

Министерство образования и науки Российской Федерации

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

Е.С. Алешина, И.Ф. Каримов, Д.Г. Дерябин

МЕТОДЫ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Методические указания к лабораторному практикуму

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
Государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург
ИПК ГОУ ОГУ
2011

УДК 591.148 (07)
ББК 28.071я7
А 49

Рецензент – доктор медицинских наук, Ю.А. Брудастов

Алешина, Е.С.
А 49 Методы биолюминесцентного тестирования: методические указания к лабораторному практикуму / Е.С. Алешина, И.Ф. Каримов, Д.Г. Дерябин; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2011. – 56 с.

Лабораторный практикум посвящен методам тестирования абиотических и биологических сред с использованием рекомбинантных люминесцирующих бактерий. Каждая лабораторная работа включает теоретический материал, описание методики проведения работы и оформления результатов.

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных работ студентами биологических специальностей, а также бакалаврами и магистрантами биологического профиля.

УДК 591.148 (07)
ББК 28.071я7

© Алешина Е.С.,
Каримов И.Ф.,
Дерябин Д.Г., 2011
© ГОУ ОГУ, 2011

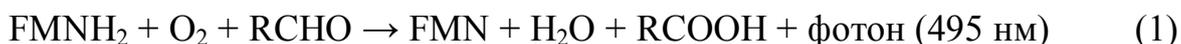
Содержание

Бактериальная биолюминесценция и ее использование в аналитических и диагностических целях.....	5
1 Использование люминесцирующих микроорганизмов для оценки интегральной токсичности природных сред и химических соединений (принцип метода).....	9
1.1 Метод определения интегральной токсичности питьевых, поверхностных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод с помощью бактериального теста «Эколюм».....	10
1.2 Особенности биолюминесцентного биотестирования бутыллированных вод.....	15
1.3 Особенности биолюминесцентного биотестирования мутных и окрашенных жидкостей (на примере суспензий углеродных наноматериалов).....	21
2 Использование люминесцирующих микроорганизмов при исследовании живых систем.....	27
2.1 Биолюминесцентный метод оценки гуморальных бактерицидных систем человека и животных.....	27
2.2 Биолюминесцентный метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов.....	31
2.3 Принцип биолюминесцентного имеджинга бактериальных инфекций.....	36
3 Создание и использование люминесцирующих микроорганизмов для оценки генной экспрессии.....	39
3.1 Репортерная люминесцирующая система для выявления генотоксикантов.....	42
3.2 Репортерная люминесцирующая система для выявления ионов тяжелых металлов.....	47

3.3 Репортерная люминесцирующая система для обнаружения бактериальных ауторегуляторов (гомосеринлактонов).....	51
4 Список рекомендуемой литературы.....	55
4.1 Базовая литература.....	55
4.2 Периодическая литература.....	56

Бактериальная биолюминесценция и ее использование в аналитических и диагностических целях

Биолюминесценция – свечение, возникающее в результате протекания специфических биохимических реакций в живых организмах, достаточно широко представлено на разных уровнях организации живой материи. У бактерий этот процесс сопровождается потреблением кислорода и в наиболее общем виде может быть представлен как окисление восстановленного флавинмоноклеотида (FMNH₂) до FMN с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) до соответствующей жирной кислоты (RCOOH):



Ферменты, катализирующие данную реакцию, носят общее название «люциферазы», а в соответствии с международной номенклатурой рассматриваются как щелочные FMN-зависимые монооксигеназы (E.C.1.14.14.3). У различных бактериальных видов они имеют сходное строение и представляют собой белковые α/β -гетеродимеры с молекулярной массой 76 ± 4 kDa, кодируемые генами *luxA* и *luxB* соответственно.

Для обеспечения стабильности световой эмиссии во времени необходимым является непрерывное возобновление субстратов для реакции биолюминесценции, без чего последняя прогрессивно затухает. В связи с этим в бактериальных клетках имеются две основные вспомогательные ферментные системы, первая из которых снабжает люциферазу восстановленными формами флавинмоноклеотида, а вторая ответственна за регенерацию альдегидов из соответствующих жирных кислот (рисунок 1).

За первый из этих процессов ответственны NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы (EC 1.6.99.-), формирующие с люциферазой единую электронотранспортную цепь и обеспечивающие последнюю восстановленным флавинмоноклеотидом (FMNH₂), в свою очередь возникающим в процессе восстановления FMN за счет энергии NAD(P)H.

Названный фермент кодируется геном *luxG*, функциональные аналоги которого встречаются у большинства бактерий, в связи с чем для воспроизведения биolumинесценции в гетерологичной системе переноса данного гена не требуется.

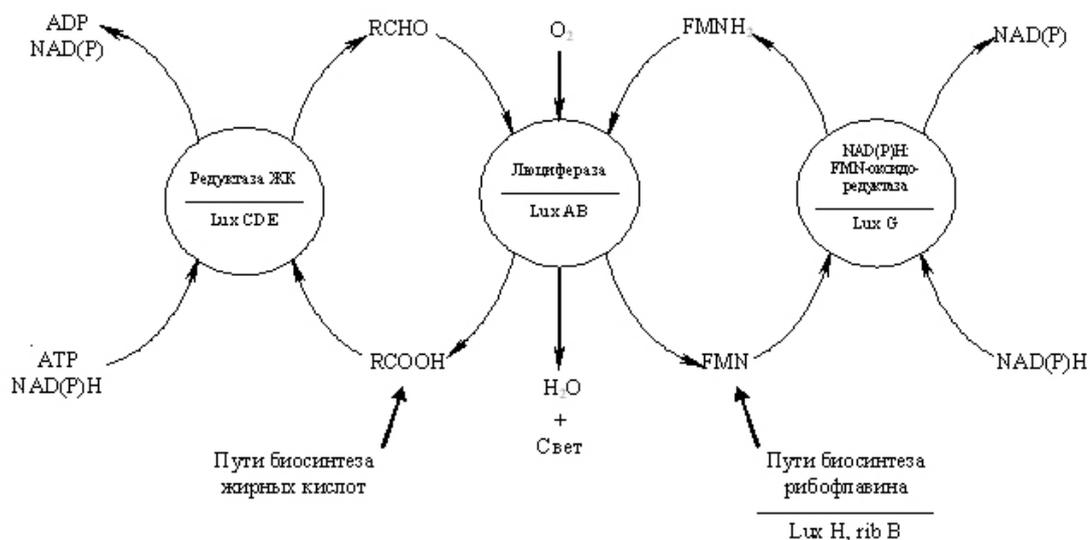


Рисунок 1 – Метаболические пути, ведущие к регенерации субстратов для реакции бактериальной биolumинесценции и контролируемые их *lux*-гены

По-иному обстоит дело с мультиферментным комплексом восстановления жирных кислот, катализирующим процесс их преобразования в длинноцепочечные алифатические альдегиды с использованием энергии ATP и NAD(P)H:



Для осуществления данной реакции необходима активность трех последовательно действующих ферментов: 1) ацилтрансферазы (EC 2.3.1.-) с молекулярной массой 33 kD; 2) лигазы (синтетазы) длинноцепочечных жирных кислот (EC 6.2.1.19) с молекулярной массой 42 kD; 3) ацил-CoA-редуктазы (EC 1.2.1.50) с молекулярной массой 54 kDa. При этом каждый из названных белков присутствует в составе мультиферментного комплекса в количестве четырех идентичных копий. Кодирующие же их гены *luxE*, *luxD* и

luxC характерны именно для люминесцирующих бактерий, в результате чего в их отсутствие для развития люминесценции в гетерологичных системах требуется экзогенное внесение длинноцепочечного альдегида.

Все вышесказанное объясняет тот факт, что гены *luxCDABE* являются наиболее универсальной частью целостного совместно транскрибируемого *lux*-оперона (рисунок 2), необходимого и достаточного для воспроизведения феномена бактериальной биолюминесценции в клетках гетерологичных хозяев.

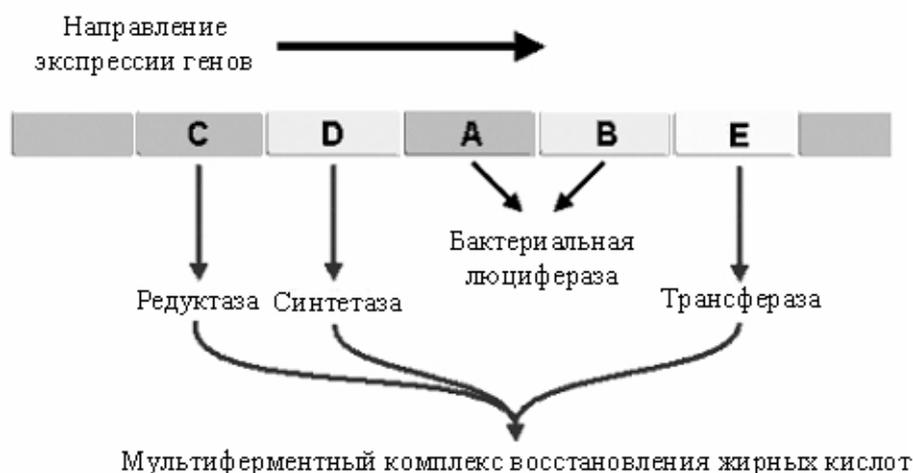


Рисунок 2 – Порядок организации основных структурных генов биолюминесценции в составе *lux*-оперона

Понимание описанных выше механизмов функционирования и генетического контроля биолюминесценции было положено в основу создания и практического использования бактериальных клеточных люминесцирующих тест-систем, использующих свечение в качестве результативного параметра проводимого аналитического исследования. При этом на основе характера экспрессии *lux*-генов подобные системы могут быть принципиально разделены на две основные группы:

1) так называемые «сенсорные» бактериальные люминесцирующие тест-системы, действующим началом которых являются природные или рекомбинантные микроорганизмы с конститутивной экспрессией *lux*-генов. В подобном случае интенсивность свечения отражает структурно-

функциональную состоятельность изначально присутствующей в бактериальных клетках люминесцентной системы, активность которой может угнетаться в результате нарушения ее энергетического обеспечения или разобщения при разрушении самой бактериальной клетки. Соответственно, основным направлением использования сенсорных тест-систем является интегральная оценка токсических или бактерицидных воздействий на люминесцирующую бактериальную клетку;

2) так называемые «репортерные» бактериальные люминесцирующие тест-системы, действующим началом которых являются рекомбинантные микроорганизмы с индуцибельной экспрессией *lux*-генов, клонированных под контролем различных промоторов. В подобном случае исходный уровень свечения подобных тест систем минимален, но многократно возрастает при появлении в среде культивирования фактора, активирующего соответствующий промотор. Результатом этого является относительно специфичная к воздействию индукция свечения, каковая может быть использована для оценки различных стрессовых факторов или детекции ауторегуляторных молекул.

Далее в настоящих методических указаниях к лабораторному практикуму мы приводим детальное описание разработанных к настоящему моменту сенсорных и репортерных люминесцирующих тест-систем, а также вариантов их использования при исследовании абиотических сред и живых систем.

1 Использование люминесцирующих микроорганизмов для оценки интегральной токсичности природных сред и химических соединений (принцип метода)

В России метод оценки качества природных сред и химических соединений закреплен законодательно и получил нормативную поддержку со стороны Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ (ныне – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека). При этом действующие рекомендации устанавливают методики определения острой химической токсичности для все видов сред, в том числе для питьевых, поверхностных пресных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод. Кроме того, методика определения интегральной токсичности поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных и очищенных сточных вод, водных экстрактов объектов окружающей среды с использованием тест-объекта биолюминесцентных микроорганизмов «Эколюм» поддерживается сертификатом Комитета по стандартизации и метрологии РФ № 01.19.231/2000. Биосенсор под коммерческим названием «Эколюм-9», созданный в МГУ им. М.В.Ломоносова, создан на основе микроорганизмов *Escherichia coli* несущих гибридную плазмиду pUC19 с клонированными *luxCDABE* генами *P.leiognathi* 54D10. Биосенсоры представляют собой лиофилизированные культуры люминесцентных бактерий с исходным содержанием бактериальных клеток около 10^9 КОЕ/мл, содержащиеся в вакууме или в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах.

В качестве измерительного прибора при определении токсичности могут использоваться «Биохемилюминометр БЛМ 8802» (СКТБ «Наука», Красноярск), «Биотокс-10» (ООО «Нера», Москва), а также прочие отечественные и зарубежные люминометры, работающие в обозначенной области спектра и обеспечивающие соответствующую дискретность измерений. Данные приборы предназначены для быстрого количественного

контроля степени интегральной токсичности проб воды в лабораторных и полевых условиях для медицинских, санитарно-гигиенических и экологических целей. Принцип действия основан на регистрации светового излучения в видимой сине-зеленой области спектра 410-580 нм с максимумом при 495 нм, возникающего в люминесцирующих бактериях при специфических ферментативных реакциях.

Критерием токсического действия исследуемой пробы служит изменение интенсивности свечения биотестов в анализируемой пробе по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе, не содержащей токсических веществ. Количественным параметром токсичности служит индекс токсичности – *T*.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2-3 час посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3-4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования – в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа.

1.1 Метод определения интегральной токсичности питьевых, поверхностных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод с помощью бактериального теста «Эколюм»

Среди природных сред, биотоксичность которых может быть определена с использованием методов биолюминесцентного анализа, по понятным причинам наиболее распространенными являются поверхностные пресные (реки, озера и др.), грунтовые, сточные и очищенные сточные воды,

а также атмосферные осадки – дождь и снег. При этом спектр детектируемых поллютантов простирается от различных веществ техногенного происхождения до образуемых естественными обитателями водоемов – цианобактериями «микроцистинов» или токсичных продуктов цветения зеленых и диатомовых водорослей.

Отбор проб питьевых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб». Пробы питьевой воды в источнике водоснабжения и сточной воды с глубиной менее 0,5 м отбираются пробоотборником любого типа объемом 10-50 мл. Отбор сточных вод осуществляется в соответствии с требованиями НВН 33-5.301-85 «Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод». Отбор природных и сточных вод следует проводить в местах наибольшего перемешивания.

Сточные воды отбираются на средней глубине потока, где твердые частицы равномерно распределены. При исследовании сточных вод на токсичность не допускается отбор разовой пробы. Количество необходимых порций выбирают на основе опыта проведения анализа. Предпочтительно отбирать среднесуточную пробу каждый час в течение 24 часов, после тщательного перемешивания всего объема отобранной пробы для исследования берется необходимое количество воды. Допустимое минимальное количество отбираемых единичных проб для последующего смешения – три, с интервалом между отборами не менее часа.

Водопроводную воду отбирают из-под крана после 5-минутного слива, кран антисептической обработке не подвергается.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность. Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают от 2 °С до 4 °С). Хранить пробы следует не более 24 часов после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (минус 18 °С) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность

воды может измениться. В случае предполагаемого замораживания пробы при ее оттаивании не следует заполнять сосуды полностью, чтобы избежать их разрыва. Если пробы требуется оттаивать или фильтровать, то фильтрация и оттаивание должны предшествовать замораживанию.

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры приблизительно 20 °С.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) проводят фильтрацию пробы через пористые обеззоленные фильтры – белая или красная ленты. Природные воды – через фильтр с диаметром пор 3,5 мкм.

Проба воды, подлежащая биотестированию должна иметь рН 6,0-8,0, если рН пробы выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют 10 %-ным раствором HCl, подщелачивание – 10 %-ным раствором NaOH.

При исследовании грунтовых или других вод с содержанием железа двухвалентного (валовая форма) необходимо предварительное оттаивание проб не менее 24 часов при температуре от 2 °С до 4 °С.

Образцы атмосферных осадков в виде снега и воды в форме льда перед анализом нагреваются до комнатной температуры.

Цель работы – освоить методику определения интегральной биотоксичности воды из поверхностного источника с использованием светящихся бактерий

Методика выполнения работы

Реконструкция биосенсора:

1) вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7,0-7,4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;

2) выдержают суспензию в холодильнике при температуре 2-4 °С в течение 30 минут;

3) доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (от 15 °С до 25 °С);

4) перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Процедура биотестирования:

1) при стандартном анализе отбирают из флакона по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и добавляют в три контрольные кюветы от люминометра и три кюветы для пробы;

2) в контрольные кюветы добавляют по 0,9 мл дистиллированной воды (рН 7,0-7,4);

3) в остальные кюветы добавляют по 0,9 мл опытной пробы (воды из поверхностного источника);

4) замечают время экспозиции и через определенный интервал времени (в стандартном варианте через 30 минут, в экспрессном – 5 минут) начинают измерять интенсивность биолюминесценции бактерий с помощью биолюминометра согласно инструкции по эксплуатации прибора;

5) проводят параллельное измерение трех (или более) пар контроль-опыт. Объем добавляемой суспензии бактерий к пробе может быть произвольным, но равным в контроле и исследуемой пробе;

6) в некоторых случаях необходимо проводить разведение исследуемого образца воды в следующих соотношениях 1:1, 1:3, 1:7 и 1:15. Для приготовления разведений используется дистиллированная вода.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности T по формуле

$$T = \frac{I_k - I_o}{I_k} \times 100 \%,$$

где I_k – интенсивность свечения в контрольной кювете;

I_o – интенсивность свечения в опытной кювете;

2) среднее значение индекса токсичности рассчитывается по формуле

$$T_{\text{ср}} = \frac{T_1 + T_2 + \dots + T_n}{n},$$

где T_1 - T_n – повторности (до 10) опытной пробы;

3) по определению острого токсического действия устанавливают три пороговых уровня индекса токсичности: индекс токсичности T находится в пределах от 0 % до 20 % – допустимая степень токсичности; T находится в пределах от 20 % до 50 % – образец токсичен; T находится в пределах >50 % – образец сильно токсичен.

4) в ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения T делается вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

Для выполнения работы определите индекс токсичности T для воды из поверхностного источника или водопроводного крана. Результаты запишите в таблицу 1. Рассчитайте среднее значение индекса токсичности.

Таблица 1

Результаты определения индекса токсичности T в исследуемых образцах				
	повторность	повторность	повторность	среднее значение
	1	2	3	$T_{\text{ср}}$
Образец 1				
Образец 2				

Сделайте вывод о биологической опасности/безопасности (степени токсичности) исследуемой пробы, взятой из поверхностного источника или водопроводного крана.

1.2 Особенности биолюминесцентного биотестирования бутыллированных вод

Несмотря на то, что технологии биолюминесцентного тестирования водных объектов к настоящему моменту детально разработаны, стандартизованы и апробированы, попытки расширения сферы применения биолюминесцентного анализа не прекращаются, в частности, в направлении исследования интегральной биотоксичности природных минеральных и искусственно минерализованных вод, традиционно используемых в качестве компонентов функционального питания, а в настоящее время все чаще рассматриваемых как альтернатива централизованному водоснабжению.

Задача тестирования биотоксичности подобных вод определяется необходимостью оценки уровня их биологической опасности, определяющей возможность/невозможность их использования человеком для питьевых целей в качестве столовых, лечебно-столовых или лечебных вод, предназначенных для регулярного применения или в качестве компонента диетических и лечебно-профилактических мероприятий. В этой связи биотестирование минеральных вод с использованием люминесцирующих бактерий внесено в перечень исследований, предусмотренных для оценки качества бутыллированных, в т.ч. минеральных вод (МУ 2.1.4.1184-03 по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества).

Основной причиной, препятствующей получению требуемого результата, является выраженное влияние на бактериальную биолюминесценцию не только токсических, но и «нормальных» компонентов минеральных вод – растворенных газов, катионов и анионов, способных имитировать эффекты химических токсикантов и, тем самым, исказить результаты биотестирования.

В связи с этим традиционная процедура биотестирования дополняется проведением пробоподготовки анализируемых проб, направленной на устранение основных причин, способных исказить результаты исследования: нормирование проб по общей минерализации и рН. В качестве дополнительного инструмента, поддерживающего разработанный алгоритм действий, зарегистрирована программа для ЭВМ № 2008611380 (2008), которая:

- 1) позволяет прогнозировать значения биолюминесцентного индекса в зависимости от индивидуального солевого состава и рН исследуемых вод;
- 2) в случае прогноза выраженного влияния нормального компонентного состава минеральной воды на результат ее биолюминесцентного биотестирования выдает рекомендации по проведению пробоподготовки, позволяющей снизить эффект подобного воздействия;
- 3) осуществляет расчет ожидаемых значений биолюминесцентного индекса после проведения подобной пробоподготовки.

Соответственно, предлагаемый алгоритм действий (рисунок 3) включает первичную дегазацию исследуемых вод с определением их минерального состава и уровня рН.

Последующее выполнение расчетов с использованием разработанной компьютерной программы позволяет либо исключить возможность искажающих эффектов компонентного состава минеральных вод на результаты биолюминесцентного биотестирования (вариант 1), после чего последнее выполняется по обычной методике, либо предположить возможность такового (вариант 2), что требует проведения дополнительной пробоподготовки. При этом наиболее универсальным и эффективным действием является контролируемое снижение значений рН в анализируемых пробах до уровня $\leq 7,5$, что позволяет устранить негативное влияние данного параметра на уровень биолюминесценции биосенсора «Эколюм-9».

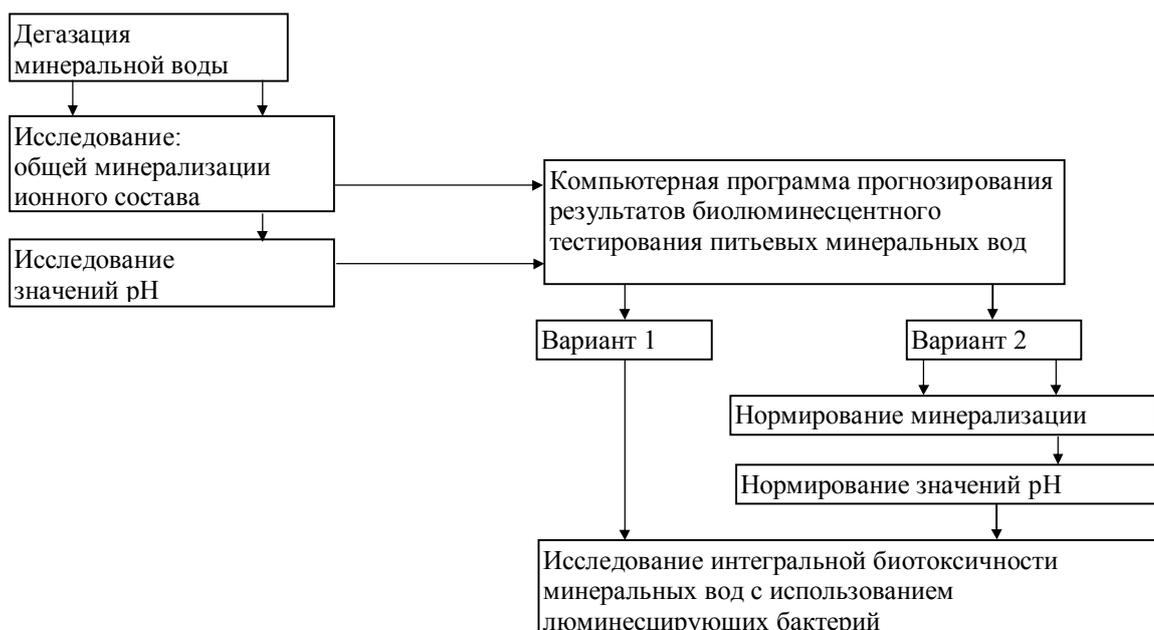


Рисунок 3 – Алгоритм проведения исследования биотоксичности питьевых минеральных вод с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров

Цель работы – освоить методику определения качества минеральной воды с использованием светящихся бактерий

Для определения острой интегральной токсичности (биотоксичности) природных минеральных бутилированных вод требуется объем пробы не менее 1100 мл.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на биотоксичность.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 24 часов с момента открытия бутылки с минеральной водой. Пробы должны содержаться при температуре, указанной на этикетке. В питьевых бутилированных водах допускается естественный осадок минеральных солей. При наличии осадка пробы необходимо фильтровать через бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ (синяя лента).

Методика выполнения работы

Пробоподготовка:

1) перед проведением биотестирования минеральные воды дегазируют путем их отстаивания в плоскодонных сосудах в течение 3-4 часов при интенсивном перемешивании на шейкере при 300 об/мин, температуре 20-24 °С и относительной влажности 100 %;

2) в части пробы объемом 1000 мл определяют уровень общей минерализации путем ее выпаривания и взвешивания сухого остатка на весах, позволяющих оценить величину последнего с точностью до $\pm 0,001$ г;

3) в дистиллированную воду в объеме 100 мл вносят навеску соли NaCl категории х.ч. в количестве определенной общей минерализации и данную воду используют в качестве контроля;

4) при проведении исследований измеряют значения рН в пробе и контроле с использованием рН-метра, позволяющего оценить значения данного показателя с точностью до 0,10 ед.;

5) если значение рН пробы выходит за 7,0, то подкисление осуществляют 0,1 н раствором соляной кислоты HCl, подщелачивание – 0,1 н раствором NaOH. При этом динамически замеряют динамику сдвига рН, после достижения значения рН=7,0 ед. внесение корректирующих растворов прекращают.

Реконструкция биосенсора:

1) вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7.0-7.4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;

2) выдержают суспензию в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 30 минут;

3) доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (15-25 °С);

4) перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Процедура биотестирования:

1) при стандартном анализе отбирают из флакона по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и добавляют в три контрольные кюветы от люминометра и три кюветы для пробы;

2) в контрольные кюветы добавляют по 0,9 мл подготовленного раствора NaCl, концентрация которого соответствует уровню общей минерализации исследуемой минеральной воды (pH 7,0-7,4);

3) в остальные кюветы добавляют по 0,9 мл опытной пробы (дегазированной минеральной воды);

4) замечают время экспозиции и через определенный интервал времени (в стандартном варианте через 30 минут, в экспрессном – 5 минут) начинают измерять интенсивность биолюминесценции бактерий с помощью биолюминометра согласно инструкции по эксплуатации прибора;

5) проводят параллельное измерение трех (или более) пар контроль-опыт. Объем добавляемой суспензии бактерий к пробе может быть произвольным, но равным в контроле и исследуемой пробе;

6) в некоторых случаях необходимо проводить разведение исследуемого образца воды в следующих соотношениях 1:1, 1:3, 1:7 и 1:15. Для приготовления разведений используется дистиллированная вода.

Обработка, оценка и оформление результатов

1) оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности T по формуле

$$T = \frac{I_k - I_o}{I_k} \times 100 \%,$$

где I_k – интенсивность свечения в контрольной кювете;

I_o – интенсивность свечения в опытной кювете.

2) Среднее значение индекса токсичности рассчитывается по формуле

$$T_{\text{ср}} = \frac{T_1 + T_2 + \dots + T_n}{n},$$

где T_1 - T_n – повторности (до 10) опытной пробы.

3) по определению острого токсического действия устанавливают три пороговых уровня индекса токсичности: индекс токсичности T находится в пределах от 0 % до 20 % – допустимая степень токсичности; T находится в пределах от 20 % до 50 % – образец токсичен; T находится в пределах >50 % – образец сильно токсичен.

4) в ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения T делается вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

Для выполнения работы определите индекс токсичности T для минеральной воды. Результаты определения уровня общей минерализации, интенсивность свечения в опытной и контрольной пробах запишите в таблицу 2. Рассчитайте индексы токсичности для исследуемых повторностей и среднее значение индекса токсичности.

Таблица 2

	Уровень общей минерализации	Интенсивность свечения в контроле	Интенсивность свечения в опытной пробе	Расчетное значение T	Среднее значение $T_{ср}$
Повторность 1					
Повторность 2					
Повторность 3					

Сделайте вывод о биологической опасности/безопасности исследуемой минеральной воды.

1.3 Особенности биолюминесцентного биотестирования мутных и окрашенных жидкостей (на примере суспензий углеродных наноматериалов)

Второй сферой расширения применения биолюминесцентного тестирования является исследование интегральной токсичности мутных и окрашенных жидкостей (наноглерода). Использование нанотехнологий и наноматериалов является одним из наиболее интригующих направлений развития науки и техники в XXI веке. К настоящему времени в мире уже зарегистрировано и выпускается более 1800 наименований наноматериалов (т.е. структур в диапазоне размеров до 100 нанометров). При этом дальнейший прогресс в их производстве и применении неизбежно приведет к массивному поступлению наноматериалов в природные экосистемы и среду обитания человека. В то же время совокупность накопленных фактов свидетельствует о том, что в силу своей малой размерности и большой удельной поверхности наноматериалы могут обладать совершенно иными биологическими (в том числе токсическими) свойствами, нежели вещества в обычном физико-химическом состоянии.

Первые результаты изучения биологической активности наноглерода оказались достаточно противоречивыми, и не столько дали ответ на поставленные вопросы, сколько вызвали множество новых.

Особенностью данного объекта исследования становится то, что наноматериалы, в частности наноглерод, являются не определенными химическими веществами или соединениями, но наноразмерными объектами, биологическая активность которых уже не описывается классическими токсикологическими законами, но предположительно зависит от таких особенностей их организации как поверхностные характеристики, размер, форма, состав, химическая реактивность и др. При этом подобные исследования не укладываются в рамки традиционной токсикологии, так как ориентированы на исследование биотоксичности соединений, активность которых не имеет прямых

концентрационных зависимостей, но определяется их размерными характеристиками и морфологической организацией. При этом, большинство соединений нанокремнезема не являются водорастворимыми, что предполагает использование неполярных или малополярных растворителей.

Особенностью биолюминесцентного тестирования суспензий нанокремнезема является то, что на уровень регистрируемого свечения может оказывать влияние не только изменение функционального состояния микроорганизма, но и определяемые свойствами самой суспензии явления частичного поглощения и/или рассеяния испускаемого света. Указанные обстоятельства могут вести к получению искаженных результатов анализа и определяют необходимость учета оптических свойств суспензий нанокремнезема при проведении их биолюминесцентного тестирования. Подходом, позволяющим исключить влияние оптических свойств нанокремнезема и реализованным на платформе микропланшетного люминометра LM-01T («Immunotech», Чехия), стало проведение кинетических измерений биолюминесценции. В данном случае нивелирование оптических свойств УНМ на результат исследования может быть осуществлено путем проведения вычислений по формуле, учитывающей значения светимости в контрольной и опытной пробках на нулевой и n-ой секунде проведения эксперимента.

Цель работы – оценить биологическую опасность/безопасность суспензий углеродных наноматериалов с использованием светящихся бактерий

Биотестирование проб нанокремнезема проводят через 24 часа с момента его разведения. Пробы должны содержаться при температуре 4 °С. Важным условием является использование посуды из стекла, которая должна быть химически чистой.

Методика выполнения работы

Пробоподготовка:

- 1) для определения острой интегральной токсичности (биотоксичности) наноуглерода делают навеску наноуглерода весом 4 мг в стеклянную емкость;
- 2) к навеске наноуглерода добавляют 1 мл органического растворителя – диметилсульфоксида категории ч.д.а., интенсивно смешивают пипетированием и оставляют на 24 часа при температуре +4 °С;
- 3) через 24 часа стеклянную емкость со взвесью наноуглерода в органическом растворителе помещают в источник ванного типа, где обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут;
- 4) часть полученной суспензии переносят в дистиллированную химически чистую воду таким образом, чтобы конечная концентрация органического растворителя равнялась 2,5 % по конечному объему.

Реконструкция биосенсора:

- 1) вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7,0-7,4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;
- 2) выдерживают суспензию при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 30 минут;
- 3) доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (от 15 °С до 25 °С);
- 4) перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Подготовка планшетного биолюцинометра:

- 1) прибор предварительно прогревают в течение получаса;
- 2) на компьютере запускают приложение «Kilia», после запуска которого будет происходить тестирование прибора;
- 3) в окне программы отмечают необходимые ячейки планшета, с которых будут сниматься показания свечения;

4) выбирают меню «Протокол» и подменю «Свойства», выставляют значения инкубации 10800 секунд, интервал между измерениями 300 секунд, нажимают «Ок» и сохраняют созданный протокол.

Процедура биотестирования:

1) в контрольные лунки планшета добавляют по 0,25 мл 2,5 % раствора использованного мало полярного растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) в дистиллированной химически чистой воде;

2) в опытные лунки добавляют по 0,25 мл суспензии наночастиц углерода, предварительно разведенного в растворе ДМСО до конечной концентрации растворителя 2,5 % и наночастиц углерода 0,1 мг/мл;

3) делают двухкратные разведения наночастиц углерода 2,5 % раствором ДМСО, получая следующие концентрации: 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, 0,0125 мг/мл, ..., 0,00156 мг/мл;

4) при стандартном анализе отбирают из флакона по 0,05 мл рабочей суспензии бактерий и добавляют в контрольные кюветы и опытные кюветы от планшетного люминометра;

5) планшет устанавливают в кюветное отделение у люминометра и производят кинетическое измерение биолюминесценции в течение 3 часов, запуская измерение нажатием соответствующей кнопки в программе «Kilia»;

6) по окончании измерения нажимают кнопку «Экспорт в XLS» и сохраняют данные.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) по окончании измерения данные сохраняются в файле с расширением «*.txt», открывают его с помощью программы Microsoft Office Excel, выбирая «Формат данных: с разделителями» и нажав кнопку «Готово»;

2) производят замену знаков «.» на знаки «,»;

3) в полученном файле столбцы соответствуют лункам планшета от 1 до 12, начиная со строки уровня А и заканчивая строкой уровня «Н». Последний столбец содержит значения точек времени, на которых производилось измерение свечения;

4) оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб на нулевой и конечной секунде (10800 с) и вычислению относительного значения биолюминесценции по формуле:

$$I = \frac{Ik_o \times Io_n}{Ik_n \times Io_o} \times 100 \%,$$

где Ik_o и Ik_n – значения светимости контрольной пробы на нулевой и n-ой секунде проведения эксперимента, отражающие кинетику «спонтанного» тушения свечения бактериального биосенсора за счет истощения энергетических субстратов для реакции биолюминесценции;

Io_o – интенсивность свечения опытной пробы на нулевой секунде после внесения сенсорного микроорганизма в суспензию УНМ, отражающая значимость их оптических свойств в снижении регистрируемого параметра;

Io_n – интенсивность свечения опытной пробы на n-ой секунде проведения эксперимента, интегрирующая в себе оптические и биологические характеристики УНМ;

5) по окончании расчетов строят график, отражающий зависимость интенсивности свечения I от концентрации исследуемой формы наноклерода на 1, 2 и 3 часу контакта с клетками-мишенями;

6) рассчитывают значения EC20 и EC50, соответствующие концентрации наноклерода, вызывающие 20 % и 50 % подавление свечения люминесцирующего штамма;

7) данные фиксируют в таблице 3.

Сделайте вывод о токсичности/нетоксичности исследуемого образца, проанализируйте как изменяются значения относительного свечения I от длительности контакта наноклерода с клетками люминесцирующих микроорганизмов *E.coli*.

Таблица 3

	Токсикологические характеристики при различном времени контакта наночуглерода с клетками люминесцирующих микроорганизмов					
	1 час		2 часа		3 часа	
	EC20	EC50	EC20	EC50	EC20	EC50
Образец 1						
Образец 2						

2 Использование люминесцирующих микроорганизмов при исследовании живых систем

Причиной изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции, помимо воздействия токсикантов на обслуживающие ее метаболические пути или индукцию генной экспрессии, может являться и гибель самой микробной клетки, сопровождающаяся пространственной дезорганизацией ферментной системы генерации свечения. Сказанное определяет еще одно направление практического использования биолюминесценции, заключающееся в выявлении антимикробных свойств живых систем и базирующееся на представлениях о том, что в подобных условиях интенсивность свечения является пропорциональной числу сохранивших свою жизнеспособность бактериальных клеток. При этом в рамках данного направления возможно сосуществование двух подходов, первый из которых ориентирован на оценку бактерицидных свойств гуморальных и клеточных факторов противоинфекционной резистентности при проведении исследований *in vitro*, а второй заключается в изучении характеристик инфекционного процесса на моделях *in vivo*.

2.1 Биоломинесцентный метод оценки гуморальных бактерицидных систем человека и животных

Бактерицидная активность цельной сыворотки крови (БАСК) определяется комплексом неспецифических факторов защиты, действие которых взаимосвязано, но вместе с тем направлено на определенные виды микроорганизмов и формы их диссоциации. Исследование бактерицидных свойств сыворотки крови показывает, что они обусловлены не только антителами, но и благодаря достаточному содержанию таких неспецифических иммунных белков, как, комплемент, бета-лизины, лизоцим и пропердин. Изучение соотносительного значения перечисленных факторов

показало, что инактивация комплемента существенным образом снижает БАСК, добавление антител резко повышает ее, отсутствие лизоцима и β -лизина приводит к более или менее выраженному снижению БАСК в зависимости от чувствительности к ним бактерий. Механизм кооперативного действия представляется так: система антитело-комплемент разрушает клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану; лизоцим – пептидогликан клеточной стенки; бета-лизины – цитоплазматическую мембрану. Следовательно, уровень БАСК является интегральным показателем антимикробных свойств сыворотки крови.

Исследование бактерицидной активности сыворотки крови возможно с помощью люминесцирующих рекомбинантных штаммов, созданных на основе представителей вида *Escherichia coli*, традиционно используемых при реализации бактериологических и нефелометрических технологий определения БАСК. Адекватным подходом к решению задачи биолюминесцентного тестирования БАСК является использование рекомбинантных штаммов *E.coli* с клонированными в них полными *lux*-оперонами *Photobacterium leiognathi*. При этом свойства донора обеспечивают самодостаточность подобных генетических конструкций для обеспечения высокого уровня конституитивной биолюминесценции без внесения каких-либо дополнительных субстратов. С другой стороны, свойства реципиентов (в первую очередь, особенности строения их поверхностных структур) обуславливают высокую чувствительность к присутствующим в сыворотке крови бактерицидным факторам, что является одним из ведущих требований к тест-штаммам, используемым при тестировании БАСК. Таким образом, рассматриваемый метод основан на гибели клеток *E.coli*, что обусловлено действием бактерицидных компонентов сыворотки крови (в первую очередь системы комплемента, что связано с грамотрицательным типом строения клеточной стенки используемых биосенсоров).

Отбор крови производится из локтевой вены утром натощак в чистые стеклянные пробирки. Затем кровь необходимо выдержать в течение 1-2 часов для седиментации клеточной массы, после чего произвести центрифугирование в течение 15 минут при 800 g (1500 об/мин). Полученную жидкую фракцию крови отобрать в чистые сухие флакончики с пробками или в пробирки с крышками, при этом цвет сыворотки должен быть от светло-желтого до насыщенного желтого. Не допускается использование мутных, загрязненных и гемолизированных образцов сыворотки крови. Полученные пробы заморозить и хранить при минус 20 °С, при этом активность сохраняется в течение трех месяцев. Не допускается повторное замораживание.

Цель работы – изучить бактерицидную активность нативной и термоинактивированной сыворотки крови с использованием рекомбинантного люминесцирующего штамма *E.coli* «Эколюм-9»

Методика выполнения работы

Реконструкция биосенсора:

- 1) вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7,0-7,4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;
- 2) выдерживают суспензию в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 30 минут;
- 3) доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (от 15 °С до 25 °С);
- 4) перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Процедура биотестирования:

- 1) тестируемые образцы сыворотки крови выдержать при комнатной температуре в течение 30 мин;

2) каждый исследуемый образец необходимо разделить на две равные аликвоты в пластиковые пробирки, одну из которых прогреть при 37 °С, а вторую – при 56 °С в течение 15 минут;

3) внести в две кюветы биохемилюминометра по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий;

4) в контрольную кювету внести 0,9 мл 0,85 % раствора NaCl;

5) в опытную кювету внести 0,9 мл тестируемого образца сыворотки крови (опытная проба);

6) зафиксировать кинетику свечения биосенсора в обеих пробах в течение 30 минут с использованием двухканального биохемилюминометра БЛМ 8802М2К или аналогичного.

7) повторить п. 3 – 6 для всех образцов сыворотки крови, в том числе и термоинактивированных.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) расчет нормализованной люминесценции произвести по формуле

$$I_{\text{норм}} = \frac{I_n^{\text{опыт}} \cdot I_0^{\text{контр}}}{I_0^{\text{опыт}} \cdot I_n^{\text{контр}}},$$

где $I_{\text{норм}}$ – нормированное значение люминесценции на n-минуте;

$I_n^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на 0-минуте;

$I_n^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на 0-минуте;

2) выявить значения максимального и минимального уровня свечения и времени их наступления, а также уровень первичного тушения люминесценции;

3) проанализировав графики и полученные данные, результаты следует внести в таблицу 4.

Таблица 4

	Первичное тушение люминесценции	БЛИ _{max} , отн.ед.	T (БЛИ _{max}), с	БЛИ _{min} , отн.ед.	T (БЛИ _{min}), с
Нативная сыворотка					
Термо-инактивированная сыворотка					

Сделайте вывод об активности изученных образцов и роли термического воздействия на ее компоненты.

2.2 Биохемилюминесцентный метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов

Наиболее важную группу способных к фагоцитозу и долгоживущих клеток составляют популяции мононуклеарных фагоцитов. Они несут функции захвата частиц, в том числе инфекционных агентов, с их поглощением, разрушением и дальнейшей презентацией антигена иммунокомпетентным клеткам. Вторая значительная группа – это полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы), составляющие большинство среди лейкоцитов, но в отличие от мононуклеаров относятся к короткоживущим клеткам, которые поглощают чужеродный материал, разрушают его и погибают, при этом они не обладают какой-либо «врожденной» специфичностью, но им принадлежит важнейшая роль в острой защитной воспалительной реакции на инфекцию.

Для оценки бактерицидности предложен достаточно большой спектр различных способов и вариантов их выполнения. К наиболее простым из них

следует отнести микроскопический метод, с использованием которого проводится подсчет обычных (жизнеспособных) и дегенеративных (разрушенных) микроорганизмов после совместной инкубации с фагоцитами в присутствии опсонизирующей сыворотки при 37 °С в течение 1 часа и последующей окраски по Романовскому-Гимзе или иными красителями. Более надежен микробиологический метод, заключающийся в определении числа микроорганизмов, выживших после контакта с фагоцитами и за счет этого сохранивших способность к формированию изолированных колоний при выращивании на плотных питательных средах.

Наиболее современные методы оценки фагоцитоза основаны на введении в фагоцитарную систему дополнительных «меток», инструментальное исследование которых позволяет получить объективное и экспрессное представление об изучаемых явлениях.

Биохемилюминесцентный метод основан на параллельной регистрации биолюминесценции (свечения, возникающего в результате специфических биохимических реакций) бактериальных клеток, находящихся в контакте с фагоцитирующими клетками и хемилюминесценции – свечения экзогенно вносимого в фагоцитарную систему вещества (люминола), возникающего в результате его окисления при взаимодействии с генерируемыми фагоцитами активными формами кислорода (АФК) – перекисью водорода, супероксид анионом и др.. В свою очередь образование последних является результатом деятельности гексозомонофосфатного шунта с окислением кислорода НАДФН-оксидазной системой, формирующегося при активации фагоцитов и сопровождающегося развитием сильного бактерицидного эффекта. В результате исследование хемилюминесцентного ответа позволяет быстро, количественно и в динамике изучаемого процесса анализировать и оценивать иммунореактивность организма по показателям активации клеток макрофально-гранулоцитарного ряда.

Цель – изучить фагоцитарную активность нейтрофилов с помощью люминесцирующих бактерий

Методика выполнения работы

Приготовление суспензии нейтрофилов:

1) гепаринизированную периферическую кровь (20 Ед/мл) в объеме от 8 до 10 мл отбирают из локтевой вены, после чего отстаивают в пластиковых пробирках в течение 2 часов для осаждения эритроцитов. После отстаивания верхнюю фазу, представляющую собой лейкоцит-обогащенную плазму, осторожно отбирают пипеткой и переносят для дальнейшего разделения в отдельную пробирку;

2) для разделения фракций мононуклеаров и нейтрофилов используют градиентные растворы «фиколл-верографин». При их приготовлении используется фиколл с молекулярной массой 400 кДа, который растворяют в дистиллированной воде до концентрации 6,1 %, после чего в определенных соотношениях смешивают с 76 % раствором урографина. Необходимую плотность ($1,092 \text{ г/см}^3$ и $1,077 \text{ г/см}^3$) доводят с помощью ареометра;

3) перед разделением в пластиковые центрифужные пробирки наслаивают градиентный раствор фиколла-верографина с плотностью $1,092 \text{ г/см}^3$, а затем второй градиентный раствор с плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$. Сверху осторожно наслаивают образец лейкоцит-обогащенной плазмы;

4) после 45 минут центрифугирования со скоростью 1500 g в пробирках формировалось шесть фракций: первая (нижняя) – осадок эритроцитов и мертвых клеток, вторая – раствор фиколла-верографина ($1,092 \text{ г/см}^3$), третья – кольцо, содержащее нейтрофилы (от 98 % до 100 %), четвертая – раствор фиколла-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$), пятая – кольцо, содержащее мононуклеары (лимфоциты и моноциты), шестая – остатки плазмы;

5) кольцо, содержащее нейтрофилы, осторожно снимали пипеткой, переносили в третью пластиковую пробирку, отмывали холодным

физиологическим раствором и ресуспендировали в среде 199 до концентрации $5 \cdot 10^6$ кл/мл (Хейфец Л.Б., Абалакина В.А., 1973).

Реконструкция биосенсора:

1) вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 °С дистиллированной воды (лучше стерильной), рН 7,0-7,4. Несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий;

2) выдерживают суспензию в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 30 минут;

3) доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (от 15 °С до 25 °С);

4) перед отбором определенных объемов для проведения анализа рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий.

Процедура биотестирования:

1) опсонизировать биосенсор антителами путем смешения бактерий и 2,5 % раствора нормального иммуноглобулина человека в соотношении 1:1 и инкубировать в течение 15 минут при 37 °С. После этого бактерии отмыть от остатков антител путем центрифугирования в течение 15 минут при 1500 g и ресуспендировать в физиологическом растворе до концентрации $5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл;

2) полученную суспензию разделить на две равные аликвоты, одну из которых помещают в твердотельный термостат и прогревают в течение 15 минут при 42 °С для термоинактивации бактериальной люциферазы, а вторую оставляют в холодильнике;

3) в одну кювету внести 100 мкл светящихся опсонизированных бактерий с концентрацией, а во вторую – 100 мкл опсонизированных бактерий с термоинактивированной люциферазой и дополнительно 20 мкл люминола в конечной концентрации 10^{-3} М;

4) процесс фагоцитоза запускают путем добавления 900 мкл нейтрофилов с концентрацией $5 \cdot 10^6$ кл/мл, так что достигаемое соотношение «бактерии : нейтрофилы» составляет 10 : 1;

5) свечение регистрируют параллельно в двух пробах в течение 60 мин при 37 °С в термостатируемой измерительной ячейке двухканального биохемилюминометра.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) расчет нормализованной люминесценции произвести по формуле

$$I_{\text{норм}} = \frac{I_n^{\text{опыт}} \times I_0^{\text{контр}}}{I_0^{\text{опыт}} \times I_n^{\text{контр}}}$$

где $I_{\text{норм}}$ – нормированное значение люминесценции на n-минуте;

$I_n^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на 0-минуте;

$I_n^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на 0-минуте.

2) выявить уровень активации нейтрофилов по уровню хемилюминесценции и величину бактерицидного эффекта по уровню биолюминесценции;

3) проанализировав полученные данные и графики определить состояние неспецифического клеточного иммунитета и выявить зависимость между активацией хемилюминесценцией и тушением биолюминесценции.

Таблица 5

Образец	I_{max} (ХЛ), отн. ед.	I_{max} (БЛ), отн. ед.	T (I_{max} (ХЛ)), с	T (I_{max} (БЛ)), с

Сделайте вывод об активности фагоцитирующих клеток исходя из интенсивности окислительного взрыва и гибели бактериальных клеток.

2.3 Принцип биолюминесцентного имеджинга бактериальных инфекций

В 1995 году была предложена модель неинвазивного изучения хода течения инфекционного заболевания и развивающегося патогенеза на животных с использованием биолюминесценции. При этом происходит воспроизведение экспериментальной инфекции с использованием несущих люминесцентную метку патогенных бактерий или вирусов с последующим прямым учетом свечения в органах и тканях инфицированных лабораторных животных. В общем виде подобный подход является частным случаем получившего в последнее время широкое распространение «имеджинга» (англ. imaging – отображение) (рисунок 4), заключающегося в неразрушающем визуальном представлении и описании процессов, происходящих в живых организмах на клеточном, тканевом и органном уровнях. При этом биолюминесцентные и флюоресцентные технологии могут быть объединены в группу методов оптического имеджинга, составляющих конкуренцию методам радионуклидного анализа, магнитного резонанса и компьютерной томографии.

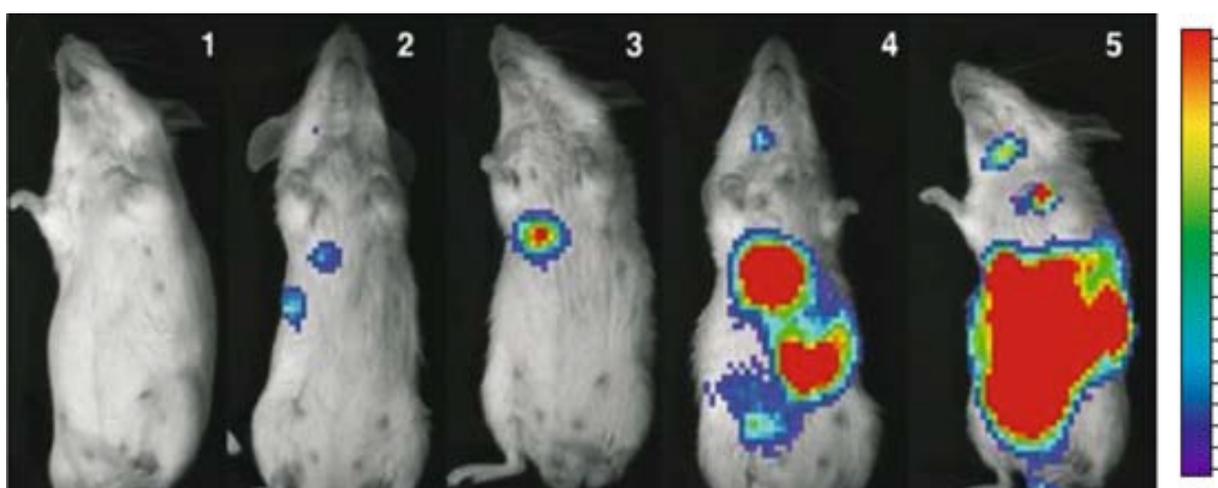


Рисунок 4 – Биолюминесцентный «имеджинг» развития листериоза у мышей в течение пяти дней. Люминесцирующие *Listeria monocytogenes* 2С введены в концентрации $4 \cdot 10^4$ клеток на животное

Технические условия для реализации подобных подходов заключаются в использовании не традиционных биолюминометров, а высокочувствительных датчиков на основе кристаллов кремния, позволяющих регистрировать низкоэнергетичные фотоны света с длиной волны от 400 до 1000 нм, одновременно отсекая тепловые помехи. Подобные CCD-камеры (англ. charged coupled device – прибор с зарядовой связью) размещаются в светонепроницаемых кабинетах и снабжаются прецизионными устройствами перемещения, что позволяет получить представления о двух- или даже трехмерном распределении свечения. При этом в связи с низкой интенсивностью последнего измерение может продолжаться в течение нескольких секунд или даже минут, что обуславливает требование к полной неподвижности объекта, достигаемой использованием наркоза. После же соответствующей обработки сигнала биолюминесценция объекта часто представляется в виде псевдоцветного изображения, где градации цвета отражают яркость свечения.

Перечисленные технические усовершенствования позволили перейти от культур клеток и прозрачных организмов к исследованию таких относительно крупных объектов, как лабораторные мыши, что все-таки имеет некоторые ограничения, определяемые типом исследуемых тканей и глубиной их расположения. В частности, свет с короткими длинами волн (синий и зеленый) поглощается тканями в большей степени, чем длинноволновый красный, в связи с чем, его наилучшее распространение происходит через мышцы и кожу, в то время как органы с высокой плотностью сосудистой сети (например, печень и селезенка) характеризуются самой низкой светопрозрачностью из-за поглощения света гемоглобином. Дополнительное поглощение света может также возникать в волосяном покрове, особенно имеющем темную окраску, что делает предпочтительным использование лабораторных животных с иммунной недостаточностью, часто сопровождающуюся облысением. Кроме того,

каждое увеличение глубины расположения светящегося объекта на 1 см ведет приблизительно к десятикратному ослаблению интенсивности сигнала, что определяет преимущество использования мышей по сравнению с более крупными лабораторным животными. Наконец, существуют некоторые ограничения в обнаружении люминесцирующих бактерий в анаэробных эконических, что объясняется обязательностью присутствия кислорода для формирования свечения.

В качестве биолюминесцирующих систем принято использовать люциферазы насекомых (северо-американский светлячок, клик-битл, *renilla*) или бактерий (*Photobacterium luminescens*). Основное отличие между указанными типами люцифераз заключается в том, что для светлячковой люциферазы необходимо экзогенное внесение люциферина, являющегося субстратом для указанного фермента, в то время как ферменты, синтезирующие деканаль – субстрат бактериальной люциферазы – кодируется клонированным *luxCDABE*-опероном.

3 Создание и использование люминесцирующих микроорганизмов для оценки генной экспрессии

Очевидным преимуществом использования биосенсоров при тестировании сред является не специфика наблюдаемого отклика, а его интегральность, показывающая общее негативное воздействие пробы на живой тест-объект. Таким образом биотест отвечает скорее на вопрос «тоскичен ли образец?», нежели на вопрос «какие токсиканты содержатся в образце?».

В последние годы рекомбинантные микроорганизмы играют значительную роль в двух параллельных направлениях в области токсикологического биоисследования, которые могут быть охарактеризованы как «системы тушения» и «системы индукции» (рисунок 5).

Понятие «тушения свечения» заключается в широком круге микробного биотестирования, которое основано на уменьшении интенсивности свечения в зависимости от концентрации образца с помощью дикого штамма люминесцирующей бактерии *Vibrio fischeri* после непродолжительного взаимодействия с образцом.

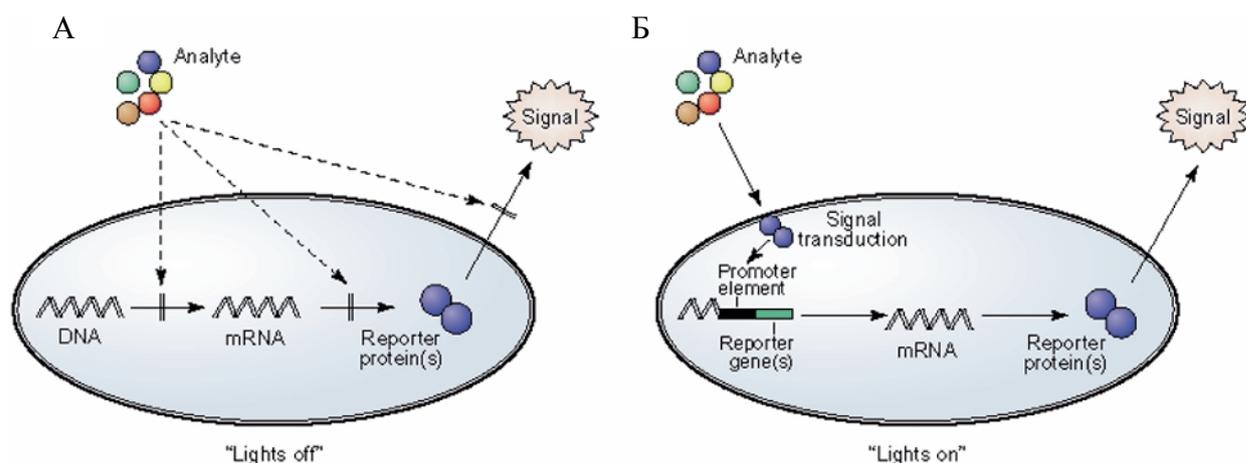


Рисунок 5 – Схема конститутивного (А) и идуцибельного (Б) свечения

Иной подход к исследованию эффектов загрязнения основан на молекулярном сшивании репортерной системы и выбранных генов-

промоторов, отвечающих на различные стрессовые состояния. Предположив, что ни один репортерный штамм не будет способен раскрывать все потенциальные клеточные стрессовые факторы, было предложено использовать совокупность штаммов, каждый из которых отвечает на то или иное воздействие. Было продемонстрировано, что подобные группы весьма чувствительны к ключевым экологическим загрязнителям, к примеру, диоксидам и эндокринным раздражителям.

Репортерные штаммы бактерий, также именуемые как клеточные биосенсоры, бактериальные биорепортеры или мониторинговые штаммы, содержат репортерные гены, кодирующие продукт, который легко может быть оценен и связан с метаболической активностью или специфической экспрессией генов в клетке-хозяине. Репортерные гены могут кодировать системы биолюминесценции (бактериальный (*lux*) или светлячковый (*luc*) оперон) или флуоресценции (гены экспрессии зеленого флуорисцирующего белка (GFP) и его производных), что является более удобным, нежели применение репортерных генов *lacZ* (кодирующий галактозидазу) или *xylE* (кодирующий катехол 2,3-диоксигеназу) ввиду более высокой чувствительности и специфичности.

Люминесцирующие бактерии можно разделить на три крупные группы. Первая группа включает в себя неспецифичных репортеров, несущих *lux* гены под контролем конститутивного промотора (маркерные гены). Часто такие штаммы несут полную кассету генов *luxCDABE*, при этом они испускают постоянный свет при аэробных условиях. Вторая группа репортеров основана на экспрессии генов репрессии в присутствии основных стрессовых факторов (полуспецифичные репортеры). И, наконец, третья группа репортеров обладают сильным специфичным ответом в присутствии фактора или его отсутствии.

В первых работах были использованы наборы *lux*-генов, направленных на специфическое детектирование нафталина и салицилата, где была показана прямая зависимость для схожих репортерных конструкций по

обнаружению органических или неорганических загрязнителей или классов загрязнителей. В большинстве случаев как репортер была использована биолюминесценция с различными типами β -галактозидазной активности и, в большинстве случаев, накоплением зеленого флюоресцирующего белка (green fluorescent protein, GFP). Недавно к этой группе биорепортеров добавились светящиеся фенол-чувствительные *Acinetobacter*, основанные на GFP толуол-чувствительные *Pseudomonas fluorescens* и репортеры 3-хлоркateхола. Созданы различные генетические структуры на основе *E. coli* или *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования некоторых металлов. Репортерные люминесцирующие штаммы позволяют оценивать биологическую доступность компонентов питательной среды, к примеру, *Synechococcus* sp. с *glnA::lux*-опероном или *nblA::lux*-опероном чувствительны к биодоступному азоту.

Еще один рекомбинантный люминесцирующий штамм, несущим гены *fabA::luxCDABE*, был сконструирован для детекции токсикантов, вызывающих мембранное повреждение. Ген *fabA* отвечает за формирование двойной связи в жирных кислотах, используемых в мембране *E. coli* и находящийся под позитивной регуляцией оперона *fadR*. При этом белок FadR действует и как репрессор генов, регулирующих разрушение жирных кислот, и как транскрипционный активатор энокислотного синтеза. С помощью таких рекомбинантных штаммов описаны механизмы действия различных веществ на бактериальные клетки, впоследствии разделенных на две группы – вещества с прямым повреждением мембраны и вещества с косвенным повреждением.

Таким образом, использование рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов с конститутивным характером экспрессии *lux*-генов позволит определить концентрационные и временные зависимости между нарушением энергетики клетки-мишени и ее гибелью. С другой стороны, применение репортерных штаммов с *lux*-генами, клонированными под различными стрессовыми промоторами, и за счет этого характеризующихся

индуцибельным характером биолюминесценции, способно стать эффективным инструментом исследования повреждающего воздействия различных факторов на основные структурно-функциональные подсистемы бактериальной клетки.

3.1 Репортерная люминесцирующая система для выявления генотоксикантов

Исследование бактериального мутагенеза может быть использовано как предварительная оценка активности химических веществ в отношении генетического материала ввиду своей простоты, точности и связи с раковыми заболеваниями у людей, при этом изучение интенсивности воздействия поллютантов может быть реализовано путем оценки активации репарирующих систем бактериальной ДНК. Однако, многие продукты генов, которые отвечают за восстановление ДНК, достаточно сложно идентифицировать и изучать ввиду их энзиматической природы и наличия множества промежуточных субстратов, участвующих в реакции восстановления.

Для решения возникшей задачи методами генной инженерии были созданы бактериальные репортерные штаммы, которые дают специфический ответ на присутствующие в среде генотоксиканты. Большинство из них основаны на сшивке промотора гена, который активируется при действии генотоксичного вещества, с генами или группой генов, активность которых может быть оценена количественно, желательно в режиме реального времени. Таким образом, гены промотора действуют как чувствительный элемент, который при активации запускает транскрипцию нижележащих репортерных генов.

В качестве таковых промоторов были выбраны промоторы SOS-систем, отвечающие за восстановление молекул ДНК. Такие гены индуцируются в ответ либо на возникшее повреждение ДНК, либо в ответ на присутствие

ДНК-повреждающих агентов, и в основном состоят из двух частей – *recA*-зависимого *lexA*-контролируемого SOS-ответа и *recA*-независимой *ada*-контролируемой адаптивной системы, индуцируемой при возникновении алькильного повреждения ДНК.

Ген *RecA* рекомбиназы, который играет ключевую роль при SOS-ответе посредством коферментной активности вместе с репрессором *LexA*, зачастую используются в качестве базы для различных конструкций генотоксических сенсоров. К примеру, был создан колориметрический «Rec-Lac тест», основанный на штамме *E.coli* GE94, несущего связку генов *recA-lacZ*, и его дефицитных по ДНК-репарации аналогов, таких как KY946 (*urvA*), KY945 (*recA*), KY943 (*lexA*). Эта конструкция показала свою чувствительность в отношении 4-нитроквинолин-N-оксида, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина, митомицина С и ультрафиолетового излучения, а также пероксида водорода, формальдегида, терт-бутил гидропероксида и стрептонигрина. Иная система, использующая гены *V.fisheri*, была основана на штамме *E.coli* DPD2794 и несла сшивку *recA':::luxCDABE*, основанную на мультикопийной плазмиде *pUCD615*. Такая генетическая конструкция позволяла в режиме реального времени визуализировать транскрипционный ответ, вызванный повреждением ДНК, без необходимости добавления внеклеточных ферментов или субстратов для люциферазы. При этом полученный рекомбинантный штамм отвечал увеличением уровня биолюминесценции на воздействие стрессовых факторов, оказывающих генотоксическое действие. В то же время, в присутствии летальных концентраций токсикантов также может быть оценено ингибирование люминесценции, определяемое снижением присутствующей конститутивной экспрессии этих генов.

В качестве гена SOS-ответа можно использовать также ген колицина Д (*sda*-промотор), присутствующий в плазмиде *ColD*, и чувствительный к различным генотоксикантам, таким как митомицин С, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, налидиксиновая кислота, диметилсульфат, пероксид

водорода, формальдегид, ультрафиолетовое и гамма-излучение. Особенностью последнего гена является высокая интенсивность экспрессии гена под воздействием SOS-индуцирующего агента наряду с низким уровнем фоновой активности *cda*-промотора.

Цель работы – изучить генотоксичность образцов с использованием репортерных люминесцирующих штаммов

Для анализа воздействия изучаемых агентов на генетический аппарат клетки используются два рекомбинантных люминесцирующих штамма *E. coli* с плазмидами *pUC19*, несущих комплекс генов *recA':::luxCDABE* и *colD::luxCABE*, созданных в «ГосНИИГенетика» и характеризующихся индуцибельным характером свечения (таблица 6).

В их основе лежит хозяйский штамм *E. coli* K12 MG1655, а в качестве донора использован природный люминесцирующий микроорганизм *P. luminescens* *Zm1* с ранее полностью секвенированным *luxCDABE*-опероном, гены которого сшиты с соответствующим стресс-промотором.

Таблица 6 – Индукторы репортерных штаммов

Репортерный штамм	Действие промотора	Индуктор	Оптимальный диапазон концентраций
<i>E. coli</i> <i>recA':::lux</i>	SOS-ответ на повреждение ДНК (синтез системы белков LexA-RecA)	ультрафиолет митомицин С	25 Вт/м ² , 10 мин 10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁶ М
<i>E. coli</i> <i>colD::lux</i>	SOS-ответ на повреждение ДНК (синтез колицина Д)	ультрафиолет митомицин С	25 Вт/м ² , 10 мин 10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁶ М

Методика выполнения работы

Подготовка биосенсора:

1) культуру бактерий *E. coli recA':::lux* (или *E. coli colD':::lux*) выращивают на LB-агаре с селективным маркером (ампициллин в концентрации 100 мкг/мл) в течение 16-18 часов при 37 °С;

2) несколько колоний свежей ночной культуры переносят в пробирку с 5 мл LB-бульона и инкубируют на качалке в течение 3 часов при 37 °С для достижения клетками стадии лаг-фазы роста;

3) по окончании инкубации измеряют оптическую плотность бактериальной суспензии, которая должна составлять 0,5 отн. ед. при 450 нм;

Подготовка планшета:

1) в лунки А2-А12 планшета вносят по 25 мкл каждого исследуемого образца в необходимых разведениях;

2) в лунки В2-В12 планшета вносят по 25 мкл митомицина С в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-5} М для контроля индукции генов;

3) в контрольные лунки А1 и В1 планшета внести по 25 мкл дистиллированной воды для оценки фонового уровня свечения и неспецифической индукции;

Методика измерения:

1) включить планшетный биолюцинометр LM-01Т и подключенный к нему ЭВМ, после чего на последнем запустить программу «Kilia», позволяющую измерять свечение образцов в кинетическом режиме;

2) создать протокол, соответствующий подготовленному для изучения планшету, с указанием интервала измерения в 300 секунд и длительности в 7200 секунд, после чего сохранить полученный протокол;

3) во все лунки планшета добавить по 225 мкл суспензии бактерий *E.coli recA':::lux* (или *E.coli colD':::lux*);

4) установить планшет в люцинометр и запустить процесс измерения люминесценции.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) расчет нормализованной люминесценции произвести по формуле

$$I_{\text{норм}} = \frac{I_n^{\text{норм}} \times I_0^{\text{норм}}}{I_0^{\text{норм}} \times I_n^{\text{норм}}},$$

где $I_{\text{норм}}$ – нормированное значение люминесценции на n-минуте;

$I_n^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на 0-минуте;

$I_n^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на 0-минуте.

2) выявить уровень индукции штамма *E.coli recA':::lux* (или *E.coli colD':::lux*) под воздействием модельных генотоксикантов, что обуславливает эффективность экспрессии генов в данном конкретном эксперименте;

3) проанализировав полученные данные выявить образцы, проявляющие свойства генотоксикантов, и определить степень их активности, сопоставив степень индукции модельного и изучаемого вещества. Внесите полученные значения уровня люминесценции в таблицу 7.

Таблица 7

Образец	Концентрация	I_{max} , отн. ед.
Митомицин С		
Ультрафиолет		
Образец		

Сделайте вывод о генотоксичности и токсичности изучаемого образца, основываясь на степени индукции свечения репортерного штамма или, наоборот, его ингибиции по сравнению с фоновыми контрольными значениями люминесценции.

3.2 Репортерная люминесцирующая система для выявления ионов тяжелых металлов

В результате человеческой деятельности ежегодно в биосферу попадает огромное количество ртути. В круговороте ртути в биосфере значительную роль играют микроорганизмы, прежде всего в процессах образования метил- и диметилртути и в восстановлении ионов ртути до элементарной ртути, что определяет устойчивость к ртути у ряда микроорганизмов. Устойчивые к ртути бактерии обнаруживаются прежде всего в условиях ртутного загрязнения, а также среди патогенных бактерий, у которых устойчивость к лекарственным препаратам коррелирует с устойчивостью к ртути и другим тяжелым металлам (мышьяку, сурьме, свинцу, меди, кадмию и др.). Устойчивость к металлической ртути и (или) органическим соединениям ртути обнаружена у представителей многих родов бактерий, в том числе у кишечных бактерий, псевдомонад, стафилококков, бацилл. Способность к обезвреживанию определяется синтезом соответствующих гидролаз, специфичность которых может быть различной, что и определяет спектр устойчивости соответствующих бактерий. Гены, определяющие устойчивость к ртути обычно локализованы в плазмидах или транспозонах. Устойчивость к ртути определяется генами *mer*-оперона.

Mer-оперон – является индуцибельным и связывание *Mer*-белка с регуляторным участком промотора (*merT*) происходит только в присутствии ртути и сопровождается раскручиванием спирали ДНК в районе промотора примерно на 50 градусов, что приводит к образованию правильного расстояния между сайтами связывания активатора и промотором, так как первый расположен необычно – между нуклеотидами в положениях -35 и -10 промотора. Без такого изменения структуры ДНК связавшийся с ним активатор не может образовать правильного контакта с РНК-полимеразой.

Использование рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих плазмиду сшитыми *mer*-генами и *lux*-генами биолуминесценции позволяет

детектировать наличие тех или отсутствие ионов ртути в анализируемом образце, что позволяет служить дополнением физическому или химическому анализу. Микроорганизмы позволяют как качественно, так и количественно обнаружить ионы тяжелых металлов и могут использовать как альтернативу дорогим методам химического анализа.

Цель работы – выявить наличие или отсутствие ионов тяжелого металла Hg^{2+} (на примере хлорида) с использованием репортерных люминесцирующих штаммов

Для анализа воздействия изучаемых агентов на генетический аппарат клетки используется рекомбинантный люминесцирующий штамм *E.coli*, несущий комплекс генов *merR::luxCDABE*, созданный в «ГосНИИГенетика» и характеризующийся индуцибельным характером свечения.

В их основе лежит штамм *E. coli* K12 TG1 pDew, а в качестве донора использован природный люминесцирующий микроорганизм *P. luminescens* *Zml* с ранее полностью секвенированным *luxCDABE*-опероном, гены которого сшиты с соответствующим стресс-промотором.

Методика выполнения работы

Подготовка биосенсора:

1) культуру бактерий *E. coli merR::lux* выращивают на LB-агаре с селективным маркером (ампициллин в концентрации 100 мкг/мл) в течение 16-18 часов при 37 °С;

2) несколько колоний свежей ночной культуры переносят в пробирку с 5 мл LB-бульона и инкубируют на качалке в течение 3 часов при 37 °С для достижения клетками стадии лаг-фазы роста;

3) по окончании инкубации измеряют оптическую плотность бактериальной суспензии, которая должна составлять около 0,5 отн. ед. при 450 нм;

Подготовка планшетного биолюминометра:

- 1) прибор предварительно прогревают в течение получаса;
- 2) на компьютере запускают приложение «Kilia», после запуска которого будет происходить тестирование прибора;
- 3) в окне программы отмечают необходимые ячейки планшета, с которых будут сниматься показания свечения;
- 4) выбирают меню «Протокол» и подменю «Свойства», выставляют значения инкубации 7200 секунд, интервал между измерениями 300 секунд, нажимают «Ок» и сохраняют созданный протокол.

Процедура подготовки планшета:

- 1) в контрольные лунки (например, ряд А) планшета добавляют по 50 мкл дистиллированной химически чистой воды;
- 2) в другие лунки (например, ряд В) вносят по 50 мкл хлорида ртути HgCl_2 в диапазоне концентраций 10^{-5} до 10^{-7} М для контроля индукции генов;
- 3) в опытные лунки (например, ряд С или D, Е, F, Н в зависимости от количества опытных образцов и их разведений) добавляют по 50 мкл исследуемого образца в необходимых разведениях;
- 4) во все лунки планшета добавить по 50 мкл суспензии бактерий *E.coli mer::lux*;
- 5) планшет устанавливают в кюветное отделение у люминометра и производят кинетическое измерение биолюминесценции в течение 2 часов, запуская измерение нажатием соответствующей кнопки в программе «Kilia»;
- 6) по окончании измерения нажимают кнопку «Экспорт в XLS» и сохраняют данные.

Обработка, оценка и оформление результатов:

- 1) по окончании измерения данные сохраняются в файле с расширением «*.txt», открывают его с помощью программы Microsoft Office Excel, выбирая «Формат данных: с разделителями» и нажав кнопку «Готово»;
- 2) производят замену знаков «.» на знаки «,»;

3) в полученном файле столбцы соответствуют лункам планшета от 1 до 12, начиная со стрипа уровня А и заканчивая стрипом уровня «Н». Последний столбец содержит значения точек времени, на которых производилось измерение свечения;

4) расчет интенсивности индукции пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб на нулевой и конечной секунде (7200 с) и вычислению относительного значения биолюминесценции по формуле:

$$I_{\text{rel}} = \frac{I_{k_o} \times I_{o_n}}{I_{k_n} \times I_{o_o}} \times 100 \%,$$

где I_{k_o} и I_{k_n} – значения светимости контрольной пробы на нулевой и n-ой секунде проведения эксперимента, отражающие кинетику «спонтанного» тушения свечения бактериального биосенсора за счет исчерпания энергетических субстратов для реакции биолюминесценции;

I_{o_o} – интенсивность свечения опытной пробы на нулевой секунде после внесения сенсорного микроорганизма в суспензию УНМ, отражающая значимость их оптических свойств в снижении регистрируемого параметра;

I_{o_n} – интенсивность свечения опытной пробы на n-ой секунде проведения эксперимента, интегрирующая в себе оптические и биологические характеристики УНМ.

5) по окончании расчетов строят колибровочный график, отражающий зависимость интенсивности индукции I_{ind} от концентрации модельного токсиканта хлорида ртути HgCl_2 и показывающий эффективность экспрессии генов в конкретном эксперименте;

6) проанализировав полученные данные выявляют образцы, проявляющие свойства токсикантов, и определяют степень их активности, сопоставив степень индукции модельного и изучаемого вещества. Внесите полученные значения уровня индукции в таблицу 8.

Сделайте вывод о наличии или отсутствию в исследованных образцах ионов ртути, основываясь на степени индукции свечения репортерного

штамма или, наоборот, или о его токсичности, основываясь на его ингибции по сравнению с фоновыми контрольными значениями люминесценции.

Таблица 8

Исследованные образцы	$I_{ind(max)}$, отн. ед.	Примерное содержание ионов ртути
Оразец 1		
Оразец 2		

3.3 Репортерная люминесцирующая система для обнаружения бактериальных ауторегуляторов (гомосеринлактонов)

У бактерий существуют механизмы, позволяющие им чувствовать плотность своей популяции и осуществлять в связи с этим те или иные действия, что получило название «quorum sensing», или чувство кворума. Таким образом, бактерии могут регулировать свою активность в зависимости от существующего вокруг них окружения других клеток того же вида, что ведет к координации взаимоотношений внутри существующей группы клеток, действия которых имитируют многоклеточный организм. У грамотрицательных организмов в качестве регуляторных молекул выступают N-ацилгомосерин лактоны (ГСЛ), из которых наиболее типичной молекулой для люминесцирующих бактерий *Vibrio fischeri* является N-3-окси-гексаноил-L-гомосерин лактон (оксоС6), синтезируемый с помощью специфического фермента *LuxI*. Данные аутоиндукторы способны диффундировать через клеточные мембраны и взаимодействовать с фактором транскрипции гена *LuxR*, в результате чего происходит запуск экспрессии генов *luxCDABE*, что сопровождается синтезом субъединиц люциферазы и субстратов для нее, а также синтезом еще большего количества белка *LuxI*. Чувство кворума, основанное на системе *LuxR-LuxI* или аналогичных, было описано у многих грамотрицательных бактерий, включая и патогенные, у которых данное

явление регулирует гены, ответственные за колонизацию эукариотических клеток-хозяев.

Собственно молекулы ГСЛ могут различаться длиной углеводородного радикала, степенью окисленности и насыщенности алкильной цепи. Помимо указанного выше оксоС6, существуют и иные молекулы аутоиндукторов, к примеру, N-3-окси-додеканоил-L-гомосерин лактон (оксоС12), работающий в системе LasI/LasR у штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

Использование рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих плазмиду сшитыми генами кворум зависимых механизмов и биолюминесценции позволяет детектировать наличие тех или иных гомосерин лактонов в анализируемом образце. Созданы штаммы, позволяющие специфично детектировать определенные молекулы гомосерин лактонов или их аналогов. Однако индукция свечения таких биосенсоров может быть не связана с присутствием в среде ГСЛ. Ввиду этого для осуществления негативного контроля и исключения возможности неспецифической, не связанной с чувством кворума, индукцией используют рекомбинантные штаммы не несущих гены, отвечающих за синтез регуляторного белка (*luxR*, *lasR*, *rhlR*), необходимо для связывания аутоиндуктора.

Цель – изучить действие гомосерин лактонов с различной длиной углеводородного радикала и их аналогов на репортерные люминесцирующие штаммы *E. coli*

Для анализа воздействия изучаемых гомосерин лактонов и их аналогов используются рекомбинантные люминесцирующие штаммы *E. coli* с плазмидами, несущих комплекс генов, ответственных за синтез и узнавание аутоиндукторов, сшитых с генами люминесценции *Photobacterium luminescence*, и характеризующихся индуцибельным характером свечения (*E. coli R⁺*), а также аналогичные штаммы, характеризующиеся отсутствием генов *luxR*, *lasR*, *rhlR* (*E. coli R⁻*) (таблица 9).

Таблица 9 – Репортерные штаммы *E. coli*

Плазмида	Генетическая конструкция	Индуктор	Оптимальный диапазон концентраций
pAL101	<i>rhlR, rhlI:luxCDABE</i>	C4, оксоC6	1-10 мкМ
pAL102	<i>rhlI:luxCDABE</i>	-	-
pAL103	<i>luxR, luxI:luxCDABE</i>	оксоC6	0,1-10 мкМ
pAL104	<i>luxI:luxCDABE</i>	-	-
pAL105	<i>lasR, lasI:luxCDABE</i>	оксоC12	0,1-1 мкМ
pAL106	<i>lasI:luxCDABE</i>	-	-

Методика выполнения работы

Подготовка биосенсора:

1) культуры бактерий двух штаммов *E. coli* (R^+ и R^-) выращивать на LB-агаре с селективным маркером (тетрацилин в концентрации 12,5 мкг/мл) в течение 16-18 часов при 37 °С;

2) несколько колоний каждой свежей ночной культуры перенести в маркированные пробирки с 5 мл LB-бульона и инкубируют на качалке в течение 3 часов при 37 °С для достижения клетками стадии лаг-фазы роста;

3) по окончании инкубации измерить оптическую плотность каждой бактериальной суспензии, которая должна составлять 0,5 отн. ед. при 450 нм;

Подготовка планшета:

1) в лунки A2-A12 и B2-B12 планшета внести по 25 мкл каждого исследуемого образца ГСЛ или аналогов в необходимых разведениях;

2) в контрольные лунки A1 и B1 планшета внести 25 мкл дистиллированной воды для оценки фонового уровня свечения и неспецифической индукции;

Методика измерения:

1) включить планшетный биолюминометр LM-01T и подключенный к нему ЭВМ, после чего на последнем запустить программу «Kilia», позволяющую измерять свечение образцов в кинетическом режиме;

2) создать протокол, соответствующий подготовленному для изучения планшету, с указанием интервала измерения в 300 секунд и длительности в 7200 секунд, после чего сохранить полученный протокол;

3) в лунки А1-А12 планшета добавить по 225 мкл суспензии бактерий штамма *E. coli* (R^+);

4) в лунки В1-В12 планшета добавить по 225 мкл суспензии бактерий штамма *E. coli* (R^-);

5) установить планшет в люминометр и запустить процесс измерения люминесценции.

Обработка, оценка и оформление результатов:

1) расчет нормализованной люминесценции произвести по формуле

$$I_{\text{нн}} = \frac{I_n^{\text{нн}} \times I_0^{\text{контр}}}{I_0^{\text{нн}} \times I_n^{\text{контр}}},$$

где $I_{\text{нн}}$ – нормированное значение люминесценции на n-минуте;

$I_n^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{опыт}}$ – уровень люминесценции опытной пробы на 0-минуте;

$I_n^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на n-минуте;

$I_0^{\text{контр}}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на 0-минуте.

2) выявить уровень индукции штамма *E.coli* (R^+) под воздействием различных гомосерин лактонов или их аналогов, а также отметить наличие или отсутствие неспецифической индукции штамма *E. coli* (R^-);

3) проанализировав полученные данные выявить образцы, обуславливающие чувство кворума у изучаемых штаммов бактерий. Внесите полученные значения уровня люминесценции в таблицу 10.

Сделайте вывод об возможности использования исследуемого вещества в качестве аутоиндуктора для той или иной системы «quorum sensing».

Таблица10

Образец	Концентрация	I_{\max} , отн. ед.

4 Литература, рекомендуемая для изучения темы

4.1 Базовая литература

4.1.1 **Гусев, М.В.** Микробиология [Текст]: учеб. для вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М.: Академия, 2008. – 464 с.

4.1.2 **Нетрусов, А.И.** Микробиология [Текст]: учебник для вузов / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 2-е изд., стер. – М.: Академия, 2007. – 352 с.

4.1.3 **Заварзин, Г.А.** Введение в природоведческую микробиологию [Текст]: учеб. пособие / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Кн. дом «Университет», 2001. – 256 с.

4.1.4 **Современная микробиология. Прокариоты** [Текст]: в 2 т.: пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.

4.1.5 **Современная микробиология. Прокариоты** [Текст]: в 2 т.: пер. с англ. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 2. – 496 с.

4.1.6 **Экология микроорганизмов** [Текст]: учеб. для вузов / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

4.1.7 **Дерябин, Д.Г.** Бактериальная билюминесценция [Текст]: монография / Д.Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 246 с.

4.2 Периодическая литература

4.2.1 **Прикладная биохимия и микробиология**: журнал / учредитель: Российская академия наук и американская компания Pleiades Publishing. – М.: АРСМИ. – ISSN 0555-1099. – 2006. – Т. 42, № 1 – 6; 2007. – Т. 43, № 1 – 6; 2008. – Т. 44, № 1 – 6; 2009. – Т. 45, № 1 – 6; 2010. – Т. 46, № 1 – 2, 4 – 6.

4.2.2 **Микробиология санитарная и медицинская**: реферативный журнал / учредитель: Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук. – М.: Агенство «Роспечать». – ISSN 0206-5517. – 2006. – № 1 – 12; 2007. – № 1 – 12; 2008. – № 1 – 12.

4.2.3 **Микробиология прикладная**: реферативный журнал: выпуск сводного тома / учредитель: Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук. – М.: Агенство «Роспечать». – ISSN 1561-7858 – М.: Агенство «Роспечать». – 2000. – № 1 – 12; 2001. – № 1 – 12; 2002. – № 1 – 12; 2003. – № 1 – 12; 2004. – № 1 – 12; 2005. – № 1 – 12; 2006. – № 1 – 12; 2007. – № 1 – 12; 2008. – № 1 – 12; 2009. – № 1 – 12; 2010. – № 1 – 3.

4.2.4 **Микробиология общая**: реферативный журнал: выпуск сводного тома / учредитель: Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук. – М.: Агенство «Роспечать». – ISSN 0208-1466 – М.: Агенство «Роспечать». – 2000. – № 1 – 10, 12; 2001. – № 1 – 12; 2002. – № 1 – 12; 2003. – № 1 – 12; 2004. – № 1 – 12; 2005. – № 1 – 12; 2006. – № 1 – 12; 2007. – № 1 – 12; 2008. – № 1 – 12; 2009. – № 1 – 12; 2010. – № 1 – 3.

4.2.5 **Микробиология**: журнал. / учредитель: Российская академия наук и американская компания Pleiades Publishing. – М.: АРСМИ. – ISSN 0026-3656. – 2006. – Т. 75, № 1 – 6; 2007. – Т. 76, № 1 – 6; 2008. – Т. 77, № 1 – 6; 2009. – Т. 78, № 1 – 6; 2010. – Т. 79, № 1 – 2, 4 – 6.