

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Терехов Станислав Сергеевич

Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

02.00.10 – биоорганическая химия

Научные руководители:

кандидат химических наук
Смирнов Иван Витальевич

доктор химических наук,
профессор, чл.-корр. РАН
Габибов Александр Габибович

Москва – 2016

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	9
Обзор литературы	11
Классические эмульсионные методы ультравысокопроизводительного скрининга активности	11
Микрофлюидные технологии для генерации монодисперсных эмульсий и инкапсуляции единичных живых клеток и организмов	17
Микрофлюидные технологии для ультравысокопроизводительного скрининга ...	26
Использование рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека в качестве антидота при отравлении фосфорорганическими токсинами	39
Скрининг антибиотической активности	45
Материалы и методы	53
Химические реактивы и сопутствующие материалы	53
Реактивы	53
Ферменты	53
Субстраты.....	53
Маркеры	54
Поверхностно-активные вещества.....	54
Фосфорорганические соединения.....	54
Антитела	54
Активированные эфиры флуорофоров.....	54
Плазмидные вектора	54
Бактериальные штаммы	54
Дрожжевые штаммы	55
Клеточные линии	55
Животные	55
Растворы	55
Бактериальные среды	55
Дрожжевые среды.....	56
Антибиотики	56
Методы работы с нуклеиновыми кислотами	56
Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции	56
Рестрикция	57
Лигирование.....	57
Выделение плазмидной ДНК	58
Электрофорез ДНК в агарозном геле	58
Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле	59
Электроолюция	59
Секвенирование плазмидной ДНК	59
Создание генетических конструкций для продукции 4pчБуХЭ	60
Создание генетических конструкций для дрожжевого дисплея ферментов	61
Создание библиотеки мутантов БуХЭ	62
Создание генетических конструкций для продукции мутантов БуХЭ	62
Методы работы с бактериями <i>E. coli</i>	63
Получение электрокомпетентных клеток	63
Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом электропорации	63
ПЦР с колоний	64

Ночная культура	64
Приготовление музейного штамма.....	64
Методы работы с дрожжами <i>Pichia pastoris</i>.....	64
Получение электрокомпетентных клеток	64
Трансформация клеток методом электропорации	65
ПЦР с генома дрожжей	65
Анализ трансформантов.....	66
Приготовление музейного штамма.....	66
Экспрессия белков, заякоренных на поверхности дрожжевой стенки, для проведения процедуры микрофлюидной компартиментализации.....	66
Методы работы с клетками линии СНО-К1 и FreeStyle™ 293-F	67
Культивирование клеток линии СНО-К1	67
Получение стабильных клонов-продуцентов 4рчБуХЭ	67
Продукция рчБуХЭ в клетках линии СНО-К1	69
Культивирование клеток линии FreeStyle™ 293-F и заморозка.....	70
Трансфекция клеток линии FreeStyle™ 293-F методом липофекции	70
Продукция мутантной рчБуХЭ в клетках линии FreeStyle™ 293-F.....	71
Методы работы с белками	71
Электрофорез в полиакриламидном геле.....	71
Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди	72
Окрашивание ПААГ на наличие бутирилхолинэстеразной активности по методу Карновского	72
Определение концентрации рчБуХЭ.....	72
Выделение и очистка 4рчБуХЭ.....	73
Выделение и очистка мутантов рчБуХЭ	74
Химическое полисиалирование препаратов рчБуХЭ	75
Введение радиоизотопной метки ¹²⁵ I в препараты рчБуХЭ.....	75
Получение препаратов флуоресцентно меченой 4рчБуХЭ.....	75
Оценка кинетических характеристик мутантов БуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ.....	76
Методы работы с животными	77
Животные, уход за животными.....	77
Определение фармакокинетических параметров препаратов рчБуХЭ и конъюгатов рчБуХЭ-ПСА.....	77
Определение профиля биораспределения препарата 4рчБуХЭ и конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА.....	78
Определение профиля биodeградации препарата 4рчБуХЭ <i>in vivo</i>	78
Оценка протективного действия препарата 4рчБуХЭ	79
Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности	80
Изготовление микрофлюидных чипов	80
Установка для генерации монодисперсной микрофлюидной эмульсии	81
Инкапсуляция дрожжевых клеток и проведение ферментативных реакций в каплях	81
Инкапсуляция клеток бактерий и культивация в каплях	82
Визуализация капель	82
Отбор капель двойной микрофлюидной эмульсии с использованием FACS и регенерация клеток из капель.....	83
Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности.....	83
Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к инактивации ФОТ	84
Отбор представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост <i>S. aureus</i>	84
Регенерация и идентификация культивируемых бактерий-ингибиторов <i>S. aureus</i>	85

Отбор бактерий-ингибиторов <i>S. aureus</i> с использованием классических микробиологических подходов скрининга на чашках (платформы Ваксмана)	86
Измерение ингибирующих свойств метаболитов в жидкой культуре	86
Очистка и идентификация действующих веществ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
16S рРНК секвенирование бактерий	87
Полногеномное секвенирование бактерий	88
Результаты и обсуждение	89
Создание микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии	89
Скрининг биокаталитической активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии	94
Дрожжевой дисплей биокатализаторов и высокочувствительная детекция биокаталитической активности	94
Эффективность отбора биокатализаторов из смеси активных и неактивных клеток ..	97
Селективность отбора биокатализаторов из смеси биокатализаторов с разной специфичностью или различным уровнем активности	100
Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОР	104
Улучшение фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера	107
Создание генетических конструкций нового поколения для высокоэффективной продукции 4рчБуХЭ	107
Изучение фармакокинетических характеристик и профиля биораспределения 4рчБуХЭ, а также влияния химического полисиалирования	110
Изучение профиля биодеградации 4рчБуХЭ <i>in vivo</i>	115
Протективное действие препарата 4рчБуХЭ	119
Скрининг антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии	122
Создание модельной системы для изучения попарных взаимодействий микроорганизмов	122
Скрининг представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост <i>S. aureus</i>	126
Выводы	135
Список литературы	137
Приложение	153
1. Праймеры	153
Создание генетических конструкций для продукции олигомерно чистой 4рчБуХЭ ..	153
Создание генетических конструкций для дрожжевого дисплея ферментов	154
Создание библиотеки мутантов БуХЭ	155
Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности	155
Создание генетических конструкций для продукции мутантов БуХЭ	155
2. Очистка рчБуХЭ	156
3. Результаты 16S рРНК и полногеномного широкомасштабного секвенирования	158
4. Кокультивация <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i>	163
5. Экстракция вторичных метаболитов <i>P. aeruginosa</i>	163

Список сокращений

АцХЭ – ацетилхолинэстераза человека

БуХЭ – бутирилхолинэстераза

рчБуХЭ – рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека

4рчБуХЭ – тетрамерная рчБуХЭ

4рчБуХЭ-sCy7 OFF – конъюгат флуоресцентно-меченой 4рчБуХЭ, с высокой степенью модификации, демонстрирующий эффект самотушения sCy7

4рчБуХЭ-sCy7 ON – конъюгат флуоресцентно-меченой 4рчБуХЭ, с низкой степенью модификации, без эффекта самотушения sCy7

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза I

ДСН – додецилсульфат натрия

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

кДа – тысяча атомных единиц массы

КОЕ – колониеобразующие единицы

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МДЭ – микрофлюидная двойная эмульсия

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МС – масс-спектрометрия

ОЕ – единицы оптической плотности

ПААГ – полиакриламидный гель

ПСА – окисленные полисиаловые кислоты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

САПР – система автоматизированного проектирования

Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

УМИ – уникальный молекулярный идентификатор

ФОТ – фосфорорганические токсины

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭК – энтеропептидаза (энтерокиназа)

ЯМР – спектрометрия ядерного магнитного резонанса

ВChE – ген чБуХЭ

BTC – бутирилтиохолина йодид

CBDP – 2-(*орто*-крезил)-4Н-1:3:2-бензодиоксафосфорин-2-оксид

ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием

CMV – промотор цитомегаловируса

sCy5 – сульфо-цианин 5

sCy7 – сульфо-цианин 7

ddPCR – капельная цифровая полимеразная цепная реакция

DTNB – дитио-5,5-бис(2-нитробензойная кислота)

Fab – участок связывания антигена (фрагмент антитела)

FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг

FAM – 6-флуоресцеина фосфорамидит

FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии

F2A-пептид – самопроцессирующий пептид вируса ящура

GD_C – кумариновый аналог зомана

GFP – зеленый флуоресцентный белок

IgG – иммуноглобулины класса G

КО – нокаут гена

k_{cat} – каталитическая константа

K_M – константа Михаэлиса

k_1/K_i – константа скорости бимолекулярного ингибирования

k_2 – константа скорости самореактивации

LD₅₀ – полуметальная доза

λ – степень заполнения

λ_{ex} – длина волны возбуждения флуоресценции

λ_{em} – длина волны испускания флуоресценции

MAR – последовательность связывания с ядерным матриксом

MQ – вода особой чистоты из установки Milli-Q (Millipore, США)

MRT – среднее время удержания

NHS – N-гидроксисукцинимид

PBS – натрий-фосфатный буфер

PDMS – полидиметилсилоксан

POX – параоксон

POX-R – параоксон-резорфин

PRAD – пролин-богатая последовательность связывания (тетрамеризации)

RFU – относительные единицы флуоресценции

RTQ1 – гаситель флуоресценции с диапазоном гашения 470-570 нм

SELEX – систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением

SLUDGE – синдром с симптомами слюноотделения, слезотечения,
мочеиспускания, потоотделения, расстройства кишечника и рвоты

TBE – Трис-боратный буфер

TE – буфер Трис-ЭДТА

$\tau_{1/2}$ – период полураспада или полувыведения

$\tau_{1/2 \text{ вывед.}}$ – период полувыведения

$\tau_{1/2 \text{ распр.}}$ – период полураспределения

VR – S-диэтиламиноэтиловый, O-2-метилпропиловый эфир метилтиофосфоновой кислоты

WT – дикий тип

16S рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота, компонент малой субъединицы рибосомы прокариот

Введение

Современная биотехнология и фармацевтика являются крайне высокотехнологичными областями, чьи успехи тесно связаны с разработкой новых принципов поиска различных видов биологической активности. Возможности, которые открывает нам “пост-геномная эра”, позволяют выявлять новые мишени для поиска терапевтических агентов [1], а также осуществлять виртуальный скрининг потенциальных кандидатов лекарственных препаратов *in silico* [2].

Несмотря на колоссальные перспективы методов молекулярного моделирования, данный подход не является универсальным, т. к. ресурсы существующих в настоящее время суперкомпьютеров не позволяют рассчитывать взаимодействия биомолекул *de novo* и используют различные приближения, требующие наличия кристаллической структуры мишени, ее динамики, а также четкого понимания механизма ее действия [3]. Комбинаторные методы скрининга, основанные на эксперименте, напротив, не требуют никаких дополнительных данных для поиска новой биологической активности, так как базируются на предположении о том, что достаточно большая выборка различных вариантов за счет своего разнообразия уже содержит в себе искомую активность и задача исследователя состоит лишь в том, чтобы эффективно отобрать ее из общего пула вариантов [4].

Несмотря на уникальные возможности поиска биологической активности *in silico de novo*, подавляющее большинство современных препаратов получено на основе комбинации методов компьютерного моделирования и высокопроизводительного скрининга лекарственных кандидатов [5]. В настоящее время высокопроизводительный скрининг осуществляется на базе автоматизированных роботизированных станций [6], однако существует очевидная тенденция к переходу биотехнологических платформ на формат “лаборатории-на-чипе”, основанный на современных успехах в области микрофлюидики [7]. Использование микрофлюидики приводит к миниатюризации оборудования, уменьшению расходов на реагенты и эксплуатацию. Происходит многократное увеличение производительности и осуществляется переход к ультравысокопроизводительному скринингу [8] за счет использования

микрофлюидных капельных технологий. Несмотря на значительные успехи ряда мировых центров [8-13], в вопросах технологии формирования микрофлюидных потоков, систем отбора и идентификации активных клонов существует еще достаточное количество нерешенных проблем.

Данная диссертационная работа посвящена созданию универсальной ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы для скрининга различных типов биокаталитической и биологической активности. В задачи работы входит отбор функционально активных клонов с использованием принципа микрофлюидной компартиментализации, а также применение данной платформы для направленной эволюции ферментов и поиска микроорганизмов, демонстрирующих антибиотическую активность по отношению к патогенным бактериям *Staphylococcus aureus*.

Обзор литературы

Классические эмульсионные методы

ультравысокопроизводительного скрининга активности

В настоящее время существует множество разнообразных ультравысокопроизводительных подходов, позволяющих эффективно отбирать различные биомолекулы, обладающие высокоспецифичным и высокоаффинным связыванием с целевыми молекулами-мишенями: скрининг с использованием микросфер [14], рибосомный дисплей [15], фаговый дисплей [16, 17], бактериальный дисплей [18], дрожжевой дисплей [19], дисплей на клетках млекопитающих [20], SELEX [21]. В то же время разработка ультравысокопроизводительных методов, направленных на отбор химической или биологической активности, в отличие от связывания, зачастую сопряжена с большими трудностями. Прежде всего, данные методы не универсальны и в каждом отдельном случае имеют ряд серьезных недостатков, принципиально ограничивающих их применение. В частности, многие из них применимы лишь для скрининга активности, связанной с образованием ковалентной связи [22, 23]. Другие требуют вовлечения дополнительных молекулярно-биологических механизмов, таких как преимущество скорости роста или возникновение выживаемости в процессе селекции [24-26]. Некоторые методы используют специфические субстраты, образующие флуоресцентные продукты, заякоренные на клеточной стенке (или обладающие высокой гидрофобностью), в результате протекания биохимической реакции, катализируемой селективируемым ферментом [27, 28], что позволяет отбирать наиболее активные клетки по флуоресценции продукта с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS). Таким образом, можно отметить, что ввиду отсутствия физической связи генотип-фенотип между мишенью и эффектором (или ферментом и продуктом реакции) отбор на активность является принципиально более сложной задачей, зачастую требующей поиска частного решения, позволяющего искусственно связать генотип и фенотип.

Традиционно, в процессе классического скрининга биологической и биокаталитической активности, роль “связующего звена”, обеспечивающего связь генотип-фенотип, играет изолированная индивидуальная лунка культуральной

плашки. Эмульсионные методы скрининга имитируют классический скрининг, используя вместо лунок изолированные капли эмульсии, имея при этом ряд принципиальных преимуществ, позволяющих выделить их в отдельный класс методов, наиболее интенсивно развивающихся в последние годы. В отличие от классических методов скрининга с использованием роботизированных платформ [29] основанных на классическом – “плашечном” подходе к анализу биологической активности (в минимальном объеме порядка микролитров), эмульсионные методы оперируют значительно более малыми объемами жидкости (от нанолитров до фемтолитров). В свою очередь это приводит к тому, что появляется возможность скринировать библиотеки представительностью более 10^7 вариантов с использованием минимального количества реагентов и оборудования.

Впервые идея, заключающаяся в создании искусственной связи между генотипом и фенотипом за счет инкапсуляции в каплях обратной эмульсии вода-в-масле, была опубликована в 1998 году [30] (Рис. 1).

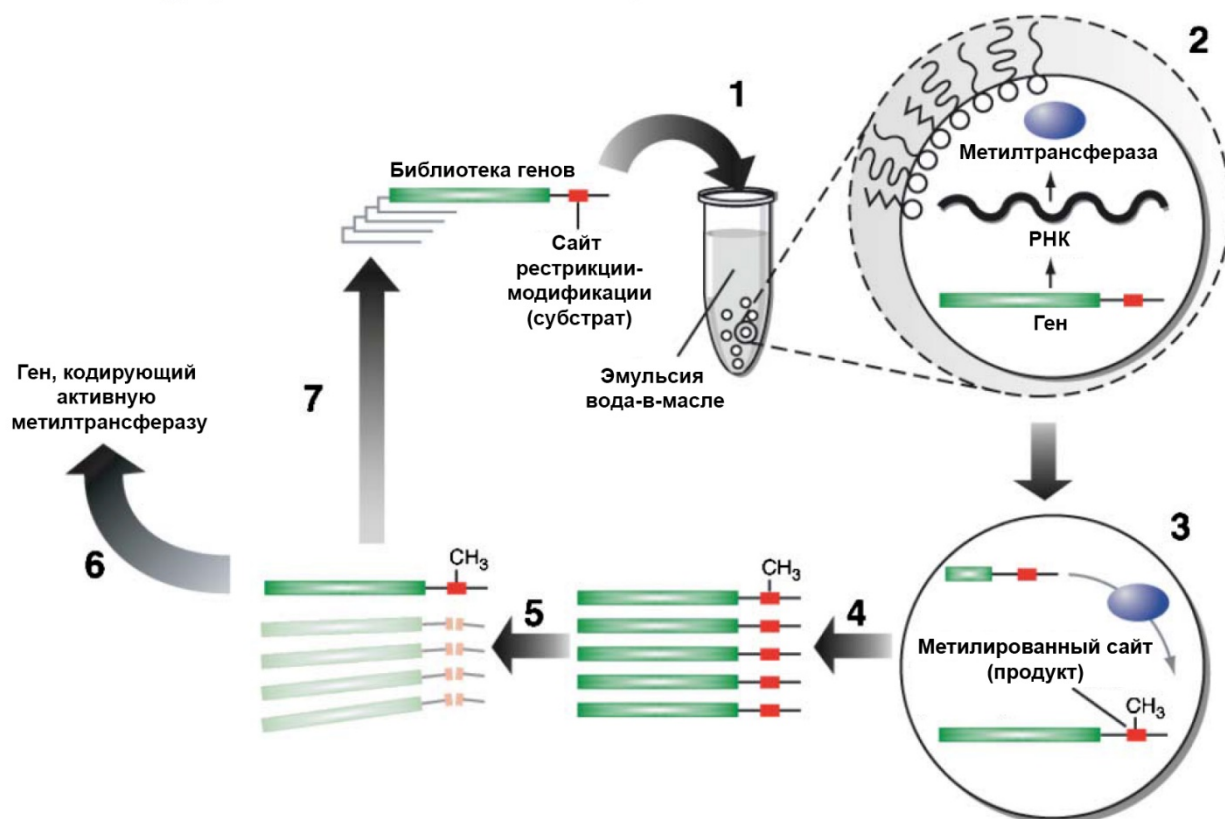


Рис. 1. Селекция метилтрансфераз за счет *in vitro* компарментализации (адаптировано из [31]). (1) Смесь для *in vitro* трансляции и библиотека генов, кодирующих варианты метилтрансферазы и несущие сайт

рестрикции/метилования подвергается эмульсификации. (2) Гены подвергаются транскрипции и трансляции в каплях эмульсии. (3) Активные варианты метилтрансферазы приводят к образованию метилированного продукта. (4) Эмульсию разрушают и реакцию останавливают. (5) Неметилированные гены подвергаются воздействию эндонуклеазы рестрикции в то время как гены, кодирующие активную метилтрансферазу устойчивы к действию эндонуклеазы рестрикции. Гены, кодирующие активную метилтрансферазу регенерируют и характеризуют (6) или подвергают следующему раунду селекции.

В данной работе было показано, что в каплях эмульсии диаметром порядка 2.6 мкм протекает эффективная *in vitro* трансляция, приводящая к образованию активного фермента метилтрансферазы *M.HaeIII*, осуществляющего модификацию ДНК-субстрата (состоящего из последовательности гена *M.HaeIII*, множественных участков узнавания эндонуклеазы рестрикции *HaeIII* и биотинилированного олигонуклеотида). Модификация субстрата (генотипа) вызывает его устойчивость по отношению к *HaeIII*, что, в свою очередь, позволяет отбирать последовательности субстратов-генотипов, несущих ген *M.HaeIII* от аналогичных субстратов, несущих ген *folA* кодирующий контрольный фермент дегидрофолатредуктазу из искусственной смеси $M.HaeIII : folA = 1 : 10^7$. Таким образом, капли эмульсии играли роль индивидуальных “искусственных клеток”, обеспечивавших физическую связь генотипа (субстрата, несущего ген *M.HaeIII*) и фенотипа, выраженного в метилировании генотипа-субстрата, приводящего к устойчивости по отношению к действию эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*. Данная работа имела принципиальное значение, так как впервые продемонстрировала возможности нового универсального принципа – *in vitro* компартиментализации, позволяющего связать генотип и фенотип на уровне единичных молекул.

Дополнительный контроль проведения реакции в каплях может достигаться за счет добавления наноразмерных капель обратной эмульсии, несущих активаторы ферментативной реакции в каплях [32]. Несмотря на уникальные возможности *in vitro* компартиментализации, в пионерской работе [30] и в ряде последующих работ [31, 33-35] не был до конца решен вопрос универсальности отбора. В качестве примера создания биокатализатора *de novo*, катализирующего нехарактерную для

природных ферментов активность, было продемонстрировано создание биокатализаторов на основе рибозимов, осуществлявших реакцию циклоприсоединения Дильса-Альдера [36]. В то же время, как и в предыдущих работах, существовал очевидный недостаток, заключающийся в том, что данный метод опирался на то, что продукт ферментативной реакции являлся генотипом (или был связан с ним ковалентно [37]), а последующий отбор активных вариантов из смеси активных и неактивных по прежнему осуществлялся за счет связывания продукта с аффинным сорбентом.

Таким образом, для создания универсальной технологии отбора на активность в каплях в общем виде требуется решение двух принципиально важных задач:

1. детекции активности на уровне единичных капель;
2. возможности отбора единичных активных капель из смеси.

Наиболее простое решение этих задач было впервые продемонстрировано в работе [38]. В качестве аналитического сигнала для высокочувствительной детекции биокаталитической активности была использована флуоресценция, а отбор капель эмульсии производился при помощи стандартного клеточного сортера (FACS). При этом наиболее принципиальным усовершенствованием предыдущей технологии был переход от однократной эмульсии вода-в-масле к двойной эмульсии вода-в-масле-в-воде. Это позволяет непосредственно анализировать индивидуальную биокаталитическую активность изолированных генов (Рис. 2).

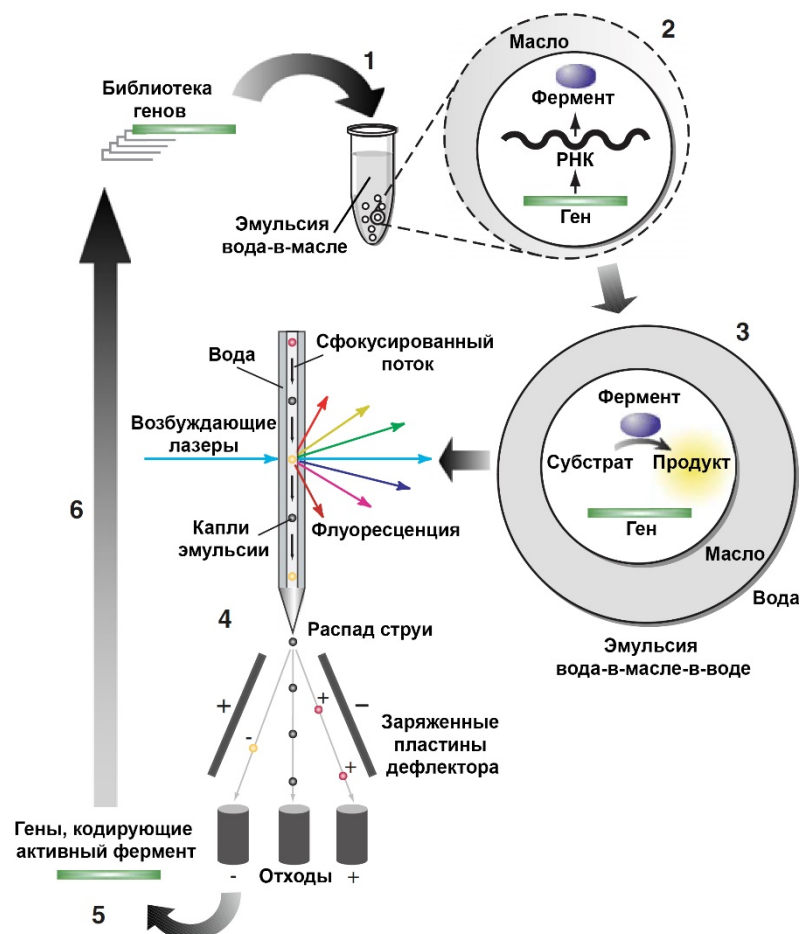


Рис. 2. Отбор каплей двойной эмульсии с использованием FACS (адаптировано из [39]). (1) Смесь для *in vitro* трансляции и библиотека генов, кодирующих различные варианты фермента, а также флуорогенный субстрат подвергаются эмульсификации с образованием каплей эмульсии вода-в-масле, несущих преимущественно одну копию гена. (2) Гены подвергаются транскрипции и трансляции в каплях эмульсии. (3) Активные варианты фермента приводят к образованию флуоресцентного продукта, однократная эмульсия вода-в-масле подвергается повторной эмульсификации с образованием каплей двойной эмульсии вода-в-масле-в-воде. (4) Флуоресцирующие капли, несущие активные варианты фермента, отделяются от неактивных при помощи флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS). (5) Отобранные гены регенерируются из каплей, амплифицируются и используются для дальнейшего отбора (6) или анализа.

Данная усовершенствованная технология эмульсионного скрининга [40] является весьма универсальной, не ограничивается необходимостью *in vitro* трансляции и может быть использована в варианте компартиментализации клеток,

продуцирующих фермент, а также клеточного дисплея [41]. Единственным принципиальным ограничением ее применения является поиск релевантного флуорогенного субстрата [42, 43]. В то же время существующие в настоящее время высокочувствительные методы анализа активности зачастую используют флуоресценцию в качестве аналитического сигнала и подобрать соответствующий флуорогенный субстрат не представляет высокой сложности, что было успешно продемонстрировано на примере β -галактозидазной [39], тиолактоназной [41], глюкозооксидазной [44-46], протеазной [47] и других видах ферментативной активности.

Эффективность метода скрининга новых ферментов в каплях двойной эмульсии была наглядно продемонстрирована в работе [48]. В результате направленной эволюции фермента параоксоназы PON1, ее активность по отношению к производному высокотоксичного боевого отравляющего вещества нервнопаралитического действия циклозарина была увеличена более чем в 10^5 раз, что приводило к его эффективной инактивации $k_{cat}/K_M \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Полученные результаты были подтверждены экспериментами *in vivo*, продемонстрировавшими профилактическое действие полученного варианта PON1 на мышах, подвергнутых токсическому воздействию аналога циклозарина. Внутривенное введение препарата улучшенной PON1 приводило к 75% выживаемости подопытных животных по сравнению с полной гибелью в контрольной группе без терапии и с терапией рекомбинантной PON1 дикого типа.

Дальнейшее усовершенствование технологии эмульсионного скрининга связано с усовершенствованием самих компарментов – капель эмульсии. Дело в том, что изначально [40] стадии генерации как однократной, так и двойной эмульсии проводились с использованием гомогенизаторов. Несмотря на то, что использование гомогенизаторов позволяет быстро получать большие количества капель, данная технология имеет ряд принципиальных недостатков:

- стохастическая генерация капель эмульсии приводит к высокой полидисперсности (Рис. 3);
- получаемая двойная эмульсия является мультикомпарментной (т.е. зачастую одна капля несет несколько изолированных капель);

- генерация эмульсии протекает в жестких условиях высокого сдвигового стресса.

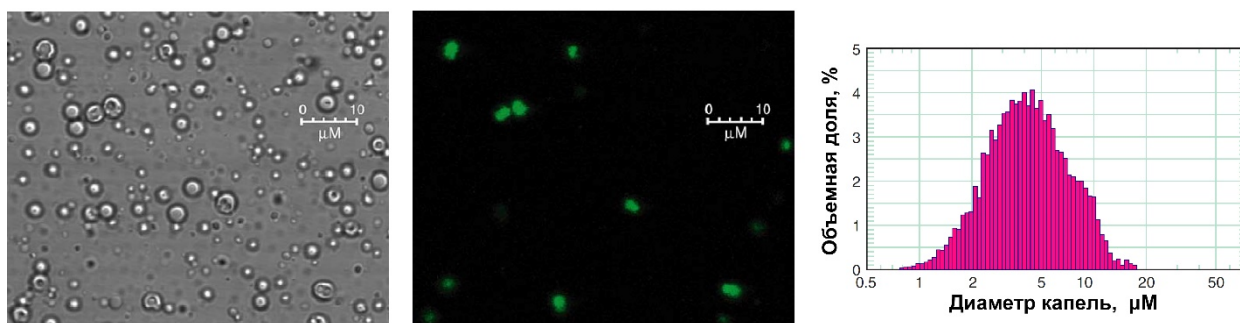


Рис. 3. Двойная эмульсия вода-в-масле-в-воде (адаптировано из [40]).
 Внутренняя водная фаза содержит конъюгат флуоресцеин-декстран (4 мкМ);
 микроскопия интерференционного контраста, флуоресцентная микроскопия,
 распределение капель по размеру (слева направо).

Данные недостатки существенно снижают чувствительность данного метода скрининга (т.к. разные по размеру и гранулярности капли имеют разный объем и рассеяние, а следовательно, приводят к разным условиям протекания реакций внутри капель), значительно снижают максимальную производительность (т.к. доля капель целевого размера и гранулярности составляет 1-5%) и не позволяют заключать в капли различные биологические объекты, чувствительные к эмульсификации (клетки млекопитающих, многие виды микроорганизмов, а также многоклеточные организмы).

Микрофлюидные технологии для генерации монодисперсных эмульсий и инкапсуляции единичных живых клеток и организмов

Решением перечисленных выше проблем является использование микрофлюидных технологий генерации эмульсии. Современные успехи в области микрофлюидики основаны на использовании микрофлюидных чипов (Рис. 4) – миниатюрных устройств, состоящих из каналов и текстур размером от нескольких десятков до нескольких микрометров [49], позволяющих реализовать концепцию “лаборатории-на-чипе”.

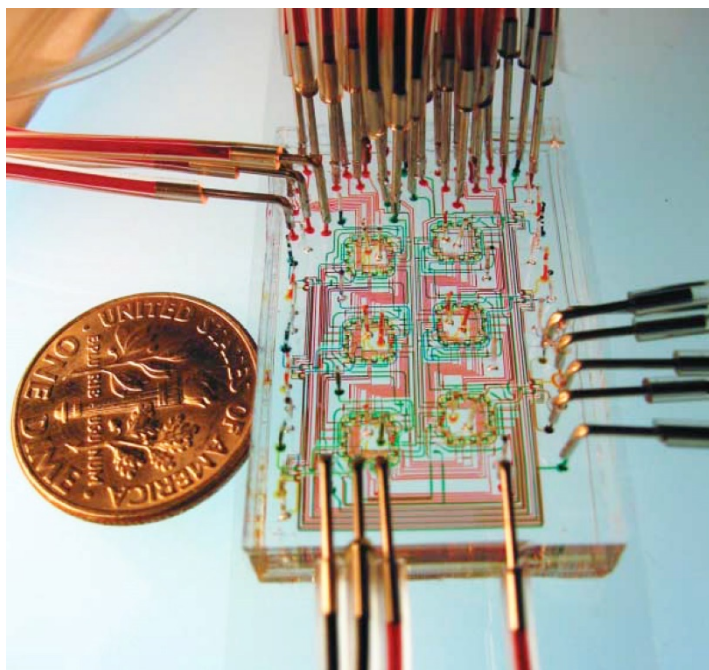


Рис. 4. Микрофлюидный чип, содержащий 6 микрореакторов, использованный для изучения роста популяций микробов. Диаметр монеты 18 мм. (адаптировано из [50]).

Эмульсионная (капельная) микрофлюидика является ее неотъемлемой частью и включает в себя огромное количество разнообразных приложений [51, 52], использующих в своей основе пространственное разделение потоков несмешивающихся друг с другом жидкостей и самопроизвольный распад струи жидкости за счет неустойчивости Плато – Рэлея [53]. Концепция “лаборатории-на-чипе” подразумевает возможность манипулирования потоками жидкости и единичными каплями (Рис. 5), что в свою очередь открывает широкие возможности использования микрофлюидных технологий для синтеза и сборки “умных” частиц [54-57], создания микрокапсул и полимеросом [58-60], биосовместимых клеточных матриц [61, 62] и, что особенно важно, высокопроизводительных методов анализа в экспериментальной биологии [63].

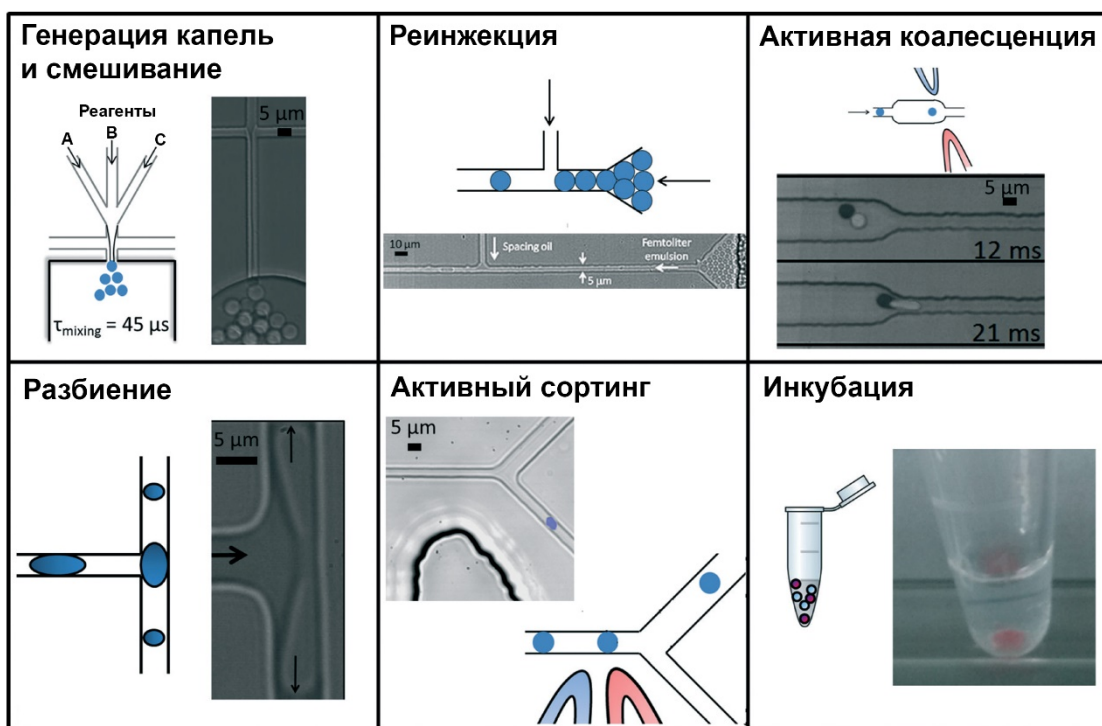


Рис. 5. Операционные возможности капельной микрофлюидики (адаптировано из [64]).

Генерация монодисперсной эмульсии контролируемого размера и морфологии (Рис. 6) в максимально мягких условиях является одним из основных преимуществ капельной микрофлюидики по сравнению с классическими подходами к эмульсификации, основанными на механическом воздействии [65-67].

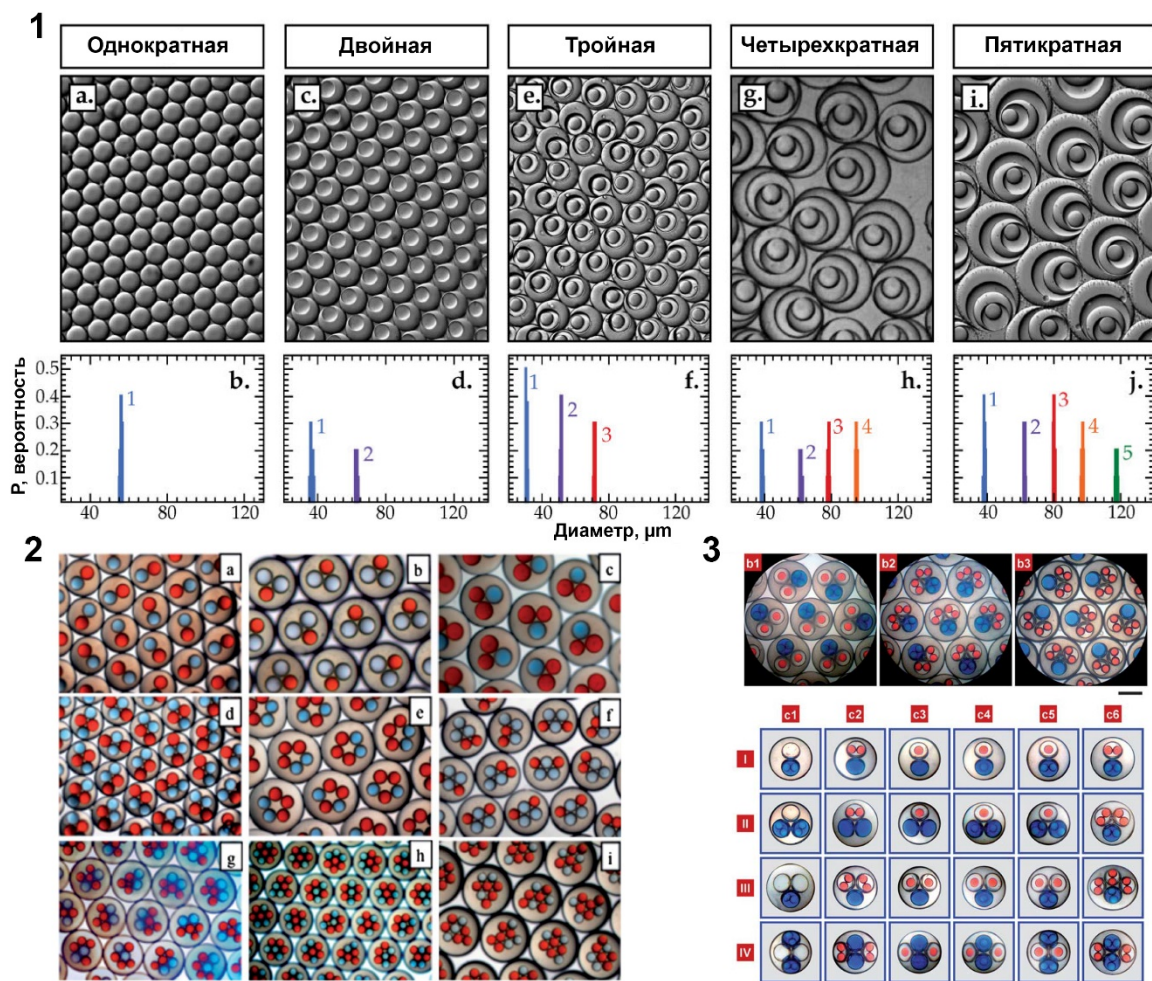


Рис. 6. Различные типы микрофлюидных эмульсий демонстрируют высокую монодисперсность (1-3 адаптировано из [65-67]).

Для эффективной генерации капель поверхность каналов чипа должна иметь высокую смачиваемость по отношению к дисперсионной среде, роль которой зачастую играют различные масла (минеральное, силиконовое или фторуглеродное) или водная фаза. Высокая смачиваемость достигается за счет химической модификации стенок каналов чипа [68]. Для получения монодисперсных микрофлюидных двойных эмульсий могут быть использованы различные режимы генерации капель: последовательное прокапывание дисперсной фазы в дисперсионную среду с последовательным образованием сначала однократной, а затем двойной эмульсии или при более высоких скоростях потоков может реализовываться режим впрыскивания, при котором образование многократной эмульсии происходит одновременно [69]. Сами микрофлюидные чипы для эмульсификации также могут иметь разную конструкцию и технологию производства (Рис. 7), начиная от простых и широкодоступных самодельных чипов

из покровных стекол [70], до коаксиально расположенных микрокапилляров [56, 61, 66, 67]. Вместе с тем наиболее совершенной и широко распространенной технологией изготовления микрофлюидных чипов является мягкая литография, позволяющая легко и технологично создавать разнообразные планарные и трехмерные текстуры каналов, необходимые для генерации микрофлюидных эмульсий [71].

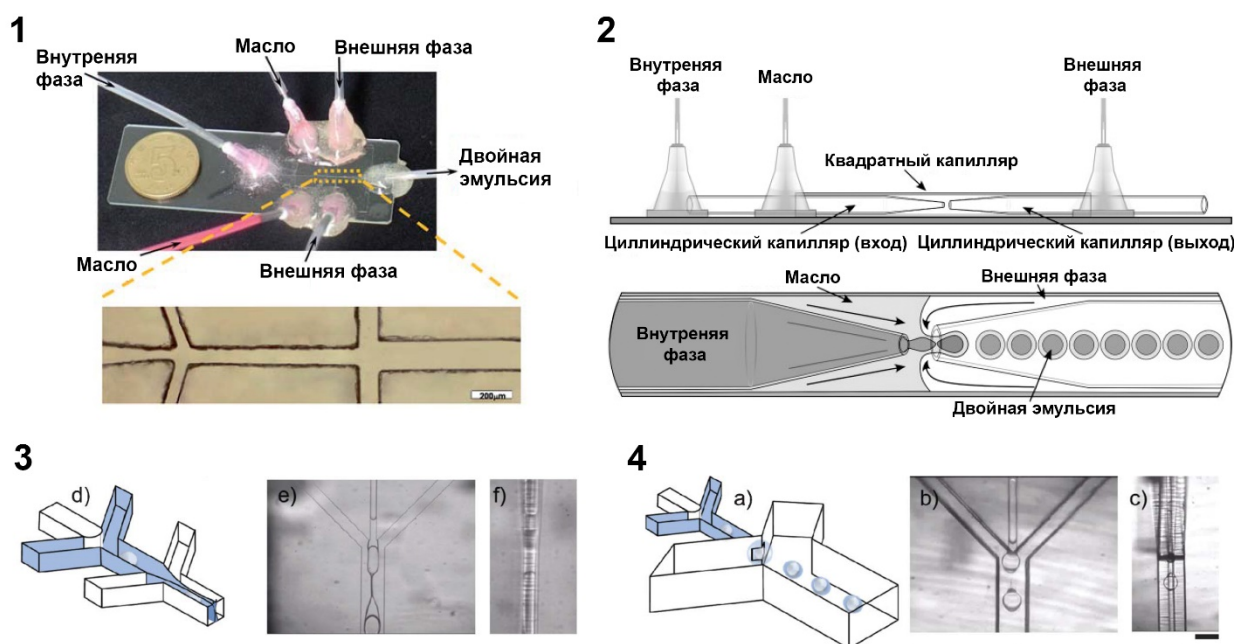


Рис. 7. Различные технологии, используемые для создания микрофлюидных чипов для генерации монодисперсных микрофлюидных эмульсий: (1) чип из покровных стекол [70], (2) чип из коаксиально расположенных капилляров [61], (3) планарный микрофлюидный чип, полученный с использованием технологии мягкой литографии [71], (4) трехмерный чип, полученный с использованием технологии мягкой литографии [71].

Технологии мягкой литографии и фотолитографии, лежащие в основе современных методов создания микрофлюидных чипов, позволяют легко осуществлять моделирование и дизайн чипов с использованием современных систем автоматизированного проектирования (САПР, например, AutoCAD), что в свою очередь приводит к легкому прототипированию и масштабированию. Таким образом, производительность микрофлюидных устройств может быть увеличена за счет мультиплицирования каналов в одном микрофлюидном чипе (Рис. 8), что

широко используется для многократного увеличения производительности генерации эмульсии и ее последующего анализа [72-77]

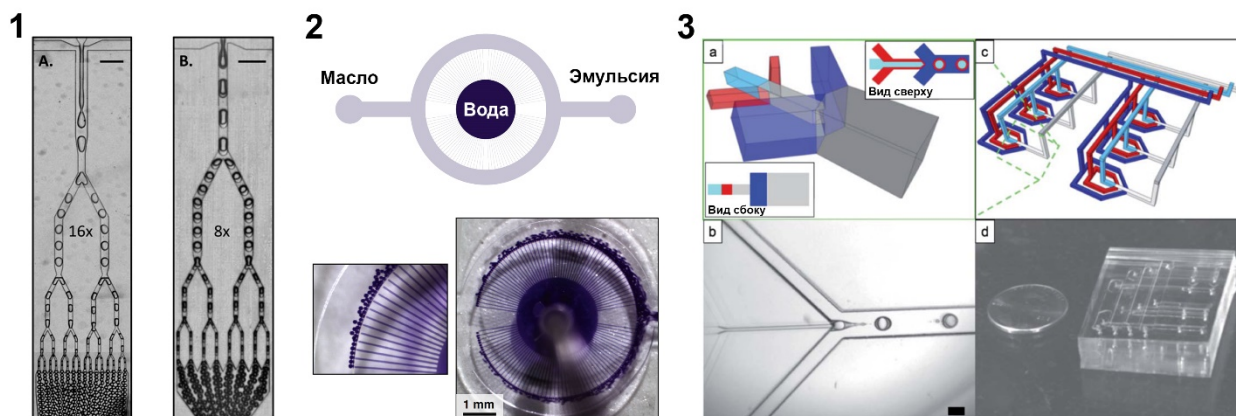


Рис. 8. Увеличение производительности за счет параллелизации генерации микрофлюидной эмульсии в планарном (1, 2) или трехмерном (3) микрофлюидном чипе (1, 2 и 3 адаптировано из [72], [73] и [74] соответственно).

Как уже было отмечено ранее, благодаря уникальному контролю над генерацией эмульсии, в настоящее время капельная микрофлюидика является наиболее привлекательным методом эмульсификации, что делает ее универсальной технологией для инкапсуляции. Инкапсуляция клеток в каплях микрофлюидной эмульсии в общем виде подчиняется распределению Пуассона [78], описываемого уравнением (1):

$$P(X = x) = \frac{\lambda^x e^{-\lambda}}{x!} \quad (1)$$

Где P – вероятность того, что в каплю попадет x клеток, а параметр λ – среднее количество клеток в каплях (отношение общего количества клеток к общему количеству капель). Таким образом, если в конкретном приложении требуется, чтобы большинство капель было заполнено клетками, необходимо использовать такую концентрацию клеток, при которой $\lambda > 1$. В то же время большинство практических приложений капельной микрофлюидики использует предположение о том, что одна капля в большинстве случаев содержит не более одной клетки, что реализуется в случае $\lambda < 1$. Статистическое заполнение микрофлюидных капель дискретными объектами лежит в основе современного метода капельной цифровой полимеразной цепной реакции (ddPCR) [79-81], позволяющей оценить их

абсолютную концентрацию. Данный метод был успешно применен для оценки дифференциальной экспрессии генов [82], изучения взаимодействий между бактериями и их вирусами [83], оценки количества копий онкогена в клинических образцах пациентов [84], а также детекции ДНК плода в материнской плазме [85].

Кроме статистического заполнения каплей дискретными объектами могут наблюдаться различные отклонения, связанные с самоорганизацией движения микрочастиц по каналам в условиях ламинарного течения [86]. Самоорганизация, в свою очередь, может быть использована для направленной инкапсуляции единичных клеток в каплях микрофлюидной эмульсии (Рис. 9).

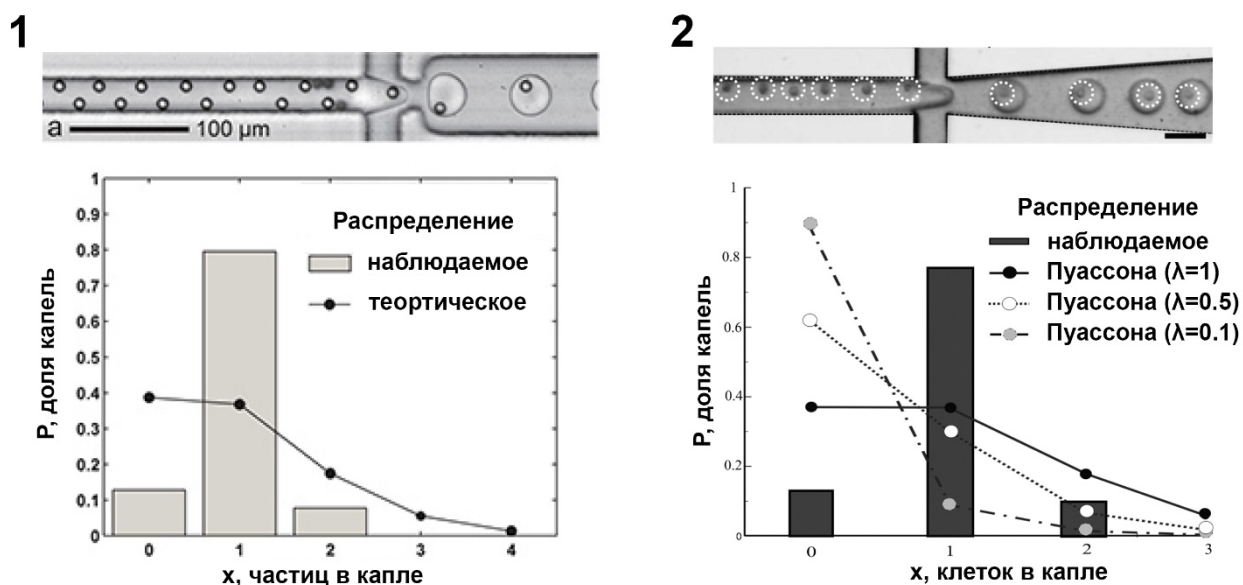


Рис. 9. Самоорганизация потока частиц в каналах микрофлюидного чипа приводит к инкапсуляции индивидуальных (1) микросфер [87] или (2) клеток [88] с эффективностью, значительно превышающую теоретически предсказанную в соответствии с распределением Пуассона.

Явление самоорганизации потока частиц происходит при движении с высокой скоростью по узким каналам (сечением менее 10 диаметров частицы) достаточно большой длины (порядка 6 см) и приводит к инкапсуляции индивидуальных микросфер [87] с вероятностью более 80% (т.е. более чем в 2 раза выше, чем это предсказывает распределение Пуассона). В свою очередь движение клеток по узким каналам с высокой скоростью может приводить к их повреждению, что в большинстве случаев недопустимо. Альтернативным решением данной проблемы является использование чипов со спиралевидной геометрией каналов, использующих силу Дина [88] для значительного ускорения процесса

самоорганизации за счет стабилизации единственного равновесного состояния. В этом случае явление самоорганизации наблюдается даже при длине каналов менее 1 см, что делает возможным прижизненную инкапсуляцию клеток миелоидный лейкемии линий HL60 и K562.

Инкапсуляция живых клеток и микроорганизмов в индивидуальных каплях микрофлюидной эмульсии представляет большой интерес, так как открывает уникальные возможности для изучения уникальных свойств индивидуальных объектов среди их популяционного разнообразия. Успехи в этой области связаны с разработкой инертных органических жидкостей и биосовместимых эмульсификаторов. Наиболее простым решением этой проблемы является использование минерального масла и высокоэффективных биосовместимых эмульсификаторов на основе полисилоксанов (например, цетил полиэтиленгликоль/полипропиленгликоль-10/1 диметикон) [40, 41, 44-48, 73, 89]. Данный подход был успешно применен для компартиментализации живых клеток факультативных анаэробов (бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), а также проведения бесклеточной *in vitro* транскрипции/трансляции. В то же время минеральное масло сильно ограничивает транспорт газов [90], что является принципиальным недостатком, ингибирующим рост микроорганизмов и затрудняющим его использование для инкапсуляции клеток млекопитающих и многочисленных видов аэробных бактерий.

Многочисленные фторуглеродные соединения – “фторуглеродные масла” (перфторуглеродные амины (FC-40, FC-70), перфторуглеводороды (перфтороктан, перфтордекалин), перфторпроизводные простых эфиров (HFE-7100, HFE-7500) и их смеси (FC-77)) представляют более удобную альтернативу минеральному маслу. Среди всех технических жидкостей, фторуглеродные масла обладают наиболее высокой газопроницаемостью, обеспечивающей эффективное дыхание клеток в каплях. Кроме того, они представляют собой “альтернативную фазу”, т.е. обладают чрезвычайно низкой растворимостью в воде, углеводородах и жирах, что приводит к их инертности и биосовместимости. Имея плотность (1.6-1.9 г/см³), значительно превышающую плотность воды, фторуглеродные масла образуют двойную эмульсию, склонную к седиментации, что позволяет легко осуществлять ее сбор и реинжекцию. Стабилизация биосовместимых фторуглеродных микрофлюидных

эмульсий может осуществляться с использованием неионных фторуглеродных поверхностно-активных веществ [91]. Получаемые в результате капли обладают высокой стабильностью и могут играть роль универсальных микрокомпарментов (Рис. 10), обеспечивающих не только выживаемость, но и культивацию клеток дрожжей [91], а также линий клеток человека (причем как суспензионных Jurkat, так и адгезионных HEK293T) и, более того, рост, развитие и размножение в том числе и многоклеточных организмов, таких как *C. elegans* [92].

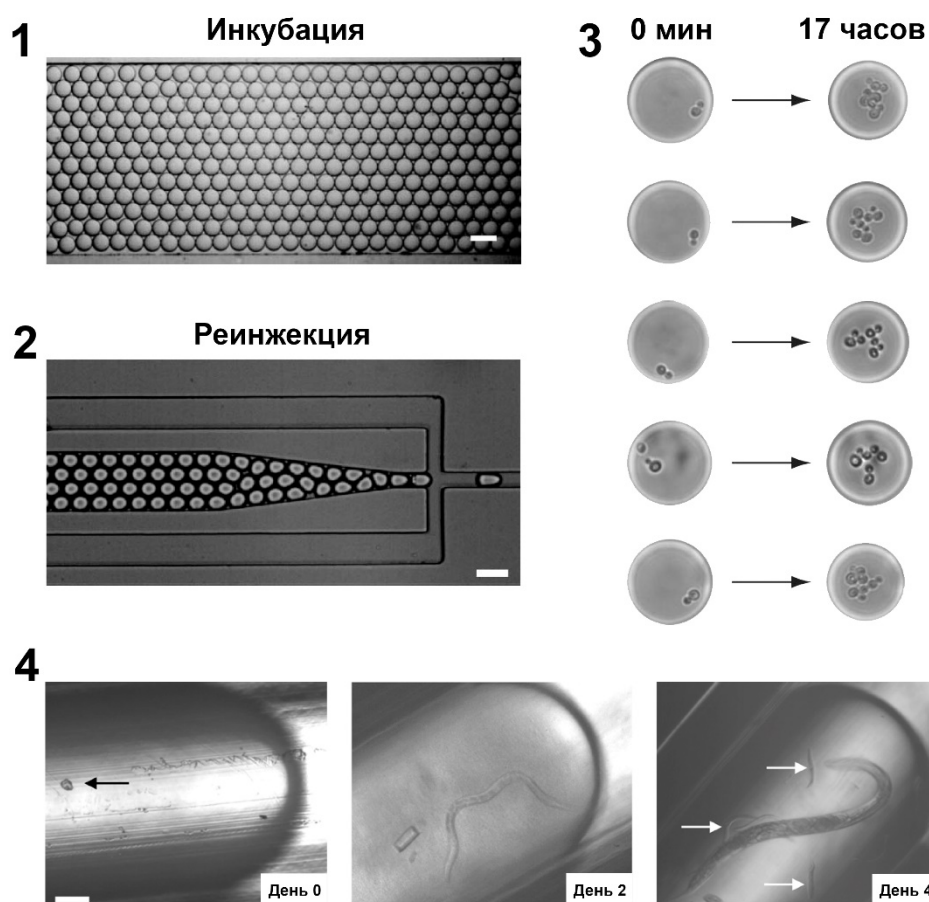


Рис. 10. Стабильность и биосовместимость капель микрофлюидных эмульсий, несущих живые клетки, полученных с использованием фторуглеродных масел. (1) Микрофлюидная эмульсия стабильна в процессе инкубации и (2) может подвергаться повторному введению в микрофлюидный чип без заметной коалесценции капель. (3) Инкубация дрожжевых клеток в каплях эмульсии приводит к их делению. (4) Капли эмульсии могут играть роль микрокомпартамента для роста, развития и размножения *C. elegans*. Черная стрелка указывает на инкапсулированное яйцо. Через 4 дня инкубации в каплях образуются дочерние личинки, отмеченные белыми стрелками (1-3 адаптировано из [91], 4 из [92]).

Таким образом, современные успехи в области микрофлюидной генерации эмульсий, моделирования течения и распада потока жидкости и микрофлюидной инкапсуляции связаны с успехами в изучении механизмов смачивания и адсорбции, гидродинамических эффектов на микроуровне, а также созданием новых технологий и материалов с уникальными характеристиками и возможностями практического применения. Находясь на стыке физики, химии и биологии, микрофлюидика является одной из наиболее развивающихся областей современной науки, имеющей в настоящее время множество различных приложений в молекулярной диагностике, медицине и биотехнологии.

Микрофлюидные технологии для ультравысокопроизводительного скрининга

В отличие от классических методов генерации эмульсии, микрофлюидные технологии позволяют получать монодисперсную эмульсию. Как уже было показано ранее, инкапсуляция живых клеток в каплях микрофлюидной эмульсии может быть использована для культивации единичных клеток [92]. Более того, для анализа активности фермента-репортера в индивидуальных клетках может быть использован флуоресцентный микроскоп, детектирующий флуоресценцию индивидуальных капель непосредственно в канале микрофлюидного чипа аналогично тому, как это происходит в проточной цитофлуориметрии. Таким образом была показана принципиальная возможность прижизненного анализа активности единичных клеток в каплях микрофлюидной эмульсии.

Данный подход впоследствии был применен для высокочувствительного анализа биомаркеров, мало представленных на поверхности клеток [93]. Ферментативная амплификация, опосредованная образованием иммуноферментных комплексов и последующий анализ активности индивидуальных клеток в каплях, позволили детектировать биомаркеры CCR5 и CD19 на поверхности единичных моноцитов человека со значительно большей чувствительностью, чем это может быть достигнуто с использованием стандартной проточной клеточной цитофлуориметрии.

Дальнейшее усовершенствование микрофлюидных технологий заключалось в интеграции электродов в чип для проведения активной электрокоалесценции капель [94]. В свою очередь это позволило контролируемо добавлять дополнительные реагенты к уже существующим каплям, осуществлять промежуточную инкубацию, проводить повторную реинжекцию капель в чип, добавлять новые реагенты для анализа и наконец, осуществлять анализ выживаемости единичных клеток (Рис. 11). Таким образом, вся последовательность операций, протекающих при классическом анализе в культуральных плашках была реализована в одном микрофлюидном чипе. За счет использования внутреннего флуоресцентного репортера, позволившего выделять отдельные субпопуляции из библиотеки баркодированных капель, данная технология позволила за одну стадию провести анализ выживаемости отдельных клеток под действием различных концентраций цитостатика митомицина С.

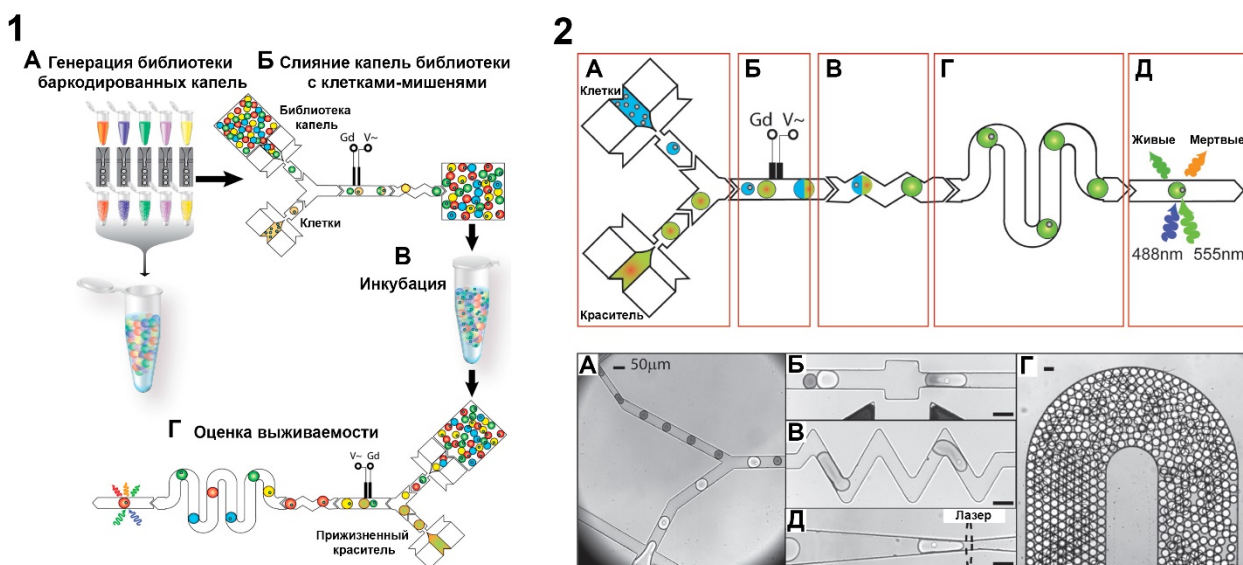


Рис. 11. Капельная микрофлюидная технология для высокопроизводительного скрининга единичных клеток (адаптировано из [94]). (1) Схема, иллюстрирующая процедуру скрининга. (А) Микрофлюидная генерация капель, содержащих анализируемые вещества, также несущих внутренний флуоресцентный репортер-баркод (имеющий разную концентрацию или флуоресцентные характеристики), позволяющий идентифицировать их в процессе анализа. (Б) Капли, несущие анализируемые вещества, сливаются с каплями живых клеток-мишеней за счет электрокоалесценции. (В) Инкубация клеток с анализируемыми веществами в каплях приводит к гибели или выживанию клеток. (Г) Доля живых и мертвых

клеток оценивается за счет реинжекции капель, их контролируемого слияния с каплями, несущими прижизненный краситель и последующего анализа флуоресценции в чипе. (2) Этапы (А) генерации и реинжекции капель, (Б) электрокоалесценции, (В) перемешивания, (Г) инкубации и (Д) анализа флуоресценции происходят параллельно для всех анализируемых веществ непосредственно в чипе.

Подобная технология была применена для оценки активации экспрессии гена-репортера у единичных клеток *Bombyx mori* [95], что позволило с высокой точностью определить EC_{50} гормона экдистена ($70 \text{ нМ} \pm 12\%$, $\alpha = 0.05$). При этом было использовано всего 6000 клеток, что более чем в 300 раз меньше, чем если были бы использованы классические методы проточной цитофлуориметрии или анализа в культуральных плашках.

По аналогии с классическими работами в области *in vitro* компартментализации [30, 40], микрофлюидные технологии были использованы для направленной эволюции [73]. Микрофлюидный чип, использующий мультиплицированные каналы для генерации обратной эмульсии вода-в-масле, генерировал монодисперсную эмульсию, в которой протекала реакция, катализируемая рибозимом. Направленная эволюция привела к получению рибозимов, устойчивых к ингибирующему действию антибиотика неомицина. Более того, некоторые из отобранных вариантов демонстрировали активацию каталитической активности в присутствии неомицина.

Использование возможностей направленной манипуляции над движением отдельно взятой капли в каналах чипа [96, 97] открыло принципиально новый взгляд на возможности микрофлюидики для ультравысокопроизводительного скрининга активности. В предыдущих работах отсутствовала стадия селекции, основанной непосредственно на анализе активности в индивидуальной капле. В то же время преимущество микрофлюидных технологий заключается в том числе и в возможности осуществлять полный цикл отбора улучшенной биокаталитической активности в чипе [8]. Использование микрофлюидной платформы для инкапсуляции индивидуальных дрожжевых клеток в каплях биосовместимой

эмульсии, их инкубации и сортировки в чипе позволило проводить скрининг активности клеток с производительностью более 2000 событий в секунду (Рис. 12).

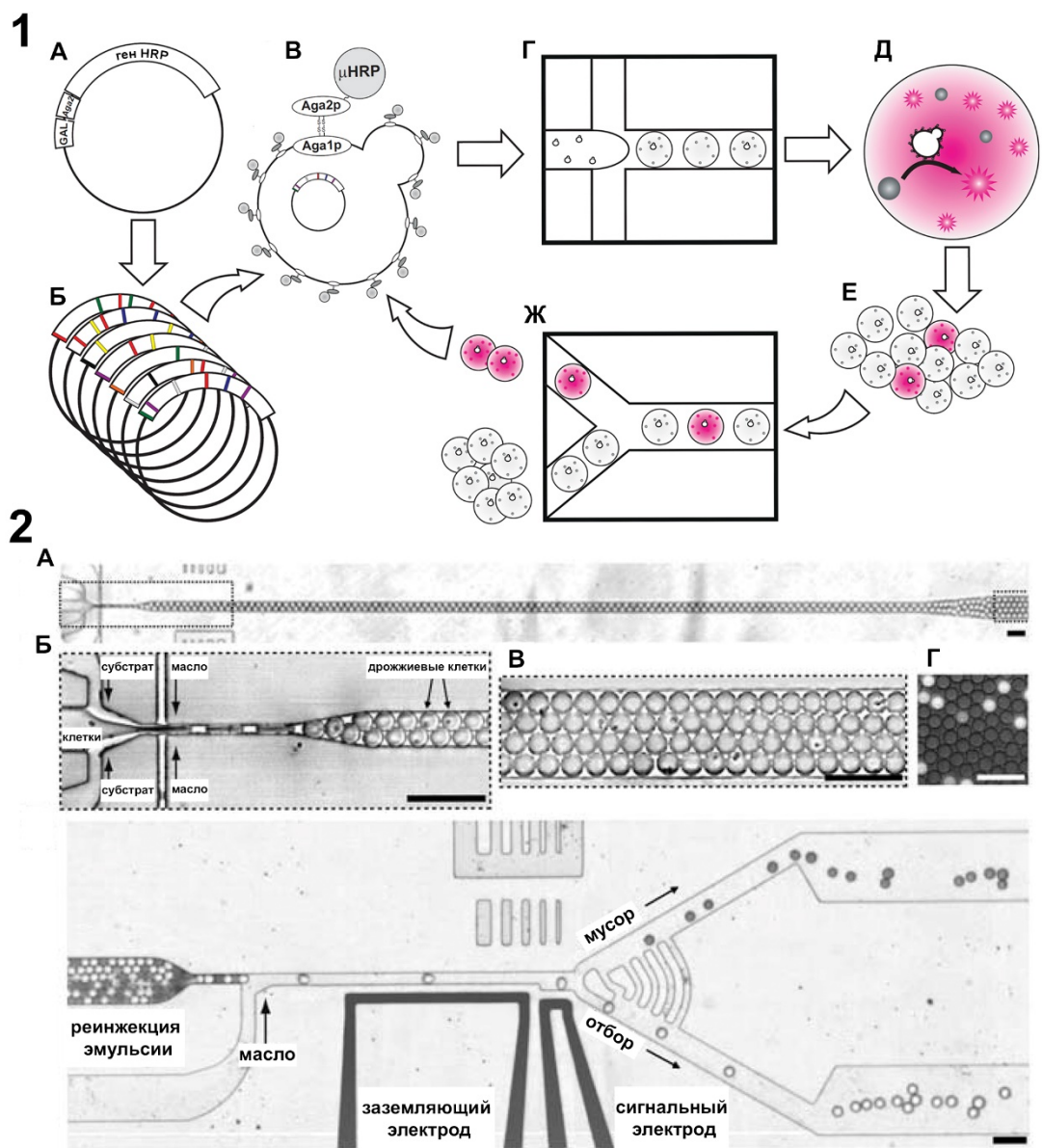


Рис. 12. Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга и направленной эволюции ферментов (адаптировано из [8]). (1) Общая схема платформы. (А) Клонирование гена *HRP* пероксидазы хрена в генетическую конструкцию, обеспечивающую индуцибельную экспрессию фермента под *GAL* промотором в виде белка слитного с фрагментом *Aga2* α-агглютинина, обеспечивающим заякоревание на клеточной стенке дрожжей [98]. (Б) Создание библиотеки мутантов пероксидазы представительностью порядка 10^7 вариантов. (В) Трансформация генетических конструкций в дрожжи и индукция экспрессии приводит к продукции мутантной пероксидазы (μ HRP), заякоренной на

поверхности дрожжевой клетки в количестве порядка 10000 копий. (Г)

Инкапсуляция индивидуальных клеток библиотеки вместе с флуорогенным субстратом в каплях биосовместимой микрофлюидной эмульсии. (Д) Активные варианты превращают нефлуоресцентный субстрат (серый) во флуоресцентный продукт (розовый) и (Е) после инкубации в каналах чипа (Ж) капли с наибольшим уровнем активности клеток, детектируемой по флуоресценции, подвергаются сортированию в чипе благодаря диэлектрофорезу, активированному флуоресценцией.

В результате направленной эволюции пероксидазы были получены новые варианты фермента, обладавшие в 10 раз большей каталитической активностью, приближавшейся к диффузионному пределу. Всего было проскринировано порядка 10^8 индивидуальных реакций за 10 часов с использованием менее 150 мкл реагентов, приводя, таким образом, к 1000 кратному увеличению производительности и 1 миллионному сокращению стоимости процедуры скрининга по сравнению со стандартными роботизированными системами (Таблица 1).

Таблица 1. Сравнение времени и затрат на проведение процедуры скрининга с использованием автоматизированных роботизированных станций и микрофлюидной платформы (адаптировано из [8]).

Характеристика	Автоматизированная роботизированная станция	Микрофлюидная платформа
Реакций всего	5×10^7	5×10^7
Объем реакции	100 мкл	6 пл
Общий объем	5 000 л	150 мкл
Реакций в день	73 000	10^8
Общее время	2 года	7 часов
Количество плашек/чипов	260 000	2
Стоимость плашек/чипов	520 000 \$	1 \$
Стоимость пластика	10 000 000 \$	0.3 \$
Амортизированная стоимость оборудования	280 000 \$	1.7 \$
Субстрат	4 750 000 \$	0.25 \$
Итого:	15 810 000 \$	2.5 \$

Использование аналогичной микрофлюидной платформы для направленной эволюции арилсульфатазы *Pseudomonas aeruginosa* привело к 6 кратному увеличению ее каталитической активности по отношению к синтетическому флуорогенному фосфонату за один раунд отбора из библиотеки представительностью порядка 10^6 вариантов [9]. В данной работе, на основании индивидуальной активности клеточных лизатов единичных бактериальных клеток в каплях, проводился отбор наиболее активных вариантов с производительностью порядка 1000 событий в секунду. Процедура скрининга основана на экспрессии рекомбинантного фермента в клетках *E. coli*, их последующего лизиса и повторной трансформации для проведения следующих раундов отбора. Таким образом, в

отличие от предыдущей, данная платформа имеет ряд ограничений, лимитирующих ее практическое применение.

Ультравысокопроизводительные микрофлюидные технологии скрининга также позволили осуществить полный цикл направленной эволюции ферментов *in vitro* [10]. Микрофлюидная инкапсуляция была использована для создания одинаковых капель для проведения эмульсионной ПЦР. Затем полученная эмульсия подвергалась реинжекции в чип, разделявший интактные капли от незначительной доли тех, что подверглись коалесценции в процессе проведения циклов нагревания/охлаждения, за счет пассивного фракционирования в сужающемся потоке жидкости [99, 100]. Полученные монодисперсные капли эмульсии, несущие амплифицированные последовательности генов, были подвергнуты попарной электрокоалесценции [101-104] с каплями, несущими реагенты для *in vitro* транскрипции и трансляции. *In vitro* транскрипция и трансляция в индивидуальных каплях приводила к образованию фермента и протеканию реакции с образованием флуоресцентного продукта. Капли с наибольшим уровнем флуоресценции подвергались направленной электрокоалесценции с собирающим потоком с производительностью порядка 2000 событий в секунду. Собирающий поток, несущий отобранные последовательности генов, в дальнейшем использовался для нового раунда отбора. Таким образом, было показано крайне эффективное обогащение с чистотой близкой к теоретическому максимуму (вероятность ложно позитивного отобранного события <0.004) с использованием технологии, максимально адаптированной для полной автоматизации.

Добавление реагентов к каплям за счет направленной электрокоалесценции капель может быть принципиально важным в том случае, когда инкапсулированные клетки не несут предварительно заякоренный белок-эффектор, а продуцируют его в среде. Использование микрофлюидной платформы позволило осуществить функциональный скрининг единичных клеток с целью поиска гибридом, продуцирующих антитела, ингибирующие активность ангиотензинпревращающего фермента [105]. Инкапсуляция индивидуальных клеток гибридом в каплях биосовместимой эмульсии вместе с ангиотензинпревращающим ферментом приводила к его инактивации исключительно в случае клеток, продуцировавших

антагонистические антитела. Последующая направленная попарная электрокоалесценция с каплями флуорогенного субстрата приводила к популяции капель, в которых наблюдалось отсутствие ангиотензинпревращающей активности, отбирившихся непосредственно в чипе. Таким образом удалось эффективно отобрать гибридомы, продуцировавшие антитела-антагонисты из смеси гибридом, а также получить гибридомы, обладавшие в 10 раз большим уровнем продукции антител и более чем в 5 раз большим уровнем ингибирования, чем с использованием классических методов гибридомного скрининга.

Микрофлюидная технология гибридомного скрининга также позволят проводить прижизненный отбор индивидуальных клеток, продуцирующих антитела [11]. В данном случае для детекции продукции антител был использован метод, основанный на локализации флуоресценции (Рис. 13). Инкапсуляция индивидуальных клеток гибридомы в каплях микрофлюидной эмульсии приводила к продукции мышинных антител в среде. Антитела, в свою очередь, связывались с антивидами антителами на поверхности микросферы (антитела козы против Fc-фрагмента IgG мыши), инкапсулированной совместно с клетками гибридомы, а также детектирующими антителами (антитела козы против F(ab')₂-фрагмента IgG мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем). Таким образом, образовавшиеся иммунные комплексы приводили к локализации флуоресценции не в объеме капли, а на поверхности микросферы, что детектировалось по возникновению узкого пика флуоресценции при движении капли в канале. Последующий отбор капель, имеющих узкий пик флуоресценции, непосредственно в чипе и регенерация клеток из капель позволяют с более чем 95% чистотой отбирать живые клетки-продуценты антител из 1:10 смеси гибридомы и лимфомы, не продуцирующей мышинные IgG, с производительностью порядка 200 событий в секунду.

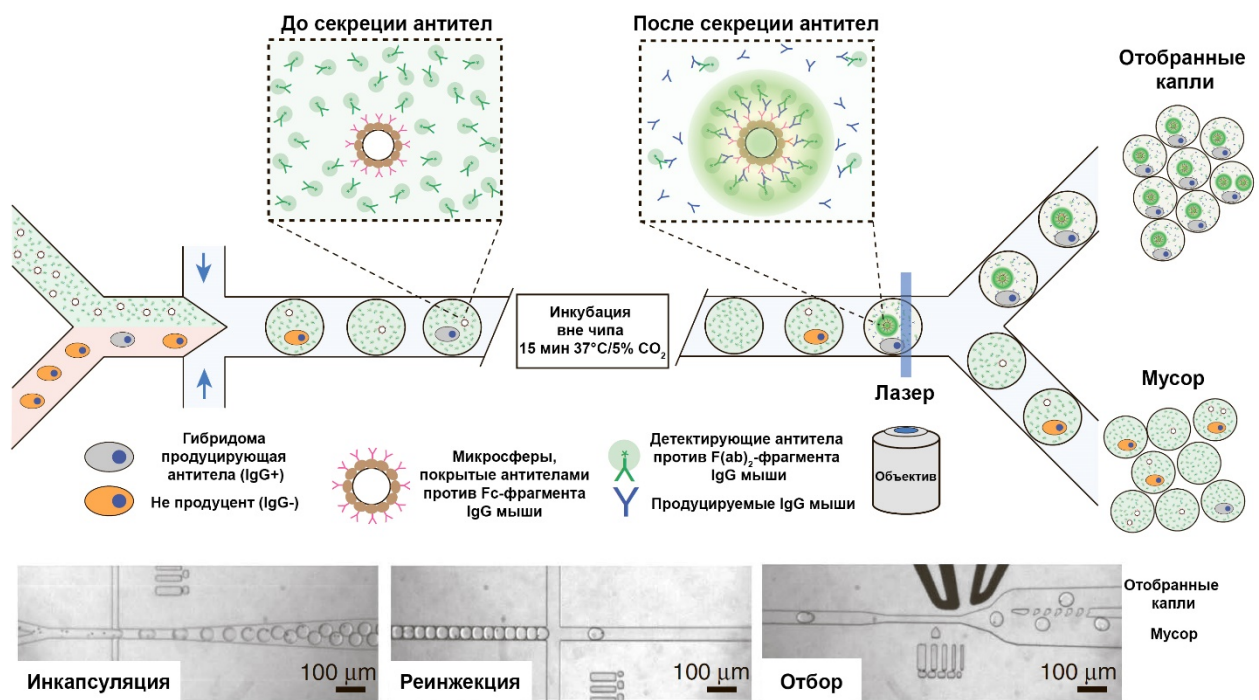


Рис. 13. Микрофлюидная платформа для высокопроизводительного скрининга гибридом, продуцирующих антитела (адаптировано из [11]).

В настоящее время капельные микрофлюидные технологии скрининга не лимитированы стадией генерации капель. Как уже было продемонстрировано ранее, мультипликация каналов чипа может быть использована для многократного увеличения производительности. Кроме того, уменьшение каналов чипа, и как следствие диаметра генерируемых капель, также приводит к многократному увеличению производительности. Генерация микрофлюидных капель объемом менее 10 фл может происходить с производительностью более 1 миллиона событий в секунду, что может быть использовано для иммуноферментной детекции единичных молекул и определения их абсолютной концентрации [106], аналогично тому, как это происходит в случае ddPCR. Диагностическая платформа, основанная на генерации капель объемом несколько фемтолитров, позволяет в течение 10 минут детектировать онкомаркер простатспецифический антиген в концентрации менее 50 фМ.

Комбинирование классических молекулярно-биологических подходов и микрофлюидных технологий позволяет проводить широкомасштабный анализ индивидуальных клеток. Иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) является широко используемым методом картирования

модификаций гистонов, факторов транскрипции и других ДНК-белковых взаимодействий. Проведение классической процедуры в изолированных каплях микрофлюидной эмульсии за счет направленной коалесценции с каплями, несущими уникальные последовательности ДНК-баркодов, и последующего их лигирования, широкомасштабного секвенирования и кластерного анализа позволяет картировать гетерохроматинизацию на уровне единичных клеток, а также выявлять субпопуляции клеток с различным спектром гетерохроматинизации [107]. Проведение ПЦР с обратной транскрипцией индивидуальных клеток пациентов больных хроническим лимфоцитарным лейкозом в каплях микрофлюидной эмульсии позволило наблюдать клональную эволюцию популяции клеток, устойчивых к действию противоопухолевого препарата ибрутиниба (ингибитора тирозинкиназы Брутона) [108]. Анализ скорости роста показал наличие клонов, устойчивых к действию препарата, еще до начала терапии ибрутинибом, а также позволил оценить их количество. Использование компартиментализации клеток в микрофлюидных каплях совместно с ДНК-баркодированными микросферами позволило провести параллельное широкомасштабное профилирование экспрессии генов на уровне индивидуальных клеток [12]. Разработанная технология получила название “молекулярное баркодирование транскриптомов клеток в каплях” (Рис. 14).

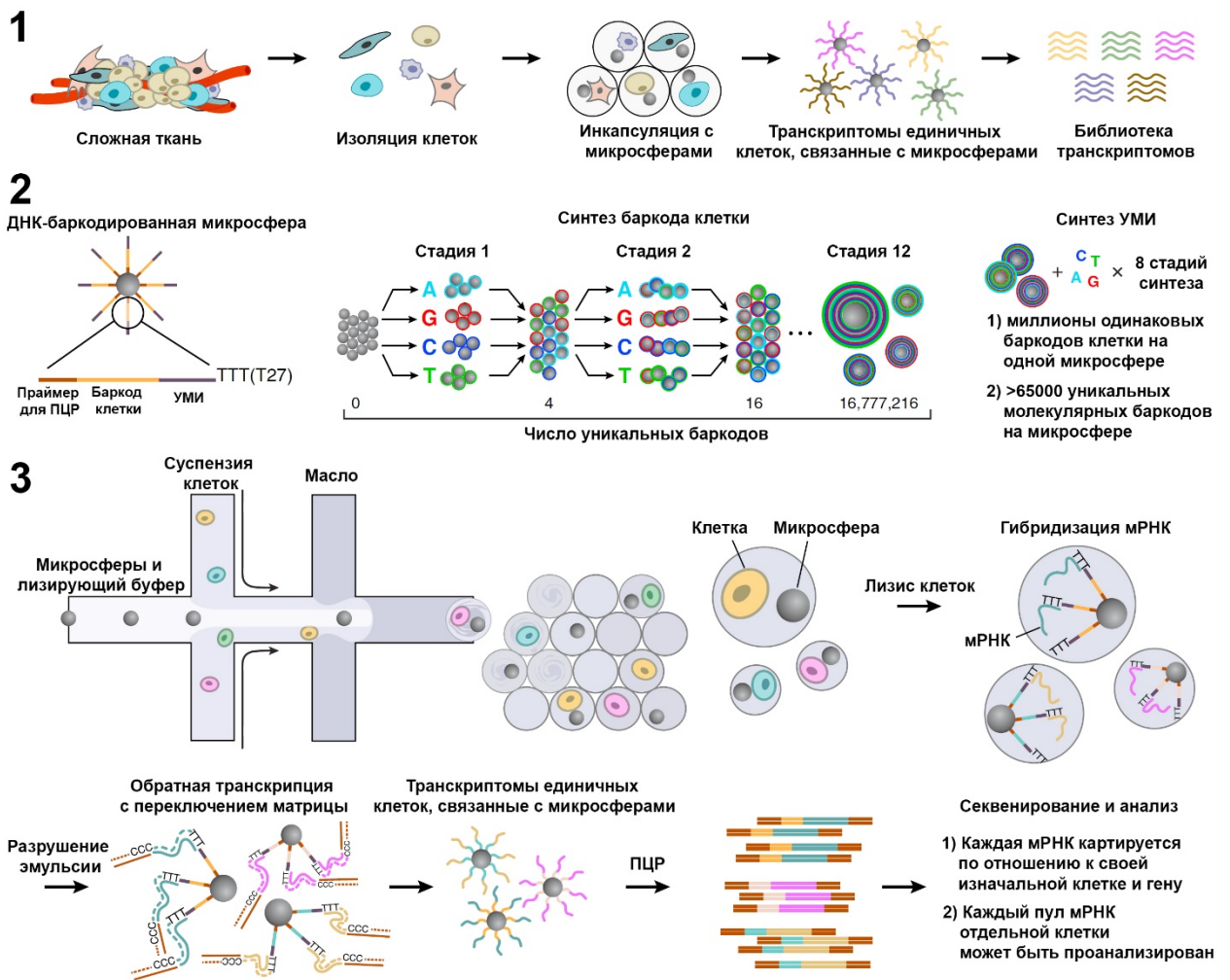


Рис. 14. Молекулярное баркодирование транскриптомов клеток в каплях (адаптировано из [12]). (1) Общая схема метода. (2) Синтез ДНК-баркодированных микросфер. (3) Компартиментализация единичных клеток с индивидуальными микросферами и лизирующим буфером в каплях микрофлюидной эмульсии приводит к лизису клеток и гибридизации мРНК индивидуальных клеток на индивидуальных микросферах. Последующие стадии разрушения эмульсии, обратной транскрипции и амплификации приводят к получению библиотеки транскриптомов индивидуальных клеток, анализируемой в дальнейшем методом широкомасштабного секвенирования и кластеризации с использованием последовательностей уникальных баркодов клетки и уникальных молекулярных идентификаторов (УМИ).

Данная технология основана на гибридизации мРНК отдельных клеток в каплях на микросферах, имеющих уникальный ДНК-баркод. ДНК-баркодированные микросферы, в свою очередь, имеют последовательность олигонуклеотидов,

состоящих из трех частей (Рис. 14, (2)): праймера для ПЦР амплификации; “баркода клетки” уникального для данной микросферы, который используется в дальнейшем для привязки данной мРНК к конкретной клетке и последовательности “уникального молекулярного идентификатора” (УМИ), позволяющего идентифицировать конкретную молекулу мРНК из общего пула мРНК индивидуальной клетки. Широкомасштабное секвенирование полученной библиотеки кДНК и кластерный анализ данных позволяют осуществить *ab initio* реконструкцию 39 популяций клеток на основании транскрипционного профилирования 44808 отдельно взятых клеток сетчатки.

Проблема скрининга уникальных субпопуляций клеток, обладающих специфической активностью, особенно актуальна в области микробиологии. Использование микрофлюидной инкапсуляции индивидуальных бактериальных клеток позволило отобрать бактерий, обладавших в 17 раз большей целлюлозогидролазной и 7 раз большей эндоглюконазной активностью [109]. В отличие от классических методов микробиологического скрининга, данный метод показал, что многие некультивируемые виды бактерий семейства *Paenibacillaceae* обладают высокой специфической активностью и отбираются с использованием микрофлюидной платформы более эффективно, чем культивируемые *Bacillaceae*, отбираемые классическими методами. Использование микрофлюидной платформы также позволяет отбирать индивидуальные клетки микроорганизмов, обладающие повышенной продукцией или потреблением внеклеточных метаболитов [110]. Данная проблема является принципиально важной для многочисленных биотехнологических приложений и позволяет отбирать клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающие повышенной способностью к поглощению ксилозы благодаря наличию множества копий гена ксилоизомеразы, изначально составляющие популяцию менее 0.1%. Также были отобраны штаммы *E. coli*, обладавшие в 5800 раз более высоким уровнем продукции молочной кислоты. Данный метод может быть универсальным при наличии соответствующей оксидазы, позволяющей флуоресцентно детектировать концентрацию метаболита в капле за счет сопряженного образования перекиси водорода, окисляющей флуорогенный субстрат. Скрининг бактерий в микрофлюидных каплях также может быть использован для поиска новых рекомбинантных ферментов из метагеномных

бактериальных библиотек [13]. Таким образом, в том числе и среди ферментов некультивируемых бактерий, могут быть найдены новые ферменты, обладающие широкой субстратной специфичностью и низкой степенью гомологии по сравнению с известными ранее.

Микрофлюидные технологии открывают новые уникальные возможности для ультравысокопроизводительного скрининга. Уменьшение объема индивидуальной реакции в капле и одновременное увеличение производительности позволяет многократно сократить издержки и в то же время отобрать необходимое свойство из функциональных библиотек представительностью более 10^7 вариантов менее чем за сутки. Добавление реагентов к каплям за счет контролируемой электрокоалесценции, возможности флуоресцентной детекции и сортировки в микрофлюидных чипах позволяют проводить широкомасштабный анализ и отбор единичных клеток, а также способствуют полной автоматизации процедуры скрининга. Использование микрофлюидных технологий доказало свою эффективность в области создания и поиска новых ферментов с заданной субстратной специфичностью, а также поиска и отбора субпопуляций живых клеток, обладающих уникальными фенотипическими свойствами, что может быть особенно важно в случае анализа эффекторных свойств многочисленных видов некультивируемых бактерий.

Несмотря на это, в настоящее время доступность микрофлюидных платформ, позволяющих осуществлять электрокоалесценцию, анализ флуоресценции и сортировку эмульсии вода/масло в чипе, ограничена. Более того, максимальная производительность сортировки в этих устройствах обычно составляет около 2000 событий в секунду и ограничена вязкостью масла. Использование двойных микрофлюидных эмульсий [111, 112] представляет собой привлекательную альтернативу, так как позволяет реализовать классические идеи скрининга в компартаментах двойной эмульсии [30, 40] на новом уровне, благодаря монодисперсности капель, позволяющей повысить чувствительность скрининга и производительность сортировки (вплоть до 70000 событий в секунду). Использование дополнительных поверхностно-активных веществ для стабилизации двойной эмульсии вода/масло/вода, а также транспорт молекул через слой масла может

представлять опасность для выживаемости клеток, что необходимо учитывать при инкапсуляции живых клеток в каплях микрофлюидной двойной эмульсии (МДЭ) [113]. Разработка методов ультравысокопроизводительного скрининга активности, основанных на генерации МДЭ и ее последующем анализе методом проточной цитофлуориметрии, а также отборе интересующих капель с использованием клеточного сортера, представляет большой интерес, так как позволяет интегрировать микрофлюидные технологии в уже существующую и широкодоступную технологическую платформу FACS для высокопроизводительного анализа и отбора.

Использование рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека в качестве антидота при отравлении фосфорорганическими токсинами

Несмотря на более чем 150-летнюю историю, фосфорорганические токсины (ФОТ), остаются одними из наиболее актуальных объектов современной токсикологии. ФОТ являются представителями нескольких классов фосфорорганических соединений, необратимо ингибирующих ацетилхолинэстеразу человека (чАцХЭ) в нервных и нервно-мышечных синапсах за счет фосфилирования Ser-200 в активном центре фермента. Ингибирование ацетилхолинэстеразы, в свою очередь, приводит к накоплению нейротрансмиттера ацетилхолина и гиперстимуляции мускариновых и никотиновых рецепторов, а также центральной нервной системы. Гиперстимуляция приводит к развитию синдрома SLUDGE(M) (*Salivation Lacrimation Urination Diaphoresis Gastrointestinal upset Emesis (Miosis)*) – Слюноотделение, Слезотечение, Мочеиспускание, Потоотделение, Расстройство кишечника, Рвота, (Миоз)). В случае тяжелых отравлений развиваются судороги, наблюдается необратимое повреждение мозга, остановка дыхания и наступает смерть [114].

Несмотря на то, что использование химического оружия было запрещено еще в 1925 году, случаи применения боевых отравляющих веществ нервнопаралитического типа неоднократно имели место во времена ирано-иракской

войны (1980-1988), войны в Персидском заливе (1990-1991), террористических атаках в Японии (1994-1995) и Сирии (2013). Несмотря на высокую угрозу применения боевых ФОТ в террористических атаках, основными жертвами ФОТ (порядка 260000 в год) в настоящее время являются индивиды, подвергшиеся отравлению фосфорорганическими пестицидами. Особенно это актуально для западной части тихоокеанского региона, где эти случаи составляет приблизительно 50% от общего числа попыток суицида [115].

Общепринятая схема терапии отравлений ФОТ [116] включает комбинированную терапию антагонистами мускаринового рецептора (обычно атропином) и реактиваторами ацетилхолинэстеразы (пралидоксимом или обидоксимом). К сожалению, данная терапия не универсальна, она не приводит к увеличению выживаемости при отравлении фосфорорганическими пестицидами [117], а также не позволяет избежать необратимого повреждения мозга.

Альтернативным подходом к терапии отравлений ФОТ является использование биологических антидотов – биомолекул, связывающих и инактивирующих ФОТ [118-121]. Бутирилхолинэстераза человека – естественный биологический антидот (суицидальный инактиватор) человека при отравлении ФОТ [122]. Благодаря уникальному сходству с чАцХЭ и большому объему полости активного центра чБуХЭ инактивирует широчайший спектр ФОТ зачастую эффективнее чАцХЭ [123]. Использование чБуХЭ в терапии отравлений ФОТ позволяет повысить выживаемость при отравлении боевыми отравляющими веществами как V-типа [124-128] (вплоть до $8 \times LD_{50}$ в случае VX), так и G-типа [128-130] (вплоть до $5.5 \times LD_{50}$ в случае зомана), а также пестицидами [128, 131, 132]. Более того, использование терапии чБуХЭ позволяет избежать долговременных побочных эффектов отравления ФОТ, в том числе и необратимого повреждения мозга [133]. ЧБуХЭ является естественным компонентом плазмы крови, где присутствует в концентрации порядка 5 мг/л. Основным источником чБуХЭ является печень, которая продуцирует чБуХЭ в плазму крови исключительно в форме тетрамера [134] (Рис. 15), обладающего исключительно высокой продолжительностью циркуляции в кровотоке (с периодом полувыведения $\tau_{1/2}=11$ дней в организме человека [135] и $\tau_{1/2} \approx 28$ часов в организме мыши [136]).

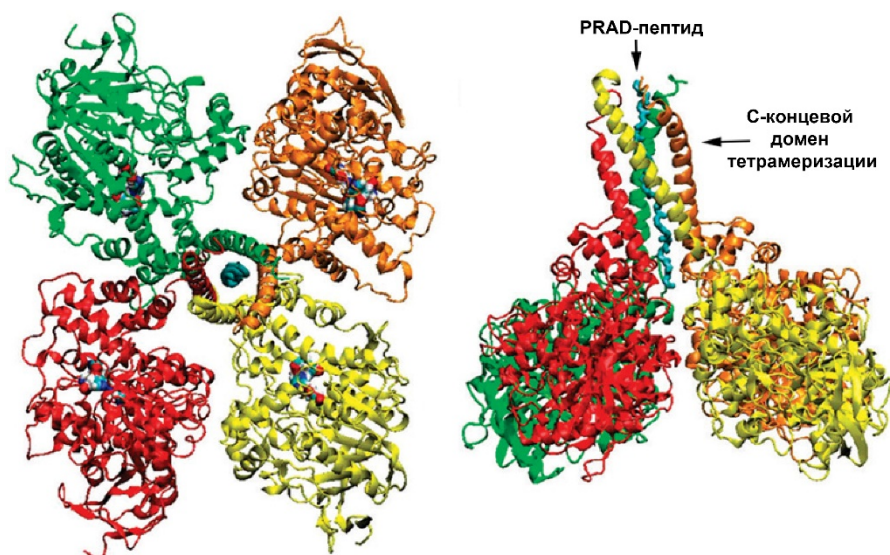


Рис. 15. Структура тетрамера чБуХЭ, полученная на основании молекулярного моделирования (адаптировано из [137, 138]). Вид сверху (слева) и сбоку (справа).

Несмотря на очевидные преимущества, применение чБуХЭ в терапии отравлений ФОТ крайне ограничено. В первую очередь это связано с высокой стоимостью препаратов чБуХЭ, которые получают в процессе многостадийной очистки из плазмы человеческой крови [139]. Использование препаратов крови человека также несет в себе высокую опасность вирусной контаминации. Альтернативным источником чБуХЭ может являться рекомбинантная чБуХЭ (рчБуХЭ), однако ввиду сложной структуры, имеющей множество дисульфидных связей, ее продукция невозможна в клетках *E. coli*. Другими источниками рчБуХЭ могли бы быть растения [128] или молоко трансгенных животных [140], однако в этих случаях рчБуХЭ продуцируется в виде смеси форм мономера и димера, обладающих, в отличие от тетрамера, экстремально быстрым выведением ($\tau_{1/2} \approx 2$ мин) из кровотока [141].

Таким образом, основные усилия в разработке эффективного терапевтического препарата были сосредоточены на повышении продукции рчБуХЭ и улучшении фармакокинетики препаратов на ее основе. Наиболее распространенным способом увеличения продолжительности циркуляции препаратов рчБуХЭ является ее химическая конъюгация с полиэтиленгликолем [128, 142, 143], позволяющая обеспечить увеличение периода полувыведения вплоть до

22 часов без возникновения иммунного ответа, что было продемонстрировано в том числе и на гомологичной модели при введении препарата обезьянам [144]. Химическая конъюгация с полиэтиленгликолем не приводит к потере активности рчБуХЭ и позволяет добиться 75% выживаемости подопытных животных после введения $2 \times LD_{50}$ зомана [128] и 100% после введения $2.5 \times LD_{50}$ VX [145] по сравнению с полной гибелью подопытных животных в контрольных группах. Продолжительность циркуляции рчБуХЭ в плазме также может быть многократно улучшена за счет ее продукции в виде белка слитного с сывороточным альбумином человека (ЧСА) [146]. Полученный слитный белок массой 150 кДа обладает бутирилхолинэстеразной активностью и средним временем удерживания (MRT) 32 часа по сравнению с 3 часами у рчБуХЭ.

Альтернативным подходом к увеличению продолжительности циркуляции рчБуХЭ в кровотоке является сборка тетрамерного комплекса рчБуХЭ (4рчБуХЭ). *In vivo* сборка 4рчБуХЭ происходит в клетках печени. Структура чБуХЭ характеризуется наличием каталитической глобулы и С-концевого домена (Рис. 15), ответственного за тетрамеризацию. Природная чБуХЭ тетрамеризуется благодаря высокоаффинному взаимодействию пролин-богатого пептида (PRAD-пептида) PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP белка ламеллиподина с четырьмя С-концевыми доменами чБуХЭ [147]. Самосборка тетрамерного комплекса 4рчБуХЭ может осуществляться при инкубации мономерной рчБуХЭ в присутствии 17-50 мерных синтетических пептидов полипролина [148]. Имитация механизмов самосборки 4рчБуХЭ за счет внутриклеточной экспрессии PRAD-пептида приводит к увеличению доли продуцируемой 4рчБуХЭ благодаря *in vivo* олигомеризации рчБуХЭ [149]. Более того, последующее химическое полисиалирование с использованием препарата окисленных полисиаловых кислот (ПСА) с молекулярной массой 27 кДа проходит с минимальным падением активности БуХЭ и приводит к получению конъюгата рчБуХЭ-ПСА27 (Рис. 16) с улучшенными фармакокинетическими свойствами (MRT смеси олигомеров ≈ 3.7 часа, MRT рчБуХЭ-ПСА27 ≈ 23 часа). Таким образом, полисиалирование является привлекательной альтернативой модификации полиэтиленгликолем ввиду того, что биоразлагаемые полисиаловые кислоты, в отличие от полиэтиленгликоля, подвергаются полной деградации в организме, что позволяет избежать ладонно-

подошвенного синдрома. Внутривенное введение препарата рЧБуХЭ-ПСА27 приводит к более чем четырёхкратному увеличению LD₅₀ у животных, подвергшихся воздействию ФОТ VR.

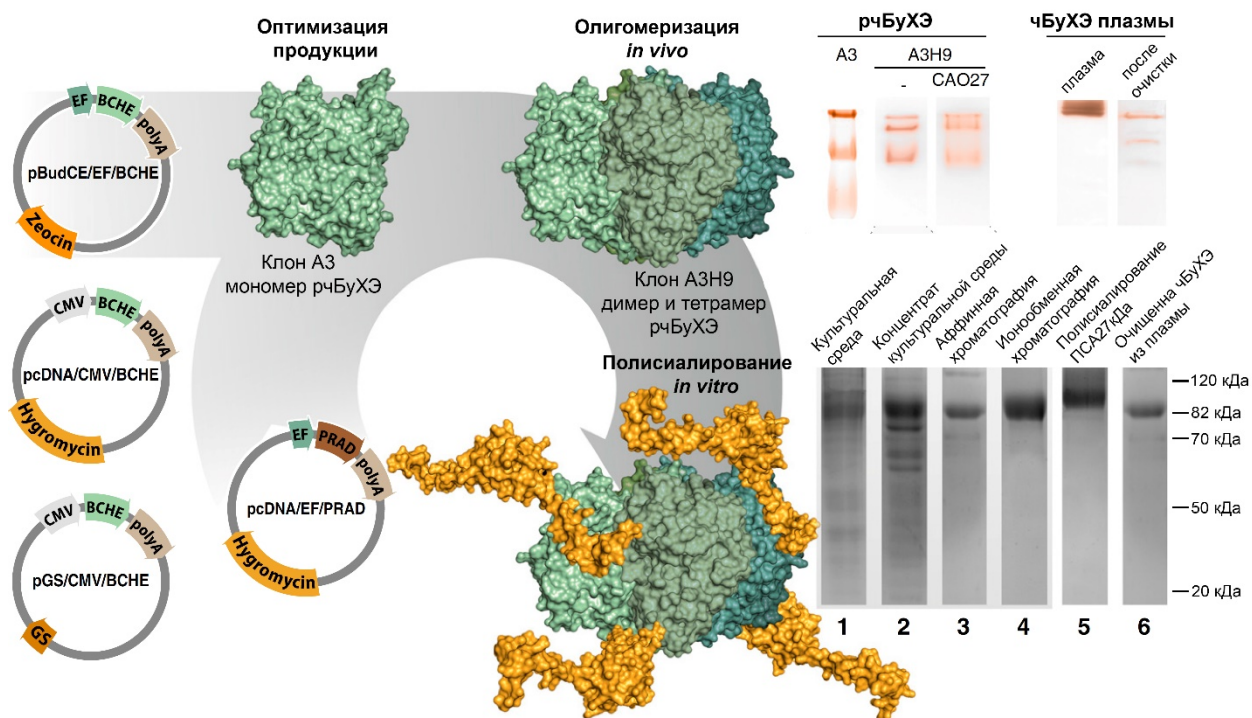


Рис. 16. Получение и очистка конъюгата рЧБуХЭ-ПСА27 (адаптировано из [149]). Выбор оптимального промотора привел к получению клона А3, продуцировавшего рЧБуХЭ с высоким уровнем в виде смеси олигомеров.

Последующая трансфекция клона А3 конструкцией, обеспечивающей конститутивную экспрессию PRAD-пептида, привела к получению клона А3Н9, продуцировавшего преимущественно димерную и тетрамерную рЧБуХЭ, которая подвергалась химическому полисиалированию с образованием конъюгата рЧБуХЭ-ПСА27.

Будучи суицидальным инактиватором, рЧБуХЭ всегда требуется вводить в стехиометрических или больших количествах по сравнению с ФОТ, что может ставить под сомнение целесообразность широкомасштабного применения препаратов рЧБуХЭ в качестве антидота при отравлении ФОТ. Решение данной проблемы заключается в переходе от необратимого связывания рЧБуХЭ с ФОТ к катализу. Для этого требуется осуществить стадию реактивации фермента. Использование новых высокоэффективных синтетических аналогов классических реактиваторов-оксимов, специфичных по отношению к чБуХЭ, представляет собой

один из вариантов решения данной проблемы [150, 151] при котором “псевдокаталитический” гидролиз ФОТ осуществляется за счет реактиватора. К сожалению, данный метод не является универсальным, так как каждый отдельно взятый ФОТ образует с чБуХЭ аддукт с уникальной структурой и реакционными свойствами. Более того, специфичность и, как следствие, эффективность реактиваторов сильно отличается и напрямую зависит от структуры аддукта чБуХЭ-ФОТ. Таким образом, оказывается весьма проблематично подобрать универсальный реактиватор, одинаково эффективный по отношению ко всем ФОТ. Кроме того, многие аддукты чБуХЭ-ФОТ подвержены “старению” – процессу деалкилирования ФОТ, приводящего к образованию стабильного аддукта чБуХЭ-ФОТ, неспособного к реактивации.

Создание мутантов рчБуХЭ, обладающих способностью к самореактивации (т.е. каталитическому гидролизу ФОТ) и неподверженных старению, представляет большой интерес [152, 153]. Тем не менее, недавний пример практического применения двойного мутанта рчБуХЭ G117H/E197Q для терапии отравлений ФОТ наглядно продемонстрировал тот факт, что если возникновение самореактивации и замедление старения понижают эффективность связывания ФОТ с рчБуХЭ, то ингибирование эндогенной АцХЭ будет происходить значительно раньше и никакой защитный эффект не будет достигнут [128]. Иными словами, создание эффективных каталитических антидотов возможно только в том случае, если они либо обладают высокоэффективным связыванием (по аналогии с рчБуХЭ дикого типа), либо обладают чрезвычайно эффективным катализом ($k_2/K_M \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$), что было продемонстрировано на примере эволюционированных параоксоназы и фосфотриэстеразы [154, 155], обладавших протективным действием по отношению к $2 \times LD_{50}$ циклозарина (GF) и VX при введении фермента в дозе всего лишь 0.2 мг/кг и 2 мг/кг соответственно. В то же время эти ферменты обладают высокой иммуногенностью и крайне быстрым выведением из плазмы крови, что требует проведения их дополнительной модификации или использования липосом в качестве инкапсулирующего агента.

Таким образом, следует отметить, что препараты чБуХЭ из плазмы крови представляют большой интерес для профилактики отравлений ФОТ ввиду низкой

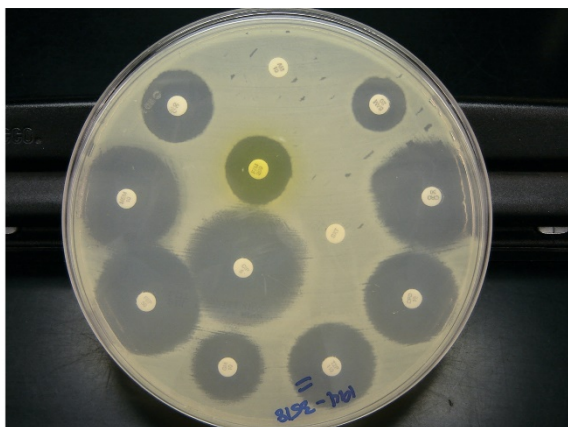
иммуногенности и высокого периода полувыведения, однако их высокая стоимость, высокая терапевтическая доза, а также и потенциальная возможность контаминации вирусами серьезно ограничивают их практическое применение. Экспрессия рчБуХЭ приводит к смеси олигомеров с низким периодом полувыведения, что требует их последующей модификации. В то же время *in vivo* олигомеризация может быть универсальным подходом к увеличению продолжительности циркуляции рчБуХЭ в плазме крови за счёт продукции в ее естественной тетрамерной форме. Полисиалирование также продемонстрировало свою эффективность в увеличении продолжительности циркуляции рчБуХЭ и представляет большой интерес в качестве биodeградируемого аналога пегелирования, однако требует более глубокого понимания механизмов влияния полисиалирования на продолжительность циркуляции, а также анализа фармакокинетических характеристик тетрамерной рчБуХЭ и конъюгатов рчБуХЭ-ПСА. Увеличение продолжительности циркуляции рчБуХЭ также представляет высокую значимость ввиду создания мутантов чБуХЭ, способных к высокоэффективному гидролизу кокаина [3, 156, 157]. Внутривенное введение мутантной БуХЭ позволяет не только защитить от летальных доз кокаина, но и отменить наркотическую зависимость [158]. В то же время наибольший интерес представляет направленная эволюция рчБуХЭ с целью создания мутантов, обладающих возможностью к реактивации (т.е. каталитическому гидролизу ФОТ), сохраняющих при этом высокую аффинность по отношению к ФОТ или обладающих высокоэффективным катализом. Создание мутантов чБуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ, также может представлять интерес с целью создания трансгенных животных, обладающих повышенной выживаемостью при отравлении ФОТ [159, 160].

Скрининг антибиотической активности

Одним из величайших достижений 20 века являлось открытие антибиотиков, позволившее многократно увеличить выживаемость, продолжительность и качество жизни многих миллионов людей. Период с 1940 по 1960-е годы стал “Золотой эрой открытия антибиотиков” – интервалом времени, когда были открыты большинство современных антибиотиков и их производных [161]. Столь фантастические

результаты были достигнуты благодаря успешному сочетанию простой, дешевой и в то же время эффективной платформы для скрининга и удачном выборе объекта для поиска. Данная платформа, получившая в последствие название “платформа Ваксмана” [162], заключалась в использовании чашек с агаром, на которые высевали бактерии из почвы. Идентификацию бактерий-продуцентов антибиотиков проводили, заливая эти чашки вторым слоем агара, несущим бактерии-мишени, и идентифицируя образовавшиеся зоны просветления (Рис. 17), выявляя клоны-кандидаты [163]. Последующий отбор клонов, продуцирующих в среду антибиотики проводился методом последовательных разведений их ростовой среды и определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Дальнейший поиск новых антибиотиков с использованием платформы Ваксмана был осложнен повторным открытием одних и тех же антибиотиков ввиду того, что данная платформа приводит к отбору только хорошо культивируемых и быстрорастущих бактерий почвы (в большинстве своем принадлежащих роду *Streptomyces*), конститутивно продуцирующих антибиотики в больших количествах. В то же время она открывала легкий доступ к дешевым и высокоэффективным лекарственным препаратам природного и полусинтетического происхождения.

1



2

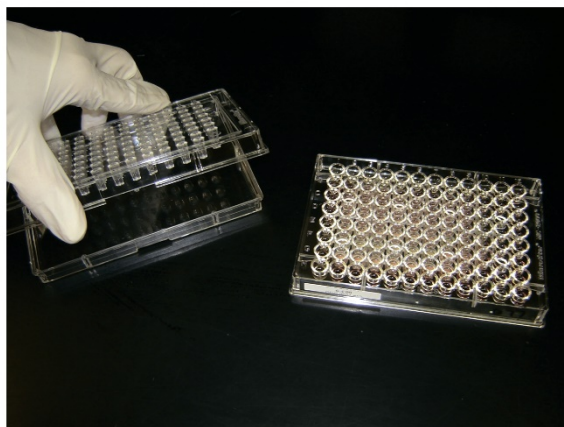


Рис. 17. Классические методы скрининга антибиотической активности: (1) поиск колоний бактерий, дающих большие зоны просветления и (2) последующее определение МИК (адаптировано из [164]).

Естественная роль антибиотиков в природе заключается в поддержании биологического разнообразия микроорганизмов за счет противостояния бактерий,

продуцирующих и деградирующих антибиотики [165] с использованием разнообразных механизмов [166-168], широко распространённых в различных экологических нишах [168-171] и зародившихся задолго до возникновения человеческих цивилизаций [172]. В свою очередь неконтролируемое использование больших количеств антибиотиков человеком создало беспрецедентные условия для селекции и мобилизации генов резистентности среди популяций бактерий, а также и их последующего захвата клетками патогенов. Эволюция резистентности проходила за счет трех основных механизмов [173]: первичного захвата генов устойчивости, в первую очередь благодаря мобилизации и горизонтальному переносу генов из окружающей среды; возникновения компенсаторных мутаций, нивелирующих негативное влияние захвата генов устойчивости [174] и активации внутренних механизмов устойчивости, таких как активный транспорт [175, 176]. Все это приводит к возникновению штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [177], особенно характерной для так называемых ESKAPE патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter spp.*), представляющих реальную угрозу жизни и здоровью людей [177].

Комбинаторная химия и высокопроизводительный скрининг библиотек химических соединений зарекомендовали себя как высокоэффективные методы создания лекарственных препаратов, нацеленных на регуляцию различных процессов в человеческих клетках, однако множественные попытки использования высокопроизводительного комбинаторного скрининга с целью создания новых антибиотиков широкого спектра действия потерпели неудачу, несмотря на значительные вложения финансов, ресурсов и использования всех доступных технологий [178-180]. Неудача, связанная со скринингом химических библиотек, ассоциируют с трудностями, связанными с проникновением ксенобиотиков в бактериальные клетки (особенно грамотрицательные), тем что антибиотики не подчиняются классическому “правилу пяти” Липински [181] (физико-химические свойства комбинаторных химических библиотек, подобранные для большинства препаратов не оптимальны для антибиотиков [182]), а также ограниченным химическим разнообразием существующих библиотек [183]. В то же время использование химических библиотек позволяет идентифицировать различные

адьюванты, значительно усиливающие антимикробные свойства известных антибиотиков [184-186], антиметаболиты [187], антивирулентные препараты [188], а также может приводить к созданию препаратов узкого спектра, направленных на конкретную мишень, что было продемонстрировано на примере бедаквилина, селективного ингибитора F₁F₀-АТФазы *M. tuberculosis* [189].

Скрининг природных веществ в настоящее время приводит к значительно большей вероятности обнаружения антибиотической активности [190], что, по-видимому, связано с тем, что природные вещества имеют более широкий спектр стереоселективных фармакофоров, уже отобранных на различную биологическую активность в процессе эволюции [183]. Метаболомика лежит в основе современных подходов скрининга природных антибиотиков [186] и является совокупностью тандемных методов разделения-анализа, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия или спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-ЯМР), и методов широкомасштабного секвенирования [191]. Метаболомика позволяет осуществить переход к функциональной геномике [192], а также идентифицировать новые рибосомальные и нерибосомальные пептиды [193, 194] и вторичные метаболиты [195].

Природные источники для поиска антибиотиков весьма разнообразны и включают в себя экстракты растений, грибов, лишайников, эндофитов, морских растений, водорослей, кораллов и микроорганизмов [196]. Тем не менее, следует отметить, что многие действующие вещества из перечисленных источников действуют по неспецифическому механизму дестабилизации мембраны, что в свою очередь затрудняет их применение ввиду высокой токсичности, вызванной низким терапевтическим индексом. Бактерии, таким образом, благодаря своему разнообразию и эволюционной предрасположенности к продукции антибиотиков для завоевания экологических ниш в процессе конкуренции друг с другом, продолжают оставаться одним из наиболее привлекательных источников антибиотической активности. Проблема “повторного открытия” антибиотиков может решаться с использованием разнообразных подходов.

Ингибирование роста коллекции различных микроорганизмов может использоваться как своеобразный индивидуальный отпечаток исследуемого

вещества или экстракта, что было продемонстрировано с использованием платформы BioMAP, позволяющей идентифицировать присутствие известных антибиотиков, а также находить новые по индивидуальному профилю ингибирования [197]. Использование коллекций штаммов бактерий одного вида также может быть использовано для обнаружения мишени действующего вещества или, наоборот, поиска веществ, обладающих специфическим механизмом действия. Коллекция 245 штаммов *S.aureus* с подавленной экспрессией генов позволила идентифицировать антибиотик платенсимицин, принадлежащий к новому классу ингибиторов фермента синтеза жирных кислот FabF/B [198].

Новый взгляд на использование бактерий из земли в качестве источника новых антибиотиков открывают некоторые новые подходы к скринингу антибиотической активности. Полногеномное секвенирование актиномицетов показало, что их потенциал производить вторичные метаболиты значительно более высок, чем это наблюдается при культивировании. Секвенирование *Streptomyces coelicolor* показало принципиальную возможность продукции более 20 вторичных метаболитов, в то время как идентифицированы при культивации *in vitro* были только три [199]. Таким образом, активация молчащих генов бактерий-продуцентов открывает новые источники ранее неизвестных антибиотиков [200], а биоинформатический анализ и методы, основанные на кластеризации генов, позволяют предсказывать антибиотики *de novo* [201]. Одним из подходов к активации молчащих генов и продукции новых антибиотиков является подбор среды для культивации клонов-продуцентов, предварительно отобранных на основании секвенирования, благодаря наличию новых генов. [202]. Использование факторов чувства кворума является другим подходом к активации молчащих генов [203], однако их эффект трудно предсказуем и, по-видимому, они не всегда являются оптимальным механизмом активации молчащих генов. В то же время одной из наиболее очевидных стратегий активации молчащих генов является их рекомбинантная экспрессия [204, 205]. Использование новых подходов к культивации “некультивируемых” бактерий почвы (Рис. 18) привело к открытию нового антибиотика теиксобактина, активного по отношению к резистентным штаммам грамположительных бактерий без развития устойчивости [206], а также к

открытие нового рода *Entotheonella*, обладающего уникальным репертуаром вторичных метаболитов и путей их синтеза [207].

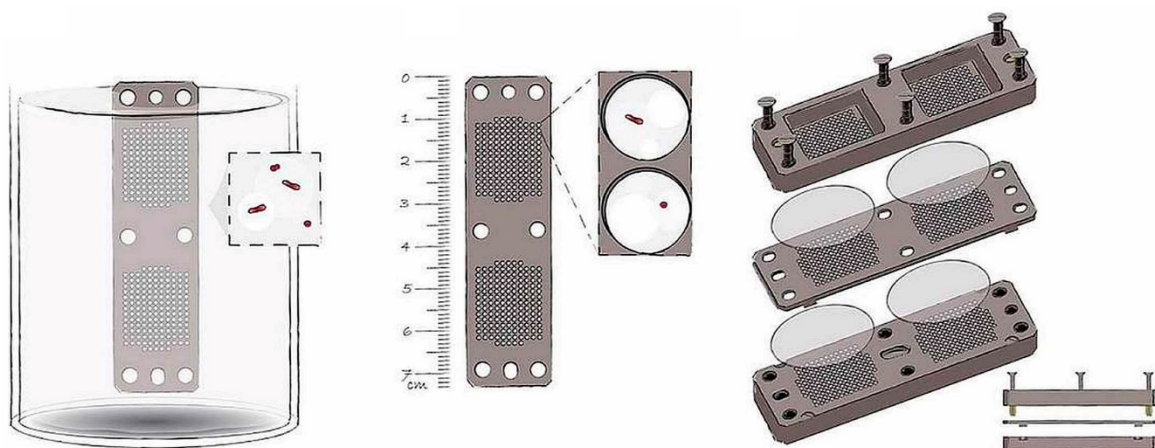


Рис. 18. Устройство для культивации “некультивируемых” бактерий почвы (адаптировано из [206]). Устройство состоит из двух частей, разделенных полупроницаемой мембраной. С одной стороны находятся индивидуальные клетки бактерий почвы в питательной среде, с другой – почва, несущая необходимые факторы роста.

Скрининг бактерий, обладающих устойчивостью к антибиотикам, может быть использован для выявления новых механизмов синергического взаимодействия, открывающих возможности для поиска адьювантов антибиотиков, усиливающих их действие [186]. Использование резистентных штаммов позволило открыть новый класс антибиотиков – ацилдепсипептидов, активирующих внутриклеточную бактериальную протеазу ClpP [208], приводящую в свою очередь к гибели бактерий, в том числе и персистирующих, и излечению от хронической инфекции [209]. Использование стадии предварительного отбора бактерий из почвы на устойчивость к росту на гликопептидных антибиотиках позволило более чем в 1000 раз повысить вероятность обнаружения клонов-продуцентов новых антибиотиков этого класса, что привело к обнаружению нового антибиотика пекискомицина, обладающего уникальной структурой [210].

Использование бифункциональных агентов, работающих по принципу троянского коня, продемонстрировало свою высокую эффективность. Конъюгат аналога антибиотика рифампицина, соединенного биodeградируемым линкером с антителом против тейхоевых кислот поверхностной стенки *S.aureus*, показал свою

эффективность в элиминации не только суспензионных клеток, но и внутриклеточного резервуара бактерий, устойчивого к действию ванкомицина [211]. Правильный выбор антитела, линкера и антибиотика имел принципиальное значение для достижения полученных результатов. Подход рационального дизайна высокоспецифичных антибиотиков также продемонстрировал свою эффективность в случае конъюгатов сидерофор-антибиотик [212].

Скрининг антимикробной активности против *M. tuberculosis* может быть также проведен с использованием зараженных клеток макрофагов [213], что позволяет максимально приблизить модель *in vitro* к патофизиологии *in vivo*, а также исключить вещества, обладающие неспецифической цитотоксичностью и низким проникновением в макрофаги. Использование моделей заражения нематоды *C. elegans* [214] и рыбок *Danio rerio* [215] *in vivo* позволяет отобрать соединения, приводящие к элиминации бактерий, в том числе и по механизмам, отличным от классической антибиотической активности.

Высокая чувствительность аналитического сигнала является принципиальной характеристикой, необходимой для увеличения производительности скрининга. Использование бактерий, продуцирующих рекомбинантные флуоресцентные белки-репортеры, в качестве биосенсора наличия антибиотической активности, позволяет напрямую детектировать ингибирование роста бактерий [216], идентифицировать антибиотики, действующие по заданному механизму ингибирования трансляции [217], а также скринировать комбинации антибиотиков с использованием нескольких флуоресцентных репортеров с различным спектром возбуждения/эмиссии [218].

Поиск новых антибиотиков является весьма актуальной задачей ввиду быстрого возникновения антибиотикорезистентности. Скрининг химических библиотек имеет крайне низкую вероятность успеха и эффективен в основном для поиска адъювантов антибиотиков и высокоспецифичных препаратов. Использование классической платформы Ваксмана для скрининга антибиотической активности микроорганизмов зарекомендовало свою эффективность в прошлом, однако ее последующее применение приводило к чрезвычайно высокой вероятности повторного открытия известных антибиотиков, в то время как открытие нового

класса антибиотиков оценивается возможным в результате скрининга 10^7 различных микроорганизмов [219]. Решение этой проблемы возможно за счет использования альтернативных платформ, основанных на использовании метаболомики, широкомасштабного секвенирования, биоинформатического анализа, рекомбинантной экспрессии генов, а также альтернативных подходов к культивации некультивируемых микроорганизмов. Свидетельства того, что физиологически значимые антибиотики могут быть найдены непосредственно среди представителей микробиоты человека [220], открывают новые источники для поиска антимикробной активности. Особый интерес представляет внедрение микрофлюидных платформ, использованных для скрининга резистентных бактерий [221], а также бактериолитической активности [222], демонстрирующих альтернативный подход, открывающий уникальные возможности для анализа активности широких репертуаров индивидуальных клеток с высокой производительностью.

Материалы и методы

Химические реактивы и сопутствующие материалы

В работе использовались следующие реактивы и материалы;

Реактивы: трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); одно- и двузамещенный фосфат натрия, одно- и двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, бромистый этидий, β-меркаптоэтанол, глицин (Sigma, США); акриламид, N',N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (ДСН), мочевины; агар, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (BD, США); изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид ИПТГ (Thermo Fisher Scientific, США); металлохелатный сорбент Ni-NTA (Qiagen, Германия), MonoQ, Superdex200; источник дрожжевых азотистых оснований (YNB) и YNB без (NH₄)₂SO₄ (BD, США); метанол, биотин (Sigma, США), глюкоза, глицерин, сорбит (Sigma, США); ацетат лития (Sigma, США), натрия (Amresham, США), дитиотреитол (Sigma, США); имидазол (Sigma, США); N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (Amresco, США); аминокислоты: глутаминовая кислота, метионин, лизин, лейцин, гистидин (Sigma, США); минеральное масло (Sigma, США); набор силиконовых эластомеров Sylgard® 184 (Dow Corning, США).

Ферменты: термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза HS-Taq (Евроген, Россия) и Encyclo (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Thermo Fisher Scientific, США); Rapid DNA Ligation kit (Thermo Fisher Scientific, США); РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США); эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Thermo Fisher Scientific, США); дезоксирибонуклеаза I (Фармстандарт, Россия); энтеропептидаза, легкая цепь, была любезно предоставлена с.н.с. Гаспарян М.Э. (ИБХ, Россия).

Субстраты: бутирилтиохолина йодид – BTC (Sigma, США); дитио-5,5-бис(2-нитробензойная кислота) – DTNB (Sigma, США); Gly-(Asp)₄-Lys-нафтиламид (Sigma, США); FRET-олигонуклеотид FAM-AAAAAАССССССАТАТАGCGCGTTTTTTT-RTQ1 (Синтол, Россия); SensoLyte Rh110 субстрат энтерокиназы (AnaSpec, США); 3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-

илкарбамоил)акриловой кислоты метиловый эфир (Millipore, США), Calcein Violet AM (Life technologies, США).

Маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Pierce™ Prestained Protein Marker 20-120 кДа (Thermo Fisher Scientific, США); PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 кДа (Thermo Fisher Scientific, США).

Поверхностно-активные вещества и модификаторы: Abil EM 180 (Evonik, Германия); Pico-Surf 2, 2% в HFE-7500 (Dolomite, Великобритания), Pluronic F-127 (Sigma, США); поливиниловый спирт Mowiol 23-88 (Kuraray Specialities Europe, Германия), трихлор(октадецил)силан (Sigma, США), Aquapel (PPG Industries, США).

Фосфорорганические соединения: параоксон – POX (Sigma, США); параоксон-резорурфин – POX-R (Annova Chem, США), аналог зомана – GDc был любезно предоставлен проф. Массоном П. (КФУ, Россия).

Антитела: конъюгат моноклональных антител мыши к НА-эпитопу с флуоресцентным красителем Alexa 488, 26183-A488 (Thermo Fisher Scientific, США).

Активированные эфиры флуорофоров: N-гидроксисукцинимидный эфир сульфо-цианина7 – sCy7-NHS (Lumiprobe, Россия); N-гидроксисукцинимидный эфир сульфо-цианина5 – sCy5-NHS (Lumiprobe, Россия).

Плазмидные вектора: pUC19 (Invitrogen, США); pBluescript II KS(- (Invitrogen, США); pFUSE-mIgG2B-Fc2 (Invivogen, США); pFUSE-hIgG1-Fc (Invivogen, США); pRc/CMV (Invitrogen, США); pGS/CMV/BChE был любезно предоставлен проф. Массоном П. (КФУ, Россия), pPicZαA (Invitrogen, США); pPIC9k (Invitrogen, США); pKatushka2S-B (Евроген, Россия); pBudCE/EF/BChE [149], pHENm/L-HEP/C122S [223] (ранее получены в лаборатории биокатализа ИБХ), pE-rhDNaseI был любезно предоставлен компанией Фармсинтез.

Бактериальные штаммы: *E. coli* DH5α Δ(*argF-lac*)169, φ80*dlacZ*58(M15), Δ*phoA*8, *glnX*44(AS), λ, *deoR*481, *rfbC*1, *gyrA*96(NalR), *recA*1, *endA*1, *thiE*1, *hsdR*17 (Gibco, Великобритания); *E. coli* JW5503 Δ(*araD-araB*)567, Δ*lacZ*4787(::*rrnB*-3), λ, Δ*tolC*732::*kan*, *rph*-1, Δ(*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514 был любезно предоставлен проф. Сергиевым П.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия); *Streptomyces venezuelae Ehrlich* Ac-505 (Российская коллекция микроорганизмов, Россия); *Staphylococcus aureus*, конститутивно продуцирующий зеленый флуоресцентный белок за счет

экспрессии гена GFPuv под SAR1 промотором, был любезно предоставлен проф. Ильиной Е.Н. (ФНКЦ ФХМ, Россия)

Дрожжевые штаммы: *Pichia Pastoris* GS115 (Invitrogen, США).

Клеточные линии: CHO-K1 (ATCC, США); HEK-293 (ATCC, США); FreeStyle™ 293-F (Thermo Fisher Scientific, США).

Животные: мыши линий BALB/c (ФИБХ РАН, Россия); мыши, нокаутированные по гену БуХЭ (КО), были любезно предоставлены проф. Креси Э. (CNRS, Франция) и были генотипированы непосредственно перед каждым экспериментом; мыши линии SCID (ИХБФМ СО РАН, Россия).

Растворы

Все растворы готовились на воде особой чистоты из установки Milli-Q (Millipore, США). Все растворы для микрофлюидной компартиментализации (за исключением суспензии клеток) подвергались фильтрации с использованием фильтров с диаметром пор 0.22 мкм.

PBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na₂HPO₄, 0.2 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

TBE десятикратный: 0.89 М трис-основание, 0.89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8.0.

TE: 10 мМ Трис-HCl, 1мМ ЭДТА, pH 8.0.

Соленый спирт: 70% EtOH, 30% 0.14М NaCl.

Бактериальные среды

LB: 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2хYT: 16 г/л пептона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl (5 г/л NaCl для плазмид с устойчивостью к зеоцину).

2хYT-агар: 2хYT, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

YTP: 8 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 2.5 г/л NaCl, 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.2.

YTP-агар: YTP, 18 г/л агара.

Дрожжевые среды

YPD: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л глюкозы.

YPD-агар: YPD, 18 г/л агара.

VMGY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 мМ калий-фосфата pH 6, 13.4 г/л YNB, 0,4 мг/л биотина, 10 г/л глицерина, (в случае БУХЭ был использован калий-фосфат pH 7.4).

VMMY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 мМ калий-фосфата pH 6, 13.4 г/л YNB, 0.4 мг/л биотина, 0.5% метанола, (в случае БУХЭ был использован калий-фосфат pH 7.4).

VMMY-агар: VMMY, 20 г/л агара.

SAK-агар: YPD-агар, 1 М сорбит, 100 мкг/мл ампициллина, 100 мкг/мл канамицина.

Антибиотики

Раствор натриевой соли ампициллина (Синтез, Россия) в воде с концентрацией 100 мг/мл (1000X), водный раствор сульфата канамицина (Sigma, США) 100 мг/мл (1000X), спиртовой раствор хлорамфеникола (Sigma, США) 50 мг/мл, водный раствор генетицина (Thermo Fisher Scientific, США) 100 мг/мл и водный раствор зеоцина (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 100 мг/мл.

Методы работы с нуклеиновыми кислотами

Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе T100 (BioRad, США). Готовили инкубационную смесь следующего состава:

однократный буфер для Taq-полимеразы (Евроген, Россия);

по 10 пмоль каждого праймера (Евроген, Россия);

по 0.2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (Thermo Fisher Scientific, США);

1-2 ед. Taq-полимеразы (Евроген, Россия),

0.1-0.2 мкг ДНК.

Аmplификацию проводили в объеме одной реакции 20-50 мкл по следующей схеме:

А

предварительная денатурация 94°C, 1 мин.

1 цикл.

Б

денатурация 94°C, 15 сек.

отжиг праймеров X°C, 30 сек.

элонгация 72°C, Y сек (рассчитывалась исходя из длины ампликона с учетом скорости элонгации ≈1000 пар/мин).

25-30 циклов.

В

элонгация 72°C, 5 мин.

1 цикл

Расчет температуры отжига праймера (X) производили по формуле:

$$X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C})$$

где n - число соответствующих нуклеотидов. Для праймеров длиной более 24 нуклеотидов использовали температуру отжига 68°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально.

Рестрикция

Рестрикцию ПЦР-продуктов вели 14-16 часов, плазмидной ДНК – 1-2 часа, в водном термостате при 37°C/30°C. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли РНКазу А до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Лигирование

Для лигирования использовали Rapid DNA Ligation kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:3, в течение 1 часа температуре 22°C. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадила), обрабатывали равным объемом смеси 1:1 фенол-хлороформа, и переосаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут 16000 g при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

Выделение плазмидной ДНК

Отдельной бактериальной колонией инокулировали 5 мл LB или 2xYT с добавлением селективирующего антибиотика и растили при 37°C, перемешивании 220-250 об/мин, в течение 18-22 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 2 минут при 3000 g, после чего ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (50 mM глюкоза, 25 mM Трис-HCl pH 8.0; 10 mM ЭДТА) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0.2 M NaOH, 1% ДСН, перемешивали переворачиванием и инкубировали 5 минут на льду. Затем быстро нейтрализовали 300 мкл ледяного 7.5 M NH₄OAc, перемешивали переворачиванием и инкубировали 10 минут на льду до образования белого осадка, который осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку с 0.6 объема (540 мкл) изопропанола, перемешивали переворачиванием до образования белого осадка, центрифугировали в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 100 мкл ледяного 2 M NH₄OAc и инкубировали в течение 5 минут на льду, после чего центрифугировали 3 минуты при 16000 g и 0°C. Супернатант переносили в пробирку с 100 мкл изопропанола и инкубировали 10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Осадок дважды промывали 900 мкл соленого спирта, подсушивали и растворяли в 20 мкл TE.

Также для выделения и дополнительной очистки плазмидной ДНК, использованной для проведения трансформации дрожжей и трансфекции, были использованы наборы для выделения и очистки методом колоночной хроматографии (Евроген, Россия).

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 0.8-1.5% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 5:1 с буфером нанесения, содержащим 10 mM Трис-HCl pH 7.6, 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 mM ЭДТА. Электрофорез проводили в буфере TBE при напряжении

120 В. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе (LKB, Германия).

Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель, (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1), приготовленный на однократном TBE. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1 мм. Процесс осуществляли на приборе EC-200 (EC Apparatus, США). В течение 30 минут проводили предварительный электрофорез при 90 В, после чего пробы смешивали в соотношении 5:1 с буфером нанесения, содержащим 10 мМ Трис-НСl рН 7.6, 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 мМ ЭДТА и наносили на гель. Электрофорез проводили при 90-120 В. По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Электроэлюция

После завершения электрофореза, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, после чего вырезали нужный фрагмент геля, помещали его в диализный мешок с 50-80 мкл однократного TBE и проводили электрофорез при 100 В в течение 30 минут. К элюату ДНК добавляли раствор NaCl до 0.14 М, обрабатывали смесью фенол-хлороформ 1:1, перемешивали, центрифугировали 5 минут при 16000 g и комнатной температуре. Водную фазу осаждали 3 объемами этанола, центрифугировали 10 мин при 16000 g и комнатной температуре, осадок промывали соленым спиртом, высушивали и растворяли в 20 мкл TE.

Секвенирование плазмидной ДНК

Для секвенирования плазмиды добавляли 1 мкл РНКазы А и инкубировали 15 минут при 37°C. После чего добавляли 25 мкл 2 М NH₄ОAc и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 16000 g и 0°C. Осадок дважды промывали 900 мкл соленого спирта, подсушивали и растворяли в 20 мкл TE. Секвенирование плазмидной ДНК проводили при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM в межинститутском ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

Создание генетических конструкций для продукции 4pчБуХЭ

Создание вектора GII

Вектор pFUSE-mIgG2B-Fc2 был использован для создания векторов GII (pFUSE PRAD-F2A-BChE) и GIII (pFUSE MAR PRAD-F2A-BChE). Последовательность F2A-пептида была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров (Приложение 1) и клонирована в вектор pBluescript II KS(-) по сайтам рестрикции *SpeI* и *ApaI*, что привело к получению вектора pBS F2A. Ген БуХЭ вместе со своей природной сигнальной последовательностью был амплифицирован при помощи ПЦР с использованием в качестве матрицы вектора pGS/CMV/BChE, обработан эндонуклеазами рестрикции *ApaI* и *KpnI* и клонирован в вектор pBS F2A по соответствующим сайтам, что привело к получению вектора pBS F2A-BChE. Последовательность пролин-богатого пептида белка ламеллиподина QPSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLPSQSAPSAGSAAP (PRAD) [147] была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров (Приложение 1) и клонирована в вектор pBS F2A-BChE по сайтам рестрикции *SacI* и *SpeI*, что привело к получению вектора pBS PRAD-F2A-BChE. Для получения вектора pFUSEmcs последовательность mcs, полученная в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров (Приложение 1), была клонирована в вектор pFUSE-mIgG2B-Fc2 по сайтам рестрикции *NcoI* и *NheI*. Последовательность PRAD-F2A-BChE была получена в результате обработки вектора pBS PRAD-F2A-BChE эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *KpnI* и клонирована по этим сайтам в вектор pFUSEmcs, что привело к получению вектора pFUSE PRAD-F2A-BChE.

ПЦР-амплификация АТ-богатых последовательностей MAR

Последовательности MAR 1-68 и MAR X-29 были получены в результате ПЦР-амплификации с использованием особых условий элонгации. Геномная ДНК клеток линии НЕК-293 была выделена с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя и использована в качестве матрицы. Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 50 мкл содержала 0.3 мМ дАТФ и дТТФ, 0.1 мМ дЦТФ и дГТФ, 50 нМ праймеров (Приложение 1), 50 нг геномной ДНК и Encuslo полимеразу (Евроген, Россия) в соответствующем буфере. Температура отжига и элонгации составляла 64°C, а время элонгации – 4.5 мин. Количество циклов амплификации составляло 35.

Создание векторов GII

Для получения вектора pUC19mcs последовательность mcs была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров (Приложение 1) и клонирована в вектор pUC19 по сайтам рестрикции *EcoRI* и *Sall*. Последовательности MAR, полученные в результате ПЦР-амплификации, были клонированы в вектор pUC19mcs по сайту *SmaI* с образованием векторов pUC19 MAR₁₋₆₈ и pUC19 MAR_{x-29}. Последовательности MAR 1-68 и MAR X-29 были получены в результате рестрикции соответствующих векторов pUC19 MAR по сайту *PvuI* и клонированы в вектор pFUSE PRAD-F2A-BChE по этому сайту. Вектора с одинаковой ориентацией последовательностей MAR и кассеты PRAD-F2A-BChE были использованы для дальнейшей работы.

Создание вектора pBudCE/EF/BChE+Neo

Для получения вектора pBudCE/EF/BChE+Neo, вектор pRc/CMV был обработан эндонуклеазой рестрикции *BamHI*, после чего фрагмент, несущий ген устойчивости к генетицину, был клонирован в вектор pBudCE/EF/BChE по соответствующему сайту рестрикции.

Правильность каждой из полученных конструкций была подтверждена секвенированием.

Создание генетических конструкций для дрожжевого дисплея ферментов

Рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека (БуХЭ), легкая цепь энтерокиназы человека (ЭК), и дезоксирибонуклеаза I человека (ДНКазы) были получены в клетках дрожжей *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, США) в виде белка, заякоренного на клеточной стенке, с использованием модифицированного вектора pPICZ-mCherry-F2A-HSA_{ss}-*AfeI*/*PvuI*-HA-SAG1, полученного на основе вектора pPICZ α A (Invitrogen, США). Этот вектор содержал в одной рамке считывания последовательность флуоресцентного белка-репортера mCherry, “самопроцессирующегося” F2A пептида, лидерного пептида человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), последовательности узнавания эндонуклеаз рестрикции *AfeI* и *PvuI*, субъединицы Aga1p α -агглютинина дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и эпитопа гемагглютинина (HA). Фрагменты, кодирующие БуХЭ, ЭК и ДНКазу были получены в результате ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы векторов pFUSE PRAD-F2A-BChE (GII), pHENm/L-HEP/C122S

[223] и pBE-rhDNaseI с использованием праймеров a/b, c/d и e/f (Приложение 1) соответственно и были клонированы в вектор pPICZ-mCherry-F2A-HSAss-AfeI/PvuI-NA-SAG1 по сайтам AfeI и PvuI.

Создание библиотеки мутантов БуХЭ

БуХЭ дикого типа и ее библиотека были получены в заякоренном виде на поверхности *Pichia pastoris* с использованием модифицированного экспрессионного вектора pPic9k- α -SfiI-FLAG-anchor, полученного на основе вектора pPIC9k (Invitrogen, США). Данный вектор содержал последовательности короткой сигнальной последовательности α -фактора, субъединицы Aga1p α -агглютинаина дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, последовательность узнавания эндонуклеазы рестрикции SfiI и последовательность 3FLAG-эпитопа. Вектор pFUSE PRAD-F2A-VChE (GII) был использован в качестве матрицы и праймеры a/c и b/d (Приложение 1) были использованы для амплификации участков БуХЭ, фланкирующих последовательность 284-TPLSV-288 ацил-связывающей петли БуХЭ дикого типа (WT). ПЦР-продукт, полученный в результате амплификации с использованием пары праймеров b/d, был использован в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с использованием пары праймеров b/e, после чего ПЦР-продукты, полученные с использованием праймеров a/c и b/e, были амплифицированы с использованием пары праймеров a/b. Полученный ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазой рестрикции SfiI и клонирован в вектор pPic9k- α -SfiI-FLAG-anchor. Представительность библиотеки оценивается величиной порядка 3×10^5 .

Создание генетических конструкций для продукции мутантов БуХЭ

Мутанты БуХЭ устойчивые к действию ФОТ были получены в клетках FreeStyle™ 293-F с использованием вектора pFUSE-VChE-6xHis, полученного на основе pFUSE-hIgG1-Fc (Invivogen, США), несущего укороченный вариант БуХЭ W541H₆ Δ [224] без с концевой домена тетрамеризации. Данный вектор был получен в результате ПЦР-амплификации с использованием вектора pFUSE PRAD-F2A-VChE (GII) в качестве матрицы и праймеров a/b и c/d (Приложение 1). ПЦР-продукт, полученный в результате амплификации фрагментов a/b и c/d с использованием праймеров a/d, был обработан эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NheI и клонирован по одноименным сайтам рестрикции в вектор pFUSE-hIgG1-Fc.

Геномная ДНК клонов мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ, была использована в качестве матрицы для амплификации ПЦР-продукта с использованием праймеров a/d. Полученный ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *NcoI* и клонирован по одноименным сайтам рестрикции в вектор pFUSE-BChE-6xHis.

Методы работы с бактериями *E. coli*

Получение электрокомпетентных клеток

Клетки высевались из музея истощающим штрихом на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика после чего инкубировались 14 часов при 37°C. Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды 2xYT и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

Ночную культуру в объеме 1 мл высевали в две двухлитровые бутылки, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили в течение 1.5-2 часов при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин до оптической плотности 0.4 ОЕ при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали на льду и стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл после чего центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21.

Клетки ресуспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной воды MQ, добавляли около 150 мл ледяной воды MQ и центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные пробирки, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой pUC19 и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

Электропорация проводилась на приборе ECM600 (ВТХ, США) с использованием 1 мм кювет (BioRad, США). К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную лигазную смесь, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли

электропорацию (1.2-1.4 кВ, 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC и инкубировали 30 минут при 37°C. Далее высевали на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением селективирующих антибиотиков, и помещали в термостат на 37°C на 14-16 часов.

ПЦР с колоний

В микропробирки разносили по 10 мкл воды MQ, после чего отдельные бактериальные колонии (в количестве 10-20 штук) переносили с использованием предварительно автоклавированных стерильных зубочисток на свежую размеченную чашку и в соответствующую пронумерованную пробирку. Готовили двукратную смесь для проведения ПЦР и разносили ее по пробиркам с инокулированными колониями в объеме 10 мкл. Далее на приборе T100 (BioRad, США) осуществляли 25 циклов ПЦР-амплификации, после чего продукты полимеразной цепной реакции анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле.

Ночная культура

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды LB или 2xYT с соответствующим селективирующим антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина или 25 мкг/мл зеоцина) и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

Приготовление музейного штамма

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -70°C. Штамм из музея рассевали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду LB-агар и инкубировали при 37°C в течение 14-16 часов.

Методы работы с дрожжами *Pichia pastoris*

Получение электрокомпетентных клеток

Клетки из музея истощающим штрихом высевали на чашку Петри с YPD-агаром и инкубировали в термостате в течение ночи при 30°C. Для культивирования отдельную колонию инокулировали в 5 мл среды YPD и растили в течение ночи при

30°C и 220-250 об/мин. 100 мкл культуры высевали в колбу с 50 мл свежей среды YPD и растили при 30°C и 220-250 об/мин до оптической плотности 1.3-1.5 ОЕ при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали во льду и стерильно переносили в 50 мл пробирки, центрифугировали 5 мин при 1500 g и 4°C на центрифуге Eppendorf 5804 (Eppendorf, Германия). Далее клетки ресуспендировали в 40 мл буфера 100 mM LiOAc, 10 mM дитиотреитол, 0.6 M сорбит, 10 mM Трис-HCl pH 7.5 и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугировали 5 мин при 1500 g и 4°C, ресуспендировали в 50 мл ледяного 1 M сорбита, центрифугировали в тех же условиях и повторяли эту процедуру два раза. Осадок ресуспендировали в 1-2 мл 1 M сорбита, разносили по 80 мкл в стерильные пробирки и использовали для электротрансформации.

Трансформация клеток методом электропорации

Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics (США) согласно инструкции производителя. Использовались 2 мм кюветы (BioRad, США). К аликвоте (80 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли 5-20 мкг линейризованной ДНК, перемешивали и инкубировали во льду 5 мин. Затем переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (2.5 кВ, 8-10 мс), после чего клетки переносили в 1 мл 1M сорбита, инкубировали 1 час в термостате при 30°C. Далее 200-500 мкл высевали на чашку Петри с YPD-агаром, с добавлением селективирующих антибиотиков, и помещали в термостат на 48-72 часа при 30°C.

ПЦР с генома дрожжей

Дрожжевые колонии переносили в пробирки со 100 мкл раствора 200 mM LiOAc и 1% ДСН. После инкубации в течение 5 минут при 70°C добавляли 300 мкл этанола и перемешивали на вортексе. Полученную суспензию центрифугировали при 16000 g в течение 3-х минут. Полученный осадок промывали 70% водным раствором этанола, после чего растворяли осадок в 100 мкл ТЕ и центрифугировали при 16000 g в течение 30 секунд. 1-5 мкл полученного супернатанта использовали для проведения ПЦР. Для проведения ПЦР использовали 30-35 циклов амплификации, после чего продукты ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле и секвенированием.

Анализ трансформантов

Аналитическую экспрессию проводили по методике фирмы-изготовителя (Invitrogen, США), используя среды BMGY и BMMY. Индивидуальную колонию инокулировали в 5 мл среды BMGY и растили в течение 16-20 часов при 30°C и 220-250 об/мин. Далее клетки центрифугировали 5 мин при 1500g и переводили в среду BMMY до 1 ОЕ при длине волны 600 нм. Метанол добавляли до концентрации 0.5% каждые 24 часов, экспрессию проводили в течение 24-72 ч с момента индукции. Анализ продукции белков проводили с использованием моноклональных антител мыши к НА-эпистоу, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa 488, а также специфических субстратов в случае продукции ферментов (дозоксирибонуклеазы I, энтеропептидазы и бутирилхолинэстеразы).

Приготовление музейного штамма

Из отдельной колонии выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -70°C.

Экспрессия белков, заякоренных на поверхности дрожжевой стенки, для проведения процедуры микрофлюидной компартиментализации

Музейную культуру *P. pastoris* из замороженного глицеринового стока рассеивали методом истончающегося штриха на чашки со средой YPD-агар. Клетки растили 24-72 часа при 30°C. Индивидуальные колонии *P. pastoris* использовали для инокуляции 50 мл среды BMGY в стеклянной колбе и растили в течение 16-20 ч при 30°C и 220-250 об/мин. Клетки собирали центрифугированием в течение 5 минут при 1500 g, ресуспендировали полученный клеточный осадок в 250 мл среды BMMY до конечной плотности 1 ОЕ при длине волны 600 нм и культивировали 24 часа при 30°C с интенсивной аэрацией. После окончания культивации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1500 g. Полученный клеточный осадок промывали 3 раза 50 mM калий-фосфатным буфером pH 7.2, после чего ресуспендировали в буфере для инкапсуляции, фильтровали через колоночные фильтры с диаметром пор 20 мкм (IDEX, США) и доводили до необходимой оптической плотности (3 ОЕ для инкапсуляции в чипах с размером каналов 20 мкм и 0.3 ОЕ для 60 мкм чипов).

Методы работы с клетками линии CHO-K1 и FreeStyle™ 293-F

Культивирование клеток линии CHO-K1

Клетки выращивали в среде Advanced DMEM (Gibco, США), содержащей 10% австралийской бычьей фетальной сыворотки (Gibco, США), 4 мМ дипептида GlutaMAX и смесь антибиотиков и антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). При достижении конfluence клетки рассеивали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного PBS (Gibco, США), добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 2–3 мин при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, после чего клетки рассеивали по 0.5-1 мл суспензии в 5 мл свежей ростовой среды.

Получение стабильных клонов-продуцентов 4pчБуХЭ

Трансфекция клеток линии CHO-K1

Клетки линии CHO-K1 были трансфицированы на приборе Nucleofector 2b (Lonza, Швейцария) с использованием набора Amaxa® Nucleofector® kit T (Lonza, Швейцария) согласно инструкции производителя. Клетки, находившиеся в состоянии 60% конfluence, снимали с флакона обработкой 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, считали количество клеток на камере Горяева и использовали 1 млн. клеток для одной трансфекции. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 150 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в свежеприготовленном растворе Nucleofector® Solution (Lonza, Швейцария), добавляли 2 мкг соответствующего линейаризованного по *Sfa*I вектора GII, GIII или pBudCE/EF/BChE+Neo (линейаризованного по *Pvu*I), переносили в кювету и запускали программу трансфекции U-023 (максимальная эффективность, низкая выживаемость). После чего рассеивали в 6-луночные планшеты в ростовой среде без селективирующего антибиотика. Спустя 6 часов прикрепившиеся клетки снимали и рассеивали 1 лунку 6-луночного планшета на 24-луночный планшет.

Селекция клеток линии СНО-К1

Спустя 16 часов после трансфекции клеточная культура подвергалась селекции на антибиотике зеоцин с концентрацией 600 мкг/мл (все конструкции на основе pFUSE) или генетицин 1200 мкг/мл (pBudCE/EF/BChE+Neo). Для этого ростовую среду заменяли на свежую с антибиотиком по 0.5 мл в лунку. Спустя 3 дня среду меняли на 0.5 мл свежей среды с антибиотиком. Процедуру повторяли каждые 3 дня до достижения конfluence клеток в лунках. После этого лунки тестировались с целью определения уровня активности БуХЭ.

Тестирование на наличие активности БуХЭ

Для отбора клонов, обладающих наибольшим уровнем продукции БуХЭ, лунки тестировались на наличие активности БуХЭ. Для этого из каждой лунки отдельно отбирали по 100 мкл среды, готовили серийные разведения 1/20 - 1/320 отобранных сред в 96-луночной плашке в объеме 100 мкл. Добавляли к полученным разведениям по 100 мкл двукратного субстрата – реактива Элмана (2 мМ ВТС и 1 мМ DTNB в PBS). Скорость реакции гидролиза субстрата регистрировали на планшетном ридере Varioscан Flash (Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению продукта реакции при длине волны 405 нм. Лунки, обладавшие наибольшей активностью, использовали для клонирования.

Получение индивидуальных клонов-продуцентов БуХЭ

Процедуру клонирования проводили методом предельных разведений. Для этого отобранные ранее лунки 24-луночного планшета обрабатывали 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 1.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, после чего определяли концентрацию клеток с использованием камеры Горяева. Клеточную суспензию разводили методом последовательных разведений до концентрации 30 кл/мл после чего высевали в 96-луночные плашки в объеме 100 мкл в лунку. На следующий день в лунки добавляли по 100 мкл свежей среды с двукратной концентрацией селективирующего антибиотика. Через 5-6 дней лунки визуально тестировали на наличие одиночных колоний и отмечали лунки, несущие одну колонию. Спустя 10-14 дней после клонирования клетки дорастали до

конфлюэнтности и их тестировали с целью определения уровня активности БуХЭ. Лунки, содержавшие индивидуальные клоны с наибольшим уровнем активности, были тестированы во флаконах (25 см²) и лучшие из них были отобраны для создания банка клонов-продуцентов.

Создание банка культуры клона-продуцента

Клетки из флаконов, отобранных на предыдущей стадии, наращивали в 5 флаконах (25 см²) в объеме среды 5 мл при 37°C, 5% CO₂. По достижении конфлюэнтности, клетки обрабатывали 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки и центрифугировали в течение 5 минут при 150 g, клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл сыворотки с 10% диметилсульфоксида. Затем с помощью серологической пипетки клеточную суспензию стерильно разносили по 1 мл в криопробирки, подписывали название клона-продуцента, дату и замораживали при -70°C. Спустя неделю криопробирки переносили в жидкий азот для долгосрочного хранения. В каждом новом цикле работы использовали пробирку из мастер-банка клона-продуцента, из которой в свою очередь получали по 10 пробирок для рабочего банка клонов.

Продукция рчБуХЭ в клетках линии СНО-К1

Криопробирка из рабочего банка клона-продуцента подвергалась разморозке при 37°C после чего ее содержимое переливали в 10 мл среды DMEM, перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут при 150 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл свежей ростовой среды и высевали в 2 флакона (25 см²). По достижении конфлюэнтности, клетки пересеивали последовательно сначала в четыре 75 см², затем 225 см² флакона. По достижении конфлюэнтности в 225 см² флаконах, клетки пересеивали в 1700 см² роллеры в объеме среды 150 мл из расчета 1 флакон – 1 роллер. Спустя 3 дня среду с сывороткой меняли на бессывороточную среду ProCHO4 (Lonza, Швейцария) с добавками 4 мМ дипептида GlutaMAX (Gibco, США) и смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, США). Нарработку рчБуХЭ проводили в двух режимах: без замены среды и с заменой среды. В случае без замены среду в роллере заменяли однократно в объеме 350 мл и проводили сбор среды однократно спустя 8 дней, что приводило к уровню продукции более 70 мг/л

(26 мг/роллер). В случае с заменой среды в объеме порядка 320 мл проводили 80% замену среды каждые двое суток в течение 17-19 суток, что приводило к уровню продукции порядка 30-40 мг/л (82 мг/роллер). Полученную в результате культуру центрифугировали 15 мин при 4000 g и температуре 4°C, отбирали супернатант, замораживали и хранили при -30°C до проведения процедуры выделения и очистки рчБуХЭ.

Культивирование клеток линии FreeStyle™ 293-F и заморозка

Клетки линии FreeStyle™ 293-F растили в среде FreeStyle™ 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 30 мл в 120 мл колбах в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, на орбитальном шейкере (125 об/мин). По достижении плотности клеточной культуры 1×10⁶ кл/мл, клетки пересевают в соотношении 1:10.

Для заморозки культуру клеток центрифугировали в течение 5 минут при 150 g. Заморозку клеток осуществляли после ресуспендирования в сыворотке с 10% диметилсульфоксида в концентрации 6×10⁶ кл/мл. Суспензию клеток замораживали при -70°C, после чего спустя неделю переносили в жидкий азот.

Трансфекция клеток линии FreeStyle™ 293-F методом липофекции

Перед проведением трансфекции определяют концентрацию живых клеток в культуре с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США). Для этого стерильно отбирают 20 мкл клеточной суспензии, смешивают с равным объемом 1% раствором трипанового синего и помещают внутрь одноразовой кюветы. Культуру клеток разводят средой FreeStyle™ 293 Expression Medium до конечной концентрации 1×10⁶ кл/мл и используют непосредственно перед трансфекцией. Линеаризованную по сайту эндонуклеазы *PmeI* плазмиду рFUSE-VChE-6xHis (или мутантов БуХЭ) в количестве 2 мкг добавляют к 60 мкл среды Opti-MEM (Gibco, США) и 4 мкл 293fectin™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) к 60 мкл среды Opti-MEM. Инкубируют в течении 5 минут при комнатной температуре и смешивают. Полученную смесь инкубируют 30 минут при комнатной температуре и добавляют к 2 мл клеточной культуры в 6-луночной плашке. Клетки инкубируют в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂, на орбитальном шейкере (125 об/мин). Спустя 24 часа анализируют продукцию БуХЭ по наличию активности в среде.

Продукция мутантной рчБуХЭ в клетках линии FreeStyle™ 293-F

Для наработки рчБуХЭ в клетках линии FreeStyle™ 293-F использовались аналогичные условия, объем всех реагентов был увеличен в 15 раз. Трансфекцию проводили с использованием 3×10^7 клеток в 30 мл среды FreeStyle™ 293 Expression Medium в 120 мл колбах. Нарботку проводили в течение 5-6 дней, окончание продукции соответствовало 50% выживаемости клеток. Уровень продукции составлял 15-20 мг/л. Полученную в результате культуру центрифугировали 15 мин при 200 g и температуре 4°C, отбирали супернатант, замораживали и хранили при -30°C до проведения процедуры выделения и очистки рчБуХЭ.

Методы работы с белками

Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис-НСl, рН 6.8; разделяющий гель – 8-10% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис-НСl, рН 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации $5 \cdot 10^{-5}\%$, а затем персульфат аммония до $1.5 \cdot 10^{-4}\%$. Для проведения нативного ПААГ-электрофореза использовали буферные растворы без ДСН.

Двукратный буфер нанесения образцов: 4% ДСН, 0.25 М Трис-НСl, рН 6.8; 4 мМ ЭДТА-На, рН 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего; (для проведения электрофореза в восстанавливающих условиях добавляли 5% меркаптоэтанола; для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН).

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6.5 г/л, рН 8.3 (для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН рН 7.4).

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C (в случае нативного электрофореза пропускали стадию нагревания), наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего

выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250 или проводили анализ активности в случае нативного электрофореза.

Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

Окрашивание ПААГ на наличие бутирилхолинэстеразной активности по методу Карновского

По окончании электрофоретического разделения белков в нативном ПААГ-электрофорезе, пластина с гелем переносилась в раствор, содержащий 125 мМ NaOH, 125 мМ малеиновой кислоты, 12 мМ цитрата натрия, 10 мМ CuSO₄, 550 мкМ, K₃[Fe(CN)₆] и 1 мМ бутирилтиохолин йодида. Гель инкубировали в растворе в течение 0.5–3 ч при комнатной температуре на шейкере.

Определение концентрации рчБуХЭ

Концентрацию активной рчБуХЭ определяли по методу Элмана [225] с использованием 1 мМ бутирилтиохолин йодида (Sigma, США) и 0.5 мМ 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) (Sigma, США) в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 7.0, при 25°C. Образование продукта реакции, 5-тио-2-нитробензойной кислоты, регистрировали спектрофотометрически при длине волны 405 нм, исходя из молярного коэффициента поглощения продукта 13600 М⁻¹см⁻¹. Концентрацию БуХЭ оценивали исходя из удельной активности 720 единиц активности на 1 мг и A_{1 см, 280}^{1%} 18 для препарата чистой БуХЭ.

Выделение и очистка 4рчБуХЭ

Ультрафильтрация и концентрирование культуральной среды

Культуральную среду, полученную в результате продукции 4рчБуХЭ в клетках линии СНО-К1, трансфицированных векторами GII, GIII и GIII+, в объеме ~10 л размораживали и подвергали фильтрации от клеточного дебриса с использованием фильтрационных модулей 0.45 мкм и 0.22 мкм (Millipore, США). Полученный фильтрат концентрировали с помощью ультрафильтрационного модуля Pelicon 2 (Millipore, США) с размером пор 100 кДа до объема системы ~300 мл согласно инструкции производителя. Далее с использованием того же модуля осуществляли диафильтрацию против буфера нанесения на аффинный сорбент прокаинамид-сефарозу (50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4) для проведения первой стадии хроматографической очистки. Для этого концентрат среды разбавляли до 2 л раствором 50 мМ калий-фосфатного буфера pH 7.4 и снова концентрировали. Процедуру повторяли три раза после чего полученный концентрат выдавливали из системы обратным потоком воздуха и использовали для дальнейшей очистки. Конечный объем концентрированной среды составлял 400 мл.

Хроматографическая очистка 4рчБуХЭ

200 мл концентрированной среды наносили на 50 мл колонку XK10/50 (GE Healthcare, США), заполненную сорбентом прокаинамид-сефарозой, в течение 16 часов в режиме рециркуляции при скорости потока 3 мл/мин. После этого сорбент промывали 10 объемами колонки буфера нанесения, затем 5 объемами 120, 200, 300, 450 и 900 мМ NaCl в 20 мМ калий фосфатном буфере pH 7.4. Регенерацию колонки проводили 10 объемами 2 М NaCl. Полученные фракции анализировали с целью определения уровня активности БуХЭ и определяли количество активной БуХЭ в каждой фракции (Приложение 2). Фракции 300, 450 и 900 мМ были сконцентрированы до 10-12 мл при помощи мембраны Pelicon XL (Millipore, США) с размером пор 100 кДа и переведены под буфер А (20 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4) для нанесения на ионообменную колонку MonoQ 10/100 GL (GE Healthcare, США). Объем нанесения на колонку составлял 3-4 мл. После нанесения колонку промывали 10 объемами буфера нанесения и проводили градиентную элюцию NaCl от 0 до 0.3 М буфером Б (1 М NaCl в 20 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.4) в 10

объемах колонки (Приложение 2). Фракции собирали через каждые 4 мл (0.5 объема колонки) и анализировали с целью определения уровня активности БуХЭ (Приложение 2). Фракции, обладавшие одинаковым уровнем специфической активности (соответствовавшие интервалу времени выхода 18.5-21 мин), объединяли, концентрировали на концентраторах Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 100 кДа и анализировали методом ПААГ-электрофореза с целью оценки чистоты препарата БуХЭ (Приложение 2). Чистота препарата БуХЭ после двух стадий очистки составляла более 90%.

Выделение и очистка мутантов рчБуХЭ

В отличие от 4рчБуХЭ, мутанты рчБуХЭ (cl 14, cl 15, cl 19 и контрольная рчБуХЭ дикого типа – WT), полученные в клетках линии FreeStyle™ 293-F, использовались исключительно для экспериментов *in vitro* и содержали преимущественно мономерную рчБуХЭ. Для проведения процедуры ультрафильтрации и концентрирования культуральной среды (в объеме 30-100 мл) использовалась мембрана Pelicon XL (Millipore, США) с размером пор 30 кДа. Далее с использованием того же модуля осуществляли диафильтрацию против буфера нанесения на металл-хелатный аффинный сорбент (300 мМ NaCl, 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 8.0). Для проведения металл-хелатной аффинной хроматографии использовали 1 мл колонку Tricorn 5/50 (GE Healthcare, США) с сорбентом Ni-NTA Superflow (QIAGEN, США). Концентрат среды наносили на предварительно уравновешенную буфером А (50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 8.0, 300 мМ NaCl) колонку на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали с той же скоростью 20 объемами буфера А и проводили изократическую элюцию 5 объемами буфера Б (50 мМ натрий фосфатный буфер pH 8.0, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол). Далее полученный элюат диализовали против 20 мМ калий-фосфатного буфера pH 7.4.

Вторую стадию очистки осуществляли с использованием анионообменной колонки MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) согласно инструкции производителя. Для нанесения использовали 20 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4, объем нанесения – 3 мл. Элюцию проводили солевым градиентом NaCl от 0 до 0.3 М в 20 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.4 в 10 объемах колонки при скорости потока 1 мл/мин.

Элюат собирали по 0.5 мл, полученные фракции анализировали на наличие активности БуХЭ, объединяли и концентрировали на концентраторах Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 30 кДа.

Химическое полисиалирование препаратов рчБуХЭ

Препараты рчБуХЭ были химически конъюгированы с окисленными полисиаловыми кислотами (ПСА) со средней молекулярной массой 24 кДа (Xenetic Biosciences, Великобритания) по реакции восстановительного аминирования согласно [149]. Конъюгацию проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 6.9, молярное соотношение рчБуХЭ : ПСА составляло 1 : 50 в расчете на мономер рчБуХЭ. Конечная концентрация NaBH_3CN – 3 мг/мл. Реакцию проводили в течение 48 ч при 25°C. Полученный в результате конъюгат рчБуХЭ-ПСА очищали от побочных продуктов реакции многократным диализом с использованием концентраторов Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 30 кДа. Эффективность модификации определяли с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (с ДСН, но без меркаптоэтанола). Концентрацию активной рчБуХЭ определяли по методу Элмана.

Введение радиоизотопной метки ^{125}I в препараты рчБуХЭ

Радиоактивную метку ^{125}I в препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА вводили по стандартной методике с использованием хлорамина Т (Sigma, США) и препарата KI (Изотоп, Россия), содержащего радиоизотоп ^{125}I . Белок инкубировался в течение 30 мин в PBS вместе с хлорамином Т (0.15 мг/мл) и KI (50 мкМ) в дозе 10^6 распадов в минуту на 1 мг белка. Реакцию останавливали добавлением 0.01% раствора тиосульфата натрия, после чего подвергали гель-фильтрации с использованием колонки HiTrap Desalting (GE Healthcare, США) объемом 5 мл.

Получение препаратов флуоресцентно меченой 4рчБуХЭ

Препарат 4рчБуХЭ был конъюгирован с NHS-активированным инфракрасным флуоресцентным красителем Sulfo-Cyanine7 (sCy7) (Lumiprobe, Россия). Конъюгацию проводили в 0.1 М NaHCO_3 согласно протоколу производителя. Флуоресцентно меченые белки были очищены от продуктов реакции методом гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare, США). Флуоресценцию препаратов белков измеряли на приборе Varioscan Flash (Thermo

Fisher Scientific, США). Для определения максимального относительного разгорания флуоресценции образцы белков были предварительно подвергнуты протеолизу раствором, содержащем смесь протеаз (1 мг/мл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мг/мл субтиллизина Карлсберг (Sigma, США)) в PBS pH 7.4 при 37°C в течении 4 часов. Полноту реакции протеолиза оценивали спектрофлуориметрически по выходу на насыщение кривой зависимости интенсивности флуоресценции (RFU) от времени. Относительное разгорание флуоресценции вычисляли как отношение интенсивности флуоресценции гидролизованного образца к интенсивности флуоресценции образца до протеолитического гидролиза. Степень модификации препаратов (N), т.е. количество групп флуорофора на молекулу белка, была определена путем измерения оптической плотности растворов при длине волны 280 нм ($E^{1\%}=18$) и при 760 нм, исходя из молярного коэффициента поглощения $240600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для sCu7. Полученные в результате препараты 4рчБуХЭ-sCu7 OFF (со степенью модификации ≈ 32) и 4рчБуХЭ-sCu7 ON (со степенью модификации ≈ 1) были использованы для визуализации профиля биораспределения и биodeградации 4рчБуХЭ *in vivo*.

Оценка кинетических характеристик мутантов БуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ

Очищенные мутанты БуХЭ были использованы для определения констант скорости бимолекулярного ингибирования (k_1/K_i) [226]. Высокоразбавленные (с концентрацией ≈ 2 нМ) образцы мутантов БуХЭ и БуХЭ дикого типа (WT) инкубировались с различными концентрациями ФОТ (в диапазоне 1.6-0.012 мкМ для POX и 125-1 мкМ для GD_C) в течение различных интервалов времени в диапазоне 1 мин – 2 ч, после чего остаточная активность БуХЭ была измерена по методу Элмана. Константа скорости самореактивации k_2 была определена по тангенсу угла наклона сигнала флуоресценции (RFU) с использованием различных концентраций БуХЭ в диапазоне 0.2-1 мкМ в процессе инкубации с 0.7-6 мкМ флуорогенного аналога POX-R или 1-4 мкМ GD_C в течение 14 часов. Измерение флуоресценции уходящих групп флуорофоров производили на приборе Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием длин волн $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=570/585$ нм (для POX-R) и $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/450$ нм (для GD_C).

Методы работы с животными

Животные, уход за животными

Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино. Животные разведены специально и ранее не участвовали в исследованиях. Производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус (животные, свободные от патогенов). Животных до начала исследования помещали в отдельную комнату содержания на период адаптации в течение 7 дней при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных контролировали проявление признаков отклонения в состоянии здоровья. В эксперимент были отобраны животные без признаков отклонений здоровья, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах пола более чем на 10%. Животных содержали индивидуально в макролоновых клетках Тип-2, оборудованных стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и 30-70% относительная влажность, 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час). В качестве подстилки использовался беспылевой подстил для грызунов, представляющий собой древесную крошку (LIGNOCEL JRS, Germany). Стандартный гранулированный корм для содержания крыс и мышей «Чара» (Ассортимент-агро, Россия) давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки. Специально подготовленная вода системой Milli-RO (Millipore, США) давалась *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками.

Определение фармакокинетических параметров препаратов рчБуХЭ и конъюгатов рчБуХЭ-ПСА

Концентрацию препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА, 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА в плазме крови определяли с использованием четырех групп мышей линии BALB/c по 18 животных в каждой. Каждая группа состояла из трех подгрупп по шесть животных в каждой для временных интервалов 2 мин–3 ч (подгруппа I), 1 ч–3 дня (подгруппа II) и 1–8 дней (подгруппа III). Препараты БуХЭ вводили внутривенно в

дозе 200 мкг/мышь (подгруппы I и II) и 500 мкг/мышь (подгруппа III). Образцы крови объемом 10-30 мкл были отобраны из глазного синуса через 2, 5, 10, 15, 30 мин, 1, 2, 3, 6, 9, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 дней после введения, заморожены и хранились при температуре -20°C до проведения анализа. Концентрацию БУХЭ в сыворотке крови мышей определяли, исходя из ее активности, по методу Элмана. Фармакокинетические характеристики препаратов получены, исходя из аппроксимации кривой выведения БУХЭ, в рамках двухкамерной модели [149] с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat software, США).

Определение профиля биораспределения препарата 4рчБУХЭ и конъюгата 4рчБУХЭ-ПСА

Радиоизотопная метка ^{125}I была введена в препараты 4рчБУХЭ и 4рчБУХЭ-ПСА по стандартной методике. Препараты меченой 4рчБУХЭ и 4рчБУХЭ-ПСА были введены внутривенно мышам линии BALB/c (три группы по шесть животных для каждого препарата) в дозе 10^5 распадов в минуту (≈ 100 мкг рчБУХЭ) на мышь. Мыши были умерщвлены спустя 0.5, 3 и 48 ч после введения препаратов, образцы их крови и тканей были отобраны и взвешены. Радиоактивность отобранных образцов измеряли с использованием автоматического гамма-счетчика WIZARD (PerkinElmer, США). Накопление в ткани было определено как отношение радиоактивности органа к радиоактивности крови в соответствующий момент времени.

Определение профиля биodeградации препарата 4рчБУХЭ *in vivo*

Биораспределение и профиль биodeградации 4рчБУХЭ были определены с использованием препаратов 4рчБУХЭ-sCy7 OFF и 4рчБУХЭ-sCy7 ON. Мышам линии SCID (без волосяного покрова) были внутривенно введены препараты конъюгатов в дозе 500 мкг/мышь. Система для оптической визуализации малых животных In-Vivo MS FX PRO (Bruker, США) была использована для прижизненной детекции флуоресценции sCy7 спустя 10 мин, 30 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч, 8ч, 24 ч после введения. Для возбуждения и детекции эмиссии флуоресценции были использованы узкополосные фильтры 730/10 и 790/10 нм соответственно.

Трем группам (n=3 в каждой) мышей линии BALB/c были внутривенно введены препараты конъюгатов в дозе 500 мкг/мышь. Мыши были умерщвлены

спустя 0.5, 3 и 48 ч после введения препаратов, образцы их крови и тканей были отобраны и взвешены, после чего с использованием In-Vivo MS FX PRO была измерена их флуоресценция.

Оценка протективного действия препарата 4рчБуХЭ

Для оценки протективного действия препарата 4рчБуХЭ были использованы мыши линии BALB/c дикого типа (WT) и мыши, нокаутированные по гену БуХЭ (КО). Для каждой линии мышей были использованы 2 группы мышей-самок. Первая группа мышей подвергалась терапии 4рчБуХЭ, вторая – контрольная, не получала препарата 4рчБуХЭ. Для специфического ингибирования карбоксилэстеразы плазмы крови мыши (ES1) обоим группам мышей был подкожно введен высокоспецифичный ингибитор ES1 2-(*орто*-крезил)-4Н-1:3:2-бензодиоксафосфорин-2-оксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг. Спустя 15 минут первой группе мышей был внутривенно введен препарат 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг в то время как контрольной группе мышей был введен физиологический раствор. Спустя 30 минут после начала эксперимента, обе группы мышей получали различные дозы модельного ФОТ – параоксона (РОХ). Дозы в подгруппах (n=4-9) варьировались от нелетальных (400 мкг/кг) до 100% летальных (700 мкг/кг) для определения протективной эффективности препарата 4рчБуХЭ. После введения РОХ происходила автоматическая регистрация тяжести проявления признаков отравления с использованием платформы TSE ActiMot Measuring System (TSE Systems, Германия). Наблюдение за животными проводилось в течение 5 суток после введения РОХ. Полученные кривые выживаемости были проанализированы с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat software, США) в рамках четырех-параметрической логистической модели.

Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности

Изготовление микрофлюидных чипов

Микрофлюидные чипы имели геометрию фокусировки потока с размерами сопла 60×70 мкм или 20×22 мкм и были спроектированы с использованием САПР AutoCAD (Autodesk, США) и получены с использованием стандартной технологии мягкой литографии [11]. Мастер штампы из фоторезиста SU-8 (MicroChem, США) на кремниевой подложке были получены по технологии фотолитографии. Мастер-штампы покрывались слоем смеси эластомеров 1:10 Sylgard® 184 (Dow Corning, США) в стеклянной чашке Петри и выдерживались при 70°C в сушильном шкафу в течение 2 часов, после чего охлаждались и отделялись в стерильных беспыльных условиях от полидиметилсилоксановой (PDMS) реплики. Полученная PDMS-реплика разрезалась на отдельные половины чипов, в которых были сделаны отверстия с использованием штампа для биопсии диаметром 1.2 мм (Harris Uni-Core, США). Полученные половины чипов были ковалентно соединены с предметными стеклами 25×76 мм (Стеклоприбор, Россия), очищенными промыванием в ацетоне, изопропанолу и MQ, с использованием плазменного окисления в установке Atto plasma cleaner (Diener, Германия). Окисление проводилось в течение 1 минуты в атмосфере кислорода с давлением 0.7 мбар в режиме максимальной мощности. Непосредственно после окисления каналы чипов были обработаны 1% водным раствором поливинилового спирта Mowiol 23-88 (Kuraray Specialities Europe, Германия) для создания гидрофильного покрытия. Для гидрофобизации чипы обрабатывали 0.5% раствором трихлор(октадецил)силана (Sigma, США) в минеральном масле или гидрофобизатором Aquapel (PPG Industries, США). Спустя 1 минуту после обработки каналов чипа, остатки модификаторов были удалены при помощи вакуума, после чего чипы нагревали в течение 3 минут в сушильном шкафу при 120°C. После модификации гидрофильные чипы сохраняли свои свойства в течении более чем года, гидрофобные более 3 лет.

Установка для генерации монодисперсной микрофлюидной эмульсии

Контроль за течением жидкостей осуществлялся при помощи пьезоэлектрического контроллера давления OB1 MkII (Elveflow, Франция), который отдельно управлял течением четырех потоков жидкостей: внутренней водной фазы 1 (ВВ₁) – суспензии клеток, внутренней водной фазы 2 (ВВ₂) – раствора субстрата, масляной фазы (М) – минерального или фторуглеродного масла и внешней водной фазы (В₃). Скорость потока каждой фазы измерялась при помощи сенсоров скорости потока (Elveflow, Франция), соединенных петлей обратной связи с контроллером давления, что позволяло автоматически поддерживать заданные скорости течения жидкостей с высокой точностью. Резервуар с внутренней водной фазой 1 и соответствующий сенсор потока располагались вертикально для того, чтобы минимизировать седиментацию клеток. Две внутренние водные фазы ВВ₁ и ВВ₂ соединялись непосредственно перед входом в чип с использованием коннектора MicroTee P-890 (IDEX, США) с мертвым объемом порядка 100 нл. Объединенный поток внутренней водной фазы подвергался последовательной эмульсификации с использованием гидрофобного и гидрофильного чипа с использованием масляной фазы. В качестве масла использовали 3% раствор эмульсификатора Abil EM 180 (Evonic, Германия) в светлом минеральном масле (Sigma, США) или 2% Pico-Surf 2 во фторуглеродном масле HFE-7500 (Dolomite, Великобритания). В качестве внешней водной фазы был использован 2% раствор Pluronic F-127 (Sigma, США), 0.1% Mowiol 23-88 в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.4. Скорости потоков ВВ₁: ВВ₂:М В₃ составляли 6:6:4:200 мкл/мин для чипов с размером каналов 60 мкм и 4:4:2:50 мкл/мин для чипов 20 мкм.

Инкапсуляция дрожжевых клеток и проведение ферментативных реакций в каплях

Дрожжи, продуцирующие заякоренные ферменты или Fab-фрагмент антитела, растили ночь в жидкой культуре на среде YPD после чего индуцировали культивацией на среде ВММУ. Дрожжевые клетки отмывали 3 раза 50 мМ калий-фосфатным буфером pH 7.4 и ресуспендировали в соответствующем буфере для инкапсуляции (1 мМ MnCl₂, 0.1 мМ CaCl₂, 20 мМ Трис-НСl pH 7.4 в случае ДНКазы; 0.2 мМ CaCl₂, 20 мМ Трис-НСl pH 7.4 для ЭК; 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4 для БуХЭ). После этого клетки были профильтрованы через 20 мкм фильтр А-

313 (IDEX, США), разведены для достижения $\lambda=0.5$ (0.3 и 3 ОЕ при длине волны 600 нм для чипов 60 мкм и 20 мкм соответственно) и смешаны в соотношении 1:10-1:10⁵ активные : неактивные. Полученные смеси подвергались микрофлюидной компартиментализации (поток ВВ₁) вместе с соответствующим субстратом в буфере (поток ВВ₂): 1 мкМ FAM-AAAAAAACCCCCCATATAGCGCGTTTTTTTT-RTQ1 – ДНКза $\lambda_{ex}=488$ нм, $\lambda_{em}=516$ нм; 10 мкМ SensoLyte Rh110 – ЭК $\lambda_{ex}=490$ нм, $\lambda_{em}=524$ нм; 30 мкМ ВТС и 30 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты метиловый эфир – ВChE $\lambda_{ex}=405$ нм, $\lambda_{em}=450$ нм.

Инкапсуляция клеток бактерий и культивация в каплях

Клетки *E. coli* JW5503 были трансформированы вектором pKatushka2S-B и использовались в качестве модельных “сожителей”. Бактерии *S. aureus*, *Streptomyces venezuelae* Ehrlich Ac-505 и *E. coli* культивировали в среде 2YT (с 10 мкг/мл хлорамфеникола в случае *S. aureus*, 2% глюкозы в случае *S. venezuelae* и 100 мкг/мл ампициллина в случае *E. coli*). Культивацию проводили в колбе при 37°C (*S. aureus* и *E. coli*) и 28°C (*S. venezuelae*) при 250 об/мин. *S. aureus* и *E. coli* до достижения логарифмической фазы роста (4-6 часов), *S. venezuelae* растили в течение 48 часов. Полученные суспензии клеток промывали 3 раза средой для кокультивации (0.16% триптона, 0.1% дрожжевого экстракта, 0.05% NaCl, 0.5% глицерина, 0.67% YNB и 1 мМ ИПТГ), после чего подвергались фильтрации с использованием клеточных сит с размером пор 40 мкм (Greiner Bio-One, Германия) и разводились до 0.1 ОЕ₆₀₀ ($\lambda=10$) в случае *S. aureus*, 0.03 ОЕ₆₀₀ ($\lambda=2$) в случае *E. coli* и 0.3 ОЕ₆₀₀ ($\lambda=1$) в случае *S. venezuelae*. Клетки *S. venezuelae* и *E. coli* подвергались попарной инкапсуляции вместе с клетками *S. aureus* с использованием 60 мкм чипов. Аналогично клетки-эффекторы (*S. venezuelae* и *E. coli*) были разведены *S. aureus* в соотношении 1:10 и 1:100 и инкапсулированы вместе с *S. aureus*. Полученная эмульсия инкубировалась в течение 48 часов при 25°C.

Визуализация капель

Капли микрофлюидной эмульсии с инкапсулированными клетками дрожжей или бактерий ресуспендировали переворачивая пробирку и переносили 5-10 мкл полученной суспензии в камеру Горяева. Визуализацию капель производили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti (Nikon,

Япония) с использованием стандартных фильтров для FITC и Texas Red (Nikon, Япония).

Отбор капель двойной микрофлюидной эмульсии с использованием FACS и регенерация клеток из капель

Капли были отобраны с использованием клеточного сортера FACSAria III (BD, США). Выбор популяции капель двойной эмульсии осуществлялся с использованием светорассеяния и фоновой флуоресценции субстрата или ростовой среды. Отбор позитивных событий (активаторов) осуществлялся с использованием 530/30 нм эмиссионного фильтра (или 450/50 нм в случае БуХЭ). Дрожжевые и бактериальные клоны были регенерированы в процессе высевания отобранной эмульсии на чашки с агаром в трех повторностях. SAK-чашки были использованы для регенерации дрожжевых клонов, 2YT-агар был использован для отбора эффекторов *S. aureus* и *E. coli* (в случае *E. coli* чашки содержали 1 мМ ИПТГ). Индивидуальные дрожжевые колонии анализировались на наличие флуоресценции белка-репортера mCherry после индукции в процессе культивации на чашках с ВММУ-агаром с использованием прибора VersaDoc (Bio-Rad, США) в режиме освещения зеленым светодиодом и эмиссии красной флуоресценции. Количество колоний *E. coli* до и после отбора подсчитывалось по наличию клонов, обладавших дальне-красной флуоресценцией белка-репортера Katushka2S. Количество колоний *S. venezuelae* подсчитывалось на основании их специфической морфологии. Степень обогащения была определена как соотношение между долей активных клеток после и до отбора. Максимальное теоретическое обогащение рассчитывалось как произведение степени разведения и максимальной теоретической чистоты отбора, рассчитанной с использованием распределения Пуассона (0.787 для $\lambda=0.5$).

Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности

Библиотека БуХЭ была скринирована с использованием трех различных гейтов с различным уровнем флуоресценции капель, растущим в порядке $G3 < G2 < G1$. Полученные в результате дрожжевые клоны и клоны до отбора были регенерированы из капель, индуцированы и проанализированы с целью определения уровня активности индивидуальных клонов с использованием 30 мкМ ВТС и 30 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты. Три клона с

различным уровнем активности (cl.3 – 55% WT, cl.8 – 5.4% WT и cl.13 – 1.1% WT) были смешаны с контрольными неактивными клетками, продуцировавшими Fab-фрагмент антитела в соотношении 1:1:1:1 и 1:1:1:1000 соответственно. Полученные смеси были скринированы с использованием гейтов (“много”, “средне”, “мало”) соответствующих медиане флуоресценции капель с инкапсулированными cl.3, cl.8 и cl.13 соответственно. Полученные в результате отбора колонии были проанализированы методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных к мутантам БуХЭ и Fab (Приложение 1).

Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к инактивации ФОТ

Дрожжи, продуцирующие библиотеку БуХЭ, заякоренной на поверхности дрожжевой стенки, были культивированы в жидкой среде, индуцированы и отмыты как было описано выше. После этого суспензия клеток инкубировалась с ФОТ – 0.2 мМ параоксоном (РОХ) или 1 мМ аналогом зомана (GD_C) в течение 30 минут при 25°C. После инкубации клетки были промыты 50 мМ калий-фосфатным буфером с 2 мкМ соответствующего ФОТ, профильтрованы, как было описано ранее, и подвергнуты микрофлюидной инкапсуляции с использованием в качестве субстрата 100 мкМ ВТС и 100 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты. Спустя 3 часа капли, обладавшие наибольшим уровнем флуоресценции в канале 450/50 нм, были отобраны с использованием FACS. Регенерированные дрожжевые клоны были проанализированы на наличие активности БуХЭ, а также на наличие устойчивости к ингибированию ФОТ. Наиболее активные клоны, демонстрировавшие наличие активности БуХЭ после ингибирования ФОТ (cl.14, 15 в случае РОХ и 19 в случае GD_C), были отобраны для дальнейшего анализа и секвенирования.

Отбор представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост

S. aureus

Образцы микробиоты ротовой полости были получены в результате соскоба с десен и подъязычной складки двух независимых здоровых доноров. Полученные бактерии были ресуспендированы в среде YTP для кокультивации, отмыты, профильтрованы с использованием фильтров А-313 с размером пор 20 мкМ (IDEX, США) и разведены до 0.8 ОЕ₆₀₀ ($\lambda \approx 0.5$ по результатам предварительных

экспериментов). Клетки-мишени *S. aureus*, продуцирующие флуоресцентный белок-репортер GFP, полученные в логарифмической фазе роста, были проинкубированы с 5 мкМ активированного эфира sulfo-Cyanine5 NHS (Lumibrobe, Россия) в течение 1 часа в PBS с 0.2% глюкозы. После инкубации клетки отмывали 3 раза средой YTP, фильтровали, разводили до 0.1 ОЕ₆₀₀ ($\lambda=10$) и подвергали микрофлюидной инкапсуляции вместе с суспензией клеток микробиоты с использованием 60 мкм чипов. После 16 часов инкубации при 35°C, к эмульсии добавляли Calcein Violet AM (Thermo Fisher Scientific, США) до финальной концентрации 10 мкМ. Спустя 30 минут капли с высоким уровнем флуоресценции sCy5, низким уровнем GFP и высоким Calcein Violet были отобраны с использованием каналов эмиссии флуоресценции 660/20, 530/30 и 450/50 нм соответственно.

Регенерация и идентификация культивируемых бактерий-ингибиторов

S. aureus

Бактериальные клоны были регенерированы в процессе высевания на чашки с YPT-агаром. Индивидуальные бактериальные колонии переносили на подложку MALDI target plate (MSP 96 ячеек; Bruker Daltonics, США) и покрывали 2 мкл насыщенного раствора матрицы α -4-циано-гидроксикоричной кислоты (Bruker Daltonics, США) в 50% ацетонитриле (Sigma, США) и 2.5% трифторуксусной кислоте (Sigma, США). Масс-спектрометрические профили были получены с использованием прибора Microflex (Bruker Daltonics, США). Пики молекулярных ионов измерялись автоматически в линейном режиме положительно заряженных ионов с оптимальным диапазоном от 2000 до 20000 масса/заряд. Программное обеспечение flexControl 3.0 (Bruker Daltonics, США) и flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, США) было использовано для обработки результатов. Анализ спектров и идентификация были проведены при помощи MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США) с использованием библиотеки MALDI Biotyper 3.0 library (версия 3.2.1.1).

Отбор бактерий-ингибиторов *S. aureus* с использованием классических микробиологических подходов скрининга на чашках (платформы Ваксмана)

Образцы микробиоты ротовой полости высевали на чашки с YTP-агаром в различных десятикратных разведениях. Спустя 48 часов культивации при 35°C чашки, содержащие 30-100 колоний были использованы для дальнейшего анализа. Индивидуальные колонии были пронумерованы и переколоты на новую чашку со свежей средой, старая чашка покрывалась теплым слоем LB с 0.7% агара и клетками *S. aureus* с оптической плотностью 0.01-0.03 ОЕ₆₀₀. После 16 часов инкубации при 35°C некоторые колонии демонстрировали появление ореола зон просветления. Клоны, обладавшие наибольшим радиусом зон просветления, были отобраны для дальнейших исследований.

Измерение ингибирующих свойств метаболитов в жидкой культуре

Измерение ингибирующих свойств проводилось как для суспензий отобранных бактерий-ингибиторов, так и для ростовых сред, полученных в результате их культивации в течение 48 часов в среде YTP при 35°C, стерилизованных методом стерильной фильтрации с использованием шприцевых фильтров с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). Бактерии-ингибиторы и их ростовые среды были разведены методом двукратных серийных разведений в плашке 96-луночного планшета в среде YTP с клетками *S. aureus* с оптической плотностью 0.03 ОЕ₆₀₀. После 16 часовой инкубации при 35°C и перемешивании 200 об/мин рост *S. aureus* анализировался путем измерения флуоресценции GFP ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}=488/513$ нм), а также оптической плотности при длине волны 600 нм с использованием прибора Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

Очистка и идентификация действующих веществ *Pseudomonas aeruginosa*

Ростовая среда, полученная в результате кокультивации отобранного штамма *P. aeruginosa* и *S. aureus*, была проэкстрагирована хлороформом и фракционирована с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 μ Bondapak 10 μ m 3.9x300 (Waters, США) в градиенте 0-80% ацетонитрила (Химмед, Россия). Полученные в результате фракции были проанализированы на наличие ингибирующей активности после выпаривания ацетонитрила. Фракции 1-7, продемонстрировавшие наибольший уровень активности, были проанализированы

методом хромато-масс-спектрометрии с использованием прибора ультравысокого разрешения Q-TOF Maxis с ячейкой HDC (Bruker Daltonik, Германия), оборудованного источником ионизации по методу электросперей. Программное обеспечение otofControl (версия 3.4, Bruker Daltonics, США) и Compass Data Analysis (версия 4.2, Compass для otofSeries версия 1.7, Bruker Daltonics, США) было использовано для получения и обработки данных. Параметры источника ионизации при скорости потока 3 мкл/мин составляли: напряжение 500/4500 В, скорость потока газа-носителя 4 л/мин, температура 200°C, давление небулайзера 0.3 бар. Перед экспериментом масс-спектрометр был откалиброван с использованием смеси ESI-L (Agilent Technologies, США), суммарное стандартное отклонение составляло менее 0.2 ppm. Пики были отобраны для фрагментации в автоматическом MS/MS режиме с использованием следующих параметров: диапазон масс 50-2000 m/z, частота 2 Гц, количество прекурсоров 50, отобранных по максимальной интенсивности.

16S рРНК секвенирование бактерий

Популяции капель до и после отбора подвергались лиофилизации с использованием прибора FreeZone (Labconco, США). Суммарная ДНК была выделена с использованием набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США). Библиотеки ампликонов были получены с использованием праймеров 341F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) и 801R (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) согласно методике 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B, Illumina, США). Секвенирование библиотек и анализ полученных данных производился с использованием генетического анализатора MiSeq (Illumina, США) и набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов, Illumina, США) согласно инструкции производителя. Уровень фона 300 прочтений соответствовал количеству прочтений в контрольном образце без капель. Полученное количество прочтений для каждого рода бактерий было нормировано на общее количество прочтений в образце. Специфическое обогащение было рассчитано как отношение нормированного количества прочтений после и до отбора с учетом сигнала фона.

Полногеномное секвенирование бактерий

Популяции капель до и после отбора подвергались лиофилизации с использованием прибора FreeZone (Labconco, США). Суммарная ДНК была выделена с использованием набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США). Полногеномная амплификация проводилась с использованием набора EPLI-g Single Cell Kit (Qiagen, США). Библиотека фрагментов была получена с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode Adapters 1–16 Kit (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование библиотек производилось с использованием генетического анализатора Ion Proton (Life Technologies, США) и наборов ION PI HIQ Sequencing 200 Kit and Ion PI™ Chip Kit v2 (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Полученные результаты подвергались биоинформатическому анализу с использованием двух различных алгоритмов Metaphlan2 и CLARK с целью таксономической классификации видов бактерий-ингибиторов (Приложение 3). Полученное количество прочтений для каждого вида бактерий было нормировано на общее количество прочтений в образце. Уровень фона 0.005%, соответствовавший нормированному количеству прочтений в контрольном образце без капель, был добавлен к каждому нормированному количеству прочтений. Специфическое обогащение было рассчитано как отношение нормированного количества прочтений после и до отбора с учетом фона.

Результаты и обсуждение

Создание микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга

биокаталитической и антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии

Для создания универсальной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга был использован принцип *in vitro* компартиментализации в каплях двойной эмульсии. В отличие от предыдущих работ, разработанная платформа (Рис. 19) основана на микрофлюидной генерации капель, что обеспечивает их монодисперсность. Монодисперсность эмульсии, в свою очередь, приводит к одинаковым концентрациям реагентов, а также одинаковым условиям проведения реакций в каплях, что позволяет многократно снизить соотношение сигнал/шум в процессе скрининга т.е. повысить чувствительность и специфичность отбора. Микрофлюидная генерация эмульсии позволяет обеспечить мягкие условия инкапсуляции, что позволяет использовать ее для живых клеток, а контролируемые условия генерации позволяют заключать в каплях эмульсии заданное количество клеток.

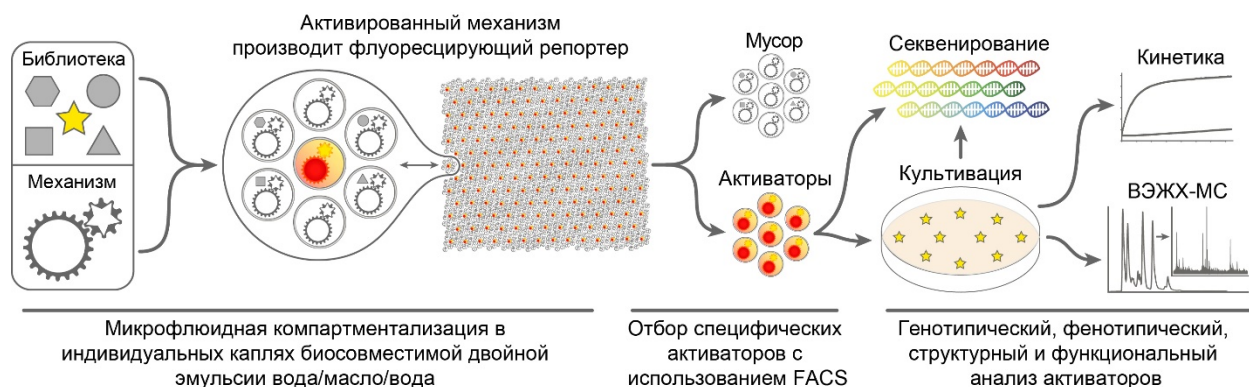


Рис. 19. Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга в каплях микрофлюидной двойной эмульсии.

Для проведения скрининга в каплях микрофлюидной двойной эмульсии необходимо подобрать некий высоко специфический механизм, активируемый искомым фенотипом. Активированный механизм должен приводить к изменению флуоресценции, используемой в качестве аналитического сигнала. Микрофлюидная

компарментализация библиотеки фенотипов вместе с механизмом в каплях биосовместимой двойной эмульсии вода/масло/вода приводит множеству индивидуальных микрокомпарментов, в которых может происходить активация механизма, приводящая к изменению флуоресценции. После этого фенотипы-активаторы подвергаются отбору с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS), после чего они могут быть проанализированы напрямую без культивации методом широкомасштабного секвенирования (что принципиально важно в случае некультивируемых и медленно растущих микроорганизмов) или подвергнуты культивации. Культивируемые фенотипы-активаторы в последствии подвергаются генотипическому, фенотипическому, структурному и функциональному анализу.

Генерация двойной микрофлюидной эмульсии проводилась методом последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах (Рис. 20). Контроллер давления осуществлял подачу сжатого воздуха в 4 резервуара с жидкостями: водной фазой, несущей библиотеку фенотипов; водной фазой, несущей механизм; масляной фазой и внешней водной фазой. Давление сжатого воздуха вызывало течение жидкостей по тефлоновым трубочкам, ведущим в чип. Скорость течения жидкостей определялась контроллерами потока, соединенными петлей обратной связи с контроллером давления, таким образом, контроллер автоматически поддерживал заданную скорость потока за счет увеличения или уменьшения давления в резервуарах. Непосредственно перед входом в чип потоки водных фаз, несущих библиотеку фенотипов и механизм, соединялись и попадали в гидрофобизированный чип. В гидрофобном чипе поток объединенной внутренней водной фазы разбивался на отдельные капли в потоке масляной фазы, и полученная в результате однократная эмульсия вода/масло попадала в гидрофильный чип. В гидрофильном чипе поток эмульсии вода/масло разбивался на отдельные капли двойной эмульсии вода/масло/вода в потоке внешней водной фазы.

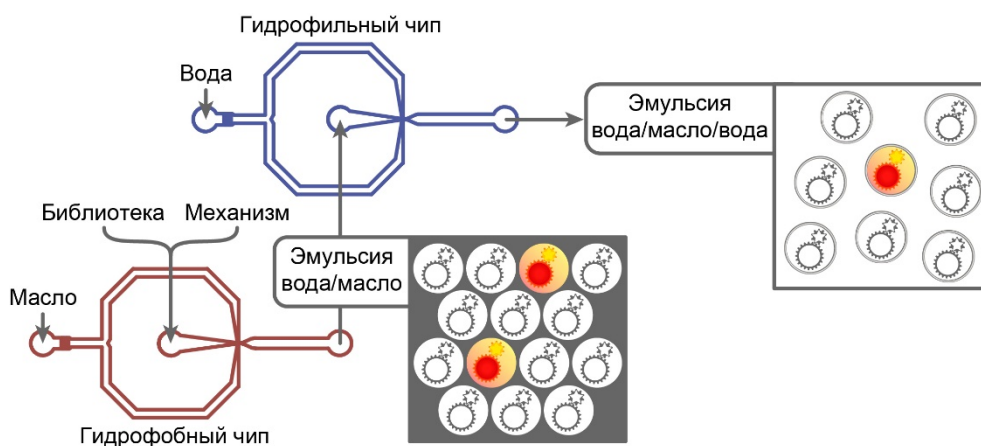


Рис. 20. Генерация двойной микрофлюидной эмульсии методом последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах.

Поверхности каналов чипов должны иметь более высокую смачиваемость по отношению к дисперсионной среде, в противном случае генерация эмульсии нестабильна. Для химической модификации были использованы гидрофобизирующие реагенты (трихлороктадецилсилан или Aquapel), а для стабилизации гидрофильной поверхности был использован поливиниловый спирт. В качестве масляной фазы было использовано минеральное масло или фторуглеродное масло. Минеральное масло обладает высокой вязкостью, снижает транспорт газов и приводит к флотирующей эмульсии, что затрудняет его применение. В свою очередь фторуглеродные масла HFE-7500 и FC-40 обладали значительно меньшей вязкостью, что позволило использовать их для генерации двойной эмульсии диаметром 20 мкм. Высокая газопроницаемость фторуглеродных масел была использована для скрининга, совмещенного с культивацией, а высокая плотность приводила к образованию седиментирующей эмульсии, более удобной для отбора. Для того чтобы обеспечить биосовместимость эмульсии, были использованы высокомолекулярные поверхностно-активные вещества, обладающие чрезвычайно низкой способностью к межфазному транспорту: Abil EM 180 для минерального масла, Pico-Surf 2 для фторуглеродного масла и Pluronic F-127 для внешней водной фазы. Разрушение отобранной после FACS эмульсии происходило за счет ее высыхания на чашке с питательной средой, что приводило к $90 \pm 20\%$ выживаемости дрожжевых клеток.

Для микрофлюидной компартиментализации были использованы микрофлюидные чипы из полидиметилсилоксана, полученные с использованием технологии мягкой литографии (Рис. 21). Использование двух чипов для однократной эмульсификации оказалось значительно технологичнее, чем одного чипа для генерации двойной эмульсии, ввиду их взаимозаменяемости и существенно более простой технологии химической модификации. Разбиение потока дисперсной фазы происходило в самом узком месте чипа, где встречались потоки несмешивающихся жидкостей. Используемые чипы имели размер каналов 20 мкм и 60 мкм, что позволяло генерировать двойную микрофлюидную эмульсию диаметром 20-90 мкм. Уменьшение размеров каналов чипа приводит к увеличению производительности. Генерация микрофлюидной двойной эмульсии происходила с производительностью ≈ 25000 событий в секунду в чипе с размером каналов 20 мкм и ≈ 3000 событий в секунду в 60 мкм чипе.

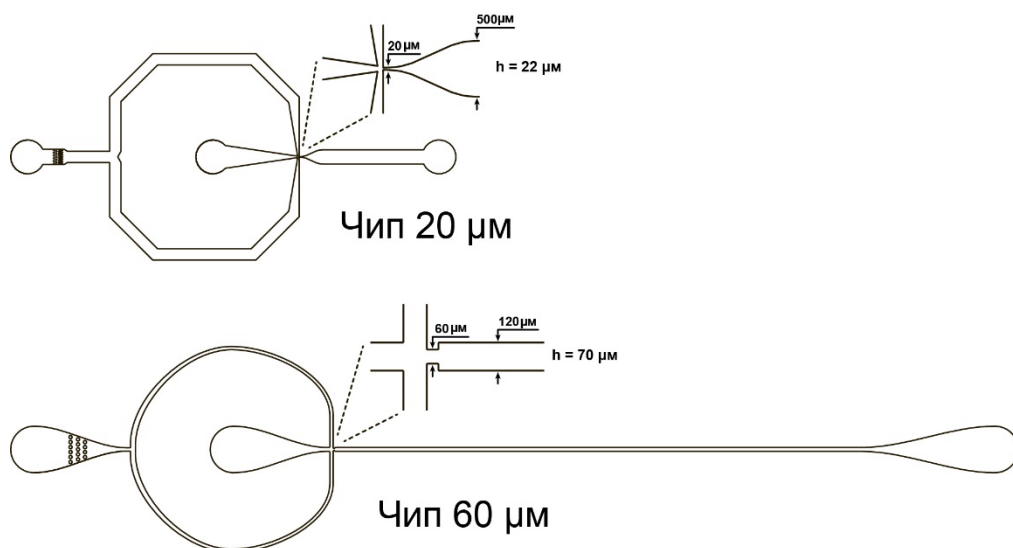


Рис. 21. Текстуры микрофлюидных чипов, использованных для скрининга биокаталитической и антимикробной активности.

Как уже упоминалось ранее, благодаря монодисперсности микрофлюидной эмульсии, заполнение ее капель дискретными объектами происходит в соответствии с распределением Пуассона (Рис. 22).

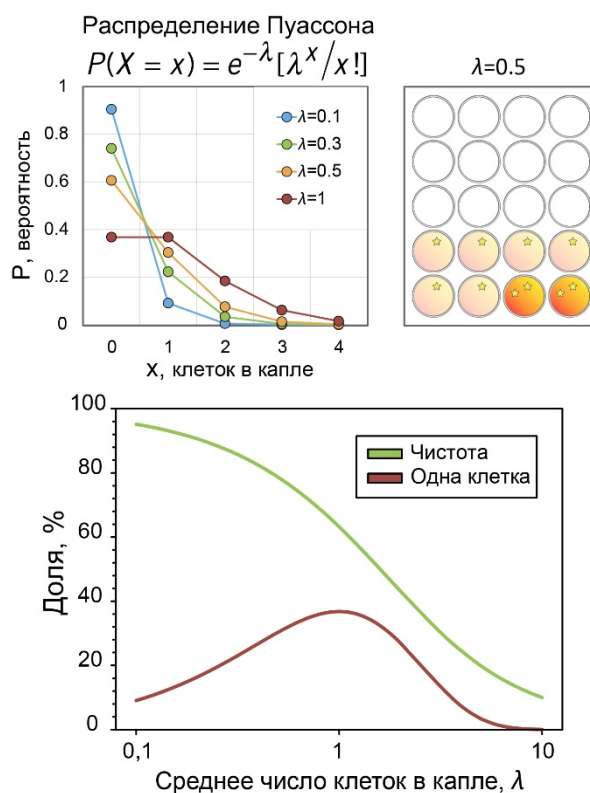


Рис. 22. Заполнение капель микрофлюидной эмульсии клетками.

Таким образом, чем ниже степень заполнения λ , тем выше чистота отбора за счет снижения вероятности попадания двух и более клеток в одну каплю. В то же время при $\lambda < 0.3$ доля заполненных капель стремительно падает, что снижает эффективность скрининга. Для $\lambda = 0.1$ капли, несущие одну клетку, составляют 95.1% от общего числа заполненных капель, тем не менее 90.5% капель при этом остаются пустыми. Таким образом, для достижения компромисса между чистотой и эффективностью скрининга наиболее оптимальным является диапазон $0.3 < \lambda < 0.7$. Для скрининга биокатализаторов была использована степень заполнения $\lambda = 0.5$, что соответствует максимальной чистоте отбора 78.7%. С другой стороны, в том случае если требуется, чтобы все капли были заполнены (что было использовано для клеток *S. aureus* в случае отбора антибиотической активности), необходимо использовать $\lambda \gg 1$. Для $\lambda = 10$, использованного для заполнения капель клетками *S. aureus*, доля пустых капель составляет $< 0.005\%$.

Скрининг биокаталитической активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии

Дрожжевой дисплей биокатализаторов и высокочувствительная детекция биокаталитической активности

Ранее для скрининга биокатализаторов в каплях за счет *in vitro* компартиментализации использовались подходы, основанные на *in vitro* транскрипции/трансляции [39], лизисе индивидуальных бактериальных клеток в каплях [112], а также бактериальном [41] и дрожжевом дисплее [8]. Из всех вышеупомянутых, дрожжевой дисплей представляет собой наиболее универсальный подход, так как позволяет обеспечить фолдинг сложных белков, образование правильных дисульфидных связей, а также обеспечить их гликозилирование, что было принципиально важно в случае рЧБуХЭ, продукция которой в активном виде возможна исключительно в эукариотических клетках.

Для того, чтобы иметь возможность впоследствии легко идентифицировать клетки, обладающие активностью, мы использовали красный флуоресцентный белок-репортер mCherry, в то же время необходимо, чтобы количество mCherry и фермента коррелировали. Для этого их экспрессия проводилась с использованием одного промотора, а последовательности mCherry и фермента были разделены “самопроцессирующимся” F2A пептидом, обеспечивающим одновременную продукцию mCherry и фермента с использованием одного мРНК транскрипта за счет процесса “пропуска” (skipping) рибосомы [227]. Таким образом, генетическая конструкция, использованная для дрожжевого дисплея биокатализаторов (Рис. 23А) содержала метанол-индуцибельный промотор алкогольоксидазы АОХ1, последовательность красного флуоресцентного белка-репортера mCherry, “самопроцессирующийся” F2A пептид, лидерный пептид человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) для внеклеточного транспорта, фермент, эпитоп гемагглютиниона (НА) для иммунофлуоресцентной детекции заякоренного фермента и последовательность SAG1, соединенную серин-глициновым линкером, обеспечивавшую заякорение фермента на дрожжевой клетке.

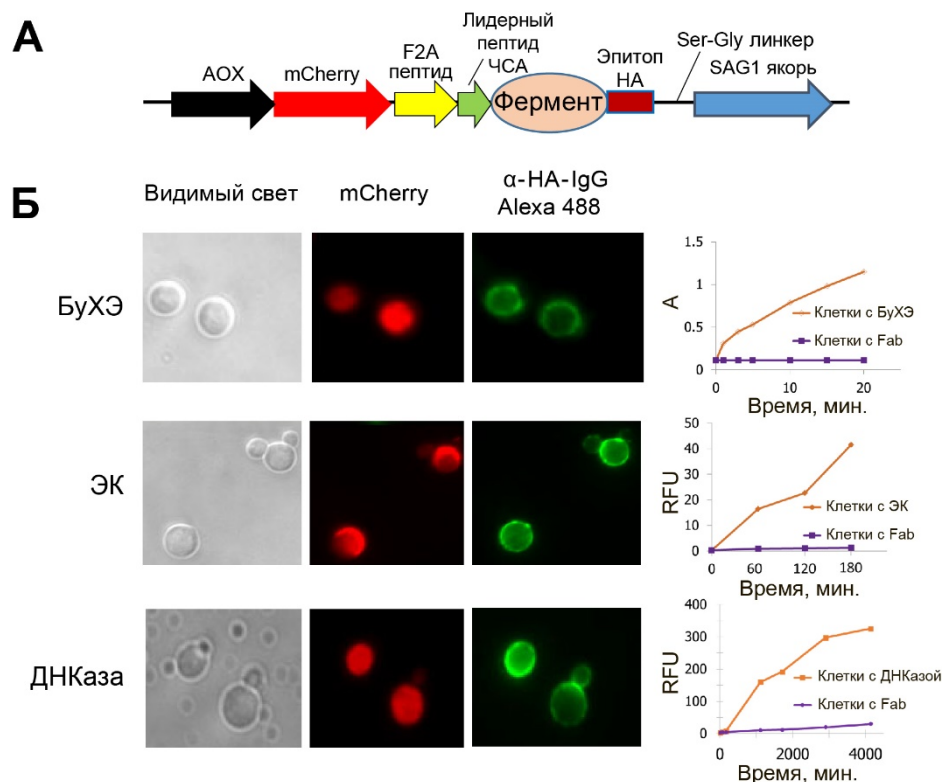
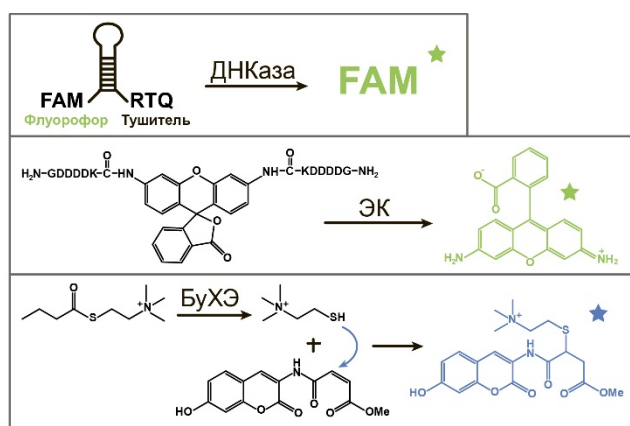


Рис. 23. Дрожжевой дисплей биокатализаторов.

Для демонстрации универсальности платформы были использованы три различных фермента демонстрирующие фосфодиэстеразную (дезоксирибонуклеаза I – ДНККаза), протеазную (энтеропептидаза – ЭК) и эстеразную (бутирилхолинэстераза – БуХЭ) активность (Рис. 23Б). Иммунофлуоресцентное окрашивание свидетельствовало о том, что все три фермента продуцировались в заякоренном виде (наблюдался ореол флуоресценции) на поверхности дрожжевых клеток. В то же время mCherry демонстрировал внутриклеточную локализацию (наблюдалась равномерная флуоресценция клеток). Дрожжи, продуцировавшие заякоренные ферменты, и контрольные дрожжи, продуцировавшие Fab-фрагмент антитела, были проанализированы на наличие биокаталитической активности с использованием соответствующих субстратов (реактива Элмана в случае БуХЭ, Gly-(Asp)⁴-Lys-нафтиламида в случае ЭК и FAM-AAAAAAAAACCCCCCATATAGCGCGTTTTTTT-RTQ1 в случае ДНККаза) и было показано, что все биокатализаторы продуцировались в активном виде.

Для проведения скрининга в каплях необходимо, чтобы продукт ферментативной реакции обладал высокой гидрофильностью (что исключает его транспорт через слой масла во внешнюю водную фазу), а также спектром

возбуждения/эмиссии флуоресценции, соответствующим возбуждающим лазерам и эмиссионным фильтрам клеточного сортера. Ввиду того, что дрожжи, несущие заякоренные ферменты, обладали красной флуоресценцией, для флуоресценции продукта был использован зеленый (530/30 нм) и голубой (450/50 нм) канал флуоресценции. Для трех ферментов были использованы разные флуорогенные субстраты (Рис. 24), действовавшие по принципу FRET-пары, нефлуоресцентного амида, и сопряженной реакции, в которой продукт классической реакции, катализируемой БуХЭ, вступал в реакцию с нефлуоресцентным субстратом с образованием флуоресцентного аддукта.



Фермент	Чистый фермент		Фермент, заякоренный на дрожжах			
	$k_{кат.}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{кат. набл.}, c^{-1}$	$K_M набл.}, \mu M$	$k_{кат.}/k_{некат.}$	Сигнал/фон через 24 ч
ДНКаза	8 ± 2	11 ± 3	6	13	550	33
ЭК	80 ± 20	4 ± 1	1.2	6	120	9.3
БуХЭ	780 ± 60	13 ± 4	120	16	85	6.5

Рис. 24. Схемы и кинетические константы ферментативных реакций, использованных для скрининга биокатализаторов в каплях.

Ферменты обладали каталитической эффективностью по отношению к данным флуорогенным субстратам, различавшейся приблизительно в 100 раз. Для суспензии клеток, несущих заякоренный биокатализатор, соотношение скоростей ферментативного и самопроизвольного гидролиза составляло от 550 до 85, что через сутки инкубации приводило к соотношению сигнал/фон от 33 до 6.5 при проведении реакции в лунках 384 луночной плашки. Иммунофлуоресцентное окрашивание и цитофлуориметрия с использованием флуоресцентных шаров, несущих стандартное количество флуорофора, показали, что на поверхности одной дрожжевой клетки

находится 7000 ± 3000 молекул биокатализатора, что позволило оценить ферментативные константы заякоренных биокатализаторов.

Эффективность отбора биокатализаторов из смеси активных и неактивных клеток

Для оценки эффективности скрининга биокатализаторов были использованы искусственные смеси активных (продуцирующих заякоренный фермент и красный флуоресцентный белок-репортер mCherry) и неактивных (продуцирующих Fab-фрагмент антитела и не имеющих флуоресцентного репортера) дрожжевых клеток (Рис. 25).

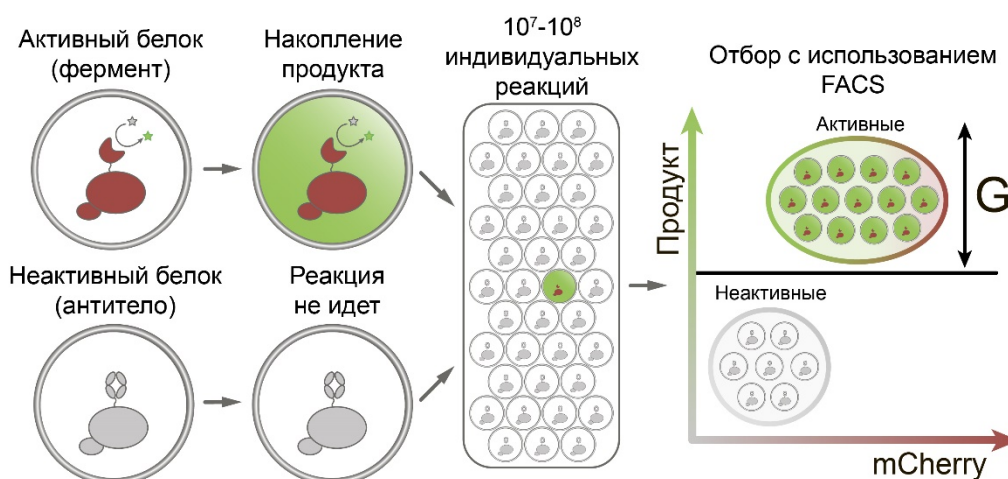


Рис. 25. Схема ультравысокопроизводительного скрининга биокатализаторов в каплях двойной эмульсии.

Компартментализация смеси активных и неактивных клеток вместе с флуорогенным субстратом в каплях микрофлюидной двойной эмульсии приводила к образованию двух популяций с различным уровнем флуоресценции продукта. Отбор капель, обладавших наибольшим уровнем флуоресценции, с использованием FACS приводил к обогащению активными клетками.

Микрофлюидная эмульсия обладала высокой монодисперсностью (Рис. 26), а накопление продукта реакции происходило исключительно в каплях, несущих активные дрожжевые клетки.

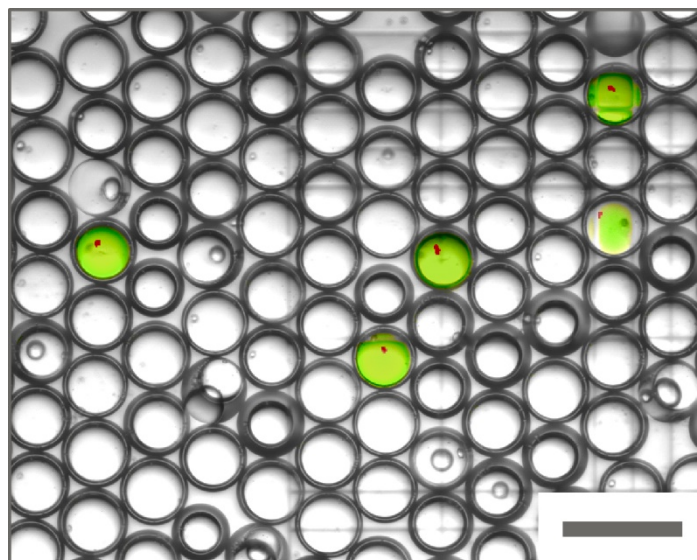


Рис. 26. Микроскопия смеси 1:10 активных и неактивных клеток. Изображение получено в результате наложения микроскопии видимого света, а также флуоресцентной микроскопии зеленой флуоресценции продукта ферментативной реакции и красной флуоресценции mCherry. Приведенная шкала составляет 100 мкм.

После протекания реакции в каплях с использованием FACS в режиме максимальной чистоты скрининга производился отбор популяции капель, обладавших высоким уровнем флуоресценции, с производительностью в диапазоне 10000-20000 событий в секунду. Отобранные капли высевались на чашки и через 2-3 дня наблюдалось образование дрожжевых колоний. Колонии, полученные из капель до и после отбора, перекальвались на чашки с метанолом, где происходила индукция экспрессии флуоресцентного репортера (Рис. 27). В результате наблюдалось эффективное обогащение каждого из биокатализаторов.

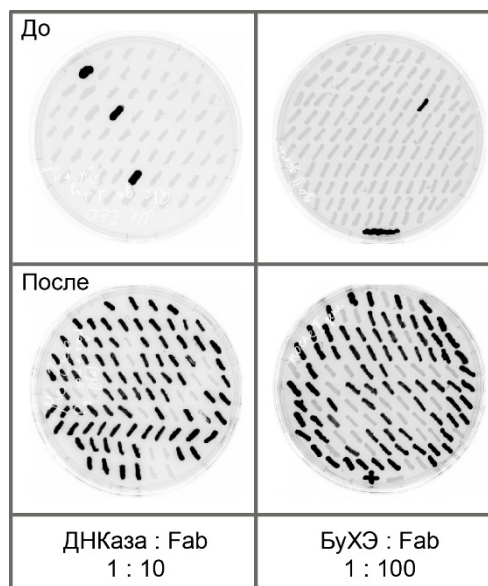


Рис. 27. Чашки, несущие колонии, регенерированные из капель до и после отбора с использованием FACS.

Для того чтобы определить, как эффективность скрининга зависит от соотношения активных и неактивных клеток, были проведены отборы биокатализаторов из смесей с различным соотношением активных и неактивных клеток в диапазоне 1:10-1:10⁵ (Рис. 28).

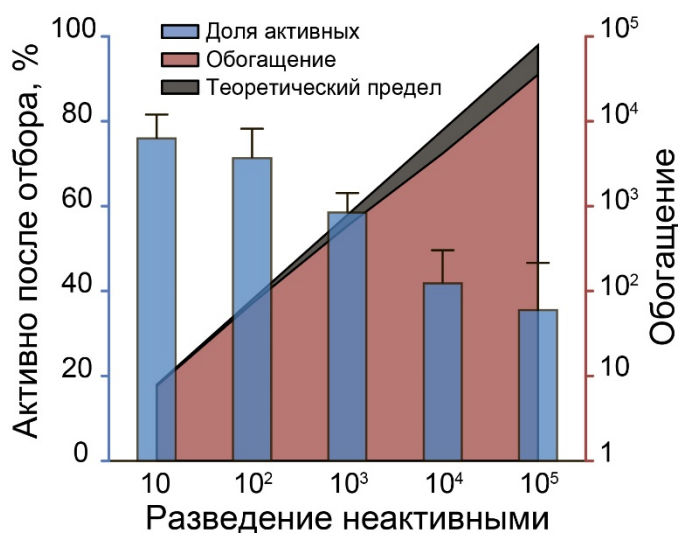


Рис. 28. Зависимость доли активных клеток, а также степени обогащения от разведения активных клеток неактивными.

Степень обогащения активных клеток из смеси с неактивными была близка к теоретическому пределу в случае разведений 1:10 и 1:100. Даже для разведения 1:10⁵

наблюдалось более 35% активных клонов после одного раунда отбора, что всего в 2 раза меньше, чем теоретический максимум.

Таким образом, для клеток, обладающих биокаталитической активностью, была показана чрезвычайно высокая эффективность отбора из смеси активных и неактивных клеток с использованием лишь одного раунда скрининга.

Селективность отбора биокатализаторов из смеси биокатализаторов с разной специфичностью или различным уровнем активности

Для проведения скрининга биокатализаторов из смеси с различной субстратной специфичностью мы использовали “искусственную библиотеку активностей”, представляющую собой смесь дрожжей, несущих по отдельности каждый из трех использованных ранее биокатализаторов, разведенную в 100 раз неактивными клетками. Таким образом, доля клеток каждого типа активности составляла менее 1% в смеси. “Библиотека активностей” была отобрана на каждый тип активности отдельно с использованием соответствующего флуорогенного субстрата (Рис. 29).

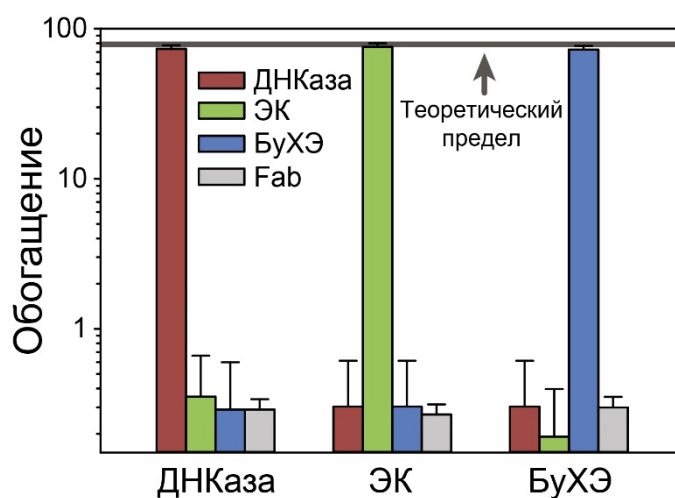


Рис. 29. Специфический отбор каждого из биокатализаторов из смеси ферментов.

Каждый из типов биокаталитической активности был селективно отобран на заданную ферментативную активность с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму, без обогащения клетками, несущими другой тип активности.

Для того чтобы изучить как эффективность и селективность отбора зависит от активности биокатализатора, была использована библиотека БуХЭ. Библиотека имела представительность порядка 3×10^5 вариантов и содержала 5 подряд идущих аминокислотных замен в последовательности БуХЭ дикого типа (WT) 284-TPLSV-288 ацил-связывающей петли, расположенной недалеко от активного центра фермента (Рис. 30А). Введение аминокислотных замен существенно снизило активность клонов. Средняя активность библиотеки составляла менее 0.5% от активности БуХЭ дикого типа. Дрожжи, несущие заякоренные мутанты БуХЭ, были инкапсулированы вместе с флуорогенным субстратом в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Полученные в результате капли обладали различным уровнем флуоресценции и были отобраны с использованием трех гейтов G1-G3 с различным уровнем флуоресценции $G1 > G2 > G3$ (Рис. 30Б).

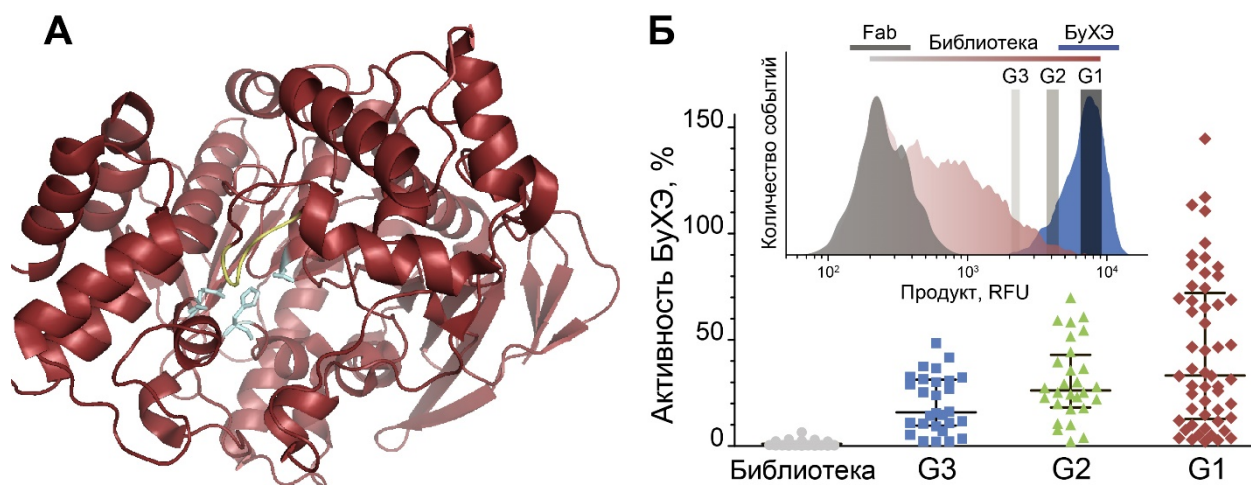


Рис. 30. (А) Кристаллическая структура БуХЭ. Каталитическая триада S198-N438-E325 обозначена серым цветом, мутированная последовательность 284-TPLSV-288 обозначена желтым. (Б) Активность индивидуальных клонов библиотеки до отбора и после отбора с использованием гейтов G1-G3 с различным уровнем флуоресценции капель. Врезка демонстрирует распределение капель, несущих контрольные клетки (серый), библиотеку (красный), а также БуХЭ дикого типа (синий) по флуоресценции, а также уровень флуоресценции гейтов G1-G3, использованных для отбора.

Анализ активности индивидуальных клонов, полученных до и после отбора, свидетельствует об эффективности отбора в случае использования каждого из трех гейтов. В то же время клоны, отобранные из капель с наибольшим уровнем

флуоресценции, обладали наибольшим уровнем активности. Таким образом, было качественно показано, что разработанная платформа может быть использована для отбора биокатализаторов с разным уровнем одинаковой активности.

Для того чтобы количественно оценить эффективность отбора биокатализаторов с различным уровнем одинаковой активности, были использованы три клон с различным уровнем ферментативной активности, отобранных с помощью гейтов G1-G3. Cl 13, отобранный из G3, обладал незначительным уровнем активности (1.1% от БуХЭ дикого типа), демонстрировал приблизительно в 2 раза большую активность в 384 луночной плашке по сравнению с контрольными клетками. Cl 8 и cl 3 были отобраны из G2 и G1 соответственно и обладали 5.4 и 55% от активности БуХЭ дикого типа. Компарментализация cl 3, cl 8, cl 13 и контрольных клеток вместе с субстратом в каплях приводила к образованию четырех популяций с разным уровнем флуоресценции, соответствовавших разным уровням накопления продукта: cl 3 – много, cl 8 – средне, cl 13 – мало (Рис. 31).

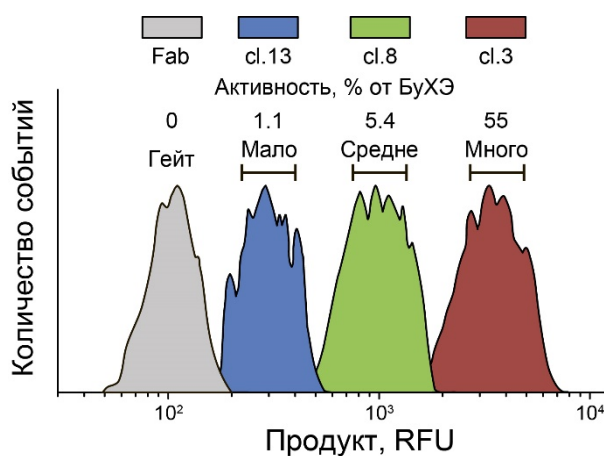


Рис. 31. Мутанты БуХЭ с различным уровнем активности приводят к образованию капель с различным уровнем флуоресценции.

Мутанты БуХЭ cl 3, cl 8 и cl 13, а также контрольные клетки (Fab) были смешаны друг с другом в равном соотношении и в соотношении 1:1:1:1000 и отобраны с использованием гейтов «Много», «Средне», «Мало» (Рис. 31), соответствовавших высокой, средней и низкой флуоресценции продукта. Для соотношения 1:1:1:1 мы наблюдали специфическое обогащение каждого из

мутантов БуХЭ с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму (Рис. 32А, В). В то же время в случае соотношения 1:1:1:1000 обогащение cl 3, cl 8 также происходило с эффективностью, близкой к максимальной, в то время как эффективность обогащения cl 13 была приблизительно на порядок ниже (Рис. 32Б, Г).

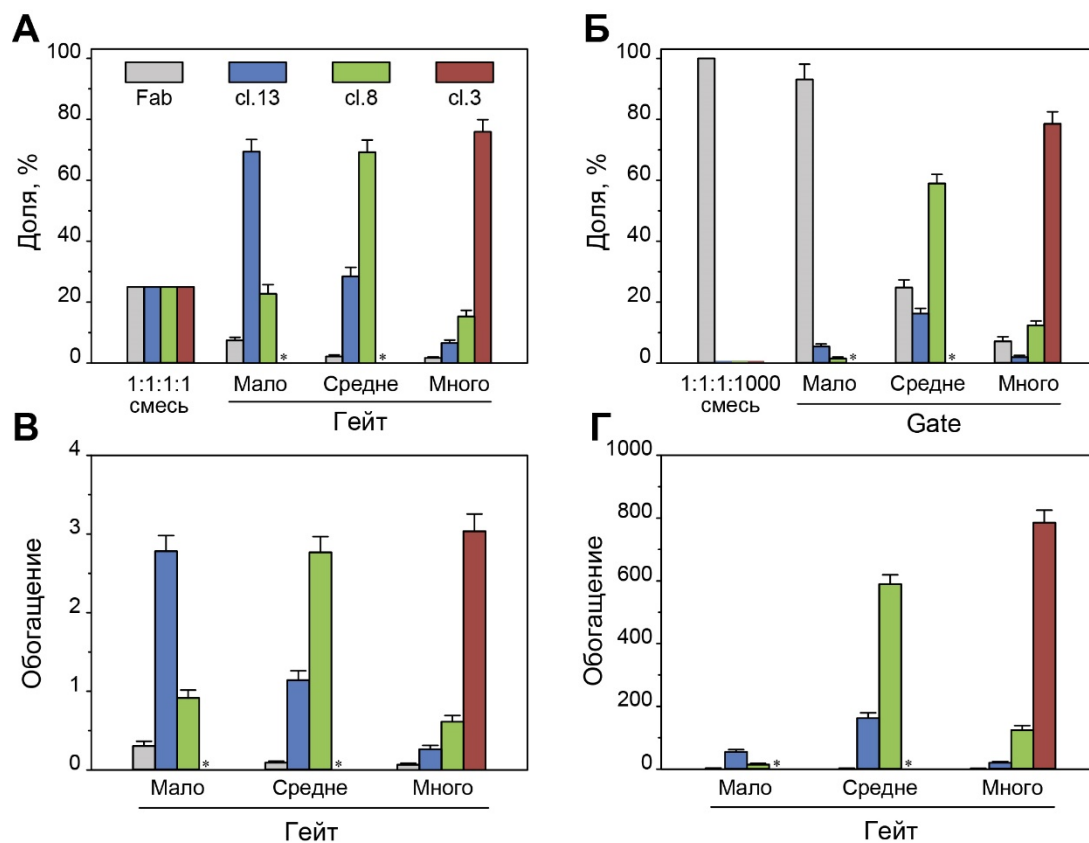


Рис. 32. Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности. Доля мутантов до и после отбора (А) для смеси 1:1:1:1 и (Б) для смеси 1:1:1:1000, а также соответствующее обогащение (В) и (Г). Звездочка означает, что данный клон (cl 3) не был идентифицирован в отобранной популяции.

Таким образом, концентрация клеток, обладающих в 384 луночной плашке активностью в 2 раза выше, чем у контрольных клеток, должна быть не менее 0.1%, чтобы они могли быть отобраны за 1 раунд скрининга. В то же время в случае клеток, обладающих более чем в 5 раз большей активностью по сравнению с контролем, эффективный отбор за 1 раунд скрининга возможен даже в том случае, если их популяция составляет менее 0.1%. В случае высокоактивных ферментов ДНКазы, ЭК и БуХЭ дикого типа, доля активных клеток может составлять менее 0.001%.

Следует также отметить, что отбор капель, обладающих средней и низкой флуоресценцией, приводит к высокоэффективному исключению высокоактивного cl 3, что может быть использовано для идентификации мутаций, приводящих к потере активности.

Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ

Для отбора мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ, была использована описанная ранее библиотека БуХЭ. Дрожжевые клетки, несущие мутанты БуХЭ, инкубировались с ФОТ параоксоном (РОХ) или кумариновым аналогом зомана (GD_C) после чего отмывались от избытка ФОТ и подвергались скринингу на наличие остаточной активности БуХЭ. После 1 раунда скрининга были отобраны два мутанта, демонстрировавших устойчивость к ингибированию РОХ (cl 14 и cl 15), и шесть мутантов (5 копий мутанта cl 19 и одна cl 14) с повышенной устойчивостью к GD_C. Для того чтобы определить, чем обусловлена наблюдаемая устойчивость, эти мутанты были секвенированы (Таблица 2) и были получены в чистом виде в клетках млекопитающих линии FreeStyle™ 293-F для проведения кинетических исследований.

Таблица 2. Последовательности замен в ацил-связывающей петле мутантов БуХЭ, использованных в работе.

БуХЭ	Последовательность 284-TPLSV-288	Активность, относительно WT, %
WT	ThrProLeuSerVal	100
cl 3	ProProLeuArgSer	1.1
cl 8	GlnSerIleHisIle	5.4
cl 13	AsnLysSerAsnVal	55
cl 14	HisThrIleHisGly	51
cl 15	ProSerHisSerGly	44
cl 19	AsnHisIleSerGly	21

Взаимодействие БуХЭ дикого типа и ФОТ (Рис. 33) приводит к быстрой (с высокой бимолекулярной константой скорости k_1/K_i) и необратимой ($k_2 \approx 0$) инактивации БуХЭ за счет фосфорилирования S198 в активном центре.

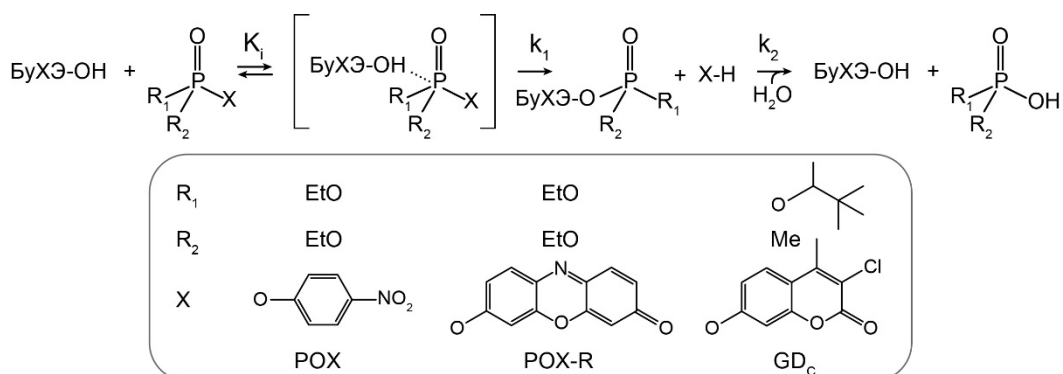


Рис. 33. Схема взаимодействия БуХЭ и ФОТ, а также структурные формулы использованных ФОТ. K_i – константа ингибирования, k_1 – константа скорости фосфорилирования, k_2 – константа скорости самореактивации.

В отличие от БуХЭ дикого типа (WT), c1 14 и c1 15 демонстрировали наличие остаточной активности даже в случае продолжительного ингибирования POX (Рис. 34А). Более того, в отличие от WT, c1 14 и c1 15 демонстрировали каталитический гидролиз ФОТ, который был идентифицирован с использованием флуоресцентного аналога POX-R (Рис. 34Б). После быстрой стадии ковалентной модификации c1 14 и WT, приводящей к выделению стехиометрического количества резорфина, WT остается полностью модифицированным в то время как c1 14 продолжает медленно реагировать с новыми молекулами POX-R, что в итоге приводит к полному гидролизу POX-R. Таким образом, мутанты c1 14 и c1 15 приобретали новую параоксоназную каталитическую активность за счет возникновения самореактивации ($k_2 > 0$).

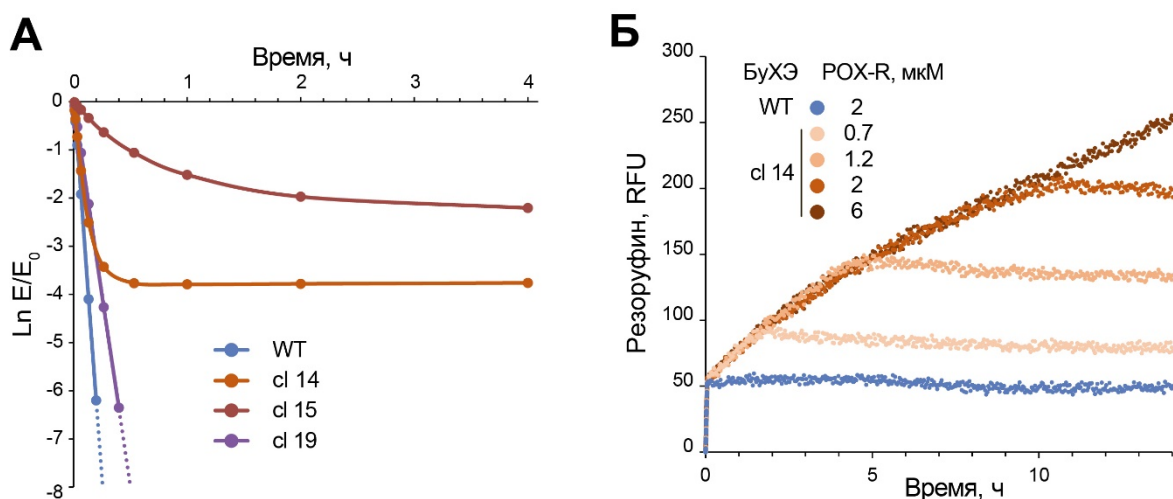


Рис. 34. (А) Кинетика ингибирования параоксоном БуХЭ дикого типа (WT), мутанта cl 19, отобранного на GD_C, и мутантов cl 14 и cl 15, отобранных на устойчивость к РОХ. (Б) Мутант cl 14, в отличие от WT, демонстрировал каталитический гидролиз РОХ-R. Концентрация обоих ферментов 0.45 мкМ.

В отличие от cl 14, обладавшего высокой реакционной способностью по отношению к РОХ, сопоставимой с WT, cl 15, также демонстрировавший каталитический гидролиз РОХ-R, обладал значительно более низкой скоростью взаимодействия с РОХ (Таблица 3).

Таблица 3. Кинетические константы БуХЭ дикого типа (WT) и мутантов, отобранных на устойчивость к РОХ и GD_C.

ФОР	РОХ				GD _C			
	WT	Отобранные		Контроль	WT	Отобранные		Контроль
БуХЭ		cl 14	cl 15	cl 19		cl 14	cl 19	cl 15
$k_1/K_i \times 10^{-1}, M^{-1}c^{-1}$	290±30	260±40	25±4	140±20	3±1	0.5±0.1	0.05±0.01	2.0±0.5
$k_2 \times 10^4, c^{-1}$	-	1.0±0.1	1.1±0.1	-	-	-	-	-

Мутанты, отобранные на устойчивость к GD_C, не обладали каталитическим гидролизом GD_C, что, по-видимому, было связано с чрезвычайно быстрым старением аддуктов зомана ($\tau_{1/2} < 1$ минуты) по сравнению с РОХ ($\tau_{1/2} = 8.6$ часов), наблюдаемым для WT чБуХЭ [228]. В свою очередь возникновение повышенной устойчивости мутанта cl 19, отобранного на устойчивость к GD_C, была связана с более чем 60 кратным снижением реакционной способности по отношению к GD_C.

Таким образом, в результате скрининга относительно небольшого разнообразия мутантов БуХЭ, за один раунд отбора из библиотеки представительностью порядка 3×10^5 , были отобраны варианты фермента, демонстрировавшие значительно более высокую устойчивость по отношению к ингибированию ФОТ. Причем в случае РОХ были *de novo* созданы мутанты БуХЭ, обладающие новой каталитической активностью. В результате были получены новые каталитические антитоды на основе стехиометрического антитода БуХЭ.

В отличие от классических методов рационального дизайна, направленного мутагенеза и кантово-механических расчётов, использование микрофлюидной платформы скрининга, впервые более чем за 20 лет поиска, позволило одновременно обнаружить несколько аминокислотных позиций БуХЭ, приводящих к возникновению каталитического гидролиза ФОТ.

Улучшение фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера

Создание генетических конструкций нового поколения для высокоэффективной продукции 4рчБуХЭ

Как уже упоминалось ранее, проблема быстрого выведения рчБуХЭ представляет высокую важность, так как основные источники рчБуХЭ – растения и молоко трансгенных животных приводят к продукции мономерной и димерной БуХЭ, имеющей чрезвычайно быстрый период полувыведения ($\tau_{1/2} \approx 2$ мин). Для решения этой проблемы был использован подход, основанный на *in vivo* тетрамеризации рчБуХЭ (Рис. 35). В отличие от предыдущих работ, в которых увеличение доли тетрамерной рчБуХЭ (4рчБуХЭ) достигалось за счет котрансфекции генетической конструкцией, приводящей к продукции пролин-богатого пептида тетрамеризации PRAD (GI), в данной работе были созданы вектора нового поколения GII, обеспечивающие продукцию исключительно 4рчБуХЭ. Полной тетрамеризации удалось добиться за счет экспрессии под одним высокоэффективным синтетическим промотором hEF/HTLV гена пролин-богатого пептида тетрамеризации PRAD, участвующего в естественном процессе

тетрамеризации 4рчБуХЭ, и гена БуХЭ. Последовательности PRAD-пептида и БуХЭ были разделены последовательностью “самопроцессирующегося” F2A пептида, приводящего к трансляции избытка PRAD-пептида по отношению к БуХЭ с использованием единого мРНК транскрипта [229]. Для увеличения уровня экспрессии в генетические конструкции были введены последовательности связывания с ядерным матриксом (MAR), позволяющие повысить продукцию целевого белка, как за счет увеличения уровня экспрессии расположенного в непосредственной близости гена, так и за счет большей стабильности его экспрессии клоном-продуцентом [230]. Так как комплекс 4рчБуХЭ состоит из 4 субъединиц рчБуХЭ и 1 PRAD-пептида, в векторах GII и GIII PRAD-пептид продуцируется в избытке по отношению к рчБуХЭ, что было использовано для увеличения продукции 4рчБуХЭ за счет трансфекции клонов-продуцентов GIII с максимальным уровнем продукции плазмидой pBudCE/EF/BChE+Neo, несущей дополнительные копии БуХЭ.

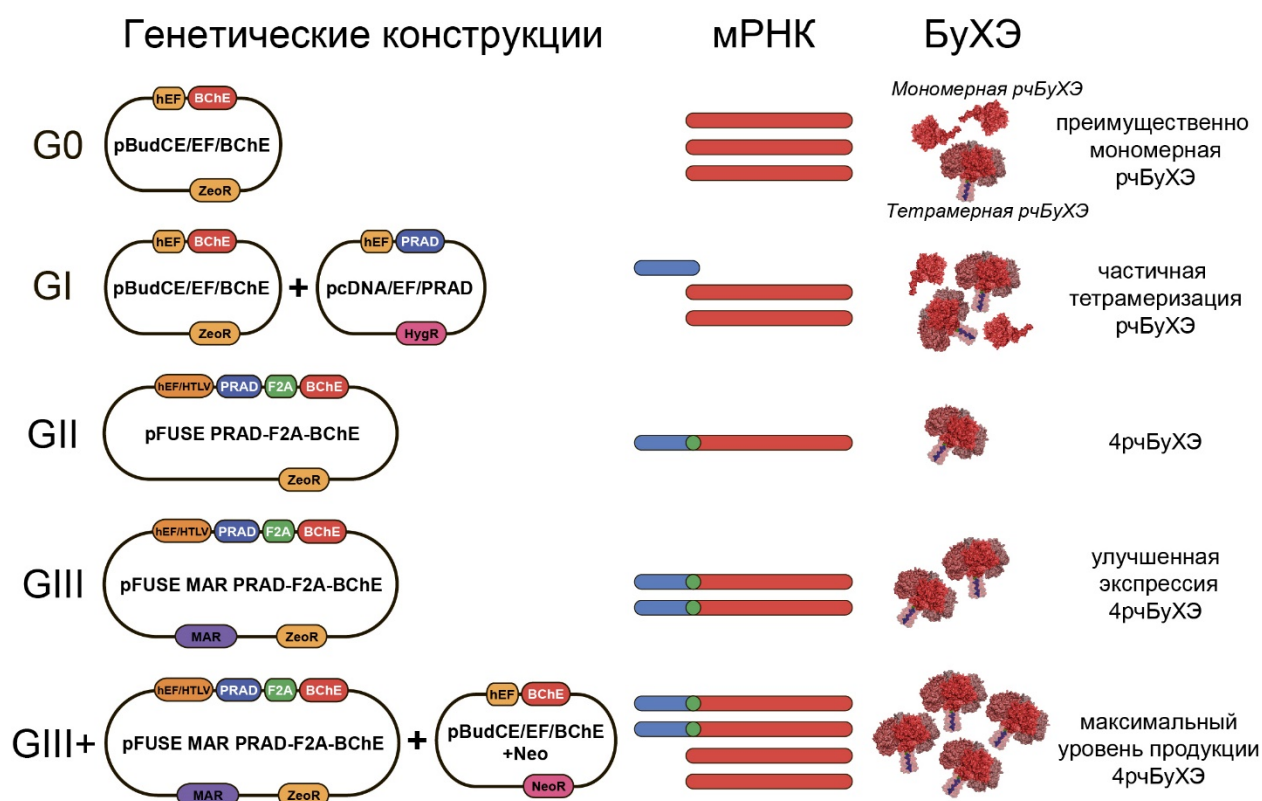


Рис. 35. Схема, иллюстрирующая основные принципы, заложенные в основу создания генетических конструкций нового поколения (GII, GIII и GIII+), обеспечивающих продукцию рчБуХЭ исключительно в естественной тетрамерной форме.

Клетки линии СНО были трансфицированы векторами G1 и GII. Нативный ПААГ-электрофорез и последующее окрашивание на наличие бутирилхолинэстеразной активности по методу Карновского [231] свидетельствовали о том, что GII, в отличие от G1, приводит к продукции исключительно 4рчБуХЭ (Рис. 36А). Для создания векторов GIII были использованы, ранее предсказанные *in silico*, наиболее эффективные последовательности MAR 1-68 и X-29 [230]. Ранее было показано, что котрансфекция последовательностями MAR позволяет увеличивать уровень экспрессии целевого гена [232]. Для того чтобы оценить, может ли котрансфекция последовательностями MAR 1-68 и X-29 повысить продукцию 4рчБуХЭ, для каждого MAR были использованы два варианта трансфекции: с использованием только вектора GIII (MAR цис) и с использованием котрансфекции GIII+MAR (MAR цис+транс). Трансфекция векторами GIII приводила к более чем трехкратному увеличению уровня продукции 4рчБуХЭ, в то же время, в отличие от предыдущей работы [232], котрансфекция MAR цис+транс была менее эффективна, чем MAR цис (Рис. 36Б). Использование MAR 1-68 позволяет значительно повысить средний уровень продукции 4рчБуХЭ индивидуальными клонами-продуцентами, в то время как MAR X-29 позволяет получить клоны-продуценты с более высоким уровнем продукции 4рчБуХЭ.

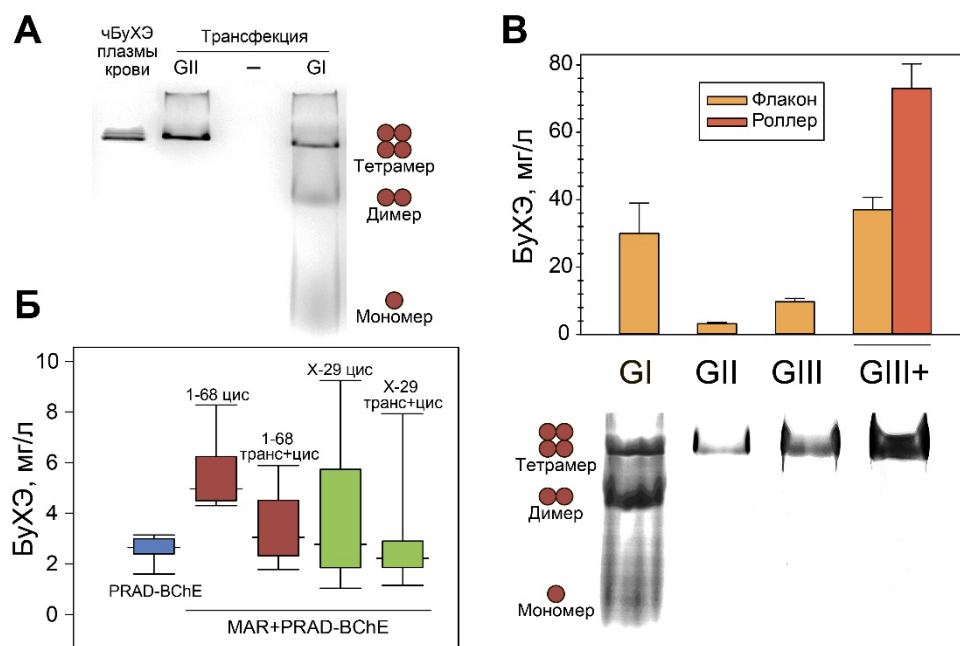


Рис. 36. (А) Трансфекция генетической конструкцией GII приводит к продукции исключительно 4рчБуХЭ. (Б) Анализ уровня продукции 4рчБуХЭ индивидуальными клонами-продуцентами, полученными в результате трансфекции и селекции с использованием векторов GII (PRAD-BChE), а также GIII с MAR 1-68 и X-29 в двух вариантах: цис и цис+транс. (В) Уровень продукции клонов-продуцентов рчБуХЭ поколений GI, GII, GIII и GIII+, а также олигомерный состав рчБуХЭ, полученной с их помощью.

Для дальнейшего увеличения уровня продукции 4рчБуХЭ, клон 11E11 с максимальным уровнем продукции, полученный в результате трансфекции рFUSE MAR_{X-29} PRAD-F2A-BChE (GIII), был трансфицирован вектором рBudCE/EF/BChE+Neo, в результате чего, после селекции генетицином, были получены клоны с большим уровнем продукции рчБуХЭ. Наибольшим уровнем продукции 4рчБуХЭ (более 70 мг/л) без примеси других олигомеров обладал клон 6 (GIII+), использованный в дальнейшем для наработки препарата 4рчБуХЭ (Рис. 36В).

Изучение фармакокинетических характеристик и профиля биораспределения 4рчБуХЭ, а также влияния химического полисиалирования

Препарат 4рчБуХЭ был получен в результате очистки с использованием аффинной и ионообменной хроматографии и был использован для определения фармакокинетических характеристик 4рчБуХЭ. Прямое определение концентрации

экзогенной 4рчБуХЭ в плазме крови мыши возможно с высокой точностью благодаря низкому уровню эндогенной БуХЭ (2.0 ± 0.5 мкг/мл). Фармакокинетические характеристики выведения 4рчБуХЭ после внутривенного введения были рассчитаны с использованием двухкомпарментной модели (Рис. 37).

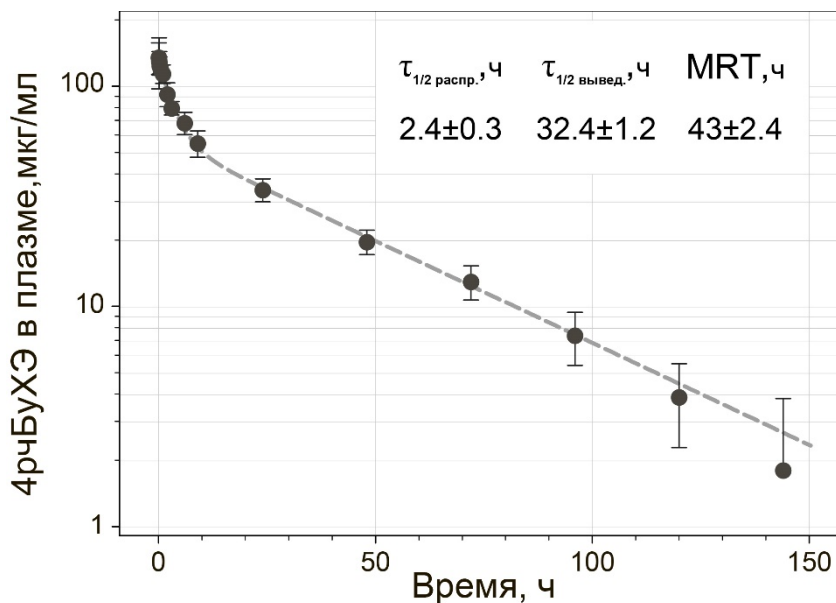


Рис. 37. Фармакокинетика выведения препарата 4рчБуХЭ после внутривенного введения.

4рчБуХЭ продемонстрировала фармакокинетические характеристики ($\tau_{1/2} = 32.4 \pm 1.2$ ч), улучшенные на три порядка по сравнению с препаратами мономерной и димерной рчБуХЭ ($\tau_{1/2} \approx 2$ мин), что позволяет использовать ее для терапии отравлений ФОТ.

Для изучения профиля биораспределения 4рчБуХЭ был получен препарат, меченый радиоизотопом ^{125}I . Накопление 4рчБуХЭ в органах оценивалось относительно его концентрации в крови (Рис. 38).

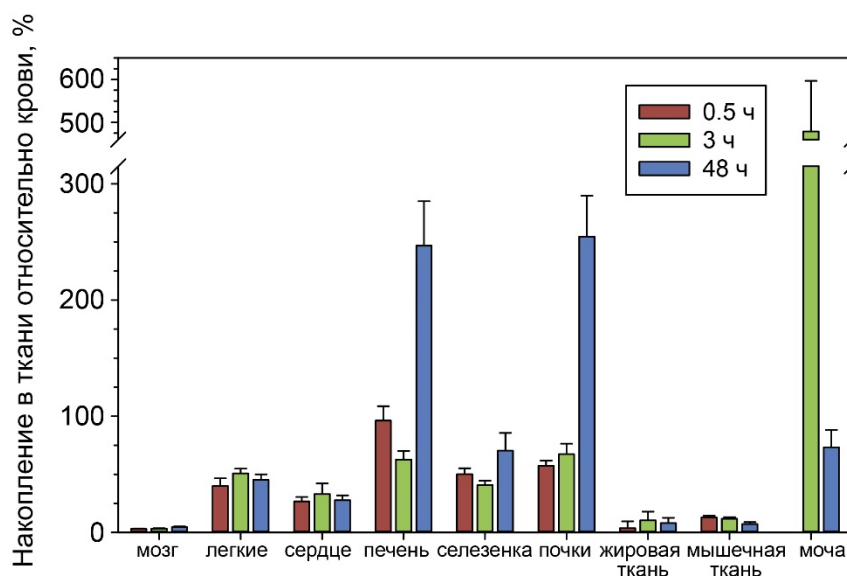


Рис. 38. Накопление препарата 4рчБуХЭ в органах и тканях спустя 0.5, 3 и 48 часов после внутривенного введения.

4рчБуХЭ демонстрировала низкое накопление в мозге, жировой, а также мышечной ткани. В первые часы после введения 4рчБуХЭ лишь незначительно накапливалась в печени. Спустя 48 часов 4рчБуХЭ накапливалась в печени и почках. Высокий уровень радиоактивности мочи свидетельствовал о том, что низкомолекулярные продукты биodeградации 4рчБуХЭ выводились почками.

Как уже было отмечено в литературном обзоре, ранее было показано [149], что химическое полисиалирование можно использовать в качестве альтернативной модификации, позволяющей многократно улучшить фармакокинетические характеристики рчБуХЭ. Для того чтобы сравнить фармакокинетические характеристики препаратов рчБуХЭ-ПСА и 4рчБуХЭ без химической модификации, а также оценить влияние химического полисиалирования на фармакокинетику конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА, были получены препараты рчБуХЭ (в виде смеси олигомеров GI), рчБуХЭ-ПСА, 4рчБуХЭ (GIII+) и 4рчБуХЭ-ПСА (Рис. 39А). Полисиалирование рчБуХЭ и 4рчБуХЭ протекало с эффективностью более 95% и приводило к образованию высокомолекулярных продуктов со степенью модификации порядка шести молекул ПСА в расчете на мономер БуХЭ. Полученные в результате конъюгаты рчБуХЭ-ПСА и 4рчБуХЭ-ПСА обладали низкой токсичностью и не вызывали гибель подопытных животных после внутривенного введения вплоть до дозы 1500 мг/кг, что в свою очередь может

свидетельствовать о потенциальной возможности увеличения защитного индекса более чем на порядок (вплоть до 40) относительно данных, полученных ранее для боевого отравляющего вещества VR [149].

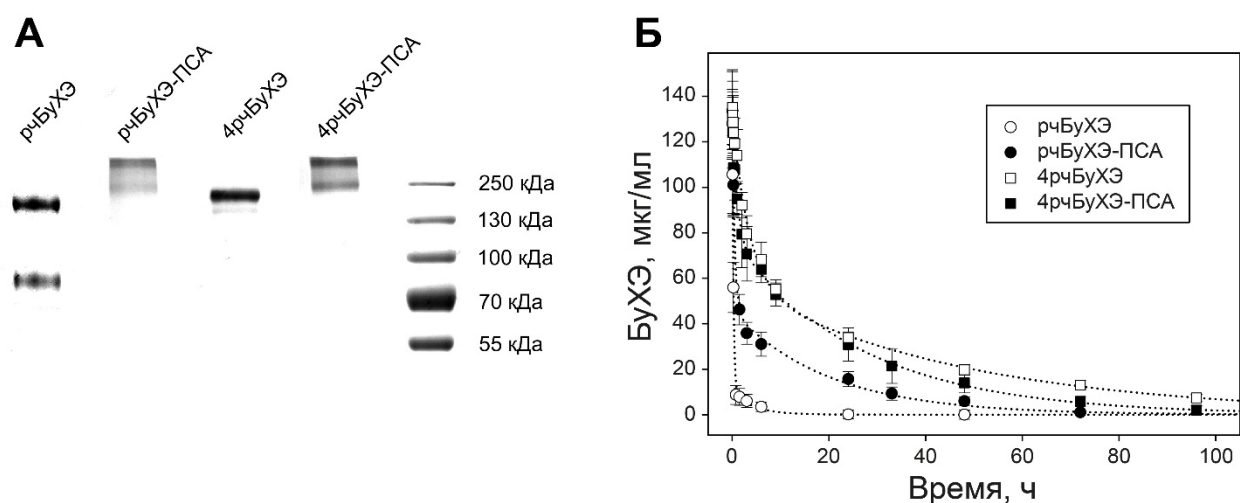


Рис. 39. (А) ПААГ электрофорез в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем Кумасси. (Б) Выведение препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА, 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА из крови после внутривенного введения.

Для оценки фармакокинетических характеристик полученных препаратов БуХЭ была использована мышьяная модель внутривенного введения и определения остаточной бутирилхолинэстеразной активности в сыворотке крови (Рис. 39Б). Очевидно, что практическое применение рчБуХЭ без модификации в значительной степени затруднено, ввиду ее крайне быстрой элиминации из кровотока. Модификация полисиаловыми кислотами позволяет более чем в 5 раз повысить фармакокинетические характеристики рчБуХЭ (Таблица 4), что значительно увеличивает область ее терапевтического применения и позволяет использовать в качестве профилактики отравления ФОТ. В то же время 4рчБуХЭ обладает характеристиками, более чем в 2 раза лучшими, по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА, что делает ее лидером среди исследованных препаратов по продолжительности циркуляции.

Таблица 4. Фармакокинетические характеристики препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА, 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА.

Препарат	Фармакокинетические параметры		
	$\tau_{1/2}$ распр., ч	$\tau_{1/2}$ вывед., ч	MRT, ч
рчБуХЭ	0.2±0.1	3±1	3±1.6
рчБуХЭ-ПСА	0.3±0.1	14±2	19±3
4рчБуХЭ	2.4±0.3	33±2	43±4
4рчБуХЭ-ПСА	0.8±0.2	19±2	27±3

Биотехнологическое получение 4рчБуХЭ аналогично рчБуХЭ и значительно более целесообразно, чем получение конъюгата рчБуХЭ-ПСА, поскольку отсутствуют стадии модификации (где используется 50-кратный избыток ПСА) и очистки. В то же время можно было ожидать, что полисиалирование 4рчБуХЭ приведет к еще большему увеличению фармакокинетических характеристик 4рчБуХЭ, однако этого не происходило. Фармакокинетика выведения 4рчБуХЭ-ПСА и 4рчБуХЭ в первые сутки практически идентична, в дальнейшем 4рчБуХЭ-ПСА выводился быстрее, чем немодифицированная 4рчБуХЭ. Таким образом, химическое полисиалирование позволяло многократно повысить фармакокинетические характеристики мономерной и димерной рчБуХЭ, но не улучшало фармакокинетику 4рчБуХЭ. Так как химическое полисиалирование 4рчБуХЭ не приводило к улучшению фармакокинетических характеристик 4рчБуХЭ-ПСА по сравнению с 4рчБуХЭ, весьма вероятно, что увеличение продолжительности циркуляции препаратов 4рчБуХЭ связано, в первую очередь, не с увеличением гидродинамического радиуса 4рчБуХЭ по сравнению с мономерной и димерной рчБуХЭ. По-видимому, образование комплекса 4рчБуХЭ приводит к маскировке доменов белка (С-концевых доменов тетрамеризации), ответственных за быструю элиминацию рчБуХЭ.

Для изучения влияния химического полисиалирования на профиль биораспределения и накопления препаратов 4рчБуХЭ были использованы препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА, меченые радиоизотопом ^{125}I (Рис. 40).

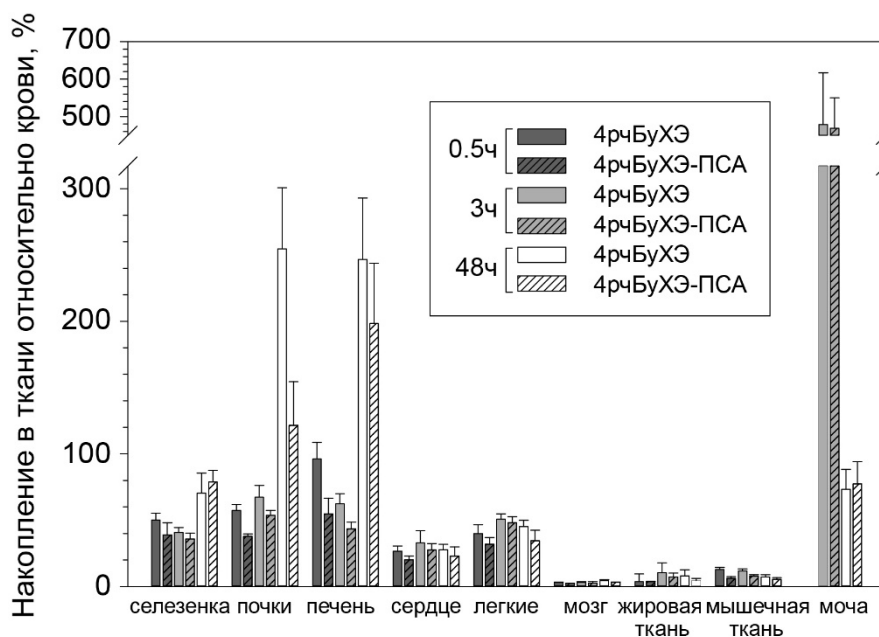


Рис. 40. Накопление препаратов 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА в органах и тканях спустя 0,5, 3 и 48 часов после внутривенного введения.

4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА демонстрировали схожий профиль биораспределения, накопление конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА в почках и печени было на 20-40% ниже, что в то же время, как уже упоминалось ранее, не приводило к улучшению его фармакокинетических характеристик.

Изучение профиля биodeградации 4рчБуХЭ *in vivo*

Для изучения профиля биodeградации препарата 4рчБуХЭ были получены его конъюгаты с инфракрасным флуоресцентным красителем сульфоцианином7 (sCy7). Однократно меченые препараты (4рчБуХЭ-sCy7 ON) обладали постоянным уровнем флуоресценции до и после протеолиза. В то же время избыточное мечение 4рчБуХЭ приводило к самотушению sCy7, таким образом, протеолиз препаратов избыточно меченой 4рчБуХЭ (4рчБуХЭ-sCy7 OFF) приводил к многократному увеличению флуоресценции (Рис. 41).

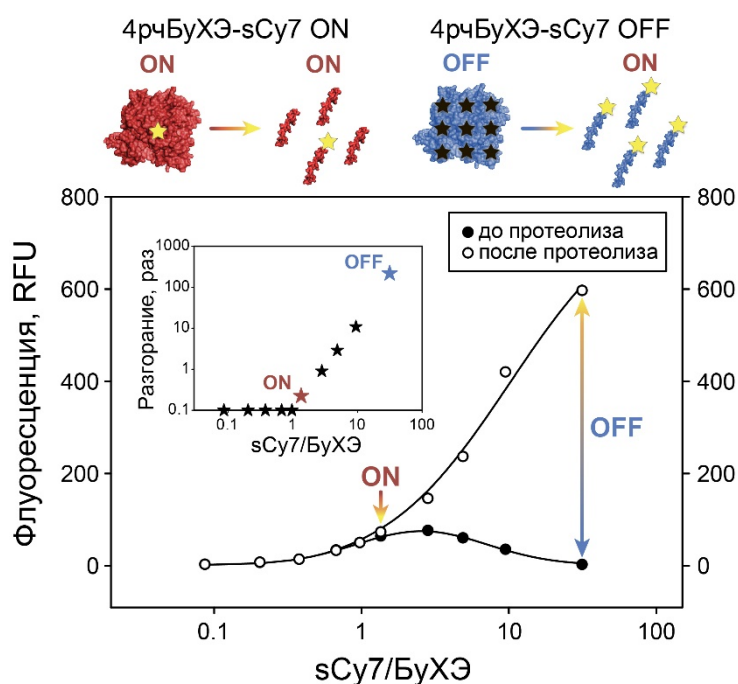


Рис. 41. Протеолиз препаратов 4рчБуХЭ-sCy7 OFF, в отличие от 4рчБуХЭ-sCy7 ON, приводит к увеличению флуоресценции.

Однократное мечение не влияло на активность 4рчБуХЭ, даже в случае препарата 4рчБуХЭ-sCy7 OFF со степенью модификации 32, удавалось добиться более чем 70% сохранения специфической активности. Наблюдая за изменением активности препарата в кровотоке, можно судить о концентрации интактной 4рчБуХЭ. В то же время флуоресцентный зонд свидетельствует о наличии как целого белка, так и его фрагментов. Таким образом, сравнение профилей выведения, наблюдаемых двумя различными методами, свидетельствует о деградации препарата на фоне его элиминации из организма. В отличие от препарата 4рчБуХЭ-sCy7 ON, демонстрировавшего сходные с 4рчБуХЭ фармакокинетические характеристики, для препарата 4рчБуХЭ-sCy7 OFF мы наблюдали значительно более быстрое выведение из кровотока (Рис. 42А).

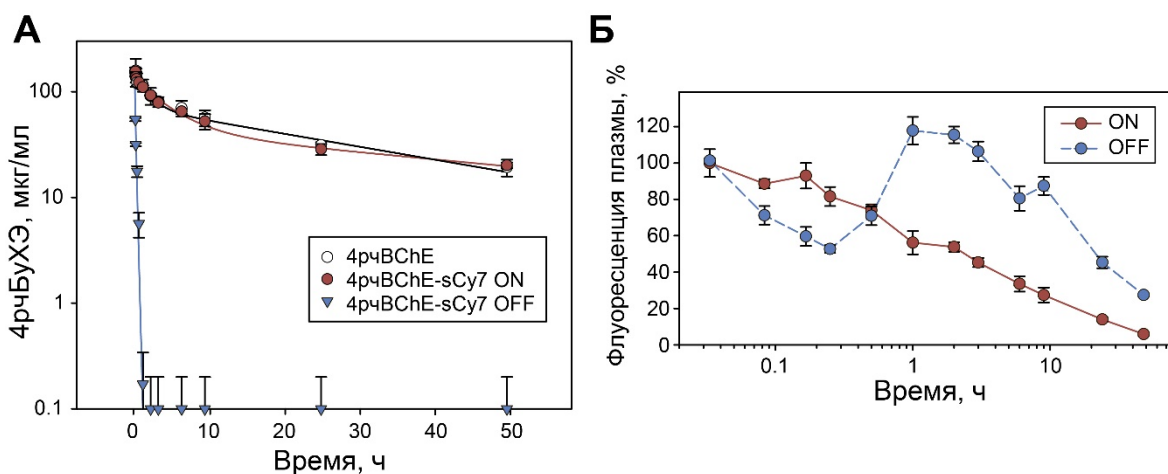


Рис. 42. (А) Фармакокинетика выведения 4рчБуХЭ, а также конъюгатов 4рчБуХЭ-sCy7 ON и 4рчБуХЭ-sCy7 OFF из крови, полученная в результате анализа активности БуХЭ. (Б) Флуоресценция плазмы крови после введения препаратов 4рчБуХЭ-sCy7 ON и 4рчБуХЭ-sCy7 OFF.

Быстрое выведение препарата 4рчБуХЭ-sCy7 OFF из кровотока также сопровождалось быстрым (в течение первых 20 минут) уменьшением флуоресценции плазмы, после чего наблюдалось ее резкое увеличение, связанное с биодegradацией 4рчБуХЭ-sCy7 OFF (Рис. 42Б).

Конъюгаты 4рчБуХЭ-sCy7 ON и 4рчБуХЭ-sCy7 OFF были использованы для прижизненной визуализации биодegradации *in vivo* (Рис. 43).

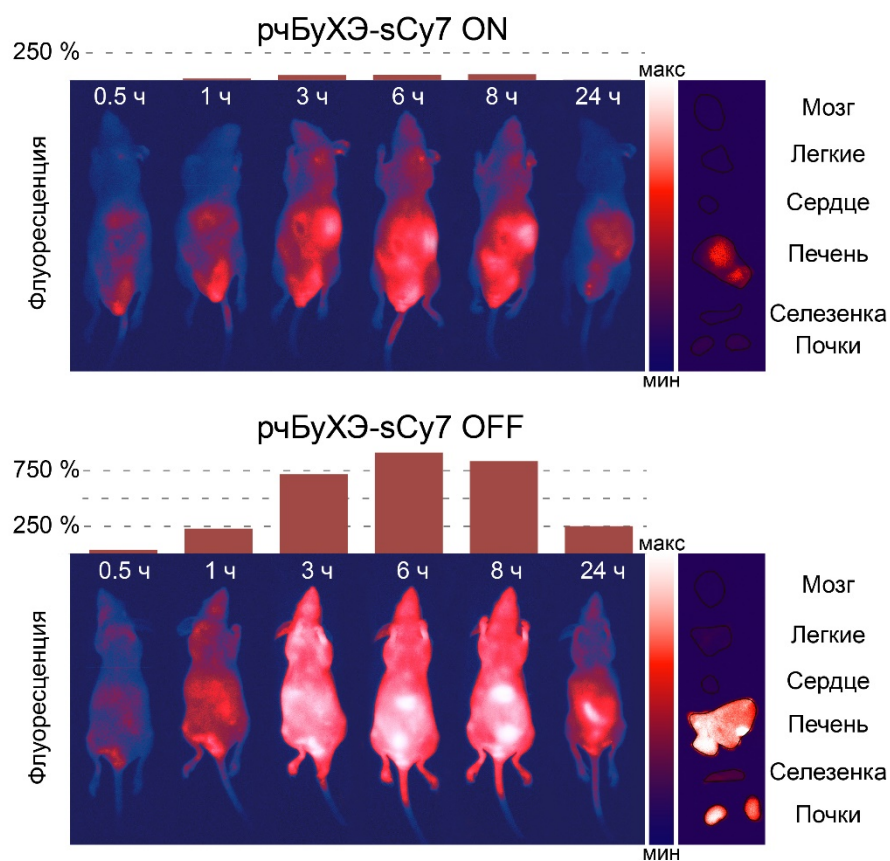


Рис. 43. Прижизненные профили биодеградации препаратов 4rCbUXЭ-sCy7 ON и 4rCbUXЭ-sCy7 OFF *in vivo*.

Несмотря на принципиальное различие в фармакокинетике конъюгатов, их профиль биодеградации был весьма схожим. Для более точного определения компартментов, ответственных за биодеградацию производился отбор органов спустя 0.5, 3 и 48 часов после внутривенного введения (Рис. 44).

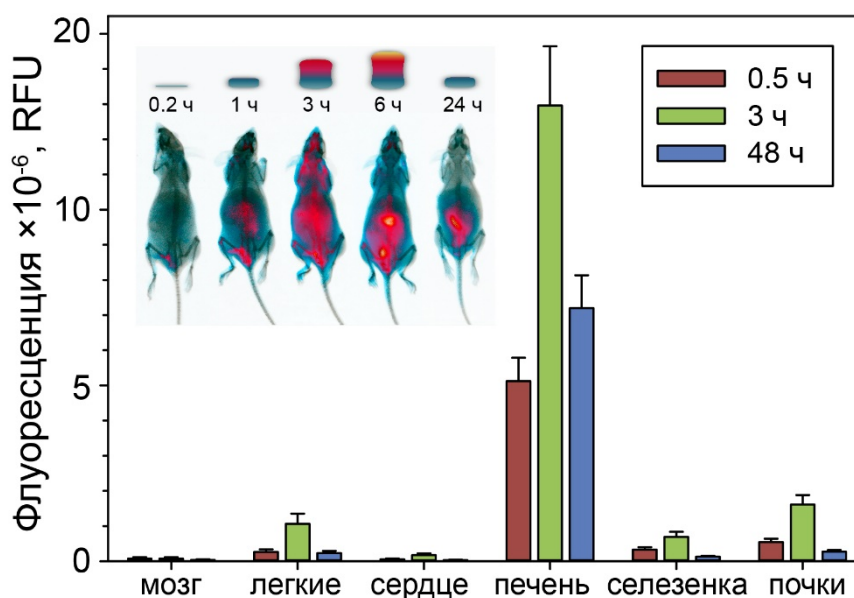


Рис. 44. Флуоресценция органов мыши спустя 0.5, 3 и 48 часов после внутривенного введения конъюгата 4рчБуХЭ-sCy7 OFF.

Основным компартментом, ответственным за биодegradацию 4рчБуХЭ, была печень, а низкомолекулярные продукты биодegradации выводились почками с мочой.

Протективное действие препарата 4рчБуХЭ

Для демонстрации протективного действия 4рчБуХЭ была использована мышинная модель отравления ФОТ параоксоном (POX). В отличие от людей, грызуны обладают дополнительным механизмом защиты от отравления ФОТ, связанным с наличием фермента карбоксилэстеразы 1 (ES1) [233]. Для того чтобы приблизить мышиную модель отравления к человеческой, мы использовали высокоспецифический ингибитор карбоксилэстеразы 1 – 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид (CBDP), обладавший чрезвычайно низкой токсичностью и не вызывавший признаков отравления при подкожном введении в дозе вплоть до 500 мг/кг [234]. Предварительное подкожное введение CBDP в дозе 1.5 мг/кг повышало токсичность POX, снижая LD₅₀ с 590±20 до 520±15 мкг/кг у мышей линии BALB/c (Рис. 45).

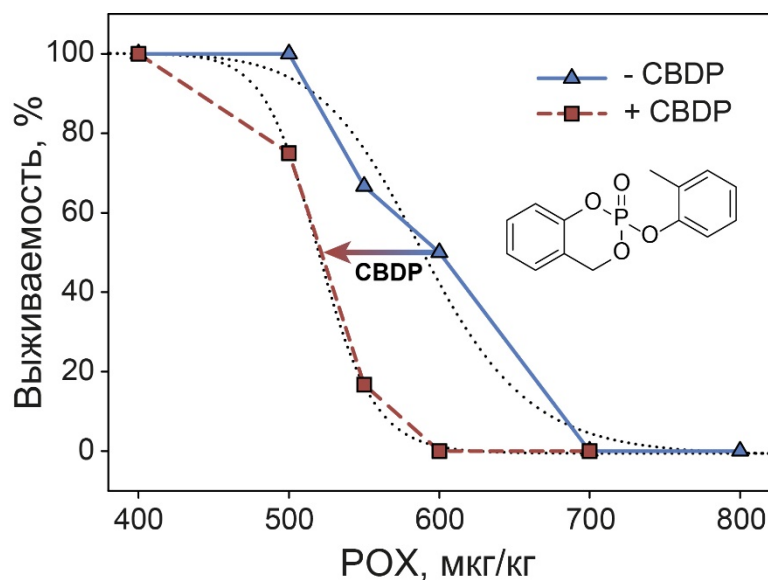


Рис. 45. Ингибирование ES1 приводит к увеличению токсичности РОХ.

Для оценки влияния эндогенной БуХЭ мыши на тяжесть отравления РОХ, были использованы мыши дикого типа дикого типа (WT), а также мыши, нокаутные по гену БуХЭ (КО). Нокаутные мыши демонстрировали большую чувствительность по отношению к РОХ, выраженную в более низком значении LD_{50} 500 ± 10 мкг/кг (Рис. 46А), а также более тяжелых симптомах отравления (Рис. 46Б). Внутривенное введение 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг приводило к увеличению LD_{50} как у мышей дикого типа (с 520 ± 15 до 660 ± 20 мкг/кг), так и у нокаутных мышей (с 500 ± 10 до 580 ± 20 мкг/кг), а также значительному снижению тяжести симптомов отравления мышей WT и КО. Более того, внутривенное введение 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг, обеспечивало 100% и 78% выживаемость мышей WT и КО, получивших абсолютно летальную дозу РОХ 600 мкг/кг ($\approx 1,2 LD_{50}$) и 550 мкг/кг ($\approx 1,1 LD_{50}$) соответственно.

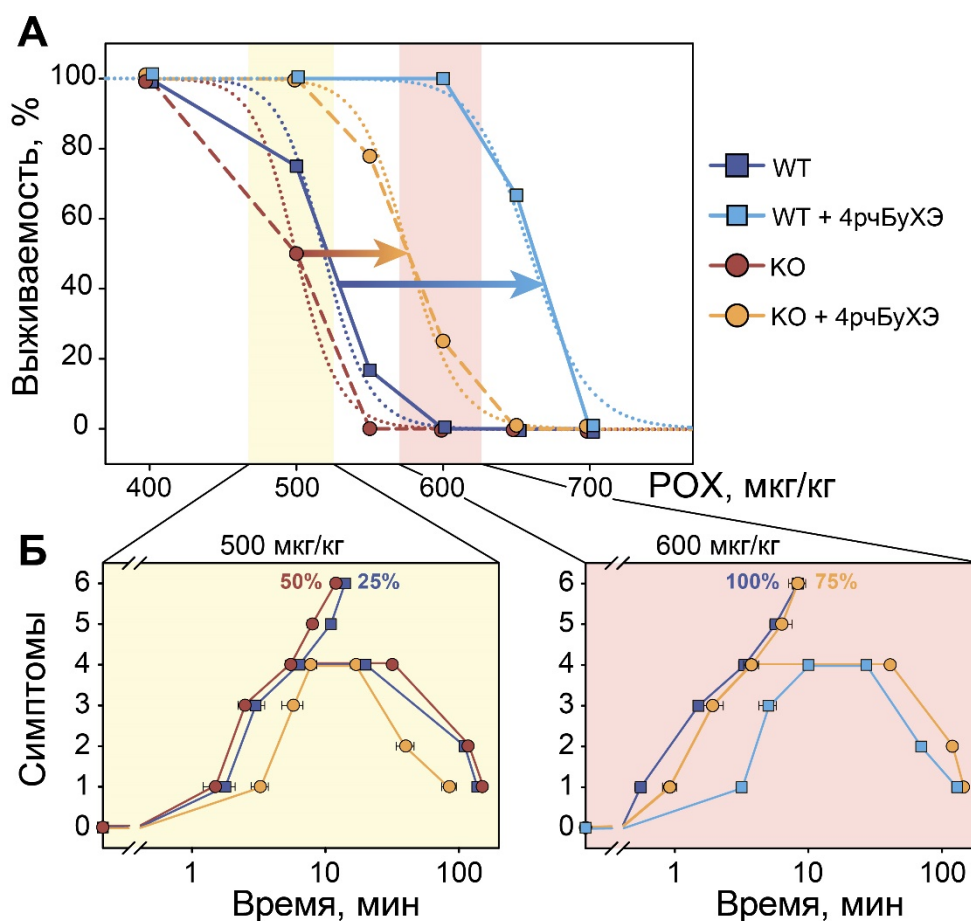


Рис. 46. (А) Выживаемость мышей дикого типа (WT), а также мышей, нокаутных по гену БуХЭ (КО), без терапии и с терапией 4рчБуХЭ. (Б) Тяжесть проявления симптомов отравления мышей, получивших РОХ в дозе 500 и 600 мкг/кг, во времени. 0 – отсутствие признаков; 1 – остановка двигательной активности и начало подъема в стойку после отравления; 3 – начало тремора; 2 – окончание тремора; 4 – проявление максимальных признаков отравления; 5 – кома; 6 – смерть.

Уровень эндогенной БуХЭ мыши значительно ниже, чем количество введенного препарата 4рчБуХЭ. В то же время 4рчБуХЭ, в отличие от РОХ, не может преодолеть гематоэнцефалический барьер. Таким образом, незначительное количество эндогенной БуХЭ мыши, ассоциированной с нейронами, вносит серьезный вклад в защиту от отравления РОХ, что наблюдалось в значительно большем сдвиге LD_{50} у мышей дикого типа (27% увеличение) по сравнению LD_{50} у нокаутных мышей (16% увеличение) в результате терапии 4рчБуХЭ.

Скрининг антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии

Создание модельной системы для изучения попарных взаимодействий микроорганизмов

Одним из наиболее привлекательных преимуществ разработанной платформы является ее биосовместимость, позволяющая осуществлять культивацию микроорганизмов в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Для изучения попарных межклеточных взаимодействий микроорганизмов в каплях была разработана простая модельная система, имитирующая взаимодействия между тремя различными видами бактерий, игравших роль “жертвы”, “убийцы” и “сожителя” (Рис. 47А). Разработанная схема была использована для отбора бактерий-продуцентов антибиотиков, ингибирующих рост патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. Штамм *S. aureus*, конститутивно продуцирующий зеленый флуоресцентный белок-репортер, был использован в качестве “жертвы”. Бактерии *Streptomyces venezuelae*, продуцирующие антибиотик хрорамфеникол и ингибирующие рост *S. aureus*, были выбраны в качестве “убийцы”. *S. venezuelae* продуцировали широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе продигнины, обладавшие красной флуоресценцией [235, 236], что было использовано для идентификации их наличия в каплях. В качестве нейтрального “сожителя”, не ингибирующего рост *S. aureus*, были использованы клетки *E. coli*, продуцировавшие дальне-красный флуоресцентный белок-репортер Katushka2S.

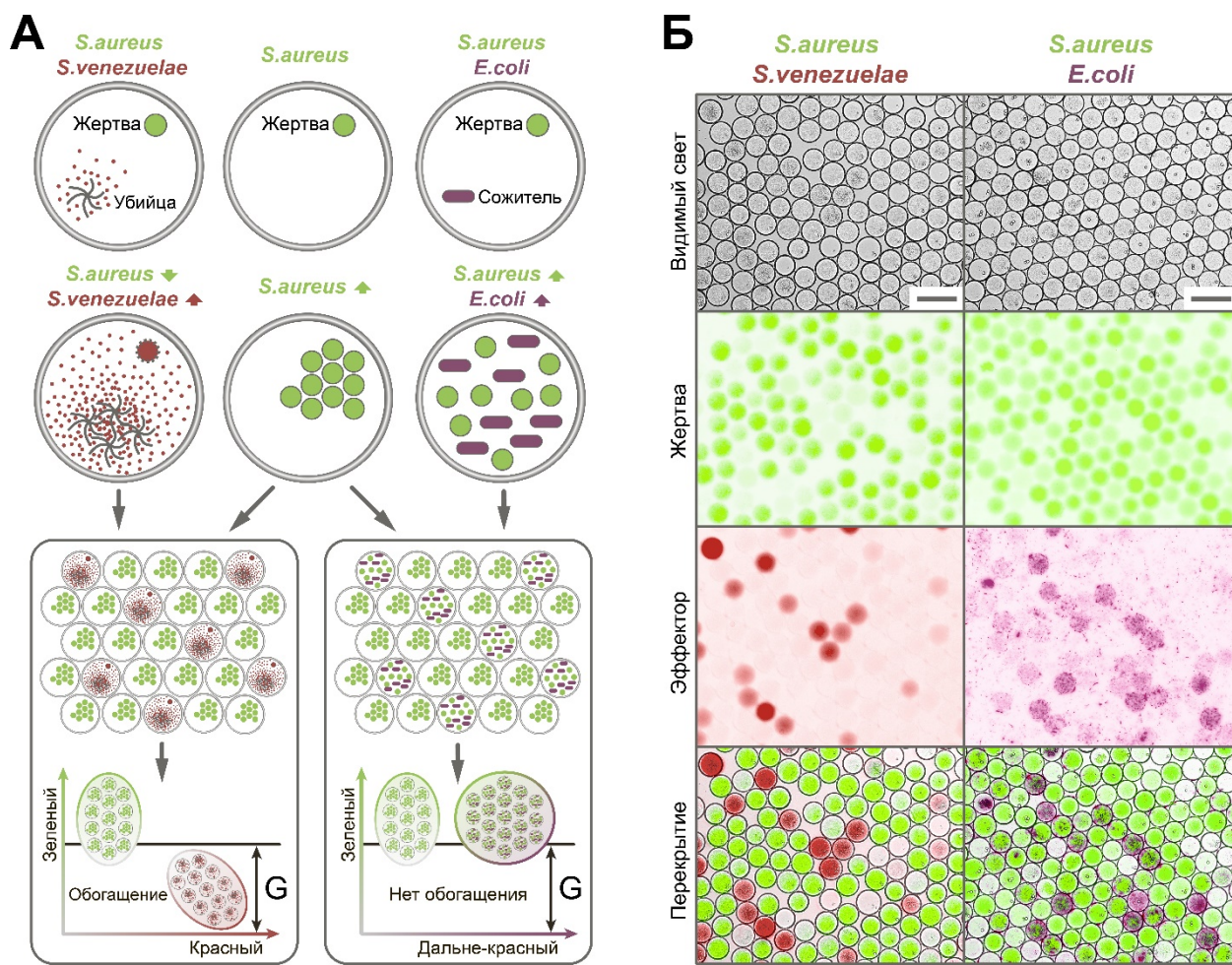


Рис. 47. (А) Схема скрининга попарных взаимодействий для отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, в каплях биосовместимой двойной микрофлюидной эмульсии. (Б) Микроскопия капель, несущих смесь клеток *S. aureus*+*S. venezuelae* и *S. aureus*+*E. coli*. Изображения получены в результате микроскопии видимого света, флуоресцентной микроскопии зеленой флуоресценции *S. aureus* (жертва), красной флуоресценции *S. venezuelae* (эффектор слева) и дальне-красной флуоресценции *E. coli* (эффектор справа), а также их общего наложения (перекрытие). Приведенная шкала составляет 100 мкм.

Таким образом, в том случае, если в одну каплю попадали клетки *S. aureus* и *S. venezuelae*, *S. venezuelae* ингибировали рост *S. aureus* и заполняли собой весь объем капли, что приводило к образованию капли, обладавшей высоким уровнем красной и низким уровнем зеленой флуоресценции. В том случае, если в каплю попадали только клетки *S. aureus*, они делились неконтролируемо, что приводило к образованию капли с интенсивной зеленой флуоресценцией. Если же в каплю одновременно попадали клетки *S. aureus* и *E. coli* обе бактерии делились, что

приводило к каплям с высоким уровнем зеленой и дальне-красной флуоресценции. После кокультивации в каплях отбор капель с наименьшим уровнем зеленой флуоресценции приводил к обогащению *S. venezuelae*, а не *E. coli*.

Ожидаемая картина наблюдалась в каплях (Рис. 47Б). В результате совместной коинкапсуляции клеток *S. aureus*+*S. venezuelae* капли, в которые попадали клетки *S. venezuelae*, обладали интенсивной красной флуоресценцией и в то же время не обладали зеленой флуоресценцией. Большинство капель, не обладавших красной флуоресценцией, обладали при этом интенсивной зеленой флуоресценцией. Напротив, в результате совместной коинкапсуляции клеток *S. aureus*+*E. coli*, капли, в которые попадали клетки *E. coli*, обладали одновременно интенсивной дальне-красной и зеленой флуоресценцией.

Последующий высокопроизводительный отбор капель с наименьшим уровнем зеленой флуоресценции с использованием FACS приводил к обогащению *S. venezuelae*, но не приводил к обогащению *E. coli*, что было идентифицировано в результате культивации отобранных капель и капель до отбора на чашках (Рис. 48).

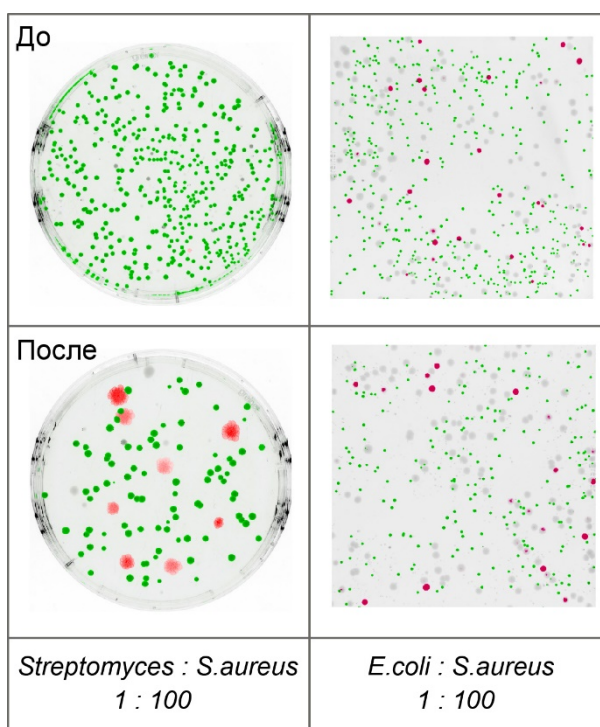


Рис. 48. Чашки, несущие колонии бактерий, регенерированные из капель до и после отбора с использованием FACS. *S. aureus*, окрашенные в зеленый цвет, были

идентифицированы благодаря их зеленой флуоресценции, *E. coli* – дальне-красной флуоресценции, а *S. venezuelae* – по специфической морфологии колоний.

В то же время, по сравнению с отбором биокатализаторов, осуществляемого по принципу позитивной селекции (отбора капель с наибольшим уровнем флуоресценции), негативный отбор наименее флуоресцентных капель приводил к значительно более низкой степени обогащения (Рис. 49А).

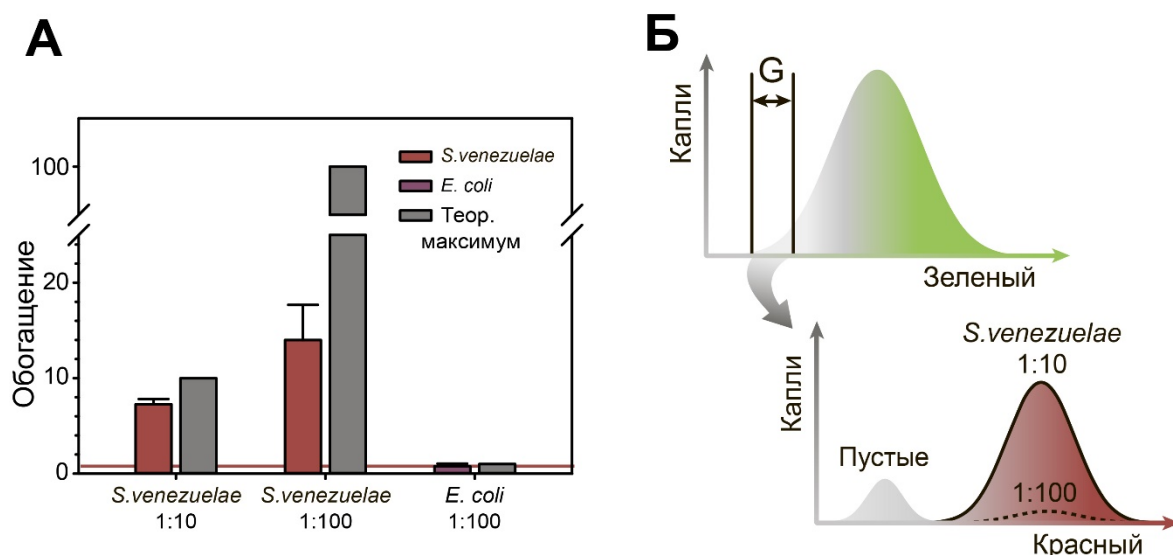


Рис. 49. (А) Степень обогащения убийц *S. venezuelae* в случае, если их доля в популяции составляет 10 и 1%, а также сожителей *E. coli* с долей в популяции 1%.

(Б) Отбор капель, обладающих наименьшим уровнем зеленой флуоресценции, приводит к отбору капель, несущих *S. venezuelae*, а также пустых капель, снижающих эффективность отбора.

В случае позитивной селекции эффективный отбор активных клеток наблюдался даже при их доле в популяции 0.001%. В случае негативной селекции наблюдалось обогащение убийц, а не сожителей. В то же время отбор убийц с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму, происходил лишь в случае, если их доля в популяции была больше 10%. В том случае, если доля *S. venezuelae* составляла менее 1%, эффективность обогащения стремительно падала. Наблюдаемое падение эффективности отбора связано с наличием популяции пустых капель, а также капель, в которых не происходило деления *S. aureus* из-за их перехода в состояние персистенции или гибели (Рис. 49Б).

Для того чтобы показать, что возможности данной платформы не ограничены использованием именно клеток *S. aureus* в качестве жертвы, были использованы клетки *E. coli*. Используя *E. coli*, чей рост также ингибировался *S. venezuelae*, было показано, что и в этом случае негативный отбор приводит к низкой эффективности обогащения *S. venezuelae*, если их доля в популяции составляет менее 1% (Рис. 50).

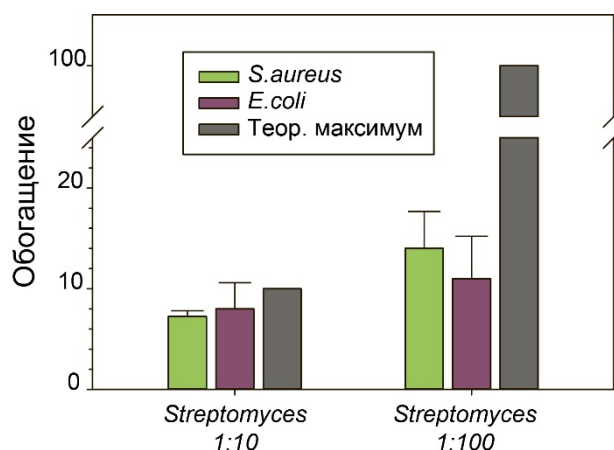


Рис. 50. Степень обогащения убийц *S. venezuelae* в случае, если их доля в популяции составляет 10 и 1% с использованием в качестве клеток-жертв *S. aureus* и *E. coli*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для проведения высокоэффективного скрининга, основанного на негативной селекции популяции клеток-эффекторов с долей менее 1%, необходимо наличие дополнительных флуоресцентных репортеров, основанных на позитивной селекции.

Скрининг представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*

Несмотря на свою чрезвычайно высокую патогенность, *S. aureus* достаточно редко ассоциирован с дентоальвеолярными инфекциями [237], что позволяет сделать предположение о наличии неких неизвестных естественных эффекторов микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. Использование классических бактериологических подходов скрининга на чашках (так называемой платформы Ваксмана) показало наличие в ротовой полости бактерий, ингибирующих рост *S. aureus* (Рис. 51А).

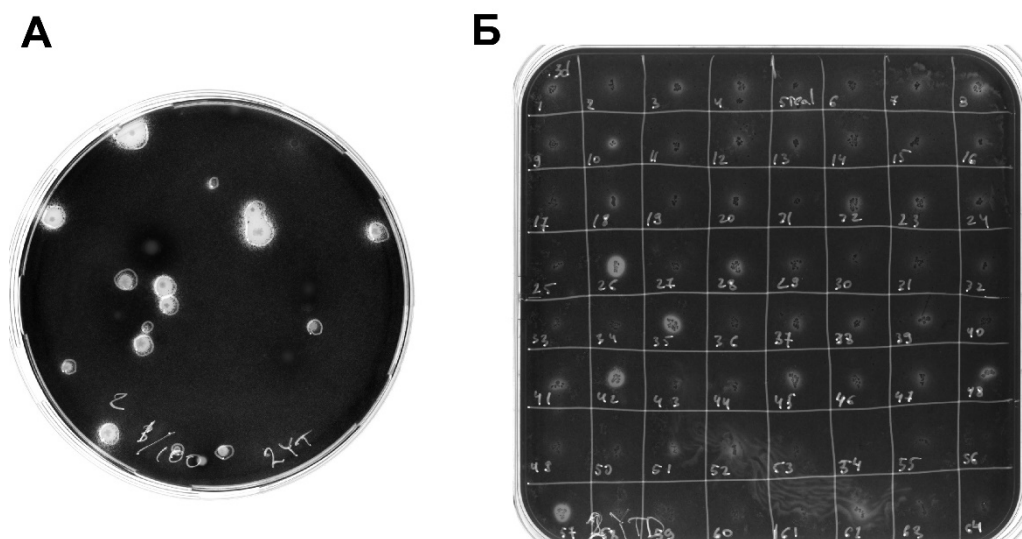


Рис. 51. Идентификация бактерий микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. (А) Образование зон просветления на чашках с индивидуальными колониями микробиоты ротовой полости, покрытых слоем агара с *S. aureus*. (Б) Отбор наиболее эффективных бактерий-ингибиторов на чашках.

Отобранные клоны-ингибиторы демонстрировали разный размер зон просветления (Рис. 51Б). Клоны с наиболее яркими зонами наибольшего диаметра были использованы для дальнейшей работы.

В отличие от классической платформы Ваксмана, разработанная микрофлюидная платформа позволяет осуществлять скрининг значительно большего биологического разнообразия, что было использовано для отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости. Для этого разработанная ранее схема скрининга попарных взаимодействий в каплях была модифицирована двумя дополнительными флуоресцентными сигналами-репортерами, позволяющими избежать проблемы, связанной с отбором пустых капель и капель с изначально низким количеством клеток *S. aureus* (Рис. 52).

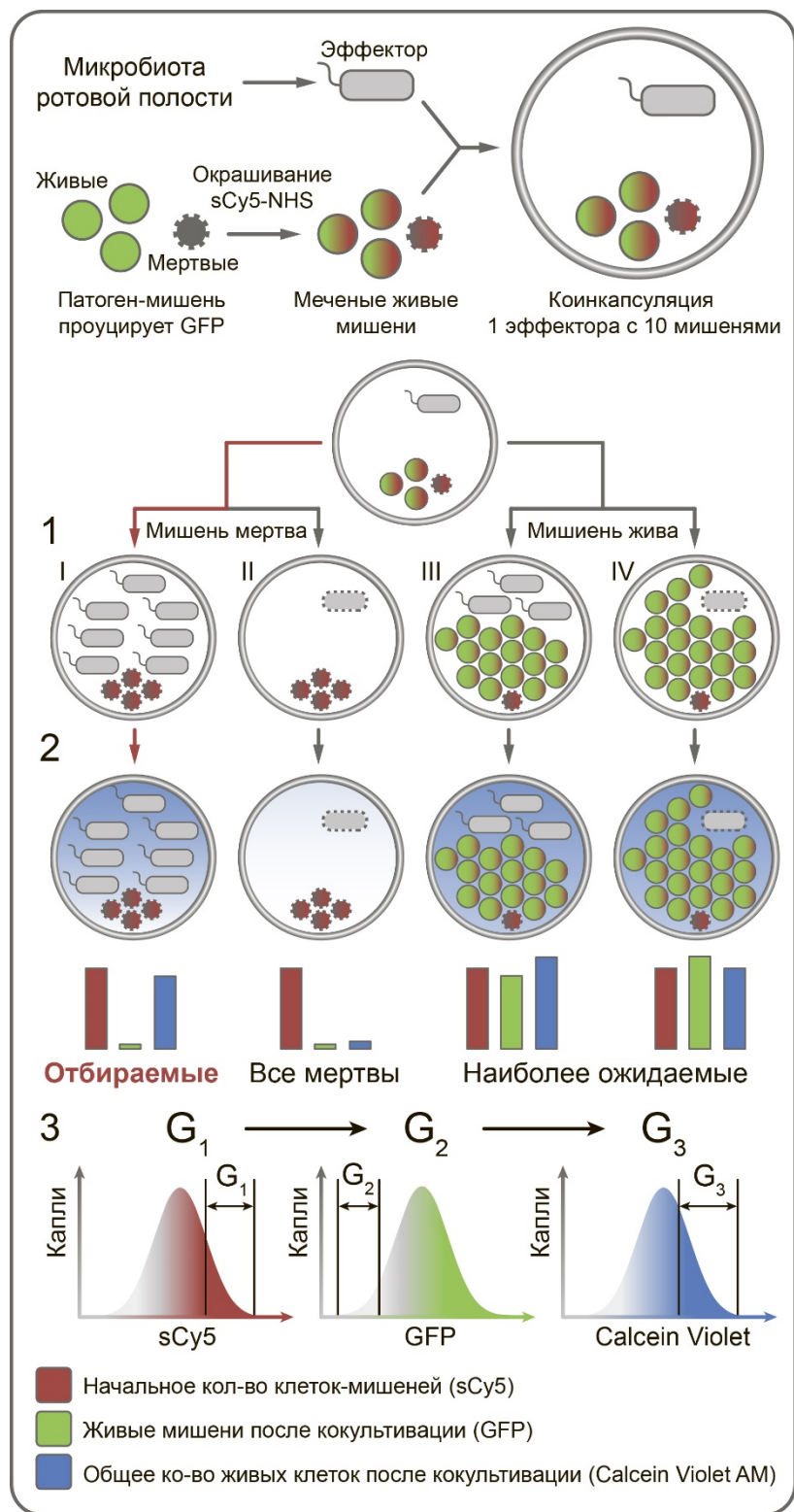


Рис. 52. Усовершенствованная схема отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости.

Клетки микробиоты ротовой полости подвергались микрофлюидной компартиментализации вместе с избытком клеток *S. aureus*, прижизненно меченых красным флуоресцентным красителем сульфонианином5 (sCy5). Кокультурация *S.*

aureus и эффекторов микробиоты приводила к четырем различным вариантам I-IV. I – эффектор ингибировал рост *S. aureus* и оставался живым в процессе кокультивации. II – эффектор и *S. aureus* погибали. III – эффектор и *S. aureus* сожительствовали в капле и не ингибировали рост друг друга. IV – *S. aureus* ингибировал рост эффектора. Для того чтобы различить эти варианты, был использован лейко-краситель Calcein Violet AM, представляющий собой нефлуоресцирующий гидрофобный ацетоксиметильный эфир, способный проникать через слой масла. В случае наличия в капле живых клеток, их эстеразы гидролизуют ацетоксиметильный эфир, что в свою очередь приводит к образованию высокогидрофильного продукта, обладающего интенсивной голубой флуоресценцией, неспособного к транспорту через гидрофобный слой масла. Таким образом, отбор популяции капель, обладающих высоким уровнем красной, низким уровнем зеленой и высоким уровнем голубой флуоресценции, приводит к отбору капель с высокой изначальной нагрузкой клетками *S. aureus*, которые не делились в каплях, в то же время в каплях присутствовали другие живые клетки, отличные от *S. aureus*.

Так как различные виды бактерий обладают разной скоростью роста и могут ингибировать рост друг друга на чашках, отобранные капли напрямую подвергались 16S рРНК и полногеномному (WGA) широкомасштабному секвенированию с целью идентификации медленно растущих и некультивируемых бактерий, ингибирующих рост *S. aureus* в каплях. Сравнение количества прочтений до и после отбора показало, что, как по результатам 16S рРНК (Рис. 53), так и полногеномного (Приложение 3) секвенирования, *Propionibacterium acnes* обладали наибольшим обогащением среди всех бактерий.

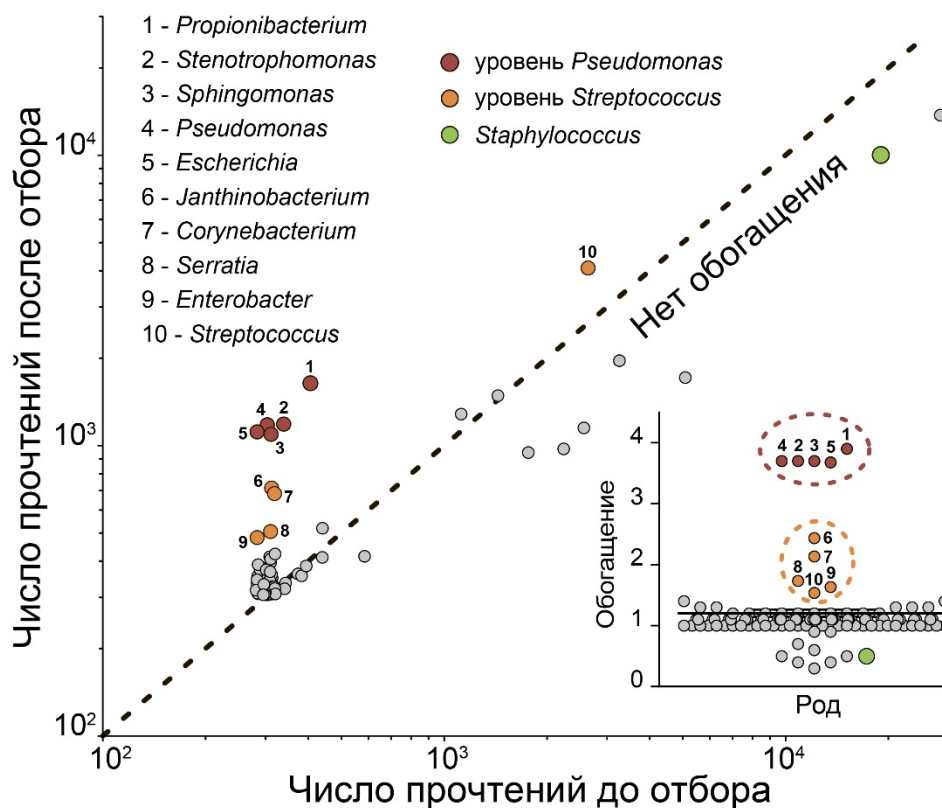


Рис. 53. Предсказание родов бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, по результатам 16S рРНК секвенирования.

16S рРНК секвенирование позволило выявить две субпопуляции бактерий-ингибиторов, отобранных с различной эффективностью. Бактерии родов *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, и *Escherichia* обладали наивысшим уровнем обогащения, в то время как *Corynebacterium*, *Janthinobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* и *Streptococcus* были также достоверно обогащены с более низкой степенью обогащения. *Streptococcus* представляли при этом популяцию наиболее распространенных ингибиторов *S. aureus* среди представителей микробиоты ротовой полости. Полногеномное секвенирование (Приложение 3) подтвердило чрезвычайно эффективное обогащение медленно растущих *Propionibacterium acnes*, также позволив идентифицировать некоторых бактерий-ингибиторов с точностью до вида. Группа *Streptococcus mitis* (*S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pseudopneumoniae*), *Prevotella dentalis* (медленно растущий вид), *Staphylococcus epidermidis* (известный эффектор *S. aureus*) и *Pseudomonas aeruginosa* были значительно обогащены после отбора.

Отобранные капли подвергались культивации с целью идентификации культивируемых бактерий-ингибиторов *S. aureus*. Более 90% бактериальных колоний, отличных от *S. aureus*, регенерированных из капель на чашках, принадлежали роду *Streptococcus* и более 64% из них были классифицированы при помощи масс-спектрометрии как *Streptococcus oralis*. Отобранные клоны в процессе роста продуцировали в ростовую среду метаболиты, ингибирующие рост *S. aureus*, причем *Streptococcus oralis* демонстрировали наибольшее ингибирующее разведение ростовой среды (вплоть до 16 кратного разведения). Анализ клонов-ингибиторов, полученных с использованием классического скрининга на чашках, и клонов, полученных в результате отбора с использованием капель, показал, что клоны, полученные с использованием капель, обладали значительно большим ингибирующим разведением ростовой среды, чем клоны, полученные с использованием чашек (Рис. 54).

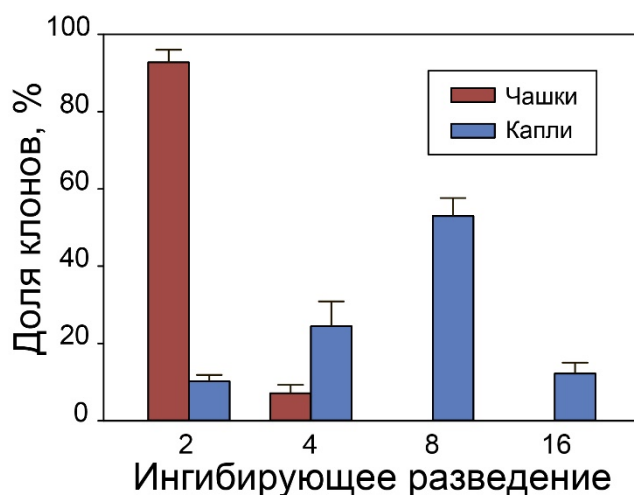


Рис. 54. Клоны стрептококков, отобранные с использованием микрофлюидной платформы (капли) демонстрировали значительно более эффективное ингибирование роста *S. aureus*, чем клоны полученные с использованием платформы Ваксмана (чашки).

Кокультивация разбавленной ($<10^6$ КОЕ/мл) культуры *Streptococcus oralis* и *S. aureus*, тем не менее, не приводила к ингибированию роста *S. aureus*, что, по-видимому, связано со значительно более быстрой кинетикой роста *S. aureus*. В то же время физиологическая значимость *Streptococcus oralis* может быть весьма высокой, и реальная картина может значительно отличаться от того, что наблюдалось при

кокультивации в разбавленной культуре, так как слюна является значительно более бедной ростовой средой, а локальные концентрации стрептококков на поверхности десен значительно выше, чем те, что были использованы в жидкой культуре. Кроме того, на чашках наблюдалось эффективное ингибирование *S. aureus*, что также свидетельствует в пользу того, что стрептококки, в частности *Streptococcus oralis*, могут играть важную физиологическую роль защитного барьера, препятствующего колонизации *S. aureus*.

Исключительно с использованием микрофлюидной платформы был отобран штамм *Pseudomonas aeruginosa*, полностью ингибирующий рост *S. aureus* в культуре даже при попадании единичных клеток *P. aeruginosa* (Рис. 55). Условно патогенные *P. aeruginosa* не являются нормальным компонентом микрофлоры ротовой полости и могли присутствовать среди представителей микробиоты ротовой полости лишь в концентрации $<0.005\%$, что делало их отбор с использованием классической платформы Ваксмана практически невозможным.

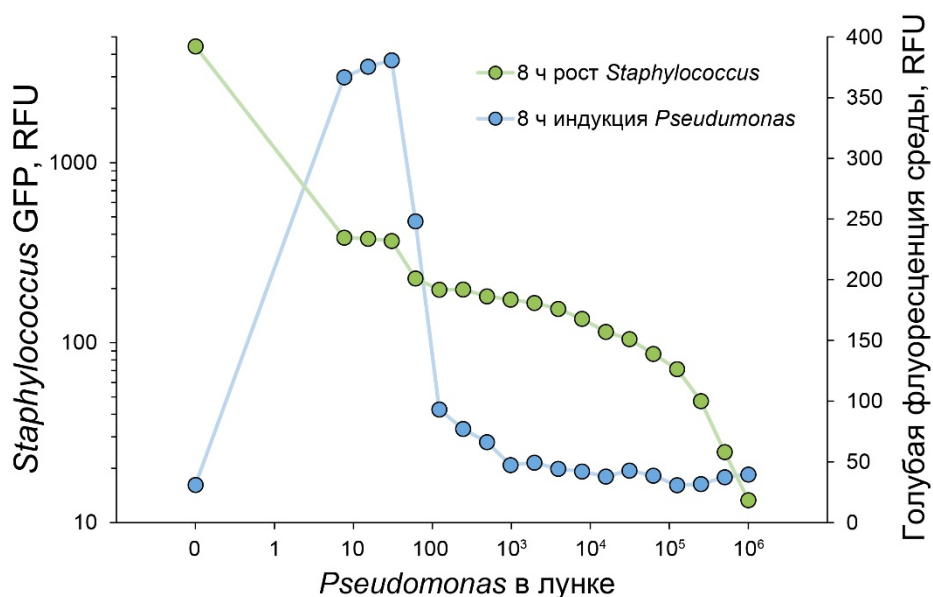
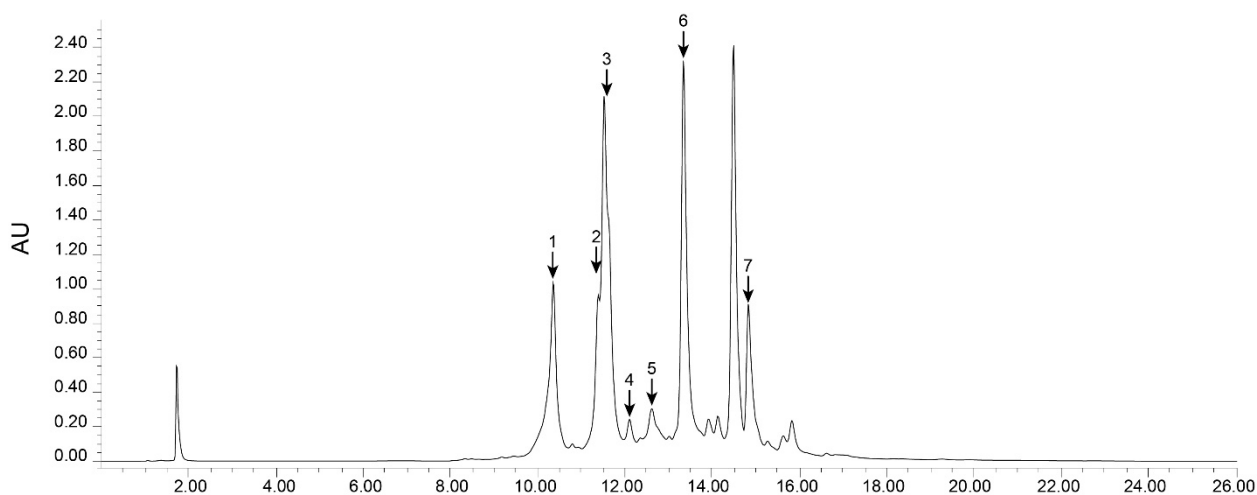


Рис. 55. *P. aeruginosa* ингибировали рост культуры *S. aureus* даже при попадании в нее единичных клеток *P. aeruginosa*.

В отличие от *S. oralis*, *P. aeruginosa* продуцировали вторичные метаболиты, ингибирующие рост *S. aureus*, не конститутивно, а индуцибельно в процессе кокультивации со *S. aureus*, причем максимальный уровень индукции соответствовал минимальной концентрации *P. aeruginosa* в ростовой среде при

кокультивации (Рис. 55, Приложение 4) и коррелировал с голубой флуоресценцией пиовердина. В то же время ингибирование роста *S. aureus* происходило не за счет пиовердина, так как после экстракции хлороформом водная фаза (содержащая пиовердин) полностью теряла ингибирующую активность, а хлороформный экстракт, напротив, практически полностью приобретал ее (Приложение 5).

Хлороформный экстракт ростовой среды *P. aeruginosa*, ингибирующей рост *S. aureus* и полученной в результате кокультивации избытка *S. aureus* (10^8 КОЕ/мл) и *P. aeruginosa* (≈ 1 КОЕ/мл), был фракционирован с использованием высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии (Рис. 56). *P. aeruginosa* продуцировали широкий спектр вторичных метаболитов, ингибирующих рост *S. aureus*.



Флуоресценция <i>S. aureus</i> после 10 ч роста																				
С18 мин.	1,75	8,25	8,75	9,25	9,75	10,25	10,75	11,25	11,75	12,25	12,75	13,25	13,75	14,25	14,75	15,25	15,75	16,25	16,75	17,25
Фракция #						1		2	3	4	5	6			7					
разведение																				
2X	418	300	360	315	277	8	172	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	9	50	489
4X	1228	1318	1145	1190	1329	10	879	56	12	102	26	18	64	85	3	56	52	1243	927	1087
8X	1690	1649	1577	1651	1891	27	1924	558	925	703	325	119	1035	821	187	951	924	1539	1170	1477
16X	1958	1983	2054	1806	1785	311	1841	429	1634	401	326	390	1396	1099	1213	1780	1434	1708	1702	1982
32X	2148	2756	2790	2454	2505	1672	2197	598	1852	947	354	1005	1434	1441	1462	1758	1754	2313	2110	1958
64X	2323	2146	2383	2349	2282	1875	2339	1336	1944	1695	413	1577	1830	1788	1694	2257	1778	2246	2192	2168

Рис. 56. Фракционирование хлороформного экстракта культуральной среды *P. aeruginosa*, ингибирующей рост *S. aureus*, и анализ ингибирующей активности полученных фракций.

Фракции 1 и 6 демонстрировали высокоэффективное синергическое ингибирование, приводившее к гибели *S. aureus* (Рис. 57А).

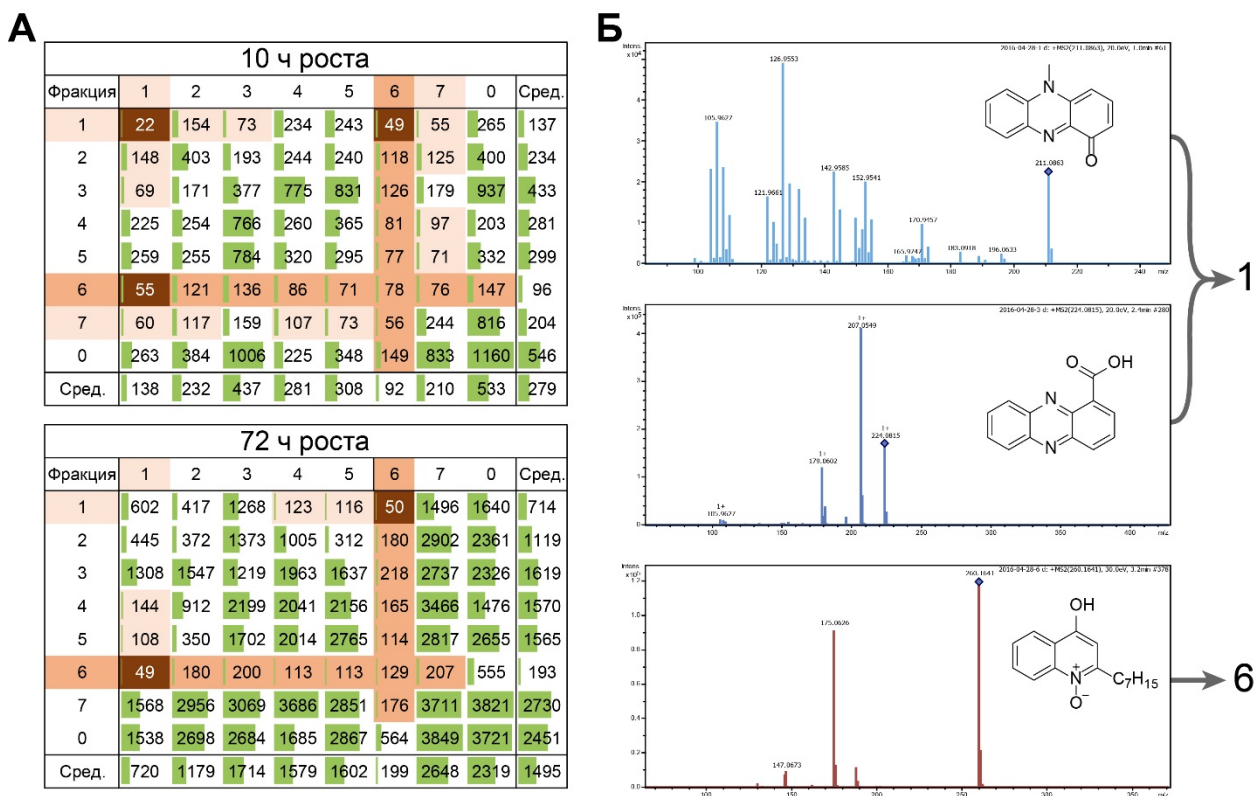


Рис. 57. (А) Синергическое ингибирование роста *S. aureus* фракциями 1 и 6, полученными в результате фракционирования с использованием высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. (Б) Основные действующие вещества фракций 1 и 6, идентифицированные с использованием масс-спектрометрии.

Основными действующими веществами, идентифицированными с помощью масс-спектрометрии (Рис. 57Б), были пиоцианин и феназин-1-карбоновая кислота (фракция 1) и 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид (фракция 6). Пиюцианин и феназин-1-карбоновая кислота являются ингибиторами каталазы, а также выступают в роли переносчиков электронов электрон-транспортной цепи, вызывая продукцию активных форм кислорода, в то время как 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид вызывает ингибирование пути окисления гидрохинонов. Таким образом, *P. aeruginosa* контролируют рост *S. aureus* за счет использования синергических механизмов, направленных, в первую очередь, на индукцию окислительного стресса *S. aureus*, приводящего к остановке деления и гибели *S. aureus*.

Выводы

В результате проделанной работы была создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Разработанная платформа была использована для высокоэффективного прижизненного отбора биокаталитической и антимикробной активности единичных клеток из популяций активных клеток представительностью 0.001% и <0.005% соответственно за один раунд селекции. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили различить различные типы активности, а также различные уровни одинаковой активности.

Разработанная платформа позволила найти новые мутанты рчБуХЭ, демонстрирующие повышенную устойчивость к инактивации ФОТ, используя один раунд отбора из библиотеки мутантов ацил-связывающей петли, обладающей представительностью $\approx 3 \times 10^5$. Устойчивость отобранных мутантов к ингибированию ФОТ была обусловлена не только снижением реакционной способности к ФОТ, но и, что более важно, возникновением новой каталитической активности, связанной с гидролизом ФОТ.

Используя подходы, основанные на *in vivo* тетрамеризации БуХЭ, впервые были получены экспрессионные вектора для продукции олигомерно чистой 4рчБуХЭ, обладающей периодом полувыведения, улучшенным более чем в 10 раз по сравнению с рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА. Полученный препарат 4рчБуХЭ обладал низким накоплением в тканях, основным компартментом ответственным за его биodeградацию являлась печень, а низкомолекулярные продукты биodeградации выводились почками с мочой.

Используя модельную систему, основанную на кокультивации бактерий в каплях, был осуществлен скрининг индивидуальных попарных клеточных взаимодействий. Разработанная платформа позволила выявить представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. Использование широкомасштабного секвенирования для анализа отобранных бактериальных ингибиторов *S. aureus* позволило без культивации предсказать бактериальные ингибиторы *S. oralis* и *P. aeruginosa*, которые были впоследствии отобраны в

результате культивирования капель и демонстрировали продукцию метаболитов, ингибиравших рост *S. aureus in vitro*. 16S и полногеномное широкомасштабное секвенирование также предсказало высокоэффективное обогащение медленно растущих *Propionibacterium acnes*, которых было невозможно идентифицировать в результате высева микробиоты ротовой полости ввиду их чрезвычайно низкой скорости деления. Метаболомный анализ показал, что *P. aeruginosa* высокоэффективно ингибируют рост *S. aureus* за счет продукции вторичных метаболитов, обладающих синергическим действием, направленным на индукцию окислительного стресса.

Список литературы

1. Zhou Y., Zhu S., Cai C., Yuan P., Li C., *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. // *Nature*. – 2014. – Vol. 509, № 7501. – P. 487-491.
2. Bleicher K.H., Bohm H.-J., Muller K., Alanine A.I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2003. – Vol. 2, № 5. – P. 369-378.
3. Zheng F., Xue L., Hou S., Liu J., Zhan M., *et al.* A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design. // *Nat Commun*. – 2014. – Vol. 5. – P. 3457.
4. Arnold F.H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, № 6817. – P. 253-257.
5. Bajorath J. Integration of virtual and high-throughput screening. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2002. – Vol. 1, № 11. – P. 882-894.
6. Inglese J., Shamu C.E., Guy R.K. Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries. // *Nat Chem Biol*. – 2007. – Vol. 3, № 8. – P. 438-441.
7. Sackmann E.K., Fulton A.L., Beebe D.J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. // *Nature*. – 2014. – Vol. 507, № 7491. – P. 181-189.
8. Agresti J.J., Antipov E., Abate A.R., Ahn K., Rowat A.C., *et al.* Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 9. – P. 4004-4009.
9. Kintses B., Hein C., Mohamed Mark F., Fischlechner M., Courtois F., *et al.* Picoliter Cell Lysate Assays in Microfluidic Droplet Compartments for Directed Enzyme Evolution. // *Chemistry & Biology*. – 2012. – Vol. 19, № 8. – P. 1001-1009.
10. Fallah-Araghi A., Baret J.-C., Ryckelynck M., Griffiths A.D. A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 882-891.
11. Mazutis L., Gilbert J., Ung W.L., Weitz D.A., Griffiths A.D., *et al.* Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. // *Nat. Protocols*. – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 870-891.
12. Macosko Evan Z., Basu A., Satija R., Nemesh J., Shekhar K., *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, № 5. – P. 1202-1214.
13. Colin P.-Y., Kintses B., Gielen F., Miton C.M., Fischer G., *et al.* Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics. // *Nat Commun*. – 2015. – Vol. 6. – P. 10008.
14. Lam K.S., Salmon S.E., Hersh E.M., Hruby V.J., Kazmierski W.M., *et al.* A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. // *Nature*. – 1991. – Vol. 354, № 6348. – P. 82-84.
15. Zahnd C., Amstutz P., Pluckthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. // *Nat Meth*. – 2007. – Vol. 4, № 3. – P. 269-279.

16. Bruin R.d., Spelt K., Mol J., Koes R., QuattrocchioFrancesca. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. // *Nat Biotech.* – 1999. – Vol. 17, № 4. – P. 397-399.
17. Lee C.M.Y., Iorno N., Sierro F., Christ D. Selection of human antibody fragments by phage display. // *Nat. Protocols.* – 2007. – Vol. 2, № 11. – P. 3001-3008.
18. Rockberg J., Lofblom J., Hjelm B., Uhlen M., Stahl S. Epitope mapping of antibodies using bacterial surface display. // *Nat Meth.* – 2008. – Vol. 5, № 12. – P. 1039-1045.
19. Boder E.T., Wittrup K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. // *Nat Biotech.* – 1997. – Vol. 15, № 6. – P. 553-557.
20. Li C.-Z., Liang Z.-K., Chen Z.-R., Lou H.-B., Zhou Y., *et al.* Identification of HBsAg-specific antibodies from a mammalian cell displayed full-length human antibody library of healthy immunized donor. // *Cell Mol Immunol.* – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 184-190.
21. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. // *Science.* – 1990. – Vol. 249, № 4968. – P. 505-510.
22. Seelig B. mRNA display for the selection and evolution of enzymes from in vitro-translated protein libraries. // *Nat. Protocols.* – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 540-552.
23. Chen I., Dorr B.M., Liu D.R. A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2011. – Vol. 108, № 28. – P. 11399-11404.
24. Castle L.A., Siehl D.L., Gorton R., Patten P.A., Chen Y.H., *et al.* Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. // *Science.* – 2004. – Vol. 304, № 5674. – P. 1151-1154.
25. Tsai P.-C., Fox N., Bigley A.N., Harvey S.P., Barondeau D.P., *et al.* Enzymes for the Homeland Defense: Optimizing Phosphotriesterase for the Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents. // *Biochemistry.* – 2012. – Vol. 51, № 32. – P. 6463-6475.
26. Esvelt K.M., Carlson J.C., Liu D.R. A system for the continuous directed evolution of biomolecules // *Nature.* – 2011. – Vol. 472, № 7344. – P. 499-503.
27. Yoo T.H., Pogson M., Iverson B.L., Georgiou G. Directed Evolution of Highly Selective Proteases by Using a Novel FACS-Based Screen that Capitalizes on the p53 Regulator MDM2. // *ChemBioChem.* – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 649-653.
28. Chen C.-P., Hsieh Y.-T., Prijovich Z.M., Chuang H.-Y., Chen K.-C., *et al.* ECSTASY, an adjustable membrane-tethered/soluble protein expression system for the directed evolution of mammalian proteins. // *Protein Engineering Design and Selection.* – 2012. – Vol. 25, № 7. – P. 367-375.
29. Baker M. Academic screening goes high-throughput. // *Nat Meth.* – 2010. – Vol. 7, № 10. – P. 787-792.
30. Tawfik D.S., Griffiths A.D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. // *Nat Biotech.* – 1998. – Vol. 16, № 7. – P. 652-656.
31. Lee Y.F., Tawfik D.S., Griffiths A.D. Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation. // *Nucleic Acids Research.* – 2002. – Vol. 30, № 22. – P. 4937-4944.

32. Bernath K., Magdassi S., Tawfik D.S. Directed Evolution of Protein Inhibitors of DNA-nucleases by in Vitro Compartmentalization (IVC) and Nano-droplet Delivery. // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 345, № 5. – P. 1015-1026.
33. Yonezawa M., Doi N., Kawahashi Y., Higashinakagawa T., Yanagawa H. DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31, № 19. – P. e118.
34. Odegrip R., Coomber D., Eldridge B., Hederer R., Kuhlman P.A., *et al.* CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein–DNA complexes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, № 9. – P. 2806-2810.
35. Ghadessy F.J., Ramsay N., Boudsocq F., Loakes D., Brown A., *et al.* Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. // *Nat Biotech*. – 2004. – Vol. 22, № 6. – P. 755-759.
36. Agresti J.J., Kelly B.T., Jäschke A., Griffiths A.D. Selection of ribozymes that catalyse multiple-turnover Diels–Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, № 45. – P. 16170-16175.
37. Griffiths A.D., Tawfik D.S. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. // *The EMBO Journal*. – 2003. – Vol. 22, № 1. – P. 24-35.
38. Bernath K., Hai M., Mastrobattista E., Griffiths A.D., Magdassi S., *et al.* In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – Vol. 325, № 1. – P. 151-157.
39. Mastrobattista E., Taly V., Chanudet E., Treacy P., Kelly B.T., *et al.* High-Throughput Screening of Enzyme Libraries: In Vitro Evolution of a β -Galactosidase by Fluorescence-Activated Sorting of Double Emulsions. // *Chemistry & Biology*. – 2005. – Vol. 12, № 12. – P. 1291-1300.
40. Miller O.J., Bernath K., Agresti J.J., Amitai G., Kelly B.T., *et al.* Directed evolution by in vitro compartmentalization. // *Nat Meth*. – 2006. – Vol. 3, № 7. – P. 561-570.
41. Aharoni A., Amitai G., Bernath K., Magdassi S., Tawfik D.S. High-Throughput Screening of Enzyme Libraries: Thiolactonases Evolved by Fluorescence-Activated Sorting of Single Cells in Emulsion Compartments. // *Chemistry & Biology*. – 2005. – Vol. 12, № 12. – P. 1281-1289.
42. Eisenstein M. Tiny droplets make a big splash. // *Nat Meth*. – 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 71-71.
43. Leamon J.H., Link D.R., Egholm M., Rothberg J.M. Overview: methods and applications for droplet compartmentalization of biology. // *Nat Meth*. – 2006. – Vol. 3, № 7. – P. 541-543.
44. Prodanovic R., Ostafe R., Blanusa M., Schwaneberg U. Vanadium bromoperoxidase-coupled fluorescent assay for flow cytometry sorting of glucose oxidase gene libraries in double emulsions. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 404, № 5. – P. 1439-1447.
45. Radivoje P., Raluca O., Andreea S., Ulrich S. Ultrahigh Throughput Screening System for Directed Glucose Oxidase Evolution in Yeast Cells. // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2011. – Vol. 14, № 1. – P. 55-60.

46. Ostafe R., Prodanovic R., Nazor J., Fischer R. Ultra-High-Throughput Screening Method for the Directed Evolution of Glucose Oxidase. // *Chemistry & Biology*. – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 414-421.
47. Tu R., Martinez R., Prodanovic R., Klein M., Schwaneberg U. A Flow Cytometry-Based Screening System for Directed Evolution of Proteases. // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2011. – Vol. 16, № 3. – P. 285-294.
48. Gupta R.D., Goldsmith M., Ashani Y., Simo Y., Mullokandov G., *et al.* Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication. // *Nat Chem Biol*. – 2011. – Vol. 7, № 2. – P. 120-125.
49. Mark D., Haeberle S., Roth G., von Stetten F., Zengerle R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. // *Chemical Society Reviews*. – 2010. – Vol. 39, № 3. – P. 1153-1182.
50. Marguet P., Balagadde F., Tan C., You L. Biology by design: reduction and synthesis of cellular components and behaviour. // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2007. – Vol. 4, № 15. – P. 607-623.
51. Teh S.-Y., Lin R., Hung L.-H., Lee A.P. Droplet microfluidics. // *Lab on a Chip*. – 2008. – Vol. 8, № 2. – P. 198-220.
52. Joensson H.N., Andersson Svahn H. Droplet Microfluidics—A Tool for Single-Cell Analysis. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2012. – Vol. 51, № 49. – P. 12176-12192.
53. Ralf S., Martin B., Thomas P., Stephan H. Droplet based microfluidics. // *Reports on Progress in Physics*. – 2012. – Vol. 75, № 1. – P. 016601.
54. Dendukuri D., Doyle P.S. The Synthesis and Assembly of Polymeric Microparticles Using Microfluidics. // *Advanced Materials*. – 2009. – Vol. 21, № 41. – P. 4071-4086.
55. Zhao Y., Shum H.C., Chen H., Adams L.L.A., Gu Z., *et al.* Microfluidic Generation of Multifunctional Quantum Dot Barcode Particles. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133, № 23. – P. 8790-8793.
56. Chen H., Zhao Y., Li J., Guo M., Wan J., *et al.* Reactions in double emulsions by flow-controlled coalescence of encapsulated drops. // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 14. – P. 2312-2315.
57. Song H., Chen D.L., Ismagilov R.F. Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2006. – Vol. 45, № 44. – P. 7336-7356.
58. Tu F., Lee D. Controlling the Stability and Size of Double-Emulsion-Templated Poly(lactic-co-glycolic) Acid Microcapsules. // *Langmuir*. – 2012. – Vol. 28, № 26. – P. 9944-9952.
59. Zheng Y., Yu Z., Parker R.M., Wu Y., Abell C., *et al.* Interfacial assembly of dendritic microcapsules with host-guest chemistry. // *Nat Commun*. – 2014. – Vol. 5. – P. 5772.
60. Thiele J., Abate A.R., Shum H.C., Bachtler S., Förster S., *et al.* Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. // *Small*. – 2010. – Vol. 6, № 16. – P. 1723-1727.
61. Martinez C.J., Kim J.W., Ye C., Ortiz I., Rowat A.C., *et al.* A Microfluidic Approach to Encapsulate Living Cells in Uniform Alginate Hydrogel Microparticles. // *Macromolecular Bioscience*. – 2012. – Vol. 12, № 7. – P. 946-951.

62. Chan H.F., Zhang Y., Ho Y.-P., Chiu Y.-L., Jung Y., *et al.* Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3, №. – P. 3462.
63. Guo M.T., Rotem A., Heyman J.A., Weitz D.A. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 12. – P. 2146-2155.
64. Leman M., Abouakil F., Griffiths A.D., Tabeling P. Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale. // *Lab on a Chip*. – 2015. – Vol. 15, № 3. – P. 753-765.
65. Abate A.R., Weitz D.A. High-Order Multiple Emulsions Formed in Poly(dimethylsiloxane) Microfluidics. // *Small*. – 2009. – Vol. 5, № 18. – P. 2030-2032.
66. Adams L.L.A., Kodger T.E., Kim S.-H., Shum H.C., Franke T., *et al.* Single step emulsification for the generation of multi-component double emulsions. // *Soft Matter*. – 2012. – Vol. 8, № 41. – P. 10719-10724.
67. Wang W., Xie R., Ju X.-J., Luo T., Liu L., *et al.* Controllable microfluidic production of multicomponent multiple emulsions. // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1587-1592.
68. Abate A.R., Thiele J., Weinhart M., Weitz D.A. Patterning microfluidic device wettability using flow confinement. // *Lab on a Chip*. – 2010. – Vol. 10, № 14. – P. 1774-1776.
69. Abate A.R., Thiele J., Weitz D.A. One-step formation of multiple emulsions in microfluidics. // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 253-258.
70. Deng N.-N., Meng Z.-J., Xie R., Ju X.-J., Mou C.-L., *et al.* Simple and cheap microfluidic devices for the preparation of monodisperse emulsions. // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 23. – P. 3963-3969.
71. Rotem A., Abate A.R., Utada A.S., Van Steijn V., Weitz D.A. Drop formation in non-planar microfluidic devices. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 21. – P. 4263-4268.
72. Abate A.R., Weitz D.A. Faster multiple emulsification with drop splitting. // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 11. – P. 1911-1915.
73. Paegel B.M., Joyce G.F. Microfluidic Compartmentalized Directed Evolution. // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17, № 7. – P. 717-724.
74. Romanowsky M.B., Abate A.R., Rotem A., Holtze C., Weitz D.A. High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 802-807.
75. Andersson P., Jesson G., Kylberg G., Ekstrand G., Thorsén G. Parallel Nanoliter Microfluidic Analysis System. // *Analytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 79, № 11. – P. 4022-4030.
76. Si G., Yang W., Bi S., Luo C., Ouyang Q. A parallel diffusion-based microfluidic device for bacterial chemotaxis analysis. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 7. – P. 1389-1394.
77. Vyawahare S., Griffiths A.D., Merten C.A. Miniaturization and Parallelization of Biological and Chemical Assays in Microfluidic Devices. // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17, № 10. – P. 1052-1065.
78. Koster S., Angile F.E., Duan H., Agresti J.J., Wintner A., *et al.* Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. // *Lab on a Chip*. – 2008. – Vol. 8, № 7. – P. 1110-1115.

79. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., *et al.* High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83, № 22. – P. 8604-8610.
80. Whale A.S., Huggett J.F., Cowen S., Speirs V., Shaw J., *et al.* Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40, № 11. – P. e82.
81. Baker M. Digital PCR hits its stride. // *Nat Meth*. – 2012. – Vol. 9, № 6. – P. 541-544.
82. Chen R., Mias George I., Li-Pook-Than J., Jiang L., Lam Hugo Y.K., *et al.* Personal Omics Profiling Reveals Dynamic Molecular and Medical Phenotypes. // *Cell*. – 2012. – Vol. 148, № 6. – P. 1293-1307.
83. Tadmor A.D., Ottesen E.A., Leadbetter J.R., Phillips R. Probing Individual Environmental Bacteria for Viruses by Using Microfluidic Digital PCR. // *Science*. – 2011. – Vol. 333, № 6038. – P. 58-62.
84. Wang J., Ramakrishnan R., Tang Z., Fan W., Kluge A., *et al.* Quantifying EGFR Alterations in the Lung Cancer Genome with Nanofluidic Digital PCR Arrays. // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 56, № 4. – P. 623-632.
85. Lo Y.M.D., Lun F.M.F., Chan K.C.A., Tsui N.B.Y., Chong K.C., *et al.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104, № 32. – P. 13116-13121.
86. Segre G., Silberberg A. Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions. // *Nature*. – 1961. – Vol. 189, № 4760. – P. 209-210.
87. Lagus T.P., Edd J.F. High Throughput Single-cell and Multiple-cell Microencapsulation. // *J Vis Exp*. – 2012. – Vol. 64. – P. e4096.
88. Kemna E.W.M., Schoeman R.M., Wolbers F., Vermes I., Weitz D.A., *et al.* High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel. // *Lab on a Chip*. – 2012. – Vol. 12, № 16. – P. 2881-2887.
89. Ghadessy F.J., Holliger P. A novel emulsion mixture for in vitro compartmentalization of transcription and translation in the rabbit reticulocyte system. // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2004. – Vol. 17, № 3. – P. 201-204.
90. Gruner P., Riechers B., Chacòn Orellana L.A., Brosseau Q., Maes F., *et al.* Stabilisers for water-in-fluorinated-oil dispersions: Key properties for microfluidic applications. // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 2015. – Vol. 20, № 3. – P. 183-191.
91. Holtze C., Rowat A.C., Agresti J.J., Hutchison J.B., Angile F.E., *et al.* Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. // *Lab on a Chip*. – 2008. – Vol. 8, № 10. – P. 1632-1639.
92. Clausell-Tormos J., Lieber D., Baret J.-C., El-Harrak A., Miller O.J., *et al.* Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. // *Chemistry & Biology*. – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 427-437.
93. Joensson H.N., Samuels M.L., Brouzes E.R., Medkova M., Uhlén M., *et al.* Detection and Analysis of Low-Abundance Cell-Surface Biomarkers Using Enzymatic Amplification in Microfluidic Droplets. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – Vol. 48, № 14. – P. 2518-2521.

94. Brouzes E., Medkova M., Savenelli N., Marran D., Twardowski M., *et al.* Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106, № 34. – P. 14195-14200.
95. Baret J.-C., Beck Y., Billas-Massobrio I., Moras D., Griffiths A.D. Quantitative Cell-Based Reporter Gene Assays Using Droplet-Based Microfluidics. // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17, № 5. – P. 528-536.
96. Ahn K., Kerbage C., Hunt T.P., Westervelt R.M., Link D.R., *et al.* Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices. // *Applied Physics Letters*. – 2006. – Vol. 88, № 2. – P. 024104.
97. Baret J.-C., Miller O.J., Taly V., Ryckelynck M., El-Harrak A., *et al.* Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. // *Lab on a Chip*. – 2009. – Vol. 9, № 13. – P. 1850-1858.
98. Antipov E., Cho A.E., Wittrup K.D., Klibanov A.M. Highly l and d enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 46. – P. 17694-17699.
99. Yamada M., Nakashima M., Seki M. Pinched Flow Fractionation: Continuous Size Separation of Particles Utilizing a Laminar Flow Profile in a Pinched Microchannel. // *Analytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 76, № 18. – P. 5465-5471.
100. Maenaka H., Yamada M., Yasuda M., Seki M. Continuous and Size-Dependent Sorting of Emulsion Droplets Using Hydrodynamics in Pinched Microchannels. // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24, № 8. – P. 4405-4410.
101. Chabert M., Dorfman K.D., Viovy J.-L. Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels. // *Electrophoresis*. – 2005. – Vol. 26, № 19. – P. 3706-3715.
102. Ahn K., Agresti J., Chong H., Marquez M., Weitz D.A. Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels. // *Applied Physics Letters*. – 2006. – Vol. 88, № 26. – P. 264105.
103. Link D.R., Grasland-Mongrain E., Duri A., Sarrazin F., Cheng Z., *et al.* Electric Control of Droplets in Microfluidic Devices. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2006. – Vol. 45, № 16. – P. 2556-2560.
104. Priest C., Herminghaus S., Seemann R. Controlled electrocoalescence in microfluidics: Targeting a single lamella // *Applied Physics Letters*. – 2006. – Vol. 89, № 13. – P. 134101.
105. Debs B.E., Utharala R., Balyasnikova I.V., Griffiths A.D., Merten C.A. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109, № 29. – P. 11570-11575.
106. Shim J.-u., Ranasinghe R.T., Smith C.A., Ibrahim S.M., Hollfelder F., *et al.* Ultrarapid Generation of Femtoliter Microfluidic Droplets for Single-Molecule-Counting Immunoassays. // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7, № 7. – P. 5955-5964.
107. Rotem A., Ram O., Shores N., Sperling R.A., Goren A., *et al.* Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. // *Nat Biotech*. – 2015. – Vol. 33, № 11. – P. 1165-1172.
108. Burger J.A., Landau D.A., Taylor-Weiner A., Bozic I., Zhang H., *et al.* Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. // *Nat Commun*. – 2016. – Vol. 7. – P. 11589.
109. Najah M., Calbrix R., Mahendra-Wijaya I.P., Beneyton T., Griffiths A.D., *et al.* Droplet-Based Microfluidics Platform for Ultra-High-Throughput Bioprospecting

- of Cellulolytic Microorganisms. // *Chemistry & Biology*. – 2014. – Vol. 21, № 12. – P. 1722-1732.
110. Wang B.L., Ghaderi A., Zhou H., Agresti J., Weitz D.A., *et al.* Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. // *Nat Biotech.* – 2014. – Vol. 32, № 5. – P. 473-478.
 111. Wu N., Oakeshott J.G., Easton C.J., Peat T.S., Surjadi R., *et al.* A double-emulsion microfluidic platform for in vitro green fluorescent protein expression. // *Journal of Micromechanics and Microengineering*. – 2011. – Vol. 21, № 5. – P. 054032.
 112. Zinchenko A., Devenish S.R.A., Kintses B., Colin P.-Y., Fischlechner M., *et al.* One in a Million: Flow Cytometric Sorting of Single Cell-Lysate Assays in Monodisperse Picolitre Double Emulsion Droplets for Directed Evolution. // *Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 86, № 5. – P. 2526-2533.
 113. Zhang Y., Ho Y.-P., Chiu Y.-L., Chan H.F., Chlebina B., *et al.* A programmable microenvironment for cellular studies via microfluidics-generated double emulsions. // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, № 19. – P. 4564-4572.
 114. Liu J., Uchea C., Wright L., Pope C. Chemical Warfare Agents and the Nervous System. // *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. – 2015. – Vol. 2. – P. 463-475.
 115. Gunnell D., Eddleston M., Phillips M.R., Konradsen F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. // *BMC Public Health*. – 2007. – Vol. 7. – P. 357-357.
 116. Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A.H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371, № 9612. – P. 597-607.
 117. Eddleston M., Eyer P., Worek F., Juszczak E., Alder N., *et al.* Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning - a randomised controlled trial. // *PLoS medicine*. – 2009. – Vol. 6, № 6. – P. e1000104.
 118. Nachon F., Brazzolotto X., Trovaslet M., Masson P. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. // *Chemico-biological interactions*. – 2013. – Vol. 206, № 3. – P. 536-544.
 119. Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2010. – Vol. 494, № 2. – P. 107-120.
 120. Kurkova I.N., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G. Creation of catalytic antibodies metabolizing organophosphate compounds. // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 77, № 10. – P. 1139-1146.
 121. Smirnov I., Belogurov A., Jr., Friboulet A., Masson P., Gabibov A., *et al.* Strategies for the selection of catalytic antibodies against organophosphorus nerve agents. // *Chemico-biological interactions*. – 2013. – Vol. 203, № 1. – P. 196-201.
 122. Wille T., Thiermann H., Worek F. In vitro kinetics of nerve agent degradation by fresh frozen plasma (FFP). // *Arch Toxicol*. – 2014. – Vol. 88, № 2. – P. 301-307.
 123. Shenouda J., Green P., Sultatos L. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2009. – Vol. 241, № 2. – P. 135-142.
 124. Raveh L., Grauer E., Grunwald J., Cohen E., Ashani Y. The Stoichiometry of Protection against Soman and VX Toxicity in Monkeys Pretreated with Human

- Butyrylcholinesterase. // Toxicology and applied pharmacology. – 1997. – Vol. 145, № 1. – P. 43-53.
125. Saxena A., Sun W., Fedorko J.M., Koplovitz I., Doctor B.P. Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX. // Biochemical Pharmacology. – 2011. – Vol. 81, № 1. – P. 164-169.
 126. Mumford H., Price M.E., Cerasoli D.M., Teschner W., Ehrlich H., *et al.* Efficacy and physiological effects of human butyrylcholinesterase as a post-exposure therapy against percutaneous poisoning by VX in the guinea-pig. // Chemico-biological interactions. – 2010. – Vol. 187, № 1-3. – P. 304-308.
 127. Mumford H., Docx C.J., Price M.E., Green A.C., Tattersall J.E.H., *et al.* Human plasma-derived BuChE as a stoichiometric bioscavenger for treatment of nerve agent poisoning. // Chemico-biological interactions. – 2013. – Vol. 203, № 1. – P. 160-166.
 128. Geyer B.C., Kannan L., Garnaud P.-E., Broomfield C.A., Cadieux C.L., *et al.* Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2010. – Vol. 107, № 47. – P. 20251-20256.
 129. Perkins M.W., Pierre Z., Rezk P., Sabnekar P., Kabra K., *et al.* Acute respiratory toxicity following inhalation exposure to soman in guinea pigs. // Toxicology and applied pharmacology. – 2010. – Vol. 245, № 2. – P. 171-178.
 130. Saxena A., Sun W., Dabisch P.A., Hulet S.W., Hastings N.B., *et al.* Pretreatment with human serum butyrylcholinesterase alone prevents cardiac abnormalities, seizures, and death in Göttingen minipigs exposed to sarin vapor. // Biochemical Pharmacology. – 2011. – Vol. 82, № 12. – P. 1984-1993.
 131. Rosenberg Y.J., Laube B., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S., *et al.* Pulmonary delivery of an aerosolized recombinant human butyrylcholinesterase pretreatment protects against aerosolized paraoxon in macaques. // Chemico-biological interactions. – 2013. – Vol. 203, № 1. – P. 167-171.
 132. Rosenberg Y.J., Gearhart J., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S. Protection against paraoxon toxicity by an intravenous pretreatment with polyethylene-glycol-conjugated recombinant butyrylcholinesterase in macaques. // Chemico-biological interactions. – 2014. – Vol. 210, №. – P. 20-25.
 133. Sun W., Doctor B.P., Lenz D.E., Saxena A. Long-term effects of human butyrylcholinesterase pretreatment followed by acute soman challenge in cynomolgus monkeys. // Chemico-biological interactions. – 2008. – Vol. 175, № 1-3. – P. 428-430.
 134. Li H., Schopfer L.M., Masson P., Lockridge O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. // The Biochemical journal. – 2008. – Vol. 411, № 2. – P. 425-432.
 135. Ostergaard D., Viby-Mogensen J., Hanel H.K., Skovgaard L.T. Half-life of plasma cholinesterase. // Acta Anaesthesiol. Scand. – 1988. – Vol. 32, № 3. – P. 266-269.
 136. Saxena A., Ashani Y., Raveh L., Stevenson D., Patel T., *et al.* Role of Oligosaccharides in the Pharmacokinetics of Tissue-Derived and Genetically Engineered Cholinesterases. // Mol. Pharmacol. – 1998. – Vol. 53, № 1. – P. 112-122.

137. Pan Y., Muzyka J.L., Zhan C.-G. Model of Human Butyrylcholinesterase Tetramer by Homology Modeling and Dynamics Simulation. // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2009. – Vol. 113, № 18. – P. 6543-6552.
138. Larson Marilynn A., Lockridge O., Hinrichs Steven H. Polyproline promotes tetramerization of recombinant human butyrylcholinesterase. // *Biochemical Journal.* – 2014. – Vol. 462, № 2. – P. 329-335.
139. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. // *Pharmacology & therapeutics.* – 2015. – Vol. 148. – P. 34-46.
140. Huang Y.J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., *et al.* Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Vol. 104, № 34. – P. 13603-13608.
141. Duysen E.G., Bartels C.F., Lockridge O. Wild-type and A328W mutant human butyrylcholinesterase tetramers expressed in Chinese hamster ovary cells have a 16-hour half-life in the circulation and protect mice from cocaine toxicity. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* – 2002. – Vol. 302, № 2. – P. 751-758.
142. Rosenberg Y.J., Gearhart J., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S. Protection against paraoxon toxicity by an intravenous pretreatment with polyethylene-glycol-conjugated recombinant butyrylcholinesterase in macaques. // *Chem Biol Interact.* – 2014. – Vol. 210, №. – P. 20-25.
143. Sun W., Luo C., Tipparaju P., Doctor B.P., Saxena A. Effect of polyethylene glycol conjugation on the circulatory stability of plasma-derived human butyrylcholinesterase in mice. // *Chem Biol Interact.* – 2013. – Vol. 203, № 1. – P. 172-176.
144. Rosenberg Y.J., Saxena A., Sun W., Jiang X., Chilukuri N., *et al.* Demonstration of in vivo stability and lack of immunogenicity of a polyethyleneglycol-conjugated recombinant CHO-derived butyrylcholinesterase bioscavenger using a homologous macaque model. // *Chemico-biological interactions.* – 2010. – Vol. 187, № 1-3. – P. 279-286.
145. Mumford H., Troyer J.K. Post-exposure therapy with recombinant human BuChE following percutaneous VX challenge in guinea-pigs. // *Toxicology Letters.* – 2011. – Vol. 206, № 1. – P. 29-34.
146. Huang Y.J., Lundy P.M., Lazaris A., Huang Y., Baldassarre H., *et al.* Substantially improved pharmacokinetics of recombinant human butyrylcholinesterase by fusion to human serum albumin. // *BMC biotechnology.* – 2008. – Vol. 8. – P. 50.
147. Li H., Schopfer Lawrence M., Masson P., Lockridge O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. // *Biochemical Journal.* – 2008. – Vol. 411, № 2. – P. 425-432.
148. Larson M.A., Lockridge O., Hinrichs S.H. Polyproline promotes tetramerization of recombinant human butyrylcholinesterase. // *The Biochemical journal.* – 2014. – Vol. 462, № 2. – P. 329-335.
149. Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T., *et al.* Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2013. – Vol. 110, № 4. – P. 1243-1248.

150. Radic Z., Dale T., Kovarik Z., Berend S., Garcia E., *et al.* Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. // *The Biochemical journal*. – 2013. – Vol. 450, № 1. – P. 231-242.
151. Sit R.K., Fokin V.V., Amitai G., Sharpless K.B., Taylor P., *et al.* Imidazole Aldoximes Effective in Assisting Butyrylcholinesterase Catalysis of Organophosphate Detoxification. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 57, № 4. – P. 1378-1389.
152. Broomfield C.A., Mills K.V., Meier B.M., Lockridge O., Millard C.B. Reaction of Human Butyrylcholinesterase (BChE) H117 Enzymes with Carbamates. // *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*. – 1998. – Vol. 1. – P. 223-226.
153. Amitay M., Shurki A. The structure of G117H mutant of butyrylcholinesterase: Nerve agents scavenger. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 77, № 2. – P. 370-377.
154. Worek F., Seeger T., Goldsmith M., Ashani Y., Leader H., *et al.* Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro. // *Arch Toxicol*. – 2014. – Vol. 88, № 6. – P. 1257-1266.
155. Worek F., Seeger T., Reiter G., Goldsmith M., Ashani Y., *et al.* Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study. // *Toxicol. Lett*. – 2014. – Vol. 231, № 1. – P. 45-54.
156. Zheng F., Yang W., Ko M.-C., Liu J., Cho H., *et al.* Most Efficient Cocaine Hydrolase Designed by Virtual Screening of Transition States. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130, № 36. – P. 12148-12155.
157. Gao Y., LaFleur D., Shah R., Zhao Q., Singh M., *et al.* An albumin–butyrylcholinesterase for cocaine toxicity and addiction: Catalytic and pharmacokinetic properties. // *Chemico-biological interactions*. – 2008. – Vol. 175, № 1–3. – P. 83-87.
158. Zlebnik N.E., Brimijoin S., Gao Y., Saykao A.T., Parks R.J., *et al.* Long-Term Reduction of Cocaine Self-Administration in Rats Treated with Adenoviral Vector-Delivered Cocaine Hydrolase: Evidence for Enzymatic Activity. // *Neuropsychopharmacology*. – 2014. – Vol. 39, № 6. – P. 1538-1546.
159. Parikh K., Duysen E.G., Snow B., Jensen N.S., Manne V., *et al.* Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2011. – Vol. 337, № 1. – P. 92-101.
160. Mata D.G., Rezk P.E., Sabnekar P., Cerasoli D.M., Chilukuri N. Investigation of Evolved Paraoxonase-1 Variants for Prevention of Organophosphorous Pesticide Compound Intoxication. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2014. – Vol. 349, № 3. – P. 549-558.
161. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2013. – Vol. 12, № 5. – P. 371-387.
162. Lewis K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. // *Nature*. – 2012. – Vol. 485, № 7399. – P. 439-440.

163. Schatz A., Bugle E., Waksman S.A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. // *Experimental Biology and Medicine*. – 1944. – Vol. 55, № 1. – P. 66-69.
164. Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 49, № 11. – P. 1749-1755.
165. Kelsic E.D., Zhao J., Vetsigian K., Kishony R. Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. // *Nature*. – 2015. – Vol. 521, № 7553. – P. 516-519.
166. Wright G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – Vol. 5, № 3. – P. 175–186.
167. Perry J.A., Westman E.L., Wright G.D. The antibiotic resistome: what's new? // *Current Opinion in Microbiology*. – 2014. – Vol. 21, №. – P. 45-50.
168. Kommineni S., Bretl D.J., Lam V., Chakraborty R., Hayward M., *et al.* Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian GI tract. // *Nature*. – 2015. – Vol. 526, № 7575. – P. 719-722.
169. Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., *et al.* The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. // *Science*. – 2012. – Vol. 337, № 6098. – P. 1107-1111.
170. Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Li X.-Z., *et al.* The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 57, № 5. – P. 704-710.
171. Forsberg K.J., Patel S., Gibson M.K., Lauber C.L., Knight R., *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. // *Nature*. – 2014. – Vol. 509, № 7502. – P. 612-616.
172. D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., *et al.* Antibiotic resistance is ancient. // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, № 7365. – P. 457-461.
173. Brown E.D., Wright G.D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. // *Nature*. – 2016. – Vol. 529, № 7586. – P. 336-343.
174. Andersson D.I., Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 35, № 5. – P. 901-911.
175. Cox G., Wright G.D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 303, № 6–7. – P. 287-292.
176. Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., *et al.* The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. e1619.
177. Davies J., Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2010. – Vol. 74, № 3. – P. 417-433.
178. Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2007. – Vol. 6, № 1. – P. 29-40.
179. Silver L.L. Challenges of Antibacterial Discovery. // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 24, № 1. – P. 71-109.
180. Tommasi R., Brown D.G., Walkup G.K., Manchester J.I., Miller A.A. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2015. – Vol. 14, № 8. – P. 529-542.

181. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. In Vitro Models for Selection of Development Candidates Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1997. – Vol. 23, № 1. – P. 3-25.
182. O’Shea R., Moser H.E. Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51, № 10. – P. 2871-2878.
183. Harvey A.L., Edrada-Ebel R., Quinn R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 111-129.
184. Peterson E.J.R., Ma S., Sherman D.R., Baliga N.S. Network analysis identifies Rv0324 and Rv0880 as regulators of bedaquiline tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Nature Microbiology*. – 2016. – Vol. 1. – P. 16078.
185. Taylor P.L., Rossi L., De Pascale G., Wright G.D. A Forward Chemical Screen Identifies Antibiotic Adjuvants in *Escherichia coli*. // *ACS Chemical Biology*. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 1547-1555.
186. Roemer T., Boone C. Systems-level antimicrobial drug and drug synergy discovery. // *Nat Chem Biol*. – 2013. – Vol. 9, № 4. – P. 222-231.
187. Zlitni S., Ferruccio L.F., Brown E.D. Metabolic suppression identifies new antibacterial inhibitors under nutrient limitation. // *Nat Chem Biol*. – 2013. – Vol. 9, № 12. – P. 796-804.
188. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., *et al.* Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt Quorum-Sensing Regulated Acute and Persistent Pathogenicity. // *PLoS Pathog*. – 2014. – Vol. 10, № 8. – P. e1004321.
189. Koul A., Vranckx L., Dhar N., Göhlmann H.W.H., Özdemir E., *et al.* Delayed bactericidal response of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism. // *Nat Commun*. – 2014. – Vol. 5. – P. 3369.
190. Sukuru S.C.K., Jenkins J.L., Beckwith R.E.J., Scheiber J., Bender A., *et al.* Plate-Based Diversity Selection Based on Empirical HTS Data to Enhance the Number of Hits and Their Chemical Diversity. // *Journal of Biomolecular Screening*. – 2009. – Vol. 14, № 6. – P. 690-699.
191. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J. Metabolic profiling on the right path. // *Nat Biotech*. – 2000. – Vol. 18, № 11. – P. 1142-1143.
192. Jewett M.C., Hofmann G., Nielsen J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 191-197.
193. Kersten R.D., Yang Y.-L., Xu Y., Cimermancic P., Nam S.-J., *et al.* A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. // *Nat Chem Biol*. – 2011. – Vol. 7, № 11. – P. 794-802.
194. Ibrahim A., Yang L., Johnston C., Liu X., Ma B., *et al.* Dereplicating nonribosomal peptides using an informatic search algorithm for natural products (iSNAP) discovery. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109, № 47. – P. 19196-19201.
195. Julia Kjer A.D., Amal H Aly, Peter Proksch. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. // *Nature Protocols*. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. 479-490.
196. Moloney M.G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2016. – Vol. 37, № 8. – P. 689-701.

197. Wong Weng R., Oliver Allen G., Linington Roger G. Development of Antibiotic Activity Profile Screening for the Classification and Discovery of Natural Product Antibiotics. // *Chemistry & Biology*. – 2012. – Vol. 19, № 11. – P. 1483-1495.
198. Wang J., Soisson S.M., Young K., Shoop W., Kodali S., *et al.* Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. // *Nature*. – 2006. – Vol. 441, № 7091. – P. 358-361.
199. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). // *Nature*. – 2002. – Vol. 417, № 6885. – P. 141-147.
200. Peter J. Rutledge G.L.C. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13, № 8. – P. 509–523.
201. Marnix H Medema M.A.F. Computational approaches to natural product discovery. // *Nature Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 11, № 9. – P. 639-648.
202. Zazopoulos E., Huang K., Staffa A., Liu W., Bachmann B.O., *et al.* A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. // *Nat Biotech*. – 2003. – Vol. 21, № 2. – P. 187-190.
203. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. // *Molecular Microbiology*. – 1999. – Vol. 34, № 1. – P. 102-111.
204. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. // *Nat Biotech*. – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 526-531.
205. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S., Cane D.E., Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 6. – P. 2646-2651.
206. Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. // *Nature*. – 2015. – Vol. 517, № 7535. – P. 455-459.
207. Wilson M.C., Mori T., Ruckert C., Uria A.R., Helf M.J., *et al.* An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. // *Nature*. – 2014. – Vol. 506, № 7486. – P. 58-62.
208. Brotz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H.-P., Endermann R., Ladel C., *et al.* Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. // *Nat Med*. – 2005. – Vol. 11, № 10. – P. 1082-1087.
209. Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Isabella V.M., *et al.* Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. // *Nature*. – 2013. – Vol. 503, № 7476. – P. 365-370.
210. Thaker M.N., Wang W., Spanogiannopoulos P., Waglechner N., King A.M., *et al.* Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. // *Nat Biotech*. – 2013. – Vol. 31, № 10. – P. 922-927.
211. Lehar S.M., Pillow T., Xu M., Staben L., Kajihara K.K., *et al.* Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. // *Nature*. – 2015. – Vol. 527, № 7578. – P. 323-328.
212. Han S., Zaniewski R.P., Marr E.S., Lacey B.M., Tomaras A.P., *et al.* Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically

- relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107, № 51. – P. 22002-22007.
213. Pethe K., Bifani P., Jang J., Kang S., Park S., *et al.* Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. // Nat Med. – 2013. – Vol. 19, № 9. – P. 1157-1160.
214. Ewbank J.J., Zugasti O. C. elegans: model host and tool for antimicrobial drug discovery. // Disease Models and Mechanisms. – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 300-304.
215. Veneman W.J., Stockhammer O.W., de Boer L., Zaat S.A.J., Meijer A.H., *et al.* A zebrafish high throughput screening system used for Staphylococcus epidermidis infection marker discovery. // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 1-15.
216. Michels K., Heinke R., Schone P., Kuipers O.P., Arnold N., *et al.* A fluorescence-based bioassay for antibacterials and its application in screening natural product extracts. // J Antibiot. – 2015. – Vol. 68, № 12. – P. 734-740.
217. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., *et al.* Attenuation-Based Dual-Fluorescent-Protein Reporter for Screening Translation Inhibitors. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2012. – Vol. 56, № 4. – P. 1774-1783.
218. Lv FengTing L.L., Wang Shu. Logic-signal output of fluorescent proteins for screening antibiotic combinations. // Science China Chemistry. – 2014. – Vol. 57, № 12. – P. 1696-1702.
219. Baltz R.H. Antibiotics from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? // SIM News. – 2005. – Vol. 55, №. – P. 186–196.
220. Zipperer A., Konnerth M.C., Laux C., Berscheid A., Janek D., *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. // Nature. – 2016. – Vol. 535, № 7613. – P. 511-516.
221. Liu X., Painter R.E., Enesa K., Holmes D., Whyte G., *et al.* High-throughput screening of antibiotic-resistant bacteria in picodroplets. // Lab on a Chip. – 2016. – Vol. 16, № 9. – P. 1636-1643.
222. Scanlon T.C., Dostal S.M., Griswold K.E. A high-throughput screen for antibiotic drug discovery. // Biotechnology and bioengineering. – 2014. – Vol. 111, № 2. – P. 232-243.
223. Gasparian M.E., Bobik T.V., Kim Y.V., Ponomarenko N.A., Dolgikh D.A., *et al.* Heterogeneous catalysis on the phage surface: Display of active human enteropeptidase. // Biochimie. – 2013. – Vol. 95, № 11. – P. 2076-2081.
224. Ralph E.C., Xiang L., Cashman J.R., Zhang J. His-tag truncated butyrylcholinesterase as a useful construct for in vitro characterization of wild-type and variant butyrylcholinesterases. // Protein Expression and Purification. – 2011. – Vol. 80, № 1. – P. 22-27.
225. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres jr V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. // Biochem. Pharmacol. – 1961. – Vol. 7, № 2. – P. 88-95.
226. Kitz R., Wilson I.B. Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. // Journal of Biological Chemistry. – 1962. – Vol. 237, № 10. – P. 3245-3249.
227. Yang S., Cohen C.J., Peng P.D., Zhao Y., Cassard L., *et al.* Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. // Gene therapy. – 2008. – Vol. 15, № 21. – P. 1411-1423.

228. Worek F., Koller M., Thiermann H., Szinicz L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. // *Toxicology*. – 2005. – Vol. 214, № 3. – P. 182-189.
229. Chan H.Y., Sivakamasundari V., Xing X., Kraus P., Yap S.P., *et al.* Comparison of IRES and F2A-Based Locus-Specific Multicistronic Expression in Stable Mouse Lines. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 12. – P. e28885.
230. Girod P.A., Nguyen D.Q., Calabrese D., Puttini S., Grandjean M., *et al.* Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. // *Nature methods*. – 2007. – Vol. 4, № 9. – P. 747-753.
231. Karnovsky M.J., Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. // *J. Histochem. Cytochem.* – 1964. – Vol. 12, № 3. – P. 219-221.
232. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – Vol. 91, № 1. – P. 1-11.
233. Li B., Sedlacek M., Manoharan I., Boopathy R., Duysen E.G., *et al.* Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 70, № 11. – P. 1673-1684.
234. Garrett T.L., Rapp C.M., Grubbs R.D., Schlager J.J., Lucot J.B. A murine model for sarin exposure using the carboxylesterase inhibitor CBDP. // *Neurotoxicology*. – 2010. – Vol. 31, № 5. – P. 502-508.
235. Tenconi E., Guichard P., Motte P., Matagne A., Rigali S. Use of red autofluorescence for monitoring prodiginine biosynthesis. // *Journal of microbiological methods*. – 2013. – Vol. 93, № 2. – P. 138-143.
236. Lopez-Garcia M.T., Rioseras B., Yague P., Alvarez J.R., Manteca A. Cell immobilization of *Streptomyces coelicolor* : effect on differentiation and actinorhodin production. // *International microbiology*. – 2014. – Vol. 17, № 2. – P. 75-80.
237. Smith A.J., Jackson M.S., Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. // *Journal of Medical Microbiology*. – 2001. – Vol. 50, № 11. – P. 940-946.

Приложение

1. Праймеры

Создание генетических конструкций для продукции олигомерно чистой
4pчБуХЭ

Праймер	Последовательность (5'-3')
F2AforwSpe	CTA GTG AAG CCA GAC ACA AAC AGA AAA TTG TGG CTC CGG TGA AA
F2AforwApa	CAG ACT TTG AAT TTT GAC CTT CTC AAG TTG GCG GGT GAC GTC GAG TCC AAC CCC GGG CC
F2ArevSpe	GAG AAG GTC AAA ATT CAA AGT CTG TTT CAC CGG AGC CAC AAT TTT CTG TTT GTG TCT GGC TTC A
F2ArevApa	CGG GGT TGG ACT CGA CGT CAC CCG CCA ACT T
PRADForwSacXhoStrep	GGA AGG AGC TCG AGA AAA GAG AAG CAT GGT CTC ACC CTC AGT TCG
PRADBustrepBstBI	GTC TCA CCC TCA GTT CGA AAA GCA ACC TTC TCC GCC TCT TCC CC
PRADBustrepForw2	CCT TCT CCG CCT CTT CCC CCG CCT CCG CCC CCA CCA CCT CCT CCT
PRADBustrepForw1	CCC CCA CCA CCT CCT CCT CCG CCT CCG CCC CCT CCA CCT CCA CCG
PRADBustrepRev1	AGA TGG TGC AGA TTG AGA TGG AAG CGG CGG TGG AGG TGG AGG GGG
PRADBustrepRev2SacII	GTA GTC CCG CGG TGC AGC AGA ACC GGC AGA TGG TGC AGA TTG AGA TG
PRADBustrepFLAGForw	TGC TGC ACC GCG GGA CTA CAA AGA CCA TGA CGG T
PRADBustrepFLAGForw2	GGG ACT ACA AAG ACC ATG ACG GTG ATT ATA AAG ATC ATG ACA TC

PRADFLAGrev2	TGT CAT CGT CAT CCT TGT AAT CGA TGT CAT GAT CTT TAT AAT CAC
PRADFLAGrevSpe	GGC TTC ACT AGT CTT GTC ATC GTC ATC CTT GTA
pFUSEmcsForwNcoNhe	CAT GGA GCT CGA GGG ATC CTA GGT ACC GTC TCA AGC TCT AGA TCT G
pFUSEmcsRevNcoNhe	CTA GCA GAT CTA GAG CTT GAG ACG GTA CCT AGG ATC CCT CGA GCT C
MAR 1-68 head for	TCT TGC AGA TCC CTG AAC TGA GGA G
MAR 1-68 tail rev	AGT CTT GTT TCT CTT AAA TCG TCC AAA CCA
MAR X-29 head for	GGC TTG CCA AAT GCG AAA AGA TCC
MAR X-29 tail rev	AGA GGA TCC CTA TGC TGC TGG TT
pUC19 PvuI mcs for	AAT TCC TCG AGC GAT CGC CCG GGC CGA TCG GGG
pUC19 PvuI mcs rev	TCG ACC CCG ATC GGC CCG GGC GAT CGC TCG AGG

Создание генетических конструкций для дрожжевого дисплея ферментов

- a) GCTTACTCGGAAGATGACATCATAATTGCAACAA
- b) CTCCTTCGATCGAGACTTTTGGAAAAAATGATGTCCAG
- c) GCTTACTCGATTGTTGGTGGCTCTAACGC
- d) CTCCTTCGATCGACGCATGCAGAAAGCTCTGG
- e) GCTTACTCGCTGAAGATCGCAGCCTTCAAC
- f) CTCCTTCGATCGACTTCAGCATCACCTCCACTG

Создание библиотеки мутантов БуХЭ

- a)
GCGCTAGCTGCGGCCAGCCGGCCGAAGATGACATCATAATTGCAACAAAGA
AT
- b)
CTTTGTAGTCCATCAGGCCCGAGGCCGAGACCCACACAACCTTTCTTTCTTG
- c) CCCATAGGGGACAACAAATGCTTC
- d) AACCTTGGTCCGACCGTGGATG
- e)
GAAGCATTTGTTGTCCCSTATGGGMVWMVWMDWMRWVDWAACCTTGGTC
CGACCGTGGATG

Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности

- 1) BChE cl3 rev GGACCAAAGTTACTACGAAGTGGAGG
- 2) BChE cl8 rev TCGGACCAAAGTTTATATGTATACTTTG
- 3) BChE cl13 rev TCGGACCAAAGTTAACATTACTTTTATT
- 4) BChE lib1 forw1 ACATCATCTTTACATGTTTATGATGGCAAG (общий для всех мутантов БуХЭ)

Для A17

A17LchEco81Iforw TAA GCG ACC CTC AGG GAT TCC T

Anchor Pst rev GGC TGT TTG CTG CTG CAG AAG GAA TTT A

Создание генетических конструкций для продукции мутантов БуХЭ

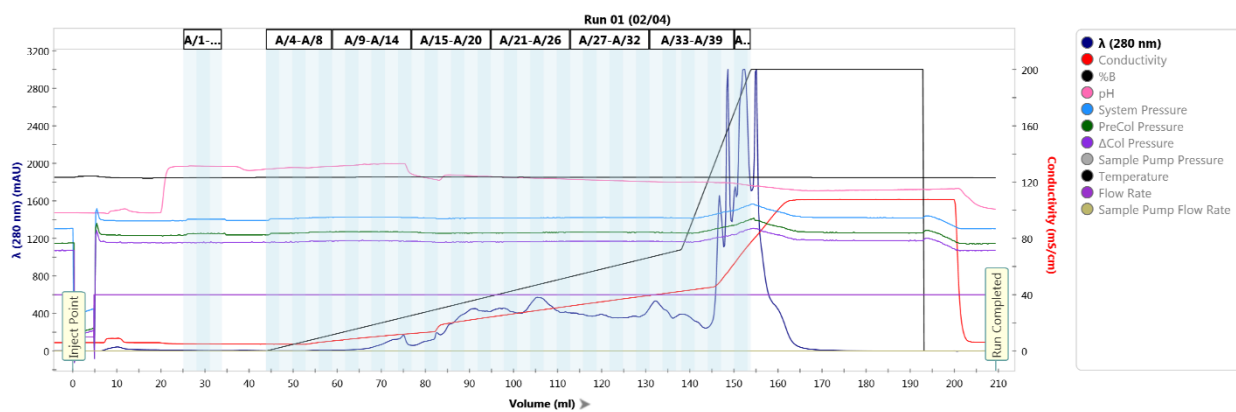
- a.
CTTGCACTTGTCACGAATTCGGAAGATGACATCATAATTGCAACAAAGAATG
GA
- b. GCTGTGCATAGGGGATTCCAAGAAA
- c. TTTCTTGGAATCCCSTATGCACAGC
- d.
TCTGGCCAGCTAGCTCAATGATGATGATGATGATGTTCTGCTTCATCAATATT
TCCTGTCAATTTCCAA

2. Очистка рчБуХЭ

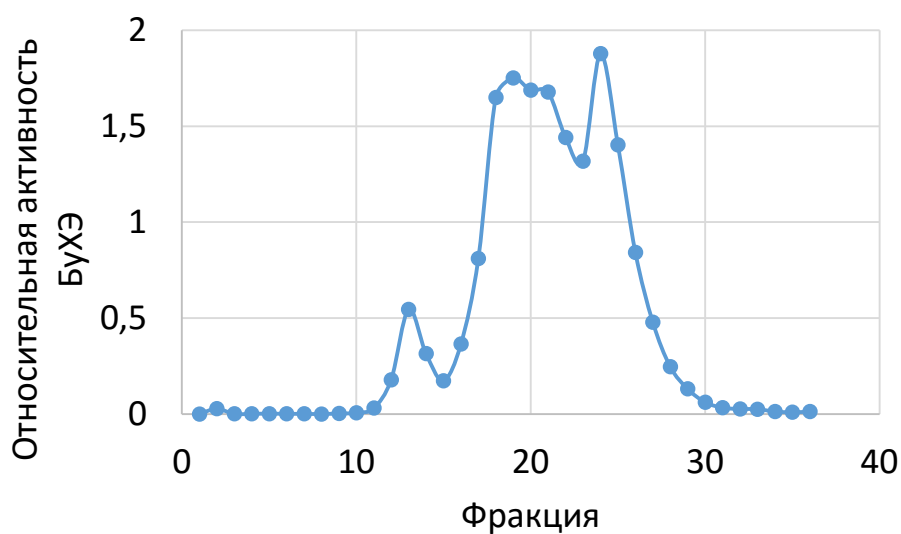
Фракционирование БуХЭ на прокаинамид-сефарозе

Фракция, mM NaCl	Доля активного биокатализатора от исходного концентрата, %
120	2
200	4
300	18
450	42
900	28
2000	4

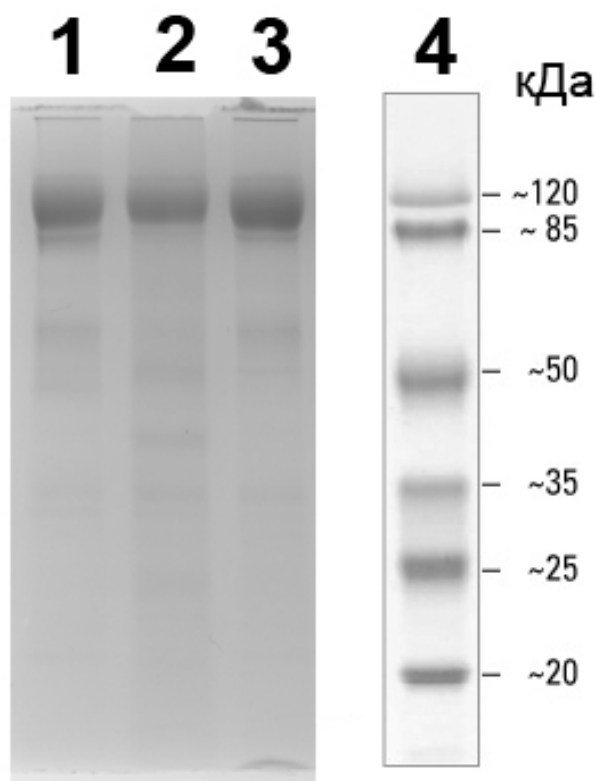
Профиль элюции ионообменной хроматограммы препаративной очистки БуХЭ на ионообменной колонке MonoQ 10/100 GL



Профиль активности фракций, полученных в результате ионообменной хроматографии БУХЭ на ионообменной колонке MonoQ 10/100 GL.



Денатурирующий восстанавливающий ПААГ-электрофорез с последующим окрашиванием элюатов фракций 900 (1) 300 (2) и 450 мМ (3) после ионообменной хроматографии красителем Кумасси R250. Справа приведены полосы белкового маркера молекулярных масс (4).



3. Результаты 16S рРНК и полногеномного широкомасштабного секвенирования капель до и после отбора на наличие активности, ингибирующей рост *S. aureus*

Широкомасштабное 16S рРНК секвенирование

Род	Количество прочтений до отбора в образце 1	Количество прочтений после отбора в образце 1	Количество прочтений до отбора в образце 2	Количество прочтений после отбора в образце 2	Обогащение в образце 1	Обогащение в образце 2	Среднее обогащение
<i>Achromobacter</i>	0	23	0	33	1,1	1,1	1,1
<i>Acinetobacter</i>	0	94	0	0	1,3	1,0	1,1
<i>Actinobacillus</i>	707	2705	1742	435	3,0	0,4	1,0
<i>Actinomyces</i>	0	13	0	0	1,0	1,0	1,0
<i>Actinopolymorpha</i>	0	25	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Aggregatibacter</i>	2163	653	2359	1089	0,4	0,5	0,4
<i>Agromyces</i>	0	34	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Alishewanella</i>	0	18	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Alkalibacterium</i>	0	0	0	61	1,0	1,2	1,1
<i>Anaerococcus</i>	0	103	0	88	1,3	1,3	1,3
<i>Aquabacterium</i>	0	21	0	49	1,1	1,2	1,1
<i>Arthrobacter</i>	0	0	0	22	1,0	1,1	1,0
<i>Bacillus</i>	0	70	0	32	1,2	1,1	1,2
<i>Bacteroides</i>	0	29	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Bosea</i>	0	66	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Bradyrhizobium</i>	0	39	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Brevundimonas</i>	0	22	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Burkholderia</i>	0	0	0	110	1,0	1,4	1,2
<i>Campylobacter</i>	0	36	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Candidatus Blochmannia</i>	127	214	157	225	1,2	1,1	1,2
<i>Candidatus Endobugula</i>	0	93	0	29	1,3	1,1	1,2
<i>Candidatus Phlomobacter</i>	0	14	0	0	1,0	1,0	1,0
<i>Candidatus Solibacter</i>	0	46	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Capnocytophaga</i>	0	16	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Caulobacter</i>	0	0	0	49	1,0	1,2	1,1
<i>Chelonobacter</i>	1526	525	1419	785	0,5	0,6	0,5
<i>Chryseobacterium</i>	0	26	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Clostridium</i>	73	52	93	71	0,9	0,9	0,9
<i>Corynebacterium</i>	61	638	0	199	2,6	1,7	2,1
<i>Delftia</i>	0	25	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Demequina</i>	0	54	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Ectothiorhodospira</i>	0	57	0	59	1,2	1,2	1,2
<i>Edwardsiella</i>	0	18	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Enhydrobacter</i>	0	119	0	0	1,4	1,0	1,2
<i>Enterobacter</i>	0	419	0	24	2,4	1,1	1,6
<i>Erwinia</i>	0	76	0	0	1,3	1,0	1,1
<i>Escherichia</i>	0	769	0	865	3,6	3,9	3,7
<i>Filifactor</i>	0	96	0	0	1,3	1,0	1,1
<i>Finegoldia</i>	0	45	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Flavobacterium</i>	0	48	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Fusobacterium</i>	1239	190	2945	1636	0,3	0,6	0,4
<i>Gallibacterium</i>	0	14	0	24	1,0	1,1	1,1
<i>Granulicatella</i>	143	0	124	266	0,7	1,3	1,0
<i>Haemophilus</i>	26107	10687	30202	16895	0,4	0,6	0,5
<i>Halomonas</i>	0	163	0	70	1,5	1,2	1,4
<i>Helicobacter</i>	0	0	0	30	1,0	1,1	1,0
<i>Herminiimonas</i>	0	46	0	178	1,2	1,6	1,4
<i>Ignavibacterium</i>	0	16	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Janthinobacterium</i>	0	30	0	1245	1,1	5,2	2,4

<i>Kocuria</i>	0	38	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Lactobacillus</i>	0	36	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Leptotrichia</i>	58	35	0	38	0,9	1,1	1,0
<i>Macrococcus</i>	52	16	0	27	0,9	1,1	1,0
<i>Mannheimia</i>	2538	1780	3399	1549	0,7	0,5	0,6
<i>Maricaulis</i>	0	13	0	0	1,0	1,0	1,0
<i>Mesorhizobium</i>	0	21	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Methylobacterium</i>	0	68	0	83	1,2	1,3	1,3
<i>Microbacterium</i>	0	22	0	22	1,1	1,1	1,1
<i>Microbispora</i>	0	16	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	22	1,0	1,1	1,0
<i>Micromonospora</i>	0	110	0	44	1,4	1,1	1,3
<i>Moryella</i>	0	43	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Mycobacterium</i>	0	16	0	28	1,1	1,1	1,1
<i>Neisseria</i>	474	0	1351	5198	0,4	3,3	1,1
<i>Ochrobactrum</i>	0	52	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Oribacterium</i>	0	93	0	55	1,3	1,2	1,2
<i>Oxalobacter</i>	0	0	0	47	1,0	1,2	1,1
<i>Paenibacillus</i>	115	25	76	90	0,8	1,0	0,9
<i>Parascardovia</i>	0	52	0	26	1,2	1,1	1,1
<i>Pasteurella</i>	0	27	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Pectinatus</i>	0	42	0	0	1,1	1,0	1,1
<i>Pelomonas</i>	0	43	0	24	1,1	1,1	1,1
<i>Peptoniphilus</i>	0	21	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Peptostreptococcus</i>	0	97	0	0	1,3	1,0	1,2
<i>Phenylobacterium</i>	0	103	0	76	1,3	1,3	1,3
<i>Porphyromonas</i>	59	73	0	47	1,0	1,2	1,1
<i>Prevotella</i>	0	151	77	98	1,5	1,1	1,3
Propionibacterium	183	1740	71	1017	4,2	3,6	3,9
<i>Providencia</i>	0	37	0	0	1,1	1,0	1,1
Pseudomonas	48	1297	0	571	4,6	2,9	3,7
<i>Ralstonia</i>	0	114	0	37	1,4	1,1	1,2
<i>Renibacterium</i>	0	28	0	30	1,1	1,1	1,1
<i>Rhodospirillum</i>	288	94	274	138	0,7	0,8	0,7
<i>Rhodovibrio</i>	0	15	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Roseospira</i>	0	30	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Rothia</i>	68	57	110	115	1,0	1,0	1,0
<i>Ruminococcus</i>	0	0	0	28	1,0	1,1	1,0
<i>Schlegelella</i>	0	37	0	51	1,1	1,2	1,1
<i>Sediminibacterium</i>	0	55	0	82	1,2	1,3	1,2
Serratia	0	411	0	60	2,4	1,2	1,7
Sphingomonas	0	675	0	929	3,3	4,1	3,7
<i>Sporolactobacillus</i>	0	24	0	28	1,1	1,1	1,1
<i>Staphylococcus</i>	20831	5240	16767	17840	0,3	1,1	0,5
Stenotrophomonas	51	818	0	960	3,2	4,2	3,7
<i>Stenoxybacter</i>	0	36	0	0	1,1	1,0	1,1
Streptococcus	1784	2782	3094	4951	1,5	1,5	1,5
<i>Streptomyces</i>	0	25	0	22	1,1	1,1	1,1
<i>Tetragenococcus</i>	0	15	0	38	1,1	1,1	1,1
<i>Thauera</i>	0	45	0	0	1,2	1,0	1,1
<i>Thioalkalivibrio</i>	0	17	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Thiomonas</i>	0	25	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Treponema</i>	0	15	0	0	1,1	1,0	1,0
<i>Veillonella</i>	4275	841	5351	2277	0,2	0,5	0,3
<i>Virgibacillus</i>	0	33	0	32	1,1	1,1	1,1
<i>Wautersiella</i>	0	13	0	0	1,0	1,0	1,0
Всего	62970	35959	69611	61249	0,6	0,9	0,7

Условные обозначения

уровень *Streptococcus*

уровень *Pseudomonas*

Фон - 300 прочтений

Полногеномное секвенирование с последующим биоинформатическим анализом методом Metaphlan2.

Бактерия	Доля в образце 1 до отбора,	Доля в образце 1 после отбора,	Доля в образце 2 до отбора,	Доля в образце 2 после отбора,	Обогащение в образце 1	Обогащение в образце 2	Среднее обогащение
	%	%	%	%			
<i>s_Propionibacterium_acnes</i>	0	22,486	0	10,913	4498,20	2183,60	3134,05
<i>s_Streptococcus_mitis_oralis_pneumoniae</i>	0	0,831	0	0,831	167,20	167,20	167,20
<i>s_Escherichia_coli</i>	0	0	0	0,864	1,00	173,80	13,18
<i>s_Escherichia_unclassified</i>	0	0,702	0	0	141,40	1,00	11,89
<i>s_Neisseria_unclassified</i>	0,444	5,063	0	0	11,29	1,00	3,36
<i>s_Kingella_unclassified</i>	0	0,374	0	0	75,80	1,00	8,71
<i>s_Streptococcus_tigurinus</i>	0	0,3	0	0	61,00	1,00	7,81
<i>s_Candidatus_Zinderia_insecticola</i>	0	0	0,782	5,59	1,00	7,11	2,67
<i>s_Haemophilus_sputorum</i>	2,452	0	0	6,091	0,00	1219,20	1,58
<i>s_Streptococcus_anginosus</i>	0,12	0,09	0	0	0,76	1,00	0,87
<i>s_Gemella_haemolysans</i>	0,972	0,597	0	0	0,62	1,00	0,78
<i>s_Haemophilus_parainfluenzae</i>	72,728	48,77	66,159	61,111	0,67	0,92	0,79
<i>s_Fusobacterium_nucleatum</i>	0,055	0	0	0	0,08	1,00	0,29
<i>s_Haemophilus_haemolyticus</i>	0,073	0	0	0	0,06	1,00	0,25
<i>s_Gemella_unclassified</i>	0	0	0,076	0	1,00	0,06	0,25
<i>s_Staphylococcus_aureus</i>	14,338	20,102	19,786	2,591	1,40	0,13	0,43
<i>s_unclassified</i>	0,788	0	10,108	12,008	0,01	1,19	0,09
<i>s_Actinobacillus_unclassified</i>	1,095	0	0	0	0,00	1,00	0,07
<i>s_Fusobacterium_periodonticum</i>	1,106	0	0	0	0,00	1,00	0,07
<i>s_Aggregatibacter_unclassified</i>	0,471	0	0,466	0	0,01	0,01	0,01
<i>s_Veillonella_parvula</i>	3,073	0,685	1,895	0	0,22	0,00	0,02
<i>s_Haemophilus_pittmaniae</i>	1,113	0	0,316	0	0,00	0,02	0,01
<i>s_Veillonella_unclassified</i>	1,169	0	0,413	0	0,00	0,01	0,01

Фон - 0,005%

Полногеномное секвенирование с последующим биоинформатическим анализом методом CLARK.

Род	Вид	Доля в образце 1 до отбора,	Доля в образце 1 после отбора,	Доля в образце 2 до отбора,	Доля в образце 2 после отбора,	Обогащение в образце 1	Обогащение в образце 2	Среднее обогащение
		%	%	%	%			
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	0,027	3,068	0,125	3,892	96,03	29,98	53,65
<i>Prevotella</i>	<i>dentalis</i>	0,007	1,023	0,035	0,152	85,67	3,93	18,34
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	0,037	3,51	0,084	0,156	83,69	1,81	12,30
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	0	0,165	0,007	0,022	34,00	2,25	8,75
<i>Macrococcus</i>	<i>caseolyticus</i>	0	0,213	0,001	0,002	43,60	1,17	7,13
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	0	0,192	0,001	0,001	39,40	1,00	6,28
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	0,001	0,007	0,001	0,106	2,00	18,50	6,08
<i>Paracoccus</i>	<i>denitrificans</i>	0	0,009	0	0,046	2,80	10,20	5,34
<i>Propionibacterium</i>	<i>avidum</i>	0	0,023	0,002	0,022	5,60	3,86	4,65
<i>Streptococcus</i>	<i>pseudopneumoniae</i>	0,007	0,134	0,011	0,021	11,58	1,63	4,34
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	0,011	0,164	0,02	0,029	10,56	1,36	3,79
<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>	0,024	0,005	0,006	0,413	0,34	38,00	3,62
<i>Shimwellia</i>	<i>blattae</i>	0	0,057	0	0	12,40	1,00	3,52
<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>	0,004	0,111	0,002	0	12,89	0,71	3,03
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	0,008	0,092	0,011	0,011	7,46	1,00	2,73
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	2,466	9,032	1,908	2,868	3,66	1,50	2,34
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,018	0,021	0,011	0,069	1,13	4,63	2,29

<i>Streptococcus</i>	<i>oligofermentans</i>	0,008	0,043	0,008	0,011	3,69	1,23	2,13
<i>Streptococcus</i>	<i>dysgalactiae</i>	0	0,013	0	0,001	3,60	1,20	2,08
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,018	0,071	0,015	0,021	3,30	1,30	2,07
<i>Tetragenococcus</i>	<i>halophilus</i>	0,002	0,022	0,003	0,003	3,86	1,00	1,96
<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	0,056	0,156	0,049	0,073	2,64	1,44	1,95
<i>Neisseria</i>	<i>lactamica</i>	0,004	0,001	0,002	0,035	0,67	5,71	1,95
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,017	0,036	0,008	0,02	1,86	1,92	1,89
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	0,007	0,023	0,003	0,006	2,33	1,38	1,79
<i>Acidiphilium</i>	<i>cryptum</i>	0	0,011	0	0	3,20	1,00	1,79
<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	0,008	0,033	0,007	0,008	2,92	1,08	1,78
<i>Dichelobacter</i>	<i>nodosus</i>	0	0	0	0,01	1,00	3,00	1,73
<i>Citrobacter</i>	<i>koseri</i>	0,004	0,016	0,003	0,005	2,33	1,25	1,71
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i>	0,005	0,018	0,004	0,006	2,30	1,22	1,68
<i>Corynebacterium</i>	<i>aurimucosum</i>	0	0,005	0	0,002	2,00	1,40	1,67
<i>Methylobacterium</i>	<i>extorquens</i>	0	0,008	0	0	2,60	1,00	1,61
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	0	0,008	0	0	2,60	1,00	1,61
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	15,658	32,652	14,587	17,599	2,08	1,21	1,59
<i>Bibersteinia</i>	<i>trehalosi</i>	0,003	0,005	0,002	0,009	1,25	2,00	1,58
<i>Actinobacillus</i>	<i>suis</i>	0,003	0,006	0,003	0,008	1,38	1,63	1,49
<i>Erwinia</i>	<i>pyrifoliae</i>	0,024	0,077	0,032	0,024	2,83	0,78	1,49
<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>	0,003	0,001	0,002	0,015	0,75	2,86	1,46
<i>Heliobacterium</i>	<i>modesticaldum</i>	0,096	0,354	0,12	0,068	3,55	0,58	1,44
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	0,004	0,016	0,004	0,003	2,33	0,89	1,44
<i>Streptococcus</i>	<i>suis</i>	0,001	0,005	0	0,001	1,67	1,20	1,41
[<i>Haemophilus</i>]	<i>ducreyi</i>	0,002	0,001	0	0,006	0,86	2,20	1,37
<i>Shigella</i>	<i>boydii</i>	0	0,004	0	0	1,80	1,00	1,34
<i>Staphylococcus</i>	<i>pseudintermedius</i>	0	0,004	0	0	1,80	1,00	1,34
<i>Methylothera</i>	<i>versatilis</i>	0	0	0	0,004	1,00	1,80	1,34
<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	0,008	0,02	0,01	0,008	1,92	0,87	1,29
<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	0	0	0	0,003	1,00	1,60	1,26
<i>Parvularcula</i>	<i>bermudensis</i>	0	0,003	0	0	1,60	1,00	1,26
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1,722	1,776	1,589	2,37	1,03	1,49	1,24
<i>Vibrio</i>	<i>vulnificus</i>	0,001	0	0	0,004	0,83	1,80	1,22
<i>Corynebacterium</i>	<i>urealyticum</i>	0	0,001	0	0,001	1,20	1,20	1,20
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	0,033	0,072	0,047	0,031	2,03	0,69	1,18
<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii</i>	0	0,002	0	0	1,40	1,00	1,18
<i>Sinorhizobium</i>	<i>medicae</i>	0	0,002	0	0	1,40	1,00	1,18
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	0,002	0,003	0,002	0,003	1,14	1,14	1,14
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	0,004	0,004	0,004	0,006	1,00	1,22	1,11
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	0	0,001	0,001	0,001	1,20	1,00	1,10
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Photorhabdus</i>	<i>asymbiotica</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Xenorhabdus</i>	<i>bovienii</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Corynebacterium</i>	<i>halotolerans</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Methylobacterium</i>	<i>populi</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Edwardsiella</i>	<i>ictaluri</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Streptococcus</i>	<i>gallolyticus</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10

<i>Bacteroides</i>	<i>vulgatus</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Corynebacterium</i>	<i>diphtheriae</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Erythrobacter</i>	<i>litoralis</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Streptococcus</i>	<i>macedonicus</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	0	0,001	0	0	1,20	1,00	1,10
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	0	0	0	0,001	1,00	1,20	1,10
<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>	0,007	0,01	0,007	0,005	1,25	0,83	1,02
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>	0,006	0,006	0,005	0,005	1,00	1,00	1,00
[<i>Haemophilus</i>]	<i>parasuis</i>	0,006	0,006	0,003	0,003	1,00	1,00	1,00
<i>Aliivibrio</i>	<i>fischeri</i>	0,001	0,001	0	0	1,00	1,00	1,00
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	0,001	0,001	0	0	1,00	1,00	1,00
<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i>	0	0,001	0,001	0	1,20	0,83	1,00
<i>Shewanella</i>	<i>baltica</i>	0,001	0,001	0	0	1,00	1,00	1,00
<i>Prevotella</i>	<i>denticola</i>	0,001	0,001	0	0	1,00	1,00	1,00
<i>Actinobacillus</i>	<i>pleuropneumoniae</i>	0,005	0,008	0,003	0,001	1,30	0,75	0,99
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	0,525	0,459	0,496	0,529	0,88	1,07	0,97
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>	0,434	0,256	0,376	0,573	0,59	1,52	0,95
<i>Mannheimia</i>	<i>haemolytica</i>	0,004	0,005	0,004	0,002	1,11	0,78	0,93
[<i>Mannheimia</i>]	<i>succiniciproducens</i>	0,002	0,002	0,002	0,001	1,00	0,86	0,93
<i>Gallibacterium</i>	<i>anatis</i>	0,002	0,002	0,002	0,001	1,00	0,86	0,93
<i>Histophilus</i>	<i>somni</i>	0,002	0,002	0,002	0,001	1,00	0,86	0,93
<i>Vibrio</i>	<i>campbellii</i>	0,002	0	0	0,001	0,71	1,20	0,93
<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus</i>	0,001	0	0	0	0,83	1,00	0,91
<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>	0,001	0	0	0	0,83	1,00	0,91
<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>	0,001	0	0	0	0,83	1,00	0,91
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Streptococcus</i>	<i>equi</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Photobacterium</i>	<i>profundum</i>	0,001	0	0	0	0,83	1,00	0,91
<i>Xenorhabdus</i>	<i>nematophila</i>	0,001	0	0	0	0,83	1,00	0,91
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Herminiimonas</i>	<i>arsenicoxydans</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdunensis</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Vibrio</i>	<i>tasmaniensis</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Glaciecola</i>	<i>nitratireducens</i>	0	0	0,001	0	1,00	0,83	0,91
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>palustris</i>	0,002	0,004	0,003	0	1,29	0,63	0,90
<i>Actinobacillus</i>	<i>succinogenes</i>	0,002	0,001	0,002	0,001	0,86	0,86	0,86
<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>	0,001	0	0,002	0	0,83	0,71	0,77
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	0,444	0,286	0,452	0,397	0,65	0,88	0,76
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	0,011	0,013	0,027	0,011	1,13	0,50	0,75
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	0,01	0,007	0,013	0,007	0,80	0,67	0,73
<i>Alteromonas</i>	<i>macleodii</i>	0,017	0,015	0,028	0,014	0,91	0,58	0,72
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	77,376	45,194	79,307	70,042	0,58	0,88	0,72
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	0,249	0,257	0,262	0,126	1,03	0,49	0,71
<i>Aggregatibacter</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>	0,008	0,005	0,006	0,002	0,77	0,64	0,70
<i>Staphylococcus</i>	<i>argenteus</i>	0,009	0,005	0,01	0,005	0,71	0,67	0,69
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	0,001	0,001	0,006	0	1,00	0,45	0,67
<i>Aggregatibacter</i>	<i>aphrophilus</i>	0,056	0,042	0,045	0,022	0,77	0,54	0,65
<i>Pediococcus</i>	<i>clausenii</i>	0	0	0,019	0	1,00	0,21	0,46
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,016	0	0,002	0	0,24	0,71	0,41
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	0,037	0,001	0,011	0,012	0,14	1,06	0,39
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,199	0,016	0,003	0,001	0,10	0,75	0,28
<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	0,23	0,042	0,14	0,025	0,20	0,21	0,20

ФОН - 0,005%

4. Кокультивация *S. aureus* и *P. aeruginosa* приводит к индукции продукции вторичных метаболитов в ростовую среду, ингибирующую рост *S. aureus*, сопровождающейся продукцией пиовердина, обладающего голубой флуоресценцией. Максимальный уровень индукции наблюдается в случае максимальной начальной концентрации *S. aureus* (SA) и минимальной начальной концентрации *P. aeruginosa* (PA) при кокультивации.

Разведение	SA:PA=0:3x10 ⁶		SA:PA=5x10 ⁷ :5x10 ⁷		SA:PA=5x10 ⁷ :3x10 ⁶		SA:PA=5x10 ⁷ :1x10 ⁵		SA:PA=5x10 ⁷ :3x10 ³		SA:PA=5x10 ⁷ :1x10 ²		SA:PA=10 ¹⁰ :3x10 ³	
	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU	A ₈₀₀	RFU
2X	0,86	28	0,47	33	0,26	27	0,05	48	0,01	283	0,00	237	0,00	255
4X	1,17	28	0,64	35	0,74	29	0,72	36	0,71	135	0,61	116	0,51	116
8X	1,21	30	1,04	35	0,95	30	0,93	31	0,89	73	0,86	66	0,85	65
16X	1,28	32	1,15	37	1,12	30	1,16	33	1,16	52	1,14	49	1,08	48
32X	1,28	34	1,19	36	1,21	33	1,21	33	1,18	43	1,21	41	1,18	40

5. Экстракция вторичных метаболитов *P. aeruginosa*. Основная часть вторичных метаболитов *P. aeruginosa*, ингибирующая рост *S. aureus*, экстрагируется хлороформом. Ингибирование *S. aureus* обусловлено в первую очередь не пиовердином.

Разведение	Среда		Водная фаза среды		CHCl ₃ экстракт среды	
	SA RFU	Пиовердин, RFU	SA RFU	Пиовердин, RFU	SA RFU	Пиовердин, RFU
2X	8	150	53	155	5	30
4X	13	104	789	92	6	27
8X	138	64	1508	64	40	25
16X	270	41	1755	44	147	27
32X	503	32	2178	43	564	29
64X	820	28	2211	37	1181	31