DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-7-10
УДК 579.22

Изучение эффективности детектирования медиаторов чувства кворума *P. aeruginosa* с использованием биосенсоров iGem

Черепушкина В.С.
Cherepushkina V.S.

¹Черепушкина В.С., мл. науч. сотр., vicky88@bk.ru

^{1,3}Миронова Т.Е., лаборант-исследователь,
mironova.tanya1994@mail.ru

¹Балыбина Н.Ю., м.н.с., madam_balybina.yandex.ru

¹Донченко Н.А., д-р ветеринар. наук, профессор, член-корреспондент РАН, tbc2009@yandex.ru

¹Коптев В.Ю., канд.ветеринар.наук., ст.науч.сотр.,
kastrolog@mail.ru

^{1,2}Афонюшкин В.Н., канд. биол. наук, зав.сектором,
lisocim@mail.ru

²Мишукова О.В., м.н.с

²Филипенко М.Л., канд. биол. наук, зав.лаб.,
lisocim@mail.ru

¹Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий РАН

²Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

³ФГБОУ ВО Новосибирский государственный аграрный
университет

Ключевые слова: биосенсор, биопленки, плазмиды, *P. aeruginosa*, кворум.

Резюме. В связи с повсеместным использованием биосенсоров для детекции различных веществ, например, таких как гомосеринлактоны, для изучения реакций чувства кворума у *Pseudomonas aeruginosa*, возникает необходимость проверки эффективности их работы, а также усовершенствования методов визуализации полученных результатов. Биосенсор – это устройство имеющее чувствительный слой, представленный биологическим материалом (антигена, антигены, ферменты, ткани, бактерии, нуклеиновые кислоты, органеллы и др). В присутствии определяемого компонента сенсорный слой генерирует сигнал, который функционально связан с концентрацией данного компонента. Изучение работы систем кворум-сенсинга имеет важное значение, так как она определяет образование биопленок, которые в свою очередь многократно повышают устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков, иммунному ответу микроорганизмов и обработке биоцидами. В данной работе был проведен сравнительный анализ эффективности детектирования медиаторов чувства кворума *P. aeruginosa* с использованием биосенсоров iGem и реалтайм амплификатора. В экспериментах использовали

Research of the effectiveness of the detection of mediators of the quorum feeling of *P. aeruginosa* by using iGem biosensors

¹Cherepushkina V.S., ^{1,3}Mironova T.E., ¹Balybina N.Y.,

¹Donchenko N.A., ¹Koptev V.Y., ^{1,2}Afonyushkin V.N.,

²Mishukova O.V., ²Filipenko M.L.

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS 630090, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev av., 8

²Siberian Federal Research Center for Agrobiotechnology RAS 630501, Russia, Novosibirsk region, Krasnoobsk, box 708

³Federal State-Funded Educational Institution of Higher Education Novosibirsk State University of Agriculture (NSAU), 630039, Russia, Novosibirsk, Dobrolubov Str. 160

Key words: biosensor, biofilms, plasmids, *P. aeruginosa*, quorum

Abstract. In connection with the widespread use of biosensors for the detection of various substances, it is necessary to check the effectiveness of their work, as well as to improve the methods of visualization of the results obtained. A biosensor is a device having a sensitive layer represented by biological material (antibodies, antigens, enzymes, tissues, bacteria, nucleic acids, organelles, etc.). In the presence of a detectable component, the sensor layer generates a signal that is functionally related to the concentration of this component. Studying the operation of quorum-sensing systems is important because it determines the formation of biofilms, which in turn greatly increase the resistance of microorganisms to antibiotics, the immune response of microorganisms, and using biocides. In this work, a comparative analysis of the efficiency of detecting mediators of the *P. aeruginosa* quorum senses using iGem biosensors and realtime amplifier was carried out. In experiments, cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 669, 668, cultures of bacteria of the genus *Bacillus*, *Geobacillus* were used. For testing homoserine lactones, plasmids iGEM pSB1C3 were used. The *P. aeruginosa* 669 IHBFM and *E. coli* NovaBlue cultures transformed with the pSB1 plasmid encoding the dodecanologorous lactone ternase synthase gene under the inducible promoter were used as producers of homoserine lactones. To study the possibility of using the biosensors under study as indicators of the presence of homoserine-lactone culture of biosensors - 12D P1 (LasR + GFP), 7P P3 (RhIR + GFP), 18B P1 (RhIR + RFP), 100 P5 (LasR + GFP), 12F P1 (- GFP / RFP), 14L P1 (LasR + GFP) were sown by intersecting strokes in front of the *P. aeruginosa* ATCC 9027 culture. After 48 hours of incubation, the fluorescence of the cultures was analyzed using a transilluminator. The study showed that only two biosensors based on recombinant *Escherichia coli* with plasmids pSB1C3 / (18B P1 (BBa_K575039) and pSB1C3 / 14 L P1 (BBa_K575024 iGEM)) are suitable for the qualitative determination of the presence of butanoylgoserin and BB6 / 14 L P1 (BBa_K575024) for measuring the presence of butanoylhomurine and BBS_1503 i143 P1B3 / 14 L P1 (BBa_K575024 iGEM)) are suitable for determining the presence of butanoyl, but it is also suitable for the presence of butanoyl, 1, 3, and PSB1C3 / 14 L P1 (BBa_K575024 iGEM)).

Для цитирования / For citation

Изучение эффективности детектирования медиаторов чувства кворума *P. aeruginosa* с использованием биосенсоров iGem / Черепушкина В.С. [и др.] // Ветеринария и кормление. 2019. №7 - С. 36-38.

Research of the effectiveness of the detection of mediators of the quorum feeling of *P. aeruginosa* by using iGem biosensors / Cherepushkina V.S. [et al.] // Veterinaria i kormlenie. -2019. №7 - P.36-38.

Рис. 1. Флуоресценция E.coli NovaBlue pSB1C3 с различными BioBricks компонентами обеспечивающими флуоресценцию в присутствии гомосеринлактонов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027: 1- 12D P1 (LasR+GFP); 2- 7P P3 (RhIR+GFP); 3-18B P1 (RhIR+RFP); 4-100 P5 (LasR+GFP); 5-12F P1 (-GFP/RFP); 6-14L P1 (LasR+GFP).

Fig. 1. Fluorescence of E.coli NovaBlue pSB1C3 with various BioBricks components providing fluorescence in the presence of homoseryl lactones *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027: 1- 12D P1 (LasR+GFP); 2- 7P P3 (RhIR+GFP); 3-18B P1 (RhIR+RFP); 4-100 P5 (LasR+GFP); 5-12F P1 (-GFP/RFP); 6-14L P1 (LasR+GFP).

культуры *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 669, 668, культуры бактерий рода *Bacillus*, *Geobacillus*. Для тестирования гомосеринлактонов использовали плазмиды iGEM pSB1C3. В качестве продуцентов гомосеринлактонов использовали культуру *P. aeruginosa* 669 ИХБФМ и *E. coli* NovaBlue трансформированную плазмидой pSB1 кодирующей ген концевой синтазы додеканолгомосеринлактона под индуцибельным промотором. Для изучения возможности применения исследуемых биосенсоров в качестве индикаторов наличия гомосеринлактонов культуры биосенсоров – 12D P1 (LasR+GFP), 7P P3 (RhIR+GFP), 18B P1 (RhIR+RFP), 100 P5 (LasR+GFP), 12F P1 (-GFP/RFP), 14L P1 (LasR+GFP) сеяли методом пересекающихся штрихов напротив культуры *P. aeruginosa* ATCC 9027. Через 48 часов инкубации анализировали флуоресценцию культур с использованием трансиллюминатора. Данное исследование показало что, только два биосенсора на основе рекомбинантной кишечной палочки с плазмидами pSB1C3/(18B P1 (BBa_K575039) и pSB1C3/14 L P1 (BBa_K575024 iGEM)) пригодны для качественного определения наличия бутаноилгомосеринлактона и додеканолгомосеринлактона в образцах, соответственно.

Биосенсор представляет собой аналитический инструмент, в котором в качестве "чувствительного элемента" используется биологический материал (ферменты, антитела, органеллы, нуклеиновые кислоты, клетки или ткани) [1, 2]. С помощью биосенсоров определяют содержание различных молекул в средах [3-9]. Одним из применений биосенсоров является детекция гомосеринлактонов для изучения реакций чувства кворума у *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка, СГП) широко представленный вид (убиквитарный) обладающий патогенным потенциалом. Данный инфекционный агент является возбудителем раневых инфекций, фиброзного цистита, фиброзирующей пневмонии, бактериального сепсиса и т.д. Микроорганизм отличается высокой устойчивостью к антисептикам, дезинфектантам реакциям иммунной системы организма [10]. Реакции чувства кворума данного вида бактерий обеспечивают включение многих факторов патогенности [11, 12]. Одной из важных особенностей синегнойной палочки является ее способность к образованию биопленок (в качестве одной из реакций чувства кворума), образование биопленок считается одним из факторов устойчивости к антибиотикам и антисептикам, хотя на сегодняшний день этот фактор ставится под сомнение некоторыми исследователями [13-15]. Также биопленки препятствуют фагоцитозу (при нахождении синегнойной палочки в организме и работе гуморального иммунитета) [16]. *P. aeruginosa* содержит одну из самых сложных систем QS(17). Существует два сигнальных пути N- ацилгомосерин-лактона (AHL), LasI / LasR и RhII / RhIR; оба являются гомологами типа LuxI / LuxR, и оба активируются путем увеличения плотности клеток в бактериальной популяции [18]. Каждая AHL-зависимая система состоит из синтазы LuxI-типа и рецептора LuxR-типа. LasR и RhIR являются регуляторами транскрипции и вместе контролируют активацию более 300 генов в геноме *P. aeruginosa* [19]. Кроме того, существует 30 -C 12 -HSL-связывающий рецептор QscR, гомолог LuxR, который не только контролирует свой собственный набор генов, но также инактивирует LasR и RhIR и тем самым репрессирует многие Las- и RhI-зависимые гены, что приводит к предотвращению ответа QS до того, как бактерии достигают кворума в популяции [20, 21].

Изучение реакций чувства кворума важно при создании антибактериальных препаратов, механизм действия которых основан на подавлении некоторых реакций кворум-сенсинга бактерии в объектах окружающей среды и в организме человека и животных [14, 22]. Для этого необходимо знать о наличии или отсутствии как додеканолгомосеринлактона и бутаноилгомосеринлактона.

Целью работы было исследовать возможность применения различных биосенсоров для определения маркеров чувства кворума у *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы

В экспериментах использовали культуры *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 669, 668, культуры бактерий родов *Bacillus*, *Geobacillus* (коллекции экстремофильных микроорганизмов ИХБФМ СО РАН).

Для тестирования гомосеринлактонов использовали следующие плазмиды любезно предоставленные The International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation pSB1C3: 16HP1 (номер iGEM: BBa_K575032) – C4-HSL биосенсор (RhIR+GFP) обеспечивает индукцию синтеза GFP в присутствии бутаноилгомосеринлактона (KristinPalarz Group: iGEM11_Northwestern (2011-09-22)) (23); 14LP1 (BBa_K575024) – 3-охо-C12-HSL биосенсор LasR+GFP обеспечивает индукцию синтеза GFP в присутствии додеканолгомосеринлактона (KristinPalarz Group: iGEM11_Northwestern (2011-09-22)) (24); 18B P1 (BBa_K575039) – C4-HSL биосенсор (RhIR+RFP) обеспечивает индукцию синтеза RFP в присутствии бутаноилгомосеринлактона (KristinPalarzGroup: iGEM11_Northwestern(2011-

Таблица 1. Относительная флуоресценция культур биосенсоров, RFU

Tabl. 1. Relative fluorescence of cultures biosensores, RFU

Канал	Культуры – биосенсоры						Neg. control
	14LP1	12F P1	100 P5	P3 7P	18B P1	12D	
FAM	2925,00*** +45,978	2444,33 +14,786	2625,00 +98,424	2471,00 +31,808	2380,67 +29,49	2547,33 +46,421	2838,67 +523,574
TexasRed	2234,000* +10,705	1961,66 7+4,98	2021,000 +22,969	2017,667 +16,002	2787,333*** +21,429	1993,333 +11,638	2045,00 +64,608

Примечание: *P <0,05; ***P <0,001.

09-22)) (25); 12d P1 (BBa_K546000) – обеспечивает синтез C12-HSL и экспрессию GFP в его присутствии (положительная обратная связь), что, вероятно, позволяет использовать в качестве положительного контроля (M. HesselmanGroup: iGEM11_Wageningen_UR (2011-09-14)) [26]; 7P P3 (BBa_C0071) -C4-HSL биосенсор (RhIR+GFP) обеспечивает индукцию синтеза GFP в присутствии бутаноилгомосеринлактона (наличие дополнительно LVA tag, должно уменьшать деградацию протеазами сенсорного белка RhIR) (DebraLin, Srinidevadas, DavidGray, RonnyKrashinsky, andChrisZhengLiu, Boopers Group: Antiquity (2004-01-26)) (27); P5 100 (BBa_K1315009) -3-oxo-C12-HSL биосенсор LasR+GFP обеспечивает индукцию синтеза GFP в присутствии додеканоилгомосеринлактона (DimitriosMichailidis Group: iGEM14_Dundee (2014-09-26)) (28); 12F P1 (BBa_K546001) – Обеспечивает продукцию фермента AiiA (с LVA-tag) в присутствии 3-oxo-C12-HSL (M. Hesselman Group: iGEM11_Wageningen_UR (2011-09-14)) [29]. В качестве продуцентов гомосеринлактонов использовали культуру *P. aeruginosa* 669 IXБФМ и *E. coli* NovaBlue трансформированную плазмидой pSB1 кодирующей ген концевой синтазы додеканоилгомосеринлактона под индуцибельным промотором. К суточным культурам на LB бульоне добавляли 1/10 часть этилового эфира уксусной кислоты (этилацетата) и через сутки экстракты центрифугировали и высушивали. Осадок из 1 мл экстракта разводили в 100 мкл дистиллированной воды.

Результаты исследований

Для изучения реакций чувств кворума синегнойной палочки с использованием биосенсоров, культуры биосенсоров – 12D P1 (LasR+GFP), 7P P3 (RhIR+GFP), 18B P1 (RhIR+RFP), 100 P5 (LasR+GFP), 12F P1 (-GFP/RFP), 14L P1 (LasR+GFP) сеяли методом пересекающихся штрихов на против культуры *P. aeruginosa* ATCC 9027. Через 48 часов инкубации анализировали флюоресценцию культур с использованием трансиллюминатора.

Только два биосенсора характеризовались экспрессией репортерных генов в присутствии метаболитов синегнойной палочки *E. coli* NovaBlue pSB1C3/14L P1 (LasR+GFP) и *E. coli* NovaBlue pSB1C3/7P P3 (RhIR+GFP), позволяющие детектировать додеканоилгомосеринлактон и бутаноилгомосеринлактон, соответственно (рис. 1). Также следует отметить снижение интенсивности флюоресценции по мере удаления от культуры синегнойной палочки.

Для более точной оценки мы отобрали культуры на расстоянии 1 см от *P. aeruginosa*, ресуспендировали до 2 единицы McFarland в PBS 0.1M pH7.4, перенесли в микропланшеты для ПЦР в объеме 50 мкл и замеры флюоресценцию на приборе Realtime PCR CFX (BioRadLaboratory) на каналах Texas Red и Fam в пяти повторностях. Все эксперименты проводили в трех повторях. В качестве негативного контроля использовали культуру кишечной палочки NovaBlue не трансформированную плазмидами и культуру 12F P1.

Биосенсорная культура 18B P1 (RhIR+RFP) характеризовалась статистически значимым повышением уровня флюоресценции ($P=0.0004$) на канале TexasRed (таблица 2). То есть этот биосенсор пригоден для детектирования бутаноилгомосеринлактона синегнойной палочки в отличие от культуры P3 7P (RhIR+GFP) характеризующейся сходным функциональным назначением.

Культура 14LP1(LasR+GFP) характеризовалась повышением уровня флюоресценции на канале FAM статистически значимо, относительно культуры 12F P1 (не обладающих генами флюоресцентных белков), ($P=0.0006$).

Следовательно, *E. coli* NovaBlue после трансформации тремя вариантами плазмид pSB1C3, содержащих компоненты из репортерного гена GFP, под промотором индуцируемым комплексом LasR/3-oxo-C12-HSL, гена LasR (конституционально экспрессируемого), не позволяют оценивать количественно содержание додеканоилгомосеринлактона. Только один из изученных вариантов генноинженерных конструкций пригоден для качественного определения наличия додеканоилгомосеринлактона – *E. coli* NovaBlue,

содержащие в составе плазмиды pSB1C3 компоненты BBa_K575024 iGEM (14 L P1).

Выводы

Два биосенсора на основе рекомбинантной кишечной палочки с плазмидами pSB1C3/(18B P1 (BBa_K575039) и pSB1C3/14 L P1 (BBa_K575024 iGEM)) пригодны для качественного определения наличия бутаноилгомосеринлактона и додеканоилгомосеринлактона в образцах, соответственно, с использованием реалтайм-амплификатора.

Данная работа была частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) Проект 18-016-00045А

Литература/References

1. Saylan Y., Erdem O., Unal S., Denizli A. An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. *Biosensors*, 2019, 9(2): 65.
2. Guo H., Zheng Y., Wang B., Li Z. A note on an improved self-healing group key distribution scheme. *Sensors (Switzerland)*, 2015, 15(10): 25033-25038.
3. Плотникова Е.Г., Шумкова Е.С., Шумков М.С. Цельноклеточные бактериальные биосенсоры для детекции ароматических углеводов и их хлорированных производных (Обзор). *Прикладная БиохимияИМикробиология*, 2016, 52(4): 353-364.
4. Feng, Shirani, Inglis. Droplets for Sampling and Transport of Chemical Signals in Biosensing: A Review. *Biosensors*, 2019, 9(2): 80.
5. Yoo E.H., Lee S.Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors*, 2010, 10(5): 4558-4576.
6. Fu Z., Lu Y.-C., Lai J.J. Recent Advances in Biosensors for Nucleic Acid and Exosome Detection. *Chonnam Med. J.*, 2019, 55(2): 86.
7. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, 2016, 6(2): 153-159.
8. Atay S., Piskin K., Yilmaz F., Gakir C., Yavuz H., Denizli A. Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors. *Anal. Methods*, 2016, 8(1): 153-161.
9. Bahadir E.B., Sezgin Turk M.K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/bio warfare analyses. *Anal. Biochem.*, 2015, 478(March): 107-120.
10. Tahrioui A., Duchesne R., Bouffartiges E., Rodrigues S., Maillot O., Tortuel D., Hardouin J., Taupin L., Groleau M.-C., Dufour A., Deziel E., Brenner-Weiss G., Feuilloley M., Orange N., Lesouhaitier O., Cornelis P., Chevalier S. Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrfF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation. *npj Biofilms Microbiomes*, 2019, 5(1): 15.
11. Ciofu O., Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.*, 2019, 10(May). doi:10.3389/fmicb.2019.00913.
12. Li Y.H., Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 2012, 12(3): 2519-2538.
13. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Козлова Ю.Н. Д.Н.А. Четыре вопроса о роли биопленок *P. aeruginosa* для адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. *Ветеринария и кормление*, 2019, 2: 34-37.
14. Teerapo K., Roytrakul S., Sistayanarain A., Id D.K. A scorpion venom peptide derivative BmKn - 22 with potent antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. 2019. : 1-17.
15. Donchenko A.S., Fomenko V. V., Vasiliev V.G., Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Kozlova Y.N., Koptev V.Y. the Study of the Antagonistic Activity of Bacteria Suppressing the Synthesis of Phenazines *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sib. Her. Agric. Sci.*, 2019, 48(5): 23-29.
16. Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. *Biolims. Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: 1-11.
17. Enrique A., Herrera C. Responsabilidad Social Empresarial Para Pequenos Hoteles De La Ciudad De Cartagena *. *SABER, Cienc. Y Lib.*, 2014, 9(2): 91-108.
18. Kim B., Park J.-S., Choi H.-Y., Kwak J.-H., Kim W.-G. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1): 7741.
19. Schuster M., Greenberg E.P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, 296(2-3): 73-81.
20. Lequette Y., Lee J.H., Ledgham F., Lazdunski A., Greenberg E.P. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(9): 3365-3370.
21. Turkina M. V., Vikstrom E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Innate Immun.*, 2019, 11(3): 263-279.
22. Wolska K.I., Grudniak A.M., Rudnicka Z., Markowska K. Genetic control of bacterial biofilms. *J. Appl. Genet.*, 2016, 57(2): 225-238.
23. http://parts.igem.org/Part:BBa_K575032
24. http://parts.igem.org/Part:BBa_K575024
25. http://parts.igem.org/Part:BBa_K575039
26. http://parts.igem.org/Part:BBa_K546000
27. http://parts.igem.org/Part:BBa_C0071
28. http://parts.igem.org/Part:BBa_K1315009
29. http://parts.igem.org/Part:BBa_K546001