

**МАТЕРИАЛЫ
ФОРУМА**

**FORUM
PROCEEDINGS**



МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL FORUM

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

**BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART
AND PERSPECTIVES**

**23 - 25 МАЯ 2018
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4**

**23 - 25 MAY, 2018
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW**



WWW.BIOMOS.RU

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL FORUM

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

**BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART
AND PERSPECTIVES**

23-25 МАЯ 2018
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

23 - 25 MAY, 2018
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ
«БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»**

Материалы международного форума
«Биотехнология: состояние и перспективы
развития»

23 - 25 МАЯ 2018 Г.

Настоящие материалы форума созданы на
основании информации, предоставленной
участниками форума и одобренные
руководителями секций.

Материалы тезисов публикуются в авторской
версии. Организаторы не несут ответственности
за неточности и опущения в названиях и адресах,
представленных в данном сборнике.
Любое копирование и использование
материалов без письменного разрешения
Программного комитета не разрешено.

УДК 575.1/2-612.017.1 ББК 28.072
ISBN 978-5-9909118-0-2-6
ISSN: 2312-640X

© ООО "РЭД ГРУПП"
119049, г. Москва, ул. Дonsкая, д. 2, стр. 1
info@biomos.ru www.biomos.ru

Все права на издание принадлежат ООО "РЭД
ГРУПП" - организатор международного форума
«Биотехнология: состояние и перспективы
развития»

**INTERNATIONAL FORUM «BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES»**

The proceedings of International forum
«Biotechnology: state of the art and perspectives»
MAY 23 - 25, 2018.

DISCLAIMER

This book contains abstracts and complete papers
approved by the Forum Review Committee. Authors
are responsible for the content and accuracy.

Opinions expressed may not necessarily reflect the
position of the Scientific Council of forum.

Information in the Biotechnology: state of the art and
perspectives » 2018 Forum Proceedings is subject
to change without notice. No part of this book may
be reproduced or transmitted in any form or by any
means, electronic or mechanical, for any purpose,
without the express written permission of the
International Scientific Council of forum.

ISBN 978-5-9909118-0-2-6
ISSN: 2312-640X

Copyright © LLC "RED GROUP"
Moscow, Donskaya str., 2, b.1
info@biomos.ru www.biomos.ru

All Rights Reserved by LLC "RED GROUP" - organizer of
the international forum «Biotechnology: state of the
art and perspectives».

UDK 577.1

MONITORING THE ANTIBIOTICS LEVEL: THE POSSIBILITIES OF RAPID MULTIPLEX TEST SYSTEMS

Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
 119071, Moscow, Leninsky prospect, 33
 e-mail: berlina.anna@gmail.com*

Immuno-chromatographic test systems have been developed for the selective determination of antibiotics using colloidal gold and quantum dots as labels. Possibilities of application of test-systems for individual estimation of antibiotic-therapy efficiency are considered.

Key words: immuno-chromatographic analysis, antibiotic-therapy, immunoassay, colloidal gold, quantum dots

The effectiveness of the use of antibiotics in the treatment of various infections is largely determined by the correctness of the choice of schemes for the treatment that take into account the individual characteristics of the biotransformation of antibiotics or resistance to them of infectious agents. In this regard, the means of individual monitoring of the dynamics of the antibiotics content in the body under the treatment become more and more popular. Immuno-chromatographic tests are the most promising means for such monitoring due to the immediacy, ease of application and interpretation of the results.

The results of the development of immuno-chromatographic test systems for the determination of antibiotics of various classes are presented. The analytical parameters of immuno-chromatography are compared with the use of two types of markers-colloidal gold and quantum dots. It is shown that quantum dot provide a 10-20-fold decrease in the detection limit. The analysis time is 15-20 minutes. The variants of multiplex test systems for monitoring several antibiotics, the use of immuno-chromatographic tests for simultaneous monitoring of the antibiotics and inflammatory markers are considered.

This work was supported by the Ministry of Science and Education of Russian Federation, agreement № 14.613.21.0061 by 17.07.2017, unique identification number of the project RFMEF161317X0061.

UDK: 577.113.5, 54.061, 54.066, 65X.30.16

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА

A.A. Филиппова, М.Ю. Рубцова, И.П. Андреева, Г.В. Преснова, М.М. Улишова, А.М. Егоров

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3 ifil@mailto, 8(495)939-2968

Разработан метод латерального проточного гибридационного анализа ДНК на тест-полосках. Идентификация ДНК проводится с использованием специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на аналитической мембране. Показана возможность использования данного метода для количественного и полуквантитативного определения генов бета-лактамаз TEM-типа.

Ключевые слова: латеральный проточный анализ, ДНК, гибридизация, наночастицы золота, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы.

В последние годы для быстрой идентификации бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, и определения их устойчивости к антибиотикам начали активно использоваться методы молекулярно-генетического анализа, основанные на определении специфических последовательностей нуклеиновых кислот. В данной работе исследована возможность применения технологии латерального проточного анализа на тест-полосках для идентификации ДНК. Данная технология хорошо известна для определения различных биологически активных соединений с использованием специфических антител. Экспрессность и простота анализа обеспечиваются внесением всех необходимых реагентов на тест-полоску и проведением биоспецифической стадии в проточном режиме.

Для определения ДНК использовали специфические олигонуклеотидные зонды, последовательность которых была комплементарна фрагменту анализируемой ДНК-мишени. Эти зонды иммобилизовали в тестовой зоне аналитической мембраны. В качестве метки ДНК-мишени использовали биотин, который высвобождался в дуплексах ДНК комплектом стрептавидина с наночастицами золота. Образец ДНК-мишени после внесения на тест-полоску двигался по ней под действием капиллярных сил и гибридизовался с иммобилизованным зондом, если его структура комплементарна участку исследуемой ДНК.

Оптимизация методики анализа проводилась с использованием модельных олигонуклеотидных зондов и включала выбор способа предобработки аналитической мембраны, метода иммобилизации зондов и их длины, состава буферного раствора, размера наночастиц золота и соотношения реагентов при получении конъюгата. В оптимизированных условиях была получена градуировочная кривая определения модельной одноцепочечной ДНК-мишени длиной 72 основания, соответствующей участку кодирующей последовательности бета-лактамаз TEM типа. Минимально определяемая концентрация ДНК составила $C_{min} = 20 \pm 3$ фмоль/мкл.

Разработанная методика была использована для определения генов бета-лактамаз TEM типа, ответственных за резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам. Процесс предподготовки заключался в выделении ДНК из штаммов-продуцентов recombinantной бета-лактамаз и клинических образцов и получения двуцепочечных и одноцепочечных фрагментов гена бета-лактамаз TEM типа методом ПЦР. В процессе ПЦР в ампликон вводили биотин. Далее проводили анализ полученных ампликонов на тест-полоске. Время анализа образца на полоске составило 15 мин. Показано, что разработанный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью.

Выводы: Оптимизированы условия гибридационного анализа ДНК на пористых мембранных носителях, разработана тест-полоска для определения и отдельной одноцепочечной ДНК. Минимально определяемая концентрация ДНК длиной 72 основания составила $C_{min} = 20 \pm 3$ фмоль/мкл. Показана возможность определения генов бета-лактамаз TEM-типа методом латерального проточного гибридационного анализа.

Финансирование: Работа выполнялась в рамках Государственной темы АААА-А16-116052010081-5.

UDC 577.113.5, 54.061, 54.066, 68К 30.16

DETERMINATION OF BETA-LACTAMASE GENES BY LATERAL FLOW HYBRIDIZATION ASSAY

A.Rilipova, M.Rubtsova, I.Andreeva, G.Presnova, M.Uyashova, A.Egorov

Chemistry Department of M. V Lomonosov Moscow State University Russia, 119991, Moscow Leninskie Gory, 1, B

A method for lateral flow analysis of DNA was developed. Specific oligonucleotides that were immobilized on the membrane were used for the determination. The possibility of using this method for the determination of the beta-lactamase genes of TEM type was shown.

Key words: lateral flow assay, DNA, hybridization, gold nanoparticles, antibiotic resistance, beta-lactamases

In recent years, rapid methods for detection of pathogenic bacteria are of great importance for clinical microbiological laboratories. In this research, the application of the lateral flow technique for identification of DNA has been shown. This technology has been known for a long time and is widely used to determine various compounds with specific antibodies. Short assay time and simplicity of the method is provided by including all the components inside the strip. Biospecific recognition is performed in a flow mode.

Specific oligonucleotide probes complementary to the fragment of target DNA were used for identification. They were immobilized on the analytical zone of the membrane. Biotin was incorporated in the target DNA as a label, and it was developed in DNA duplexes by the conjugate of streptavidin with the gold nanoparticles. Target DNA sample moved along the strip by capillary forces. Target DNA hybridized with an immobilized probe in the test spot if it has a fragment complementary to the probe.

In this research we optimized the technique of membrane treatment, the method of immobilization of a specific probe and its length, buffer composition and the size of gold nanoparticles. Under optimized conditions, a calibration curve was obtained for the determination of a single-stranded DNA target with a length of 72 bases, which corresponds to the region of the coding sequence of TEM type beta-lactamases. The minimum detectable DNA concentration was $C_{min} = 20 \pm 3$ fmol/ μ L.

This technique was applied for the determination of genes of TEM-type beta-lactamase responsible resistance of gram-negative bacteria to beta-lactam antibiotics. The sample preparation process consisted of DNA isolation from the cells-producers of recombinant beta-lactamases and clinical samples. Then, a PCR reaction was carried out to obtain double-stranded and single-stranded fragments of the TEM-type beta-lactamase gene. During the reaction, a biotin label was incorporated into the amplicon. The amplicons were analyzed on a test strip. The assay time for the test strip took 15 minutes. The developed method has high specificity and sensitivity.

Conclusions: the conditions of hybridization analysis of DNA on porous membrane supports were optimized. A test strip was developed for the determination of model single-stranded DNA. The minimum detectable DNA concentration was $C_{min} = 20 \pm 3 \text{ fmd}/\mu\text{L}$. The possibility of determining the TEM-type beta-lactamase genes by lateral flow hybridization assay was shown.

Grant: The work was supported by the theme AAAA-A16-1160B010081-5.

УДК: 615.012.6, 615.012.8, 564.30.16

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА α -2b БЕЗ N-КОНЦЕВОГО МЕТИОНИНА

А.Ф.Еллина, Е.В.Демьянова, Е.С.Денисенко, В.Н.Леонова, С.В.Мартышкин, Т.О.Антипов, А.Е.Полещук, Е.А.Протопоп, Я.А.Забродская, И.Н.Горбунова, А.М.Ищанко

ФГУП «ГосНИИ ОНБ» ИМБА России, Россия, 197110 Санкт-Петербург, Пудожская, 7, alell@inbox.ru, 89219259737

Изучено влияние условий культивирования на наличие интерферона α -2b с N-концевым метионином. Подобраны условия для биосинтеза интерферона α -2b без N-концевого метионина в растворимом виде. Разработана технология выделения и очистки интерферона α -2b, продуцируемого клетками *E.coli* в растворимой форме.

Ключевые слова: интерферон α -2b, N-концевой метионин, *Escherichia coli*, ионнообменная хроматография, растворимый белок.

При суперэкспрессии рекомбинантного интерферона α -2b (IFN α -2b) в клетках *Escherichia coli* BL21 DE3 происходит накопление двух форм интерферона с N-концевым метионином (IFN met α -2b) и без него. Согласно современным требованиям к качеству IFN α -2b наличие N-концевого метионина является нежелательным. На настоящий момент данная проблема решалась за счет создания новых генетических конструкций [1], дополнительной обработки ферментами [2] или использования дополнительных стадий очистки с использованием дорогостоящего оборудования.

Цель данной работы заключалась в получении IFN α -2b без N-концевого метионина путем оптимизации условий культивирования штамма-продуцента.

В ходе работы было изучено влияние ряда параметров процесса культивирования на качество целевого белка, а именно: аэрация, состав питательной среды, температура культивирования.

Культивирование проводилось в колбах на качалке и в ферментере BioFlo 110 (New Brunswick) объемом 14 л. Наличие N-концевого метионина оценивалось как с помощью ВЭЖХ в обратной фазе, так и с помощью MALDI масс-спектрометрии в линейном режиме (масс-спектрометр «Ultraflex beam», Bruker, Германия).

Снижение аэрации за счет увеличения фазы с 0,125 до 0,250 и 0,5 привело к увеличению содержания IFN met α -2b. Культивирование на минимальной питательной среде (M9+ вместо 1,5LB+M9+) существенно снижало выход IFN α -2b в целом, причем доля IFN met α -2b не уменьшалась. Внесение добавки из 11 микроэлементов (ионы двухвалентных металлов) не повлияло на содержание IFN met α -2b. Повышение температуры культивирования с 37 до 42 °C привело к значительному снижению общего выхода IFN α -2b. Только повышение температуры (30 °C) вызвало существенное снижение содержания N-концевого метионина, при этом скорость синтеза интерферона замедлялась. Было выдвинуто предположение о том, что полное отщепление N-концевого метионина не достигается из-за быстрой укладки белка в ТВ. Повышение температуры культивирования с 37 °C до 25 °C в течение стадии индукции синтеза белка привело к накоплению целевого белка в растворимой форме. При этом как по результату анализа ВЭЖХ, так и MALDI масс-спектрометрии получаемый интерферон альфа-2b является аналогом стандартного образца