

Получение мышинных моноклональных антител к белку BclA спор *Bacillus anthracis*

А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панферцев, Р.И.Миронова С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Особенностью сибиреязвенных захоронений является длительная персистенция спор патогена в почве. Детекция спор *Bacillus anthracis* в образцах почвы – сложная и трудоемкая задача, главным образом из-за ингибирующего действия почвенного матрикса, в частности гуминов, на реакции детектирования. Получение моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам спор открывает перспективу использования иммуномагнитных частиц (ИМЧ) для очистки спор от ингибиторов и повышения эффективности детекции.

Цель работы – получение МКА, специфичных к эпитопам белка BclA, локализованным на поверхности спор *B. anthracis*.

Разработана генно-инженерная конструкция, обеспечивающая синтез в клетках *Escherichia coli* рекомбинантного белка rBclA, который использовали для иммунизации мышей BALB/c с последующей гибридизацией клеток спленоцитов с миеломными клетками Sp2/0-Ag14, что привело к получению гибридом-продуцентов МКА к поверхностно локализованным эпитопам на белке BclA сибиреязвенных спор. Для отбора гибридом-продуцентов МКА, специфических к BclA, использовали метод предварительного инкубирования культуральных жидкостей, полученных после культивирования гибридомом, со спорами *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* и последующим иммуноблоттингом с препаратом экстракта спор *B. anthracis*. В результате получено 3 гибридомы-продуцента МКА, специфичных к поверхностно расположенным эпитопам белка BclA спор возбудителя сибирской язвы. Специфичность МКА проверили методом дот-блота со спорами *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*.

Ключевые слова: сибирская язва, моноклональные антитела, BclA

Для цитирования: Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Панферцев Е.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф., Ветчинин С.С. Получение мышинных моноклональных антител к белку BclA спор *Bacillus anthracis*. Бактериология. 2024; 9(4): 25–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-25-33

Production of monoclonal antibodies against the protein BclA from *Bacillus anthracis*

A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, R.I.Mironova, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Anthrax burials present a unique challenge due to the long-term preservation of the pathogen in soil. Determination of spores in soil samples is a difficult and laborious task, mainly via inhibition of detection process by soil matrix (particularly humic acid). Obtaining monoclonal antibodies (MAB) to surface antigens of spores opens up the prospect of using immunomagnetic particles (IMP) to clean spores from inhibitors and increase detection efficiency.

The aim of the work is to obtain MAB specific to epitopes of the BclA protein localized on the surface of *B. anthracis* spores. A genetically engineered construct has been developed that provides synthesis of recombinant rBclA protein in *Escherichia coli* cells. The protein was used to immunize BALB/c mice with subsequent hybridization of splenocytes with Sp2/0-Ag14 myeloma cells, which resulted in obtaining hybridoma-producing mAbs to surface-localized epitopes on the BclA protein of anthrax spores. To select hybridoma-producing mAbs specific to BclA, a method of preliminary incubation of culture fluids obtained after hybridoma cultivation with *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores and subsequent immunoblotting with a preparation of *B. anthracis* spore extract was used. As a result, 3 hybridomas-producing mAbs specific to surface-located epitopes of the BclA protein of the causative agent of anthrax were obtained. The specificity of the mAb was tested using the dot blot method with spores of *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and *B. anthracis*.

Key words: anthrax, monoclonal antibodies, BclA

For citation: Shevyakov A.G., Yakovleva V.A., Panfertsev E.A., Mironova R.I., Biketov S.F., Vetchinin S.S. Production of monoclonal antibodies against the protein BclA from *Bacillus anthracis*. Bacteriology. 2024; 9(4): 25–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-25-33

Для корреспонденции:

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24

E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 12.08.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Anton G. Shevyakov, researcher, Department of immunobiology of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation

E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 12.08.2024, accepted for publication 25.12.2024

Сибирская язва – опасное зоонозное заболевание, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Возбудитель сибирской язвы в его споровой форме – наиболее известный агент, использованный в качестве биологического оружия (рассылка спор почтой в США, сентябрь 2001 г.) [1]. Выбор этого микроорганизма для биотерроризма обусловлен высокой летальностью заболевания, относительной простотой получения большого количества спор и легкостью их применения. Однако чаще всего заболевание сибирской язвой происходит в результате хозяйственной деятельности человека, связанной с содержанием домашних животных, среди которых может циркулировать возбудитель. По современным оценкам, ~1,8 млрд людей живут в регионах с риском заражения сибирской язвой. К ним относятся равнинные территории Евразии, Африки и Северной Америки. Согласно оценке Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно регистрируется от 2000 до 20 000 случаев заражения сибирской язвой [2]. На территории Российской Федерации отмечаются спорадические вспышки сибирской язвы, с колебаниями ежегодного числа заболевших от 2 до 24. Максимум был зарегистрирован в 2016 г. – 36 случаев.

С эпидемиологической точки зрения наибольшую опасность представляют скотомогильники, биотермические ямы и места захоронения трупов сельскохозяйственных животных, павших от сибирской язвы (сибиреязвенные захоронения). Особенностью сибиреязвенных захоронений является долговременное сохранение спор патогена в почве, что может приводить к инфицированию животных и человека. Поэтому одним из важных элементов противоэпидемических мероприятий является исследование образцов почв потенциальных мест захоронений животных, павших от сибирской язвы, обнаружение неучтенных скотомогильников, сибиреязвенных почвенных очагов [3].

В настоящее время для детекции возбудителя сибирской язвы в Российской Федерации зарегистрированы три диагностических тест-системы на основе моноклональных антител (МКА): «Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ-тест-система *B. anthracis*» ФСР 2009/05485 (ФБУН ГНЦ ПМБ), «Набор реагентов для определения спор *B. anthracis* в реакции латекс-агглютинации» ФСР 2011/12159 (ФБУН ГНЦ ПМБ) и «Набор реагентов для определения возбудителей сибирской язвы и туляремии методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (Тест-система ИФЛА-2ВФ)» РЗН 2014/1468 (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Для сибиреязвенных диагностических тест-систем используют иммуноглобулины, полученные через иммунизацию лабораторных животных препаратом спор *B. anthracis*. Однако из результатов исследований состава различных препаратов спор для иммунизации, полученных *in vitro*, следует, что в них часто присутствует высокоиммуногенный белок EA1, содержащийся также в S-слое вегетативной формы бактерий [4, 5]. Поэтому специфичные к EA1 иммуноглобулины, полученные через иммунизацию спорами, могут использоваться для детекции как споровой, так и вегетативной формы *B. anthracis*, полученных *in vitro*. Некоторые авторы считают наличие EA1 в спорах из почвы сибиреязвенного захоронения маловероятным, что обуславливает интерес к

использованию антител к другим антигенным мишеням при выявлении спор в почве. Кроме указанных выше специфичных к EA1, используют антитела к сахару антрозы, присутствующему в гликопротеинах экзоспориума *B. anthracis* [6]. По данным литературы, в регионах с интенсивной иммунизацией животных вакцинами на основе антрозы отмечено появление мутантных безантрозных штаммов сибирской язвы [7], что делает актуальной разработку новых иммунохимических тест-систем, использующих антитела, специфичные для всех циркулирующих в природе штаммов *B. anthracis*, и обновление существующих методов диагностики с учетом эволюции патогена в природных условиях.

Внешняя оболочка спор *B. anthracis* (экзоспориум) состоит из паракристаллического базального слоя, образующего гексагональные структуры, и внешнего слоя, состоящего из белков-филаментов. В составе экзоспориума к настоящему времени обнаружено не менее 12 белков. Основной структурный компонент филаментов – бациллярный коллагеноподобный сибиреязвенный белок (Bacillus collagen-like protein of anthracis/BclA). Он состоит из сигнального пептида на N-концевом фрагменте, центрального коллагеноподобного домена и глобулярного C-концевого домена. Высокогликозилированный белок BclA – иммунодоминантный антиген спор [8]. Размер белка отличается у разных штаммов *B. anthracis*. Коллагеноподобный участок белка содержит повторяющиеся аминокислотные триплеты GXX (от 17 до 91 повторов), наиболее часто это (GPT)_n. Коллагеноподобные белки редко встречаются среди микроорганизмов. Описано всего несколько видов бактерий и вирусов, в которых они присутствуют. Основная функция этих белков еще не определена. Чаще всего они представлены поверхностными белками. Споры *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* также содержат похожие на BclA белки, но их структура отличается [9, 10]. В рамках исследований по получению антител к BclA, перспективных для детекции *B. anthracis*, отмечается сложность отбора подходящих клонов, вызванная перекрестной реакцией или низкой аффинностью [11]. Описано использование специфичных к BclA МКА BA21 для синтеза однодоменного фрагмента антител и получение гибридного термостабильного белка MBP-BA21 для разработки тест-систем [12]. В другой работе [13] предложено использование рекомбинантных антител ламы к BclA *B. cereus* для детекции спор с помощью xMAP-технологии. Таким образом, получение новых вариантов антител с высокой специфичностью и аффинностью является важным направлением для улучшения диагностики *B. anthracis* в природных условиях.

Цель настоящего исследования заключалась в получении МКА, специфичных к BclA спор *B. anthracis*.

Материалы и методы

Инактивированные штаммы бактерий *B. anthracis* (55, M-71, СТИ-1, 71/12), *B. cereus* 160, *B. thuringiensis* 214, *Bacillus anthracoid* 217, *Bacillus licheniformis* B-1411, споры и вегетативные клетки которых использовали в работе, получены из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболенск». Культивирование микроорганизмов проводили в соответствии с общепринятой методикой работы с возбудителем сибирской язвы [14].

Таблица 1. Материалы для получения макромолекулы
Table 1. Materials for obtaining macromolecule

Источник гена / Source of gene	<i>B. anthracis</i> СТИ-1
Прямой праймер F-BclA / Forward primer F-BclA	5'- aac ata tgt ttg acc cta atc ttg tag gac c-3'
Обратный праймер R-BclA / Reverse primer R-BclA	5'- gga agc tta gca act ttt tca ata ata atg g-3'
Экспрессионный вектор / Expression vector	pET-40b(+)
Штамм для экспрессии белка / Strain for protein expression	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)

Если не указано иное, в работе использовали химические реагенты производства SigmaAldrich (США), ThermoFisher (США) без дополнительной очистки.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка BclA

Ген *bclA* амплифицировали из геномной ДНК штамма *B. anthracis* СТИ-1 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (табл. 1).

Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в NdeI-HindIII сайты плазмидного вектора pET-40b(+) (Novagen, США) и трансформировали полученной генетической конструкцией штамм *Escherichia coli* BL21(DE3). В результате селекции на среде с канамицином получили рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET-*bclANH*.

Рекомбинантный белок BclA (rBclA) выделяли из индуцированного 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид лизата биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET-*bclANH* с помощью металло-хелатной хроматографии на сорбенте Ni HisTrap (GE, США). Очищенный из телец включения белок переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25 (GE, США) с целью рефолдинга. Степень чистоты оценивали с помощью полиакриламидного гель-электрофореза по Лэммли.

Для иммунизации rBclA сорбировали на гидроксиде алюминия в качестве адьюванта. Препарат готовили из расчета 100 мкг rBclA на 200 мкл готовой суспензии. Полученную суспензию подкожно вводили мышам линии BALB/c (самки в возрасте 4–6 нед.). Доза введения составляла 100 мкг на животное. Через 28 дней иммунизацию повторяли. Бустер-иммунизацию проводили на 56-й день введением внутрибрюшинно по 20 мг rBclA в 0,9%-м хлориде натрия. На 60-й день проверяли титр специфических антител в сыворотке с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) с rBclA.

Культивирование клеток

Культивирование клеток миеломы Sp2/0-Ag14 и гибридом проводили на культуральной среде RDF, состоящей из смеси 1:1 сред RPMI-1640 и DMEM/F-12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Гибридизация

Слияние миеломных клеток Sp2/0-Ag14 и спленоцитов иммунных мышей проводили по методике Nowinski [15]. В

качестве агента для слияния клеток использовали 50%-й водный раствор ПЭГ-4000 с pH 8,0. Суспензию клеток после гибридизации переносили в 96-луночные планшеты с селекционной средой и фидерным слоем перитонеальных макрофагов. Селекционная среда RDF-HAT содержала 20% фетальной телячьей сыворотки 2 мМ глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 100 мкМ гипоксантина, 16 мкМ тимидина, 0,4 мкМ аминоптерина. Каждые 3–4 дня в планшетах проводили замену половины объема RDF-HAT-среды. Через 2 нед. RDF-HAT заменяли на RDF-HT (без добавления аминоптерина), на 21-е сутки использовали среду RDF с 20% сыворотки. Клетки гибридом-продуцентов после селекции и проверки специфичности антител клонировали методом лимитирующих разведений на культуральных планшетах с фидерным слоем перитонеальных макрофагов. Клонирование повторяли трижды. Стабильные гибридомы-продуценты замораживали в криопротективной среде и хранили в жидком азоте.

Иммуноферментный анализ

Раствор рекомбинантного белка BclA (5 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буфере pH 9,6) вносили в лунки планшета для ИФА по 100 мкл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. Неспецифические места связывания блокировали 5%-м раствором обезжиренного молока в течение 60 мин при температуре 37°C на шейкере. Планшеты промывали 10 мМ фосфатно-солевым буферным раствором с 0,05% полисорбат-20 (ФСБ-Т) трижды, добавляли по 100 мкл исследуемых образцов, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000, инкубировали в течение 60 мин. Лунки промывали трижды ФСБ-Т, добавляли по 100 мкл антимишинных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении, инкубировали 60 мин. Шестикратно отмывали лунки планшета ФСБ-Т и вносили по 100 мкл раствора пероксидазного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М раствора H₂SO₄ через 5 мин. Результат учитывали на планшетном спектрофотометре Varioskan LUX (ThermoScientific, США) при λ = 450 нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Денатурирующий гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия проводили по стандартной методике Лэммли [16] за исключением модификации сэмпл-буфера: дополнительно вносили 8 М мочевины, 200 мМ периодата натрия NaIO₄. Вертикальный электрофорез образцов проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, США). Параметры разделения 75 В 30 мин, 150 В 60 мин.

Белок rBclA для электрофореза готовили из расчета 3 мкг в 10 мкл сэмпл-буфера, кипятили в течение 5 мин.

Суспензии спор *B. anthracis* 71/12 и *B. cereus* 160 промывали деионизованной водой центрифугированием на скорости 12 000 г в течение 5 мин дважды. Осадок ресуспендировали в 200 мкл деионизованной воды и наслаивали на 500 мкл фиколла-400 в микропробирке, центрифугировали на скорости 3000 г в течение 10 мин с отключенным тормозом. Надосадочную жидкость убирали, к осадку добавляли

100 мкл модифицированного сэмпл-буфера, перемешивали и кипятили в течение 20 мин.

Скрининг культуральной жидкости (КЖ) гибридом-производителей проводили методом иммуноблоттинга [17] в мини-блоттере Mini-Protean II (Bio-Rad, США). Предварительно проводили гель-электрофорез спорового экстракта в полиакриламидном геле без гребенки. Далее белки из полиакриламидного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) в Power Blotter Station (Invitrogen, США). Для блокирования неспецифической сорбции НЦМ инкубировали в растворе 5%-го обезжиренного молока в течение 18 ч при температуре +4°C, затем трижды промывали ФСБ-Т.

Для исключения перекрестно взаимодействующих с *B. cereus* антител КЖ гибридом-производителей истощали с помощью суспензии спор *B. cereus*. К 1 мл КЖ в разведении 1:10 добавляли 10^7 спор *B. cereus*, инкубировали 30 мин при 37°C с перемешиванием. Споры осаждали центрифугированием 8000 г 5 мин. НЦМ помещали в миниблоттер Mini-Protean II, в микрокамеры вносили по 400 мкл образцов КЖ, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000, отрицательный контроль, инкубировали 90 мин при 37°C при перемешивании. Затем отбирали образцы из микрокамер, промывали НЦМ в миниблоттере ФСБ-Т один раз, НМЦ извлекали из устройства и переносили в емкости, дважды промывали ФСБ-Т с перемешиванием. Далее вносили раствор пероксидазного конъюгата антимишинных иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) в рабочем разведении, инкубировали в течение 60 мин при 37°C с перемешиванием. НЦМ промывали 6 раз ФСБ-Т, проявляли пероксидазным субстратом диаминобензидина.

Дот-блоттинг

Образцы спор разводили до концентрации 10^7 /мл деионизованной водой и вносили на НЦМ в устройстве Bio-Dot (Bio-Rad, США) по 100 мкл в лунку. После внесения образцов НЦМ просушивали в течение 40 мин в термостате при температуре 37°C. Неспецифические места связывания инактивировали 5%-м обезжиренным молоком, инкубируя в течение 10 ч при температуре 4°C. После трехкратной промывки ФСБ-Т вносили образцы МКА с концентрацией 1 мкг/мл, контрольную сыворотку интактной мыши в разведении 1:1000 и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C с перемешиванием. Отмывали НЦМ трижды ФСБ-Т, вносили раствор пероксидазного конъюгата антимишинных иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) в рабочем разведении. Инкубировали в течение 60 мин в термостате при температуре 37°C при перемешивании. НМЦ промывали 6 раз ФСБ-Т. Реакцию проявляли с помощью пероксидазного субстрата 3,3'-диаминобензидина в течение трех минут, после НЦМ тщательно промывали деионизованной водой и высушивали.

Очистка моноклональных антител

Гибридомы-производители МКА культивировали на питательной среде RDF с 10% ФТС в культуральных флаконах до концентрации клеток 106/мл. Клетки и дебрис осаждали центрифугированием на 400 г в течение 5 мин. Белковую фракцию КЖ осаждали высаливанием сульфатом аммония 50%-го насыщения в течение 18 ч при температуре +4°C.

Полученный осадок отделяли центрифугированием на 8000 г в течение 15 мин. Осадок растворяли в 100 мМ натрий-фосфатном буферном растворе (ФБ) pH 8,6. Вносили 1 мМ PMSF, 1 мМ ЭДТА, центрифугировали при 12 000 г в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через фильтр с порами 0,45 мкм и переводили в ФБ гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25 (GE, США).

Образцы МКА в ФБ наносили на аффинную колонку с белок А сепарозой (BioToolomics, Англия) со скоростью 0,5 мл/мин. Очищенные МКА элюировали с помощью 0,1 М цитратного буферного раствора pH 3,0 с быстрым доведением pH до 7 раствором 2 М NaOH. Элюат переводили в ФСБ pH 7,4 гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Sepharose G-25. Специфическую активность очищенных МКА проверяли с помощью непрямого тИФА.

Результаты исследования и их обсуждение

На основе ORF гена *bclA* штамма *B. anthracis* СТИ-1 создана генно-инженерная конструкция, кодирующая синтез рекомбинантного белка BclA с относительной молекулярной массой 34 кДа (376 аминокислотных остатков) в штамме *E. coli* BL21(DE3). На N-концевом фрагменте rBclA удалены 20 аминокислотных остатков, представляющих собой сигнальный пептид. Очистку rBclA (содержащего His10-метку) из телец включения проводили с помощью металл-хелатной хроматографии (рис. 1) в денатурирующих условиях. После рефолдинга с помощью гель-фильтрующей хроматографии получили белок с электрофоретической чистотой не менее 95%. Нативный гликопротеин BclA на поверхности спор образует олигомерные структуры. Электрофорез без денатурации образца проявил серию бэндов в области ~100 кДа,

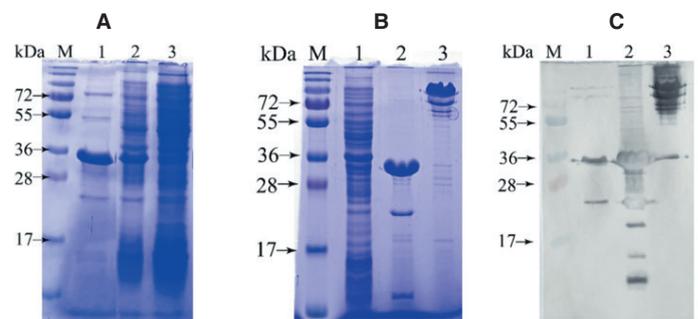


Рис. 1. А) Электрофореграмма образцов в процессе металлохелатной хроматографии, где М – маркеры молекулярного веса; 1 – фракция элюата 150 мМ имидазола; 2 – проток с хроматографической колонки; 3 – исходный раствор телец включения в 8 М мочеvine. В) Электрофореграмма готового препарата rBclA, где М – маркеры молекулярного веса, 1 – УЗ-дизинтегратор клеток штамма-производителя *E. coli* B121(DE3)/pET-bclANH, 2 – готовый препарат rBclA в денатурирующих условиях, 3 – препарат белка rBclA в нативных условиях; С) иммуноблот с антителами к His-метке рекомбинантного белка BclA.

Fig. 1. A) Electrophoretic diagram showing samples during Ni-NTA chromatography, where M – molecular weight markers; 1 – eluate fraction 150 mM imidazole; 2 – flowthrough from the chromatographic column; 3 – initial cell lysate in 8 M urea. B) Electrophoretic diagram of purified rBclA protein where M – molecular weight markers, 1 – sonicated cells of *E. coli* B121(DE3)/pET-bclANH strain, 2 – purified rBclA protein in denaturing conditions, 3 – purified rBclA protein in native conditions; C) western blot with antibodies to His-tag on recombinant BclA protein.

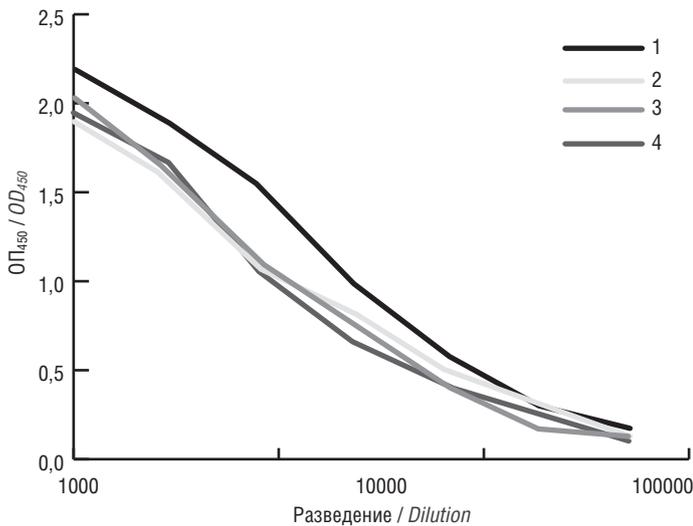


Рис. 2. График титрования иммунных сывороток мышей №№ 1–4 в непрямом тИФА с rBclA, где 1–4 – кривые титрования для экспериментальных животных. Горизонтальная пунктирная линия – OD_{450} контрольной мышинной сыворотки.

Fig. 2. Graph for immune mouse sera #1–4 in indirect ELISA with rBclA, where 1–4 are titration curves for experimental animals. The horizontal dotted line is the OD_{450} control of the naïve mouse serum.

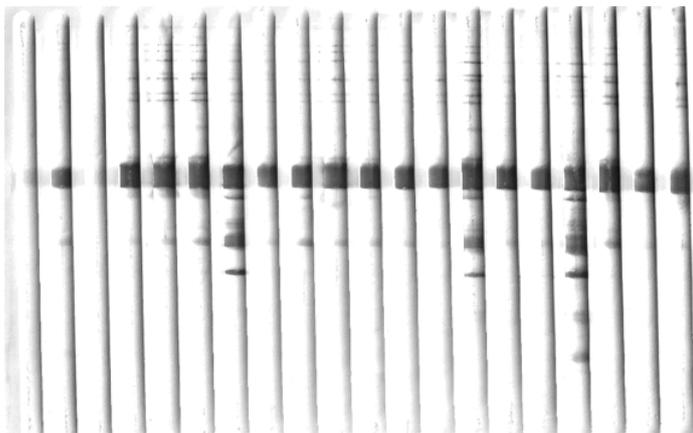


Рис. 3. Иммуноблот rBclA с образцами КЖ гибридом-продуцентов МКА в устройстве Mini-Protean II.

Fig. 3. Western blot of hybridoma cell media samples with rBclA in Mini-Protean II device.

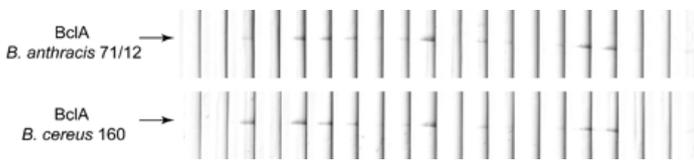


Рис. 4. Иммуноблот экстрактов спор *B. anthracis* 71/12 и *B. cereus* 160 с образцами КЖ гибридом-продуцентов МКА в устройстве Mini-Protean II.

Fig. 4. Western blot of *B. anthracis* 71/12 and *B. cereus* 160 spore extracts with hybridoma cell media samples in Mini-Protean II device.

что демонстрирует способность rBclA к полимеризации (рис. 1, В). Иммуноблоттинг с антителами, специфичными к гистидинового метке, подтвердил выделение целевого белка (рис. 1, С).

Полученный белок rBclA использовали для иммунизации мышей BALB/c. В результате курса иммунизаций достигнут титр иммунной сыворотки мышей ~1:50000 в непрямом

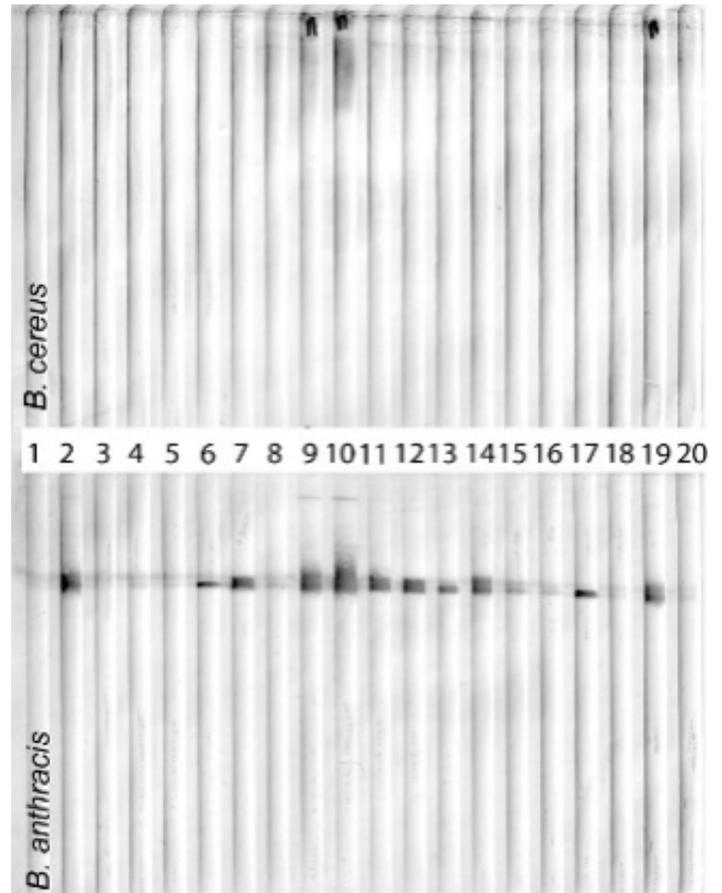


Рис. 5. Иммуноблот образцов КЖ гибридом после истощения спорами *B. cereus*. 1 – нормальная мышинная сыворотка в разведении 1:1000, 2 – специфическая сыворотка в разведении 1:1000, 3 – полная среда RDF, 4–20 – образцы КЖ гибридом.

Fig. 5. Western blot of samples of hybridoma cell media after incubation with *B. cereus* spores. 1 – naïve mouse serum in dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum in dilution 1:1000, 3 – complete RDF medium, 4–20 – hybridoma cell media samples.

тИФА (рис. 2). Все животные проявили достаточный для гибридизации спленоцитов иммунный ответ.

После гибридизации спленоцитов иммунной мыши с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 с последующей селекцией и скринингом КЖ в ИФА против rBclA получено 347 положительно реагирующих лунок. Использование rBclA в иммуноблоттинге не позволяло однозначно определить специфичность исследуемых МКА (рис. 3). Для поиска МКА, специфично реагирующих с BclA *B. anthracis*, проводили экстракцию поверхностных антигенов спор денатурирующим буферным раствором с окислением углеводной части гликопротеина периодатом натрия. В результате отщепления сахаров молекулярный вес спорового BclA уменьшался.

Проверка КЖ гибридом в иммуноблоттинге со споровым экстрактом показала связывание МКА с BclA как *B. anthracis*, так и *B. cereus* (рис. 4). В проверяемых лунках могло находиться более одного клон-продуцента МА, что затрудняло отбор целевых гибридом.

С целью повышения эффективности отбора гибридом-продуцентов МКА, специфичных к BclA *B. anthracis*, использовали двухстадийный процесс скрининга в иммуноблоттинге. На первой стадии образцы КЖ предварительно инкубировали с суспензией спор *B. cereus* для удаления перекрест-

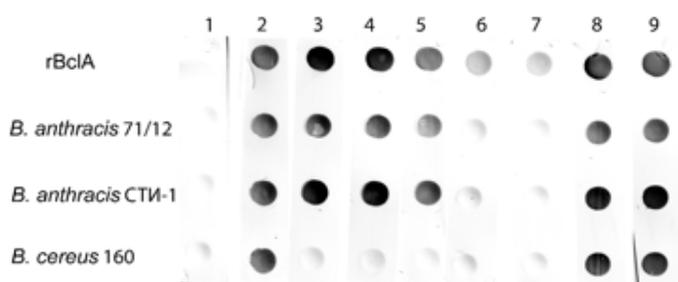


Рис. 6. Дот-блот МКА со спорами (105 спор на точку) *B. anthracis* 71/12 и СТИ-1, *B. cereus* 160 и rBclA (100 нг на точку), где 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 6. Dot blot with spores (10⁵ spores per point) of *B. anthracis* 71/12 and STI-1, *B. cereus* 160 and rBclA (100 ng per point), where 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, concentration of all Mab samples are 1 µg/ml.

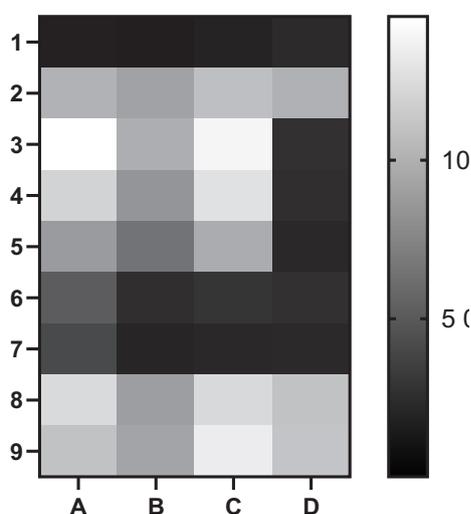


Рис. 7. Результат обработки НЦМ после дот-блота с помощью программы ImageJ и перевода значений относительной интенсивности цвета в тепловую карту в программе GraphPad Prism, где А – rBclA, В – *B. anthracis* 71/12, С – *B. anthracis* СТИ-1, D – *B. cereus* 160, 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 7. Result of dot blot membrane processing using ImageJ software and converting color intensity values into thermal map in GraphPad Prism software, where A – rBclA, B – *B. anthracis* 71/12, C – *B. anthracis* STI-1, D – *B. cereus* 160, 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA1D8, 7 – BA2F2, 8 – BA4F7, 9 – BA2G8, all Mab samples at concentration 1 µg/ml.

но взаимодействующих МКА. На второй стадии с образцами КЖ после истощения проводили иммуноблоттинг, используя споровые экстракты *B. anthracis* и *B. cereus*. Из рис. 5 видно, что можно выделить три варианта реакции КЖ гибридом. В первом варианте реакция отсутствует, что свидетельствует об отсутствии целевых МКА. Второй вариант – специфическое связывание МКА с VclA *B. anthracis*. Споровый VclA в гель-электрофорезе представлен двумя бэндами, полученные МКА реагируют только с одним или с двумя бэндами. Третий вариант – сохранение реакции с VclA *B. cereus* в виде

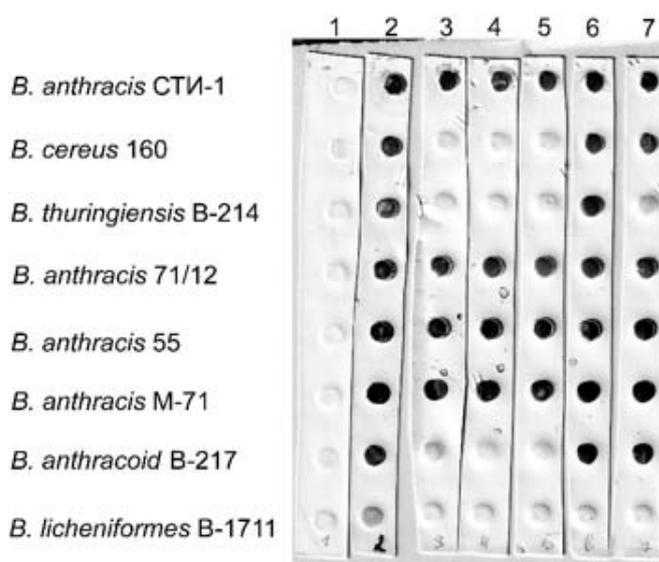


Рис. 8. Результат дот-блоттинга со спорами бацилл (10⁵ спор на точку), где 1 – нормальная мышьяная сыворотка 1/1000, 2 – специфическая мышьяная сыворотка 1/1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA4F7, 7 – BA2G8, все образцы МКА в концентрации 1 мкг/мл.

Fig. 8. The result of dot blot with bacilli spores (10⁵ spores per point), where 1 – naïve mouse serum at dilution 1:1000, 2 – specific mouse antiserum at dilution 1:1000, 3 – BA2G11, 4 – BA2G10, 5 – BA6F9, 6 – BA4F7, 7 – BA2G8, all Mabs samples are at a concentration of 1 µg/ml.

диффузного окрашивания на уровне 150–200 кДа, что соответствует молекулярному весу гликозилированного VclA. Это явление можно объяснить не полным расщеплением сахаров в препарате экстракта спор *B. cereus*. Возможна специфичность исследованных МКА к эпитопу, скрытому в нативной конформации белка на поверхности спор, что делало истощение неэффективным.

Для дальнейшей работы отобрали гибридомы, продуцирующие МКА, специфичные к VclA экстракта спор *B. anthracis*. Также отобрали две гибридомы-продуцента МКА, перекрестно реагирующих с *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Клетки гибридом клонировали методом предельных разведений на фидерном слое перитонеальных макрофагов в культуральных планшетах. В результате получили 3 стабильных гибридомы-продуцента МКА к VclA *B. anthracis*.

Отсутствие перекрестного взаимодействия специфичных *B. anthracis* МА с интактными спорами проверяли методом дот-блоттинга. Из рис. 6 видно, что МКА BA2G10, BA2G11, BA6F9 не имеют перекрестного взаимодействия со спорами *B. cereus* 160. МКА BA2G8 и BA4F7 взаимодействуют со спорами *B. cereus* 160, МКА BA1D8 и BA2F2 слабо взаимодействуют с rBclA и практически не связываются со спорным VclA (данные МКА взаимодействуют только с денатурированным белком).

Сканирование НЦМ после дот-блоттинга с последующей обработкой изображения в программе ImageJ и GraphPad Prism позволило сравнить интенсивность взаимодействия МКА с антигенами на количественном уровне (рис. 7). Наиболее интенсивная реакция взаимодействия со спорами отмечается для МКА BA2G11.

Дальнейшая проверка методом дот-блоттинга полученных МКА на панели нескольких штаммов *B. anthracis*, а

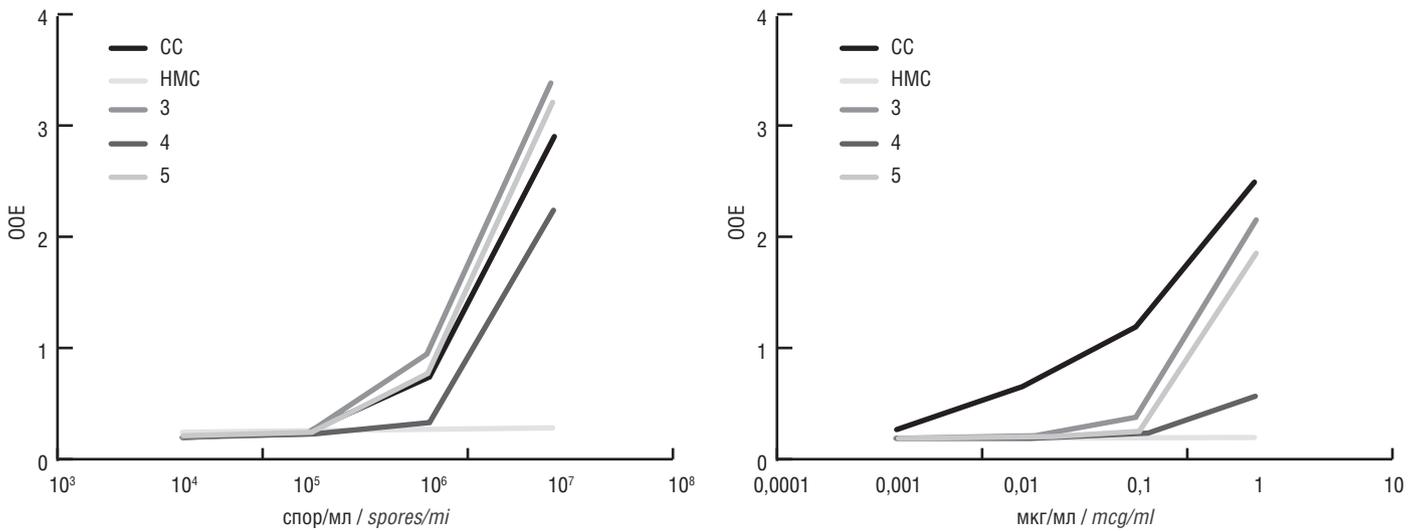


Рис. 9. Графики значений относительных оптических единиц в дот-блоттинге МКА со спорами *B. anthracis* СТИ-1 (А) и rBclA (В), где 3 – BA2G10, 4 – BA6F9, 5 – BA2G11.

Fig. 9. Graphs of relative optical units in dot blotting with *B. anthracis* STI-1 spores (A) and rBclA (B), where 3 – BA2G10, 4 – BA6F9, 5 – BA2G11.

также *B. cereus*, *B. anthracoid* и *B. thuringiensis* подтвердила их специфичность (рис. 8).

Как видно из рис. 8, МКА BA2G10, BA6F9 BA2G11 являются специфичными к белку BclA спор *B. anthracis* штаммов СТИ-1, 71/12, М-71, 55. МКА BA4F7 взаимодействуют со спорами *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. anthracoid* и *B. thuringiensis*. МКА BA2G8 взаимодействуют со спорами *B. anthracis*, *B. anthracoid* и *B. cereus*.

Для определения предела детекции спор и rBclA в дот-блоттинге на НЦМ вносили серийные разведения препаратов в объеме 100 мкл. Как видно из рис. 9, МКА BA2G10 и BA2G11 достоверно детектируют точки 10^6 спор/мл и 100 нг/мл rBclA.

Проверка МКА BA2G10, BA6F9 BA2G11 с клетками гетерологичных микроорганизмов в дот-блоттинге показала отсутствие перекрестной реакции (табл. 2).

Заключение

При совершенствовании средств обследования сибиреязвенных захоронений на наличие спор, определяющих опасность для людей и животных, следует учитывать условия, при которых может происходить формирование спор *B. anthracis*.

При разложении в глубине туши павшего животного быстро возникают анаэробные условия, в которых все вегетативные формы клеток гибнут, не пройдя процесса споруляции, который требует аэробных условий. Лишь часть клеток *B. anthracis* может оказаться в гнойно-серозных выделениях и, получив доступ к кислороду воздуха, пройти споруляцию. Таким образом, количество образующихся спор хотя и достаточно для поддержания циркуляции возбудителя за счет высокой контагиозности, но часто ниже предела обнаружения существующими методами. Поэтому для совершенствования средств обследования сибиреязвенных захоронений на наличие спор требуются методики, обеспечивающие концентрирование и сепарацию спор из общего микробиоценоза почвы. Выявление спор *B. anthracis* в образцах почвы затруднено также из-за ингибирующего действия почвенного матрикса, в частности гуминов, на реакции детектирования, поэтому желательна очистка спор от этих компонентов почвы. Разработка подобных методик подчас невозможна без специфических МКА, позволяющих связывать и извлекать споры патогена из почвенной матрицы.

В качестве мишени для получения МКА был выбран белок BclA, присутствующий в большом количестве на поверхности спор. С целью минимизации вероятности получения МКА на другие белки спор или белки вегетативной формы бактерий была применена схема с иммунизацией мышей очищенным рекомбинантным белком BclA и отбором гибридом-продуцентов МКА по способности связываться с BclA из экстракта спор сибирской язвы. В результате выбирались только положительно реагирующие с нативным белком BclA клоны гибридом-продуцентов. Так как бактерии рода *Bacilli* в большом количестве присутствуют в почве, вторым критерием отбора клонов была проверка перекрестной реакции со спорами *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

Итогом работы является панель МКА, на основе которой возможна разработка методов сепарации и специфической детекции спор сибирской язвы в образцах окружающей среды.

Таблица 2. Результаты скрининга неспецифичной активности моноклональных антител в дот-блоттинге
 Table 2. Results of non-specific activity screening of monoclonal antibodies in dot blotting

Штаммы микроорганизмов / Strains of microorganisms	МКА Mab		
	BA2G10	BA2G11	BA6F9
<i>B. abortus</i> 19, <i>E. coli</i> JM83, <i>Salmonella</i> Paratyphi, <i>Francisella tularensis</i> 15/10, <i>Salmonella</i> Typhimurium 19585, <i>Salmonella enteritidis</i> 3-2, <i>Yersinia pestis</i> EV, <i>Legionella micdadei</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> 6, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 997, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P7650, <i>Streptococcus pyogenes</i> CA-209, <i>Listeria monocytogenes</i> 35152	–	–	–

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Hilmas CJ and Anderson J. Anthrax. In Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2015;387-410.
2. Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nature Microbiology. 2019;4:1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
3. Шишкова НА, Тюрин ЕА, Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Опасность сибирской язвы в современных условиях. Экологический и эпидемиологический аспекты. Научград: наука, производство, общество. 2017;3:29-34.
4. Williams DD, Turnbough CL. Surface Layer Protein EA1 Is Not a Component of *Bacillus anthracis* Spores but Is a Persistent Contaminant in Spore Preparations. J of Bacteriology. 2004;186:566-569. DOI: 10.1128/jb.186.2.566-569.2004
5. Swiecki MK, Lisanby MW, Shu F, Turnbough CL Jr, Kearney JF. Monoclonal antibodies for *Bacillus anthracis* spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6076-84. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.6076
6. Kuehn A, Kovác P, Saksena R, Bannert N, Klee SR, Ranisch H, et al. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Clin Vaccine Immunol. 2009 Dec;16(12):1728-37. DOI: 10.1128/CVI.00235-09
7. Tamborini M, Bauer M, Bolz M, Maho A, Oberli MA, Werz DB, et al. Identification of an African *Bacillus anthracis* lineage that lacks expression of the spore surface-associated anthrose-containing oligosaccharide. J Bacteriol. 2011 Jul;193(14):3506-11. DOI: 10.1128/JB.00078-11
8. Rodionov AP, Artemeva EA, Melnikova LA, Kosarev MA, Ivanova SV. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology. Veterinary Science Today. 2021;151-158. DOI: 10.29326/2304-196x-2021-2-37-151-158
9. Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. Microbiol Mol Biol Rev. 2015 Dec;79(4):437-57. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15
10. Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, et al. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16014-9. DOI: 10.1073/pnas.1109419108
11. Walper S, Lee P, Anderson G, Goldman E. Selection and Characterization of Single Domain Antibodies Specific for *Bacillus anthracis* Spore Proteins. Antibodies. 2013;2:152-167. DOI: 10.3390/antib2010152
12. Buckley PE, Calm AM, Welsh H, Thompson R, Menking D, Carney J, et al. US Army Combat Capabilities Development Command Chemical Biological Center/EXCET, I. Defense Advanced Research Projects Agency Antibody Technology Program Phase II: Characterization of an Anti-BclA Antibody Produced by Illumina, Inc. 2021.
13. Moteshareie H, Hassen WM, Dirieh Y, Groulx E, Dubowski JJ, Tayabali AF. Rapid, Sensitive, and Selective Quantification of *Bacillus cereus* Spores Using xMAP Technology. Microorganisms. 2022 Jul 13;10(7):1408. DOI: 10.3390/microorganisms10071408

14. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие. Под ред. Дятлова ИА. Оболонск: Династия, 2021.
15. Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC, Stong L, Kuo CC, Corey L, et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. Science. 1983 Feb 11;219(4585):637-44. DOI: 10.1126/science.6297006
16. Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Ed. by Hames BD, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.
17. Gallagher SR, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. Curr Protoc Cell Biol. 2001 May;Chapter 6:Unit 6.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0602s00

References

1. Hilmas CJ and Anderson J. Anthrax. in Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2015;387-410.
2. Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nature Microbiology. 2019;4:1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
3. Shishkova NA, Tyurin EA, Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN. Danger of anthrax in modern conditions. Ecological and epidemiological aspects. Science City: Science, Production, Society. 2017;3:29-34. (In Russian).
4. Williams DD, Turnbough CL. Surface Layer Protein EA1 Is Not a Component of *Bacillus anthracis* Spores but Is a Persistent Contaminant in Spore Preparations. J of Bacteriology. 2004;186:566-569. DOI: 10.1128/jb.186.2.566-569.2004
5. Swiecki MK, Lisanby MW, Shu F, Turnbough CL Jr, Kearney JF. Monoclonal antibodies for *Bacillus anthracis* spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6076-84. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.6076
6. Kuehn A, Kovác P, Saksena R, Bannert N, Klee SR, Ranisch H, et al. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Clin Vaccine Immunol. 2009 Dec;16(12):1728-37. DOI: 10.1128/CVI.00235-09
7. Tamborini M, Bauer M, Bolz M, Maho A, Oberli MA, Werz DB, et al. Identification of an African *Bacillus anthracis* lineage that lacks expression of the spore surface-associated anthrose-containing oligosaccharide. J Bacteriol. 2011 Jul;193(14):3506-11. DOI: 10.1128/JB.00078-11
8. Rodionov AP, Artemeva EA, Melnikova LA, Kosarev MA, Ivanova SV. Features of anthrax natural foci and *Bacillus anthracis* ecology. Veterinary Science Today. 2021;151-158. DOI: 10.29326/2304-196x-2021-2-37-151-158
9. Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. Microbiol Mol Biol Rev. 2015 Dec;79(4):437-57. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15
10. Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB, et al. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16014-9. DOI: 10.1073/pnas.1109419108
11. Walper S, Lee P, Anderson G, Goldman E. Selection and Characterization of Single Domain Antibodies Specific for *Bacillus anthracis* Spore Proteins. Antibodies. 2013;2:152-167. DOI: 10.3390/antib2010152
12. Buckley PE, Calm AM, Welsh H, Thompson R, Menking D, Carney J, et al. US Army Combat Capabilities Development Command Chemical Biological Center/EXCET, I. Defense Advanced Research Projects Agency Antibody Technology Program Phase II: Characterization of an Anti-BclA Antibody Produced by Illumina, Inc. 2021.
13. Moteshareie H, Hassen WM, Dirieh Y, Groulx E, Dubowski JJ, Tayabali AF. Rapid, Sensitive, and Selective Quantification of *Bacillus cereus* Spores Using xMAP Technology. Microorganisms. 2022 Jul 13;10(7):1408. DOI: 10.3390/microorganisms10071408

14. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN. Methods for studying biological and molecular genetic properties of the anthrax pathogen: a teaching aid. Edited by Dyatlov IA. Obolensk: Dynasty Publ., 2021. (In Russian).
15. Nowinski RC, Tam MR, Goldstein LC, Stong L, Kuo CC, Corey L, et al. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. Science. 1983 Feb 11;219(4585):637-44. DOI: 10.1126/science.6297006
16. Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Ed. by Hames BD, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.
17. Gallagher SR, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. Curr Protoc Cell Biol. 2001 May;Chapter 6:Unit 6.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0602s00

Информация о соавторах:

Яковлева Вера Александровна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Vera A. Yakovleva, Junior Researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, Senior Researcher of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Raisa I. Mironova, Researcher, Department of especially dangerous infections, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

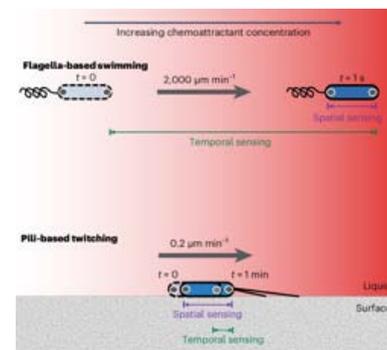
Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Head, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

Sergey S. Vetchinin, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Бактериальные клетки могут использовать пространственное восприятие химических градиентов для управления хемотаксисом

Плавающие бактерии, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, демонстрируют удивительные способности к перемещению в ответ на химические градиенты, что является важным аспектом их хемотаксического поведения. Эти микроорганизмы используют временное зондирование, чтобы обнаруживать изменения концентрации веществ вокруг себя с течением времени. Это позволяет им адаптироваться к окружающей среде и находить источники питательных веществ или избегать токсичных соединений. Однако прикрепленные к поверхности бактерии, такие как *P. aeruginosa*, применяют совершенно иной подход к хемотаксису. В недавних исследованиях, в которых использовались микрофлюидные эксперименты, массивное параллельное отслеживание клеток и флуоресцентные репортеры, ученые смогли детально изучить, как эти бактерии ощущают химические градиенты. В частности, внимание было уделено пилообразным структурам, которые «дергаются» на поверхности клеток. Эти структуры играют ключевую роль в том, как бактерии воспринимают изменения в концентрации химических веществ. Интересно, что в отличие от плавающих клеток, временные изменения концентрации не влияют на подвижность дергающихся клеток *P. aeruginosa*. Это открытие опровергает традиционное представление о том, что бактериальные клетки, будучи столь малыми, не могут эффективно воспринимать химические градиенты. Вместо этого исследования показали, что неподвижные клетки способны количественно оценивать хемотаксическое поведение, отслеживая изменения в субклеточной локализации флуоресцентных белков. Это происходит даже в условиях, когда градиент изменяет свое направление. Таким образом, *P. aeruginosa* может ощущать различия в концентрации химических веществ по всей длине своего тела, что позволяет им реагировать на изменения окружающей среды с высокой точностью. Это открытие имеет важные биологические и медицинские последствия, поскольку *P. aeruginosa* является патогеном, способным вызывать инфекции у людей с ослабленным иммунитетом. Понимание механизмов, с помощью которых эти бактерии обнаруживают и реагируют на химические сигналы, может помочь в разработке новых методов лечения инфекций и в борьбе с устойчивостью к антибиотикам. Эти исследования также подчеркивают важность взаимодействия между микроорганизмами и их окружением, а также роль, которую играют физические и химические свойства среды в определении поведения бактерий. В будущем дальнейшие исследования могут привести к новым открытиям в области микробиологии, экологии и медицины, открывая новые горизонты для понимания жизнедеятельности бактерий и их взаимодействия с окружающим миром.



Wheeler JHR, Foster KR, Durham WM.

Individual bacterial cells can use spatial sensing of chemical gradients to direct chemotaxis on surfaces. Nat Microbiol. 2024 Sep;9(9):2308-2322. DOI: 10.1038/s41564-024-01729-3