

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ОТРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФАГОВОГО ДИПЛЕЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ К АМПИЦИЛЛИНУ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422_группы
направления (специальности) 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Хомяковой Анастасии Андреевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

А.М. Петерсон

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор

С.А. Степанов

Научный консультант:

вед.н.с. ИБФРМ РАН,

д. б. н., профессор

О.И. Гулий

Саратов 2021

Введение. Антибактериальные препараты широко распространены на фармацевтическом рынке. Антибиотики активно используются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании и транспортировке, а также для усиления роста животных при добавлении их в корм в субтерапевтических концентрациях. В связи с этим актуальным является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в жидкостях организма человека и животных, продуктах питания, питьевой воде, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Одним из наиболее перспективных подходов для экспресс-анализа антибактериальных препаратов являются биосенсорные системы, состоящие из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы детекции [1].

Важным моментом при развитии биосенсоров является подбор сенсорного элемента. Перспективами обладает фаговый дисплей, направленный на получение и наработку антител к определяемым антигенам. Антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, обладают рядом преимуществ для применения в качестве сенсорного элемента биологических датчиков.

Таким образом, актуальность данной темы объясняется необходимостью подбора чувствительного элемента, который будет использован в биосенсорах для быстрого обнаружения и контроля антибиотиков в водных объектах.

Целью данного исследования являлась отработка технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к ампициллину. В соответствии с данными на 2018 г. данная группа антибиотиков занимают 2-е место по объему продаж среди всех антибиотиков [2].

Для реализации поставленной цели в ходе работы были поставлены и решались следующие задачи:

1. Подготовка теоретической и экспериментальной базы для работы с комбинаторной фаговой библиотекой.
2. Отработка методики получения в препаративных количествах фаговых антител, специфичных к ампициллину.
3. Определение титра фаговых антител.
4. Анализ специфичности полученных фаговых антител в отношении к ампициллину и другим антибактериальным препаратам.
5. Оценка возможности неспецифичного взаимодействия ампицилиновых фаговых антител с L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

В работе были использованы бактерии *Escherichia coli* XL-1 Blue, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия). Экспериментальные исследования проводились в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН. Культуры выращивали на среде 2xTY (NaCl; триптон; дрожжевой экстракт) при 37°C 160 об/мин. Для контроля зараженности культуры бактериофагами производился высев на агаризованную среду 2xTY с антибиотиками (тетрациклин, ампициллин, канамицин). Для выделения рекомбинантных фаговых частиц использовали среду 2xTY с 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина (Sigma-Aldrich, США). В работе использовали фагмиды, на основе бактериофага M13, содержащие ген устойчивости к ампициллину и гены Fab-фрагмента антител, из фаговой библиотеки овцы, любезно предоставленной профессором университета г. Абердин (Великобритания) Уильямом Харрисом. Хелперные бактериофаги M13K07 (Stratagene, Швеция) содержат ген устойчивости к канамицину. Для закрепления ампициллина использовали PVDF-мембрану «Western S» (Millipore, США). Для блокировки мембраны использовали 2% р-р сухого молока в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) (таблетки фосфатно-солевого буфера, Росмедбио, Россия). Элюцию проводили 0.1 М глицин-HCl буфером pH 2.5, нейтрализацию проводили 500мкл 1М трис HCl (Sigma, Германия) буфер pH 9.5. Для выделения фагов использовались 1,25 мкл/мл

IP TG (Helicon Ltd, Россия) и ПЭГ/NaCl (NaCl – 93,5 г/л; ПЭГ 6000 (Serva, Германия). В дот-иммуноанализе использовали PVDF-мембрану, конъюгаты наночастиц золота с кроличьими антифаговыми антителами. Для контроля использовались канамицин, тетрациклин, L-фенилаланин, L-триптофан и L-цистеин. Измерения оптической плотности антител проводили на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (Analytik Jena, Германия).

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 42 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: антибиотики и объемы их применения, технология фагового дисплея антител, биосенсорные системы и применение фаговых антител в качестве селективного рецептора биосенсоров.

Основное содержание работы. В ходе исследования было проведено 3 раунда отбора фаговых антител, специфичных к ампициллину. Перед каждым раундом проводился контроль зараженности клеточной культуры библиотечным и хелперным фагом. Для этого микроорганизмы высевали на плотную питательную среду с добавлением антибиотиков.

Антибиотики растворяли в воде до концентрации 100 мг/мл. Далее в первую стерильную чашку Петри добавляли 50 мкл тетрациклина и 50 мкл ампицилина, так как библиотечный фаг несет гены устойчивости к ампициллину. Во вторую - 50 мкл тетрациклина и 25 мкл канамицина (так как хелперный фаг несет гены устойчивости к канамицину). В третью - 50 мкл тетрациклина. Затем в каждую чашку Петри вносили указанную выше агаризованную среду и тщательно перемешивали для равномерного распределения антибиотиков. Культура будет считаться не зараженной, если рост будет наблюдаться на чашках, содержащих только тетрациклин, поскольку клетки данного штамма несут ген устойчивости к тетрациклину и чувствительны к двум другим антибиотикам.

На PVDF-мембрану наносили раствор ампициллина и оставляли подсыхать в термостате при 28°C на 1,5ч. Для исключения неспецифического связывания и блокировки незанятого антигеном пространства на мембране саму мембрану помещали в 2% р-р сухого молока в фосфатно-солевом буферном растворе ФСБ на 1ч на шейкере при 37°C. Далее отмывали мембрану в р-ре ФБС для удаления несвязанного антигена. Затем на мембрану наносили фаговую библиотеку (в концентрации 10^{12} , 10^{11} и 10^{10} фаговых частиц в мл в первом, втором и третьем раундах селекции соответственно) и оставляли на 12ч, 1,5ч и 1ч в первом, втором и третьем раундах селекции соответственно на шейкере при температуре 37°C. Затем проводили отмывку мембраны для удаления несвязанных фагов, для этого мембрану помещали в TBS-T буфер и встряхивали по 10 мин 3 раза. Элюцию связавшихся фаговых частиц проводили 0.1 М глицин-HCl буфером (pH 2.5), для этого мембрану переносили в 500мкл 0,1 М глицин HCl буфера pH 2,5 на 10 мин, потом туда же добавили 500мкл 1М трис HCl буфер pH 9,5. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма XL1 Blue.

Рост *E. coli*, как и предполагалось, отмечался только на среде с тетрациклином.

Далее произвели высев с единичной колонии с чашки с тетрациклином на жидкую среду, инкубировали в шейкере при интенсивности перемешивания 160 об/мин и температуре 37 °C в течении 24ч. Затем 1/5 часть культуры пересевали на свежую среду и инкубировали в шейкере при 160 об/мин и температуре 37 °C в течении 4ч, после чего культуру термостатировали 30-40 мин при 37°C для образования F-пилей. Затем к ней добавили элюированные фаговые частицы библиотеки. Оставляли колбу с культурой бактерий и фагами в термостате 28°C на 30 мин для заражения культуры. Полученную суспензию центрифугировали в эппендорфах на центрифуге 20мин при 3000 оборотов, осадок перенесли на свежую среду с добавлением 600 мкл 20% р-ра глюкозы и ампициллином. Инкубировали в шейкере 37°C 24ч.

Затем 1/5 часть выросшей культуры переносили на свежую среду с ампициллином и глюкозой, затем инкубировали на шейкере 4ч 37°C. После этого переносили культуру в термостат (28°C) на 30 мин для образования F-пилей. Затем в колбу вносили хелперный бактериофаг в количестве 1:20 и выдерживали еще 30 мин при 37°C для заражения культуры (без покачивания и встряхивания). Затем суспензию центрифугировали в течение 20мин при 3000 оборотах, осадок перенесли на свежую 2YT с добавлением ампициллина, канамицина и р-ра IPTG и оставляли на шейкере на 24ч при 37°C. Затем суспензию центрифугировали 20 мин при 6000 оборотах, собирали надосадок и добавили к нему ПЭГ/NaCl (1/5 объема). Полученную суспензию оставляли в холодильнике 24ч. Далее суспензию фаговых мини-Ат центрифугировали в течении 15 мин при 14000 оборотах 4°C. Осадок ресуспензировали в 0,01М ФСБ. Затем полученную фаговую суспензию очищали, для этого ставили диализ против 0,01М ФБС в мерном цилиндре 24-48 ч. Осадок собирали и хранили в морозилке.

Специфичность полученных фаговых мини-Ат в отношении ампициллина определяли методом дот-иммуноанализа после каждого раунда селекции. В качестве образцов на мембрану в виде серии точек наносили антибиотик (ампициллин) в различных концентрациях. Затем проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее антигеном в течение 1 ч 2% сухим молоком, разведенным в 0.01 М ФБС рН 7.2. Мембрану погружали в раствор специфичных фагов, разведенных до концентрации 10^{13} частиц в 1 мл 0.01 М ФСБ рН 7.2, и проводили инкубацию в течение одного часа при комнатной температуре. В результате биоспецифического взаимодействия фаговые Ат связывались с антибиотиком, адсорбированным на мембране. После чего мембрану отмывали от неспецифически связавшихся мини-Ат и погружали в конъюгат наночастиц золота с кроличьими антифаговыми Ат и наблюдали связывание комплекса Ag^+ мини-Ат (в виде серии окрашенных пятен). Цвет пятен соответствует максимуму экстинкции наночастиц или молекул-меток.

Получение наночастиц золота и их конъюгатов с антителами проводили совместно с сотрудниками лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН. Коллоидное золото (КЗ) со средним диаметром частиц 15 нм получали по методу [3], используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Идентификацию наночастиц проводили методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), как описано в работе [4].

Для определения количества частиц вирусов использовали спектрофотометрический метод. Предварительно разводили суспензию фага 1/100 в р-ре ФСБ. Исходя из соотношения, что 2×10^{14} фаговых частиц/мл соответствуют 30 опт.ед., для расчетов использовали следующую формулу, как представлено в работе [5]: $(A_{269} - A_{320}) \times 10^{14} / 15 \times \text{разведение}$, где A_{320} – оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм, A_{269} – оптическая плотность суспензии при длине 269 нм.

Концентрация фаговых частиц, отобранных из фаговой библиотеки, определенная с помощью спектрофотометрии, представлена в таблице 1. Для определения использовали средние значения, полученные в ходе проведения экспериментов не менее, чем в пяти повторностях. Данные представлены в виде средних значений с учетом подсчета ошибки. Обработку и представление данных осуществляли при помощи пакета Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки.

Таблица 1 - Количество вирусных частиц в образце после разных раундов селекции

| № раунда селекции | Оптическая плотность, о.е | | Концентрация фаговых частиц, вирионов/мл |
|-------------------|---------------------------|--------------|--|
| | 269нм | 320 нм | |
| 1 | 0,065589±1,6 | 0,047854±0,9 | $4 \cdot 10^7$ |
| 2 | 0,072075±1,4 | 0,046798±1,5 | $2 \cdot 10^{11}$ |
| 3 | 0,075448±1,2 | 0,044334±1,1 | $2 \cdot 10^{13}$ |

о.е – относительных единиц

Исходя из данных, представленных в таблице 1, можем сделать вывод о присутствии фаговых частиц в полученных растворах, т.к. с помощью используемого метода измеряли оптическую плотность по ДНК.

Из полученных данных дот-анализа установлено, что после первого раунда селекции четкой картины, свидетельствующей о специфичности мини-Ат не наблюдалось. Однако, после 3-го раунда селекции видно, что мини-Ат обладают специфичностью к ампициллину.

Из полученных данных можно сделать вывод, что для повышения чувствительности мини-Ат необходимо проводить не менее 3-х раундов селекции.

Титр мини-Ат определяли с помощью ИФА по общепринятой методике [6]. Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре АИФ-Ц-01С (ЗАО ИЛИП, РФ) при длине волны 490 нм. Титр полученных фаговых мини-Ат составил 1: 500.

В литературных источниках довольно часто встречаются работы по применению твердофазного иммуноанализа в лабораторной диагностике [7,8]. Несмотря на то, что это, в основном, качественные или полуколичественные методы, использование этих тестов может оказывать большую помощь при предварительном тестировании. В работе необходимо было определить минимальную концентрацию Аг, детектируемую визуально с помощью дот-анализа. Поэтому на следующем этапе работы проводили исследования по использованию дот-иммуноанализа для выявления разных концентраций ампициллина в воде с использованием рекомбинантных (фаговых) антител, специфичных к ампициллину. Для этого исследования использовали антиампициллиновые фаговые Ат, полученные после 3-го раунда селекции, и ампициллин в концентрациях 1; 4; 6.0; 12; 25; 50 и 100 мкг/мл. В качестве метки использовали 15 нм конъюгаты золотых наночастиц-протеин А (200 мкл конъюгата на 1 мл PBS при визуальном контроле (около 20 минут)).

Из данных анализа установлено, что конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуально наблюдать в виде серии красных пятен. Следовательно, полученные в работе фаговые Ат способны детектировать ампициллин с помощью метода дот-иммуноанализа, при минимальной определяемой концентрации 4 мкг/мл, так как при меньшей концентрации ампициллина четкое окрашивание образца не проявляется.

Таким образом, в результате проведенных исследований, показана возможность применения технологии фагового дисплея для получения мини-антител, специфичных к ампициллину.

На следующем этапе проводился анализ специфичность взаимодействия антиампициллиновых фаговых антител в отношении других антибиотиков. Для этого использовали представителей антибактериальных препаратов, которые, в соответствии с данными на 2018 г., активно используются во всем мире (Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018): тетрациклин (занимает 1 место по объему продаж) и канамицин (как представитель аминогликозидных антибиотиков, объем продаж которого составляет 6,2% от общего объема продаж всех антибактериальных препаратов).

Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны. В результате проведенных исследований установлено, что конъюгат связывался с комплексом ампициллин (антиген)-специфичные фаговые антитела, что можно визуально наблюдать в виде серии красных пятен. Полученные фаговые антитела, специфичны к ампициллину и не взаимодействуют с тетрациклином и канамицином, так как на мембране с данными антибиотиками не проявляется их окрашивание.

Далее проводили анализ возможности неспецифичного взаимодействия с другими аналитами, близкими по химическому строению. Поскольку химическая формула ампициллина, L-фенилаланина и L-триптофана содержат ароматическое кольцо и группу NH₂, проводили контрольные исследования по исключению возможности неспецифичного взаимодействия

антиампициллиновых фаговых антител с L-фенилаланином и L-триптофаном. Дополнительно проводили исследования, исключая неспецифичное взаимодействия полученных антител в отношении L-цистеина, который также в своем составе содержит группу NH₂.

Из данных анализа установлено, что полученные нами фаговые антитела, специфичные в отношении ампициллина, не взаимодействуют с L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином, так как на мембране с данными веществами не проявляется их окрашивание.

Полученные фаговые антитела обладают достаточно высокой специфичностью по отношению к ампициллину и не взаимодействуют с антибиотиками тетрациклином, канамицином, а также L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

В известных базах данных отсутствует информация о получении фаговых антител, специфичных к антибиотикам, в том числе и к ампициллину. Контроль данного антибиотика в растворах (биологические жидкости, лекарства, продукты питания) является необходимым условием обеспечения здоровья человека. Пенициллины занимают второе место по продажам (28.8%) в странах ЕС, и в большей степени это относится к пеницилинам расширенного спектра действия, в которые входит ампициллин (по данным 10th ESVAC report 2018г). В дальнейшем планируется отработка возможности использования фаговых антител, специфичных к ампициллину, для анализа антибиотика с помощью биосенсорной системы.

Выводы. Проведенные в работе исследования впервые показали возможность применения технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к ампициллину. Полученные антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с канамицином и тетрациклином, а также L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Также подтверждены литературные данные о целесообразности проведения не менее 3-х раундов селекции антител. С

помощью данных антител возможно определять ампициллин методом до-иммуноанализа, при нижнем пределе детекции 4 мкг/мл.

Таким образом, антиампициллиновые антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, являются весьма перспективными для применения в качестве сенсорного элемента датчика при определении ампициллина в водных растворах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Перспективы применения фаговых антител в качестве селективного рецептора биосенсоров / А. А. Хомякова [и др.] // Исследования молодых ученых в биологии и экологии. – 2021. – 144 с.
2. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 [Электронный ресурс]. – https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf
3. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nature Phys. Sci. – 1973. – V. 241. – P. 20-22.
4. Prospects for the use of gold nanoparticles to increase the sensitivity of an acoustic sensor in the detection of microbial cells / O. I. Guliy [et al.] // Ultrasound in Medicine & Biology. – 2020. – V. 46, № 7. – P. 1727–1737.
5. Smith, G. P. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage / G. P. Smith, J.K. Scott // Methods in enzymology. – 1993. – V. 217. – P. 228.
6. Beatty, J. D. Measurement of monoclonal affinity by noncompetitive immunoassay / J. D. Beatty, B. G. Beatty, W. G. Vlahos // J. Immunol. Meth. – 1987. – V. 100. – P. 173–179.
7. Дыкман, Л. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л. А. Дыкман, В.А. Богатырев // Усп. химии. – 2007. – Т. 76. – С. 199-213.
8. Staroverov, S. A. The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum / S. A. Staroverov // J Immunoassay Immunochem. – 2015. – V. 36, № 1. – P. 100-110.