

Применение флуоресцентного зонда АTeam для измерения скорости синтеза и гидролиза АТФ *in vitro*.

Научный руководитель – Лапашина Анна Сергеевна

Третьяков Данила Олегович

Студент (специалист)

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

E-mail: tretjakov3927@gmail.com

В большое количество процессов в живой клетке тем или иным способом вовлечен АТФ. Однако существующие на сегодняшний день методы измерения концентрации АТФ *in vitro* имеют ряд ограничений в использовании. Ни один из них не позволяет в реальном времени наблюдать за изменением концентрации АТФ в условиях, приближенных к физиологическим (в присутствии АДФ и нескольких мМ неорганического фосфата).

Целью данной работы являлась постановка метода количественного измерения концентрации АТФ *in vitro* в режиме реального времени. Для этого использовали гибридный белковый зонд из семейства АTeam, который представляет собой субъединицу ϵ АТФ-синтазы *Bacillus subtilis*, к которой с двух сторон присоединены флуоресцентные белки, способные к Фёрстеровскому резонансному переносу энергии (FRET) между собой. Обратимое связывание АТФ субъединицей ϵ приводит к конформационным изменениям, в результате которых донорный и акцепторный белки сближаются и эффективность FRET растет [1].

Разработанный нами метод позволяет достаточно точно измерять концентрацию АТФ в динамическом диапазоне одного порядка величины: варьируя вид зонда и температуру, можно следить за изменениями концентрации АТФ в интервале от 1 мкМ до 10 мМ. Зонд почти не чувствителен к наличию в среде измерения АДФ и фосфата и изменению рН в интервале от 7 до 9, что позволяет приблизиться к физиологическим условиям. Новый метод был успешно использован для измерения АТФазной и гексокиназной активности. Результаты измерений были подтверждены классическими методами. Это дает много новых возможностей для измерения кинетики реакций синтеза и гидролиза АТФ.

Источники и литература

- 1) Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, 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.