

МЕТОДЫ И ПРИБОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Д.Г.Дерябин, И.Ф.Каримов

ГОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», 460018, Оренбург, пр. Победы 13
E-mail: dgderyabin@yandex.ru

Биолюминесценция – свечение живых организмов, возникающее в результате протекающих в них специфических биохимических реакций. Достаточно широко этот феномен представлен среди гаммапротеобактерий родов *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* и *Photorhabdus*, у которых биолюминесценция возникает в результате катализируемого ферментом (люциферазой) окисления восстановленного флавинонуклеотида до ФМН с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида до соответствующей жирной кислоты.

Практические аспекты использования люминесцирующих бактерий при исследовании живых систем определяются тремя основными моментами. Во-первых, биолюминесцентная система тесно сопряжена с основными энергетическими потоками в клетке, в результате чего жизнеспособность последней может быть интегрально оценена через характеристики свечения. Во-вторых, распространение технологии клонирования генов люминесценции (lux-генов) в широком круге патогенных и условно-патогенных бактерий стало основой для расширения сферы биолюминесцентного анализа в область инфектологии и иммунологии. В-третьих, современные методы детектирования излучений достигли чрезвычайно высокой скорости и чувствительности.

Использование рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* с клонированными lux-генами природных люминесцирующих бактерий легло в основу исследования биологических жидкостей человека и животных с акцентом на выявление присутствующих в них компонент-зависимой и КАМП-зависимой бактерицидных систем. При этом подобные технологии могут быть реализованы с использованием обычных однокюветных люминометров, а при значительном количестве анализируемых проб – их высокопроизводительных т.н. «планшетных» модификаций.

Тушение свечения бактериальных клеток-мишеней значимо и при оценке киллинговой активности фагоцитов. Одновременно различия в химической природе эмиттеров биолюминесценции (4a-гидроксилаваин) и характеризующей генерацию активных форм кислорода люминолзависимой хемиллюминесценции (3-аминофталат) с определяемыми этим различиями в спектрах световой эмиссии явились основой для разработки интегрального биохемиллюминесцентного метода, позволяющего на основе анализа свечения получать представление, как о степени активации фагоцитов, так и о выраженности развивающегося при этом бактерицидного эффекта. Для реализации метода разработан двухканальный биохемиллюминетр, конструкция которого обеспечивает регистрацию свечения в одной исследуемой пробе в двух диапазонах длин волн.

Наиболее сложной, но одновременно интегральной моделью, использующей явление биолюминесценции для исследования взаимодействия микроорганизмов с живыми системами, является воспроизведение экспериментальной инфекции с использованием несущих lux-гены патогенных бактерий и последующим прямым учетом свечения в органах и тканях инфицированных лабораторных животных. Реализация методов такого «биолюминесцентного имеджинга» оказывается возможной с использованием высокочувствительных датчиков на основе кристаллов кремния, позволяющих регистрировать низкоэнергетичные фотоны света с длиной волны 400-1000 нм. Созданные на их основе ССD-камеры (англ. – charged coupled device) размещаются в светонепроницаемых кабинетах и снабжаются прецизионными устройствами перемещения, что позволяет получать представления о двух- или даже трехмерном распределении свечения.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-04-13726-офи_ц)

METHODS & DEVICES FOR LIVE SYSTEMS RESEARCH WITH USE OF LUMINESCENT BACTERIA

D.G.Deryabin, I.F.Karimov

Orenburg State University, 460018, Russia, Orenburg, Pobedy av.13; E-mail: dgderyabin@yandex.ru

Methods of humoral and cellular immune response research, and also the infectious process which are carried out with use of luminescent bacteria are characterized. The equipment, specialized for performance of these researches is described.