

С.С.Ветчинин, П.Х.Копылов, Н.В.Киселева, О.Г.Николаева, А.В.Гаврюшкин

### ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОМАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК *FRANCISELLA TULARENSIS*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Получены иммуномагнитные частицы с иммобилизованными высокоспецифичными моноклональными антителами FB11-х к *Francisella tularensis*. Их использование в иммуноферментном анализе позволило определить  $10^5 - 10^6$  КОЕ / мл *F. tularensis*. Связывание бактериальных клеток с ИМЧ подтверждено флуоресцентной микроскопией.

*Ключевые слова:* *Francisella tularensis*, иммуномагнитные частицы, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, флуоресцентная микроскопия.

S.S.Vetchinin, P.Kh.Kopylov, N.V.Kiseleva, O.G.Nikolaeva, A.V.Gavryushkin

### Obtainment of the Immunomagnetic Particles for *Francisella tularensis* Cells Detection

State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Obtained are the immunomagnetic particles with the immobilized highly-specific monoclonal antibodies FB 11-x to *Francisella tularensis*. Their usage in enzyme-linked immunoassays made it possible to detect  $10^5 - 10^6$  CFU/ml of *F. tularensis*. The binding of the bacterial cells with IMP was confirmed by the results of fluorescent microscopy.

*Key words:* *Francisella tularensis*, immunomagnetic particles, monoclonal antibodies, enzyme-linked immunoassay, fluorescent microscopy.

Особо опасные инфекции, относящиеся преимущественно к карантинным и природно-очаговым, в эпидемиологическом плане не теряют актуальности. В течение 2005 г. в России наблюдался резкий рост заболеваемости туляремией, который привел к госпитализации 831 человека (из них 109 детей в возрасте до 14 лет), и повышению показателя заболеваемости до 0,58 на 100 тыс. населения. Эпидемиологическая ситуация характеризовалась преимущественным инфицированием городских жителей (более 80 % случаев), в частности, в Москве впервые было зарегистрировано 230 случаев. Заражение происходило на территории Московской, Рязанской и Владимирской областей. Предположительно, причиной болезни людей стала активизация природного очага среди мышевидных грызунов. Ситуация существенно осложняется ошибками в индикации *F. tularensis* и продолжает оставаться нестабильной. Поэтому разработка новых методов идентификации возбудителей опасных инфекционных болезней в различных объектах внешней среды остается актуальной ввиду ее социальной значимости. Использование традиционных методов культивирования патогенных бактерий и определение их биохимических маркеров в объектах окружающей среды может приводить к недооценке воздействия ряда сублетальных факторов, изменяющих метаболизм и репродуктивную способность бактерий при выращивании на искусственных питательных средах. Это приводит к задержке их роста и увеличению продолжительности анализов, как минимум, на одни сутки, особенно при низких

концентрациях микробов. Одним из подходов для решения этой проблемы может быть использование предварительной иммуномагнитной сепарации патогенов [6, 12]. Повышенный интерес к использованию магнитных носителей представляется правомерным, так как лежит в русле передовых тенденций создания полностью автоматизированных систем экспресс-диагностики патогенных микроорганизмов.

Целью работы было получение магнитных частиц (МЧ) и создание на их основе иммуномагнитных частиц (ИМЧ), пригодных для определения возбудителя туляремии.

### Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали бактериальные штаммы из коллекции ФГУН ГНЦ ПМБ: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Providencia rettigeri*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Pasteurella multocida* ATCC 43137, *Corynebacterium diphtheria* № 75, *Citrobacter diversus*, *Morganella morgani* 1253, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia pseudotuberculosis* шт. 1 (Pfeiffer), *Yersinia enterocolitica* 348-01, *Legionella micdadei* 11731 (NCTC), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* F-392, *Burkholderia pseudomallei* 109 (Roos) и *Burkholderia mallei* Z-12, *Francisella tularensis* штамм 15, *Francisella novicida* штамм 112.

**Реактивы.** Полиаллиламингидрохлорид и полистиролсульфонат (Aldrich, США), сульфаты двух- и

трехвалентного железа, гидроокись калия, тетраэтоксисилан, однозамещенный и двузамещенный фосфаты натрия, хлористый натрий, глутаровый альдегид, Трис, НЕРЕС, бикарбонат натрия, натрий йоднокислый мета, боргидрид натрия, сухое обезжиренное молоко, твин-20, *o*-фенилендиамин, лимонная кислота (FLUKA, США), сефароза – белок А, стрептавидин, *N*-гидроксисукцинимидный эфир биотина, *N,N'*-диметилформамид, флуоресцинизотиоцианат (ФИТЦ), пероксидаза хрена, конъюгат антимышиных антител с пероксидазой хрена и натрий уксуснокислый (SIGMA, США), остальные реактивы – отечественного производства с квалификацией «х.ч.» или «о.с.ч.».

**Получение модифицированных магнитных частиц с иммобилизованным стрептавидином.** Магнитные частицы получали конденсацией сульфатов двух- и трехвалентного железа [10], силиконировали [4] и покрывали полимерными слоями полиаллиламингидрохлорида (ПАА) и полистиролсульфоната (ПСС), несущими чередующиеся противоположные заряды [11]. Последовательно повторяя процедуру обработки, наносили восемь полимерных слоев: (ПАА-ПСС)<sub>8</sub>. Контроль поверхностного заряда магнитных частиц на каждом этапе обработки полимерами подтверждали измерением их электрофоретической подвижности [9]. Размеры магнитных частиц и их концентрацию в суспензии определяли методом световой микроскопии [1]. Для иммобилизации стрептавида на поверхности магнитных частиц использовали 1 % раствор глутарового альдегида, 0,3 мл которого смешивали с 1,0 мл суспензии магнитных частиц в 0,1 М ФСБ, содержащей 0,005 % стрептавида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 120 мин со скоростью 150 об./мин<sup>-1</sup>. Несвязавшиеся реагенты удаляли центрифугированием, осадок МЧ суспензировали в 1 мл 0,5 М трис-НСl (рН 8,5) и инкубировали при температуре 10 °С в течение ночи, после чего модифицированные МЧ с конъюгированным стрептавидином промывали 0,1 М ФСБ, рН 7,5.

**Получение модифицированных моноклональных антител FB11-х.** Использовали моноклональные антитела FB11-х [3, 8], которые очищали аффинной хроматографией на сефарозе – белок А. По результатам твердофазного ИФА их титр составлял не менее 1:100000 для концентрации МКАТ равной 1 мг/мл. Перекрестное взаимодействие МКАТ FB11-х с клетками перечисленных выше видов патогенных микроорганизмов определяли в твердофазном ИФА [2]. Биотинилирование МКАТ FB11-х проводили *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина [7]. Для флуоресцентного анализа МКАТ FB11-х обрабатывали флуоресцинизотиоцианатом по методу [5]. Пероксидазу хрена и МКАТ FB11-х конъюгировали периодатным методом [13].

**Получение иммуномагнитных частиц.** Для определения оптимального соотношения МКАТ и магнитных частиц в микропробирке емкостью 0,2 мл

вносили по 2 мкл 10 % суспензии магнитных частиц, покрытых стрептавидином, и по 20 мкл биотинилированных антител в ФСБ с концентрациями от 0,05 до 1,0 мг/мл. Смесь инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре и пятикратно промывали 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,2), содержащим 0,05 % твина-20 (ФСБТ), удерживая частицы постоянным магнитом. Для уменьшения вероятности неспецифического связывания компонентов ИФА на последующих этапах комплекс МЧ – МКАТ FB11-х инкубировали со 100 мкл 5 % раствора обезжиренного молока в ФСБТ при тех же условиях. Избыток молока удаляли трехкратной промывкой ФСБТ и добавляли в каждую пробирку по 100 мкл раствора (1:2000) антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Суспензию инкубировали при перемешивании в течение 40 мин при температуре 37 °С. После пятикратной промывки ФСБТ в микропробирке вносили по 100 мкл субстрата, содержащего 0,003 % перекиси водорода и 0,04 % раствора *o*-фенилендиамина в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере, рН 5,0. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М раствора серной кислоты и регистрировали оптическую плотность продукта реакции при 492 нм. За оптимальную концентрацию МКАТ FB11-х принимали ее значение, при котором величина оптической плотности достигала предельной величины.

**Определение клеток *F. tularensis* с использованием иммуномагнитных частиц.** К 2 мкл 10 % суспензии иммуномагнитных частиц (ИМЧ) добавляли 30 мкл клеток *F. tularensis*, инкубировали при температуре 37 °С и перемешивали в течение 30 мин. Несвязавшиеся микробные клетки удаляли пятикратной промывкой ФСБТ. Как и в предыдущем разделе, варьировали концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х при постоянной концентрации клеток возбудителя туляремии, составлявшей  $3,3 \cdot 10^8$  КОЕ / мл буферного раствора. Затем ИМЧ обрабатывали моноклональными антителами FB11-х, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 мг/мл), разведенными 1:3000. Обработку, промывку и регистрацию результатов ИФА проводили, как указано в предыдущем разделе.

В другой серии вариантов ИФА использовали корректированную в предыдущих экспериментах концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х и варьировали концентрацию клеток *F. tularensis*, инактивированных на кипящей водяной бане в течение 15 мин, в интервале от  $10^3$  до  $10^7$  КОЕ / мл.

**Флуоресцентная микроскопия клеток *F. tularensis*.** Иммуномагнитные частицы, связанные с клетками *F. tularensis* ( $10^9$  в 1 мл), инкубировали с раствором ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х (разведение 1:1000) в ФСБТ в течение 1 ч при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании. Затем проводили семикратную промывку частиц тем же буфером. Осадок суспензировали в 50 мкл 50 % раствора

глицерина в 100 мМ трис-буфере, pH 8,5. Суспензию переносили на предметное стекло, накрывали препарат покровным стеклом и анализировали на флуоресцентном микроскопе (Opton, Германия). Контрольные пробы содержали МЧ, не обработанные биотинилированными МКАТ FB11-х.

### Результаты и обсуждение

В экспериментах получены частицы магнетита (окись-закись железа), представляющие собой гранулы овальной формы размером 0,5–1 мкм. Начальные этапы модифицирования МЧ включали силиконирование поверхности оксидных микрогранул ферромагнетика с последующим нанесением чередующихся слоев полимеров, противоположные заряды которых обеспечивали их удерживание на поверхности. Величины электрофоретической подвижности частиц, покрытых полимерными слоями, измеренные на каждом текущем этапе модификации, составляли в среднем  $0,28 \text{ мкм} \times \text{см} \times \text{в}^{-1} \times \text{с}^{-1}$  и  $-1,16 \text{ мкм} \times \text{см} \times \text{в}^{-1} \times \text{с}^{-1}$  для слоев ПАА и ПСС соответственно.

Стрептавидин ковалентно иммобилизовали на аминогруппах внешнего слоя ПАА, что давало возможность варьировать природу биотинилированных лигандов и, в итоге, изменять функциональную активность ИМЧ в отношении различных возбудителей. Концентрация МЧ, покрытых стрептавидином, составляла  $10^{10}$  частиц в 1 мл суспензии.

Связывающую способность МЧ с иммобилизованным стрептавидином определяли титрованием биотинилированными МКАТ FB11-х с последующей детекцией образованного аффинного комплекса в ИФА. Максимальное связывание биотинилированных МКАТ с МЧ наблюдали при концентрации антител равной 0,5 мг/мл. Так как ИМЧ создавались с целью идентификации клеток, для подтверждения предыдущего результата была использована систе-

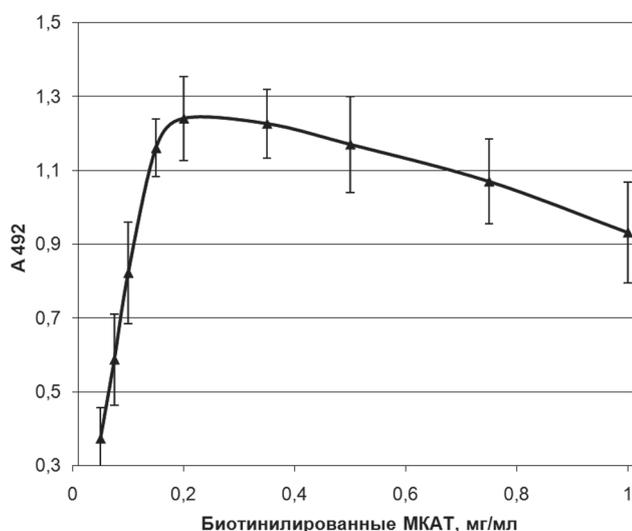


Рис. 1. Иммуноферментный анализ связывания клеток *F. tularensis* иммуномагнитными частицами, образованными различными инкубационными концентрациями биотинилированных МКАТ FB11-х

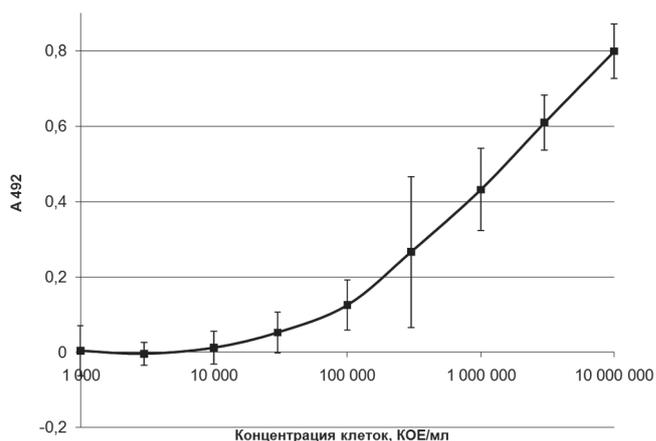


Рис. 2. Определение клеток *F. tularensis* с помощью иммуномагнитных частиц иммуноферментным анализом

ма ИФА, включающая ИМЧ, бактериальные клетки и конъюгат МКАТ FB11-х с пероксидазой хрена. Введение клеток *F. tularensis* в эту систему показало, что для их определения в ИФА оптимальной является концентрация биотинилированных антител равная 0,2 мг/мл, а не 0,5 мг/мл (рис. 1). Этот эффект, вероятно, был обусловлен особенностями пространственного взаимодействия ИМЧ с бактериальными клетками. В связи с этим в последующих экспериментах с микробными клетками, образующими комплекс с ИМЧ, использовали концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х равную 0,2 мг/мл. Такая система регистрировала в ИФА  $10^5$ – $10^6$  КОЕ / мл *F. tularensis* в 1 мл (рис. 2).

Результаты взаимодействия МКАТ FB11-х, меченных ФИТЦ, с комплексом ИМЧ – бактериальные клетки представлены на рис. 3. Интенсивное зеленое свечение иммуномагнитных частиц, наблюдаемое в поле зрения флуоресцентного микроскопа, свидетельствовало об эффективном связывании ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х с клетками возбудителя *F. tularensis* (рис. 3, В). Флуоресценция ИМЧ без добавления туляремийных клеток имела желтый цвет, что от-

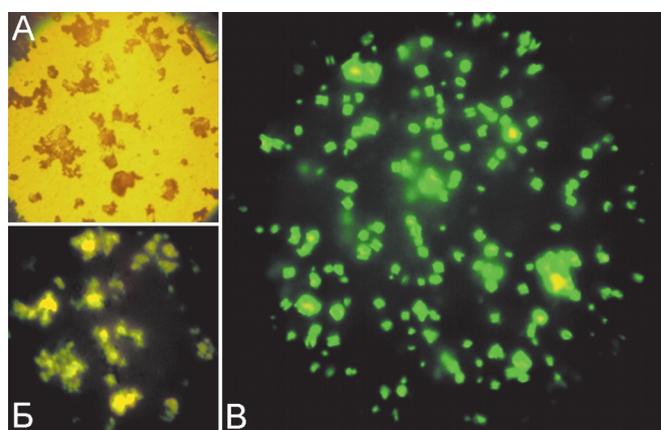


Рис. 3. Микроскопия комплекса иммуномагнитных частиц и бактериальных клеток:

А – ИМЧ в видимом свете в отсутствии клеток *F. tularensis*;  
 Б – аутофлуоресценция ИМЧ в отсутствии клеток *F. tularensis*;  
 В – флуоресценция ИМЧ с клетками *F. tularensis*

ражало отсутствие взаимодействия ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х и магнитных частиц (рис. 3, Б).

Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования ИМЧ для определения клеток *F. tularensis* в ИФА, так как чувствительность метода не уступает его твердофазному варианту на микропланшетах. Полученные высокоспецифичные ИМЧ могут успешно применяться для концентрирования клеток возбудителя из объектов окружающей среды. Простота, специфичность и наглядность определения патогена не требуют дополнительного культивирования клеток после их концентрирования и подтверждаются иммуноферментным и иммунофлуоресцентным анализом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельй В.А., Пинчук Л.С. Введение в материаловедение герметизирующих систем. Минск: Наука и техника; 1980. 169 с.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа; 1991. 288 с.
3. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Тохтамышева Н.В., Аверин С.Ф., Кулеватский Д.П., Аверина А.А. и др. Определение антигенной детерминанты превентивных моноклональных антител, специфичных к липополисахариду *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 1:83–8.
4. Шляпникова Е.А., Шляпников Ю.М., Афанасьев В.Н., Афанасьева Г.В., Гаврюшкин А.В., Белецкий И.П. Исследование качества amino-модифицированных подложек, используемых для гибридизационного анализа. Биоорганическая химия. 2007; 33(2):261–8.
5. Goding J.W. Conjugation of antibodies with fluorochrome: modifications to the standard methods. J. Immunol. Meth. 1976; 13:215–26.
6. Grant I.R., Ball H.J., Rowe I.M.T. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(9):3153–8.
7. Hofmann K., Finn F.M., Kiso Y. Avidin-biotin affinity columns. General methods for attaching biotin to peptides and proteins. J. Amer. Chem. Soc. 1978; 100(11):3585–90.
8. Khlebnikov V.S., Vetchinin S.S., Tochtamycheva N.V., Golovljov I.R., Grechko G.K., Kulevatsky D.P. et al. Preventive of monoclonal antibodies specific to LPS *Francisella tularensis* and lo-

calisation of antigenic determinant. 11th Meeting Europ. Federat. Immunol. Soc. Abstracts. Finland; 1991. P. 23–4.

9. Lvov Y., Mohwald H., Dekker M., editors. Protein architecture: interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology. New York; 2000. P. 125–67.

10. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE Trans. Magn. 1981; 2:1247–8.

11. Petrov A.I., Gavryushkin A.V., Sukhorukov G.B. Effect of temperature, pH and shell thickness on the rate of Mg<sup>2+</sup> and Ox<sup>2-</sup> release from multilayered polyelectrolyte shells deposited onto microcrystals of magnesium oxalate. J. Phys. Chem. B. 2003; 107:868–75.

12. Pyle B.H., Broadaway S.C., McFeters G.A. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65(5):1966–72.

13. Wilson M.B., Nakane P.P. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, in immunofluorescence and related staining techniques. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., editors. Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam; 1978. P. 215–24.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Belyi V.A., Pinchuk L.S. [Introduction to the Material Engineering of Sealing Systems]. Minsk: Nauka i Tekhnika; 1980. 169 p.
2. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. [Theory and practice of enzyme-linked immunoassay]. M.: Vys. Shkola; 1991. 288 p.
3. Khlebnikov V.S., Golovlev I.R., Tochtamycheva N.V., Averbina S.F., Kulevatsky D.P., Averbina A.A. et al. [Epitope detection of the preventive monoclonal antibodies, specific for *Francisella tularensis* lipopolysaccharide]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1993; 1:83–8.
4. Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Yu.M., Afanas'ev V.N., Afanas'eva G.V., Gavryushkin A.V., Beletsky I.P. [Examination of the quality of amino-modified bases, used for the hybridization analysis]. Bioorganic Chemistry. 2007; 33(2):261–8.

#### Authors:

Vetchinin S.S., Kopylov P.Kh., Kiseleva N.V., Nikolaeva O.G., Gavryushkin A.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Ветчинин С.С., Копылов П.Х., Киселева Н.В., Николаева О.Г., Гаврюшкин А.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 27.07.10.