

## Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

### Исследование свойств флуоресцентного АТР-индикатора АTeam in vitro Столярова Анастасия Валерьевна

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: taisniqm@gmail.com

АТР выполняет роль универсальной энергетической валюты клетки, участвующей в различных процессах как внутри, так и вне ее. Для изучения подобных процессов требуется метод, позволяющий определять концентрацию АТР в отдельных клетках и их компартментах без их разрушения.

Не так давно был разработан генетически кодируемый индикатор АTeam, основанный на резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET) [1]. АTeam состоит из СFP и YFP, между которыми заключен небольшой АТР-связывающий белок. При связывании АТР этот белок переходит из открытой конформации в компактную, обеспечивая резонансный перенос энергии. К сожалению, на данный момент характеристики зонда изучены мало, что позволяет использовать его только на качественном уровне.

Целью нашей работы было детально охарактеризовать зонд, чтобы его можно было применять для количественных измерений in vivo. Кроме того, мы изучили возможность использования АTeam как метода измерения процессов синтеза и гидролиза АТР in vitro. Дело в том, что существующие методы измерения концентрации АТР (люциферин-люциферазный метод, детекция неорганического фосфата, сопряженные АТР-регенерирующие системы) имеют ряд недостатков.

Зонд АTeam был экспрессирован в *Escherichia coli*, выделен и очищен. Мы изучили влияние концентрации белка на его ответ на изменение уровня АТР и нашли оптимальное для измерений соотношение сигнал/шум. Была определена кажущаяся константа диссоциации АТР и влияние на нее различных факторов, таких как изменения температуры и присутствие ионов  $Mg^{2+}$  или фосфата, которые участвуют в процессах синтеза и гидролиза АТР. Мы также определили специфичность зонда и его сродство к нуклеотидам, отличным от АТР, в том числе ADP. Кроме того, было выяснено, что используемый рН-буфер оказывает влияние на характеристики зонда.

Была также охарактеризована скорость изменения сигнала зонда в ответ на добавку АТР. Время ответа зонда оказалось меньше, чем время перемешивания пробы (10 с.). Таким образом, зонд АTeam можно использовать для визуализации различных процессов, в которые вовлечен АТР, в секундной шкале времени in vitro.

### Литература

- 1 Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:15651–15656.