УДК 534.231.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФАГОВЫМИ МИНИ-АНТИТЕЛАМИ ДАТЧИКОМ НА ОСНОВЕ РЕЗОНАТОРА С ПОПЕРЕЧНЫМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ ИЗ ПЬЕЗОКЕРАМИКИ ЦТС-19

© 2021 г. И. А. Бородина^{1,} *, Б. Д. Зайцев¹, А. А. Теплых¹, А. К. М. Алсовэйди², О. С. Ларионова³, О. И. Гулий^{3, 4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова Российской академии наук, Саратовский филиал, Саратов, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского", Саратов, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия ⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия *E-mail: borodinaia@vandex.ru

> Поступила в редакцию 09.12.2020 г. После доработки 25.01.2021 г. Принята к публикации 26.02.2021 г.

Описывается конструкция датчика на основе акустического резонатора с поперечным электрическим полем, изготовленного из пьезокерамики ЦТС-19 для экспресс-анализа микробных клеток. Показана возможность обнаружения и идентификации микробных клеток путем регистрации их специфического взаимодействия с фаговыми мини-антителами непосредственно в суспензии. Время анализа не превышает 5 мин.

DOI: 10.31857/S0367676521060065

введение

Определение микробных клеток в объектах окружающей среды, в том числе в водной среде, с помощью биосенсорных систем является одним из актуальных направлений в настоящее время. Основными требованиями к биосенсорам являются быстродействие, высокая чувствительность и точность полученного результата [1]. Этим требованиям вполне удовлетворяют акустические датчики, обладающие высокой чувствительностью и позволяющие проводить анализ биологических взаимодействий за короткое время [2-4]. Среди большого количества акустических биологических датчиков можно выделить датчики на основе пьезоэлектрических резонаторов с поперечным электрическим полем [5-10]. Такие резонаторы представляют особый интерес для исследования свойств различных жидкостей, поскольку в них отсутствует контакт исследуемого материала с металлическими электродами. Наличие свободной от электродов поверхности позволяет датчику реагировать не только на механические свойства исследуемого образца (вязкость), но и на его электрические свойства (проводимость).

Ранее коллективом авторов были разработаны акустические биологические и жидкостные датчики на основе резонатора с поперечным электрическим полем с продольной акустической волной, изготовленного из пластины ниобата лития [8–11]. Была показана перспективность таких датчиков для обнаружения и идентификации микробных клеток при их взаимодействии со специфичными антителами непосредственно в суспензии [10]. Однако резонатор из пластины ниобата лития имел низкую добротность при контакте с жидкостью, поскольку возбуждение продольной волны в таком резонаторе приводило к радиационным потерям в жидкости. Таким образом, проблема повышения чувствительности таких датчиков при контакте с жидкостью остается актуальной.



Рис. 1. Схема датчика (*a*), частотные зависимости реальной (*б*) и мнимой (*в*) частей электрического импеданса датчика с пустым контейнером.

Для повышения чувствительности акустического биологического датчика при обнаружении и идентификации бактерий существует, по крайней мере, два подхода. Первый подход заключается в разработке акустической системы, обладающей высокой чувствительностью к изменению характеристик клеточной суспензии вследствие специфического биологического взаимодействия. Второй подход состоит в выборе наиболее чувствительного биологического реагента.

В данной работе в качестве чувствительной акустической сенсорной системы был использован датчик на основе акустического резонатора с поперечным электрическим полем, изготовленный из пластины керамики ЦТС-19. Такой выбор обусловлен тем, что в датчике преобладала сдвиговая составляющая механического смещения, которая не приводила к радиационным потерям при контакте с жидкостью. Кроме того, пьезокерамика обладает более высоким коэффициентом электромеханической связи по сравнению с ниобатом лития [12]. Для реализации второго подхода в качестве чувствительного реагента использовали фаговые мини-антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея. Известно, что фаговые мини-антитела обладают хорошей специфичностью к микробным клеткам [13]. Помимо этого, использование технологии фагового дисплея для получения мини-антител, имеет ряд преимуществ. Во-первых, технология основана на простых процедурах манипулирования с ДНК и бактериями, что значительно сокращает время получения и стоимость стабильных клонов [14, 15]. Во-вторых, данный метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации и дорогих сред.

Цель работы — экспериментальное исследование датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем, изготовленного из пластины керамики ЦТС-19, для обнаружения и идентификации микробных клеток при их взаимодействии с фаговыми мини-антителами.

ОПИСАНИЕ ДАТЧИКА И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Датчик представлял собой резонатор с поперечным электрическим полем на основе керамической пластины ЦТС-19 толщиной 3.54 мм и поперечными размерами 20 × 18 мм² (рис. 1*a*). Одна сторона пластины была покрыта алюминиевой пленкой с зазором в центре шириной 4 мм, т.е., обе половины покрытия использовались как электроды. Этот резонатор служил основанием жидкостного контейнера объемом 4 мл.

Для проведения исследований резонатор подключался к анализатору импедансов E4990A (Keysight Technologies), с помощью которого измерялись действительная и мнимая части электрического импеданса резонатора в диапазоне частот 50–300 кГц.

Сначала были изучены характеристики резонатора с пустым контейнером и с дистиллированной водой. Затем в контейнер помещали дистиллированную воду с микробными клетками и измеряли частотную зависимость электрического импеданса датчика. На последнем этапе в контейнер с клеточной суспензией добавляли специфичные или неспецифичные мини-антитела и наблюдали за изменениями параметров датчика. Измерения проводили для различной концентрации клеток, а также при различном количестве мини-антител, добавляемых в клеточную суспензию.

Принцип работы датчика заключался в изменении реальной и мнимой частей электрического импеданса при изменении проводимости суспензии клеток вследствие биологического взаимодействия микробных клеток со специфичными фаговыми мини-антителами.

В работе использовали культуры бактерий Azospirillum brasilense Sp245 (IBPPM 219) и Escherichia coli XL-1 (IBPPM 632), полученные из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http://collection.ibppm.ru).

Микробные клетки обоих штаммов выращивали на жидкой питательной среде LB (Luria– Bertani's), как описано в [16]. Перед проведением анализа клетки отмывали в дистиллированной воде трехкратным центрифугированием при 2800 g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом объеме воды (электропроводность 1.8 мкСм/см). Оптическую плотность подготовленной бактериальной суспензии доводили до значений D_{660} 0.4–0.42, что соответствовало концентрации 4.5 × 10⁸ кл/мл.

Аффинную селекцию мини-антител из фаговой библиотеки проводили по разработанной ранее методике [16]. Раунды аффинной селекции (биопаннинга), усиливающие селектированную библиотеку, повторялись 4 раза. Специфичность полученных препаратов определяли методом дотанализа и методом иммуно-ферментного анализа.

Концентрацию фаговых частиц определяли методом спектрофотометрии в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" (ИБФРМ РАН), используя соотношение: *А*269–*А*320, что составляло ~1.2 × 10¹³ вирионов/мл.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

При измерении параметров датчика с пустым контейнером наблюдалось три резонансных пика на частотных зависимостях действительной (R) (рис. 1 δ) и мнимой (X) (рис. 1e) частей электрического импеданса резонатора. После добавления в контейнер дистиллированной воды было обнаружено, что добротность каждого резонанса при контакте с жидкостью значительно выше добротности резонатора с продольной акустической волной на основе пластины ниобата лития [8–11].

Затем в контейнер добавляли дистиллированную воду с микробными клетками штамма Sp245 с различной концентрацией (10^3 , 10^4 , 10^6 , 10^8 кл/мл). Было показано, что добавление к воде микробных клеток с концентрацией 10^3-10^6 практически не влияло на частотные зависимости электрического импеданса. Добавление клеток с концентрацией 10^8 кл/мл приводило к уменьшению сигнала датчика. Это объясняется увеличением проводимости клеточной суспензии по сравнению с дистиллированной водой при добавлении клеток с большой концентрацией [17].

На следующем этапе к клеточной суспензии добавляли специфичные фаговые мини-антитела. Измерения проводились для разного количества мини-антител при заданном значении концентрации клеток. В суспензию клеток вносили 1. 2. 4 и 6 мкл мини-антител на 1 мл клеточной суспензии. Было показано, что добавление к клеткам штамма Sp245 специфичных мини-антител приводит к существенному уменьшению реальной и мнимой частей электрического импеданса. Ранее было показано, что в качестве информативного параметра для измерения проводимости и вязкости жидкости более предпочтительным является использование действительной части электрического импеданса резонатора на резонансной частоте [9]. Поэтому в данной работе мы также использовали этот параметр в качестве аналитического сигнала.

Следует отметить, что поведение всех резонансных пиков было одинаковым, поэтому далее приводятся данные на примере одного резонансного пика вблизи частоты 97 кГц.

На рис. 2*а* в качестве примера приведены частотные зависимости реальной части электрического импеданса датчика для суспензии клеток *A. brasilense Sp*245 до (кривая *I*) и после (кривая *2*) добавления специфичных мини-антител. Данные приведены для концентрации клеток 10⁶ кл/мл при добавлении в клеточную суспензию мини-антител в количестве 6 мкл/мл.

Видно, что величина реальной части электрического импеданса резонатора уменьшилась более чем в два раза (на 80 кОм) после добавления специфичных мини-антител. Наблюдаемое изменение параметров датчика произошло благодаря увеличению проводимости суспензии клеток вследствие специфического биологического взаимодействия микробных клеток со специфичными к ним реагентами [8, 10].

Одним из основных моментов при развитии методов обнаружения и идентификации микробных клеток является исключение неспецифичного взаимодействия мини-антител, специфичных к штамму Sp245, с клетками других штаммов. Для контрольных экспериментов использовали бактерии E. coli XL-1. Выбор данной культуры обусловлен близкими размерами с клетками штамма Sp245 и иным таксономическим положением штамма. Условия проведения эксперимента с неспецифическим взаимодействием микробных клеток с мини-антителами были аналогичны вышеописанным, только в измерительную ячейку вносили бактерии штамма XL-1. Показано, что при внесении в суспензию клеток E. coli XL-1 ми-



Рис. 2. Частотные зависимости реальной части электрического импеданса резонатора (R) из керамики ЦТС-19: (a) контейнер с клетками штамма Sp245 до (кривая I) и после (кривая 2) добавления специфичных мини-антител; (b) контейнер с клетками E. coli XL-1 до (кривая I) и после (кривая 2) добавления неспецифичных мини-антител.



Рис. 3. (*a*) Зависимость ΔR_{max} резонатора из керамики ЦТС-19 от концентрации мини-антител (*m*), добавленных к суспензии клеток *A. brasilense Sp*245 для резонансного пика вблизи частоты 97.8 кГц. Концентрация клеток составляет 10⁶ кл/мл. (*б*) Зависимость ΔR_{max} резонатора из керамики ЦТС-19 от концентрации клеток *A. brasilense Sp*245 (*n*) для резонансного пика вблизи частоты 97.8 кГц при добавлении специфичных мини-антител в количестве 6 мкл/мл.

ни-антител, специфичных в отношении штамма Sp245, изменений электрического импеданса датчика не наблюдалось.

На рис. 26 приведены частотные зависимости реальной части электрического импеданса датчика для суспензии клеток *E. coli XL*-1 до (кривая *I*) и после (кривая 2) добавления неспецифичных к данному типу клеток мини-антител. Видно, что в этом случае параметры датчика практически не изменились. На основании измеренных частотных зависимостей реальной части электрического импеданса датчика, были построены зависимости изменения максимального значения действительной части электрического импеданса (ΔR_{max}) от концентрации мини-антител, добавляемых к клеточной суспензии. На рис. За в качестве примера приведены зависимости ΔR_{max} от количества мини-антител, добавляемых в суспензию клеток с концентрацией 10⁶ кл/мл. Видно, что с увеличением концен-

775

трации мини-антител значение ΔR_{max} увеличивается. Добавление мини-антител в количестве 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии приводит к изменению ΔR_{max} на 53 кОм. Наибольшее значение ΔR_{max} оказалось равным 80 кОм при добавлении мини-антител с концентрацией 6 мкл/мл.

Были также построены зависимости ΔR_{max} от концентрации клеток для фиксированного значения количества специфичных мини-антител. добавляемых к суспензии клеток. На рис. 36 в качестве примера представлена зависимость ΔR_{max} от концентрации клеток A. brasilense Sp245 при добавлении в контейнер с суспензией клеток специфичных мини-антител в количестве 6 мкл/мл. Видно, что наибольшее изменение R_{max} достигается при добавлении специфичных мини-антител к суспензии клеток с концентрацией 10³-10⁶ кл/мл и составляет порядка 70-80 кОм. Для концентрации клеток 10^8 кл/мл, ΔR_{max} становится существенно меньше (порядка 30 кОм). Это связано с тем, что добавление к дистиллированной воде клеток с концентрацией 10⁸ кл/мл приводит к некоторому увеличению проводимости суспензии клеток еще до добавления специфичных реагентов [17]. Последующее добавление специфичных мини-антител приводит к менее значительному изменению проводимости при специфическом биологическом взаимодействии и, как следствие, к менее значительному изменению параметров датчика.

Таким образом, показано, что значительные изменения реальной части электрического импеданса датчика при специфичных взаимодействиях микробных клеток *A. brasilense Sp*245 с фаговыми мини-антителами наблюдались даже при небольшой концентрации клеток (10³ кл/мл) и малом количестве мини-антител (1 мкл/мл). При этом время анализа не превышало 5 минут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что взаимодействие микробных клеток *Azospirillum brasilense Sp*245 со специфичными фаговыми миниантителами приводит к существенному изменению электрического импеданса датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем из керамики ЦТС-19. Датчик обладает высокой чувствительностью и быстродействием. Время анализа не превышает 5 мин. Контрольные эксперименты по исследованию взаимодействий микробных клеток *E. coli XL*-1 с неспецифичными реагентами показали отсутствие изменений электрического импеданса датчика. Полученные результаты показали перспективность применения датчика на основе резонатора с поперечным электрическим полем, из пластины керамики ЦТС-19, не только для обнаружения, но и для идентификации бактерий.

Работа выполнена при частичном финансировании Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания, и при частичном финансировании РФФИ (проекты № 19-07-00304а и 20-07-00602а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen S., Cheng Y.F. // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 2. No. 6. P. 97.
- Andrä J., Böhling A., Gronewold T.M.A. et al. // Langmuir. 2008. V. 24. No. 16. P. 9148.
- Don E., Farafonova O., Pokhil S. et al. // Sensors. 2016. V. 16. No. 1. P. 96.
- Andle J.C., Vetelino J.F. // Sens. Actuat. A. 1994. V. 44. No. 3. P. 167.
- Wark M., Kalanyan B., Ellis L. // Proc. 2007 IEEE Ultrason. Symp. 2007. P. 1217.
- Handa H., Gurczynski S., Jackson M.P. et al. // Surf. Sci. 2008. V. 602. P. 1393.
- Vetelino J.F. // Proc. 2010 IEEE Ultrason. Symp. 2010. P. 2269.
- Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M. et al. // Trans. Ultrason. Ferroel. Freq. Contr. 2012. V. 59. No. 5. P. 963.
- 9. Zaitsev B.D., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A. et al. // Ultrason. 2015. V. 63. P. 179.
- Guliy O.I., Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E. et al. // Microbiol. 2013. V. 82. No. 2. P. 215.
- Зайцев Б.Д., Шихабудинов А.М., Теплых А.А. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2016. Т. 80. № 10. С. 1350; Zaitsev B.D., Shikhabudinov А.М., Teplykh А.А. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2016. V. 80. No. 10. P. 1218.
- 12. *Ibrahim S., Ramadan R., Mohamed A.* Piezoelectric ceramic materials. Saarbrucken: Lap Lambert Academic Publishing GmbH & Company KG, 2011. 116 p.
- Nanduri V., Sorokulova I.B., Samoylov A.M. et al. // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 22. P. 986.
- 14. Smith G.P., Petrenko V.A. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 391.
- 15. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G. et al.* // Nature. 1990. V. 348. P. 552.
- Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. et al. // Talanta. 2018. V. 78. P. 569.
- 17. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Teplykh A.A. et al. // Sensors. 2020.V. 20. No. 10. P. 3003.

БОРОДИНА и др.

Determination of a microbial cells in their interaction with phage mini-antibodies by the sensor based on a PZT resonator with a lateral electric field

I. A. Borodina^{*a*, *}, B. D. Zaitsev^{*a*}, A. A. Teplykh^{*a*}, A. K. M. Alsowaidi^{*b*}, O. S. Larionova^{*c*}, O. I. Guliy^{*c*, *d*}

^aKotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS, Saratov Branch, Saratov, 410019 Russia ^bChernyshevsky National Research State University, Saratov, 410012 Russia

^cSaratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia

^dInstitute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia *e-mail: borodinaia@vandex.ru

A sensor based on a PZT resonator with a lateral electric field for express analysis of microbial cells is presented. The possibility of detecting and identifying microbial cells by recording their specific interaction with phage mini-antibodies directly in suspension has been shown. The analysis time did not exceed 5 minutes.