

МИКРОФЛЮИДНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРА НА ОДИНОЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ *Helicobacter pylori*

© 2018 г. А.М. Белова, Д.В. Басманов, К.А. Прусаков,
В.Н. Лазарев, Д.В. Клинов

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

E-mail: ambelova26@gmail.com

Поступила в редакцию 25.12.17 г.

После доработки 28.04.18 г.

Представлен микрофлюидный биосенсор для регистрации изменений транскрипционной активности единичных генетически-модифицированных клеток бактерии *Helicobacter pylori* в ответ на воздействие внешних факторов. В качестве основы для разработки биосенсора использован микрофлюидный чип, в котором была проведена модификация поверхности стенок канала для обеспечения эффективной иммобилизации клеток и поддержания их жизнеспособности. Для демонстрации работоспособности биосенсора проводилась регистрация изменения флуоресценции в ответ на кислотный стресс белка GFP, ген которого находился под контролем промоторов pH-зависимых генов вирулентности *H. pylori*. Разработанный микрофлюидный чип может использоваться как для фундаментальных исследований в микробиологии, так и для диагностики различных патологических состояний.

Ключевые слова: микрофлюидный чип, биосенсоры; иммобилизация клеток, *Helicobacter pylori*, экспрессия генов, исследования одиночных клеток.

DOI: 10.1134/S0006302918050113

Миниатюризация инструментов исследования с помощью микрофлюидных технологий является одним из наиболее развивающихся подходов к совершенствованию техники исследования единичных клеток и разработке новых диагностических систем [1–3]. Использование микрофлюидных чипов для исследования биологических проб позволяет автоматизировать эксперимент и сократить время анализа, сохраняя при этом точность проводимых измерений.

Биосенсоры на основе недорогих одноразовых микрофлюидных систем [4–7] сегодня рассматриваются как альтернатива традиционным аналитическим методам исследования. Прежде всего, это связано с тем, что применение микрофлюидики позволяет существенно уменьшить количество анализируемой пробы, в качестве которой могут выступать макромолекулы, биологически активные вещества и живые бактериальные и эукариотические клетки. В миниатюрном чипе легче воссоздавать одни и те же

экспериментальные условия, обеспечивая высокую степень воспроизводимости измерений. Применение микрофлюидных чипов также позволяет упростить всю систему детекции биосенсора.

Для создания биосенсора необходимо интегрировать чувствительный элемент в микрофлюидное устройство, сконструированное с использованием технологий микрофабрикации, таких как фотолитография, химическое осаждение из газовой фазы, вакуумное напыление материалов, травление в индуктивно-связанной плазме, лазерное или химическое спекание [8]. Биосенсор, в котором в качестве чувствительного элемента используются живые микроорганизмы, может быть применен для детекции результатов воздействия неизвестных факторов на метаболизм и транскрипционную активность бактериальных клеток.

Среди всего разнообразия микроорганизмов *Helicobacter pylori* привлекает особое внимание по ряду причин. Этот микроорганизм, которым инфицировано более половины человеческой популяции, может вызывать гастрит, язву и рак желудка [9], хотя у более чем 80% зараженных

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок, ПЦР – полимеразная цепная реакция, IPTG – изопропил-β-D-1-тиогаалактопиранозид.

никак себя не проявляет [10]. На данный момент это единственный известный патоген, способный длительное время выживать в чрезвычайно кислой среде желудка [9]. Это обеспечивается большим набором различных факторов вирулентности, а также метаболической и транскрипционной гибкостью, позволяя этой бактерии быстро адаптироваться к изменениям в среде желудка [11]. В этой связи изменения в уровне экспрессии генов, кодирующих факторы вирулентности, могут служить индикатором ответа клеток на новые условия окружающей среды. Однако клетки *H. pylori*, сосуществующие в одних и тех же условиях, обладают как микро-, так и макрогетерогенностью. Это выражается в том, что они отличаются между собой на генетическом уровне, профилями транскрипции и белковым составом [12]. Следовательно, традиционный анализ экспрессии генов будет давать усредненную картину, не показывая особенностей транскрипции отдельных клеток.

Для того чтобы зарегистрировать изменения уровня экспрессии генов факторов вирулентности в отдельных клетках *H. pylori*, можно использовать репортерную систему, в которой ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) [13, 14] помещен под контроль соответствующего промотора. Флуоресценция GFP в этом случае будет индикатором уровня экспрессии генов.

Комбинирование методов генной инженерии с микрофлюидными технологиями нами рассматривается как перспективный подход к созданию стандартизованного биосенсора для детекции факторов, влияющих на экспрессию генов вирулентности и патогенности *H. pylori*. Для проверки и подтверждения принципа работы подобного биосенсора мы проводили оценку изменения экспрессии гена *gfp* под контролем промоторов pH-чувствительных генов вирулентности *H. pylori* в составе челночного вектора в ответ на кислотный стресс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штаммы *Escherichia coli* Top10 и JM110, содержащие плазмиду pHel2 и ее производные, а также штамм BL21DE3, содержащий плазмиду pET21-GFP, культивировали при 37°C на твердой среде Luria–Bertani или в жидкой среде Luria–Bertani с аэрацией 150 об/мин. Для обеспечения селекции в среду добавляли хлорамфеникол (8 мкг/мл, Panreas, Испания) или ампицилин (150 мкг/мл, Amresco, США).

Клетки *H. pylori* культивировали при 37°C в микроаэрофильных условиях в течение 20–48 ч

на твердой питательной среде Columbian agar (Becton Dickinson, США) с добавлением 10% лошадиной сыворотки Donor Horse Serum (PAA Labs, Австрия) или в жидкой питательной среде ВНИ (Becton Dickinson, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США) и 0,5% дрожжевого экстракта (Becton Dickinson, США). Для обеспечения селективного роста мутантных клеток добавляли хлорамфеникол (8 мкг/мл) или канамицин (15 мкг/мкл, Amresco, США).

Клинический изолят А-45 *H. pylori* был получен из образца биопсии слизистой желудка пациента с язвенной болезнью. Этот изолят был использован для получения модифицированных клеток *H. pylori*. Природную трансформацию клеток проводили, как было описано ранее [15]. Плазмидную ДНК в количестве 2–5 мкг смешивали с клеточной суспензией (CFU 10⁹), смесь наносили каплями на поверхность твердой среды. После этого чашки оставляли в CO₂-инкубаторе агаром вверх на 17–20 ч. Затем клетки пересеивали на селективную среду, содержащую антибиотик.

Для всех экспериментов клетки промывали буфером HBSS, pH 7,5 (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher, США) и осаждали путем центрифугирования при 3000 g в течение 10 мин.

Получение штаммов *H. pylori*, содержащих рекомбинантные векторы. Ген *gfp* был клонирован в плазмиду pHel2 [16]. В результате была получена исходная плаزمида pHel2-promotorlessGFP, в которую затем клонировали промоторные области трех генов *H. pylori*: *flaA*, *flaB*, *ureA*.

Эти области были выбраны путем биоинформационного анализа. На основе литературных данных [17] и данных по транскрипционному профилированию *H. pylori* был произведен анализ регуляции величины экспрессии генов штамма А-45 (GenBank) с использованием программного пакета BioTapestry [18]. Последовательности были амплифицированы с использованием пар праймеров (см. ниже) *flaA*-f,r (промотор *flaA*), *flaB*-f,r (промотор *flaB*), 0073-f,r (промотор *ureA*). Промоторные области были клонированы в плазмиду pHel2-promotorlessGFP. Рекомбинантные векторы pHel2-gfp-*flaA*, pHel2-gfp-*flaB*, pHel2-gfp-0073, которые были наработаны в *E. coli* Top10, использовались для трансформации штамма *H. pylori* А-45.

Штамм А-45Δ(*flaA*) Kan^r был получен, как описывалось ранее [19]. Для этого исходный штамм А-45 был трансформирован ампликоном, содержащим плечи гомологии к областям,

фланкирующим ген *flaA* в геноме бактерии, а также ген устойчивости к канамицину (*kan*). В результате гомологичной рекомбинации ген *flaA* был удален из генома штамма А-45 с заменой на ген *kan*. Нокаутные клетки отбирали на чашках со средой, содержащей канамицин. Затем нокаутный штамм был трансформирован плазмидой pHel2-gfp-*flaA*, содержащей промоторную область нокаутированного гена *flaA*.

В работе были использованы следующие последовательности олигонуклеотидов для клонирования промоторных областей:

flaA-f.r (TATAGATCTTAGCTCTAAATCTTGTAAGG,
ATTAGATCTTCAATCTCTCCAATGAAGTTT),

flaB-f.r

(TATAGATCTAAATCCCTAACATGCCCTTTA,
ATAAGATCTTAACTTTTCAAGCGAGCTTGA),

0073-f.r (TATAGATCTCGCGCTTCCAATAACGCT,
ATTAGATCTCCACATAGTTAAGCTTAATGCCT).

Для нокаута гена *flaA* в геноме были использованы следующие последовательности олигонуклеотидов

flaKD_u-f.r (CGGACACACTCTGCAAGCTT,
AGTTCTTCTGATTTTGAGAAAAGT),

KanKD-f.r (ACTTTTCTCAAAATCAGAAGAATC,
AGGAGTTACAACAATGATTTGAACA),

flaKDD-f.r (TTC AATCATTTGTTGTAACCTTGT,
TCTGGTTTTCGGTGTTTTGTAATC).

Для количественной оценки экспрессии *gfp* на плаزمидях с помощью ПЦР в реальном времени мы использовали следующие последовательности олигонуклеотидов GFP2, GFP3, GFP5, GFP6 (GTTCAGCGTGTCCGGCGA, CCACATGAAG-CAGCACGA, GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC и CTT-GATGCCGTTCTTCTGC соответственно).

Все процедуры, связанные с клонированием, получением и анализом плазмидной ДНК, проводили по стандартным протоколам [20]. Выделение геномной ДНК *H. pylori* проводили с использованием Genomic DNA Purification Kit (Genomed, Германия) согласно инструкции производителя.

В результате природной трансформации клеток *H. pylori* рекомбинантными векторами были получены следующие мутантные штаммы: А45-*flaKD* (штамм А-45Δ(*flaA*) Kan^r, содержащий вектор pHel2-gfp-*flaA*), А45-*flaA* (штамм А-45, содержащий вектор pHel2-gfp-*flaA*), А45-*flaB* (штамм А-45, содержащий вектор pHel2-gfp-*flaB*), А45-0073 (штамм А-45, содержащий вектор pHel2-gfp-0073).

Выделение РНК, синтез кДНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Поли-

меразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени [21] использовали для оценки изменения экспрессии *gfp* в рекомбинантных штаммах в ответ на снижение рН среды. Для этого штаммы выращивали в жидкой среде, как описано выше. После достижения логарифмической фазы роста ($OD_{550} = 0,1$) в клетках индуцировали ответ на изменение значения рН с нормального до 5,5 путем добавления соляной кислоты к жидкой среде. Значение рН в контрольных образцах оставалось неизменным. Спустя 90 мин после индукции клетки отбирали для выделения РНК. Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Путем реакции обратной транскрипции получали кДНК, которую затем использовали для постановки ПЦР в реальном времени.

Реакцию проводили с использованием указанных выше олигонуклеотидов. В качестве референсных генов были использованы гены 16S и 23S, кодирующие субъединицы рРНК. Оценку экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения амплификатора Real-Time CFX96 Touch (Biorad, США). Для каждой из трех промоторных областей были сделаны три независимых биологических повтора.

Микрофлюидный чип. Микрофлюидный чип (рис. 1) представляет собой трехслойную конструкцию, которая состоит из основы, выполненной из экструзионного полиметилметакрилата (Plexiglas, Германия), размером 25 × 75 мм и толщиной 3 мм, адгезивного материала 468MP (3M, США) толщиной 100 мкм и стандартного покровного стекла толщиной 130–170 мкм. Входные и выходные отверстия чипа, а также геометрия канала в адгезионном слое были сформированы литографической установкой Laser Pro 100 с CO₂-лазером (GCC, США). Наличие двух каналов в чипе необходимо для удобства одновременного наблюдения за контрольным образцом в одном канале и индуцированным образцом в другом канале в режиме реального времени. Покровное стекло в таком микрофлюидном чипе служило подложкой для иммобилизации на нем бактериальных клеток, флуоресцентный сигнал от которых регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon, Япония).

Иммобилизация и индукция штаммов трансформированных клеток *H. pylori* в канале микрофлюидного чипа. Штаммы культивировали в жидкой среде до достижения логарифмической фазы роста (около 17–20 ч, $OD_{550} = 0,1$), осаждали центрифугированием и промывали HBSS-буфером для очистки от компонентов

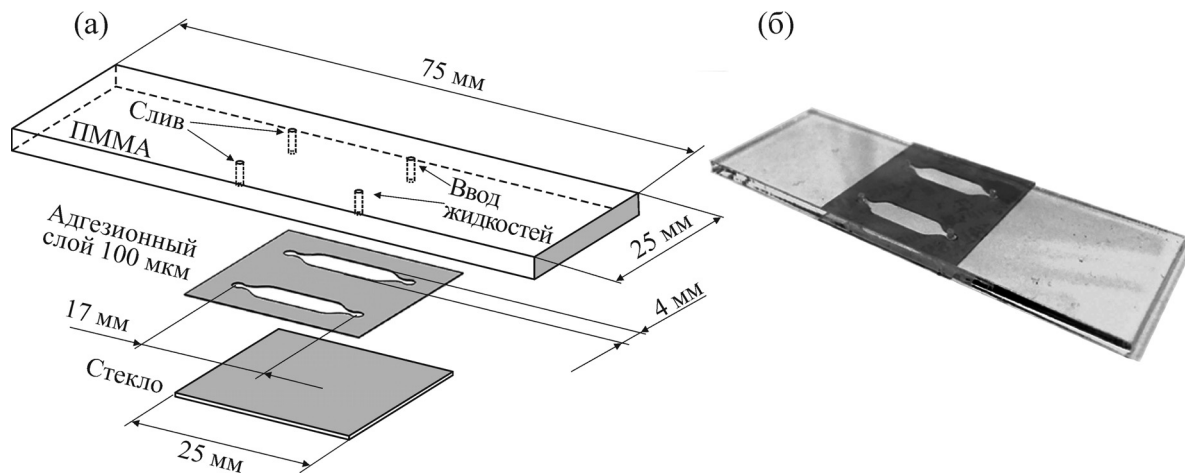


Рис. 1. Оригинальная конструкция микрофлюидного чипа (а) и его фотография в собранном виде (б).

среды. Клетки концентрировали в HBSS-буфере, после чего суспензию вносили через входное отверстие с помощью автоматической пипетки внутрь канала. После этого выжидали в течение 3–5 мин для осаждения клеток из суспензии и закрепления их на поверхности покровного стекла. Затем микрофлюидные каналы промывали жидкой средой для культивирования с различным значением рН (5,5 – для индуцированных образцов, 7,3 – для контрольных образцов).

Так как данные бактериальные клетки обладают подвижностью, а получение микрофотографий требует их фиксации на поверхности канала, иммобилизация отдельных клеток достигалась благодаря предварительной модификации стеклянной поверхности микрофлюидного канала. Предварительную модификацию проводили в четыре этапа:

1) отмытое в этаноле и бидистиллированной воде стекло подвергали плазменной очистке в низкотемпературной плазме кислорода на установке Zerto с плазменным генератором мощностью 100 Вт (Diener Electronic, Германия);

2) после сборки трехслойной конструкции микрофлюидного чипа через него прокачивали водный раствор полиаллиламина (65 кДа, 0,1 мг/мл; Sigma Aldrich, США) [21,22];

3) микрофлюидный канал промывали бидистиллированной водой в количестве, превышающем утроенный объем канала;

4) канал промывали сначала 0,1%-м водным раствором глутарового альдегида (Sigma Aldrich, США), а затем бидистиллированной водой.

Флуоресцентная микроскопия. Микрофлюидный чип с иммобилизованными на дне канала бактериями помещали в держатель микроскопа.

Первичную фокусировку проводили на слое бактерий. Временные изменения флуоресценции клеток регистрировали путем последовательного фотографирования микрофлюидного канала в заданной фокальной плоскости. Все процедуры проводили при комнатной температуре.

Для регистрации изображений использовали флуоресцентный микроскоп Eclipse Ti-E с объективом Nikon Apo TIRF 100×/1.49 Oil. Изображения захватывались EMCCD-камерой iXon Ultra 512×512 (Andor Technology, Великобритания). Время экспозиции составляло 300 мс, коэффициент усиления на камере iXon Ultra выставляли равным 150. Был использован набор флуоресцентных фильтров для детекции красителя FITC с длинами волн возбуждения 465–495 нм и длинами волн эмиссии 515–635 нм.

Захват и последующую обработку флуоресцентных изображений проводили с помощью программного обеспечения NIS-Elements Advanced research 4.30. На каждой микрофотографии в полуавтоматическом режиме выбирали контрастные изображения одиночных клеток *H. pylori*, определяли контуры объекта, а после производили расчет отношения интегральной светимости объекта к его площади. В каждом эксперименте для одного канала собирали статистику более чем по 100 одиночным клеткам.

Статистическая обработка данных. Во всех экспериментах оценку достоверности двух независимых выборок (контроль /индуцированный образец) проводили с помощью статистических критериев различия. Так как выборки удовлетворяли критериям нормальности (критерий Колмогорова–Смирнова) и равенства дисперсий (критерий Фишера), то использовали *t*-критерий Стьюдента. Уровень статистической

значимости составлял $p < 0,05$. Все расчеты проводили в программах Excel и Origin.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модифицированные клетки были получены на основе штамма А-45 и названы А45-flaA, А45-flaB, А45-0073. Нокаутный штамм А45Δ(*flaA*)KanR, в котором ген *flaA* был заменен путем гомологичной рекомбинации на ген устойчивости к канамицину, был получен с использованием вектора pHel-gfp-flaA и назван А45-flaKD. Изменение экспрессии гена *gfp*, находящегося под контролем выбранных промоторных областей, в ответ на понижение pH среды детектировали с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 2). В случае штамма А45-flaA статистически значимые отличия получены не были (данные не представлены), поэтому в дальнейшем мы не использовали этот штамм для биосенсора.

Количество мРНК репортерного гена в штамме А45-flaKD увеличилось приблизительно в три раза в ответ на снижение pH. В случае штамма А45-flaB уровень экспрессии гена *gfp* вырос в два раза по сравнению с контролем. Для штамма А45-0073 прирост составил приблизительно 2,7 раза. Во всех случаях изменения были статистически достоверны.

Прежде чем иммобилизовать модифицированные клетки *H. pylori*, мы проверили, сохраняют ли бактериальные клетки жизнеспособность в канале микрофлюидного чипа? Для этого в нем были иммобилизованы клетки *E. coli* BL21DE3, трансформированные плазмидой pET21-GFP. В этом штамме ген Т7 РНК полимеразы находится под контролем lacUV5-промотора (лактозный оперон) [23]. Поэтому добавление IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида) в среду индуцирует транскрипцию гена *gfp* на плазмиде, в результате чего наблюдается увеличение клеточной флуоресценции (рис. 3 и 4).

Наши эксперименты показали, что интенсивность флуоресценции клеток *E. coli* в пробирке (данные флуориметра) возрастает, выходя на плато через три часа. В этой связи измерение флуоресценции единичных клеток в канале чипа проводили на протяжении трех часов. Значимое изменение флуоресценции регистрируется уже через 30 мин (рис. 4) после индукции. За все время инкубации в канале (три часа) флуоресценция клеток *E. coli* возрастает приблизительно в шесть раз. Полученные данные согласуются с измерениями, полученными для клеток, индуцированных в пробирке.

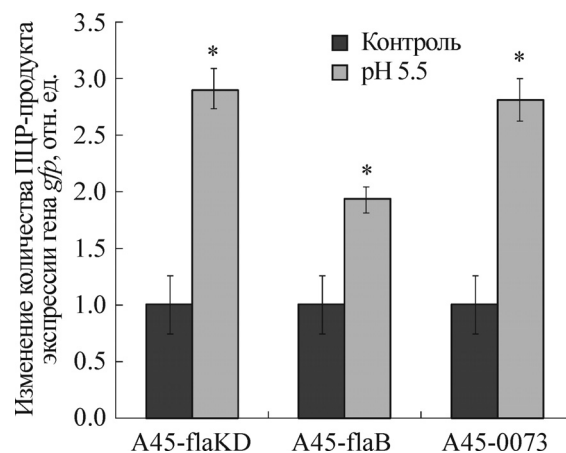


Рис. 2. Изменение экспрессии гена *gfp*, находящегося под контролем выбранных промоторных областей, в ответ на понижение pH среды. Контроль соответствует значению pH 7,3. Выбранный уровень значимости $p < 0,05$.

Далее мы проводили иммобилизацию клеток *H. pylori* в канале чипа. Полученные нами мутантные штаммы характеризовались сильной, устойчивой флуоресценцией, обладали S-образной или U-образной формой, что говорит о благоприятных условиях культивирования (рис. 5).

После иммобилизации было проведено измерение интенсивности флуоресценции единичных клеток модифицированных штаммов *H. pylori* А45-flaKD, А45-flaB и А45-0073 в ответ на понижение значения pH среды (рис. 6). В случае нокаутного штамма А45-flaKD интенсивность флуоресценции увеличилась приблизительно в 1,7 раза (рис. 6а). Для штамма А45-flaB флуоресценция GFP выросла в 1,9 раз (рис. 6б), а в случае штамма А45-0073 прирост составил 1,4 раза (рис. 6в).

Таким образом, для каждого из трех выбранных нами промоторов была показана чувствительность модифицированных клеток *H. pylori*, иммобилизованных в канале чипа, к понижению значения pH среды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Любые популяции как эукариотических, так прокариотических клеток в независимости от условий их поддержания являются гетерогенными. В этой связи анализ клеточных популяций в целом часто не позволяет объяснить некоторых явлений, наблюдаемых в них. Анализ же индивидуальных клеток дает возможность детектировать события, которые невозможно было бы увидеть при изучении популяции в целом, и выяснить механизмы, лежащие

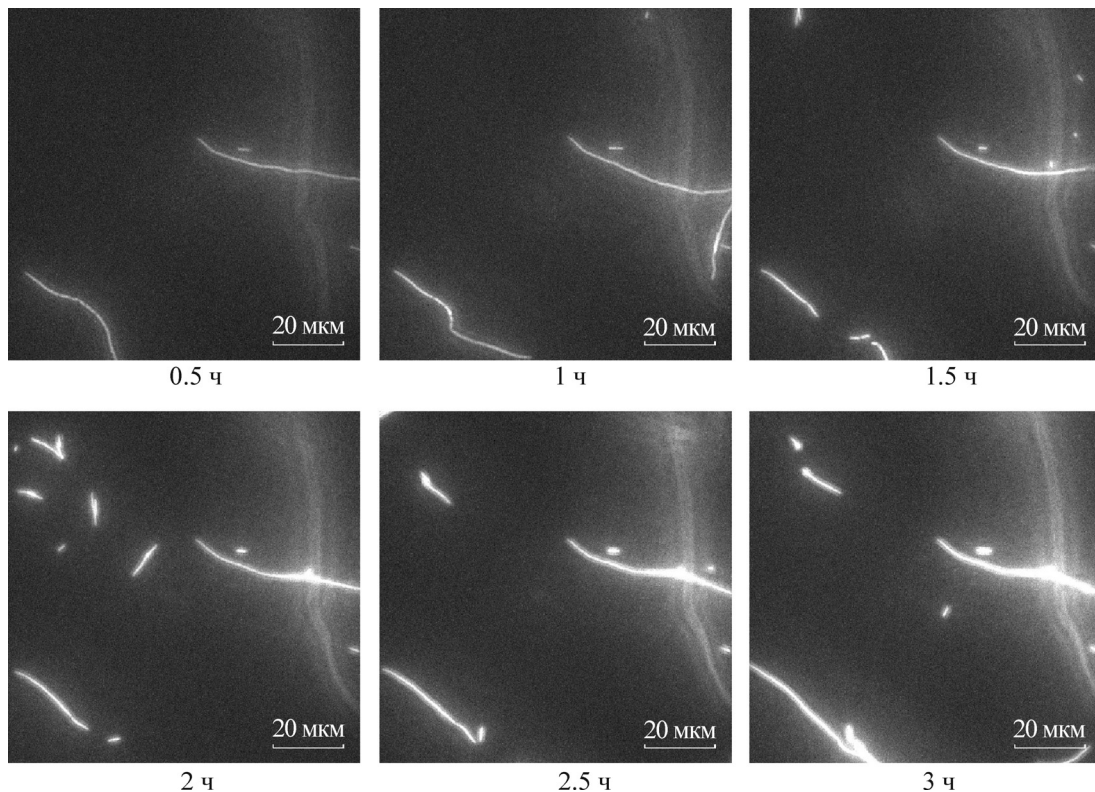


Рис. 3. Микрофотографии единичных клеток *E. coli* BL21DE3 pET21-GFP в канале чипа. Изменение флуоресценции GFP в клетках после добавления 1 мМ IPTG в канал микрофлюидного чипа. Клетки, достигшие плотности $OD_{550} = 0,5$, суспендировали в буфере Henks и вносили в канал микрофлюидного чипа, после чего промывали его жидкой средой, содержащей индуктор. Фотографирование проводили через каждые 30 мин.

в их основе [24,25]. Именно поэтому изменение интересующего параметра следует проводить индивидуально для каждой клетки. Очевидно,

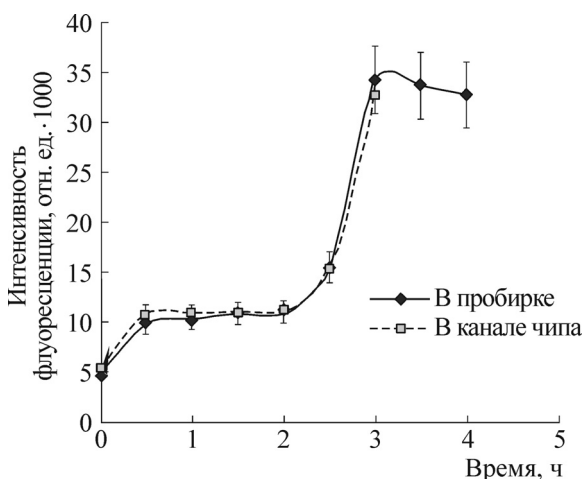


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции клеток *E. coli* BL21DE3 pET21-GFP в зависимости от времени. Клетки индуцировали добавлением 1 мМ IPTG к среде. Сравнение эффективности индукции клеток в пробирке и в канале чипа. Выбранный уровень значимости $p < 0,05$.

для таких экспериментов необходимо адаптировать методы и средства анализа. Одним из новых подходов, позволяющих сделать такую адаптацию, является применение микрофлюидных технологий.

В настоящее время для анализа единичных клеток уже используются разнообразные микрофлюидные устройства с различными подходами к иммобилизации. Основными требованиями к таким устройствам являются соблюдение условий для длительного культивирования и возможность стандартизации параметров эксперимента.

Одними из первых работ в этой области были работы Куксон с соавторами [26]. В этих работах для анализа был использован микрохимостат Тесла. Балагэйдд с соавторами создали биореактор, позволяющий непрерывно манипулировать с единичными клетками [27].

В нашей работе фиксация единичных клеток достигалась благодаря предварительной модификации дна микрофлюидного канала, образованного тонким слоем стекла, которое обрабатывали в низкотемпературной плазме кислорода. Последующая химическая модификация по-

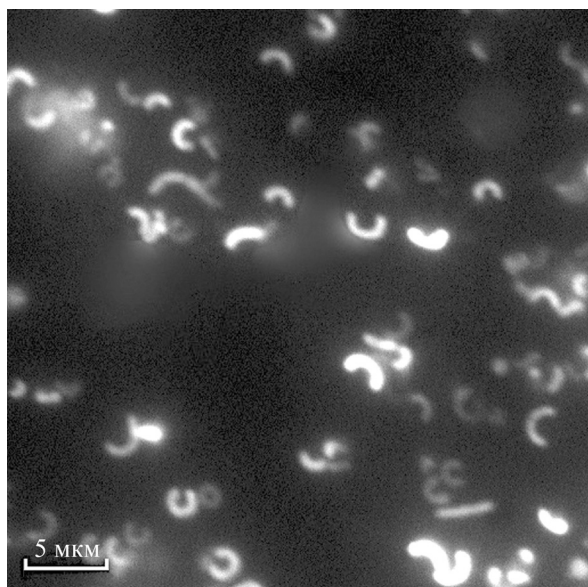


Рис. 5. Микрофотография клеток штамма *H. pylori* A45-0073 в канале микрофлюидного чипа непосредственно после их иммобилизации. Для других штаммов изображения клеток выглядели аналогично.

верхности чипа проходила уже внутри сформированного микрофлюидного канала. Основными преимуществами такого подхода по сравнению с рядом предыдущих исследований [26–29] являются короткое время модификации, простота методики, возможность иммобилизовать живые бактериальные клетки для последующего наблюдения за ними в реальном времени. При этом минимальное число механических манипуляций, требуемых для заполнения микрофлюидного чипа, снижает гибель клеток. Последнее особенно важно при исследовании таких чувствительных микроорганизмов, как *H. pylori*.

В качестве биологической составляющей сенсора в нашей работе были использованы клетки *H. pylori*, модифицированные плазмидами, содержащими промоторные области таких генов, как *ureA* (*hp0073*), кодирующий α -субъединицу фермента уреазы [22], а также *flaA* (*hp0601*) и *flaB* (*hp0115*), кодирующие α - и β -субъединицы бактериального жгутика, контролирующей экспрессию репортерного гена *gfp* [19]. Низкий pH желудка является одним из основных стрессовых факторов, непрерывно действующих на бактерию в процессе колонизации слизистой [30]. Этот факт подразумевает наличие у *H. pylori* широкого набора способов быстрой адаптации для выживания в такой агрессивной среде. В литературе неоднократно было показано, что выбранные нами гены активно участвуют в патогенезе и весьма чувств-

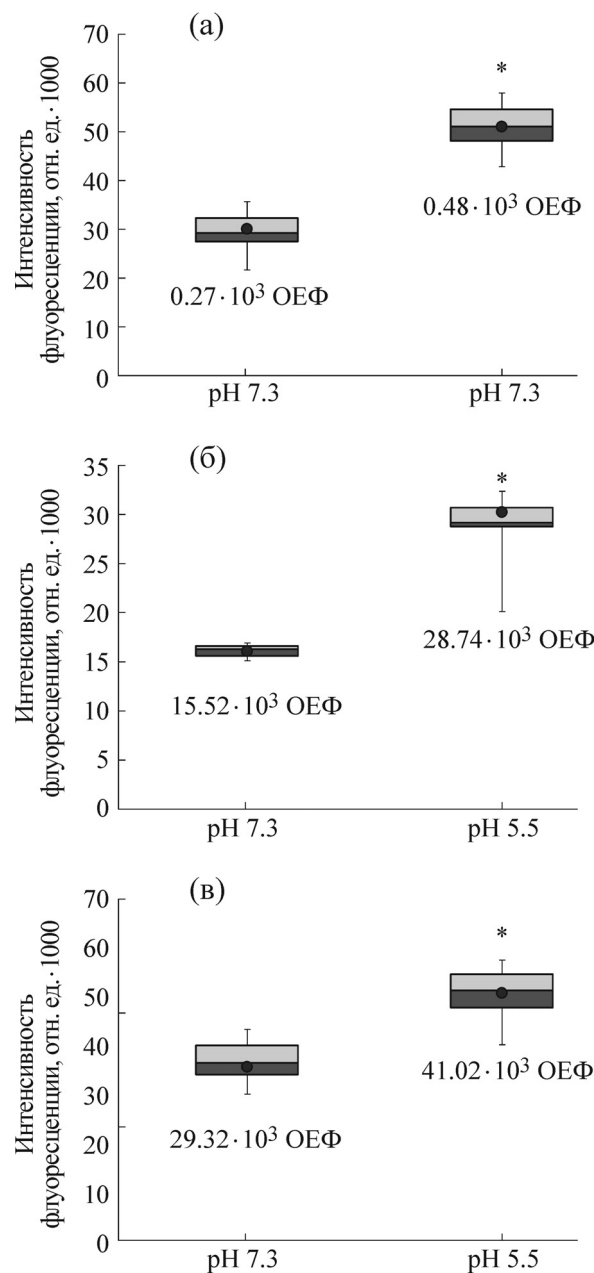


Рис. 6. Изменения интенсивности флуоресценции модифицированных единичных клеток *H. pylori* в ответ на кислотный стресс в канале чипа: (а) – изменение ОЕФ для штамма A45-flaKD, (б) – изменение ОЕФ для штамма A45-flaB, (в) – изменение ОЕФ для штамма A45-0073. В случае каждого из трех генов для построения графиков значения были собраны в результате пяти независимых экспериментов и двух биологических повторов в каждом эксперименте.

ствительны к изменению кислотности среды [31–33].

Предварительно мы исследовали возможность клеточной иммобилизации в канале микрофлюидного чипа клеток *E. coli* BL21DE3

pET21-gfp, в которых репортерный ген *gfp* находился под контролем T7-промотора [23], а клеточная флуоресценция увеличивалась в ответ на добавление IPTG к среде. Клетки находились под наблюдением в режиме реального времени в течение нескольких часов, и за это время не было зафиксировано каких-либо критических изменений в клеточной морфологии. При этом флуоресценция индуцированных образцов устойчиво росла в зависимости от времени в ответ на добавление IPTG. Полученные данные по изменению интенсивности флуоресценции единичных клеток *E. coli* в канале чипа совпали с результатами индукции в пробирке. Это говорит о том, что полученная нами микрофлюидная платформа обеспечивает оптимальные условия для проведения длительного эксперимента с живыми клетками. При этом объемы сред и аналитов для постановки эксперимента были минимальны.

Для модифицированных штаммов *H. pylori* нами также были получены результаты по изменению флуоресценции в ответ на изменение кислотности среды. Наблюдение за клетками в канале чипа показало устойчивость морфологии. Клетки в канале были S-образной или U-образной формы, что говорит о благоприятных условиях для поддержания клеток в микрофлюидном чипе. Известно, что при длительных стрессовых воздействиях среды этот микроорганизм претерпевает дегенеративные изменения, которые выражаются в превращении его в кокковые формы. Было показано, что эти кокковые формы теряют репродуктивную способность, а обмен веществ в них редуцируется [34].

В случае каждого штамма *H. pylori* сигнал флуоресценции GFP единичных клеток соответствовал активности выбранных промоторов. Так, наиболее низким уровнем флуоресценции характеризовались клетки, содержащие *gfp* под контролем промотора гена *flaA* (А-субъединица бактериального жгутика) в нокаутном штамме A-45Δ(*flaA*) Kan^r. В этом штамме ген, промотор которого представлен на плазмиде, был удален из хромосомы. Это было сделано для проверки возможности повышения эффективности индукции, плазмидного промотора в отсутствие гена на хромосоме. Однако эффект был обратным. Светимость этих образцов была почти в 50 раз ниже, чем в штамме A45-*flaB*, и в 100 раз ниже, чем в штамме A45-0073. Самой сильной флуоресценцией характеризовался штамм, в котором *gfp* находился под контролем промотора гена *hp0073* (*ure A* – А-субъединица фермента уреазы). Из литературы хорошо известно, что, несмотря на свою природную нишу, бактерия

может существовать лишь при значениях pH, близких к нормальным [34]. Следовательно, ей необходимо непрерывно модулировать внешнюю среду в процессе колонизации желудка. Это достигается именно благодаря ферменту уреазе, который в ответ на понижение pH преобразует мочевины в аммиак и углекислый газ, нейтрализуя кислоту в желудке [35]. На долю этого фермента приходится свыше 5% всех клеточных белков *H. pylori*, что свидетельствует о «чрезвычайном» уровне продукции данного фермента. При этом *H. pylori* по интенсивности продукции этого фермента в два–десять раз превосходит многие другие организмы (*Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuarti*) [36].

Мы обнаружили несоответствие изменений интенсивности флуоресценции бактерий и количества мРНК гена *gfp*. Это может быть объяснено либо деградацией мРНК в определенных условиях, либо некорректным фолдингом GFP [25]. Однако нельзя исключать и другие причины. В частности, штамм A-45, выбранный нами для модификации, относится к Tox⁻-штаммам [37], для которых характерно не такое агрессивное протекание инфекции и показан пониженный уровень общей транскрипционной активности по сравнению со штаммами типа Tox⁺ [38,39]. Также нельзя недооценивать возможный вклад малых некодирующих РНК, экспрессируемых в межгенных областях *H. pylori* [40], которые, как уже было показано, соединяясь с целевыми матричными РНК, могут модулировать их стабильность [41]. Механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [42] также были описаны для *H. pylori* [43] и могут вносить свой вклад в наблюдаемый нами эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа показывает, что разработанная нами микрофлюидная платформа может быть использована в качестве стандартизованного биосенсора для поиска факторов, влияющих на экспрессию критически значимых генов *H. pylori*. Достоинствами данной микрофлюидной платформы являются простота интеграции и иммобилизации живых микроорганизмов в ней для проведения длительных экспериментов в реальном времени, воспроизводимость экспериментальных условий и возможность детекции сигнала от одиночных бактериальных клеток.

Таким образом, можно заключить, что предложенная микрофлюидная платформа может стать не только удобным инструментом для

изучения метаболизма одиночных клеток в реальном времени, но и найдет применение в иммунохимии и системах для персонализированного мультиплексного анализа биологических проб.

Авторы выражают отдельную благодарность О.В. Подгорному (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Россия, Москва) за ценные рекомендации и обсуждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-30064).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Cookson, N. Ostroff, W. L. Pang, et al., *Mol. Syst. Biol.* **1** (1), 2005.0024 (2005). DOI: 10.1038/msb4100032.
2. D. Longo and J. Hasty, *Mol. Syst. Biol.* **2** (1), 64 (2006). DOI: 10.1038/msb4100110.
3. K. J. Wieder, K. R. King, D. M. Thompson, et al., *Biomed. Microdevices* **7** (3), 213 (2005).
4. B. Kuswandi, B. Nuriman, J. Huskens, and W. Verboom, *Anal. Chim. Acta* **601** (2), 141 (2007).
5. T. M. Squires and S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.* **77** (3), 977 (2005).
6. E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, *Nature* **507** (7491) 181 (2014).
7. D. Mark, S. Haerberle, G. Roth, et al., *NATO Sci. Peace Secur. Ser. A. Chem. Biol. No. 3*, 305 (2010).
8. J. Zhang, S. Yan, D. Yuan, et al., *Lab. Chip* **16** (1), 10 (2016).
9. B. J. Marshall and J. R. Warren, *Lancet* **323** (8190), 1311 (1984). DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91816-6.
10. www.bsg.org.uk (Официальный сайт Британского общества гастроэнтерологов). Patient information. *Helicobacter pylori*.
11. M. F. Loughlin, *Expert Opin. Ther. Targets* **7**, 725 (2003). DOI: 10.1517/14728222.7.6.725.
12. M. J. Blaser, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **24** (Suppl. 1), S3 (2012).
13. J. A. Carroll, P. E. Stewart, P. Rosa, et al., *Microbiology* **149** (7), 1819 (2003).
14. C. Josenhans, S. Friedrich, and S. Suerbaum, *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 263 (1998).
15. Yi. Wang, K. P. Ross, and D. E. Taylor, *J. Gen. Microbiol.* **139** (10), 2485 (1993). DOI: 10.1099/00221287-139-10-2485.
16. D. Heuermann and R. Haas, *Mol. Gen. Genet.* **257**, 519 (1998).
17. A. Danielli, G. Amore, and V. Scarlato, *PLoS Pathog.* **6** (6), e1000938 (2010).
18. W. J. R. Longabaugh, E. H. Davidson, and H. Bolouri, *Biochim. Biophys. Acta* **1789** (4), 363 (2009).
19. C. Josenhans, A. Labigne, and S. Suerbaum, *J. Bacteriol.* **177** (11), 3010 (1995).
20. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989).
21. A. Yilmaz, H. I. Onen, E. Alp, and S. Menevse, in *Polymerase Chain Reaction*, Ed. by P. Hernandez-Rodriguez and A. P. R. Gomez (InTech, 2012), pp. 239–254.
22. D. R. Scott, E. A. Marcus, D. L. Weeks, and G. Sachs, *Gastroenterology* **123** (1), 187 (2002).
23. D. Pribnow, *J. Mol. Biol.* **99**, 419 (1975).
24. M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain, *Science* **297**, 1183 (2002).
25. J. M. Raser and E. K. O'Shea, *Science* **309** (5743), 2010 (2005).
26. S. Cookson, N. Ostroff, W. L. Pang, et al., *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0024 (2005).
27. F. K. Balagadde, L. You, C. L. Hansen et al., *Science* **309** (5731), 137 (2005).
28. O. Tatarinova, V. Tsvetkov, D. Basmanov, et al., *PLoS One* **9** (2), e89383 (2014).
29. M. Prokofjeva, V. Tsvetkov, D. Basmanov, et al., *Nucl. Acid Ther.* **27** (1) (2017).
30. J. Seo, H. Do, C. Park, et al., *Korean J. Gastroenterol.* **61** (4), 191 (2013).
31. G. Zanotti and L. Cendron, *IUBMB Life* **62** (10), 715 (2010).
32. Y. Wen, E. A. Marcus, U. Matrubutham, et al., *Infection and Immunity* **71** (10), 5921 (2003).
33. M. Pflock, S. Kennard, N. Finsterer, and D. Beier, *J. Biotechnol.* **126** (1), 52 (2006).
34. R. Willen, B. Carlen, X. Wang, et al., *Upsala J. Med. Sci.* **105**, 31 (2000).
35. M. Pflock, S. Kennard, I. Delany, et al., *Infection and Immunity* **73**, 6437 (2005).
36. K. Vogt and H. Harm, *Zbl. Bakt.* **275**, 63 (1991).
37. J. A. Garner and T. L. Cover, *J. Infectious Diseases* **172** (1), 290 (1995).
38. M. H. Forsyth, J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover, *Infection and Immunity* **66** (7), 3088 (1998).
39. G. Ayala, L. Chihu, G. Perales, et al., *Microbial Pathogenesis* **37**, 163 (2004).
40. T. Bischler, H. S. Tan, K. Nieselt, and C. M. Sharma, *Methods* **86**, 89 (2015).
41. A. J. Westermann, K. U. Förstner, F. Amman, et al., *Nature* **529** (7587), 496 (2016).
42. M. A. Collart and H. Th. M. Timmers, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **77**, 289 (2004).
43. J. K. Akada, M. Shirai, H. Takeuchi, et al., *Mol. Microbiol.* **36** (5), 1071 (2000).

A Microfluidic Biosensing Platform for the Development of a Biosensor Based on Genetically Modified *Helicobacter pylori* Single Cells

A.M. Belova, D.V. Basmanov, K.A. Prusakov, V.N. Lazarev, and D.V. Klinov

**Federal Research Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of Russia, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

In this paper, we present a new microfluidic biosensor to detect changes in transcriptional activity of genetically engineered *Helicobacter pylori* bacterium at a single cell level in response to exogenous factors. The microfluidic chip was used as the basis for the development of the biosensor, the channel surface modification was performed to provide the effective cell immobilization and maintain cell viability. In order to demonstrate the performance of the biosensor, we made a recording of the elevated fluorescent signal in response to acidification of medium, in which *gfp* gene was driven by the pH-dependent promoters of the genes associated with *H. pylori* virulence. The established microfluidic biosensor is useful not only for basic microbiological research, but also for application in diagnosing different pathological states.

Keywords: microfluidic chip, biosensors, cell immobilization, Helicobacter pylori, gene expression, single cell study