

УДК 615.339;57.088.1

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЭНДОЛИЗИНА LysAm24-SMAP

© 2024 г. А. А. Климова^{1,2}, И. В. Григорьев¹, Д. В. Васина¹,
М. Н. Анурова², В. А. Гущин^{1,3}, Н. П. Антонова^{1,*}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России,
Москва, 123098 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,
Москва, 119991 Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: northernnatalia@gmail.com

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

В настоящее время модифицированные лизины бактериофагов широко исследуются в качестве активных субстанций противомикробных средств. В связи с этим становится актуальной разработка эффективных и точных методов измерения этих ферментов. Для детекции рекомбинантного модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP в биологических образцах разработан метод иммуноферментного анализа (ИФА). Были подобраны оптимальные параметры для определения белка, в частности, изучено влияние соли и состава буферной системы для подготовки образцов для анализа. Показана применимость системы для иммунодетекции генно-инженерного эндолизина LysAm24-SMAP в различных биологических образцах при содержании в них фермента начиная от 0.4 нг/мл. Также, оценено влияние матричных эффектов образцов гомогенатов органов и тканей животных, лизатов штамма-продуцента и их отдельных компонентов при проведении анализа и показано, что наличие 0.65 М NaCl в ИФА-буфере в случае LysAm24-SMAP критично для получения корректных результатов и снижает неспецифические взаимодействия. Была подтверждена эффективность использования разработанной системы в иммунохимическом контроле бактериолитического фермента.

Ключевые слова: рекомбинантные эндолизины, иммуноферментный анализ, бактериальные лизаты, фармакокинетические исследования

DOI: 10.31857/S0555109924040108 EDN: RZYKWW

Литические бактериофаги являются облигатными паразитами, вызывающими гибель инфицированных бактерий, что побудило исследовать их, а также ферменты их литического комплекса – лизины, в качестве средств терапии бактериальных инфекций, альтернативных классическим антибиотикам [1, 2]. Бактериофаги выделяют несколько типов лизинов, одними из которых являются выделяемые на терминальной стадии инвазии бактерий эндолизины, разрушающие клеточную стенку бактериальной клетки изнутри для высвобождения новых собранных вирусных частиц. Эти ферменты гидролизуют пептидные и/или гликозидные связи пептидогликана, что приводит к нарушению тургорного давления и гибели клетки.

В последние годы актуальность исследований и разработок в данной сфере возросла по причине

распространяющейся антибиотикорезистентности у бактерий [3, 4]. Сегодня ведутся активные исследования по использованию эндолизинов в борьбе с заболеваниями, вызванными грамположительными и грамотрицательными возбудителями, склонными к приобретению множественной лекарственной устойчивости, в том числе группы ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и другим представителям семейства *Enterobacteriaceae* [5, 6]. Применение лизинов в отношении грамотрицательных бактерий долгое время было затруднено из-за экранирующего действия наружной мембраны, однако в последнее десятилетие стало возможным, в том числе, благодаря созданию генноинженерных модифицированных молекул. Методы генной инженерии

и направленного конструирования молекул позволяют модифицировать нативные фаговые эндолизины, значительно увеличивая их бактерицидную активность, улучшая фармакокинетическую стабильность и физико-химические свойства [7], а рекомбинантная экспрессия таких белков позволяет получать их биотехнологическим путем.

Необходимость в точном количественном определении возникает практически на всех стадиях изучения лизинов. Например, при оптимизации экспрессии белка количественная оценка становится одним из основных критериев выбора оптимальных условий экспрессии. Также, при исследованиях фармакокинетических параметров лекарственных средств на основе лизинов необходимо проводить оценку содержания и распределения лизинов в органах, тканях и биологических жидкостях лабораторных животных. Очевидно, что такие исследования требуют разработки быстрого и высокоспецифичного метода скрининга, позволяющего отбирать высокоэффективные штаммы-продуценты белков, а также детектировать низкие концентрации фермента в биологических образцах.

Существует несколько способов специфического и неспецифического измерения количественного содержания молекул белковой природы: УФ-спектроскопия, колориметрия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, масс-спектрометрические методы анализа. Однако для сложных смесей, таких как биологические образцы, в которых присутствует множество различных белков, больше подходит иммунодетекция с помощью, например, иммуноферментного анализа (ИФА), который отличается высокой чувствительностью и специфичностью, низкими затратами времени, не требует сложного оборудования [8]. Точность данного вида анализа обеспечивается специфическим взаимодействием антиген-антитело, а высокая чувствительность позволяет измерять белки в нано- и пикограммовых концентрациях. Тем не менее, в случае эндолизинов важно учитывать факторы, которые могут влиять на результат ИФА: гомология с белками штаммов-продуцентов или с белками, которые присутствуют в гомогенатах органов животных, взаимодействие участков лизина с компонентами ИФА-буферов, поскольку данные ферменты часто содержат функциональные домены, способные связываться с полисахаридами, или склонны к электростатическим взаимодействиям. Кроме того, в случае биологических образцов, необходимо учитывать возможное взаимодействие аналита с содержащимися в образце ферментами, нуклеиновыми кислотами и другими биомолекулами (так называемый матричный эффект), приводящее как к протеолизу эндолизина, так и к его агрегации с компонентами матрикса, что, в свою очередь, может существенно исказить результаты измерений. Подбор оптимальных условий проведения анализа

и, в первую очередь состава буфера для разведения образцов, в значительной степени позволяет нейтрализовать негативное влияние матрикса на результаты измерения.

LysAm24-SMAP является генно-инженерным белком с молекулярной массой 27.0 кДа, ИЭТ 9.95, полученным при слиянии последовательности эндолизина LysAm24 [5] и SMAP-фрагмента. LysAm24 – это лизоцим-подобная N-ацетилмурамидаза бактериофага, поражающего бактерии рода *Acinetobacter*, содержащая на N-конце дополнительный домен связывания с клеточной стенкой, на C-конце – каталитический домен [5]. Каталитический домен относится к гликозид-гидролазам семейства 24 (GH24) и является распространенным среди литических бактериофагов. Ранее LysAm24 показал способность активно действовать на широкий спектр грамотрицательных бактерий в тестах *in vitro*, в дальнейшем его использование позволит создавать высокоэффективные противомикробные средства [5, 11]. SMAP-фрагмент – это миелоидный пептид барана, использующийся для повышения антибактериальной активности [9, 10]. Добавление SMAP-пептида повышает расчетный общий заряд белка до 19.8 при pH 7.5 и введение его в структуру молекулы позволяет эффективно пермеабиллизировать наружную мембрану бактерий. Разработка эффективного и точного инструмента для количественного измерения гибридной молекулы LysAm24-SMAP позволит делать выводы по результатам подбора условий экспрессии белка, а также в экспериментах по выявлению фармакокинетических и фармакодинамических свойств препарата.

Цель работы – создание и оценка применимости тест-системы ИФА для количественного определения содержания эндолизина в различных биологических образцах, таких как лизаты бактериальной биомассы штамма-продуцента *E. coli*, гомогенаты органов и тканей, а также в сыворотке крови подопытных животных на примере модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP, активного в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий.

МЕТОДИКА

Получение рекомбинантного эндолизина LysAm24-SMAP. В экспериментах был использован эндолизин LysAm24-SMAP, полученный методом рекомбинантной экспрессии. Для этого исходная кодирующая последовательность LysAm24-SMAP, включающая последовательность мурамидазы LysAm24 (NCBI AN: APD20282.1), C-конец которой был дополнительно модифицирован фрагментом противомикробного пептида SMAP-29 (1–17, K2,7,13, RKLRLKRLKRIANKVKKY), была искусственно синтезирована в векторе pALTA-LysAm24-SMAP и интегрирована в экспрессионный вектор

pET-42b (+). Корректность сборки векторной конструкции проверяли методом секвенирования по Сэнгеру.

Далее, эндолизин получали аналогично протоколу, описанному в [12]. Полученные конструкции помещали в штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3) pLysS методом трансформации “heat-shock”, культивировали в жидкой питательной среде LB с добавлением селективных антибиотиков (хлорамфеникол и канамицин) при 37°C в шейкере-инкубаторе. Экспрессию белка индуцировали с помощью изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (“AppliChem”, Германия). Полученную биомассу осаждали центрифугированием, лизировали и проводили двухстадийную хроматографическую очистку с использованием катионообменного сорбента SP-sepharose (“GE Healthcare”, США) и гель-экслюзионного сорбента Superdex 75pg, на хроматографической колонке XK 16–600 (“GE Healthcare”, США), элюируя белки фосфатно-солевым буфером (PBS tablets: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7.3–7.5, “VWR”, США). Конечную концентрацию раствора эндолизина определяли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 280 нм (Implen NanoPhotometer, “IMPLEN”, Германия) с учетом теоретического коэффициента поглощения, равного 0.852. Определение чистоты белка проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 16%-ном полиакриламидном геле.

Получение специфических поликлональных антител. Кроликов иммунизировали не менее 8 раз введением 140 мкг LysAm24-SMAP подкожно с промежутком в 14 дней. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда (“Sigma”, США), а все последующие – в неполном адьюванте Фрейнда. Через 5–7 сут после второй, четвертой и последующих четных иммунизаций у кроликов забирали 35–40 мл крови из ушной вены, после завершения процесса свертывания осаждали тромб, к полученной сыворотке добавляли азид натрия до конечной концентрации 0.1% и хранили при 4°C.

Очистку поликлональных антител (АТ) проводили с использованием иммуноаффинного сорбента на основе NHS-сефарозы (“GE Healthcare”, Германия). Для приготовления сорбента LysAm24-SMAP с помощью колонок для обессоливания PD-10 (“GE Healthcare”, Германия) АТ переводили в буфер для конъюгации (0.2 М NaHCO₃ (“Amresco”, США), 0.5 М NaCl, pH 8.3), раствор смешивали с равным объемом отмытого сорбента в соотношении 1 : 1 и инкубировали в ротационном шейкере в течение 16–18 ч при комнатной температуре. Свободные сайты связывания блокировали добавлением раствора Трис-НСl pH 8.0 до конечной концентрации 100 мМ согласно протоколу производителя NHS-сефарозы.

Для выделения АТ в сыворотки иммунных кроликов вносили NaCl до концентрации 0.5 М и наносили их на сорбент (LysAm24-SMAP-NHS-sepharose). Далее сорбент промывали раствором PBS с добавлением 0.5 М NaCl и элюировали ацетатным буфером pH 2.5–2.8 (0.1 М CH₃COOH, 0.15 М NaCl). Сразу же после элюции добавляли Трис-НСl 1.0 М до pH 7.0–8.0. Содержащие АТ фракции элюата переводили в буфер для хранения (PBS с 0.1%-ным NaN₃, “Amresco”, США) с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15 (“Millipore”, Германия) 30 кДа, одновременно доводя концентрацию АТ в образце до 1–2 мг/мл. Специфическую активность полученных антител определяли методом непрямого ИФА.

Оценка активности полученных антител методом непрямого ИФА. В лунках ИФА-планшеты (96-луночные ИФА-планшеты высокой сорбции ESP-96-D, “Servicebio”, Китай) сорбировали эндолизин, внося по 100 мкл раствора LysAm24-SMAP с концентрацией 1 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) pH 9.3–9.6. Сорбцию проводили в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день блокировали свободные сайты связывания, внося в лунки планшета по 100 мкл блокирующего раствора S002 (“Хема”, Россия) с добавлением сахарозы до 5% (“Диа-эм”, Россия) и сорбита до 0.5% (“Хема”, Россия). Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 4°C, удаляли жидкость из лунок, высушивали 24–48 ч при комнатной температуре, упаковывали в целфоновые пакеты и хранили до использования при 4°C.

Для постановки эксперимента в лунки вносили по 100 мкл исследуемых сывороток и очищенных антител в серийных разведениях 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 в ИФА-дiluэнте S011 (PBS pH 7.2–7.4, казеин, Твин-20, консервант на основе фенола, краситель, “Хема”, Россия). Инкубировали 1 ч при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 600 об./мин. Для удаления несвязавшихся антигенов, лунки отмывали PBS с 0.1%-ным Твин-20. После этого добавляли по 100 мкл раствора антител (конъюгат поликлональных антител козы к IgG кролика с пероксидазой хрена, “HyTest”, Россия) в разведении 1 : 25000, инкубировали 1 ч при температуре 37°C, 600 об./мин, затем проводили отмывку.

Для визуализации реакции в лунки вносили по 100 мкл субстратного буфера с тетраметилбензидином (R055, “Хема”, Россия) и инкубировали 10 мин. Останавливали реакцию с помощью раствора 10%-ного HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (Multiscan FC, “Thermo Scientific”, США).

Измерение LysAm24-SMAP методом сэндвич-ИФА. Для измерения содержания эндолизина в образцах бактериальных лизатов, в присутствии ДНК и пептидогликана, в образцах биологических

жидкостей, органов и тканей животных, предварительно проводили конъюгацию очищенных антител к LysAm24-SMAP с пероксидазой хрена аналогично методике, описанной в [13] со следующими модификациями. Для остановки реакции пероксидазы с периодатом натрия наносили смесь на колонку для гель-фильтрации PD-10 и переводили в боратный буфер (0.05 М H_3BO_3 , "Helicon", Россия), pH 8.6). При конъюгации антител с пероксидазой хрена для стабилизации образовавшегося основания Шиффа вместо натрия цианоборогидрида добавляли натрия борогидрид ("Merk", Германия). В полученный конъюгат добавляли глицерин до конечной концентрации 55% (об./об.) и хранили при -30°C .

Для анализа на ИФА-планшеты сорбировали аффинно-очищенные кроличьи антитела к LysAm24-SMAP, в концентрации 1 мкг/мл в КББ. Сорбцию проводили в течение ночи при 4°C . Далее блокировали свободные сайты связывания, внося в лунки планшета по 100 мкл блокирующего раствора S002 ("Хема", Россия) с добавлением сахаразы до 5% и сорбитола до 0.5%. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 4°C , удаляли жидкость из лунок, высушивали 24–48 ч при комнатной температуре, упаковывали и хранили до использования при 4°C .

Для постановки эксперимента раствор эндолизина известной концентрации и исследуемые образцы разводили в ИФА-дилюэnte S011 либо в 50 мМ Трис-буфере pH 7.5 с 1.0% бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma-Aldrich, США), 500 мМ NaCl и 0.1% Твин-20 и вносили в лунки по 100 мкл. Инкубировали 1 ч при температуре 37°C с перемешиванием со скоростью 600 об./мин. Лунки трижды отмывали, внося в них по 300 мкл отмывочного буфера (PBS с 0.1%-ным Твин-20). После этого добавляли по 100 мкл раствора аффинно очищенных кроличьих антител к LysAm24-SMAP, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 5000. Инкубировали 1 ч при температуре 37°C при 600 об./мин, далее лунки промывали пять раз. Визуализацию проводили, как описано выше.

Для эндолизинов LysAp22-SMAP и LysECD7-SMAP методика проведения анализа была аналогичной.

Измерение LysECD7-SMAP, CFP-10 методом сэндвич-ИФА. Для того, чтобы сравнить влияние добавления соли к буферу для разведения образцов S011 проводили сэндвич-ИФА для белков LysECD7-SMAP и CFP-10. Очистку АТ, сорбцию и блокировку данных АТ проводили аналогично методике на тест-систему для LysAm24-SMAP. Для CFP-10 использовали моноклональные АТ мыши к CFP-10 (сорбционные АТ) и конъюгат мышинных моноклональных АТ к CFP-10 с ПХ ("HyTest", Россия). Для постановки эксперимента растворы LysECD7-SMAP, CFP-10 с известной

концентрацией и исследуемые образцы разводили в ИФА-дилюэnte S011 и в S011 с добавлением NaCl до 0.25, 0.5, 1 М. Далее проводили анализ аналогично методике сэндвич-ИФА, описанной выше.

Пробоподготовка образцов бактериальных лизатов. Для измерения концентрации эндолизина в отрицательном лизате, не содержащем эндолизина, использовали штамм *E. coli* BL21(DE3) pLysS ("Евроген", Россия).

Бактериальные лизаты получали по стандартному протоколу разрушения культуры для дальнейшей очистки белка [11]. Для этого, выращенную в течение ночи при температуре 37°C , 250 об./мин в жидкой среде LB с добавлением антибиотика (хлорамфеникол) культуру *E. coli* разбавляли свежей средой в соотношении 1 : 100 и продолжили выращивание при 37°C при 250 об./мин еще 8 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием (15 мин, 3000 g), а затем разрушали клетки с помощью ультразвука в буфере для лизиса: 20 мМ Трис-HCl pH 8.0, 250 мМ NaCl, 0.1 мМ динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты ("Helicon", Россия). Полученный лизат снова центрифугировали (30 мин, 10000 g) и сохраняли супернатант.

Выделение ДНК и пептидогликана. ДНК и пептидогликан выделяли из культуры бактериального штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50–16, депонированного в коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Для этого штамм выращивали в среде LB в течение 16–18 ч, биомассу осаждали центрифугированием (6000 g, 10 мин). Для выделения ДНК из культуры использовали СТАВ метод [14]. Пептидогликан выделяли по методике, описанной в работе [15]. Концентрацию ДНК измеряли при помощи набора Qubit DNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit 3.0 ("Thermo Fisher Scientific Eugene", США), пептидогликана – на спектрофотометре Implen NanoPhotometer ("Implen", Германия) по калибровочной кривой OD_{206} , которая была построена на основе концентраций пептидогликана *Micrococcus luteus* ("Sigma", США).

Получение гомогенатов органов и тканей животных. Все манипуляции проводили на льду. Образцы органов и тканей мышей, хранящиеся в низкотемпературном холодильнике при температуре -80°C , размораживали при 4°C минимально необходимое для оттаивания образцов время. Далее к исследуемым образцам добавляли буфер для гомогенизации (PBS, 1.0 М NaCl, 1.0 мМ ЭДТА-Na) в соотношении 1 : 4 (на 100 мг органа – 400 мкл буфера), добавляли фенолметилсульфонил фторид ("Диаэм", Россия) до конечной концентрации 1 мМ. В каждую пробирку вносили по 1 стальному шартику 5 мм и гомогенизировали образцы 4 минуты с частотой 50 Гц на TissueLyser LT ("QiaGen", Германия). Сразу же после гомогенизации образцы замораживали и хранили при -80°C .

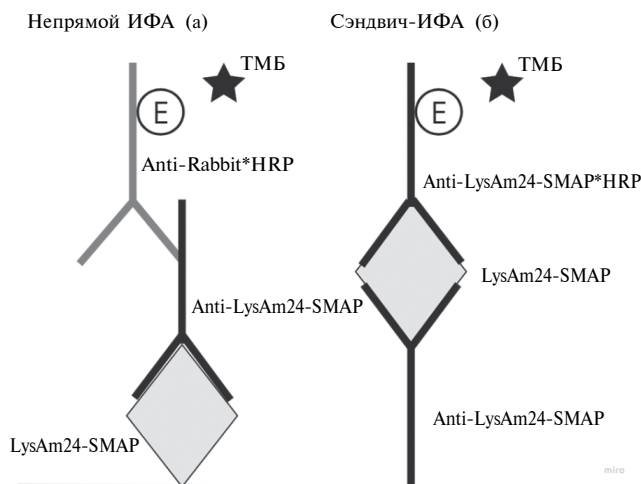


Рис. 1. Тест-системы, используемые в работе: не-прямой ИФА (а); сэндвич-ИФА (б). LysAm24-SMAP – антиген, Anti-LysAm24-SMAP – поликлональные антитела, выделенные из сыворотки иммунизированных животных, Anti-Rabbit*HRP – антивидовой конъюгат антител к IgG кролика с пероксидазой хрена (Е), ТМБ – субстрата для визуализации реакции. Для визуализации схем ИФА была использована бесплатная версия сайта <https://miro.com/gu/>.

Непосредственно перед постановкой образцы размораживали на льду, перемешивали и осветляли центрифугированием со скоростью 16000 g при 4°C в течение 10 мин. Измерение проводили в осветленном супернатанте.

Заключение биоэтической комиссии. Протоколы получения антител и образцов с использованием животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заключение ЛЭК № 64 от 10 октября 2023г).

Статистический анализ и визуализация данных. Данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 9.5.0. Использовали 2 технические и по 2 или 5 биологических повторностей в ИФА. На графиках приведены определенные значения \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость изменений величины оптической плотности рассчитана с использованием дисперсионного анализа (значимыми считались $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе разработки лекарственных ферментных препаратов возникает ряд задач, связанных с их детекцией. При этом, метод ИФА является одним из наиболее доступных и удобных в применении. В настоящее время в литературе опубликовано небольшое количество научных работ по иммунохимическому определению эндолизин и других литических ферментов. Для эндолизина SAL200, обладающего антистафилококковым действиям,

в исследовании фармакокинетики на обезьянах использовали иммуноферментный анализ для количественного определения молекулы в сыворотке крови [16]. Также известен метод сэндвич-ИФА количественного анализа в сыворотке крови крыс лизостафина – бактериоцина стафилококка, также являющегося пептидогликан-деградирующим ферментом [17]. Тем не менее, работы, описывающие разработку подобных тест-систем на данный момент в литературе, отсутствуют.

Для LysAm24-SMAP отсутствуют способы специфического количественного определения с высокой чувствительностью, в связи с этим в настоящей работе была разработана тест-система для оценки количественного содержания целевого белка в различных матриксах и исследованы ее основные параметры: чувствительность, специфичность, динамический диапазон и точность измерения.

После иммунизации кроликов модифицированным эндолизин LysAm24-SMAP, были получены гипериммунные сыворотки, проанализированные методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (рис. 1а). Полученные результаты свидетельствовали о наличии специфических АТ в сыворотках иммунизированных животных (сигнал в разведении 1 : 100000 превышал 1 ед. ОП) и были пригодны для их выделения и конъюгации с пероксидазой хрена.

Очищенные специфические к LysAm24-SMAP АТ использовали для создания тест-системы по принципу “сэндвич”-ИФА (рис. 1б) как в качестве АТ, сорбируемых на подложку, так и для получения детектирующего конъюгата с пероксидазой хрена. Выбор метода обусловлен тем, что применение двухстадийного сэндвич-ИФА является оптимальным для детекции антигенов, размер которых позволяет одновременное связывание с двумя антителами к различным фрагментам молекулы. Также использование на первом этапе специфического захвата антигена сорбированными на подложку антителами позволяет проводить измерение в сложных белковых матриксах, поскольку удаление несвязавшихся компонентов матрикса в ходе отмывки позволяло значительно снизить их влияние на результат реакции, а также избежать так называемого “хук-эффекта” [18]. Это делает использование двухстадийного ИФА для измерения широких диапазонов аналитов в сложных матриксах более предпочтительным в сравнении с одностадийным сэндвич-ИФА.

Исследование диапазона и специфичности тест-системы для количественного измерения LysAm24-SMAP. С целью определения рабочих диапазонов тест-системы для исследования образцов, содержащих эндолизин, растворов LysAm24-SMAP с известными концентрациями от 1.25 нг/мл до 100 нг/мл измеряли методом “сэндвич-ИФА”. Также в ходе экспериментов оценивали перекрестную

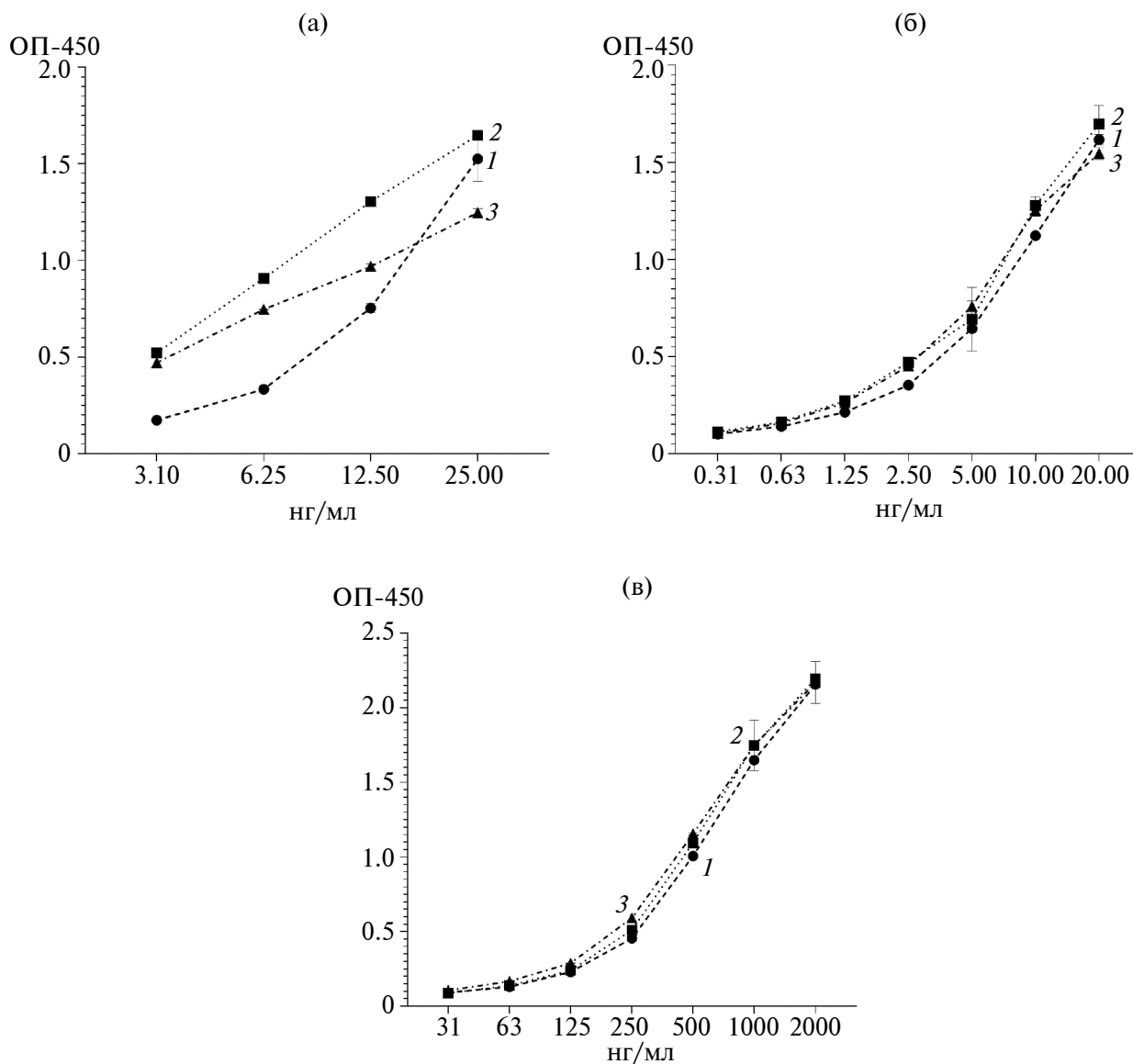


Рис. 2. Стандартные кривые измерения LysAm24-SMAP (а), LysECD7-SMAP (б) и CFP-10 (в) при различных концентрациях соли в стандартном ИФА-буфере: 1 – буфер S011, 2 – S011 + 0.25 M NaCl, 3 – S011 + 1.0 M NaCl.

реактивность полученных антител. Мурамидазы – распространенный класс ферментов, часто встречающийся у бактериофагов и бактерий [19, 20]. При этом, они обладают значительной гомологией каталитических и функциональных доменов. Более того, лизоцим-подобные белки распространены и в эукариотических организмах, например, встречаются у рыб [21], мышей, коров [22]. У человека такие белки присутствуют в крови, почках, кишечнике, эпителии [23]. Все это может сказываться на результатах количественной оценки и приводить к получению ложноположительных результатов.

Для оценки специфичности антител, полученных к LysAm24-SMAP, были использованы два других модифицированных эндолизина – LysAp22-SMAP и LysECD7-SMAP. Эти ферменты также

получены из геномов бактериофагов семейства *Myoviridae*, поражают грамтрицательные бактерии и дополнительно модифицированы SMAP-пептидом. При этом, LysAp22-SMAP содержит каталитический домен лизоцим-подобной N-ацетилмурамидазы, близкий LysAm24, в то время как LysECD7-SMAP – обладает эндопептидазной активностью [5].

Экспрессия и очистка трех перечисленных эндолизинов проводились в аналогичных условиях, следовательно, примесные белки у этих эндолизинов близки по составу. Оценка специфичности тест-системы с использованием таких модифицированных эндолизинов позволила проверить, выработалось ли к примесным белкам или к идентичному SMAP-фрагменту в препарате достаточное

количество антител, чтобы дать сигнал, мешающий интерпретации результатов.

Анализ показал, что в рабочем диапазоне тест-системы (3–50 нг/мл) перекрестная активность с образцами других эндолизинов не наблюдалась, значения оптической плотности для гетерологичных антигенов не превышали фоновые 0.1 опт. ед., что говорит о высокой специфичности полученных антител. Полученные данные позволяют предположить, что АТ вырабатываются на эпитопы в последовательности эндолизина LysAm24, в то время как SMAP-пептид не является иммунодоминантным эпитопом. При этом, вклад отдельных компонентов гибридной молекулы в ее иммуногенность и их способность обеспечить формирование сэндвич-комплексов представляет интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, при изучении полученных поликлональных антител показано, что они антиген-специфичны и не обладали кросс-реактивностью к гомологичным белкам.

Влияние содержания соли в буфере для разведения на измерение LysAm24-SMAP. Исследуемый эндолизин содержит положительно заряженные участки в своей структуре, через которые может электростатически взаимодействовать с компонентами матрикса образца. В связи с этим, было изучено влияние различных концентраций NaCl при внесении в буфер для разведения (S011).

Показано, что добавление NaCl в ИФА-буфер при измерении LysAm24-SMAP приводило к значительному повышению сигнала в ИФА для низких концентраций калибровки (3.13 и 6.25 нг/мл) (рис. 2а). При этом, наблюдалась зависимость увеличения сигнала от концентрации эндолизина: добавление даже небольших концентраций NaCl (0.25 М) к буферу S011 приводило к усилению сигнала для низких (3.13–6.25 нг/мл) концентраций эндолизина, но при этом практически не влияло на высокие (12.5–25.0 нг/мл) концентрации. Кроме того, этот эффект не коррелировал с концентрацией вносимой в буферный раствор соли, и значение ОП при 1.0 М соли были ниже, чем при 0.25 М.

В большинстве случаев, повышение ионной силы приводит к ослаблению неспецифических и низко аффинных специфических взаимодействий АГ-АТ, что, в свою очередь, приводит к снижению сигнала в ИФА [24]. В данной ситуации наблюдался обратный эффект. Чтобы оценить, насколько универсален эффект усиления сигнала при внесении соли в других тест-системах, построенных по принципу “сэндвич-ИФА”, этот эффект исследовали для двух других белков – эндолизина LysECD7-SMAP (рис. 2б), с использованием поликлональных аффинно-выделенных АТ, для измерения белка *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 с помощью коммерческих мышиных моноклональных антител (рис. 2в).

В обоих тест-системах добавление 0.25 или 1.0 М NaCl соли не влияло на сигнал в ИФА во всём диапазоне измеряемых концентраций специфического АГ (рис. 2б, 2в). Следовательно, можно сделать вывод о том, что эффект повышения сигнала при увеличении концентрации NaCl было характерно для LysAm24-SMAP.

Влияние состава буфера для разведения на измерение LysAm24-SMAP. Чтобы оценить, зависит ли наблюдаемый эффект усиления сигнала от используемой буферной системы, помимо стандартного коммерческого ИФА-буфера (S011), ранее успешно использованного при разработке тест-систем на антитела к белку нуклеокапсида SARS-CoV-2 [25] и антитела к вирусу осповакцины [26], также был использован буфер известного состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7.5 с добавлением 1% БСА, 0.1% Твин-20 и 0.15 М NaCl (TBS). Для оценки влияния соли в буфер-основу дополнительно вносили NaCl в концентрации 0.5 М (итоговая концентрация NaCl – 0.65 М).

Без дополнительного внесения соли (0.5 М NaCl), разведение образцов в буфере TBS давало повышение измеряемого сигнала, относительно разведения в S011 (рис. 3а). При этом эффект был более выражен в диапазоне концентраций фермента 0.4–12.5 нг/мл, где сигнал увеличивался в 4.5–2.3 раза. При концентрациях 25.0–50.0 нг/мл отношение измеренных оптических плотностей TBS/S011 составляло лишь 1.4–1.1 раз. При добавлении 0.5 М NaCl сигнал также был выше при использовании TBS, по сравнению с коммерческим ИФА-буфером (рис. 3б), однако, зависимость от концентрации эндолизина не сохранялась и превышение ОП TBS/S011 составляло 1.2–1.4 раза во всем диапазоне измеренных концентраций.

Одним из объяснений может служить способность эндолизина способен взаимодействовать с компонентом ИФА-дилюента, присутствующим в низкой концентрации, и делающим эндолизин недоступным для связывания с АТ, приводя к занижению сигнала при низких концентрациях белка. В частности, можно предположить, что таким компонентом может быть полисахарид, так как LysAm24-SMAP содержит в своей структуре домен связывания с пептидогликаном (pfam01471) [27] и потенциально способен взаимодействовать с соединениями гликозидной природы. Также в качестве ингибиторов можно рассматривать остаточные нуклеиновые кислоты, которые могут взаимодействовать с эндолизином через ионные связи. Введение соли в состав буфера частично разрушало эту связь, “высвобождая” эндолизин из комплекса и приводя к повышению сигнала.

В результате, разработанный метод детекции с использованием TBS с добавлением 0.5 М NaCl, позволяет определять LysAm24-SMAP в образцах в диапазоне концентраций от 0.4–25.0 нг/мл.

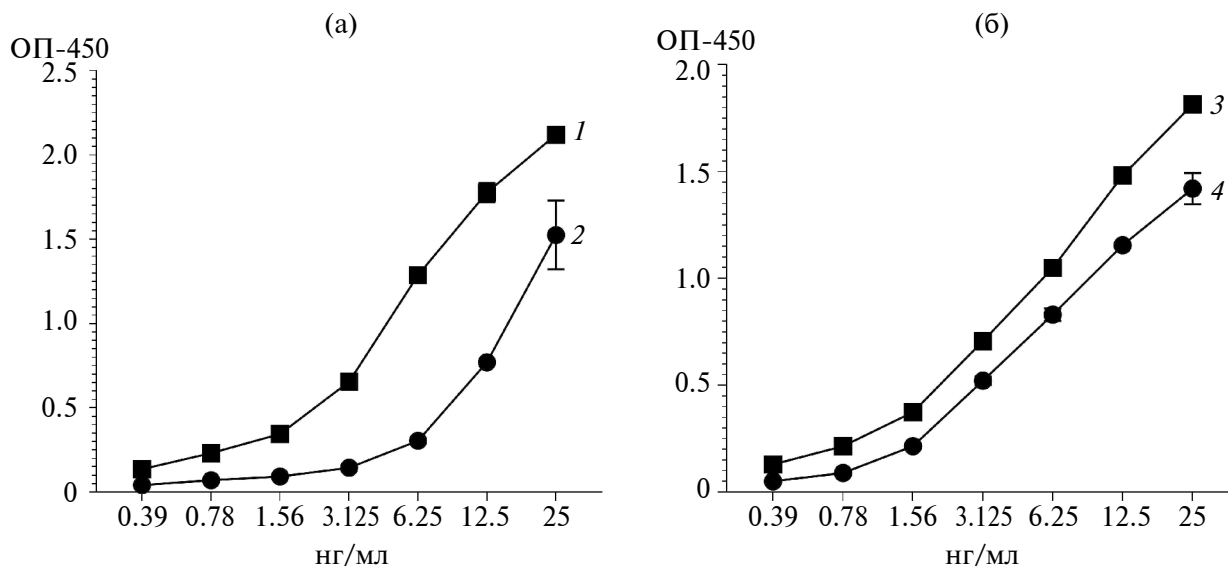


Рис. 3. Стандартные кривые измерения раствора LysAm24-SMAP при разведении образцов в буферах без добавления NaCl (а) и с добавлением 0.5 М NaCl (б): 1 – TBS, 2 – S011, 3 – TBS + 0.5 М NaCl, 4 – S011 + 0.5 М NaCl.

Измерение LysAm24-SMAP в бактериальных лизатах. Для исследования применимости метода ИФА для количественной оценки эндолизина при его наработке и оптимизации продукции в рекомбинантной системе экспрессии, оценивали точность детекции внесенного фермента в лизат бактериальной клеточной массы. Для этого, проводили постановку эксперимента с образцами лизатов трех независимо полученных образцов биомассы лабораторного экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3) pLysS, используемого для получения LysAm24-SMAP.

При внесении 2 нг/мл в лизаты биомассы *E. coli* и использовании S011, превышение сигнала относительно калибровки составляло 500%. Стоит отметить, что неспецифическое связывание компонентов лизата непосредственно с антителами на подложке и в составе конъюгата отсутствовало, поскольку в образцах без внесения LysAm24-SMAP измеряемая ОП сохранялась на уровне фона ИФА-буфера. При измерении эндолизина в TBS и в буферных растворах с добавлением 0.5 М NaCl, завышение измеряемой концентрации в бактериальных лизатах снижалось до 300–200% (рис. 4). При измерении концентрации эндолизина в образцах лизатов *E. coli* ОП отрицательных образцов без внесения эндолизина также не превышали фоновые, следовательно, перекрестной активности с белками продуцента не наблюдалось.

Одной из гипотез, объясняющих данный эффект, является взаимодействие эндолизина с компонентами матрикса, в результате связывания белка с полисахаридами, за счет домена, описанного выше. В частности, подобные результаты могут быть обусловлены нековалентной агрегацией LysAm24-SMAP с полимерными компонентами

матрикса. Данный процесс, предположительно, приводит к формированию комплекса Антиген-Антитело (АГ-АТ), в котором на одну молекулу антитела, сорбированного на подложку, приходилось избыточное количество антигена, связывающегося с конъюгатом. Это обуславливалось тем, что при агрегации становились доступными необходимые для этого эпитопы. Таким образом, в настоящий момент данная тест-система пригодна для качественного, но не количественного анализа эндолизина в бактериальных лизатах и требует дальнейшей оптимизации.

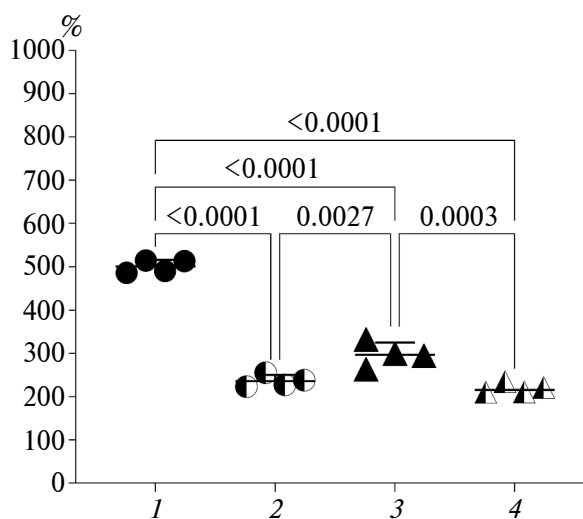


Рис. 4. Влияние состава буфера для разведения на измеряемые концентрации LysAm24-SMAP, внесенные в лизаты бактериальной биомассы (% измеренной концентрации от внесенной): 1 – S011, 2 – S011 + 0.5 М NaCl, 3 – TBS, 4 – TBS + 0.5 М NaCl.

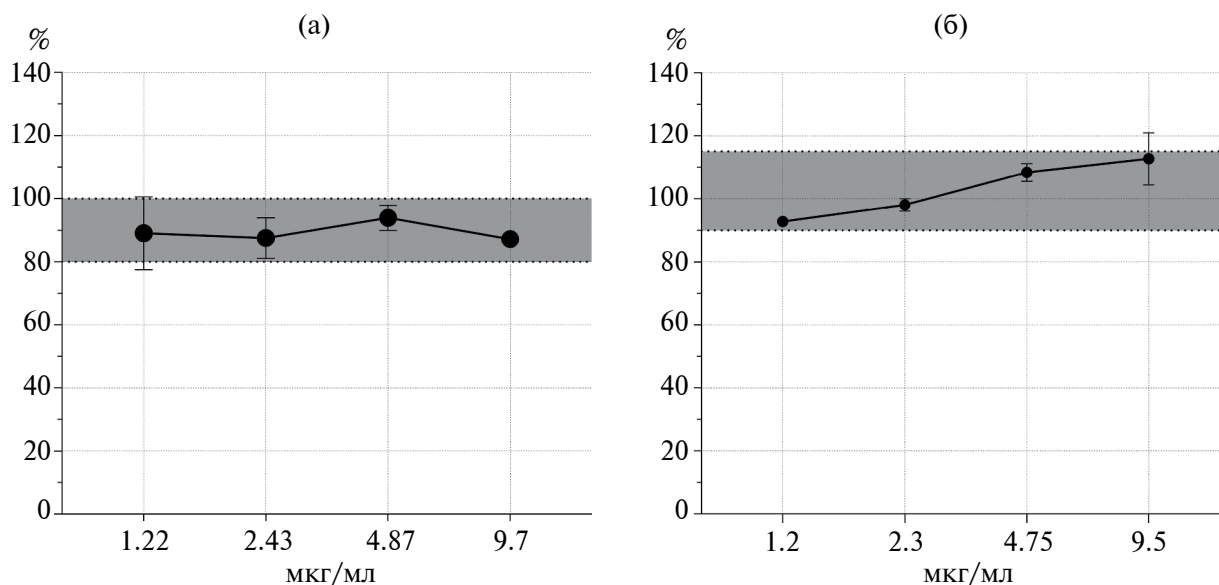


Рис. 5. Влияние компонентов матрикса на измерение концентраций эндолизина (% измеренной концентрации от внесенной): ДНК (а) и пептидогликана (б).

Влияние компонентов матрикса на результаты ИФА-анализа. К компонентам лизированных клеток бактерий, которые могут вносить свой вклад в измерение белка, можно отнести такие биополимеры как пептидогликан (ПГ) и ДНК, в больших количествах выходящих во внеклеточную среду при разрушении бактериальных клеток и потенциально способных связываться с LysAm24-SMAP. Так, ДНК (и другие нуклеиновые кислоты) за счет своего заряда могут электростатически взаимодействовать с эндолизинном и затруднять его определение. Аналогично пептидогликан, высвобождающийся при лизисе бактериальных клеток, в силу особенностей доменной организации LysAm24, может необратимо взаимодействовать с ферментом, препятствуя его корректной детекции.

Были получены препараты тотальной ДНК и ПГ клеточной стенки *A. baumannii*. Перед измерением, в раствор эндолизина концентрации 3.1 нг/мл, внесли ДНК и ПГ в концентрациях 1.22–9.75 мкг/мл и 1.19–9.50 мкг/мл соответственно.

Было показано, что добавление ДНК к раствору эндолизина давало меньшие и нелинейные колебания отношений концентраций: от 80 до 97% (рис. 5а), что вписывалось в допустимые пределы погрешностей данного метода анализа [28, 29]. Внесение пептидогликана оказывало незначительное влияние на измерение эндолизина (рис. 5б). Отношения концентраций внесенного и измеренного фермента линейно изменялись от 93 до 120%. При этом сохранялась линейная зависимость отношения измеренной концентрации к внесенной от концентрации компонентов матрикса. Таким образом, исследованные молекулы, по всей видимости, не были значимой причиной завышения

получаемых результатов и не должны вносить значимых искажений при измерении эндолизина в лизатах, тем не менее, в дальнейшем требуется исследование другие компоненты, присутствующих в больших количествах в матриксе, в том числе, различные типы полисахаридов.

Измерение LysAm24-SMAP в сыворотке крови и органах животных. В ходе разработки лекарственных препаратов одним из определяющих этапов является исследование фармакокинетических свойств на животных, подразумевающее изучение распределения вещества в органах, тканях и биологических жидкостях. Для препаратов белковой природы, к которым относится LysAm24-SMAP, ИФА остается одним из наиболее доступных и удобных методов количественного анализа. Однако, в данном случае особенности биологических образцов, например, наличие эндогенных протеаз и других интерферирующих веществ белковой природы, а также значение pH, могут сказаться на результатах эксперимента. В ходе работы была проведена оценка возможности применения разработанного метода на образцах, полученных от животных.

Для оценки матричных эффектов биологических образцов животного происхождения, у мышей были отобраны и гомогенизированы образцы печени, легких, а также сыворотки крови. После гомогенизации в образцы вносили эндолизин до концентрации 200 нг/мл с дальнейшим использованием для разведения TBS и TBS с добавлением соли 500 мМ (рис. 6).

В результате, как и в случаях бактериальных лизатов, при использовании TBS без дополнительного введения соли, наблюдалось завышение измеряемой концентрации, по сравнению с внесенной.

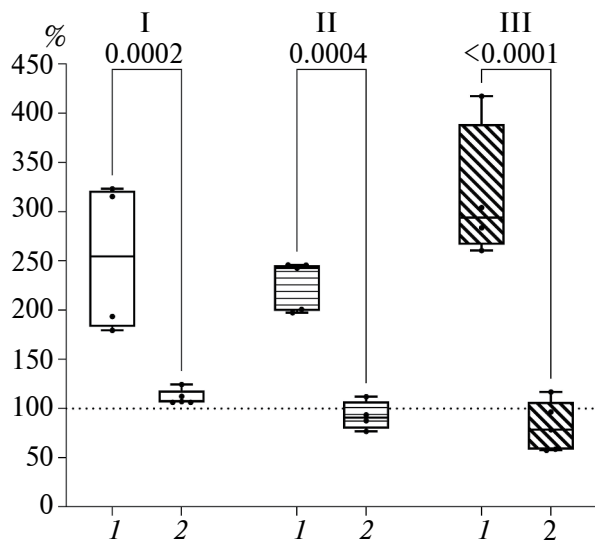


Рис. 6. Влияние состава буфера на измерение концентрации эндолизина (% измеренной концентрации от внесенной) в: I – гомогенатах печени, II – легких, III – в сыворотке крови. 1 – TBS, 2 – TBS + 0.5 М NaCl. Результаты представлены диаграммами размаха: линии – медианы; ящики – интерквартильный диапазон; усы – мин-макс.

Так, в сыворотке крови увеличение составляло от 259 до 441%, для органов (печени и легких) – 180–330%. При добавлении 0.5 М соли до итоговой концентрации 0.65 М NaCl в буфере и в гомогенатах органов, и в сыворотке крови – значения измеряемой концентрации приближались к концентрации внесенного препарата: 101–120% для гомогенатов печени, 55–112% для сыворотки крови, от 70–110% для гомогенатов легких.

Таким образом, и в случае гомогенатов использование TBS с 0.5 М NaCl в качестве буфера для разведения образцов позволяло получить результаты, приближенные к ожидаемым. Необходимо отметить, что значения варьируют от органа к органу. Гомогенаты печени и легких давали наиболее сравнимые с внесённым содержанием эндолизина концентрации. Занижение значений в сыворотке, предположительно, связано с действием протеаз, содержащихся в ней, поскольку, в этом случае при пробоподготовке не использовали ингибиторы протеаз.

Таким образом, в ходе работы была разработана ИФА тест-система и проведена оценка ее применимости для качественной иммунодетекции генно-инженерного эндолизина LysAm24-SMAP в различных биологических образцах при содержании в них фермента от 0.4 нг/мл. При этом, добавление 0.5 М соли оказалось критичным для получения корректных результатов при измерении в образцах органов и тканей животных.

Полученные результаты показали, что в случае литических ферментов бактериофагов матричные эффекты, так же, как и состав буфера могут

значительно сказываться на результатах измерений и необходим их тщательный подбор в каждом конкретном случае. Разработанная тест-система, в дальнейшем, будет использована при исследовании биологических и фармакокинетических свойств модифицированного эндолизина LysAm24-SMAP.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-01068, <https://rscf.ru/project/23-74-01068/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Протоколы получения антител и образцов с использованием животных были одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заключение ЛЭК № 64 от 10 октября 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerstmans H., Rodríguez-Rubio L., Lavigne R., Briers Y. // *Biochem. Soc. Trans.* 2016. V. 44. P. 123–128. <https://doi.org/10.1042/BST20150192>
2. Love M.J., Bhandari D., Dobson R.C.J., Billington C. // *Antibiotics (Basel)*. 2018. V. 7. № 1. 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010017>.
3. Huemer M., Shambat S.M., Brugger S.D., Zinkernagel A.S. // *EMBO Rep.* 2020. e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
4. Baquero F. // *Int. Microbiol.* 2021. V. 24. P. 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y>
5. Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M., Usachev E.V., Makarov V.V., Gintsburg A.L. et al. // *Viruses*. 2019. V. 11. № 3. <https://doi.org/10.3390/v11030284>
6. Gutiérrez D., Briers Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021. V. 68. P. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.014>
7. Fursov M.V., Abdrakhmanova R.O., Antonova N.P., Vasina D.V., Kolchanova A.D., Bashkina O.A. et al. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 545. <https://doi.org/10.3390/v12050545>
8. Tabatabaei M.S., Ahmed M. // *Methods Mol. Biol.* 2022. 2508. P. 115–134. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10
9. Antonova N.P., Vasina D.V., Rubalsky E.O., Fursov M.V., Savinova A.S., Grigoriev I.V. et al. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. P. 440. <https://doi.org/10.3390/biom10030440>
10. Dawson R.M., Liu C.Q. // *Drug Dev. Res.* 2009. V. 70. P. 481–498.
11. Vasina D.V., Antonova N.P., Grigoriev I.V., Yakimakha V.S., Lendel A.M., Nikiforova M.A. et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748718>

12. *Arshinov I.R., Antonova N.P., Grigoriev I.V., Pochtovyi A.A., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. V. 58. Suppl. 1. <https://doi.org/10.1134/S0003683822100027>*
13. *Alves N.J. // Antib Ther. 2019. V. 2 P. 33–39. <https://doi.org/10.1093/abt/tbz002>*
14. *Minas K., McEwan N.R., Newbold C.J., Scott K.P. // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 325. P. 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x>*
15. *Li G., Howard S.P. // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1615. P. 143–149.*
16. *Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J., Youm S.Y., Han H.-Y., Lee J.-H. et al. // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016. V. 43. P. 1013–1016. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12613>*
17. *Grishin A.V., Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V. et al. // Molecules. 2019. V. 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24101879>*
18. *Ross G.M.S., Filippini D., Nielsen M.W.F., Salentijn G.I. // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 15587–15595. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03740>*
19. *Adhya S., Merril C. R., Biswas B. // Cold Spring Harb. Perspect Med. 2014. V. 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012518>*
20. *Höltje J.-V. // Arch. Microbiol. 1995. V. 164. P. 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF02529958>*
21. *Chen T., Rao, Y., Li J., Ren C., Tang D., Lin T. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21020501>*
22. *Callewaert L., Michiels C.W. // J. Biosci. 2010. V. 35. P. 127–160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>*
23. *Liu R., Meng Q., Dai Y., Zhang Y. // Chinese journal of biotechnology. V. 39. P. 4482–4496. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.230241>*
24. *Xu H., Lu J.R., Williams D.E. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 1907–1914. <https://doi.org/10.1021/jp0538161>*
25. *Generalova L.V., Grigoriev I.V., Vasina D.V., Tkachuk A.P., Kruzhkova I.S., Kolobukhina L.V. et al. // Bulletin of RSMU. 2022. V. 1. P. 14–21. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.005>*
26. *Gushchin V.A., Ogarkova D.A., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Grigoriev I.V., Pochtovyi A.A. et al. // Front Immunol. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1023164>*
27. *Antonova N., Vasina D., Lendel A., Usachev E., Makarov V., Gintsburg A. et al. // Viruses. 2019. V. 11. <https://doi.org/10.3390/v11030284>*
28. *Stiller J., Jasensky A.-K., Hennies M., Einspanier R., Kohn B. // J. Vet. Diagn. Invest. 2016. V. 3. P. 235–243. <https://doi.org/10.1177/1040638716634397>*
29. *Biswas S., Saha M.K. // Immunochemistry & Immunopathology. 2015. V. 1. <https://doi.org/10.4172/icoa.1000109>*

Development of a Method for Detection and Quantitative Analysis of Engineered Endolysin LysAm24-SMAP in Biological Samples

A. A. Klimova^{a, b}, I. V. Grigoriev^a, D. V. Vasina^a, M. N. Anurova^b,
V. A. Gushchin^{a, c}, N. P. Antonova^{a, *}

^a*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

^b*Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia*

^c*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: northernnatalia@gmail.com*

In recent years modified bacteriophage lysins are widely investigated for the purposes of antibacterial therapy development. Thus, effective and precise methods for the quantitative analysis of these enzymes are of high demand. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method has been developed for the detection of recombinant modified endolysin LysAm24-SMAP in biological samples. The optimal parameters for protein detection were determined, particularly, the influence of salt and the composition of the buffer system for samples preparation was studied. The applicability of the immunodetection system of the genetically engineered endolysin LysAm24-SMAP in various biological samples with enzyme concentrations from 0.4 ng/ml was demonstrated. Also, the influence of matrix effects in animals' organs and tissues homogenates samples, producer strain lysates and their individual components during the analysis was assessed and it was shown that 0.65 M NaCl addition in the ELISA buffer is crucial for achieving correct results and reduces non-specific interactions in the case of LysAm24-SMAP. The effectiveness of the developed system in the immunochemical control of the bacteriolytic enzyme was confirmed.

Keywords: recombinant endolysins, ELISA, bacterial lysates, pharmacokinetic studies