

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.

Антитела (АТ) являются одним из эффекторных компонентов иммунной системы. Высокоспецифичное, высокоаффинное взаимодействие АТ с антигенами (АГ) позволяет использовать их в исследовательских, аналитических и терапевтических целях. Исторически первым источником АТ была сыворотка иммунных животных и человека. Получаемые таким образом АТ содержат набор иммуноглобулинов разных классов и подклассов, специфично узнающих «свой» АГ. Различные АТ сыворотки узнают несколько эпитопов АГ. Таким образом, сыворотка полиспецифична, что в ряде случаев является недостатком. Дальнейшим развитием способов получения АТ явилось создание гибридомной технологии [1], которая позволяет получать АТ, продуцируемые одним клеточным клоном, узнающие один эпитоп и сохраняющие свои свойства во многих генерациях гибридной клетки (моноклональные АТ). К достоинствам моноклональных АТ можно отнести высокую специфичность, химическую однородность, возможность получения в больших количествах. К недостаткам – то, что технология получения моноклональных АТ разработана для мышей и крыс и является трудноприменимой в случае АТ человека, в то время как для терапии требуются именно человеческие иммуноглобулины. Затруднения возникают и в тех случаях, когда иммунизация животных по какой-либо причине невозможна или не удается преодолеть недостаток иммуногенности потенциальных АГ.

Для разрешения этой проблемы в настоящее время предложены методы молекулярного клонирования фрагментов генов АТ. Одним из таких методов является техника фагового дисплея АТ, впервые предложенная в работе [2]. Эти исследователи показали возможность получения одноцепочечных последовательностей, составленных из переменных доменов АТ, в составе гибридного белка оболочки фага. Они же продемонстрировали возможность высокоэффективной аффинной селекции клонов, несущих антигенспецифические одноцепочечные АТ (миниантитела).

Основой метода является создание комбинаторной библиотеки, в которой переменные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов соединены случайным образом и представлены на поверхности нитевидного бактериофага. Каждый бактериофаг, как и В-лимфоцит, экспрессирует АТ единственной специфичности. При достаточно большом размере библиотеки репертуар переменных участков будет сравним с репертуаром АТ в организме. Фаги, несущие АГ-связывающие фрагменты АТ (scFv, Fab) нужной специфичности, могут быть отобраны на иммобилизованном АГ.

Создание фагового дисплея АТ обязательно включает следующие этапы: выделение мРНК из иммунных или интактных лимфоцитов, синтез на этой матрице переменных фрагментов генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, объединение генов легких и тяжелых цепей с помощью олигонуклеотидного линкера, клонирование этих генов в фаг, инфицирование этим вектором *E. coli* (рис. 1). В результате таких манипуляций получают библиотеки, в которых комбинации легких и тяжелых цепей экспрессируются в составе фагового белка в виде одноцепочечных АТ, гетеродимеров или отдельных растворимых молекул.

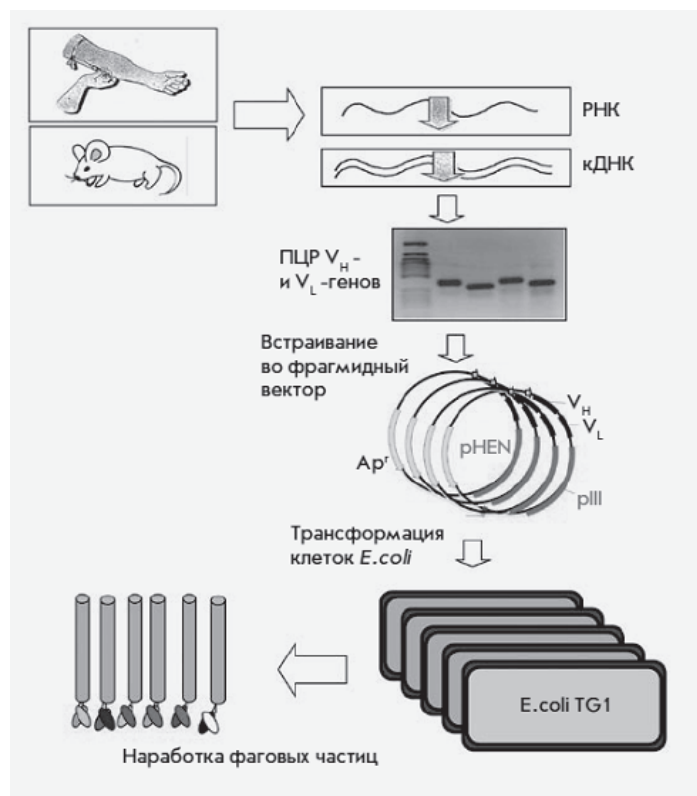


Рис. 1 - Схема конструирования фаговой библиотеки антител.

В технологии фагового дисплея чаще всего используют нелизирующие нитевидные фаги (M13, f1, fd и др.). Их вирион содержит кольцевую одноцепочечную ДНК, генетическая организация и последовательность которой известна для многих представителей данной группы фагов. Размер генома составляет около 6000 нуклеотидов. Капсид вирусной частицы устроен одинаково у представителей всей группы и образован 5 структурными белками. Во всех сконструированных к настоящему времени фаговых библиотеках фрагменты АТ экспрессируются в составе гибридных белков на основе капсидного белка g3p. G3p является самым большим из структурных белков нитевидных фагов (406 аминокислотных остатков, M = 42 КДа). Он состоит из двух доменов: С-концевой домен встраивается в вирион и играет роль в сборке полноценного вириона, а N-концевой домен выполняет функцию адсорбции на F-пилях бактерии-хозяина. Хотя для конструирования фаговых библиотек успешно использовалось введение целевых последовательностей по нескольким разным сайтам, минимальное влияние на инфекционность вириона оказывали вставки, отстоящие на несколько аминокислотных остатков от N-конца белка. Лабильность конформации белка g3p и его терминальное расположение на вирионе являются благоприятными факторами для использования его в качестве основы для конструирования гибридных белков, особенно в тех случаях, когда не требуется получать большое количество копий гибридного белка в составе каждого вириона.

К достоинствам метода фагового дисплея можно отнести возможность отбора клонов-продуцентов миниантител *in vitro*, минуя стадию иммунизации животных, возможность получения АТ к аутоантигенам, токсинам и слабоиммуногенным соединениям, отсутствие необходимости использования лабораторных животных и поддержания долговременных культур клеток эукариот, сокращение времени получения индивидуальных клонов до 10-14 дней по сравнению с несколькими месяцами в случае гибридной технологии, относительную простоту получения миниантител и их низкую себестоимость, возможность создания гибридных

молекул АТ с маркерными белками.

Фаговый дисплей – молекулярная техника, которая позволяет экспрессировать чужеродные белки на поверхности фаговых частиц. Фаги, трансформированные таким образом, становятся способны не только экспрессировать и переносить чужеродные белки, но и способны к дальнейшей репликации чужеродной ДНК. Фаговый дисплей значительно расширяет число нуклеотидных последовательностей, которые могут быть преобразованы в популяции различных пептидов и белков, позволяя отбирать те из них, которые имеют интересующие исследователя свойства. Первые опыты фагового дисплея включали варианты только с одним экспрессированным на поверхности фаговой частицы пептидом на фоне всей популяции белков фагов дикого типа (пептидные библиотеки) [3]. В настоящее время масштабы и возможности метода значительно увеличились. Естественные и синтетические пептиды, белки и белковые домены, а также синтетические АТ можно экспрессировать на поверхности фаговых частиц.

И для обычной гибридомы и для фаговых АТ источником материала является обширное разнообразие репертуара АТ млекопитающих. Фундаментальное различие в том, что для производства АТ посредством гибридомной технологии применяют иммортализацию продуцирующих АТ В-клеток, в то время как фаговый дисплей АТ использует гены, которые кодируют переменные участки АТ. V-гены млекопитающих, которые кодируют переменные области АТ, являются источником материала для конструирования фаговых библиотек АТ. Библиотеки по существу разделяются на две категории в зависимости от того, получены эти гены из неиммунизированных животных (сингл-пот библиотеки) или животных, иммунизированных целевым АГ (постиммунные библиотеки).

В широком смысле и фаговый дисплей и АТ, полученные посредством гибридомной технологии, могут использоваться в одном диапазоне применений, например ELISA, вестерн-блоттинг и иммуноцитохимия. Однако фаговый дисплей имеет некоторые преимущества в сравнении с гибридомной технологией. Одно из ограничений гибридомной технологии состоит в том, что использование гибридомных АТ должно вестись при параметрах, приближенных к физиологическим, что может быть неудобным для некоторых исследуемых объектов. Технология фагового дисплея позволяет изолировать АТ с достаточной связывающей способностью при любых физиологических условиях.

Кроме иммуноанализа, миниантитела используют в иммунотерапевтической практике [4], в протеомике [5], в технологиях создания биосенсоров [6]. Обширную информацию о методе и вариантах его применения можно почерпнуть в обзорах [7-12].

Работа с библиотекой сводится к тому, чтобы изначально большое разнообразие рекомбинантных клонов уменьшить до разумного количества, которое можно детально анализировать. Основа процедуры скрининга – аффинная селекция (биоаннинг) и она имеет несколько базовых шагов (рис. 2):

- 1) амплификация начальной библиотеки;
- 2) инкубация фаговых частиц с иммобилизованным АГ;
- 3) отмывка и удаление несвязавшихся фаговых частиц;
- 4) элюция связавшихся фагов;
- 5) инфицирование элюированными частицами клеток-хозяев и дальнейшая их амплификация либо индивидуальное расселение колоний.

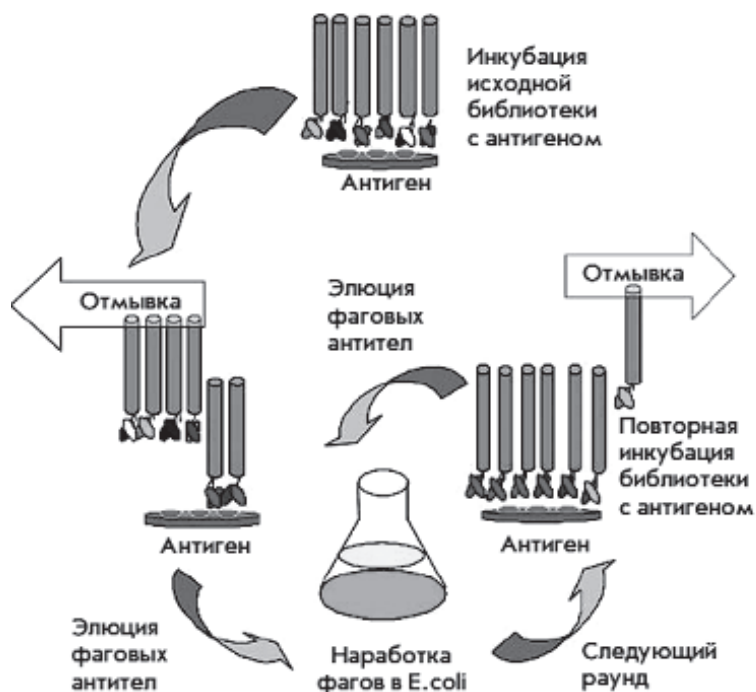


Рис. 2 - Схема биопаннинга

Раунды аффинной селекции (биопаннинга), усиливающие селектированную библиотеку, повторяются, как правило, от 3 до 6 раз. В конечном счете, отбирают отдельные клоны фагов, имеющие наибольшее средство к АГ.

Используются различные формы отбора фага, включая прямое связывание фага с АГ, присоединенным к матриксу (на колонке) или же сорбированным на чашках или иммунотьюбах (основной способ), или с АГ на поверхности клеток. Причем при получении АТ к гаптенам, последние приходится предварительно конъюгировать с белком-носителем.

В последние годы только на фармацевтическом рынке США продается более 14 антител, антигенсвязывающие домены которых получены методом фагового дисплея [13]. Все это объясняет факт притока крупных компаний, таких как Morphosys GmbH (Германия; <http://www.morphosys.com>); Cambridge Antibody Technology (Великобритания; <http://www.catplc.co.uk>) и Dyax (США; <http://www.dyax.com>) и др., в область разработки и применения комбинаторных фаговых библиотек фрагментов антител.

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

Библиографический список

1. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity // Nature. - 1975. - V. 256. - P. 495-497.
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. Smith G.P. Filamentous phage fusion: Novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the viron // Science. - 1985. - V. 228. - P. 1315-1317.
4. Harris W.J., Cunnigham C. Antibody therapeutics. - Berlin: Springer-Verlag, 1995, - 150 p.

5. Liu B., Marks J.D. Applying phage antibodies to proteomics: Selecting single chain Fv antibodies to antigens blotted on nitrocellulose // *Anal. Biochem.* - 2000. - V. 286. - P. 119-128.
6. Stich N., Gandhum A., Matyushin V., Raats J., Mayer C., Alguel Y., Schalkhammer T. Phage display antibody-based proteomic device using resonanace-enhanced detection // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2002. - V. 2 - P. 375-381.
7. Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making antibodies by phage display technique // *Ann. Rev. Immunol.* - 1994. - V. 12. - P. 433-455.
8. Smith G.P., Petrenko V.A. Phage display // *Chem. Rev.* - 1997. - V. 97. - P. 391-410.
9. Willats W.G.T. Phage display: Practicalities and prospects // *Plant Mol. Biol.* - 2002. - V. 50. - P. 837-854.
10. Clark M. V gene selection *in vitro* (phage libraries) – making assembled repertoires of antibody heavy and light chain variable domains // In: John Humphrey Advanced Lecture Series in Immunology: Immunology in Health and Disease / Eds. Asherson G., McMichael A.F.R.S., Nesmeyanov V. - London, Moscow, 2002.
11. Yau K.Y.F., Lee H., Hall J.C. Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies // *Biotechnol. Adv.* - 2003. - V. 21. - P. 599-637.
12. Тикунова Н.В., Морозова В.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae.* - 2009. - № 3. - С. 22-31.
13. Azzazy H., Highsmith W. Phage display technology: clinical applications and recent innovations // *Clin. Biochem.* - 2002. - V. 35. - P. 425-445.

ANTIBODY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

Dykman L.A.

Key words: *phage display, filamentous bacteriophage, combinatorial libraries, biopanning*
The article presents the current data on the use of antibody phage display in biomedical research.

УДК 619:616-07

БОКСЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ. ОСНОВЫ ЭКСПЛУАТАЦИИ И ОБСЛУЖИВАНИЯ.

*Ененко А.А., начальник аналитической лаборатории
ЗАО «Ламинарные системы», г.Миасс
Тел. +7(3513)54-47-44*

Деятельность химических, радиологических, бактериологических и других лабораторий связана с использованием различного рода защитного лабораторного оборудования. Традиционным было использование активной вытяжной системы, которая, до определенного времени, была единственным средством удаления и контроля распространения аэрозолей агентов, образующихся в процессе работы. Однако на сегодняшний день только вытяжной вентиляции недостаточно для обеспечения безопасной работы персонала, и защиты окружающей среды. Помимо этого остро стоит вопрос об организации области пространства с чистой воздушной