

Высококчувствительный микроанализ на основе искусственной люциферазы NLuc для диагностики социально значимых заболеваний

Франк Л.А.*, Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Кудрявцев Н.А., Панамарев Н.С.

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

* lfrank@yandex.ru

Ключевые слова: люцифераза NLuc; биолюминесцентный микроанализ

Люцифераза NanoLuc – искусственный фермент, полученный в результате мутагенеза каталитической субъединицы целентеразин-зависимой люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. Малый молекулярный вес (19 кДа), уникально яркая биолюминесценция, длительная кинетика сигнала ($t_{1/2} = 2.5$ ч) и высокая термостабильность определили перспективность использования этого белка в качестве репортера в различных аналитических системах [1]. Биоспецифические соединения NanoLuc получают с помощью генетического фьюзинга, поскольку, как и другие люциферазы, фермент теряет активность при химическом конъюгировании. Это существенно ограничивает разнообразие биолюминесцентных репортеров на основе NanoLuc. Целью данного исследования было разработать способ получения сайт-специфичных высокоактивных конъюгатов этого фермента с разнообразными молекулами и тестировать полученные конъюгаты в молекулярном микроанализе ряда диагностически важных мишеней.

Методами генетической инженерии разработан дизайн и сконструирована плазида, содержащая ген кодирующий вариант люциферазы NanoLuc(C164S)-LCTPSR (NLuc) с уникальным остатком цистеина на С-конце. Соответствующий белок получен бактериальным синтезом, очищен хроматографически и изучены его свойства. Показано, что по характеристикам биолюминесценции и стабильности полученный белок не отличается от исходной люциферазы NanoLuc. Обнаружено, что биолюминесцентный сигнал NLuc инициируется различными субстратами – фуримазином (производное целентеразина), целентеразином, и их стабильными водорастворимыми комплексами с Ca^{2+} -зависимым целентеразин-связывающим белком *Renilla* [2]. Разработан способ синтеза конъюгатов модифицированной люциферазы с различными соединениями – биотином, антителами, олигонуклеотидами и показаны их преимущества как репортеров в высококчувствительном микроанализе на основе аналогичных производных Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина [3].

Конъюгаты с антителом против кардиального тропонина I, а также с ДНК-аптамером к кардиальному белку, связывающему жирные кислоты (кБСЖК) были испытаны как репортеры в микроанализе соответствующих кардиомаркеров в модельных образцах сыворотки человека. Показана линейная зависимость сигнала в диагностически важном диапазоне концентрации мишеней с пределом обнаружения 5.4 и 1.2 нг/мл для кБСЖК и тропонина I соответственно.

Конъюгаты люциферазы с поликлональными антителами мыши против онкомаркера сурвивина были испытаны в анализе этого белка в модельных и клинических образцах мочи, и полученные результаты удовлетворительно совпадали с таковыми коммерческого колориметрического набора для ИФА ($r = 0,814, p < 0,0001$).

Разработан твердофазный биолюминесцентный микроанализ онкомаркера МІА (белок с меланома-ингибирующей активностью) на основе полученных нами ДНК-аптамеров и люциферазы NLuc. Получены успешные результаты тестирования способа на примере модельных стандартных и контрольных сыворотках человека.

Получены конъюгаты миниантител мыши к вирусу клещевого энцефалита с фрагментами NLuc, способными к комплементации с восстановлением биолюминесцентной активности. Показана принципиальная возможность обнаружения ВКЭ в модельных образцах и экстрактах клещей с помощью однофазного биолюминесцентного анализа.

Разработанный вариант люциферазы NLuc обладает свойствами, близкими таковым интактной люциферазы NanoLuc и не теряет биолюминесцентную активность при химическом конъюгировании с различными биоспецифическими молекулами. Полученные на ее основе конъюгаты тестированы в молекулярном микроанализе ряда диагностически важных мишеней (кардиальных и онкомаркеров, а также корпускулярного антигена) и показана перспективность их использования для разработки тест-систем на их основе.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках ГЗ Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2022-0002).

Highly sensitive microassay based on artificial luciferase NLuc for the diagnosis of socially significant diseases

Frank L.A.*, Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Kudryavtsev N.A., Panamarev N.S.

Institute of Biophysics, FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia

* lf Frank@yandex.ru

Key words: NLuc luciferase; bioluminescence microassay

NanoLuc luciferase is an artificial enzyme obtained by mutagenesis of the catalytic subunit of coelenterazine-dependent luciferase from the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris*. Low molecular weight (19 kDa), uniquely bright bioluminescence, long signal kinetics ($t_{1/2} = 2.5$ h) and high thermal stability determined the prospects for using this protein as a reporter in various analytical systems [1]. NanoLuc biospecific compounds are obtained with the use of genetic fusing, since, like other luciferases, the enzyme loses activity upon chemical conjugation. This significantly limits the diversity of NanoLuc-based bioluminescent reporters. The goal of this study was to develop a method for producing site-specific, highly active conjugates of this enzyme with a variety of molecules and to test the resulting conjugates as labels in molecular microanalysis of diagnostically important targets.

Using genetic engineering methods, a plasmid was constructed containing the gene encoding the luciferase variant NanoLuc(C164S)-LCTPSR (NLuc) with a unique cysteine residue at the C-terminus. The corresponding protein was obtained by bacterial

synthesis, purified by chromatography, and its properties were studied. According to the characteristics of bioluminescence and stability, the resulting protein does not differ from intact NanoLuc. It was found that the bioluminescent signal of NLuc is initiated by various substrates – furimazine (a coelenterazine derivative), coelenterazine, and their stable water-soluble complexes with the Ca^{2+} -dependent coelenterazine-binding protein *Renilla* [2]. A method was developed for the synthesis of modified luciferase conjugates with various compounds – biotin, antibodies, oligonucleotides – and their advantages as reporters in highly sensitive microassay compared to the similar derivatives of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin was demonstrated [3].

Conjugates with an antibody against the cardiac biomarker troponin I, as well as with a DNA aptamer against heart fatty acid binding protein (hFABP) were tested as reporters in microassays of relevant cardiac markers in model human serum samples. A linear dependence of the signal is shown in the diagnostically important range of target concentrations with a detection limit of 5.4 and 1.2 ng/mL for hFABP and troponin I respectively.

Luciferase conjugates with mouse polyclonal antibodies against the tumor marker survivin were tested in the analysis of this protein in model and clinical urine samples, and the results obtained satisfactorily coincided with those of a commercial colorimetric ELISA kit ($r = 0.814$, $p < 0.0001$).

A solid-phase bioluminescent microassay for the tumor marker MIA (a protein with melanoma-inhibitory activity) has been developed based on our unique anti-MIA DNA aptamers and NLuc luciferase. Successful results of testing the method were obtained using model standard and control human sera.

Conjugates of mouse mini-antibodies to tick-borne encephalitis virus (TBEV) with NLuc fragments capable of complementation with restoration of bioluminescent activity were obtained. The possibility of detecting TBEV in model samples and tick extracts using single-phase bioluminescence analysis has been demonstrated.

The developed version of NLuc luciferase has properties similar to intact NanoLuc and does not lose bioluminescent activity when chemically conjugated with various biospecific molecules. The conjugates obtained on its basis were tested in molecular microassay of a number of diagnostically important targets (cardiac and tumor markers, as well as corpuscular antigen) and showed good prospects of their use for the development of test systems based on them.

Funding: The study was funded by State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (projects No. FWES-2022-0002).

Список литературы/References

1. Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Frank L.A. Coelenterazine-dependent luciferases as a powerful analytical tool for research and biomedical applications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7465
2. Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Efremov M.K. et al. Ca^{2+} -Triggered coelenterazine-binding protein *Renilla*: expected and unexpected features. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2144. doi 10.3390/ijms24032144. 4
3. Krasitskaya V.V., Efremov M.K., Frank L.A. Luciferase NLuc site-specific conjugation to generate reporters for in vitro assays. *Bioconjug Chem.* 2023;34(7):1282-1289. doi 10.1021/acs.bioconjchem.3c00165