

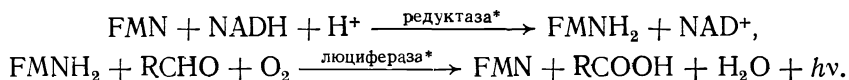
УДК 577.152.1

## БИФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА NADH : FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА ИЗ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ

ПЕТУШКОВ В. Н., КРАТАСЮК Г. А., РОДИОНОВА Н. С.,  
ФИШ А. М., БЕЛОБРОВ П. И.

Изучена биферментная система NADH : FMN-оксидоредуктаза-люцифераза из светящихся бактерий *Venekeea harveyi* и *Photobacterium leiognathi*. Ферменты высокой удельной активности получены путем гель-фильтрации через биогель P-100 и хроматографии на гидроксилпатите. Определены основные кинетические характеристики ферментных препаратов, pH и температурная зависимости активности биферментной системы. На основании экспериментальных данных построена математическая модель функционирования такой системы. В модели учитывается неферментативное окисление FMNH<sub>2</sub> кислородом, ингибирование люциферазы FMN и присутствие в системе долгоживущего интермедиата люциферазы. Для частных случаев определены аналитические выражения зависимости интенсивности биолюминесценции биферментной системы люцифераза — редуктаза от времени, концентрации ферментов и их субстратов. Показано, что сопряжение между редуктазой и люциферазой осуществляется благодаря свободному промежуточному продукту FMNH<sub>2</sub>. Полученные ферментные препараты были использованы для определения микроколичеств NADH с чувствительностью 10<sup>-15</sup> моль.

Структура люминесцентной системы и ее место в общем метаболизме светящихся бактерий находится пока на стадии изучения [1, 2]. С люциферазой могут быть сопряжены любые ферменты, нарабатывающие ее субстраты. Первой *in vitro* была исследована сопряженная биферментная система NAD : FMN-оксидоредуктаза-люцифераза [3], осуществляющая следующую цепь ферментативных реакций:



Оба этих фермента содержатся в экстрактах светящихся бактерий [3–6], методы очистки которых хорошо разработаны [5, 7, 8]. С помощью данной биферментной системы возможно определение микроколичеств NADH и NADH-зависимых дегидрогеназ, играющих ключевую роль во многих участках метаболических путей. Последнее обстоятельство обусловило широкую популярность этой сопряженной системы в аналитической биохимии [9]. Вопрос о механизме сопряжения ферментов в данной системе остается до сих пор открытым. Прежде всего, это способ передачи FMNH<sub>2</sub> с редуктазы на люциферазу, то есть непосредственно с одного фермента на другой (мультиферментный комплекс), либо перенос промежуточного продукта FMNH<sub>2</sub> через раствор (независимо работающие ферменты). Ряд отличительных особенностей биолюминесцентной биферментной системы не позволяет использовать для ее описания ранее разработанные модели [10].

Своей целью мы ставили изучение биолюминесцентной биферментной системы редуктаза — люцифераза и построение математической модели ее функционирования.

\* Редуктаза — NADH : FMN-оксидоредуктаза, люцифераза — люцифераза из светящихся бактерий.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Биомасса и лизис клеток.** В работе использованы светящиеся бактерии *Veneckea harveyi*, штамм В-392 [11], *Photobacterium leiognathi*, штам 362, из коллекции Института биофизики СО АН СССР. Бактериальную биомассу получали в условиях периодического культивирования в 30-литровом ферментере. Состав питательной среды и условия культивирования описаны ранее [12]. После достижения в культуре максимальной биолюминесценции клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием и отмывали 3%-ным раствором NaCl. Клетки разрушали, помещая их в раствор  $10^{-2}$  М ЭДТА, pH 7,0, и  $10^{-3}$  М дитиотрептола в отношении 1:10 (вес/объем). Для облегчения лизиса проводили однократное замораживание и оттаивание. Затем центрифугировали при 14 000 g 60 мин. Белки супернатанта осаждали сульфатом аммония (35—70% насыщения). Полученный осадок растворяли и диализовали против 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, и  $10^{-3}$  М дитиотрептола.

**Очистка редуктазы и люциферазы из *V. harveyi*.** Белковую фракцию бактериального лизата *V. harveyi*, полученную после высаливания сульфатом аммония, подвергали гель-фильтрации на колонке  $2,5 \times 180$  см с биогелем Р-100, уравновешенным 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,0 и  $10^{-3}$  М дитиотрептолом и элюировали тем же буфером со скоростью 20 мл/ч. Фракции, содержащие люциферазу и редуктазу, собирали отдельно. Белки осаждали сульфатом аммония (35—70% насыщения), растворяли и диализовали против 0,01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0 и  $10^{-3}$  М дитиотрептола. Далее редуктазу и люциферазу очищали хроматографией на гидроксил-апатите (колонки  $1,5 \times 50$  см и  $2,5 \times 40$  см соответственно), уравновешенном стартовым буфером. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации натрий-фосфатного буфера  $0,01 \div 0,2$  М. Скорость элюции для колонки  $1,5 \times 50$  см составляла 25 мл/ч, а для колонки  $2,5 \times 40$  см — 70 мл/ч. Все процедуры, если специально не оговорено, выполняли при температуре 0—4°. Запись хроматограммы осуществляли по оптической плотности на проточном фотометре Uvicord-3 (LKB, Швеция).

**Активность люциферазы** определяли по максимальной интенсивности биолюминесценции в ответ на быстрое введение 300 мкл  $6 \cdot 10^{-5}$  М FMNH<sub>2</sub> в 500 мкл раствора, содержащего люциферазу,  $6,8 \cdot 10^{-6}$  М миристиновый альдегид в 0,1 М натрий-фосфатном буфере. FMNH<sub>2</sub> получали фотохимическим восстановлением FMN в присутствии  $10^{-2}$  М ЭДТА, pH 7,0. Линейность при определении активности наблюдалась в диапазоне концентраций люциферазы от 0,02 до 200 мкг/мл.

**Активность редуктазы** измеряли по скорости окисления NADH, концентрацию которого определяли при 340 нм на спектрофотометре VSU-2P (ГДР) в 1-см кювете. Реакцию инициировали добавлением 300 мкл  $2,7 \cdot 10^{-4}$  М NADH к 500 мкл раствора, содержащего редуктазу,  $10^{-4}$  М FMN в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0. За единицу активности редуктазы принимали количество фермента, перерабатывающего 1 мкмоль NADH в 1 мин.

**Активность биферментной системы** измеряли по интенсивности биолюминесценции в ответ на добавление NADH в реакционную смесь, содержащую редуктазу, люциферазу,  $3 \cdot 10^{-6}$  М FMN и  $6 \cdot 10^{-6}$  М альдегида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0. Для определения pH- и температурной зависимости биферментной системы из *V. harveyi* реакционная смесь содержала 0,3 мкг редуктазы и 20 мкг люциферазы, полученных после очистки на гидроксил-апатите.

**Константы Михаэлиса** находили по методу Эйзенталя — Корниш-Боудена [13]: для отдельно взятой редуктазы — спектрофотометрически по скорости потребления NADH, для биферментной системы — по зависимости биолюминесценции от начальной концентрации NADH и FMN в условиях насыщения вторым субстратом. Величина ошибки составляла не более 30%.

**Определение кинетических констант  $k_2$  и  $k_2'$**  проводили независимо:  $k_2$  — при измерении активности люциферазы по снижению биолюминесценции (уравнение 6) от 80% до 20% от  $t_{\max}$ ;  $k_2'$  — по нарастанию биолюминесценции биферментной системы (уравнение 8) в ответ на добавление NADH.

Константу ингибирования люциферазы FMN определяли по зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации FMN при фиксированных концентрациях FMNH<sub>2</sub> ( $6 \cdot 10^{-5}$  М и  $0,6 \cdot 10^{-5}$  М).

**Концентрацию белка** в ферментных препаратах определяли по методу Брэдфорда [14]. Измерение биолюминесценции проводили на установке, состоящей из ФЭУ (калиброванного по квантовому выходу в области 440—500 нм с использованием люминольного стандарта), усилителя и самописца. Исследуемый образец находился в термостатируемой кювете с перемешиванием [15].

В работе использованы NADH, деканаль, додеканаль, тетрадеканаль («Merck», ФРГ); дитиотрептол, FMN, ЭДТА («Sigma», США); биогель и гидроксил-апатит («Bio-Rad», США); остальные реактивы — отечественного производства, квалификации х. ч. и ч. д. а.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение работы биферментной системы из *V. harveyi* и *P. leiognathi* было выполнено на очищенных ферментах. Для этого на первом этапе белки бактериального лизата, содержащие редуктазную и люциферазную активности, подвергали гель-фильтрации через биогель Р-100 (рис. 1). При этом происходило разделение люциферазы и редуктазы,

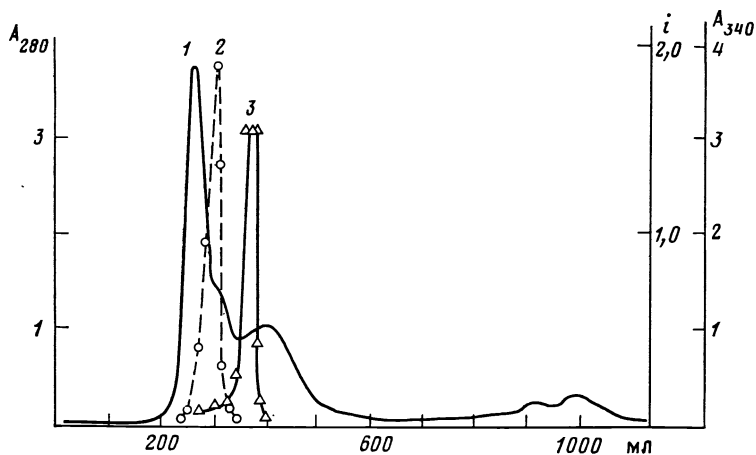


Рис. 1. Гель-хроматография бактериального лизата *B. harveyi* на колонке с биогеом P-100. 1 — белок,  $A_{280}$ ; 2 — активность люциферазы,  $i$  ( $10^{15}$  квант/с на 1 мл); 3 — активность редуктазы,  $A_{340}$  (мкмоль NADH/мин на 1 мл)

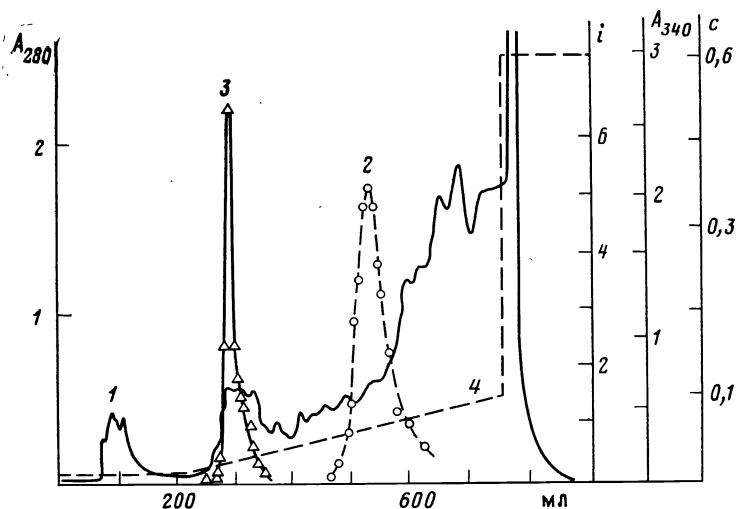


Рис. 2. Хроматография редуктазы на колонке с гидроксилпатитом. 1 — белок,  $A_{280}$ ; 2 — активность люциферазы,  $i$  ( $10^{12}$  квант/с на 1 мл); 3 — активность редуктазы,  $A_{340}$ , (мкмоль NADH/мин на 1 мл); 4 — натрий-фосфатный буфер pH 7,0 ( $c$  — молярная концентрация)

обусловленное различием в молекулярном весе ферментов [7–9], а специфические активности их возросли в 20 и 4 раза соответственно (табл. 1). Изменение ионной силы элюирующего буфера от 0,01 до 1 М не сказывалось на эффективности разделения ферментов. Частичное перекрытие пиков при гель-фильтрации обусловлено недостаточной разрешающей способностью метода. Дальнейшее разделение редуктазы и люциферазы проводили при хроматографии отдельных фракций редуктазы и люциферазы на гидроксилпатите (рис. 2 и 3, табл. 1). В обоих случаях редуктаза элюировалась при концентрации элюирующего буфера 0,020–0,025 М, а люцифераза — при 0,06–0,07 М.

Удельная активность препаратов люциферазы и редуктазы из *B. harveyi*, полученных после хроматографии на гидроксилпатите, приведена в табл. 1. У препарата люциферазы она составляла  $0,84 \cdot 10^{15}$  квант  $\cdot$  с $^{-1}$  на 1 мг белка. Препарат люциферазы содержал 0,02% редуктазы по белку. Препарат редуктазы не проявлял люциферазной активности, а удельная активность его составляла 11 мкмоль NADH/мин на 1 мг белка, что в 3–5 раз меньше активности гомогенных препаратов редуктазы, полученных разными авторами [8, 16]. За две хроматографи-

Очистка редуктазы и люциферазы из *B. harveyi*

Стадии очистки	Белок, мг/мл	Суммар- ный бе- лок, мг	Активность люциферазы, $10^{14}$ квант/с			Активность редуктазы, мкмоль NADH/мин		
			на 1 мл	на 1 мг белка	суммарная	на 1 мл	на 1 мг белка	суммар- ная
1. Бесклеточный экстракт	3,5	1750	920	260	460 000	0,29	0,083	145
2. Сульфат-аммоний- ный осадок (35—70%)	46	1600	16 000	340	550 000	4,0	0,0087	140
3. Гель-фильтрация (биогель P-100): люцифераза	7,6	430	9 200	1200	520 000	0,2	0,026	11
редуктаза	1,0	65	81	81	5 200	1,9	1,9	122
4. Хроматография на гидроксилapatите: люцифераза	0,6	54	5 100	8400	455 000	0,0006	0,001	0,06
редуктаза	0,12	9,5	—	—	—	1,34	11,0	106

ческие процедуры специфические активности люциферазы и редуктазы возросли более чем в 40 и 100 раз соответственно и стали сравнимы со специфическими активностями гомогенных препаратов. Это позволяет рекомендовать данный способ очистки указанных ферментов там, где не требуется высокая степень гомогенности препаратов. Этой степени чистоты достаточно для достижения чувствительности биолуминесцентной биферментной системы к NADH до  $10^{-15}$  моль.

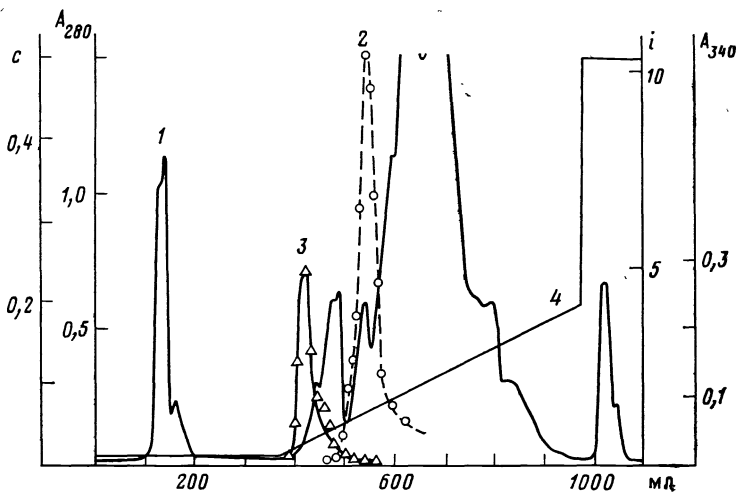


Рис. 3. Хроматография люциферазы на колонке с гидроксилapatитом. 1 — белок,  $A_{280}$ ; 2 — активность люциферазы,  $i$  ( $10^{14}$  квант/с на 1 мл); 3 — активность редуктазы,  $A_{340}$  (мкмоль NADH/мин на 1 мл); 4 — натрий-фосфатный буфер pH 7,0,  $c$  (молярная концентрация)

Свойства очищенных ферментных препаратов из *B. harveyi* и *P. leiognathi*. Определение pH- и температурной зависимостей активности биферментной системы и отдельно взятой люциферазы из *B. harveyi* показало, что область оптимальных значений pH биферментной системы лежит в диапазоне 6,5—7,5 и совпадает с pH-оптимумом люциферазы (рис. 4). Активность биферментной системы *B. harveyi* сильно зависит от температуры. В интервале от 8° до 35° наблюдается возрастание ее активности в 8 раз. Падение активности в области температур выше 35° объясняется быстрой инактивацией ферментов, выраженной тем сильнее, чем выше температура реакционной смеси. Например, константа инактивации биферментной системы при температуре 40° в 0,2 М

натрий-фосфатном буфере, рН 7,0 и  $10^{-3}$  М дитиотреитоле равна  $0,35 \text{ мин}^{-1}$ . Потеря активности обусловлена в основном инактивацией люциферазы, поскольку после 10-мин инкубирования ферментов при  $40^\circ$  интенсивность биолюминесценции восстанавливается до исходного уровня добавлением свежей порции люциферазы, а не редуктазы. Во избежание термоинактивации биолюминесценцию измеряли при  $30^\circ$ .

Биферментные системы *B. harveyi* и *P. leiognathi* сильно различаются как по свойствам отдельных ферментов (константы Михаэлиса для каждого из субстратов редуктазы и константы ингибирования люциферазы), так и по свойствам систем в целом (оптимальная концентрация FMN и эффективные константы Михаэлиса). Например, константы Михаэлиса редуктаз из *B. harveyi* и *P. leiognathi*, определенные спектрофотометрически по потреблению NADH, существенно больше эффективных констант Михаэлиса, определенных по биолюминесценции для систем в целом. Причем разница между значениями констант Михаэлиса, определенными различными методами, больше у биферментной системы из *P. leiognathi*. Аналогичные различия наблюдались и другими авторами [16, 17]. В настоящее время удовлетворительного объяснения этому не найдено. С одной стороны, полагают, что это — следствие образования комплекса между люциферазой и редуктазой, изменяющего сродство субстратов к редуктазе [17]. Однако прямые эксперименты по обнаружению такого комплекса методами термоинактивации, гель-фильтрации и центрифугированием с субстратами и без них [9], по конкурентному ингибированию за место посадки на люциферазу NADH-зависимой редуктазы [16] не дали положительного результата. С другой стороны, образование эквимольного бифермент-

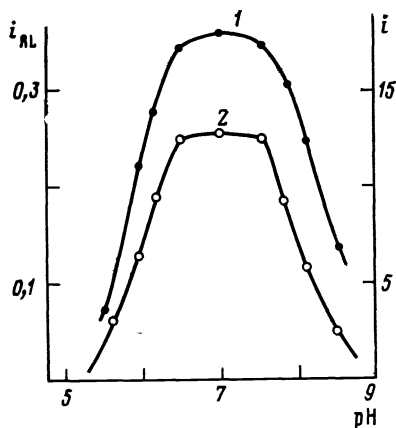


Рис. 4

Рис. 4. рН-зависимость активности люциферазы (1,  $i$ ) и биферментной системы (2,  $i_{FL}$ ) из *B. harveyi*. Биферментная система содержала 25 мкг люциферазы и 0,3 мкг редуктазы

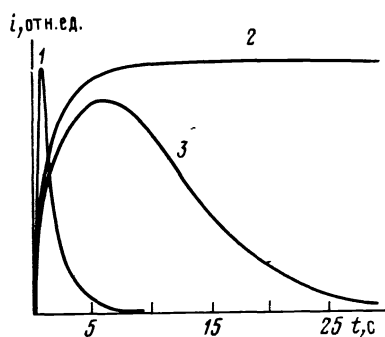


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика биолюминесценции ( $i$ , отн. ед.) биферментной системы при инициации ее: 1 — промежуточным продуктом реакции — FMN $_2$  ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  М); 2 — NADH ( $\cdot 10^{-4}$  М); 3 — NADH ( $\cdot 10^{-6}$  М)

ного комплекса не представляется возможным, поскольку молярная концентрация люциферазы в грубом экстракте намного больше, чем редуктазы [7, 8]. Не в пользу комплекса говорит и различие в числах оборотов редуктазы и люциферазы [7, 8, 19], а также низкая эффективность работы биферментной системы ( $\sim 1$  квант на 1000 молекул NADH) [20]. К тому же присутствие люциферазы в реакционной смеси не сказывается на скорости потребления NADH редуктазой [16].

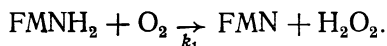
Поэтому нашей целью было объяснение существующих противоречий в рамках одной модели. Мы предполагали, что редуктаза и люцифераза *in vitro* работают независимо, и сопряжение между ними осущес-

ствляется промежуточным продуктом реакции — FMNH<sub>2</sub>. Для проверки этого предположения ниже рассматривается модель реакции в сопоставлении с экспериментом.

**Математическая модель биолюминесцентной биферментной системы.** Следуя работе [10], рассмотрим кинетику биферментной системы. Условие гомогенности распределения ферментов и субстратов в растворе тождественно нашему основному предположению. Отметим особенности биферментной системы редуктазы — люциферазы:

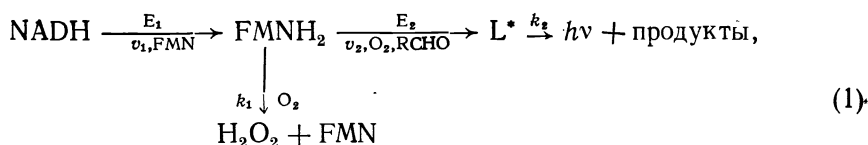
1. Первая стадия реакции (редуктазная) — двухсубстратная (NADH и FMN) со случайным присоединением субстратов.

2. Образовавшийся на первой стадии промежуточный продукт (FMNH<sub>2</sub>) крайне нестоек и подвержен неферментативному окислению кислородом. Согласно реакции [21]:



3. FMNH<sub>2</sub> с люциферазой в присутствии избытка кислорода и альдегида через ряд быстрых стадий образует долгоживущий интермедиат L\*, который распадается с излучением кванта света.

4. FMN является конкурентным ингибитором люциферазной реакции. С учетом указанных особенностей предлагается следующая схема реакции рассматриваемой биферментной системы:



где L\* — долгоживущий интермедиат (L·FMNH<sub>2</sub>·O<sub>2</sub>·RCHO), k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> — константы окисления FMNH<sub>2</sub> и распада долгоживущего интермедиата L\*, E<sub>1</sub> — редуктаза, E<sub>2</sub> — люцифераза.

Система уравнений, описывающих нестационарную кинетику биферментной реакции (1), при сделанных предположениях имеет вид:

$$\frac{dA}{dt} = - \frac{v_1 \cdot A \cdot B}{A \cdot B + K_m^B \cdot A + K_m^A \cdot B + K_m^A \cdot K_m^B}, \quad (2)$$

$$\frac{dF}{dt} = \frac{v_1 \cdot A \cdot B}{A \cdot B + K_m^B \cdot A + K_m^A \cdot B + K_m^A \cdot K_m^B} - \frac{v_2 F}{K_m^F (1 + B/K_i) + F} - k_1 F, \quad (3)$$

$$\frac{dL^*}{dt} = \frac{v_2 F}{K_m^F (1 + B/K_i) + F} - k_2 L^*, \quad (4)$$

где A = [NADH]; F = [FMNH<sub>2</sub>]; B = [FMN]; K<sub>m</sub><sup>A</sup> и K<sub>m</sub><sup>B</sup> — константы Михаэлиса редуктазы для каждого из субстратов; K<sub>m</sub><sup>F</sup> — константа Михаэлиса люциферазы для FMNH<sub>2</sub>; v<sub>1</sub> и v<sub>2</sub> — максимальные скорости редуктазы и люциферазы, пропорциональные концентрации соответствующего фермента.

Уравнение интенсивности биолюминесценции (i) имеет вид:

$$i = ak_2 L^*, \quad (5)$$

где a — константа.

Система нелинейных дифференциальных уравнений (2)–(4) аналитически может быть решена только при введении упрощающих предположений. Для сравнения с экспериментом интерес представляет изучение трех частных случаев работы биферментной системы (рис. 5). Рассмотрим их.

*Случай 1* — кинетика системы при запуске ее промежуточным продуктом FMNH<sub>2</sub> (рис. 5, кривая 1). Этот случай нетривиален из-за присутствия в системе долгоживущего интермедиата L\*, что позволяет исследовать релаксационные характеристики биферментной системы, определяемые свойствами люциферазы, поскольку редуктаза в этом

Значения  $k_2$  и  $k_2'$  ( $\text{с}^{-1}$ ) для биферментных систем

Источник	Альдегид					
	$C_{10}$		$C_{12}$		$C_{14}$	
	$k_2$	$k_2'$	$k_2$	$k_2'$	$k_2$	$k_2'$
<i>B. harveyi</i>	0,4	0,4	0,09	0,06	1,8	1,5
<i>P. leiognathi</i>	0,7	0,3	1,2	0,9	3,0	2,2

случае в работе не участвует. При  $k_1 \gg k_2$  из уравнений (4) и (5) следует:

$$i(t) = i_{\max} \cdot \exp(-k_2 t), \quad (6)$$

где  $i_{\max} = a \cdot k_2 L_{\max}^*$ . Условие  $k_1 \gg k_2$  в эксперименте соблюдается, так как по оценкам  $k_1 > 20 \text{ с}^{-1}$  [21], а наблюдаемые значения  $k_2$  не превышают  $3 \text{ с}^{-1}$  (табл. 2).

*Случай 2* – кинетика биферментной системы при запуске ее NADH, при превращении NADH на небольшую глубину (рис. 5, кривая 2). Если поток FMNH<sub>2</sub>, идущий на образование долгоживущего интермедиата L\* намного меньше потока, идущего на неферментативное окисление кислородом ( $v_2 \ll k_1 K_m^F$ ) и  $A \gg K_m^A$ ,  $F \ll K_m^F$ , из уравнения (3) следует:

$$F(t) = \frac{v_1 \cdot B}{(B + K_m^B) \cdot k_1} \cdot \{1 - \exp(-k_1 t)\}. \quad (7)$$

Это означает, что стационарная концентрация FMNH<sub>2</sub> достигается за время  $\tau \sim 0,1 \text{ с}$ , поэтому при  $t > \tau$  из уравнений (4), (5), (7) получаем:

$$i(t) = i_s \cdot \{1 - \exp(-k_2 t)\}, \quad (8)$$

где

$$i_s = \frac{av_1 v_2 B}{(B + K_m^B) k_1 K_m^F (1 + B/K_i)}.$$

Учитывая, что  $v_1 = C_1 R$  и  $v_2 = C_2 L$ , где R и L – концентрации редуцтазы и люциферазы, при условии  $R + L = \text{const}$  получаем, что  $i_s$  как функция концентрации ферментов достигает максимума при  $R = L$ . Из (8) следует также, что для биферментной системы существует оптимальная концентрация FMN, когда стационарная интенсивность свечения как функция параметров системы достигает максимума:

$$B_0 = [\text{FMN}]_{\text{опт}} = \sqrt{K_m^B \cdot K_i}. \quad (9)$$

*Случай 3* – инициация биolumинесценции порцией NADH в условиях расходования субстрата, когда начальная концентрация NADH много меньше константы Михаэлиса редуцтазы для NADH (условие  $A \ll K_m^A$ ). После достижения равновесия по FMNH<sub>2</sub> и по L\*, т. е. при  $t \gg 1/k_2$  от системы нелинейных уравнений (2)–(4) остается одно уравнение (2), которое при сделанных предположениях имеет следующее решение:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{v_1}{K_m^A} \cdot t\right),$$

где  $A_0$  – начальная концентрация NADH. Формулы (3)–(5) в этом случае описывают работу люциферазы как измерителя уровня FMNH<sub>2</sub>. Используя (3)–(5), получаем при  $t \gg 1/k_2$

$$i(t) = \frac{av_1 v_2 A_0}{K_m^A \cdot k_1 \cdot K_m^F (1 + B/K_i)} \exp(-k_2 t), \quad (10)$$

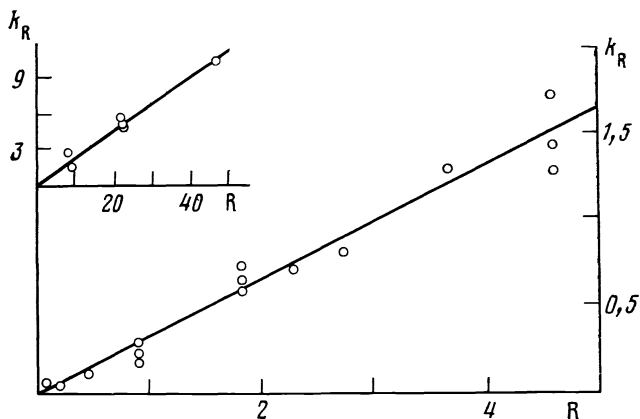


Рис. 6. Зависимость константы спада ( $k_R$ ,  $\text{мин}^{-1}$ ) биолюминесценции биферментной системы от количества редуктазы ( $R$ ,  $\mu\text{кг}$  в 800  $\mu\text{кл}$  реакционной смеси). Начальная концентрация  $\text{NADH } 10^{-6} \text{ M}$

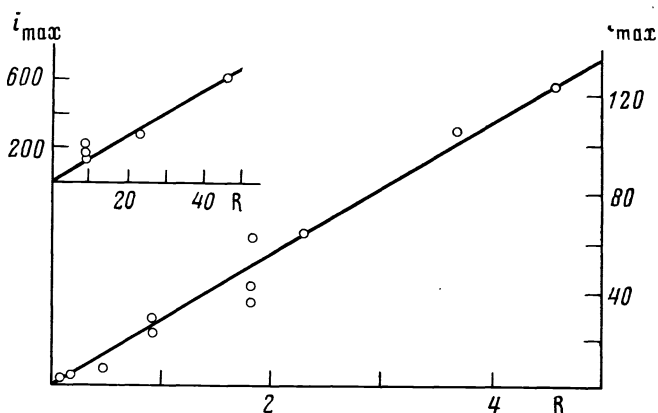


Рис. 7. Зависимость максимальной интенсивности ( $i_{\text{max}}$ , отн. ед.) биолюминесценции биферментной системы от количества редуктазы ( $R$ ,  $\mu\text{кг}$  в 800  $\mu\text{кл}$  реакционной смеси). Начальная концентрация  $\text{NADH } 10^{-6} \text{ M}$

где

$$k_R = v_1 / K_m^A$$

Сравнение модели с экспериментом. Аналитические выражения (6), (8) и (10) хорошо описывают зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от времени (рис. 5). При различных условиях проведения эксперимента возможны два варианта определения кинетической константы  $k_2$  (см. «Методы исследования»,  $k_2$  и  $k_2'$ ). Для биферментных систем *B. harveyi* и *P. leiognathi* с различными альдегидами ( $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ) наблюдаемые значения  $k_2$  и  $k_2'$  совпадают (табл. 2). Это равенство следует из модели.

При малой начальной концентрации  $\text{NADH}$  (модель — случай 3; эксперимент — рис. 6, 7) константа спада  $k_R$  и максимальная интенсивность биолюминесценции линейно зависят от количества редуктазы в пробе. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [17, 22]. Из этих результатов следует, что при анализе малых количеств  $\text{NADH}$  ( $A \ll K_m^A$ ) варьирование содержания редуктазы в биферментной системе при прочих равных условиях изменяет кинетику биолюминесценции, оставляя постоянным общее количество излучаемых квантов (площадь под кривой  $\mathcal{I}$ , рис. 5), т. е. увеличение содержа-



## Характеристики отдельных ферментов и биферментной системы в целом

Объект исследования	<i>B. harveyi</i>	<i>P. leiognathi</i>
Отдельные ферменты, $10^{-6}$ М		
$K_i$	$13 \pm 7$	$24 \pm 10$
$K_m^A$	$43 \pm 10$	—
$K_m^B$	$0,8 \pm 0,2$	$20 \pm 10$
Биферментная система (эффективные значения), $10^{-6}$ М		
$K_m^A$	$18 \pm 4$	—
$K_m^B$	$0,25 \pm 0,1$	$3,6 \pm 1$
Отдельные ферменты, рассчитано по ур. (8), $10^{-6}$ М		
$K_i$	5,0	10
$K_m^B$	0,5	10
Биферментная система		
$V_0$ (экспериментальная), $10^{-6}$ М	2—3	10
$V_0$ рассчитано по ур. (9); $10^{-6}$ М	3,1	22

\*  $K_i$  — константа ингибирования лксиферазы FMN;  $K_m^A$  и  $K_m^B$  — константы Михаэлиса редуктазы для NADH и FMN;  $V_0$  — оптимальная концентрация FMN.

ния редуктазы позволяет лучше выделить полезный биолюминесцентный сигнал на фоне шумов системы.

Модель удовлетворительно описывает экспериментальные данные для биферментных систем из *B. harveyi* и *P. leiognathi* по зависимости биолюминесценции от концентрации FMN (рис. 8) и предсказывает значение оптимальной концентрации FMN для этих систем — табл. 3, уравнение (9). Сплошные кривые на рис. 8 проведены в соответствии с моделью уравнения (8), где параметры  $K_m^B$  и  $K_i$  близки к наблюдаемым в независимых экспериментах (табл. 3).

Различие значений констант Михаэлиса редуктаз для FMN, определенных спектрофотометрически и по зависимости биолюминесценции биферментной системы от концентрации FMN — рис. 8, уравнение (8), объясняется скорее всего различием рабочих температур, а именно:  $22^\circ$

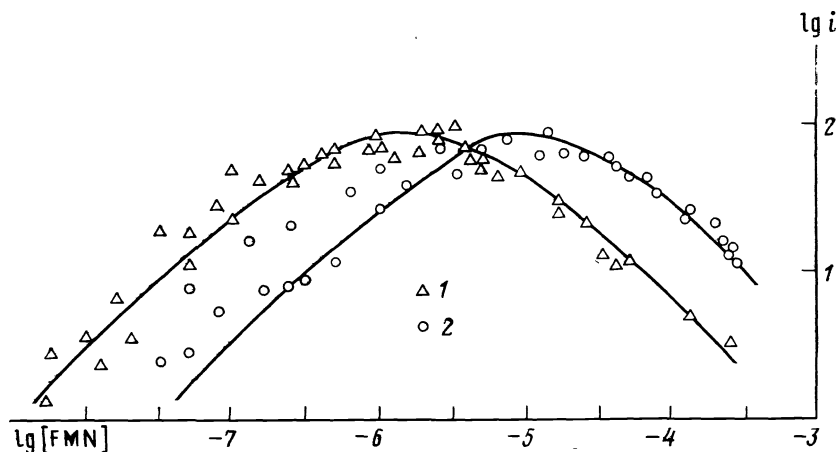


Рис. 8. Зависимость интенсивности биолюминесценции ( $i$ ) биферментных систем из *B. harveyi* (1) *P. leiognathi* (2) от концентрации FMN в реакционной смеси. Начальная концентрация NADH  $10^{-4}$  М. Кривые проведены в соответствии с уравнениями (8) для *B. harveyi* ( $K_i = 5 \cdot 10^{-6}$  М,  $K_m^B = 0,5 \cdot 10^{-6}$  М), для *P. leiognathi* ( $K_i = 1 \cdot 10^{-5}$  М,  $K_m^B = 1 \cdot 10^{-5}$  М)

для первого способа и  $30^\circ$  — для второго. Значения эффективных констант Михаэлиса  $K_m^B$  для биферментных систем существенно меньше значений  $K_m^B$ , рассчитанных по модели уравнения (8) из экспериментальных данных, представленных на рис. 8, поскольку в первом случае не учитывается ингибирование люциферазы FMN (табл. 3). Завышение константы ингибирования люциферазы FMN для отдельно взятой люциферазы объясняется тем, что при измерении ее активности концентрация FMN в реакционной смеси увеличена из-за быстрого неферментативного окисления FMNH<sub>2</sub> кислородом.

При инициации биолюминесценции биферментной системы добавлением NADH обращает на себя внимание зависимость интенсивности от произведения активностей редуктазы и люциферазы: модель — уравнения (8), (10); эксперимент — [3, 20, 23]. Максимальная интенсивность биолюминесценции биферментной системы в опытах при варьировании пропорции редуктаза/люцифераза достигается при  $R=L$  (модель — случай 2; эксперимент — [22, 24]).

В работе Гастингса и др. [3] интенсивность биолюминесценции биферментной системы, деленная на активность люциферазы, пропорциональна активности редуктазы. Используя полученные нами результаты (рис. 6), можно найти активность редуктазы, не определяя активности люциферазы.

Таким образом, в настоящей работе изучена биферментная система редуктаза — люцифераза светящихся бактерий. Построена математическая модель функционирования этой системы *in vitro*, которая описывает всю совокупность экспериментов в широком диапазоне варьирования параметров системы. Это доказывает основное предположение данной работы, состоящее в том, что мультиферментный комплекс между люциферазой и редуктазой не образуется. Исследованная биферментная система трансформирует изменение концентрации NADH в кванты света и является ферментативным преобразователем, который может служить базовым модулем при конструировании более сложных систем ферментов для измерения концентраций различных метаболитов.

Благодарим Н. Н. Угарову за полезное обсуждение и критические замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Meighen E., Riendeau D., Bognar A. In: Bioluminescence and Chemiluminescence. Acad. Press, 1981, p. 129—137.
2. Высоцкий Е. С., Заворухин В. В., Межевикин В. В. Биохимия, 1982, т. 47, № 12, с. 1983—1987.
3. Hastings J. W., Riley W. H., Massa H. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 3, p. 1473—1481.
4. Gibson Q. H., Hastings J. W., Weber G., Duane W., Massa J. In: Flavins and Flavoproteins. Amsterdam, 1966, p. 341—359.
5. Gunsalus-Miguel A., Meighen E. A., Nicoli M., Neelson K. H., Hastings J. W. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 2, p. 398—404.
6. Kuwabara S., Cormier M. J., Dure L. S., Kreiss P., Pfuderer P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1965, v. 53, № 4, p. 822—828.
7. Jablonski E., DeLuca M. Biochemistry, 1977, v. 16, № 13, p. 2932—2936.
8. Michalyszyn G. A., Wing S. S., Meighen E. A. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 21, p. 7495—7499.
9. DeLuca M. In: Methods in Enzymology. Acad. Press, 1978, v. 57, p. 125—226.
10. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979.
11. Reichelt Y. L., Baumann P. Arch. Microbiol., 1973, v. 94, p. 283.
12. Родичева Э. К., Щербакоева Г. А., Фиш А. М., Высоцкий Е. С., Пожидаев А. И., Смирнова Е. В. Микробиология, 1978, т. 47, с. 810—815.
13. Корниш-Боуден А. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979.
14. Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, p. 248—254.
15. Петушков В. Н. А. с. № 972397 — Оpubл. в Б. И., 1982, № 41.
16. Jablonski E., DeLuca M. Biochemistry, 1978, v. 17, № 4, p. 672—678.
17. Duane W., Hastings J. W. Mol. Cell. Biochem., 1975, v. 6, № 1, p. 53—64.
18. Gerlo E., Charlier J. Europ. J. Biochem., 1975, v. 57, p. 461—467.
19. Hastings J. W., Weber K., Friedland J., Mitchell G. W., Gunsalus-Miguel A. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 4681—4689.
20. Hastings J. W., Neelson K. H. Anal. Rev. Microbiol., 1977, v. 31, p. 549—595.
21. Gibson Q. H., Hastings J. W. Biochem. J., 1962, v. 83, p. 368—377.

22. *Brolin S. E., Hjerten S.* Mol. Cell. Biochem., 1977, v. 17, p. 61—73.  
23. *Strehler B. L., Cormier M. J.* Arch. Biochem. and Biophys., 1953, v. 47, p. 16—21.  
24. *Jablonski E., DeLuca M.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1978, v. 73, p. 3848—3851.

Институт биофизики СО АН СССР,  
Красноярск  
Институт физики им. Л. В. Киренского  
СО АН СССР, Красноярск

Поступила в редакцию  
17.VIII.1983

## BIENZYMATIC SYSTEM OF NADH:FMN-OXIDOREDUCTASE-LUCIFERASE FROM LUMINESCENT BACTERIA

*PEYUSHKOV V. N., KRATASYUK G. A., RODIONOVA N. S.,  
FISH A. M., BELOBROV P. I.*

*Institute of Biophysics, Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences,  
Krasnoyarsk*

The bienzymatic system of NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase from the luminescent bacteria *Beneckea harveyi* and *Photobacterium leiognathi* was studied. The enzymes possessing a high specific activity were obtained by gel filtration through Biogel P-100 and by chromatography on hydroxylapatite. The main kinetic parameters of the enzyme preparations and the pH- and temperature dependencies of the bienzymatic system were determined. Based on the experimental data, a mathematical model of this system has been constructed. This model stipulates non-enzymatic oxidation of FMNH<sub>2</sub> by O<sub>2</sub>, inhibition of FMN luciferase and the presence of a long-living intermediate of luciferase. The analytical expressions for the dependence of bioluminescence intensity of the bienzymatic luciferase-reductase system on time, enzyme and substrate concentrations were determined under various conditions. It was shown that the coupling between reductase and luciferase is effected by way of the free intermediate product — FMNH<sub>2</sub>. The enzyme preparation obtained were used for an analysis of microquantities of NADH with the sensitivity of 10<sup>-16</sup> mol.