

На правах рукописи

ФОМИН АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ МИНИ-АНТИТЕЛ ДЛЯ
ИММУНОАНАЛИЗА ДИАГНОСТИЧЕСКИ-ЗНАЧИМЫХ
АНТИГЕНОВ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

Научные руководители:

доктор биологических наук
Староверов Сергей Александрович

доктор биологических наук
старший научный сотрудник
Дыкман Лев Абрамович

Официальные опоненты:

Щербаков Анатолий Анисимович
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
профессор кафедры микробиологии,
вирусологии и биотехнологии

Киреев Михаил Николаевич
кандидат медицинских наук,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб», ведущий
научный сотрудник лаборатории
экспериментальной биотехнологии

Ведущая организация: Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Защита состоится «20» декабря 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 на базе ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» по адресу: 410005, г. Саратов ул. Соколова, 335.

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Доктор биологических наук, профессор

Карпунина Л.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Успехи современной медицины и сельского хозяйства зачастую зависят от того, удастся ли обнаруживать специфические антигены в организме животных или человека, в растениях, воде, почве или других объектах окружающей среды. Например, профилактику и лечение любого инфекционного заболевания значительно облегчает ранняя и точная идентификация вызвавшего его патогенного микроорганизма. Для проведения многих диагностических процедур необходимо сначала вырастить культуру потенциального патогенного микроорганизма и лишь затем проанализировать спектр его физиологических свойств. Хотя подобные тесты весьма эффективны и обладают достаточно высокой специфичностью, они занимают много времени и являются весьма дорогостоящими. Это относится к идентификации бактерий и других паразитических микроорганизмов. Кроме того, весьма ограничена возможность выявления тех патогенных микроорганизмов, которые плохо растут в культуре либо вообще не поддаются культивированию. Чтобы устранить эти принципиальные ограничения был разработан (наряду с методиками молекулярной диагностики) широкий спектр иммунохимических методов (Глик, 2002; Madsen, 2013; Kuna, 2013). К иммунохимическим относятся методы, основанные на взаимодействии растворимых или корпускулярных антигенов (Аг) со специфическими антителами (Ат). Как сами методы, так и их приложения в клинической лабораторной практике чрезвычайно разнообразны (Воробьев, 2002).

Степень разработанности проблемы. Современная иммунохимия предлагает широкий ассортимент качественных и количественных методов анализа Аг, отличающихся по чувствительности и степени сложности (Коллинз, 1991; Joshua, 1995; McIntyre, 1995). В основе современного иммунохимического исследования лежат, в частности, разнообразные модификации иммунохроматографических и иммунопреципитационных методов (Ройт, 2000; Дзантиев, 2010). Эти методы, основанные на обнаружении различных Аг, варьируются от простых (иммуноанализ) к более сложным (иммуносенсоры). Для оценки качества современных иммунохимических анализов есть определенные требования, которых придерживаются в современной иммунодиагностике. Во-первых, Ат для проведения анализа должны соответствовать определенным условиям для создания надежного биоспецифического взаимодействия (нормы ISO 15087). Во-вторых, нормы наличия целевых соединений (Аг) в матрице продукта, который будет

исследоваться, должны быть приняты во внимание в связи с пределом обнаружения в рабочем диапазоне анализа (Meulenberg, 2012). Однако, в целом, все иммунохимические методы зависят, в первую очередь, от качества специфических Ат, используемых для получения диагностических систем. Одним из способов улучшения качества Ат стал метод гибридомной технологии для получения моноклональных антител (Kohler, Milstein, 1975). Однако гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности и требуют сложных и дорогих сред. Получаемые таким образом моноклональные антитела весьма дороги, что не позволяет широко использовать их в клинической практике. Чтобы решить эту проблему, были предприняты попытки создания своего рода «биореакторов» на основе генетически модифицированных бактерий, растений и животных. Для эффективной доставки и функционирования некоторых иммунотерапевтических средств достаточно одной антигенсвязывающей области (Fab- или scFv-фрагмента), т.е. присутствие Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина необязательно (Глик, 2002). Одним из таких методов является техника фагового дисплея Ат, ее основоположниками являются Джон Маккаферти с соавт. (McCafferty, 1990). Ими было показано, что антигенсвязывающие фрагменты Ат (scFv, Fab), представленные на поверхности нитевидного фага (мини-антитела), могут быть отобраны на иммобилизованном Аг. Использование в диагностических методах мини-антител, отобранных из рекомбинантной фаговой библиотеки, с нашей точки зрения, является весьма актуальной задачей для современной биотехнологии и микробиологии.

Цель работы – использование высокоспецифичных фаговых мини-антител и их применение для детекции биоактивных молекул и микроорганизмов в биологических объектах.

Задачи исследования:

1. Выделить ферритин из печени коров и получить к нему специфические мини-антитела с использованием фагового дисплея антител.
2. Разработать эффективный метод идентификации ферритина с использованием поликлональных и фаговых антител.
3. Получить мини-антитела на диминазен и разработать метод детекции диминазена в биологических жидкостях с использованием иммунодот-анализа.
4. Разработать методы применения мини-антител на туберкулин для идентификации возбудителя туберкулеза с помощью световой и электронной микроскопии и твердофазного иммуноанализа.

5. Оценить эффективность применения фаговых мини-антител для иммуноанализа бактерий рода *Azospirillum*.

Научная новизна работы. Впервые был разработан метод идентификации ферритина в сыворотке крови коров методом твердофазного иммуноанализа с использованием мини-антител на ферритин. Разработан метод индикации диминазена в биологических жидкостях методом иммунодот-анализа с использованием мини-антител на диминазен. Впервые получены мини-антитела на туберкулин и изучена возможность их применения для идентификации возбудителя туберкулеза методами световой и электронной микроскопии и твердофазного иммуноанализа. Полученные мини-антитела на антигенные структуры бактерий рода *Azospirillum* предложено использовать для детекции данного микроорганизма микроскопическими методами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в настоящей работе высокоспецифичные мини-антитела на ферритин, диминазен, туберкулин и антигены азоспирилл и разработанные эффективные методики их применения для идентификации этих (и других) диагностически значимых антигенов в биологических объектах, открывают перспективы использования данных антител в разнообразных тест-системах, для решения широкого круга научных и прикладных задач в области микробиологии, биотехнологии, ветеринарии и медицины. По материалам диссертационной работы опубликовано учебно-методическое пособие «Этиология, диагностика и профилиактика железодефицитной анемии поросят», для студетов 3, 4, 5-го курсов специальности «Ветеринария» (в соавторстве с Винниковым Н.Т., Анниковой Л.В., 2010). Материалы исследований используются в учебном процессе и научной работе ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ИБФРМ РАН, ФГБОУ ВПО «Донской ГАУ», ФГБОУ ВПО «Воронежский ГАУ», УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (Республика Беларусь).

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам получения моноклональных и поликлональных антител и их использования в иммунологических тест системах. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложении материала автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения,

эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанного методов, а также анализ фактического материала позволили обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование фаговой библиотеки антител обеспечивает получение *in vitro* мини-антител против ферритина, диминазена, туберкулина и азоспирилл.
2. Одновременное использование поликлональных и мини-антител для диагностики ферритина методом ИФА является оптимальным способом детекции ферритина в биологических жидкостях животных.
3. Полученные при помощи фаговой библиотеки мини-антитела к диагностически значимым антигенам обладают высокой специфичностью и чувствительностью и могут быть использованы для создания современных иммунологических тест-систем.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на: IX семинаре Ассоциации практикующих ветеринарных врачей РФ (Казань, 2010); V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействий микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной ветеринарии» (Краснодар, 2011); Международной научно-практической конференции «От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины» (Саратов, 2011); IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); VIII молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Работа выполнена на кафедре «Терапия, акушерство и фармакология» факультета ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». Работа частично поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации № 8852 (2012-2013 гг.).

Структура и объем диссертации: диссертация состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, включающих объекты, материалы и методы исследования, результаты исследований и их

обсуждение, а также заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 118 страницах, иллюстрирована 36 рисунками и включает 4 таблицы. Список литературы включает в себя 190 источников.

Собственные исследования

Объекты и методы исследований

Объекты. Поголовье крупного рогатого скота породы черно-пестрая в хозяйстве ООО «Роща», Саратовская обл., Новобурасский район. Исследовали КРС различных возрастных групп: телята 20 голов (5 мес), нетели 20 голов (2,5-3 года), коровы 20 голов (4-5 лет). Кролики породы шиншила (9 животных, возраст 2-3 года) и крысы белые лабораторные беспородные (10 животных, возраст 3 мес.) содержались в условиях стационара Саратовского ГАУ им. Н.И. Вавилова. В работе использовали бактериальные клетки *Azospirillum brasilense* Sp245 и *E. coli* XL1-Blue, полученные из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. *Mycobacterium bovis* вакцинного штамма БЦЖ, *M. phlei* и *M. smegmatis*, *Staphylococcus aureus* 209-R, *Brucella abortus* вакцинный шт. 82 были получены из лаборатории туберкулеза и бруцеллеза Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института РАСХН.

Методы. Выделение ферритна из печени крупного рогатого скота проводили по методу, предложенному в работах (Kong, 2003; Mete, 2005) с небольшими модификациями, с последующей очисткой на колонке Sephadex G-150. Аффинную селекцию антител (биопаннинг) проводили по методу предложенному McCafferty (1990). Метод дот-иммуноанализа основан на визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране Аг и меченых (коллоидными или молекулярными метками) Ат. Детально протоколы получения кроличьих антифаговых Ат, их конъюгатов с пероксидазой, коллоидным золотом и золотыми наночастицами на ядрах из двуокиси кремния представлены в работах (Khlebtsov, 2006; Khanadeev, 2011). В нашем исследовании мы использовали стратегию непрямого мечения, то есть сначала проводили биоспецифическую реакцию Аг+фаговые Ат, а затем визуализовали ее с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых Ат. Коллоидное золото (КЗ) со средним диаметром частиц 15 нм получали по методу (Frens, 1973), используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Средний размер частиц контролировали по спектрофотометрической калибровке и

методом трансмиссионной электронной микроскопии. Для конъюгации с антителами определяли «золотое число» (минимальное количество вещества, защищающего золь от солевой агрегации) для водного раствора антифаговых Ат. Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов (Дыкман, 2008). Выделение перитонеальных макрофагов осуществляли по общепринятой методике (Пастер, 1989). Количество выделенных клеток определяли в камере Горяева. При изучении биодинамических параметров различных лекарственных форм диминазена нами использовался водный и мицеллярный препарат диминазена. Животных для экспериментов подбирали по принципу аналогов. Сформировали 2 группы по 3 овцы. Кровь у животных отбирали из яремной вены через 0.5, 2, 4, 6, 8, 24, 48 ч. Хроматографический анализ диминазена основан на определении количественного содержания диминазена с применением внутреннего стандарта – имидокарба дипропионата – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой с применением спектрофотометрического детектора. Пробоподготовка заключалась в твердофазной экстракции диминазена из плазмы крови и эритроцитов на патронах SPE Chromabond C18. Детектирование вели по интенсивности поглощения при длинах волн света 370 и 240 нм для диминазена и имидокарба дипропионата, соответственно. Чувствительность метода составляла 300 пг в пробе, нанесенной на колонку.

Результаты исследований и их обсуждение

Получение мини-антител на ферритин и их использование в дог-анализе. Следует отметить: несмотря на то, что анемия – одно из наиболее распространенных заболеваний КРС, характеризующееся снижением концентрации гемоглобина и гематокрита и протекающее в несколько стадий, – в доступной специализированной литературе отсутствует информация о наличии простых и достоверных тест-систем для диагностики данного заболевания. В частности в российской ветеринарной медицине практически отсутствует упоминание о таком важном показателе как ферритин, выполняющем роль основного внутриклеточного депо железа. Кроме того, не рассматривается роль ферритина, как самого информативного индикатора запасов железа в организме. Первым этапом нашей работы было выделение ферритина из печени коров. У полученного белка определили молекулярную массу электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) (Рисунок 1). На Рисунке 1 видно, что полученный нами белок, при проведении нативного

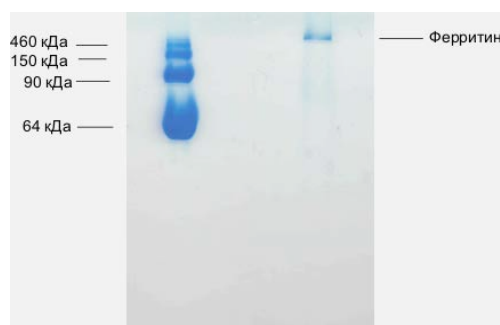


Рисунок 1 – Электрофорез ферритина в 10% ПААГ

электрофореза, выходит единичной полосой с молекулярной массой 460 кДа, что указывает на степень чистоты выделенной нами фракции. На следующем этапе работы нами были получены фаговые Ат на ферритин. После выделения мини-Ат была проведена их наработка с клонированием фагов до титра 1:8192, которые в дальнейшем использовали в иммуноанализе в разведении 1:100. Сначала было необходимо определить минимальную концентрацию Ат, детектируемую визуалью с помощью дот-анализа. На Рисунке 2 представлен дот-иммуноанализ ферритина, выделенного из печени коров, с использованием в качестве метки конъюгатов 15 нм КЗ, золотых наноболочек и пероксидазы хрена с антифаговыми Ат. Видно, что использование в качестве метки 15 нм КЗ, наноболочек и пероксидазы дает сходные результаты: чувствительность методов во всех трех случаях составила 0.225 мкг/мл. В случае негативного контроля (БСА, нижний ряд) никаких окрашенных пятен на мембране не наблюдали. Следует, однако, отметить, что применение коллоидных частиц снижает время детекции в среднем на 1 ч по сравнению с ферментной меткой.

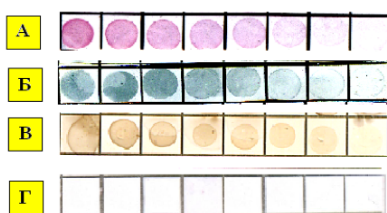


Рисунок 2 – Дот-иммуноанализ ферритина, выделенного из печени коров, с использованием в качестве маркеров конъюгатов антифаговых антитела с 15 нм КЗ (А), золотыми наноболочками (Б), пероксидазой хрена(В); контроль – БСА (Г)

Затем был проведен дот-анализ ферритина, содержащегося в сыворотках крови КРС различных половозрастных групп. На Рисунках 3, 4, 5 представлены результаты дот-иммуноанализа ферритина в сыворотках крови КРС с

использованием в качестве метки конъюгатов 15 нм КЗ, золотых наноболочек и пероксидазы хрена с антифаговыми антителами. В верхнем ряду коровий ферритин (выделенный нами из печени КРС) в концентрации от 15 мкг/мл до 0.225 мкг/мл, в нижнем ряду сыворотки крови исследуемых животных, концентрация ферритина составила от 1.7 мкг/мл до 0.6 мкг/мл. При проведении планшетного иммуноферментного анализа (ИФА) по методу (Hornbeck, 1991) были получены аналогичные данные.

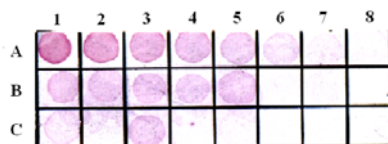


Рисунок 3 – Дот-иммуноанализ ферритина с использованием в качестве метки конъюгатов 15 нм КЗ. А1-А8 – очищенный ферритин КРС в концентрации от 15 мкг/мл до 0.225 мкг/мл, В1-В5 и С1-С3 – сыворотка крови КРС, С4 – БСА, С5 – лошадиный ферритин

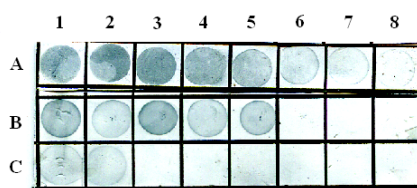


Рисунок 4 – Дот-иммуноанализ ферритина с использованием в качестве метки золотых наноболочек. А1-А8 – очищенный ферритин в концентрации от 15 мкг/мл до 0.225 мкг/мл, В1-В5 и С1-С2 – сыворотка крови КРС, С3 – БСА, С4 – лошадиный ферритин

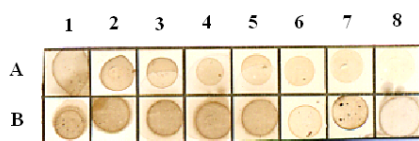


Рисунок 5 – Дот-иммуноанализ ферритина с использованием в качестве метки пероксидазы хрена. А1-А8 – очищенный ферритин в концентрации от 15 мкг/мл до 0.225 мкг/мл, В1-В7 – сыворотка крови КРС, В8 – лошадиный ферритин

При использовании в качестве метки пероксидазы хрена повышается трудоемкость процесса постановки дот анализа, увеличивается время выявления метки (3-4), усиливается неспецифическое прокрашивание фона мембраны. Золотые наноболочки и коллоидные золотые наночастицы со средним диаметром 15 нм являются оптимальными метками. При схожей с ферментными

метками чувствительности, прокрашивание фона мембраны незначительно, а минимальное время необходимое для проявления окраски составляет 30-60 мин.

Конструирование сэндвич-метода ИФА для обнаружения ферритина в сыворотке крови крупного рогатого скота. С использованием планшетного ИФА-ридера мы провели определение концентрации ферритина прямым методом с использованием поликлональных и мини-Ат. Поликлональные Ат показали более высокую чувствительность, а мини-Ат – более высокую специфичность. На следующем этапе нашей работы работе мы разработали сэндвич-метод на основе ИФА для обнаружения ферритина в сыворотке крови КРС. Мы проводили адсорбцию кроличьих поликлональных Ат на ферритин на дно иммунологического планшета, инкубировали их с ферритином и осуществляли его детекцию при помощи мини-Ат, полученных на ферритин, выявляемых с использованием кроличьих антифаговых Ат, меченных пероксидазой хрена, на планшетном ИФА-ридере. На Рисунке 6 представлены результаты ИФА ферритина разработанным сэндвич-методом. В процессе исследований нами было проведено разведение Ат от концентрации 62.5 мкг/мл до 0.12 мкг/мл включительно. На данном рисунке видно, что чувствительность предложенного метода составила 0.244 мкг/мл. Этот результат соответствует данным по использованию поликлональных Ат для индикации ферритина. Следует отметить, что при использовании разработанного метода отсутствовали перекресты в выявлении коровьего и лошадиного ферритинов, что было характерно для прямого ИФА с использованием поликлональных Ат. Таким образом, преимущество сэндвич-метода ИФА заключается в его более высокой специфичности, по сравнению с методами, где используются только поли- или моноклональные антитела для детекции Ат. Мы

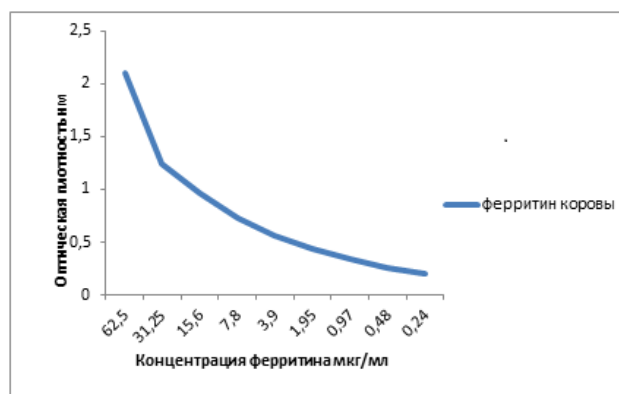


Рисунок 6 – Чувствительность определения ферритина сэндвич-методом

использовали преимущества в чувствительности поликлональных Ат и преимущества в специфичности мини-Ат. В результате сэндвич-анализ показал чувствительность сходную с поликлональными Ат и специфичность сходную с мини-Ат. Следующим этапом наших исследований было применение предложенного метода для определения ферритина в сыворотке крови КРС различных половозрастных групп. В результате проведенных исследований нами были получены следующие данные: содержание ферритина в сыворотке крови в весенний период составило у телят 1.9 ± 0.085 мкг/мл, у нетелей 1.8 ± 0.06 мкг/мл, у дойных коров 1.6 ± 0.09 мкг/мл (Рисунок 7).

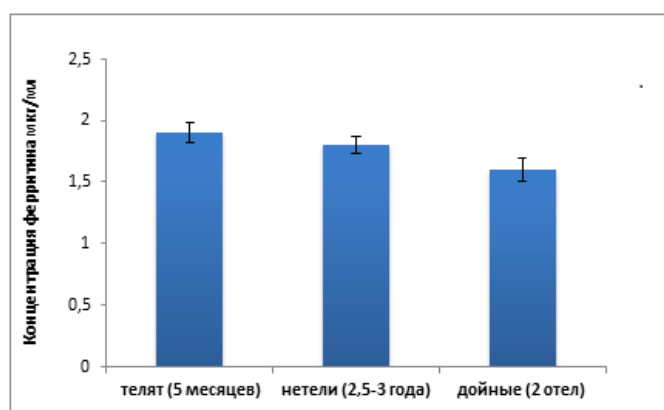


Рисунок 7 – Концентрация ферритина в сыворотке крови коров различных возрастных групп, определенных методом сэндвич-ИФА

Таким образом, в результате проведенных исследований мы предлагаем следующие методы детекции ферритина: (1) дот-анализ с использованием как золотых наносфер и наноболочек, так и ферментной метки; (2) прямой ИФА с использованием как поликлональных, так и мини-АТ; (3) сэндвич метод ИФА с одновременным использованием поликлональных и мини-АТ, который представляется нам оптимальным. Дот-анализ, основанный на полученных нами фаговых антителах, показал высокую чувствительность, что подтвердилось при проведении ИФА. Сэндвич-метод ИФА показал более высокую чувствительность и специфичность анализа. Предложенный метод был апробирован для определения ферритина в сыворотке крови КРС различных половозрастных групп. Разработанные методы могут помочь проведению дальнейших исследований по ранней диагностике анемий КРС.

Использование мини-антител для определения биодинамических параметров различных лекарственных форм диминазена. В наших исследованиях были проведены работы по иммуноцитохимическому

обнаружению диминазена во внутриклеточном пространстве при использовании водного и мицеллярного комплекса диминазена. Диминазен в перитонеальных клетках определяли при помощи иммунофлуоресцентного анализа с использованием мини-Ат. Следует отметить, что как мицеллярный, так и водный раствор диминазена обнаруживается в перитонеальных клетках крыс, на что указывает зеленовато-желтое свечение клеток при микроскопии с использованием флюоресцентных красителей. В контроле мы не наблюдали окрашенных клеток. Таким образом, использование иммунофлуоресцентного анализа с применением фаговых антител позволяет обнаружить распределение антигенов (гаптенов) в иммунокомпетентных клетках. Определив, что диминазен накапливается в клетках при использовании как водного, так и мицеллярного препарата, мы провели изучение биодинамики обеих форм препарата в плазме и эритроцитах овец с использованием мини-Ат и ВЭЖХ. Фармакокинетические параметры лекарства зависят от его химических свойств, лекарственной формы и способа введения. Для водорастворимой формы диминазена характерно достаточно быстрое повышение концентрации в крови при внутримышечном введении. Фармакокинетическая кривая описывается двухкамерной моделью, причем концентрация препарата во второй фазе часто падает ниже терапевтического уровня. В наших исследованиях максимум концентрации водного препарата диминазена в плазме составлял для овец 16,86 мкг/мл (30 мин). Время полувыведения диминазена различалось незначительно

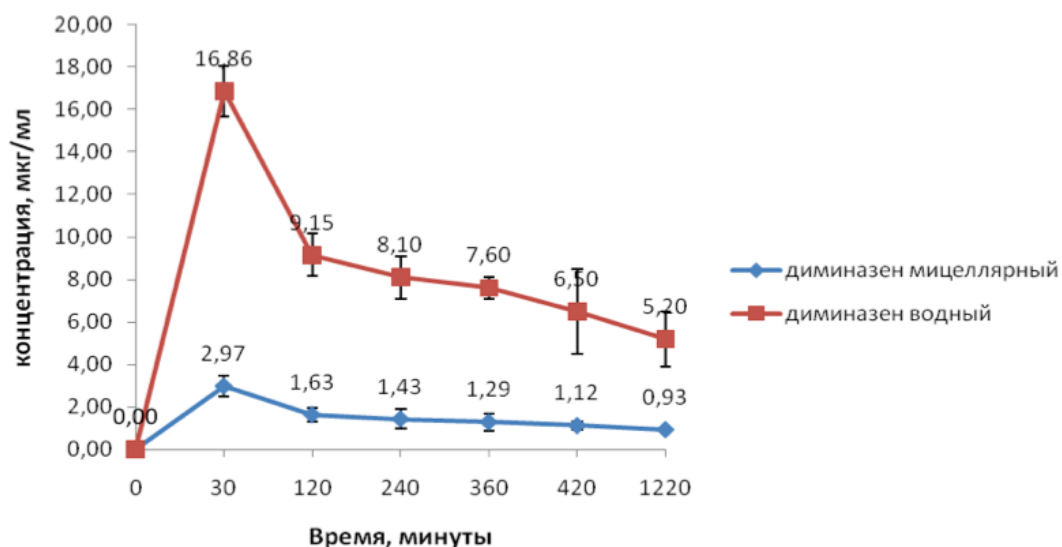


Рисунок 8 – Кинетические параметры водного и мицеллярного диминазена в плазме овец при внутримышечном введении (данные ВЭЖХ)

(10 ± 1.5 ч). При применении мицеллярного препарата диминазена пик максимума обнаруживался через 30 мин после введения препарата, но он был значительно ниже и составил 2.97 мкг/мл. Время полувыведения препарата составило (4 ± 1.5 ч). В обоих случаях в течение 96 ч из организма животных выводилось 97% дозы водного препарата (Рисунок 8).

Сравнивая данные ВЭЖХ с данными проведенного иммунодот-анализа с мини-Ат, следует отметить, что мы получили схожие результаты (Рисунок 9). Однако надо учитывать, что метод иммунодот-анализа является полуколичественным, и в данном случае мы наблюдаем только примерные концентрации, которые все же сопоставимы с хроматографическими.

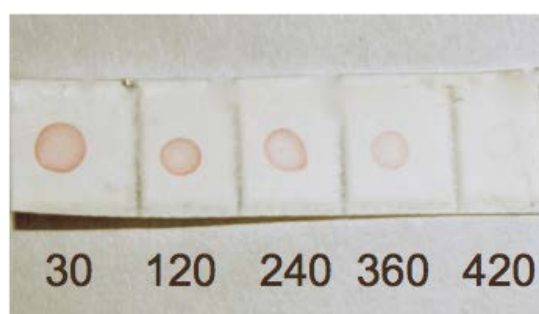


Рисунок 9 – Дот-иммуноанализ диминазена, выделенного из плазмы крови овец, при применении мицеллярной формы препарата (цифры – время, мин)

При определении диминазена в эритроцитах нами была получена более интересная картина (Рисунок 10). При использовании мицеллярного раствора диминазена нами регистрировалось два пика концентрации активного вещества в препарате: первый пик фиксировался через 2 ч после введения препарата и составлял 2.1 мкг/мл, второй пик (пик максимума) обнаруживался нами через 22 ч и составлял 2.4 мкг/мл. Кинетика водного диминазена в эритроцитах фактически повторяла таковую в плазме, и пик максимума в данном случае в эритроцитах овец фиксировался через 4 ч и составлял 1.87 мкг/мл.

Индикация диминазена в эритроцитах методом дот-анализа дала результаты, сходные с кинетическими исследованиями. В заключение следует отметить, что при сравнении хроматографических данных с данными иммунодот анализа можно отметить, что наиболее четкая детекция диминазена наблюдается в диапазоне от 3.55 до 0.90 мкг/мл, в больших концентрациях наблюдается слияние окраски пятен, что приводит к сложности определения больших концентраций диминазена в образцах. Таким образом, предложенный

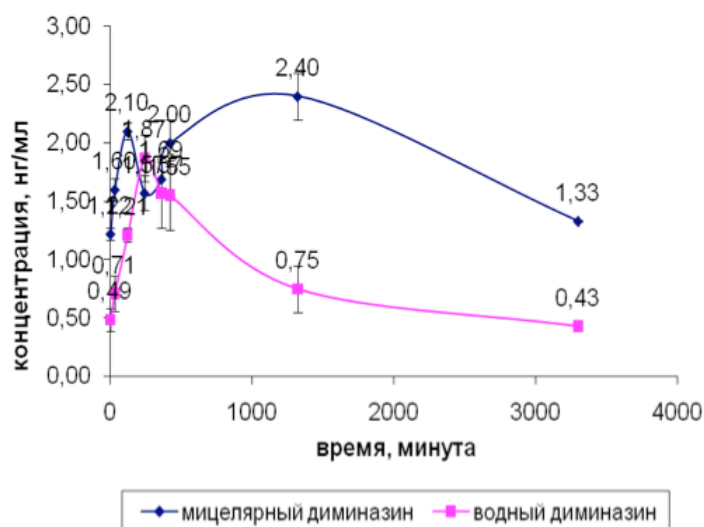


Рисунок 10 – Кинетические параметры водного и мицеллярного диминазена в эритроцитах овец при внутримышечном введении (данные ВЭЖХ)

метод получения мини-Ат к диминазону с использованием фаговой библиотеки позволяет получать специфичные Ат, которые могут быть использованы в экспресс-анализе диминазена в биологических жидкостях животных. Несмотря на то, что дот-анализ позволяет зарегистрировать лишь присутствие определяемого препарата в пробе и относительное изменение его концентрации (по интенсивности окраски дота), данный метод отличает экспрессность, простота пробоподготовки, доступность используемого оборудования и материалов.

Применение мини-антител для детекции возбудителя туберкулеза животных. Целью исследования было изучение возможности получения фаговых Ат на туберкулин и разработка методик применения полученных Ат в иммунодиагностике микобактерий. Была проведена селекция клонов фагов, специфически реагирующих с туберкулином, с использованием овечьей комбинаторной фаговой библиотеки. Было проведено три раунда селекции, в результате которых отобраны клоны фагов, показавшие наибольшую чувствительность и специфичность к антигену в дот-анализе. При определении специфичности полученных нами Ат мы установили, что мини-Ат реагируют как с самими бактериальными клетками, так и с туберкулиновой фракцией. С такими микроорганизмами, как *E. coli* XL-1 blue, *S. aureus* 209-R, *B. abortus* вакцинный шт. 82, полученные нами мини-Ат не реагировали. Затем мы провели

исследования по определению видовой специфичности полученных мини-Ат. Для этого проводили изучение перекрестных реакций Ат на туберкулин у

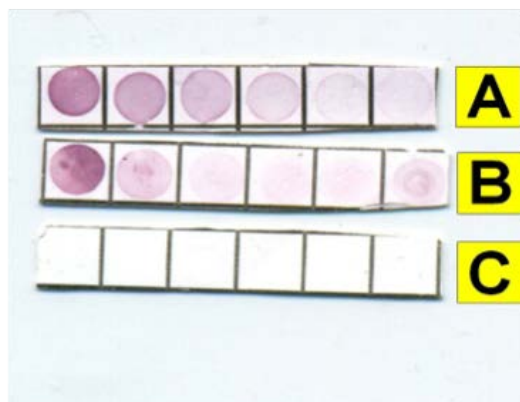


Рисунок 11 – Дот-анализ микобактерий с использованием мини-Ат на туберкулин (А – *M. bovis*; В – *M. smegmatis*; С – *M. phlei*)

M. bovis и атипичных видов микобактерий: *M. phlei* и *M. smegmatis*. Нами было установлено, что полученные мини-Ат давали частичный перекрест в больших концентрациях (от 2.5×10^8 микробных тел в мл и выше) с *M. smegmatis*. Перекрест мини-Ат с *M. phlei* в иммунодот-анализе нами обнаружен не был (Рисунок 11). Полученные результаты дали возможность в дальнейшем

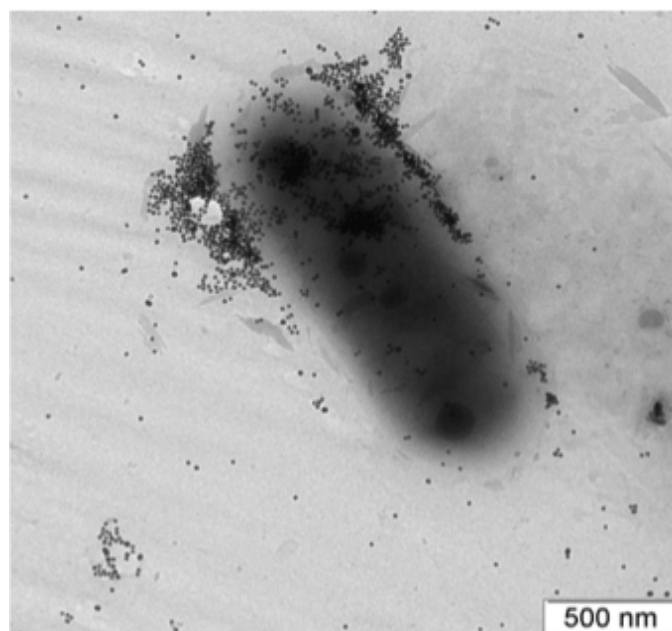


Рисунок 12 – Выявление туберкулинового Аг на клетках *M. bovis* шт. БЦЖ при помощи мини-Ат. Выявление фаговых частиц проводили с использованием конъюгатов антифаговых Ат с КЗ

использовать данный вид рекомбинантных Ат для разработки диагностических тест-систем. Следующим этапом исследований стало применение полученных мини-Ат для проведения микроскопических исследований клеток микобактерий. На Рисунке 12 приведены данные электронной микроскопии при выявлении антигенных детерминант на клеточной поверхности микобактерий полученными нами мини-Ат. Видно, что данный Ат распределяется на одном из субполярных концов клеточной поверхности микобактерий. После проведения электронной микроскопии мы изучили возможность применения полученных мини-Ат для иммунохимического обнаружения микобактерий в препаратах при использовании световой микроскопии. Для этого мы провели выявление микобактерий методом световой микроскопии с использованием конъюгатов антифаговых Ат с КЗ в качестве контрастирующего красителя. Из Рисунка 13 видно, что при использовании данного красителя, клетки микобактерий при световой микроскопии обнаруживаются как полиморфные палочки окрашенные в красный цвет.

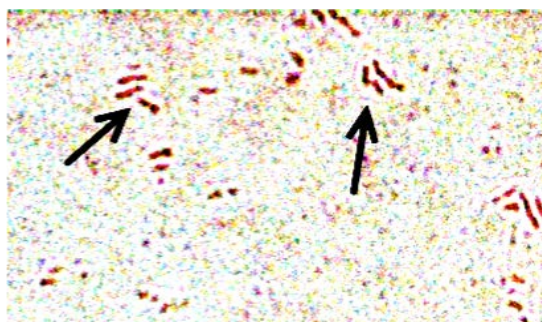


Рисунок 13 – Выявление туберкулинового Ат на клетках *M. bovis* шт. БЦЖ при помощи мини-Ат. Выявление фаговых частиц проводили с использованием конъюгатов антифаговых Ат с КЗ

Данный метод может в дальнейшем позволить обнаруживать микобактерии в различных объектах окружающей среды и быть хорошим дополнением к имеющимся уже методам окраски. Кроме того, используя специфические Ат данным методом можно в дальнейшем проводить дифференциальную диагностику микобактерий.

Анализируя полученные выше результаты можно отметить, что Ат, отселектированные из фаговой библиотеки, можно успешно применять в

иммунологических исследованиях. В дальнейшем полученные антитела планируется использовать для создания диагностикума на *M. tuberculosis*.

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

Значительный интерес представляет изучение возможности получения мини-Ат на целые клетки и компоненты клеточной стенки азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*, участвующих в ассоциативных взаимоотношениях с растениями, для решения вопросов быстрой идентификации почвенных бактерий. В связи с этим, основная задача данного этапа исследований заключалась в получении фаговых Ат на Аг клеточной стенки типового штамма *A. brasilense* Sp245 при использовании овечьей фаговой библиотеки, а также изучение возможности их применения при анализе поверхностных Аг клеточных структур и детекции клеток с помощью микроскопических методов. 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.

Среди основных Аг бактериальной поверхности азоспирилл как грамотрицательных микроорганизмов особый интерес представляет липополисахарид или О-Аг. Строение его О-специфического полисахарида определяет иммунохимическую специфичность микроорганизмов, что служит основой для их внутривидовой классификации. Н-антигеном называют белок, из которого построены жгутики бактерий. Антигенными свойствами обладают как целые жгутики (свободные и в составе бактериальной клетки), так и формирующий их белок флагеллин. У бактерий рода *Azospirillum* флагеллин, являющийся родоспецифичным Аг, покрыт чехлом полисахаридной природы. Поэтому в дальнейшей работе мы уделили внимание именно этим Аг клеточной поверхности азоспирилл. Для электронно-микроскопической идентификации взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp245 с мини-Ат готовили препараты с концентрацией клеток 10^6 на 1 мл, инкубировали 0.5 мл суспензии микроорганизмов в забуференном физиологическом растворе с 10 мкл раствора гомологичных Ат с концентрацией 100 мкг/мл в течение 1 ч на шейкере. После чего центрифугировали суспензию при 12000 g 5 мин и ресуспендировали осадок клеток в 0.5 мл буфера. Инкубировали суспензию со 100 мкл раствора маркера антифаговые Ат + КЗ (D₅₂₀ 0.5) в течение 1 ч. Повторяли операции осаждения и ресуспендирования. Приблизительно 20 мкл суспензии наносили на

пленку (Parafilm, США) и помещали на каплю никелевую сеточку с нитроцеллюлозной подложкой, укрепленной углеродом, на 20 мин. Осуществляли тепловое приклепление, удерживая сеточку около лампы накаливания 2 мин. Анализ проводили с помощью электронного микроскопа Libra 120. Фотографии, полученные с использованием электронной микроскопии, представлены на Рисунках 14 и 15. Как видно из рисунков, полученные фаговые мини-Ат располагаются по всей клеточной поверхности в случае ЛПС и, вероятно, на «обломке» жгутика в случае с флагеллином, что соответствует литературным данным. Из данного эксперимента можно сделать вывод, что на основе мини-Ат и КЗ можно разработать тест-систему для изучения клеточной поверхности бактерий.

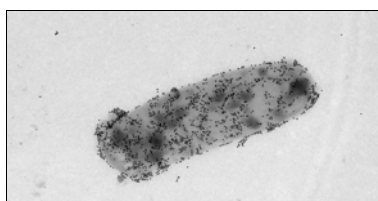


Рисунок 14 – Электронно-микроскопическое выявление Аг клеточной поверхности *A. brasilense* Sp245с помощью мини-Ат на ЛПС

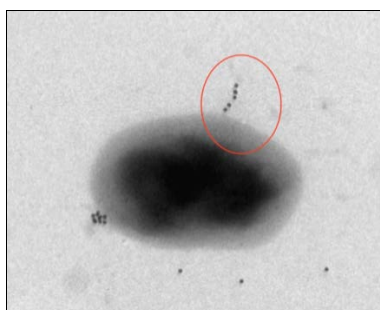


Рисунок 15 – Электронно-микроскопическое выявление Аг клеточной поверхности *A. brasilense* Sp245с помощью мини-Ат на флагеллин

Затем мы использовали полученные мини-Ат на целые клетки *A. brasilense* Sp245 для идентификации азоспирилл на поверхности корня пшеницы методом конфокальной лазерной микроскопии. На Рисунке 16 приведена микрофотография корневого волоска, полученная на конфокальном лазерном микроскопе Leica TCS SP5. 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.

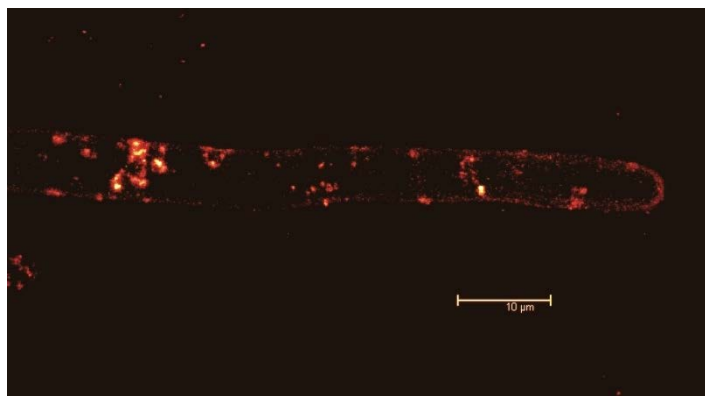


Рисунок 16 – Выявление клеток *A. brasilense* Sp245 на поверхности корневого волоска пшеницы (конфокальная микроскопия). Выявление бактериальных клеток проводили последовательной инкубацией препарата корней пшеницы с азоспириллами, мини-Ат на *A. brasilense* Sp245, кроличьими антифаговыми Ат и козьими антикроличьими Ат, мечеными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594

Кроме того, полученные мини-антитела были использованы в электрооптическом и акустоэлектронном анализе азоспирилл. 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 в составе клеточной поверхности бактерий.

Таким образом, в приведенных выше исследованиях мы обобщили возможность использования фаговой библиотеки Ат для исследовательских и диагностических целей. Полученные результаты экспериментальных исследований показали, что мини-антитела, полученные на ферритин, туберкулин, диминазен и антигены азоспирилл, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут быть использованы для создания диагностических тест-систем.

Выводы

1. Мини-антитела, полученные на ферритин, туберкулин, диминазен и антигены азоспирилл, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут быть использованы для создания диагностических тест-систем.

2. Усовершенствован способ выделения ферритина из печени коров и разработана методика получения специфических мини-антител к ферриту с использованием фагового дисплея антител.
3. Предложены эффективные иммунохимические методы идентификации ферритина с применением поликлональных и фаговых антител, в том числе в сыворотке крови КРС.
4. Показана возможность детекции диминазена в биологических жидкостях животных методом иммунодот-анализа с использованием мини-антитела на диминазен. Предложенный метод отличает экспрессность, простота пробоподготовки, доступность используемого оборудования и материалов.
5. Разработаны методики применения мини-антител на туберкулин для идентификации возбудителя туберкулеза с помощью световой и электронной микроскопии и твердофазного иммуноанализа.
6. Показана эффективность использования фаговых мини-антител для иммуноанализа бактерий рода *Azospirillum*.

Практические рекомендации

Полученные результаты экспериментальных исследований показали, что мини-антитела, полученные на ферритин, туберкулин, диминазен и антигены азоспирилл, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут быть использованы для создания эффективных диагностических тест-систем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Разработка иммунозолотых диагностических систем для идентификации возбудителя туберкулеза *in situ* / С.А. Староверов, И.В. Видяшева, А.С. Фомин [и др.] // **Российский ветеринарный журнал**. 2011. №. 2. С. 29-32.
2. Изучение механизмов токсического воздействия туберкулина PPD на клетки иммунной системы лабораторных животных / А.С. Фомин, М.Л. Малинин, О.А. Василенко [и др.] // **Ветеринарная патология**. 2011. №. 3. С. 76-82.
3. Уточнение механизмов токсического воздействия туберкулина PPD на клетки иммунной системы лабораторных животных / А.С. Фомин, С.В. Козлов, А.А. Волков [и др.] // **Ветеринарная клиника**. 2011. №. 11. С. 12-15.
4. Biodynamic parameters of micellar diminazene in sheep erythrocytes and blood plasma / S.A. Staroverov, V.A. Sidorkin, A.S. Fomin [et al.] // **Journal of Veterinary Science**. 2011. V.12., №. 4. P. 303-307.

5. Использование фаговых мини-антител для определения концентрации ферритина в сыворотке крови животных / А.С. Фомин, С.А. Староверов, С.В. Козлов [и др.] // **Российский ветеринарный журнал**. 2012. №. 4. С. 30-33.
6. Preparation of miniantibodies to *Azospirillum brasilense* Sp245 surface antigens and their use for bacterial detection / L.A. Dykman, S.A. Staroverov, O.I. Guliy, O.V. Ignatov, A.S. Fomin [et al.] // *Journal Immunoassay Immunochem*. 2012. V. 33, №. 2. P. 115-127.
7. Определение концентрации ферритина с использованием рекомбинаторной антительной фаговой библиотеки / А.С. Фомин, С.А. Староверов, Н.Т. Винников [и др.] // В сб. статей “Ветеринарная медицина домашних животных”. – Казань: Печатный двор, 2010. С. 269-272.
8. Изучение механизмов взаимодействия туберкулина PPD с клетками иммунной системы лабораторных животных / С.А. Староверов, М.Л. Малинин, А.С. Фомин [и др.] // От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: Матер. межд. научн.-практ. конф. – Саратов: ГНУ СНИВИ РАСХН, 2011. С. 277-281.
9. Изучение механизма воздействия туберкулина PPD на клетки иммунной системы лабораторных животных / В.Н. Ласкавый, А.С. Фомин, М.Л. Малинин [и др.] // Актуальные проблемы современной ветеринарии: Матер. межд. науч.-практ. конф. – Краснодар: КубГАУ, 2011. С. 276-278.
10. Использование фаговой библиотеки для получения антител на ферритин / А.С. Фомин, С.А. Староверов, Н.Т. Винников [и др.] // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Матер. V всеросс. конф. молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2010. С. 143.
11. Использование электроакустического датчика для детекции микробных клеток при их взаимодействии с мини-антителами / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, И.Е. Кузнецова, А.М. Шихабудинов, О.А. Караваева, Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, А.С. Фомин [и др.] // IV Съезд биофизиков России. – Нижний Новгород, 2012. С. 84.
12. Получение мини-антител к поверхностным антигенам *Azospirillum brasilense* и их использование для детекции микробных клеток / О.И. Гулий, О.А. Караваева, С.С. Макарихина, Д.Ю. Володин, С.А. Павлий, Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, А.С. Фомин [и др.] // Актуальные аспекты современной микробиологии: VIII Молодежная школа-конф. с межд. Участием. – Москва, 2012. С. 120.