTATCACGACTGCACGCTGCATTTGGCGC  
TAGCGGCGCAGGACGCGAAGCAGGTGCTGCAGAAGGGCTGGGGCCAGCGCCAT  
CCGCTGGCAGGGCCTGGGATGCCCGGGCCGCCACGGAGTGGACGTTCTTGTAT  
GCCCGGAGGACCGAGGAGGAAGTGAAGGTTGTGGAGACCATTGTCGAGGCCTCT  
ATCGCGTACATGACGAACGCGGAGAAGCCGGTTCGAGCTGGTGCAAG

*Mycena citricolor*

ATGGCTTATCAGCTCACTTGGATTCAGACTCTCGTGCTGGGTGCCCTTGTGGCAAT  
GGCAGTAGCGTTCCCCTTCATCAAGAAAGACTACGAGACGTTCCCTGAAGGGCGGC  
CCCTCCTATGCGCCCCAAAACGTTCCGCGGATACATCATCGTGCTCGTGCTCGCGC  
TCTTCCGCCAAGAGCAGCTCGGGCTGGAGATCTACGACCGCATGCCCGAGAAAC  
GTCGCTGGCTCGCGAATCTCCCTCAGCGCGAGGGCCCCCGCCCCAAGACCACAA  
GTCACATCATCCAGCGGCAGCTCAGCCAGCACACGGACCCCGCATTCCGGCGCCG  
CGTACCTCAAAGACACCGTCATTCCGCGCGTCCAGGCGCGGCACGCAGCCAACA  
CGCACATCGCGCGCTCGACGTTCCGAGTTCCACGCCCGCCGCGATCTTCCTGAACGC  
GGACGTGCCGCTGCCCGAGGGCCTGCCCGCAAGCGAGACGGTGGCGGCGGACCA  
AGGGCGAGATCGCGCACATGCACGACTACCACGACTTCACGCTGCACCTCGCGCT  
CGCAGCAGCGGATGGGAAGGAGGTGGTCGGCAAGGGCTGGGGGCAGCGCCATC  
CGCTGGCGGGACCCGGCGTGCCGGGTCCGCCGAACGAGTGGACCTTTGTGTATG  
CGCCGAGGAATGAAGAGGAGATGGGCGTGGTTCGAGCAGATCGTAGAGGCGGCGA  
TTGGGTACATGTGCAACGTGCCTGCGCTGGAA

*Omphalotus olearius*

ATGCTCCCAGCTTTTCATCTACAAACCAAGGCTAGTGATCACTTGTGTATTTCGTTCTG  
GCCTCCGCACTCGCATTTCCTTCATACGCAAAGATTACCAGACTTTCCTGGAGGT  
GGGACCCTCGTACGCCCGCAGAACCTCCAAGGATACATCATCGTCTGTGTACTC  
TCTCTGTTCCGGCAAGAACAGAAAGACGTAGCGATTTATGATCGCCTTCCTGAGAA  
AAGGAGGTGGTTAGGAGACCTCCCGTTTTCGCGAGGGGCCAAGACCGAGTATCACT  
AGCCATATCATCCAGCGACAGCGCACCCAATTGGCTGACGCCGAGTTCGCTACCA  
AAGAGCTGATAGGCAAATCATCCCTCGCGTCCAAGCCCGACACACCAACACAAC  
ATTCCTCAGCACATCTAAATTCGAATTCCACGCCAGGCCATCTTCCTTTTGCCCTC  
TATCCCAATCAACGACCCTCAAACATTCCAAGCCACGATACCGTTCGTGCGACGA  
AACGCGAGATCGCGCATATGCATGATTATCACGACTGTACGTTGCATCTCGCACTT  
GCTGCTCAAGATGGGAAGGAGGTTTTAGAGAAAGGATGGGGTCAGCGACATCCTC  
TTGCTGGACCTGGTGTTCCTGGCCCGCCGACGGAGTGGACGTTTCTTTATGCACC  
GCGCAGCGAAGAGGAGGTTCCGGTGTGGAGATGATTGTTGAGGCATCAGTTGTG  
TATATGACGAATGATCCTGCGGATAAAATCGTAGAAGCTACTGTGCAGGGTACTGA  
AGAATAG

*Panellus stipticus*

ATGAACATCAACCTGAAAGCTCTGATCGGAGTCTGTGCCGTGCTCATCACCGCTG  
CAGTGTTCCCCTTCGTTTCGTAAAGACTATCACACCTTTCTTGAAGGTGGACCATCC  
TACGCGCCGCAGAATTTGCAAGGCTATATCATCGTGTGGTGTCTCTACTCTTTTCG  
AGGGGAGGAGACGGGATTGGAATATACGACCGCTTGCCCGAAAAACGCCGCTG  
GCTCGAGGAGCTGCCTGTTTCGCGAAGGCCCGCGCCCAAAGACAACCAGCCACAT  
CATTGAGAGACAGTTGAATCAGCACGTTGACCCGGACTTCGGAATGAACTCTTTGA  
AAGGCTCCGTCATCCGGCGCCTTCAATCCCGCCACCAGGACATAACTCAACTCGC  
ACTCTCGAAATTCGAATTCCACGCCGAGGCCATATTTCTGCGCCCCGATGTCGCG  
ATCAACGATCCCAAACACGTCCCGAGCCACGACACGGTGCGCCGCACAAAGCGC  
GAGATAGCTCACATGCACGACTACCATGATTACACGTGTCATTTGGCGCTCGCAGC  
GCAGGATGGGAAGCAAGTGATTGCAAAGGGTGGGGCCAGAGACATCCGCTCGC  
CGGACCGGGCATGCCGGGGCCCGCCGACGGAGTGGACATTTTTGTATGCGCCGAG  
GAATGAGGCGGAGGTTCAAGTGTTGGAGACGATTATCGAAGCGTCAATCGGGTAC  
ATGTCGAACGCACCAGCCTTGGGTGGGAGCGAG

### Приложение 3

#### Гуманизированные кодирующие последовательности люцифераз из различных видов грибов

##### *Neonothopanus nambi*

ATGCGCATTAACATCTCCCTTTTCATCTCTTTTTCGAGCGATTGAGCAAACCTGAGTTCC  
AGGAGTATTGCAATCACTTGTGGGGTTGTCTCGCGAGCGCCATCGCATTCCCCA  
TCATCCGGAGAGATTATCAGACGTTTCTTGAGGTGGGCCCTAGCTATGCACCACA  
GAACTTCCGAGGATATATCATCGTGTGTGTACTGTCACTGTTTAGGCAAGAACAAA  
AGGGATTGGCTATCTATGATAGGTTGCCTGAGAAACGGCGGTGGCTCGCTGATCT  
CCCATTTAGAGAGGGGACACGACCGAGCATCACTTCACACATCATACAAAGACAG  
CGAACGCAGCTCGTTGACCAAGAGTTCGCAACTAGGGAACCTGATTGATAAGGTGA  
TACCCAGAGTACAGGCGCGACACACCGATAAACTTTTCTTTCCACCTCTAAATTC  
GAGTTCCATGCCAAAGCTATTTTCTTGTTGCCTTCCATACCGATTAATGATCCTCTG  
AATATTCCATCCCACGACACAGTTCGACGGACGAAACGCGAAATTGCGCACATGC  
ACGACTATCACGATTGCACTTTGCACCTGGCACTGGCTGCTCAAGACGGAAAAGA  
AGTTCTGAAAAGGGTTGGGGGCAAAGACATCCGCTGGCGGGACCCGGTGTACC  
TGGGCCGCTACGGAATGGACATTTTTGTACGCACCGAGGAACGAAGAGGAGGC  
CAGGGTCGTTGAGATGATTGTTGAGGCTAGTATTGGGTACATGACGAATGATCCG  
GCTGGTAAAATTGTTGAAAATGCAAAG

##### *Armillaria gallica*

ATGAGCTTTATAGACTCAATGAACTTGATCTTGTAGGACACCTCTTCGGCATAACG  
CAACAGAGGACTCGCAGCAGCCTGTTGCGCCCTTGCAGTAGCTTCCACGATAGCT  
TTCCCTTATATCCGCCGGGATTACCAAACGTTCCCTTAGCGGTGGCCCTTCTTACGC  
GCCACAGAACATACGAGGCTATTTTATCGTGTGTGTGCTCGCTCTGTTTCGCCAAG  
AACAGAAAGGGCTGGCGATTTATGACCGACTTCCCTGAGAAACGAAGGTGGCTTCC  
TGACCTTCCCTCCCCGGAATGGCCCTCGCCCGATTACGACCTCTCATATTATACAAA  
GACAGAGGAACCAAGCGCCAGATCCGAAATTTGCCCTGGAGGAGCTCAAGGCCA  
CTGTGATTCCACGAGTCCAAGCCCGCCATACGGATCTTACACATCTCAGTCTTAGC  
AAATTTGAGTTTCATGCCGAGGCAATTTTTCTTTTGGCGTCCGTTCCGATAGACGAC  
CCCAAAAATGTACCCTCACACGATACGGTCAGGCGCACAAAGAGGGAGATCGCCC

ATATGCATGACTATCACGACTTTACCCTGCATCTCGCTCTGGCGGCACAAGACGGC  
AAGGAGGTAGTCAGCAAAGGCTGGGGCCAAAGGCATCCGCTCGCGGGCCCAGGG  
GTTCCGGGGCCACCTACAGAGTGGACTTTCATCTATGCGCCGCGAAACGAGGAAG  
AACTCGCAGTAGTTGAGATGATCATAGAGGCATCAATTGGCTACATGACGAACGAT  
CCTGCCGGAGTCGTTATAGCC

*Armillaria mellea*

ATGAGTTTTTTTTGACTCTGTCAAACCTTGATCTGGTGGGACGGCTCTTCGGCATCCG  
AAACAGGGGACTTGCGGTTACTTGCTGCGCGGTAGCGGTCGCCTCTATTATCGCC  
TTCCCATACATTCGCCGCGACTATCAGACCTTCCTGTCAGGCGGACCTTCTTATGC  
ACCGCAGAATATAAGGGGCTATCTTATTGTTTGTGTACTGGCTCTCTTTCGGCAAG  
AACAAAAGGTCTGGCTATCTACGATAGACTTCCTGAGAAACGACGCTGGCTGCCA  
GATCTTCCCCCCCCGCGACGGCCCAAGGCCATAACAACAAGTCATATTATACAGA  
GACAACGGAACCAGGCCCCAGACCTCAAGTTTGCCCTCGAGGAGCTGAAAGCGA  
CTGTTATACCTAGAGTACAGGCGAGACATACAGACTTGACCCATTTGAGCCTGAGC  
AAGTTTGAATTCCATGCCGAAGCAATCTTTCTTCTGCCTTCCGTACCCATTGACGAT  
CCAAAAACGTCCCCTCACATGATACTGTAAGACGCACGAAGCGAGAGATCGCAC  
ACATGCACGACTACCATGACTACACTCTGCACCTTGCCTTGGCAGCTCAGGATGG  
CAAGGAAGTTGTATCCAAGGGGTGGGGCCAAAGACACCCCTTGGCTGGCCCGGG  
AGTGCCTGGACCCCGACCGAATGGACGTTTATTTACGCACCAAGGAACGAGGAA  
GAATTGGCCGTCGTTGAAATGATTATTGAAGCGTCCATAGGATATATGACCAACGA  
TCCGGCCGGAAGACAATCGCG

*Armillaria ostoyae*

ATGTCTTTTTATTGACAGTATGAAGCTTGATTTTCGTAGGTCACTTGTTTGGTATACGA  
AACCGAGGTCTCGCTACTGCGTGCTGCGCGGTGGCAGTAGCGAGTGCTATAGCAT  
TCCCGTATATCCGCCGAGATTACCAGACATTTCTTAGCGGTGGACCTAGCTATGCA  
CCCCAGAATATTAAGGGTATTTGATCGTTTGTGTGCTTGCCTGAGAAAAGGCGATGGTTGCCT  
GCAGAAGGGTCTTGCTATTTACGACCGACTGCCTGAGAAAAGGCGATGGTTGCCT  
GACCTTCCACCCAGAAACGGTCCCAGGCCATCACGACCTCACACATAATCCAAC  
GGCAGAGGAACCAGGCTCCAGATTCAAAGTTTGCCTTGGGAACTCAAGGCTAC  
TGTAATACCTAGAGTCCAGGCCAGACATACGGATCTCACCCATCTCAGCCTCAGTA  
AGTTTGAGTTTCATGCGGAAGCTATTTTCTGCTCCCGAGCGTACCCATTGATGAC  
CCAAGAATGTCCCCTCACATGATACGGTACGACGCACGAAGCGGGAGATAGCTC  
ACATGCACGACTACCATGATTTCACTCTGCATCTCGCCTTGGCAGCGCAGGATGG

CAAGGAGGTAGTAGCGAAAGGATGGGGGCAGAGACACCCGCTGGCAGGCCCTGG  
GGTCCCGGCCCTCCGACCGAATGGACATTTATCTATGCGCCCCGCAACGAAGAG  
GAGCTCGCAGTTGTTGAGATGATCATTGAAGCATCCATTGGGTACATGACAAATGA  
CCCAGCCGGTACAGTCATTGTT

*Mycena chlorophos*

ATGGTACAGCTCACGCGAACCTCAGGGTTTATTGCAGCGGCTGCGATTGTTGCCG  
CCATCGCGTTCCCGTTTATTCGACGGGACTATCAGACTTTTCTGCGAGGGGGCCC  
CTCATATGCCCCACAGAATATTCGCGGCTATATCATTGTCCTGGTCTTGTCCCTCTT  
CAGAGGAGAAGAAAAGGGTCTGGCTATCTATGAGCCGCTTCCAGAGAAACGGACG  
TGGTTGCCAGAGTTGCCTAGACGGGCGGGCGATAGACCCAAAACCTACCAGCCATA  
TAATACAACGACAACCTCGACCAATATCCCGACCCGGACTTCGTACTTAAAGCATTG  
AAAGCAACTGTAATACCGAGAGTTCAGGCAAGGCACACTGATAAAACCCATCTTGC  
ACTTTCCAAGTTTGAATTCCACGCCGAGGCAATCTTCGTCCGACCAGAGATAGCCA  
TAGACGATCCGAAACATATCCCAAGTCATGACACAGTCAGACGAACGAAACGGGA  
GATAGCCCATATGCATGATTATCATGACTGCACCCTGCACCTTGCCTTGCGGCAC  
AGGACGCAAAACAGGTCTTGCAAAAAGGATGGGGACAGAGACACCCCCTTGCCG  
GACCTGGCATGCCGGGTCCGCCTACTGAATGGACATTCCTCTACGCCCCGAGAAC  
TGAGGAGGAGGTGAAAGTGGTTGAAACCATAGTGGAGGCGAGTATAGCTTACATG  
ACCAATGCAGAAAAACAGTAGAACTCGTACAA

*Mycena citricolor*

ATGGCTTATCAGTTGACATGGATTCAGACTCTTGTATTGGGTGCTCTCGTGGCTAT  
GGCTGTTGCATTTCCATTCATCAAAAAGATTATGAGACCTTCTCAAGGGCGGCC  
CTTCATACGCCCCCGAATGTCCGCGGTTATATTATCGTACTCGTCCTCGCGCTG  
TTCAGACAAGAACAATTGGGGCTTGAGATATATGACCGCATGCCCGAAAAACGCA  
GGTGGCTCGCTAACCTCCCTCAACGGGAAGGTCCGCGACCGAAAACCACTAGCCA  
TATCATTAGCGCCAGCTCTCTCAGCATAACCGACCCCGCCTTTGGAGCGGCTTATC  
TGAAAGACACCGTAATCCCGCGAGTGCAGGCGCGGCATGCAGCGAACACTCACAT  
AGCGCGAAGTACGTTTCAATTTACGCAGCGGCTATCTTTCTCAACGCAGACGTG  
CCGTTGCCCGAAGGACTGCCAGCTAGCGAAACAGTGAGACGAACCAAAGGAGAAA  
TCGCGCACATGCACGATTACCACGATTTTACGCTGCACCTGGCACTTGCGGCAGC  
GGACGGGAAAGAGGTGGTTCGGCAAAGGATGGGGACAGAGACATCCACTCGCTGG  
CCCTGGGGTGCCTGGCCCTCCGAATGAGTGGACATTCGTGTACGCTCCCAGGAAC

GAGGAAGAGATGGGCGTAGTAGAGCAGATTGTAGAGGCTGCAATCGGTTACATGT  
CAAATGTCCCTGCTCTCGAG

*Omphalotus olearius*

ATGCTCCCGGCTTTCATATATAAACCGAGATTGGTCATTACGTGCGTTTTTGTTC  
GCTAGTGCATTGGCTTTTCCCTTCATAAGAAAGGACTATCAGACTTTCCTCGAAGT  
CGGGCCGTCTTATGCTCCTCAAACCTTCAAGGGTATATCATAGTCTGCGTATTGT  
CACTCTTCAGACAAGAGCAAAAAGATGTAGCCATATACGATAGACTCCCCGAGAAA  
AGAAGGTGGCTTGGTGACCTGCCGTTTCAAGAGAAGGGCCGCGCCCGTCTATTACCT  
CCCACATTATCCAACGCCAAAGAACGCAACTTGCTGATGCAGAGTTCGCAACAAAG  
GAGTTGATTGGGAAGATCATTCCGAGGGTGCAGGCAAGGCATACAAATACCACTTT  
CTTGTC AACGAGTAAATTTGAGTTTCACGCCAGGCAATCTTTCTGCTTCCTTCAAT  
TCCATAAACGATCCACAAAATATCCCAAGTCACGATACGGTACGGCGCACGAAG  
CGCGAGATCGCCACATGCATGATTATCATGATTGCACGCTTCACTTGGCTCTCGC  
CGCGCAGGACGGGAAAGAGGTGCTTGAGAAGGGGTGGGGTCAGCGGCATCCACT  
CGCCGGGCCAGGTGTTCCCGGTCCCCAACCGAATGGACATTTCTCTATGCGCCC  
CGCTCTGAAGAAGAGGTACGGGTGCGTGGAAATGATAGTCGAGGCTAGCGTGGTTT  
ATATGACGAATGATCCTGCGGACAAGATTGTAGAGGCCACCGTCCAGGGCACCGA  
AGAG

*Panellus stipticus*

ATGAATATAAATCTGAAAGCACTTATTGGTGTCTGTGCGGTA CT CATCACCGCTGC  
TGCTTTTCTTTTGTACGGAAAGACTATCACACCTTTTTGGAGGGCGGCCCTTCT  
ATGCTCCACAGAACTTGCAGGGCTACATAATAGTCCTCGTCTTGTCACTCTTCAGG  
GGAGAGGAGACTGGTTTGGAAATTTATGATCGCTTGCCAGAAAAGCGGCATGGC  
TGGAAGAACTGCCAGTGCGGGAGGGACCGCGGCCTAAGACTACGAGTCACATCA  
TCCAACGCCAGCTCAACCAGCACGTTGACCCCGACTTCGGCATGAATAGCTTGAA  
AGGCTCTGTGATACGGAGGCTTCAATCCCGCCACCAAGATATAACGCAGCTTGCT  
CTTTCCAAGTTTGTAGTTTACGCCGAAGCAATTTTTCTCCGGCCTGACGTCGCAAT  
CAATGACCCCAAACACGTGCCATCTCATGACACTGTCCGACGCACAAAGAGGGAG  
ATCGCTCACATGCACGACTACCACGATTACACTTGCCATTTGGCCCTTGCCGCCCA  
AGATGGCAAACAAGTGATAGCGAAGGGCTGGGGTCAAAGACATCCGCTTGCTGGG  
CCCGGTATGCCTGGACCTCCTACCGAGTGGACCTTCTTTATGCCCCACGCAACG  
AAGCAGAGGTGCAAGTGCTGGAAACTATTATTGAGGCAAGTATAGGATATATGAGT  
AACGCACCTGCCCTGGGAGGTTCCGAA

### Список использованной литературы

1. AbouKhair N.K., Ziegler M.M., Baldwin T.O. Bacterial luciferase: demonstration of a catalytically competent altered conformational state following a single turnover. // *Biochemistry*. 1985. Т. 24. № 15. С. 3942–7.
2. Akiyoshi R., Ogo K., Suzuki H. Star-worm luciferase. Патент № 20140073031. USA. Olympus corporation (Tokyo, JP), Perak state development corporation (IPOH, MY), Nimura genetic solutions co., ltd. (Tokyo, JP), 2014.
3. Alipour B.S. и др. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Т. 325. № 1. С. 215–22.
4. Altschul S.F. и др. Basic local alignment search tool. // *J. Mol. Biol.* 1990. Т. 215. № 3. С. 403–10.
5. Amaral D.T. и др. A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016. Т. 15. № 9. С. 1148–1154.
6. Amaral D.T., Prado R.A., Viviani V.R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera:Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. Т. 11. № 7. С. 1259–67.
7. Aristotle. *De Anima (On the Soul)* // Book. Т. Book II. № Part VII.
8. Babbitt P.C. и др. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. // *Biochemistry*. 1992. Т. 31. № 24. С. 5594–604.
9. Bae Y.M., Hastings J.W. Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. Т. 1219. № 2. С. 449–56.
10. Baldwin T.O. и др. Contribution of folding steps involving the individual subunits of bacterial luciferase to the assembly of the active heterodimeric enzyme. // *J. Biol.*



Chem. 1993. T. 268. № 15. C. 10766–72.

11. Baldwin T.O., Ziegler M.M. No Title // Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes / под ред. F. Muller. CRC Press, 1992. C. 467–530.

12. Balny C., Hastings J.W. Fluorescence and bioluminescence of bacterial luciferase intermediates. // Biochemistry. 1975. T. 14. № 21. C. 4719–23.

13. Bechara E.J.H., Colepicolo P. Brazilian Species of luminescent elaterids: Biochemistry and Biology // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987. T. 82. C. 129–131.

14. Belas R. и др. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. // Science. 1982. T. 218. № 4574. C. 791–3.

15. Biggley W.H., Lloyd J.E., Seliger H.H. The spectral distribution of firefly light. II. // J. Gen. Physiol. 1967. T. 50. № 6. C. 1681–92.

16. Bitler B., McElroy W.D. The preparation and properties of crystalline firefly luciferin. // Arch. Biochem. Biophys. 1957. T. 72. № 2. C. 358–68.

17. Bode V.C., Hastings J.W. The purification and properties of the bioluminescent system in *Gonyaulax polyedra*. // Arch. Biochem. Biophys. 1963. T. 103. C. 488–99.

18. Borisova V. V и др. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for in vitro assay. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. T. 7. № 9. C. 1025–31.

19. Boyle R. Experiments concerning the relation between light and air in shining wood and fish. // Phil Trans. 1668. T. 2. C. 581–600.

20. Branchini B.R. и др. Naphthyl- and quinolyl-luciferin: green and red light emitting firefly luciferin analogues. // Photochem. Photobiol. 1989. T. 49. № 5. C. 689–95.

21. Branchini B.R. и др. Identification of a firefly luciferase active site peptide using a benzophenone-based photooxidation reagent. // J. Biol. Chem. 1997. T. 272. № 31. C. 19359–64.

22. Branchini B.R. и др. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site. // Biochemistry. 1998. T. 37. № 44. C. 15311–9.

23. Branchini B.R. и др. The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-

adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. // *Biochemistry*. 2000. Т. 39. № 18. С. 5433–40.

24. Branchini B.R. и др. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Т. 145. № 2. С. 159–67.

25. Bron P.A. и др. Novel luciferase reporter system for in vitro and organ-specific monitoring of differential gene expression in *Listeria monocytogenes*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Т. 72. № 4. С. 2876–84.

26. Bryan B., Szent Gyorgyi C. Luciferases, fluorescent proteins, nucleic acids encoding the luciferases and fluorescent proteins and the use thereof in diagnostics, Патент №WO9949019A2 USA, 1999

27. Camacho F.G. и др. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. // *Biotechnol. Adv.* 2007. Т. 25. № 2. С. 176–94.

28. Campbell A.K., Herring P.J. Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms // *Mar. Biol.* 1990. Т. 104. № 2. С. 219–225.

29. Chang K.H., Xiang H., Dunaway-Mariano D. Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase. // *Biochemistry*. 1997. Т. 36. № 50. С. 15650–9.

30. Charbonneau H., Cormier M.J. Ca<sup>2+</sup>-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein. // *J. Biol. Chem.* 1979. Т. 254. № 3. С. 769–80.

31. Chen S., Bagdasarian M., Walker E.D. *Elizabethkingia anophelis*: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Т. 81. № 6. С. 2233–43.

32. Choi Y.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Hotaria unmunšana*. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2002. Т. 132. № 3. С. 661–70.

33. Choi Y.S. и др. Genomic structure of the luciferase gene and phylogenetic analysis in the *Hotaria*-group fireflies. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2003. Т.

134. № 2. С. 199–214.
34. Chomzynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction // *Anal. Biochem.* 1987. Т. 162. № 1. С. 156–159.
35. Chung E. и др. Secreted Gaussia Luciferase as a Biomarker for Monitoring Tumor Progression and Treatment Response of Systemic Metastases // *PLoS One.* 2009. Т. 4. № 12. С. e8316.
36. Cline T.W., Hastings J.W. Mutationally altered bacterial luciferase. Implications for subunit functions // *Biochemistry.* 1972. Т. 11. № 18. С. 3359–3370.
37. Close D. и др. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (lux) as a real-time bioreporter. // *Sensors (Basel).* 2012. Т. 12. № 1. С. 732–52.
38. Cohn D.H. и др. Nucleotide sequence of the luxA gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the alpha subunit of bacterial luciferase. // *J. Biol. Chem.* 1985. Т. 260. № 10. С. 6139–46.
39. Colepicolo-Neto P., Costa C., Bechara E.J.H. Brazilian species of luminescent Elateridae. Luciferin identification and bioluminescence spectra // *Insect Biochem.* 1986. Т. 16. С. 803–810.
40. Colepicolo P. и др. Circadian regulation of bioluminescence in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. // *J. Phycol.* 1993. Т. 29. № 2. С. 173–179.
41. Contag C.H. и др. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. // *Mol. Microbiol.* 1995. Т. 18. № 4. С. 593–603.
42. Conti E., Franks N.P., Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes // *Structure.* 1996. Т. 4. № 3. С. 287–298.
43. Cormier M.J. Biochemistry of *Renilla reniformis* luminescence // *Light and Life* / под ред. W.D. McElroy, B. Glass. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1961. С. 274–293.
44. Cormier M.J. Applications of *Renilla* bioluminescence: An introduction // 1978. Т. 57C. С. 237–244.
45. Cormier M.J., Strehler B.L. The identification of KCF: requirement of long-chain aldehydes for bacterial extract luminescence // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. Т. 75. № 19.

C. 4864–4865.

46. Cronin M. и др. Development of a luciferase-based reporter system to monitor *Bifidobacterium breve* UCC2003 persistence in mice. // *BMC Microbiol.* 2008. Т. 8. № 1. С. 161.

47. Daubner S.C. и др. Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987. Т. 84. № 24. С. 8912–6.

48. Day J.C. и др. Genomic structure of the luciferase gene from the bioluminescent beetle, *Nyctophila cf. caucasica*. // *J. Insect Sci.* 2006. Т. 6. № 37. С. 1–8.

49. Degeling M.H. и др. Directed molecular evolution reveals *Gaussia* luciferase variants with enhanced light output stability. // *Anal. Chem.* 2013. Т. 85. № 5. С. 3006–12.

50. DeLong E.F. и др. Isolation of the lux genes from *Photobacterium leiognathi* and expression in *Escherichia coli*. // *Gene.* 1987. Т. 54. № 2–3. С. 203–10.

51. DeLuca M. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. // *Biochemistry.* 1969. Т. 8. № 1. С. 160–6.

52. Demidova T.N. и др. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. Т. 81. № 1. С. 15–25.

53. Demont E.H. и др. 1,3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Т. 5. № 11. С. 1190–5.

54. Deng L. и др. All three Ca<sup>2+</sup>-binding loops of photoproteins bind calcium ions: the crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin. // *Protein Sci.* 2005. Т. 14. № 3. С. 663–75.

55. Deplus R. и др. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. // *EMBO J.* 2013. Т. 32. № 5. С. 645–55.

56. Devine J.H. и др. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1993. Т. 1173.

№ 2. С. 121–132.

57. Duane W., Hastings J.W. Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. // *Mol. Cell. Biochem.* 1975. Т. 6. № 1. С. 53–64.

58. Dunlap J.C., Hastings J.W. Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: purification and characterization of dinoflagellate luciferin from *Pyrocystis lunula*. // *Biochemistry.* 1981. Т. 20. № 4. С. 983–9.

59. Dunlap P. *Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. С. 37–64.

60. Edvardsen B. и др. Genetic variability and molecular phylogeny of dinophysis species (dinophyceae) from norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. // *J. Phycol.* 2003. Т. 39. № 2. С. 395–408.

61. Engebrecht J., Neelson K., Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. // *Cell.* 1983. Т. 32. № 3. С. 773–81.

62. Engebrecht J., Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984. Т. 81. № 13. С. 4154–8.

63. Feder J.L., Velez S. Intergenic exchange, geographic isolation, and the evolution of bioluminescent color for *Pyrophorus* click beetles ETLES // *Evolution (N. Y.)*. 2009. Т. 63. № 5. С. 1203–1216.

64. Fisher A.J. и др. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution. // *Biochemistry.* 1995. Т. 34. № 20. С. 6581–6.

65. Fogel M., Schmitter R.E., Hastings J.W. On the physical identity of scintillons: bioluminescent particles in *Gonyaulax polyedra*. // *J. Cell Sci.* 1972. Т. 11. № 1. С. 305–17.

66. Francis K.P. и др. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. // *Infect. Immun.* 2000. Т. 68. № 6. С. 3594–600.

67. Francis K.P. и др. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice

using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. // *Infect. Immun.* 2001. T. 69. № 5. C. 3350–8.

68. Friedland J., Hastings J.W. The reversibility of the denaturation of bacterial luciferase. // *Biochemistry.* 1967. T. 6. № 9. C. 2893–900.

69. Fujino T., Yamamoto T. Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. // *J. Biochem.* 1992. T. 111. № 2. C. 197–203.

70. Fuller C.W., Kreiss P., Seliger H.H. Particulate bioluminescence in dinoflagellates: dissociation and partial reconstitution. // *Science.* 1972. T. 177. № 4052. C. 884–5.

71. Gahan C.G.M. The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies. // *Curr. Gene Ther.* 2012. T. 12. № 1. C. 12–9.

72. Gast R., Lee J. Isolation of the in vivo emitter in bacterial bioluminescence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978. T. 75. № 2. C. 833–7.

73. Ghisla S. и др. On the structure of flavin-oxygen intermediates involved in enzymatic reactions. // *Eur. J. Biochem.* 1977. T. 76. № 1. C. 139–48.

74. Gómez F. A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata) // *Syst. Biodivers.* 2012. T. 10. № 3. C. 267–275.

75. Green A.A., McElroy W.D. Crystalline firefly luciferase. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1956. T. 20. № 1. C. 170–6.

76. Grim C.J. и др. Occurrence and Expression of Luminescence in *Vibrio cholerae* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. T. 74. № 3. C. 708–715.

77. Gruber M.G., Kutuzova G.D., Wood K. V. Cloning and expression of a *Phengodes* luciferase // *Biolumin Chemilumin, Proc Int Symp 9th, 1996 / под ред. H. JW. , 1997. C. 244–247.*

78. Gupta R.K. и др. Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. // *FEMS Yeast Res.* 2003. T. 4. № 3. C. 305–13.

79. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the sea. // *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2010. T. 2. № 1. C. 443–93.

80. Hall M.P. и др. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. // ACS Chem. Biol. 2012. Т. 7. № 11. С. 1848–57.
81. Hallegraef G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. // Phycologia. 1993. Т. 32. № 2. С. 79–99.
82. Hamman J.P., Seliger H.H. The mechanical triggering of bioluminescence in marine dinoflagellates: chemical basis. // J. Cell. Physiol. 1972. Т. 80. № 3. С. 397–408.
83. Hamorsky K.T. и др. Chemiluminescence and Bioluminescence / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
84. Hannah R.R., McCaslin D.R., Wood K. Evidence for molecular aggregation of beetle luciferases // Bioluminescence and Chemiluminescence: Perspectives for the 21st Century / под ред. A. Roda и др. Chichester: Wiley, 1999. С. 361–364.
85. Hardy J. и др. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. // Science. 2004. Т. 303. № 5659. С. 851–3.
86. Harvey E.N. The chemistry of light production in luminous organisms // Publ Carneg Instn. 1917a. Т. 251. С. 171–234.
87. Harvey E.N. What substance is the source of the light in the firefly // Science. 1917b. Т. 46. № 1184. С. 241–3.
88. Harvey E.N. Bioluminescence. New York: Academic Press, 1952.
89. Harvey E.N. A History of Luminescence. Philadelphia: The American Philosophical Society, 1957.
90. Hastings J.W. и др. Spectral properties of an oxygenated luciferase-flavin intermediate isolated by low-temperature chromatography. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1973. Т. 70. № 12 Pt 1-2. С. 3468–72.
91. Hastings J.W. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. // J. Mol. Evol. 1983. Т. 19. № 5. С. 309–21.
92. Hastings J.W. The *Gonyaulax* Clock at 50: Translational Control of Circadian Expression // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2007. Т. 72. № 1. С. 141–144.
93. Hastings J.W., Baldwin T.O., Nicoli M.Z. Bacterial luciferase: Assay, purification,

and properties. , 1978. С. 135–152.

94. Hastings J.W., Sweeney B.M. The luminescent reaction in extracts of the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1957. Т. 49. № 2. С. 209–25.

95. Haygood M.G., Cohn D.H. Luciferase genes cloned from the unculturable luminous bacteroid symbiont of the Caribbean flashlight fish, *Kryptophanaron alfredi*. // *Gene*. 1986. Т. 45. № 2. С. 203–9.

96. He S.-X. и др. Nanoluciferase as a novel quantitative protein fusion tag: Application for overexpression and bioluminescent receptor-binding assays of human leukemia inhibitory factor. // *Biochimie*. 2014. Т. 106. С. 140–8.

97. Henry J.P., Hastings J.W. Solubilization of molecular elements of scintillons: bioluminescent particles from dinoflagellates. // *Mol. Cell. Biochem.* 1974. Т. 3. № 2. С. 81–91.

98. Herring P.J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1987. Т. 1. № 3. С. 147–163.

99. Hori K. и др. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977. Т. 74. № 10. С. 4285–7.

100. Illarionov B.A. и др. Isolation of bioluminescent functions from *Photobacterium leiognathi*: analysis of *luxA*, *luxB*, *luxG* and neighboring genes. // *Gene*. 1990. Т. 86. № 1. С. 89–94.

101. Inoue S. и др. Cypridina bioluminescence VI a new route for the synthesis of cypridina luciferin and its analogs // *Tetrahedron Lett.* 1969. Т. 10. № 20. С. 1609–1610.

102. Inoue S., Kakoi H., Goto T. Oplophorus luciferin, bioluminescent substance of the decapod shrimps, *Oplophorus spinosus* and *Heterocarpus laevigatus* // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976. № 24. С. 1056.

103. Inouye S. и др. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase(1). // *FEBS Lett.* 2000. Т. 481. № 1. С. 19–25.



104. Inouye S. и др. Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of *Oplophorus* luciferase by three amino acid substitutions. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Т. 445. № 1. С. 157–62.
105. Inouye S., Sahara Y. Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Т. 365. № 1. С. 96–101.
106. Inouye S., Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris*. // *Protein Expr. Purif.* 2007. Т. 56. № 2. С. 261–8.
107. Inouye S., Shimomura O. The use of *Renilla* luciferase, *Oplophorus* luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Т. 233. № 2. С. 349–53.
108. Johnston T.C., Thompson R.B., Baldwin T.O. Nucleotide sequence of the *luxB* gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the beta subunit of bacterial luciferase. // *J. Biol. Chem.* 1986. Т. 261. № 11. С. 4805–11.
109. Kajiyama N., Nakano E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. // *Protein Eng.* 1991. Т. 4. № 6. С. 691–3.
110. Karkhanis Y.D., Cormier M.J. Isolation and properties of *Renilla reniformis* luciferase, a low molecular weight energy conversion enzyme. // *Biochemistry.* 1971. Т. 10. № 2. С. 317–26.
111. Karlsson E.A. и др. Visualizing real-time influenza virus infection, transmission and protection in ferrets. // *Nat. Commun.* 2015. Т. 6. С. 6378.
112. Karp M. и др. A sensitive model system for in vivo monitoring of baculovirus gene expression in single infected insect cells. // *Biotechnology.* (N. Y). 1992. Т. 10. № 5. С. 565–9.
113. Karp M. и др. Identification of biotinylated molecules using a baculovirus-expressed luciferase-streptavidin fusion protein. // *Biotechniques.* 1996. Т. 20. № 3. С. 452–6, 458–9.

114. Kasai S. Freshwater bioluminescence in *Vibrio albensis* (*Vibrio cholerae* biovar *albensis*) NCIMB 41 is caused by a two-nucleotide deletion in *luxO*. // *J. Biochem.* 2006. Т. 139. № 3. С. 471–82.
115. Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Yampolsky I. V. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Т. 45. № 21. С. 6048–6077.
116. Kato M. и др. Bioluminescence assay for detecting cell surface membrane protein expression. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2011. Т. 9. № 1. С. 31–9.
117. Khrulnova S.A. и др. *Alivibrio logei* KChI (Kamchatka isolate): biochemical and bioluminescence characteristics and cloning of the *lux* operon. // *Microbiol.* 2010. Т. 79. С. 349–355.
118. Kim S.-B., Fujii R. How to Fabricate Functional Artificial Luciferases for Bioassays // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). , 2016. С. 43–53.
119. Kim S.B. и др. Superluminescent Variants of Marine Luciferases for Bioassays // *Anal. Chem.* 2011. Т. 83. № 22. С. 8732–8740.
120. Kim S.B., Izumi H. Functional artificial luciferases as an optical readout for bioassays // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Т. 448. № 4. С. 418–423.
121. Kim S.B., Torimura M., Tao H. Creation of artificial luciferases for bioassays. // *Bioconjug. Chem.* 2013. Т. 24. № 12. С. 2067–75.
122. Kishi T. и др. Cypridina bioluminescence I Structure of luciferin // *Tetrahedron Lett.* 1966. Т. 7. № 29. С. 3427–3436.
123. Kishi Y., Goto T., Hirata Y. The structure of Cypridina luciferin. // *Bioluminescence in Progress* / под ред. F.H. Johnson, Y. Haneda. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1966. С. 89–113.
124. Knaust R. и др. The circadian rhythm of bioluminescence in *pyrocystis* is not due to differences in the amount of luciferase: a comparative study of three bioluminescent marine dinoflagellates. // *J. Phycol.* 1998. Т. 34. № 1. С. 167–172.
125. Koka P., Lee J. Separation and structure of the prosthetic group of the blue fluorescence protein from the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*.

- // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979. T. 76. № 7. C. 3068–72.
126. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Approaches to engineer stability of beetle luciferases. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012. T. 2. № 3. C. e201209004.
127. Krieger N., Njus D., Hastings J.W. Active proteolytic fragment of *Gonyaulax* luciferase // *Biochemistry*. 1974. T. 13. № 14. C. 2871–2877.
128. Kurfuerst M. и др. Isolation and characterization of the transient, luciferase-bound flavin-4a-hydroxide in the bacterial luciferase reaction // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1987. T. 924. № 1. C. 104–110.
129. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature*. 1970. T. 227. № 5259. C. 680–5.
130. Lee J., O’Kane D.J., Gibson B.G. Dynamic fluorescence properties of bacterial luciferase intermediates. // *Biochemistry*. 1988. T. 27. № 13. C. 4862–70.
131. Lee K.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. // *J. Biotechnol.* 2001. T. 92. № 1. C. 9–19.
132. Lei B., Ding Q., Tu S.-C. Identity of the emitter in the bacterial luciferase luminescence reaction: binding and fluorescence quantum yield studies of 5-decyl-4a-hydroxy-4a,5-dihydroriboflavin-5'-phosphate as a model. // *Biochemistry*. 2004. T. 43. № 50. C. 15975–82.
133. Lember N. Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light. // *Biochem. J.* 1996. C. 273–7.
134. Li L. и др. N-terminal intramolecularly conserved histidines of three domains in *Gonyaulax* luciferase are responsible for loss of activity in the alkaline region. // *Biochemistry*. 2001. T. 40. № 6. C. 1844–9.
135. Li L. и др. Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. // *Mol. Genet. Metab.* 2010. T. 101. № 4. C. 364–9.
136. Li L., Hastings J.W. The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. // *Plant Mol. Biol.* 1998. T. 36. № 2. C. 275–84.
137. Li L., Hong R., Hastings J.W. Three functional luciferase domains in a single

- polypeptide chain. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. T. 94. № 17. C. 8954–8.
138. Liu L., Hastings J.W. Two different domains of the luciferase gene in the heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans* occur as two separate genes in photosynthetic species. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. T. 104. № 3. C. 696–701.
139. Liu L., Wilson T., Hastings J.W. Molecular evolution of dinoflagellate luciferases, enzymes with three catalytic domains in a single polypeptide // Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. T. 101. № 47. C. 16555–16560.
140. Loening A.M. и др. Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output. // Protein Eng. Des. Sel. 2006. T. 19. № 9. C. 391–400.
141. Loening A.M., Fenn T.D., Gambhir S.S. Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. // J. Mol. Biol. 2007. T. 374. № 4. C. 1017–28.
142. Loening A.M., Wu A.M., Gambhir S.S. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. // Nat. Methods. 2007. T. 4. № 8. C. 641–3.
143. Lorenz W.W. и др. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. T. 88. № 10. C. 4438–42.
144. Lupold S.E. и др. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the  $\beta$ -actin promoter and enhancer. // PLoS One. 2012. T. 7. № 5. C. e36535.
145. Macheroux P. и др. Purification of the yellow fluorescent protein from *Vibrio fischeri* and identity of the flavin chromophore. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. T. 146. № 1. C. 101–6.
146. Macheroux P., Ghisla S., Hastings J.W. Spectral detection of an intermediate preceding the excited state in the bacterial luciferase reaction. // Biochemistry. 1993. T. 32. № 51. C. 14183–6.
147. Maeda Y. и др. Expression of a bifunctional chimeric protein A-*Vargula hilgendorffii* luciferase in mammalian cells. // Biotechniques. 1996. T. 20. № 1. C. 116–21.

148. Mancini J.A. и др. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique lux gene organization. // *J. Biol. Chem.* 1988. Т. 263. № 28. С. 14308–14.
149. Manukhov I. V и др. Cloning and expression of the lux-operon of *Photobacterium luminescens*, strain Zm1: nucleotide sequence of luxAB genes and basic properties of luciferase. // *Genetika*. 2000. Т. 36. № 3. С. 322–30.
150. Manukhov I. V. и др. Comparative Analysis of the lux Operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (a Kamchatka Isolate) and *Aliivibrio salmonicida* // *J. Bacteriol.* 2011. Т. 193. № 15. С. 3998–4001.
151. Marcinko C.L.J. и др. A review of the measurement and modelling of dinoflagellate bioluminescence // *Prog. Oceanogr.* 2013. Т. 109. С. 117–129.
152. Markova S. V и др. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 5. С. 3212–7.
153. Markova S. V и др. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Т. 457. № 1. С. 77–82.
154. Markova S. V., Vysotski E.S. Coelenterazine-dependent luciferases // *Biochem.* 2015. Т. 80. № 6. С. 714–732.
155. Markova S. V, Burakova L.P., Vysotski E.S. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. Т. 417. № 1. С. 98–103.
156. Marquette C.A., Blum L.J. *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
157. Matthews J.C., Hori K., Cormier M.J. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. // *Biochemistry*. 1977. Т. 16. № 1. С. 85–91.
158. McCapra F. и др. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence // *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects* / под ред. A.K. Campbell, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester: Wiley, 1994. С. 387 – 391.

159. McCapra F., Chang Y.C. The chemiluminescence of a Cypridina luciferin analogue // Chem. Commun. 1967. № 19. C. 1011.
160. McElroy W.D. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1947. T. 33. № 11. C. 342–5.
161. McElroy W.D., DeLuca M., Travis J. Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. // Science. 1967. T. 157. № 3785. C. 150–60.
162. McElroy W.D., Green A.A. Enzymatic properties of bacterial luciferase. // Arch. Biochem. Biophys. 1955. T. 56. № 1. C. 240–55.
163. McElroy W.D., Hastings J.W. Biochemistry of firefly luminescence // The Bioluminescence of Biological Systems / под ред. F.H. Johnson. Washington: American association of the advancement of science, 1955. C. 161–198.
164. McElroy W.D., Seliger H.H. Mechanisms of bioluminescent reactions // Light and Life / под ред. W.D. McElroy, B. Glass. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 1961. C. 219–257.
165. Meighen E.A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. // Microbiol. Rev. 1991. T. 55. № 1. C. 123–42.
166. Miesenböck G., Rothman J.E. Patterns of synaptic activity in neural networks recorded by light emission from synaptolucins. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. T. 94. № 7. C. 3402–7.
167. Mitani Y. и др. Cloning and characterization of luciferase from a Fijian luminous click beetle. // Photochem. Photobiol. 2013. T. 89. № 5. C. 1163–9.
168. Mittag M., Li L., Hastings J.W. The mRNA level of the circadian regulated *Gonyaulax* luciferase remains constant over the cycle. // Chronobiol. Int. 1998. T. 15. № 1. C. 93–8.
169. Miyamoto C.M. и др. Polycistronic mRNAs code for polypeptides of the *Vibrio harveyi* luminescence system. // J. Bacteriol. 1985. T. 161. № 3. C. 995–1001.
170. Miyamoto C.M. и др. Organization of the lux structural genes of *Vibrio harveyi*. Expression under the T7 bacteriophage promoter, mRNA analysis, and nucleotide

- sequence of the luxD gene. // J. Biol. Chem. 1988. T. 263. № 26. С. 13393–9.
171. Miyamoto C.M., Graham A.F., Meighen E.A. Nucleotide sequence of the LuxC gene and the upstream DNA from the bioluminescent system of *Vibrio harveyi*. // Nucleic Acids Res. 1988. T. 16. № 4. С. 1551–62.
172. Morishita H. и др. Cloning and characterization of an active fragment of luciferase from a luminescent marine alga, *Pyrocystis lunula*. // Photochem. Photobiol. 2002. T. 75. № 3. С. 311–5.
173. Morse D. и др. Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989. T. 86. № 1. С. 172–6.
174. Mulcahy H. и др. *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. // Infect. Immun. 2008. T. 76. № 2. С. 632–8.
175. Nakajima Y. и др. cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. T. 68. № 3. С. 565–70.
176. Nakajima Y. и др. Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. // PLoS One. 2010. T. 5. № 4. С. e10011.
177. Nakamura H. и др. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products // J. Am. Chem. Soc. 1989. T. 111. № 19. С. 7607–7611.
178. Nakamura H. и др. Convergent and short-step syntheses of dl-Cypridina luciferin and its analogues based on Pd-mediated cross couplings // Pergamon Tetrahedron Lett. 2000. T. 41. С. 2185–2188.
179. Nakamura T., Matsuda K. Studies on luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. I. Purification and physicochemical properties. // J. Biochem. 1971. T. 70. № 1. С. 35–44.
180. Nakatsu T. и др. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. // Nature. 2006. T. 440. № 7082. С. 372–6.
181. Nelson E.J. и др. A novel lux operon in the cryptically bioluminescent fish

pathogen *Vibrio salmonicida* is associated with virulence. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Т. 73. № 6. С. 1825–33.

182. Nicolas M.T. и др. Characterization of the bioluminescent organelles in *Gonyaulax polyedra* (dinoflagellates) after fast-freeze fixation and antiluciferase immunogold staining. // *J. Cell Biol.* 1987. Т. 105. № 2. С. 723–35.

183. Nishide S. и др. New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues // *Genes to Cells.* 2006. Т. 11. № 10. С. 1173–1182.

184. Nishitsuji H. и др. Novel reporter system to monitor early stages of the hepatitis B virus life cycle. // *Cancer Sci.* 2015. Т. 106. № 11. С. 1616–24.

185. Norisada J. и др. A sensitive assay for the biosynthesis and secretion of MANF using NanoLuc activity. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Т. 449. № 4. С. 483–9.

186. O’Kane D.J., Karle V.A., Lee J. Purification of lumazine proteins from *Photobacterium leiognathi* and *Photobacterium phosphoreum*: bioluminescence properties. // *Biochemistry.* 1985. Т. 24. № 6. С. 1461–7.

187. Oba Y. и др. Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*. // *Chembiochem.* 2004. Т. 5. № 11. С. 1495–9.

188. Oba Y. и др. Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly eggs. // *Biochemistry.* 2010. Т. 49. № 51. С. 10788–95.

189. Oba Y., Iida K., Inouye S. Functional conversion of fatty acyl-CoA synthetase to firefly luciferase by site-directed mutagenesis: a key substitution responsible for luminescence activity. // *FEBS Lett.* 2009. Т. 583. № 12. С. 2004–8.

190. Oba Y., Kumazaki M., Inouye S. Characterization of luciferases and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: a click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity. // *Gene.* 2010. Т. 452. № 1. С. 1–6.

191. Ogo K., Akiyoshi R., Suzuki H. Firefly luciferase. Патент №8722376. USA. Olympus Corporation (Tokyo, JP), Nimura Genetic Solutions Co., Ltd. (Tokyo, JP),



Perak State Development Corporation (Perak Darul Ridzuan, MY). , 2014

192. Ohmiya Y. и др. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferases from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. // *Photochem. Photobiol.* 1995. Т. 62. № 2. С. 309–13.

193. Okamoto O.K. и др. Members of a dinoflagellate luciferase gene family differ in synonymous substitution rates. // *Biochemistry.* 2001. Т. 40. № 51. С. 15862–8.

194. Oker-Blom С. и др. A baculovirus-expressed fusion protein containing the antibody-binding domain of protein A and insect luciferase. // *Biotechniques.* 1993. Т. 14. № 5. С. 800–9.

195. Oliveira A.G. и др. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. Т. 11. № 5. С. 848.

196. Park H.-S. и др. Membranous cells in nasal-associated lymphoid tissue: a portal of entry for the respiratory mucosal pathogen group A streptococcus. // *J. Immunol.* 2003. Т. 171. № 5. С. 2532–7.

197. Patterson S.S. и др. Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Т. 32. № 3. С. 115–123.

198. Pavela-Vrancic M. и др. ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. // *Biochemistry.* 1994. Т. 33. № 20. С. 6276–83.

199. Petushkov V.N., Gibson B.G., Lee J. The yellow bioluminescence bacterium, *Vibrio fischeri* Y1, contains a bioluminescence active riboflavin protein in addition to the yellow fluorescence FMN protein. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Т. 211. № 3. С. 774–9.

200. Phillips-Jones M.K. Bioluminescence (*lux*) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1993. Т. 106. № 3. С. 265–70.

201. Picaud S. и др. 9H-purine scaffold reveals induced-fit pocket plasticity of the BRD9 bromodomain. // *J. Med. Chem.* 2015. Т. 58. № 6. С. 2718–36.

202. Prasher D.C. и др. The lumazine protein gene in *Photobacterium phosphoreum* is

- linked to the lux operon. // *Nucleic Acids Res.* 1990. Т. 18. № 21. С. 6450.
203. Puget K., Michelson A.M. Studies in bioluminescence. VII. Bacterial NADH: flavin mononucleotide oxidoreductase. // *Biochimie.* 1972. Т. 54. № 9. С. 1197–204.
204. Purto V. K. V. и др. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2015. Т. 54. № 28. С. 8124–8128.
205. Qazi S.N. и др. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. // *Infect. Immun.* 2001. Т. 69. № 11. С. 7074–82.
206. Raibekas A.A. Green flavoprotein from *P. leiognathi*: purification, characterization and identification as the product of the lux G(N) gene. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1991. Т. 6. № 3. С. 169–76.
207. Remy I., Michnick S.W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on *Gaussia luciferase*. // *Nat. Methods.* 2006. Т. 3. № 12. С. 977–9.
208. Riedel C.U. и др. Improved luciferase tagging system for *Listeria monocytogenes* allows real-time monitoring in vivo and in vitro. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007a. Т. 73. № 9. С. 3091–4.
209. Riedel C.U. и др. Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007b. Т. 73. № 21. С. 7092–5.
210. Robison B.H. и др. Light production by the arm tips of the deep-sea cephalopod *Vampyroteuthis infernalis*. // *Biol. Bull.* 2003. Т. 205. № 2. С. 102–9.
211. Rocchetta H.L. и др. Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *Escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Т. 45. № 1. С. 129–37.
212. Ruby E.G., Nealson K.H. A luminous bacterium that emits yellow light. // *Science.* 1977. Т. 196. № 4288. С. 432–4.
213. Saito M. и др. Three conserved glycine residues in valine activation of gramicidin S synthetase 2 from *Bacillus brevis*. // *J. Biochem.* 1995. Т. 117. № 2. С. 276–82.
214. Sala-Newby G.B., Thomson C.M., Campbell A.K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly

Photinus pyralis. // Biochem. J. 1996. С. 761–7.

215. Salykhova A.I. и др. Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium Aliivibrio logei: a comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in Escherichia coli cells // Microbiology. 2016. Т. 162. № 4. С. 717–724.

216. Sandalova T.P., Ugarova N.N. Model of the active site of firefly luciferase. // Biochemistry. (Mosc). 1999. Т. 64. № 8. С. 962–7.

217. Sato Y. и др. Crystal Structures of the Lumazine Protein from Photobacterium kishitanii in Complexes with the Authentic Chromophore, 6,7-Dimethyl- 8-(1'-D-Ribityl) Lumazine, and Its Analogues, Riboflavin and Flavin Mononucleotide, at High Resolution // J. Bacteriol. 2010. Т. 192. № 1. С. 127–133.

218. Schaefer A.L. и др. Quorum sensing in Vibrio fischeri: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. // J. Bacteriol. 1996. Т. 178. № 10. С. 2897–901.

219. Schmetterer G., Wolk C.P., Elhai J. Expression of luciferases from Vibrio harveyi and Vibrio fischeri in filamentous cyanobacteria. // J. Bacteriol. 1986. Т. 167. № 1. С. 411–4.

220. Schmitter R.E. и др. Dinoflagellate bioluminescence: a comparative study of invitro components. // J. Cell. Physiol. 1976. Т. 87. № 1. С. 123–34.

221. Scholten J.D. и др. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. // Science. 1991. Т. 253. № 5016. С. 182–5.

222. Schröder J. Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. // Nucleic Acids Res. 1989. Т. 17. № 1. С. 460.

223. Schultz L.W. и др. Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. Т. 102. № 5. С. 1378–83.

224. Seliger H.H., McElroy W.D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1964. Т. 52. № 1. С. 75–81.

225. Seliger H.H., Morton R.A. A physical approach to bioluminescence // Photophysiology. 1968. Т. 4. С. 253.

226. Seo K.S., Fritz L. Cell ultrastructural changes correlate with circadian rhythms in *Pyrocystis lunula* (Pyrrophyta) // *J. Phycol.* 2001. Т. 36. № 2. С. 351–358.
227. Shevchenko A. и др. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. // *Anal. Chem.* 1996. Т. 68. № 5. С. 850–8.
228. Shevchenko A. и др. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. // *Nat. Protoc.* 2006. Т. 1. № 6. С. 2856–60.
229. Shimomura O. и др. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. // *Biochemistry.* 1978. Т. 17. № 6. С. 994–8.
230. Shimomura O. Chemiluminescence of panal (a sesquiterpene) isolated from the luminous fungus *Panellus stipticus*. // *Photochem Photobiol.* 1989. Т. 49. С. 355–360.
231. Shimomura O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. // *J Exp Bot.* 1992. Т. 43. С. 1519–1525.
232. Shimomura O. и др. Isolation and properties of the luciferase stored in the ovary of the scyphozoan medusa *Periphylla periphylla*. // *Biol. Bull.* 2001. Т. 201. № 3. С. 339–47.
233. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. Singapore: World Scientific, 2006.
234. Shimomura O., Flood P.R. Luciferase of the Scyphozoan Medusa *Periphylla periphylla* // *Biol. Bull.* 1998. Т. 194. № 3. С. 244–252.
235. Shimomura O., Goto T., Hirata Y. Crystalline Cypridina Luciferin // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1957. Т. 30. № 8. С. 929–933.
236. Shimomura O., Johnson F.H. Mechanisms in the quantum yield of Cypridina bioluminescence. // *Photochem. Photobiol.* 1970. Т. 12. № 4. С. 291–5.
237. Shimomura O., Johnson F.H. Mechanism of the luminescent oxidation of cypridina luciferin. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. Т. 44. № 2. С. 340–6.
238. Sinclair J.F. и др. Purified native subunits of bacterial luciferase are active in the bioluminescence reaction but fail to assemble into the alpha beta structure. // *Biochemistry.* 1993. Т. 32. № 19. С. 5036–44.

239. Sleator R.D. и др. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract // *Microbiology*. 2009. Т. 155. № 8. С. 2463–2475.
240. Smirnova D. V., Ugarova N.N. Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis // *Photochem. Photobiol.* 2016.
241. Song G. и др. A convenient luminescence assay of ferroportin internalization to study its interaction with hepcidin. // *FEBS J.* 2013. Т. 280. № 8. С. 1773–81.
242. Stauber J.L. и др. Comparison of the Qwiklite algal bioluminescence test with marine algal growth rate inhibition bioassays. // *Environ. Toxicol.* 2008. Т. 23. № 5. С. 617–25.
243. Stepanyuk G.A. и др. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: why it is not a calcium-regulated photoprotein. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008a. Т. 7. № 4. С. 442–7.
244. Stepanyuk G.A. и др. Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells. // *Protein Expr. Purif.* 2008b. Т. 61. № 2. С. 142–8.
245. Stepanyuk G.A. и др. Structure based mechanism of the Ca(2+)-induced release of coelenterazine from the *Renilla* binding protein. // *Proteins*. 2009. Т. 74. № 3. С. 583–93.
246. Stepanyuk G.A. и др. Coelenterazine-v ligated to Ca<sup>2+</sup>-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Т. 398. № 4. С. 1809–17.
247. Stepanyuk G.A. и др. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca(2+)-loaded apoprotein conformation state. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Т. 1834. № 10. С. 2139–46.
248. Stevens A.M., Dolan K.M., Greenberg E.P. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Т. 91. № 26. С. 12619–23.
249. Stevens A.M., Greenberg E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. // *J. Bacteriol.* 1997. Т. 179. № 2. С. 557–62.

250. Stolz U. и др. Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Т. 100. № 25. С. 14955–9.
251. Strehler B.L., Cormier M.J. Factors affecting the luminescence of cell-free extracts of the luminous bacterium, *Achromobacter fischeri*. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1953. Т. 47. № 1. С. 16–33.
252. Strehler B.L., Cormier M.J. Isolation, identification, and function of long chain fatty aldehydes affecting the bacterial luciferin-luciferase reaction. // *J. Biol. Chem.* 1954. Т. 211. № 1. С. 213–25.
253. Stuible H. и др. Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. // *FEBS Lett.* 2000. Т. 467. № 1. С. 117–22.
254. Sun C. и др. Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. // *J. Virol.* 2014. Т. 88. № 4. С. 2035–46.
255. Suzuki C. и др. A new additional reporter enzyme, dinoflagellate luciferase, for monitoring of gene expression in mammalian cells. // *Gene.* 2005. Т. 344. С. 61–6.
256. Suzuki H. и др. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. // *J. Biol. Chem.* 1990. Т. 265. № 15. С. 8681–5.
257. Swanson R. и др. Crystals of luciferase from *Vibrio harveyi*. A preliminary characterization. // *J. Biol. Chem.* 1985. Т. 260. № 2. С. 1287–9.
258. Szittner R., Meighen E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. // *J. Biol. Chem.* 1990. Т. 265. № 27. С. 16581–7.
259. Takenaka Y. и др. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*. // *Gene.* 2008. Т. 425. № 1–2. С. 28–35.
260. Takenaka Y. и др. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods. // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Т. 29. № 6. С. 1669–81.
261. Takenaka Y. и др. Computational analysis and functional expression of ancestral

- copepod luciferase. // *Gene*. 2013. Т. 528. № 2. С. 201–5.
262. Tannous B.A. и др. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. // *Mol. Ther.* 2005. Т. 11. № 3. С. 435–43.
263. Tannous B.A., Teng J. Secreted blood reporters: insights and applications. // *Biotechnol. Adv.* 2011. Т. 29. № 6. С. 997–1003.
264. Tatsumi H. и др. Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *Escherichia coli*. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. Т. 3. № 2. С. 75–8.
265. Tatsumi H., Kajiyama N., Nakano E. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis* // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1992. Т. 1131. № 2. С. 161–165.
266. Thompson E.M., Nagata S., Tsuji F.I. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. Т. 86. № 17. С. 6567–71.
267. Thompson E.M., Nagata S., Tsuji F.I. *Vargula hilgendorffii* luciferase: a secreted reporter enzyme for monitoring gene expression in mammalian cells. // *Gene*. 1990. Т. 96. № 2. С. 257–62.
268. Thompson J.F. и др. Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties. // *J. Biol. Chem.* 1997. Т. 272. № 30. С. 18766–71.
269. Titushin M.S. и др. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Т. 7. № 2. С. 189–196.
270. Toh H. N-terminal halves of gramicidin S synthetase 1, and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. // *Protein Seq. Data Anal.* 1990. Т. 3. № 6. С. 517–21.
271. Tortorec A.H. Le и др. Stimulated bioluminescence as an early indicator of bloom development of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* // *J. Plankton Res.* 2014. Т. 36. № 2. С. 412–423.
272. Tsutomu M., Hiroki T., Eiichi N. Cloning and sequence analysis of cDNA for

- luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata* // *Gene*. 1989. T. 77. № 2. С. 265–270.
273. Tu S.C. Isolation and properties of bacterial luciferase-oxygenated flavin intermediate complexed with long-chain alcohols. // *Biochemistry*. 1979. T. 18. № 26. С. 5940–5.
274. Tu S.C., Mager H.I. Biochemistry of bacterial bioluminescence. // *Photochem. Photobiol.* 1995. T. 62. № 4. С. 615–24.
275. Ugarova N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. T. 4. № 1. С. 406–18.
276. Ulitzur S., Hastings J.W. Evidence for tetradecanal as the natural aldehyde in bacterial bioluminescence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. T. 76. № 1. С. 265–7.
277. Ura S. и др. Single cell reporter assay using cell surface displayed *Vargula* luciferase. // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. T. 92. № 6. С. 575–9.
278. Urbanczyk H. и др. Natural replacement of vertically inherited lux-rib genes of *Photobacterium aquimaris* by horizontally acquired homologues. // *Environ. Microbiol. Rep.* 2012. T. 4. № 4. С. 412–6.
279. Valiadi M., Iglesias-Rodriguez D. Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates-How Far Have We Come? // *Microorganisms*. 2013. T. 1. № 1. С. 3–25.
280. Verhaegent M., Christopoulos T.K. Recombinant *Gaussia* luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. // *Anal. Chem.* 2002. T. 74. № 17. С. 4378–85.
281. Vervoort J. и др. Identifications of the true carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of the stable intermediate II in bacterial luciferase // *Biochemistry*. 1986. T. 25. № 24. С. 8062–8067.
282. Vinayak S. и др. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. // *Nature*. 2015. T. 523. № 7561. С. 477–80.
283. Viviani V. и др. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. T. 280. № 5. С. 1286–91.
284. Viviani V., Ohmiya Y. Nucleic acid molecules encoding red and green emitting



luciferases Патент № US7276363 B2. USA, 2007.

285. Viviani V., Bechara E.J.H. Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze D-luciferin and ATP-dependent chemiluminescence: a luciferase-like enzyme // *Photochem. Photobiol.* 1996. Т. 63. С. 713–718.

286. Viviani V.R. и др. Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. // *Photochem. Photobiol.* 1999. Т. 70. № 2. С. 254–60.

287. Viviani V.R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. Т. 59. № 11. С. 1833–50.

288. Viviani V.R. и др. The influence of Ala243 (Gly247), Arg215 and Thr226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. // *Photochem. Photobiol.* 2002. Т. 76. № 5. С. 538–44.

289. Viviani V.R. и др. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2004. Т. 139. № 2. С. 151–6.

290. Viviani V.R. и др. A New Firefly Luciferase with Bimodal Spectrum: Identification of Structural Determinants of Spectral pH-Sensitivity in Firefly Luciferases¶ // *Photochem. Photobiol.* 2007. Т. 81. № 4. С. 843–848.

291. Viviani V.R. и др. The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Т. 7. № 2. С. 159–69.

292. Viviani V.R. и др. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011. Т. 10. № 12. С. 1879–86.

293. Viviani V.R., Bechara E.J., Ohmiya Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. // *Biochemistry.* 1999. Т. 38. № 26. С. 8271–9.

294. Viviani V.R., Bechara E.J.H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid (railroad worm) bioluminescence // *Photochem. Photobiol.* 1993. Т. 58. С. 615–622.

295. Viviani V.R., Bechara E.J.H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases // *Photochem. Photobiol.* 1995. T. 62. C. 490–495.
296. Viviani V.R., Bechara E.J.H. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroad worms (Coleoptera: Phengodidae) // *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1997. T. 90. C. 389–398.
297. Wada M. и др. LuxA gene of light organ symbionts of the bioluminescent fish *Acropoma japonicum* (Acropomatidae) and *Siphamia versicolor* (Apogonidae) forms a lineage closely related to that of *Photobacterium leiognathi* ssp. *mandapamensis*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. T. 260. № 2. C. 186–92.
298. Ward W.W., Cormier M.J. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. // *J. Biol. Chem.* 1979. T. 254. № 3. C. 781–8.
299. Wassink E.C. *Luminescence in Fungi* / под ред. P.J. Herring. London: Academic Press, 1978. 171–197 C.
300. Watanabe H. и др. Luminescence and respiratory activities of *Photobacterium phosphoreum*. Competition for cellular reducing power. // *J. Biochem.* 1975. T. 77. № 6. C. 1147–55.
301. Waud J.P. и др. Engineering the C-terminus of firefly luciferase as an indicator of covalent modification of proteins. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. T. 1292. № 1. C. 89–98.
302. Wet J.R. de и др. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985. T. 82. № 23. C. 7870–3.
303. Wet J.R. de и др. Cloning firefly luciferase. // *Methods Enzymol.* 1986. T. 133. C. 3–14.
304. White E.H. и др. The structure and synthesis of firefly luciferin // *J Am Chem Soc.* 1961. T. 83. C. 2402–2403.
305. White E.H. и др. Amino analogs of firefly luciferin and biological activity thereof // *J.*

Am. Chem. Soc. 1966. T. 88. C. 2015–2019.

306. White E.H. и др. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of excited states // *Bioorg. Chem.* 1971. T. 1. C. 92–122.

307. White E.H., Branchini B.R. Letter: Modification of firefly luciferase with a luciferin analog. A red light producing enzyme. // *J. Am. Chem. Soc.* 1975. T. 97. № 5. C. 1243–5.

308. White E.H., Karpetsky T.P. Unambiguous synthesis of *Cypridina* etioluciferamine. Application of titanium tetrachloride to the synthesis of pyrazine N-oxides // *J. Am. Chem. Soc.* 1971. T. 93. № 9. C. 2333–2335.

309. White E.H., McCapra F., Field G.F. The structure and synthesis of firefly luciferin // *J Am Chem Soc.* 1963. T. 85. C. 337–343.

310. Widder E.A., Case J.F. Distribution of subcellular bioluminescent sources in a dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis* // *Biol. Bull.* 1982. T. 162. № 3. C. 423–448.

311. Wiles S. и др. In Vivo Bioluminescence Imaging of the Murine Pathogen *Citrobacter rodentium* // *Infect. Immun.* 2006. T. 74. № 9. C. 5391–5396.

312. Wilmanns M. и др. Structural conservation in parallel beta/alpha-barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. // *Biochemistry.* 1991. T. 30. № 38. C. 9161–9.

313. Wilson T., Hastings J.W. Bioluminescence. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998. T. 14. № 1. C. 197–230.

314. Woo J., Arnim A.G. von. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. // *Plant Methods.* 2008. T. 4. № 1. C. 23.

315. Wood K. V и др. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. T. 124. № 2. C. 592–6.

316. Wood K. V и др. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. // *Science.* 1989. T. 244. № 4905. C. 700–2.

317. Wood K. V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence // *Photochem. Photobiol.* 1995. T. 62. C. 662–673.

318. Woodland Hastings J., Dunlap J.C. Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence. The particulate activity: Scintillons; the soluble components: Luciferase, luciferin, and luciferin-binding protein. , 1986. С. 307–327.
319. Wu C. и др. Preparation of biotinylated cypridina luciferase and its use in bioluminescent enzyme immunoassay. // *Anal. Chem.* 2007. Т. 79. № 4. С. 1634–8.
320. Wu C. и др. A bioluminescent enzyme immunoassay for prostaglandin E(2) using Cypridina luciferase. // *Luminescence.* 2009a. Т. 24. № 2. С. 131–3.
321. Wu C. и др. In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009b. Т. 106. № 37. С. 15599–603.
322. Wu C. и др. Chemical studies on the BRET system between the bioluminescence of Cypridina and quantum dots. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011. Т. 10. № 10. С. 1531–4.
323. Wu S., Letchworth G.J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. // *Biotechniques.* 2004. Т. 36. № 1. С. 152–4.
324. Xueyan L., Shuang Y., Xingcai L. Phylogenetic relationship of the firefly, *Diaphanes pectinealis* (Insecta, Coleoptera, Lampyridae) based on DNA sequence and gene structure of luciferase // *Zool. Res.* / “Dong wu xue yan jiu” bian ji wei yuan hui bian ji. 2006. Т. 27. № 4. С. 367–374.
325. Yamada Y. и др. Monitoring circadian time in rat plasma using a secreted Cypridina luciferase reporter. // *Anal. Biochem.* 2013. Т. 439. № 2. С. 80–7.
326. Yamagishi K., Enomoto T., Ohmiya Y. Perfusion-culture-based secreted bioluminescence reporter assay in living cells. // *Anal. Biochem.* 2006. Т. 354. № 1. С. 15–21.
327. Ye L. и др. Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica* // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. Т. 1339. № 1. С. 39–52.