



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.158.54 + 535.379

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ

*Березин И. В., Бровко Л. Ю., Угарова Н. Н.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии*

В обзоре рассматриваются биохимические и физико-химические свойства люциферазы светляков. Описаны методы выделения и очистки фермента. Рассмотрена кинетическая схема действия люциферазы и выведены уравнения для скорости реакции в стационарном режиме. Имеющиеся в литературе экспериментальные данные по кинетике действия люциферазы обработаны в рамках выведенной схемы. Рассмотрены методы применения фермента в аналитических целях.

В основе биолюминесценции — свечения живых организмов — лежит катализируемая специфическим ферментом хемлюминесцентная реакция. Из классических работ Дюбуа [1] известно, что биолюминесценция обусловлена окислением субстрата, названного люциферином, в присутствии фермента люциферазы. Люциферины и люциферазы разных организмов оказались соединениями неодинаковой структуры. Из этого следует, что люциферин и люцифераза — это собирательно-функциональные, а не структурно-химические понятия, ими обозначаются субстраты и ферменты, при взаимодействии которых излучается свет.

Все изученные к настоящему времени биолюминесцентные системы можно разделить на пять типов в зависимости от характера стадий, предшествующих образованию возбужденного состояния фермент-субстратного комплекса [2]:

1) образование возбужденного продукта происходит в результате энзиматического окисления субстрата (рачок *Cypridina hilgendorffii*, рыбы *Apogon* и *Parapriacanthus*, моллюск *Latia*, червь *Ogontosyllis*),

2) стадия активации субстрата предшествует его энзиматическому окислению (светляки и морские апотины глазки *Renilla*),

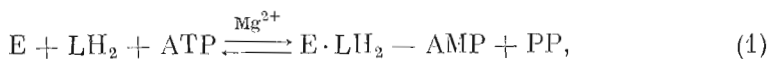
3) на первой стадии происходит восстановление субстрата с последующим его ферментативным окислением (бактерии и грибы),

4) перекисное окисление субстрата (кишечнодышащие *Balanglossus* и земляной червь *Diplocardia*),

5) «предварительно заряженные системы» (кишечнополостные и многощетинковый червь *Chaetopterus*).

Уникальным свойством люминесцентной реакции светляков является обязательное участие в реакции наряду с люциферином и люциферазой АТР [3]. Другой такой системы с потребностью в АТР не обнаружено. Реакция АТР со светляковым люциферином аналогична активации ряда других соединений, включая жирные кислоты и аминокислоты. Механизм реакции биолюминесценции в светляках (*Photinus pyralis* сем. *Lampy-*

ridae) был подробно изучен Мак-Элроем с сотр. [4, 5]. К настоящему времени можно считать принятым следующий механизм реакции [6]:



где E — фермент люцифераза, LH_2 — люциферин, АТР — аденозинтрифосфорная кислота, РР — пирофосфат, АМР — аденозинмонофосфорная кислота, P^* — электронно-возбужденный продукт реакции, испускающий свет.

На каждую молекулу люциферина светляка потребляется одна молекула кислорода [7, 8] и испускается один квант света. Квантовый выход биолюминесцентной реакции равен 1. Другой био- или хемилюминесцентной реакции с таким высоким квантовым выходом пока не обнаружено. Для разных видов светляков наблюдается различный максимум излучения ($\lambda_{\text{макс}}$ от 5524 до 5820 Å). Структура люциферина и общий механизм реакции, по-видимому, сходны для всех видов светляков [9, 10]. В то же время структура люциферазы из различных источников может несколько различаться. Уникальные свойства биолюминесцентной системы светляков (потребность в АТР, высокий квантовый выход, почти абсолютная специфичность) нашли в настоящее время широкое использование в аналитической биохимии при количественном определении АТР и различных метаболитов, в ходе превращения которых образуется или расходуется АТР [11, 12].

В данном обзоре рассмотрены свойства наиболее изученной люциферазы светляков — *Photinus pyralis*.

Физико-химические свойства люциферазы

1. Источники фермента, выделение и очистка

Различные виды светляков (семейство *Lampyridae*) встречаются на юге Северной Америки, в Японии, Юго-Восточной Азии, в Индонезии, на Ямайке и т. д. В Советском Союзе светляки обитают на Черноморском побережье Кавказа (*Luciola mingrelica*) и в Приморском крае (*Lampyris noctilica*, *Luciola mongolica* Motsch, *Luciola lateralis* Motsch, *Pyrocoelia rufa* E. ol.). Нередко светляками называют люминесцирующих представителей других семейств — *Coleoptera* — *Elateridae*, *Phenogolidae*, *Drilidae*, *Phagophthalmidae* [13].

Для получения препаратов люциферазы живые светляки дегидратируют 24 ч в вакууме над $CaCl_2$. Высушенные «лампочки» вручную отделяют и хранят в запаянных ампулах при температуре не выше -10° . Неочищенный препарат получают экстрагированием люциферазы на холоду либо ацетоном, либо буфером при рН 7,5—8,0 [11, 12]. Такой препарат широко используется в аналитических целях, однако специфичность его невысока из-за присутствия в нем ферментов, участвующих в превращениях АТР.

В кристаллическом виде люцифераза светляков была впервые получена Грин и Мак-Элроем в 1956 г. [14, 15]. Трижды перекристаллизованный препарат не содержал примесей неорганической пирофосфатазы и люциферил-аденилат-гидролазы. Пять раз перекристаллизованный фермент был гомогенен, по данным электрофореза, седиментации и энзиматическим тестам [15].

В работах Нильсена [16, 17] была проведена очистка люциферазы путем фракционирования на колонках с сефадексами G-25 и G-100. В более

поздней работе Б. А. Рубина и др. [10] было отмечено, что можно добиться значительного уменьшения аденилаткиназной активности в препарате путем фракционирования на сефадексе G-25. Однако очистка люциферазы на сефадексах, особенно на гелях высокой пористости, очень затруднена вследствие сильной гидрофобной сорбции фермента на носителе. Поэтому проблема получения чистого, высокоспецифичного по отношению к АТФ препарата люциферазы остается открытой.

2. Структура люциферазы

Молекулярный вес люциферазы, по данным равновесного ультрацентрифугирования в 0,1 М буферном растворе Трис-НСl (рН 7), составляет 92 000—95 000, а в 5 М растворе гуанидинхлорида — 50 000—52 000 [18]. Коэффициент седиментации $s_{20, w} = 3,81$ в первом и $s_{20, w} = 1,64$ во втором случае. Эти данные показывают, что молекула люциферазы состоит из двух субъединиц с $M \sim 50 000$. Аминокислотный состав люциферазы приведен в табл. 1. Число пептидов, найденных в триптическом гидролизате, соответствует двум идентичным субъединицам [18, 19]. Были найдены две С-концевые аминокислоты (лейцин и серин) и только одна N-концевая аминокислота — серин [19]. Люцифераза не содержит какой-либо простетической группы, в спектрах фермента нет характеристического поглощения. Оптическая плотность раствора с концентрацией люциферазы 1 мг/мл — 0,75 ед. опт. пл. при 278 нм [14]. Изоэлектрическая точка фермента находится около 6,2—6,3 [14].

Как следует из табл. 1, в состав люциферазы входит большое число неполярных аминокислот. Средняя гидрофобность составляет 1240 кал на один аминокислотный остаток [4]. Это делает люциферазу одной из самых гидрофобных среди известных белков. Высокое содержание неполярных аминокислот, по-видимому, требует того, чтобы некоторые из них находились на внешней поверхности белковой глобулы. Возможность межмолекулярного гидрофобного взаимодействия позволяет объяснить многие физико-химические свойства люциферазы. В растворе с низкой ионной си-

Таблица 1

Аминокислотный состав люциферазы

Аминокислота	мкМ/мг белка	М/50 000 ед. мол. веса *	% *
Лизин	0,541	27,0	6,2
Гистидин	0,232	11,6	2,7
Аргинин	0,336	16,8	3,9
Аспарагиновая кислота	0,784	39,2	9,0
Треонин	0,450	22,5	5,2
Серин	0,460	23,0	5,3
Глутаминовая кислота	0,885	44,3	10,2
Пролин	0,467	23,4	5,4
Глицин	0,654	32,7	7,5
Аланин	0,607	30,3	2,8
Валин	0,655	32,8	7,0
Метионин	0,248	12,4	9,4
Изолейцин	0,609	30,5	3,3
Лейцин	0,820	41,0	6,3
Тирозин	0,335	16,8	1,0
Фенилаланин	0,547	27,4	
Цистеиновая кислота	0,104; 0,102 0,087; 0,092 0,062; 0,069	5,2; 5,1 4,35; 4,6 3,1; 3,45	
Всего		436,2	100,2

* Рассчитано нами.

лой уже при небольших концентрациях мономер с M 50 000 относительно легко ассоциирует в димер с M 100 000 [20].

К настоящему времени остается открытым вопрос об идентичности субъединиц люциферазы. Если данные аминокислотного анализа и изучение триптических пептидов говорят в пользу того, что две субъединицы M 50 000 идентичны, то изучение функциональных свойств фермента, в частности кинетических, не дает однозначного ответа на этот вопрос. Ряд результатов свидетельствует о функциональном подобии субъединиц люциферазы:

- 1) в расчете на 100 000 ед. молекулярного веса
- а) имеется по два связывающих участка для люциферина и АТР [21, 22], а также для $\text{LN}_2\text{-AMP}$,
- б) образуется 2 моль продукта [23],
- в) связывается две молекулы красителя и требуется две молекулы $\text{LN}_2\text{-AMP}$, чтобы вытеснить эти две молекулы красителя [24, 25],
- 2) удельная активность фермента не изменяется при возрастании M от 50 000 до 100 000 [20];
- 3) методом гель-хроматографии показано, что молекулярный вес комплексов $\text{E}\cdot\text{AMP}$ и $\text{E}\cdot\text{P}$ равен 50 000 [23].

Однако ряд других данных указывает на некоторую неравноценность двух субъединиц:

- 1) «активный субстрат» — MgATP — связывается с одним участком на 100 000 ед. молекулярного веса, а второй участок связывает только либо АТР, либо АМР,
- 2) только одна молекула $\text{LN}_2\text{-AMP}$ образуется из LN_2 и MgATP на 100 000 ед. молекулярного веса,
- 3) хотя на 100 000 ед. молекулярного веса образуется 2 моль продукта, первый моль образуется быстрее, чем второй,
- 4) выделенный комплекс фермента с оксилуциферином содержит одну молекулу последнего на 100 000 ед. молекулярного веса [23].

Из этих данных авторы [4] делают заключение, что димер с M 100 000 содержит две субъединицы, из которых только одна энзиматически активна. Чтобы получить однозначный ответ о функциональном и структурном сходстве или различии двух субъединиц люциферазы, необходимо более подробное кинетическое и физико-химическое исследование мономера и димера люциферазы.

3. Стабильность люциферазы

Препараты высушенных и замороженных «лампочек» светляков могут храниться в замороженном состоянии в течение 2 лет, при этом активность люциферазы полностью сохраняется. В экстрактах в присутствии EDTA при pH 7,4 активность фермента сохраняется несколько дней, если концентрация белка в растворе не менее 10 мг/мл EDTA и альбумин эффективно защищают фермент от инактивации [25]. Хорошие условия для хранения люциферазы в растворе: 2,4 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 М EDTA, pH 7,5—8,0, при 4°. Кристаллический фермент, как показали Грин и Мак-Элрой [14], нестабилен даже в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и быстро инактивируется при замораживании и размораживании раствора. Цистеин и глутатион не защищают фермент от инактивации. Данных по влиянию pH и температуры на стабильность люциферазы в литературе не имеется.

4. Роль и реактивность сульфгидрильных групп

Число сульфгидрильных групп светляковой люциферазы было определено спектрофотометрическим титрованием *n*-меркурбензоатом в присутствии конкурентного ингибитора — дегидролюциферина и без него [26]. В нативном ферменте титруется 7—8 групп, что приводит к полной потере

активности. В фермент-ингибиторном комплексе титруется 4—5 SH-групп. Последующее удаление ингибитора приводит к 90% восстановлению активности. Фермент теряет активность при взаимодействии с такими реагентами, как арсенит-2,3-димеркаптопропанол, CdCl_2 и γ -(*n*-арсенофенил)-*n*-бутановая кислота [4].!

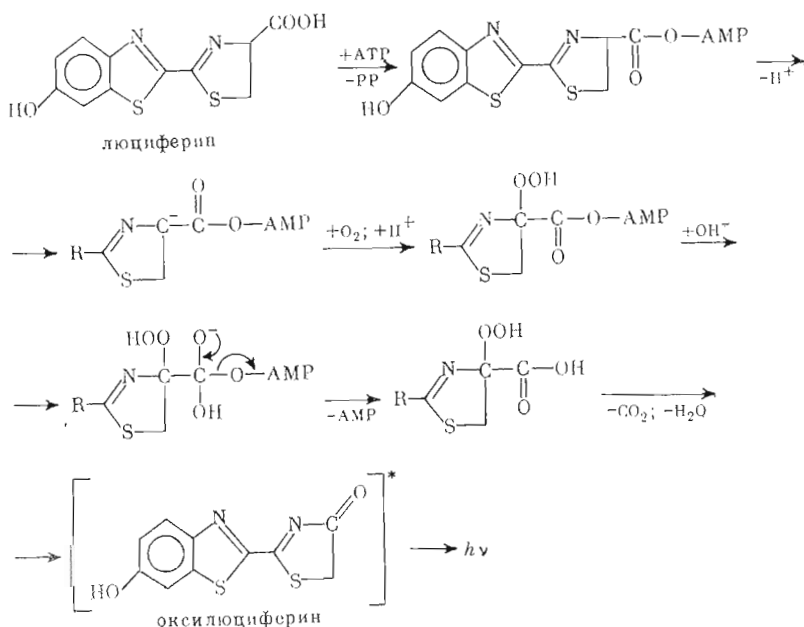
Показано, что две SH-группы, существенные для каталитической активности, реагируют с *N*-этилмалеимидом. При этом люцифераза теряет способность связывать конкурентный ингибитор — дегидролюциферин, что указывает либо на близкое расположение SH-групп к участку связывания люциферина, либо на конформационные изменения, в результате которых фермент теряет способность связывать ингибитор или субстрат [4].

Следовательно, люцифераза относится к сульфгидрильным белкам, т. е. к ферментам, в активный центр которых входят SH-группы. Такие ферменты весьма чувствительны к следам тяжелых металлов, поэтому становится понятным защитное, стабилизирующее действие EDTA на люциферазу в растворе.

Кинетические свойства и механизм действия люциферазы

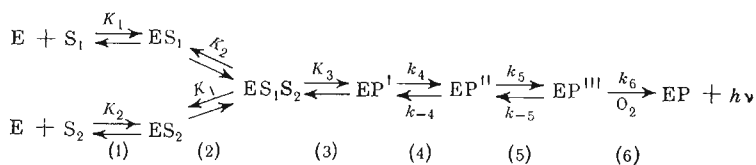
1. Механизм ферментативного окисления люциферина

Светляковый люциферин был выделен из светляков в 1957 г. Битлери и Мак-Элрой [25]. В последующих работах было установлено, что это соединение — производное бензотиазола *D*(—)-2-(6-оксibenзотиазолил-2)-3,4-дигидротиазолил-4-карбоновая кислота [28, 29]. Сузуки и Гого [30] идентифицировали и синтезировали продукт окисления люциферина — оксилуциферин. Кроме того, было установлено, что последовательность процессов, приводящих к био- и хемилюминесценции, также весьма близка. На основании имеющихся данных Де Люка и Мак-Элрой [4] предложили следующий механизм окисления люциферина и образования возбужденного продукта, дезактивация которого сопровождается эмиссией света:



2. Кинетическая схема люциферазной реакции

Известные из литературы экспериментальные кинетические данные можно описать схемой



где S_1 и S_2 — люциферин и MgATP соответственно. Предполагается, что связывание субстратов происходит независимо.

Поскольку количество излучаемых квантов света N равно количеству образовавшихся молекул продукта (P), скорость реакции можно записать в виде

$$v = \frac{d[EP]}{dt} = \frac{d[N]}{dt} = I,$$

где I — интенсивность люминесценции. Если считать, что равновесия на первых трех стадиях (1—3) в схеме устанавливаются гораздо быстрее, чем на последующих стадиях (4—6), и что концентрация фермента значительно меньше концентрации обоих субстратов, то начальная скорость реакции в стационарном режиме выражается уравнением (1). Мерой v_0 является интенсивность люминесценции, которая достигается после установления стационарного режима для реакций, указанных в схеме:

$$v_0 = \frac{k_6 E_0 S_1 S_2}{A_1 + A_2 S_1 + A_3 S_1 S_2 + A_4 S_2}, \quad (1)$$

где

$$\begin{aligned}
 A_1 &= \frac{(k_{-4} + k_5)(k_{-5} + k_6) - k_{-5}k_5}{k_4 k_5} \cdot K_1 K_2 K_3, \\
 A_2 &= \frac{(k_{-4} + k_5)(k_{-5} + k_6) - k_5 k_{-5}}{k_4 k_5} \cdot K_2 K_3, \\
 A_3 &= \frac{(k_{-4} + k_5)(k_{-5} + k_6)}{k_4 k_5} \cdot (K_3 + 1) + \frac{k_{-5} + k_6}{k_5} + 1, \\
 A_4 &= \frac{(k_{-4} + k_5)(k_{-5} + k_6) - k_{-5}k_5}{k_4 k_5} \cdot K_1 K_3
 \end{aligned}$$

(S_1 , S_2 и E_0 — начальные концентрации субстратов и фермента соответственно).

В случае $S_2 = \text{const}$ уравнение (1) принимает следующий вид:

$$v_0 = \frac{V'_{\text{макс}} S_1}{K'_m + S_1}, \quad (2)$$

где

$$V'_{\text{макс}} = \frac{k_6 E_0 S_2}{A_2 + A_3 S_2}, \quad (3)$$

$$K'_m = \frac{A_1 + A_4 S_2}{A_2 + A_3 S_2}. \quad (3')$$

В случае $A_3 S_2 \ll A_2$ и $A_4 S_2 \ll A_1$, т. е. при достаточно малом S_2 , имеем

$$V'_{\text{макс},0} = \frac{k_6 E_0 S_2}{A_2}; \quad (4)$$

$$K'_{m,0} = \frac{A_1}{A_2} = K_1. \quad (4')$$

В случае, когда S_2 велико, так что $A_2 \ll A_3 S_2$ и $A_1 \ll A_4 S_2$,

$$V'_{\text{макс}, \infty} = \frac{k_6 E_0}{A_3}; \quad (5)$$

$$K'_{\text{м}, \infty} = \frac{A_4}{A_3}. \quad (5')$$

Подобные зависимости для v_0 от S_2 при $S_1 = \text{const}$ приводятся ниже:

$$v_0 = \frac{V''_{\text{макс}} S_2}{K''_{\text{м}} + S_2}, \quad (6)$$

где

$$V''_{\text{макс}} = \frac{k_6 E_0 S_1}{A_4 + A_3 S_1}, \quad (7)$$

$$K''_{\text{м}} = \frac{A_1 + A_2 S_1}{A_4 + A_3 S_1}. \quad (7')$$

Когда S_1 мало, т. е. $A_4 \gg A_3 S_1$ и $A_1 \gg A_2 S_1$,

$$V''_{\text{макс}, 0} = \frac{k_6 E_0 S_1}{A_4}, \quad (8)$$

$$K''_{\text{м}, 0} = \frac{A_1}{A_4} = K_2. \quad (8')$$

Когда S_1 велико, т. е. $A_4 \ll A_3 S_1$ и $A_1 \ll A_2 S_1$,

$$V''_{\text{макс}, \infty} = \frac{k_6 E_0}{A_3}; \quad (9)$$

$$K''_{\text{м}, \infty} = \frac{A_2}{A_3}. \quad (9')$$

Из приведенных уравнений видно, что предельное значение $V'_{\text{макс}, \infty}$ не зависит от того, из какого уравнения и при каких условиях ($S_1 = \text{const}$ или $S_2 = \text{const}$) оно определяется, т. е.

$$V'_{\text{макс}, \infty} = V''_{\text{макс}, \infty} = \frac{k_6 E_0}{A_3}.$$

Общее уравнение скорости при постоянной концентрации одного из субстратов имеет вид уравнения Михаэлиса — Ментен. Однако $V'_{\text{макс}}$ и $K'_{\text{м}}$ являются сложными функциями элементарных констант скорости и концентрации второго субстрата. Как видно из уравнений (3') и (7'), из зависимости $K'_{\text{м}}$ и $K''_{\text{м}}$ от концентрации субстрата можно получить величины констант связывания субстратов K_1 и K_2 (схема).

3. Экспериментальные результаты по кинетике люциферазной реакции в стационарных условиях

Экспериментальные результаты, полученные Мак-Элроем с сотр. [21], по окислению люциферина в присутствии АТФ и люциферазы при рН 7,9 были обработаны по кинетической схеме, выведенной нами. За стационарную скорость v_0 авторы принимали величину максимальной интенсивности люминесценции. При постоянных концентрациях одного из субстратов ЛН₂ или АТФ зависимость стационарной скорости реакции v_0 от концентрации субстрата описывается типичной михаэлисовской кривой (рис. 1а и 2а). На рис. 3 показаны зависимости $V'_{\text{макс}}$ и $K'_{\text{м}}$ от концентрации АТФ, а на рис. 4 — зависимости $V''_{\text{макс}}$ и $K''_{\text{м}}$ от концентрации люциферина. Предельные величины $V'_{\text{макс}, \infty}$ и $V''_{\text{макс}, \infty}$, как следует из формул (5) и (9), должны совпадать, если схема применима для данной реакции. Рассчитанные из эксперимента предельные величины $V'_{\text{макс}, \infty}$ и $V''_{\text{макс}, \infty}$ достаточ-

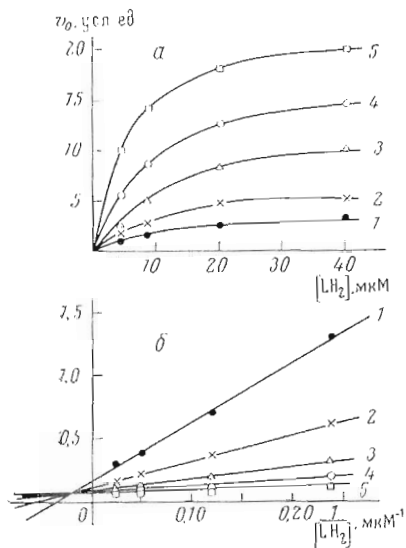


Рис. 1

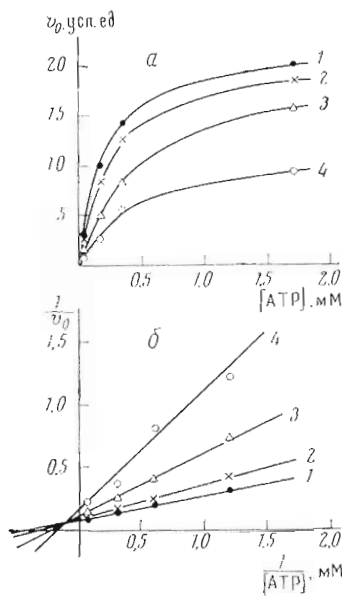


Рис. 2

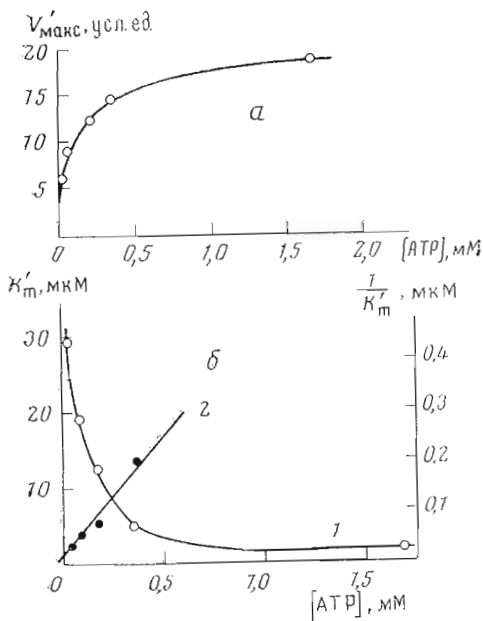


Рис. 3

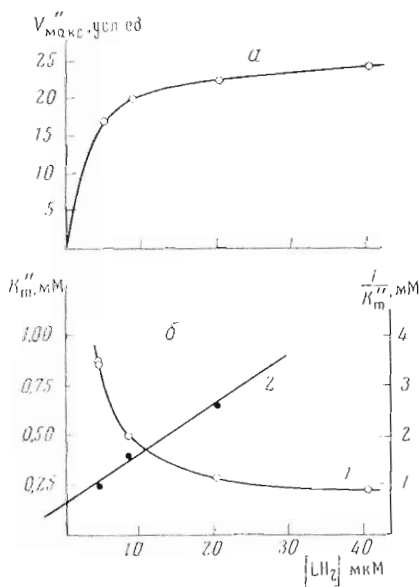


Рис. 4

Рис. 1. Кинетические данные по окислению люциферина в присутствии люциферазы и АТР [21]. Условия: 2 мл 25 мМ глицил-глицинового буфера (рН 7,9), 0,1 мл 0,1 М раствора $MgSO_4$, 5—10 мкг люциферазы. Реакцию инициировали добавлением АТР. *a* — зависимости v_0 от концентрации люциферина при различных концентрациях АТР (мМ): 1 — 0,033; 2 — 0,083; 3 — 0,17; 4 — 0,33; 5 — 1,7; *b* — те же зависимости, но в обратных координатах

Рис. 2. Кинетические данные по окислению люциферина в присутствии люциферазы и АТР [21]. Условия — см. рис. 1. *a* — зависимости v_0 от концентрации АТР при различных концентрациях люциферина (мкМ): 1 — 40; 2 — 20; 3 — 8,3; 4 — 4,15; *b* — те же зависимости, но в обратных координатах

Рис. 3. Зависимость V'_{max} (*a*) и K'_m (*b*, 1), $1/K'_m$ (*b*, 2) от концентрации АТР. Условия — см. рис. 1

Рис. 4. Зависимость V''_{max} (*a*) и K''_m (*b*, 1), $1/K''_m$ (*b*, 2) от концентрации люциферина. Условия — см. рис. 1

тно близки: 19 и 24 усл. ед. соответственно. Величины K'_m и K''_m уменьшаются с увеличением S_1 и S_2 соответственно (рис. 3б и 4б). Величины K'_m и K''_m при малых значениях S_1 и S_2 приближаются к величинам K_1 и K_2 , т. е. максимально высокие величины $K'_{m,0}$ и $K''_{m,0}$ характеризуют лишь константы связывания субстратов S_1 и S_2 с ферментом соответственно ($K_1 = 40$ мкМ, $K_2 = 1,3$ мМ, рис. 3 и 4). Минимальные величины $K'_{m,\infty}$ и $K''_{m,\infty}$ являются весьма сложными функциями констант связывания и кинетических констант реакций, указанных в схеме. При насыщающей концентрации одного из субстратов S_1 или S_2 предельные величины $K'_{m,\infty}$ и $K''_{m,\infty}$ характеризуют взаимодействие с ферментом соответственно субстратов S_1 и S_2 . Так, при насыщающих концентрациях АТФ (~ 1 мМ, рис. 3б) определяемая величина $K'_{m,\infty}$, равная 1,7 мкМ, характеризует взаимодействие фермента с люцифериним. При концентрациях люциферина, близких к насыщающей (~ 40 мкМ), величина $K''_{m,\infty}$, равная 0,2 мМ, характеризует взаимодействие MgАТФ с ферментом. Следовательно, $K'_{m,\infty}$ по люциферину превышает $K''_{m,\infty}$ по MgАТФ примерно в 100 раз.

На рис. 5 показана рН-зависимость $K'_{m,\infty}$ по люциферину [21], полученная при насыщающих концентрациях АТФ. Величина $K'_{m,\infty}$ минимальна при $\text{pH} \leq 6,4$, где она равна 2 мкМ. При увеличении рН $K'_{m,\infty}$ возрастает и становится равной 20 мкМ при $\text{pH} \geq 8$. Точка перегиба для полученной кривой находится при $\text{pH} 7,2-7,4$. Поскольку величина $K'_{m,\infty}$ — сложная функция нескольких констант (см. выше), трудно объяснить наблюдаемую зависимость влиянием ионизации какой-либо определенной группы фермента. По некоторым независимым данным вблизи люциферин-связывающего участка на ферменте находится SH-группа [21, 31], диссоциация которой может приводить к ухудшению связывания люциферина, имеющего карбоксильную группу $\text{R}-\text{COO}^-$. Однако нельзя утверждать, что на рН-зависимости для K'_m проявляется рК именно —SH-группы люциферазы. Для этого, по-видимому, необходимы независимые определения рН-зависимости для константы связывания люциферина с люциферазой.

4. Предстацонарные стадии биолюминесцентной реакции

Особенностью данной люциферазной реакции, как и ряда других биолюминесцентных реакций, является то, что после смешения реагентов наблюдается относительно большой период времени, необходимый для достижения наибольшей скорости реакции (максимальной интенсивности). Даже при использовании насыщающих концентраций субстратов период индукции составляет 25 мс при 25° , а максимальная интенсивность свечения достигается в течение 0,3 с.

В ряде работ авторы ставили своей целью выяснить, какие стадии из последовательности реакций (1—6), указанных в схеме, обуславливают существование периода индукции и какие стадии лимитируют общую скорость процесса.

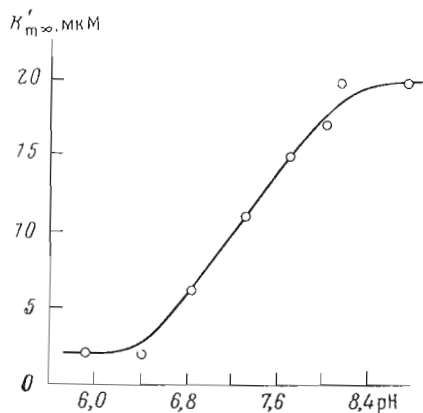


Рис. 5. Зависимость $K'_{m,\infty}$ от рН. Условия: 0,01 М Na-фосфатный буфер, рН 6—8,78. Концентрацию люциферина изменяли, а концентрация АТФ была постоянной ($> 5 \cdot K''_{m,\infty}$) [21]

Термодинамические характеристики отдельных стадий реакции, катализируемой люциферазой при 25° [6]

Стадия	ΔF^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger , э.ед.
	ккал/моль		
Эмиссия света ($t_{1/2 \text{ макс}}$)	19,700	7,900	-42
Период индукции	18,700	18,800	0,4
Активация дегидролюциферина (образование E·L-AMP)	15,500	9,900	-22

Чтобы оценить скорость сорбции субстратов и образования промежуточного продукта LH₂-AMP, была изучена кинетика уменьшения флуоресценции конкурентного ингибитора — дегидролюциферина, которое происходит при образовании E — L — AMP [6]. Оказалось, что для этой реакции при всех изученных концентрациях ингибитора (7—70 мкМ) период индукции отсутствует, а константа скорости реакции следует первому порядку по ингибитору (до 60%-ной глубины реакции).

Реакции (1—3) в схеме можно исключить, если вводить в реакцию предварительно синтезированный субстрат LH₂-AMP. В этом случае период индукции сохраняется [6] и длительность его не изменяется (~ 25 мс), как не изменяется и время достижения максимальной интенсивности (0,3 с). Эти результаты показывают, что стадии (1—3) вряд ли являются лимитирующими в процессе окисления люциферина.

На длительность периода индукции также не влияет изменение концентрации фермента и использование избытка фермента по отношению к субстрату. Изучение влияния концентрации АТР (1 мкМ — 1 мМ) на длительность периода индукции показывает, что время, необходимое для достижения 50 % высоты пика, постоянно и не зависит от концентрации АТР. Все эти факты говорят о том, что существование довольно значительного периода индукции не лимитируется процессом связывания субстратов и образования промежуточного продукта реакции LH₂-AMP.

С другой стороны, Мак-Элрой с сотр. [32—34] показали, что при введении кислородсодержащего буфера в анаэробный раствор люциферина, люциферазы, АТР и Mg²⁺ люминесценция начинается очень быстро. Время достижения максимальной интенсивности в этом случае составляет всего 60 мс, а период индукции отсутствует. Таким образом, можно сделать вывод, что на стадию, предшествующую окислению и выделению света, должны влиять некие внутримолекулярные процессы, которые на схеме обозначены как стадии (4) и (5). Были определены термодинамические параметры для стадии, включающей период индукции, и для стадии последующего выделения света. Данные представлены в табл. 2.

Для периода индукции в качестве меры константы скорости при разных температурах была использована величина, обратная длительности периода индукции. Данные табл. 2 показывают, что на стадии, включающей период индукции, наблюдается только энтальпийное изменение, без существенного вклада энтропии в свободную энергию активации ΔF^\ddagger . В противоположность этому стадия возникновения света характеризуется большой величиной отрицательной энтропии активации. Влияние температуры на активацию дегидролюциферина свидетельствует о наличии довольно большого вклада энтропии активации в ΔF^\ddagger . Однако реакция активации субстрата, по-видимому, не относится к лимитирующей, поэтому этот эффект не должен проявляться на стадии выделения света.

Полученные данные показывают, что имеются по крайней мере две медленные стадии, происходящие до излучения света, но после связывания

субстратов с ферментом и синтеза $\text{LN}_2\text{-AMP}$. Кроме конформационных изменений белка после образования $\text{LN}_2\text{-AMP}$ происходит единственное известное химическое изменение — отрыв протона ферментом с образованием $\text{E} - \text{LN}^- - \text{AMP}$. Последний комплекс присоединяет кислород, и ряд последующих реакций ведет к выделению света [35].

Наличие больших конформационных изменений в люциферазе, происходящих во время реакции, подтверждается также данными по скоростям тритийводородного обмена и по дисперсии оптического вращения [36, 37].

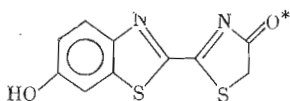
Наконец, некоторые авторы считают, что лимитирующей стадией является мономолекулярная реакция комплекса люцифераза — люциферин — $\text{AMP} - \text{O}_2$ с образованием оксилуциферина [38].

Приведенные в табл. 2 термодинамические параметры констант скоростей реакций — эффективные величины, но на данном этапе исследований трудно сказать, характеризуют ли они отдельную стадию или совокупность нескольких стадий процесса окисления.

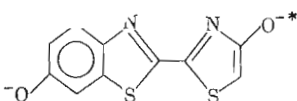
5. Влияние некоторых факторов на биоломинесцентную реакцию окисления люциферина

Максимальная интенсивность биоломинесценции в люциферин-люциферазной системе достигается при pH 7,6 в глицил-глициновом и фосфатном буферах, где наблюдается желто-зеленая люминесценция $\lambda_{\text{макс}}$ 562 нм [39, 40]. При изменении pH наблюдается изменение $\lambda_{\text{макс}}$ излучаемого света, а также интенсивности излучения. Так, при $\text{pH} < 6,5$ в спектрах люминесценции появляется красная полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ 616 нм, а при $\text{pH} < 5,5$ желто-зеленая эмиссия полностью подавляется и наблюдается только красная полоса, при этом значительно уменьшается и квантовый выход люминесценции. При щелочных значениях pH скорость окисления люциферина несколько ниже, чем при pH 7,6, но квантовый выход близок к 1. Обратимый красный сдвиг в спектрах люминесценции можно наблюдать не только при подкислении среды, но и при повышении температуры, при проведении реакции в 0,2 М мочеvine, pH 7,6, и при добавлении хлоридов цинка или кадмия.

Подробное изучение хемилюминесценции в реакции окисления люциферина дало возможность предложить структуру красного и желто-зеленого излучателя [41]:



красный излучатель



желто-зеленый излучатель

Следовательно, в кислых растворах образующийся продукт присутствует в основном в кетонной, неионизированной форме и излучает свет с $\lambda_{\text{макс}}$ 616 нм. При нейтральных и щелочных pH происходит енолизация продукта реакции и излучается свет с $\lambda_{\text{макс}}$ 562 нм. Логично ожидать, что введение в молекулу субстрата заместителей, которые изменяют кислотно-основные свойства енольной группы при углероде в положении 5 тиазолинового кольца, будет существенно изменять и спектр люминесценции. Это подтверждается исследованием биоломинесценции аналога люциферина — 6'-аминолюциферина [42]. Данное соединение является субстратом люциферазы, причем красная эмиссия сопровождает его окисление в диапазоне pH 6—10. Этот результат заставляет предположить, что 6'-аминогруппа оказывает сильное влияние на способность фермента отщеплять протон енольной группы тиазолинового кольца.

Спектральные характеристики биолюминесценции люциферин-люциферазной системы в сильной степени зависят от свойств субстратсвязывающей области фермента. Изменение полярности и относительной гидрофобности связывающего участка должно в значительной мере влиять на спектр излучаемого света. Возможно, что изменение $\lambda_{\text{макс}}$ излучаемого света при добавлении мочевины или хлоридов тяжелых металлов объясняется изменением свойств адсорбционного центра фермента.

Характер взаимодействия нуклеотида с ферментом также влияет на длину волны излучаемого света. Например, замена АТФ на 3-изо-АТФ приводит к тому, что при рН 7,5 значительная часть излучаемого света имеет $\lambda_{\text{макс}}$ 616 нм [43].

6. Исследование активного центра люциферазы с помощью ингибиторов

Изучение механизма и кинетики ингибирования фермента различными ингибиторами дает полезную информацию о структуре его активного центра.

Субстраты люциферазы — MgATP и люциферин — в изученных пределах их концентраций (рис. 1, 2) не оказывают ингибирующего действия на фермент. Интересная особенность механизма действия люциферазы — почти полное отсутствие оборота фермента. После достижения максимальной интенсивности следует сначала довольно быстрое, а затем медленное уменьшение интенсивности, которое может продолжаться несколько минут. Предполагается, что быстрый спад интенсивности — следствие ингибирования фермента продуктом реакции [44]. Однако тот факт, что фермент-субстратные смеси могут излучать свет (хотя и низкой интенсивности) в течение нескольких часов, свидетельствует о существовании некоторого оборота фермента [45, 32]. Это подтверждается также кинетическими данными по уменьшению интенсивности свечения в ходе реакции окисления люциферина, которые не могут быть количественно объяснены, если предположить, что практически необратимо фермент ингибируется продуктом реакции. Как показано в табл. 3, продукт реакции окислюциферин действительно наиболее эффективен из исследованных ингибиторов люциферазы ($K_1 = 0,2—0,3$ мкМ).

Интенсивность люминесценции в люциферазной реакции зависит от природы используемого буфера и от присутствия некоторых неорганических ионов. Так, при рН 7,4—7,8 высокие концентрации фосфата или арсената значительно уменьшают интенсивность свечения [32]. Замена фосфатного буфера на глицил-глициновый увеличивает интенсивность свечения в 3 раза [38]. В то же время добавление арсената или фосфата частично препятствует быстрому спаду интенсивности, наблюдаемому в ходе люциферазной реакции [46]. Подробно механизм действия различных ионов на люциферазу не изучался.

Многие производные бензтиазола и родственные ему соединения — эффективные ингибиторы люциферазы [47]. Аналоги люциферина, за исключением индена, и тех соединений, которые имеют в положении 6' бензтиазолинового кольца метил- или метоксигруппу, ведут себя как конкурентные ингибиторы [31]. Константы ингибирования приведены в табл. 3. Значения K_1 для всех аналогов люциферина колеблются в пределах 0,1—3 мкМ, а производные бензтиазола являются менее сильными ингибиторами (K_1 составляет 25—58 мкМ). Поскольку индивидуальные значения K_1 мало зависят от природы боковых заместителей, можно предположить, что в основном за связывание с ферментом ответственны циклические структуры ингибиторов. Изучение связывания красителей с люциферазой показывает весьма гидрофобный характер люциферинсвязывающего участка [23, 24].

Однако энергетически трудно объяснить связывание ингибиторов с

Константы ингибирования люциферазы аналогами люциферина и производными бензтиазола [21]

Ингибиторы	K_i (мкМ) при pH				
	8,3	7,7	7,3	6,3	5,9
Аналоги люциферина					
1. Модификации в бензтиазольном кольце					
6'-аминолюциферин		1,8		—	
6'-ацетиламинолюциферин		3,0		0,8	
6'-хлоролуциферин	1,2	1,0	0,53	0,28	0,16
6'-дезгидроксилюциферин		3,4		0,7	
2. Модификация в тиазолиновом кольце					
5-(<i>цис</i>)-метиллюциферин		2,9		0,6	
5-(<i>транс</i>)-метиллюциферин		2,7		0,75	
5,5-диметиллюциферин		2,0		0,66	
гомолуциферин		2,5		0,34	
дегидролюциферин	1,2	1,0	0,63	0,23	0,10
декарбоксилуциферин	0,22	0,29	0,28	0,20	0,17
оксилуциферин		0,23*			
Производные бензтиазола					
бензтиазол		25		33	
6-оксибензтиазол		—		22	
2-циано-6-оксибензтиазол		58		58	
2-циано-6-хлорбензтиазол		26		32	
2-циано-4-оксибензтиазол		45		29	
2-циано-4-метоксибензтиазол		28		25	
этил-2-бензтиазолсульфонат		2,3**			
2-бензтиазолсульфоновая кислота		14**			

* pH 7,9 [51]; ** pH 7,9 [42].

Таблица 4

Данные по распределению и константы ингибирования (K_i) для веществ, структурно сходных с бензтиазолом [21]

Вещество	Растворимость в воде, $M \cdot 10^3$	Коэффициент распределения, K		$-\Delta F_{\text{э}}$ ккал/моль	$K_i \cdot 10^5$, M	$-\Delta F_{\text{БГ}}$	$\frac{\Delta F_{\text{БГ}} - \Delta F_{\text{э}}}{-\Delta \Delta F}$
		этилацетат-буфер	генсан-буфер				
Бензимидазол	400	3,7	0,02	0,7	79	4,0	3,3
Бензоксазол	260	34	10	2,0	11	5,2	3,2
Бензтиазол	140	84	45	2,5	2,4	6,0	3,5
Индол	96	113	8	2,7	8,0	5,3	2,6
Тионафталин	2,2	230	1000	3,1	3,6	5,8	2,7
Инден	1,7	400	1000	3,4	2,5	6,0	2,6

ферментом такой моделью, которая учитывает только гидрофобные взаимодействия, т. е. согласно которой связывание ингибитора можно представить себе лишь как процесс экстракции. Как показано в табл. 4 [21], абсолютные значения свободных энергий переноса бензтиазола и сходных соединений из водного раствора в этилацетат значительно ниже, чем свободные энергии образования соответствующих фермент-ингибиторных комплексов (табл. 4). По-видимому, большая часть свободной энергии связывания обусловлена другими силами, дополняющими гидрофобные взаимодействия. Среди шести исследованных соединений те, которые имеют

по два гетероатома (бензимидазол, бензоксазол, бензтиазол), характеризуются большей величиной $\Delta\Delta F$, чем соединения, содержащие лишь по одному гетероатому (индол, тионафталин, инден). По-видимому, донорно-акцепторные взаимодействия между ингибитором и ферментом значительно влияют на константу связывания.

Аналоги люциферина и производные тиазола, имеющие метил- или метоксигруппу в положении 6' бензтиазольного кольца, проявляют себя как аномальные ингибиторы. Они не конкурентны по отношению к люциферину, в то же время они не являются и неконкурентными. Однако если эти ингибиторы вводить одновременно с АТФ, то степень ингибирования уменьшается, причем ингибирование становится конкурентным по отношению к люциферину (K_1 2 мкМ при рН 7,7 для 6'-метоксилюциферина). Следует отметить, что для других ингибиторов K_1 не зависит от порядка смешения реагентов. Следовательно, аномальный вид ингибирования 6'-метил- или 6'-метоксипроизводными люциферина объясняется, по-видимому, тем, что связывание этих соединений частично необратимо, что и приводит к отклонениям от конкурентного характера.

Значительная разница наблюдается в характере ингибирования для производных, содержащих метильную группу в положении 5' и 6' бензтиазольного кольца, т. е. эти положения не эквивалентны [21]. По-видимому, за стереоспецифичность связывания ответственны гетероатомы N и S в кольце, в то время как 6'-ОН-группа люциферина не является необходимой для стереоспецифического связывания, так как 6'-замещенные аналоги люциферина связываются с ферментом почти столь же эффективно, как и сам люциферин. Какие же группы на ферменте ответственны за связывание люциферина или конкурентных ингибиторов, остается до сих пор неизвестным.

Второй специфический субстрат люциферазы — MgАТФ [48]. Свободная АТФ также связывается с ферментом и является при этом конкурентным ингибитором по отношению к MgАТФ, в то время как Mg^{2+} с люциферазой не связывается [48].

Аналитическое применение люциферин-люциферазной системы светляков

Упомянутые выше свойства светляковой люциферазы — почти абсолютная специфичность по отношению к АТФ, прямая пропорциональность между интенсивностью люминесценции и концентрацией АТФ, высокий квантовый выход, а также возможность измерять очень низкие уровни люминесценции — позволили на основе этого фермента создать высокочувствительный и высокоспецифичный аналитический метод для количественного определения АТФ в различных биологических препаратах, что весьма важно для многих областей физиологии, биохимии и медицины.

Имеется ряд работ по методам применения люциферазы светляков в аналитических целях [12, 25, 38, 49, 50] для определения АТФ. Добавление коэнзима А к смеси, содержащей люциферазу, инактивированную аденилатоксилюциферинном, вызывает реактивацию фермента путем разрушения комплекса люцифераза — аденилатоксилюциферин; поэтому люциферазная система светляков может быть использована в качестве чувствительного метода измерения концентрации коэнзима А [12]. С помощью люциферин-люциферазной системы светляков можно исследовать ряд ферментов, связанных с потреблением и синтезом АТФ, таких, как миокиназа, гексокиназа, АТФ-аза и т. д.

Этот метод позволяет определять концентрации АТФ вплоть до 10^{-13} М. При определении концентрации АТФ излучаемый свет измеряется либо интегрированием светового сигнала за определенный промежуток времени, либо интенсивностью люминесценции в определенный момент времени, обычно в точке максимума интенсивности, и сравнивается с калибро-

вочным графиком. Первый метод более чувствителен, так как помехи от шумов при этом невелики. Второй метод экспериментально более удобен.

Высокой специфичности по отношению к АТР можно достичь только в случае очищенных препаратов люциферазы, в которых отсутствуют другие ферменты, катализирующие синтез или деградацию АТР. К тому же было отмечено [25], что для очищенных препаратов люциферазы при определенных концентрациях интенсивность люминесценции достигает максимума, а затем довольно долгое время остается постоянной. Такой метод позволяет более точно определять максимальный уровень интенсивности и соответственно концентрацию АТР и использовать автоматизированные системы регистрации.

Решение задачи получения очищенных препаратов люциферазы, а также более подробное исследование кинетики и механизма действия фермента дадут возможность оптимизировать условия аналитического применения люциферин-люциферазной системы светляков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubois R. (1887) *C. r. Soc. biol.*, **39**, 564—578.
2. Hastings J. W. (1968) *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 597—630.
3. McElroy W. D. (1947) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **33**, 342—348.
4. McElroy W. D., De Luca M. (1974) in *Chemiluminescence and Bioluminescence*, pp. 285—311, N. Y., Plenum Press.
5. De Luca M., Dempsey M. E. (1974) in *Chemiluminescence and Bioluminescence*, pp. 345—355, N. Y., Plenum Press.
6. De Luca M., McElroy W. D. (1974) *Biochemistry*, **13**, 921—925.
7. McElroy W. D., Seliger H. H. (1963) *Adv. Enzym.*, **25**, 119—125.
8. Plant R., McElroy W. D., White E. N. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, 525—529.
9. Seliger H. H., McElroy W. D. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 75—79.
10. Рубин Б. А., Кост А. Н., Кукарских Г. П., Юровская М. А. (1974) *Химия природн. соедин.*, **3**, 293—300.
11. Strehler V. L., McElroy W. D., Colowick S. P., Kaplan N. O. (1957) *Methods in Enzymology*, **3**, 871.
12. Chase A. M. (1960) *Meth. Biochem. Anal.*, **8**, 61—115.
13. Гительзон И. И., Чумакова Р. И. (1975) *Успехи совр. биол.*, **79**, 3—20.
14. Green A. A., McElroy W. D. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **20**, 170—176.
15. McElroy W. D. (1960) *Methods in Enzymology*, **6**, 445—448.
16. Nielsen R., Rasmussen H. (1968) *Acta chem. scand.*, **22**, 1757—1762.
17. Nielsen R., Rasmussen H. (1968) *Acta chem. scand.*, **22**, 1745—1757.
18. Travis J., McElroy W. D. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2170—2175.
19. Lee R. T., McElroy W. D. (1971 B) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **145**, 78—81.
20. Denburg J., McElroy W. D. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4619—4626.
21. Denburg J., McElroy W. D. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **141**, 668—672.
22. Denburg J., Lee R. T., McElroy W. D. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **134**, 381—394.
23. Gates B. J., De Luca M. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **169**, 616—621.
24. Turner D. C., Brand L. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3381—3394.
25. De Luca M. (1969) *Biochemistry*, **8**, 160—164.
26. Lundin A., There A. (1975) *Anal. Biochem.*, **66**, 47—63.
27. De Luca M., Wirtz G., McElroy W. D. (1964) *Biochemistry*, **3**, 935—939.
28. White E. H., McCapra F., Field G. F., McElroy W. D. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 2402—2406.
29. White E. H., McCapra F., Field G. F. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 337—342.
30. Suzuki N., Goto T. (1971) *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2021—2027.
31. Lee R., McElroy W. D. (1969) *Biochemistry*, **8**, 130—136.
32. McElroy W. D., Seliger H. H. (1961) in *Light and Life* (McElroy W. D., Glass B., eds.), pp. 219—254, Baltimore, Johns Hopkins Press.
33. McElroy W. D., Hastings J. W. (1956) in *Physiol. Triggers*, p. 80—84 (Prosser C. L., ed.), Ronald Press, N. Y.
34. Hopkins T. A. (1968) Ph. D. Thesis, John Hopkins University.
35. De Luca M., Brand L., Cebula Th. A., Seliger H. H., Makula A. F. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6702—6704.
36. De Luca M., Marsh M. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **121**, 233—240.
37. McElroy W. D., De Luca M. (1967) *J. Travis Science*, **157**, 150—160.
38. Rhee S. G., Greifner M. I., Check P. B. (1975) *Anal. Biochem.*, **66**, 259—264.
39. Seliger H. H., McElroy W. D. (1960A) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **88**, 136—138.
40. McElroy W. D., Seliger H. H. (1962) *Federat. Proc.*, **21**, 1006—1012.

41. White E. H., Rapaport E., Seliger H. H., Hopkins T. A. (1971) *Bioorgan. Chem.*, **1**, 92—98.
42. White B. W., Branchini B. R. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 1243—1245.
43. Secrist J. A., Barrio J. R., Leonard N. J. (1972) *Science*, **177**, 279—284.
44. Seliger H. H., McElroy W. D. (1965) in *Light: Physical and Biological Action*, pp. 168—205, N. Y., Acad. Press.
45. Rhodes W. C., McElroy W. D. (1958) *J. Biol. Chem.*, **233**, 1528—1535.
46. Strehler B. L., Totter J. R. (1954) in *Methods of Biochemical Analysis* (Click D., ed.), v. 1, pp. 341—356, N. Y.
47. McElroy W. D., Hastings J. W. (1958) in *Luminescence in Biological System*, pp. 161—183, N. Y.
48. Lee R. T., Denburg J., McElroy W. D. (1970) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **141**, 33—45.
49. Neufeld H. A., Towner R. D., Pace J. (1971) *Experientia*, **31**, 391—392.
50. Lemasters J. J., Heckenrock Ch. R. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1262—1270.
51. Goto T., Kubota I., Suzuki N., Kishi Y. (1974) in *Chemiluminescence and Bioluminescence*, pp. 325—335, N. Y., Plenum Press.

Поступила в редакцию
4.IV.1977

FIREFLY LUCIFERASE

BEREZIN I. V., BROVKO L. Yu., UGAROVA N. N.

*Department of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

Biochemical and physico-chemical properties of the firefly luciferase are reviewed. The methods for isolation and purification of this enzyme are described. The kinetic scheme of luciferase action was examined and the equations for the steady-state reaction rate were obtained. The experimental kinetic data available in the literature were treated in accordance with the proposed kinetic scheme. The applications of the enzyme for analytical purposes are discussed.
