

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

УДК 54.061,543.9,577.112.7

### ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2019 г. А. А. Исакова<sup>1, \*</sup>, И. В. Жарникова<sup>2</sup>, Т. В. Жарникова<sup>2</sup>, А. В. Инденбом<sup>1, 3, \*\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Россия 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4

<sup>2</sup>ФКУЗ “Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт” Роспотребнадзора, Россия 355035, Ставропольский край, Ставрополь, ул. Советская, 13–15

<sup>3</sup>ФГАОУВО “Московский физико-технический институт (государственный университет)”, Россия 141701, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*e-mail: Isakova\_Aleks@list.ru

\*\*e-mail: a.indenbom@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2017 г.

После доработки 21.09.2017 г.

Принята к публикации 17.10.2017 г.

Предложен способ регистрации возбудителя туляремии в водных растворах методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. Исследована кинетика иммобилизации антител к туляремии на поверхности позолоченных стеклянных чипов. На основании количественного анализа результатов делается вывод о преимущественно латеральной ориентации молекул антител на поверхности. Данный вывод подтверждается анализом сенсограмм последующего взаимодействия антиген-антитело. Показано, что предложенной методикой можно в течение нескольких минут достоверно определять наличие возбудителя туляремии в водных растворах с чувствительностью до  $1.0 \times 10^2$  м.к./мл. Предложены различные варианты усовершенствования данного метода регистрации возбудителя туляремии с целью повышения его чувствительности.

**Ключевые слова:** поверхностный плазменный резонанс, сенсоры, возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), антитела, адсорбция белков, поверхностная ориентация

**DOI:** 10.1134/S0044185619020104

#### ВВЕДЕНИЕ

Выявление антигенов и антител является важным направлением диагностики инфекционных заболеваний и специфической индикации патогенных агентов в объектах окружающей среды, клиническом материале, пищевых продуктах и т.д. Одной из опасных для человека инфекций является туляремия (малая чума). Это заболевание переносится грызунами и передается также при контакте со шкурами зараженных животных и водой. Болезнь сопровождается интоксикацией, лихорадкой, поражением лимфатических узлов. Возбудителем туляремии является мелкая бактерия *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), которая характеризуется высокой устойчивостью в окружающей среде, особенно при низких температурах и высокой влажности. Восприимчивость людей к туляремии составляет 100%, что означает, что каждый человек, перенесший контакт с возбудителем, заболевает. Порядка 70% всех пациентов заболевших туляремией являются городскими жителями, не прошедшими вакцинацию.

Распространению инфекции препятствует своевременное выявление ее очагов. В настоящее время для идентификации туляремии применяют ряд диагностических методов, наиболее известными среди которых являются иммуноферментный анализ (ИФА) и микрогравиметрический анализ [1–7]. В основе этих методов диагностики лежит высокоселективная биохимическая реакция “антиген-антитело”. Однако указанные методы имеют ряд существенных недостатков, в числе которых многостадийность и длительность процесса, необходимость введения дополнительных методов, достаточно высокая концентрация растворов антител (125 мкг/мл) и антигена ( $10^6$ – $10^4$  микробных клеток на мл (м.к./мл)), определяющие большой расход дорогостоящих реагентов.

Одним из новых перспективных методов для выявления антигенов является предлагаемый здесь метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в проточных ячейках, который позволяет с высокой чувствительностью регистрировать реакции “антиген-антитело” в режиме ре-

ального времени и характеризовать энергию возникающих взаимодействий. Для этого на поверхность ППР-сенсора (позолоченного стеклянного чипа) иммобилизуют антитела, которые впоследствии избирательно реагируют с антигеном. Данный метод чувствителен к изменениям, происходящим на расстояниях порядка 100 нм от поверхности чипа. В процессе осаждения антигена на поверхность ППР-сенсора в результате взаимодействия с антителами меняются оптические свойства (показатель преломления) приповерхностного слоя. В результате этого регистрируется сдвиг резонансной кривой ППР. Этот сдвиг пропорционален количеству частиц антигена, которые вошли в контакт со слоем антитела. Таким образом, измеряя величину сдвига минимума кривой ППР, можно количественно определять поверхностную концентрацию антител и наличие в растворах бактерий, вступающих в реакцию с находящимися на поверхности молекулами-мишенями, исследовать кинетику этих процессов и характеризовать прочность возникающих связей [8].

Очевидно, что для повышения точности и эффективности определения антигена необходимо, чтобы при создании на поверхности ППР-чипа слоя антител последние были нужным образом ориентированы. Воздействовать на пространственную ориентацию антител можно варьированием условий их адсорбции, в числе которых концентрация и pH-раствора, скорость потока, природа поверхности, ее структура и т.д. Одним из перспективных направлений является использование ориентирующего действия электрического поля, которое можно создавать с помощью внешнего источника напряжения [9–13].

В настоящей работе исследуется кинетика адсорбции антител на поверхности ППР-сенсоров, высказывается предположение об их пространственной ориентации, анализируется последующее взаимодействие с антигеном и обсуждаются преимущества применения метода ППР для выявления возбудителя туляремии.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Методики получения туляремийных антигенов

Водорастворимые туляремийные антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией и дезинтеграцией микроорганизмов: *F. tularensis* Miura, *F. tularensis* 890-Аз, *F. tularensis* 543/6, *F. tularensis* 503/840, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенных на желточной среде Мак-Коя в течение 24 ч при 37°C и инактивированных хлороформом. Экстракцию антигенных комплексов проводили 2.5% раствором хлорида натрия. Дезинтеграцию осуществляли под высоким давлением в X-прессе (Швеция) и ультразвуковым методом на аппарате УЗДН-2Т (Россия)

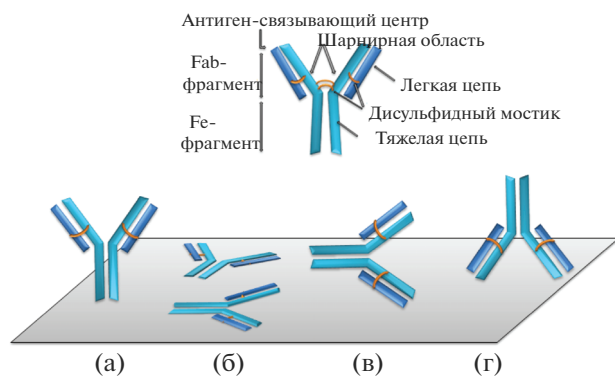
при частоте колебаний 22 кГц в течение 10 мин. О степени разрушения микробных клеток судили по изменению оптической плотности, по количеству белка в надосадочных жидкостях и микроскопически.

### 2.2. Получение иммунных сывороток крови животных и иммуноглобулинов

В работе использовали иммунные сыворотки туляремийные, полученные иммунизацией кроликов по схеме, разработанной И.С. Тюменцевой и Е.Н. Афанасьевым с иммуномодулятором феракрилом [14]. Для выделения иммуноглобулинов использовали метод фракционирования белковых смесей с использованием каприловой кислоты. В полученных сыворотках более 90% составляли иммуноглобулины (Ig) класса G.

### 2.3. Исследование адсорбции антител на поверхности золота

Исследование адсорбции антител IgG на поверхности золота проводили методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью ППР-спектрометра Biosuplar 6 (Mivitec, Германия) оснащенного плоской двухкамерной проточной ячейкой (размер каждой камеры примерно  $1 \times 0.5 \times 0.1$  см<sup>3</sup>). Перед проведением измерений проводили тщательную очистку поверхности ППР-чипов. Для этого их последовательно отмывали хлороформом, затем в течение 10–20 с обрабатывали в ультразвуковой ванне (ПСБ-Галс, Россия) с 96% этанолом, далее споласкивали дистиллированной водой и сушили при температуре 100°C. Исследуемые растворы прокачивали через обе камеры измерительной ячейки с помощью двухканального перистальтического насоса (BT100-1F, LONGER Precision Pump, КНР) со скоростью 960 мкл/мин (скорость ламинарного потока жидкости в ячейке около 19 см/мин). Предварительно через ячейку пропускали раствор фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH 7.4) до установления стабильного сигнала. После этого вводился раствор изучаемого биообъекта. Его адсорбция на поверхности чипа сопровождалась изменением оптических параметров поверхностного слоя жидкости, что приводило к росту сигнала ППР-спектрометра, измеряемого в условных единицах (RU). Растворы антитела и микробных клеток первые 1.5–2 мин после введения в систему пропускались на выход для полного установления необходимой концентрации в измерительной ячейке. После этого поток жидкости через ячейку пускали по замкнутому циклу. Для исследования обратимости взаимодействия вводимых веществ с поверхностью исследовалась кинетика десорбции в ответ на промывку системы исходным буферным раствором. Все измере-



**Рис. 1.** Схематическое изображение молекулы иммуноглобулина IgG и различные варианты их расположения на поверхности ППР-чипа: а, г – ортогонально, б – латеральное расположение молекулы, в – “на боковые стороны”, промежуточное положение.

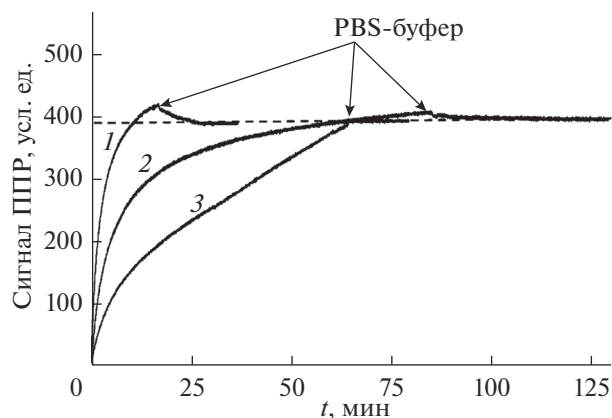
ния проводили в термостатируемом боксе при температуре 25°C.

Оценка поверхностной концентрации адсорбированных белков была проведена на основании сопоставления результатов исследования зависимости откликов приборов Biosuplar 6 и Bioscore T100 в ответ на одинаковое изменение концентрации (а, следовательно, и оптической плотности) пропускаемых через измерительные ячейки этих приборов растворов хлористого калия (KCl). В результате этих экспериментов было установлено, что величина сигнала 1 у.е. на Biosuplar 6 соответствует сигналу 6.5 RU на Bioscore T100. Согласно информации производителя последнего прибора, сигнал 1 RU соответствует адсорбции примерно 1 пг/мм<sup>2</sup> белка. Тем самым было установлено, что сигнал величиной в 1 у.е. на приборе Biosuplar 6 соответствует адсорбции примерно 6.5 пг/мм<sup>2</sup> белка.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноглобулины класса G – это мономеры, имеющие Y-образную форму с размерами 14.3 × 7.7 × 4.0 нм и массой 150 кДа. Их молекулы состоят из двух легких и двух тяжелых цепей, которые попарно соединены дисульфидными связями (–S–S–) (рис. 1). Между тяжелыми цепями также есть дисульфидная связь. Это “шарнирная область”. Такой тип межпептидного соединения придает структуре молекулы динамичность, что позволяет легко менять конформацию в зависимости от окружения [15, 16].

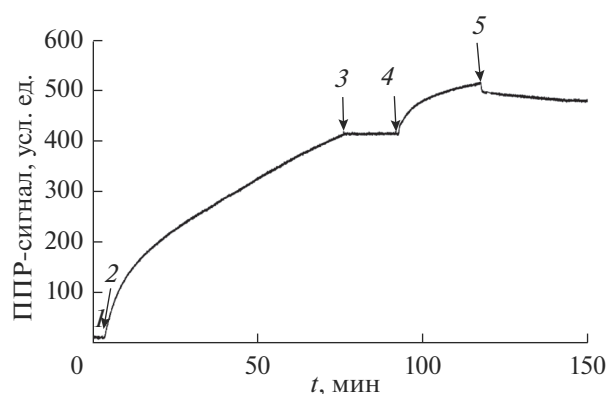
При взаимодействии антител со слоем золота на поверхности ППР-чипа нами был зарегистрирован значительный сигнал их адсорбции в широком интервале концентраций от 5 до 125 мкг/мл (рис. 2).



**Рис. 2.** Кинетика адсорбции антител на поверхности ППР-чипа и последующей десорбции в ответ на промывку буферным раствором в зависимости от их концентрации. Пунктирной линией обозначен уровень окончания десорбции антител с поверхности ППР-чипа. Концентрация иммуноглобулина IgG (антитела): кривая 1 – 125 мкг/мл, кривая 2 – 42 мкг/мл и кривая 3 – 5 мкг/мл.

Максимальная концентрация антител в этом диапазоне (125 мкг/мл) типична для определения *E. tularensis* иммуноферментным и микрогравиметрическим методами [4, 5]. При такой высокой концентрации антител адсорбция на поверхности ППР-чипа происходила наиболее интенсивно: 400 у.е. не более чем за 20 мин (рис. 1, кривая 1). Для более низких концентраций аналогичные значения сигнала адсорбции достигались уже за более длительный период инкубации (рис. 2, кривые 2 и 3). Интересно, что практически никогда, даже по прошествии 1 ч и более, не наблюдалось выхода сигнала на насыщение. Рост адсорбционного сигнала не прекращался. Кроме того, при отмывке PBS-буфером десорбция антител всегда заканчивалась при достижении одного и того же уровня сигнала ППР: примерно 390 у.е. Оба эти факта указывают на стремление антител формировать полислойное покрытие, которое после промывки оставляет на поверхности адсорбированный монослой, одинаковый при всех начальных условиях (концентрациях) адсорбции. Этот вывод основан на том, что в полислойных покрытиях именно первый адсорбированный монослой обычно наиболее прочно связан с поверхностью, а последующие слои адсорбируются обратимо [13, 17].

Молекулы иммуноглобулина IgG в ходе адсорбции могут различным образом ориентироваться на поверхности. Примеры их различного расположения приведены на рис. 1 [16]. Наиболее эффективной ориентацией для определения антигена является ортогональное расположение молекулы, соответствующее случаю (рис. 1а). При такой ориентации антиген-связывающие



**Рис. 3.** ППР-сенсограмма последовательной адсорбции антител и антигена. Цифрами показано: 1 – базовая линия PBS-буфер, 2 – введение иммуноглобулина IgG (антитела) с концентрацией 5 мкг/мл, 3, 5 – промывка PBS-буфером, 4 – введение антигена *F. tularensis* в PBS-буфере с концентрацией  $10^4$  м.к.л./мл.

центры иммуноглобулина направлены в раствор и наиболее доступны для взаимодействия с антигеном. Однако связь с поверхностью в этом случае, очевидно, будет более слабой по причине малой площади контакта. По нашим оценочным расчетам при такой ориентации молекулы площадь проекции иммуноглобулина на плоскость поверхности должна составлять около  $30 \text{ нм}^2$ . Такая же площадь проекции будет приходиться на одну молекулу при аналогичной, но перевернутой ориентации (случай (рис. 1г)). В случае (рис. 1б), при латеральном расположении молекулы с максимальным взаимодействием с поверхностью, площадь проекции будет максимальной и составит около  $110 \text{ нм}^2$ , а в промежуточном случае (рис. 1в) на каждую адсорбированную молекулу будет приходиться около  $60 \text{ нм}^2$ .

Пересчет уровня ППР-сигнала, соответствующего мономолекулярному слою антител, полученному в результате их достаточно длительной адсорбции и последующей промывки буферным раствором (см. обсуждение рис. 2), по вышеприведенной методике позволил оценить их поверхностную концентрацию. Она составила около  $2.6 \text{ нг/мм}^2$ , что для соответствующей молекулярной массы этого белка эквивалентно  $\sim 10^{10}$  молекул/мм<sup>2</sup>. Эта величина соответствует площади около  $100 \text{ нм}^2$ , приходящейся на одну молекулу иммуноглобулина. Согласно вышеприведенным оценкам площадей проекции молекулы антитела при различной ее ориентации, полученная величина соответствует тому, что практически все молекулы в первом адсорбционном слое располагаются на поверхности латерально. Оценка для такой ориентации давала площадь около  $110 \text{ нм}^2$  на молекулу. Очевидно, такое расположение не способствует эффективному взаимодействию анти-

тел с антигеном. Доступность антиген-активного разветвленного конца молекулы иммуноглобулина может быть достигнута лишь благодаря ее небольшой подвижности и шероховатости поверхности, способствующей меньшему контакту с поверхностью [18].

Проведенные далее эксперименты подтвердили предположение о сравнительно низкой активности адсорбированных антител в результате их латеральной ориентации. На рис. 3 приведена сенсограмма, отражающая кинетику процессов, происходящих при последовательной адсорбции на поверхности ППР-чипа иммуноглобулина, взятого при концентрации 5 мкг/мл, отмывки слабо связанных молекул и последующего введения пробы антигена возбудителя *F. tularensis*. Как и в вышеописанных экспериментах, после достижения достаточно высокого уровня адсорбции антител на поверхности ППР-чипа обратимо связавшиеся молекулы удалялись путем прокачивания через измерительную ячейку PBS-буфера в режиме циркуляции жидкости. Промывка заканчивалась по достижении стабильного уровня на ППР-сенсограмме. При введении пробы антигена возбудителя *F. tularensis* с концентрацией  $10^4$  м.к./мл в PBS-буфере наблюдался рост сигнала ППР, что может свидетельствовать о реакции “антиген-антитело”. Однако, несмотря на значительные размеры возбудителя *F. tularensis* ( $0.2\text{--}0.7 \times 0.7\text{--}1.7 \text{ мкм}$ ) [19] и его достаточно высокую концентрацию прирост ППР-сигнала был значительно менее интенсивным по сравнению с адсорбцией антитела. Такой сравнительно слабый сигнал может быть обусловлен неэффективной латеральной ориентацией молекул антител.

Для нахождения предела обнаружения возбудителя *F. tularensis* была проведена серия экспериментов с варьированием концентрации антигена в пределах от  $1.0 \times 10^2$  до  $1.0 \times 10^9$  м.к.л./мл. Было установлено, что уже на нижней границе этого интервала удается проводить достоверное обнаружение указанного микроба, то есть чувствительность предлагаемого нами метода составила  $1 \times 10^2$  м.к./мл, что в 1000 раз превышает чувствительность метода ИФА [20]. Дополнительным преимуществом нашего метода является малое время получения достоверного отклика, свидетельствующего о наличии возбудителя туляремии в исследуемом растворе. Оно составляет всего несколько минут. Напомним, что в микрогравиметрическом методе для регистрации туляремии требуется более получаса, а в методе ИФА – несколько часов [6, 7]. Недостатком некоторых ИФА является то, что используется метод, предусматривающий предварительную сенсибилизацию планшет, которая составляет 16–18 ч при температуре  $4\text{--}6^\circ\text{C}$  или 3 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ , что существенно увеличивает время анализа при невысокой

**Таблица 1.** Сравнение основных показателей методов при определении *F. tularensis*

Метод	Время получения результата, ч	Чувствительность, м.к./мл	C(Ig), мкг/мл	Число операций	Оценка результата измерений	Информативность
ИФА	>5*	$1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$	100–125	8	Последняя операция	Образование иммунореактивного комплекса, концентрация
Микрогравиметрический сенсор (QSM)	0.5 [6, 7]	$5.0 \times 10^6$ [6, 7] $1.0 \times 10^3 - 1.0 \times 10^4$ [4, 20]	125 [4, 20]	5	Режим реального времени с контролем каждой операции в исследовании	
ППР	<0.1	$1.0 \times 10^2$	5–125	3–4		

\* С учетом сенсibilизации планшетов.

чувствительности  $1.0 \times 10^5$  до  $1.0 \times 10^6$  м.к./мл [20]. Основные характеристики методов, применяемых для регистрации возбудителя туляремии, представлены в табл. 1.

Таким образом, нами показано, что для создания чувствительных сенсоров для определения туляремии методом ППР можно использовать растворы антител с концентрацией от 5 мкг/мл. Чувствительность полученных сенсоров позволяет проводить быстрые определения микроба в растворе вплоть до концентраций  $1.0 \times 10^2$  м.к./мл. Дальнейшие работы по оптимизации создания слоя правильно ориентированных молекул антител должны позволить еще больше увеличить чувствительность предложенного метода.

В ходе проделанной работы, мы установили, что антитела к туляремии проявляют склонность к обратимой полислойной адсорбции на поверхности золота. Вместе с тем, при промывке буферным раствором, независимо от условий предварительной адсорбции, на поверхности чипа остается прочно связанный мономолекулярный слой антител, которые, согласно предварительным оценкам и кинетике последующего связывания с антигеном, ориентированы латерально. Практически необратимое связывание антител с поверхностью позволяет создавать биосенсоры к туляремии. Введение раствора антигена позволяет быстро, с высокой чувствительностью и достоверно получить отклик, соответствующий его взаимодействию с антителами, сопряженный с формированием иммунореактивного комплекса. Однако преимущественно латеральная ориентация антител на поверхности не позволяет получить достаточно высоких сигналов, соответствующих размерам антигена. Еще более повысить чувствительность предложенного метода регистрации туляремии можно путем оп-

тимизации условий адсорбции антител, способствующих их более эффективной ортогональной ориентации на поверхности. На наш взгляд эта задача может быть решена тремя способами: предварительным созданием связующего слоя молекул, помогающих последующей правильной ориентации антител; созданием определенного рельефа поверхности или предварительным частичным покрытием поверхности пористым инертным материалом, препятствующим плотному латеральному контакту антител с поверхностью золота и использованием электрического поля для правильной ориентации и увеличения поверхностной концентрации антител в процессе их адсорбции.

Работа выполнена в рамках Научно-технического соглашения от 15.09.2015 между ИФХЭ РАН и ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора на безвозмездной основе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015. № 4. С. 21.
2. Kon K., Kuwahara T., Shimomura V. // Bioscience and Bioengineering. 2011. V. 111. № 2. P. 242.
3. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашиканова О.Ю. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2008. Т. III. № 2. С. 17.
4. Кальной С.М., Жарникова И.В., Дикова С.П. и др. // Патент Российской Федерации № 2510830, РФ // Б.И. 2014. № 29. С. 7.
5. Жарникова И.В., Кальной С.М., Курчева С.П. и др. // Технологии живых систем. 2014. Т. 11. № 4. С. 54.
6. Pohanka M., Skládal P. // Anal. Lett. 2005. V. 38. № 3. P. 411.

7. *Pohanka M., Skládal P.* // Folia Microbiol. 2007. V. 52. № 4. P. 325
8. *Homola J.* // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 462.
9. *Xie Y., Liao C., Zhou J.* // Biophysical Chemistry. 2013. V. 179. P. 26.
10. *Wang X., Li Y., He X. et al.* // J. Phys. Chem. A. 2014. V. 118. P. 8942–8952.
11. *Benavidez T.E., Garcia C.D.* // Langmuir. 2013. V. 29. № 46. P. 14154.
12. *Morrow R., McKenzie D.R., Bilek M.M. et al.* // Physica B: Condensed Matter. 2007. V. 394. I. 2. P. 203.
13. *Бревнов В.В., Федорова Н.В., Инденбом А.В.* // Биологические мембраны. 2013. Т. 30. С. 214.
14. *Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Коготкова О.И.* // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. Вып. 1(103). С. 67.
15. *Новиков В.В., Добротина Н.А., Бабаев А.А.* Иммунология: Учебное пособие / Нижний Новгород: Издательство ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2004. С. 212.
16. *Trilling A.K., Beekwilder J., Zuilhof H.* // Analyst. 2013. V. 138. P. 1619.
17. *Бревнов В.В., Федорова Н.В., Инденбом А.В.* // Известия Академии наук. Серия химическая. 2016. № 11. С. 2737.
18. *Исакова А.А., Инденбом А.В., Якобсон О.Д. и др.* // Физикохимия поверхности и защита материалов. 2016. Т. 52. № 4. С. 424.
19. *Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. Учебное пособие / Под ред. Лабинской А., Блинковой Л., Ещиной А.* СПб.: Лань, 2016. С. 588.
20. *Жарникова И.В., Курчева С.А., Жарникова Т.В. и др.* // Технологии живых систем. 2015. Т. 12. № 1. С. 41.