

## Мутагенез неконсервативных остатков цистеина люциферазы светляков *L. mingrelica*

Модестова Юлия Александровна<sup>1</sup>

студентка 5-го курса

Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В.  
Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: modestova\_julia@mail.ru

Люцифераза светляков *L. mingrelica* находит широкое применение в биолюминесцентном микроанализе, биоаналитической химии, биотехнологии и молекулярной биологии. Ген люциферазы используется как ген-маркер при изучении различных биохимических процессов. На основе люциферазной реакции разработан экспресс-метод определения ультрамалых количеств АТФ, все шире применяющийся в методах «быстрой микробиологии» для определения биологической загрязненности различных объектов. Однако недостаточная стабильность фермента существенно осложняет его получение и использование.

Известно, что одним из процессов, приводящих к инаktivации люциферазы, является окисление SH-групп остатков цистеина под действием компонентов реакционной среды. Анализ литературы подтвердил, что стабильность люциферазы светляков тем выше, чем меньше свободных остатков цистеина находится в их структуре. Молекула люциферазы *L. mingrelica* содержит 8 свободных остатков цистеина, 5 из которых неконсервативные, расположенные на поверхности или вблизи белковой глобулы. Можно ожидать, что замена этих остатков на менее реакционно-способные приведет к стабилизации фермента. Цель данной работы – выяснение возможности стабилизации фермента методом сайт-направленного мутагенеза неконсервативных остатков цистеина.

Проведен компьютерный анализ 3D-моделей молекул люцифераз различных видов для выяснения топологии и характера микроокружения неконсервативных остатков цистеина (количество водородных связей, степень гидрофобности 3Å микроокружения, доступность растворителю) и выбраны аминокислотны-замены.

Получены мутанты люциферазы *L. mingrelica* с единичными заменами Cys62Ser, Cys62Val, Cys146Ser, а также с двойной заменой Cys86,146Ser. Сравнение кинетических свойств исходного фермента и его мутантных форм показало, что единичные замены не привели к изменению значений  $V_{max}$  и  $K_M$  по люциферину и АТФ. Мутант с двойной заменой Cys86,146Ser ферментативной активностью практически не обладает.

Максимум биолюминесценции при рН 7,8 наблюдался на длине волны 570 нм для всех мутантных форм фермента, для мутанта Cys62Ser наблюдалось уменьшение полуширины пика биолюминесценции.

Изучена термоинаktivация исходной люциферазы светляков и ее мутантных форм при 37°C и вычислены константы их инаktivации. По термостабильности полученные ферменты располагаются в ряд: Cys146Ser > Cys62Ser > Cys62Val > исходный. Термостабильность при 37°C для мутанта Cys146Ser в 3 раза превосходит исходный фермент. Этот же мутант обладает максимальной устойчивостью к диметилсульфоксиду - в присутствии 10% ДМСО он сохраняет более 80% активности, в то время как исходный фермент - лишь 30%.

Таким образом, мутант Cys146Ser обладает лучшими биотехнологическими характеристиками и может быть рекомендован для практического применения.

<sup>1</sup> Автор выражает признательность руководителю научной работы с.н.с. к.х.н. Ломакиной Г. Ю.