

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

2•2012

Квартальный
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, В. А. ГВОЗДЕВ, В. Н. ГЕРШАНОВИЧ
А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН, Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ, Н. Ф. МЯСОЕДОВ,
С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМЕРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,
В. З. ТАРАНТУЛ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск), А. А. ПРОЗОРОВ
(Москва), Н. В. ТОМИЛИН (Санкт-Петербург), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОР

- Колесников А. В., Козыр А. В., Шемякин И. Г.** Перспективы применения аптамеров в диагностике бактериальных инфекций 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Монахова Е. В., Писанов Р. В., Мазрухо А. Б., Маркина О. В., Алексеева Л. П.** Свойства CEF (CHO CELL ELONGATING FACTOR) холерных вибрионов: биоинформационный анализ и экспериментальные данные 9
- Миронова Л. В., Балахонов С. В., Урбанович Л. Я., Козhevnikov A. S., Половинкина В. С., Куликалова Е. С., Афанасьев М. В.** Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae eltor*, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России 13
- Микшис Н. И., Живова Ю. Н., Новикова Л. В., Шаропова Н. А., Попов Ю. А., Кутырев В. В.** Определение различий в структуре генов биосинтеза метионина у штаммов *Bacillus anthracis* и филогенетически родственных видов бацилл 21
- Еременко Е. И., Рязанова А. Г., Цыганкова О. И., Цыганкова Е. А., Буравцева Н. П., Куличенко А. Н.** Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа 26
- Кулаков Ю. К., Ковалев Д. А., Мисетова Е. Н., Головнева С. И., Ляпустина Л. В., Желудков М. М.** Использование multiple locus variable tandem repeats analysis в систематике возбудителя бруцеллеза 30
- Yong Huang, Quan Zou, Xing Jia Shen, Xue Li Yu, Zhan Bin Wang, Xiang Chao Cheng.** Construction of baculovirus expression vector of miRNAs and Its expression in insect cells 35

REVIEW

- Kolesnikov A. V., Kozyr A. V., and Shemyakin I. G.** Prospects for Application of Aptamers in Diagnostics of Bacterial Infections

EXPERIMENTAL WORKS

- Monakhova E. V., Pisanov R. V., Mazrukho A. B., Markina O. V., and Alekseeva L. P.** Characteristics of *Vibrio Cholerae* Cef (CHO Cell Elongating Factor): Bioinformatics Analysis and Experimental Data
- Mironova L. V., Balakhonov S. V., Urbanovich L. Y., Kozhevnikov A. S., Polovinkina V. S., Kulikalova E. S., and Afanas'ev M. V.** Molecular-Genetic Analysis of the Epidemical Strains of the *Vibrio cholerae El Tor* Isolated from the Siberian and Maritime Regions of Russia
- Mikshis N. I., Zhivova Yu. N., Novikova L. V., Sharapova N. A., Popov Yu. A., and Kuttyrev V. V.** Identification of the Differences in the Genes Responsible for Methionine Biosynthesis in *Bacillus anthracis* Strains and Phylogeny-Related Species
- Eremenko E. I., Ryazanova A. G., Tsygankova O. I., Tsygankova E. A., Buravtseva N. P., and Kulitchenko A. N.** Genotype Diversity of the *Bacillus anthracis* Strains Isolated from the Caucasus Region
- Kulakov Y. K., Kovalev D. A., Misetova E. N., Golovneva S. I., Lyapustina L. V., and Zheludkov M. M.** Use of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis for the *Brucella* Systematization
- Yong Huang, Quan Zou, Xing Jia Shen, Xue Li Yu, Zhan Bin Wang, and Xiang Chao Cheng** Construction of the Baculovirus Expression Vector of the miRNAs and Its Expression in the Insect Cells



Адрес редакции:

Москва, 115088**ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14****ОАО «Издательство "Медицина"»**

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: (499) 264-36-66

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

Ответственность
за достоверность информации,
содержащейся в рекламных
материалах, несут
рекламодатели.

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Корректор Л. В. Кузнецова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого
издания не может быть занесена в память
компьютера либо воспроизведена любым
способом без предварительного письменного
разрешения издателя.

Сдано в набор 27.02.12
Подписано в печать 01.06.12
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная. Печ. л. 5,00.
Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.
Заказ 227.
Подписной тираж номера 221 экз.
ЛР №010215 от 29.04.97 г.
E-mail: meditsina@mtu-net.ru
www.medlit.ru
Отпечатано в типографии ООО «Подольская
Периодика»,
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

А. В. Колесников, А. В. Козырь, И. Г. Шемякин

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АПТАМЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФБУН ГНЦ ПМБ, Московская область, пос. Оболенск

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот являются перспективной платформой для разработки широкого спектра диагностических и терапевтических препаратов и средств мониторинга окружающей среды. Свойства аптамеров позволяют рассматривать их как синтетические аналоги антител. Вместе с тем аптамеры имеют ряд важных преимуществ по сравнению с антителами, что делает их эффективным инструментом для разработки диагностических средств нового поколения, обеспечивающих высокую чувствительность и специфичность детекции при высокой степени воспроизводимости и контролируемости свойств и низких затратах на производство. В частности, технологии детекции биомолекул и целых микроорганизмов, созданные на базе аптамеров, могут быть использованы для решения задач высокочувствительной экспресс-диагностики бактериальных патогенов. В данном обзоре суммируются достижения аптамерных технологий в области детекции бактериальных патогенов и их компонентов и рассматриваются перспективы их практического использования.

Ключевые слова: аптамеры, комбинаторные библиотеки, биосенсоры, иммуноферментный анализ, иммуно-ПЦР, диагностика, патогены, токсины

Введение

Использование новых методов диагностики, профилактики и лечения бактериальных инфекций позволило значительно снизить их негативное воздействие на человека, известное по прошедшим эпохам. Тем не менее смертность от инфекционных болезней остается высокой во всем мире, занимая первые места в развивающихся странах и уступая лишь онкологическим и сердечно-сосудистым заболеваниям в государствах с развитой или переходной экономикой. Это обусловлено как недостатками систем ранней диагностики и терапии бактериальных инфекций, так и ускорившейся модификацией патогенов под действием различных, часто антропогенных факторов, известной в западной литературе как «emerging and re-emerging infectious diseases» [32].

Несмотря на существующий арсенал молекулярных, биохимических и микробиологических методов детекции и его постоянное развитие, в клинической диагностике имеется ряд проблем, решение которых крайне важно для повышения эффективности борьбы с бактериальными патогенами. Одна из них – этиологическая расшифровка инфекции. Определение видовой принадлежности патогена проводится микробиологическими и биохимическими методами и требует значительного времени, связанного с необходимостью выделения и культивирования микроорганизма. В ряде случаев этиологическая расшифровка считается нецелесообразной, поскольку отдалает начало терапии [1].

Вместе с тем для многих инфекций быстрая этиологическая расшифровка жизненно необходима. Это

в первую очередь особо опасные инфекции и токсикоинфекции. Например, в ходе исследований смертельных случаев сибирской язвы в США в 2001 г. было показано, что порог концентрации в крови летального токсина, при котором наступает так называемое «состояние невозврата», составляет не более 1–5 пг/мл [21, 45]. Более того, для этиологической расшифровки ряда инфекций необходим мультиплексный анализ, способный дифференцировать, к примеру, относительно безвредный изолят *E. coli* O104:H4 от смертельно опасного варианта патогена, несущего шига-токсин, и мультирезистентного к антибиотикам [30]. Таким образом, основным требованием к новым диагностическим методам идентификации патогенов является возможность быстрой, высокочувствительной (1–10 пг/мл и менее для молекул, например, для токсинов и 1–20 клеток/мл для бактерий) детекции мишени без предварительного обогащения и культивирования микроорганизмов.

Одним из перспективных направлений создания высокочувствительных тест-систем для экспресс-диагностики инфекций является использование аптамеров. Аптамерами называются фрагменты нуклеиновых кислот или полипептидов, полученные в результате искусственно направляемой «эволюции в пробирке» и специфически связывающие избранные молекулы-мишени с высокой аффинностью [11, 12]. В данном обзоре будут рассматриваться аптамеры на базе нуклеиновых кислот и их потенциал для быстрой диагностики бактериальных инфекций.

Методы экспресс-диагностики и перспективы использования аптамеров

Основными способами быстрой специфической диагностики бактериальных патогенов, широко применяющимися в клинической практике, в настоящее время являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и различные методы детекции с использованием специфических антител, наиболее распространенным из которых является иммуноферментный анализ (ИФА). Несмотря на широкое применение данных методов, в современном виде они имеют ряд недостатков, ограничивающих их эффективность как средств экспресс-диагностики и быстрой этиологической расшифровки патогена. Чувствительность классического ИФА с применением колориметрической детекции, как правило, не превышает 1 нг/мл мишени. Вторичные антитела и конъюгаты на основе авидина и его производных, задействованные в сэндвич-системах ИФА, нередко являются источником неспецифического сигнала. Это ограничивает возможности повышения

эффективности метода за счет увеличения чувствительности вторичных реакций в ИФА, например, использования хемилюминесцентной детекции.

ПЦР является весьма чувствительным и специфичным методом анализа, теоретически для детекции ДНК-мишени достаточно присутствия в образце всего нескольких копий генома патогена. На практике клинические образцы или образцы, включающие частицы пищи, почвы и прочие примеси, содержат также ингибиторы ПЦР, родственные микроорганизмы, неспецифическую ДНК, способную дать ложноположительный сигнал (подробное описание указанных проблем ПЦР ДНК патогенов приводится, например, в работе [26]). Для проведения ПЦР часто требуется обогащение детектируемых мишеней (аналитов) в образце с применением аффинных меток или селективных сред [52], что значительно увеличивает время детекции. Кроме того, методом ПЦР невозможно напрямую детектировать белки или другие факторы вирулентности, в частности, осуществлять мониторинг концентрации токсина или иного фактора вирулентности в процессе заболевания.

Таким образом, ключевыми компонентами системы экспресс-диагностики и ранней этиологической расшифровки инфекции являются: 1) детектирующий агент, обеспечивающий высокую аффинность и специфичность связывания с мишенью; 2) система детекции и/или амплификации сигнала от детектирующего агента, обеспечивающая определение аналита в концентрации 5–50 пг/мл (или 10–100 клеток (КОЕ)/мл) и менее.

Аптамеры являются одним из наиболее перспективных современных инструментов высокочувствительной экспресс-диагностики. К преимуществам аптамеров по сравнению с антителами можно отнести широкую химическую синтез, простоту введения широкого спектра меток и функциональных групп непосредственно при синтезе, отсутствие падения аффинности за счет необратимой денатурации активных структур, возможность использования внутренних особенностей структуры самого аптамера для создания, например, флуоресцентного репортера, изменяющего интенсивность флуоресценции при взаимодействии с мишенью [33, 39], высокую по сравнению с антителами плотность иммобилизации в ориентированном положении на твердой фазе и целый ряд других свойств [20]. В отличие от антител аптамеры можно получить к полностью неиммуногенным мишеням и даже к малым, повсеместно встречающимся молекулам, например к АТФ [27]. Для получения и производства аптамеров не нужны живые системы. Небольшая молекулярная масса и отсутствие протяженных участков, не входящих в связывающий центр аптамеров, снижают вероятность их неспецифического взаимодействия с различными молекулами по сравнению с таковой для антител. Стоимость синтеза аптамеров и сайт-направленного введения в эти молекулы различных меток намного ниже стоимости производства и модификации антител. Чувствительность аптамеров к нуклеазам блокируется химическими модификациями в процессе синтеза [29].

Технология селекции мишень-направленных аптамеров

Технология селекции аптамеров, разработанная в начале 90-х годов XX века, получила название SELEX

(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [14, 42, 44, 48]. Метод SELEX является типичным представителем методов скрининга комбинаторных библиотек. Вероятность нахождения высокоаффинного лиганда к избранной мишени тем больше, чем выше сложность библиотеки. Исходное разнообразие библиотеки “нуклеиновых” аптамеров намного превышает степень сложности фаговых и рибосомных библиотек. Масса 60-членной библиотеки аптамеров на базе нуклеиновых кислот (НК-аптамеров), содержащей $6 \cdot 10^{17}$ уникальных молекул, будет составлять всего около 1,8 мг. При этом количество уникальных молекул в такой библиотеке превышает технически достижимое число уникальных молекул в комбинаторной библиотеке на основе рибосомного дисплея не менее чем в 1000 раз, в фаговой библиотеке антител – в 10^6 раз, в репертуаре антител человека – в 10^8 раз.

Размножение НК-аптамеров проводят в системе, состоящей из буферного раствора, ферментов обмена ДНК и нуклеотидтрифосфатов. Для амплификации основных альтернативных видов комбинаторных библиотек необходимы живые системы или их многокомпонентные фракции *in vitro*. Большое число неопределенных компонентов и интерференция с жизненно важными процессами в системах оказывают селективное влияние на эффективность амплификации отдельных членов библиотек. Таким образом, скрининг библиотек аптамеров является наиболее эффективным способом получения высокоаффинных лигандов к биомолекулам.

Системы детекции бактерий и их компонентов на основе аптамеров

Разработка методов аптамерной диагностики бактерий, бактериальных токсинов и факторов вирулентности началась в последние 4–5 лет; число исследований в данной области еще относительно невелико, однако достигнутые результаты свидетельствуют о значительном потенциале аптамеров для разработки диагностических систем и подходов к детекции в области микробиологии и инфекционных заболеваний. Основные работы по селекции аптамеров в этой области можно разделить на три группы: получение аптамеров, узнающих целые бактерии; аптамеров, связывающихся с токсинами и другими индивидуальными биомолекулами и фракциями молекул, и разработка принципиально новых методов детекции на основе уже полученных аптамеров.

Аптамеры, специфичные к целым бактериальным клеткам, и методы детекции патогенов на их основе

Аптамеры, специфичные к спорообразующим бациллам, были одними из первых представителей этого класса молекул, отобранных с использованием живых клеток. Уместно отметить, что селекция аптамеров к целым бактериям технологически несколько проще селекции аптамеров, специфичных к биомолекулам, поскольку бактерии представляют собой по сути природный аффинный сорбент, который может быть отделен от молекул аптамеров, находящихся в растворе, простым центрифугированием, в то время как связавшиеся с бактериями аптамеры окажутся в осадке. Бактерии, фиксированные, например фор-

мальдегидом, весьма устойчивы к жестким условиям эволюции связавшейся ДНК, что позволяет отбирать высокоаффинные аптамеры. Споры бацилл, в частности *B. anthracis*, выдерживают кипячение, сохраняя жизнеспособность, поэтому являются удобной моделью для изучения методов селекции высокоаффинных аптамеров в максимально жестких условиях. Аптамеры, отобранные к спорам возбудителя сибирской язвы, демонстрировали столь высокую аффинность к мишени, что не могли быть элюированы в физиологических растворах при нагревании до 99°C, однако диссоциировали из комплекса со спорами в деионизованной воде [2]. Электрохемилюминесцентная детекция спор с применением отобранных аптамеров характеризовалась чувствительностью менее 10 бактерий и широким динамическим диапазоном (до 10⁶ клеток в 1 мл) [3]. Аптамеры к спорам *B. thuringensis* позволяли детектировать только около 10³ микроорганизмов, что, возможно, связано с выбором метода детекции (флуоресцентные квантовые точки), чувствительность которого меньше, чем у электрохемилюминесценции. Вместе с тем чувствительность данного метода выше таковой других способов флуоресцентной детекции спор бацилл [19].

Интересный подход был использован для создания системы детекции целых бактерий *Staphylococcus aureus* на основе аптамеров. Авторы применили как позитивную селекцию на клетках патогена, так и негативную с использованием близкородственных непатогенных стафилококков [6]. Было получено 5 аптамеров, эффективно детектирующих патогенный стафилококк на фоне различных, в том числе близкородственных, бактерий. Поскольку неспецифическое связывание данных аптамеров оказалось весьма невысоким, они были использованы одновременно для повышения эффективности селекции различных изолятов *Staphylococcus aureus*.

Как правило, в работах по получению диагностических аптамеров, специфичных к целым бактериям, деконволюция индивидуальной молекулы-мишени не производится, так как это сопряжено со значительными затратами без гарантии идентификации и невозможно заранее определить, будет та или иная мишень присутствовать в 100% изолятов патогена или только в части из них. Детекция нескольких мишеней одновременно, возможная ввиду высокой селективности аптамеров, позволяет значительно повысить вероятность успешного обнаружения патогена. Описанная методика позволяет детектировать единичные бактерии в мазках, полученных непосредственно от пациента. Определить потенциальную селективность пары различных аптамеров, полученных к однотипным микроорганизмам, можно методом конкурентного ингибирования, при котором избыток аптамера А, не содержащего метки, препятствует связыванию с бактерией меченого аптамера А, но не препятствует связыванию аптамеров В, С, Е и т. д., меченных красителями с различной длиной волны флуоресценции.

Помимо применения нескольких аптамеров одновременно для селективной детекции однотипной мишени, возможна и селекция одного группоспецифического аптамера. Такие молекулы были получены для определения стрептококков М-типа, преобладающих в Канаде [16]. Интересно, что полученные аптамеры

связывали все или почти все штаммы стрептококка, отобранные для селекции с константами, находящимися в диапазоне 1–13 нМ, в то время как связывание аптамеров со штаммами М-типа, не участвовавшими в селекции, было значительно менее эффективным. Таким образом, селекцию аптамеров на целых бактериальных клетках можно использовать не только с целью получения панспецифических диагностикумов, но и для разработки методов тонкой дифференциации субтипов и изолятов патогена.

Использование аптамеров, специфичных для конкретного серовара патогена, рассматривается на примере *Salmonella typhimurium* [23]. Эти аптамеры были ранее отобраны по связыванию с фракцией внешних мембранных белков (ОМР) бактерии [22] и оказались эффективны для связывания с целыми клетками и их очистки методом магнитной сепарации из сложных смесей, содержащих близкородственные бактерии. Авторы работы показывают эффективность аптамеров как инструмента, обеспечивающего адекватную чувствительность ПЦР в реальном времени при анализе сложных смесей микроорганизмов, в которых эффективность амплификации ДНК-мишени может снижаться на несколько порядков. Чувствительность метода аптамерной магнитной очистки на микросферах, сопряженного с ПЦР в реальном времени, составляла 1 бактерию (КОЕ) на ПЦР-реакцию [23].

Исследование по отбору аптамеров к одному из основных возбудителей нозокомиальных инфекций — *Pseudomonas aeruginosa*, было направлено на разработку метода детекции клеток патогена с помощью флуоресцентно меченных аптамеров. Было показано, что наиболее эффективно связывающийся аптамер (K_d около 20 нМ) позволял эффективно определять клетки-мишени методом флуоресцентной микроскопии. Такой метод является быстрым (1,5–2 ч), а также недорогим и технически несложным, что делает его использование привлекательным для диагностики в условиях стандартной клинической лаборатории [50].

Детекция патогенов с использованием аптамеров, полученных при селекции на целых бактериях, может быть весьма эффективна в тех случаях, когда культивирование бактерий проблематично. Например, распространенный пищевой патоген *Campylobacter jejuni* нуждается в микроаэрофильных условиях культивирования, которые требуют наличия оборудования и квалификации персонала, как правило, недоступных в стандартной клинико-диагностической лаборатории. Аптамеры, отобранные на связывание либо с фракцией внешних мембранных белков патогена [4], либо с целыми клетками [10], были способны детектировать примерно от 2 до 250 бактерий/мл в зависимости от типа образца, использованного для анализа. Это делает возможным эффективную детекцию клинических образцов на предмет наличия *Campylobacter jejuni* с использованием стандартного флуориметра или флуоресцентного микроскопа [4]. Кроме того, для аптамера, отобранного на взаимодействие с целыми клетками, была показана белковая природа мишени, с которой он связывается. С учетом высокой специфичности данного аптамера к различным изолятам *Campylobacter jejuni* дальнейшие исследования могут позволить выделить маркер, уникальный для данного патогена [10].

В заключение уместно отметить, что аптамеры,