



# ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 4, 2024

Иммуноанализ с использованием полноразмерных и фаговых антител для обнаружения антибиотиков (Обзор) <i>О. И. Гулий, Л. А. Дыкман</i>	325
Оптимизация биосинтеза масляной кислоты из глюкозы по обращенному β-окислению жирных кислот рекомбинантными штаммами <i>Escherichia coli</i> <i>А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, В. Г. Дебабов</i>	340
Исследование влияния различных протеолитических ферментных препаратов отечественного производства на органолептические свойства изолятов белка гороха <i>И. В. Кравченко, В. А. Фуралев, Е. С. Пшенникова, Е. В. Костылева, А. С. Середя, Е. И. Курбатова, Н. В. Цурикова, А. Н. Федоров, В. О. Попов</i>	348
Наночастицы платины в водных растворах сополимера хитозан-винилпирролидона: синтез и биологическая активность <i>Д. Н. Зуев, Е. И. Черкасова, К. В. Апрятина, С. Д. Зайцев, Л. А. Смирнова</i>	356
Динамика уровней шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов при тепловом стрессе отличается у трех видов тыквы с разной устойчивостью к стрессам <i>Н. Д. Муртазина, Л. С. Шарпова, Н. П. Юрина</i>	366
Филогения и характеристика эндофитных бактерий из растений гороха ( <i>Pisum sativum</i> L.), выделенных из ризосферы проростков <i>Л. Е. Макарова, Ю. А. Маркова, Ю. В. Зайцева, А. А. Бычкова, И. В. Горбенко, Ю. М. Константинов, И. А. Васильев, А. С. Мориц, П. А. Бизиков</i>	375
Использование штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ОВА 2.4.1 для предпосевной обработки семян гороха посевного ( <i>Pisum sativum</i> L.) в присутствии тяжелых металлов и глифосфата <i>Л. Р. Хакимова, О. В. Чубукова, З. Р. Вершинина</i>	383
Генно-инженерный синтез мутантного дифтерийного токсина CRM197: влияние и оптимизация условий гетерологичной экспрессии гена в клетках <i>E. coli</i> <i>С. О. Рогожкин, А. С. Герасимов</i>	392
Значимость антигенов <i>Yersinia pestis</i> в рецепции чумного диагностического бактериофага L-413С <i>А. А. Бывалов, Л. Г. Дудина, Т. Б. Кравченко, С. А. Иванов, И. В. Коньшев, Н. А. Морозова, А. В. Чернядьев, С. В. Дентовская</i>	403
Разработка метода иммуноферментного анализа для детекции модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP <i>А. А. Климова, И. В. Григорьев, Д. В. Васина, М. Н. Анурова, В. А. Гуцин, Н. П. Антонова</i>	413
Влияние органических растворителей на результаты иммуноферментного определения гербицида бутахлора: выбор режимов пробоподготовки <i>А. Н. Берлина, Н. И. Смирнова, Н. С. Комова, К. В. Серебренникова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	424

# CONTENTS

Vol. 60, No. 4, 2024

Immunoassay Using Full-Length and Phage Antibodies for Antibiotic Detection <i>O. I. Gulyi, L. A. Dykman</i>	325
Optimization of Biosynthesis of Butyric Acid from Glucose Through the Inverted Fatty Acid $\beta$ -Oxidation Pathway by Recombinant <i>Escherichia coli</i> Strains <i>A. Yu. Gulevich, A. Yu. Skorokhodova, V. G. Debabov</i>	340
The Effect of Various Domestically Produced Proteolytic Enzyme Preparations on the Organoleptic Properties of Pea Protein Isolates <i>I. V. Kravchenko, V. A. Furalyov, E. S. Pshennikova, E. V. Kostyleva, A. S. Sereda, E. I. Kurbatova, N. V. Tsurikova, A. N. Fedorov, V. O. Popov</i>	348
Platinum Nanoparticles in Aqueous Solutions of Chitosan-Vinylpyrrolidone Copolymer: Synthesis and Biological Activity <i>D. N. Zuev, E. I. Cherkasova, K. V. Apryatina, S. D. Zaitsev, L. A. Smirnova</i>	356
The Dynamics of the Levels of Cytoplasmic HSP70 and Chloroplast HSP70B Chaperones Under Heat Stress Differs in Three Species of Pumpkin with Different Resistance to Stress <i>N. D. Mur tazina, L. S. Sharapova, N. P. Yurina</i>	366
Phylogeny and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Pea Seedlings ( <i>Pisum sativum</i> L.) <i>L. E. Makarova, Yu. A. Markova, Yu. V. Zaytseva, A. A. Bychkova, I. V. Gorbenko, Yu. M. Konstantinov, I. A. Vasiliev, A. S. Morits, P. A. Bizikov</i>	375
Use of Strain <i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.4.1 for Pre-Sowing Treatment of Pea Seeds ( <i>Pisum sativum</i> L.) in the Presence of Heavy Metals and Glyphosphate <i>L. R. Khakimova, O. V. Chubukova, Z. R. Vershinina</i>	383
Bacterial Expression of CRM197: Investigation and Optimization of Gene Expression Factors for Effective Production in <i>E. coli</i> <i>S. O. Rogozhkina, A. S. Gerasimov</i>	392
The Role of <i>Yersinia pestis</i> Antigens in Reception of the Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C <i>A. A. Byvalov, L. G. Dudina, T. B. Kravchenko, S. A. Ivanov, I. V. Konyshchev, N. A. Morozova, A. V. Chernyadiev, S. V. Dentovskaya</i>	403
Development of a Method for Detection and Quantitative Analysis of Engineered Endolysin LysAm24-SMAP in Biological Samples <i>A. A. Klimova, I. V. Grigoriev, D. V. Vasina, M. N. Anurova, V. A. Gushchin, N. P. Antonova</i>	413
Influence of Organic Solvents on the Results of Immunoenzyme Determination of Herbicide Butachlor: Selection of Sample Preparation Modes <i>A. N. Berlina, N. I. Smirnova, N. S. Komova, K. V. Serebrennikova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev</i>	424

УДК 57.083

## ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ И ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР)

© 2024 г. О. И. Гулий<sup>1, \*</sup>, Л. А. Дыкман<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”,  
Саратов, 410049 Россия

\*e-mail: gulyi\_olga@mail.ru

\*\*e-mail: dykman\_l@ibppm.ru

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Широкое применение антибиотиков, приводящее к антибиотикорезистентности и появлению антибиотиков в окружающей среде и продуктах питания, стимулирует развитие новых методов контроля антибактериальных препаратов в объектах окружающей среды. Одно из перспективных направлений по развитию методов определения антибиотиков принадлежит сенсорным технологиям. Ключевым моментом при развитии сенсорных систем является подбор чувствительного (распознающего) элемента. Одним из самых популярных методов распознавания антибиотиков является использование антител. В работе представлены основные иммуносенсорные системы, основанные на регистрации взаимодействия “антиген-антитело” и показаны преимущества и недостатки использования поликлональных и моноклональных антител. Отдельно описана возможность применения фаговых антител для определения антибиотиков.

*Ключевые слова:* антитела, антибиотики, иммуноанализ, фаговый дисплей, биосенсоры

DOI: 10.31857/S0555109924040016 EDN: SBJQUY

Распознавание биомолекул имеет решающее значение не только для своевременной диагностики соматических и инфекционных заболеваний, но и при контроле качества пищевых продуктов и экологическом мониторинге. Антибиотики – важный класс препаратов, предназначенных для лечения бактериальных заболеваний человека и животных, кроме того, антибиотики широко используются в сельском хозяйстве и пищевой промышленности с начала 1940 г. Практика использования антибиотиков в ветеринарной медицине произвела революцию в отрасли. Антибиотики в основном используются для лечения инфекций, например, лечения респираторных и кишечных инфекций на ранней стадии жизни животных или для лечения бактериальных инфекций, таких как мастит, на взрослой стадии [1]. Кроме того, антибиотики активно применяются в качестве корма в субтерапевтических концентрациях для ускорения роста животных. Злоупотребление антибиотиками создало серьезную угрозу экологии, поскольку антибиотики и продукты их деградации попадают в объекты окружающей среды. Повсеместное

распространение антибиотиков приводит к ухудшению здоровья и качества жизни человека.

Одним из важнейших мероприятий, направленных на ограничение распространения антибиотиков в окружающей среде является мониторинг остатков антибактериальных препаратов. В связи с этим актуальной является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в биологических жидкостях, в продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Стандартные методы определения антибиотиков обладают высокой чувствительностью, но требуют трудоемких этапов предварительной обработки образца, что увеличивает их стоимость. Поэтому разрабатываются новые технологии, направленные на экспресс-анализ антибиотиков. Одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антигенов являются биосенсоры. Биосенсорные методы анализа имеют довольно широкое применение и постепенно становятся неотъемлемой частью клинической диагностики и экологического мониторинга. Решающей задачей при разработке биосенсоров является

подбор биоселективного агента (элемента распознавания), который обеспечивает специфичное связывание с целевым аналитом, которое фиксируется датчиком. В качестве узнающих биоспецифических молекул в биосенсорах чаще всего используют антитела, поскольку специфичное взаимодействие антиген-антитело обеспечивает уникальную избирательность и высокую чувствительность сенсоров, которые характеризуются простотой использования, надежностью, малым временем отклика. Иммуноаналитические тест-системы являются одним из самых удобных методом мониторинга таких соединений, как антибиотики, гормоны, витамины, нейромедиаторы, пестициды и др. в крови людей и животных, в мясных и молочных продуктах, в культуральных средах [2, 3].

В статье приводится обзор современных методов определения антибиотиков с помощью иммуносенсорных систем на основе полноразмерных (поликлональных, моноклональных) и фаговых антител. Хотя в обзоре и не приведена полная характеристика всех существующих разработок по иммунодетекции антибиотиков, в ней подробно обсуждаются различные распространенные методы иммуноанализа, их преимущества и недостатки в отношении обнаружения широкого спектра антибиотиков разных групп.

### АНТИБИОТИКИ И ВАЖНОСТЬ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Антибактериальные препараты являются одними из наиболее важных препаратов, используемых в здравоохранении. Однако их эффективному применению препятствует огромное и широко распространенное во всем мире явление бактериальной резистентности. Бактериальная антибиотикорезистентность ускоряется из-за неконтролируемого и иногда неадекватного применения противомикробных препаратов в медицине, широкого использования в ветеринарии, а также присутствия антибактериальных препаратов в окружающей среде и продуктах питания. В результате возникает необходимость активизации поиска новых препаратов антибиотиков и ограничения их распространения в окружающей среде.

В последнее время внимание человечества обращено на безопасность пищевых продуктов, ожидается, что к 2030 г. потребление антибактериальных препаратов достигнет более чем 100000 тонн в год [4]. Большое количество неиспользованных антибиотиков, их метаболитов и остатков попадают различными путями в окружающую среду, что влияет на природные экосистемы, а также способствует развитию антибиотикорезистентности бактерий.

Антибиотики применяют не только для лечения в медицине и ветеринарии, но и в качестве стимуляторов роста скота, при транспортировке

продуктов питания, в пчеловодстве [5]. Остатки антибиотиков являются ключевым объектом мониторинга качества пищевых продуктов. Чрезмерное попадание антибактериальных препаратов через пищу приводит к онкологическим заболеваниям, повреждению репродуктивной системы или тератогенности [6]. Небезопасная пища обычно содержит один или несколько антибиотиков. За счет синергизма сосуществование нескольких антибиотиков в одном продукте может повысить их токсичность, поэтому важно разрабатывать методы, способные определять несколько антибиотиков в одной пробе [7].

В мясе, печени, почках, молоке, твороге, сметане, сыре, яйцах, рыбе, меде и других продуктах питания достаточно часто обнаруживают остаточные количества антибиотиков, что предопределяет необходимость проведения выборочного, периодического или систематического их контроля. При реализации программ по обеспечению продовольственной безопасности особое внимание уделяют качеству молока как стратегически важного продукта питания. На его пищевую ценность влияет множество факторов, прежде всего, состояние здоровья животных, от которых оно было получено. Срок годности молока, как сырья для производства готовой продукции, весьма непродолжителен. Поэтому своевременный и повсеместный контроль наличия в молоке остаточных количеств ветеринарных препаратов, в том числе антибиотиков, считается приоритетной задачей. Важность контроля содержания антибиотиков невозможно переоценить по той причине, что молочные продукты используются в качестве ингредиентов при производстве разнообразных продуктов питания, в том числе для детей [8]. В связи с этим проблема определения содержания антибиотиков и их метаболитов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды представляется весьма актуальной.

Для определения антибиотиков используют стандартные, успешно зарекомендовавшие себя методы анализа, такие как: микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективную жидкостную хроматографию и хромато-масс-спектрометрию, инверсионную вольтамперометрию, электроаналитическое определение с модифицированными электродами, поверхностный плазмонный резонанс, биохимические методы (капиллярный электрофорез), колориметрические методы и др. [9–12]. Основные аналитические методы, используемые для определения антибиотиков, представлены на рис. 1 [1].

Несмотря на значительное количество разработанных методов определения антибиотиков, одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антибактериальных препаратов



Рис. 1. Аналитические методы определения антибиотиков [1].

являются биосенсорные системы. Биосенсоры позволяют проводить качественный и количественный анализ антибиотиков, что делает их весьма востребованными при необходимости крупномасштабного анализа антибактериальных препаратов. Биосенсоры различной конструкции и техники применялись для поиска антибактериальных веществ в объектах окружающей среды и пищевых продуктов.

## ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БИОСЕНСОРАХ

Согласно действующему определению Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry), биосенсор представляет собой автономный интегрированный биорецептор/преобразователь, устройство, предназначенное для получения выборочной количественной или полуквантитативной аналитической информации с использованием элемента биораспознавания [13]. Биосенсорные системы можно разделить в зависимости от типа биологически чувствительного элемента на три группы: ферментные, аффинные и клеточно-тканевые [14, 15]. В качестве элемента биораспознавания в биосенсорах используются следующие компоненты: ферменты, антигены, антитела, гормоны, клетки, органеллы и др. Общая схема сенсора представлена на рис. 2. Биосенсоры обладают высоким потенциалом для обнаружения антибиотиков из-за их высокой специфичности, являются идеальным аналитическим инструментом для быстрого получения информации о составе сложных систем.

Остаточные количества антибиотиков в пищевых продуктах могут привести к серьезным проблемам со здоровьем и безопасностью человеческого организма. Быстрый и своевременный анализ антибиотиков с использованием простых и чувствительных методов пользуется большим спросом. Биосенсоры, в том числе на основе

наноматериалов, представляют собой аналитическое оборудование с полезными характеристиками, такими как простота, низкая цена, возможность установки на месте, высокая точность и чувствительность для обнаружения аналитов [16, 17].

К молекулам распознавания в составе биосенсоров предъявляются высокие требования. Лиганды должны быть высокоспецифичными, стабильными и экономичными в производстве. Принцип образования комплекса антиген-антитело широко используется в методах иммуноанализа для определения остаточных количеств антибиотиков, особенно в качестве рутинных скрининговых методов. Среди иммунохимических методов, применяемых, в том числе, для детекции антибиотиков, ранее активно использовали радиоиммунологический и иммунофлуоресцентный анализы. В настоящее время чаще применяют различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА), а также твердофазного иммуноанализа (дот-блот, иммунохроматография) [18]. Антитела активно используются как датчики биоаффинных взаимодействий в различных сенсорных системах, успешно применяются для разработки разнообразных биочипов и биосенсоров. Этот же принцип широко применяется при конструировании биосенсоров. Аффинные биосенсоры являются одной из бурно развивающихся областей иммуноанализа, где ключевым моментом является регистрация формирования комплекса антиген-антитело [19, 20]. Группа биосенсоров (используемых, в том числе, для определения антибиотиков), основанная на использовании иммунохимических реакций биораспознавания получила название иммуносенсоры.

Иммуносенсоры – устройства, состоящие из специфического антитела (антигена), связанного с преобразователем, и электронного устройства, отображающего сигнал о связывании с

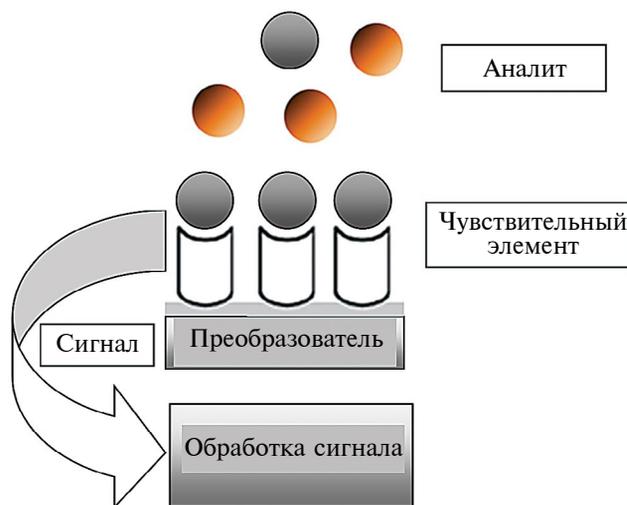


Рис. 2. Общая схема биосенсора.

соответствующим лигандом. С 1980-х годов активно развивается разработка биосенсоров для скрининга остатков антибиотиков, первыми биорецепторами которых являлись антитела [21]. Наиболее часто применяемые иммуносенсоры – электрохимический и оптический, последний чаще всего является биосенсором поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от времени инкубации, необходимого для образования комплекса антиген-антитело [22, 23].

Иммуносенсоры используются для оценки качества лекарственных препаратов, то есть для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфичными антителами и последующей детекции. Качественный анализ позволяет получить положительный или отрицательный результат содержания антигена или антитела в исследуемом веществе. При проведении количественного анализа определяют содержание того или иного антигена или антитела в исследуемом веществе с использованием калибровочного графика.

Специфические взаимодействия антиген-антитело обеспечивают уникальную избирательность и высокую чувствительность иммуносенсоров, простоту в использовании, надежность, малое время отклика. Основные принципы современных методов иммуноанализа представлены в обзорах [18, 20, 24].

### АНТИТЕЛА ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА

Антитела – широко распространенный инструмент современной биохимии и микробиологии, специфичное взаимодействие антиген-антитело лежит в основе разнообразных иммунохимических реакций [25]. Высокоаффинные антитела, связывающие антигены, используются в качестве

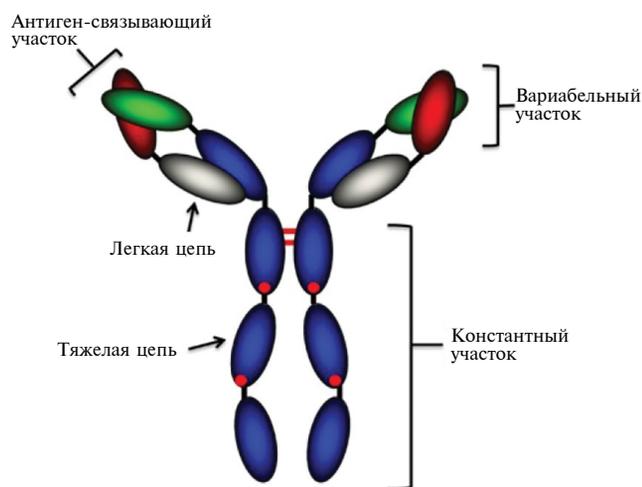


Рис. 3. Структура антител [26].

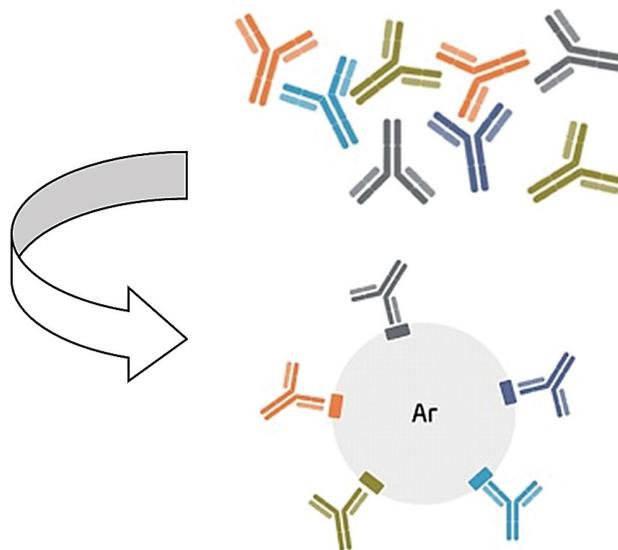


Рис. 4. Общая схема действия поликлональных антител с анализируемым агентом.

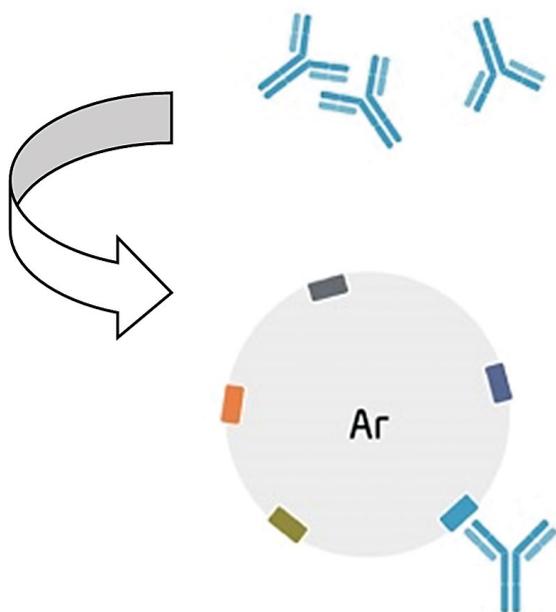
чувствительного компонента большинства иммуносенсоров. Антитела в зависимости от технологии получения могут быть поликлональными, моноклональными и рекомбинантными.

Антитела, образующиеся в сыворотке крови в разных клонах В-лимфоцитов и связывающиеся с различными антигенными детерминантами (эпитопами) молекулы-мишени (антигеном), называют поликлональными антителами. Структура антител представлена на рис. 3 [26].

Поликлональные антитела широко используются в иммунодиагностике и для их получения иммунизируют лабораторных животных. Активность поликлональных антител представляет собой комбинацию антител различного антигенсвязывающего действия, что делает иммунохимический метод менее чувствительным. Присущая поликлональным антителам вариабельность объясняется разным иммунным статусом экспериментальных животных. Поликлональные антитела продуцируются многочисленными клонами. Общая схема взаимодействия поликлональных антител с анализируемым агентом представлена на рис. 4.

Использование поликлональных антител имеет следующие недостатки при их применении в диагностике:

- содержание отдельных антител в поликлональном препарате может варьировать от одной партии к другой;
- поликлональные антитела нельзя применять, если необходимо различить две подобные мишени, например, когда патогенная (мишень) и



**Рис. 5.** Общая схема действия моноклональных антител с анализируемым агентом.

непатогенная (не-мишень) формы различаются единственной детерминантой.

Несмотря на указанные недостатки поликлональные антитела широко используются в иммунодиагностике и лабораторных исследованиях, прежде всего из-за низкой стоимости их получения, также для поиска вариантов белка, если неизвестно, какой именно эпитоп открыт для связывания с антителами.

В дополнение к поликлональным были разработаны препараты антител, специфичных к одной определенной антигенной детерминанте, то есть препараты моноклональных антител. Моноклональные антитела синтезируются одним клоном, происходящим от одного предшественника плазматической клетки, направлены только против одного конкретного эпитопа иммуногенного вещества, идентичны по своему строению, относятся к одному классу/изотипу/аллотипу иммуноглобулинов, имеют одинаковую структуру лиганд-связывающего сайта и обладают одинаковыми специфичностью и родством, как показано на рис. 5.

Преимущество моноклональных антител заключается в возможности стандартизации препаратов антител. Определенная клеточная линия гибридомы при производстве моноклональных антител обеспечивает стабильное производство антител и не зависит от статуса животного, как в случае с поликлональными антителами. Моноклональные антитела используют в аналитических и прикладных исследованиях для отработанных методик и стандартных задач (изготовление лекарств, иммунодиагностика и проч.). Важнейший фактор, определяющий широкое использование моноклональных

антител в различных областях заключается в их уникальной специфичности к определенному эпитопу.

У гибридной технологии, несмотря на преимущества, есть ограничения: низкая иммуногенность некоторых целевых молекул, высокая стоимость наработки, непредсказуемый иммунный ответ в связи с происхождением антител от грызунов, большие временные затраты и потребность в клетках миеломы [27].

Рекомбинантные антитела представляют собой моноклональные антитела, генерируемые *in vitro* (без использования животных) посредством технологии рекомбинантных ДНК. Рекомбинантные антитела преодолевают многие ограничения, свойственные обычным моноклональным антителам [28]:

- рекомбинантные антитела могут быть получены против нестабильных, токсичных, летучих, иммуносупрессивных или неиммуногенных антигенов;
- рекомбинантные антитела могут быть сконструированы так, чтобы иметь аффинность от пикомолярного до фемтомолярного диапазона;
- производство рекомбинантных антител занимает приблизительно от 2 до 8 нед, в то время как при иммунизации животных весь процесс займет более 4 месяцев;
- нет надобности в содержании животных;
- в отличие от клеточных линий гибридомы, запасы рекомбинантных антител не имеют риска истощения.

Развитие технологий дисплеев (фаговых, бактериальных, дрожжевых, рибосомных и мРНК) стало отправной точкой для продукции различных форматов рекомбинантных антител с необходимыми характеристиками. Рекомбинантные антитела, такие как Fab-фрагменты или антитела с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv) по сравнению с полноразмерными природными антителами, имеют меньшую молекулярную массу и повышенную молекулярную подвижность, что обеспечивает им более легкий доступ к эпитопу антигена. Это делает их альтернативой классическим моноклональным антителам.

Метод фагового дисплея – эффективный метод выделения моноклональных антител с высокой аффинностью к целевой молекуле. Метод фагового дисплея основан на манипуляциях с генами покровных белков нитевидных фагов – в основном M13 и Fd. Антитела, полученные с помощью фагового дисплея, проходят несколько этапов отбора по аффинности и могут использоваться в качестве селективных рецепторов в биосенсорах [29]. Показано, что фаговые библиотеки представляют собой богатый источник фрагментов антител, связывающихся с белковыми и гликопротеиновыми антигенами с наномолярным сродством и высокой специфичностью. Поэтому фаговые антитела

используются в диагностике из-за их специфичности и аффинности. Многие платформы, такие как иммунохроматографический анализ, ИФА и иммунофлуоресценция, позволяют быстро и точно идентифицировать целевые антигены, обнаруженные в образце [29].

Огромный потенциал комбинаторных фаговых библиотек открывает беспрецедентную возможность обнаруживать бактерии, вирусы и токсины, игнорируя использование трудоемких диагностических процедур. Одним из важных компонентов при проектировании биосенсора является выбор подходящего сенсорного элемента. Фаговый дисплей фрагментов антител является перспективным методом получения стабильных сенсорных элементов. Фаговые антитела высокоэффективны при обнаружении желаемого аналита; они имеют преимущества перед природными иммуноглобулинами и в ряде случаев перед их растворимыми фрагментами. Сама технология дешевая и быстрая, и она позволяет быстро получить репертуар фрагментов антител посредством саморепликации фага. Этот репертуар можно даже расширить за счет искусственного синтеза. Другим важным преимуществом фаговых антител является возможность создания гибридных молекул с маркерными белками, что позволяет эффективно детектировать иммунохимические реакции. Кроме того, с появлением фагового дисплея появилась возможность вырабатывать антитела к гаптенам, в том числе антибиотикам.

### ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Загрязнение пищевых продуктов остатками антибиотиков стало всемирной проблемой из-за интенсивного и неправильного использования антибиотиков. Разработка быстрых, высокопроизводительных, простых и экономичных методов скрининга для обнаружения остатков антибиотиков является важным требованием в качестве альтернативы традиционным анализам. Иммуноанализ является широко распространенным перспективным методом, способным достичь условий аналитических методов при оценке защиты пищевых продуктов и окружающей среды [18, 30].

Ранее часто для определения антибиотиков использовали радиоиммунологический и иммунофлуоресцентный анализы. Так описан радиоиммунологический анализ для обнаружения остатков левомецетина (хлорамфеникола) в яйцах, молоке и мясе. Для тканей и других пищевых продуктов животных, получавших левомецетин (кур, коров, свиней), предел обнаружения составил около 200 нг/кг [31]. Этот же антибиотик было предложено определять методами иммунохемилюминесцентной детекции на мембранных носителях [32] и иммунодот-анализа [33].

Также иммунодот-анализ использовали для детекции антибиотиков группы аминогликозидов (гентамицина, неомицина, канамицина), линкозамидов (клиндамицина, линкомицина), фторхинолонов (пемфлоксацина, энрофлоксацина, ципрофлоксацина, норфлоксацина) [34–37]. Фторхинолоновый антибиотик левофлоксацин также было предложено определять методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа, предел обнаружения составил 0.5 нг/мл [38].

Для детекции антибиотика из группы трициклических гликопептидов ванкомицина разработан гомогенный конкурентный иммуноанализ турбидиметрического ингибирования [39]. Антитела и частицы латекса связываются, образуя агрегаты, которые увеличивают мутность раствора. Свободное лекарственное средство из образца конкурирует за антитела, тем самым снижая скорость агрегации частиц. Скорость агрегации обратно пропорциональна концентрации препарата в образце.

Особенность методов электрохимического анализа состоит в том, что в анализируемую систему не вводятся какие-либо химические реагенты, а используются процессы, связанные с переносом ионов или электронов. Перспективы использования электрохимического анализа для определения антибиотикочувствительности продемонстрированы в работах [24, 40, 41]. Привлекательность электрохимических методов для определения антибиотиков обусловлена их низкой общей стоимостью, быстрым временем анализа и возможностью миниатюризации аналитической платформы [41–43].

Так, например, в работе [44] описан электрохимический биосенсор на основе аффинности для безметочного обнаружения остатков цефтиофура в образцах мяса. Датчик использует иммуноанализ на самособранных монослоях для нацеливания на антибиотик с помощью электрохимической импедансной спектроскопии для исследования межфазных емкостных изменений, когда цефтиофур связывается с поверхностью датчика. Разные модификации электрохимических сенсорных систем разработаны для определения левомецетина [45, 46].

Магнитные наночастицы, модифицированные хитозаном, также использовались для создания простых и недорогих электрохимических иммуносенсоров с моноклональными антителами против антибиотиков. Магнитные наночастицы обладают хорошей биосовместимостью, низкой токсичностью и высоким переносом электронов; пленки хитозана использованы из-за их высокой механической прочности [47]. Разработан электрохимический биосенсор для определения пенициллина G путем иммобилизации антител к пенициллину в поддерживаемой двухслойной липидной мембране, модифицированной наночастицами золота [48].

Возможности амперометрического определения тетрациклина с помощью амперометрического магнитоиммуносенсора, включающего использование селективного захватывающего антитела, иммобилизованного на поверхности магнитных шариков, функционализированных белком G, и угольных электродов с трафаретной печатью показаны в работе [49]. Был представлен амперометрический иммуносенсорный метод определения  $\beta$ -лактамных антибиотиков в сыворотке и моче человека. Этот метод оказался очень чувствительным, дешевым и воспроизводимым; значение предела обнаружения составило около 10–11 М [50]. Отдельные направления применения антител в качестве распознающих компонентов связано с развитием иммуносенсоров на основе трафаретного углеродного рабочего электрода [51], а также комбинирования с пьезоэлектрическим резонатором [52–54]. Принципы конкурентного иммуноанализа реализованы в иммуносенсоре на основе интегрированной микро-электромеханической системы, содержащей восемь золотых микроэлектродов ( $\mu$ WE) для определения тетрациклина [55].

Согласно данным, представленным в работе [1] оптические биосенсоры на основе ППР довольно часто используются для обнаружения или количественного определения остатков антибактериальных или противомикробных препаратов в пищевой промышленности. Использование метода ППР является предпочтительным выбором из-за его надежности и высокой чувствительности, а также практичности с точки зрения высокой производительности, надежности и экономической эффективности. Оптические иммуносенсоры для скрининга остатков ампициллина описаны в работах [56, 57]. Разновидности сенсорной ППР-системы для определения антибиотиков на основе как прямого (с иммобилизацией антитела), так и конкурентного (с иммобилизацией антигена) методов описаны в работе [58]. Некоторые другие виды иммуносенсоров описаны в работах [24, 59, 60].

Широко распространенным методом детекции антибиотиков является ИФА. Его использовали, в частности, для определения антибиотиков аминокликозидного ряда (канамицина и тобрамицина) [61–65], а также тетрациклина [66].

В настоящее время наиболее популярным методом определения антибиотиков в биологических средах и объектах окружающей среды становится иммунохроматографический анализ [67]. С его помощью детектируют антибиотики ряда хинолонов, тетрациклинов,  $\beta$ -лактамов, сульфонамидов, левомицетина, стрептомицина и др. [68]. В частности иммунохроматографический анализ использовали для определения энрофлоксацина [69], цефалексина [70], офлоксацина [71], линкомицина [72], неомицина [73], тетрациклина [74], пенициллина [75]. Разработаны иммунохроматографические тесты

для одновременного обнаружения сразу нескольких антибиотиков в одном образце [76–79].

Иммунохроматографический анализ (также называемый lateral flow immunoassay, strip test) представляет собой иммунохимический тест, основанный на хроматографии (разделения компонентов образца на основе различий в их движении через сорбент) и иммуноанализе, предназначенного для определения наличия или отсутствия целевого аналита. Он основан на том же принципе, что и другие твердофазные иммунохимические методы анализа (ИФА дот-блот, дипстик-тест), с тем отличием, что иммунологическая реакция осуществляется на хроматографической бумаге за счет капиллярного действия. Для иммунохроматографического анализа используются две разновидности специфических антител против антигена – меченные и нативные. Когда жидкий образец наносят на подложку для образцов, антиген в образце образует иммунокомплекс с меченым красителем антителом. Комплекс антиген-антитело мигрирует вместе с жидким образцом и вступает в контакт с немеченым антителом, иммобилизованным на мембране, с последующим образованием иммунокомплекса. По мере того, как все больше и больше комплексов антиген-антитело останавливаются на тестовой линии, она дает окрашенную полосу, которая свидетельствует о присутствии искомого антигена в образце. Поскольку жидкость образца проходит через мембрану очень быстро, это позволяет определить наличие или отсутствие антигена в течение ~15 мин [67].

Для усиления чувствительности анализа предложен способ, сочетающий недорогой, простой, быстрый иммунохроматографический анализ с методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). С помощью этого способа разработаны методики определения как отдельных антибиотиков, так и нескольких антибиотиков в одном образце [80–83].

Ведутся исследования по развитию современных иммуносенсоров для определения аминокликозидов [84]. Так, например, для количественного определения неомицина предложено использовать поликлональные антитела, иммобилизованные на бумажной полоске, модифицированной одностенными нанотрубками [85]. Предел обнаружения составляет 0.04 нг/мл, относительно широкий линейный диапазон обнаружения от 0.2 до 125 нг/мл.

Новым направлением исследований является развитие иммуносенсоров для одновременного определения нескольких антибиотиков [20, 86]. Так, например, в работе [87] показана возможность одновременного обнаружения тетрациклина, стрептомицина и пенициллина в молоке с использованием в качестве узнающего компонента антител, с пределом детекции 5 пг/мл для каждого из исследуемых препаратов. В табл. 1 представлены

Таблица 1. Варианты иммуносенсоров для определения ряда антибиотиков с использованием поликлональных и моноклональных антител

Антибиотик	Тип антител	Метод	Предел (диапазон) определения	Ссылки
Левомецетин	Поликлональные	Радиоиммунологический анализ	200 нг/кг	[31]
Левомецетин	Поликлональные	Хемилюминесцентный иммуноанализ	0.01–100 нг/мл	[32]
Энрофлоксацин Ципрофлоксацин Норфлоксацин	Поликлональные	Дот-иммуноанализ	20 мкг/кг	[36]
Фторхинолоны	Поликлональные	ИФА Дот-иммуноанализ	$\leq 10$ мкг/кг (ИФА) $\leq 20$ мкг/кг (дот-анализ)	[37]
Левифлоксацин	Поликлональные	Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ	0.5 нг/мл	[38]
Тетрациклин	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	0.006 мкг/л Диапазон 0.05–100 нг/мл	[42]
Ампициллин	Анти-ампициллиновые антитела	Электрохимический иммуносенсор	0.028 мкг/мл Диапазон 0.0325–64 мкг/мл	[43]
Цефтиофур	Антитела к цефтиофур	Электрохимический иммуносенсор	0.01 нг/мл	[44]
Левомецетин	Моноклональные	Амперометрический иммуносенсор	$3.2 \times 10^3 - 3.2 \times 10^6$ нг/л	[45]
Тетрациклин	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	0.03 мкг/л Диапазон 0.08–1 нг/мл	[47]
Пенициллин G	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	$2.7 \times 10^{-4}$ нг/л Диапазон $3.34 \times 10^{-3} - 3.34 \times 10^3$ нг/л	[48]
Тетрациклин	Поликлональные	Амперометрический иммуносенсор	44 нг/мл	[49]
Пенициллин G	Моноклональные	Амперометрический иммуносенсор	$10^{-11}$ М	[50]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	$\leq 1.0$ мкг/кг	[51]
Полимиксин Тетрациклин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	25–450 нг/мл	[52]
Левифлоксацин Ципрофлоксацин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	8–21 нг/мл	[53]
Ципрофлоксацин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	5–400 нг/мл	[54]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	1.2 пг/мл Диапазон 0.1–1000 пг/мл	[55]

Таблица 1. Окончание

Антибиотик	Тип антител	Метод	Предел (диапазон) определения	Ссылки
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	0.087 мкг/л	[56]
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	$7.4 \times 10^{-10}$ г/мл	[57]
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	$10^{-3} - 10^{-1}$ М	[58]
Левифлоксацин	Поликлональные	Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ	1.0 нг/мл Диапазон 2.5–50 нг/мл	[59]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	0.01 мкг/л Диапазон 1–200 мкг/л	[60]
Канамицин	Моноклональные	ИФА	0.2 нг/мл	[62]
Канамицин Тобрамицин	Моноклональные	ИФА	0.83 нг/мл	[63]
Хинолоны Тетрациклины $\beta$ -Лактамы Левомецетин Стрептомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	1.2–80 нг/мл	[68]
Энрофлоксацин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.935 мкг/кг	[69]
Цефалексин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.39 мкг/кг	[70]
Офлоксацин	Моноклональные	Иммунохроматография	30 пг/мл	[71]
Линкомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.008–0.8 нг/мл	[72]
Неомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.1–10 нг/мл	[73]
Тетрациклин	Моноклональные	Иммунохроматография	2 мкг/л	[74]
Офлоксацин Левомецетин Стрептомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.12–0.3 нг/мл	[76]
Ципрофлоксацин Левомецетин	Моноклональные	Иммунохроматография	20 пг/мл – 0.5 нг/мл	[77]
Канамицин	Анти-канамициновые антитела	ГКР иммуносенсор	2 пг/мл	[80]
Неомицин	Моноклональные	Иммунохроматография + ГКР	0.216 пг/мл	[80]
Левомецетин	Моноклональные	Иммунохроматография + ГКР	0.20 нг/мл	[82]
Неомицин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	0.04 нг/мл Диапазон 0.2–125 нг/мл	[85]

различные варианты иммуносенсоров для определения ряда антибиотиков с использованием поликлональных и моноклональных антител.

Отметим, что по чувствительности анализа иммунологические методы определения антибиотиков сопоставимы с традиционно используемыми микробиологическими и хроматографическими методами. Стандартный диапазон концентраций всех методов (0.1–100 нг/мл) охватывает диапазон концентраций рутинной дозы антибиотиков, который отвечает клиническим потребностям. Иммунологические методы хорошо коррелируют с традиционными методами (коэффициент корреляции > 0.9), при этом они проще в использовании, обладают хорошей производительностью, более экологичны, экономичны и практичны для больницы первичного звена, где нет дорогостоящего оборудования. Поскольку имеется широкая номенклатура коммерчески доступных реагентов, иммунологические методы являются часто используемыми методами обнаружения антибиотиков в клинике [88]. Из недостатков этих методов следует отметить большее количество образца, требуемое для анализа, несколько меньшую чувствительность и специфичность (во многом из-за большого размера молекулы иммуноглобулина по сравнению с молекулами антибиотиков) по сравнению с хроматографическими методами. При этом биосенсоры — относительно новые аналитические инструменты — помогают избежать этих недостатков для простого, быстрого, недорогого, высокопроизводительного, специфичного и чувствительного обнаружения антибиотиков *in situ* [61, 89]. Помимо этого, наблюдается важная тенденция к миниатюризации скрининговых систем (чипы, микрочипы), а также к автоматизации. По этим причинам будущие разработки должны также включать новые исследования в области нанотехнологий для обеспечения контроля безопасности пищевых продуктов и объектов окружающей среды [90, 91].

Как видно из представленных данных, в иммуносенсорах для определения антибиотиков активно используются как поликлональные, так и моноклональные антитела, при этом разработанные системы направлены на обнаружение следовых количеств определенных антибиотиков. При всех достоинствах используемых антител, в последнее время все большее внимание уделяется антителам фагового происхождения и их применению для детекции различных биомолекул.

### ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Иммуноанализ — это надежный, эффективный и точный метод анализа низкомолекулярных веществ (в том числе антибиотиков), которые могут присутствовать в пищевых продуктах. Однако

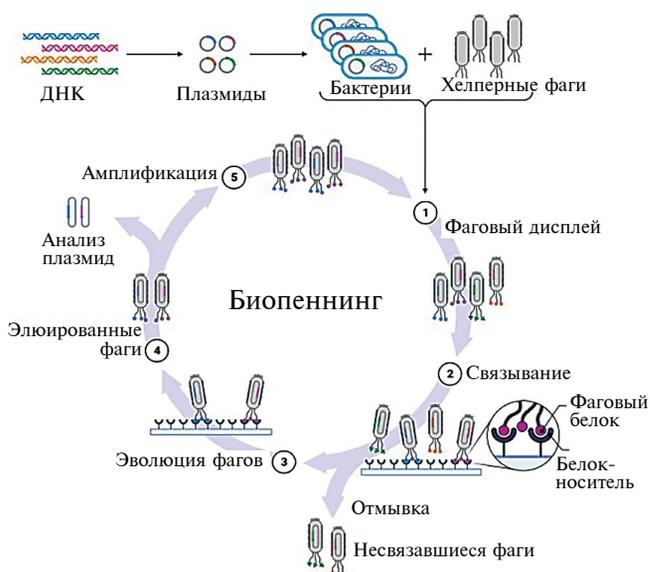


Рис. 6. Схема аффинной селекции антител из фаговой библиотеки [93].

традиционные поликлональные и моноклональные антитела ограничены использованием животных. С постепенным применением метода фагового дисплея в качестве эффективной технологии селекции *in vitro*, варибельные одноцепочечные фрагменты иммуноглобулинов (scFv) представляют собой интересную альтернативу традиционным антителам. С использованием эффективно созданных исходных библиотек scFv и специально разработанных схем биопеннинга можно получать scFv, обладающие специфическими способностями распознавания. Рациональная стратегия мутагенеза еще больше повышает аффинность scFv и позволяет ей достичь уровня, которого невозможно достичь при иммунизации. Наконец, соответствующие меры прокариотической экспрессии обеспечивают стабильное и эффективное производство scFv [92].

Большой научный интерес представляет фаговый дисплей, направленный на получение и разработку антител к известным антигенам. Данная технология является выгодной заменой гибридной технологии, т.к. фаговая система заменяет все этапы работы по иммунизации животных и удалению селезенки простыми процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с месяцев до недель и удешевляя процесс [28]. В дальнейшем, полученные таким образом антитела, могут быть использованы в качестве селективных рецепторов биосенсоров, т.к. они проходят несколько этапов отбора по аффинности — биопеннинга.

Биопеннинг — это метод, используемый для скрининга и отбора библиотек фагового дисплея

на наличие антител, которые специфически связываются с желаемой мишенью. Этот процесс включает в себя несколько этапов выделения и амплификации вариантов связывания, исключая при этом неспецифическое связывание. Ключевыми этапами биоэ́ннинга являются: иммобилизация интересующего лиганда на твердой подложке, нанесение библиотеки фагового дисплея на твердую подложку, промывка для удаления несвязывающихся клонов, элюирование оставшихся связавшихся фагов с твердой подложки, повторная обработка, реамплификация элюированных фагов посредством бактериальной инфекции, повторение процесса, по меньшей мере, в течение трех раундов для обогащения вариантов связывания и исключения любых неспецифических связывающихся агентов, скрининг элюированных фагов из последнего раунда для идентификации и выделения клонов со специфическим связыванием (рис. 6). Каждый раунд биоэ́ннинга увеличивает долю специфически связывающихся клонов в библиотеке фагового дисплея [93].

Фаговые антитела успешно используются для терапии [94, 95], для индикации вирусов [93, 96], бактерий и биомаркеров [27, 97]. Развитие технологии фаговой инженерии привело к созданию нового типа библиотек фагового дисплея, которые обладают огромным ресурсом диагностических/обнаруживающих зондов и универсальной конструкцией [27].

Для определения фармакодинамики лекарственных средств в организме хорошим инструментом является фаговый дисплей антител, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам). В частности, с применением этой технологии были получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела, специфичные к ампициллину [98] и канамицину [99]. С помощью метода дот-иммуноанализа показана их специфичность к определяемому антибиотику.

Метод конкурентного флуоресцентного поляризационного анализа с использованием фаговых антител был разработан для определения ветеринарного антибиотика моненсина, который широко применяется в кормах для жвачных животных. Чувствительность метода составила 0.03 мкМ [100].

Был разработан воспроизводимый конкурентный ИФА для определения ципрофлоксацина с использованием магнитных шариков в качестве носителя фаговых антител. Этот анализ показал пределы обнаружения и количественного определения 9.3 нМ и 33 нМ соответственно [101]. Метод непрямого конкурентного ИФА с использованием фаговых антител был предложен для детекции ципрофлоксацина в пищевых продуктах животного происхождения [102]. Этот же метод применяли для обнаружения макролидных антибиотиков

в целях мониторинга безопасности пищевых продуктов [103] и определения левомецетина в морепродуктах [104]. scFv против ампициллина было предложено применять в методе ИФА в качестве диагностического реагента при использовании антибиотиков у человека и животных, в качестве модели эффекта экспрессии в *Escherichia coli* молекул, связывающих антибиотики, а также для направленной эволюции в сторону высокой устойчивости к антибиотикам [105].

Для контроля лекарственной аллергии и создания диагностических тестов на β-лактамы антибиотик амоксициллин был разработан хемиллюминесцентный иммуноанализ с использованием фаговых антител [106].

\* \* \*

Неадекватное применение антибактериальных препаратов ускорило явление бактериальной резистентности, что является огромной проблемой для здоровья человека и окружающей среды. Для обнаружения антибиотиков и их метаболитов в различных объектах окружающей среды перспективным направлением является использование современных методик иммуноанализа и биосенсорики [107].

Предложено большое количество коммерчески доступных реагентов и аналитических наборов для иммуноанализа антибиотиков. Так ИФА, являясь одним из наиболее часто используемых клинических методов определения антибиотиков, может использоваться для быстрого тестирования образцов с применением обычных биохимических анализаторов и коммерческих наборов [88]. В частности, коммерческие ИФА наборы для определения ряда антибиотиков выпускает фирма PerkinElmer (США), Roche Diagnostics (Швейцария), Siemens Healthineers (ФРГ) и др. [104, 108]. Также в последние годы различные коммерческие стрип-тесты на основе иммунохроматографического метода были произведены несколькими компаниями под разными торговыми названиями (Bioo AuroFlow™, PerkinElmer; Charm ROSA, CHARM Science, США; IDEXX SNAP, ThermoFisher Scientific, США). Такие тесты выявляют многочисленные антибиотики с высокими пороговыми значениями [89, 90]. Для анализа с использованием метода ППР широко используются аналитические системы Biacore™ (“Cytiva”, Швеция), SPReeta (“Texas Instruments”, США) и BioSuplar (“Mivitec”, ФРГ) [22, 58]. На основе иммунофлуоресцентного анализа была разработана мультифункциональная платформа Extensio (“Unisensor”, Бельгия), которая позволяет определить остаточные уровни 98 антибиотиков [8].

Разрабатываются новые модели иммуноанализа с применением машинного обучения и интеллектуальных наномашин [109, 110]. Учитывая преимущества разработки и применения иммунобиосенсоров в области детекции антибиотиков, в этом

обзоре представлены данные об использовании и перспективах применения биосенсоров для обнаружения антибактериальных веществ в окружающей среде и пищевых продуктах.

За последние три десятилетия поликлональные и моноклональные антитела стали наиболее важными классами биоспецифичных компонентов сенсорных систем при обнаружении антибиотиков. Разработка антител была ускорена благодаря технологиям рекомбинантной ДНК, которые позволили гуманизировать мышиные моноклональные антитела, сделать их пригодными для применения в качестве селективного агента. Фаговый дисплей антител – первая и наиболее широко используемая технология селекции *in vitro*. Он оказался надежной и универсальной платформой для получения антител. Учитывая высокую специфичность фаговых антител к антибиотикам, в дальнейшем они смогут составить конкуренцию антителам нефаговой природы при использовании в биосенсорах.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-24-00309.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pauter K., Szultka-Młyńska M., Buszewski B.* // *Molecules* 2020. V. 25. 2556. <https://doi.org/10.3390/molecules25112556>
2. Новые методы иммуноанализа / Ред. У.П. Коллинз, М.: Мир, 1991. 279 с. (Complementary Immunoassays / Ed. Collins, W.P., Chichester: Wiley&Sons, 1988.)
3. *Mukhametova L.I., Eremin S.A.* // *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 2024. V. 16. 4. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1601004>
4. *Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson, T.P. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
5. *Ayankojo A.G., Reut J., Nguyen V.B.C., Boroznjak R., Syritski V.* // *Biosensors*. 2022. V. 12. 441. <https://doi.org/10.3390/bios12070441>
6. *Ko E.-B., Hwang K.-A., Choi K.-C.* // *Reprod. Toxicol.* 2019. V. 90. P. 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.08.006>
7. *Fungo G.B.N., Uy J.C.W., Porciuncula K.L.J., Candelario C.M.A., Chua D.P.S., Gutierrez T.A.D. et al.* // *Phage* 2023. V. 4. P. 55–67. <https://doi.org/10.1089/phage.2023.0007>
8. *Соколова О.* // *Животноводство России*. 2021. № 7. С. 34–36.
9. *Кирничная В.К., Касьяненко Г.Р., Киселева Т.В.* // *Пищевая промышленность*. 2013. № 9. С. 60–63.
10. *Zhang X., Wang J., Wu Q., Li L., Wang Y., Yang H.* // *Molecules* 2019. V. 24. 1902. <https://doi.org/10.3390/molecules24101902>
11. *Кулапина Е.Г., Баринаова О.В., Кулапина О.И., Умц И.А., Снесарев С.В.* // *Антибиотики и химиотерапия*. 2009. Т. 54. С. 53–60.
12. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* In: *Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics.* / Eds. P.K. Maurya, P. Chandra. Sawston: Woodhead Publishing, 2022. P. 143–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9>
13. *Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S.* // *Biosens. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
14. *Leca-Bouvier B.D., Blum L.J.* *Recognition Receptors in Biosensors* / Ed M. Zourob. New York: Springer, 2010. P. 177–220. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0919-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0919-0_4)
15. *Moreira F., Dutra R., Noronha J., Sales G.* // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 56. P. 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.052>
16. *Dezhakam E., Tavakkol M., Kafili T., Nozohouri E., Naseri A., Khalilzadeh B., Rahbarghazi R.* // *Food Chem.* 2024. V. 439. 138145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138145>
17. *Reder-Christ K., Bendas G.* // *Sensors* 2011. V. 11. P. 9450–9466. <https://doi.org/10.3390/s111009450>
18. *Ahmed S., Ning J., Peng D., Chen T., Ahmad I., Ali et al.* // *Food Agric. Immunol.* 2020. V. 31. P. 268–290. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171>
19. *Rudenko N., Fursova K., Shepelyakovskaya A., Karatovskaya A., Brovko F.* // *Sensors*. 2021. V. 21. 7614. <https://doi.org/10.3390/s21227614>
20. *Lu N., Chen J., Rao Z., Guo B., Xu Y.* // *Biosensors* 2023. V. 13. 850. <https://doi.org/10.3390/bios13090850>
21. *Gaudin V.* // *Biosens Bioelectron.* 2017. V. 90. P. 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
22. *Fernandez F., Hegnerova K., Piliarik M., Sanchez-Baeza F., Homola J., Marco M.P.* // *Biosens Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.012>
23. *Fernandez F., Pinacho D.G., Sanchez-Baeza F., Marco M.P.* // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5036–5043. <https://doi.org/10.1021/jf1048035>

24. Pollap A., Kochana J. // Biosensors. 2019. V. 9. 61. <https://doi.org/0.3390/bios9020061>
25. Антитела. Методы / Ред. Д. Кэрти. М.: Мир, 1991.
26. Sharma S., Byrne H., O'Kennedy R.J. // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 9–18. <https://doi.org/10.1042/ЕВС20150002>
27. Petrenko V.A. // Viruses 2018. V. 10. 311. <https://doi.org/10.3390/v10060311>
28. Тукунова Н.В., Морозова В.В. // Acta Nat. 2009. Т. 1. С. 22–31. <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-3-20-28>.
29. Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A. // Biosens. Bioelectron. 2023. V. 222. 114909. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
30. Xiao X., Hu S., Lai X., Peng J., Lai W. // Trends Food Sci. Technol. 2021. V. 111. P. 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.045>
31. Arnold D., Somogyi A. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985. V. 68. P. 984–990.
32. Самсонова Ж.В., Рубцова М.Ю., Чикишева Л.В., Егоров А.М. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. С. 396–398.
33. Федотова Е.С., Щербаков А.А., Сидоркин В.А., Староверов С.А., Дыкман Л.А., Василенко О.А. // Ветеринария 2007. № 6. С. 57–58.
34. Дыкман, Л.А., Сумарока, М.В., Староверов, С.А., Зайцева, И.С., Богатырев, В.А. // Известия РАН. Сер. биол. 2004. Т. 31. С. 86–91.
35. Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю. // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. С. 58–68. <https://doi.org/10.1134/S1995078010110029>
36. Sui J.X., Lin H., Cao L.M., Li Z.X. // Food Agr. Immunol. 2009. V. 20. P. 125–137. <https://doi.org/10.1080/09540100902889936>
37. Cao L., Sui J., Kong D., Li Z., Lin H. // Food Anal. Methods. 2011. V. 4. P. 517–524. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9196-2>
38. Sui J., Lin H., Xu Y., Cao L. // Food Anal. Methods 2011. V. 4. P. 245–250. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9137-5>
39. Gunther M., Saxinger L., Gray M., LeGatt D. // Ann. Pharmacother. 2013. V. 47. e19. <https://doi.org/10.1345/aph.1R566>
40. Islam R., Luu H.T.L., Kuss S. // J. Electrochem. Soc. 2020. V. 167. 045501. <https://doi.org/0.1149/1945-7111/ab6ff3>
41. Raykova M.R., Corrigan D.K., Holdsworth M., Henriquez F.L., Ward A.C. // Biosensors. 2021. V. 11. 232. <https://doi.org/0.3390/bios11070232>
42. Que X., Chen X., Fu L., Lai W., Zhuang J., Chen G., Tang D. // J. Electroanal. Chem. 2013. V. 704. P. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.06.023>
43. Yadav A.K., Verma D., Lakshmi G.B.V.S., Eremin S., Solanki P.R. // Food Chem. 2021. V. 363. 130245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130245>
44. Stevenson H.S., Shetty S.S., Thomas N.J., Dhamu V.N., Bhide A., Prasad S. // ACS Omega 2019. V. 4. P. 6324–6330. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03534>
45. Tomassetti M., Angeloni R., Martini E., Castrucci M., Campanella L. // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 255. P. 1545–1552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.166>
46. El-Moghazy A.Y., Zhao C., Istamboulie G., Amaly N., Si Y., Noguer T., Sun G. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 117. P. 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>
47. Liu X., Zheng S., Hu Y., Li Z., Luo F., He Z. // Food Anal. Methods 2016. V. 9. P. 2972–2978. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0480-z>
48. Li H., Xu B., Wang D., Zhou Y., Zhang H., Xia W., Xu S., Li Y. // J. Biotechnol. 2015. V. 203. P. 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.013>
49. Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Reviejo A.J., Pingarrón J.M. // Anal. Chim. Acta 2012. V. 737. P. 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>
50. Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. V. 106. P. 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.005>
51. Faridah S., Hazana R., Gayah A. R., Norzaili Z., Azima A., Nur Azura M. S., Zamri I. // Mal. J. Anim. Sci. 2012. V. 15. P. 67–80.
52. Шинко Е.И., Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2021. Т. 87. С. 11–16. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-12-12-17>
53. Shinko E.I., Farafonova O.V., Shanin I.A., Eremin S.A., Ermolaeva T.N. // Anal. Lett. 2022. V. 55. P. 1164–1177 <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1991364>
54. Bizina E.V., Farafonova O.V., Zolotareva N.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N. // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. P. 458–465. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040049>
55. Hassani E.A.E., N., Baraket A., Boudjaoui S., Neto E.T.T., Bausells J., El Bari, N. et al. // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 130. P. 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.052>
56. Tomassetti M., Merola G., Martini E., Campanella L., Sanzò G., Favero G., Mazzei F. // Sensors 2017. V. 17. 819. <https://doi.org/10.3390/s17040819>

57. Chaudhari P.P., Chau L.K., Tseng Y.T., Huang C.-J., Chen Y.-L. // *Microchim. Acta* 2020. V. 187. 396. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04381-w>
58. Tomassetti M., Conta G., Campanella L., Favero G., Sanzò G., Mazzei F., Antiochia R. // *Biosensors* 2016. V. 6. 22. <https://doi.org/10.3390/bios6020022>
59. Shanin I.A., Shaimardanov A.R., Thai N.T.D., Eremin S.A. // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. P. 712–717. <https://doi.org/10.1134/S1061934815060167>
60. Prusty A.K., Bhand S. // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 863. 114055. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114055>
61. Mungroo N.A., Neethirajan S. // *Biosensors* 2014. V. 4. P. 472–493. <https://doi.org/10.3390/bios4040472>
62. Watanabe H., Satake A., Kido Y., Tsuji A. // *Analyst* 1999. V. 124. P. 1611–1615. <https://doi.org/10.1039/A906026J>
63. Chen Y.Q., Wang Z., Wang Z., Tang S., Zhu Y., Xiao X. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 2944–2952. <https://doi.org/10.1021/jf703602b>
64. Hoppentocht M., Akkeman O.W., Voerman A.-J., Greijdanus B., Touw D.J., Alffenaar J.-W.C. // *J. App. Bioanal.* 2015. V. 1. P. 123–127. <https://doi.org/10.17145/jab.15.020>
65. Dijkstra J.A., Voerman A.J., Greijdanus B., Touw D.J., Alffenaar J.W.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. P. 4646–4651. <https://doi.org/10.1128/AAC.03025-15>
66. Gaurav A., Gill J.P.S., Aulakh R.S., Bedi J.S. // *Vet. World* 2014. V. 7. P. 26–29. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.26-29>
67. Li G., Li Q., Wang X., Liu X., Zhang Y., Li R., Guo J., Zhang G. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. V. 242. 125186. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125186>
68. Han M., Gong L., Wang J., Zhang X., Jin Y., Zhao et al. // *Sens. Actuators B* 2019. V. 292. P. 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.019>
69. Zhao Y., Zhang G., Liu Q., Teng M., Yang J., Wang J. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 12138–12142. <https://doi.org/10.1021/jf802648z>
70. Chen L., Wang Z., Ferreri M., Su J., Han B. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 4674–4679. <https://doi.org/10.1021/jf900433d>
71. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.-T., Sun Y., Dzantiev B.B. // *Talanta* 2014. V. 119. P. 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.054>
72. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *J. Food Sci. Technol.* 2021. V. 58. P. 292–301. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04541-z>
73. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Popravko D.S., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *J. Chromatogr. B* 2020. V. 1141. 122014. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122014>
74. Sheng W., Chang Q., Shi Y., Duan W., Zhang Y., Wang S. // *Microchim. Acta* 2018. V. 185. 404. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2945-9>
75. Prakashan D., Kolhe P., Gandhi S. // *Food Chem.* 2024. V. 439. 138120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138120>
76. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 63. P. 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.049>
77. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Shanin I.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *J. Sci. Food Agric.* 2019. V. 99. P. 3834–3842. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9605>
78. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B. // *Food Chem.* 2020. V. 318. 126510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126510>
79. Li Y., Li J., Huang H., Jian D., Shan Y., Wang S., Liu F. // *Food Control* 2021. V. 130. 108256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108256>
80. Zengin A., Tamer U., Caykara T. // *Anal. Chim. Acta* 2014. V. 817. P. 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.042>
81. Shi Q., Huang J., Sun Y., Yin M., Hu M., Hu X., Zhang Z., Zhang G. // *Spectrochim. Acta A* 2018. V. 197. P. 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.045>
82. Shi Q., Huang J., Sun Y., Deng R., Teng M., Li Q. et al. // *Microchim. Acta* 2018. V. 185. 84. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2556-x>
83. Pan Y., Fei D., Liu P., Guo X., Peng L., Wang Y., Xu N., Wei X. // *Food Anal. Methods* 2021. V. 14. P. 2642–2650. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02091-4>
84. Li Z., Liu Y., Chen X., Wang Y., Niu H., Li F., et al. // *Foods* 2023. V. 12. 1587. <https://doi.org/10.3390/foods12081587>
85. Wu X., Kuanga H., Hao C., Xing C., Wang L., Xu C. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 33. P. 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.017>
86. Conzuelo F., Campuzano S., Gamella M., Pinacho D.G., Reviejo A.J., Marco M.P., Pingarrón J.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 50. P. 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.019>
87. Song E., Yu M.; Wang Y.; Hu W.; Cheng D.; Swihart M.T.; Song Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2015, 72, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.018>
88. Cheng X., Ma J., Su J. // *Molecules* 2022. V. 27. 7319. <https://doi.org/10.3390/molecules27217319>
89. Majdinasab M., Mishra R.K., Tang X., Marty J.L. // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 127. 115883. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115883>
90. Cháfer-Pericás C., Maquieira Á., Puchades R. // *Trends Anal. Chem.* 2010. V. 29. P. 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>

91. *Chen T., Cheng G., Ahmed S., Wang Y., Wang X., Hao H., Yuan Z.* // *Talanta* 2017. V. 175. P. 435–442.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.044>
92. *Li L., Wu S., Si Y., Li H., Yin X., Peng D.* // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2022. V. 21. P. 4354–4377.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13018>
93. *Mustafa M.I., Mohammed A.* // *SLAS Discov.* 2024. V. 29. 100140.  
<https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.01.001>
94. *Frenzel A., Schirrmann T., Hust M.* // *mAbs* 2016. V. 8. P. 1177–1194.  
<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149>
95. *Majewska J., Kaźmierczak Z., Lahutta K., Lecion D., Szymczak A., Miernikiewicz P. et al.* // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. 2607.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02607>
96. *Petrenko V.A., Gillespie J.W., De Plano L.M., Shokhen M.A.* // *Viruses*. 2022. V. 14. 384.  
<https://doi.org/10.3390/v14020384>
97. *Petrenko, V.A.* // *Viruses*. 2024. V. 16. 277.  
<https://doi.org/10.3390/v16020277>
98. *Гулий О.И., Алсовэйти А.К.М., Фомин А.С., Габалов К.П., Староверов С.А., Караваева О.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. С. 513–519.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683822050088>
99. *Гулий О.И., Евстигнеева С.С., Староверов С.А., Фомин А.С., Караваева О.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. С. 512–519.
100. *Makvandi-Nejad S., Sheedy C., Veldhuis L., Richard G., Hall J.C.* // *J. Immunol. Methods* 2010. V. 360. P. 103–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.06.015>
101. *Gomes F.B.M.B., Riedstra S., Ferreira J.P.M.* // *J. Immunol. Methods*. 2010. V. 358. P. 17–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.03.021>
102. *Wang F., Li N., Zhang Y., Sun X., Hu M., Zhao Y., Fan J.* // *Foods* 2021. V. 10. 1933.  
<https://doi.org/10.3390/foods10081933>
103. *Li L., Wang X., Hou R., Wang Y., Wang X., Xie C. et al.* // *Food Control*. 2022. V. 133. 108571.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108571>
104. *Swofford C.A., Nordeen S.A., Chen L., Desai M.M., Chen J., Springs et al.* // *Protein Sci.* 2022. V. 31. e4457.
105. *Burmester J., Spinelli S., Pugliese L., Krebber A., Honegger A., Jung S. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 309. P. 671–685.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4663>
106. *Quintero-Campos P., Gozalbo-Rovira R., Rodríguez-Díaz J., Maquieira Á., Morais S.* // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. P. 12113–12121.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02284>
107. *Wentao D., Mian L., Qingsheng B., Zhonglin Z., Chao Y., Shuying L.* // *Biotechnol. Bull.* 2013. V. 6. P. 70–74.
108. *Sandúa A., Sanmamed M.F., Rodríguez M., Ancizu-Marckert J., Gúrpide A., Perez-Gracia et al.* // *Clin. Chim. Acta* 2023. V. 543. 117303.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117303>
109. *Sarma D., Marak M.R., Chetia I., Badwaik L.S., Nath P.* // *Phys. Scr.* 2024. V. 99. 026006.  
<https://doi.org/10.1088/1402-4896/ad1c7f>
110. *Xu X., Li T., Liu Y., Zhou L., Li Y., Luo Y. et al.* // *Small*. 2024. V. 20. e2309502.  
<https://doi.org/10.1002/sml.202309502>

## Immunoassay Using Full-Length and Phage Antibodies for Antibiotic Detection

O. I. Guliy<sup>a, \*</sup>, L. A. Dykman<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

\**e-mail: guliy\_olga@mail.ru*

\*\**e-mail: dykman\_l@ibppm.ru*

The widespread use of antibiotics, leading to antibiotic resistance and the appearance of antibiotics in the environment and food, stimulates the development of new methods for monitoring antibacterial drugs in environmental objects. One of the promising areas for the development of methods for determining antibiotics belongs to sensor technologies. The key point in the development of sensory systems is the selection of a sensitive (recognizing) element. One of the most popular methods for recognizing antibiotics is the use of antibodies. The work presents the main immunosensory systems based on recording the “antigen-antibody” interaction and shows the advantages and disadvantages of polyclonal and monoclonal antibodies. The possibility of using phage antibodies to determine of antibiotics is described separately.

*Keywords:* antibodies, antibiotics, phage display, biosensors

УДК 577.121

## ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ $\beta$ -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli*

© 2024 г. А. Ю. Гулевич<sup>1</sup>\*, А. Ю. Скороходова<sup>1</sup>, В. Г. Дебабов<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Оптимизирован биосинтез масляной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* по обращенному  $\beta$ -окислению жирных кислот. Повышенный выход целевого соединения достигнут при экспрессии генов *atoB*, *fadB* и *fadE/fabI* в базовом штамме MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*uciA* (MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*proxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*tesB*, Δ*uciA*) в составе плазмид. Продемонстрировано положительное влияние форсированного гидролиза АТФ на микроаэробную конверсию рекомбинантами углеводного субстрата в конечный продукт. Активация в клетках футильного цикла пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота, за счет усиления экспрессии гена *ppsA*, обеспечивала выраженный рост потребления рекомбинантами глюкозы и приводила к росту молярного выхода масляной кислоты до 39.5%. При разобнении компонентов H<sup>+</sup>-АТФ синтазного комплекса, вследствие делеции генов *atpFH*, молярный выход масляной кислоты из глюкозы, продемонстрированный штаммом, формирующим бутирил-КоА под действием еноил-АЦП редуктазы FabI, достигал 46%.

**Ключевые слова:** АТФ, масляная кислота,  $\beta$ -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, бутирил-КоА, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109924040021 EDN: SBJIMZ

Масляная кислота это четырехуглеродная монокарбоновая кислота, имеющая широкое применение в различных отраслях промышленности, в том числе лакокрасочной, химической, фармацевтической и пищевой [1]. Эфиры масляной кислоты, в первую очередь этиловый и бутиловый, помимо традиционного использования в косметических композициях, могут служить компонентами биотоплив [2], а продукт восстановления масляной кислоты – бутанол – в качестве прямой замены бензина [3]. В настоящее время масляную кислоту получают нефтехимическим синтезом при окислении производного от пропилена масляного альдегида [4]. Однако масляная кислота также может быть получена из возобновляемого растительного сырья посредством микробиологического синтеза. Природными продуцентами масляной кислоты являются строгие анаэробы, принадлежащие к родам *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Megasphaera* и *Sarcina* [5]. Наибольшей продуктивностью среди них отличаются штаммы *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. tyobutyricum* [4]. Тем не менее, биосинтетические

характеристики как природных продуцентов, так и их оптимизированных производных не позволяют в настоящее время реализовать экономически оправданное биотехнологическое производство масляной кислоты [6]. Это обусловило интерес к созданию неприродных продуцентов масляной кислоты с использованием традиционных для промышленной биотехнологии и удобных для направленной инженерии микроорганизмов, в первую очередь *Escherichia coli* [7]. В норме, *E. coli* не обладает способностью к синтезу масляной кислоты при утилизации стандартных источников углерода. В данной связи, для обеспечения биосинтеза целевого соединения в клетках этой бактерии экспрессировали те или иные наборы чужеродных генов, включающие гены 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназы (КФ 1.1.1.157), *hbd*, 3-гидроксибутирил-КоА дегидратазы (КФ 4.2.1.55), *crt*, клостридий, транс-еноил-КоА редуктазы (КФ 1.3.1.44) *Treponema denticola*, ацетил-КоА ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.9), *phaA*, и ацетоацетил-КоА редуктазы (КФ 1.1.1.36), *phaB*, *Cupriavidus necator* [8–10]. Однако, было показано, что в результате изменения

регуляции экспрессии отдельных генов *ato*-оперона и *fad*-регулона, *E. coli* способна продуцировать масляную кислоту в результате функционального обращения природного пути  $\beta$ -окисления жирных кислот (БОЖК) [11]. Тем не менее, уровни синтеза масляной кислоты соответствующими мутантами и направленно сконструированными штаммами были крайне невысоки [11, 12].

Цель работы – оптимизация биосинтеза масляной кислоты из глюкозы по обращенному пути  $\beta$ -окисления жирных кислот рекомбинатными штаммами *Escherichia coli*.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали рестриктазы, ДНК полимеразу Taq, T4 ДНК лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), высокоточную ДНК полимеразу Q5 (“New England Biolabs”, США) и набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (“Agilent Technologies”, США). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195), ранее сконструированный штамм *E. coli* MG  $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*tesB* *ΔyciA* [13], лишенный путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, с усиленной экспрессией гена тиоэстеразы П, а также штамм VOX3.3  $\Delta 4$  P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI* [12], с дополнительно измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного  $\beta$ -окисления жирных кислот и еноил-АПБ-редуктазу, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Для культивирования бактерий применяли богатую среду LB и минимальную среду M9 [14], с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Конструирование штаммов и плазмид.** Целевые штаммы, производные штаммов MG $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*tesB* *ΔyciA* и VOX3.3  $\Delta 4$  P<sub>trc-id-4</sub>-*fabI*, с инактивированными генами *atpFH* и природной регуляторной областью гена *ppsA* замененной искусственным генетическим элементом P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>, были получены с помощью P1-зависимых трансдукций [14] с использованием ранее полученных препаратов трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [15, 16].

**Таблица 1.** Штаммы и плазмиды, сконструированные и использованные в работе.

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм: MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG $\Delta 4$ P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> <i>ΔyciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i>	[13]
VOX3.3 $\Delta 4$ P <sub>trc-id-4</sub> - <i>fabI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i>	[12]
MG $\Delta 4$ P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> <i>ΔyciA</i> P <sub>L</sub> - <i>ppsA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>ppsA</i>	Данная работа
MG $\Delta 4$ P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> <i>ΔyciA</i> $\Delta$ <i>atpFH</i>	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i> , $\Delta$ <i>atpFH</i>	Данная работа
VOX3.3 $\Delta 4$ P <sub>trc-id-4</sub> - <i>fabI</i> P <sub>L</sub> - <i>ppsA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>ppsA</i>	Данная работа
VOX3.3 $\Delta 4$ P <sub>trc-id-4</sub> - <i>fabI</i> $\Delta$ <i>atpFH</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , <i>ΔyciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , $\Delta$ <i>atpFH</i>	Данная работа
Плаزمида: pMW118m- <i>atoB-fadB</i>	pMW118, P <sub>trc-ideal-2</sub> -SD <sub>lacZ</sub> - <i>atoB-fadB</i> -T <sub>rrnB</sub>	[13]
pVOX1	pMW118, P <sub>trc-ideal-2</sub> -SD <sub>lacZ</sub> - <i>atoB-fadB-fadE</i> -T <sub>rrnB</sub>	Данная работа
pVOX2	pMW118, P <sub>trc-ideal-2</sub> -SD <sub>lacZ</sub> - <i>atoB-fadB-fabI</i> -T <sub>rrnB</sub>	Данная работа

Плазмиды рMW118m-*atoB-fadB-fadE* и рMW118m-*atoB-fadB-fabI*, содержащие под контролем промотора  $P_{irc-ideal-2}$  гены ферментов, способных катализировать полный каскад реакций обращенного БОЖК, и обозначенные как рВОХ1 и рВОХ2, были сконструированы на основе плазмиды рMW118m-*atoB-fadB* по ранее описанной схеме [13]. Гены *fadE* и *fabI*, кодирующие ацил-КоА дегидрогеназу и еноил-АСР редуктазу, способные катализировать финальные реакции целевого биохимического пути, первоначально были клонированы в составе вектора рUC18. С этой целью кодирующие области соответствующих генов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием пар специфических праймеров и хромосомной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы. Дизайн праймеров предполагал, что в результате подобной амплификации кодирующие области генов будут дополнительно содержать на флангах сайты узнавания *Bgl*II и *Bam*HI, расположенные, соответственно, непосредственно после старт- и непосредственно перед стоп- кодоном, а также сайты узнавания *Sal*I, расположенные на 5'-концах и сайты узнавания *Xho*I и *Kpn*I, расположенные на 3'-концах ампликонов. Полученные фрагменты ДНК были, впоследствии, клонированы в составе вектора рUC18 по сайтам *Sal*I и *Kpn*I и секвенированы. Природные сайты узнавания *Bam*HI и *Aat*II, расположенные в кодирующей области гена *fadE* были далее элиминированы в результате трехстадийного сайт-направленного мутагенеза с использованием QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit ("Agilent Technologies", США). С использованием соответствующих рUC-производных плазмид, содержащих корректные последовательности генов *fadE* и *fabI*, и рестрикционных сайтов *Aat*II, *Sal*I и *Xho*I были получены целевые плазмиды рВОХ1 и рВОХ2, производные рMW118m-*atoB-fadB*, в которых исходная бицистронная конструкция *atoB-fadB* была трансляционно сопряжена с генами *fadE* или *fabI* соответственно. Трансформацию рекомбинантных штаммов плазмидами рВОХ1 и рВОХ2 осуществляли по стандартной методике.

**Культивирование штаммов.** Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде М9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды М9, содержащей 15 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 12 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимых промоторов  $P_{irc-ideal-4}$  и  $P_{irc-ideal-2}$ , индуцировали спустя 3 ч от начала инкубации, добавляя в среды

культивирования изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

**Аналитические методы.** Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали 2.5 мМ водный раствор серной кислоты со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75/25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Количественный анализ содержания масляной кислоты в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Использовали газовый хроматограф GC-2010 Plus ("Shimadzu", Япония), укомплектованный капиллярной колонкой Stabilwax-DA ("Restek", США) длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. Газом-носителем служил гелий при постоянной объемной скорости 1.2 мл/мин. Пробы, объемом 0.5 мкл, вводили в испаритель в режиме деления потока 1 : 20. Температура испарителя и пламенно-ионизационного детектора составляла 150°C и 250°C соответственно. Термостат колонки был запрограммирован следующим образом: начальная изотерма – 2 мин при 90°C с последующим линейным градиентом до 200°C со скоростью 10°C/мин и конечной изотермой – 2 мин при 200°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные реакции обращенного БОЖК включают в себя иницирующую конденсацию двух молекул ацетил-КоА, с формированием ацетоацетил-КоА, последующее восстановление кето-интермедиата в 3-гидроксibuтирил-КоА, его дегидрирование до кротонил-КоА и последующее восстановление ненасыщенной связи, ведущее к бутирил-КоА. Таким образом, при гидролизе тиоэфирной связи бутирил-КоА под действием тиоэстеразы, конечным продуктом однократного обращения БОЖК будет являться масляная кислота. В норме, в клетках *E. coli* реакции БОЖК катализируются ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазой (КФ 2.3.1.9/16), бифункциональной (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой/

еноил-КоА-редуктазой (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17) и ацил-КоА дегидрогеназой (КФ 1.3.8.-) [17]. Однако, было показано, что в определенных условиях еноил-АЦП редуктаза *FabI* (КФ 1.3.1.9), принимающая участия в биосинтезе липидов, может также проявлять ацил-КоА дегидрогеназную активность, обеспечивая эффективное функциональное обращение БОЖК [18]. Так, ранее сконструированные штаммы  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$  и  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$  с измененной регуляцией экспрессии гена тиоэстеразы II и генов, кодирующих ферменты способные к катализу реакций обращенного БОЖК, синтезировали масляную кислоту из глюкозы при формировании бутирил-КоА под действием как ацил-КоА дегидрогеназы *FadE*, так и еноил-АЦП редуктазы *FabI* [12]. Вместе с тем, количества целевого продукта, анаэробно синтезированные рекомбинантами, были невысоки и составляли лишь ~511 мкМ и ~471 мкМ соответственно. В первую очередь это было связано, по-видимому, с низкой активностью ацил-КоА дегидрогеназ при хромосомной экспрессии в клетках единичных копий соответствующих генов. При этом, поскольку штаммы  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$  и  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$  были лишены путей смешанно-кислотного брожения, невозможность эффективного реокисления гликолитически сформированного НАДН в реакциях обращенного БОЖК ограничивала, в свою очередь, потребление рекомбинантами глюкозы в отсутствие аэрации. В настоящем исследовании, для обеспечения возможности эффективного протекания в клетках реакций обращенного БОЖК, гены ключевых ферментов пути и еноил-АЦП редуктазы были экспрессированы в базовых штаммах в составе плазмид. В качестве базового использовался штамм  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ , также как и штаммы  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$  и  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$  лишенный путей смешанно-кислотного брожения, активности неспецифичной тиоэстеразы *YciA* и экспрессирующий ген тиоэстеразы II под контролем сильного конститутивного промотора.

При экспрессии в штамме  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  целевых генов в составе плазмид, соответствующие рекомбинанты,  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX1) и  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX2), синтезировали при микроаэробной утилизации глюкозы ~4.0 мМ и ~12.9 мМ масляной кислоты соответственно, с молярными выходами, составляющими 9.3% и 30.7% (табл. 2). Таким образом, продукция целевого вещества штаммом, формирующим бутирил-КоА под действием еноил-АЦП редуктазы *FabI*, в три раза превосходила соответствующие показатели, демонстрируемые штаммом, образующим данный тиоэфир под действием ацил-КоА дегидрогеназы *FadE*. Это, по-видимому, могло являться следствием разной кофакторной специфичности указанных ферментов. В то время как еноил-АЦП редуктаза *FabI* является НАДН-зависимой, ацил-КоА дегидрогеназа *FadE* использует в качестве кофактора

$\text{FADH}_2$  и др. Соответственно, при утилизации глюкозы еноил-АЦП редуктаза может использовать в качестве восстановленных эквивалентов гликолитически сформированный НАДН непосредственно, тогда как формирование  $\text{FADH}_2$  требует вспомогательного действия флаavin редуктазы (КФ 1.5.1.37). Таким образом, как в анаэробных, так и в микроаэробных условиях внутриклеточная активность ацил-КоА дегидрогеназы могла зависеть не только от количества соответствующих белковых молекул и доступности восстановленных эквивалентов, но и лимитироваться неоптимальным действием флаavin редуктазы. Тем не менее, уровни синтеза масляной кислоты штаммами  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX1) и  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX2) значительно превосходили таковые, продемонстрированные ранее их аналогами, штаммами  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$  и  $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$ , экспрессирующими гены *atoB*, *fadB* и *fadE/fabI* в составе хромосомы. Это подтверждало предположение о необходимости обеспечения высоких уровней экспрессии целевых генов для эффективного функционирования обращенного БОЖК в клетках рекомбинантных штаммов. Интересно отметить, что штамм  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pMW118m-*atoB-fadB*), экспрессирующий в составе плазмиды лишь гены ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазы и 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-редуктазы, синтезировал в результате частичного однократного обращения БОЖК 3-гидроксимасляную кислоту из глюкозы с молярным выходом 38% [13]. 3-гидроксибутирил-КоА, из которого формировалась 3-гидроксимасляная кислота является не только субстратом для тиоэстеразы, но и интермедиатом БОЖК – предшественником бутирил-КоА. Таким образом, дополнительная экспрессия в составе плазмиды гена еноил-АЦП редуктазы *FabI*, приводящая к синтезу штаммом  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX2) масляной кислоты с выходом ~31%, обеспечивала в рекомбинанте эффективную конкуренцию между гидролизом 3-гидроксибутирил-КоА и его восстановлением в последующих реакциях БОЖК, способствуя практически количественному туннелированию соответствующего интермедиата пути в сторону формирования бутирил-КоА. Соответственно, если в штамме  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX1) продукция масляной кислоты лимитировалась, по-видимому, недостаточной активностью ацил-КоА дегидрогеназы или флаavin редуктазы, то в случае штамма  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX2) данная лимитация была обусловлена другими причинами.

При микроаэробной утилизации глюкозы, штаммы  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX1) и  $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$  (pVOX2) потребляли не весь доступный субстрат, секретировав в качестве основного продукта пировиноградную кислоту с выходами, составляющими практически 50% (табл. 2). Можно было предположить, что секреция пировиноградной кислоты, как и основное потребление глюкозы штаммами,

**Таблица 2.** Концентрации потребленного субстрата и метаболитов, секретированных исследованными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы\*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота		Уксусная кислота		Янтарная кислота		Масляная кислота	
		мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA</i> (pBOX1)	42.5 ± 2.3	21.1 ± 1.0	49.7	12.1 ± 0.8	28.4	2.8 ± 0.2	6.6	4.0 ± 0.3	9.3
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA</i> (pBOX2)	42.2 ± 2.0	20.6 ± 1.2	48.8	4.6 ± 0.6	11.0	0.5 ± 0.1	1.2	12.9 ± 1.0	30.7
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA P<sub>L</sub>-pps</i> (pBOX1)	55.8 ± 2.9	27.0 ± 1.6	48.4	16.1 ± 1.2	28.8	2.5 ± 0.1	4.5	6.0 ± 0.4	10.8
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA P<sub>L</sub>-pps</i> (pBOX2)	56.4 ± 3.2	23.8 ± 1.4	42.2	0.2 ± 0.1	0.3	—	—	22.2 ± 1.6	39.5
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA ΔatpFH</i> (pBOX1)	63.2 ± 3.5	31.6 ± 1.8	50.0	18.0 ± 1.1	28.5	2.4 ± 0.1	3.8	7.1 ± 0.5	11.2
MG44 P <sub>L</sub> - <i>tesB ΔyciA ΔatpFH</i> (pBOX2)	64.1 ± 3.3	19.5 ± 1.1	30.5	—	—	—	—	29.6 ± 1.9	46.2
BOX3.3 Δ4 P <sub>trc-id-4-fabI</sub>	42.0 ± 2.2	20.4 ± 1.2	48.6	12.6 ± 1.0	30.0	5.0 ± 0.3	11.9	0.5 ± 0.1	1.1
BOX3.3 Δ4 P <sub>trc-id-4-fabI</sub> ΔatpFH	62.8 ± 3.0	29.9 ± 1.6	47.6	18.5 ± 1.4	29.5	7.4 ± 0.4	11.8	1.2 ± 0.1	1.8

\* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

имели место на начальных этапах культивирования при достаточно высоком уровне кислорода в среде, тогда как синтез масляной кислоты по обращенному БОЖК активировался при снижении аэрации и интенсивности реокисления НАДН посредством дыхания. Реакции обращенного БОЖК, приводящие к формированию 3-гидроксibuтирил-КоА и бутирил-КоА, являются НАДН-потребляющими. При этом, гликолиз подавляется избыточными внутриклеточными уровнями как НАДН, так и АТФ [19, 20]. Снижение уровня аэрации повышает доступность НАДН эквивалентов для реакций обращенного БОЖК, но уменьшает потребность культуры в АТФ. Поэтому, при выраженной кислородной лимитации, способствующей синтезу масляной кислоты с точки зрения окислительно-восстановительного баланса, избыточные уровни АТФ могли приводить к замедлению гликолиза и падению потребления штаммами глюкозы, снижая интенсивность формирования как необходимых для синтеза целевого вещества метаболитов-предшественников, так и восстановленных эквивалентов.

Основные подходы, направленные на снижение внутриклеточного уровня АТФ и интенсификацию гликолитического потока углерода в рекомбинантных штаммах *E. coli*, включают манипуляции компонентами (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) Н<sup>+</sup>-АТФ синтазного комплекса и активацию футильных циклов [21]. Так, в частности, разобщение мембранно-связанной F<sub>0</sub> и цитоплазматической F<sub>1</sub> субъединиц (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) Н<sup>+</sup>-АТФ синтазного комплекса приводит не только к активации цитоплазматической АТФазы, но и к прекращению

генерации АТФ за счет окислительного фосфорилирования. В качестве примера футильного цикла, снижающего общеклеточный уровень АТФ за счет разницы в формировании и потреблении этого кофактора в разнонаправленных реакциях, может быть рассмотрен цикл пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота. При утилизации клетками гликолитических субстратов, пируваткиназа (КФ 2.7.1.40), катализирующая прямую реакцию цикла, ответственна за АДФ-зависимое дефосфорилирование фосфоенолпирувата в пировиноградную кислоту с образованием молекулы АТФ, а фосфоенолпируватсинтаза (КФ 2.7.9.2), фосфорилирующая пировиноградную кислоту в фосфоенолпируват, использует АТФ как кофактор, расщепляя его до АМФ. Регенерация АМФ в АТФ, с участием аденилаткиназы (КФ 2.7.4.3), расходует, при этом, два АТФ, обуславливая общую потерю одного АТФ в результате действия соответствующего футильного цикла. Данные подходы ранее успешно применялись для улучшения потребления субстрата и продукции целевых веществ рекомбинантными штаммами *E. coli* как в условиях аэрации, так и при анаэробии [22, 23]. В настоящем исследовании каждый из них был использован для улучшения продукции штаммами MG44 P<sub>L</sub>-*tesB ΔyciA* (pBOX1) и MG44 P<sub>L</sub>-*tesB ΔyciA* (pBOX2) масляной кислоты из глюкозы в микроаэробных условиях.

Активность футильного цикла пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота была обеспечена в штаммах при усилении экспрессии гена фосфоенолпируватсинтазы, *ppsA*.

Потребление глюкозы соответствующими производными, MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX1) и MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX2), возросло, по сравнению с родительскими штаммами, в 1.3 раза (табл. 2). При этом, в случае штамма MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX1), формирующего бутирил-КоА под действием ацил-КоА дегидрогеназы FadE, выход масляной кислоты повышался лишь незначительно, с 9.3% до 10.8%, тогда как штамм MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX2) синтезировал целевой продукт с выходом, выросшим практически на треть – до 39.5%. Соответственно повышение выхода масляной кислоты, пропорциональное увеличению потребления штаммом MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX2) глюкозы, указывало на то, что продукция целевого вещества штаммом возросла, в первую очередь, в результате большей доступности для обращенного БОЖК восстановленных эквивалентов и метаболитов предшественников. Действительно, титр синтезированной штаммом масляной кислоты возрастал за счет прекращения секреции янтарной кислоты, выраженного снижения формирования уксусной кислоты и некоторого падения накопления пировиноградной кислоты (табл. 2). Это свидетельствовало об интенсификации потока углерода от пировиноградной кислоты к ацетил-КоА, через реакцию катализируемую НАДН-генерирующей пируватдегидрогеназой, с последующим туннелированием соответствующего КоА-производного в реакции обращенного БОЖК, эффективно потребляющие этот тиоэфир за счет возросшей доступности гликолитического НАДН. Ограниченный рост синтеза масляной кислоты штаммом MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA P<sub>L</sub>-ppsA* (pVOX1) свидетельствовал, таким образом, о правомочности предположения относительно неоптимальной активности в штамме ацил-КоА дегидрогеназы и/или флавин редуктазы.

При разобщении компонентов Н<sup>+</sup>-АТФ синтазного комплекса, за счет делеции генов *atpFH*, потребление глюкозы штаммами MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) и MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2) возрастало в 1.5 раза по отношению к исходным рекомбинантам с интактным комплексом (табл. 2). Продукция масляной кислоты штаммом MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) продолжала оставаться ограниченной, и выход целевого продукта возрастал лишь до 11.2%. Штамм MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2) секретировал практически 30 мМ масляной кислоты с выходом из глюкозы, возросшим до ~46%. При этом, соответствующее вещество становилось основным продуктом утилизации углеродного субстрата, в то время как единственным детектированным побочным продуктом оставалась пировиноградная кислота, выход которой из глюкозы падал до 30%. Соответственно, выраженное снижение внутриклеточного уровня АТФ вследствие прекращения его формирования при окислительном фосфорилировании

и принудительном гидролизе цитоплазматической АТФазой, в большей степени способствовало интенсификации потока углерода через гликолиз и реакции обращенного БОЖК, нежели опосредованное интерконверсией пировиноградная кислота – фосфоенолпируват. Вместе с тем, остаточная секреция штаммом пировиноградной кислоты, предполагающая возможность дальнейшего увеличения степени конверсии субстрата в целевой продукт, указывала на то, что при исключении АТФ-опосредованного торможения гликолиза, часть гликолитически сформированных НАДН-эквивалентов реокислялась посредством дыхания, оставаясь недоступными для реакций обращенного БОЖК. Это свидетельствовало о том, что для оптимизации микроаэробного биосинтеза масляной кислоты из глюкозы сконструированными штаммами необходимо соблюдение определенного баланса между окислительно-восстановительным и энергетическим статусами клетки. Очевидно, что оба параметра, зависящие от степени аэрации, могут быть подвержены тонкой регуляции при культивировании рекомбинантов в контролируемых условиях в биореакторах. Это предполагает проведение дальнейших экспериментов по масштабированию процесса микробиологического синтеза целевого вещества с использованием штаммов, сконструированных в данном исследовании.

Следует отметить, что позитивный эффект форсированного гидролиза АТФ на микроаэробный биосинтез масляной кислоты из глюкозы, в ходе вышеописанных экспериментов, был наиболее четко продемонстрирован в штамме MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2). Однако повышенная экспрессия даже нативных генов в составе плазмид, в общем случае, приводит к повышенной нагрузке на клетки рекомбинантного штамма-производителя. Поэтому, соответствующий эффект оценивали также в штамме VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fabI*, экспрессирующим гены ферментов ответственных за катализ реакции обращенного БОЖК в составе хромосомы.

При инактивации генов *atpFH*, потребление глюкозы штаммом VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fabI ΔatpFH* возрастало аналогично таковому, продемонстрированному штаммами MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) и MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2). Вместе с тем, степень конверсии рекомбинантом глюкозы в секретированные метаболиты практически не отличалась от показателей контрольного штамма VOX3.3 Δ4 P<sub>irc-id-4</sub>-*fabI*, а синтез масляной кислоты сохранялся на крайне низком уровне (табл. 2). В совокупности это указывало на необходимость совместного обеспечения благоприятного метаболического статуса клетки и повышенного уровня экспрессии ключевых генов для достижения возросших уровней синтеза масляной кислоты из глюкозы направленно сконструированными штаммами *E. coli*.

В итоге, в результате проведенного исследования, сконструированы штаммы *E. coli* способные к эффективному биосинтезу масляной кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК. Повышенные уровни конверсии субстрата в целевой продукт достигнуты при экспрессии в базовых штаммах генов ферментов, ответственных за катализ реакций обращенного БОЖК, в составе плазмид. Показано позитивное влияние на биосинтез штаммами целевого соединения форсированного гидролиза АТФ. Стратегия дальнейшего улучшения параметров микробиологического синтеза масляной кислоты с использованием сконструированных бутират-продуцирующих штаммов предполагает необходимость оптимизации процесса в контролируемых условиях аэрации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-14-00040).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dwidar M., Park J.Y., Mitchell R.J., Sang B.I.* // *Sci. World. J.* 2012. V. 2012. 471417. <https://doi.org/10.1100/2012/471417>
2. *Sjoblom M., Risberg P., Filippova A., Ohrman O.G.W., Rova U., Christakopoulos P.* // *CemCatChem.* 2017. V. 9. P. 4529–4537.
3. *Dürre P.* // *Biotechnol. J.* 2007. V. 2. № 12. P. 1525–1534.
4. *Jha A.K., Li J., Yuan Y., Baral N., Ai B.* // *Int. J. Agric. Biol.* 2014. V. 16. P. 1019–1024.
5. *Zigová J., Šturdík E.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 24. P. 153–160.
6. *Luo H., Yang R., Zhao Y., Wang Z., Liu Z., Huang M., Zeng Q.* // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 253. P. 343–354.
7. *Volker A.R., Gogerty D.S., Bartholomay C., Hennen-Bierwagen T., Zhu H., Bobik T.A.* // *Microbiology.* 2014. V. 160. P. 1513–1522.
8. *Saini M., Wang Z.W., Chiang C.J., Chao Y.P.* // *J. Agric. Food. Chem.* 2014. V. 62. № 19. P. 4342–4348.
9. *Kataoka N., Vangnai A.S., Pongtharangkul T., Yakushi T., Matsushita K.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2017. V. 123. № 5. P. 562–568.
10. *Wang L., Chauliac D., Moritz B.E., Zhang G., Ingram L.O., Shanmugam K.T.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2019. V. 12. № 62. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1408-9>
11. *Серегина Т.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г., Миронов А.С.* // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 24–35.
12. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2022. Т. 58. № 4. С. 330–337.
13. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
14. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.*
15. *Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 4. С. 342–352.
16. *Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Fermentation.* 2022. V. 8. № 12. 738. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
17. *Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K.* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 66. № 4. P. 829–839.
18. *Vick J.E., Clomburg J.M., Blankschien M.D., Chou A., Kim S., Gonzalez R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 54. P. 1406–1416.
19. *Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 14. P. 3909–3916.
20. *Vemuri G.N., Altman E., Sangurdekar D.P., Khodursky A.B., Eiteman M.A.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 5. P. 3653–3661.
21. *Hädicke O., Klamt S.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2015. V. 43. № 6. P. 1140–1145.
22. *Causey T.B., Shanmugam K.T., Yomano L.P., Ingram L.O.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. № 8. P. 2235–2240.
23. *Hädicke O., Bettenbrock K., Klamt S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2015. V. 112. № 10. P. 2195–2199.

## Optimization of Biosynthesis of Butyric Acid from Glucose Through the Inverted Fatty Acid $\beta$ -Oxidation Pathway by Recombinant *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich<sup>a,\*</sup>, A. Yu. Skorokhodova<sup>a</sup>, V. G. Debabov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia  
\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

The biosynthesis of butyric acid from glucose through the inverted fatty acid  $\beta$ -oxidation by recombinant *Escherichia coli* strains was optimized. The increased yield of the target compound was achieved resulting from the plasmid expression of *atoB*, *fadB* and *fadE/fabI* genes in the core strain MG $\Delta$ 4 P<sub>L</sub>-*tesB*  $\Delta$ *yciA* (MG1655  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*tesB*,  $\Delta$ *yciA*). The positive effect of enforced ATP hydrolysis on microaerobic conversion of carbohydrate substrate to the final product by the recombinants was demonstrated. Activation of the futile cycle of pyruvate-phosphoenolpyruvate-pyruvate, due to the increased expression of the *ppsA* gene, ensured a marked increase in glucose consumption by the recombinants and led to an increase in the molar yield of butyric acid up to 39.5%. When the components of the H<sup>+</sup>-ATP synthase complex were uncoupled resulting from the deletion of *atpFH* genes, the molar yield of butyric acid from glucose demonstrated by the strain forming butyryl-CoA by the action of enoyl-ACP reductase FabI reached 46%.

*Keywords:* ATP, butyric acid, butyryl-CoA, *Escherichia coli*, fatty acid  $\beta$ -oxidation, metabolic engineering

УДК 579.66

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БЕЛКА ГОРОХА

© 2024 г. И. В. Кравченко<sup>1, \*</sup>, В. А. Фуралев<sup>1</sup>, Е. С. Пшенникова<sup>1</sup>, Е. В. Костылева<sup>2</sup>,  
А. С. Середина<sup>2</sup>, Е. И. Курбатова<sup>2</sup>, Н. В. Цурикова<sup>2</sup>, А. Н. Федоров<sup>1</sup>, В. О. Попов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, 111033 Россия

\*e-mail: ink71@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.02.2024 г.

После доработки 26.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

В работе исследовано влияние четырех ферментных препаратов (ФП): Бациллолизина, Агропрота, Протозима и Протозима С (Россия), белковый и пептидный профили белкового изолята, выделенного из гороха сорта Фокор, а также на его запах и вкус. Показано, что обработка ферментами позволяет улучшить запаховые характеристики изолята. Так, удалось заметно понизить выраженность запаха бобовых и травянистого запаха. В то же время ферментная обработка позволяла улучшить также и вкус изолята: удалось весьма существенно уменьшить выраженность таких мешающих привкусов, как бобовый, терпкий, горький и травянистый. Полученные результаты позволили подобрать ФП (грибная кислая аспаратная протеаза) для улучшения органолептических параметров изолятов горохового белка, предназначенных для изготовления аналогов мясных и молочных продуктов.

**Ключевые слова:** нейтральная протеаза, кислая протеаза, щелочные протеазы, изолят белка гороха, органолептические свойства

DOI: 10.31857/S0555109924040031 EDN: SBJCNE

Использование изолятов горохового белка для производства растительных аналогов пищевых продуктов животного происхождения является перспективным направлением прикладной биотехнологии. Основным методом получения изолятов горохового белка является метод щелочной экстракции с последующим изоэлектрическим осаждением при рН в области изоэлектрической точки [1]. Получаемый таким способом продукт характеризуется высоким содержанием ценного в питательном отношении белка (80%) с оптимальным соотношением почти всех незаменимых аминокислот, он обладает хорошей растворимостью при нейтральных значениях рН.

Однако такой метод выделения не позволяет избавиться от характерного бобового запаха, а иногда и ряда других запахов, что сильно затрудняет его использование в пищевой промышленности. Для большинства потребителей наличие бобового запаха существенно снижает потребительскую

ценность растительных аналогов молока, йогурта, мяса и колбас, а также спортивных напитков на основе гороховых белков. Помимо этого, получаемый вышеописанным методом изолят обладает вкусом, далеким от нейтрального и кроме сильно выраженного бобового вкуса, имеется целый ряд заметных привкусов, включая горький, терпкий и травянистый.

Существует несколько подходов к получению изолятов растительных белков с относительно нейтральными органолептическими свойствами. Можно модифицировать методику выделения, вводя в неё дополнительные стадии очистки, однако этот подход приводит к существенному удорожанию конечного продукта. Простым, экономичным и технологичным способом является обработка изолята протеолитическими ферментами. Описано применение этого подхода для улучшения как функционально-технических, так и органолептических показателей изолята растительного белка

[2–4]. В то же время количество работ, в которых изучалось воздействие протеаз на изолят горохового белка, относительно невелико. В предыдущем исследовании [5] было изучено влияние протеаз различных классов на растворимость, эмульгирующие и пенообразующие свойства таких изолятов. В этой связи представляет особенный интерес сравнение воздействия протеаз различных классов (щелочных, нейтральных и кислых) на органолептические свойства изолята горохового белка.

В ходе работы изучалось действие протеаз трех вышеупомянутых классов, причем для исследования были взяты ферменты различного происхождения: бактериального и грибного.

Цель работы – изучение влияния таких протеаз, как нейтральная протеаза *Bacillus subtilis*-96 (БНП) – Бациллолизин, кислая грибная аспаратная протеаза (ГКП) – Агропрот, бактериальная щелочная сериновая протеаза (БЩП) – Протозим, грибная щелочная сериновая протеаза (ГЩП) – Протозим С, на вкусовые и запаховые характеристики изолята горохового белка, а также на его белковый и пептидный профиль.

## МЕТОДИКА

**Выделение изолята горохового белка.** Для выделения изолята горохового протеина использовалась общепринятая методика [6]. Гороховую муку (150 г) суспендировали в 1.5 л воды, доводили pH до 9.0 с помощью 1 М NaOH и экстрагировали 2 ч. Суспензию центрифугировали при 4200 g 20 мин, pH супернатанта доводили до 4.5 с помощью 5 М HCl и инкубировали 2 ч. Суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 20 мин при 4°C, осадок белка растворяли в 200 мл воды, доводили pH с помощью 1 М NaOH до 7.0 и высушивали на распылительной сушке.

**Гельпроникающая хроматография.** Анализ белкового профиля проводили на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE HealthCare, США), уравновешенной забуференным физраствором (ЗФР) (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 M NaCl pH 7.4) с использованием хроматографа АКТА™FPLC (GE HealthCare, США), образец белкового изолята 10 мг/мл суспендировали в ЗФР, встряхивали 1 ч при комнатной температуре, затем центрифугировали при 10000 g 10 мин наносили на колонку по 100 мкл. Профиль элюции регистрировали при длине волны 280 нм.

Анализ пептидного профиля проводили на колонке Superdex peptide 10/300 GL (GE HealthCare, США), уравновешенной 50 mM HCl. Образец суспендировали в 50 mM HCl в концентрации 10 мг/мл, встряхивали 1 ч при комнатной температуре, затем центрифугировали 10000 g 10 мин и наносили на колонку по 100 мкл. Профиль элюции регистрировали при длине волны 214 нм.

**Обработка ферментами.** В работе были использованы следующие ферментные препараты: бактериальной нейтральной протеазы (КФ 3.4.24.28, БНП) – Бациллолизин, лабораторный образец предоставлен ВНИИПБТ. Препарат кислой грибной аспаратной протеазы (КФ 3.4.23.20, ГКП) – пенициллопепсин (ФП Агропрот, ООО “Агрофермент”, Россия). Препарат бактериальной щелочной сериновой протеазы (КФ 3.4.21.62, БЩП) – субтилизин бактериальный (ФП Протозим) и препарат грибной щелочной сериновой протеазы (КФ 3.4.21.62, ГЩП) – субтилизин грибной, ФП Протозим С, производства ТД “Биопрепарат”, Россия.

Для проведения ферментативной обработки изолят горохового белка суспендировали в дистиллированной воде, получая концентрацию белка 50 мг/мл, инкубировали 30 мин при встряхивании на шейкере ИКА МТС 2/4 при 300 об./мин. Затем pH суспензии доводили до требуемого значения для обработки БЩП и ГЩП – до 8.0, БНП – до 7.0, ГКП до 5.0 и прогревали на водяной бане до 50°C. Далее добавляли к суспензии фермент и инкубировали в термостате при перемешивании 1 ч. Выбранная рабочая активность БЩП, ГЩП и ГКП составила 1.5 Ед/мл, а БНП – 8.9 мЕд/мл. Ферменты инактивировали нагреванием на водяной бане 10 мин при 85°C, полнота инактивации была доказана инкубацией инактивированных ферментов с изолятом с последующим электрофорезом с додецилсульфатом натрия.

**Сенсорный анализ.** Для органолептического тестирования готовили 5%-ную белковую суспензию на питьевой воде. Тестировали гидролизованные и необработанные образцы, которые были подписаны случайными номерами [3]. В тестировании участвовало 7 человек, дескрипторы запаха и вкуса оценивали по 10-бальной шкале [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние обработки протеолитическими ферментами на запах изолятов.** Из всех исследованных ферментов ГКП наиболее существенно снижал выраженность бобового запаха изолята (табл. 1): после обработки данным ферментом она уменьшилась более, чем на 2.5 балла. Эффект БНП был немного слабее: он понижал интенсивность бобового запаха немного более, чем на 2 балла. БЩП и ГЩП практически не изменяли интенсивность данного запаха. У необработанного изолята также присутствовал травянистый запах, хотя его интенсивность была и существенно ниже, чем бобового. Из исследованных ферментов только ГКП существенно уменьшал интенсивность этого запаха (на 1.7 балла), остальные ферменты понижали его интенсивность весьма незначительно.

**Таблица 1.** Влияние на запах изолята горохового белка обработки препаратами БНП, ГКП, БЩП и ГЩП (оценка по десятибалльной шкале)

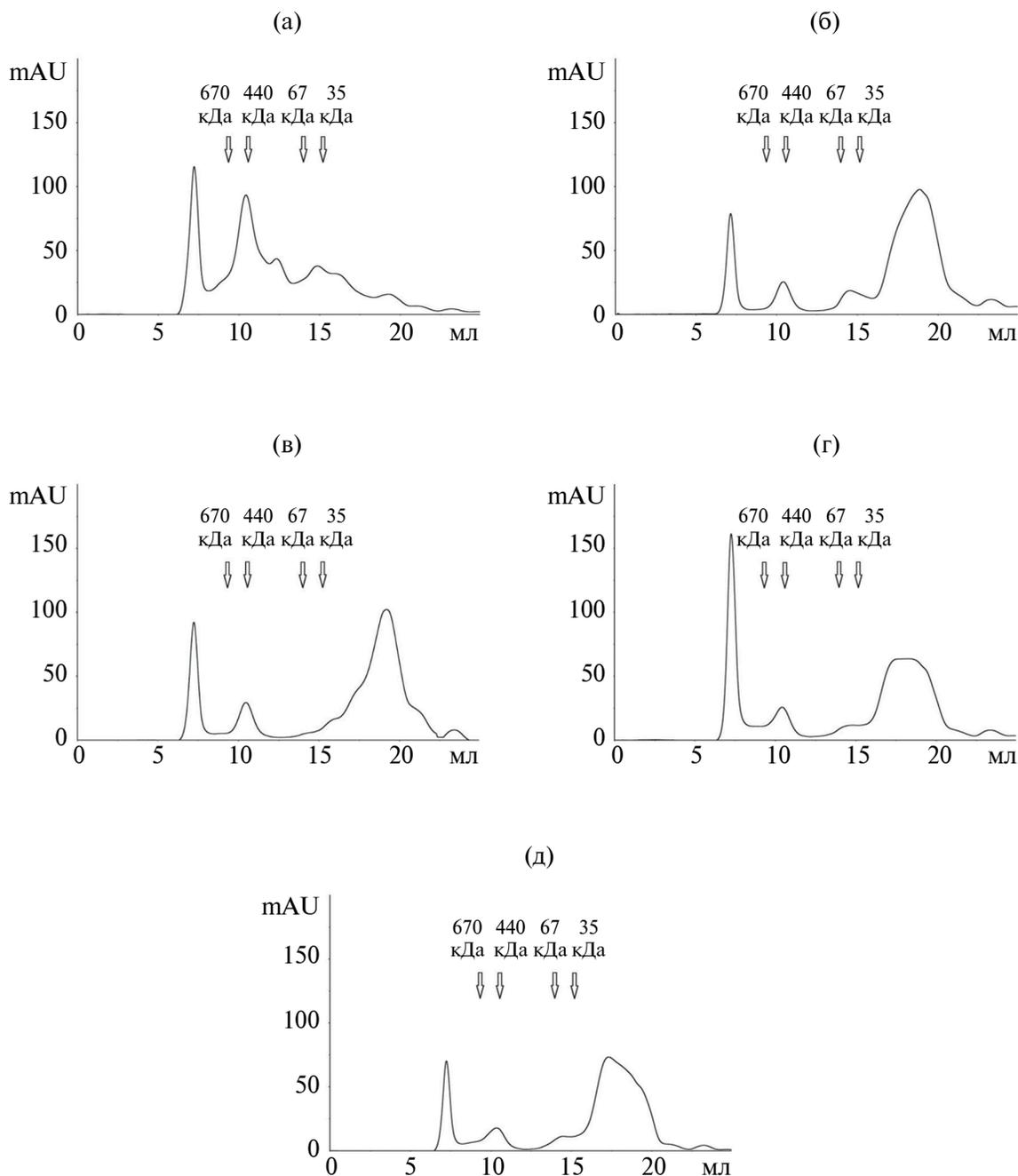
Характеристика запаха	БНП	ГКП	БЩП	ГЩП	Без обработки
Бобовый	0.86	0.57	3	3	3.14
Травянистый	0.86	0.14	1	1.43	1.86
Ореховый	0.43	0.29	0.86	1	1.0
Сладкий	0	0.86	0	0	0
Мучнистый	1	0	0	0	0

Бобовый запах создается комбинацией большого количества различных по химическому составу веществ [8]. В коммерческом продукте Nutralys® (Roquette, Франция) большинство из 71 запахоактивных соединений были альдегидами, затем шли кетоны и карбоновые кислоты, однако в количественном отношении кетоны преобладали, затем шли спирты и альдегиды, затем остальные вещества. Среди них были обнаружены в существенных количествах 2-метил-3-гептанон, этиловый эфир пропановой кислоты, гексаналь, гептаналь, 3,5-октадиен-2-он, гексановая кислота, октанол, 5-этилдигидрофуранон и др. Значительная часть запахоактивных веществ образуется из липидов семян гороха. Они легко подвергаются окислению как неферментативным путем, так и за счет липоксигеназной активности [9], и это окисление приводит к образованию соединений, типичных для бобового аромата. Основной жирной кислотой в гороховой муке и получаемом из нее изоляте является линолевая кислота. Многие ароматические соединения, упомянутые выше, образуются при окислении линолевой кислоты: ферментативное и неферментативное окисление приводит к образованию нескольких гидропероксидов, при разложении которых образуются вторичные продукты - альдегиды, кетоны, кислоты и сложные эфиры.

Важно отметить, что многие из этих соединений обладают способностью связываться с белками горохового изолята, поэтому от них не удастся полностью избавиться в процессе выделения методом щелочной экстракции и осаждения в изоэлектрической точке. Взаимодействия между белком и ароматическим соединением обусловлены обратимыми гидрофобными, гидрофильными, Ван-дер-Ваальсовыми, ионными взаимодействиями, но также и необратимым ковалентным связыванием. Было показано, что вицилин высокоаффинно связывает альдегиды и кетоны, а легумин имеет высокое сродство к альдегидам, но кетоны связывает гораздо хуже [10]. В связи с этим представляет несомненный интерес изучение влияния протеолитических ферментов на спектр белковых комплексов изолята.

**Влияние обработки протеолитическими ферментами на профиль белковых комплексов изолята.** В процессе протеолиза всеми четырьмя исследованными ферментами профиль распределения по молекулярной массе белковых комплексов изолята изменялся. В профиле исходного необработанного изолята (рис. 1а) в большом количестве представлены три комплекса: 150–210, 320–380 кДа и комплекс с очень большой молекулярной массой, первым элюируемый с колонки гелепроникающей хроматографии. Первый из этих комплексов соответствует 7S растительным глобулинам [11], среди которых в семенах гороха в большом количестве присутствуют вицилин и конвицилин. Второй комплекс соответствует 11S глобулинам [11], в семенах гороха из этих белков важнейшее место занимает легумин, хотя в составе этого комплекса содержится также и конвицилин, и другие белки. Наконец, третий комплекс образуется огромными агрегатами, включающими и 7S, и 11S глобулины, а также различные другие белки.

Ограниченный протеолиз изолятов различными протеолитическими ферментами существенно изменял белковый профиль изолятов. Так, первый комплекс (7S глобулины) исчезал после обработки изолята всеми четырьмя ФП (рис. 1б–1д). Ранее [5] было показано, что каждый из исследованных ферментов расщепляет хотя бы один из белков, принадлежащих к классу 7S: БНП расщепляет вицилин, а ГКП, БЩП и ГЩП и расщепляют как вицилин, так и конвицилин. По-видимому, исчезновение данного комплекса из профиля распределения белков по молекулярной массе объяснялась этим обстоятельством. Второй комплекс ни в одном случае не исчезал полностью (рис. 1б–1д), но его количество заметно снижалось после обработки всеми четырьмя ферментами. Что же касается третьего, самого высокомолекулярного комплекса, то обработка тремя исследованными ферментами (БНП, ГКП и ГЩП) понижала его количество (рис. 1б, 1в и 1д), а после обработки изолята БЩП его количество увеличивалось (рис. 1г). Это увеличение может объясняться тем, что после ограниченного протеолиза БЩП фрагменты расщепляемых белков стали обладать повышенной склонностью к агрегации, так как исследованные ферменты имели разную специфичность



**Рис. 1.** Хроматография необработанного изолята горохового белка (а), а также изолятов, обработанных препаратами БНП (б), ГКП (в), БШП (г) и ГШП (д), на колонке Superdex 2000 10/300 G1.

к расщепляемым последовательностям аминокислот, и, следовательно, фрагменты даже одного белка, образуемые в результате протеолиза различными ферментами, будут обладать разными свойствами.

Фермент ГКП, наиболее существенно снижающий интенсивность бобового запаха изолята, понижал количество всех трех комплексов, благодаря чему, вероятно, и происходило такое снижение. Не совсем понятно, почему обработка остальными

ферментами не приводила к столь же существенному уменьшению запаха. Возможно, в обработанных ими изолятах запахоактивные вещества связывались с белками и комплексами промежуточной молекулярной массы (35–70 кДа) – эти белки наиболее интенсивно расщеплялись именно ГКП (рис. 1в), а не другими ферментами. Также возможно, что запахоактивные вещества связывались с третьим, наиболее высокомолекулярным

**Таблица 2.** Влияние на вкус изолята горохового белка обработки препаратами БНП, ГКП, БЩП и ГЩП (оценка по десятибалльной шкале)

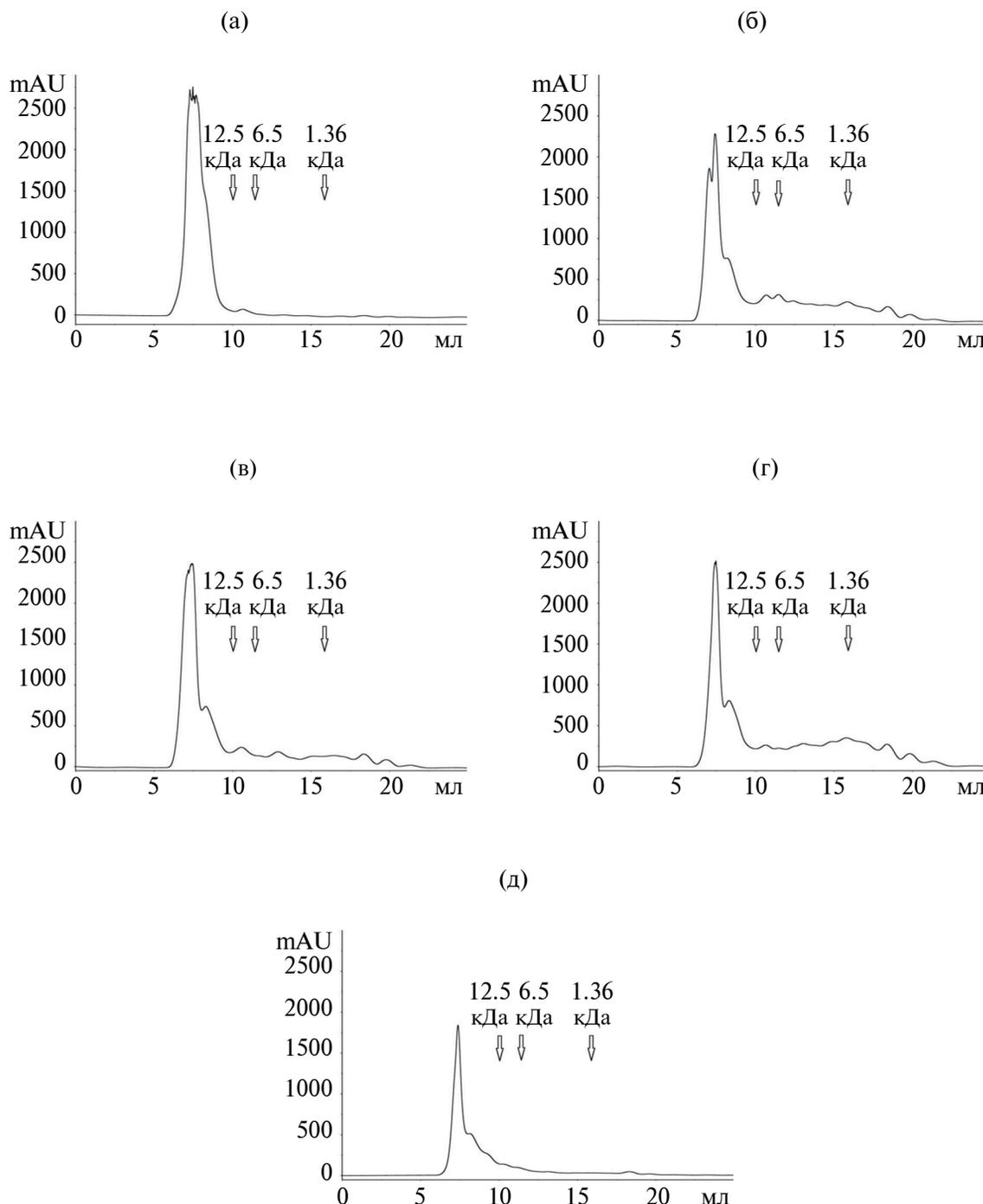
Оценка вкуса	БНП	ГКП	БЩП	ГЩП	Без обработки
Соленый	0.57	0.43	0.86	1	0.86
Бобовый	1.86	1.14	2.86	4.14	5
Горький	2.43	0.86	3	3.14	4.86
Терпкий	2.57	1.43	3.57	4.14	5.14
Травянистый	1.86	0	2.14	1.86	3.14
Ореховый	2.14	1.86	2	2.14	0
Сладкий	0.14	0.86	0	0	0.29
Мучнистый	0.86	0	0.14	0	0

комплексом, структура которого, а следовательно, и способность связывать различные низкомолекулярные соединения, была различна после обработки изолята разными ферментами. В пользу второго предположения свидетельствует тот факт, что БНП также понижал интенсивность бобового запаха изолята, хотя и не столь сильно, но в обработанном им изоляте сохранялось существенное количество белков и комплексов с молекулярной массой в диапазоне 35–70 кДа (рис. 16).

**Влияние обработки протеолитическими ферментами на вкус изолятов.** Все четыре исследованных фермента заметно изменяли вкус изолята горохового белка (табл. 2). Наиболее существенные изменения наблюдались в результате обработки ГКП. Она снизила выраженность бобового вкуса конечного продукта почти на 4 балла, привкус горечи был снижен на 4 балла, терпкий привкус – более, чем на 3.5 балла, а травянистый – более, чем на 3 балла и исчез вовсе. Кроме того, обработка ГКП почти на 2 балла повысила выраженность орехового вкуса. Заметные изменения вкуса, хотя и не столь масштабные, наблюдались и при обработке изолята БНП. Этот фермент также уменьшил выраженность бобового вкуса конечного продукта, хотя и не столь сильно, но более, чем на 3 балла. Привкус горечи он снизил более чем на 2.5 балла, терпкий привкус был снижен более чем на 3 балла, а травянистый – почти на 1.3 балла. Выраженность орехового вкуса повысилась более, чем на 2 балла. Обработка БЩП приводила лишь к небольшим изменениям вкуса изолята: выраженность бобового вкуса снижалась немного более чем на 2 балла, горький привкус – почти на 2 балла, терпкий привкус уменьшался приблизительно на 1.5 балла, а травянистый – на 1 балл. Выраженность орехового вкуса повышалась на 2 балла. Обработка ГЩП вызывала еще менее существенное улучшение вкусовых свойств изолята, выраженность горького привкуса снижалась приблизительно на 1.7 балла, травянистого – почти на 1.3 балла.

Вкус белкового изолята определяется множеством различных соединений разного химического состава. Так, специфический бобовый вкус создается сложной комбинацией разных веществ, состав и соотношение которых пока недостаточно изучены [12]. Согласно одним данным, терпкий вкус продукту придают различные низкомолекулярные вещества, в первую очередь танины [13]. Однако в другой работе показано, что в создании этого вкусового оттенка важную роль играют белки альбуминовой фракции с молекулярной массой в диапазоне 35–70 кДа [14]. В этой связи важно отметить, что в проведенных экспериментах наибольшее снижение терпкого вкуса было достигнуто в результате обработки изолята ГКП, наиболее интенсивно расщеплявшим именно эту фракцию белков. Имеются данные, что горький вкус изоляту могут придавать определенные низкомолекулярные соединения: сапонины, в особенности соясапонин I и (2,3-дигидро-2,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он)-сапонин [15, 16], а также продукты перекисного окисления липидов [17]. Следует отметить, что низкомолекулярные вещества, влияющие на вкус изолята, обычно связываются с различными белками гороха, и не удаляются в процессе выделения по обычной методике. В то же время, в других работах было показано, что наличие горького вкуса часто обусловлено присутствием небольших пептидов, имеющих гидрофобные остатки [18]. В связи с этим представляет несомненный интерес изучение влияния протеолитических ферментов на пептидный спектр изолята.

**Влияние обработки протеолитическими ферментами на пептидный профиль изолята.** Исходный необработанный изолят содержал относительно небольшое количество пептидов с молекулярной массой менее 12 кДа (рис. 2а). После обработки всеми исследованными протеолитическими ферментами общее количество пептидов существенно увеличилось. Гидролизаты, полученные в результате обработки изолята разными ферментами, имели различные профили распределения пептидов по



**Рис. 2.** Хроматография необработанного изолята горохового белка (а), а также изолятов, обработанных препаратами БНП (б), ГКП (в), БЩП (г) и ГЩП (д), на колонке SuperdexPeptide 10/300 G1.

молекулярной массе. Так, на пептидном профиле изолята, обработанного БНП, можно четко различить пики, соответствующие пептидам с молекулярными массами около 10, 7.6, 5.3 и менее 0.5 кДа (рис. 2б). Пептидный профиль изолята, обработанного ГКП, содержал три четких пика, соответствующих пептидам с молекулярными массами около 10.3, 4.3 и менее 0.5 кДа, а также очень размытый

участок в диапазоне 0.7–1.9 кДа (рис. 2в). На пептидном профиле изолята, обработанного БЩП, можно заметить два довольно размытых пика, соответствующих пептидам с молекулярными массами около 10.8 и 7.3 кДа, и очень размытый участок, соответствующий пептидам с молекулярными массами 3.2–5.0 кДа, а также пик с молекулярной массой менее 0.5 кДа (рис. 2г). Наконец, изолят,

обработанный ГЩП, показал сходный пептидный профиль, при этом первые два пика соответствовали пептидам с чуть большей молекулярной массой около 11.2 и 8.3 кДа, а третий участок захватывал диапазон от 4.3 до 3.3 кДа (рис. 2д).

Один пептидный профиль не позволил провести сопоставление горького вкуса, сильно выраженного у некоторых изолятов, с определенными пептидами, для такого сопоставления нужны дальнейшие исследования. Можно лишь сделать предположение, что уменьшение горького вкуса, наблюдающееся при обработке изолята ГКП, связано со значительным уменьшением содержания пептидов диапазона 7.3–8.3 кДа (рис. 2в), однако это предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Таким образом, для улучшения органолептических свойств изолята горохового белка наиболее предпочтительным выбором будет использование ГКП, так как именно этот фермент весьма существенно снизил выраженность как бобового и травянистого запахов конечного продукта, так и мешающих привкусов (бобового, терпкого, горького и травянистого).

В предыдущем исследовании было изучено влияние протеолитических ферментов на функционально-технологические свойства изолята [5]. Было показано, что для улучшения этих свойств наиболее целесообразно использовать БЩП, поскольку этот фермент весьма существенно повышал растворимость изолята при pH 5.0, эмульгирующую активность при pH 5.0 и 6.0, стабильность эмульсии при pH 6.0, пенообразование при pH 5.0 и 6.0, а также стабильность пены при pH 5.0. Однако в настоящем исследовании было показано, что этот фермент практически не улучшает органолептические показатели изолята горохового белка. Улучшающий эти свойства фермент ГКП в предыдущей работе продемонстрировал способность улучшать также и некоторые функционально-технологические свойства: повышал растворимость изолята, стабильность эмульсии, пенообразование и стабильность пены при pH 5.0. Последний показатель он увеличивал также и при pH 6.0, хотя величина эффекта была относительно невелика. Следовательно, при необходимости проводить комплексное улучшение органолептических и функционально-технологических свойств изолята горохового белка выбор фермента зависит от того, насколько сильно требуется скорректировать последние. Если достаточно небольшого увеличения соответствующих показателей, то можно рекомендовать обработку ГКП. Если же требуется более масштабное улучшение функционально-технологических свойств конечного продукта, то, вероятно, следует использовать обработку двумя различными ферментами, что однако нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Таким образом, в результате проведенной работы было исследовано влияние различных протеолитических ферментных препаратов отечественного

производства на запах и вкус изолята белка гороха, изучено их влияние на белковый и пептидный профиль изолята. Был подобран фермент, позволяющий существенно повысить органолептические параметры изолятов, имеющие важнейшее значение при производстве растительных аналогов животных продуктов, а также продуктов для спортивного и лечебного питания.

В работе было использовано научное оборудование ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”, а также за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2022–2024 годы (тема № FGMP-2022-0006).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Asen N.D., Aluko R.E., Martynenko A., Utioh A., Bhowmik P.* // Foods. 2023. V. 12. № 21. 3978. <https://doi.org/10.3390/foods12213978>
2. *Humiski L.M., Aluko R.E.* // J. Food Sci. 2007. V. 72. № 8. S605–S611. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00475.x>
3. *García Arteaga V., Demand V., Kern K., Strube A., Szardenings M., Muranyi I. et al.* // Foods. 2022. V.11. № 1. 118. <https://doi.org/10.3390/foods11010118>
4. *Barac M., Cabrilo S., Pešić M., Stanojević S., Pavličević M., Mačej O., Ristić N.* // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. № 12. P. 8372–8387. <https://doi.org/10.3390/ijms12128372>
5. *Кравченко И.В., Фуралев В.А., Костылева Е.В., Середина А.С., Курбатова Е.И., Цурикова Н.В. и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2024. V. 60. № 1. в печати.
6. *Barac M., Cabrilo S., Pesic M., Stanojevic S., Zilic S., Macej O., Ristic N.* // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. № 12. P. 4973–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms11124973>
7. *Onyeoziri I.O., Kinnear M., de Kock H.L.* // J. Sci. Food Agric. 2018. V. 98. № 6. P. 2231–2242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8710>

8. Murat C., Bard M.-H., Dhalleine C., Cayot N. // Food Res Int. 2013. V. 53. P. 31–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.049>
9. Hoover R., Cloutier L., Dalton S., Sosulski F.W. // Starch. 1988. V. 40. № 9. P. 336–342.  
<https://doi.org/10.1002/star.19880400904>
10. Heng L., van Koningsveld G.A., Gruppen H., van Boekel M.A.J.S., Vincken J.P., Roozen J.P., Voragen A.G.J. // Trends in Food Science & Technology. 2004. V. 15. №3–4. P. 217–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.018>
11. Lu Z.X., He J.F., Zhang Y.C., Bing D.J. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2020. V. 60. № 15. P. 2593–2605.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>
12. Liu Y., Cadwallader D.C., Drake M. // Food Chem. 2023. V. 16. 406. 134998.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134998>
13. Soares S., Brandão E., Guerreiro C., Soares S., Mateus N., de Freitas V. // Molecules. 2020. V. 25. № 11. 2590.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25112590>
14. Lesme H., Kew B., Bonnet L., Sarkar A., Stellacci F. // Food Hydrocolloids. 2024. V. 149. 109489.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109489>
15. Heng L., Vincken J.-P., van Koningsveld G., Legger A., Gruppen H., van Boekel T., Voragen F. // J. Sci. Food and Agriculture. 2006. V. 86. № 8. P. 1225–1231.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2473>
16. Reim V., Rohn S. // Food Research International. 2015. V. 76. P. 3–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.043>
17. Gläser P., Dawid C., Meister S., Bader-Mittermaier S., Schott M., Eisner P., Hofmann T. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2020. V. 68. P. 10374–10387.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06663>
18. Saha G.B.C., Hayashi K. // Biotechnol. Adv. 2001. V. 19. № 5. P. 355–370.  
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00070-2)

## The Effect of Various Domestically Produced Proteolytic Enzyme Preparations on the Organoleptic Properties of Pea Protein Isolates

I. V. Kravchenko<sup>a,\*</sup>, V. A. Furalyov<sup>a</sup>, E. S. Pshennikova<sup>a</sup>, E. V. Kostyleva<sup>b</sup>, A. S. Sereda<sup>b</sup>, E. I. Kurbatova<sup>b</sup>, N. V. Tsurikova<sup>b</sup>, A. N. Fedorov<sup>a</sup>, V. O. Popov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – a Branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 111033 Russia*

\**e-mail: ink71@yandex.ru*

The work investigated the effect of four enzyme preparations (EP): Bacillolysin, Agroprot, Protozyme and Protozyme C (Russia), on smell, taste, as well as protein and peptide profiles of protein isolate isolated from Focor peas. It has been shown that enzyme treatment improves the odor characteristics of the isolate. Thus, it was possible to significantly reduce the severity of bean and herbal smell. At the same time, enzyme treatment also improved the taste of the isolate: it was possible to significantly reduce the severity of such disturbing flavors as legume, astringent, bitter and herbal. The results obtained made it possible to select EP (fungal acidic aspartate proteinase) to improve the organoleptic parameters of pea protein isolates intended for the manufacture of analogues of meat and dairy products.

*Keywords:* neutral protease, acid protease, alkaline proteases, pea protein isolate, organoleptic properties

УДК 547.458:546.92:615.277.3

## НАНОЧАСТИЦЫ ПЛАТИНЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СОПОЛИМЕРА ХИТОЗАН-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2024 г. Д. Н. Зуев<sup>1</sup>\*, Е. И. Черкасова<sup>1</sup>, К. В. Апятина<sup>1</sup>, С. Д. Зайцев<sup>1</sup>, Л. А. Смирнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия

\*e-mail: z\_u\_e\_v2020@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Получены привитые сополимеры хитозан-винилпирролидона водорастворимые при рН среды 6.8–7.5. Разработана методика получения агрегативно устойчивой системы наночастиц платины в растворах сополимера со средними размерами ~ 4 нм. Исследованы теплофизические, структурные характеристики порошкообразной композиции наночастицы платины-сополимер. Выполнено сопоставление *in vitro* противоопухолевой активности растворов разработанной композиции и цисплатина при одинаковой концентрации платины. Выявлено, что в отношении культуры раковых клеток HeLa Куото и A431 композиция по эффективности уступает цисплатину в пять и два раза соответственно. Наряду с этим эффект подавления роста клеток фибробластов линии hTERT VJ-5TA композиции в 17 раз меньше, чем у цисплатина, что допускает использование ее при повышенной концентрации и разработку противоопухолевого средства с наночастицами платины соизмеримого по результативности с цисплатином.

**Ключевые слова:** хитозан-прив-поливинилпирролидон, наночастицы платины, водорастворимая композиция, противоопухолевые свойства, биосовместимость

DOI: 10.31857/S0555109924040049 EDN: SBIMRS

Нанотехнологии за последние два десятилетия стремительно развиваются во всех направлениях вследствие существенного изменения свойств материалов при введении в них наночастиц (НЧ). В области биомедицины НЧ металлов, в частности благородных – серебра, золота и платины, исследуются в лечении и диагностике различных заболеваний, в том числе при терапии рака, вируса иммунодефицита человека, туберкулеза, болезни Паркинсона и перспективны для доставки лекарственных средств [1, 2]. В связи с этим большое внимание уделяется токсикологическому и терапевтическому эффектам НЧ, которые зависят от их концентрации, размера, формы [3]. Форму и размер металлических НЧ можно контролировать, используя стабилизаторы различной природы [4, 5]. В качестве стабилизаторов перспективны биополимеры, которые обладают собственной биологической активностью и в комплексе с НЧ могут проявляться синергетические свойства и усиление терапевтического эффекта последних [6].

Особенно востребованной областью исследований НЧ платины является синтез противоопухолевых лекарств [7–12]. Препаратов для лечения

онкологических патологий существует много, но еще больше находится на стадии разработки. Несмотря на то, что среди этого большого количества получаемых препаратов есть очень перспективные, они часто не могут пройти клинические испытания ввиду их токсичности или по причине трудности растворения в физиологических условиях.

Платиносодержащие химиотерапевтические препараты эффективны, но их применение связано с серьезными дозозависимыми побочными эффектами и повышением лекарственной резистентности, которая может еще больше увеличиться после воздействия химиотерапевтических препаратов [13–17].

Препараты платины до сих пор остаются базовыми при химиотерапии видов рака, в основном в качестве координационных комплексов Pt<sup>II</sup> таких, как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, надаплатин, лобоплатин и гептаплатин. Препараты на основе платины являются наиболее эффективными химиопрепаратами при лечении немелкоклеточного рака легкого и рекомендованы в качестве препаратов I линии при его лечении. В исследовании [18] показано, что схемы лечения, не включающие платиновые препараты,

сопровождается снижением эффективности лечения, медианы выживаемости до 1-летней. Самым распространённым и эффективным препаратом на данный момент является цисплатин. Он представляет собой кристаллический порошок, который растворяется в воде и используется в виде инъекций. Структурно цисплатин состоит из центрального атома платины, который связан с двумя хлоридными и двумя аммиачными группами. Он применяется для лечения различных видов рака, таких как рак легких, яичников, мочевого пузыря, а также некоторых других.

Цисплатин может взаимодействовать с ДНК клеток. Он предпочтительно связывается с нуклеотидами, прежде всего с аденином и гуанином, вызывая различные изменения в структуре ДНК, такие как: деформации двойной спирали, скрещивания, сшивки и разрывы цепей [19]. Взаимодействие цисплатина с ДНК, приводит к нарушению ее структуры и блокированию процесса деления клеток. Цисплатин вызывает остановку клеточного цикла в G1- S- или G2-фазе. Вероятно, остановка в фазе G2 является необходимой для запуска индуцированной цисплатином гибели клеток.

Однако цисплатин может вызывать различные побочные эффекты: тошнота, рвота, диарея, потеря волос и др. Также может наблюдаться нарушение функции почек и нервной системы [20].

Платиновые наночастицы широко используются для биомедицинских приложений, в том числе в составе имплантатов, при фототермической терапии и доставке лекарств. С целью снижения токсичности и увеличения биосовместимости противоопухолевых лекарств, актуальной является разработка новых модифицированных комплексов на основе НЧ платины. Повышенная высокая реакционная способность НЧ в биологической среде могут привести к гибели опухолевых клеток. Платина может быть цитотоксичной при окислении до платины (II), в такой форме она встречается в обычных химиотерапевтических средствах [21]. Например, многие НЧ взаимодействуют с клетками с образованием активных форм кислорода, которые могут привести к преждевременной гибели опухолевых клеток. Это свойство может быть использовано для их подавления [22].

По сравнению с традиционными клиническими препаратами платины, препараты на основе НЧ платины продемонстрировали высокую стабильность и растворимость *in vitro*, а также низкую системную токсичность и биосовместимость *in vivo*. Исследования эффективности НЧ платины показывают, что они сами по себе нетоксичны для здоровых клеток человека в терапевтических концентрациях и могут быть использованы в более высоких концентрациях для лечения опухоли [23]. НЧ платины обладают внутренними противомикробными, антиоксидантными и противораковыми свойствами. Таким образом, НЧ платины являются весьма перспективными для исследований и использования в наномедицине и в биомедицинской инженерии [24].

Одной из проблем, связанной с успешным применением противоопухолевых лекарств, является то, что активный агент имеет небольшую молекулярную массу, поэтому не проникает к целевому органу и не достигает тканей опухоли или не может проникнуть в них. С помощью заключения лекарственного агента в “капсулу” можно решить эту проблему. НЧ, стабилизированные полимерной матрицей-носителем, будут адсорбироваться на опухолевых тканях и попадать внутрь. Одним из таких перспективных полимеров для создания систем доставки лекарств является хитозан – деацетилированное производное природного полисахарида хитина. Хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и неорганической природы [25]. Он также является биоразлагаемым, биосовместимым и нетоксичным. Хитозан имеет реакционноспособные группы (гидроксильную и аминогруппу) в каждом звене, что позволяет осуществлять химическое присоединение нескольких молекул, необходимых для функционализации частиц. Такая структура хитозана позволяет получать производные с разным зарядом и гидрофобностью [26]. В работе [27] были описаны исследования, проведенные с использованием НЧ на основе хитозана для доставки химиопрепаратов. Такая система доставки повышала растворимость и биодоступность исследуемых препаратов. Например, цисплатин был заключен в НЧ из магнетита, модифицированные хитозаном. Такие НЧ оказывали цитотоксическое действие на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-231, причем она была выше, чем у цисплатина не заключенного в НЧ.

Недостатком хитозана, как матрицы-носителя, является его растворимость при pH меньше 5, а значение pH крови и лимфы 7. Одним из вариантов решения является модификация хитозана водорастворимым и биосовместимым полимером, такими как поливинилпирролидон (ПВП). ПВП также часто используется как носитель НЧ, он препятствует их неконтролируемому росту и агрегации. Применение различных НЧ, стабилизированных ПВП, может быть перспективно в биомедицине. Например, в работе [28] были синтезированы НЧ золота при использовании ПВП в качестве стабилизатора. Такие НЧ проявляли токсичность в отношении клеток HeLa. Недостатком этого полимера является возможность его гидролиза. В работах [29, 30] показано, что в кислых средах винилпирролидон (ВП) может гидролизироваться с образованием  $\alpha$ -оксиэтилпирролидона. Решением данной проблемы является оптимизация условий синтеза сополимера до минимальной концентрации продукта гидролиза или использование апротонного растворителя, полностью исключающего гидролиз.

Цель работы – получение водорастворимой композиции хитозан-прив-ПВП с НЧ платины и исследование свойств системы.

## МЕТОДИКА

В исследовании был использован хитозан, полученный из крабового хитина (ОАО “Биопрогресс”, Россия) с молекулярной массой (ММ)  $2.20 \times 10^5$  и степенью деацетилирования 0.82. Массовая доля минералов в хитозане не превышала 0.1%, влагосодержание – 6%, нерастворимых соединений – 0.1%.

Для приготовления растворов хитозана использовали ледяную уксусную кислоту марки “хч” ГОСТ 61–75. Модификацию хитозана проводили привитой полимеризацией с N-винил-2-пирролидоном (“Acros Organics”, Бельгия), предварительного очищенного вакуумной перегонкой.

Диметилсульфоксид (ДМСО) – марки “хч” СТП ТУ КОМП 2–451–11 (ООО “Компонент-Реактив”, Россия). Салициловая кислота – марки “хч” (ООО “Векослаб”, Россия).

НЧ платины получали из прекурсора хлороплатиновой кислоты 6-водной ( $H_2PtCl_6 \times 6 H_2O$ ) марки “ч” (ОАО “Аурат”, Россия), массовая доля платины не менее 37.5%. В качестве восстановителя ионов платины использовали боргидрид натрия  $NaBH_4$ .

Привитую сополимеризацию ВП на хитозан проводили в трехгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, помещенной в термостат с регулируемой температурой, при непрерывном перемешивании. Концентрация хитозана в растворе уксусной кислоты во всех опытах составляла 3 мас. %, уксусной кислоты 1.2 мас. %, температура реакции 70°C. Концентрация хитозана в диметилсульфоксиде во всех опытах составляла 1.5 мас. %, 1.5% салициловой кислоты, температура реакции 70°C. ВП вводили в систему после установления температуры в реакторе на уровне 70°C и барботирования аргоном в течение 15 мин. Соотношение (мономер)/(хитозан) по массе составляло 4. В качестве иницирующей системы и в водном растворе и в растворе диметилсульфоксида использовали персульфат аммония и церий нитрат аммония. Систему выдерживали 15 мин для установления необходимой температуры раствора и вносили навеску инициатора. Концентрация инициаторов составляла  $10^{-3}$  моль/л. Синтез проводили в течение 3 ч до полного завершения процесса полимеризации ВП.

Глубину превращения ВП определяли по результатам анализа остаточного мономера методом газовой хроматографии.

Определение концентрации остаточного мономера проводили на газовом хроматографе GCMS-QP2010, “Shimadzu” (Япония) с детектором по теплопроводности и системой компьютерной регистрации. Колонка: Equity-1 (30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм), газ-носитель: гелий, скорость потока газа-носителя в колонке – 1 мл/мин, температура колонки для определения содержания ВП – 230°C. Из реакционной системы каждые 30 мин отбирали пробу и осаждали находящиеся в ней полимеры тетрагидрофураном. Соотношение пробы и осадителя составляло 100 мг на 1 мл. Далее надосадочную

жидкость фильтровали через мембранный фильтр PTFE (Merck, Millipore), 0.45 мкм, и методом газовой хроматографии определяли в ней содержание ВП.

Молекулярно-массовое распределение образцов полимеров проводили методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Prominence UFLC Fast LC-20AD (“Shimadzu”, Япония). Условия анализа: элюент 0.5 н раствор уксусной кислоты, скорость потока 0.8 мл/мин,  $T = 30^\circ C$ , детектор ELSD (низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния). Колонка: TSK-GEL G3000SWXL, 7.8 мм ID  $\times$  30.0 см L, 5 мкм. Калибровку выполняли, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да.

НЧ платины получали в растворах водноуксуснокислого хитозана (3 мас. %) и в водных растворах хитозан-прив-ПВП путем восстановления ионов  $Pt^{4+}$  из допанта  $H_2PtCl_6$  с помощью восстановителя боргидрида натрия  $NaBH_4$  (0.5M). К 0.5 мас. % водного раствора сополимера при постоянном перемешивании добавляли  $H_2PtCl_6$  так чтобы концентрация НЧ составляла 2% Pt от сополимера и термостатировали при температуре 70°C в течение 30 мин. Спектр абсорбции снимали относительно разбавленного 19 частями воды 0.5%-ного водного раствора сополимера в УФ-спектрометре Shimadzu UV-1650PC. В процессе восстановления  $Pt^{4+}$  наблюдали возникновение и нарастание полосы плазмонного поглощения, характерной для НЧ платины в области длин волн 210–230 нм [31].

Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов выполняли на рентгеновском дифрактометре “Bruker D8 Discover” (Германия), с использованием  $CuK\alpha$  излучения. Регистрацию дифрактограмм проводили для углового диапазона  $10^\circ$ – $60^\circ$  по углу дифракции  $2\theta$  в симметричной геометрии со щелью 0.6 мм на первичном пучке и линейным позиционно-чувствительным детектором LynxEye (“Bruker”, Германия).

Теплофизические свойства образцов изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе ДСК 500 (Лаборатория аналитического приборостроения СамГТУ, Россия). Измерения образцов проводили в атмосфере азота при скорости нагрева  $10^\circ C/мин$ . Перед анализом образцы прогревали до  $105^\circ C$  в атмосфере азота для удаления следов воды.

Размер и кристаллическую структуру НЧ платины изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в ультратонких полисахаридных пленках с помощью полевого эмиссионного микроскопа LIBRA 200 MC (“Carl Zeiss SMT”, Германия). Для подготовки образца каплю раствора наносили на тонкую (30 нм) мембрану  $Si_3N_4$  с центрифугированием при  $\sim 2000$  об/мин. После этого полимерные пленки обрабатывались в мягкой кислородной плазме с использованием системы очистки RF-плазмой De-Contamination RF Evactron 25/45 (США). Эту обработку использовали для удаления органической матрицы из образцов. Изображения ПЭМ были получены и обработаны с помощью

программного обеспечения Digital Micrograph (“Gatan, Inc.”, Плезантон, Калифорния, США).

Дополнительно размер и морфологию НЧ платины на поверхности полимерных композитных пленок охарактеризовали сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) на приборе JEOL JSM–IT300LV (США), оснащенного элементными анализаторами энергии и волновой дисперсии.

Цитотоксичность препаратов, содержащих НЧ платины, в отношении опухолевых клеток определяли при помощи метилтетразолиевого теста (МТТ-тест). МТТ-тест основан на способности НАДФ-Н-зависимых оксиредуктазных дегидрогеназ жизнеспособных клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид в кристаллы формазана. Клетки А431, HeLa Kyoto высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $3 \times 10^3$  кл./луночка. После 2 сут культивирования исходную среду заменяли свежей средой, содержащей препараты в различных концентрациях. Инкубацию с препаратом проводили в течение 24 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37.0°C, 5% CO<sub>2</sub>), затем клетки промывали раствором натрий-фосфатным буфером и в каждую лунку вносили по 200 мкл среды, содержащей 0.5 мг/мл МТТ. Клетки снова помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 4 ч, после чего среду с МТТ отбирали. Образовавшийся формазан лизировали добавленным по 100 мкл в лунку раствором ДМСО. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на

планшетном спектрофотометре Synergy MX (“BioTek”, США) при длине волны 570 нм.

Исследовали рост и адгезию клеток фибробластов человека клеточной линии hTERT VJ-5ta (предоставлены Институтом биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия) на поверхности пленок композиций хитозана с НЧ платины. Пленки предварительно получали методом полива на лавсановую подложку исходных растворов в условиях равномерного испарения растворителя до постоянной массы при 25°C. Пленки композиций, после стерилизации автоклавированием при температуре 110°C, помещали в лунки планшета для культивирования клеток и добавляли 500 мкл среды DMEM. Клетки высевали на поверхность пленки с плотностью  $1.6 \times 10^5$  кл./см<sup>2</sup> и культивировали в течение 24 ч. Визуализацию клеток и оценку их жизнеспособности оценивали методом люминесцентной микроскопии. В качестве красителя для окрашивания фибробластов использовали  $2 \times 10^{-4}$ %-ный раствор акридина оранжевого в фосфатном буфере. Этот краситель путем интеркаляции или электростатического притяжения избирательно взаимодействует с ДНК и РНК, находящимися в ядре и митохондриях клетки соответственно. Это позволяет оценить общее состояние клеток – активность, пролиферацию и апоптоз. Исследование пленок проводили на инвертном микроскопе Olympus IX71 (Япония) с использованием “зеленого” фильтра (эмиссия 510–555 нм, возбуждение 460–495 нм), что позволяло визуализировать зеленый цвет ядра живых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью получения биосовместимого и водорастворимого хитозана была проведена его модификация ВП методом привитой полимеризации. Привитую полимеризацию ВП на хитозан проводили в водно-кислотных растворах и ДМСО (рис. 1). Известно, что в воднокислотных растворах ВП гидролизует с образованием пирролидона по схеме, приведенном на рис. 2.

Действительно, результаты хроматографического анализа продуктов синтеза свидетельствовали о том, что в процессе полимеризации гидролизует до 6% ВП с образованием пирролидона (рис. 3) – так пик с временем выхода 9.89 мин соответствовал мономеру, а пик, соответствующий 9.28 мин, соответствовал продукту гидролиза – пирролидону.

Привитая полимеризация в воде при 70°C с использованием таких инициаторов как персульфат аммония и церий нитрат аммония достигалась уже за

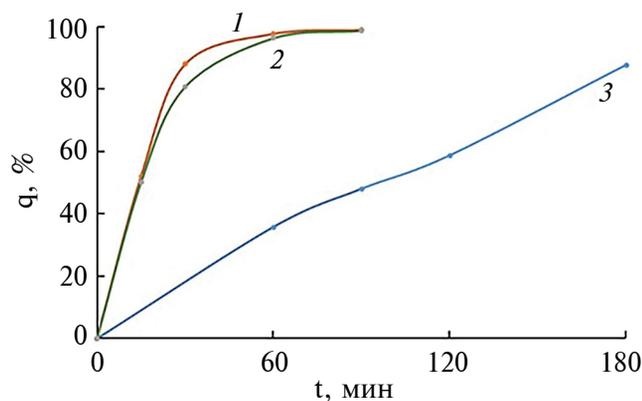


Рис. 1. Конверсия ВП в процессе привитой полимеризации: в водном растворе при 70°C, инициатор – церий нитрат аммония (1); в водном растворе при 70°C, инициатор – персульфат аммония (2) и в растворе ДМСО при 70°C, инициатор – церий нитрат аммония (3).

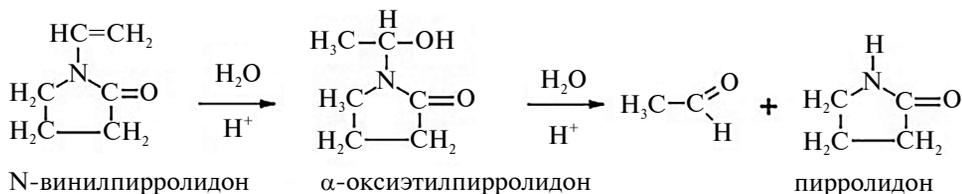


Рис. 2. Реакции кислотного гидролиза ВП.

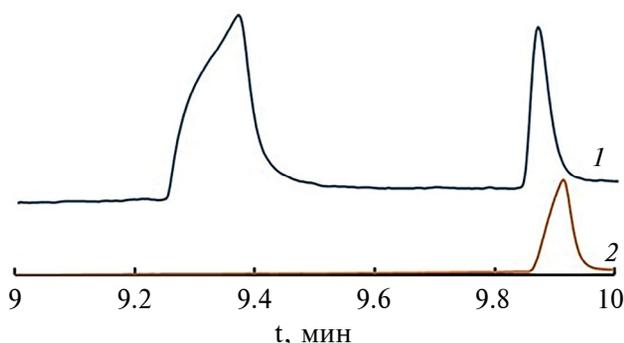


Рис. 3. Хроматограммы – пробы, после проведения синтеза отделения полимера (1) и – ВП (2).

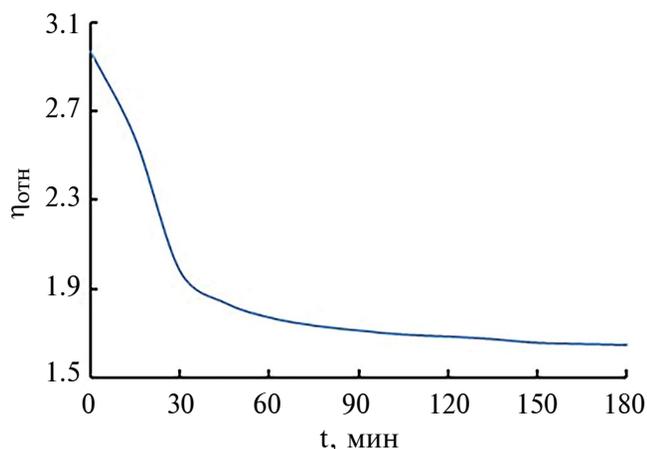


Рис. 4. Снижение относительной вязкости раствора хитозана под действием персульфата аммония при 70°C и концентрации инициатора  $5 \times 10^{-3}$  моль/л.

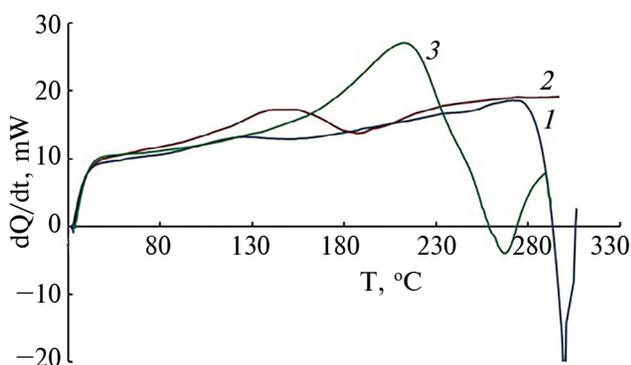


Рис. 5. Кривые, полученные методом ДСК: 1 – хитозан; 2 – ПВП; 3 – хитозан-прив-ПВП.

1.5 ч при конверсии 99%, однако в реакционной смеси также появлялся продукт гидролиза ВП.

Были исследованы молекулярно-массовые характеристики полученного сополимера хитозан-прив-ПВП и привитых цепей ВП методом ГПХ. Для определения ММ привитых цепей ВП в сополимере проводили ферментативное разложение цепей хитозана хитозаназой (“Weifang Yuxiang Chemical Co”, Китай). В раствор сополимера вносили хитозаназу в соотношении хитозан-хитозаназа 2 : 1 (по массе). Хитозаназа – фермент,

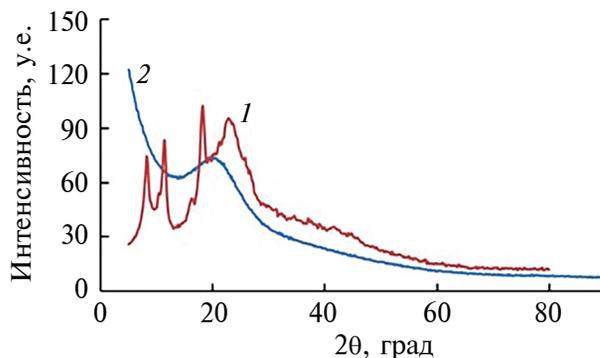


Рис. 6. РФА-спектр хитозана (1) и хитозан-прив-ПВП (2).

специфически расщепляющий  $\beta$ -1.4-гликозидные связи между остатками D-глюкозамина, а также между остатками D-глюкозамина и N-ацетилглюкозамина в молекуле хитозана с последующим образованием олигомеров. Полученную реакцию смесь выдерживали при 50°C и оставляли на 6 ч для полного расщепления полисахарида. Для прекращения действия фермента раствор прогревали при температуре 75°C в течение 3 ч. Методом ГПХ определили ММ оставшихся в растворе блоков ПВП. Были выделены две фракции, ММ привитых цепей ВП составила  $1.16 \times 10^4$  и  $2.55 \times 10^4$ .

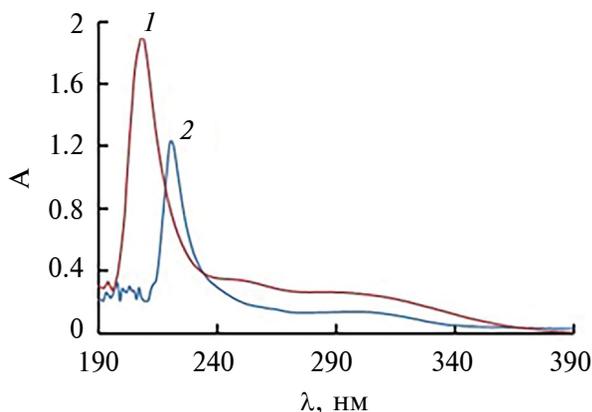
Известно, что при действии инициаторов, таких как персульфат аммония и церий нитрат аммония происходит разрушение полисахаридной цепи хитозана, и в процессе полимеризации может получиться блок-сополимер (рис. 4) [32, 33].

Для доказательства строения сополимера были исследованы теплофизические свойства сополимера и исходных гомополимеров (рис. 5). Известно, что у блок-сополимеров наблюдались две температуры стеклования, а в привитом сополимере только одна [34].

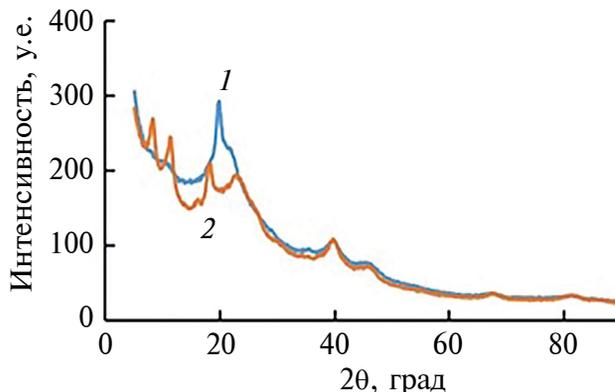
Следует отметить, что образец сополимера имел температуру стеклования 180°C. Снижение температуры стеклования сополимера ( $T_g = 180^\circ\text{C}$ ) по отношению к исходному хитозану (200°C) могла быть связана с уменьшением кристалличности сополимера.

Чтобы показать уменьшение степени кристалличности была исследована структура сополимера методом РФА. Из рис. 6 видно, что в сополимере пропадают пики кристалличности, характерные для хитозана, и наблюдается аморфное гало. Степень кристалличности исходного хитозана рассчитывается, как отношение площади пиков кристалличности к общей площади кривой рассеяния: она составила 50.5%. Это говорит о том, что привитая полимеризация прошла успешно и сополимер более аморфный, чем исходный хитозан.

В водорастворимом сополимере были получены НЧ платины. Определены размерные характеристики НЧ в растворе сополимера по сравнению с НЧ, полученными в растворе исходного хитозана. По данным



**Рис. 7.** УФ-спектры поглощения НЧ платины в водно-кислотных растворах хитозана (1) и в водных растворах сополимера (2).



**Рис. 8.** РФА-спектр НЧ платины в сополимере (1) и в хитозане (2).

ультрафиолетовой спектроскопии (рис. 7) в растворах хитозана в процессе облучения наблюдалось закономерно стабильное нарастание максимума полосы при  $\lambda = 215$  нм, соответствующей поверхностному плазмонному резонансу НЧ платины, достигающей постоянного значения через 30 мин. В водном же растворе сополимера максимум полосы поверхностного плазмонного резонанса при  $\lambda = 219$  нм. Известно, что чем больше максимум поверхностного плазмонного резонанса смещается в длинноволновую область полос, тем больше размер НЧ. Таким образом, в сополимере формировались НЧ платины, характеризующиеся большими размерами, чем в хитозане.

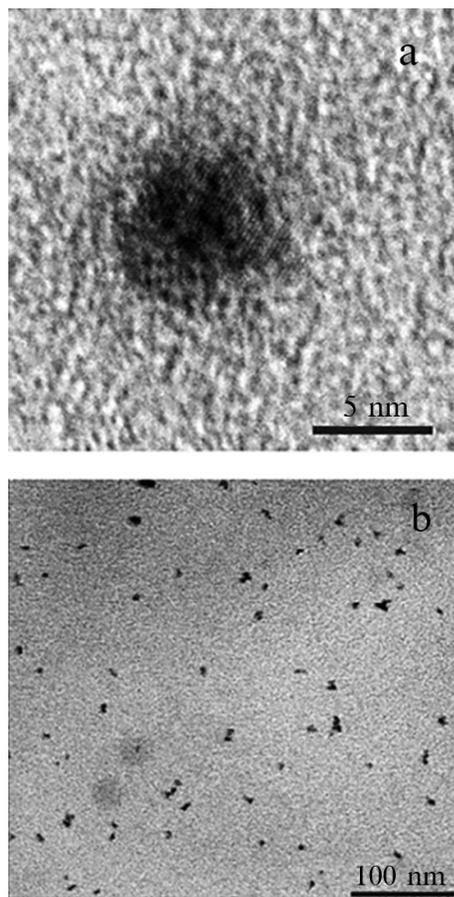
Средние размеры НЧ платины в растворах хитозана и сополимера были определены методом РФА. На дифрактограммах РФА образцов появляются характерные пики платины (рис. 8). Ширина пиков платины для хитозана  $2.7^\circ$ , для сополимера  $2.2^\circ$ . Максимумы поглощения платины у обоих сополимеров наблюдались на  $39.72^\circ$ . Оценка размеров областей когерентного рассеяния по ширине пиков позволяла рассчитать размеры НЧ платины в композициях по формуле Шеррера:

$$D = \frac{K\lambda}{FWHM \times \cos \theta},$$

где  $D$  — размер кристаллита ( $\text{\AA}$ ),  $K$  — так называемая “постоянная Шеррера” (в данном исследовании  $k = 0.94$ ),  $\lambda$  — длина волны излучения ( $0.15418$  нм для  $\text{CuK}\alpha$ ), а  $\theta$  — угол дифракции вершины пика. Основной “вкладом” в формулу является значение  $FWHM$  ( $FWHM =$  Полная ширина на полувысоте максимума) пиков.

Средние размеры НЧ Pt составили  $4$  нм в сополимере и  $3$  нм в исходном хитозане. Видно, что данные УФ-спектроскопии согласовались с данными РФА, а размер НЧ платины в сополимере больше, чем в исходном хитозане.

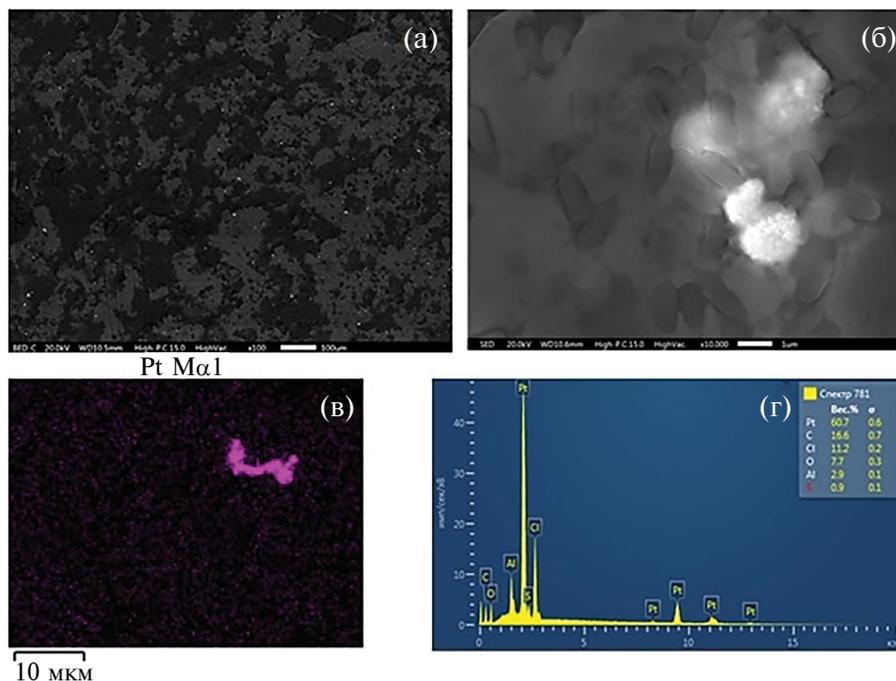
На микрофотографиях ПЭМ отчетливо видно, что большинство НЧ платины образуют агломераты, состоящие из нескольких десятков НЧ (рис. 9б). При этом отдельные НЧ платины характеризуются



**Рис. 9.** ПЭМ-микрофотографии композита с НЧ платины.

кристаллической структурой и средним диаметром около  $1.6\text{--}5.0$  нм НЧ (рис. 9а).

НЧ платины так же определены в тонких пленках композиций методом СЭМ и регистрируются на изображениях как световые точки (рис. 10). Показано, что они формируют крупные агломераты, состоящие из множества мелких НЧ, однако их распределение



**Рис. 10.** Изображения поверхности композита, полученные методом СЭМ. Световые точки (а, б, в) относятся к НЧ платины, на диаграмме (г) продемонстрировано распределение элементов в точке изображения (в), относящейся к агломератам НЧ.

на поверхности равномерно. Образование агломератов обусловлено подготовкой и высушиванием тонких пленок.

Было исследовано влияние композиции с НЧ платины, стабилизированными хитозан-прив-ПВП, на жизнеспособность раковых клеток линии HeLa Kyoto и A431 и проведено сравнение с цисплатином (рис. 11а-11г). Критерием эффективности служила концентрация ингибирования ( $C_{инг}$ ), при которой погибала половина клеток. В испытаниях на раковых клетках, чем ниже получалось  $C_{инг}$ , тем эффективнее вещество борется с раковыми клетками. Результаты представлены в табл. 1. При испытаниях на культуре клеток HeLa Kyoto  $C_{инг}$  составила для цисплатина –  $5 \times 10^{-5}$  моль/л, для композита –  $10^{-4}$  моль/л. На раковых клетках линии A431  $C_{инг}$  равна  $10^{-5}$  моль/л, для композита  $5 \times 10^{-5}$  моль/л. В обоих случаях концентрация необходимая для ингибирования роста раковых клеток для композита больше, чем у цисплатина.

**Таблица 1.** Значения концентраций ингибирования (моль/л) препаратов платины в отношении исследуемых клеток

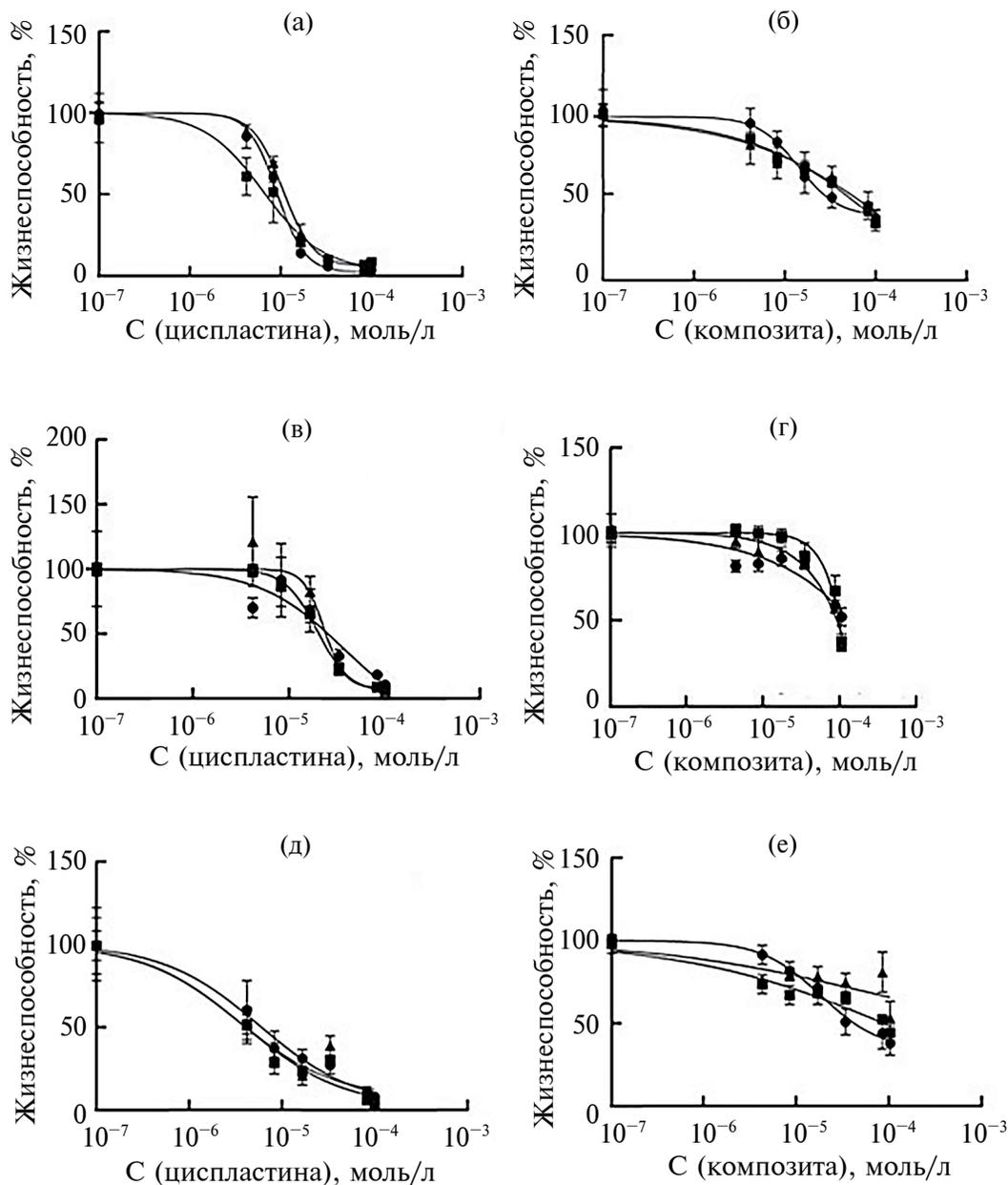
Тип клеток	$C_{инг}$ (цисплатин), моль/л	$C_{инг}$ (композит), моль/л
HeLa Kyoto	$5 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$
A431	$10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$
hTERT VJ-5TA	$6 \times 10^{-6}$	$10^{-4}$

То есть эффективность композиции меньше в пять и два раза, по сравнению с цисплатином, для раковых клеток культурных линий HeLa Kyoto и A431 соответственно. Однако за счет биосовместимой полимерной матрицы и меньшей токсичности платины было выдвинуто предположение, что композит будет более биосовместимым по сравнению с цисплатином.

Оценивали жизнеспособность клеток фибробластов линии hTERT VJ-5TA по их адгезии и росту на поверхности пленок композита и цисплатина (рис. 11д–11е). Концентрация, при которой происходило ингибирование роста клеток фибробластов, составила  $10^{-4}$  моль/л при использовании композита, а цисплатина –  $6 \times 10^{-6}$ . Возможно, это указывает на то, что НЧ Pt, стабилизированные сополимером, менее токсичны, чем препарат сравнения, что делает перспективным разработку препарата НЧ платины в водорастворимой полимерной матрице хитозан-прив-ПВП при использовании увеличенной концентрации активного агента.

\*\*\*

Исследован процесс привитой полимеризации ВП на хитозан в водно-кислотных растворах и ДМСО. Отработаны оптимальные условия получения водорастворимого привитого сополимера хитозан-ВП при содержании ВП 80%. Синтезированы НЧ платины в растворе хитозан-прив-ПВП при рН среды 7.0, средний размер которых – 4 нм. Противоопухолевые свойства НЧ Pt в растворе хитозан-прив-ПВП в 2–5 раз уступали по эффективности цисплатину при испытаниях *in vitro* на культуре раковых клеток HeLa



**Рис. 11.** Жизнеспособность (%) раковых клеток линии HeLa Kyoto (а, б), клеток линии А431 (в, г) и клеток фибробластов линии hTERT VJ-5ТА (д, е) при воздействии – цисплатина (а, в, д), композита НЧ Pt с сополимером (б, г, е).

Kyoto и А431 и одинаковой концентрации платины. На культуре фибробластов клеточной линии hTERT VJ-5ТА показано, что композит с НЧ платины, стабилизированный хитозан-прив-ПВП, обладал в 17 раз меньшим подавляющим действием в отношении роста клеток фибробластов hTERT VJ-5ТА по сравнению с цисплатином. Перспективно исследование композиции на основе НЧ платины, стабилизированных хитозаном-прив-ПВП, при увеличении концентрации активного агента по сравнению с цисплатином.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-13-00342, <https://rscf.ru/project/23-13-00342/>.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamada M., Foote M., Prow T.W. // WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. 2015. V. 7. P. 428–445. <https://doi.org/10.1002/wnan.1322>
2. Rai M., Ingle A.P., Birla S., Yadav A., Santos C.A.D. // Crit. Rev. Microbiol. 2016. V. 42. P. 696–719. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>
3. Arvizo R.R., Bhattacharyya S., Kudgus R.A., Giri K., Bhattacharya R., Mukherjee P. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
4. Huang H., Yuan Q., Yang X. // Colloids Surf. B. 2004. V. 39. P. 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.014>
5. Du Y.K., Yang P., Mou Z.G., Hua N.P., Jiang L. // J. Appl. Polym. Sci. 2006. V. 99. P. 23–26. <https://doi.org/10.1002/app.21886>
6. Rai M., Ingle A.P., Gupta I., Brandelli A. // Int. J. Pharm. 2015. V. 496. P. 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.059>
7. Yerpude S.T. et al. // Environmental Research. 2023. V. 231 (2). 116148. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116148>
8. Khan M.A.R., Al Mamun M.S., Ara M.H. // Microchemical Journal. 2021. V. 171. C. 106840. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106840>
9. Gutiérrez de la Rosa S.Y. et al. // International Journal of Molecular Sciences. 2022. V. 23. № . 16. C. 9404. <https://doi.org/10.3390/ijms23169404>
10. Malode U. et al. // Bulletin of the National Research Centre. 2023. V. 47. № . 1. C. 130. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01104-y>
11. Kumar A., Das N., Rayavarapu R.G. // Journal of Nanotheranostics. 2023. V. 4. № . 3. C. 384–407. <https://doi.org/10.3390/jnt4030017>
12. Jan H. et al. // Journal of Saudi Chemical Society. 2021. T. 25. № . 8. C. 101297. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101297>
13. Jeyaraj M., Gurunathan S., Qasim M., Kang M., Kim J. // Nanomaterials. 2019. V. 9. № 12. P. 1719. <https://doi.org/10.3390/nano9121719>
14. Wang W., Liang G., Zhang W. // Chem Mater. 2018. V. 30. № 10. P. 3486–3498. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09566-3>
15. Kutwin M. // Arch. Med. Sci. 2017. V. 201. № 13. P. 1322–1334. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58925>
16. Аранцева Д.А., Водовозова Е.Л. // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44. № 6. С. 620–632. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265>
17. Моисеенко В.М. // Практическая онкология. 2006. Т. 7. № 3. С. 170–178.
18. Вартамян А.А., Огородникова М.В. // Российский био-терапевтический журнал. 2004. Т. 1. № 3. С. 14–18.
19. Ахтямов А.Э. // Международный студенческий научный вестник. 2018. № 4 (часть 3). С. 436–439.
20. Johnstone T.C., Suntharalingam K., Lippard S.J. // Prodrugs. Chem. Rev. 2016. V. 116. № 5. P. 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
21. Panikkanvalappil S.R., Mahmoud M.A., Mackey M.A., El-Sayed M.A. // ACS Nano. 2013, V. 7. № 9. P. 7524–7533. <https://doi.org/10.1021/nn403722x>
22. Zhang C., Xu C., Gao X., Yao Q. // Theranostics. 2022. V. 12. № 25. P. 2115–2132. <https://doi.org/10.7150/thno.69424>
23. Wennemers H., Shoshan M.S., Vonderach T. // Angewandte Chemie International Edition. 2018. V. 58. № 15. P. 4901–4905. <https://doi.org/10.1002/anie.201813149>
24. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // Успехи биологической химии. Т. 60. 2020. С. 317–368.
25. Свирицевская Е.В., Гриневич Р.С., Решетов П.Д., Зубов В.П., Зубарева А.А., Ильина А.В., Варламов В.П. // Бионанотехнологии и нанобиоматериаловедение. 2012. Т. 1. № 19. С. 13–19.
26. Sartaj A., Qamar Z., Qizilbash F.F., Annu K., Md S., Alhakamy N., Baboota S., Ali J. // Polymers (Basel). 2021. V. 13. № 24. P. 4400. <https://doi.org/10.3390/polym13244400>
27. Панфилова Е.В., Буров А.М., Хлебцов Б.Н. // Коллоидный журнал. 2020. Т. 82. № 1. С. 37–46. <https://doi.org/10.31857/S0023291220010097>
28. Nie Z., Petukhova A., Kutacheva E. // Nat. Nanotechnol. 2010. V. 5. № 1. P. 15–25. <https://doi.org/10.1388/nano.2009.453>
29. Куликов С.Н., Хайруллин Р.З. // Вестник Казанского технологического университета. 2015. Т. 18. № 18. С. 265–267.
30. Литманович О.Е. // Высокомолекулярные соединения, Серия С. 2008. Т. 50. № 7. С. 1370–1396.
31. Pourjavadi A., Mahdavinia G.R., Zohuriaan-Mehr M.J., Omidian H. // Journal of Applied Polymer Science. 2003. V. 88. № 8. P. 2048–2054. <https://doi.org/10.1002/app.11820>
32. Solomko N.Yu., Dron I.A., Budishevskaya O.G., Voronov S.A. // Procedia Chemistry. 2009. V. 1. № . 2. P. 1567–1575. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.11.005>
33. Hsu S.-C., Don T.-M., Chiu W.-Y. // J. Appl. Polym. Sci. 2002. V. 86. № 12. P. 3047–3056. <https://doi.org/10.1002/app.11333>
34. Аржаков М.С. Термомеханика полимеров. Montreal: Accent Graphics Communications, 2019. 150 с.

## Platinum Nanoparticles in Aqueous Solutions of Chitosan-Vinylpyrrolidone Copolymer: Synthesis and Biological Activity

D. N. Zuev<sup>a, \*</sup>, E. I. Cherkasova<sup>a</sup>, K. V. Apryatina<sup>a</sup>, S. D. Zaitsev<sup>a</sup>, L. A. Smirnova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky,  
Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

*\*e-mail: z\_u\_e\_v2020@mail.ru*

Grafted copolymers of chitosan-vinylpyrrolidone, water-soluble at a pH of 6.8–7.5, were obtained. A technique has been developed for obtaining an aggregatively stable system of platinum nanoparticles in copolymer solutions with an average size of ~ 4 nm. The thermophysical and structural characteristics of the powdered composition of a platinum nanoparticle-copolymer are investigated. An *in vitro* comparison of the antitumor activity of solutions of the developed composition and cisplatin at the same platinum concentration was performed. It was found that with respect to the culture of HeLa Kyoto and A431 cancer cells, the composition is five and two times less effective than cisplatin, respectively. Along with this, the biocompatibility of the composition is 17 times higher than that of cisplatin, which allows its use at elevated concentrations and the development of an antitumor agent with platinum nanoparticles commensurate in effectiveness with cisplatin.

*Keywords:* chitosan-graft-polyvinylpyrrolidone, platinum nanoparticles, water-soluble composition, anti-tumor properties, biocompatibility

УДК 581.132

## ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ШАПЕРОНОВ HSP70 ЦИТОПЛАЗМЫ И HSP70В ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ ОТЛИЧАЕТСЯ У ТРЕХ ВИДОВ ТЫКВЫ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССАМ

© 2024 г. Н. Д. Муртазина<sup>1</sup>, Л. С. Шарапова<sup>1</sup>, Н. П. Юрина<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 29.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Первой линией защиты у растений при стрессе является шаперонная система клетки. В настоящей работе изучено действие теплового стресса на уровни шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов трех видов *Cucurbita* (*C. maxima* Duchesne, *C. pepo* L. и *C. moschata*, Duchesne), различающихся по устойчивости к стрессам. Установлена взаимосвязь между уровнями шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов и видовой принадлежностью растений тыквы в условиях теплового стресса. При стрессе отмечено значительное повышение уровня шаперонов в клетках растений тыквы *C. maxima* – уровень HSP70 цитоплазмы возрос в 3.6 раза, а уровень HSP70В хлоропластов – в 2 раза. Тепловой стресс вызывал увеличение в 1.7 раза уровень цитоплазматического шаперона HSP70 в клетках растений тыквы *C. pepo*, а значимого изменения уровня белка HSP70В отмечено не было. Однако в результате действия теплового стресса на растения тыквы *C. moschata* выявлено уменьшение уровней HSP70 и HSP70В по сравнению с уровнем у необработанных растений. Динамика изменения уровней шаперонов цитоплазмы и хлоропластов при действии теплового стресса аналогичная. Следует отметить, что конститутивный уровень в нормальных условиях HSP70 и HSP70В у *C. moschata* и *C. pepo* более высокий по сравнению *C. maxima*. Анализ полученных данных выявил интересную закономерность: высокие конститутивные уровни HSP приводят к незначительной индукции HSP и наоборот – низкий конститутивный уровень этих белков коррелирует с высокой индукцией этих белков после действия теплового стресса. Полученные данные важны для понимания механизмов устойчивости растений к стрессам и могут быть полезны для отбора и создания высокоустойчивых продуктивных сортов сельскохозяйственно-значимых растений.

**Ключевые слова:** *Cucurbita* sp., белки теплового шока, тепловой стресс, семейство белков HSP70

DOI: 10.31857/S0555109924040052 EDN: SBHDFQ

Растения постоянно подвергаются воздействию различных видов биотических и абиотических стрессов, негативно влияющих на их рост, развитие и продуктивность. Первая линия защиты клеток, подвергшихся воздействию стрессовых условий представлена шаперонной системой. Белки теплового шока (HSP), обладающие шаперонной активностью, являются высоко консервативными и в зависимости от молекулярной массы их разделяют на семейства, которые включают HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 и малые HSP [1, 2].

Среди семейств белков теплового шока доминирующую роль играют плейотропные белки – шапероны HSP70, выполняющие разнообразные функции в клетке [3–5]. Шапероны HSP70 участвуют в фолдинге белков, повышении активности антиоксидантной системы, транслокации белков

через мембраны, удалении поврежденных белков, предотвращении денатурации белков и др. HSP70 обнаружены практически во всех клеточных компартментах (ядре, цитоплазме, эндоплазматическом ретикулуме, хлоропластах и митохондриях) [3, 4, 6].

Благодаря шаперонной активности, белки теплового шока являются универсальными цитопротекторами. Обладая такими разнообразными функциями, шапероны HSP70s играют важную роль при различных стрессах, что является ключевым фактором для роста и развития растений. Поэтому это семейство генов является отличным кандидатом для повышения устойчивости к множественным стрессам [7].

Показана жизненно важная роль шаперонов HSP70 в реакциях как на абиотические, так и на

биотические стрессы [8]. Недавно появились сообщения о более высоком уровне экспрессии HSP70 у устойчивых к болезням сортов? подсолнечника, по сравнению с восприимчивыми растениями [9]. Повышенные уровни HSP70 связаны с устойчивостью к засухе у риса [10], *Arabidopsis* [11], табака [12] сахарного тростника [13] и хризантемы [14].

Способность ослаблять повреждающие эффекты и сохранять клеточный гомеостаз растений, подвергающихся различным неблагоприятным воздействиям, делает некоторые HSP особенно привлекательными для повышения устойчивости к стрессам. Использование методов генетической инженерии и геномного редактирования позволяет использовать гены белков HSP для повышения устойчивости растений к стрессовым условиям. Так, сверхэкспрессия цитоплазматических генов HSP70-1 HSP70-2 перца *Capsicum annuum* в трансгенных клетках *Arabidopsis* привела к повышенной термотолерантности у *Arabidopsis* [15]. Эти результаты иллюстрируют важность и значение изучения HSP для практического использования. Однако необходимы дальнейшие исследования, которые позволят оценить функции HSP для создания желаемых признаков у конкретных культур. Механизм ответа клеток растений на тепловой стресс представляет собой сложную систему, и явное участие HSP70 в механизме термотолерантности нуждается в дальнейшем изучении.

Тыква – это широко культивируемая по всему миру овощная культура. Культура богата витаминами, минералами и антиоксидантами [16], имеет высокую пищевую и лекарственную ценность, а ее семена являются хорошим источником для получения масла [17]. Сравнительного изучения шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов у трех видов тыквы, преимущественно возделываемых в России, не проводилось.

В связи с угрозой глобального потепления и изменения климата проводятся опыты по созданию трансгенных растений, устойчивых к тепловому стрессу и повышенной температуре для выращивания. По-видимому, положительных результатов в этом направлении можно достичь, создавая растения с повышенной экспрессией генов белков теплового шока [18].

Сегодня свойствам и функциям белков теплового шока в живых организмах посвящено большое количество научных работ, проводимых в разных странах мира. Большинство исследований проводится на белках теплового шока цитоплазмы, в то время как белки хлоропластов изучены намного меньше. Особый интерес представляет изучение белков HSP70В хлоропластов в связи с их важной ролью в защите фотосинтетического аппарата. Интерес к шаперонам, скорее всего, будет лишь возрастать – настолько необычными, незаменимыми

и важными для жизни растений являются, как показывают исследования, эти белки [1, 2]

Цель данной работы – изучить динамику уровней белков теплового шока HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов при тепловом стрессе в клетках трех видов тыквы семейства *Cucurbita* – *C. maxima* Duchesne, *C. pepo* L. и *C. moschata* Duchesne, различающихся по устойчивости к стрессам окружающей среды.

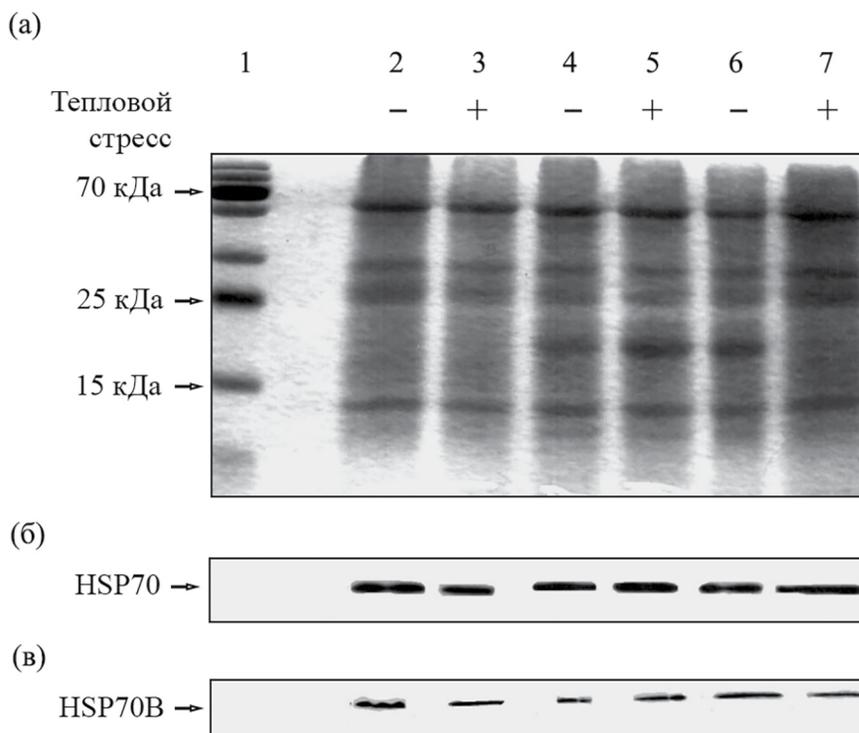
## МЕТОДИКА

**Объект исследования.** В качестве объектов исследования нами выбраны три наиболее распространённых на территории России вида тыквы – крупноплодная (*Cucurbita maxima* Duchesne) сорт Мраморная, твердокорая (*Cucurbita pepo* L.) сорт Кустовая оранжевая и мускатная (*Cucurbita moschata* Duchesne) и сорт Витаминная. Тыква в качестве объекта исследования была выбрана нами потому, что три указанных выше вида имеют различную устойчивость к неблагоприятным условиям (Круг, 2000). *C. maxima* и *C. pepo* характеризуются большей устойчивостью к неблагоприятным условиям, особенно тепловому стрессу, чем *C. moschata* [19].

Растения выращивали в климатической камере в следующих условиях освещения: 16 ч свет/8 ч ночь при 25°C в дневное время/16°C в ночное. Молодые 14-дневные растения тыквы делили на две группы: 1) растения оставляли в нормальных благоприятных для роста условиях; 2) растения подвергали воздействию теплового стресса – 38°C в течение 2 ч. После обработки листья собирали и использовали для анализа или хранили при –80°C для выделения препаратов.

**Выделение белка.** Для выделения суммарного белка растения замораживали в жидком азоте и растирали в ступке до консистенции пудры. В микропробирку помещали навеску 0.1 г растительного материала и добавляли 1мл буфера, следующего состава: Трис-HCl – 62.5 мМ, рН 6.8; ДДС-Na – 2.5%; 2-меркаптоэтанол – 5%; глицерин – 10%; PMSF – 10 мМ. Пробирки помещали в кристаллизатор со льдом на 10 мин. Затем пробирки прогревали при температуре 90°C в течение 5 мин и центрифугировали при 18000 g и комнатной температуре в течение 15 мин. Надосадочную жидкость собирали и определяли концентрацию белка по методу Бредфорда [20].

**Электрофорез белков в ПААГ.** Электрофорез белковых препаратов проводили по методу Леммли [21] в 12.5%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na. На одну дорожку наносили 60 мкг белка. После электрофоретического разделения белков в ПААГ гели окрашивали Кумасси ярко-голубым R-250 (0.2%-ный Кумасси R-250; 40%-ный этанол; 5%-ная уксусная кислота).



**Рис. 1.** Содержание белков Hsp70 цитоплазмы и Hsp70B хлоропластов в растениях тыквы мускатной *Cucurbita moschata* Duchesne (дорожки 2, 3), твердокорой *Cucurbita pepo* L. (дорожки 4, 5), крупноплодной *Cucurbita maxima* Duchesne (дорожки 6, 7) в условиях теплового стресса (+) или без (-): а – электрофореграмма белков, окрашенных Кумасси, белковый маркер (дорожка 1); б – иммуноблотинг с антителами к Hsp70 цитоплазмы; в – иммуноблотинг с антителами к Hsp70B хлоропластов.

**Вестерн-блот-гибридизация.** Для проведения иммунной реакции с помощью электроблоттинга белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для блокирования неспецифических сайтов связывания белков мембраны с иммобилизованными белками инкубировали в блокирующем буфере: 5%-ное сухое обезжиренное молоко в буфере TBST (50 мМ Трис/HCl, pH 7.5; 200 мМ NaCl; 0.1% Tween-20) в течение 1 ч при 4°C на мини-рокер-шейкере MR-1 (“BioSan”, Латвия). Затем добавляли первичные поликлональные кроличьи антитела к HSP70 цитоплазмы (AS08371; Agrisera) и HSP70B хлоропластов (любезно предоставленные проф. M. Shroda, TU Kaiserslautern, Германия) в разведении 1 : 3000 и 1 : 10000 соответственно и оставляли на ночь на мини-рокер-шейкере при 4°C.

Мембраны промывали 2 раза TBST. Далее мембраны снова помещали в блокирующий буфер и добавляли вторичные антитела (антитела козла к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, 1 : 20000, AS09602; “Agrisera”, Швеция). Прокачивали на шейкере в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембраны промывали TBST 2 раза по 2 мин, 3 раза по 5 мин.

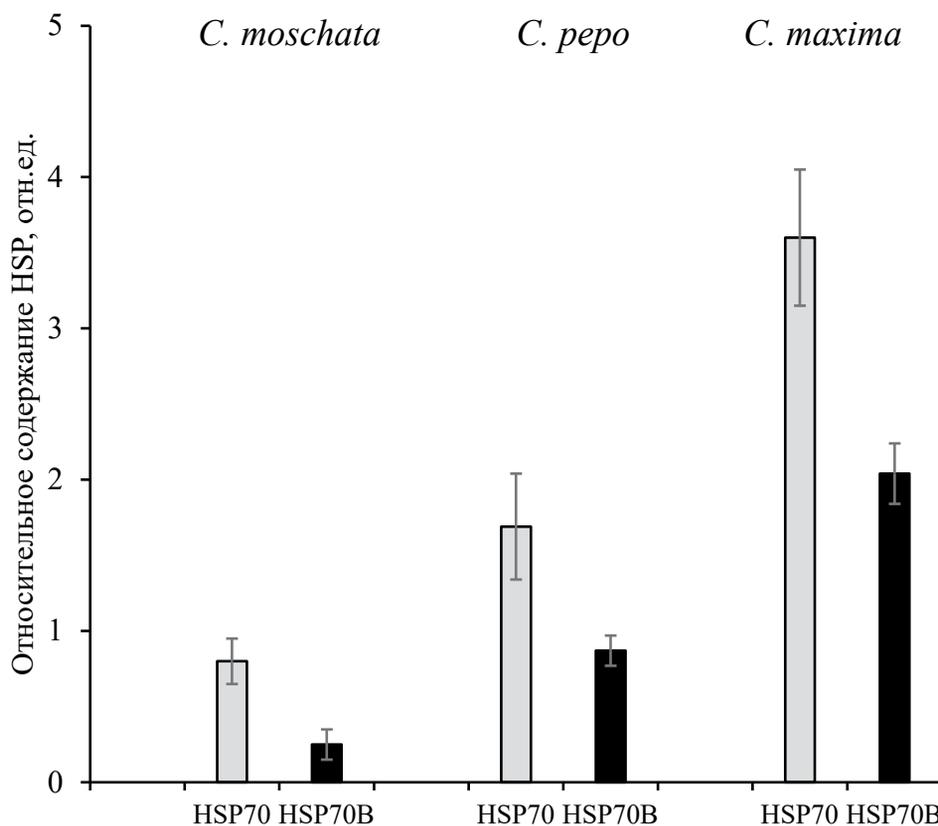
Использовали высокочувствительный метод иммунодетекции белков ECL (enhanced chemiluminescence) для определения иммобилизованных антигенов.

Раствор для проявления иммунных комплексов наносили на мембрану и регистрацию хемилюминесцентного сигнала проводили в темноте с помощью рентгеновской пленкой Retina X-ray. Продолжительность экспозиции составляла 1–3 мин. Рентгеновскую пленку проявляли, обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Далее в программе Excel проводили обработку данных и построение диаграмм.

Опыты повторяли по крайней мере три раза на независимо выращенных растениях. Количественный анализ уровня HSP проводили с помощью программы ImageJ, Статистический анализ проводили с помощью t-теста Стьюдента [22], используя Microsoft Office Excel 2003. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты изучения действия теплового стресса на белки теплового



**Рис. 2.** Изменение уровней белков HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов у трех видов тыквы после действия теплового стресса. Уровни белков теплового шока при тепловом стрессе рассчитаны относительно уровня HSP соответствующего вида тыквы в условиях без стресса.

шока Hsp70 цитоплазмы и Hsp70В хлоропластов у трех видов растений тыквы, отличающихся по устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды (*C. maxima* Duchesne  $\geq$  *C. pepo* L. > *C. moschata* Duchesne) [19].

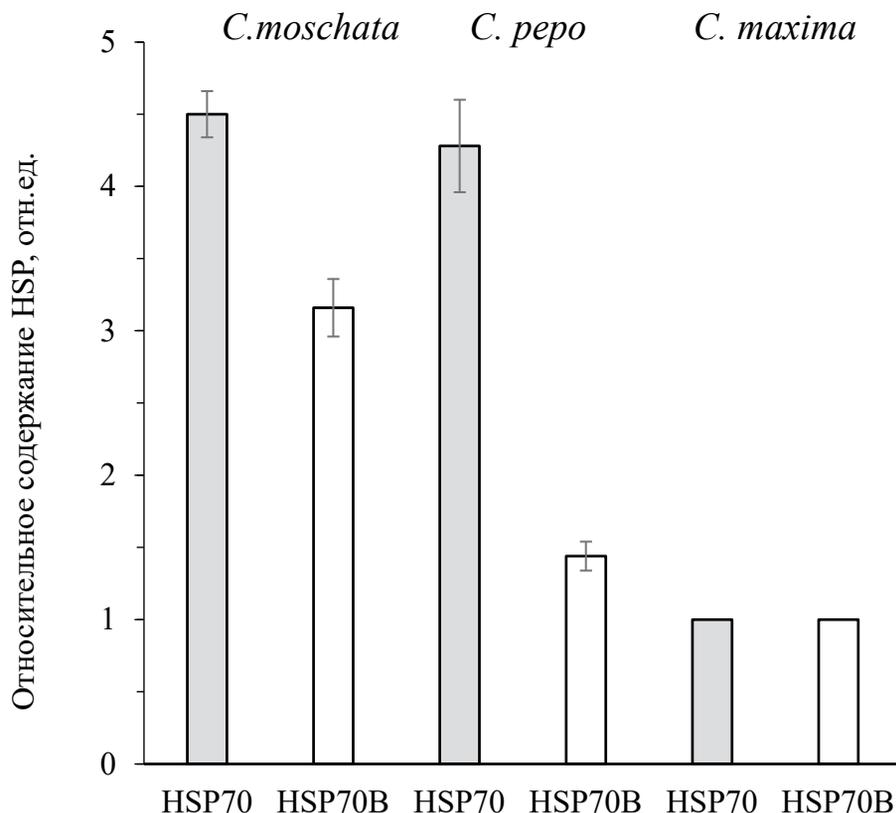
Установлена взаимосвязь между содержанием белков теплового шока HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов и видовой принадлежностью растений тыквы в условиях теплового стресса. Обнаружено, что по сравнению с нормальными условиями в условиях теплового стресса уровень белков HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов у *C. pepo* и *C. maxima* повышен, тогда как уровни этих белков у тыквы *C. moschata* снижены.

Проведены количественные расчеты относительных уровней HSP у трех видов тыквы в условиях теплового стресса по сравнению с необработанными растениями (рис. 2). При стрессе отмечено значительное повышение уровней белков теплового шока в клетках растений тыквы *C. maxima* – уровень HSP70 в цитоплазме возрос в 3.6 раза, а уровень HSP70В хлоропластов – в два раза. Тепловой стресс вызывал увеличение в 1.7 раза уровень цитоплазматического шаперона HSP70 в клетках растений тыквы *C. pepo*, а значимого изменения

уровня белка HSP70В не отмечено. Однако в результате действия теплового стресса на растения тыквы *C. moschata* выявлено уменьшение уровней HSP70 и HSP70В по сравнению с необработанными растениями.

Как следует из рис. 2 уровни белков цитоплазмы и хлоропластов изменяются сходным образом у каждого из видов тыквы после действия теплового стресса. Однако у всех изученных видов тыквы уровень белков HSP70 цитоплазмы превышал уровень HSP70В хлоропластов, что, по-видимому, обусловлено в три раза более высоким числом генов HSP70 цитоплазмы (10 генов) по сравнению с HSP70В хлоропластов (3 гена) [23, 24].

Известно, что белки теплового шока способствуют поддержанию гомеостаза в клетках живых организмов, что особенно важно в условиях стресса. На основании этого нами был сделан вывод, что увеличение уровней HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов в клетках растений тыквы *C. maxima* говорит о ее способности активно противостоять тепловому стрессу и выжить в неблагоприятных условиях. Это согласуется с гипотезой о том, что белки теплового шока семейства HSPs70 являются



**Рис. 3.** Конститутивные уровни белков HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов у трех видов тыквы в условиях без теплового стресса. За 1 ед. принят уровень белков теплового шока HSP70 и HSP70B у растений *C. maxima*.

одними из основных компонентов устойчивости к стрессам [8–10].

Повышение температуры приводило к меньшему повышению уровней белков теплового шока HSP70 в клетках растений тыквы *C. pepo*, и не вызывало значимого изменения уровня белка HSP70B после воздействия стресса. Это указывает на относительную устойчивость данного вида и увеличение вероятности его гибели при продолжительном действии неблагоприятного фактора по сравнению с *C. maxima*.

В результате воздействия повышенных температур на растения тыквы вида *C. moschata*, было выявлено снижение уровней HSP70 и HSP70B по сравнению с необработанными растениями, что указывало не только на низкую способность противостоять стрессу, но и на начавшиеся в клетках деструктивные процессы. Не исключено, что избыточная конститутивная экспрессия генов HSP70 у *C. moschata* могла также приводить к подавлению синтеза новых HSP или некоторых других белков теплового стресса, как это ранее было показано для клеток экстремальных психрофилов [15].

Определение уровня шаперонов HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов в растениях, не подвергавшихся тепловому стрессу, показало более

высокий конститутивный уровень HSP70 у тыкв *C. moschata* и *C. pepo* по сравнению *C. maxima*. Наименьший конститутивный уровень белков теплового шока цитоплазмы и хлоропластов HSP70B обнаружен у вида *C. maxima* и был принят за единицу (рис. 3). Как следует из рисунка конститутивные уровни HSP70 цитоплазмы и HSP70B хлоропластов у тыквы *C. moschata* в 4.5 и 2 раза выше, а у тыквы *C. pepo* в 4.3 раза и в 1.5 раза выше по сравнению с тыквой *C. maxima* соответственно (рис. 3).

Анализ полученных данных показал, что существует обратная зависимость между конститутивным уровнем белков теплового шока у растений трех видов тыквы и индуцированным уровнем шаперонов после действия теплового стресса. Таким образом, более высокие конститутивные уровни белков теплового шока в клетках *Cucurbita* коррелировали с более низкой индукцией HSP70 и HSP70B после воздействия стресса. По-видимому, для устойчивых к тепловому стрессу растений в большей степени важен высокий показатель уровня индукции белков теплового шока, чем более высокий конститутивный уровень шаперонных белков. Предполагают, что высокий конститутивный уровень HSP связан с конститутивно экспрессирующимися HSP70, которые участвуют

**Таблица 1.** Число генов *HSP* в геноме некоторых видов высших растений

Вид (плоидность)	<i>sHSP</i>	<i>HSP60</i>	<i>HSP70</i>	<i>HSP90</i>	<i>HSP100</i>	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2n)	19	18	18	7	7	[26]
<i>Lactuca sativa</i> (2n)	32	22	64	7	7	[29]
<i>Oriza sativa</i> (2n)	29	20	27	8	9	[32]
<i>Populus trichocarpa</i> (2n)	37	28	20	10	5	[27]
<i>Setaria italic</i> (2n)	37	20	27	9	20	[28]
<i>Triticum aestivum</i> (6n)	169	95	114	18	84	[30, 31]
<i>Cucurbita moschata</i> (2n)	–	–	21	–	–	[24]
<i>Capsicum annuum</i> (2n)	–	–	21	–	–	[15]

в поддержании жизненной активности клеток в нормальных условиях, а индуцированные белки HSP это те белки, которые участвуют в защите от окислительного стресса, вызванного тепловым или другими видами стресса [23]. На основании этих результатов можно предположить, что индукция этих белков может рассматриваться как клеточный компенсаторный механизм. Полученные результаты указывают на то, что HSP70 цитоплазмы и HSP70В хлоропластов являются не только защитными белками клетки, но могут служить и маркерами окислительного стресса.

Сходные результаты были получены для клеток зеленых водорослей, выросших в экстремальных условиях Антарктики. В клетках обнаружено повышенное содержание конститутивных HSP70 цитоплазмы [23] и HSP70В хлоропластов [25]. Однако тепловой стресс не вызывал у этих водорослей дальнейшего увеличения содержания белков теплового стресса. По-видимому, клетки теряли способность к дополнительному накоплению HSP или достигнут максимальный уровень этих шаперонов в клетке.

К настоящему времени проведено обширный биоинформатический анализ семейств генов *HSP* в стрессовых условиях, а также при развитии и росте растений. Анализ полностью секвенированных геномов ряда растений позволил обнаружить все предполагаемые гены белков теплового шока, их дублирование и разнообразие, изучить структуру генов – консервативных сайтов, специфических мотивов, интронов, экзонов, сайтов связывания с различными лигандами, а также провести филогенетический анализ и распределение генов *HSP* на хромосомах [24].

Большинство фундаментальных исследований HSP выполнено на модельном растении *A. thaliana* [26]. К настоящему времени проведена также характеристика представителей всех семейств HSP у таких видов, как *A. thaliana* [26], тополь

(*P. trichocarpa*) [27], щетинник (*Setaria italica*) [28], салат латук (*Lactuca sativa*) [29], пшеница (*Triticum aestivum*) [30, 31] и рис (*O. sativa*) [32] (табл. 1).

Как следует из табл. 1 наибольшее число представителей HSP выявлено у семейств белков теплового шока – *sHSP*, *HSP60* и *HSP70*. Недавно был проведен биоинформатический анализ семейства генов *HSP70* тыквы *C. moschata*, включая филогенетические взаимоотношения, мотивы и структурный анализ генов, дубликацию генов и анализ промоторов. Геномный анализ выявил у *C. moschata* 21 ген *HSP70*, которые были разделены на пять групп на основании структурного анализа (от А до Е). Предсказана субклеточная локализация представителей семейства HSP70 у *C. moschata*. Предполагено, что белки в цитоплазме локализованы – 10 HSP70, в хлоропластах – 3, митохондриях – 2, ядре – 2 и эндоплазматическом ретикулуме – 4.

У тыквы обнаружено сходное число генов *HSP70* с перцем, тополем и представителями *Arabidopsis* в отличие от других изученных видов растений (табл. 1). Однако салат-латук, рис, щетинник и пшеница содержали существенно больше генов *HSP70* – 64, 27, 27 и 114 соответственно. Разное количество генов одного и того же семейства HSP у разных видов может быть связано с размером генома или эволюционным разнообразием [24]. Показано, что HSP70 локализованные в одном и том же компартменте клетки имеют сходные свойства или функции. Эти белки имеют большое сходство с точки зрения мотивов, количества интронов/экзонов и локализации в соответствующих клеточных компартментах. По-видимому, дубликация генов оказывает решающее влияние на увеличение представителей семейств генов HSP в геноме и на эволюцию генома растений [33]. Предполагают, что увеличение числа генов *HSP70* происходило в основном за счет сегментарной, а не тандемной дубликации [24].

Показано, что между двумя видами растений, относящихся к одному семейству (как например огурец и тыква) больше ортологичных генов *HSP70*, чем между тыквой и *Arabidopsis*. Однако при этом обнаружено пять общих генов (*СмоCh08G006500.1*, *СмоCh03G004440.1*, *СмоCh07G010280.1*, *СмоCh02G009230.1* и *СмоCh15G013530.1*) между этими тремя видами, что может указывать на консервативную функцию этих генов у разных видов растений [24]. По-видимому, эти пять консервативных генов могут выполнять важные функции в клетке и участвовать в формировании устойчивости растений к стрессам.

Обнаружено, что действие двух близких стрессов засуха и тепловой стресс (чаще всего оба стресса действуют одновременно) индуцирует сходные профили транскрипции гена *HSP70*. Анализ профилей транскрипции генов *HSP* растений показал значительное перекрытие между профилями ответа на тепловой стресс и засуху, что указывает на тесное взаимодействие участвующих сигнальных путей в клетке [34]. В клетках *C. moschata* обнаружено всего 10 генов *HSP70* цитоплазмы из них в условиях засухи существенно индуцировалось два гена *HSP70* цитоплазмы (*СмоCh07G010280.1* и *СмоCh10G004900.1*). По-видимому, эти индуцируемые гены важны для устойчивости и к тепловому стрессу. Эти два гена похожи по структуре и обеспечивают высокий уровень экспрессии генов этих белков. С помощью транскрипционного анализа показано, что 13 генов из 21 генов *HSP70* не изменяют активности в ответ на действие засухи.

У высших растений в отличие от водорослей обнаруживается избыточное число генов *HSP70*. Полагают, что эти гены образовались в результате дупликации. Функции этих избыточных генов *HSP70* еще предстоит изучить. Растения, как организмы, которые не способны передвигаться и избегать стрессов, обладают развитыми механизмами защиты для выживания или адаптации к стрессовым условиям. Например, эволюционный анализ показал, что растения имеют в 3–4 раза больше генов белков, стрессового ответа, например, таких как белки теплового шока, чем другие организмы, в результате дупликации всего генома [24].

Биоинформатический анализ промоторной области показал присутствие различных цис-регуляторных элементов в (up-stream) области перед генами *HSP70* цитоплазмы, таких как элементы, реагирующие на стресс и гормоны. Все это указывает на потенциальную роль генов этого семейства в устойчивости к стрессовым воздействиям [24]. Необходимо дальнейшее изучение функций этих идентифицированных *HSP70* белков.

В различных компартментах хлоропласта обнаружены три белка *Hsp70*. В строме хлоропластов выявлены два *Hsp70*, участвующих в сворачивании денатурированных белков. Помимо роли *Hsp70* стромы хлоропластов в рефолдинге денатурированных белков у них обнаружена узкоспециализированная активность по защите фотосистемы II (ФСII) от светового стресса [35]. Предполагают, что один из белков стромы – *HSP70В* может защищать ФСII от необратимого фотоповреждения или стабилизировать фотоповрежденную ФСII. По-видимому, *HSP70В* участвует также в биогенезе/поддержании тилакоидных мембран [35]. Третий белок *Hsp70* с молекулярной массой 75 кДа., обнаруженный в хлоропластах, локализован с внутренней стороны оболочки хлоропласта. По нашим данным именно белок *HSP70В* хлоропластов индуцируется тепловым стрессом и может служить индикатором окислительного стресса [2, 35].

Разнообразная роль представителей семейства *HSP70* в условиях засухи дает информацию для дальнейшего изучения функций представителей этого жизненно важного семейства, особенно в стрессовых условиях. Основываясь на полученных нами данных и биоинформатическом анализе можно заключить, что два белка *HSP70* цитоплазмы и белок *HSP70В* хлоропластов *Cucurbita* представляют наибольший интерес для практических целей и согласуются с ранее опубликованными данными о ключевой функции *HSP70* в реакциях на стрессовые условия [24]. Это необходимая информация, как для селекции, так и для интродукции – введении в культуру растений как в пределах ареала, так и в новых областях, где эти виды не встречались.

В условиях засухи и состоянии теплового шока растения могут оказаться очень часто поэтому, данное исследование может быть использовано для разработки новых стратегий и инструментов повышения устойчивости к стрессу с помощью генетических манипуляций. Полученные результаты позволят глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе стрессовых ответов фотосинтезирующих клеток, а также может иметь практическое значение.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23 2400486).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Al-Whaibi M.H.* // J. King Saud Univ.-Science. 2011. V. 23. P. 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
2. *Юрина Н.П.* // Молекулярная биология. 2023. Т. 57. С. 949–964. <https://doi.org/10.31857/S00 M26898423060228>
3. *Cazale A.C., Clement M., Chiarenza S., Roncato M.A., Pochon N., Creff A. et al.* // J. Exp. Bot. 2009. V. 6. P. 2653–2664. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp109>
4. *Ul Haq S., Khan A., Ali M., Khattak A.M., Gai W.X., Zhang H.X. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. 5321. <https://doi.org/10.3390/ijms20215321>
5. *Rehman A., Atif R.M., Qayyum A., Du X., Hinze L., Azhar M.T.* // Genomics. 2020. V. 112. P. 4442–4453. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.07.039>
6. *Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L.* // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 789–800. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.789>
7. *Masand S., Yadav S.K.* // Mol. Biol. Rep. 2016. V. 43. P. 53–64. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3938-y>
8. *Jung K.H., Gho H.J., Nguyen M.X., Kim S.R., An G.* // Funct. Integr. Genom. 2013. V. 13. P. 391–402. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0331-6>
9. *Kallamadi P.R., Dandu K., Kirti P.B., Rao C.M., Thakur S.S., Mulpuri S.* // Proteomics. 2018. V. 18. 1700418. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700418>
10. *Devarajan A.K., Muthukrishnan G., Truu J., Truu M., Ostonen I., Kizhaeral S.S. et al.* // Plants. 2021. V. 10. 387. <https://doi.org/10.3390/plants10020387>
11. *Pulido P., Llamas E., Rodriguez-Concepcion M.* // Plant Signal. Behav. 2017. V. 12. e1290039.
12. *Cho E.K., Hong C.B.* // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. P. 349–358. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0093-2>
13. *Augustine S.M., Cherian A.V., Syamaladevi D.P., Subramonian N.* // Plant Cell Physiol. 2015. V. 56. P. 2368–2380. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv142>
14. *Song A., Zhu X., Chen F., Gao H., Jiang J., Chen S.* // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 5063–5078. <https://doi.org/10.3390/ijms15035063>
15. *Guo M., Liu J.-H., Ma X., Zhai Y.-F., Gong Z.-H., Lu M.-H.* // Plant Sci. 2016. V. 252. P. 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.001>
16. *Mokhtar M., Bouamar S., Di Lorenzo A., Temporini C., Daglia M., Riazi A.* // Molecules. 2021. V. 26. 3623. <https://doi.org/10.3390/molecules26123623>
17. *Vinayashree S., Vasu P.* // Food Chem. 2021. V. 340. 128177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128177>
18. *Grover A., Mittal D., Negi M., Lavania D.* // Plant Science. 2013. V. 205–206. P. 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.01.005>
19. *Круг Г.* Овощеводство. Перевод с немецкого. М.: Колос, 2000. 572 с.
20. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
21. *Laemmly U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
22. *Snedecor G.W., Cochran W.G.* // Statistical methods. 6th Ed., Ames, Iowa: The Iowa state University. 1967.
23. *Cvetkovska M., Zhang X., Vakulenko G., Benzaquen S., Szyszka-Mroz B., Malczewski N. et al.* // Plant, Cell & Environment. 2022. V. 45. P. 156–177. <https://doi.org/10.1111/pce.1420>
24. *Davoudi M., Chen J., Lou Q.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. 1918. <https://doi.org/10.3390/ijms23031918>
25. *Chankova S., Mitrovska Z., Miteva D., Oleskina Y.P., Yurina N.P.* // Gene. 2013. V. 516. P. 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.052>
26. *Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P.* // BMC Genomics. 2007. V. 8. 125. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-125>
27. *Zhang L., Zhao H.-K., Dong Q.-L., Zhang Y.-Y., Wang Y.-M., Li H.-Y. et al.* // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. 773. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00773>
28. *Singh R.K., Jaishankar J., Muthamilarasan M., Shweta S., Dangi A., Prasad M.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. 32641. <https://doi.org/10.1038/srep32641>
29. *Kim T., Samraj S., Jimenez J., Gomez C., Liu T., Begcy K.* // BMC Plant Biol. 2021. V. 17. 185. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02959-x>
30. *Kumar A., Sharma S., Chunduri V., Kaur A., Kaur S., Malhotra N. et al.* // Sci. Repts. 2020. V. 10. 7858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64746-2>
31. *Duan S., Liu B., Zhang Y., Li G., Guo X.* // BMC Genomics. 2019. V. 20. 257. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5617-1>
32. *Hu W., Hu G., Han B.* // Plant Sci. 2009. V. 176. P. 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.01.016>
33. *Andrási N., Pettkó-Szandtner A., Szabados L.* // Journal of Experimental Botany. 2021. V. 72. P. 1558–1575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa576>
34. *Schroda M.* // Photosynthesis Research. 2004. V. 82. P. 221–240. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2216-y>
35. *Ермохина О.В., Белкина Г.Г., Олескина Ю.П., Фаттахов С.Г., Юрина Н.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 612–617. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050160>

## The Dynamics of the Levels of Cytoplasmic HSP70 and Chloroplast HSP70B Chaperones under Heat Stress Differs in Three Species of Pumpkin with Different Resistance to Stress

N. D. Murtazina<sup>a</sup>, L. S. Sharapova<sup>a</sup>, N. P. Yurina<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru*

The first line of defense in plants under stress is the cell chaperone system. In this work, we studied the effect of heat stress on the levels of cytoplasmic chaperones HSP70 and HSP70B in chloroplasts of three species of *Cucurbita* (*C. maxima* Duchesne, *C. pepo* L. and *C. moschata* Duchesne), which differ in resistance to stress. A relationship has been established between the levels of chaperones HSP70 in the cytoplasm and HSP70B in chloroplasts and the species of pumpkin plants under heat stress conditions. Under stress, a significant increase in the level of chaperones was observed in the cells of pumpkin plants *C. maxima* – the level of HSP70 in the cytoplasm increased by 3.6 times, and the level of HSP70B in chloroplasts – by two times. Heat stress caused a 1.7-fold increase in the level of the cytoplasmic chaperone HSP70 in the cells of *C. pepo* pumpkin plants, but no significant change in the level of the HSP70B protein was noted. However, as a result of the effect of heat stress on *C. moschata* pumpkin plants, a decrease in the levels of HSP70 and HSP70B was revealed compared to untreated plants. The dynamics of changes in the levels of chaperones in the cytoplasm and chloroplasts under the influence of heat stress are similar. It should be noted that the constitutive level of HSP70 and HSP70B under normal conditions in *C. moschata* and *C. pepo* is higher than in *C. maxima*. Analysis of the data obtained revealed an interesting pattern: high constitutive levels of HSP lead to insignificant induction of HSP and vice versa – low constitutive level of these proteins correlates with high induction of these proteins after heat stress. The data obtained are important for understanding the mechanisms of plant resistance to stress and can be useful for the selection and creation of highly resistant productive varieties of agriculturally important plants.

*Keywords:* *Cucurbita* sp., heat shock proteins, heat stress, HSP70 protein family

УДК 579.22:577.13:633.358

## ФИЛОГЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ПРОРОСТКОВ

© 2024 г. Л. Е. Макарова<sup>1,\*</sup>, Ю. А. Маркова<sup>1</sup>, Ю. В. Зайцева<sup>3</sup>, А. А. Бычкова<sup>3</sup>, И. В. Горбенко<sup>1</sup>, Ю. М. Константинов<sup>1,2</sup>, И. А. Васильев<sup>1</sup>, А. С. Мориц<sup>1</sup>, П. А. Бизиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003 Россия

<sup>3</sup>Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, 150003 Россия

\*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Ранее было показано, что эндофитные бактерии могут перемещаться из корней проростков растений гороха (*Pisum sativum* L.) в ризосферу. В настоящей работе при выращивании проростков на водной среде из среды для роста корней выделены 6 штаммов бактерий. С помощью анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рРНК установлено таксономическое положение этих штаммов с точностью до рода. Изучены культурально-морфологические признаки, активность гидролитических ферментов (пектиназы, целлюлазы, протеазы), ИУК-продуцирующая способность. Обнаружено, что количество эндофитных бактерий, оказывающихся на поверхности корня проростков гороха, существенно превышает их количество в тканях корня. Сделано предположение, что в перемещении исследуемых бактерий во внешнюю среду принимали участие гидролитические ферменты пектиназы и целлюлазы, вызывающие разрушение углеводных структур растительных клеточных стенок. Обсуждаются особенности метаболизма у исследуемых штаммов эндофитных бактерий и их значение для растения-хозяина после их выхода из корней в ризосферу.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии, ген 16S рРНК, целлюлаза, пектиназа, протеаза, ИУК- продуцирующая способность бактерий

DOI: 10.31857/S0555109924040064 EDN: SATJVO

В жизнедеятельности растений важная роль принадлежит непатогенным эндофитным бактериям, поселяющимся в растениях и вступающим с ними в мутуалистические взаимоотношения [1–4]. Со стороны растений осуществляется регуляция локализации и численности эндофитных бактерий в пределах растительного организма, а со стороны эндофитных бактерий – биоконтроль колонизации растений не только патогенными микроорганизмами, но и насекомыми [3].

Особый интерес вызывают исследования взаимодействия эндофитных ненодулирующих и нодулирующих видов бактерий при формировании бобово-ризобиальных симбиозов [4–5]. Считают, что поселяющиеся в клубеньках неризобиальные эндофитные бактерии способствуют функционированию азотфиксирующей системы, обеспечивая улучшение минерального питания и синтез

биологически активных соединений [7]. По спискам приведенных в публикациях [1, 4, 6, 8] в числе таксонов эндофитных бактерий, встречающихся в тканях бобовых культур, насчитывается более 30 неризобиальных родов.

Временным хранилищем эндофитных бактерий можно рассматривать семена [8]. После прорастания семян эндофитные бактерии перемещаются в развивающиеся органы проростков. Далее они могут проникать из тканей растения во внешнюю среду, что было зафиксировано у проростков гороха, полученных из поверхностно обеззараженных семян [9]. Проведенные исследования позволили установить, что эндофитные бактерии, аккумулярованные в семенах гороха, по мере роста появляющихся проростков через корни проникают во внешнюю среду, где размножаются и по-разному способны взаимодействовать с ризосферными

бактериями, включая нодулирующие корни гороха ризобии. Установлено, что взаимодействия обсуждаемых эндофитных бактерий с ризобиями не вызывают изменений в их составе и, таким образом, благоприятны для размножения последних в ризосфере гороха [9].

У выращенных в асептических условиях проростков в водной среде, куда на 1 сут помещали их корни, было обнаружено 6 штаммов бактерий [9]. Для данных штаммов исследованы некоторые морфологические показатели, получены данные о неоднозначности их взаимодействия с разными видами ризосферных бактерий и способности деградировать нафталиновые структуры с образованием фталатов. При этом не были определены механизмы перемещения этих бактерий из тканей корня во внешнюю среду для выхода эндофитных бактерий из корней в ризосферу и не установлена их таксономическая принадлежность.

Выявленные штаммы, неоднозначно взаимодействуя с другими видами почвенных бактерий [9], вероятно, способны вносить изменения в состав почвенного микробиома путем воздействия на другие виды бактерий посредством синтезируемых ими метаболитов. В частности, в числе таковых – фталаты, которые образуются в их клетках при деградации полициклических соединений. Это свойство бактерий было описано в работе [9]. Было показано, что все 6 штаммов способны деградировать *N*-фенил-2-нафтиламин – один из представителей полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), присутствующий в корневых экссудатах бобовых культур, с образованием фталатов [10]. При этом штаммы отличались по активности деградации указанного соединения и по соотношению образовавшихся при этом видов фталатов. Известно, что фталаты, в зависимости от структуры входящих в их состав алкильных группировок, связанных эфирной связью с фталевой кислотой, неоднозначно влияют на жизнедеятельность разных видов бактерий [11].

В литературе присутствуют, в основном, описания путей и механизмов проникновения эндофитных бактерий в растения [4, 8, 5]. Эти бактерии попадают в растения преимущественно через корневую систему из почвы и, отчасти, через устьица, и могут продвигаться далее по апопласту и сосудам растений. Проникновению данных бактерий в растительные ткани могут способствовать разрывы в эпидермисе, а также имеющиеся у этих бактерий гидролитические ферменты. В корни бобовых растений нодулирующие эндофитные бактерии могут проникать через корневые волоски совместно с ризобиями [7].

Цель настоящей работы – идентификация штаммов бактерий, выделенных из водной среды роста корней проростков гороха, определение наличия у этих бактерий гидролитических ферментов

для перемещения из корневых тканей во внешнюю среду и выяснение их способности оказывать влияние на рост растения, посредством продуцирования индоллил-уксусной кислоты (ИУК).

## МЕТОДИКА

**Изоляция штаммов бактерий.** Культуры бактерий выделяли из водной среды, куда помещали корни проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг, выращенных из поверхностно стерилизованных семян [9].

Колонии эндофитных бактерий получали на твердой агаризованной среде, приготовленной на гороховом отваре как описано в работе [9], на которую наносили содержащую бактерии водную суспензию из сосуда, где находились корни проростков. Бактерии из одиночных колоний неоднократно пересеивали на новые твердые среды до получения однотипных по внешнему виду колоний и содержащихся в них клеток. Полученные таким образом культуры бактерий использовали для исследований.

**Определение соотношения количества бактерий, содержащихся на поверхности корней и в тканях у проростков гороха.** Объектами исследования служили этиолированные проростки гороха сорта Торсдаг. Поверхностную стерилизацию семян, используемых для исследования эндофитных бактерий, проводили в 3 этапа, по схеме, описанной в работе [9]. По этой схеме, семена промывали мыльным раствором, затем помещали на 10 мин в 95%-ный этанол, а после отмытия – на 30 мин в 3%-ный раствор пероксида водорода. После каждого вида обработки семена 3-кратно отмывали стерильной водой. Для контроля эффективности стерилизации на твердую агаризованную среду наносили небольшие количества смывных вод, полученных после третьего промыва семян, обработанных перекисью, либо на такую же среду помещали семена (на 2 ч). Затем в течение 2–3 сут проводился просмотр поверхности сред. Отсутствие на средах бактериальных колоний служило подтверждением эффективности проведенной поверхностной стерилизации семян.

Отмытые от раствора пероксида семена заливали стерильной водой нагретой до 60°C. После охлаждения воды до комнатной температуры семена помещали в термостат на 6–7 ч для набухания. Далее семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашках Петри для получения трехсуточных проростков. Рост проростков проходил в термостате с температурой 21°C и при отсутствии освещения. Набухание семян, рост проростков, процедуры, проводимые с проростками, происходили в строго соблюдаемых асептических условиях. У проростков отделяли корни, которые делили на 2 группы. В одну группу входили корни,

которые промывали детергентом (0.01% нонидет Р-40) для удаления с их поверхности бактерий, во вторую группу входили необработанные детергентом корни. После обработки детергентом корни 3-кратно промывали стерильной водой и полноту отмывки от бактерий контролировали после нанесения небольшого количества последних смывных вод на твердую агаризованную среду.

Небольшие навески корней (1–2 г) каждой из групп растирали до кашицы в керамической ступке, заливали небольшим объемом стерильной воды, перемешивали, и полученные суспензии в разных разведениях наносили для выращивания бактерий на твердые агаризованные среды, которые готовили на гороховом отваре с сахарозой в качестве источника углерода по [9]. Количество бактерий рассчитывали на 1 г сырой массы корня.

**Исследование морфолого-культуральных признаков штаммов бактерий.** Изучали морфолого-культуральные показатели для колоний и клеток, тип реакции по Граму. Морфологические показатели для колоний бактерий получали при выращивании их на твердой агаризованной среде, приготовленной на гороховом отваре, как описано в работе [9], и на агаризованной среде Эшби. Изучение формы и размеров клеток при помощи инвертированного микроскопа “Axio Observer” (“Carl Zeiss Microscopy”, Германия) проводили, используя суспензии бактерий, взятых из отдельных колоний и окрашенных по Граму.

**Молекулярно-генетическая идентификация штаммов.** Идентификацию проводили с помощью анализа гена 16S рРНК. Тотальную ДНК из суточных культур микроорганизмов выделяли с помощью набора ExtractDNA (“Евроген”, Москва) в соответствии с инструкциями производителя. Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием универсальных прокариотических праймеров: 16S-9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG), 16S-1512R (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT). ПЦР проводилось с помощью коммерческого набора БиоМастер HS-Тақ ПЦР-Color (2х), оптимизированного для ПЦР с горячим стартом согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Москва).

Условия ПЦР: предварительная денатурация 95°C 4 мин. Денатурация 95°C 1 мин, отжиг 55°C 1 мин, элонгация 72°C 1.5 мин, 30 циклов. Финальная элонгация 72°C 5 мин. Детекция результатов ПЦР осуществлялась методом электрофореза в 1.5% агарозном геле. Выделение и очистка амплифицированных генов 16S рРНК производилась с помощью набора CleanupMini (“Евроген”, Москва) согласно инструкциям производителя.

Последовательности, секвенированные в настоящее исследование, были загружены в БД NCBI Nucleotide под идентификаторами: PS1 – OQ383612; PS2 – OQ383613; PS3 – OQ383614; PS4 – OQ383615; PS5 – OQ383616; PS6 – OQ383617. Названия

штаммов присвоены по первым буквам растения, из которого они выделены (*Pisum sativum*) с порядковыми номерами.

Идентификацию бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с использованием базы данных SILVA [12] и пакета dada2 для R [13].

Для построения филогенетического дерева дополнительно использовались по 10 последовательностей самой высокой оценки подобия из результатов BLASTN. Выравнивание производили с помощью ПО MAFFT [14]. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA11 [15] с помощью метода Neighbor-Joining [16] с бутстрепом (10000 повторностей). Эволюционный расстояние рассчитывались с помощью метода “p-distance” [17]. В качестве аутгруппы использовали последовательность *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA, complete sequence (GenBank: J01859.1).

**Определение подвижности бактерий.** Для определения подвижности микроорганизмов использовали среду БТН-бульон (ООО “Биотехновация”, Россия) с 0.4%-ным агаром. Среду разливали в пробирки по 5–7 мл, посев проводили уколом [18]. Культивировали 10 сут при 37°C. Подвижность оценивали визуально, неподвижные микроорганизмы росли по ходу укола, подвижные давали диффузный рост.

**Определение протеолитической активности.** К БТН-бульону (ООО “Биотехновация”, Россия) добавляли 15% желатина, оставляли для набухания на 30 мин и нагревали на водяной бане до полного растворения желатина. Полученную среду разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали. Посев проводили уколом, культивировали 10 сут при 37°C [18]. Разжижение столбика желатина отмечали визуально.

**Определение пектиназной и целлюлазной активности.** Бактерии культивировали в стеклянных колбах при 27°C на минеральной среде 8E [19] с 5 г/л пектина (для определения пектиназной активности) или фильтрованной бумаги размером 1 × 5 см (для определения целлюлазной активности). Определение активности целлюлазы и пектиназы бактерий осуществляли по количеству образовавшихся редуцирующих сахаров методом, описанным в работе [20]. Количество редуцирующих сахаров оценивали через 3 и 14 сут экспозиции. Для этого суспензию бактерий центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. К 0.5 мл раствора Шомоди добавляли 0.5 мл супернатанта, смесь нагревали до 60°C на водяной бане 20 × 40 мин. После охлаждения добавили 0.5 мл раствора Нельсона, а затем 5.0 мл Н<sub>2</sub>O. Измерения проводили при 750 нм против контрольного раствора (0.5 мл раствора Шомоди + 0.5 мл раствора Нельсона + 4.0 мл Н<sub>2</sub>O). Содержание сахаров определяли с помощью калибровочной кривой. Активность ферментов

выражали в мг редуцирующих сахаров и рассчитывали на мг белка на 3 сут. Количество белка определяли методом Лоури.

**Определение продукции индолилуксусной кислоты (ИУК).** Бактерии культивировали в минеральной среде 8E с 5 г/л глюкозы и 200 мг/л триптофана, как предшественника индолилуксусной кислоты. Бактериальную суспензию на 3 и 14 сут экспозиции центрифугировали 15 мин при 1000 g. Как описано в работе [21], 1.0 мл супернатанта смешивали с 1.0 мл реактива Сальковского. Оптическую плотность измеряли при 490 нм с помощью спектрофотометра Specord S-100 (“BioRad”, США). Развитие розовой окраски показывало наличие ИУК. Содержание ИУК определяли с помощью калибровочной кривой и выражали в мг/мл среды.

**Статистическая обработка.** Все измерения проводили в 3–5 повторностях. Для показателей активности ферментов (пектиназы, целлюлазы) и содержания ИУК вычисляли средние значения и стандартные отклонения к ним. Вычисления производили в программе Microsoft Excel 2007 (“Microsoft,” США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

О выходе эндофитных бактерий во внешнюю среду свидетельствуют данные, приведенные в публикации [9], а также впервые полученные при выращивании проростков в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге (см. Методику). В ранее опубликованной работе [9] были использованы двухсуточные проростки гороха. Их корни помещали в водную среду, где наличия бактерий в нулевой

временной точке не выявляли, а через 1 сут экспозиции титр бактерий достигал  $2.3 \times 10^7$  кл./мл. По полученным на основе этих данных расчетам, с учетом объема водной среды и числа проростков, приходящихся на 1 сосуд, к концу экспозиции на 1 корень приходилось  $14.7 \times 10^7$  клеток бактерий. У трехсуточных проростков, росших на фильтровальной бумаге, количество бактерий на поверхности 1 корня после 3 сут выращивания проростков на влажной фильтровальной бумаге составляло около  $8.9 \times 10^5$  клеток. По-видимому, водная среда с минимальным количеством микроэлементов, в которую из корней экскретировались органические компоненты в составе корневых экссудатов, способствовала более активному размножению эндофитных бактерий, чем условия роста на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри.

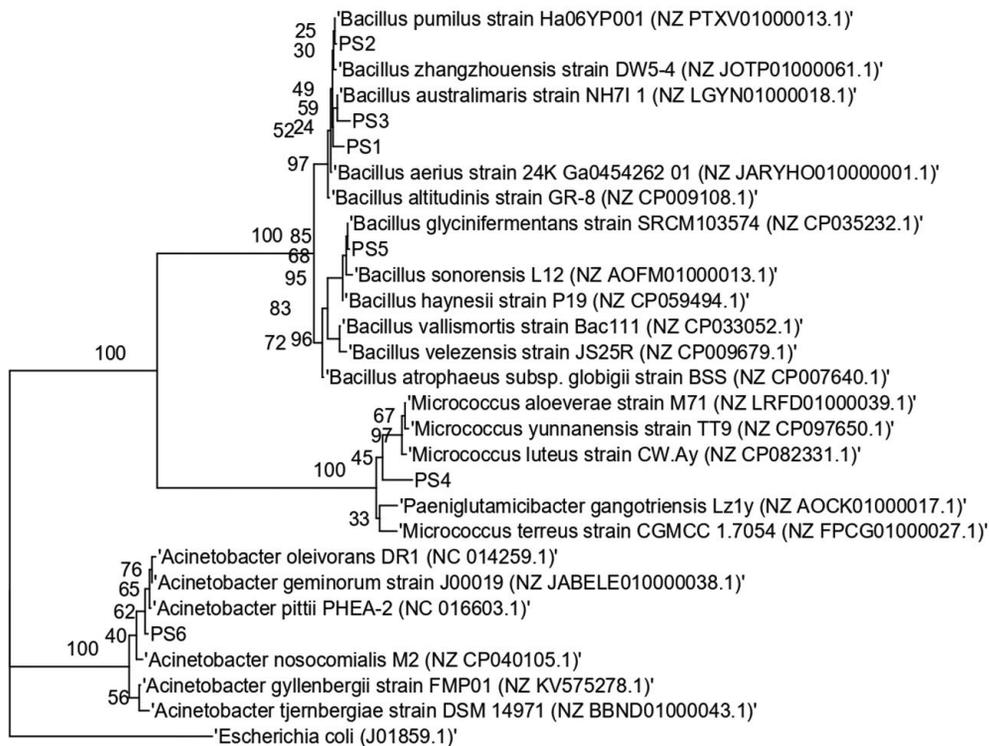
Полученные нами данные для проростков, выращиваемых в чашках Петри, свидетельствуют о более активном размножении эндофитных бактерий во внекорневой среде, чем в тканях корня. На это указывает сопоставление установленных количеств эндофитных бактерий в тканях 1 корня и на его поверхности. Количество бактерий в корнях составляло около 2.0% от их количества на поверхности корня.

Итак, результаты этих двух экспериментов позволили заключить, что перемещение эндофитных бактерий из корней во внешнюю среду – это естественное явление. Полагаем, что значение перемещения эндофитных бактерий из растения во внешнюю среду определяется трофическими преимуществами для их размножения в условиях почвы.

**Таблица 1.** Культуральные признаки эндофитных бактерий

Штамм	Характерные признаки колоний					Признаки клеток		
	Форма	Прозрачность	Цвет	Поверхность	Край	Окраска по Граму	Длина/ширина, мкм (средн.)	Наличие спор
PS1	Круглая	–	Белый	Гладкая	Неровный	+	1.84/0.51	+
PS2	Круглая	–	Светло желтый, с белым ободком	Гладкая	Ровный	+	2.02/0.53	+
PS3	Круглая	–	Светло желтый	Морщинистая	Слабо волнистый	+	1.63/0.75	+
PS4	Круглая	+	Желтый	Гладкая	Ровный	+	1.36/0.68	–
PS5	Ризоидная	–	Белый	Гладкая	Волнистый	+	2.27/0.54	+
PS6	Овальная, растекающаяся	+	Белый	Гладкая	Слабо волнистый	–	1.21/0.47	–

Обозначения: +, – соответственно наличие или отсутствие признака.



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, построенное методом Neighbor-Joining (NJ), на основе последовательностей генов 16S рНК. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп значения. В скобках указаны идентификаторы последовательностей из GenBank. В качестве аутгруппы была использована последовательность 16S рНК *E. coli* (J01859.1).

Некоторые морфологические показатели выявленных нами штаммов суммированы в табл. 1. Штаммы PS1, PS2, PS3, PS5 по морфологическим показателям для клеток, положительно окрашивающихся по Граму, наличие в них спор можно отнести к роду *Bacillus* [22, 23]. Штаммы PS4 и PS6 имели близкие по форме клетки, разную окраску по Граму и не были способны к образованию спор.

С помощью анализа фрагментов последовательностей 16S рНК алгоритмом *dada2* была подтверждена принадлежность штаммов PS1, PS2, PS3, PS5 к роду *Bacillus*, штамма PS4 к *Micrococcus*, PS6 к *Acinetobacter* (рис. 1).

Результаты филогенетического анализа фрагментов последовательностей 16S рНК изучаемых штаммов и наиболее похожих последовательностей, обнаруженных с помощью BLAST, методом Neighbor-Joining (NJ) представлены на рис. 1. Штамм PS2 был наиболее филогенетически близок к виду *Bacillus pumilus*, PS5 – к виду *Bacillus glycinifermentans*, штамм PS4 к виду *Micrococcus aloeverae*, а штамм PS6 к *Acinetobacter pittii*.

Что позволяет бактериям перемещаться из корневых тканей в ризосферу? По данным из табл. 2, подвижностью обладали 3 из 6 исследуемых штаммов. Выше отмечалось, что перемещение бактерий в растениях возможно по апопласту. В этом процессе, вероятно, должны участвовать

гидролитические ферменты, необходимые для разрушения пекто-целлюлозных структур растения. У всех исследуемых нами штаммов выявлены активности пектиназ и целлюлаз, которые, по всей вероятности, необходимы для перемещения этих бактерий из тканей корня во внешнюю среду (табл. 2). Следовательно, способность выхода всех шести штаммов бактерий в ризосферу из тканей корня объяснялась наличием у них активности ферментов, гидролизующих компоненты клеточных стенок – пектины и целлюлозу.

У изучаемых штаммов установлена протеолитическая активность, которая оказалась более выраженной у штаммов PS1 и PS4. Внеклеточные протеазы могут выполнять защитную функцию, участвуя в подавлении роста фитопатогенных грибов [24].

Модулирующее влияние эндофитных бактерий на рост растений при посредстве синтезируемых ими фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллины, абсцизовая кислота, по-видимому, представляет один из механизмов, направленных на поддержание мутуалистических взаимоотношений между ними. Одним из важных фитогормонов для роста и развития растений является ИУК. Способность к продуцированию ИУК выявлена у многих представителей почвенных бактерий, но уровень ее продуцирования может существенно различаться, даже у штаммов, являющихся представителями

Таблица 2. Физиолого-биохимические свойства эндофитных бактерий

Штамм	Целлюлаза, мг/мл на 3 сут	Пектиназа, мг/мл на 3 сут	Протеаза, 10 сут*	Продукция ИУК, мг/мл на 3 сут	Подвижность, 10 сут	Рост на среде Эшби**
PS1	0.215 ± 0.020	0.406 ± 0.019	++	0.138 ± 0.001	Хорошая	–
PS2	0.147 ± 0.021	0.489 ± 0.055	+	0.155 ± 0.002	Слабая	+
PS3	0.134 ± 0.019	0.342 ± 0.024	+	0.864 ± 0.009	Нет	+
PS4	0.155 ± 0.018	0.477 ± 0.039	++	0.146 ± 0.005	Нет	+
PS5	0.076 ± 0.013	0.418 ± 0.027	+	0.579 ± 0.018	Нет	–
PS6	0.133 ± 0.014	0.416 ± 0.009	+	0.167 ± 0.001	Средняя	+

\* “+” – наличие или \*\* “–” – отсутствие признака соответственно.

одного вида бактерий [25]. Подобное можно отметить для исследуемых нами штаммов, относящихся к роду *Bacillus*: PS1, PS2, PS3, PS5. Среди них оказалось 2 штамма (PS3, PS5) с высокой продукцией ИУК, а 2 штамма (PS1, PS2) имели значительно более низкую способность к синтезу ИУК (табл. 2).

Относительно представителей рода *Acinetobacter*, к которым отнесен выделенный штамм PS6, из данных литературы известно, что эти бактерии могут не только синтезировать ИУК, но и участвовать в ее деградации. Большинство штаммов бактерий *Acinetobacter* относят к индолнегативным [26], поскольку у них имеется система ферментов, деградирующих ИУК [27]. В то же время авторами работы [28] описан штамм *Acinetobacter pittii* гр-1, выделенный из почвы, который характеризовался достаточно выраженной продуктивностью ИУК. Исследуемый эндофит из растений гороха, штамм PS6, вероятно, принадлежит к тому же виду – *Acinetobacter pittii* (рис. 1). Однако, *in vitro* у штамма была определена относительно невысокая способность к синтезу ИУК, близкая к определяемой у выделенных штаммов рода *Bacillus* – PS1, PS2 и *Micrococcus* PS4 (табл. 2).

В числе полезных для растений свойств почвенных бактерий из рода *Acinetobacter* отмечены их способности солилизировать минералы, синтезировать сидерофоры, обезвреживать поллютанты и фиксировать азот [27]. Отмечалось, что штамм *Acinetobacter pittii* гр-1 обладает хорошими возможностями утилизировать нерастворимые фосфаты до образования растворимых фосфорных соединений [29]. Примечательно, что выделенный штамм *Acinetobacter* оказался способным к росту на среде Эшби (табл. 2), что является косвенным свидетельством наличия у этих бактерий азотфиксирующей способности. Подобным свойством, очевидно, характеризуются штаммы *Bacillus* – PS2, PS3 и штамм *Micrococcus* – PS4 (табл. 2).

Следует отметить, что не только бактерии рода *Acinetobacter* обладают свойством обезвреживать поллютанты, все исследуемые штаммы эндофитных бактерий способны снижать в среде концентрации полициклические ароматических

углеводородов (ПАУ), многие из которых относятся к опасным для живых организмов соединениям. На это указывает их способность деградировать N-фенил-2-нафтиламин – негативное аллелопатическое соединение, присутствующее в корнях и корневых экссудатах растений гороха [9, 10].

Роль эндофитных бактерий, представителей рода *Bacillus*, чаще всего выявляемых в тканях растений, в настоящее время исследуется весьма активно [4, 25, 30]. Выделено немало штаммов *Bacillus*, стимулирующих рост и устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов среды, некоторые из которых используются для создания биопрепаратов для применения в сельском хозяйстве [4, 30]. Полученные в настоящей работе данные для исследованных штаммов *Bacillus* позволяют сделать вывод о наличии у них ряда полезных для растений свойств: способность к продукции ИУК, у 2 из 4 штаммов (PS2, PS3) – способность к азотфиксации (табл. 4). У всех штаммов бацилл ранее отмечена способность к деградации ПАУ [9], у исследованных представителей *Bacillus* наиболее активным оказался штамм PS3. Высокую деградирующую активность демонстрировали также бактерии штамма PS6, предварительно идентифицированные как *Acinetobacter pittii* (рис. 1). Разница между обсуждаемыми штаммами PS3 и PS6 проявлялась в соотношении видов фталатов, образующихся при деградации N-фенил-2-нафтиламина. Среди фталатов – продуктов деградации указанного соединения, в среде с бактериями штамма PS3 преобладал диоктилфталат, а в среде с бактериями штамма PS6 – дибutilфталат [9].

Появляющиеся в среде роста корней проростков гороха эндофитные бактерии могут взаимодействовать с другими видами бактерий, но неоднозначно. Как показано нами ранее [9], с *Rhizobium leguminosarum* (эндосимбионт) и *Azotobacter chroococcum* (эктосимбионт) эти бактерии показали совместимость, что, вероятно, должно благоприятствовать их симбиозу с растениями гороха. В то же время, не все из штаммов бактерий смогли выдержать присутствие в прикорневой среде гороха бактерий *Pseudomonas syringae* pv *pisi* – патогена

для растений гороха, и *Rodococcus erythropolis*, которые подавляли рост некоторых из исследуемых эндофитов [9]. Последнее говорит о подверженности эндофитных бактерий антагонистическому воздействию со стороны некоторых видов почвенных бактерий. В целом, можно заключить, что проникновение из корней гороха во внешнюю среду исследуемых штаммов эндофитных бактерий – представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus* и *Acinetobacter* благоприятствует их более интенсивному размножению в аэробных условиях. Перемещение этих бактерий из корневых тканей в ризосферу, по-видимому, обусловлено наличием у них активности гидролитических ферментов – пектиназ и целлюлаз. Появление и размножение эндофитных бактерий в ризосфере может иметь важное значение для жизнедеятельности растения-хозяина и присутствующих в его прикорневой среде почвенных бактерий. К полезным для растения свойствам у изучаемых бактерий следует отнести их ИУК-продуцирующую способность и наличие у них возможности для деградации ПАУ. Среди выделенных из прикорневой среды проростков гороха наиболее активными в аспекте продуцирования ИУК оказались 2 представителя *Bacillus* – бактерии штаммов PS3 и PS5. В плане деградации ПАУ показали высокую активность штамм PS3 из рода *Bacillus* и бактерии *Acinetobacter*. Обсуждаются установленные у исследуемых штаммов показатели метаболизма и значение этих эндофитных бактерий для растения-хозяина после их выхода из корней в ризосферу. Мы предполагаем, что обнаруженные свойства штаммов PS3, PS5 и PS6 – активность в продуцировании ИУК и деградации ПАУ, могут быть использованы для получения биоактивных препаратов соответствующего целевого практического назначения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам СИФИБР СО РАН О.В. Захаровой и А.М. Гончаровой за техническую помощь при размножении культур бактерий.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Работа выполнена в рамках проекта № гос. регистрации 122041100050-6, частично проекта № 122041100052-0. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов бактерий выполнена в научно-образовательной лаборатории “Молекулярная генетика и биотехнология” в рамках программы развития ЯрГУ до 2030 г. (№ 123042800011-6, грант ЯрГУ № GL-2023-03).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muresu R., Polone E., Sulas L., Baldan B., Tondello A., Delogu G., Cappuccinelli P. et al. // FEMS Microbiol Ecol. 2008. V. 63. P. 383–400.
2. Гарипова С.Р. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 11. С. 493–505.

3. Чеботарь В.К., Мальфанова Н.В., Щербаков А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тихонович И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 3. С. 283–289. <https://doi.org/10.7868/S0555109915030058>
4. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 1. С. 19–32. <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>
5. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 299–307.
6. Martinez-Hidalgo P., Hirsh A.M. // Phytobioms. 2017. V. 1. № 2. P. 70–82.
7. Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A.M., Trujillo M.E. // Sc. Rep. 2017. V. 7. Art. 11051. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11428-1>
8. Dudeja S.S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., Kothe E. // J. Basic Microbiol. 2012. V. 52. № 3. P. 248–260.
9. Макарова Л.Е., Маркова Ю.А., Мориц А.С., Карпова М.С., Сидоров А.В., Соколова Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 4. С. 394–401. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040103>
10. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 394–402
11. Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гвильдис Д.Э., Семенов А.А. // Докл. Академии наук. 2018. Т. 480. № 3. С. 381–383. <https://doi.org/10.7868/S0869565218150264>
12. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. // Nucl. Acids. Res. 2013. V. 41 (D1). P. D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
13. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. № 7. P. 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
14. Katoh K., Standley D.M. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 4. P. 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
15. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
16. Saitou N., Nei M. // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
17. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000. 350 p.

18. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск: БГУ, 2005. 116 с.
19. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Жиркова Н.А. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 6. С. 666–671.
20. Вешняков В.А., Хабаров Ю.Г., Камакина Н.Д. // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 47–50.
21. Чумаков М.И., Горбань В.В., Ковлер Л.Е., Соловова Г.К., Кривопалов Ю.В., Васильев А.Ю., Каменева С.В. // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 92–102.
22. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямса. М.: Мир, 1997. Т. 1. С. 421.
23. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямс. М.: Мир, 1997. Т. 2. С. 799.
24. Afzal I., Iqbal I., Shinwari Z.K., Yasmin A. // Plant Growth Regul. 2017. V. 81. № 3. P. 399–408.
25. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Хайруллин Р.М. // Агрехимия. 2018. № 4. С. 39–44.
26. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. // Вестник РАМН. 2014. № 9–10. С. 39–50.
27. Lin H.-R., Shu H.-Y., Lin G.-H. // Microbiol. Research. 2018. V. 216. P. 30–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.004>
28. He D., Wan W. // Frontiers in Microbiology. 2021. V. 12. Art 737116.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737116>
29. Wan W., Qin Y., Wu H., Zuo W., He H., Tan J., Wang Y., He D. // Frontiers in Microbiology. 2020. V. 11. Art. 752.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>
30. Гарипова С.Р., Маркова О.В., Гарифуллина Д.В., Иванчина Н.В., Хайруллин Р.М. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3(1). С. 56–58.

## Phylogeny and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Pea Seedlings (*Pisum sativum* L.)

L. E. Makarova<sup>a, \*</sup>, Yu. A. Markova<sup>a</sup>, Yu. V. Zaytseva<sup>c</sup>, A. A. Bychkova<sup>c</sup>, I. V. Gorbenko<sup>a</sup>,  
Yu. M. Konstantinov<sup>a, b</sup>, I. A. Vasiliev<sup>a</sup>, A. S. Morits<sup>a</sup>, P. A. Bizikov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS), Irkutsk, 664033 Russia

<sup>b</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, 664003 Russia

<sup>c</sup>Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia

\*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

We have previously shown the ability of endophytic bacteria to move out of the pea plant seedling roots (*Pisum sativum* L.) into the rhizosphere. In this study, six distinct bacterial strains were isolated from the root growth medium during the cultivation of seedlings in an aqueous medium. By analyzing the nucleotide sequence of 16S rRNA genes, the taxonomic position of these strains was established, their morphological and cultural parameters were assessed, the activity of hydrolytic enzymes (pectinase, cellulase, protease) and the IAA-producing capability were examined. It has been observed that the quantity of endophytic bacteria that appears on the root surface during the growth of pea seedlings significantly surpasses the quantity present in the root tissues. It is assumed that hydrolytic enzymes such as pectinase and cellulase are involved in the release of bacteria into the external environment, causing the destruction of carbohydrate structures in plant cell walls. The metabolic parameters established in the studied strains and the significance of these endophytic bacteria for the host plant after their exit from the roots into the rhizosphere are under discussion.

**Keywords:** endophytic bacteria strains, 16S rRNA genes, pectinase, cellulase, protease, IAA-producing capability of bacteria

УДК 579.6

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММА *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*Pisum sativum* L.) В ПРИСУТСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ГЛИФОСФАТА

© 2024 г. Л. Р. Хакимова<sup>1, \*</sup>, О. В. Чубукова<sup>1</sup>, З. Р. Вершинина<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450064 Россия

\*e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Изучено влияние PGPB-штамма бактерий *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, устойчивого к NiCl<sub>2</sub> (до 3 мМ), к Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (до 5 мМ) и глифосату (до 8 мг/мл), на растения *Pisum sativum* L. при разных концентрациях ТМ и гербицида. Установлено, что исследуемый штамм положительно влиял на длину корней проростков растений гороха в присутствии ТМ, что свидетельствует о повышении устойчивости растения к стрессу, вызванному воздействием никеля и свинца. Однако такой эффект не был зафиксирован в варианте эксперимента с добавлением глифосата, что подтверждало его высокую токсичность. Полученные результаты показывают, что штамм *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 способствовал росту *Pisum sativum* L. при стрессовом воздействии никеля и свинца, что может быть использовано при разработке биопрепаратов комплексного действия, предназначенных как для защиты сельскохозяйственных растений от воздействия ТМ, так и для рекультивации загрязненных почв.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas* sp., тяжелые металлы, глифосат, PGPB, *Pisum sativum* L., свинец, никель

DOI: 10.31857/S0555109924040071 EDN: SAOYUE

В эпоху глобальной индустриализации происходит быстрое и значительное загрязнение окружающей среды, в том числе сельскохозяйственных угодий [1]. Наиболее опасными отходами для человека являются ксенобиотики и тяжелые металлы (ТМ). К наиболее распространенным и токсичным относятся свинец (Pb), никель (Ni), хром (Cr) и другие [2]. Многие из этих загрязнителей окружающей среды канцерогенны как для человека, так и для всей экосистемы. По мере поглощения организмом ТМ, они способны накапливаться в мозге, печени и почках человека [3]. Металлы необходимы для биологических процессов в организме, но их избыточное количество токсично. Угнетение роста растений происходит в результате снижения фотосинтеза, минерального питания и активности жизненно важных ферментов, что наносит огромный ущерб сельскому хозяйству, так как происходит снижение урожайности растений. Токсическое действие металлов влияет на развитие, обмен веществ, ингибируя цитоплазматические ферменты в растительных клетках и вызывая окислительный стресс в клеточных

структурах. Обнаружено, что вредные металлы накапливаются в почве, ингибируют рост популяций бактерий, препятствуют их симбиозу с растениями и значительно снижают урожайность растений [3]. Решением этой проблемы может стать использование ростостимулирующих бактерий (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria), которые не теряют свои свойства даже в присутствии токсинов. Биопрепараты на основе таких PGPB могут стать эффективным решением в переходе к органическому сельскому хозяйству [1].

Давно известно, что бактерии рода *Pseudomonas* имеют высокую PGPB активность, но, кроме того, имеют и повышенный биоремедиационный потенциал. Например, *Pseudomonas* sp. S2–3 значительно увеличивал физиологические характеристики растений сорго (*Sorghum bicolor* L.) в присутствии Cu и Zn [4]. *P. citronellolis* KM594397 показал высокую толерантность к As (V), при этом стимулировал рост растений нута (*Cicer arietinum* L.) [5]. *Pseudomonas* sp. NT27 увеличивал сухую массу

## МЕТОДИКА

побегов и корней *Medicago sativa* L. в присутствии Cr(VI) по сравнению с неинкулированными контрольными растениями. При этом значительно увеличивалось содержание хлорофилла, и снижался уровень маркеров стресса (малонового диальдегида, перекиси водорода и пролина) в растениях [6]. Таким образом, РГРВ могут увеличивать рост и продуктивность растений через уменьшение токсического воздействия ТМ, и напрямую, через продукцию фитогормонов и факторов роста. Действительно, такие бактерии участвуют в стимулировании роста растений и снижении степени токсического воздействия ТМ на них [7].

Большой вред оказывают не только ТМ, но и ксенобиотики, к которым относится и гербицид глифосат. Глифосат (N-(фосфометил) глицин) является наиболее эффективным и широко используемым гербицидом во всем мире [8, 9]. Благодаря низкой стоимости и высокой эффективности, его производство и использование растет с каждым годом, составляя около 25% мирового рынка гербицидов [10]. Из-за повсеместного применения глифосата в борьбе с сорняками в сельском хозяйстве, его часто обнаруживают в воде, почве, воздухе и грунтовых водах, а также в продуктах питания [11]. Токсическое воздействие глифосата связывают с его влиянием на репродуктивную систему крыс, появлением врожденных дефектов и повышением риска метаболических патологий печени животных [12]. Кроме того, было установлено, что он существенно влияет на встречаемость патологий у крыс поколений F2 и F3, на которых не оказывалось постоянного прямого воздействия этого гербицида. Все это указывает на то, что глифосат является токсичным экополлютантом в пролонгированном периоде [13]. Также показано, что глифосат и продукты его разложения могут нарушать микробиоту кишечника млекопитающих, домашних птиц, рептилий, а также медоносных пчел [14–16].

Наиболее перспективной и экологичной стратегией удаления ксенобиотиков из окружающей среды является микробная деградация глифосата [17]. К микроорганизмам, способным эффективно разлагать глифосат, относятся и бактерии рода *Pseudomonas* [18, 19]. Показана возможность *Pseudomonas* sp. QJX-1 [20] и других штаммов псевдомонад (GA07, GA09 и GC04) использовать глифосат в качестве источников питания для роста [21]. У *Pseudomonas* sp. HA-09 описан ген устойчивости к глифосату *aroA* [22]. Все это дает возможность считать, что использование псевдомонад для биодegradации глифосата может быть эффективным методом утилизации токсичных соединений, присутствующих в окружающей среде.

Цель исследований – оценка влияния штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на рост растений гороха посевного при разных концентрациях  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  и глифосата.

**Бактериальная обработка корней проростков гороха.** Для визуализации способности *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 колонизировать корневые волоски растений гороха штамм трансформировали плазмидой pJN105TurboRFP. Для удобства детектирования бактерий штамм содержал ген флуоресцентного белка RFP (red fluorescent protein) [23]. Стерильные семена проращивали в течение 1 недели на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Затем проростки выдерживали при покачивании (25 об./мин) в бактериальной суспензии в 50 мМ фосфатном буфере (PBS, pH 7.2, “Merck”, Германия). Для приготовления суспензии использовали односуточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде LB (бактотриптон – 1%, дрожжевой экстракт – 0.5%, NaCl – 0.5%, агар-агар – 1%) и отмытые от PBS. Суспензию бактерий разбавляли до концентрации  $10^5$  КОЕ/мл. Растения выращивали в стерильных условиях 3 сут при 25°C. Затем проростки однократно отмывали стерильным PBS (5 мин при 25 об./мин) и нарезали корни на фрагменты длиной 10–15 мм для микроскопирования [24]. Далее флуоресцентно окрашенные бактерии наблюдали в флуоресцентном микроскопе AxioImager M1 (“CarlZeiss”, Германия). Для детекции RFP использовали набор светофильтров № 15 (возбуждение BP 546/12, испускание LP 590).

**Выращивание штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1. на питательных средах с ТМ и глифосатом.** Для определения минимальной ингибирующей концентрации ТМ и глифосата для исследуемого штамма был поставлен *in vitro* эксперимент на твердой среде LB. Исходные растворы ТМ –  $\text{NiCl}_2$  и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  готовили в дистиллированной воде и стерилизовали. Глифосат готовили из гербицида “Торнадо-500” (“Август”, Россия), в качестве исходного раствора использовали 50%-ный стерильный разведенный препарат. Далее культуру клеток выращивали в течение 24 ч на чашках Петри со средой LB с добавлениями  $\text{NiCl}_2$  (1, 3 и 5 мМ),  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (1, 3, 5 и 8 мМ) и глифосата (3.0, 6.0, 8.0, 10.0 мг/мл) по отдельности. После инкубации в термостате в течение 24 ч при 28°C исследовали рост клеток. При таких же условиях был исследован рост *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1+ pJN105TurboRFP.

**Обработка растений штаммом *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1.** Семена растений гороха сорта Памяти Попова (Чишминский селекционный центр БНИИСХ УФИЦ РАН) стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном спирте и затем 15 мин в 15%-ном растворе гипохлорита натрия (“Содовая компания”, Россия) с добавлением нескольких капель Твин-20 [24]. Далее семена обрабатывали штаммом *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1/*Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 + pJN105TurboRFP и проращивали на фильтровальной бумаге в стерильной воде (контроль) и в различных концентрациях  $\text{NiCl}_2$  (1 и 2 мМ),

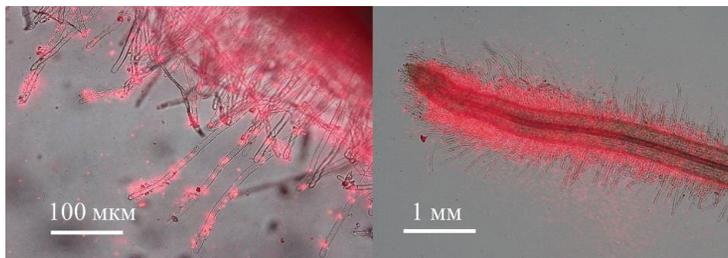


Рис. 1. Адгезия меченых RFP бактериальных клеток на поверхности корневых волосков проросших семян гороха под флуоресцентным микроскопом AxioImager M1 (“CarlZeiss”, Германия).

$Pb(CH_3COO)_2$  (1 и 2 мМ) и глифосата (3 и 6 мг/мл). Для инокуляции суспензию бактерий разбавляли до  $10^5$  КОЕ/мл стерильной жидкой средой LB. Для определения ростостимулирующего эффекта штамма у обработанных и необработанных (контрольных) растений измеряли длину корней через 7 сут культивирования. Для анализа было использовано по 50 растений в каждом варианте опыта при трехкратной повторности.

**Статистическая обработка результатов.** Данные представлены в виде средних арифметических значений ростовых ( $n = 50$ ) параметров с доверительными интервалами. При сравнении групп растений, различающихся условиями выращивания, выявляли статистически значимые отличия изученных параметров по сравнению с контролем с учетом t-критерия Стьюдента для 95%-ного уровня значимости. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05. Результаты исследований были обработаны с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Описание штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1.** Защитный и ростостимулирующий эффекты достигались благодаря продукции целого ряда активных соединений, стимулирующих рост растений, например, фитогормонов и сидерофоров [1]. Ранее для штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 были описаны выделение, идентификация с помощью секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов консервативного гена 16S рРНК и гена *rpoD*, кодирующего бактериальный фактор инициации транскрипции [25]. Также была описана способность штамма синтезировать сидерофоры и ИУК, способность расти при концентрации 1 мМ  $CdCl_2$  в среде, а также улучшение энергии прорастания семян и рост растений *Medicago sativa* L. и *Pisum sativum* L. при стрессовом воздействии 0.5 мМ кадмия в среде [23, 25–27].

Для исследования способности штамма к поверхностной колонизации корней растений гороха, бактерии были трансформированы вектором pJN105TurboRFP для их визуализации с помощью

флуоресцентного микроскопа [23]. Анализ уровня колонизации после 3 сут совместного культивирования показал формирование на поверхности корневых волосков проростков гороха бактериальных агрегаций, микроколоний и биопленок (рис. 1).

**Рост штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1. на питательных средах с ТМ и глифосатом.** Микроорганизмы могут по-разному переносить токсичность металлов [3]. Устойчивые к воздействию ТМ штаммы бактерий, обладающие ростостимулирующим действием, имеют особую ценность. В рамках нашего исследования был изучен рост штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на средах с добавлением различных концентраций ТМ и гербицида. Показано, что на средах с добавлением  $NiCl_2$  до 3 мМ он способен активно расти, а при концентрации 5 мМ роста не было (рис. 2а). При посеве штамма на среды с различными концентрациями  $Pb(CH_3COO)_2$  было показано, что он был способен расти на среде LB с добавлением 3 мМ  $Pb(CH_3COO)_2$ , а при внесении 5 мМ было заметно значительное угнетение роста бактерий, а при 8 мМ роста уже практически не наблюдалось (рис. 2б). На средах с добавлением глифосата *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 рос при концентрации до 6 мг/мл, ингибировался при 8 мг/мл, при 10 мг/мл роста бактерий не было (рис. 2в).

Результаты показали достаточно высокую устойчивость исследуемого штамма к токсическому воздействию ТМ и глифосата. Наибольшую токсичность при меньшей концентрации показал  $NiCl_2$ .

Таким же образом была проведена оценка устойчивости к ТМ и глифосату модифицированного штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 с плазмидой pJN105TurboRFP, который имел яркую розовую окраску при росте на среде. На рис. 3 показано, что полученный трансформированный штамм не терял своей устойчивости к исследуемым токсинам и показал такие же результаты, как и нетрансформированный штамм.

Бактерии могут сорбировать, поглощать либо окислять в более мобильную соль ТМ из окружающей среды. Например, устойчивый к свинцу психротрофный штамм *Pseudomonas* sp. I3 служил биосорбентом для удаления  $Pb(II)$  из сточных вод, при этом минимальная ингибирующая

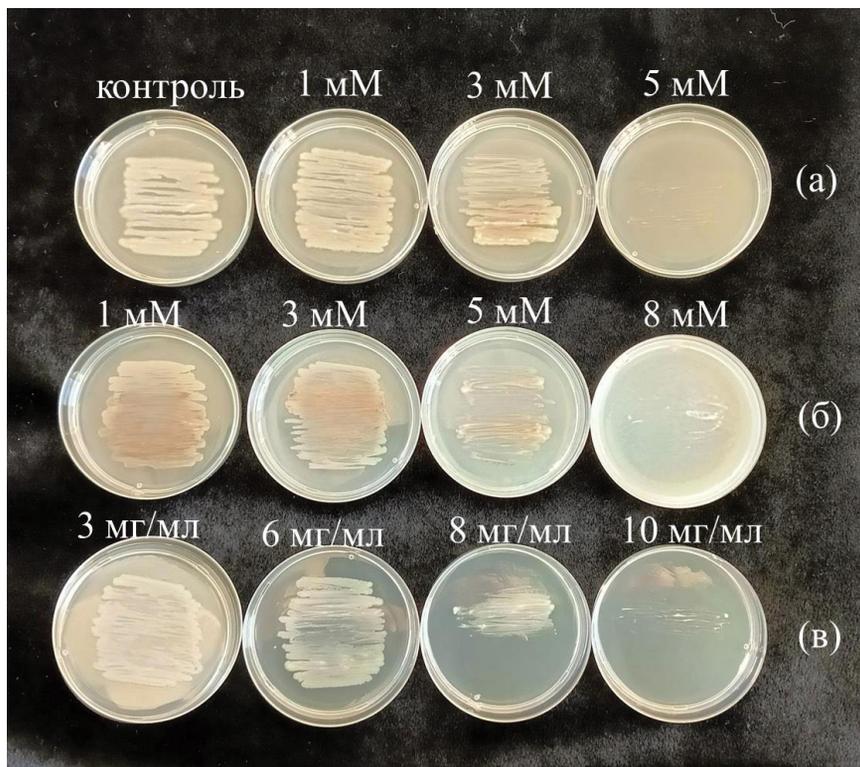


Рис. 2. Рост штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 при различных концентрациях  $\text{NiCl}_2$  (а) и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (б) и на глифосате (в).

концентрация ТМ составила 7.5 мМ [28]. Другие исследования показали, что фосфатмобилизующий штамм *P. rhodesiae* НР-7 имел высокую эффективность при рекультивации почв, загрязненных свинцом [29]. Описаны исследования, где штамм *P. hibiscicola* L1 одновременно удалял нитраты и Ni(II) из сточных вод [30]. Псевдомонады показывали самую высокую способность к поглощению никеля из среды по сравнению с бактериями – представителями других родов [31], а изоляты, выделенные из ила и сточных вод, имели множественную устойчивость к ТМ, в том числе к никелю в концентрации до 160 мкг/мл [32]. Фосфатмобилизующие изоляты, принадлежащие к роду *Pseudomonas* sp., показали высокую устойчивость к глифосату и способность метаболизировать данный гербицид [33].

**Анализ влияния *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на рост растений гороха в присутствии ТМ и глифосата.** Для анализа влияния штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1/*Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1+pJN105TurboRFP на рост и развитие растений гороха, была проведена обработка семян бактериями и измерение длины корней проростков гороха в процессе роста при воздействии стресса. Обработка семян растений гороха исходным и трансформированным штаммами показала увеличение длины корней на 32.3%. Присутствие  $\text{NiCl}_2$  оказало негативное влияние на рост растений, длина корней проростков уменьшалась

относительно контроля в присутствии 1 и 2 мМ  $\text{NiCl}_2$  на 62.7 и 67.6% соответственно. У инокулированных псевдомонадами растений длина корней уменьшалась на 49.9 и 54.9% соответственно относительно контроля (рис. 4). Штамм *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, также как и рекомбинантный, сохраняли свои ростостимулирующие свойства даже при токсическом влиянии ТМ на семена гороха, что может свидетельствовать о защитном действии бактерий на растения при стрессе на начальном этапе своего роста.

По литературным данным известно, что применение ростостимулирующих бактерий *P. fluorescens* 20, *P. fluorescens* 21 и *P. putida* 23 в присутствии никеля (300 мг/кг в почве) значительно уменьшало токсическое воздействие на растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) [34]. Бактериальные штаммы рода *Pseudomonas* увеличивали биомассу растений нута (*Cicer arietinum* L.) в вегетационном опыте при концентрации никеля до 2 мМ [35]. Применение *Pseudomonas* sp. SRI2 также значительно увеличило биомассу горчицы сарептской (*Brassica juncea* L.) при выращивании на загрязненных никелем почвах [36].

Анализ влияния штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1/*Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 + pJN105TurboRFP на рост и развитие растений гороха при стрессовом воздействии  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  показал, что при концентрации 1 и 2 мМ этого ТМ длина корней

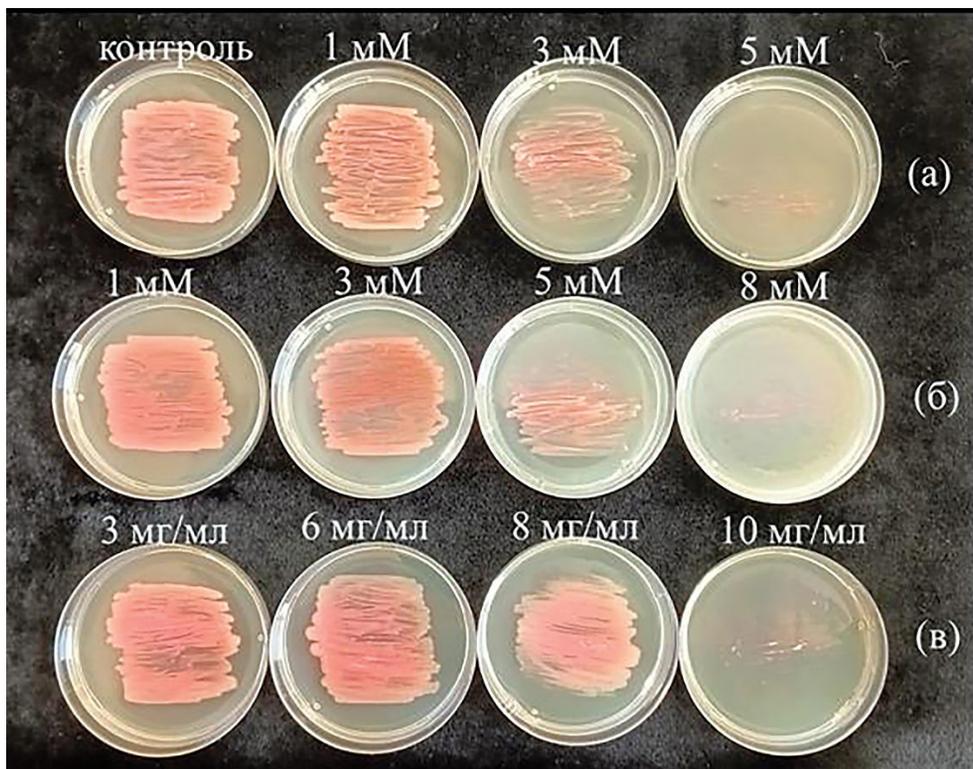


Рис. 3. Рост штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, трансформированного вектором pJN105TurboRFP при различных концентрациях  $\text{NiCl}_2$  (а) на  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (б) и глифосата (в).

проростков уменьшалась относительно необработанных контрольных растений на 53.5 и 60.5%, а у инокулированных псевдомонадами растений длина корней уменьшалась на 13.9 и 36.5% соответственно (рис. 5).

Полученные результаты показали, что инокуляция псевдомонадами семян гороха оказывала положительное влияние на рост корней проростков, что может указывать на защитные свойства бактерий.

Установлено, что инокуляция ростостимулирующим штаммом *P. oitidis* SMHMP23, способным мобилизовать Ni и Pb в почве, значительно увеличивала рост *Brassica juncea* L. [37]. Ростостимулирующий штамм *Pseudolabrys taiwanensis* WRS8 увеличивал биомассу растений кориандра (*Coriandrum sativum* L.) на 25–48%, при этом снижал содержание свинца и кадмия в съедобных частях на 40–59% по сравнению с контролем [38].

Учитывая широкий метаболический потенциал *Pseudomonas* sp., актуально изучение их взаимодействия и с гербицидами. Применение глифосата под разными коммерческими названиями привело к практически повсеместному присутствию его остатков в окружающей среде.

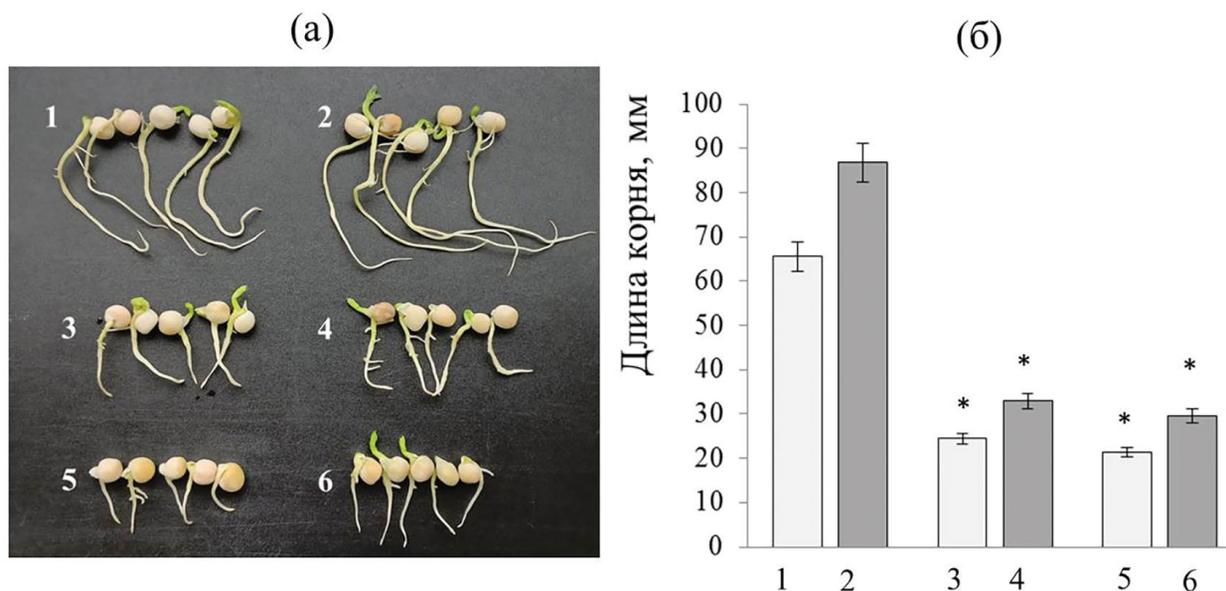
В работе установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 был способен расти на питательной среде с добавлением глифосата в концентрации до 6 мг/мл, значительно тормозился при 8 мг/мл,

а при 10 мг/мл роста бактерий не наблюдалось. Для изучения влияния штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на рост и развитие растений гороха, была проведена обработка семян при стрессовом воздействии глифосата.

Глифосат значительно ингибировал рост и энергию прорастания семян гороха. Так, в присутствии глифосата 3 и 6 мг/мл длина корней проростков уменьшалась относительно контроля на 83 и 84.6%, а у инокулированных бактериями растений длина корней уменьшилась на 74.4 и 76.7%, соответственно (рис. 6).

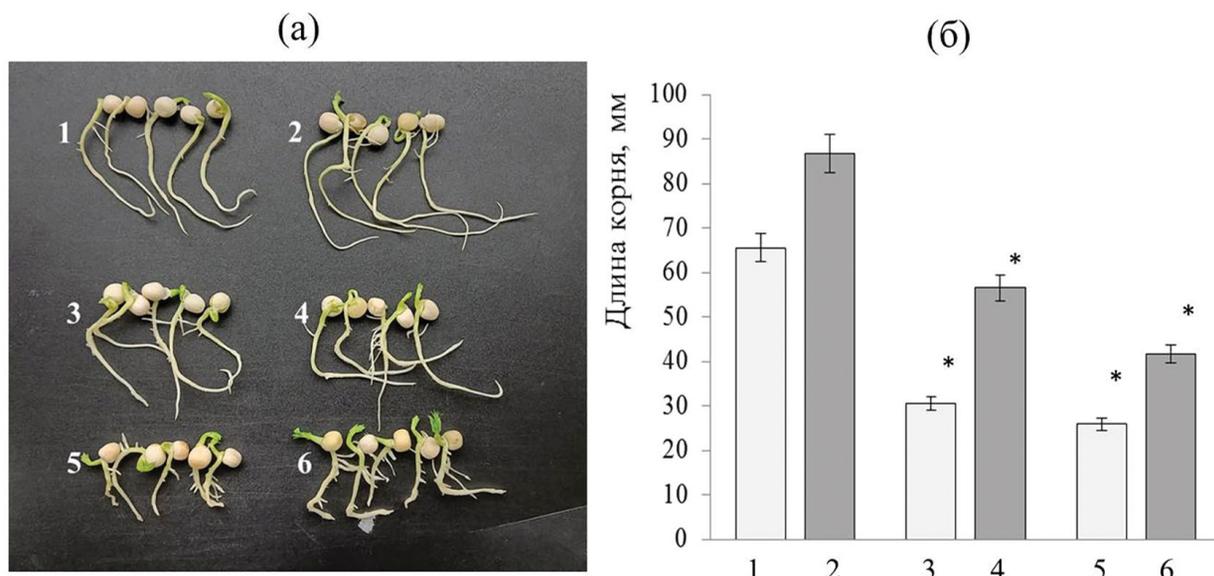
Даже визуально глифосат показал самое сильное ингибирование роста семян гороха по сравнению с ТМ, при этом обработка исследуемым штаммом бактерий, устойчивым к таким концентрациям гербицида, не оказывала значительного положительного эффекта на рост растений. Полученные результаты показывают, что штамм *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, несмотря на устойчивость к токсическому действию глифосата, не способен нейтрализовать негативное действие гербицида на растения.

Во всех исследованиях показано, что рекомбинантный штамм имел такие же свойства, как и исходный, полученные данные не имели достоверных различий от результатов, показанных нетрансформированным штаммом.



**Рис. 4.** Растения гороха (а) и длина корней проростков (б) при стрессовом воздействии  $\text{NiCl}_2$ : 1 – необработанные семена; 2 – обработанные псевдомонадами семена; 3 – необработанные семена в присутствии 1 мМ  $\text{NiCl}_2$ ; 4 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 1 мМ  $\text{NiCl}_2$ ; 5 – необработанные семена в присутствии 2 мМ  $\text{NiCl}_2$ ; 6 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 2 мМ  $\text{NiCl}_2$ .

\* Статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0.05$ ).



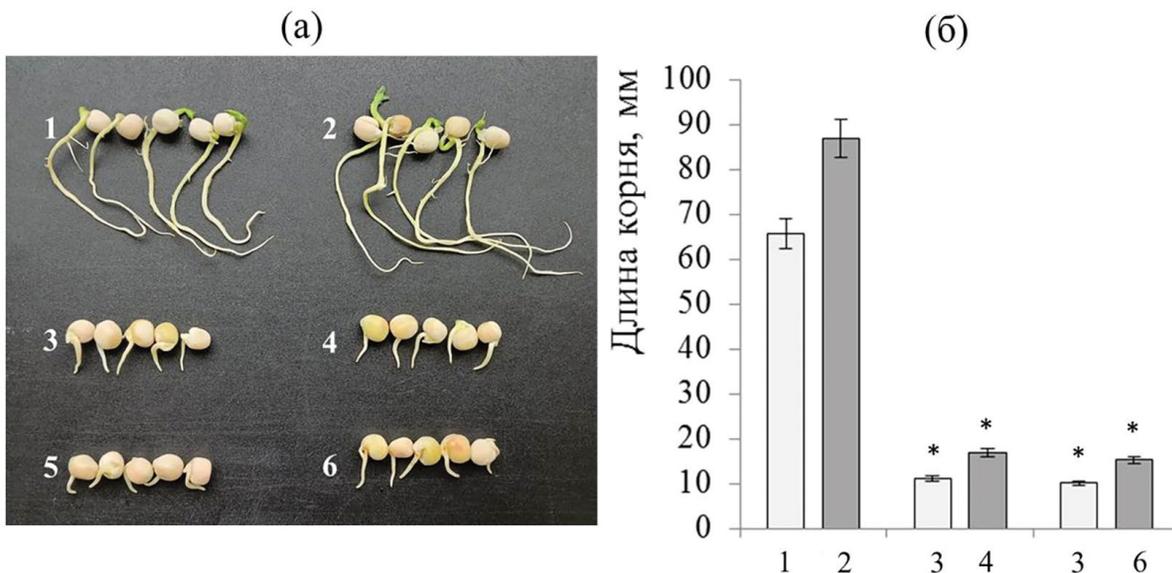
**Рис. 5.** Растения гороха (а) и длина корней проростков (б) при стрессовом воздействии  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ : 1 – необработанные семена; 2 – обработанные штаммом *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 семена; 3 – необработанные семена в присутствии 1 мМ  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ; 4 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 1 мМ  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ; 5 – необработанные семена в присутствии 2 мМ  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ; 6 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 2 мМ  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .

\* Статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, устойчивость растений к токсическому действию ТМ могла быть обусловлена более эффективным ростом корней обработанных растений за счет положительного действия веществ, выделяемых РГРВ, и снижению концентраций и накопления ТМ в корневой системе растений. По-видимому,

способность бактерий колонизировать поверхность корней имела большое значение для снижения токсичности ТМ для растений и окружающей среды.

Бактерии имеют ряд преимуществ перед традиционными методами восстановления окружающей среды, включая улучшение качества почвы,



**Рис. 6.** Рост растений гороха (а) и длина корней проростков (б) при стрессовом воздействии глифосата: 1 – не-обработанные семена; 2 – обработанные штаммом *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 семена; 3 – необработанные семена в присутствии 3 мг/мл глифосата; 4 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 3 мг/мл глифосата; 5 – необработанные семена в присутствии 6 мг/мл глифосата; 6 – обработанные псевдомонадами семена в присутствии 6 мг/мл глифосата.

\* Статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0.05$ ).

ускорение развития растений и т.д. [3]. Полученные в настоящем исследовании результаты подтвердили способность штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 как РГРВ, способствовать росту и развитию семян гороха *Pisum sativum* L. при стрессовом воздействии ТМ, что может быть использовано для создания биопрепаратов комплексного действия, предназначенных как для защиты культурных растений от воздействия ТМ, так и для рекультивации сельскохозяйственных загрязненных почв.

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № 122041400162-3).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикина Г.Ф., Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Логинов О.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. V. 57. № 3. P. 211–227. <https://doi.org/10.31857/S0555109921030089>
2. Ojuederie O.B., Babalola O.O. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2017. V. 14. № 12. P. 1504. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
3. Saharan B.S., Chaudhary T., Mandal B.S., Kumar D., Kumar R., Sath P.K., Duhan J.S. // J. Xenobiot. 2023. V. 13. № 2. P. 252–269. <https://doi.org/10.3390/jox13020019>
4. Wu Z., Kong Z., Lu S., Huang C., Huang S., He Y., Wu L. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2019. V. 65. № 5. P. 254–264. <https://doi.org/10.2323/jgam.2018.11.004>
5. Adhikary A., Kumar R., Pandir R., Bhardwaj P., Wusirika R., Kumar S. // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 142. P. 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.006>
6. Tirry N., Kouchou A., El Omari B., Ferioun M., El Ghachtouli N. // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2021. V. 19. № 1. P. 149. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00254-8>
7. Tahri Joutey N., Tirry N., Bahafid W., Sayel H., El Ghachtouli N. Bioremediation. Plant Growth Promoting Bacteria in Heavy Metals Bioremediation // Ed. M. Kuddus. Adv. Res. Appl. Nov. Sci. Publ, 2018. 185–211 p.
8. Maggi F., la Cecilia D., Tang F.H.M., McBratney A. // Sci. Total Environ. 2020. V. 717. P. 137167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>
9. Tang F.H.M., Lenzen M., McBratney A., Maggi F. // Nat. Geosci. V. 2021. № 14. 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
10. Wang L., Deng Q., Hu H., Liu M., Gong Z., Zhang S. et al. // J. Hematol. Oncol. 2019. V. 12. № 70. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0767-9>
11. Zoller O., Rhyn P., Rupp H., Zarn J.A., Geiser C. // Food Addit. Contam: Part B. 2018. V. 11. № 2. P. 83–91. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1419509>

12. Li J., Chen W. J., Zhang W., Zhang Y., Lei Q., Wu S. et al. // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. № 43. P. 13945–13958.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05612>
13. Kubsad D., Nilsson E.E., King S.E., Sadler-Riggelman I., Beck D., Skinner M.K. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 6372.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>
14. Aitbali Y., Ba-M'hamed S., Elhidar N., Nafis A., Sora N., Bennis M. // Neurotoxicol. Teratol. 2018. V. 67. P. 44–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.002>
15. Kittle R.P., McDermid K.J., Muehlstein L., Balazs G.H. // Mar. Pollut. Bull. 2018. V. 127. P. 170–174.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.030>
16. Blot N., Veillat L., Rouz R., Delatte H. // PLoS One. 2019. V. 14. № 4. e0215466.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
17. Castrejón-Godínez M.L., Tovar-Sánchez E., Valencia-Cuevas L., Rosas-Ramírez M.E., Rodríguez A., Mussali-Galante P. // Microorganisms. 2021. V. 9. № 11. P. 2322.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112322>
18. Rossi F., Carles L., Donnadieu F., Batisson I., Artigas J. // J. Hazard. Mater. 2021. V. 420. P. 126651  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126651>
19. Masotti F., Garavaglia B.S., Piazza A., Burdisso P., Altabe S., Gottig N., Ottado J. // Sci. Total Environ. 2021. V. 774. P. 145761.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145761>
20. Yu J., Jin B., Ji Q., Wang H. // J. Hazard Mater. 2023. V. 448. P. 130902.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130902>
21. Zhao H., Tao K., Zhu J., Liu S., Gao H., Zhou X. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2015. V. 61. № 5. P. 165–170.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.61.165>
22. Ghaderitabar H., Mousavi A., Hatef Salmanian A., Hadi F. // Iran J. Biotechnol. 2020. V. 18. № 3. e2597.  
<https://doi.org/10.30498/IJB.2020.204133.2597>
23. Khakimova L., Chubukova O., Vershinina Z., Maslennikova D. // BioTech. 2023. V. 12. № 5.  
<https://doi.org/10.3390/biotech12010005>
24. Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р. и др. // Микробиология. 2021. V. 90. № 2. P. 191–203.  
<https://doi.org/10.31857/S0026365621020154>
25. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. // Микробиология. 2022. V. 91. № 5. P. 537–546.  
<https://doi.org/10.31857/S0026365622100196>
26. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурясова А.Р., Сумороз Е.В., Чумакова А.К., Вершинина З.Р. // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 2(30). P. 155–163.
27. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурясова А.Р., Вершинина З.Р. // Биомика. 2022. V. 14. № 2. P. 101–110.  
<https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-7>
28. Li D., Xu X., Yu H., Han X. // J. Environ. Manage. 2017. V. 196. P. 8–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.076>
29. Li J., Bai R., Chen W., Ren C., Yang F., Tian X., Xiao X., Zhao F. // J. Hazard Mater. 2023. V. 447. P. 130772.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130772>
30. An Q., Deng S., Liu M., Li Z., Wu D., Wang T., Chen X. // J. Environ. Manage. 2021. V. 299. P. 113641.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113641>
31. Knuutinen J., Bomberg M., Ketell M., Lusa M. // Front Microbiol. 2019. V. 10. P. 2677.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02677>
32. Fawwaz Alfarras A., Hamid Al-Fahdawi M. // Arch. Razi Inst. 2022. V. 77. № 3. P. 1041–1047.  
<https://doi.org/10.22092/ARI.2022.357399.2036>
33. Михайловская Н.А., Барашенко Т.Б., Погирницкая Т.В., Дюсова С.В. // Почвоведение и агрохимия. 2022. № 2. P. 110–120.
34. Шаббаев В.П., Остроумов В.Е. // Агрохимия. 2021. № 11. P. 87–94.  
<https://doi.org/10.31857/S0002188121090106>
35. Tank N.M., Saraf M. // J. Basic Microbiology. 2009. V. 49. № 2. P. 195–204.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.200800090>
36. Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. // Chemosphere. 2009. V. 75. № 6. P. 719–725.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.056>
37. Sharma S., Saraf M. // Biol. Futur. 2023. V. 74. P. 3309–3325  
<https://doi.org/10.1007/s42977-023-00179-y>
38. Ge Y., Wen Z., He L., Sheng X. // Environ. Sci. Pollut Res. Int. 2023. V. 30. № 31. P. 76911–76922.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-27967-2>

## Use of Strain *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 for Pre-Sowing Treatment of Pea Seeds (*Pisum sativum* L.) in the Presence of Heavy Metals and Glyphosate

L. R. Khakimova<sup>a, \*</sup>, O. V. Chubukova<sup>a</sup>, Z. R. Vershinina<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

<sup>b</sup>*Ufa State Petroleum Technological University (USPTU), Ufa, 450064 Russia*

\*e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

The effect of the PGPB strain of bacteria *Pseudomonas* sp. was studied. OBA 2.4.1, resistant to NiCl<sub>2</sub> (up to 3 mM), Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (up to 5 mM) and glyphosate (up to 8 mg/ml), on *Pisum sativum* L. plants at different concentrations of HMs and herbicide. It was found that the strain under study had a positive effect on the length of the roots of pea plant seedlings in the presence of HM, which indicates an increase in the plant's resistance to stress caused by exposure to nickel and lead. However, this effect was not recorded in the experimental version with the addition of glyphosate, which confirmed its high toxicity. The results obtained indicate that the strain *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 promoted the growth of *Pisum sativum* L. under stress exposure to nickel and lead, which can be used in the development of complex-action biological products intended both to protect agricultural plants from the effects of heavy metals and to reclaim contaminated soils.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp., heavy metals, glyphosate, PGPB, *Pisum sativum* L., lead, nickel

УДК 577.112.083

## ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ СИНТЕЗ МУТАНТНОГО ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА CRM197: ВЛИЯНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В КЛЕТКАХ *E. coli*

© 2024 г. С. О. Рогожкин<sup>1</sup>\*, А. С. Герасимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

\*e-mail: usr22574@vyatsu.ru

Поступила в редакцию 02.02.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 22.02.2024 г.

CRM197 (Cross Reacting Material 197) представляет собой неактивную форму экзотоксина *Corynebacterium diphtheriae*, используемого в качестве белка-носителя для производства конъюгированных полисахаридных вакцин и иммунотерапевтических препаратов. Развитие данных направлений требует разработки эффективной и рентабельной технологии получения CRM197 требуемого качества. Разработан высокоэффективный метод получения рекомбинантного CRM197 в виде гибрида с белком-партнером SUMO в клетках *E. coli*, позволяющий синтезировать более 3 г/л в виде телец включения. Было показано существенное влияние типа экспрессионного вектора, условий гетерологичной экспрессии гена и культивирования продуцента на его растворимость. В результате снижения температуры культивирования и использования промотора гена, кодирующего белок теплового шока CspA, а количество растворимого SUMO-CRM197 составило более 30% от общего белка при уровне биосинтеза около 2 г/л. Коэкспрессия целевого гена с геном дисульфид-изомеразы DsbC *E. coli*, позволила получить целевой белок полностью в растворимом состоянии и выходом более 1.4 г/л. Полученные результаты могут стать основой для разработки перспективной отечественной технологии получения CRM197.

**Ключевые слова:** CRM197, *E. coli*, рекомбинантные белки, конъюгированные вакцины, экспрессионный вектор

DOI: 10.31857/S0555109924040085 EDN: SALHWX

Вакцины являются одним из приоритетных направлений развития фармацевтической биотехнологии. Однако разработка новых иммунологических препаратов, обладающих улучшенными профилями активности, эффективности и безопасности, вместе с относительно простыми и рентабельными технологиями их производства, является сложной мультидисциплинарной задачей. В настоящее время актуально направлять исследования также на разработку технологических платформ, обеспечивающих производство нескольких вакцин по однотипной технологии. Примером является производство конъюгированных полисахаридных вакцин на основе мутантного дифтерийного токсина CRM197.

CRM197 (Cross Reacting Material 197) – нетоксичная форма дифтерийного токсина, находящая свое широкое применение как в фундаментальной науке, так и в медицине. Его использование в качестве адъюванта приводит к образованию T-зависимого иммунного ответа, и существенно увеличивает иммуногенность антигенов [1]. Этот факт

делает данную молекулу идеальным белком-носителем. Разработка и производство вакцин на основе CRM197 интенсивно развивается. Примером является разработка рекомбинантных пептидных и терапевтических вакцин, в которых в качестве антигена выступают фрагменты белковой природы. Серьезным фактором, препятствующим развитию разработки иммунологических препаратов на основе CRM197, является сложность его получения в требуемых количествах. Отсутствие рентабельной и эффективной технологии получения белка-носителя можно назвать критическим фактом, препятствующим развитию прогресса в данной области.

Современные тенденции биофармацевтической промышленности ограничивают применение дифтерийной палочки *Corynebacterium diphtheriae* в качестве продуцента. Развитие методов генной инженерии сделало возможным получение рекомбинантного CRM197. Однако существующие технологии плохо воспроизводимы в промышленном масштабе и требуют высоких затрат на их осуществление. Анализ научной и патентной литературы

показал, что существуют различные способы получения рекомбинантного CRM197 в бактериальных и дрожжевых системах экспрессии. Например, были предприняты попытки экспрессии гена CRM197 в *B. subtilis*, с использованием сигнальной последовательности субтилилина для секреции в культуральную среду. Ввиду низкой продуктивности, порядка 7.1 мг/л, этот организм оказался не перспективным [2]. Большинство результатов по высокопродуктивному биосинтезу CRM197 были получены на клетках *E. coli*. Система экспрессии на основе промотора T7 РНК-полимеразы является наиболее используемой в производстве фармацевтических белков. При получении CRM197, целевой продукт накапливался в виде нерастворимых телец включения, что требует дальнейшего проведения низкоэффективной процедуры рефолдинга [3, 4]. Однако в работе [5] описали способ получения CRM197 путем его секреции в периплазматическое пространство, с использованием лидерных сигнальных последовательностей (восемь SRP-зависимых, две Sec-зависимые и две сигнальные последовательности грамм-положительных бактерий *Streptococcus pneumoniae*). Вектор, несущий конструкцию FlgI–CRM197, оказался наиболее эффективным, а выход составил свыше 1 г/л в условиях биореактора и культивирования с подпиткой [5]. В остальных работах, доступных на данный момент, выход целевого продукта составлял порядка 100–300 мг/л, причем в подавляющем большинстве случаев, в виде телец включения.

Для получения CRM197 также активно используется технология гибридной экспрессии. Например, при использовании белка-партнера SUMO и при культивировании продуцента на среде, содержащей сорбитол, удалось получить небольшое количество целевого продукта в растворимом состоянии. Однако, несмотря на возможность получения целевого белка в растворимом состоянии, выход продукта оказался незначительным [6]. К тому же использование стадии ферментативного расщепления при помощи специфической Ulp1-гидролазы, делало этот процесс нерентабельным при соответствующих выходах.

Среди факторов, положительно влияющих на выход CRM197, можно выделить следующие: оптимизация кодонного состава целевого гена, подбор оптимального хозяйского штамма *E. coli*, оптимизация условий культивирования продуцента. Например, Ходак с соавт. [7] показали повышения уровня экспрессии целевого гена в несколько раз путем оптимизации кодонного состава. Дизайн 5'-конца мРНК, с целью снижения вероятности образования трудноплавких вторичных структур, позволил достичь выхода целевого продукта до 270 мг/л. Вторым примером может быть использование штаммов с мутациями в генах оксидоредуктаз *trxB* и *gor*. Известно, что молекула CRM197

имеет 2 дисульфидные связи в положениях Цис186–Цис201 и Цис461–Цис471, причем первая пара остатков цистеина экспонирована на поверхности белка и является потенциальной проблемой образования ковалентных агрегатов и телец включения при сверхэкспрессии в *E. coli*. Использовании штаммов с более высоким внутриклеточным окислительно-восстановительным потенциалом, таких как OrigamiB (DE3) или ShuffleT7 (DE3) позволяет решить данную проблему. Хотя данные штаммы и отличаются низкой продуктивностью как по целевому продукту, так и по скорости накопления клеточной биомассы, все же используются в крупномасштабном производстве [7, 8]. Следовательно, необходимо изучение других факторов, влияющих на уровень биосинтеза целевого продукта, а также его растворимость.

Следует отметить, что авторы многих исследований отмечают факт влияния особенностей реализации транскрипции и трансляции. В настоящей работе была поставлена задача изучить влияние процессов транскрипции и трансляции на уровень биосинтеза целевого белка, используя в качестве модельного белка гибрид CRM197 с белком-партнером SUMO.

## МЕТОДИКА

Для всех экспериментов использовались реактивы высокого качества, марки “Для анализа” (“Sigma-Aldrich”, США), если не указано иное. Для приготовления питательных сред использовались компоненты “Becton Dickinson”, (США). Для генной инженерии использовались ферменты производства “Thermo Fisher Scientific” (США). Все генно-инженерные эксперименты проводились на клетках *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (“Stratagene”, США), для бактериальной экспрессии – штамм BL21(DE3) [F– *ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm* (DE3)] (“Novagen”, США).

**Конструирование экспрессионных векторов, содержащих ген CRM197.** Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование и другие генноинженерные манипуляции проводили согласно стандартным методикам [9]. Химический синтез олигонуклеотидов, а также контрольное секвенирование полученных конструкций проведены “Евроген” (Россия).

Ген дифтерийного токсина (Uniprot #Q5PY51) с точечной мутацией “Гли52Глу” и 5'-концевой последовательностью гена SUMO, содержащего 6 остатков гистидина, был оптимизирован при помощи онлайн ресурса “GenSmart™” (“Genscript”, США). Гибридный ген был фланкирован сайтами рестрикции *NdeI* и *XhoI*, содержание GC

нуклеотидов – 52%. Последовательность гена SUMO-CRM197 при помощи программы “DNABuilder” была разбита на взаимно перекрывающиеся олигонуклеотидные праймеры длиной 50 нуклеотидов (перекрывание – 15 нуклеотидов). Сборку гена осуществляли методом ПЦР, используя в качестве матрицы смесь олигонуклеотидов (по 0.1 мкМ каждого) и высокоточную полимеразу Phusion, согласно протоколу изготовителя. Далее, полученные фрагменты ДНК были очищены при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (“Qiagen”, Германия), гидролизованы рестриктазами *NdeI* и *XhoI* и клонированы в векторы pET9a (+), pET39b (+) – оба “Novagen” (США), pGEMEX1 – “Stratagene” (США) и pCOLDIII – “TakaraBio” (Япония), также обработанные соответствующими ферментами.

**Анализ уровня экспрессии гена SUMO-CRM197.** Трансформацию бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3) для экспериментов по экспрессии проводили согласно стандартному протоколу с использованием 0.1 М раствора хлорида кальция [9]. Все эксперименты по экспрессии проводили в 24-луночных планшетах с использованием системы Duetz в шейкере-инкубаторе “Kuhner ISFX-1” (“Kuhner”, Швейцария) [10]. Трансформанты культивировали на среде TBP (12 г/л триптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 100 мМ калий фосфатного буфера, pH 7.0), содержащей либо ампициллин (для pGEMEX1 и pCOLDIII, 100 мкг/мл), либо канамицин (для pET9a (+) и pET39b (+), 50 мкг/мл) до достижения оптической плотности ( $OP_{550}$ ) 1.5–2 единицы. Затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0, 0.01, 0.05, 0.25 и 1 мМ. Одновременно проводили эксперимент на автоиндукционной среде TBP-5052, согласно работе [11]. Клетки выращивали при температуре в пределах 15–37°C (в зависимости от генетической конструкции) в течение 16 ч. Содержание целевого белка анализировали методом дот-иммуноблоттинга [12], используя мышиные моноклональные антитела против полигистидинового тэга, конъюгированные с пероксидазой хрена (A7058, “Sigma”, США). Для этого образцы биомассы получали осаждением клеток центрифугированием при 5000 g, 2 мин, предварительно нормализовав объемы культур по конечной оптической плотности (из расчета 100 мкл при  $OP_{550}$  15 ед.). Затем клетки лизировали в 1 мл TES-буфера (100 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 1% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА), и 10 мкл лизата наносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C0.45 мкм (“Cytiva”, Швеция). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в TBST-буфере в течение 1 ч. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч, после отмывали буфером TBST (4 раза по 5 минут). Визуализацию проводили с помощью готового хромогенного субстрата для

мембран (T0565, “Sigma”, США). Денситометрический анализ мембраны осуществляли при помощи программы ImageJ (www.imagej.net). В качестве положительного контроля и полуколичественной оценки уровня экспрессии целевого гена использовали очищенный SUMO-CRM197 с известной концентрацией и разведенный в клеточном лизате хозяйского штамма BL21(DE3), не содержащем экспрессионных векторов.

**Фракционирование белков из клеток *E. coli*.** Биомассу *E. coli*, из 1 мл культуры содержащую целевой белок суспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 500 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 0.2% Тритона X-100) в соотношении 1 г биомассы: 15 мл раствора. Суспензию переносили в пробирки (2 мл), добавляли 5 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл), PMSF до концентрации 0.5 мМ и проводили 3 цикла “замораживания–оттаивания”. Для снижения вязкости лизат трижды обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 с, с перерывом между циклами 2–3 мин. Во время всего процесса пробирки находились на ледяной бане. Затем 100 мкл лизата центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант (растворимый белок) отбирали в отдельную пробирку и добавляли 400 мкл TES-буфера. Для получения раствора белка из телец включения осадок растворяли в 500 мкл TES-буфера. Для получения образца общего белка 100 мкл лизата до центрифугирования смешивали с 400 мкл TES-буфера. Образцы прогревали в течение 5 мин при 90°C. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (14%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) и гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США).

**Анализ факторов, влияющих на повышение уровня экспрессии SUMO-CRM197 в растворимой форме.** Эксперименты проводились на основе конструкций pCOLDIII, pET9a (+) и pET39b (+). Для продуцентов на основе pET-векторов было проведен анализ влияния сорбитола, согласно [6]. Для этой цели 100 колоний трансформантов культивировали одновременно в колбах Эрленмейера объемом 1 л на средах TBP или TBPS (TBP + 200 мМ сорбитола), объемом 100 мл, содержащих 50 мкг/мл канамицина. После достижения  $OP_{550}$  1.5–2 ед. 50 мл клеточной культуры из каждой колбы переносили в две колбы Эрленмейера объемом 500 мл, а затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0.05 и 0.5 мМ. Дальнейшее культивирование проводили в течение 16 ч при 20 и 30°C для опытов с 0.05 и 0.5 мМ ИПТГ соответственно. Условия для трансформантов на основе pCOLDIII-вектора: температура культивирования – 15°C при концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ.

Для изучения влияния коэкспрессии дисульфид-изомеразы DsbC *E. coli*, штамм BL21(DE3)

котрансформировали экспрессионными векторами pCOLDIII\_SUMO-CRM197 и pBA2219 [13]. 100 колоний трансформантов культивировали в колбе Эрленмейера объемом 1 л на среде ТВР, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина. После достижения оптической плотности ( $OP_{550}$ ) 1.5–2 ед. по 50 мл клеточной культуры переносились в две колбы Эрленмейера объемом 500 мл, а затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0.05 и 0.1 мМ. Культивирование проводили при 15°C в течение 16 ч.

Все образцы биомассы, собранные из 1 мл культуры, фракционировали согласно описанной методике. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (14%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) и гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США). Биомассу с растворимым SUMO-CRM197 использовали для дальнейших экспериментов по выделению и очистке целевого белка.

**Выделение и очистка рекомбинантного CRM197 из клеток *E. coli*.** Среду ТВР объемом 100 мл, содержащую ампициллин (100 мкг/мл), инокулировали 50 колониями штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного вектором pCOLDIII\_SUMO-CRM197. Культуру выращивали при 37°C, 300 об./мин в течение 2–4 ч до достижения  $OP_{550}$  1.5. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и снижали температуру культивирования до 15°C. Индукцию проводили в течение 16 ч. Биомассу отделяли с помощью центрифугирования при 8000 g, в течение 10 мин при 4°C, после чего осадок суспендировали в 35 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.2% Тритон X-100, 0.5 мМ PMSF), клетки разрушали при помощи ультразвука (10 циклов по 30 с, перемены по 2 мин). После разрушения в полученный лизат добавляли 0.05% (об./об.) полиэтиленimina для удаления ДНК, и центрифугировали в течение 30 мин при 12000 g. Супернатант пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP (“Cytiva”, Швеция) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную лизирующим буфером с использованием хроматографической системы АКТА Pure 25M (“Cytiva”, Швеция). Затем колонку последовательно промывали буфером А (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 40 мМ имидазола) – 10 объемов колонки, буфером В (50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 100 мМ NaCl, 40 мМ имидазола) – 10 объемов колонки. Затем элюцию проводили буфером С (50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 200 мМ имидазола) и элюат сразу же переводили в буферный раствор (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 100 мМ NaCl) на обессоливающую колонку PD10 (“Cytiva”, Швеция), согласно протоколу изготовителя. Препарат целевого белка

инкубировали с Ulp1-протеазой (1 : 1000) в течение 1 ч при комнатной температуре, и снова наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP. CRM197 собирали как фракцию белков, не связавшихся с сорбентом и далее концентрировали на центрифужных картриджах Millipore с пределом отсечения молекулярных масс 30 кДа до концентрации 2.5 мг/мл. Полученный препарат CRM197 тестировался на наличие эндонуклеазной активности.

**Определение эндонуклеазной активности рекомбинантного CRM197.** Методика была оптимизирована с использование результатов работы [3]. На 1 реакцию добавляли 600 нг ДНК фага лямбда (SD0011, “ThermoScientific”, США), 2.5 мкг очищенного CRM197, 1 мкл 10-кратного реакционного буферного раствора (100 мМ Трис-НСl, 25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6). Объем реакционной смеси доводили до конечного объема 10 мкл при помощи деионизованной воды MQ. В случае отрицательного контроля одновременно добавляли 1 мкл 10-кратного стоп-буфера (200 мМ ЭДТА, pH 7.6). Пробирки инкубировали в воздушном инкубаторе при 37°C в течение 6, 20, 30, 44 ч. Результаты эксперимента анализировали в 0.8%-ном агарозном геле и при помощи гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активная иммунизация признается одним из ключевых способов борьбы с распространением многих инфекционных заболеваний. Тем самым разработка и производство вакцинных препаратов являются релевантным направлением в развитии фармацевтической биотехнологии. Конъюгированные полисахаридные вакцины, в которых в качестве антигенов выступают капсульные полисахариды патогенных бактерий и дрожжей, занимают значительную часть всего наименования вакцин. Однако для их получения требуется производство иммуногенного белка-носителя, например CRM197.

CRM197, не активный мутант дифтерийного токсина, представляет собой глобулярный белок, состоящий из двух субъединиц: А (~21 кДа), и В (~37 кДа). Последняя, в свою очередь, несет рецептор-связывающий (R) и трансмембранный (T) домены. Между цистеинами в положениях 186–201 и 461–471 имеются две дисульфидные связи, которые важны для поддержания иммуногенной структуры [14].

В последнее время наблюдаются успешные варианты разработки пептидных вакцин [15], терапевтических онковакцин [16], препарата для лечения астмы на основе CRM197 [17]. Многие из них находятся уже в фазе клинических испытаний, и этот факт однозначно стимулирует развитие данной иммунотерапевтической платформы.

Более того, накопленный опыт по конъюгированию CRM197 с другими макромолекулами, и его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, взаимодействуя с клеточными рецепторами, открывают перспективы разработки таргетной доставки лекарственных препаратов, для лечения болезни Альцгеймера или опухолей мозга. Исходя из вышеперечисленных аргументов можно предположить, что в будущем на основе CRM197 будут существовать десятки препаратов. Следовательно, эффективная и рентабельная технология его получения является важной задачей.

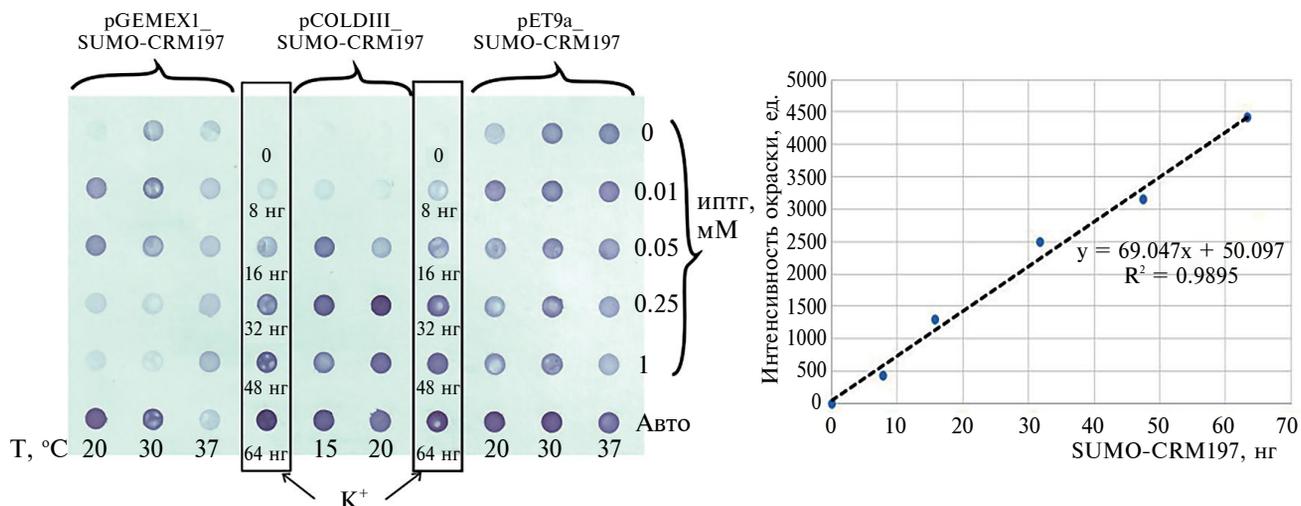
По оценкам, для удовлетворения потенциального спроса необходима технология, позволяющая достичь продуктивности не менее 1 г/л по целевому продукту. Однако, относительно большой размер молекулы, содержание трансмембранного региона, наличие дисульфидных связей вносят ряд значительных трудностей для его экспрессии в бактериальных клетках. Помимо продуктивности и экономических показателей, важной характеристикой технологии является ее воспроизводимость – способность от партии к партии получать продукт надлежащего и стабильного качества. Технологии, основанные на сложных живых системах в контексте производства высокомолекулярных и структурно детерминированных молекул белков, к сожалению, не являются таковыми *a priori*. Сложность заключается в поиске комбинации определенных факторов, которые оптимально влияют на эффективность процесса и качества продукта. Иначе говоря, на сложную живую систему, такую как клетка-продуцент, может влиять множество факторов, а процесс поиска сводится к тестированию множества вариантов на каждом этапе разработки. Сложность и относительная неэффективность данного подхода привела к смене парадигмы разработки “Quality by testing” (сокр. QbT, качество, достигаемое посредством тестирования) на парадигму “Quality by design” (сокр. QbD, качество, достигаемое посредством дизайна). Согласно последней, не только важно найти ключевые факторы и их комбинации, но также важно понимать каким образом или с какой закономерностью они влияют на данный процесс [18].

В настоящей работе, согласно парадигме QbD было решено оценить, как условия гетерологичной экспрессии могут повлиять на выход и растворимость мутантного дифтерийного токсина. В качестве объекта исследования был изучен биосинтез CRM197, слитого с белком-партнером SUMO. Гибридный белок, как показано в более ранних работах, можно экспрессировать в клетках *E. coli*, а при культивировании на среде, содержащей 200 мМ сорбитола, повысить его растворимость. Этот факт был интересен тем, что всего лишь один ключевой фактор, воздействуя на сложную систему, способен

изменить растворимость целевого белка при определенных условиях экспрессии.

**Биосинтез гибридного белка SUMO-CRM197 и факторы, влияющие на его уровень генной экспрессии.** Первоначально исходили из представлений о том, что продуцент представляет собой живую бактериальную клетку определенного штамма, трансформированную рекомбинантной ДНК, несущей целевой ген под контролем различных регуляторных элементов, а эффективность биосинтеза – это совокупная характеристика роста продуцента и внутриклеточного содержания целевого белка. Баланс между тем, сколько клеточной биомассы можно получить, и сколько целевого белка при этом будет содержаться в каждой клетке. На этот показатель может влиять множество факторов, например, цитотоксические свойства самого рекомбинантного белка, его внутриклеточная концентрация, эффективность репликации плазмиды, транскрипции и трансляции, а также любые ответные и регуляторные молекулярные механизмы хозяина. В этом случае преимуществом обладают индуцибельные системы экспрессии, позволяющие экспрессировать целевой ген и модулировать интенсивность его транскрипции только при добавлении индуктора в оптимальной концентрации в определенный момент времени роста культуры. Ген SUMO-CRM197 был клонирован в 2 вектора на основе промотора фага T7 – pET9a и pGEMEX1. Существенная разница между данными векторами – это селективные маркеры и копияемость (pET9a – среднекопийный, канамицин), pGEMEX1 (высококопийный, ампициллин). Также был использован вектор pCOLDIII на основе температурочувствительного промотора белков теплового шока CspA. Селективная индукция синтеза целевого белка происходит только при низкой температуре культивирования (15–20°C), что подавляло экспрессию других клеточных белков и снижало активность протеаз. Безусловно, являясь нативным промотором *E. coli*, он обладал меньшей транскрипционной активностью, чем промотор T7, однако вектор pCOLDIII содержал в своем составе TEE-элемент, повышающий эффективность трансляции, дающий в дальнейшем преимущество при трансляции мРНК [19].

В ходе анализа уровня экспрессии целевого гена при различных условиях, был описан различный уровень экспрессии целевого гена, который достигал значений более 3 г/л (табл. 1). Можно также сделать вывод, о различии двух разных векторов на основе T7-промотора, особенно при 37°C (рис. 1). Для продуцента с вектором pGEMEX1, отсутствовал дозозависимый отклик в уровне биосинтеза SUMO-CRM197 в ответ на различные концентрации ИПТГ и при автоиндукции. Это свидетельствовало об определенном пределе, характерном для продуцента в целом в таких условиях и не

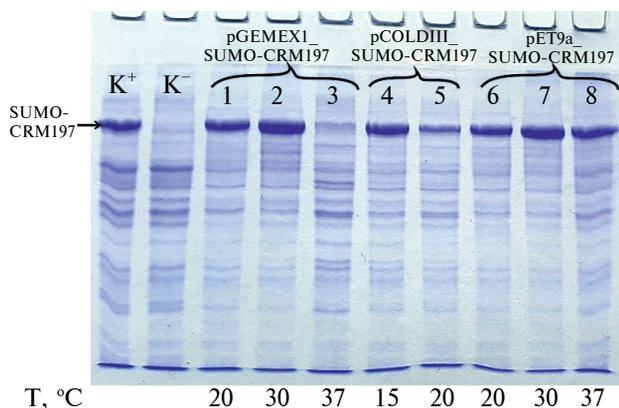


**Рис. 1.** Иммуноблоттинг лизатов *E. coli* BL21(DE3), выращенных при различных температурах и концентрациях ИПТГ (а) и калибровочный график для полуколичественной оценки уровня экспрессии гибридного белка SUMO-CRM197, приведенного в табл. 1 (б). 1, 2, 3 – лизат клеток, трансформированных вектором pGEMEX1\_SUMO-CRM197, 4, 5 – лизат клеток, трансформированных вектором pCOLDIII\_SUMO-CRM197, 6, 7, 8 – лизат клеток, трансформированных вектором pET9a\_SUMO-CRM197. “К+” – лизат *E. coli* BL21(DE3), содержащий известную концентрацию очищенного SUMO-CRM197. “Авто” – культивирование проводилось на автоиндукционной среде TBP-5052, содержащей лактозу в качестве индуктора.

**Таблица 1.** Уровень экспрессии гена SUMO-CRM197\*

Вектор	T, °C	C <sub>Ind</sub> , mM	ОП <sub>кон</sub> , ед.	Выход*	Вектор	T, °C	C <sub>Ind</sub> , mM	ОП <sub>кон</sub> , ед.	Выход*
pGEMEX	37	0	19.3	+	pET9a	37	0	25.6	++
		0.01	16.5	+			0.01	18.1	++
		0.05	16.4	+			0.05	17.6	++
		0.25	18.3	+			0.25	19.7	++
		1	18.8	+			1	19.6	+
		Auto	20.2	+			Auto	26.1	+++
	30	0	26.7	+	30	0	28.5	++	
		0.01	20.3	++		0.01	24.9	++	
		0.05	19.5	++		0.05	16.8	++	
		0.25	16.9	+		0.25	16.8	++	
		1	16.9	+		1	16.6	++	
		Auto	22.6	+++		Auto	29.2	+++	
	20	0	24.6	–	20	0	25.0	+	
		0.01	25.5	++		0.01	25.6	++	
		0.05	19.0	++		0.05	13.1	++	
		0.25	9.0	+		0.25	12.8	++	
		1	8.8	+		1	12.1	++	
		Auto	37.5	+++		Auto	30.7	+++	
pCOLDIII	20	0	24.4	–	pCOLDIII	15	0	24.1	–
		0.01	24.3	+			0.01	23.8	+
		0.05	22.1	+			0.05	24.3	++
		0.25	20.3	+++			0.25	20.1	+++
		1	17.7	++			1	17.3	++
		Auto	34.3	+++			Auto	31.8	+++

\* C<sub>Ind</sub> – концентрация ИПТГ, mM; T – температура культивирования, °C. полуколичественная оценка уровня экспрессии целевого гена (по данным дот-иммуноблоттинга, рис. 1): “–” менее 100 мг/л, “+” 0.1–1.0 г/л, “++” 1.0–3.0 г/л, “+++” более 3 г/л.



**Рис. 2.** Электрофорез в ПААГ лизатов *E. coli* BL21(DE3), выращенных на автоиндукционной среде TBP-5052 при различных температурах. “К–” – лизат штамма BL21(DE3); 1, 2, 3 – лизат клеток, трансформированных вектором pGEMEX1\_SUMO-CRM197, 4, 5 – лизат клеток, трансформированных вектором pCOLDIII\_SUMO-CRM197, 6, 7, 8 – лизат клеток, трансформированных вектором pET9a\_SUMO-CRM197; “К+” – лизат “К–”, с добавлением 1 мкг очищенного SUMO-CRM197.

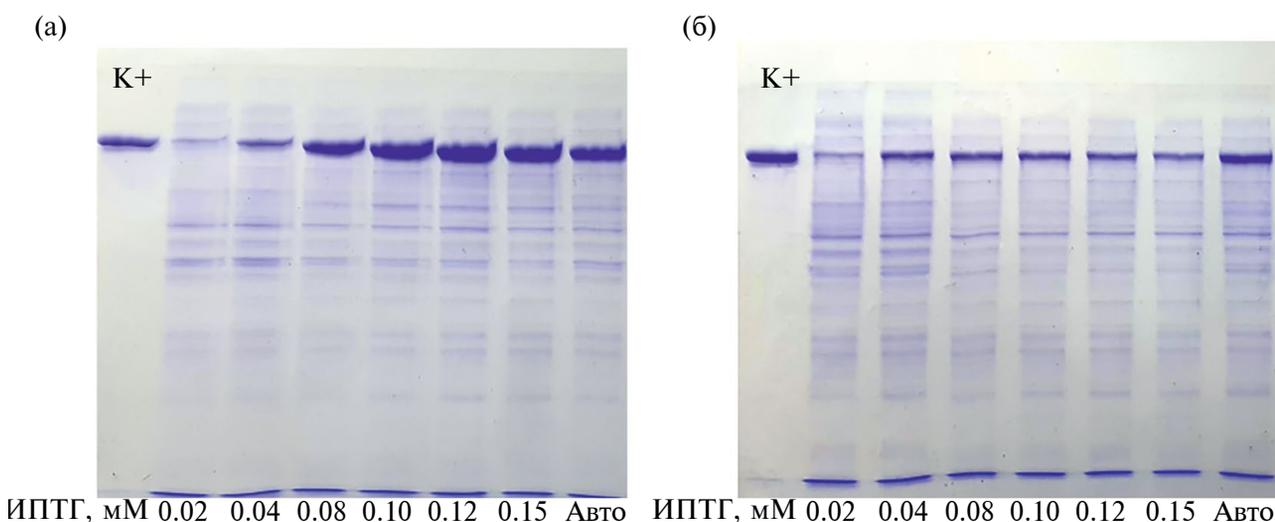
зависило от уровня транскрипции целевого гена. Напротив, для продуцента с pET9a – уровень экспрессии был значительно выше при низких концентрациях ИПТГ и составлял более 3 г/л при автоиндукции, что могло указывать на токсичность процесса гетерологической экспрессии для клетки продуцента.

Можно наблюдать высокий уровень биосинтеза на автоиндукционной среде во всех экспериментах (рис. 2). Известно, что лактоза является более мягким и естественным индуктором транскрипции систем на основе регуляторных элементов

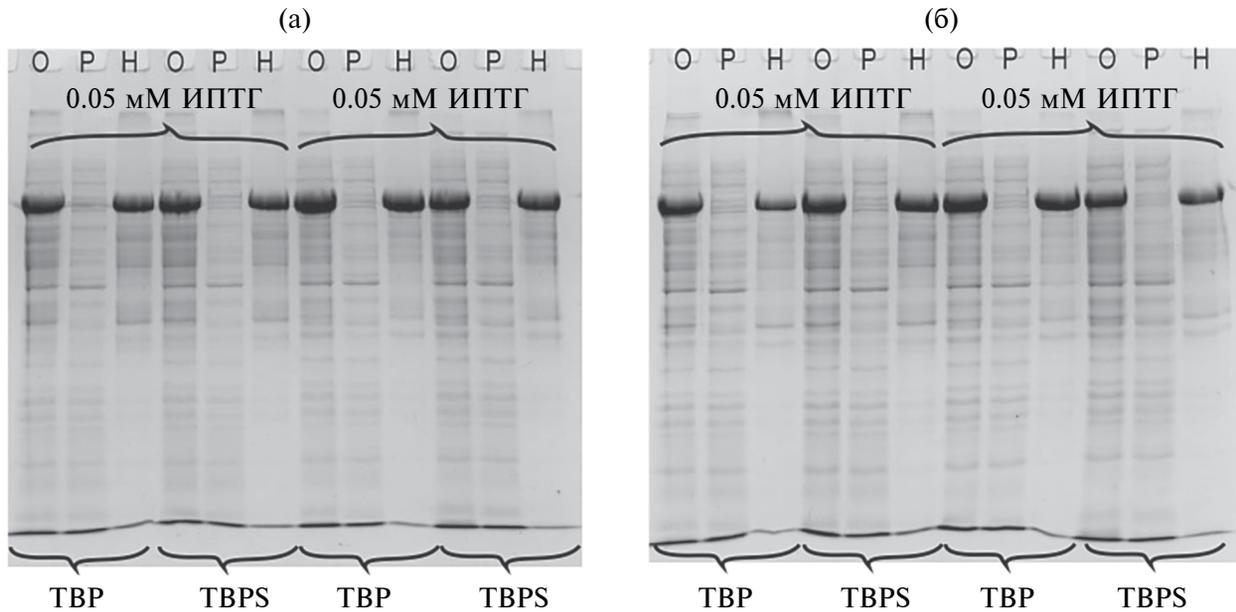
Lac-оперона, а также селективно транспортируется в клетку через LacY-пермеазу. Следовательно, возможно, что клетка испытывает меньший стресс при сверхэкспрессии целевого гена, что также выразилось в большей биомассе клеток на конец культивирования.

Наиболее интересными, на наш взгляд, выглядели результаты при использовании вектора pCOLDIII. В этом случае наблюдались отсутствие самоиндукции (без ИПТГ) экспрессии гена SUMO-CRM197, а также дозозависимый ответ на повышающуюся концентрацию ИПТГ. При концентрации индуктора 0.25 мМ и температуре 20°C выход составил более 3.7 г/л, что соответствовало 3 г/л CRM197. Однако, в данной точке также наблюдался и негативный эффект сверхэкспрессии, которые можно было оценить по снижению оптической плотности в конце культивирования.

Далее был проведен экспрессионный анализ при концентрации ИПТГ в пределах 0.02–0.15 мМ при 15°C. В этих условиях отсутствовал негативный эффект на рост клеток, а дозозависимый эффект наблюдался наиболее отчетливо (рис. 3а), с максимальным выходом более 4.3 г/л по гибриду (3.6 г/л по CRM197) при концентрациях ИПТГ 0.1–0.12 мМ. Стоит отметить, что позитивное влияние может оказывать не только сила промотора и пониженная температура культивирования, но также и его природа, а именно сама зависимость транскрипционной активности CspA от температуры. Было интересно оценить уровень экспрессии целевого гена под контролем других индуцибельных, но слабых промоторов, например, арабинозного или рамнозного оперона. Это помогло бы глубже понять роль транскрипции и условий культивирования продуцента.



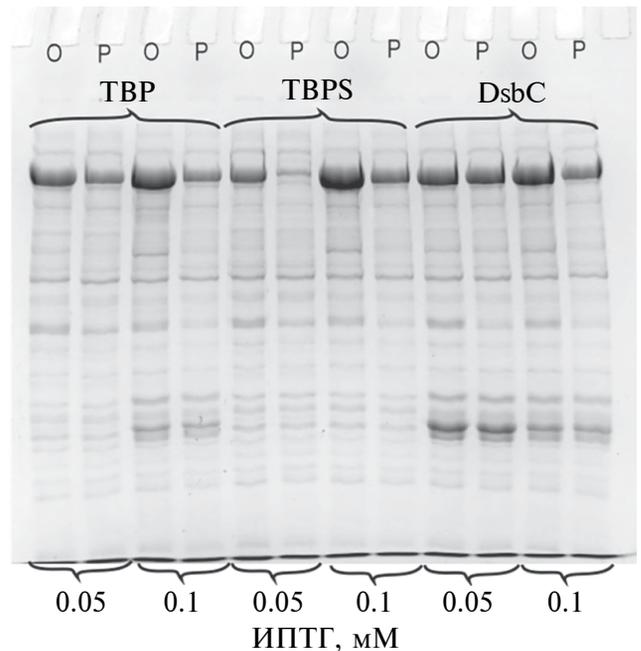
**Рис. 3.** Электрофорез в ПААГ лизатов *E. coli* BL21(DE3)\_pCOLDIII\_SUMO-CRM197 (а) и соответствующих номеров фракций растворимых белков (б), выращенных при различных концентрациях ИПТГ и температуре культивирования 15°C. “К+” – 1 мкг очищенного SUMO-CRM197 на лунку.



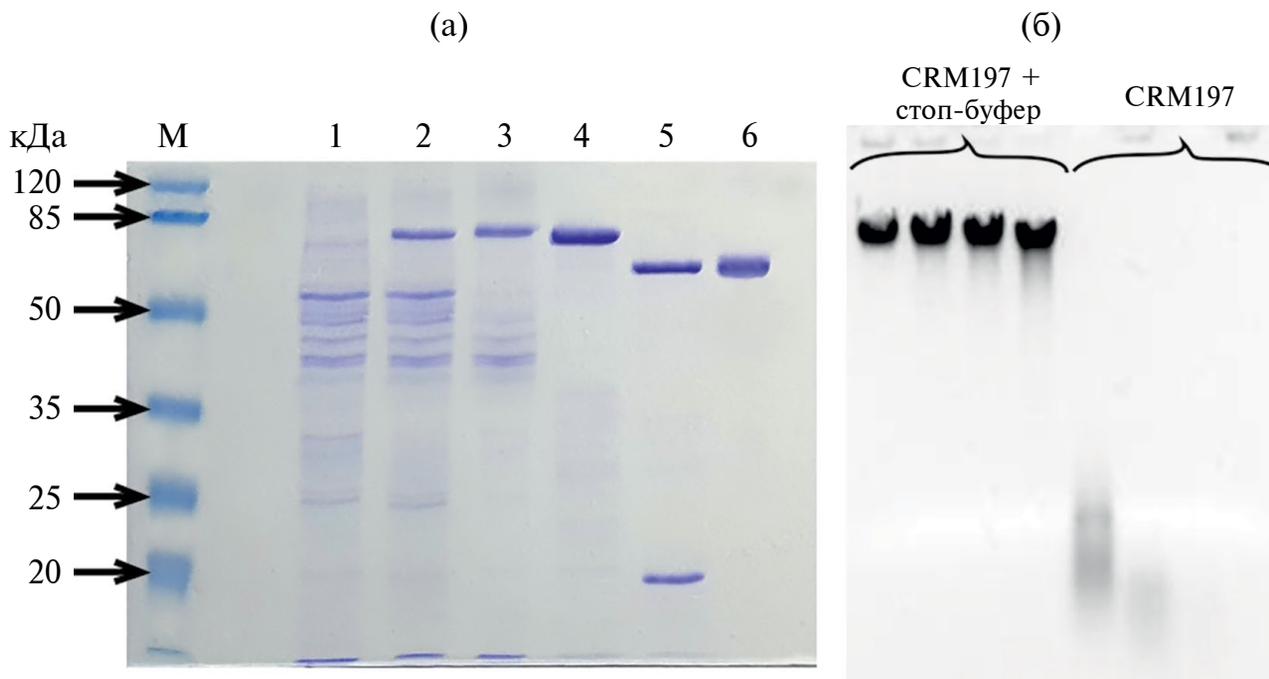
**Рис. 4.** Электрофорез в ПААГ белковых фракций *E. coli* BL21(DE3)  $\_pET9a\_SUMO-CRM197$  (а) и BL21(DE3)  $\_pET39b\_SUMO-CRM197$  (б) при температуре культивирования 30°C и концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.5 мМ. 1, 2, 3 – культивирование проводили на среде ТВР, 1с, 2с, 3с – культивирование проводили на среде ТВРС (ТВР + 200 мМ сорбитола); 1, 1с – фракции общего клеточного белка; 2, 2с – фракции растворимого клеточного белка; 3, 3с – фракции нерастворимого клеточного белка.

Необходимо отметить, что только в том случае, когда имеется закономерный ответ системы на изменение факторов, можно говорить о разработке воспроизводимой технологии по методологии QbD. Анализ растворимости показал возможность биосинтеза SUMO-CRM197 в растворимой форме (рис. 3б). Максимальная доля и выход растворимого белка были достигнуты при концентрации ИПТГ 0.04 мМ и автоиндукции соответственно. Был впервые обнаружен факт влияния экспрессионного вектора на растворимость SUMO-CRM197, однако, выходы при этом все же составили менее 1 г/л, что стимулировало к дальнейшему поиску благоприятных условий и факторов, способных повысить растворимость при сохранении общего высокого уровня экспрессии

Также следует отметить тот факт, что, по-видимому, оптимизация нуклеотидной последовательности и кодонного состава, вместе с повышением стабильности репликации экспрессионного вектора, предложенного в работе [7], не влияли на уровень экспрессии целевого гена, а лишь повышали стабильность и воспроизводимость реализации генетической информации в клетке. Напротив, применение технологии гибридной экспрессии с белком-партнером SUMO и оптимизация регуляции транскрипции и трансляции, путем использования вектора на основе естественного промотора CspA и энхансера трансляции, приводили к увеличению выхода целевого продукта на порядок, а также положительно повлияли на его растворимость.



**Рис. 5.** Электрофорез в ПААГ белковых фракций *E. coli* BL21(DE3)  $\_pCOLDIII\_SUMO-CRM197$  при температуре культивирования 15°C и концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ. 1, 2 – культивирование проводили на среде ТВР, 1с, 2с – культивирование проводили на среде ТВРС (ТВР + 200 мМ сорбитола); 1д, 2д – коэкспрессия с геном дисульфид-изомеразы на среде ТВР; 1, 1с, 1д – фракции общего клеточного белка; 2, 2с, 2д – фракции растворимого клеточного белка.



**Рис. 6.** Электрофорез в ПААГ образцов, содержащих целевой белок и полученных в ходе выделения и очистки CRM197 (а). М – маркер молекулярной массы; 1 – общий белок штамма BL21(DE3); 2 – общий белок штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pCOLDIII\_SUMO-CRM197; 3 – растворимый белок штамма pCOLDIII\_SUMO-CRM197; 4 – элюат после стадии металлохелатной аффинной хроматографии; 5 – гидролиз SUMO-CRM197 при помощи Ulp1-гидролазы, 6 – препарат CRM197 после стадии вычитающей металлохелатной аффинной хроматографии. Электрофорез в 0.8%-ном агарозном геле препаратов геномной ДНК фага лямбда, инкубированного с очищенным препаратом CRM197 (б) при инкубировании в течение 6, 20, 30, 44; 1, 2, 3, 4 – реакция проводилась в реакционном буфере с добавлением стоп-буфера (20 мМ ЭДТА, отрицательный контроль); 5, 6, 7, 8 – реакция проводилась в реакционном буфере, содержащем по 2.5 мМ CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>.

**Влияние сорбитола и коэкспрессии гена DsbC на растворимость SUMO-CRM197.** Известно, что при синтезе целевого белка, слитого с SUMO, наблюдалось заметное увеличение экспрессии целевого полипептида и его растворимости [20]. Внешняя гидрофильная оболочка и внутренний гидрофобный кор белка-партнера иногда могли оказывать эффект, аналогичный детергентам при солюбилизации, что действительно оказалось полезным для биосинтеза CRM197, содержащего трансмембранный регион. Также известны условия, при которых возможно получение растворимого CRM197 при прямой экспрессии – это секрета в периплазматическое пространство и использование штаммов типа Origami B или Shuffle. В этом случае важное значение имело корректное образование дисульфидных связей, которое достигалось путем фолдинга белка в условиях более высокого окислительно-восстановительного потенциала и перегруппировке случайно образованных некорректных дисульфидных связей благодаря дисульфид-изомеразе DsbC.

В первую очередь был исследован факт влияния сорбитола на растворимость SUMO-CRM197. Для этой цели использовали векторы pET9a (+) и pET39b (+), отличающиеся между собой лишь

тем, что в последнем имеется последовательность гена *LacI*, отвечающая за более строгую регуляцию экспрессии. Опираясь на полученные данные по уровню экспрессии в различных условиях и информацию, описанную в референтном исследовании, как и предполагалось, не удалось получить SUMO-CRM197 в растворимом состоянии (рис. 4а, 4б). Однако, в этом случае, было бы нелогично делать вывод о влиянии сорбитола на растворимость, поскольку не было четкой закономерности по экспрессии целевого белка в моделируемых условиях. Для того чтобы проверить эффект сорбитола на растворимость SUMO-CRM197 была использована плаزمид pCOLDIII при концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ. В обоих случаях белок может нарабатываться в растворимом состоянии, однако при 0.05 мМ растворимая доля белка близка к максимальной, а при 0.1 мМ общий выход. Следовательно, можно судить об изменении уровня растворимости SUMO-CRM197 при культивировании на среде, содержащей сорбитол.

Результаты экспериментов подтвердили предположение. Сорбитол не оказывал влияния на растворимость SUMO-CRM197, напротив, DsbC значительно ее повысил (рис. 5). В результате

при концентрации ИПТГ 0.05 мМ в условиях ко-экспрессии удалось достигнуть получения полностью растворимого продукта с выходом более 1.7 г/л (1.4 г/л по CRM197) в условиях периодического культивирования в колбе. Полученные результаты могут внести значительный вклад в развитие промышленной технологии получения CRM197.

В дальнейшем были проведены эксперименты по выделению и очистке CRM197 (рис. 6а). Оценка молекулярной массы методом масс-спектрометрии показала значение 58387.64 Да, что соответствовало теоретическому значению 58410 Да (данные не представлены). Биохимической особенностью CRM197 является наличие эндонуклеазной активности в присутствии катионов двухвалентных металлов. Данный факт был подтвержден гидролизом полноразмерной ДНК фага лямбда, что свидетельствовало о его правильной биологической конформации (рис. 6б).

\* \* \*

Было проанализировано влияние условий гетерологической экспрессии на уровень биосинтеза SUMO-CRM197. Подтверждено, что использование генетически модифицированных живых систем для производства высокомолекулярных продуктов является сложно воспроизводимой задачей при разработке технологии. Тем не менее, посредством систематического анализа, удалось получить CRM197 в цитоплазме с выходом более 1 г/л. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по анализу факторов, повышающих растворимость SUMO-CRM197 без использования коэкспрессии DsbC, с целью дальнейшего повышения технологичности, рентабельности и воспроизводимости данного подхода.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Broker M.* // Human Vaccine and Immunotherapeutics. 2016. V. 12. № 3. P. 667–669.
2. *Zhou J., Petracca R.* // J Tongji Med. Univ. 1999. V. 19. № 4. P. 253–256.
3. *Stefan A., Conti M., Rubboli D., Ravagli L., Presta E., Hochkoepler A.* // J. Biotechnol. 2011. V. 156. № 4. P. 245–252.
4. *Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев. А.С.* // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5. № 1. С. 37–44.
5. *Goffin P., Dewerchin M., De Rop P., Blais N., Dehottay P.* // Biotechnol. J. 2017. V. 12. № 7. P. 1–11.
6. *Tarahomjoo S., Bandehpour M., Aghaebrahimian M., Ahangaran S.* // Prot. and Pept. Lett. 2022. V. 29. № 4. P. 350–359.
7. *Khodak Y.A., Ryazanova A.Y., Vorobiev I.I., Kovalchuk A.L., Ovechko N.N., Aparin P.G.* // BioTech. 2023. V. 12. № 1. P. 1–9.
8. Патент США. 2015. № US10093704B2.
9. *Sambrook J., Green M.R.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4th Ed. V. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1546 p.
10. *Duetz W., Ruedi L., Hermann R., O'Connor K., Buchs J., Witholt B.* // Appl. Biotech. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2641–2646.
11. *Studier W.F.* // Protein. Expr. Purif. 2005. V. 41. № 1. P. 207–234.
12. *Zeder-Lutz G., Cherouati N., Reinhart C., Pattus F., Wagner R.* // Protein Expr. Purif. 2006. V. 50. № 1. P. 118–127.
13. *Austin B.P., Waugh D.S.* // Protein Expr. Purif. 2011. V. 82. № 1. P. 116–124.
14. *Carboni F., Kitowski A., Sorieul C., Veggi D., Marques M.C., Oldrini D.* // Chem. Sci. 2022. V. 13. № 8. P. 2440–2449.
15. *Zhao Q., Gao Y., Xiao M., Huang X., Wu X.* // Chem. Commun (Camb). 2021. V. 57. № 12. P. 1474–1477.
16. *Xiong A.W., Fang J.M., Ren S., Li W., Wang J, Zhao Y. et al.* // Front. Oncol. 2022. V. 5. № 11. P. 1–10.
17. *Conde E., Bertrand R., Balbino B, Bonnefoy J., Stackowicz J, Caillot N. et al.* // Nat. Comm. 2021. V. 2574. № 12. P. 1–14.
18. *Rathore A.S., Winkle H.* // Nat. Biotech. 2009. V. 27. № 1. P. 26–34.
19. *Герасимов А.С., Рогожкин С.О., Шахова Е.С., Чепурных Т.В., Гороховатский А.Ю., Мышкина Н.М. и др.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. № 5. С. 610–622.
20. *Butt T.R., Edavettal S.C., Hall J.P., Mattern M.R.* // Prot. Expr. Purif. 2005. V. 43. № 1. P. 1–9.

## **Bacterial Expression of CRM197: Investigation and Optimization of Gene Expression Factors for Effective Production in *E. coli*.**

**S. O. Rogozhkin<sup>a, \*</sup>, A. S. Gerasimov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: usr22574@vyatsu.ru*

CRM197 (Cross Reacting Material 197) is an inactive form of *C. diphtheriae* exotoxin used as a carrier protein for the development and production of conjugated polysaccharide vaccines and immunotherapeutic drugs. However, the development of these research areas is not possible without an efficient and cost-effective technology to produce CRM197 of the proper quality. In this study, we developed a highly efficient method to produce recombinant CRM197 as a fusion with SUMO protein, yielding more than 3 grams per liter in form of the inclusion bodies. We examined the significant effect of expression vector type, heterologous gene expression conditions and cultivation on its solubility. Using a combination of reduced cultivation temperature and the promoter of the gene encoding the heat shock protein CspA, we achieved an increase in the solubility level of SUMO-CRM197 of more than 30%, with an overall biosynthesis level of more than 2 grams per liter. Coexpression of the target gene with the DsbC disulfide isomerase gene allowed us to obtain the target protein completely in the soluble state with a yield of more than 1.4 grams per liter. The results obtained may become the basis for the development of a promising domestic technology for the production of CRM197.

*Keywords:* CRM197, *E. coli*, recombinant proteins, conjugated vaccine, expression vector

УДК 578.233.2

## ЗНАЧИМОСТЬ АНТИГЕНОВ *Yersinia pestis* В РЕЦЕПЦИИ ЧУМНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА L-413C

© 2024 г. А. А. Бывалов<sup>1, 2, \*</sup>, Л. Г. Дудина<sup>1, 2</sup>, Т. Б. Кравченко<sup>3</sup>, С. А. Иванов<sup>3</sup>,  
И. В. Конышев<sup>1, 2</sup>, Н. А. Морозова<sup>1</sup>, А. В. Чернядьев<sup>1</sup>, С. В. Дентовская<sup>3, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

<sup>2</sup>Институт физиологии Коми научного центра Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук”, Сыктывкар, 167982 Россия

<sup>3</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Серпухов, 142279 Россия

\*e-mail: byvalov@nextmail.ru

\*\*e-mail: info@obolensk.org

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Проведена экспериментальная оценка роли поверхностных антигенов *Yersinia pestis* в рецепции бактериофага L-413C. С помощью методов, основанных на определении уровня инактивации фага после коинкубации с находящимися в растворе или сорбированными на полистирольных микросферах антигенами, подтверждена значимость липополисахарида чумного микроба в связывании частиц фага и отсутствие связывающей способности у капсульного антигена F1, белка Ail и двух автотранспортных белков YарF и YарM. Препараты нативного и рекомбинантного антигена PsaA в растворе, но не в связанном с микросферами виде, существенно и в одинаковой мере подавляли литическую активность фага. Адгезивность бактерий родительского штамма EV в отношении фага L-413C не превышала адгезивность клеток нокаутного мутанта EVΔpsaA. Использование трех методов оценки роли антигена PsaA в рецепции фага L-413C дали противоречивые результаты. С одной стороны, реакционноспособные домены PsaA взаимодействуют с частицами фага в растворе. В то же время эти домены, по-видимому, определяют неспецифическое связывание белка PsaA с нижерасположенными структурами бактериальной клетки и материалом микросферы, препятствуя адгезии фага.

**Ключевые слова:** бактериофаг L-413C, антиген, *Yersinia pestis*, рецептор

DOI: 10.31857/S0555109924040094 EDN: SAFZEF

В последние десятилетия одной из глобальных проблем медицины стал резкий рост антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций, в том числе и чумного микроба. От больных людей и животных выделяют культуры *Yersinia pestis*, устойчивые к действию антибиотиков, рекомендованных для лечения чумы [1, 2].

Показано, что гены резистентности как к отдельным [3, 4], так и одновременно к нескольким антибиотикам [5], предположительно могут переноситься в клетки *Y. pestis* конъюгативными плазмидами энтеробактерий кишечника блох – естественного переносчика возбудителя [6]. Проблема борьбы с антибиотикорезистентностью может решаться несколькими путями: разработкой новых классов антибиотиков, а также иных терапевтических средств, а именно иммунотерапевтических препаратов, катионных

пептидов – ингибиторов отдельных факторов вирулентности, в частности, белков системы секреции III типа и связанных с ними токсинов, а также препаратов, действующих на структуры макроорганизма, используемые возбудителем для инвазии (host-directed therapies). Иными подходами к решению этой проблемы являются коррективка питания макроорганизма (nutritional immunity), применение бактерий-хищников (predatory bacteria), выживание которых зависит от использования клеток возбудителя в качестве источника питания, а также поиск ингибиторов LpxC – фермента, катализирующего первую обязательную стадию биосинтеза липида A [6].

Еще одним подходом к созданию альтернативных средств лечения чумы является фаготерапия, которая может быть использована в том числе и на фоне применения антибиотиков [7, 8].

Первая попытка лечения больных чумой путем введения суспензии литического фага в бубоны, предпринятая столетие назад, оказалась удачной [9]. Однако в последующем в силу разных причин, главным образом вследствие появления эффективных антибиотиков, это направление утратило актуальность. Рост числа случаев выделения антибиотикорезистентных культур *Y. pestis* от больных людей и животных сделал актуальным возобновление исследований в области создания средств фаготерапии чумы [10]. Для повышения вероятности эффективного лечения чумы, вызванной существенно различающимися штаммами возбудителя, считается целесообразным составление “коктейлей”, включающих несколько фагов, способных лизировать максимальное количество штаммов *Y. pestis* [11].

Чумные бактериофаги различаются по генетической организации, определяющей особенности их морфологии, антигенности, вирулентности в отношении культур *Y. pestis* и структуры выявляемого ими рецепторного аппарата бактерий. Геномы наиболее часто используемых чумных фагов L-413С, фА1122, Покровской и Yер-phi секвенированы [11]. Эти фаги характеризуются различной и относительной специфичностью, они позволяют выявлять наряду со штаммами чумного микроба некоторые штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* или *Escherichia coli*. По-видимому, один из наиболее высокоспецифичных фагов – литический фаг L-413С морфотипа *Myoviridae*, относимый к Р2-подобным фагам, превосходит по диагностической специфичности фаги Покровской и фА1122 морфотипа *Podoviridae*. Вместе с тем, предположительно ложноотрицательные (равно как и ложноположительные) результаты, полученные при использовании одного фага, например, L-413С целесообразно подтверждать или отрицать применением другого фага, взаимодействующего с иным рецептором на поверхности чумного микроба, например, фага Покровской [11, 12]. При этом нужно учитывать значимость температуры культивирования идентифицируемых клеток иерсиний. Так, рецептор-связывающий белок GpH фага L-413С способен выявлять культуры чумного микроба, выращенные при различных температурах (от 6 до 37°C), в то время как аналогичный белок Gp17 фага фА1122 может связываться с клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 37°C или, во всяком случае, не ниже 30°C. Бактерии *Y. pestis*, выращенные при температуре 37°C, практически не выявляются с помощью белка Gp17 из-за экранирования рецепторов капсульным антигеном [13]. Кроме того, при оценке эффективности фагов следует отдавать отчет в том, что они могут характеризоваться различной литической активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*. Так, фаг PST проявлял

выраженную литическую активность в отношении бактерий штамма *Y. pestis* EV76, выращенных как в жидкой питательной среде, так и в цельной крови человека, в то время как фаг фА1122 активно лизировал лишь микробные клетки после их культивирования в жидкой питательной среде [10]. В такого рода исследованиях следует использовать в том числе и условия, имитирующие ту или иную среду обитания возбудителя в организме хозяина. Это особенно важно для возбудителя чумы, способного расти и размножаться внутриклеточно и в биологических жидкостях человека.

Вполне вероятно, что одним из компонентов разрабатываемого “коктейля” должен стать фаг L-413С, как способный лизировать наибольшее количество штаммов возбудителя чумы (99.9%) и, по-видимому, на сегодняшний день наиболее специфичный из числа используемых в диагностической практике чумных фагов [12]. Очевидно, эти достоинства фага L-413С определяются его существенными отличиями от большинства других чумных фагов, используемых в диагностической практике, не только по морфологическим особенностям, но и по механизмам рецепции и последующим стадиям инфицирования бактериальной клетки. Однако, несмотря на доказанную значимость липополисахарида (ЛПС) *Y. pestis* в качестве рецептора фага L-413С, процесс первичной адгезии фага на поверхности микробной клетки нуждается в дальнейшем исследовании.

Цель работы – изучение значимости поверхностных антигенов *Y. pestis* в рецепции фага L-413С.

## МЕТОДИКА

**Бактериофаги.** В работе использовали бактериофаги производства ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”: 1) чумной L-413С морфотипа *Myoviridae*, по новой классификации (<https://ictv.global/taxonomy>) – Peduovirus L413С (класс Caudoviricete, семейство Peduoviridae, род *Peduovirus*) и 2) псевдотуберкулезный диагностический морфотипа *Podoviridae*, по новой классификации (<https://ictv.global/taxonomy>) – Teseptimavirus YpsP-G (класс Caudoviricete, семейство Autographiviridae, субсемейство *Studiivirinae*, род *Teseptimavirus*), известный и как бактериофаг d’Herelle-m (PpsP-G) [11, 14].

**Получение нокаутного мутанта  $\Delta$ psaA.** Конструирование нокаутного  $\Delta$ psaA мутанта вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводили с помощью RedGam-мутагенеза по методу, описанному в работе [15].

**Выделение и очистка антигенов.** Выделение и очистку препаратов рекомбинантного (PsaA-рек) и нативного (PsaA-нат) антигена

PsaA (или впервые обозначенного как антиген рН 6) из штаммов *E. coli* DH5 $\alpha$ /pIG428 и *Y. pestis* KM260(11) соответственно, проводили как описано в работе [16]. Секретируемый капсульный антиген (F1, Caf1) выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK3–9 путем фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой (Методические рекомендации 4.2.0219–20 “Выделение и очистка F1 антигена чумного микроба”).

Кодирующую последовательность генов *yapF*, *yapM* и *ail* из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV линии НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках дефицитного по протеазе штамма *E. coli* BL21(DE3) (“Novagen”, Германия). Рекомбинантные белки YapF, YapM и Ail выделяли методом металло-хелатной хроматографии. Препарат ЛПС выделяли из культуры вакцинного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV линии НИИЭГ, выращенной при 27°C, методом Вестфала с помощью водно-фенольной экстракции [17] и очищали трехкратным ультрацентрифугированием при 105000 g в течение 3 ч.

**Получение антисывороток.** Беспородных белых мышей обоего пола массой (19  $\pm$  1) г иммунизировали препаратами вышеназванных белковых антигенов подкожно двукратно с интервалом 30 сут. Через 30 сут после бустерной иммунизации забирали кровь путем пункции ретроорбитального синуса.

**Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА).** Использовали стандартную процедуру постановки реакции. Лунки микротитровальных планшетов (“Greiner BioOne”, Германия) сенсibilизировали 100 мкл антигенных препаратов в концентрации 10 мкг/мл, после отмывки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (1%-ного бычьего сывороточного альбумина, БСА, “Диаэм”, Россия). Далее в лунки добавляли 100 мкл комплементарной сенситину исследуемой антисыворотки, после отмывки вносили 100 мкл козьего антимышиного конъюгата (“Sigma”, США) в буфере для отмывки с 0.5% БСА и после инкубации (1 ч при комнатной температуре) четырежды отмывали. Вносили по 100 мкл субстрата (0.04%-ный ортофенилендиамин, “Alfa Aesar”, Великобритания) в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.7–5.0, с добавлением 0.05% пероксида водорода и после 30 мин инкубации – 50 мкл 1 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для остановки реакции. Результаты реакции регистрировали с помощью микропланшетного ридера Anthos 2020 (ЗАО “БиоХимМак”, Россия) и выражали в единицах оптической плотности при  $\lambda = 492$  нм (ОП<sub>492</sub>).

**Трансмиссионная электронная микроскопия.** Исследуемые препараты наносили на медные сеточки (200 меш, SPISupplies, США), покрытые

углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, убирали избыток жидкости фильтровальной бумагой, сушили препарат. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование осуществляли с использованием CCD камеры Keen View (“Olympus”, Германия).

**Сканирующая электронная микроскопия.** Для измерения диаметра микросфер использованы сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6510LV (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, вакуумный напыляющий аппарат JEOL JFC-1600 (JEOL, Япония). Размер микросфер определяли при увеличении  $\times 40000$  в ручном режиме с применением встроенного инструмента анализа размеров частиц.

**Определение титра бактериофага.** Использовали метод Грациа. Кратко: смесь (по 100 мкл) исследуемых растворов, содержавших бактериофаг и суспензию бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV (~ 1 млрд м.к./мл), выращенного при 27°C в течение 18–20 ч, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в пробирки добавляли по 3 мл 1.5% БТН-агара (“Биотехновация”, Россия), предварительно расплавленного и охлажденного до 47°C, интенсивно перемешивали и переносили в чашки Петри с подсушенным 3% БТН-агаром. Через 18–24 ч термостатирования чашек при 27°C подсчитывали количество бляшек, соответствующее числу бляшкообразующих единиц (БОЕ).

**Сенсibilизация микросфер антигенами.** Для сенсibilизации микросфер антигенами использовали полистирольные микросферы диаметром 1 мкм (Polysciences, США). Пассивную сенсibilизацию микросфер препаратами белков проводили в соответствии с ранее описанными методиками [18]. Процедура сенсibilизации микросфер препаратом ЛПС изложена в [19]. Контролем служили микросферы, покрытые БСА (“Диаэм”, Россия) по методике сенсibilизации микросфер белковыми антигенами *Y. pestis*. Конечные препараты сенсibilизированных микросфер в концентрации 0.5% (w/v) хранили при температуре 4–6°C в фосфатном буферном растворе, рН 7.3 (ФБР).

Наличие на поверхности сенсibilизированных микросфер того или иного белкового антигена, подтверждали иммунохимически. Для этого микросферы инкубировали с сывороткой, комплементарной целевому антигену, взятой в предварительно подобранной концентрации. По результатам сравнения результатов ТИФА сыворотки, истощенной микросферами той или иной специфичности, и сыворотки, коинкубированной с контрольными микросферами, покрытыми БСА, судили о присутствии антигена на поверхности микросфер. Как показали результаты

ТИФА, значения ОП<sub>492</sub> для сывороток, истощенных микросферами, которые были сенсibilизированы белковыми антигенами всех 6 типов, оказались не менее чем в два раза ниже по сравнению с соответствующими сыворотками, коинкубированными с микросферами “БСА”. Это однозначно указывало на наличие каждого из использованных антигенов на поверхности микросфер. Факт иммобилизации препарата ЛПС-EV на поверхности микросфер верифицировали методом сканирующей электронной микроскопии, оценивая их диаметр (диаметр несенсibilизированных микросфер составил  $0.989 \pm 0.009$  мкм, покрытых ЛПС-EV –  $0.994 \pm 0.009$  мкм, различие достоверно для  $p < 0.01$ ).

**Адсорбция бактериофага на сенсibilизированные микросферы.** Сенсibilизированные тем или иным антигеном микросферы разводили ФБР до ОП<sub>600</sub>, равной 1.2, на спектрофотометре SmartSpec Plus (“BioRad”, США). Затем смешивали 100 мкл суспензии тех или иных микросфер и 20 мкл разведенного в буфере SM (0.58% NaCl, 0.2% MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.05 М трис-HCl, pH 7.5) бактериофага с концентрацией  $8 \cdot 10^5$  БОЕ/мл. Смесь инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“Biosan”, Латвия) при 500 об/мин в течение 3 ч при температуре 37°C. После этого микросферы осаждали на центрифуге Centrifuge 5424 (“Eppendorf”, Германия) при 13000 г в течение 10 мин, надосадочные жидкости разбавляли 1 : 100 буфером SM и высевали на чашки Петри по методике определения титра бактериофага.

**Инактивация бактериофага антигенами в растворе.** Готовили препараты белковых антигенов, БСА и ЛПС-EV в концентрации 0.2 мг/мл в ФБР с 0.01% SDS. Предварительно белок Ail солюбилизировали в буфере TES (100 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1% ДДС-Na, 5 мМ ЭДТА) в объемном соотношении антиген – буфер 4 : 1 в течение 10 мин и диализовали против ФБР с 0.01% SDS, а препарат ЛПС-EV, хранившийся при температуре –70°C, центрифугировали (13000 г, 15 мин) для освобождения от высокомолекулярных конгломератов, надосадочную жидкость переводили в ФБР с 0.01% SDS. Смешивали 100 мкл каждого из этих растворов с 20 мкл бактериофага, разведенного буфером SM до концентрации  $8 \cdot 10^5$  БОЕ/мл. Смесь инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“BIOSAN”, Латвия) при 500 об/мин в течение 3 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации суспензии разбавляли 1 : 100 в буфере SM и полученные разведения высевали по методике определения титра бактериофага.

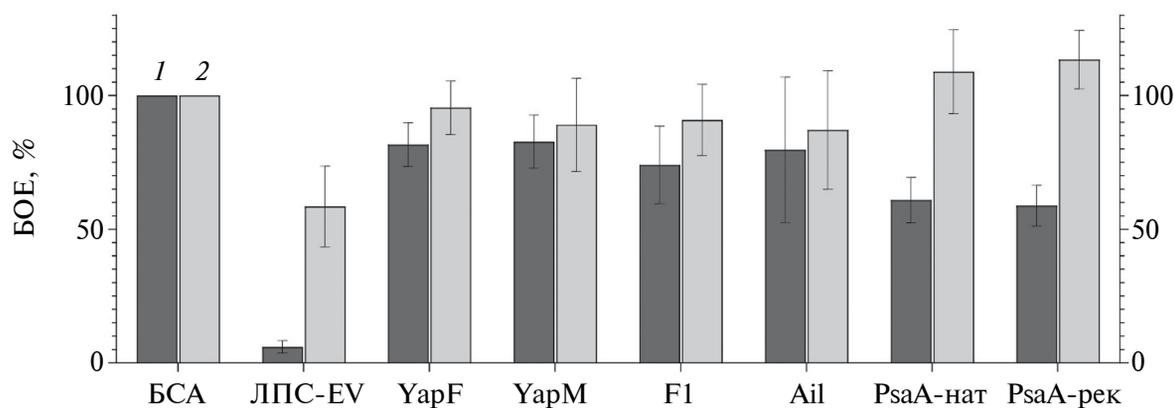
**Методика оценки адгезивности бактериофага к бактериальным клеткам.** Культуры *Y. pestis* EV и EVΔ*psaA* выращивали в жидкой питательной среде LB (дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлористый

натрий – 10 г/л, триптон – 10 г/л) при температуре 37°C и pH 6.0, а также pH 7.0 в течение 18–20 ч, осаждали низкоскоростным центрифугированием. Осадок клеток разводили до концентрации  $8 \cdot 10^9$  кл./мл либо в ацетатном буферном растворе (АБР) (необработанные клетки), либо в АБР с добавлением 100 мМ периодата натрия. Обработку проводили в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Обработанные и необработанные клетки трижды отмывали буфером SM путем осаждения на центрифуге Eppendorf при 15870 г в течение 10 мин. Отмытые клетки разводили в жидкой питательной среде LB, доводя концентрацию до значения ОП<sub>600</sub> = 1.2. Далее к 100 мкл каждого препарата клеток добавляли 20 мкл препарата бактериофага L-413C в расчетной концентрации  $8 \cdot 10^5$  БОЕ/мл и инкубировали при 27°C в течение 20 мин на шейкере-инкубаторе Thermo Shaker PST-60HL-4 (“BIOSAN”, Латвия) при 450 об./мин. Клетки осаждали на центрифуге Eppendorf при 15870 г в течение 10 мин и к 10 мкл надосадочной жидкости добавляли 990 мкл буфера SM, после чего полученные суспензии фага высевали по методу Грация. Контролем служила суспензия фага без клеток в идентичной концентрации.

Иммунохимическую активность клеток *Y. pestis* EV и EVΔ*psaA* с полученной кроличьей антисывороткой к PsaA антигену оценивали методом ТИФА. Для этого в лунки планшета вносили суспензию клеток в концентрации  $200 \cdot 10^6$  кл./мл и, после блокировки, последовательно по стандартной схеме добавляли антисыворотку к антигену PsaA, антикроличий пероксидазный конъюгат морской свинки (“Sigma”, США), ортофенилендиамин (“Alfa Aesar”, Великобритания), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Результаты представляли в виде ОП<sub>492</sub>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство чумных фагов в качестве рецепторов на поверхности клеток *Y. pestis* используют определенные участки липополисахарида [20]. Однако имеются сообщения об участии в процессе их адгезии и других компонентов наружной мембраны возбудителя. В этой связи, для дальнейшего изучения природы взаимодействия фага L-413C с клеткой чумного микроба оценивали значимость в рецепции фага ряда поверхностных антигенов *Y. pestis*, экспериментально подтвержденных или предположительно проявляющих адгезивные свойства по отношению к эукариотическим клеткам [21]. Как было показано ранее, антигены Ail и YarpF в той или иной степени могут участвовать в рецепции фагов Покровской и псевдотуберкулезного диагностического [22].



**Рис. 1.** Влияние на адсорбцию фага L-413C коинкубации с антигенами *Y. pestis*, находящимися в растворе (1) или на микросферах (2). БОЕ (%) – доля литически активных частиц фага после коинкубации с антигенами в растворе или на поверхности микросфер. За 100% принимали среднее значение концентрации фага после взаимодействия с БСА, иммобилизованным на микросферах, или в растворе; 95% CI – доверительный интервал для  $p = 0.95$ .

Возможный вклад антигенов *Y. pestis* в рецепцию фага L-413C первоначально оценивали с помощью двух методических подходов. Первый из них основан на способности микросфер, предварительно покрытых препаратом того или иного антигена, связывать частицы фага из раствора. Второй метод использует эффект инактивации литической способности фага за счет его связывания с водорастворимым антигеном, не связанным с твердой фазой. Полученные результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что антигены YopF, YopM, F1 и Ail не способны к существенному связыванию частиц фага, определяемому двумя использованными методами (различия не достоверны для  $p = 0.01$ ). ЛПС проявил высокую адгезивность в отношении фага L-413C, причем выраженность этого эффекта более ярко проявлялась, когда антиген находился в растворе, по сравнению с антигеном, иммобилизованным на микросфере. При этом количество литически активных частиц фага, определенное двумя методами, снижалось до  $6.0 \pm 2.3$  и  $58.5 \pm 15.1\%$  относительно соответствующих контролей (рис. 1). Значимость ЛПС в качестве рецептора фага L-413C подтверждена и результатами трансмиссионной электронной микроскопии микросфер, покрытых ЛПС-EV и БСА (контроль). Доли микросфер “ЛПС-EV” и “БСА”, не содержащих на своей поверхности фаговых частиц, составили 23.0 и 41.7% соответственно. Среднее количество частиц фага, приходящихся на одну микросферу, оказалось равным, в среднем, 13.7 (для “ЛПС-EV”) и 1.6 (для “БСА”). Способность сенсibilизированных микросфер адгезировать частицы фага L-413C иллюстрирует рис. 2, на котором представлены покрытые препаратами ЛПС-EV и БСА микросферы,

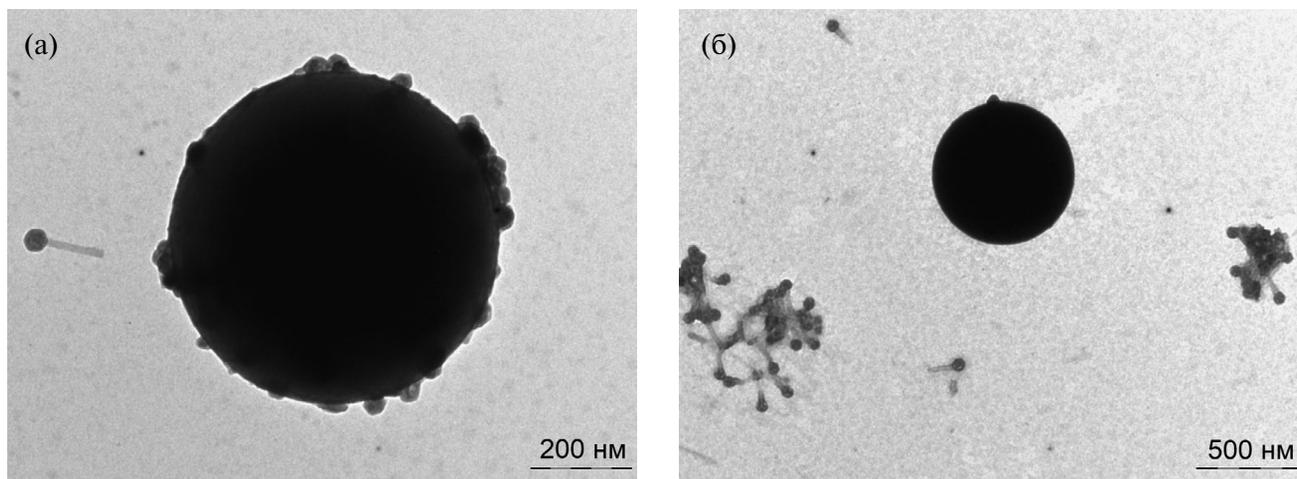
инкубированные в суспензии фага L-413C. Как видно из рис. 2, частицы фага находятся в свободном состоянии или адгезированы к поверхности микросферы.

Эти результаты согласуются с данными А. Филиппова с соавт. [20], которые, используя мутанты штамма *Y. pestis* CO92, показали, что рецептор фага L-413C ассоциирован с липополисахаридом, точнее, N-ацетилглюкозамином наружного кора.

Как было показано нами ранее, ЛПС-EV значим и в рецепции фага d’Herelle-m. Однако, если доля обоих фагов, не связавшихся с микросферами, сенсibilизированными этим антигеном, оказалась одинаковой и ярко выраженной:  $58.5 \pm 15.1\%$  для L-413C (рис. 1) и  $58.5 \pm 19.9\%$  для фага d’Herelle-m [19], то в растворе ЛПС-EV фаг d’Herelle-m практически не инактивировался (различие с контролем несущественно для  $p = 0.05$ ) [19], в отличие от фага L-413C (рис. 1). Очевидно, названные различия объясняются особенностями механизмов рецепции двух фагов, в том числе различиями в локализации и степени доступности для фагов рецепторных участков на молекуле ЛПС, имеющей различные конформационные свойства при том или ином использованном в работе методе оценки адгезивности фагов.

Неожиданными оказались результаты определения роли в рецепции фага L-413C антигена PsaA. Если микросферы, покрытые препаратами антигена PsaA-нат и PsaA-рек, не адсорбировали на себя частицы фага, то инкубация фага в растворе этого антигена оставляла литически активными  $60.9 \pm 8.5\%$  и  $58.8 \pm 7.6\%$  частиц соответственно (рис. 1).

В параллельно проводившихся сравнительных экспериментах оценивали способность



**Рис. 2.** Трансмиссионная электронная микроскопия. Микросферы “ЛПС-EV” (а) и “БСА” (б) после инкубации с суспензией фага L-413С.

этих же препаратов PsaA-нат и PsaA-рек, а также ЛПС-EV находящихся в растворе, инактивировать частицы фага d’Herelle-m. Результаты этих исследований подтвердили ранее полученные о слабо выраженной инактивации указанного фага препаратом PsaA-рек – в растворе оставалось  $75.7 \pm 26.8\%$  [22] и препаратом ЛПС-EV –  $83.3 \pm 14.2\%$  частиц фага, способных к лизису бактерий [19]. Вместе с тем, доля литически активных частиц фага d’Herelle-m после инкубации с микросферами, покрытыми ЛПС-EV составила  $58.5 \pm 19.9\%$  [19], то есть практически столько же, сколько при использовании фага L-413С (рис. 1).

Несмотря на то, что проведенные эксперименты включали использование одних и тех же препаратов антигена PsaA, результаты, полученные с использованием двух вышеназванных методов, оказались прямо противоположными в отношении двух препаратов антигена. Объяснением такому кажущемуся противоречию могли служить известные данные литературы о том, что результаты подобных исследований во многом зависят от неоднородности физико-химических свойств поверхности биомолекул, в частности, белков, что может приводить к разнородной ориентации молекул при их пассивной адсорбции на твердом субстрате. Кроме того, твердые поверхности могли иметь гетерогенный химический состав, что также объясняет вариативность взаимодействия белок – субстрат. Различия в условиях проведения адсорбции, например, наличие соли или ее концентрация, также могли резко менять картину ориентации молекул на субстрате и результаты их взаимодействия с целевым биообъектом, в данном случае бактериофагом [23, 24]. Молекулы антигена PsaA в растворе, очевидно, имели больше вариантов связывания с частицами фага по сравнению с иммобилизованным на

микросферах антигеном. Косвенно на это указывает сопоставление результатов взаимодействия с фагом и других антигенов *Y. pestis*, оценка которых была проведена двумя методами – во всех случаях средние значения доли литически активных частиц фага, остающихся в растворе, оказались несколько выше при использовании антигенов, адсорбированных на поверхности микросфер (рис. 1). Однако, резкая, практически полная инактивация фага зарегистрирована только для ЛПС и, в меньшей мере, для двух препаратов антигена PsaA, находящихся в растворе. Разница в результатах экспериментов с микросферами, покрытыми двумя этими антигенами, объясняется, по-видимому, тем, что при иммобилизации на полистироле происходит блокировка структур антигенов, способных связываться с фагом – от полной для PsaA до частичной для ЛПС.

Учитывая неоднозначные результаты оценки роли антигена PsaA в рецепции фага L-413С, полученные с помощью двух охарактеризованных выше методов, представлялось целесообразным провести подобные исследования с использованием штамма *Y. pestis* с нокаутом гена *psaA*. В этой работе были использованы исходный штамм *Y. pestis* EV, а также его изогенный вариант, дефектный по биосинтезу белка PsaA. Культуры этих бактерий выращивали в жидкой питательной среде LB с pH ~7.0 и pH ~6.0. Биосинтез антигена PsaA происходит при температуре 37°C и низких значениях pH. Для исключения вклада в рецепцию фага компонентов микробной клетки углеводной природы, во всяком случае ЛПС, каждую из четырех вариантов культур (EV и EVΔ*psaA*, выращенных при двух значениях pH) обрабатывали (и не обрабатывали) раствором NaIO<sub>4</sub> (100 мМ) в течение 2 ч с последующей отмывкой SM.

**Таблица 1.** Значимость антигена PsaA *Y. pestis* в рецепции фага L-413С, оцененная с помощью нокаута EVΔpsaA

Вариант <i>Y. pestis</i>	pH среды выращивания	Обработка NaJO <sub>4</sub>	*Количество фага в надосадочной жидкости, %, X <sub>mean</sub> ± 95% CI	Результаты ТИФА (ОП <sub>492</sub> ), X <sub>mean</sub> ± 95% CI
EV	6.0	–	33 ± 9	1.79 ± 0.52
		+	110 ± 14	1.35 ± 0.30
	7.0	–	42 ± 11	0.39 ± 0.08
		+	104 ± 13	0.30 ± 0.05
EVΔpsaA	6.0	–	16 ± 9	0.39 ± 0.08
		+	104 ± 11	0.31 ± 0.04
	7.0	–	32 ± 13	0.40 ± 0.13
		+	100 ± 22	0.38 ± 0.14

\* Доля литически активных частиц фага, не связавшихся с бактериальными клетками после их коинкубации; 95% CI – доверительный интервал для  $p = 0.95$ .

Представленные в табл. 1 результаты подтвердили иммунохимическую инертность нокаута EVΔpsaA в ТИФА с антисывороткой к PsaA антигену и способность клеток исходного варианта EV к продукции этого антигена в жидкой питательной среде при pH 6.0.

Как показали результаты высева по Грация надосадочных жидкостей после центрифугирования суспензий, содержащих бактериальные клетки и частицы бактериофага, PsaA-антиген в составе микробной клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV не способствовал адгезии фага L-413С, как это видно из табл. 1. Более того, при выращивании бактериальных культур в жидкой питательной среде при pH 6.0 доля фага, связавшегося с клетками исходного штамма EV, продуцирующего PsaA-антиген, оказалась существенно ниже ( $p < 0.05$ ) по сравнению с его изогенным вариантом EVΔpsaA, дефектным по биосинтезу антигена. Это могло быть связано с изменением поверхностной структуры клеток варианта-нокаута в процессе его получения, что могло привести к повышению доступности для фага ЛПС – основного, если не единственного, рецептора. Нельзя исключить также и того, что делеция *pgt* локуса хромосомной ДНК вирулентного штамма-прародителя штамма EV привела не только к прекращению биосинтеза ряда факторов патогенности чумного микроба [25], но и к конформационным изменениям поверхностных структур бактерии. По этой причине экспрессия в том числе PsaA-антигена на поверхности бактерий вакцинного штамма EV могла существенно отличаться от таковой вирулентных штаммов возбудителя и вследствие этого опосредовать изменения в проявлении биологических свойств, в частности, рецепции фага L-413С. Следует также отметить тенденцию к снижению адгезивности фага L-413С к клеткам обоих сравниваемых

вариантов *Y. pestis* при повышении значения pH с 6.0 до 7.0 (табл. 1), что могло объясняться экранированием ЛПС поверхностными белками, которые лучше экспрессируются при температуре культивирования 37°C и нейтральных значениях pH питательной среды, такими как F1, белки системы секреции III типа. Обработка культур вариантов EV и EVΔpsaA периодатом натрия приводила к полному прекращению адгезии фага к клеткам безотносительно к значению pH питательной среды. Последнее лишней раз подтверждало значимость ЛПС *Y. pestis* в качестве рецептора фага L-413С.

Учитывая способность антигена PsaA связываться с Fc-фрагментом IgG человека [26], апо-липпротеином В сыворотки крови человека [16], фосфатидилхолином эпителиальных альвеолярных клеток человека [27], галактозильными остатками гликофинголипидов эукариотических клеток нескольких типов [28], а также полученные в этой работе результаты, можно предположить, что молекула антигена включает поверхностные домены, опосредующие высокую неспецифическую адгезию к ряду абиотических (например, полистирол микросфер) и биотических субстратов различной химической природы. Последнее объясняет неспособность сенсibilизированных белком PsaA микросфер связывать частицы фага, которые так же достаточно хорошо взаимодействовали с указанными доменами антигена, о чем может свидетельствовать выраженная адгезивность фага L-413С к нативной форме антигена в растворе (рис. 1). По-видимому, этот реакционноспособный участок молекулы PsaA-антигена не экспрессируется на поверхности микробной клетки штамма EV, но участвует в связывании образующего пили белка PsaA с нижерасположенными мембранными структурами бактерии.

Оценивая экспериментальные данные относительно значимости поверхностных антигенов *Y. pestis* в адгезии к фагу L-413C, следует отметить существенные различия между этим фагом и другими чумными фагами, используемыми в диагностической и исследовательской практике. Несмотря на показанную способность ЛПС *Y. pestis* участвовать в рецепции большинства специфических фагов, относящихся к нескольким группам, отдельные участки молекулы ЛПС, вовлеченные в механизм их рецепции, не идентичны [11]. Для нескольких чумных фагов показано участие в адгезии и других поверхностных антигенов бактериальной клетки. Так, T7-подобный бактериофаг Yер-phi использует для адгезии, помимо ЛПС, белки Ail и OmpF [29, 30], бактериофаг Покровской – белки Ail и YарF [22], бактериофаг псевдотуберкулезный диагностический (или d'Herelle-m или YpsP-G) – порины OmpF и, возможно, OmpC *Y. pseudotuberculosis* [19]. Для двух последних упомянутых фагов антиген PsaA оказался незначим в качестве рецепторной структуры [22].

Учитывая разнообразие чумных фагов по их морфологии, антигенности и другим свойствам, есть основания считать возможным составление фагового “коктейля”, эффективного для лечения этого тяжелейшего заболевания, вызываемого различными штаммами возбудителя. Одним из компонентов такого “коктейля”, по-видимому, должен стать фаг L-413C. Его скорее всего нельзя отнести к числу высоковирулентных фагов, во всяком случае, в условиях *in vitro* [11], однако вследствие его высокой, возможно наибольшей среди чумных фагов, универсальности в выявлении всего разнообразия штаммов возбудителя чумы [13], вероятность включения фага L-413C в состав разрабатываемого “коктейля” достаточно высока.

Полученные результаты подтвердили значимость в рецепции фага L-413C липополисахарида *Y. pestis*. Если этот антиген, иммобилизованный на поверхности микросфер, показал приблизительно одинаковую способность связывать частицы фагов L-413C и d'Herelle-m, то в растворе ЛПС инактивирует фаг L-413C в значительно большей мере по сравнению с фагом d'Herelle-m (рис. 1) и [19]. Образующий пили белок PsaA в растворенном в воде виде оказался способным инактивировать литическую активность этого фага, но не проявлял этого свойства, будучи связанным с полистирольными микросферами или в составе микробной клетки вакцинного штамма EV. Вместе с тем, как было установлено ранее [22], PsaA не связывается с чумными фагами Покровской и d'Herelle-m ни в растворе, ни в связанном с микросферами виде. Показанная в работе способность белка PsaA инактивировать частицы фага L-413C в растворе наряду с известными данными об участии этого антигена

в адгезии иерсиний к эукариотическим клеткам нескольких типов, способности инициировать гемагглютинацию эритроцитов барана, опосредовать антифагоцитарную активность, ингибировать продукцию антител макроорганизмом, реакцию митогензависимой бласттрансформации и др. [31–33] свидетельствует о высокой и, по-видимому, неспецифической адгезивности антигена к биотическим структурам различного химического состава.

Таким образом, приведенные выше результаты еще раз подчеркнули разницу в механизмах адсорбции чумных фагов, определяемую особенностями их морфологии, химического состава, а также пространственной организацией рецепторных структур наружной мембраны возбудителя. Представленные экспериментальные результаты подтвердили ранее установленную значимость в рецепции фага L-413C липополисахарида *Y. pestis*. Иные, использованные в работе поверхностные антигены этого микроба (YарF, YарM, Ail, F1), не проявляли этого свойства. Способность взаимодействовать с фагом L-413C показана для препаратов антигена PsaA, нативного и рекомбинантного, находящегося в растворе. PsaA в составе бактериальной клетки или будучи иммобилизованным на поверхности полистирольной микросферы не способствовал их взаимодействию с частицами фага. Отмеченное противоречие объясняется, по-видимому, различиями в агрегатном состоянии антигена, определяющих конформационные особенности и доступность для взаимодействия с фагом реакционноспособных групп белка.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. “Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней”.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (No P05–28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216–2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными”.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galimand M., Courvalin P. Plague Treatment and Resistance to Antimicrobial agents. In: *Yersinia: Systems Biology and Control.* / Eds. E. Carniel and

- B.J. Hinnebusch. Norfolk: Caister Academic Press, 2012. P. 109–114.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00306-06>
2. Kiefer D., Dalantai G., Damdindorj T., Riehm J.M., Tomaso H., Zöller L. et al. // Vector Borne Zoonotic Diseases. 2012. V. 12. № 3. P. 183–188.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0748>
  3. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2018. V. 51. № 2. P. 249–254.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015>
  4. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S. et al. // Emerg. Infect. Dis. 2001. V. 7. № 1. P. 43–48.  
<https://doi.org/10.3201/eid0701.010106>
  5. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M.L., Rasko D.A. et al. // PLoS ONE. 2007. V. 2. № 3. e309.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000309>
  6. Sebbane F., Lemaître N. // Biomolecules. 2021. V.11. № 5. 724.  
<https://doi.org/10.3390/biom11050724>
  7. Vagima Y., Gur D., Aftalion M., Moses S., Levy Y., Makovitzki A. et al. // Viruses. 2022. V. 14. № 4. 688.  
<https://doi.org/10.3390/v14040688>
  8. Xiao L., Qi Z., Song K., Lv R., Chen R., Zhao H. et al. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2023. V. 13. 1174510.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1174510>
  9. d'Hérelle F. // Presse Med. 1925. V. 33. P. 1393–1394.
  10. Moses S., Vagima Y., Tidhar A., Aftalion M., Mamroud E., Rotem S. et al. // Viruses. 2021. V. 13. № 1.  
<https://doi.org/10.3390/v13010089>
  11. Filippov A.A., Sergueev K.V., Nikolich M.P. // Bacteriophage. 2012. V. 2. № 3. P. 186–189.  
<https://doi.org/10.4161/bact.22407>
  12. Garcia E., Chain P., Elliott J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O. et al. // Virology. 2008. V. 372. № 1. P. 85–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.032>
  13. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. // Pathogens. 2020. V. 9. № 8. 611.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens9080611>
  14. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Nikolich M.P. // Advances in Yersinia Research. New York: Springer, 2012. P. 123–134.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3561-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3561-7_16)
  15. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
  16. Makoveichuk E., Cherepanov P., Lundberg S., Forsberg A., Olivecrona G. // Journal of Lipid Research. 2003. V. 44. № 2. P. 320–330.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.M200182-JLR200>
  17. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
  18. Konyshv I.V., Ivanov S.A., Kopylov P.H., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Byvalov A.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 4. P. 394–400.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683822040081>
  19. Dudina L.G., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A., Konyshv I.V., Byvalov A.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 4. P. 426–433.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683821040049>
  20. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J. et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 9. e25486.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025486>
  21. Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C. // Proteomics Clin. Appl. 2016. V. 10. № 10. P. 949–963.  
<https://doi.org/10.1002/prca.201600012>
  22. Byvalov A.A., Dudina L.G., Ivanov S.A., Kopylov P.K., Svetoch T.E., Konyshv I.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2022. V. 174. № 2. P. 241–245.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-023-05681-w>
  23. Džupponová V., Žoldák G. // Biophysical Chemistry. 2021. V. 275. 106609.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106609>
  24. Cerofolini L., Fragai M., Luchinat C., Ravera E. // Biophysical Chemistry. 2020. V. 265. 106441.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106441>
  25. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // Clinical Microbiology Reviews. 2004. V. 17. № 2. P. 434–464.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.434-464.2004>
  26. Zav'yalov V.P., Abramov V.M., Cherepanov P.G., Spirina G.V., Chernovskaya T.V., Vasiliev A.M. et al. // FEMS Immunology & Medical Microbiology. 1996. V. 14. № 1. P. 53–57.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00267.x>
  27. Galvan E.M., Chen H., Schifferli D.M. // Infection and Immunity. 2007. V. 75. № 3. P. 1272–1279.  
<https://doi.org/10.1128/iai.01153-06>
  28. Payne D., Tatham D., Williamson E.D., Titball R.W. // Infection and Immunity. 1998. V. 66. № 9. P. 4545–4548.  
<https://doi.org/10.1128/iai.66.9.4545-4548.1998>
  29. Zhao X., Cui Y., Yan Y., Du Z., Tan Y., Yang H. et al. // Journal of Virology. 2013. V. 87. № 22. P. 12260–12269.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.01948-13>
  30. Xiao L., Qi Z., Song K., Lv R., Chen R., Zhao H. et al. // Front Cell Infect Microbiol. 2023. V. 13. 1174510.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1174510>
  31. Yang Y., Merriam J.J., Mueller J.P., Isberg R.R. // Infection and Immunity. 1996. V. 64. № 7. P. 2483–2489.  
<https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2483-2489.1996>
  32. Pakharukova N., Roy S., Tuittila M., Rahman M.M., Paavilainen S., Ingars A.K. et al. // Molecular Microbiology. 2016. V. 102. № 4. P. 593–610.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13481>
  33. Anisimov A.P. // Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya. 2002. № 3. P. 3–23.

## The Role of *Yersinia pestis* Antigens in Reception of the Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C

A. A. Byvalov<sup>a, b, \*</sup>, L. G. Dudina<sup>a, b</sup>, T. B. Kravchenko<sup>c</sup>, S. A. Ivanov<sup>c</sup>, I. V. Konyshev<sup>a, b</sup>,  
N. A. Morozova<sup>a</sup>, A. V. Chernyadiev<sup>a</sup>, S. V. Dentovskaya<sup>c, \*\*</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Educational Institute of Higher Education "Vyatka State University",  
Kirov, 610000 Russia

<sup>b</sup> Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Federal Research Center "Komi Scientific Center of the Ural  
Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktyvkar, 167982 Russia

<sup>c</sup> The Federal Budgetary Institution of Science "State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology",  
Obolensk, 142279 Russia

\*e-mail: byvalov@nextmail.ru

\*\*e-mail: info@obolensk.org

The role of surface antigens of *Yersinia pestis* in reception of the phage L-413C was experimentally evaluated. Based on the methods of the phage inactivation after its co-incubation with the soluble or bead-bounded antigens, an importance of LPS from the plague microbe in the phage reception and inability to bind a capsular antigen F1, Ail protein and two autotransporters YapF and YapM were confirmed. The native and recombinant PsaA, being solved, significantly inhibited the lytic activity of the phage in comparison with the bead-bound antigens. The knockout EV cells ( $\Delta psaA$ ) are able to bind the phage particles as well as the wild strain. The use of three methods to evaluate the role of PsaA antigen in phage L-413C reception gave contradictory results. On the one hand the reactive domains of PsaA are able to interact with phage particles in solution. At the same time, these domains appear to determine nonspecific binding of PsaA protein to the underlying bacterial cell structures and polystyrene microsphere, preventing phage adhesion.

**Keywords:** bacteriophage L-413C, antigen, *Yersinia pestis*, receptor

УДК 615.339;57.088.1

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЭНДОЛИЗИНА LysAm24-SMAP

© 2024 г. А. А. Климова<sup>1,2</sup>, И. В. Григорьев<sup>1</sup>, Д. В. Васина<sup>1</sup>,  
М. Н. Анурова<sup>2</sup>, В. А. Гуцин<sup>1,3</sup>, Н. П. Антонова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России,  
Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,  
Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: northernnatalia@gmail.com

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

В настоящее время модифицированные лизины бактериофагов широко исследуются в качестве активных субстанций противомикробных средств. В связи с этим становится актуальной разработка эффективных и точных методов измерения этих ферментов. Для детекции рекомбинантного модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP в биологических образцах разработан метод иммуноферментного анализа (ИФА). Были подобраны оптимальные параметры для определения белка, в частности, изучено влияние соли и состава буферной системы для подготовки образцов для анализа. Показана применимость системы для иммунодетекции генно-инженерного эндолизина LysAm24-SMAP в различных биологических образцах при содержании в них фермента начиная от 0.4 нг/мл. Также, оценено влияние матричных эффектов образцов гомогенатов органов и тканей животных, лизатов штамма-продуцента и их отдельных компонентов при проведении анализа и показано, что наличие 0.65 М NaCl в ИФА-буфере в случае LysAm24-SMAP критично для получения корректных результатов и снижает неспецифические взаимодействия. Была подтверждена эффективность использования разработанной системы в иммунохимическом контроле бактериолитического фермента.

**Ключевые слова:** рекомбинантные эндолизины, иммуноферментный анализ, бактериальные лизаты, фармакокинетические исследования

DOI: 10.31857/S0555109924040108 EDN: RZYKWW

Литические бактериофаги являются облигатными паразитами, вызывающими гибель инфицированных бактерий, что побудило исследовать их, а также ферменты их литического комплекса – лизины, в качестве средств терапии бактериальных инфекций, альтернативных классическим антибиотикам [1, 2]. Бактериофаги выделяют несколько типов лизинов, одними из которых являются выделяемые на терминальной стадии инвазии бактерий эндолизины, разрушающие клеточную стенку бактериальной клетки изнутри для высвобождения новых собранных вирусных частиц. Эти ферменты гидролизуют пептидные и/или гликозидные связи пептидогликана, что приводит к нарушению тургорного давления и гибели клетки.

В последние годы актуальность исследований и разработок в данной сфере возросла по причине

распространяющейся антибиотикорезистентности у бактерий [3, 4]. Сегодня ведутся активные исследования по использованию эндолизинов в борьбе с заболеваниями, вызванными грамположительными и грамотрицательными возбудителями, склонными к приобретению множественной лекарственной устойчивости, в том числе группы ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и другим представителям семейства *Enterobacteriaceae* [5, 6]. Применение лизинов в отношении грамотрицательных бактерий долгое время было затруднено из-за экранирующего действия наружной мембраны, однако в последнее десятилетие стало возможным, в том числе, благодаря созданию генноинженерных модифицированных молекул. Методы генной инженерии

и направленного конструирования молекул позволяют модифицировать нативные фаговые эндолизины, значительно увеличивая их бактерицидную активность, улучшая фармакокинетическую стабильность и физико-химические свойства [7], а рекомбинантная экспрессия таких белков позволяет получать их биотехнологическим путем.

Необходимость в точном количественном определении возникает практически на всех стадиях изучения лизинов. Например, при оптимизации экспрессии белка количественная оценка становится одним из основных критериев выбора оптимальных условий экспрессии. Также, при исследованиях фармакокинетических параметров лекарственных средств на основе лизинов необходимо проводить оценку содержания и распределения лизинов в органах, тканях и биологических жидкостях лабораторных животных. Очевидно, что такие исследования требуют разработки быстрого и высокоспецифичного метода скрининга, позволяющего отбирать высокоэффективные штаммы-продуценты белков, а также детектировать низкие концентрации фермента в биологических образцах.

Существует несколько способов специфического и неспецифического измерения количественного содержания молекул белковой природы: УФ-спектроскопия, колориметрия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, масс-спектрометрические методы анализа. Однако для сложных смесей, таких как биологические образцы, в которых присутствует множество различных белков, больше подходит иммунодетекция с помощью, например, иммуноферментного анализа (ИФА), который отличается высокой чувствительностью и специфичностью, низкими затратами времени, не требует сложного оборудования [8]. Точность данного вида анализа обеспечивается специфическим взаимодействием антиген-антитело, а высокая чувствительность позволяет измерять белки в нано- и пикограммовых концентрациях. Тем не менее, в случае эндолизинов важно учитывать факторы, которые могут влиять на результат ИФА: гомология с белками штаммов-продуцентов или с белками, которые присутствуют в гомогенатах органов животных, взаимодействие участков лизина с компонентами ИФА-буферов, поскольку данные ферменты часто содержат функциональные домены, способные связываться с полисахаридами, или склонны к электростатическим взаимодействиям. Кроме того, в случае биологических образцов, необходимо учитывать возможное взаимодействие аналита с содержащимися в образце ферментами, нуклеиновыми кислотами и другими биомолекулами (так называемый матричный эффект), приводящее как к протеолизу эндолизина, так и к его агрегации с компонентами матрикса, что, в свою очередь, может существенно исказить результаты измерений. Подбор оптимальных условий проведения анализа

и, в первую очередь состава буфера для разведения образцов, в значительной степени позволяет нейтрализовать негативное влияние матрикса на результаты измерения.

LysAm24-SMAP является генно-инженерным белком с молекулярной массой 27.0 кДа, ИЭТ 9.95, полученным при слиянии последовательности эндолизина LysAm24 [5] и SMAP-фрагмента. LysAm24 – это лизоцим-подобная N-ацетилмурамидаза бактериофага, поражающего бактерии рода *Acinetobacter*, содержащая на N-конце дополнительный домен связывания с клеточной стенкой, на C-конце – каталитический домен [5]. Каталитический домен относится к гликозид-гидролазам семейства 24 (GH24) и является распространенным среди литических бактериофагов. Ранее LysAm24 показал способность активно действовать на широкий спектр грамотрицательных бактерий в тестах *in vitro*, в дальнейшем его использование позволит создавать высокоэффективные противомикробные средства [5, 11]. SMAP-фрагмент – это миелоидный пептид барана, использующийся для повышения антибактериальной активности [9, 10]. Добавление SMAP-пептида повышает расчетный общий заряд белка до 19.8 при pH 7.5 и введение его в структуру молекулы позволяет эффективно пермеабиллизировать наружную мембрану бактерий. Разработка эффективного и точного инструмента для количественного измерения гибридной молекулы LysAm24-SMAP позволит делать выводы по результатам подбора условий экспрессии белка, а также в экспериментах по выявлению фармакокинетических и фармакодинамических свойств препарата.

Цель работы – создание и оценка применимости тест-системы ИФА для количественного определения содержания эндолизина в различных биологических образцах, таких как лизаты бактериальной биомассы штамма-продуцента *E. coli*, гомогенаты органов и тканей, а также в сыворотке крови подопытных животных на примере модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP, активного в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий.

## МЕТОДИКА

**Получение рекомбинантного эндолизина LysAm24-SMAP.** В экспериментах был использован эндолизин LysAm24-SMAP, полученный методом рекомбинантной экспрессии. Для этого исходная кодирующая последовательность LysAm24-SMAP, включающая последовательность мурамидазы LysAm24 (NCBI AN: APD20282.1), C-конец которой был дополнительно модифицирован фрагментом противомикробного пептида SMAP-29 (1–17, K2,7,13, RKLRLKRLKRIANKVKKY), была искусственно синтезирована в векторе pALTA-LysAm24-SMAP и интегрирована в экспрессионный вектор

pET-42b (+). Корректность сборки векторной конструкции проверяли методом секвенирования по Сэнгеру.

Далее, эндолизин получали аналогично протоколу, описанному в [12]. Полученные конструкции помещали в штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3) pLysS методом трансформации “heat-shock”, культивировали в жидкой питательной среде LB с добавлением селективных антибиотиков (хлорамфеникол и канамицин) при 37°C в шейкере-инкубаторе. Экспрессию белка индуцировали с помощью изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (“AppliChem”, Германия). Полученную биомассу осаждали центрифугированием, лизировали и проводили двухстадийную хроматографическую очистку с использованием катионообменного сорбента SP-sepharose (“GE Healthcare”, США) и гель-эксклюзионного сорбента Superdex 75pg, на хроматографической колонке XK 16–600 (“GE Healthcare”, США), элюируя белки фосфатно-солевым буфером (PBS tablets: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7.3–7.5, “VWR”, США). Конечную концентрацию раствора эндолизина определяли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 280 нм (Implen NanoPhotometer, “IMPLEN”, Германия) с учетом теоретического коэффициента поглощения, равного 0.852. Определение чистоты белка проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 16%-ном полиакриламидном геле.

**Получение специфических поликлональных антител.** Кроликов иммунизировали не менее 8 раз введением 140 мкг LysAm24-SMAP подкожно с промежутком в 14 дней. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда (“Sigma”, США), а все последующие – в неполном адьюванте Фрейнда. Через 5–7 сут после второй, четвертой и последующих четных иммунизаций у кроликов забирали 35–40 мл крови из ушной вены, после завершения процесса свертывания осаждали тромб, к полученной сыворотке добавляли азид натрия до конечной концентрации 0.1% и хранили при 4°C.

Очистку поликлональных антител (АТ) проводили с использованием иммуноаффинного сорбента на основе NHS-сефарозы (“GE Healthcare”, Германия). Для приготовления сорбента LysAm24-SMAP с помощью колонок для обессоливания PD-10 (“GE Healthcare”, Германия) АТ переводили в буфер для конъюгации (0.2 М NaHCO<sub>3</sub> (“Amresco”, США), 0.5 М NaCl, pH 8.3), раствор смешивали с равным объемом отмытого сорбента в соотношении 1 : 1 и инкубировали в ротационном шейкере в течение 16–18 ч при комнатной температуре. Свободные сайты связывания блокировали добавлением раствора Трис-НСl pH 8.0 до конечной концентрации 100 мМ согласно протоколу производителя NHS-сефарозы.

Для выделения АТ в сыворотки иммунных кроликов вносили NaCl до концентрации 0.5 М и наносили их на сорбент (LysAm24-SMAP-NHS-sepharose). Далее сорбент промывали раствором PBS с добавлением 0.5 М NaCl и элюировали ацетатным буфером pH 2.5–2.8 (0.1 М CH<sub>3</sub>COOH, 0.15 М NaCl). Сразу же после элюции добавляли Трис-НСl 1.0 М до pH 7.0–8.0. Содержащие АТ фракции элюата переводили в буфер для хранения (PBS с 0.1%-ным NaN<sub>3</sub>, “Amresco”, США) с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15 (“Millipore”, Германия) 30 кДа, одновременно доводя концентрацию АТ в образце до 1–2 мг/мл. Специфическую активность полученных антител определяли методом непрямого ИФА.

**Оценка активности полученных антител методом непрямого ИФА.** В лунках ИФА-планшеты (96-луночные ИФА-планшеты высокой сорбции ESP-96-D, “Servicebio”, Китай) сорбировали эндолизин, внося по 100 мкл раствора LysAm24-SMAP с концентрацией 1 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) pH 9.3–9.6. Сорбцию проводили в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день блокировали свободные сайты связывания, внося в лунки планшета по 100 мкл блокирующего раствора S002 (“Хема”, Россия) с добавлением сахарозы до 5% (“Диа-эм”, Россия) и сорбита до 0.5% (“Хема”, Россия). Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 4°C, удаляли жидкость из лунок, высушивали 24–48 ч при комнатной температуре, упаковывали в целфеновые пакеты и хранили до использования при 4°C.

Для постановки эксперимента в лунки вносили по 100 мкл исследуемых сывороток и очищенных антител в серийных разведениях 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 в ИФА-дiluэнте S011 (PBS pH 7.2–7.4, казеин, Твин-20, консервант на основе фенола, краситель, “Хема”, Россия). Инкубировали 1 ч при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 600 об./мин. Для удаления несвязавшихся антигенов, лунки отмывали PBS с 0.1%-ным Твин-20. После этого добавляли по 100 мкл раствора антител (конъюгат поликлональных антител козы к IgG кролика с пероксидазой хрена, “HyTest”, Россия) в разведении 1 : 25000, инкубировали 1 ч при температуре 37°C, 600 об./мин, затем проводили отмывку.

Для визуализации реакции в лунки вносили по 100 мкл субстратного буфера с тетраметилбензидином (R055, “Хема”, Россия) и инкубировали 10 мин. Останавливали реакцию с помощью раствора 10%-ного HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (Multiscan FC, “Thermo Scientific”, США).

**Измерение LysAm24-SMAP методом сэндвич-ИФА.** Для измерения содержания эндолизина в образцах бактериальных лизатов, в присутствии ДНК и пептидогликана, в образцах биологических

жидкостей, органов и тканей животных, предварительно проводили конъюгацию очищенных антител к LysAm24-SMAP с пероксидазой хрена аналогично методике, описанной в [13] со следующими модификациями. Для остановки реакции пероксидазы с периодатом натрия наносили смесь на колонку для гель-фильтрации PD-10 и переводили в боратный буфер (0.05 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , "Helicon", Россия), pH 8.6). При конъюгации антител с пероксидазой хрена для стабилизации образовавшегося основания Шиффа вместо натрия цианоборогидрида добавляли натрия борогидрид ("Merk", Германия). В полученный конъюгат добавляли глицерин до конечной концентрации 55% (об./об.) и хранили при  $-30^\circ\text{C}$ .

Для анализа на ИФА-планшеты сорбировали аффинно-очищенные кроличьи антитела к LysAm24-SMAP, в концентрации 1 мкг/мл в КББ. Сорбцию проводили в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ . Далее блокировали свободные сайты связывания, внося в лунки планшета по 100 мкл блокирующего раствора S002 ("Хема", Россия) с добавлением сахаразы до 5% и сорбитола до 0.5%. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$ , удаляли жидкость из лунок, высушивали 24–48 ч при комнатной температуре, упаковывали и хранили до использования при  $4^\circ\text{C}$ .

Для постановки эксперимента раствор эндолизина известной концентрации и исследуемые образцы разводили в ИФА-дилюэнте S011 либо в 50 мМ Трис-буфере pH 7.5 с 1.0% бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma-Aldrich, США), 500 мМ NaCl и 0.1% Твин-20 и вносили в лунки по 100 мкл. Инкубировали 1 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  с перемешиванием со скоростью 600 об./мин. Лунки трижды отмывали, внося в них по 300 мкл отмывочного буфера (PBS с 0.1%-ным Твин-20). После этого добавляли по 100 мкл раствора аффинно очищенных кроличьих антител к LysAm24-SMAP, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 5000. Инкубировали 1 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  при 600 об./мин, далее лунки промывали пять раз. Визуализацию проводили, как описано выше.

Для эндолизинов LysAp22-SMAP и LysECD7-SMAP методика проведения анализа была аналогичной.

**Измерение LysECD7-SMAP, CFP-10 методом сэндвич-ИФА.** Для того, чтобы сравнить влияние добавления соли к буферу для разведения образцов S011 проводили сэндвич-ИФА для белков LysECD7-SMAP и CFP-10. Очистку АТ, сорбцию и блокировку данных АТ проводили аналогично методике на тест-систему для LysAm24-SMAP. Для CFP-10 использовали моноклональные АТ мыши к CFP-10 (сорбционные АТ) и конъюгат мышинных моноклональных АТ к CFP-10 с ПХ ("HyTest", Россия). Для постановки эксперимента растворы LysECD7-SMAP, CFP-10 с известной

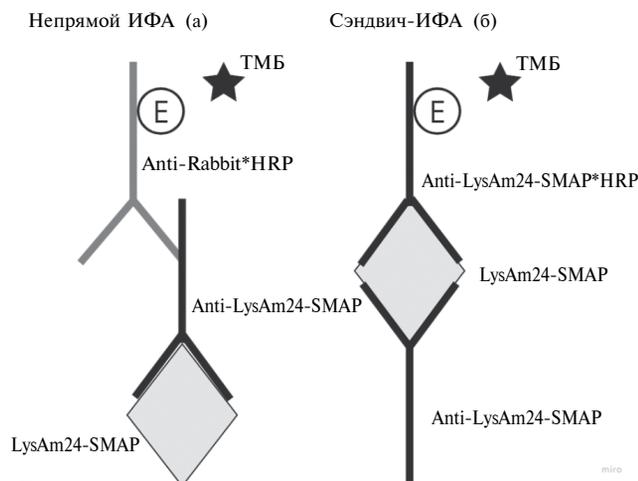
концентрацией и исследуемые образцы разводили в ИФА-дилюэнте S011 и в S011 с добавлением NaCl до 0.25, 0.5, 1 М. Далее проводили анализ аналогично методике сэндвич-ИФА, описанной выше.

**Пробоподготовка образцов бактериальных лизатов.** Для измерения концентрации эндолизина в отрицательном лизате, не содержащем эндолизина, использовали штамм *E. coli* BL21(DE3) pLysS ("Евроген", Россия).

Бактериальные лизаты получали по стандартному протоколу разрушения культуры для дальнейшей очистки белка [11]. Для этого, выращенную в течение ночи при температуре  $37^\circ\text{C}$ , 250 об./мин в жидкой среде LB с добавлением антибиотика (хлорамфеникол) культуру *E. coli* разбавляли свежей средой в соотношении 1 : 100 и продолжили выращивание при  $37^\circ\text{C}$  при 250 об./мин еще 8 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием (15 мин, 3000 g), а затем разрушали клетки с помощью ультразвука в буфере для лизиса: 20 мМ Трис-HCl pH 8.0, 250 мМ NaCl, 0.1 мМ динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты ("Helicon", Россия). Полученный лизат снова центрифугировали (30 мин, 10000 g) и сохраняли супернатант.

**Выделение ДНК и пептидогликана.** ДНК и пептидогликан выделяли из культуры бактериального штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50–16, депонированного в коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Для этого штамм выращивали в среде LB в течение 16–18 ч, биомассу осаждали центрифугированием (6000 g, 10 мин). Для выделения ДНК из культуры использовали СТАВ метод [14]. Пептидогликан выделяли по методике, описанной в работе [15]. Концентрацию ДНК измеряли при помощи набора Qubit DNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit 3.0 ("Thermo Fisher Scientific Eugene", США), пептидогликана – на спектрофотометре Implen NanoPhotometer ("Implen", Германия) по калибровочной кривой  $\text{OD}_{206}$ , которая была построена на основе концентраций пептидогликана *Micrococcus luteus* ("Sigma", США).

**Получение гомогенатов органов и тканей животных.** Все манипуляции проводили на льду. Образцы органов и тканей мышей, хранящиеся в низкотемпературном холодильнике при температуре  $-80^\circ\text{C}$ , размораживали при  $4^\circ\text{C}$  минимально необходимое для оттаивания образцов время. Далее к исследуемым образцам добавляли буфер для гомогенизации (PBS, 1.0 М NaCl, 1.0 мМ ЭДТА-Na) в соотношении 1 : 4 (на 100 мг органа – 400 мкл буфера), добавляли фенолметилсульфонил фторид ("Диаэм", Россия) до конечной концентрации 1 мМ. В каждую пробирку вносили по 1 стальному шарикю 5 мм и гомогенизировали образцы 4 минуты с частотой 50 Гц на TissueLyser LT ("QiaGen", Германия). Сразу же после гомогенизации образцы замораживали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .



**Рис. 1.** Тест-системы, используемые в работе: непрямой ИФА (а); сэндвич-ИФА (б). LysAm24-SMAP – антиген, Anti-LysAm24-SMAP – поликлональные антитела, выделенные из сыворотки иммунизированных животных, Anti-Rabbit\*HRP – антивидовой конъюгат антител к IgG кролика с пероксидазой хрена (Е), ТМБ – субстрата для визуализации реакции. Для визуализации схем ИФА была использована бесплатная версия сайта <https://miro.com/gu/>.

Непосредственно перед постановкой образцы размораживали на льду, перемешивали и осветляли центрифугированием со скоростью 16000 g при 4°C в течение 10 мин. Измерение проводили в осветленном супернатанте.

**Заключение биоэтической комиссии.** Протоколы получения антител и образцов с использованием животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заключение ЛЭК № 64 от 10 октября 2023г).

**Статистический анализ и визуализация данных.** Данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 9.5.0. Использовали 2 технические и по 2 или 5 биологических повторностей в ИФА. На графиках приведены определенные значения  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическая значимость изменений величины оптической плотности рассчитана с использованием дисперсионного анализа (значимыми считались  $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе разработки лекарственных ферментных препаратов возникает ряд задач, связанных с их детекцией. При этом, метод ИФА является одним из наиболее доступных и удобных в применении. В настоящее время в литературе опубликовано небольшое количество научных работ по иммунохимическому определению эндолизин и других литических ферментов. Для эндолизина SAL200, обладающего антистафилококковым действиям,

в исследовании фармакокинетики на обезьянах использовали иммуноферментный анализ для количественного определения молекулы в сыворотке крови [16]. Также известен метод сэндвич-ИФА количественного анализа в сыворотке крови крыс лизостафина – бактериоцина стафилококка, также являющегося пептидогликан-деградирующим ферментом [17]. Тем не менее, работы, описывающие разработку подобных тест-систем на данный момент в литературе, отсутствуют.

Для LysAm24-SMAP отсутствуют способы специфического количественного определения с высокой чувствительностью, в связи с этим в настоящей работе была разработана тест-система для оценки количественного содержания целевого белка в различных матриксах и исследованы ее основные параметры: чувствительность, специфичность, динамический диапазон и точность измерения.

После иммунизации кроликов модифицированным эндолизин LysAm24-SMAP, были получены гипериммунные сыворотки, проанализированные методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (рис. 1а). Полученные результаты свидетельствовали о наличии специфических АТ в сыворотках иммунизированных животных (сигнал в разведении 1 : 100000 превышал 1 ед. ОП) и были пригодны для их выделения и конъюгации с пероксидазой хрена.

Очищенные специфические к LysAm24-SMAP АТ использовали для создания тест-системы по принципу “сэндвич”-ИФА (рис. 1б) как в качестве АТ, сорбируемых на подложку, так и для получения детектирующего конъюгата с пероксидазой хрена. Выбор метода обусловлен тем, что применение двухстадийного сэндвич-ИФА является оптимальным для детекции антигенов, размер которых позволяет одновременное связывание с двумя антителами к различным фрагментам молекулы. Также использование на первом этапе специфического захвата антигена сорбированными на подложку антителами позволяет проводить измерение в сложных белковых матриксах, поскольку удаление несвязавшихся компонентов матрикса в ходе отмывки позволяло значительно снизить их влияние на результат реакции, а также избежать так называемого “хук-эффекта” [18]. Это делает использование двухстадийного ИФА для измерения широких диапазонов аналитов в сложных матриксах более предпочтительным в сравнении с одностадийным сэндвич-ИФА.

**Исследование диапазона и специфичности тест-системы для количественного измерения LysAm24-SMAP.** С целью определения рабочих диапазонов тест-системы для исследования образцов, содержащих эндолизин, растворов LysAm24-SMAP с известными концентрациями от 1.25 нг/мл до 100 нг/мл измеряли методом “сэндвич-ИФА”. Также в ходе экспериментов оценивали перекрестную

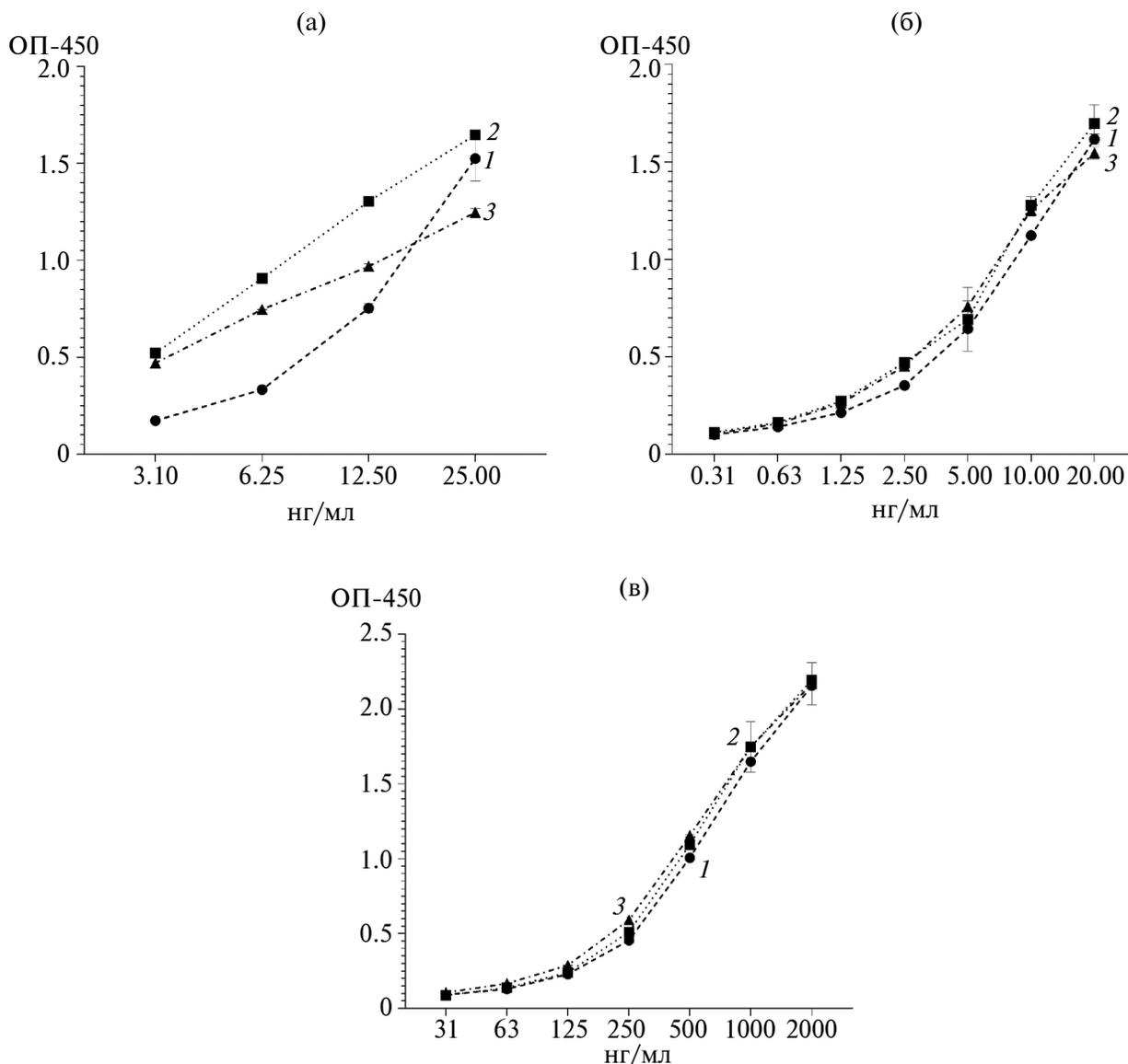


Рис. 2. Стандартные кривые измерения LysAm24-SMAP (а), LysECD7-SMAP (б) и CFP-10 (в) при различных концентрациях соли в стандартном ИФА-буфере: 1 – буфер S011, 2 – S011 + 0.25 M NaCl, 3 – S011 + 1.0 M NaCl.

реактивность полученных антител. Мурамидазы – распространенный класс ферментов, часто встречающийся у бактериофагов и бактерий [19, 20]. При этом, они обладают значительной гомологией каталитических и функциональных доменов. Более того, лизоцим-подобные белки распространены и в эукариотических организмах, например, встречаются у рыб [21], мышей, коров [22]. У человека такие белки присутствуют в крови, почках, кишечнике, эпителии [23]. Все это может сказываться на результатах количественной оценки и приводить к получению ложноположительных результатов.

Для оценки специфичности антител, полученных к LysAm24-SMAP, были использованы два других модифицированных эндолизина – LysAp22-SMAP и LysECD7-SMAP. Эти ферменты также

получены из геномов бактериофагов семейства *Myoviridae*, поражают грамтрицательные бактерии и дополнительно модифицированы SMAP-пептидом. При этом, LysAp22-SMAP содержит каталитический домен лизоцим-подобной N-ацетилмурамидазы, близкий LysAm24, в то время как LysECD7-SMAP – обладает эндопептидазной активностью [5].

Экспрессия и очистка трех перечисленных эндолизинов проводились в аналогичных условиях, следовательно, примесные белки у этих эндолизинов близки по составу. Оценка специфичности тест-системы с использованием таких модифицированных эндолизинов позволила проверить, выработалось ли к примесным белкам или к идентичному SMAP-фрагменту в препарате достаточное

количество антител, чтобы дать сигнал, мешающий интерпретации результатов.

Анализ показал, что в рабочем диапазоне тест-системы (3–50 нг/мл) перекрестная активность с образцами других эндолизинов не наблюдалась, значения оптической плотности для гетерологичных антигенов не превышали фоновые 0.1 опт. ед., что говорит о высокой специфичности полученных антител. Полученные данные позволяют предположить, что АТ вырабатываются на эпитопы в последовательности эндолизина LysAm24, в то время как SMAP-пептид не является иммунодоминантным эпитопом. При этом, вклад отдельных компонентов гибридной молекулы в ее иммуногенность и их способность обеспечить формирование сэндвич-комплексов представляет интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, при изучении полученных поликлональных антител показано, что они антиген-специфичны и не обладали кросс-реактивностью к гомологичным белкам.

**Влияние содержания соли в буфере для разведения на измерение LysAm24-SMAP.** Исследуемый эндолизин содержит положительно заряженные участки в своей структуре, через которые может электростатически взаимодействовать с компонентами матрикса образца. В связи с этим, было изучено влияние различных концентраций NaCl при внесении в буфер для разведения (S011).

Показано, что добавление NaCl в ИФА-буфер при измерении LysAm24-SMAP приводило к значительному повышению сигнала в ИФА для низких концентраций калибровки (3.13 и 6.25 нг/мл) (рис. 2а). При этом, наблюдалась зависимость увеличения сигнала от концентрации эндолизина: добавление даже небольших концентраций NaCl (0.25 М) к буферу S011 приводило к усилению сигнала для низких (3.13–6.25 нг/мл) концентраций эндолизина, но при этом практически не влияло на высокие (12.5–25.0 нг/мл) концентрации. Кроме того, этот эффект не коррелировал с концентрацией вносимой в буферный раствор соли, и значение ОП при 1.0 М соли были ниже, чем при 0.25 М.

В большинстве случаев, повышение ионной силы приводит к ослаблению неспецифических и низко аффинных специфических взаимодействий АГ-АТ, что, в свою очередь, приводит к снижению сигнала в ИФА [24]. В данной ситуации наблюдался обратный эффект. Чтобы оценить, насколько универсален эффект усиления сигнала при внесении соли в других тест-системах, построенных по принципу “сэндвич-ИФА”, этот эффект исследовали для двух других белков – эндолизина LysECD7-SMAP (рис. 2б), с использованием поликлональных аффинно-выделенных АТ, для измерения белка *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 с помощью коммерческих мышинных моноклональных антител (рис. 2в).

В обоих тест-системах добавление 0.25 или 1.0 М NaCl соли не влияло на сигнал в ИФА во всём диапазоне измеряемых концентраций специфического АГ (рис. 2б, 2в). Следовательно, можно сделать вывод о том, что эффект повышения сигнала при увеличении концентрации NaCl было характерно для LysAm24-SMAP.

**Влияние состава буфера для разведения на измерение LysAm24-SMAP.** Чтобы оценить, зависит ли наблюдаемый эффект усиления сигнала от используемой буферной системы, помимо стандартного коммерческого ИФА-буфера (S011), ранее успешно использованного при разработке тест-систем на антитела к белку нуклеокапсида SARS-CoV-2 [25] и антитела к вирусу осповакцины [26], также был использован буфер известного состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7.5 с добавлением 1% БСА, 0.1% Твин-20 и 0.15 М NaCl (TBS). Для оценки влияния соли в буфер-основу дополнительно вносили NaCl в концентрации 0.5 М (итоговая концентрация NaCl – 0.65 М).

Без дополнительного внесения соли (0.5 М NaCl), разведение образцов в буфере TBS давало повышение измеряемого сигнала, относительно разведения в S011 (рис. 3а). При этом эффект был более выражен в диапазоне концентраций фермента 0.4–12.5 нг/мл, где сигнал увеличивался в 4.5–2.3 раза. При концентрациях 25.0–50.0 нг/мл отношение измеренных оптических плотностей TBS/S011 составляло лишь 1.4–1.1 раз. При добавлении 0.5 М NaCl сигнал также был выше при использовании TBS, по сравнению с коммерческим ИФА-буфером (рис. 3б), однако, зависимость от концентрации эндолизина не сохранялась и превышение ОП TBS/S011 составляло 1.2–1.4 раза во всем диапазоне измеренных концентраций.

Одним из объяснений может служить способность эндолизина способен взаимодействовать с компонентом ИФА-дилюента, присутствующим в низкой концентрации, и делающим эндолизин недоступным для связывания с АТ, приводя к занижению сигнала при низких концентрациях белка. В частности, можно предположить, что таким компонентом может быть полисахарид, так как LysAm24-SMAP содержит в своей структуре домен связывания с пептидогликаном (pfam01471) [27] и потенциально способен взаимодействовать с соединениями гликозидной природы. Также в качестве ингибиторов можно рассматривать остаточные нуклеиновые кислоты, которые могут взаимодействовать с эндолизином через ионные связи. Введение соли в состав буфера частично разрушало эту связь, “высвобождая” эндолизин из комплекса и приводя к повышению сигнала.

В результате, разработанный метод детекции с использованием TBS с добавлением 0.5 М NaCl, позволяет определять LysAm24-SMAP в образцах в диапазоне концентраций от 0.4–25.0 нг/мл.

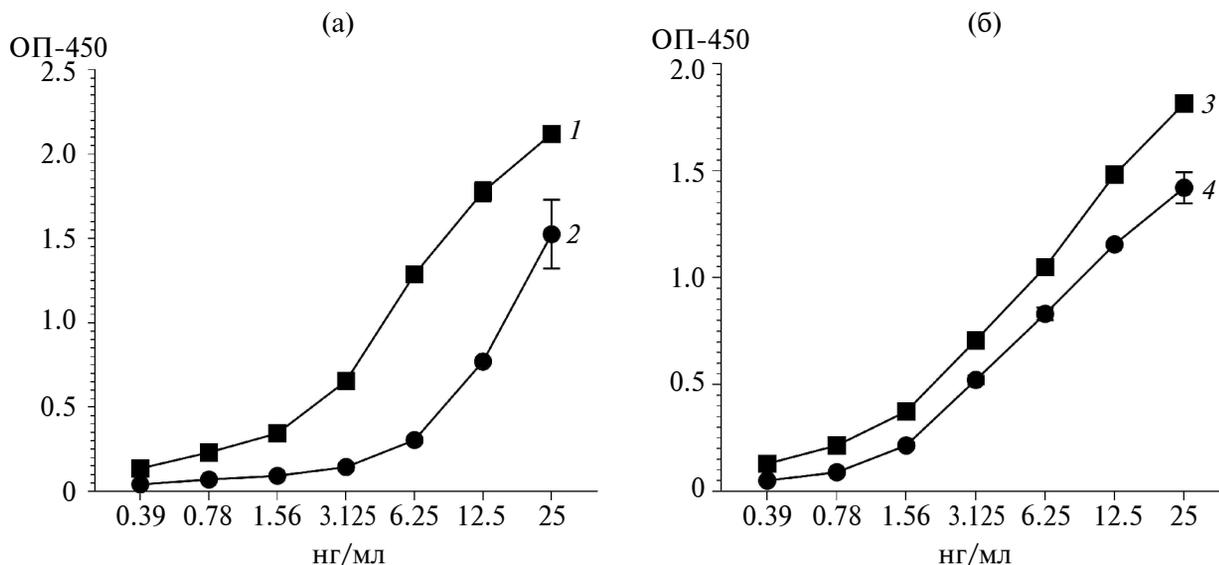


Рис. 3. Стандартные кривые измерения раствора LysAm24-SMAP при разведении образцов в буферах без добавления NaCl (а) и с добавлением 0.5 М NaCl (б): 1 – TBS, 2 – S011, 3 – TBS + 0.5 М NaCl, 4 – S011 + 0.5 М NaCl.

**Измерение LysAm24-SMAP в бактериальных лизатах.** Для исследования применимости метода ИФА для количественной оценки эндолизина при его наработке и оптимизации продукции в рекомбинантной системе экспрессии, оценивали точность детекции внесенного фермента в лизат бактериальной клеточной массы. Для этого, проводили постановку эксперимента с образцами лизатов трех независимо полученных образцов биомассы лабораторного экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3) pLysS, используемого для получения LysAm24-SMAP.

При внесении 2 нг/мл в лизаты биомассы *E. coli* и использовании S011, превышение сигнала относительно калибровки составляло 500%. Стоит отметить, что неспецифическое связывание компонентов лизата непосредственно с антителами на подложке и в составе конъюгата отсутствовало, поскольку в образцах без внесения LysAm24-SMAP измеряемая ОП сохранялась на уровне фона ИФА-буфера. При измерении эндолизина в TBS и в буферных растворах с добавлением 0.5 М NaCl, завышение измеряемой концентрации в бактериальных лизатах снижалось до 300–200% (рис. 4). При измерении концентрации эндолизина в образцах лизатов *E. coli* ОП отрицательных образцов без внесения эндолизина также не превышали фоновые, следовательно, перекрестной активности с белками продуцента не наблюдалось.

Одной из гипотез, объясняющих данный эффект, является взаимодействие эндолизина с компонентами матрикса, в результате связывания белка с полисахаридами, за счет домена, описанного выше. В частности, подобные результаты могут быть обусловлены нековалентной агрегацией LysAm24-SMAP с полимерными компонентами

матрикса. Данный процесс, предположительно, приводит к формированию комплекса Антиген-Антитело (АГ-АТ), в котором на одну молекулу антитела, сорбированного на подложку, приходилось избыточное количество антигена, связывающегося с конъюгатом. Это обуславливалось тем, что при агрегации становились доступными необходимые для этого эпитопы. Таким образом, в настоящий момент данная тест-система пригодна для качественного, но не количественного анализа эндолизина в бактериальных лизатах и требует дальнейшей оптимизации.

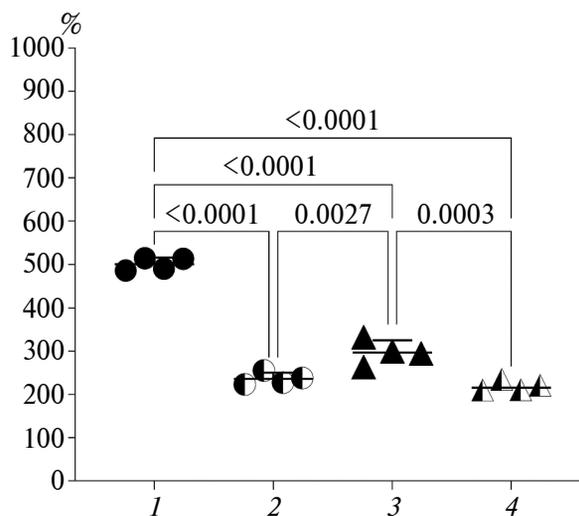


Рис. 4. Влияние состава буфера для разведения на измеряемые концентрации LysAm24-SMAP, внесенные в лизаты бактериальной биомассы (% измеренной концентрации от внесенной): 1 – S011, 2 – S011 + 0.5 М NaCl, 3 – TBS, 4 – TBS + 0.5 М NaCl.

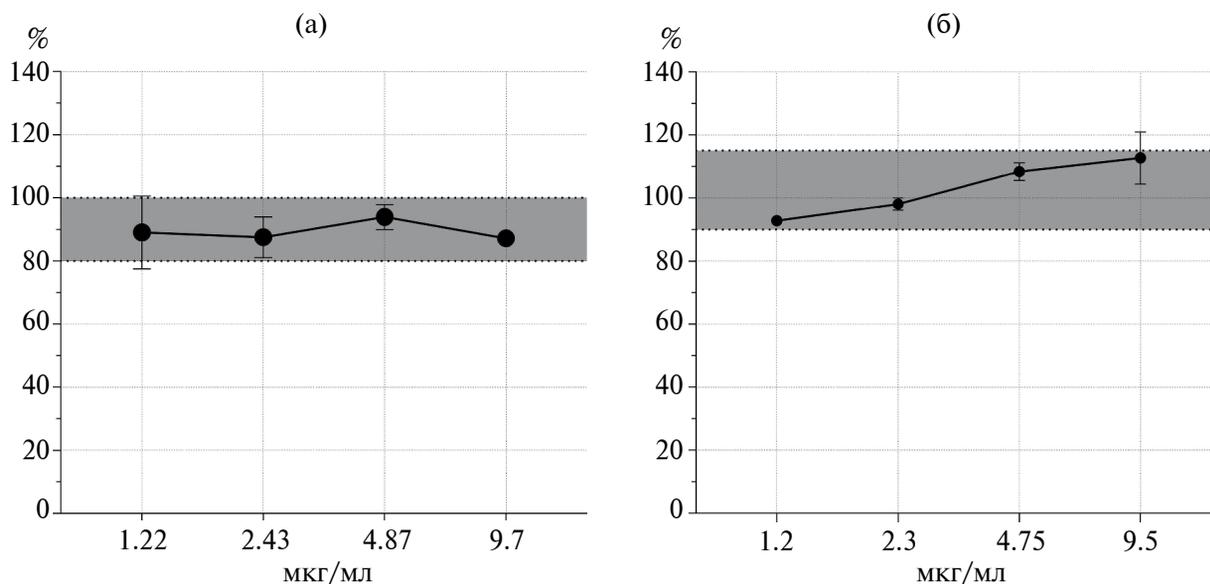


Рис. 5. Влияние компонентов матрикса на измерение концентраций эндолизина (% измеренной концентрации от внесенной): ДНК (а) и пептидогликана (б).

**Влияние компонентов матрикса на результаты ИФА-анализа.** К компонентам лизированных клеток бактерий, которые могут вносить свой вклад в измерение белка, можно отнести такие биополимеры как пептидогликан (ПГ) и ДНК, в больших количествах выходящих во внеклеточную среду при разрушении бактериальных клеток и потенциально способных связываться с LysAm24-SMAP. Так, ДНК (и другие нуклеиновые кислоты) за счет своего заряда могут электростатически взаимодействовать с эндолизином и затруднять его определение. Аналогично пептидогликан, высвобождающийся при лизисе бактериальных клеток, в силу особенностей доменной организации LysAm24, может необратимо взаимодействовать с ферментом, препятствуя его корректной детекции.

Были получены препараты тотальной ДНК и ПГ клеточной стенки *A. baumannii*. Перед измерением, в раствор эндолизина концентрации 3.1 нг/мл, внесли ДНК и ПГ в концентрациях 1.22–9.75 мкг/мл и 1.19–9.50 мкг/мл соответственно.

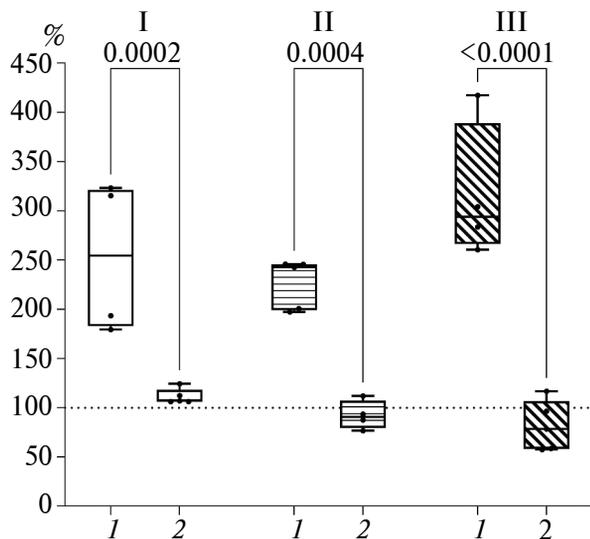
Было показано, что добавление ДНК к раствору эндолизина давало меньшие и нелинейные колебания отношений концентраций: от 80 до 97% (рис. 5а), что вписывалось в допустимые пределы погрешностей данного метода анализа [28, 29]. Внесение пептидогликана оказывало незначительное влияние на измерение эндолизина (рис. 5б). Отношения концентраций внесенного и измеренного фермента линейно изменялись от 93 до 120%. При этом сохранялась линейная зависимость отношения измеренной концентрации к внесенной от концентрации компонентов матрикса. Таким образом, исследованные молекулы, по всей видимости, не были значимой причиной завышения

получаемых результатов и не должны вносить значимых искажений при измерении эндолизина в лизатах, тем не менее, в дальнейшем требуется исследование другие компоненты, присутствующих в больших количествах в матриксе, в том числе, различные типы полисахаридов.

**Измерение LysAm24-SMAP в сыворотке крови и органах животных.** В ходе разработки лекарственных препаратов одним из определяющих этапов является исследование фармакокинетических свойств на животных, подразумевающее изучение распределения вещества в органах, тканях и биологических жидкостях. Для препаратов белковой природы, к которым относится LysAm24-SMAP, ИФА остается одним из наиболее доступных и удобных методов количественного анализа. Однако, в данном случае особенности биологических образцов, например, наличие эндогенных протеаз и других интерферирующих веществ белковой природы, а также значение pH, могут сказаться на результатах эксперимента. В ходе работы была проведена оценка возможности применения разработанного метода на образцах, полученных от животных.

Для оценки матричных эффектов биологических образцов животного происхождения, у мышей были отобраны и гомогенизированы образцы печени, легких, а также сыворотки крови. После гомогенизации в образцы вносили эндолизин до концентрации 200 нг/мл с дальнейшим использованием для разведения TBS и TBS с добавлением соли 500 мМ (рис. 6).

В результате, как и в случаях бактериальных лизатов, при использовании TBS без дополнительного введения соли, наблюдалось завышение измеряемой концентрации, по сравнению с внесенной.



**Рис. 6.** Влияние состава буфера на измерение концентрации эндолизина (% измеренной концентрации от внесенной) в: I – гомогенатах печени, II – легких, III – в сыворотке крови. 1 – TBS, 2 – TBS + 0.5 М NaCl. Результаты представлены диаграммами размаха: линии – медианы; ящики – интерквартильный диапазон; усы – мин-макс.

Так, в сыворотке крови увеличение составляло от 259 до 441%, для органов (печени и легких) – 180–330%. При добавлении 0.5 М соли до итоговой концентрации 0.65 М NaCl в буфере и в гомогенатах органов, и в сыворотке крови – значения измеряемой концентрации приближались к концентрации внесенного препарата: 101–120% для гомогенатов печени, 55–112% для сыворотки крови, от 70–110% для гомогенатов легких.

Таким образом, и в случае гомогенатов использование TBS с 0.5 М NaCl в качестве буфера для разведения образцов позволяло получить результаты, приближенные к ожидаемым. Необходимо отметить, что значения варьируют от органа к органу. Гомогенаты печени и легких давали наиболее сравнимые с внесённым содержанием эндолизина концентрации. Занижение значений в сыворотке, предположительно, связано с действием протеаз, содержащихся в ней, поскольку, в этом случае при пробоподготовке не использовали ингибиторы протеаз.

Таким образом, в ходе работы была разработана ИФА тест-система и проведена оценка ее применимости для качественной иммунодетекции генно-инженерного эндолизина LysAm24-SMAP в различных биологических образцах при содержании в них фермента от 0.4 нг/мл. При этом, добавление 0.5 М соли оказалось критичным для получения корректных результатов при измерении в образцах органов и тканей животных.

Полученные результаты показали, что в случае литических ферментов бактериофагов матричные эффекты, так же, как и состав буфера могут

значительно сказываться на результатах измерений и необходим их тщательный подбор в каждом конкретном случае. Разработанная тест-система, в дальнейшем, будет использована при исследовании биологических и фармакокинетических свойств модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-01068, <https://rscf.ru/project/23-74-01068/>.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** Протоколы получения антител и образцов с использованием животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заключение ЛЭК № 64 от 10 октября 2023 г.).

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerstmans H., Rodríguez-Rubio L., Lavigne R., Briers Y. // *Biochem. Soc. Trans.* 2016. V. 44. P. 123–128. <https://doi.org/10.1042/BST20150192>
2. Love M.J., Bhandari D., Dobson R.C.J., Billington C. // *Antibiotics (Basel)*. 2018. V. 7. № 1. 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010017>
3. Huemer M., Shambat S.M., Brugger S.D., Zinkernagel A.S. // *EMBO Rep.* 2020. e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
4. Baquero F. // *Int. Microbiol.* 2021. V. 24. P. 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y>
5. Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M., Usachev E.V., Makarov V.V., Gintsburg A.L. et al. // *Viruses*. 2019. V. 11. № 3. <https://doi.org/10.3390/v11030284>
6. Gutiérrez D., Briers Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021. V. 68. P. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.014>
7. Fursov M.V., Abdrakhmanova R.O., Antonova N.P., Vasina D.V., Kolchanova A.D., Bashkina O.A. et al. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 545. <https://doi.org/10.3390/v12050545>
8. Tabatabaei M.S., Ahmed M. // *Methods Mol. Biol.* 2022. 2508. P. 115–134. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10)
9. Antonova N.P., Vasina D.V., Rubalsky E.O., Fursov M.V., Savinova A.S., Grigoriev I.V. et al. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. P. 440. <https://doi.org/10.3390/biom10030440>
10. Dawson R.M., Liu C.Q. // *Drug Dev. Res.* 2009. V. 70. P. 481–498.
11. Vasina D.V., Antonova N.P., Grigoriev I.V., Yakimakha V.S., Lendel A.M., Nikiforova M.A. et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748718>

12. *Arshinov I.R., Antonova N.P., Grigoriev I.V., Pochtovyi A.A., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. V. 58. Suppl. 1. <https://doi.org/10.1134/S0003683822100027>*
13. *Alves N.J. // Antib Ther. 2019. V. 2 P. 33–39. <https://doi.org/10.1093/abt/tbz002>*
14. *Minas K., McEwan N.R., Newbold C.J., Scott K.P. // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 325. P. 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x>*
15. *Li G., Howard S.P. // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1615. P. 143–149.*
16. *Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J., Youm S.Y., Han H.-Y., Lee J.-H. et al. // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016. V. 43. P. 1013–1016. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12613>*
17. *Grishin A.V., Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V. et al. // Molecules. 2019. V. 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24101879>*
18. *Ross G.M.S., Filippini D., Nielsen M.W.F., Salentijn G.I. // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 15587–15595. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03740>*
19. *Adhya S., Merril C. R., Biswas B. // Cold Spring Harb. Perspect Med. 2014. V. 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012518>*
20. *Höltje J.-V. // Arch. Microbiol. 1995. V. 164. P. 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF02529958>*
21. *Chen T., Rao, Y., Li J., Ren C., Tang D., Lin T. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21020501>*
22. *Callewaert L., Michiels C.W. // J. Biosci. 2010. V. 35. P. 127–160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>*
23. *Liu R., Meng Q., Dai Y., Zhang Y. // Chinese journal of biotechnology. V. 39. P. 4482–4496. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.230241>*
24. *Xu H., Lu J.R., Williams D.E. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 1907–1914. <https://doi.org/10.1021/jp0538161>*
25. *Generalova L.V., Grigoriev I.V., Vasina D.V., Tkachuk A.P., Kruzhkova I.S., Kolobukhina L.V. et al. // Bulletin of RSMU. 2022. V. 1. P. 14–21. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.005>*
26. *Gushchin V.A., Ogarkova D.A., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Grigoriev I.V., Pochtovyi A.A. et al. // Front Immunol. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1023164>*
27. *Antonova N., Vasina D., Lendel A., Usachev E., Makarov V., Gintsburg A. et al. // Viruses. 2019. V. 11. <https://doi.org/10.3390/v11030284>*
28. *Stiller J., Jasensky A.-K., Hennies M., Einspanier R., Kohn B. // J. Vet. Diagn. Invest. 2016. V. 3. P. 235–243. <https://doi.org/10.1177/1040638716634397>*
29. *Biswas S., Saha M.K. // Immunochemistry & Immunopathology. 2015. V. 1. <https://doi.org/10.4172/icoa.1000109>*

## Development of a Method for Detection and Quantitative Analysis of Engineered Endolysin LysAm24-SMAP in Biological Samples

A. A. Klimova<sup>a, b</sup>, I. V. Grigoriev<sup>a</sup>, D. V. Vasina<sup>a</sup>, M. N. Anurova<sup>b</sup>,  
V. A. Gushchin<sup>a, c</sup>, N. P. Antonova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

<sup>b</sup>*Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia*

<sup>c</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: northernnatalia@gmail.com*

In recent years modified bacteriophage lysins are widely investigated for the purposes of antibacterial therapy development. Thus, effective and precise methods for the quantitative analysis of these enzymes are of high demand. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method has been developed for the detection of recombinant modified endolysin LysAm24-SMAP in biological samples. The optimal parameters for protein detection were determined, particularly, the influence of salt and the composition of the buffer system for samples preparation was studied. The applicability of the immunodetection system of the genetically engineered endolysin LysAm24-SMAP in various biological samples with enzyme concentrations from 0.4 ng/ml was demonstrated. Also, the influence of matrix effects in animals' organs and tissues homogenates samples, producer strain lysates and their individual components during the analysis was assessed and it was shown that 0.65 M NaCl addition in the ELISA buffer is crucial for achieving correct results and reduces non-specific interactions in the case of LysAm24-SMAP. The effectiveness of the developed system in the immunochemical control of the bacteriolytic enzyme was confirmed.

**Keywords:** recombinant endolysins, ELISA, bacterial lysates, pharmacokinetic studies

УДК 632.95:543.645:57.083.3

## ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРБИЦИДА БУТАХЛОРА: ВЫБОР РЕЖИМОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ

© 2024 г. А. Н. Берлина<sup>1</sup>, Н. И. Смирнова<sup>1</sup>, Н. С. Комова<sup>1</sup>, К. В. Серебренникова<sup>1</sup>,  
А. В. Жердев<sup>1</sup>, Б. Б. Дзантиев<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Изучено влияние органических растворителей метанола и ацетонитрила на результаты иммуноопределения бутахлора в пробах риса и продуктов на его основе. Рассмотрены схемы иммуноферментного анализа с использованием: нативной антисыворотки, содержащей специфические антитела к бутахлору, антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена, и биотинилированных специфических антител и стрептавидина, меченного пероксидазой. Для двух схем установлены близкие значения IC<sub>50</sub> (0.77 и 0.68 нг/мл соответственно) и рабочего диапазона (2.6–165 и 2.4–192 нг/мл соответственно) при проведении анализа в смеси фосфатного буфера и метанола 85%: 15%. Для второй схемы показано обнаружение бутахлора в пробах риса и пищевых продуктов на его основе на уровне 80–132% от вводимого количества аналита. Проведенное сравнение способов пробоподготовки позволило рекомендовать экстрагирование бутахлора гексаном с переработкой сухого остатка в буфере с 15% метанола, либо получение метанольного экстракта с последующим разведением буферным раствором в 6 раз.

**Ключевые слова:** пестициды, иммуноанализ, рис, иммуноферментный анализ, водно-органические смеси, экстракция

DOI: 10.31857/S0555109924040118 EDN: RZUMFS

Широкое применение агрохимикатов за последние годы привело к загрязнению биосферы токсичными соединениями [1]. К наиболее распространенным загрязнителям окружающей среды относят пестициды [2, 3]. Бутахлор, или N-(бутоксиметил)-2-хлор-N-(2,6-диэтилфенил) ацетамид представляет собой хлорацетамидный гербицид избирательного действия, используемый для борьбы с однолетними сорняками при выращивании риса, кукурузы и пшеницы [4]. Использование бутахлора в технологиях производства сельскохозяйственных культур приводит к накоплению химиката в окружающей среде, что отрицательно сказывается на продовольственной безопасности. Установлено, что бутахлор проявляет канцерогенные свойства и индуцирует апоптоз клеток млекопитающих [5]. Детекция бутахлора играет важную роль в контроле безопасности окружающей среды и оценке рисков для здоровья человека.

В настоящее время при рутинном определении гербицидов преимущественно используются физико-химические методы на основе

газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [6, 7]. Несмотря на высокую специфичность и чувствительность данных методов (предел обнаружения бутахлора достигает 5 нг/л), их реализация сопряжена с использованием дорогостоящего оборудования, большим расходом органических растворителей, необходимостью профессиональной подготовки персонала и продолжительной процедуры с последовательным тестированием проб [8]. Иммунохимические системы вытесняют традиционные виды определения гербицидов благодаря быстрым и простым методическим решениям, а применение антител в качестве распознающего элемента определяет их высокую специфичность и чувствительность. Иммуноопределение хлорацетамидных гербицидов, в частности бутахлора, в различных матрицах описано в работах [9–14]. Однако преобладают разработки систем для определения структурно близких соединений – алахлора и метолахлора, реализованных в различных форматах иммуноанализа в сочетании с колориметрической [15–17]

или флуоресцентной [11] детекцией сигнала. Иммуноаналитические системы для определения бутахлора представлены несколькими разработками и включают ферментный [13], поляризационно-флуоресцентный [12], а также мембранный иммуноанализ [18]. Среди перечисленных методов иммуноферментный анализ (ИФА) заслуживает особого внимания благодаря разделению стадий взаимодействий и возможности одновременно скринингового контроля большого количества проб. Применение ИФА для определения бутахлора в сложных по составу продуктах питания и ограничения, которые при этом возникают, ранее не изучались. Особенность иммуноанализа многих пестицидов с низкой растворимостью в водно-солевых средах и высокой в органических растворителях заключается в необходимости выбора таких условий, в которых полнота экстрагирования аналита из проб сочетается с возможностью его иммунохимического определения без инактивации антител.

Цель настоящей работы – оценка влияния органических растворителей на результаты иммуноферментного определения бутахлора в рисе (наиболее распространенной культуры, обрабатываемой этим гербицидом) и пищевых продуктах на его основе.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** Для проведения работы использовали бутахлор фирмы “Clearsynth” (Индия), ацетохлор, диметахлор и пропахлор фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Исходные растворы бутахлора (2 мг/мл) готовили в ацетонитриле и метаноле и хранили при 4°C. Для получения конъюгата гаптен–белок применяли овальбумин (ОВА), N,N'-дициклогексилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид и 3-меркаптопропионовую кислоту (МПА) фирмы “Sigma-Aldrich” (США). В работе использовали биотин и стрептавидин, а также меченный пероксидазой хрена стрептавидин фирмы “ИМТЕК” (Россия).

Для проведения ИФА использовали следующие реагенты: конъюгат бутахлор-3-меркаптопропионовая кислота – ОВА (БМПА-ОВА), антивидовые (иммуноглобулины козы, связывающие иммуноглобулины кролика) антитела, меченные пероксидазой хрена (“ИМТЕК”, Россия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, “НВО Иммунотех”, Россия), Твин-20 (“Sigma-Aldrich”, США), а также 96-луночные прозрачные микропланшеты Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи и органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli Q (сопротивление 18

МОм·см), полученной с помощью системы очистки воды Simplicity (“Millipore”, США).

**Оборудование.** Спектры поглощения и оптические плотности измеряли в лунках микропланшетов с помощью многофункционального планшетного анализатора EnSpire Multimode Plate Reader (“PerkinElmer”, США).

**Получение конъюгата бутахлора с белком-носителем.** Гаптен состава бутахлор-3-меркаптопропионовая кислота (БМПА) синтезировали по описанной ранее методике [13].

Полученный БМПА ковалентно связывали с ОВА карбодиимидным методом с получением конъюгата БМПА-ОВА. Смесь, состоящую из 3 мг (0.0075 ммоль) гаптена, 4.7 мг (0.045 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 9.4 мг (0.045 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимид в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) инкубировали в течение ночи при перемешивании и комнатной температуре. На следующий день смесь центрифугировали и к супернатанту по каплям добавляли 13.2 мг ОВА (молярное соотношение гаптен: белок составило 25 : 1) в 1 мл 0.15 М натрий-бикарбонатного буфера, pH 9.5. Далее реакционную смесь оставляли на 12 ч при 4°C, после чего полученный конъюгат очищали диализом против 50 мМ фосфатного буфера (ФБС), pH 7.4, в течение 48 ч при 4°C. Концентрацию препарата БМПА-ОВА рассчитывали, исходя из спектров поглощения компонентов. Аликвоты белкового конъюгата (5 мг/мл в ФБС) лиофилизовали и хранили при –20°C.

**Выделение иммуноглобулинов G (IgG) из антисыворотки и их биотинилирование.** К 1 мл антисыворотки [13] добавляли 270 мг сульфата аммония и перемешивали в течение 30 мин. Далее проводили осаждение центрифугированием при 9500 g в течение 10 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Осадок растворяли в 1 мл ФБС и диализовали против 2 л ФБС в течение суток.

Для биотинилирования к 1 мл выделенных иммуноглобулинов (10 мг/мл) добавляли N-гидроксисукцинимид эфира биотина в 20-кратном молярном избытке. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при перемешивании и диализовали против 10 мМ ФБС в течение суток. Концентрацию белка определяли по оптической плотности при 280 нм.

**Иммуноферментный анализ бутахлора с использованием нативной антисыворотки и биотинилированных антител.** Конъюгат БМПА-ОВА, растворенный в 50 мМ ФБС, вносили в лунки микропланшета в концентрации 1.0 мкг/мл (по 50 мкл) для стандартного ИФА и в концентрации 2.0 мкг/мл (по 100 мкл) для усиленного ИФА, инкубируя в течение 2 ч при 37°C. Затем микропланшет три раза промывали ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ). На первой стадии стандартного и усиленного ИФА варьировали разведение антисыворотки/

биотинилированных антител, специфичных к бутахлору. Различные разведения антисыворотки/биотинилированных антител добавляли для взаимодействия с адсорбированным конъюгатом БМПА-ОВА и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем после отмывки добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение коммерческого препарата 1 : 3000), или меченный пероксидазой стрептавидин (разведение коммерческого препарата 1 : 5000) и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывки (три раза ФБСТ и один раз дистиллированной водой) определяли активность ферментной метки, связавшейся в лунках микропланшета, добавляя по 100 мкл раствора субстрата (коммерческий раствор ТМБ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0.1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность измеряли при 450 нм и строили график зависимости оптической плотности (ОП) от разведения антисыворотки/биотинилированных антител с использованием программного обеспечения Origin 9.0 ("OriginLab", США). Разведение антисыворотки/биотинилированных антител, соответствующее ОП<sub>450</sub> = 1.0, выбирали для проведения конкурентного ИФА.

При проведении конкурентного ИФА бутахлора после иммобилизации конъюгата БМПА-ОВА и промывки микропланшета, описанных выше, в лунки вносили по 50 мкл раствора бутахлора (концентрации в диапазоне 10000–0.06 и 0 нг/мл) и антисыворотки (разведение в ФБСТ 1 : 100000), либо биотинилированных антител (разведение в ФБСТ 1 : 6000). Затем микропланшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Заключительные стадии ИФА также совпадали с описанной выше методикой.

Для оценки влияния органических растворителей на результаты ИФА проводили анализ с использованием буферных растворов, содержащих от 5 до 50% по объему органических растворителей (метанол или ацетонитрил).

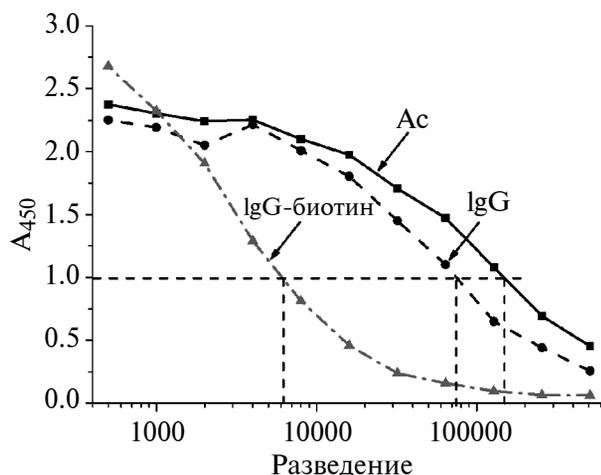
**Подготовка проб.** В качестве проб для анализа использовались красный рис (круглозерный, не перемолотый), рис басмати (не пропаренный), рис басмати (пропаренный, длиннозерный), рисовая мука (цельнозерновая), флайчипсы (кукурузно-рисовые), хлебцы рисовые с кунжутом. Для приготовления экстрактов взвешивали 1 г измельченного продукта, вносили 80 мкл бутахлора (2 мг/мл в метаноле), добавляли 5 мл 50 мМ ФБС и интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли 2 мл гексана и проводили экстракцию при перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. После экстракции пробы центрифугировали 15 мин при 6000 g, отбирали гексановый слой и выпаривали супернатант под тягой в течение ночи. Для метанольной экстракции к 1 г пробы добавляли 2 мл метанола, оставляли смесь на 2 ч при перемешивании, а затем центрифугировали при 4°C и 4000 g в течение 15 мин и отбирали супернатант.

**Обработка результатов иммуноферментного анализа.** Параметры получаемых кривых зависимости аналитического сигнала (y) от концентрации аналита (x) определяли на основании четырехпараметрической сигмоидной аппроксимации:  $y = (A1 - A2)/(1 + (x/x_0)^p) + A2$ , проводившейся с использованием программного обеспечения Origin 9.0. Далее вычислялись величины IC<sub>10</sub>, IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>80</sub> – концентрации бутахлора, ингибирующие аналитический сигнал на 10, 20, 50 и 80% от максимального ингибирования, соответственно. Принимая во внимание точность измерений, IC<sub>10</sub> рассматривали как предел обнаружения, IC<sub>20</sub>–IC<sub>80</sub> – как диапазон концентраций, определяемых методом ИФА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Принцип анализа и подготовка реагентов для ИФА.** Исследование было направлено на то, чтобы сравнить две схемы анализа по пределам обнаружения и оценить влияние органических растворителей на результаты определения бутахлора при использовании этих схем. В первой схеме конкурентный ИФА проводили с использованием нативной антисыворотки. Антисыворотка содержит специфические антитела в естественной среде, которая защищает их от денатурации при хранении. Сорбированный в лунках микропланшета конъюгат гаптен–белок конкурировал со свободным аналитом (бутахлором) за центры связывания антител. Если аналит отсутствовал в пробе, антитела связывались с иммобилизованным гаптеном и далее взаимодействовали с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой, обеспечивавшей при окислении субстрата формирование аналитического колориметрического сигнала оптической плотности, регистрировавшейся при 450 нм. Присутствие аналита в пробе снижало связывание антител с иммобилизованным гаптеном, приводя к уменьшению аналитического сигнала.

Во второй схеме использовались антитела, которые были выделены из антисыворотки и затем биотинилированы. Иммуные комплексы, формирувавшиеся аналогично первой схеме, обнаруживались благодаря взаимодействию биотина с меченым пероксидазой стрептавидином. Применение высокоаффинного взаимодействия стрептавидин–биотин зачастую помогает снизить предел обнаружения аналита. В то же время часть специфических антител при выделении из антисыворотки и последующих манипуляциях может денатурировать. Это особенно важно при работе с органическими растворителями, используемыми для экстракции гидрофобных соединений, поэтому исследование предусматривало сравнение двух форматов ИФА, проводившихся в присутствии метанола либо ацетонитрила.

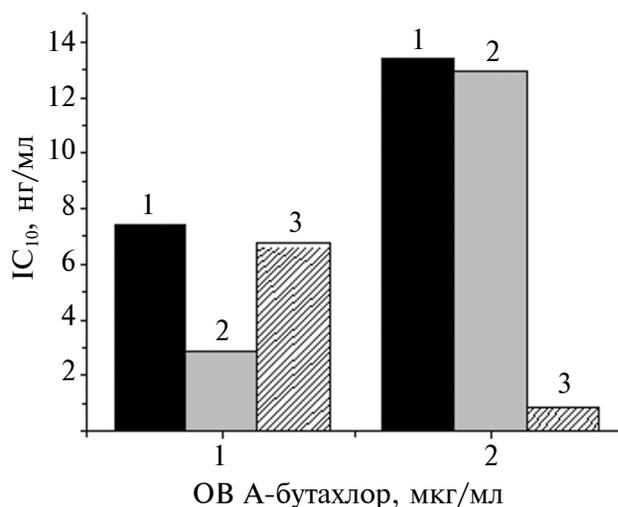


**Рис. 1.** Зависимости регистрируемой в ИФА ОП<sub>450</sub> нм при от разведений препаратов антисыворотки (Ac), выделенных IgG и конъюгата IgG–биотин. Горизонтальная пунктирная линия соответствует ОП 1.0, выбранной для проведения конкурентного ИФА, вертикальные показывают разведения препаратов, обеспечивающие достижение этой ОП.

Антисыворотка против бутахлора была получена ранее в лаборатории [13]. Антисыворотку, выделенные антитела и биотинилированные антитела титровали в лунках микропланшета с иммобилизованным конъюгатом БМПА-ОВА. На рис. 1 приведены кривые титрования антисыворотки, выделенных из нее иммуноглобулинов класса G (IgG) и биотинилированных IgG. Для проведения конкурентного анализа выбраны разведения 1 : 150000 антисыворотки и 1 : 6000 препарата IgG–биотин. Также по расположению кривых видно, что антиген-связывающая способность IgG снизилась после модификации биотином. Исходная концентрация препарата биотинилированных антител составила 10 мг/мл, а выбранная для проведения конкурентного анализа концентрация – 1.7 мкг/мл. Для сравнения; концентрация выделенных IgG, выбранная для конкурентного анализа, составила 0.45 мкг/мл.

Используемая в работе антисыворотка кролика была проверена на селективность определения бутахлора. С этой целью проводились замены бутахлора на ацетохлор, диметахлор, пропахлор в качестве конкурента. С двумя последними хлорацетамидами не наблюдалось перекрестных взаимодействий (IC<sub>50</sub> составлял более 10000 нг/мл), а ацетохлор продемонстрировал незначительную перекрестную реактивность, которая составила 0.6%. Таким образом, антисыворотка, а соответственно и антитела, высокоспецифичны по отношению к бутахлору.

**Характеристика конкурентных кривых для двух форматов ИФА бутахлора.** С использованием выбранных для ИФА концентраций



**Рис. 2.** Значения параметра IC<sub>10</sub>, достигаемого в ИФА при различных сочетаниях иммунореагентов. 1 – Ac – 1 : 150000; 2 – IgG – 1 : 80000; 3 – IgG–биотин – 1 : 6000.

иммунореагентов получены зависимости оптической плотности при 450 нм от концентрации бутахлора в буферном растворе. В табл. 1 приведены аналитические характеристики систем. Наименьшее значение IC<sub>10</sub> достигалось при использовании биотинилированных антител и составляло 0.9 нг/мл, что в 8 раз меньше по сравнению с использованием нативной антисыворотки: IC<sub>10</sub> = 7.4 нг/мл. Как видно, применение высокоаффинной пары биотин–стрептавидин действительно позволило снизить предел обнаружения ИФА. При использовании препарата IgG–биотин наблюдалось некоторое расширение диапазона определяемых концентраций – до 43–512 нг/мл. Описанные отличия не имеют универсального характера и не сохраняются при концентрациях реагентов, отличающихся от выбранных оптимальных. Об этом свидетельствует, в частности, сравнение IC<sub>10</sub> при двух концентрациях конъюгата ОВА–бутахлор, иммобилизованного в лунках микропланшета – 1 и 2 мкг/мл (см. рис. 2).

**Изучение влияния органических растворителей на ИФА бутахлора.** Иммуноопределение антигенов с выраженными гидрофобными свойствами – микотоксинов, органических красителей, многих пестицидов и других соединений требует использования органического растворителя как для экстракции аналита из проб, так и для поддержания его в растворимом состоянии при взаимодействии с антителами. Однако при высоких концентрациях органических веществ происходила инактивация антител, а значительные разведения органических экстрактов вызывали потери в чувствительности обнаружения исходного содержания аналита в пробе. При работе с гидрофобными

**Таблица 1.** Аналитические параметры конкурентного ИФА бутахлора с использованием антисыворотки, выделенных IgG и конъюгата IgG–биотин

Препарат	IC <sub>10</sub> , нг/мл	IC <sub>20</sub> , нг/мл	IC <sub>80</sub> , нг/мл	IC <sub>50</sub> , нг/мл
Антисыворотка	7.4	15.1	171.7	50.9
IgG	2.8	8.1	298.9	49.1
IgG-биотин	0.9	3.6	513.4	43.2

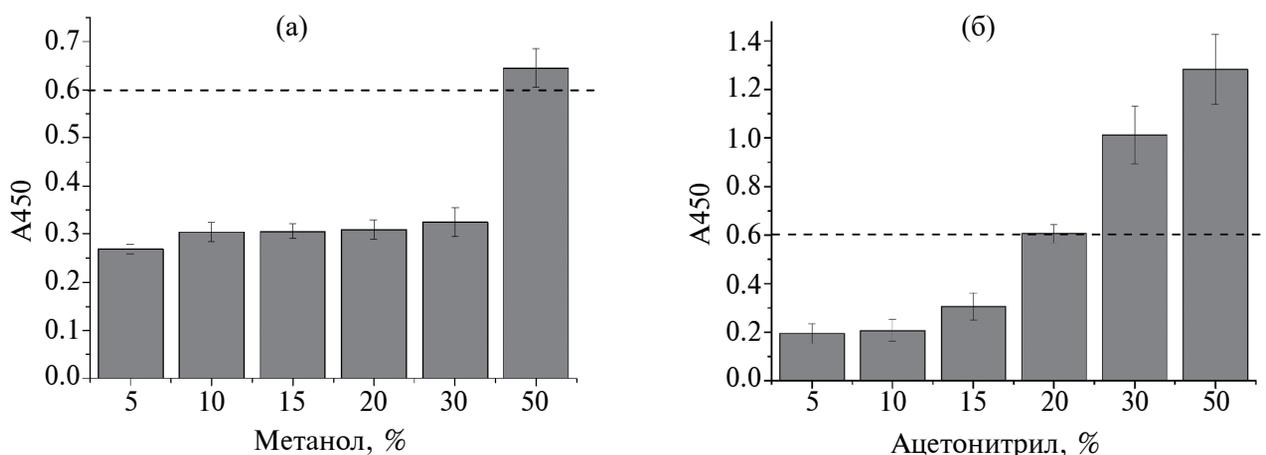
соединениями такими, как бутахлор, необходимо понимать уровень толерантности иммунореагентов и допустимое содержание растворителя как при экстракции, так и на стадии иммунодетекции.

С учетом вышеизложенного рассматривались два варианта пробоподготовки. Первый вариант состоял в экстракции бутахлора гексаном с выпариванием органического слоя и перерастворением в буферном растворе, содержащем метанол либо ацетонитрил. Второй вариант – экстракция в метаноле и разбавление экстракта перед проведением ИФА.

Была изучена зависимость связывания в ИФА при варьировании от 5 до 50% добавляемого к ФБСТ метанола либо ацетонитрила. Для этой цели использовали концентрацию бутахлора 100 нг/мл, находящуюся внутри рабочего диапазона ИФА, а метанол либо ацетонитрил добавляли на стадии конкуренции. Падение оптического сигнала ниже 0.6 считали критичным, существенно ухудшающим точность количественных измерений содержания аналита. Полученные результаты (рис. 3) отражают большее влияние ацетонитрила на степень связывания и формирование меченых иммунных комплексов в ИФА. Однако и тот, и другой компонент не рекомендуется использовать в концентрациях более 30%, что подтверждают и предшествующие работы по иммунодетекции гидрофобных соединений [19–21].

Концентрация 15% была выбрана в качестве рабочей; дальнейшие эксперименты “добавлено-выявлено” проводились в этих условиях. Стоит отметить, что по сравнению с ранее описанным ИФА структурно близкого соединения претилахлора [17] в данной работе достигнуто в 3 раза большее содержание метанола, что повышает чувствительность определения из расчета на содержание аналита в исходных пробах.

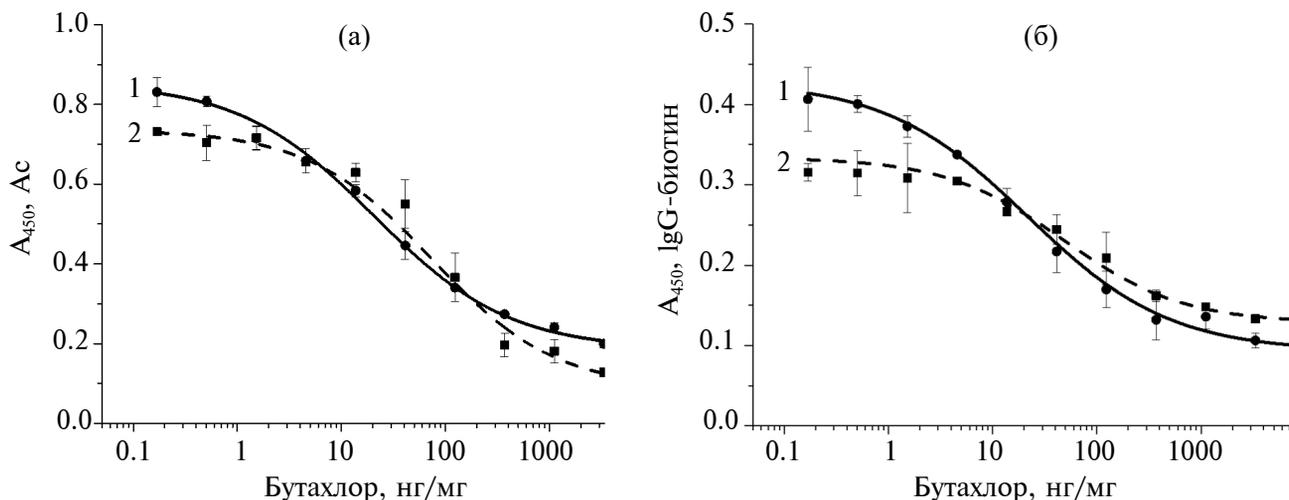
**Получение градуировочных зависимостей ИФА.** С учетом выбранных концентраций метанола и ацетонитрила были получены градуировочные зависимости регистрируемой в ИФА оптической плотности при 450 нм от концентрации бутахлора. Данные графики приведены на рис. 4. Значение IC<sub>10</sub> для градуировочной зависимости в буфере с 15% метанола и применением сочетания антисыворотки и меченых антивидовых антител составило 0.77 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций – от 2.6 до 165 нг/мл. Аналогичная схема с применением ацетонитрила позволила получить IC<sub>10</sub> 3.7 нг/мл, а рабочий диапазон составил 11.2–496.1 нг/мл. Видно, что введение ацетонитрила изменило параметры, ранее полученные для ИФА в буфере, но незначительно. В случае использования конъюгатов IgG–биотин и стрептавидин–пероксидаза влияние органических растворителей более выражено. Так, при добавлении 15% метанола IC<sub>10</sub> составило 0.68 нг/мл, а рабочий



**Рис. 3.** Гистограммы зависимости ОП при проведении ИФА от концентрации растворителя: метанола (а), ацетонитрила (n = 2, б). Горизонтальная пунктирная линия соответствует ОП 0.6 при 450 нм.

Таблица 2. Результаты тестирования пробы, контаминированных бутахлором, для разных форматов ИФА и вариантов пробоподготовки ( $n = 2$ )

Растворитель для пробы/иммунореагенты	Бутахлор в пробе											
	рис красный, непропаренный		рис белый, непропаренный		рис белый, пропаренный		рисовая мука		рисовые чипсы		рисовые хлебцы	
	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %	добавлено, нг/г	выявлено, %
ФБС + метанол, 15% / антисыворотка + меченные пероксидазой антивидовые антитела	1110	130 ± 1	1110	116 ± 2	1110	157 ± 6	1110	120 ± 4	1110	88 ± 2	1110	98 ± 3
	370	106 ± 3	370	112 ± 1	370	106 ± 0.7	370	115 ± 5	370	86 ± 5	370	88 ± 4
	123	114 ± 3	123	134 ± 5	123	109 ± 1	123	130 ± 2	123	115 ± 6	123	98 ± 2
	41	134 ± 2	41	130 ± 5	41	145 ± 4	41	120 ± 4	41	109 ± 3	41	100 ± 3
	13.7	101 ± 3	13.7	114 ± 1	13.7	85 ± 3	13.7	134 ± 2	13.7	127 ± 2	13.7	132 ± 6
ФБС + метанол, 15% / биотинилированные антитела + меченный пероксидазой стрептавидин	1110	81 ± 3	1110	102 ± 0.6	1110	117 ± 2	1110	87 ± 3	1110	107 ± 2	1110	94 ± 4
	370	120 ± 5	370	83 ± 4	370	80 ± 2	370	107 ± 2	370	124 ± 5	370	87 ± 2
	123	78 ± 4	123	124 ± 2	123	105 ± 0.8	123	124 ± 4	123	105 ± 4	123	140 ± 6
	41	132 ± 3	41	71 ± 3	41	90 ± 1	41	90 ± 2	41	102 ± 6	41	122 ± 4
	13.7	75 ± 4	13.7	117 ± 5	13.7	104 ± 0.7	13.7	129 ± 2	13.7	129 ± 2	13.7	58 ± 4
ФБС + 15% ацетонитрила / антисыворотка + меченные пероксидазой антивидовые антитела	1110	91 ± 1	1110	127 ± 4	1110	84 ± 4	1110	83 ± 3	1110	84 ± 5	1110	113 ± 2
	370	79 ± 3	370	122 ± 3	370	88 ± 2	370	86 ± 4	370	111 ± 3	370	111 ± 5
	123	118 ± 2	123	147 ± 4	123	106 ± 0.9	123	108 ± 1	123	118 ± 4	123	128 ± 3
	41	123 ± 2	41	123 ± 2	41	119 ± 1	41	123 ± 2	41	128 ± 5	41	136 ± 5
	13.7	72 ± 5	13.7	67 ± 5	13.7	104 ± 1	13.7	106 ± 6	13.7	106 ± 5	13.7	132 ± 2



**Рис. 4.** Градуировочные кривые иммуноферментного определения бутахлора в ФБСТ с 15% метанола/ацетонитрила с применением нативной антисыворотки (а) либо биотинилированных IgG (б). 1 – метанол, 2 – ацетонитрил.

диапазон концентраций – от 2.4 до 192 нг/мл. Воздействие ацетонитрила было еще более выраженным по сравнению с метанолом. Существенно снизилась оптическая плотность в лунках в отсутствие аналита, но при этом возросло неспецифическое связывание, кривая приняла более пологую форму.  $IC_{10}$  изменилось до 2.7 нг/мл, а рабочий диапазон составил от 7.8 до 298.4 нг/мл.

**Тестирование проб риса и продуктов на его основе и выбор способа пробоподготовки.** В данной работе рассмотрены способы экстракции с использованием различных органических растворителей, изучалось их влияние на степень извлечения бутахлора в стандартном и усиленном за счет взаимодействий биотин–стрептавидин форматах иммуноферментного анализа. При характеристике пробоподготовки сопоставляли экстракцию аналита метанолом и гексаном. При работе с твердыми пробами преимущество первого варианта состоит в возможности без потерь отобрать органический надосадок. При проведении ИФА полученный экстракт разбавляли буферным раствором, обеспечивая допустимую конечную концентрацию метанола. При экстракции гексаном аналит можно сконцентрировать при перерастворении упаренного экстракта, выбирая объем используемой для этого смеси буфер: метанол либо буфер: ацетонитрил уже установленного состава.

Характеризуемые пробы включали не только рисовые зерна, но и рисосодержащие продукты, в состав которых входят специи, растительное масло, кунжут и кукуруза. Поскольку действующие вещества специй и масла также экстрагируются, представляла интерес оценка их влияния на ИФА, отражающая степень универсальности разработанных методик. Интересным объектом исследования оказалась рисовая мука, для которой перед экстракцией потребовалось добавление

буферного раствора для смачивания и набухания рисового крахмала.

Массив данных, полученный при тестировании данных проб разработанными методиками ИФА, суммирован в табл. 2. Как видно из таблицы, при использовании нативной антисыворотки и 15%-ного метанола степень выявления введенного бутахлора варьировала в диапазоне 86–134%, а при замене метанола на ацетонитрил этот диапазон расширялся до 72–147%, при этом воспроизводимость результатов измерений ухудшалась. При использовании сочетания конъюгатов IgG–биотин и стрептавидин–пероксидаза степень выявления бутахлора составила от 80 до 132%. Необходимо отметить, что сочетание использования гексана и ацетонитрила в среде для ИФА при пробоподготовке с оказалось неудачным. Результаты измерений концентраций добавленного бутахлора находились в другом концентрационном диапазоне, что могло объясняться инактивацией модифицированных антител компонентами пробы. Данные, полученные при такой комбинации растворителей при пробоподготовке и анализе в реакционной среде в табл. 2 не включены. Этот результат дополнительно демонстрировал предпочтительность использования метанола по сравнению с ацетонитрилом.

Сравнение предела обнаружения бутахлора для выбранной схемы и нормативов содержания бутахлора в пищевых продуктах подтвердило возможность мониторинга безопасности продуктов питания с помощью разработанного ИФА. Так, предел обнаружения в самой чувствительной схеме определения бутахлора составил 0.9 нг/мл или 0.9 нг/г, тогда как максимальное допустимое содержание бутахлора в сельскохозяйственной продукции составляет 0.05 мкг/г (или 50 нг/г) [22]. С учетом разведения метанольного экстракта

в 6 раз предел обнаружения бутахлора составил 5.4 нг/мл (нг/г), что на порядок ниже предельно допустимого содержания определяемого гербицида. В табл. 2 представлены данные по тестированию проб с известными количествами бутахлора, добавляемого в них до соответствующей пробоподготовки. Последние две пробы для каждого вида продукта содержали бутахлор ниже нормативного уровня (41.0, 13.2 нг/г), а в остальных пробах уровень бутахлора был выше допустимого. Согласно приведенным результатам, разработанный ИФА позволяет определять бутахлор в различных концентрациях, с учетом используемого разведения экстракта, и делать выводы о возможности использования тестируемой продукции.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-46-00018).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (№ Р05-28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными”.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meena R.S., Kumar S., Datta R., Lal R., Vijayakumar V., Brtnicky M. et al. // *Land*. 2020. V. 9. № 2. Article 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>
2. Intisar A., Ramzan A., Sawaira T., Kareem A.T., Hussain N., Din M.I. et al. // *Chemosphere*. 2022. V. 293. Article 133538. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133538>
3. Parra-Arroyo L., González-González R.B., Castillo-Zacarías C., Melchor Martínez E.M., Sosa-Hernández J.E., Bilal M. et al. // *Sci. Total Environ*. 2022. V. 807. Article 151879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151879>
4. Li N., Zhang J.J., Liu J., Zhang N., Yang H. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 242. Article 113942. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113942>
5. Yang B., Liu Y., Li Y., Zhu S., Li Y., Yi J. et al. // *Chemosphere*. 2021. V. 283. Article 131226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131226>
6. Kim S.H., Lee Y.H., Jeong M.J., Gwon D.Y., Lee J.H., Shin Y. et al. // *Foods* 2023. V. 12. № 8. Article 1683. <https://doi.org/10.3390/foods12081683>
7. Xue J., Jiang W., Liu F., Zhao H., Wang S., Peng W. // *J. AOAC Int*. 2014. V. 97. № 1. P. 245–251. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-313>
8. Wu Y., Zhang L., Zhang D., Yu R. // *Food Chem*. 2024. V. 435. Article 137659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137659>
9. Zha Y., Lu S., Hu P., Ren H., Liu Z., Gao W. et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021. V. 13. № 5. P. 6091–6098. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21760>
10. Zha Y., Liu X., Hu P., Lu S., Ren H., Liu Z. et al. // *Food Anal. Methods*. 2020. V. 13. P. 1008–1016. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01706-6>
11. Zha Y., Li Y., Hu P., Lu S., Ren H., Liu Z. et al. // *Anal. Chem*. 2021. V. 93. P. 13886–13892. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02736>
12. Lei H., Xue G., Yu C., Haughey S.A., Eremin S.A., Sun Y. et al. // *Anal. Methods*. 2011. V. 3. P. 2334–2340. <https://doi.org/10.1039/C1AY05347G>
13. Yakovleva J., Zherdev A.V., Popova V.A., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 491. № 1. P. 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00796-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00796-7)
14. Yan X., Li H., Yan Y., Su X. // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. P. 3543–3554. <https://doi.org/10.1039/C3AY41946K>
15. Yu X., Zhang X., Xu J., Guo P., Li X., Wang H. et al. // *J. Hazard. Mater*. 2021. V. 418. Article 126305. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126305>
16. Li Z., Wu Y., Li Z., Yu B., Mao X., Shi G. // *Anal. Methods*. 2023. V. 15. P. 5087–5094. <https://doi.org/10.1039/D3AY01379K>
17. Zhang L., Yin X., Yang H., Wen H., Han S., Pan X. et al. // *Foods*. 2023. V. 13. № 1. Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods13010012>
18. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Zherdev A.V., Hennion M.C. // *J. Immunoassay Immunochem*. 2005. V. 26. № 3. P. 231–244. <https://doi.org/10.1081/IAS-200062498>
19. Berlina A.N., Zherdev A.V., Xu C., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Food Control*. 2017. V. 73. Part B. P. 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.011>
20. Nevanen T.K., Söderholm L., Kukkonen K., Suortti T., Teerinen T., Linder M. et al. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 925. № 1–2. P. 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01021-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01021-4)
21. Ren X., Zhang F., Chen F., Yang T. // *Food Agric. Immunol*. 2009. V. 20. № 4. P. 333–344. <https://doi.org/10.1080/09540100903365852>
22. Hormenoo Y.A., K. Agbenorhevi J., Ekyem S.O., Bonsu K.O., Torve V., Voegborlo B.R. // *Cogent Food Agric*. 2021. V. 7. № 1. Article 1910159. <https://doi.org/10.1080/23311932.2021.1910159>

## **Influence of Organic Solvents on the Results of Immunoenzyme Determination of Herbicide Butachlor: Selection of Sample Preparation Modes**

**A. N. Berlina<sup>a</sup>, N. I. Smirnova<sup>a</sup>, N. S. Komova<sup>a</sup>, K. V. Serebrennikova<sup>a</sup>,  
A. V. Zherdev<sup>a</sup>, B. B. Dzantiev<sup>a, \*</sup>**

*<sup>a</sup>Bach Institute of Biochemistry Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

The influence of organic solvents such as methanol and acetonitrile on the results of immunodetermination of butachlor in samples of rice and rice products was studied. The schemes of enzyme immunoassay using: (a) native antiserum containing specific antibodies to butachlor and antispecies antibodies labeled with horseradish peroxidase, and (b) biotinylated specific antibodies and streptavidin labeled with peroxidase are considered. The close values of  $IC_{10}$  (0.77 and 0.68 ng/ml, respectively) and working range (2.6–165 and 2.4–192 ng/ml, respectively) were established for the two schemes, when analyzing in a mixture of phosphate buffer and methanol 85 : 15%. For the second scheme, the detection of butachlor in samples of rice and food products based on it is shown at a level of 80–132% of the administered amount of the analyte. The comparison of sample preparation methods allows us to recommend the extraction of butachlor with hexane with redissolution of the dry residue in a buffer with 15% methanol, or the preparation of a methanol extract followed by a 6-fold dilution with a buffer solution.

*Keywords:* pesticides, immunoassay, rice, enzyme immunoassay, aqueous-organic mixtures, extraction