УДК 579.6

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ АНТИГЕНАМИ КЛЕТОК Herbaspirillum seropedicae Z78 ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИМ ДАТЧИКОМ

© 2020 г. О. И. Гулий^{1, 2, *}, Н. С. Величко¹, Ю. П. Федоненко¹, В. Д. Бунин³

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия ²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия ³EloSystem GbR, Берлин, 13407, Германия

> **e-mail: guliy_olga@mail.ru* Поступила в редакцию 06.06.2019 г. После доработки 23.08.2019 г. Принята к публикации 30.08.2019 г.

Электрооптическим методом с применением фаговых антител к основным антигенам клеток *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (ЭПСІ, КПСІ и ЛПС) проведена оценка их комплементарного взаимодействия в системе антиген—антитело. Показано, что электрооптический анализатор позволяет разграничивать присутствие/отсутствие специфичного взаимодействия фаговых антител с основными эпитопами бактериальной поверхности. Выявленные закономерности изменения электрофизических параметров хорошо согласовывались с компонентным составом антигенов *Herbaspirillum*, их топографическим распределением, а также были подтверждены результатами электронной микроскопии и дот-анализа. Продемонстрирована возможность применения метода электрооптического анализа для детекции *Herbaspirillum* spp. с экспонированными на их поверхности антигенами. Полученные результаты могут служить основой при создании теста для быстрого определения данных микроорганизмов.

Ключевые слова: фаговые антитела, липополисахарид, экстраклеточный липополисахарид, электрооптический датчик, детекция

DOI: 10.31857/S0555109920010079

В результате снижения иммунорезистентности населения планеты все чаще возникают инфекции, вызываемые условно-патогенными бактериями. Основными оппортунистическими агентами становятся представители почвенной микрофлоры. Грамотрицательные *β*-*Proteobacteria*, включающие Burkholderia, Ralstonia, Herbaspirillum и другие почвенные микроорганизмы, широко представлены в биосфере и играют важную роль в различных областях народного хозяйства [1-3]. Herbaspirillum spp. широко населяет биосферу как в свободноживущем состоянии [1, 4], так и в тканях экономически и агрономически значимых сельскохозяйственных культур [5-7]. Увеличивается количество работ. отмечающих способность Herbaspirillum провоцировать и утяжелять течение септическиех процессов [8-13]. Первоначальная ошибочная идентификации гербаспирилл как представителей Burkholderia spp. была связана с их близким филогенетическим и фенотипическим сходством с Burkholderia cepacia [11, 13]. Диагностика гербаспирилл осложняется отсутствием для них коммерчески доступных тест-систем. В связи с этим улучшение методов детекции *Herbaspirillum* для создания экспресс-метода оценки бимолекулярной реакции антиген—антитело и их обнаружения представляет интерес с практической точки зрения.

Эффективным инструментом для решения проблем биотехнологии и прикладной микробиологии оказываются методы, основанные на анализе электрофизических параметров клеток в переменном электрическом поле [14–17]. Регистрация оптическим способом изменений электрических характеристик суспендированных клеток носит название электрооптического (ЭО) анализа. Ранее была показана возможность применения метода ЭО анализа для идентификации микробных клеток при их взаимодействии с поликлональными и моноклональными антителами [15, 18, 19]. При развитии ЭО метода дифференциальной диагностики микробных клеток важен подбор соответствующих антител (Ат).

Основными антигенами (**Ar**) поверхности бактерий являются экзо- и эндотоксины гликополимерной природы. Капсула бактерий содержит капсульные полисахариды (**КПС**), а микробная слизь — внеклеточные или экстраклеточные полисахариды (ЭПС). К гликополимерам, преобладающим на поверхности у грамотрицательных бактерий, наряду с КПС и ЭПС, относят липополисахариды (ЛПС), формирующие наружный слой внешней мембраны. Капсульные гликаны ряда бактерий представляют собой экстраклеточную форму ЛПС [20, 21], а некоторые бактерии при определенных условиях способны выделять ЛПС в окружающую среду [22]. Все они играют важную роль в иммунохимическом поведении микроорганизмов [23–27].

Традиционно для серологических и иммунохимических исследований используют поликлональные или моноклональные Ат, получение которых включает этап иммунизации животных, который может быть затруднителен при низкой иммуногенности или высокой токсичности Аг. Известно, что для эффективной диагностики достаточно одной антигенсвязывающей области (Fab- или Fv-фрагмента), то есть присутствие Fcфрагмента Ат необязательно [28]. В качестве альтернативы классической иммунизации можно осуществлять эффективный отбор Ат в формате фагового дисплея [29, 30]. Селекция Аг-связывающих фрагментов Ат (cFv, Fab), представленных на поверхности нитевилного фага, проводится, как и селекция В-лимфоцитов, по способности взаимодействовать с Аг. Подобно плазматическим клеткам, нарабатывающим Ат, бактериальные клетки, инфицированные фагами, в геноме которых содержатся соответствующие гены, способны секретировать растворимые фрагменты Ат, успешно применяемые для идентификации микроорганизмов [14, 31, 32].

Получение фаговых антител (м- $At_{\Theta \Pi CI}$, м- $At_{K\Pi CI}$ и м- $At_{\Pi \Pi C}$) на основные антигены бактерий рода *Herbaspirillum* ($\Theta \Pi CI$, К ΠCI и Л ΠC) и их дальнейшее применение для быстрого скрининга бактерий методом электрооптического анализа представляет значительный интерес.

Цель работы — получение м- $At_{\Theta \Pi CI}$, м- $At_{K\Pi CI}$ и м- $At_{\Pi \Pi C}$ к основным антигенам *Herbaspirillum se-ropedicae* Z78 (ЭПСІ, КПСІ и ЛПС) и оценка возможности их применения для детекции *Herbaspirillum* spp. методом электрооптического анализа.

МЕТОДИКА

Микробные клетки и условия их культивирования. В работе использовали культуры *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (IBPPM217), *Azospirillum brasilense* Sp245 (IBPPM 219) и *Escherichia coli* XL-1 (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http:// collection.ibppm.ru).

Н. seropedicae Z78 выращивали в жидкой синтетической питательной среде с витаминами [33] в течение 24 ч при 30° С, что соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста бактерий. *А. brasilense* Sp245 и *E. coli* XL-1 выращивали на жидкой среде LB в течение 18-20 ч при 30° С, как описано [34].

Выделение и очистка ЛПС. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 40 мин), осадок трижды ресуспендировали в 0.15 M NaCl, механически перемешивали и переосаждали. Экстракцию ЛПС из высушенной ацетоном бактериальной массы проводили горячим 45%-ным водным фенолом по модифицированной методике [35]. ЛПС очищали двукратным ультрацентрифугированием (105000 g, 4 ч). Препараты ЛПС лиофилизировали с использованием Benchtop 2K ("Virtis", США).

Выделение внеклеточных гликополимеров. Гликополимеры выделяли как описано в работе [33]. Все фракции, содержащие углеводы, которые не поглощали между 240 и 260 нм, объединяли, концентрировали и лиофилизировали. В результате были получены и охарактеризованы экстраклеточный (ЭПСІ) и капсульный (КПСІ) гликополимеры [33].

Получение фаговых антител. Фаговые антитела к ЛПС, ЭПСІ и КПСІ получали с использованием овечьей фаговой библиотеки, любезно предоставленной профессором Харрисом (W.J. Harris, Griffin. 1, Великобритания; 10¹² вирионов/мл) [36]. В качестве твердой фазы для закрепления Аг использовали полистирольный 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа (ИФА). В лунку вносили 200 мкл 1.0 мг/мл соответствующего Аг и инкубировали в течение 12 ч при 4°С. ЛПС, ЭПСІ и КПСІ связывались с подложкой за счет электростатического взаимодействия. Неспецифичное связывание исключали блокированием в течение 1 ч пространства на стенках планшета, не занятого Аг, 2%-ным раствором БСА в фосфатно-солевом буфере. Затем в лунку вносили 200 мкл фаговой библиотеки в солевом буфере с твином (TBS-T) и после инкубации в течение 12 ч при 4°С планшет трехкратно отмывали этим буфером. Связавшиеся фаговые частицы элюировали 0.1 М глицин-HCl-буфером, pH 2.5, и использовали для инфицирования клеток E. coli штамма XL-1 Blue.

Аликвоты объемом 200 мкл с плотностью клеток *E. coli* штамм XL 1 Blue не менее 10¹² кл./мл высевали на чашки Петри с ТҮЕ агаром, в который добавляли антибиотики: тетрациклин, ампицилин и канамицин для предотвращения заражения *E. coli* хелперными и библиотечными фагами. Клетки культивировали в течение 18 ч при 37°С. Рост *E. coli* отмечался только на среде с тетрациклином. Отбирали единичную колонию *E. coli* и высевали на питательную среду 2ТҮ, после чего культивировали в течение ночи на термошейкере для достижения экспоненциальной фазы роста бактерий при 37°С. После этого культуру (из расчета 1 часть культуры на 5 частей среды) высевали на свежую питательную среду 2ТУ и культивировали в течение 4 ч при 37°С. Культуру помещали в термостат на 30 мин при 37°С без перемешивания для образования F-пилей. Далее E. coli заражали фаговой библиотекой и культивировали в течение 30 мин при 37°С. Затем высевали (из расчета 1 часть культуры на 5 частей среды) на свежую питательную среду 2ТҮ, содержащую 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампицилина, и культивировали в течение ночи при 37°С, после чего термостатиро-вали 30 мин при 37°С. В бактериальную культуру, полученную на предыдущем этапе, вносили 200 мкл 10¹¹ вирионов/мл фага М13К07 и инкубировали в течение 1.5 ч при 37°С. Клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 10 мин), осадок ресуспензировали в 2ТУ среде, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, 25 мкг/мл канамицина и 1.25 мкл/мл изопропил-β-D-тиогалактозида. Это позволило размножаться клеткам, содержащим как специфичный, так и вспомогательный (хелперный) фаг.

После инкубации клетки центрифугировали (1000 g, 10 мин), а к супернатанту, содержащему фаги, добавляли 1/5 объема ПЭГ/NaCl и инкубировали 1 ч при 4°С. Затем суспензию фаговых антител центрифугировали при 17000 g 20 мин и 4°С. Полученный осадок ресуспензировали в 3 мл 0.01 М фосфатно-солевого буфера (PBS). Фаговую суспензию диализовали в течение 24 ч против 0.01 M PBS. Полученные фаговые частицы использовали для последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях, но с уменьшением вдвое концентрации антигенов, как описано в работе [37] для увеличения специфичности фаговых антител. Было проведено 4 раунда селекции бактериофагов, при этом с каждым раундом вдвое уменьшалась концентрация Аг для увеличения специфичности Ат. Начальная концентрация Аг составляла 1 мг/мл.

Для количественной характеристики полученных Ат использовали соотношение $(A_{269}-A_{320}) \times 5 \times$ $\times 10^{14}/15$, где A_{320} – оптическая плотность суспензии при 320 нм и A_{269} – при 269 нм. Концентрацию фаговых частиц определяли из расчета $A_{269}-A_{320} = 30$ оптических единиц, что соответствовало 2 $\times 10^{14}$ вирионам/мл [38]. Концентрация фаговых антител составила 1.2 $\times 10^{13}$, 2.2 \times $\times 10^{13}$ и 2.6 s $\times 10^{13}$ вирионов/мл для ЛПС, КПСІ и ЭПСІ соответственно.

Титр сыворотки определяли с помощью ИФА по общепринятой методике [39]. Измерение проводили на Specord BS-250 UV ("Analytic Jena", Германия) при 490 нм. Титр полученных фаговых мини-Ат составил 1 : 4000. Дот-иммуноанализ. Для дот-анализа использовали мембрану Western S ("Sigma-Aldrich", США) и культуру клеток *H. seropedicae* Z78 с концентрацией 1.06×10^{11} кл./мл (по эталону мутности), как описано ранее [14].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Подготовку препаратов для электронномикроскопических снимков осуществляли при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 ("CarlZeiss", Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ, как описано в работе [34], в Центре коллективного пользования научным оборудованием, применяемым в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" ИБФРМ РАН.

Проведение электрооптического анализа клеточных суспензий. Перед проведением ЭО осуществляли трехкратную отмывку клеток всех используемых штаммов от культуральной среды центрифугированием (2800 g, 5 мин). Для этого использовали дистиллированную воду с электропроводностью 1.6-1.8 µS/см. Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HI 8733 ("HANNA", США). Полученную суспензию центрифугировали (1000 g, 1 мин) для устранения конгломератов. Оптическую плотность при А₆₇₀ полученного супернатанта доводили дистиллированной водой до значения ~0.42-0.45, что соответствовало 4.5 × 10⁸ и 1.6 × 10⁹ кл./мл для A. brasilense Sp245 и H. seropedicae Z78 соответственно. Ориентационные спектры клеток измеряли на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser ("EloSystemGbR", Германия). Параметры измерения: напряженность электрического поля (Е) 93.1 В/см, длина волны света 670 нм (относительно вакуума), время (t) приложения электрического поля 3.0 с. Объем измерительной ячейки составлял 1 мл. В экспериментах оперировали дискретным набором частот (f) ориентирующего электрического поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

Логарифмическая зависимость разности значений оптической плотности суспензии (δA), измеренной при распространении пучка неполяризованного света (I) вдоль и поперек направления электрического ориентирующего поля, была получена при последовательном изменении частоты радиоимпульсов. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток [16].

Для оценки взаимодействия антигенных детерминант микробных клеток с фаговыми антителами в измерительную ячейку к 1 мл суспензии *H. seropedicae* Z78 (1.6 × 10⁹ кл./мл) вносили 3 мкл м-Ат (1.2 × 10¹³, 2.2 × 10¹³ и 2.6 × 10¹³ вирионов/мл для ЛПС, КПСІ и ЭПСІ соответственно) и измеряли ЭО сигнал. При проведении исследований с клетками *A. brasilense* Sp245 условия экспериментов были аналогичными с *H. seropedicae* Z78, од-



Рис. 1. Схема измерения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО-анализа в моменты приложения электрического поля (I, хаотическая ориентация клеток), его выключения (II, клетки в ориентированном состоянии) и возвращения клеток в состояние с хаотической ориентацией (III).

нако количество клеток *A. brasilense* Sp245 в измерительной ячейке составляло 4.5×10^8 кл./мл.

Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010. Доверительные интервалы определены для надежности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная оболочка бактерий представляет собой сложную структуру с экспонированными на поверхности углеводными остатками, защищающую и в то же время осуществляющую взаимодействие клетки с окружающей внешней средой. Многие микроорганизмы образуют капсулы вокруг своих клеточных стенок и выделяют специфическую слизь, в которой происходят межклеточные взаимодействия. Бактериальные капсулы содержат КПС, тогда как микробная слизь состоит из ЭПС. Структурное разнообразие позволяет ЭПС и КПС функционировать в клеточных взаимодействиях в качестве сигнальных молекул [23, 40, 41]. Наряду с КПС и ЭПС, к основным поверхностным антигенам относятся ЛПС. Они участвуют в процессах адгезии, механизмах узнавания чужеродных объектов и индукции защитных реакций макропартнера. Однако данные, касающиеся состава экстраклеточных, капсульных и мембранных гликополимеров Herbaspirillum, фрагментарны [42, 43].

Для изучения различной экспонированности углеводных антигенных детерминант бактериальной поверхности с помощью метода ЭО анализа использовали штамм *H. seropedicae* Z78. Суть метода ЭО анализа микробных суспензий заключалась в измерении вариаций их оптических свойств при воздействии на суспендированные клетки переменного электрического поля. Электрическое поле на границах смежных клеточных структур вызывало появление в нем индуцированных зарядов. Их величина зависела от электрических свойств смежных структур, и, в частности, от параметров слоя поверхностного взаимодействия [15]. Регистрируемый ЭО сигнал можно охарактеризовать двумя параметрами: его стационарной величиной после завершения ориентационных процессов ΔA и формой релаксационной кривой (рис. 1). Ранее было показано, что бактерии *H. seropedi*-

Ранее было показано, что бактерии *H. seropedicae* Z78 выделяют два экстраклеточных гликополимера липополисахаридной природы. Один из них сохраняет связь с поверхностью клетки и обнаруживается в капсуле – КПСІ, а второй, ЭПСІ, выделяется бактериями в культуральную жидкость. При этом эти полимеры отличаются как составом моносахаридов, так составом и соотношением жирных кислот [33]. Детальная характеристика КПСІ, ЭПСІ и ЛПС *H. seropedicae* Z78 представлена в работах [33, 35].

В предыдущей работе было показано, что поликлональные кроличьи Ат к очищенному препарату ЛПС не проявляли специфичности ни к одному из изученных Аг, в том числе гомологичному [44]. В связи с трудностями, возникшими при получении поликлональных кроличьих Ат, была проведена селекция фаговых антител к очищенным индивидуальным препаратам ЭПСІ, КПСІ и



Рис. 2. Изменение величины ЭО-сигнала суспензии клеток *H. seropedicae* Z78 при взаимодействии с м-Ат_{ЛПС} (а), м-Ат_{КПСI} (б) и м-Ат_{ЭПСI} (в): *1* (контроль) – суспензии клеток без добавления м-Ат ; 2 – после добавления м-Ат.

ЛПС клеток *H. seropedicae* Z78 (м-Ат_{ЭПСI}, м-Ат_{КПСI} и м-Ат_{ЛПС}). Их подробные характеристики приведены в работе [44].

Увеличение специфичности фаговых антител оценивали с помощью ИФА. На одном уровне с гомологичным Аг взаимодействовали м-Ат_{ЛПС}. Также отмечалось их взаимодействие с КПСІ. ЭПСІ отличались очень слабым (почти на уровне контроля) взаимодействием с м-Ат_{ЛПС}. В то время как м-Ат_{ЭПСI} взаимодействовал со всеми выделенными гликополимерами *H. seropedicae* Z78, при этом реакция с гомологичным Аг оказалась слабее, чем с КПСІ, а с ЛПС – сильнее, чем КПСІ.

Было показано, что м-Ат_{КПСІ} взаимодействовали со всеми Аг *H. seropedicae* Z78, однако максимально с ЛПС. Результаты анализа полученных данных указывали на сложную природу полисахаридсодержащих Аг поверхности *H. seropedicae* Z78. Можно предположить, что ЛПС и КПСІ обладают индивидуальными антенными детерминантами, которые узнаются м-Ат_{ЛПС}, но отсутствуют в ЭПСІ.

В предыдущей работе [15] была показана общая закономерность, заключающаяся в неизменности электрооптических параметров клеточной суспензии при отсутствии специфичного взаимодействия действующего агента с бактериальными клетками. В то же время связывание агента со строго определенной антигенной детерминантой клеток приводила к выраженному изменению величины электрооптического сигнала [15]. Тем не менее не было очевидным получение аналогичных закономерностей изменения ЭО-параметров при использовании фаговых антител, специфичных к различным антигенным детерминантам (ЭПСІ, КПСІ и ЛПС) микробных клеток.

ЭО-датчиком оценивали взаимодействие антигенных детерминант клеток *H. seropedicae* Z78 с соответствующими фаговыми Aт. При анализе полученных данных решающей является разница величины ЭО-сигнала между контролем (клетки без добавления специфичных AT) и экспериментом (клетки с добавлением AT). Показано (рис. 2а), что при взаимодействии клеток *H. seropedicae* Z78 с м-Aт_{ЛПС} величина ЭО-сигнала изменялась на 79% по сравнению с контролем (клетки без добавления AT). Для удобства расчета полученных результатов использовали величины значений ЭО-сигнала суспензии клеток при частоте ориентирующего поля 1000 кГц.

Помимо электрооптических данных об аффинности взаимодействия клеток *H. seropedicae* Z78 с м-Ат_{ЛПС} методом электронной микроскопии визуализировали образование иммунных комплексов. Результаты, приведенные на рис. 36, подтвердили высокий уровень взаимодействия м-Ат_{ЛПС} с клетками данного штамма. Дополни-



Рис. 3. ПЭМ клеток *H. seropedicae* Z78 (×10 000) без Ат (а) и после инкубации с м-Ат_{ЛПС} (б), м-Ат_{КПСІ} (в) и м-Ат_{ЭПСІ} (г), меченными коллоидным золотом.

тельно на рис. За представлена фотография клеток *H. seropedicae* Z78 без Ат.

При изучении взаимодействия м-Ат_{КПСІ} с клетками *H. seropedicae* Z78 (рис. 26) было зафиксировано изменение величины ЭО-сигнала на 66% по сравнению с контролем (клетки без добавления Ат), то есть м-Ат_{КПСІ} взаимодействовали с соответствующими Аг детерминантами клеточной поверхности. Электронно-микроскопический анализ также выявил высокую степень взаимодействия м-Ат_{КПСІ} с клетками *H. seropediсае* Z78 (рис. 3в).

При оценке взаимодействия м-Ат_{ЭПСІ} с клетками *H. seropedicae* Z78 при использовании значений на частотах 740 и 1000 кГц были зафиксированы изменения ЭО-параметров в диапазоне 4%, а на остальных частотах их изменений практически не наблюдали (рис. 2в). Можно предположить, что это связано со структурными различиями мембранных и экстраклеточных липополисахаридов. На рис. Зг представлены результаты электронной микроскопии, демонстрирующие отсутствие взаимодействия клеток с м-Ат_{ЭПСІ}. Полисахаридные части ЛПС и КПСІ состояли, помимо галактозы, глюкозы и глюкозамина, из остатков полиспиртов эритрита и глицерина. В то время как в составе ЭПСІ помимо указанных сахаров присутствовали только остатки глицерина. Мажорным компонентом ЭПСІ была глюкоза [33]. В отличие от ЛПС и КПСІ, расположенных вблизи и на поверхности внешней мембраны клеточной стенки, ЭПСІ секретируется бактериальной клеткой в окружающую среду, поэтому антигенные детерминанты, соответствующие этому полисахариду, могут полностью отсутствовать на клеточной поверхности.

На основании ранее проведенных измерений, регистрирующих взаимодействия Ат с микробными клетками, можно было ориентировочно определить критерий специфичного взаимодействия как изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток на величину не менее ~5% при добавлении в суспензию клеток м-Ат. При анализе полученных данных решающей становится разница величин ЭО-сигнала между контролем (клетки без добавления специфичных м-Ат) и экспериментом (клетки с добавлением м-Ат).

том 56 № 1 2020

м-Ат	Микроорганизмы			
	H. seropedicae Z78		A. brasilenseSp245	
	дот-анализ	ЭО-анализ	дот-анализ	ЭО-анализ
м-Ат _{ЛПС}	+*	+	—	—
м-Ат _{КПСІ}	+	+	—	_
м-Ат _{ЭПСІ}	—	—	—	—

Таблица 1. Выявление взаимодействия м-Ат с клетками методами дот-анализа и электрооптического анализа суспензий микробов

* "+"/"-" – наличие/отсутствие четкого взаимодействия в дот-анализе, а также наличие/отсутствие разницы в сигнале между контролем и экспериментом при ЭО-анализе.

Данные, представленные на рис. 2, показали, что при взаимодействии м-Ат_{ЭПСІ} с клетками *H. sero*pedicae Z78 изменения ЭО-параметров зафиксировались в диапазоне 4% при использовании значений на частотах 740 и 1000 кГц, а на остальных частотах они практически отсутствовали. Для исключения ложноположительных результатов на основании ранее проведенных многократных измерений с привлечением микробных клеток других штаммов, был выработан критерий специфического взаимодействия, как изменение величины ЭО-сигнала суспензии клеток на величину не менее ~5% при внесении в суспензию специфичных антител. Указанный порог разграничивал лишь конкретные иммунохимические реакции, изученные в этой работе. Данный критерий может быть применен для тех препаратов, в которых распознаваемые бактерии присутствовали в смеси с другими бактериями или иными примесями, влияющими на A_{670} и, соответственно, определяющими их разведение. Необходимо отметить, что для определения критерия следовало принимать во внимание значение сигнала не на одной частоте, а на всем используемом наборе частот.

На следующем этапе проверялась активность м- $AT_{ЛПС}$, м- $AT_{KПСI}$ и м- $AT_{ЭПСI}$ по отношению к представителю других почвенных азотфиксирующих бактерий *A. brasilense* Sp245. Выбор этой культуры был обусловлен достаточно полным описанием ее серологических и иммунохимических свойств, что позволило корректно интерпретировать полученные результаты.

Специфичные изменения ЭО-параметров клеточных суспензий штамма Sp245 при воздействии м-Ат_{ЛПС}, м-Ат_{КПСІ} и м-Ат_{ЭПСІ} не были зафиксированы. Сравнение результатов ЭО- и дот-иммуноанализа показало совпадение данных, полученных двумя независимыми методами (табл. 1).

Поскольку данные ЭО-анализа микробных суспензий были подтверждены стандартными методами дот-анализа и электронной микроскопией, можно было утверждать, что м-Ат_{ЛПС} и м-Ат_{КПСI} взаимодействовали с клетками *H. sero*-

pedicae Z78, а м- $AT_{\Theta \Pi CI}$ нет. При этом все изученные м-AT не взаимодействовали с клетками *A. brasilense* Sp245.

В предыдущей работе [44] было показано, что в моносахаридном составе ЛПС и КПСІ присутствуют рамноза, глюкозамин и галактозамин, которые могут входить и в состав АгД этих гликанов. Это объясняет взаимодействие м-Ат_{лпс}, м-Аткпсі не только с гомологичными Аг, но и перекрестные реакции с ЛПС и КПСІ. Можно предположить, что из-за отсутствия в составе ЭПСІ рамнозы и присутствия глюкозамина и галактозамина лишь в следовых количествах не наблюдалось их реакции с м-Атлпс, а взаимодействие м-Атэпсі с ЛПС и КПСІ объяснялось присутствием в составе указанных Аг глюкозы и галактозы. На основании всего выше изложенного можно предположить, что м-Атлпс должны проявлять большую специфичность к детерминантам, содержащим рамнозу, глюкозамин и галактозамин, м-Ат_{ЭПСІ} – к детерминатам, содержащим глюкозу и галактозу, а м-Ат_{КПСІ} – к детерминантам, несущим в равной степени и те, и другие сахара.

В работе на примере фаговых антител (м-Ат_{эпсі}, м-Ат_{кпсі} и м-Ат_{лпс}) к различным антигенным детерминантам клеточной поверхности H. seropediсае Z78 показана возможность регистрации ЭОдатчиком взаимодействия Ат с комплементарными антигенами (ЭПСІ, КПСІ и ЛПС). Установлено, что специфичные изменения ЭО-параметров клеточных суспензий при их взаимодействии с фаговыми Ат происходили только у микробных клеток, обладающих соответствующими Аг-детерминантами. Таким образом, ЭО-анализатор позволил отличать ситуации, когда бактериальные клетки взаимодействовали со специфичными фаговыми Ат, и контрольные эксперименты, когда такое взаимодействие отсутствовало. Следует отметить, что с помощью предлагаемого анализа детектировались именно микробные клетки с экспонированными на их поверхности антигенами, а не антигены.

Принципиальными преимуществами предлагаемого подхода являются его оперативность (время анализа составляло около 5 мин), отсутствие необходимости дополнительной иммобилизации компонентов и возможность многократного использования датчика.

Адаптация электрооптического метода для анализа потенциально опасных для человека микроорганизмов открывает возможность скрининогового выявления идентичных антигенных детерминант в образцах, структуры которых еще не были изучены, и соотносить их с образцами полисахаридов известного строения. Результаты представляют интерес с практической точки зрения для создания экспресс-метода оценки бимолекулярной реакции Аг—Ат и могут служить основой при создании теста для быстрого обнаружения бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L., Dobereiner J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. № 1. P. 86–93.
- Falk E.C., Johnson J.L., Baldani V.L.D., Dobereiner J., Krieg N.R. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. № 1. P. 80–85.
- Pedrosa F.O., Benelli E.M., Yates M.G., Wassem R., Monteiro R.A., Klassen G., Steffens M.B., Souza E.M., Chubatsu L.S., Rigo L.U. // J. Biotechnol. 2001. V. 91. № 1–2. P. 189–195.
- Ding L., Yokota A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004.
 V. 54. № 6. P. 2223–2230.
- James E.K., Olivares F.L. // Crit. Rev. Plant Sci. 1997.
 V. 17. № 1. P. 77–119
- Boddey R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani V.L.D., Döbereiner J. // Plant Soil. 1995. V. 174. № 1–2. P. 195–209.
- Rothballer M., Schmid M., Klein I., Gattinger A., Grudmann S., Hartmann A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. № 6. P. 1341–1348.
- Baldani J.I., Pot B., Kirchhof G., Falsen E., Baldani V.L., Olivares F.L., Hoste B., Kersters K., Hartmann A., Gillis M., Döbereiner J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 3. P. 802–810.
- Tan M., Oehler R. // Infect. Dis. Clin. Pract. 2005. V. 13. № 5. P. 277–279.
- Coenye T., Goris J., Spilker T., Vandamme P., LiPuma J.J. // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. № 6. P. 2062–2069.
- Spilker T., Uluer A.Z., Marty F.M., Yeh W.W., Levison J.H., Vandamme P., Lipuma J.J. // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46. № 8. P. 2774–2777.
- 12. *Chen J., Su Z., Liu Y., Sandoghchian S., Zheng D., Wang S., Xu H.* // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 1. P. 331–333.
- 13. Ziga E.D., Druley T., Burnham C.A. // J. Clin. Microbiol. 2010. V. 48. № 11. P. 4320–4321.
- 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. // J. Immunoassay. Immunochem. 2012. V. 33. № 2. P. 115–127.
- 15. *Guliy O.I., Bunin V.D., Korzhenevich V.I., Ignatov O.V. //* Curr. Immun. Rev. 2017. V. 13. № 2. P. 153–162.

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Bunin V.D., Voloshin A.G. // J. Colloid. Interface Sci. 1996. V. 180. № 1. P. 122–126.
- Мирошников А.В., Фомченков В.М., Иванов А.Ю.
 Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука, 1986. 185 с.
- Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Voloshin A.G., Dykman L.A., O'Neil D., Ivnitski D. // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 19. № 2. P. 1759–1761.
- Guliy O.I., Matora L.Yu., Burygin G.L., Dykman L.A., Ostudin N.A., Bunin V.D., Ignatov V.V., Ignatov O.V. // Anal. Biochem. 2007. V. 370. № 2. P. 201–205.
- 20. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V.// FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. № 2. P. 93–99.
- 21. Смолькина О.Н., Качала В.В., Федоненко Ю.П., Бурыгин Г.Л., Здоровенко Э.Л., Матора Л.Ю., Коннова С.А., Игнатов В.В. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 5. С. 707-716.
- Здоровенко Г.М. // Микробиол. журн. 1988. Т. 50. № 4. С. 98–107.
- 23. *Оводов Ю.С. //* Биохимия. 2006. Т. 71. № 9. С. 1155– 1174.
- 24. *Hols O., Ulme A.J., Brade H., Fla H-D., Rietsche E.T. //* FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996. V. 16. № 2. P. 83–104.
- Mora L., Newton W.E. New Horizons in Nitrogen fixation / Ed. B. Eckert. Dordrecht: Kluwer acad. pub., 2008. 705 p.
- 26. Saunder N.J., Pede J.F., Hoo D.W., Moxon E.R. // Mol. Microbiol. 1998. V. 27. № 6. P. 1091–1098.
- 27. Kannenberg E.L., Carlson R.W. // Mol. Microbial. 2001. V. 39. № 2. P. 379–391.
- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.
- 29. *Smith G.P., Petrenko V.A.* // Chem. Rev. 1997. V. 97. № 2. P. 391–410.
- 30. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J.* // Nature. 1990. V. 348. № 6301. P. 552–554.
- Nanduri V., Sorokulova I.B., Samoylov A.M., Simonian A.L., Petrenko V.A., Vodyanoy V. // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 22. № 6. P. 986–992.
- 32. *Paoli G.C., Chen C.Y., Brewster J.D.* // Immunol. Methods. 2004. V. 289. № 1–2. P. 147–155.
- Смолькина О.Н., Шишонкова (Величко) Н.С., Юрасов Н.А., Игнатов В.В. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 345–352.
- Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A., Staroverov S.A., Fomin A.S. // Talanta. 2018. V. 178. P. 569–576.
- Величко Н.С., Суркина А.К., Федоненко Ю.П., Здоровенко Э.Л., Коннова С.А. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 511–518.
- 36. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J. // J. Immunol. 2000. V.164. № 9-12. P. 6221–6229.
- Griep R.A., van Twisk C., van Beckhoven J.R., van der Wolf J.M., Schots A. // Phytopathology. 1998. V. 88. № 8. P.795–803.
- Smith G.P., Scott J.K. // Meth. Enzymol. 1993. V. 217. P. 228–257.

том 56 № 1 2020

- 39. *Beatty J.D., Beatty B.G. and Vlahos W.G.* // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. № 1–2. P. 173–179.
- Jiang C.H., Fan Z.H., Xie P., Guo J.H. // Front. Microbiol. 2016. V. 7:664. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00664
- Maruzani R., Sutton G., Nocerino P., Marvasi M. // J. Microbiol. 2019 V. 57. № 1. P. 1–8.
- 42. Serrato R.V., Sassaki G.L., Cruz L.M., Carlson R.W., Muszyński A., Monteiro R.A., Pedrosa F.O., Souza E.M.,

Iacomini M. // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56. № 4. P. 342–347.

- 43. Balsanelli E., Tuleski T.R., de Baura V.A., Yates M.G., Chubatsu L.S., Pedrosa Fde O., de Souza E.M., Monteiro R.A. // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. P. e77001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077001
- 44. Velichko N.S, Fedonenko Yu.P. // Ann. Microbiol. 2019.
 V. 69. № 7. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01490-7

Analysis the Interaction of the Phage Antibodies with Complete Antigens of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 Cells by an Electro-Optical Sensor

O. I. Guliy^{*a*, *b*, *, N. S. Velichko^{*a*}, Yu. P. Fedonenko^{*a*}, and V. D. Bunin^{*c*}}

^a Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia ^bSaratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia

^cEloSystem GbR, Berlin, 13407 Germany

*e-mail: guliy olga@mail.ru

Received Jine 06, 2019; revised Avgust 23, 2019; accepted August 30, 2019

By using the electro optical analysis and phage antibodies to the main antigens of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 cells (EPSI, KPSI and LPS) for the first time were evaluated their complementary interactions in the antigen– antibody system. It was shown that the electro-optical analyzer allows one to distinguishes between the presence/absence of a specific interaction the phage antibodies with the main epitopes of the bacterial surface. The revealed patterns of the changes in the electrophysical parameters are in good agreement with the component composition of *Herbaspirillum* antigens, their topographic distribution, and are also confirmed by electron microscopy and dot-analysis. The applicability of the electro-optical analysis is demonstrated for the detection of *Herbaspirillum* spp. The results can serve as the basis for creating a test for the rapid detection these microorganisms.

Keywords: phage antibodies, lipopolysaccharide, extracellular lipopolysaccharide, electro-optical sensor, detection