

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ЭМИССИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ШТАММОВ МОРСКИХ ФОТОБАКТЕРИЙ

Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Исмаилов А.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, РФ; e-mail: anvaris@list.ru  
Поступила в редакцию: 20.07.2020

**Аннотация.** Установлено, что низкотемпературные светящиеся бактерии, обладают специфическими эмиссионными и спектральными характеристиками. *In vivo* все выделенные штаммы продуцируют интенсивную биолюминесценцию (до  $10^5$  квант/с.кл) с максимумами свечения около 478-480 нм со плечами при 500-510 и 530-540 нм. Проведено разложение спектров при разных температурах. Суммарный спектр хорошо разлагается на 3 составляющие, соответствующие люциферазному, BFP и YFP эмиттерам. Проведен анализ температурной зависимости биолюминесценции клеток при длинах волн, соответствующих максимумам эмиссии компонентов в диапазоне активации (4-20<sup>0</sup>С) и спада (22-32<sup>0</sup>С) биолюминесценции интерпретируется присутствием в низкотемпературных видах бактериях вспомогательных эмиттеров, которые в комплексе с люциферазой участвуют в процессе биолюминесценции.

**Ключевые слова:** фотобактерии, биолюминесценция, *Photobacterium phosphoreum*.

Основные данные по спектрам биолюминесценции получены на бактериях групп *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, в меньшей степени исследованы бактерии группы *Photobacterium*. Фотобактерии мезофильных штаммах *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* излучают свет с максимумом при ~495 нм. В роли эмиттера функционирует связанный на люциферазе 4а-гидроксифлавин. Бактерии группы *P. phosphoreum* и штамм *Vibrio fischeri* Y1 излучают нестандартную биолюминесценцию из-за участия в эмиссионном процессе эмиссии света дополнительных эмиттеров. Спектр биолюминесценции бактерий группы *P. phosphoreum* голубоватый, с максимумом 476-480 нм, у бактерий *Vibrio fischeri* Y1 желтое свечение с максимумом при 530-540 нм. Установлено, что бактерии *P. phosphoreum* продуцируют, т.н. голубой флуоресцентный белок (BFP) который ассоциируясь с люциферазой меняет длину волны излучения с «люциферазной», на более коротковолновую, – 476-480 нм [1, 2]. Эмиссионным хромофором BFP является 6,7-диметил-8-(рибитил)люмазин. Показано, что бактерии *V. fischeri* Y1, содержат другой флуоресцентный белок – YFP, вызывающий сдвиг свечения в длинноволновую область. Флуорофором функционирует связанный на белке FMN. В спектре биолюминесценции проявляются две полосы, первый при 490 нм. – эмиссия люциферазы, второй при 540 нм, – эмиссия YFP [3]. Также установлено [4], что *P. phosphoreum* str. bmFP, выделенный из донных отложений на глубине 500 м, продуцирует димерный белок, испускающий бимодальную (488 и 517 нм) флуоресценцию, который способен ассоциироваться с люциферазой.

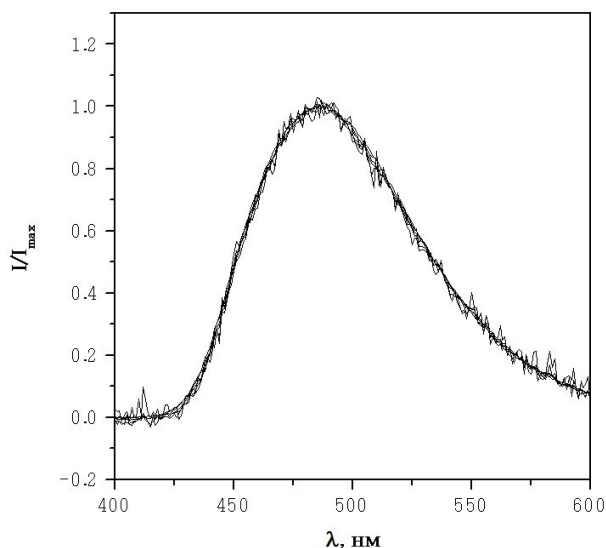
Установлено [5], что психрофильные бактерии, выделенные из рыб арктических морей при низкой температуре *in vivo* продуцируют интенсивную биолюминесценцию с максимумами излучения около 478-480 нм со слабо выраженными плечами при 500-510 и 530-540 нм. Сложную картину спектра биолюминесценции можно обосновать присутствием в данных бактериях различных вспомогательных белков, которые в комплексе с люциферазой участвуют в процессе биолюминесценции. Очевидно, что при соизмеримой эмиссионной активности, все хромопротеины должны проявляться в спектрах свечения. Удельная биолюминесцентная активность выделенных психрофильных штаммов на полтора-два порядка выше, чем у мезофильных. При высокой интенсивности эмиссии клеток анализ спектров биолюминесценции возможен при низких температурах, позволяющих получить более выраженную картину спектра.

Целью данной работы был анализ спектрального распределения биолюминесценции *in vivo* при разных температурах и анализ спектров флуоресценции бесклеточного экстракта и белковой фракции симбиотических низкотемпературных фотобактерий, выделенных из рыб арктических морей.

На рисунке 1 представлен типичный спектр биолюминесценции интактных клеток бактерий одного из изолированных штаммов фотобактерий. Спектр свечения имеет неявно выраженный максимум при 478 нм, с широкой полосой близких значений интенсивности эмиссии в диапазоне 470-510 нм.

Исходя из того, что бактерии относятся к группе *P. phosphoreum*, которые содержат кроме люциферазы и дополнительные эмиттерные белки, можно было полагать, что эмиссионный максимум сформирован как суперпозиция двух компонентов (флавинового и люмазинового) с близкими полосами эмиссии, 495 и 476 нм, соответственно. Предположительно плечо при 530 нм может указывать присутствию дополнительного эмиттера сходного с YFP бактерий *V. fischeri* Y-1. В пользу такого предположения говорит тот факт, что эти бактерии, с желто-зеленой биолюминесценцией, содержат белок, аналогичный BFP, который обеспечивает голубое свечение бактерий *P. phosphoreum*.

Нижеследующие эксперименты проведены исходя из предположения, что эмиссионная активность основного (люциферазного) и вспомогательных (люмазинового и YFP) эмиттеров может различаться по



**Рисунок 1.** Спектр биолюминесценции изолированных клеток *P.phosphoreum* в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,5 + 2% NaCl, 4°C

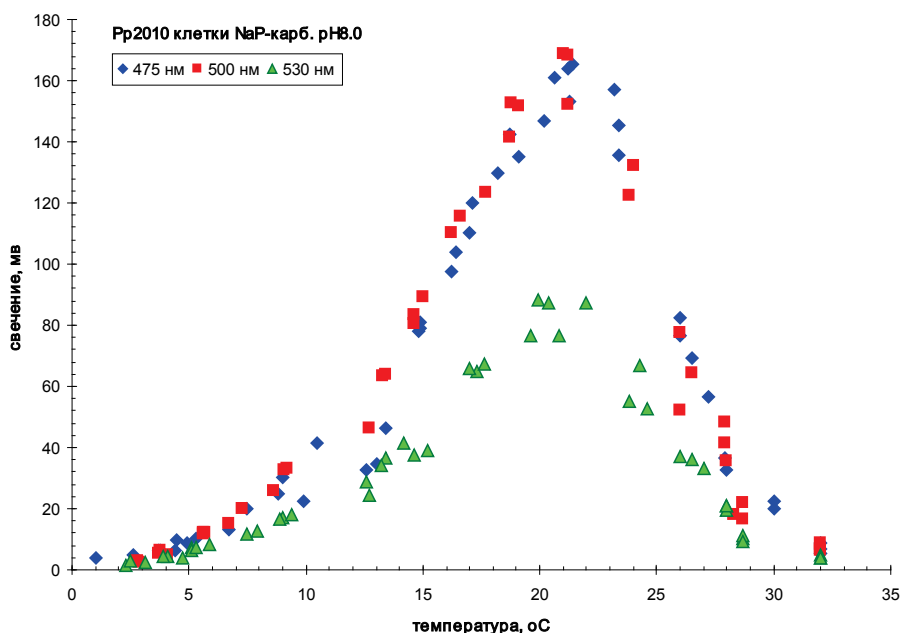
температурной зависимости. Соответственно, был проведен анализ температурной зависимости биолюминесценции при трех длинах волн, соответствующих максимумам эмиссии этих компонентов в диапазоне активации (4-20°C) и спада (22-32°C) биолюминесценции:

На рисунке 2 представлена температурная зависимость биолюминесцентной активности интактных клеток при трех длинах волн: 475, 500 и 530 нм. Установлено, что в данных условиях неявно выраженный максимум свечения для всех выбранных длин волн находится при ~20°C.

Выявлено, что температура отражается на всех спектральных характеристиках: положении максимума, ширине базовой линии, амплитуде ответа. Основываясь на различиях в этих параметрах, можно предполагать, что выделенные штаммы психрофильных фотобактерий содержат ассоциированные с люциферазой вторичные эмиттерные белки, способные изменять спектр биолюминесценции.

Проведен кинетический анализ температурной зависимости. Кинетические константы оценивались в двух диапазонах: активационном (2-20°C) и затухающем (22-32°C). В области нарастания интенсивности эмиссии (4-20°C) изменения при длинах волн 480 и 495 нм протекают с близкими константами скорости реакции (псевдопервого) порядка, но отличается от константы скорости реакции для 530 нм. В области затухания люминесценции в области 20-32°C кинетические зависимости для 480 и 495 нм меняются с близкими константами, но существенно отличаются от константы при 530 нм.

Проведено теоретическое разложение спектров (рис. 3). Суммарный спектр хорошо разлагается на 3 составляющие, соответствующие люциферазному, BFP и YFP эмиттерам.



**Рисунок 2.** Температурная зависимость эмиссии интактных клеток при трех (475, 500, 530 нм) длинах волн. Среда измерения: 0,1 М Na- фосфатный буфер, 2% NaCl, pH 7,5

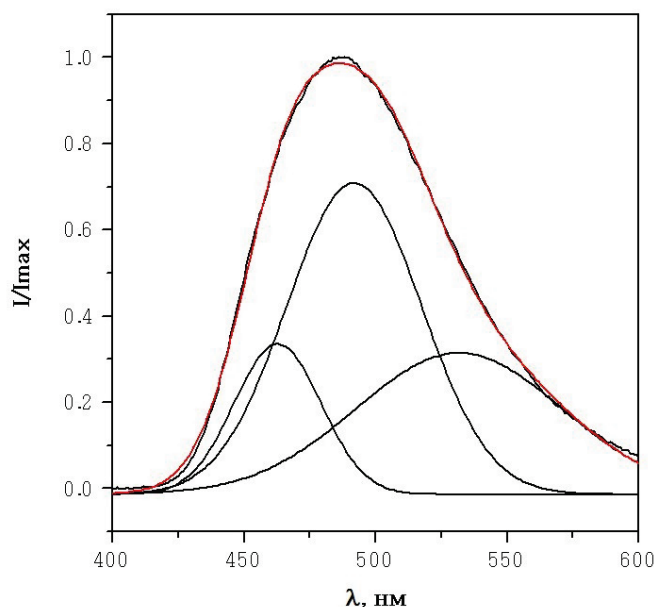


Рисунок 3. Спектры фотобактерий

Подтверждение наличия у бактерий вспомогательных эмиттеров вытекает из спектров флуоресценции бесклеточного экстракта и 30-80% белковой фракции из этих бактерий.

На рисунок 4 представлены спектры возбуждения и эмиссии компонентов бесклеточного экстракта фотобактерий.

При возбуждении с длиной волны 460 нм наблюдается одна широкая полоса эмиссии с максимумом около 540 нм. Можно полагать, что основной вклад во флуоресценцию в этой области вносит свободный флаavin. При возбуждении 380 нм в спектрах эмиссии проявляются два пика около 450 и 510 нм с плечом при 530 нм. Необходимо отметить, что в экстракте бактерий *V. fischeri* Y-1 также отмечена эмиссия с максимумом 540 нм при возбуждении с длиной волны 400 нм, которая может соответствовать желтому флуоресцирующему белку YFP. Спектры возбуждения флуоресценции для эмиссии при 460 нм проявляет полосы с максимумами при 350 нм и плечами при 360 и 380 нм. Для эмиссии при 530 нм спектр возбуждения имеет доминантный пик при 470 нм и дополнительный при 455 нм. Для исключения вклада свободных флуоресцентных компонентов проведен спектральный анализ на суммарной фракции белков, – 30-80% сульфат аммония. При возбуждении с длиной волны 390 нм в белковой фракции проявляются три полосы эмиссии с максимумами 480, 520, 580 нм. Можно полагать, что эти флуоресцирующие компоненты могут, ассоциируясь с основным эмиттером – люциферазой, вовлекаться в эмиссионный процесс. Спектральная картина возбуждения и эмиссии бесклеточного экстракта и

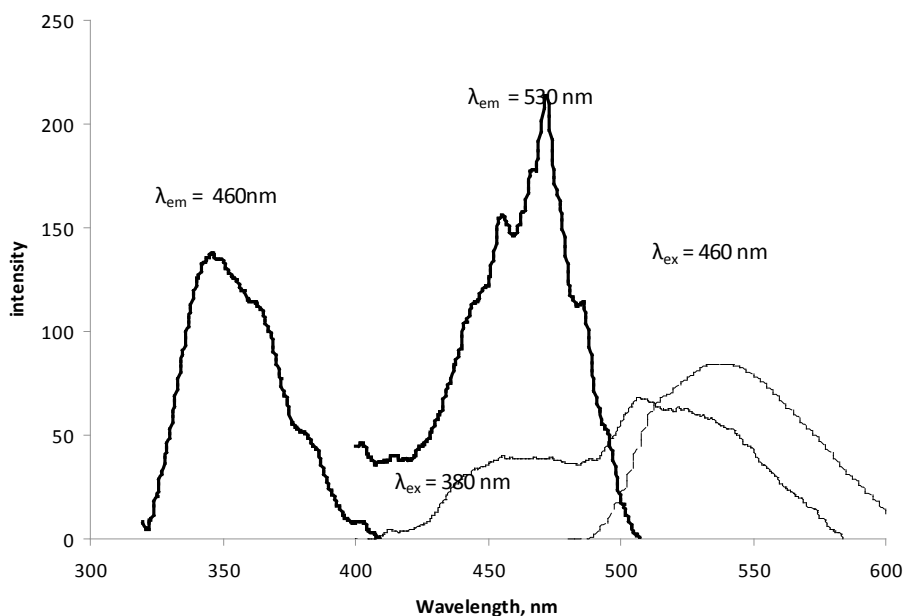


Рисунок 4. Спектры возбуждения и эмиссии бесклеточного экстракта бактерий *P. phosphoreum* в 50 мМ фосфатном буфере + 2% NaCl, pH 7,5 при 20°C

белковой фракции по некоторым полосам сходна с бимодальным спектром белков у ранее описанного штамма бактерий *P. phosphoreum*, и частично со спектром бесклеточного экстракта бактерий *V. fischeri* Y-1.

Таким образом, в результате проведенного спектрального и кинетического анализа получены данные, свидетельствующие, что голубоватая биолюминесценция низкотемпературных фотобактерий группы *P. phosphoreum* из арктических морей может быть сформирована с участием как минимум двух (люциферазного и люмазинового) эмиттеров.

**Список литературы / References:**

1. Wilson Th., Hastings W. Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Development Biology*, 1998, vol. 14, pp. 197-230.
2. Eckstein J., Cho K., Colepicolo P., Ghisla S., Hastings J., Wilson T. A time-dependent bacterial bioluminescence emission spectrum in an in vitro single turnover system: Energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y1. *PNAS*, 1990, vol. 87, no. 4, pp. 1466-1470.
3. Karatani H., Wilson T., Hastings J. A blue fluorescent protein from a yellow-emitting luminous bacterium. *Photochemistry and photobiology*, 1992, vol. 55, no. 2, pp. 293-299.
4. Karatani H., Konaka T., Katsukawa Ch. Properties of the bimodal fluorescent protein produced by *Photobacterium phosphoreum*. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 71, no. 2, pp. 230-236.
5. Kuts V.V., Ismailov A.D. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology-(Russia)*, 2009, vol. 78, no. 5, pp. 554-558.

**SPECIFIC SPECTRAL AND EMISSION CHARACTERISTICS OF LOW-TEMPERATURE STRAINS OF MARINE PHOTOBACTERIA**

**Aleskerova L.E., Alenina K.A., Ismailov A.D.**

Moscow State University

Moscow, Leninskie Gory, 1, bldg. 12, e-mail: anvaris@list.ru

**Abstract.** It has been established that low-temperature luminous bacteria have specific emission and spectral characteristics. In vivo, all isolated strains produce intense bioluminescence (up to 105 quant/s. per cell) with luminescence maxima of about 478-480 nm with shoulders at 500-510 and 530-540 nm. The spectra were decomposed at different temperatures. The total spectrum is well decomposed into 3 components corresponding to luciferase, BFP and YFP emitters. The analysis of the temperature dependence of cell bioluminescence at wavelengths corresponding to the emission maxima of these components in the range of activation (4-20°C) and decay (22-32°C). The bioluminescence spectrum is interpreted by the presence in low-temperature photobacteria species the auxiliary emitters, which, in combination with luciferase, participate in the bioluminescence process.

**Key words:** photobacteria, *bioluminescence*, *Photobacterium phosphoreum*.