

5. МУ СТОР 2.2.1.0005-11

6. МУ СТОР 2.2.1.0006-11

7. МУ СТОР 2.2.1.0007-11

Уровень выше указанных разработок и методик подтвержден в настоящее время рядом публикаций в ФИПС РОСПАТЕНТА и защищён его патентами.

УДК 577.27

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАТОРНЫХ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЦЕЛЫМ КЛЕТКАМ

*Дыкман Л.А., доктор биологических наук, с.н.с., [dykman@ibppm.sgu.ru](mailto:dykman@ibppm.sgu.ru)*

*Староверов С.А., доктор биологических наук, [staroverov@ibppm.sgu.ru](mailto:staroverov@ibppm.sgu.ru)*

*Щеголев С.Ю., доктор химических наук, профессор, [su@ibppm.sgu.ru](mailto:su@ibppm.sgu.ru)*

*Богатырев В.А., доктор биологических наук, с.н.с., [bog@ibppm.sgu.ru](mailto:bog@ibppm.sgu.ru)*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН*

**Ключевые слова:** *фаговый дисплей, биопаннинг, биоимиджинг, *Azospirillum brasilense**

*Представлены данные об использовании фагового дисплея для получения антител к целым клеткам и применении фаговых мини-антител для детекции клеток.*

**Введение.** Традиционно биологическими компонентами, используемыми для специфической детекции клеток, являются поликлональные и моноклональные антитела (АТ), которые широко применяются в производстве диагностических тест-систем. В последнее время для решения подобных задач в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов, которые являются более дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиям. К такому методу относится технология фагового дисплея, созданная Джорджем Смитом [1]. Впервые возможность получения одноцепочечных последовательностей, составленных из вариабельных доменов АТ, в составе гибридного белка оболочки фага, была продемонстрирована Мак Кафферти с соавт. [2]. В дальнейшем были сконструированы библиотеки, в которых комбинации легких и тяжелых цепей АТ продуцировались в составе фагового белка в виде мини-АТ – одноцепочечных АТ, гетеродимеров или отдельных растворимых молекул.

В настоящее время в литературе встречается достаточное количество данных о применении АТ, полученных методом фагового дисплея. В основном они используются в иммуноанализе и иммунотерапии, например, для выявления и лечения гепатоклеточной карциномы, лимфатической лейкемии, меланомы и рака груди. Фрагменты scFv являются ценным инструментом в иммунотерапии рака и могут быть использованы как «внутриклеточные АТ», из-за уменьшения их размера по сравнению с Fab фрагментами. С помощью техники фагового дисплея могут быть получены разнообразные производные для векторной генной терапии, а также для создания специфически-направленных лекарственных средств. Помимо этого возможно применение мини-АТ в протеомике, в технологиях создания биосенсоров [3].

Кроме того, АТ, полученные с помощью технологии фагового дисплея, успешно ис-

пользуются для идентификации бактерий [4]. При этом чаще всего, для получения АТ используют изолированные бактериальные антигены (АГ). Имеются лишь отдельные работы, которые описывают получение АТ к целым бактериальным клеткам, в частности, стрептококкам [5]. На наш взгляд, изучение возможности получения мини-АТ на целые клетки (животные и бактериальные) представляет значительный интерес. Этому вопросу посвящено наше исследование.

**Материалы и методы исследований.** В распоряжении Лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН имеются две библиотеки АТ: овечья комбинаторная фаговая библиотека, любезно предоставленная профессором университета г. Абердина У. Харрисом [6], и комбинаторная фагмидная библиотека scFv мыши, сконструированная в Филиале института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН [7]. Процедуру биопаннинга проводили согласно [6].

**Результаты исследований и их обсуждение.**

***Биоимиджинг опухолевых клеток с использованием фаговых антител и наночастиц золота.***

Целью данного этапа работы являлось получение мини-АТ на мембранные структуры опухолевых клеток, синтез конъюгатов мини-АТ с золотыми наночастицами (НО) и применение данных наноконструктов для мечения опухолевых клеток.

В качестве АГ использовали целые клетки линии СПЭВ. СПЭВ – клеточная линия почек эмбриона свиньи; морфология – эпителиоподобная, способ культивирования – монослойный. На поверхности экспонированы опухолевые АГ лейковирусов (Мезон–Пфайфер-подобных) и онкорнавирусов А и С.

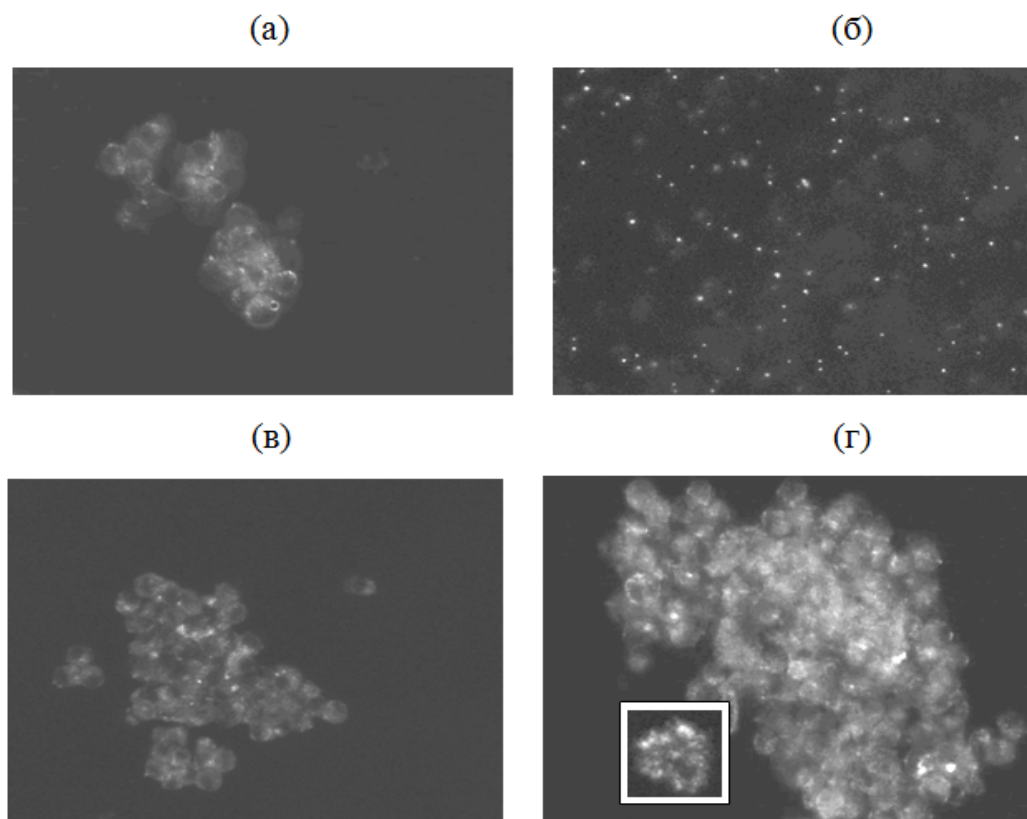
Мини-АТ на клетки СПЭВ были получены из овечьей комбинаторной фаговой библиотеки. Для получения мини-АТ было проведено 3 раунда селекции, полученные специфичные фаги были проверены методом дот-анализа. В качестве вторичной метки использовали кроличьи антифаговые АТ, меченные золотыми НО.

На первом шаге клетки СПЭВ инкубировали с мини-АТ. Затем меченые фаговыми АТ (опыт) и немеченые (контроль) клетки инкубировали с конъюгатами золотых НО с кроличьими антифаговыми АТ. Конъюгаты золотых НО с антифаговыми АТ биоспецифически связывались лишь с клетками, на поверхности которых присутствовали мини-АТ, а в случае «контроля» биоспецифического мечения не происходило.

Фотографии клеток СПЭВ, меченых НО, были получены методом темнопольной микроскопии. Данный метод позволяет регистрировать только рассеянный свет от исследуемого объекта, что делает его очень удобным для визуализации клеток, меченных ЗНЧ. Фотографии получали с помощью микроскопа Leica DM 2500, оборудованного цветной ПЗС-камерой, с использованием объектива 40×. Все изображения меченых и контрольных клеток получали при одинаковых условиях освещения.

На рис. 1а,б приведены темнопольные снимки исходных клеток СПЭВ и золотых НО на ядрах из двуокиси кремния, соответственно. НО интенсивно рассеивают свет и выглядят на фотографиях как цветные пятна с диаметром около 1 мкм. Стоит отметить, что реальный размер НО гораздо меньше (около 140 нм). Как можно заметить, на снимках исходных клеток СПЭВ (рис. 1а) подобные цветные пятна не встречаются.

На рис. 1в,г приведены темнопольные фотографии клеток СПЭВ, которые инкубировали только с конъюгатами НО с антифаговыми АТ (в), а также клеток СПЭВ, которые сначала инкубировали с мини-АТ и затем с конъюгатами НО (г). На темнопольных изображениях отчетливо видна разница между специфически (мини-АТ + конъюгат), неспецифически (только конъюгат НО с антифаговыми АТ) мечеными и немечеными клетками.



**Рис. 1 - Темнопольные изображения исходных клеток СПЭВ (а), золотых НО на ядрах из двуокиси кремния (б), исходных клеток СПЭВ, инкубированных с конъюгатами золотых НО (негативный контроль, в), и клеток СПЭВ, которые инкубировали с мини-АТ и затем с конъюгатами золотых НО (г). На вставке показан увеличенный фрагмент, на котором отчетливо видно рассеяние от адсорбированных золотых НО.**

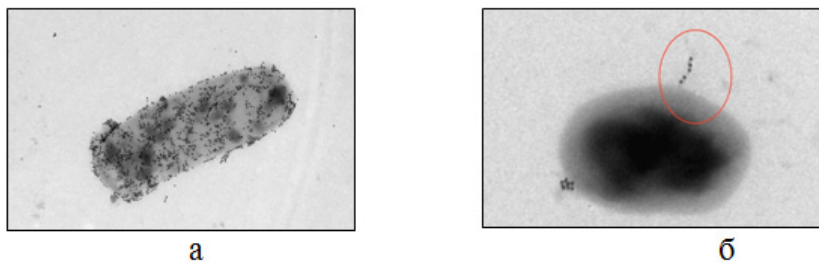
***Получение мини-антител к поверхностным антигенам *Azospirillum brasilense* Sp245 и их использование для детекции микробных клеток***

Значительный интерес, на наш взгляд, представляет изучение возможности получения мини-АТ на азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum*, участвующие в ассоциативных взаимоотношениях с растениями, для решения вопросов быстрой идентификации бактерий в окружающей среде. В связи с этим, основная задача данного этапа наших исследований заключалась в получении фаговых АТ на АГ клеточной поверхности типового штамма *A. brasilense* Sp245 с использованием овечьей фаговой библиотеки, а также изучение возможности их применения при анализе поверхностных АГ клеточных структур и детекции клеток с помощью микроскопических методов.

Нами было проведено 3 раунда селекции мини-АТ на целые клетки *A. brasilense* Sp245 и 1 раунд селекции на ЛПС и флагеллин клеток этого штамма с использованием клонов, обладающих более высокой чувствительностью и продуктивной активностью. Титр полученных фаговых мини-АТ составил 1:8000.

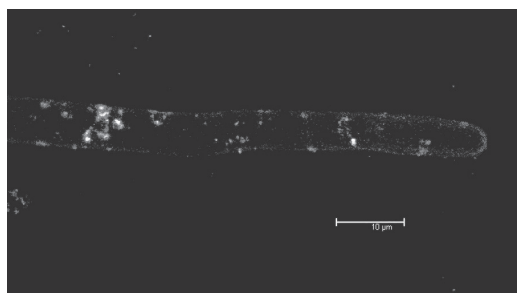
Электронно-микроскопическую идентификацию взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp245 с мини-АТ проводили с помощью электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Фотографии, полученные с использованием электронной микроскопии, представлены на рис. 2. Как видно из рисунков, полученные нами фаговые мини-АТ располагаются по всей

клеточной поверхности в случае ЛПС и, вероятно, на «обломке» жгутика в случае с флагеллином. Из данного эксперимента можно сделать вывод, что на основе мини-АТ и КЗ можно разработать тест-систему для изучения клеточной поверхности бактерий.



**Рис. 2 - Электронно-микроскопическое выявление АГ клеточной поверхности *A. brasilense* Sp245c помощью мини-АТ на ЛПС (а) и флагеллин (б).**

Затем мы использовали полученные мини-АТ на целые клетки *A. brasilense* Sp245 для идентификации азоспирилл на поверхности корня пшеницы. На рис. 3 приведена микрофотография корневого волоска, полученная на конфокальном лазерном микроскопе TCS SP5 (Leica, Германия). Выявление бактериальных клеток проводили последовательной инкубацией препарата корней пшеницы с азоспириллами (7 суток), мини-АТ на *A. brasilense* Sp245 (сутки), кроличьими антифаговыми АТ (сутки) и козьими антикроличьими АТ, мечеными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США).



**Рис. 3 - Выявление клеток *A. brasilense* Sp245 на поверхности корневого волоска пшеницы (конфокальная микроскопия).**

Мы полагаем, что представленные в настоящем разделе результаты могут быть использованы для создания теста быстрой детекции микробных клеток и оценки экспонированности тех или иных антигенных детерминант на клеточной поверхности бактерий [8-10].

**Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-00629-а.**

### **Библиографический список**

1. Smith G.P. Filamentous phage fusion: Novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion surface // Science. – 1985. – V. 228. – P. 1315-1317.
2. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains // Nature. – 1990. – V. 348. – P. 552-554.
3. Тикунова Н.В., Морозова В.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // Acta Naturae. – 2009. – № 3. – С. 22-31.
4. Paoli G., Brewster J.D. Identification of the surface antigen recognized by a *Listeria monocytogenes*-specific phage-displayed antibody fragment and its presence in different physiologi-

cal conditions // J. Rapid Meth. Automat. Microbiol. – 2007. – V. 4. – P. 74-83.

5. De Greeff A., van Alphen L., Smith H.E. Selection of recombinant antibodies specific for pathogenic *Streptococcus suis* by subtractive phage display // Infect. Immun. – 2000. – V. 68. – P. 3949-3955.

6. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J.R., Harris W.J. Analysis of the diversity of a sheep antibody repertoire as revealed from a bacteriophage display library // J. Immunol. – 2000. – V. 164. – P. 6221-6229.

7. Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Улитин А.Б., Маркова Е.В., Мареева Т.Ю., Быстров Н.С., Бровко Ф.А., Несмеянов В.А. Получение мини-антител против гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека с использованием библиотеки scFv мыши // Биоорг. химия. – 2002. – Т. 28. – С. 126-134.

8. Dykman L.A., Staroverov S.A., Guliy O.I., Ignatov O.V., Fomin A.S., Vidyasheva I.V., Karavaeva O.A., Bunin V.D., Burygin G.L. Preparation of miniantibodies to *Azospirillum brasilense* Sp245 surface antigens and their use for bacterial detection // J. Immunoassay Immunochem. – 2012. – V. 33. – P. 115-127.

9. Староверов С.А., Видяшева И.В., Фомин А.С., Василенко О.А., Малинин М.Л., Габалов К.П., Богатырев В.А., Дыкман Л.А. Разработка иммунозолотых диагностических систем для идентификации возбудителя туберкулеза *in situ* // Российский ветеринарный журнал. – 2011. – № 2. – С. 29-32.

10. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Pinaeva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Quantitative cell bioimaging using gold nanoshell conjugates and phage antibodies // J. Biophotonics. – 2011. – V. 4. – P. 74-83.

## USING THE COMBINATORIAL PHAGE LIBRARY TO OBTAIN ANTIBODIES TO WHOLE CELLS

*Dykman L.A., Staroverov S.A., Shchyogolev S.Yu., Bogatyrev V.A.*

**Key words:** *phage display, biopanning, bioimaging, Azospirillum brasilense*

*The article presents data on the use of phage display technique to obtain the antibodies to whole cells and the use of phage mini-antibodies for cells detection.*

УДК 577.27

## ТЕХНОЛОГИЯ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ АНТИТЕЛ

*Дыкман Л.А., доктор биологических наук, с.н.с.*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН*

*Тел. +7(8452)970403, E-mail dykman@ibppm.sgu.ru*

**Ключевые слова:** *фаговый дисплей, нитчатые бактериофаги, комбинаторные библиотеки миниантител, биопаннинг*

*Представлены современные данные об использовании фагового дисплея антител в медико-биологических исследованиях.*