

АННОТАЦИЯ

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

и их применение в экологическом мониторинге

(Учебное пособие)

Лавриненко В.А., Лавриненко И.А.

Учебное пособие подготовлено в рамках реализации *Программы развития государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет на 2009-2018 годы.*

Предлагаемое учебное пособие представляет собой обзор современных данных о создании методами генной инженерии цельноклеточных бактериальных биосенсоров и их использовании в экологическом мониторинге объектов окружающей среды. Целью данного учебного пособия является обсуждение дизайна, развития и аналитического применения генетически модифицированных цельноклеточных бактериальных биосенсоров. «Электродные» методы применения биосенсорики рассматриваться не будут, исключая примеры их сравнения с цельноклеточными биосенсорами.

Данное учебное пособие включает следующие главы:

I. Введение.

II. Репортерные гены и белки, используемые в биосенсорах

III. Неспецифические и индуцируемые стрессорными воздействиями биосенсорные системы для определения экотоксикантов.

A. Бактериальные цельноклеточные тест - системы, отвечающие на стресс.

B. Детекция генотоксинов и мутагенов.

IV. Специфические биосенсорные системы

V. Применение бактериальных биосенсоров для экологического мониторинга.

VI. Перспективы использования бактериальных биосенсоров.

VII. Литература.

Биосенсором называют измерительное устройство, которое состоит из чувствительного биологического компонента, распознающего химическое или физическое воздействие, и связанного с ним преобразователя, который генерирует сигнал в ответ на аналит. Современное определение биосенсора традиционно базируется на определении биосенсорного электрода, которое дал Кларк. В 1962 году он предположил, что ферменты можно сорбировать на электрохимических датчиках и такие «ферментные электроды» могут быть использованы для целей биологического тестирования. В дальнейшем границы определения биосенсора постепенно расширялись. Одним из стимулирующих поводов для развития биосенсорной технологии было стремление применить биосенсоры для медицины. Возможность анализа биологических препаратов, проб крови и лекарственных препаратов с помощью экспрессных и дешевых приемов способствовало внедрению биосенсоров. Примером может служить биосенсор для определения глюкозы в крови людей больных сахарным диабетом. Общественный интерес к медицинскому использованию биосенсоров возрос при осознании опасности загрязнения окружающей среды. Индустриализация и новые технологии сделали жизнь человека комфортной, но создали многочисленные экологические проблемы. Действительно, пестициды, тяжелые

металлы, отходы химической, фармакологической, пищевой, нефтяной, космической промышленности, в значительных количествах попадают в объекты окружающей среды, почву и водные источники, включаются в пищевые цепи, создавая угрозы для здоровья и жизни человека и животных. Действие ряда экотоксикантов связано с генотоксическими повреждениями генома, с возникновением и сохранением мутаций, возможно, с возникновением рака. Определенную роль в возникновении рака могут играть эпигенетические причины, связанные с дерепрессией или репрессией генов, модификацией оснований ДНК в области промоторов и включением «молчащих» генов в транскрипцию.

В настоящее время биосенсорная техника бурно развивается и использует как традиционные, так и развивающиеся направления (наночастицы, поверхностный плазмонный резонанс, волоконно-оптические, кондуктометрические, электрохимические, генно-инженерные методы) для совершенствования химического и биохимического анализа объектов окружающей среды. Следует отметить, что аналитические методы, применяемые для измерения уровня экотоксикантов (спектроскопические методы, нейтронно-активационный анализ, электрохимические методы, газовая хроматография, хроматография высокого давления, ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия) требуют дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала и не пригодны для полевого анализа. Не дают эти методы и прямой информации о биологической опасности экотоксикантов. Более того, химические и физико-химические методы имеют тенденцию переоценивать биодоступность ксенобиотиков, так как многие металлы и органические соединения находятся в окружающей среде в нерастворимой форме, а в таком состоянии они только потенциально опасны для здоровья человека. Совершенно очевидно, что ответ об опасности экотоксикантов для организма могут дать только биологические методы. Поэтому в последние годы целью многих исследований была разработка простых и адекватных методов для оценки токсического воздействия химических и физических факторов окружающей среды на организм. Так, в последние годы, наряду с биосенсорами электродных типов, широкое распространение получили цельноклеточные (whole-cell) биосенсоры. Они представляют собой живые клетки (микроорганизмов или высших организмов) и дают измеряемый продукт своей геномной деятельности в ответ на присутствие токсикантов. Среди биосенсоров данного типа, микробные цельноклеточные биосенсоры имеют многочисленные преимущества в экологическом тестировании. Культивирование микроорганизмов дешевле по сравнению с культурами клеток высших организмов. Они могут быть получены в больших количествах, подвергнуты более строгому контролю, чем клетки высших организмов, и легко хранятся. При этом, цельноклеточные биосенсоры обычно трансформированы рекомбинантными плазмидами и они имеют в составе этих плазмид промотор, отвечающий на воздействие экотоксикантом транскрипцией репортерного гена, находящегося под контролем этого промотора, и дают в результате трансляции репортерный белок, который легко измерить с помощью флуориметра, люминометра или цветной реакции. Оказалось, что цельноклеточные биосенсоры быстро отвечают на наличие в среде экотоксикантов и в этом качестве превосходят физико-химические методы анализа. Цельноклеточные биосенсоры могут успешно применяться для научных целей: при оценке изучения генетической экспрессии, при физиологических исследованиях на животных, растениях и человеке. Целью данного руководства является

необходимость обсудить дизайн и тенденции развития и аналитического применения генно-инженерных вариантов цельноклеточных бактериальных биосенсоров, которые созданы в последние годы. Преимущества использования цельноклеточных биосенсоров связаны с их высокой специфичностью, селективностью и экспрессностью. Новые возможности использования цельноклеточных биосенсоров связаны также с возможностью изучать процессы в клетке, которые были ранее недоступны для анализа. Принципиальной особенностью использования цельноклеточных биосенсоров является способность с их помощью оценить, не только биодоступность аналита, но и физиологическое значение получаемых данных. Генетически измененные цельноклеточные биосенсоры реагируют на наличие аналита путем индукции гена, связанного с чувствительным к аналиту промотором путем создания гибридного (фьюз) гена. Обычно такие гибридные гены существуют в генетически трансформированных бактериальных клетках в составе плазмид, которыми трансформируют клетки. Структурная часть генетической конструкции кодирует измеряемый аналитическим способом репортерный белок. Сливаемый со структурным геном промотор обычно представляет собой регуляторный компонент, селективный и индуцируемый аналитом.

Биодоступный аналит проходит через мембрану клетки и взаимодействует с промотором гена-репортера непосредственно или путем инактивации его репрессора. Индуцированный ген транскрибируется. Трансляция мРНК репортерного гена приводит к синтезу белка, который легко регистрируется. Транскрипционные конструкции, созданные путем слияния (fuse, фьюза) гена – репортера и промотора являются мощным орудием для изучения экспрессии бактериальных генов в природной среде обитания и для детекции определенных соединений в окружающей среде. Хотя транскрипционные конструкции, созданные для этой цели, часто оказываются достаточно слабо экспрессируемыми, и их индукция может происходить в течение длительного времени и экотоксикант может поступить к биосенсору в ограниченный промежуток времени, необходимость определять экспрессию гена– репортера, существует. Действительно, определение экотоксиканта может быть принципиально важно для понимания экологической обстановки в данном регионе.

Для того, чтобы синтез репортерного белка произошел, необходимо создать генно-инженерными методами плазмиду с клонированным в нее “геном-репортером” под управление промотора, который отвечает на исследуемый аналит. Несколько условий необходимо, чтобы использовать такую биосенсорную конструкцию. Во-первых, генетическая конструкция, отвечающая за синтез репортерного белка, должна быть относительно простой, во-вторых, специфичность чувствительного элемента (промотора) по отношению к аналиту - высокой, и, наконец, в клетке должны отсутствовать сходные протеины или субстраты, которые могут помешать определению данного репортерного белка. Обычно промоторы и энхансеры располагают в *cis*- положении по отношению к структурному целевому гену. Исследования на клеточных культурах и трансгенных животных позволили отобрать репортерные гены и транскрипционные элементы, ответственные за тканево-специфическую экспрессию генов, в частности тех, которые могут участвовать в ответе на заболевания. Было показано, что воздействие на некоторые гены необходимо для лечения наследственных, вирусных, бактериальных, восталительных, сердечно - сосудистых и раковых заболеваний. Была оценена также роль генов межклеточной коммуникации и их влияние на активность ряда генов у

микроорганизмов. Научные исследования позволили изучить *cis*-действующие структуры генома (энхансеры, промоторы). Работы на клеточных культурах и трансгенных животных и растениях позволило отобрать репортерные гены, ответственные за базальный и тканево-специфический уровень синтеза белков клетки. Идентификация некоторых репортерных генов (люциферазы светлячков и зеленого флуоресцирующего белка), которые могут использоваться как неинвазивные маркеры генетической экспрессии, позволяет в режиме реального времени (например, с помощью конфокальной спектроскопии) следить за экспрессией репортерных и регулирующих метаболизм клетки белков. Так, можно оценить влияние различных транскрипционных факторов и медиаторных механизмов клетки для лечения ряда заболеваний, включая рак, вирусные, воспалительные инфекции, сердечно-сосудистые заболевания.

Цельноклеточные биосенсоры и репортерные гены в настоящее время широко используются для обнаружения различных по химическому составу и структуре соединений. Так, например, имеются биосенсоры, с помощью которых можно оценить наличие в среде металлов. Можно определить целый ряд органических соединений, пестицидов, мутагенов, генотоксикантов. В последние годы репортерные широко используются в качестве тонкого молекулярно-биологического инструмента в фундаментальных и прикладных исследованиях в биологии, химии и медицине.

В результате работ последнего десятилетия были отобраны репортерные белки, наиболее удобные для регистрации. В настоящее время в биосенсорах используются восемь уникальных репортерных белков: зеленый флуоресцирующий белок (GFP) и его мутантные производные (например, CFP, YFP), β -галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, бактериальная люцифераза и люцифераза светлячков, акворин, уропорфириноген III метилтрансфераза, красный флуоресцирующий белок кораллов (DsRed).

Круг проблем, возникающий в связи с расширением ракетно-космической деятельности, обусловлен частотой пусков ракет космического назначения и типом запускаемых аппаратов. Наибольшую опасность для растительного и животного мира представляет падение первых ступеней ракет-носителей, в топливных магистралях которых находится достаточно большое количество топлива и окислителя. Основным веществом, используемым в качестве горючего в жидкостных ракетных двигателях ракет-носителей, является несимметричный диметилгидразин (1,1-ДМГ), относящийся к первому классу токсичности и обладающий общетоксическим и местно-раздражающим действием, а также проявляющий канцерогенные свойства. Однако сравнительно немного известно о мутагенном и генотоксическом эффекте 1,1-ДМГ, что может быть одним из ключевых звеньев действия КРТ на ДНК человека и животных. Особую опасность представляет накопление продуктов трансформации 1,1-ДМГ, таких как нитрозодиметиламин (НДМА), тетраметилтетразен (ТМТ), 1-метил-1Н-1,2,4-триазол, 1,2,4,5-тетразин, 2,3,5,6-тетрагидро-1,4-диметил и другие.

Интенсивная эксплуатация космодрома Байконур выдвигает в круг первоочередных задач необходимость разработки эффективных методов определения 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации в природных объектах для полевых и лабораторных условий. Актуальность этой задачи обусловлена тем, что на долю ракет, в которых используются токсичные компоненты топлив, приходится около 50% от общего числа запусков РН, а также сложностью экологической обстановки во многих эксплуатируемых районах

Казахстана и России. При регулярных пусках ракет на поверхности земли образуются зоны загрязнения, которые не совпадают с зонами падения отделяющихся частей ракет-носителей (ОЧРН) и значительно превышают их по площади.

Необходимо отметить, что физико-химические методы, существующие для измерения уровня гидразинов в организме человека и окружающей среде, а также позволяющие оценить мутагенный эффект этих соединений (*Ames* тест, *Mutatox* анализ, *umi*-тест, *rec-lac*-тест, *SOS*-хромотест, *Pro-tox* анализ) требуют дорогостоящего оборудования и не пригодны для рутинного анализа.

Применение токсичных жидких ракетных топлив вызывает необходимость всесторонних микробиологических исследований загрязненных почв, разработки микробных препаратов, утилизирующих 1,1-ДМГ и продукты его трансформации, изучения мутагенного действия на геном живой клетки. Кроме того, 1,1-ДМГ вступает в реакции комплексообразования с органическими соединениями, белками, ДНК и его определение затрудняется.

Постановка исследований по определению гидразина и продуктов его трансформации возможна только при разработке биологических методов определения компонентов ракетного топлива, обеспечивающих проведение эксперимента в лабораторных и полевых исследованиях.

Разработка метода оценки генотоксических и токсических свойств 1,1-диметилгидразина на основе специальной биосенсорной технологии с привлечением последних достижений генной инженерии и соответствующих аппаратных средств может найти широкое применение в экологических исследованиях. Одним из подходов в решении этой задачи может служить разработка применения рекомбинантных репортёрных генов, кодирующих биолюминесцентные белки.

В системе мониторинга окружающей среды особое место занимает контроль загрязнения почв. Как известно, разнообразие токсических веществ, поступающих в окружающую среду, значительно осложняет контроль загрязнения объектов. Хотя существующие методы физико-химического анализа позволяют надежно и с высокой точностью определять качественный и количественный состав целого ряда экотоксикантов, они не всегда могут оценить их биодоступность и опасность для живых организмов. Известно, что в почвенных экосистемах подвижность, биодоступность и, следовательно, токсичность химических соединений существенно зависит от форм их нахождения и типа связи с почвой. При этом в ряде случаев, анализ экотоксикантов осложнен необходимостью очистки экстрактов из почв перед инструментальным определением изучаемых компонентов, что является весьма трудоемким процессом, часто приводящим к ошибкам в результатах анализа. В этой связи, большое внимание уделяется экспрессным методам анализа, ориентированным на быстрый предварительный контроль опасного уровня загрязнения или превалирующего токсического эффекта. Поставленные задачи определения экотоксикантов могут быть достигнуты, прежде всего, путем сочетания физико-химических методов и современной биосенсорной технологии.

Многие ионы металлов играют важную роль во всех стадиях жизнедеятельности организма, некоторые ионы являются токсичными для клеток. К металлам, необходимым для функции клеток, следует отнести Na, K, Mg, Ca. Они присутствуют в клетках в высокой концентрации и участвуют в создании и поддержании химических градиентов и

мембранного потенциала. Ряд металлов, Mn, Zn, Fe, Co, Ni, Cu, имеют множество функций, которые простираются от стабилизации структуры рецепторов и ферментов, до участия в ферментативных и окислительно-восстановительных реакциях (в качестве кофакторов, переносчиков кислорода и электронов). Кадмий, мышьяк, ртуть, серебро, алюминий, не имеют определенной биологической функции, но часто замещают другие металлы в структуре ферментов и в метаболических путях, вызывая токсический эффект и гибель клеток. Отметим, что некоторые существенные для клетки металлы, например цинк и медь, при высоких концентрациях становятся токсичными для клеток. В случае некоторых тяжелых металлов, токсичность определяется способностью этих металлов образовывать комплексы внутри клеток с биомолекулами и структурами клеток и вызывать необратимые физиологические повреждения.

Как правило, ионы металлов попадают в клетку неспецифическим путем, в результате диффузии по осмотическому градиенту, создаваемому мембраной клетки. Однако ряд металлов входит в клетку более медленно, специфически, через определенные транспортные каналы и с затратой энергии АТФ. Чтобы выжить в окружающей среде, микроорганизмы выработали механизмы устойчивости к токсическому воздействию металлов. Так, может происходить связывание металлов в цитоплазме клетки с белками - металлотионеинами, связывание ионов металлов на внешней стороне мембраны клетки, восстановление ионов металлов, чтобы привести их в менее токсичную форму, активный транспорт ионов металлов из клетки. Как известно, возможно модифицировать ионы металлов, чтобы перевести их в нерастворимую или менее токсичную форму.

Механизмы устойчивости микроорганизмов к действию металлов определяются оперонами, присутствующими на плазидах, транспозонах или хромосоме клетки. Во многих случаях, такие опероны кодируют ферменты, обеспечивающие устойчивость к близким по биохимическому характеру действия металлам. Попадание ионов металлов в клетки индуцирует синтез ферментов, необходимых для обеспечения резистентности клеток к токсическому действию. Основываясь на существовании механизмов резистентности, были разработаны многочисленные специфические тест-системы для оценки содержания ионов в окружающей клетке среде, например, ртути, хрома, кадмия, меди, алюминия, сурьмы, никеля, мышьяка.

Органические соединения являются главными источниками загрязнения окружающей среды и они стали основной мишенью для развития цельноклеточных биосенсоров. Многие бактериальные виды способны использовать органические соединения, как источник углерода. Следовательно, эти микроорганизмы имеют ферментные системы, позволяющие метаболизировать органические соединения.и они в настоящее время используются для ликвидации последствий загрязнения окружающей среды нефтью и другими углеводородами. Биодоступность экотоксикантов, чувствительность и селективность разрабатываемых тест-систем, механизмы регуляции активности и экспрессии, необходимых для деструкции экотоксикантов ферментов, являются основой разрабатываемых тест-систем. Такие системы должны включать промотор, из системы ферментов, регулирующей расщепление органики, и репортерный белок. Созданные для этих целей клеточные биосенсоры оказались экспрессными и приобрели широкую популярность.

Цельноклеточные бактериальные генетически измененные биосенсоры, представляют собой экспрессное, недорогое и чувствительное средство для изучения

экологической обстановки окружающей среды. Современные тест-системы позволяют проводить определение обычно без экстракции ферментов и репортерных белков из клетки, что дает весомые преимущества для работы в полевых условиях на «живой» системе. В настоящее время применение цельноклеточных биосенсоров расширяется в не только в области биотехнологии, но и в медицине при диагностике, фармакологии, пищевой и химической промышленности, в научных исследованиях при изучении регуляции транскрипции генов, в функциональной геномике, микробной экологии *in situ*. С помощью цельноклеточных биосенсоров можно оценить токсичность металлов, общую токсичность и генотоксичность, мутагенный и канцерогенный потенциал антибиотиков, многих лекарственных и вновь синтезируемых органических и неорганических соединений. Можно изучать метаболизм целых организмов и микроорганизмов, судьбу препаратов, применяемых для защиты растений от вредителей, пестицидов и фунгицидов. Модификации промоторов микроорганизмов и другие генетические манипуляции, позволяют увеличить чувствительность определения аналитов. Хотя следует отметить, что применение природных, не модифицированных промоторов, позволяет оценить воздействие экотоксикантов наиболее адекватно.

Несомненно, применение биосенсоров в научных исследованиях также расширяется в связи с возможностью их использования при изучении мутагенеза, генотоксического действия пестицидов, металлов, органических соединений, маркеров вирусной инфекции и канцерогенеза. Применение в биосенсорах флуоресцирующих репортерных белков (GFP и его вариантов с уникальными флуоресцирующими свойствами, люциферазы, галактозидазы) позволило их использовать в цитологии, цитохимии, как мультиокрашивающие красители, в исследованиях на животных и растениях *in situ*, изучать введение генов репортерных белков в геном высших животных. Кроме того, использование цельноклеточных биосенсоров позволило расширить сферу применения средств регистрации сигналов из клетки с помощью приборных методов: световолоконной оптики, поверхностного плазмонного резонанса, кондуктометрии, различных сред (гели, пленки). Появились возможности сорбции клеток на поверхности сенсоров волоконно-оптического характера, пленках, гелях, пористых стеклянных шариков, диализных мембранах, что позволяет повысить точность определения аналита. Появление рынка биосенсоров в России, связанное с производством недорогих тест-систем, позволит использовать такие цельноклеточные биосенсоры в экологическом мониторинге более широко. Изучение индукции различных ферментных систем пестицидами, компонентами ракетного топлива, продуктами химической, пищевой и фармацевтической промышленности, позволит в ближайшее время применять микроорганизмы не только для определения экотоксикантов, но и для биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды.

Таким образом, цельноклеточные бактериальные биосенсоры, появившиеся в последние десятилетия, являются перспективным средством для определения экотоксикантов в объектах окружающей среды:

1. Биосенсоры позволяют определять только биодоступные для живой клетки компоненты, давая объективный ответ о токсической или мутагенной опасности экотоксикантов. Это позволяет наметить меры для биоремедиации окружающей среды. Если аналит биодоступен, он потенциально биодegradуем.

2. Биосенсоры дают в руки экологов и других исследователей экспрессное, дешевое и доступное средство предварительной оценки действия экотоксикантов на живую клетку.

3. Использование генетически измененных микроорганизмов, способных существовать в окружающей среде и подвергать экотоксиканты деградации, дает экологам перспективы оценки отдаленных последствий воздействия антропогенного фактора на организм человека и животных.

3. Биосенсоры дают возможность оценить канцерогенный потенциал пестицидов, антибиотиков и химических соединений на живой организм.

4. Биосенсоры представляют собой средство научного изучения транскрипционной регуляции различных ферментных систем, участвующих в ответе на экотоксиканты.

Данное учебное пособие рассчитано на студентов-бакалавров, магистрантов, аспирантов и преподавателей, повышающих квалификацию на химических и биологических кафедрах. Рекомендовано в качестве пособия для спецкурса кафедры химии окружающей среды ФЕН «Экологическая микробиология».