

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA ŽEL

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA ŽEL

**NOVE METODE VREDNOTENJA AFINITETE FAGNIH KLONOV IZ  
BAKTERIOFAGNIH KNJIŽNIC**

**NEW METHODS FOR EVALUATION AFFINITY OF PHAGE CLONES FROM  
PHAGE DISPLAY LIBRARIES**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in asist. dr. Miha Vodnika.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Mojci Lunder za možnost opravljanja magistrske naloge na Katedri za farmacevtsko biologijo in za pomoč pri pisanju magistrske naloge. Hvala asist. dr. Mihi Vodniku za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela in pri pisanju magistrske naloge. Obema se zahvaljujem tudi za posredovano znanje, prijaznost in dostopnost med celotnim procesom izdelave magistrske naloge.

Zahvaljujem se družini za spodbudo, podporo in razumevanje med pisanjem magistrske naloge in tekom študija.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder.

Mateja Žel

Predsednica magistrske komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega

Mentorica: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Somentor: asist. dr. Miha Vodnik

Član magistrske komisije: asist. dr. Vid Mlakar

## Vsebina

1	UVOD .....	1
1.1	Bakteriofagi .....	1
1.2	Nitasti bakteriofagi M13.....	2
1.3	Uporaba bakteriofagov M13 .....	5
1.4	Metode za vrednotenje vezave bakteriofagov na tarčno molekulo .....	7
1.4.1	Encimsko imunski test (ELISA) .....	7
1.4.2	Površinska plazmonska resonanca (SPR).....	7
1.4.3	Titracijsko določanje deleža vezanih bakteriofagov.....	9
1.4.4	Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC).....	9
2	NAMEN DELA.....	10
3	MATERIALI IN METODE .....	11
3.1	Materiali .....	11
3.1.1	Laboratorijska oprema .....	11
3.1.2	Reagenti.....	12
3.1.3	Biološki material .....	13
3.1.4	Pufri, raztopine in gojišča .....	14
3.2	Metode .....	17
3.2.1	Priprava prekonočne kulture bakterij E. coli ER2738.....	17
3.2.2	Pomnoževanje bakteriofagov.....	17
3.2.3	Mikrobiološka titracija.....	18
3.2.4	Encimsko–imunski test na trdnem nosilcu (ELISA).....	18
3.2.5	Označevanje bakteriofagov s fluorescien izotiocianatom (FITC).....	19
3.2.6	Preverjanje označevanja bakteriofagov .....	20
3.2.7	Vrednotenje vezave FITC-označenega NL8 (NL8-FITC) na pAb RN.....	20
3.2.8	Označevanje bakteriofagov z biotinom .....	21
3.2.9	Preverjanje biotinizacije bakteriofagov .....	21
3.2.10	Vrednotenje vezave biotiniranih fagov na pAb RN .....	21
3.2.11	Vrednotenje vezave bakteriofagov na pAb RN s qPCR.....	22
4	REZULTATI.....	25
4.1	ELISA – preverjanje ustreznosti modela vezave .....	25
4.2	Fluorescenčno označevanje bakteriofagov .....	26
4.2.1	Vezava NL8-FITC na pAb RN - ELISA.....	26
4.2.2	Vezava NL8-FITC na pAb RN – merjenje fluorescence .....	27

4.3	Biotinilirani bakteriofagi .....	28
4.3.1	Označevanje bakteriofagov z biotinom .....	28
4.3.2	Preverjanje biotinitacije bakteriofagov - ELISA.....	28
4.3.3	Vezava biotiniliranih bakteriofagov na pAb RN – detekcija s SA-HRP .....	29
4.4	Določanje deleža vezanih bakteriofagov s qPCR.....	33
4.4.1	Priprava umeritvene premice qPCR .....	33
4.4.2	Primerjava vezave bakteriofagov NL8, 7S1 in K4 na pAb RN .....	34
4.4.3	Redčitvena vrsta klonov NL8 in 7S1.....	35
5	RAZPRAVA .....	40
5.1	Označevanje bakteriofagov s FITC.....	41
5.2	Označevanje bakteriofagov z biotinom .....	43
5.3	Vrednotenje vezave bakteriofaga z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) ..	44
5.4	Primerjava preizkušanih metod .....	45
6	SKLEP .....	47
7	LITERATURA.....	48

## *Povzetek*

Bakteriofage, ki imajo na svoji površini predstavljene želene proteine, lahko iz predstavitvenih knjižnic izoliramo s pomočjo bakteriofagnega prikaza. Po afinitetni selekciji lahko ovrednotimo afiniteto bakteriofagov z več metodami. Najpogostejša metoda je, zaradi enostavne izvedbe in uporabe standardne laboratorijske opreme, test ELISA. Za detekcijo uporabimo protitelesa, na katera je vezan encim, ki omogoči spremembo barve substrata in tako zaznamo prisotnost preiskovanih bakteriofagov. Problem nastane, kadar delamo s bakteriofagi, ki imajo na svoji površini predstavljene proteine, ki neposredno vežejo protitelesa. V tem primeru pride do lažno pozitivnih signalov. Proteini, ki se vežejo na konstantne domene protiteles so bakterijski proteini A, G, L in sintezna Z domena. Za ovrednotenje afinitete takih proteinov lahko uporabimo druge metode, kjer protiteles ne uporabimo. To so površinska plazmonska resonanca, titracijsko določanje deleža vezanih bakteriofagov in izotermna titracijska kalorimetrija. Te metode ne omogočajo sočasne analize večjega števila bakteriofagnih klonov, so zapletene in za njihovo izvedbo potrebujemo bolj specifično opremo.

V magistrski nalogi smo poskusili razviti tri nove metode za določanje afinitete bakteriofagov do tarčnih molekul brez uporabe protiteles. Želeli smo razviti metode, ki bi bile enostavnejše, cenejše in hitrejše. Preizkusili smo naslednje metode: označevanje bakteriofagov s fluorescencnim izotiocianatom, ki mu sledi detekcija z merjenjem fluorescence vzorcev, označevanje bakteriofagov z biotinom, ki mu sledi detekcija s konjugatom streptavidin – hrenova peroksidaza in določanje deleža vezanih bakteriofagov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR).

## *Abstract*

Bacteriophages displaying the desired peptides or proteins on their surface can be isolated from phage display libraries in the process of affinity selections. Affinity of selected bacteriophages can be evaluated with several methods. The most common method is ELISA test, due to its simple implementation and use of standard laboratory equipment. Detection is based on secondary antibody fused to an enzyme, allowing the colour change of the substrate, and thus detection investigated bacteriophages. The problem arises when we are working with targets that bind directly to the antibody. In this case, there is a false positive signal. Proteins, which bind to the constant domains of antibodies, are bacterial proteins A, G, L and synthetic Z domain. In order to evaluate the affinity of these proteins, we can use other methods, where the antibodies are not involved. These are Surface Plasmon Resonance, Micropanning and Isothermal Titration Calorimetry. These methods do not allow the simultaneous analysis of a

large number of bacteriophage clones, they are complex and their implementation requires more specific equipment.

In this Master thesis we tried to develop three new methods for determining the affinity of bacteriophages to target molecules, without the use of antibodies. We wanted to develop methods that are simpler, cheaper and faster. We tried the following methods: Identification of bacteriophages with Fluorescein Isothiocyanate combined with fluorescence measurements of the samples, labelling bacteriophages with biotin combined with detection by streptavidin conjugated with horseradish peroxidase and Micropanning combined with determining the concentration of bacteriophages in the eluate by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

## Seznam okrajšav

A	Absorbanca
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
Anti-M13/HRP	Monoklonsko protitelo proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo
BSA	Goveji serumski albumin ( <i>angl. Bovine serum albumine</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Ultra čista voda
DMF	Dimetilformamid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	Dvoverižna deoksiribonukleinska kislina
ELISA	Encimsko imunski test ( <i>angl.: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay</i> )
FITC	Fluorescien izotiocianat
HRP	Hrenova peroksidaza ( <i>angl. Horseradish peroxidase</i> )
ICTV	Mednarodni odbor za taksonomijo virusov ( <i>angl. International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IPTG	Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranotid
ITC	Izotermna titracijska kalorimetrija
K <sub>D</sub>	Konstanta disociacije
LB	Tekoče gojišče Lennox L Broth Base
mRNA	Informacijska ribonukleinska kislina
MRSA	Proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
pAb RN	Poliklonska protitelesa proti grelinu
PBS	Fosfatni pufer s soljo ( <i>angl. Phosphate buffer saline</i> )
PBST	Fosfatni pufer s soljo z dodanim Tweenom <sup>®</sup> 20 ( <i>angl. Phosphate buffer saline Tween</i> )
PEG	Polietilenglikol
Pfu	Plakotvorna enota ( <i>angl. Plaque forming unit</i> )
PS	Pakirno zaporedje ( <i>angl. Packaging sequence</i> )
qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl. Quantitative polymerase chain reaction</i> )
RF	Replikativna DNA ( <i>angl. Replicative form</i> )
SA	Streptavidin



SPR	Površinska plazmonska resonanca ( <i>angl. Surface Plasmon Resonance</i> )
ssDNA	Enoverižna deoksiribonukleinska kislina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
VRE	Proti vankomicinu odporni enterokoki
vrt./minuto	Število vrtljajev na minuto
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid

### *Okrajšave za aminokislino*

A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asp	asparaginska kislina
E	Glu	glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin

W Trp triptofan

Y Tyr tirozin

# 1 UVOD

## 1.1 Bakteriofagi

Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterije in se razmnožujejo znotraj njih, saj sami nimajo celičnih mehanizmov, potrebnih za lastno razmnoževanje (1). Bakteriofage sta prva odkrila angleški znanstvenik Frederick William Twort in francosko-kanadski mikrobiolog Felix d'Herelle, ki sta pri svojem delu z bakterijami opazila, da ponekod v gojiščih bakterije ne uspevajo (3). Felix d'Herelle je pravilno domneval, da so zato krivi organizmi, ki se razmnožujejo na račun bakterij. Poimenoval jih je bakteriofagi, phagein po grško pomeni jesti. Bakteriofagi so preprosti organizmi, ki so zgrajeni iz nukleinske kisline, ki jo obdaja zaščitna beljakovinska ovojnica oziroma kapsida (1). Nukleinska kislina je lahko DNA ali RNA in je lahko enoverižna ali dvoverižna v krožni ali linearni obliki. Kapsido največkrat tvori več enakih proteinskih podenot, ki se imenujejo kapsomere. Zgradba kapside iz ponavljajočih se kapsomer ima številne ugodnosti. Nov bakteriofag se lažje sestavi iz enakih enot. Bakteriofagni dedni material nosi zapis za izgradnjo celotne kapside v kratkem odseku, saj kodira le en protein. Če bi kapsida nastala iz več različnih proteinov, bi se dolžina nukleinske kisline morala podaljšati. Nekateri bakteriofagi imajo tudi ovojnico, ki jo tvori lipidni dvosloj, v katerega so vključeni proteini in včasih tudi ogljikovi hidrati (2).

Glede na način razmnoževanja ločimo litične in lizogene bakteriofage.

Litični bakteriofagi se pritrdijo na bakterijsko celico, vanjo vnesejo svoj genom in nato izkoristijo celične mehanizme za pomnoževanje lastnega genoma in sintezo strukturnih proteinov kapside (3). Po sestavljanju novih virusnih delcev bakteriofag izzove lizo celice in pomnoženi virusni delci se sprostijo iz bakterijske celice. Pri lizogenih bakteriofagih pa se dedni material vgradi v genom gostiteljske celice in se z njo vred podvojuje (3). Bakteriofag je tako v latentni fazi in se imenuje profag. Ob indukciji bakteriofagna DNA izstopi iz bakterijskega genoma, bakteriofag pa vstopi v litični cikel, s čimer nastanejo novi bakteriofagi. Trenutno za razvrščanje bakteriofagov uporabljamo ICTV klasifikacijo (mednarodni odbor za taksonomijo virusov; *angl.: International Committee on Taxonomy of Viruses*), ki upošteva morfološke značilnosti in dedni material bakteriofaga. Klasifikacija ni dokončna in se prilagaja novo odkritim bakteriofagom tudi z dodajanjem novih družin in rodov (4).

ICTV razlikuje 6 osnovnih morfoloških tipov, povzetih po bakteriofagih T4,  $\lambda$ , T7,  $\phi$ X174, MS2 in fd. Podobno kot pri Linnaeus-ovem razvrščanju rastlin in živali so posamezni virusi združeni v skupine na podlagi skupnih lastnosti. Bakteriofagi so klasificirani z enim redom in

desetimi družinami. 96 % vseh bakteriofagov je uvrščenih v red *Caudovirales*, ki je razdeljen na tri družine: bakteriofagi z dolgimi, gibljivimi repi (*Myoviridae*), bakteriofagi z dolgimi, negibljivimi repi (*Siphoviridae*) in bakteriofagi s kratkimi repi (*Podoviridae*) (5). Te družine se naprej razčlenijo v 17 rodov glede na konfiguracijo genoma (linearen, okrogel, super zvit), velikost genoma in vrsto bakterij, ki jih okužijo. Ostalih družin, ki niso razvrščene, je sedem in v njih spadajo kubični, nitasti in pleomorfni bakteriofagi. So majhne in dobro definirane. Družine nitastih bakteriofagov so *Inoviridae*, *Lipothrixviridae* in *Rudiviridae* (6).

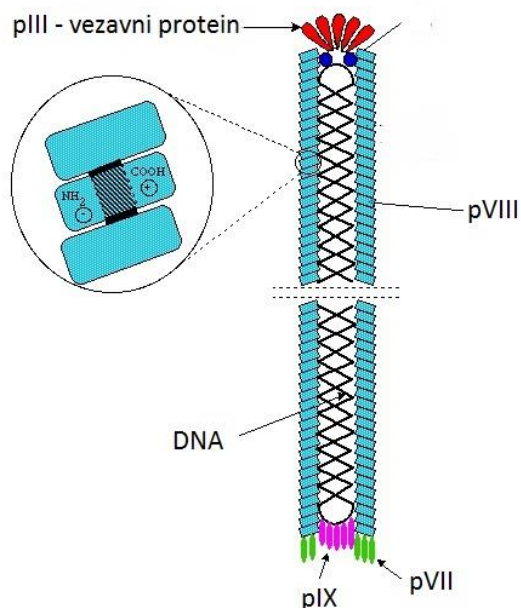
Klasifikacija ICTV ima kar nekaj pomanjkljivosti, saj v veliki meri zanemarljivo genomske in proteomske informacije, ki jih v današnjem času s sekvenciranjem in drugimi testi lahko dokaj hitro pridobimo. Če želimo bakteriofage klasificirati, moramo njegove karakteristike ugotoviti in potrditi z elektronskim mikroskopom. Zaradi hitrejših in natančnejših metod, ki so na voljo, si večina znanstvenikov ne vzame časa za uvrstitev novo odkritih bakteriofagov. Posledično kar 40 % bakteriofagov ni klasificiranih dalje od družine, 10 % pa jih ni uvrščenih niti v ustrezen red in so navedeni kot neklasificirani bakteriofagi, čeprav je njihova genska sekvenca v celoti poznana. Podatkovne baze vsebujejo tudi napačno identificirane bakteriofage (7).

## 1.2 Nitasti bakteriofagi M13

Nitasti bakteriofagi M13 spadajo v rod *Inovirus*, družino *Inoviridae*, niso pa uvrščeni v red (unassigned). Genomsko in strukturno so jim zelo sorodni bakteriofagi f1 in fd, zato vse bakteriofage včasih označujemo s Ff. Njihov genom je sestavljen iz enoverižne krožne molekule DNA (ssDNA) (6). Okužijo lahko bakterije *E. coli*, ki nosijo episom F in omogočajo konjugacijo.

Bakteriofag M13 ima enostavno spiralno kapsido nitaste oblike, ki je sestavljena iz okoli 2700 kopij glavnega plaščnega proteina pVIII. Na obeh koncih kapside se nahaja pet kopij štirih različnih manjših proteinov (pIII, pVI, pVII, pIX).

Protein pVIII je sestavljen iz 50 aminokislinskih ostankov, ki tvorijo strukturo skoraj popolne vijačnice alfa in s tem protein v obliki kratke palice. Znotraj te palice so tri različne domene. Negativno nabita N-končna regija vsebuje kisle aminokislinske ostanke in tvori zunanjo hidrofilno površino virusa. Pozitivno nabita C-končna regija obdaja negativno nabito DNA. Hidrofobno osrednje področje pa je odgovorno za interakcije med podenotami posameznih plaščnih proteinov (8).

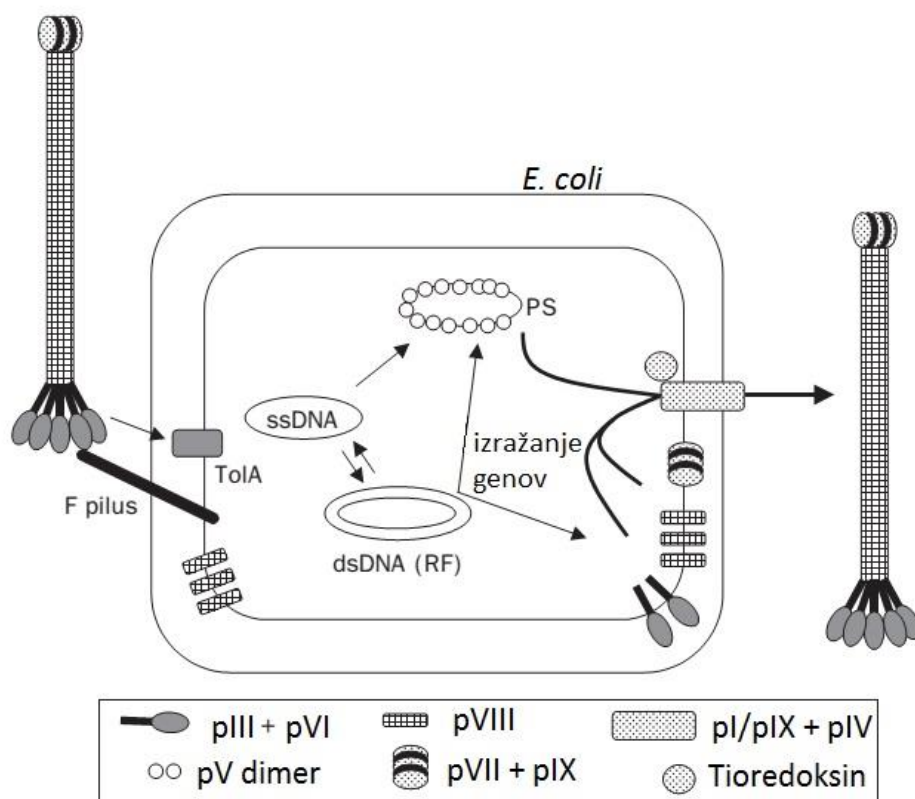


Slika 1: Bakteriofag M13 (prirejeno po: (8)).

Na distalnem koncu bakteriofaga, ki se sestavi najprej, se nahaja pet kopij proteinov pVII in pIX, ki sta nujna za sestavljanje novih bakteriofagov v gostiteljski celici in sproščanje iz nje. Na proksimalnem koncu je lokaliziranih pet kopij vezavnega proteina pIII in pet kopij proteina pVI, s pomočjo katerih virus vstopi v gostiteljsko celico.

Bakteriofagna ssDNA je zvit v kapsidi virusa. Velikost kapside je odvisna od dolžine DNA, kar nam omogoča, da lahko v genom M13 vstavimo tuje gene in ga uporabimo kot vektor za kloniranje. Z naraščanjem velikosti genoma M13 se zmanjšuje učinkovitost pomnoževanja virusa. 1-10 % daljši genom ne povzroča razlik, pri 10-50 % pa pomnoževanje poteka počasneje. Kadar je genom več kot 50 % daljši od normalnega genoma, pa težje izoliramo rekombinantne bakteriofage (8).

Določeno število bakteriofagov, med katere spada tudi M13, ima nekoliko drugačen proces okužbe. Bakteriofag M13 ne povzroča lize svojega gostitelja, ampak se novi bakteriofagi nenehno sproščajo iz celice (mehanizem razmnoževanja je prikazan na sliki 2). Čeprav okužene bakterije še naprej rastejo in se delijo, je njihova rast bistveno počasnejša od neokuženih, saj okužba vpliva na presnovo bakterij. Nelitični način razmnoževanja M13 nam omogoča doseganje visokih koncentracij virusa (9).



Slika 2: Življenjski cikel bakteriofaga M13. Prirejeno po (12).

Okužba bakterije z bakteriofagom M13 se začne z adsorpcijo bakteriofagnih proteinov pIII na bakterijsko strukturo, imenovano F-pilus. Adsorpcija sproži kontrakcijo pilusa in s tem se bakteriofag približa celični membrani, kjer se veže še na koreceptor Tola (10). Nato sledi prenos bakteriofagne DNA v celico, vendar natančen mehanizem ni poznan. Znano je, da pVIII kapsidni protein spremeni svojo spiralno konformacijo in s tem omogoča penetracijo virusne DNA v celico. Gostiteljski protein Tola depolimerizira plaščne proteine, ki se zlijejo s citoplazemsko membrano, kjer ostanejo, dokler novi bakteriofagi ne začnejo zapuščati bakterije (11). Gostiteljske RNA in DNA polimeraze pretvorijo bakteriofagno ssDNA v dvovijačno DNA (dsDNA), poznano kot replikativna DNA (*angl. replicative form*; RF). DNA molekula RF se ne vključi v genom bakterije, ampak se pomnožuje posebej. RF je matrica za izražanje bakteriofagnih proteinov in za nastajanje novih ssDNA. V obdobju po okužbi se količina vseh bakteriofagnih proteinov eksponentno povečuje, vendar zaradi razlik v promotorjih in afiniteti nastalih mRNA do ribosoma proteini nastajajo različno hitro. To omogoča natančno regulacijo nastajanja bakteriofagov. Pri tem ima pomembno vlogo protein pV, ki ob določeni mejni koncentraciji tvori dimere, ki se vežejo na novo sintetizirane ssDNA. To prepreči dostop DNA polimerazi in nadaljnjo spremembo ssDNA v RF. Kompleksi ssDNA in proteina pV se z zanko pakirnega zaporedja PS (*angl.: packaging sequence*) združijo v strukturo, ki je morfološko

podobna sestavljenemu bakteriofagu. Multimerni kompleks, sestavljen iz proteinov pI, pXI, pIV in citoplazemskega gostiteljskega proteina tioredoksina pa omogoča, da se kompleks pV-DNA poveže z ostalimi elementi bakteriofaga. Novi bakteriofagi se sestavijo na notranji membrani celice. DNA se iztisne v periplazemski prostor, plaščni protein pV pa se nadomesti s proteinom pVIII. Protein pV se reciklira in se uporabi za tvorbo naslednjih bakteriofagnih delcev (10).

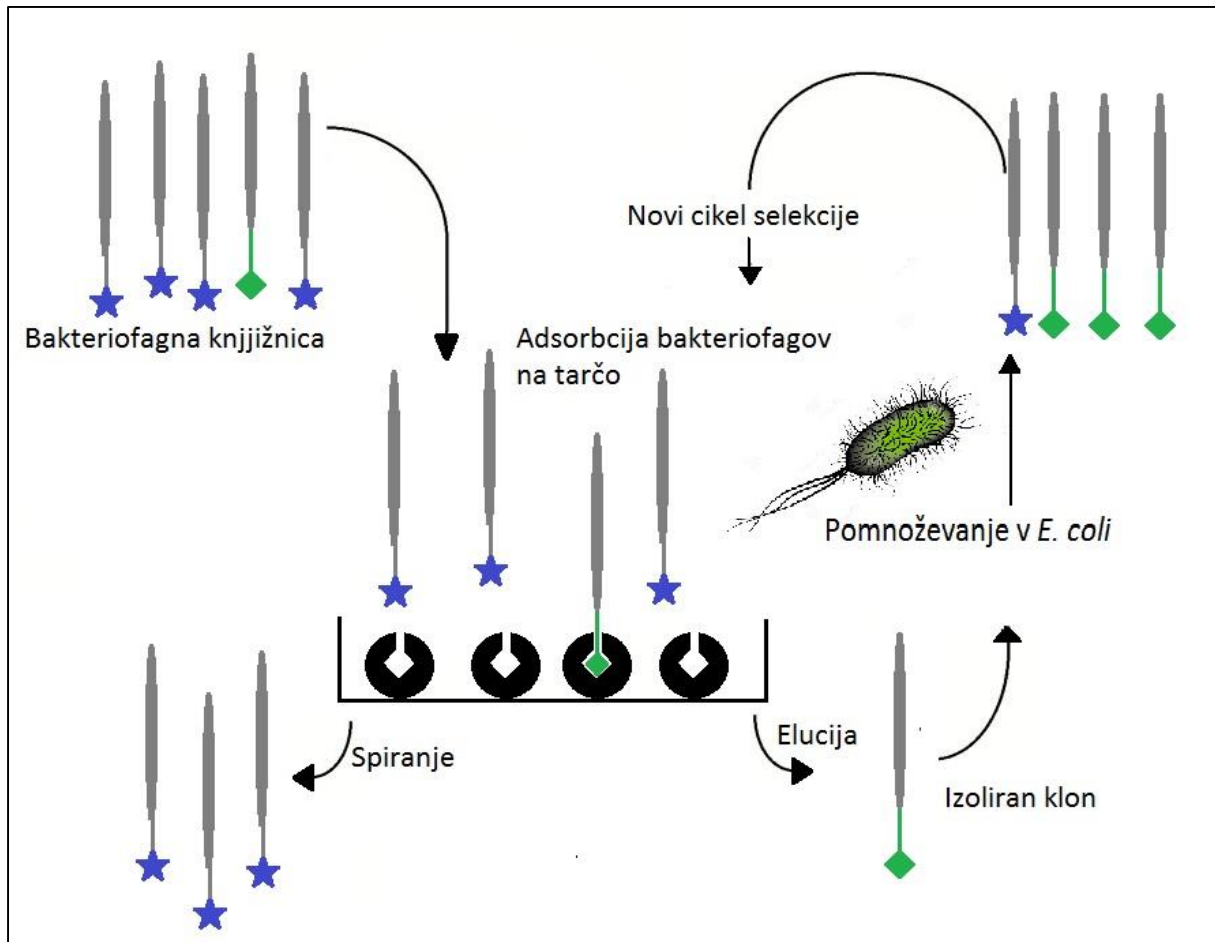
### 1.3 Uporaba bakteriofagov M13

Bakteriofage M13 uporabljamo kot vektorje za prenos genske informacije bakterije *E. coli*. Kloniranje z vektorjem M13 je enostavno, vektor je preizkušen in zato daje zanesljive rezultate. Vektor je v tem primeru rekombinanten bakteriofag, t.j. virusna DNA molekula, ki ima vstavljen tuj DNA segment, obdana s kapsidnimi proteini bakteriofaga. Tujo DNA vstavimo v RF obliki DNA, ki se obnaša kot bakterijski plazmid in jo pridobimo z izolacijo iz kulture okuženih celic *E. coli*. V bakterijo jo ponovno vstavimo s transfekcijo. Dobra lastnost vektorja M13 je tudi, da vsebuje ssDNA, ki jo lahko direktno uporabimo za nadaljnje analize, na primer DNA sekvenciranje in *in vitro* mutagenozo. Problem pri konstrukciji vektorja je, da je 6,4 kb velik genom M13 večinoma sestavljen iz genov, ki so esencialni za replikacijo bakteriofaga in jih zato ne moremo odstraniti oziroma zamenjati. Tujo DNA lahko vstavimo samo v eno 507 nukleotidov dolgo neesencialno zaporedje, kar omejuje možnosti za kloniranje. Zaradi velikosti kapside pa je omejena tudi velikost DNA, ki jo je bakteriofag sposoben sprejeti (9).

Bakteriofagi so uporabni tudi za zdravljenje okužb z bakterijami, tudi takih, ki so odporne na večino znanih antibiotikov, kot so MRSA (*Staphylococcus aureus* odporen proti meticilinu), VRE (enterokoki odporni proti vankomicinu),... Bakteriofagi so glede na gostitelja vrstno, pogosto pa celo sevno visoko specifični. Zato imajo minimalni vpliv (ali pa ga sploh nimajo) na ljudi ali na človeško bakterijsko floro. Vendar pa se bakteriofagi M13 v ta namen ne uporabljajo (3).

Drugo področje uporabe bakteriofagov M13 je bakteriofagni prikaz. To je tehnika, s katero lahko iz obsežnih predstavitvenih knjižnic izoliramo peptide (tudi proteine ali protitelesa) z afiniteto do različnih tarčnih molekul. Bakteriofagna knjižnica je zbirka velikega števila bakteriofagnih klonov, pri čemer vsak bakteriofag na svoji površini izraža naključen peptid (13). Bakteriofagno knjižnico pripravimo tako, da genu za protein pIII v genomu bakteriofaga dodamo zaporedja, ki kodirajo naključne peptide. Ta peptid se izrazi na kapsidi bakteriofaga v obliki fuzijskega proteina s pIII. To ne prizadene infektivnosti virusa, če prikazani peptid ni daljši od 50 aminokislinskih ostankov. Peptide z afiniteto do tarče izoliramo s postopkom

afinitetne selekcije (glej sliko 3) in pomnožimo le bakteriofag, ki izraža ustrezne peptide. Metoda je uporabna za raziskovanje interakcij med proteini, prispevala je tudi k razvoju imunoterapije in cepiv (14). Poleg pIII lahko za fuzijo uporabimo tudi glavni plaščni protein pVIII (13).



Slika 3: Shematski prikaz protokola afinitetne selekcije.

Na mikrotitrsko ploščico adsorbiramo tarčno molekulo. Dodamo bakteriofagno knjižnico in inkubiramo, da se bakteriofagi, ki izražajo ustrezne peptide, vežejo na tarčo. V dolbinice nato speremo in s tem odstranimo nevezane bakteriofage. Bakteriofagi, ki so se vezali na tarčne molekule ostanejo pritrjeni na vdolbinice v mikrotitrski ploščici. Vezane bakteriofage eluiramo z raztopino proste tarče, s kompetitivnim ligandom, s spremembo ionske moči ali pH, z denaturacijo, delno proteolizo ali s sonifikacijo. Eluirane bakteriofage pomnožimo in jih uporabimo v novi stopnji afinitetne selekcije. Ta postopek običajno ponovimo trikrat in vsakič pogoje selekcije zaostriamo, da izoliramo klone z visoko afiniteto do tarče. Po treh stopnjah izoliramo posamezne klone in s testom ELISA določimo afiniteto vezave na tarčno molekulo. S sekvenciranjem bakteriofagnega genoma lahko nato identificiramo peptide, ki so predstavljeni na površini bakteriofaga (15).



## 1.4 Metode za vrednotenje vezave bakteriofagov na tarčno molekulo

### 1.4.1 Encimsko imunski test (ELISA)

Test ELISA je biokemijska metoda, ki se rutinsko uporablja za preverjanje vezave izbranih bakteriofagov (16). Na vdolbinice mikrotitrne plošče najprej adsorbiramo tarčo. Nezasedeno površino vdolbinic blokiramo z govejim serumskim albuminom (BSA) ali mlekom. Nato dodamo vzorec z bakteriofagi in inkubiramo na sobni temperaturi, da se bakteriofagi vežejo na tarče. Nevezane bakteriofage odstranimo s spiranjem vdolbinic, vezane pa detektiramo z monoklonskimi protitelesi proti bakteriofagom, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo. Po njihovi vezavi dodamo kromogeni substrat za hrenovo peroksidazo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) ali 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina (ABTS), ki se po reakciji obarva. Obarvanost vzorcev določimo z merjenjem absorbance. ELISA tako jasno potrdi oziroma ovrže vezavno afiniteto različnih klonov. Meje detekcije so odvisne od količine vezane tarče na vdolbinice mikrotitrne ploščice in afinitete liganda do tarče (15).

Metoda je enostavna in ne zahteva drage opreme. Primerna je za sočasno preverjanje velikega števila različnih bakteriofagnih klonov.

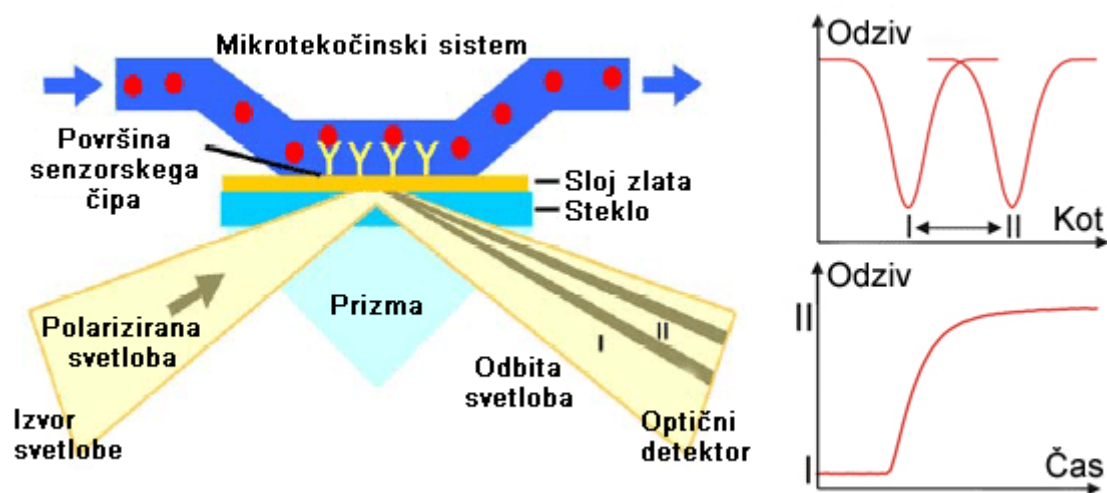
Največja pomanjkljivost testa ELISA je količina tarčnega proteina, ki ga potrebujemo za izvedbo testa. Za izvedbo testa ELISA morajo biti vdolbinice mikrotitrne ploščice popolnoma obložene s tarčo in vsako vdolbinico lahko uporabimo samo enkrat. Metoda ni občutljiva, postopek pa je dolgotrajen (16). Testa ELISA ne moremo uporabiti za preverjanje vezave bakteriofagov na tarče, ki vežejo protitelesa. V tem primeru pride do neposredne vezave sekundarnih protiteles na tarčo in s tem do lažno pozitivnih signalov. Takšni proteini so na primer bakterijski proteini A, G, L in sintezna Z domena, ki vežejo konstantne regije protiteles (17).

Kadar želimo ovrednotiti vezavo takih bakteriofagov, moramo uporabiti metode, pri katerih za določevanje afinitete ne uporabimo protiteles. Takšne metode so površinska plazmonska resonanca, micropanning in izotermna titracijska kalorimetrija.

### 1.4.2 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

S to metodo merimo afiniteto interakcij med molekulami z refraktometri tovarne Biacore. Sestavljeni so iz senzorskega čipa, detektorja in mikrotekočinskega sistema. Mikrotekočinski sistem sestavljajo drobne cevke, po katerih vzorec (suspenzijo bakteriofagov) dovedemo do senzorskega čipa. Senzorski čip je steklena ploščica s tanko plastjo zlata in vezano tarčno molekulo. Detektorski sistem je optični senzor, ki meri intenziteto odbite svetlobe na meji med dvema medijema z različnima lomnima količnikoma. Z laserjem svetlobo usmerimo skozi

prizmo, ki predstavlja prvi medij, na senzorski čip, ki je drugi medij. Med obema medijema je tanek sloj zlata, ki lahko pod določenimi pogoji privzame del energije vpadne svetlobe. Intenziteta odbite svetlobe pri določenem vpadnem kotu zato močno upade in ta pojav imenujemo površinska plazmonska resonanca (angl. *surface plasmon resonance*, SPR). SPR je odvisen od več faktorjev, najbolj pa od lomnega količnika svetlobe senzorskega čipa. Če se lomni količnik spremeni, se spremeni tudi kot, pri katerem pride do SPR. Ko se ligand veže na tarčo na površini čipa, pride do spremembe lomnega količnika in s tem do premika kota, kjer se pojavi SPR (19). Aparat meri intenziteto svetlobe pri fiksnem kotu vpadne svetlobe in izriše senzorgram. Senzorgram je krivulja, ki prikazuje odvisnost intenzitete svetlobe v času.



Slika 4: Prikaz meritve SPR (19)

S to metodo lahko interakcije med molekulami opazujemo v realnem času in iz podatkov določimo konstante asociacije, disociacije in ravnotežne konstante vezave; uporabimo pa jo lahko tudi za relativno medsebojno primerjavo afinitete bakteriofagnih klonov (18). V primerjavi s testom ELISO, potrebujemo manjše količine ligandov ali analitov, kar je glavna prednost uporabe metode pri določanju afinitete bakteriofagnih klonov (16). Interakcije med molekulami pa lahko zaznamo v kompleksnih zmesih, zato ni nujno predhodno čiščenje vzorca. Prednost je tudi možnost hitrega in enostavnega pregleda večjega števila vezavnih partnerjev za potencialne terapevtske tarče in možnost povezave z masnim spektrometrom ali tekočinsko kromatografijo. Metoda je zelo občutljiva, meja detekcije pa je odvisna od količine imobiliziranega liganda, od molekulske mase analita in liganda in od afinitete analita do imobiliziranega liganda (19).

Nespecifična adsorpcija na površino zlate ploščice lahko pripelje do lažnih signalov. Problem je tudi, da se molekulam na senzorskem čipu lahko zmanjša bioaktivnost, velike molekule v

vzorcu (kot so biopolimeri) lahko ovirajo vezavo na tarčne molekule. Oprema, ki jo potrebujemo za izvedbo SPR analize, je zelo draga (20).

### 1.4.3 Titracijsko določanje deleža vezanih bakteriofagov

To je miniaturna različica enega koraka afinitetne selekcije in se uporablja za posamezne klone in ne za celotne knjižnice. Podobno kot pri testu ELISA tudi tukaj s tarčno molekulo prekrijemo vdolbinice mikrotitrskih ploščic, blokiramo nezasedeno površino in na tarčo vežemo posamezne bakteriofagne klone. Nevezane bakteriofage speremo, vezane pa eluiramo najpogosteje z uporabo pufrov s kislim pH. Signal predstavlja meritev koncentracije bakteriofagnih delcev v eluatih, ki ga lahko določimo z mikrobiološko titracijo (26).

Metoda je veliko bolj občutljiva kot ELISA in prav tako ne zahteva posebne opreme (42). Po drugi strani pa je zamudna in neprimerna za analizo večjega števila bakteriofagnih klonov. Dodatno težavo predstavlja nenatančnost mikrobiološke titracije. Kljub tem omejitvam pa se metoda včasih uporablja za določanje afinitete bakteriofagnih klonov (21, 22, 23).

### 1.4.4 Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Izotermna titracijska kalorimetrija je metoda, s katero določamo termodinamične parametre (afiniteto vezave, spremembo entalpije, vezavno stehiometrijo) interakcij med dvema ali več molekulami v raztopini. Uporablja se za preučevanje interakcij med molekulami. Izotermni titracijski kalorimeter je sestavljen iz dveh identičnih celic, ki sta izdelani iz kemično inertnega materiala. Referenčna celica je napolnjena s pufrom ali vodo, vzorčna celica pa vsebuje molekule, ki reagirajo s ligandom. V referenčno celico dodajamo ligand v natančno znanih alikvotih, kar povzroči zmanjšanje ali povečanje temperature v vzorčni celici, odvisno od vrste reakcije, ki poteka (ekso- ali endotermna). Merimo vnos energije, ki jo potrebujemo za vzdrževanje enakih temperatur med vzorčno in referenčno celico (9).

ITC se lahko obravnava kot univerzalni detektor, saj skoraj vsako kemično reakcijo ali fizikalno spremembo spremlja sprememba toplote ali entalpije. V nasprotju z optičnimi metodami je kalorimetrične meritve mogoče opraviti v neprozornih, motnih in heterogenih vzorcih. Na meritve tudi ne vplivajo biološki pogoji, ki se lahko prilagajajo glede na vzorec (topnost, temperatura, pH, dodatek soli,...). Delo z aparaturo ITC je avtomatizirano (41). Metoda je zapletena, ni primerna za termolabilne vzorce in zahteva drago opremo, ki večini laboratorijev ni dostopna (25). V bakteriofagnem prikazu se uporablja, vendar večinoma za vrednotenje vezave peptidov in ne bakteriofagnih klonov na tarčne molekule (26, 27, 28).

## 2 NAMEN DELA

Bakteriofagni prikaz je učinkovita metoda, s katero lahko iz obsežnih predstavitvenih knjižnic izoliramo bakteriofage z afiniteto do različnih tarč. Po afinitetni selekciji ovrednotimo afiniteto bakteriofagov do tarče z encimsko imunskim testom ELISA. Kadar izvajamo selekcijo bakteriofagov s proteini, ki imajo afiniteto do protiteles (npr. stafilokokni protein A, streptokokni protein G) pa testa ELISA ne moremo uporabiti. Neposredna vezava z encimom označenih protiteles na te proteine namreč povzroči lažno pozitivne rezultate. V takšnih primerih lahko uporabimo metode, kjer za določevanje afinitete proteinov ne uporabimo protiteles, kot so površinska plazmonska resonanca, titracijsko določanje deleža vezanih bakteriofagov in izotermna titracijska kalorimetrija. Te metode niso primerne za rutinsko uporabo, saj so dokaj zapletene, zahtevajo posebno opremo in so neprimerne za sočasno analizo večjega števila bakteriofagnih klonov. V magistrski nalogi bomo poskušali razviti alternativne metode, ki ne vključujejo uporabe protiteles in s katerimi bi lahko enostavno, hitro in poceni določali afiniteto bakteriofagnih klonov do tarčnih molekul. Preizkusili bomo tri metode:

- označevanje bakteriofagov s fluorescien izotiocianatom in detekcija z merjenjem fluorescence vzorcev,
- označevanje bakteriofagov z biotinom in detekcija s konjugatom streptavidin – hrenova peroksidaza,
- določanje deleža vezanih bakteriofagov s qPCR.

Za vsako izmed omenjenih metod bomo določili najnižjo koncentracijo bakteriofagov, pri kateri zaznamo vezavo in optimalno koncentracijo, pri kateri je razmerje med signalom in ozadjem največje. Primerjali bomo tudi čas, ki je potreben za ovrednotenje vezave s posamezno metodo.

Za preskušanje teh metod bomo uporabili modelni sistem bakteriofag NL8, ki ima na svoji površini protein z zaporedjem GLVDVLF in se veže na poliklonska protitelesa proti grelinu (pAb RN) ter bakteriofag K4 s sekvenco HPQ, ki posnema biotin in se veže na streptavidin. Za negativno kontrolo pa bomo uporabili bakteriofag 7S1.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema

LABORATORIJSKA OPREMA	MODEL; PROIZVAJALEC
Avtoklav	Systec 2540 EL; Bel-Art products, Pequannock, ZDA
Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka	LFVP 12, Iskra PIO, Slovenija
Centrifuge	5804 in 5415 R Eppendorf, Nemčija mini G, IKA, Nemčija
Centrifugirke (15 in 50 mL)	TPP, Švica
Dializne kasete	Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific, Danska
Hladilnik (4 <sup>0</sup> C)	Gorenje, Slovenija
Inkubator	Unihood 650, Uni Equip, Nemčija
Magnetna mešala	Tehtnica, Slovenija
Magnetni mešalnik	Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija
Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL) (0,75 mL)	Sarstedt, Nemčija Eppendorf, Nemčija
Mikropipete	Eppendorf, Nemčija Biohit, Finska
Mikrotitrne ploščice	F8 Maxisorp loose; Nunc- immuno module Thermo scientific, Danska
Črne mikrotitrne ploščice	Maxisorp črna, Nunc- immuno module Thermo scientific, Danska
Mikrotitrne ploščice za PCR v realnem času	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA
Mikrotitrski čitalec UV-VIS	Tecan Genios, Tecan, Švica Tecan Safire <sup>2</sup> , Tecan, Švica
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Nastavki za mikropipete	Sarstedt, Nemčija
PCR v realnem času	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, ZDA

Petrijevke	TPP, Švica
pH meter	Metrohm, Švica
Precizna tehtnica	Exacta 610 EB, Tehtnica, Slovenija
Sterilizacijski filtri 0,20 $\mu$ m	Minisart; Sartorius, Nemčija
Stresalnik	MS3 digital, IKA Works, ZDA Thermomixer Comfort 1,5 mL. Eppendorf, Nemčija
Štoparica	Asistent, Nemčija
Vibracijski stresalnik	Vibromix 104 EV, Tehtnica, Slovenija Lab dancer, IKA Works, ZDA
Zmrzovalnik (-20 <sup>0</sup> C)	Gorenje, Slovenija

### 3.1.2 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
DMF (dimetilformamid)	Merck, Nemčija
FITC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Glicerol	Fluka Chemie, Švica
Gojišče LB (Lennox L Broth Base)	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Nemčija
IPTG (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranotid)	Promega, Madison, ZDA
KCl	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika, Zagreb, Hrvaška
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix	Thermo Scientific, Danska
NHS-PEG <sub>4</sub> -Biotin	Thermo Scientific, Danska
PEG-8000 (polietilenglikol 8000)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
Tetraciklin, liofilizat	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA

### 3.1.3 Biološki material

Gostiteljski bakterijski sev	Proizvajalec
<i>E. coli</i> ER2738	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
<b>Peptidi in proteini</b>	
Streptavidin, liofilizat Streptavidin, raztopljen v PBS (založna raztopina s koncentracijo 0,81 mg/mL)	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Streptavidin HRP	
BSA (goveji serumski albumin), liofilizat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Anti-M13-mAb-HRP monoklonsko protitelo proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo	GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo
<b>Bakteriofagni kloni</b>	
Klon NL8	Izoliral dr. Miha Vodnik
Klon 7S1	Izolirala Irena Roškar
Klon K4	Izolirala dr. Mojca Lunder
<b>Začetni oligonukleotidi</b>	
F-M13 5-AGGGTGGCGG TACTAAACC-3	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija
R-M13 5-CAGTACCAGGCGGATAAGTG-3	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija

### 3.1.4 Pufri, raztopine in gojišča

Pufer in sestava	Količine	Postopek
PBS – fosfatni pufer, pH 7,4		Navedene količine snovi smo stehali in dodali 400 mL bidestilirane vode. Z magnetnim mešalom smo mešali do nastanka čiste raztopine. pH smo uravnali s pH metrom na 7,4. Pufer smo avtoklavirali in shranili pri sobni temperaturi.
NaCl	3,2 g	
KCl	0,08 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,722 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,096 g	
ddH <sub>2</sub> O	400	
0,1 % PBST – fosfatni pufer s Tween <sup>®</sup> -om 20		V 50 mL PBS smo dodali 50 µL Tween <sup>®</sup> 20 in z magnetnim mešalom premešali. Shranili smo pri sobni temperaturi.
PBS	50 mL	
Tween <sup>®</sup> 20	50 µL	
PEG/NaCl (20 % w/v PEG-8000 / 2,5 M NaCl)		PEG-8000 in NaCl smo stehali in raztopili v 40 mL ddH <sub>2</sub> O. Raztopino smo avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.
PEG-8000	8 g	
NaCl	5,85 g	
ddH <sub>2</sub> O	do 40 mL	
IPTG		IPTG smo stehali in ga raztopili v 10 mL bidestilirani vodi. Raztopino smo sterilizirali z membransko filtracijo in jo razdelili na več alikvotov. Te smo shranjevali pri temperaturi -20°C.
IPTG	2,383 g	
ddH <sub>2</sub> O	10 mL	
X-gal – 2 % raztopina		X-gal smo stehali in ga raztopili v DMF-ju. Raztopino smo razdelili na več alikvotov in jih shranili pri temperaturi -20°C.
X-gal	0,2 g	
DMF	10 mL	
ELUCIJSKI PUFER (20 mM GLICINSKI PUFER)		75 mg glicina smo stehali in ga raztopili v 50 mL bidestilirane vode. Z HCl smo uravnali pH pufra do 2,2.
Glicin	75 mg	
ddH <sub>2</sub> O	50 mL	
NEVTRALIZACIJSKI PUFER		



Tris		2,423 g	Stehtali smo zahtevano količino Tris-a in ga raztopili v bidestilirani vodi. pH raztopine smo uravnali na 9,1. Raztopino smo nato sterilizirali z membransko filtracijo in jo shranili pri sobni temperaturi.
ddH <sub>2</sub> O		20 mL	
<b>RAZTOPINA TETRACIKLINA (20 mg/mL)</b>			Tetraciklin smo raztopili v bidestilirani vodi. Raztopino smo filtrirali preko membranskega filtra. Dodali smo glicerol, ki je bil steriliziran z nasičeno vodno paro. Raztopino tetraciklina smo shranjevali pri -20°C.
Glicerol		40 mL	
ddH <sub>2</sub> O		40 mL	
Tetraciklin		1,6 g	
<b>5 % RAZTOPINA BSA</b>			BSA smo stehtali in ga raztopili v PBS. Raztopino smo filtrirali preko membranskega filtra. Shranjevali smo jo v hladilniku, na 4°C.
BSA		2,5 g	
PBS		50 mL	
<b>0,1 % BSA</b>			V mikrocentrifugirko smo napipetirali PBS in dodali 5 % raztopino BSA. Raztopino smo premešali na vibracijskem mešalniku.
5 % raztopina BSA		200 mL	
PBS		800 mL	
<b>TEKOČE GOJIŠČE LB</b>			Stehtali smo 8 g gojišča LB in ga raztopili v bidestilirani vodi. Raztopino smo avtoklavirali in jo nato shranjevali pri sobni temperaturi.
Gojišče LB (Lennox L Broth Base) Sestava na 1L: 10 g peptona 5 g kvasnega ekstrakta 5 g NaCl		8 g	
ddH <sub>2</sub> O		400 mL	
<b>Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X - gal</b>			Stehtali smo 14 g gojišča LB z agarjem, dodali 400 mL bidestilirane vode ter z magnetnim mešalom mešali dokler se ni gojišče raztopilo. Raztopino smo avtoklavirali. Ko se je raztopina po
Gojišče LB - Agar		14 g	
ddH <sub>2</sub> O		400 mL	
1 M IPTG		800 µL	

2 % X- gal	84 $\mu$ L	avtoklaviranju ohladila na približno 50°C, smo dodali IPTG in X-gal. Gojišče smo v komori z laminarnim pretokom zraka prelili v petrijevke. Petrijevke z gojišči smo hranili v hladilniku (4°C).
------------	------------	--

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprava prekonočne kulture bakterij *E. coli* ER2738

V sterilni vsebnik smo odmerili 10 mL gojišča LB in dodali 10  $\mu$ L založne raztopine antibiotika tetraciklina. V tako pripravljeno gojišče smo s pipeto prenesli eno kolonijo bakterij *E. coli* ER2738. Pripravljeno kulturo bakterij smo inkubirali čez noč pri 37°C in mešanju.

### 3.2.2 Pomnoževanje bakteriofagov

1. V 250 ml erlenmajerico z utori smo dodali 25 mL gojišča LB, 25  $\mu$ L založne raztopine tetraciklina in 250  $\mu$ L prekonočne kulture.
2. Bakterijsko kulturo smo stresali 15 minut pri 37°C.
3. V erlenmajerico smo dodali nekaj  $\mu$ L suspenzije bakteriofagov.
4. Mešanico smo stresali 4,5 h pri 37°C.
5. Suspenzijo smo prenesli v 50 mL centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 4°C in 10000 vrt./minuto.
6. Supernatant smo odlili v svežo centrifugirko, dodali 1/6 volumna PEG/NaCl in ga preko noči pustili v hladilniku pri 4°C.
7. Naslednji dan smo suspenzijo centrifugirali 15 minut pri 4°C in 10000 vrt./minuto.
8. Supernatant smo odlili.
9. Oborino smo resuspendirali v 1 mL PBS in prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko.
10. Dodali smo 1/6 volumna PEG/NaCl in inkubirali 1 uro na ledu.
11. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 4°C in 13200 vrt./minuto. Supernatant smo odstranili z mikropipeto.
12. Oborino smo resuspendirali v 100  $\mu$ L PBS in centrifugirali 1 minuto, da smo odstranili netopne snovi.
13. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Tako smo dobili pomnožene bakteriofage, ki smo jih do uporabe hranili v zamrzovalniku pri -20°C.

### 3.2.3 Mikrobiološka titracija

S to metodo smo določevali koncentracijo bakteriofagov po pomnoževanju in v eluatih. Enota za koncentracijo bakteriofagov je pfu/ml (število plaketovnih enot v 1 mL).

1. Petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal smo postavili v inkubator in jih segreli na 37°C.
2. Top agarozo smo stalili v mikrovalovni pečici in pripravili 3 alikvote po 3-4 mL za vsako redčitev bakteriofagov ter jih postavili v termostat pri 52°C.
3. Bakteriofage smo razredčili s PBS (običajno do 10<sup>9</sup>).
4. V tri 1,5 mL mikrocentrifugirke smo prenesli po 200 µL prekonočne bakterijske kulture *E. Coli* ER2738 in v vsako dodali 10 µL ustrezne redčitve bakteriofagov. Suspenzijo smo premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali na sobni temperaturi 1-5 minut.
5. Okužene bakterijske celice smo prenesli v staljeno top agarozo, vsebino premešali in takoj prelili na petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal.
6. Petrijevke smo pokrili in počakali približno 5 minut, da se je gojišče strdilo. Nato smo jih inkubirali čez noč pri 37°C.

Naslednje jutro smo prešteli število modro obarvanih plakov na posamezni petrijevki in izračunali koncentracijo bakteriofagov po enačbi 1. Iz koncentracij vseh treh redčitev smo izračunali srednjo vrednost.

Enačba 1:

$$c\left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}}\right) = \frac{n \times R \times V'}{V}$$

n= število modrih plakov na plošči

R= faktor redčitve (npr.: 10<sup>9</sup>)

V'= celotni volumen redčitve

V= volumen redčitve, s katerim smo okužili bakterije (10 µL).

### 3.2.4 Encimsko–imunski test na trdnem nosilcu (ELISA)

S to metodo smo preverjali vezavo bakteriofagov na tarče.

1. V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo nanjali 50  $\mu\text{L}$  raztopine tarčne molekule in inkubirali čez noč pri 4°C. Vezali smo 250 ng poliklonskih protiteles proti grelinu (pAb RN) oz. 4,05 ng streptavidina (SA).
2. Vdolinice smo ob rahlem stresanju blokirali z 280  $\mu\text{L}$  5 % BSA za 2 uri na sobni temperaturi.
3. Vdolinice smo spirali trikrat z 200  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST, ob 4-minutnem stresanju pri sobni temperaturi.
4. V vdolinice smo nanjali 100  $\mu\text{L}$  suspenzije fagov, ki smo jih razredčili z 1% BSA. Vezava je potekala 1 uro pri sobni temperaturi in rahlem stresanju.
5. Nevezane bakteriofage smo petkrat sprali z 200  $\mu\text{L}$  0,1% PBST.
6. Dodali smo 100  $\mu\text{L}$  raztopine monoklonskih protiteles proti bakteriofagom M13, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo (anti-M13/HRP) in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Protitelesa smo redčili v razmerju 1:5000 z 1 % BSA.
7. Vdolinice smo sprali petkrat z 200  $\mu\text{L}$  0,1% PBST.
8. V vsako vdolinico smo dodali 200  $\mu\text{L}$  substrata TMB in pustili na pultu 3 minute, da se je vsebina obarvala modro.
9. V vsako vdolinico smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in tako zaustavili reakcijo s TMB. Barva se je spremenila v rumeno.
10. S čitalcem mikrotitrskih ploščic Tecan genios smo izmerili absorbanco pri 450 nm.

### 3.2.5 Označevanje bakteriofagov s fluorescien izotiocianatom (FITC)

1. V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 90  $\mu\text{L}$  bakteriofagov in nato petkrat v 10-minutnih intervalih dodali 2,56  $\mu\text{L}$  FITC, da smo dosegli končno koncentracijo 0,25 mg/mL. Zmes smo 2 uri stresali v temi.
2. Dodali smo 5,43  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , da je njegova končna koncentracija znašala 50 mM in inkubirali 30 minut v temi.

3. Mešanico smo dopolnili do 500  $\mu\text{L}$  s PBS in nato dodali 1/6 celotnega volumna PEG/NaCl. Mikrocentrifugirko smo premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 30 minut na ledu.
4. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali 10 minut pri 13200 vrt./minuto in 4°C.
5. Supernatant smo zavrgli, oborino pa resuspendirali v 90  $\mu\text{L}$  PBS.
6. Ponovno smo dodali 1/6 volumna PEG/NaCl, premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali še 30 minut na ledu.
7. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 13200 vrt./minuto in 4°C.
8. Oborino smo resuspendirali v 90  $\mu\text{L}$  PBS.
9. Mikrocentrifugirko s FITC-označenim bakteriofagom smo zavili v aluminijasto folijo in hranili v hladilniku do uporabe.

### 3.2.6 Preverjanje označevanja bakteriofagov

V črne mikrotitrne ploščice smo nanesti 100  $\mu\text{L}$  bakteriofagov, označenih s FITC. Direktno smo izmerili fluorescenco pri valovni dolžini 280 nm. Fluorescenco smo vzbujali pri valovni dolžini 495 nm.

### 3.2.7 Vrednotenje vezave FITC-označenega NL8 (NL8-FITC) na pAb RN

1. V črne mikrotitrne ploščice smo čez noč vezali 50  $\mu\text{L}$  raztopine pAb RN s koncentracijo 5  $\mu\text{g/mL}$ .
2. Vdolbinice smo 2 uri ob rahlem stresanju blokirali z 280  $\mu\text{L}$  5 % BSA pri sobni temperaturi.
3. Vdolbinice smo trikrat sprali z 0,1% PBST.
4. V vsako vdolbinico smo dodali suspenzijo NL8-FITC in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi, da je potekla vezava.
5. Vdolbinice smo spirali petkrat z 0.1 % PBST.
6. V vsako vdolbinico smo dodali 100  $\mu\text{L}$  PBS, vzorcu smo vzbujali fluorescenco pri valovni dolžini 495 nm in jo izmerili pri 525 nm.

### 3.2.8 Označevanje bakteriofagov z biotinom

1. Bakteriofage smo pomnožili po prej opisanem postopku in jih resuspendirali v PBS s pH 8,0.
2. Reagentu NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin smo dodali 170 µL ultra čiste vode, da smo dobili 20 mM raztopino.
3. K 180 µL bakteriofagom v 1,5 mL mikrocentrifugirki smo dodali ustrezno količino reagenta NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotina, da smo dobili 12-kratni molarni presežek reagenta nad bakteriofagi (izračunano po enačbi 2).

Izračun dodatka reagenta:

Enačba 2:

$$mL \text{ protein} * \frac{mg \text{ protein}}{mL \text{ protein}} * \frac{mmol \text{ protein}}{mg \text{ protein}} * \frac{12 \text{ mmol biotin}}{mmol \text{ protein}} = \mu L \text{ Biotin}$$

4. Inkubirali smo na sobni temperaturi 30 minut.
5. Membrano dializne kasete Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO smo hidrirali, tako da smo jo potopili v pufer PBS s pH 7,4 za 1-2 minuti. Potem smo kaseto odstranili iz pufra in presežno tekočino odstranili s papirnato brisačo.
6. Reakcijsko zmes smo z injekcijsko brizgo prenesli v kaseto.
7. Kaseto smo potopili v 300 mL dializnega pufra s pH 7,4 in dializirali 2 uri, pri 4°C.
8. Po dveh urah smo zamenjali dializni pufer. Po naslednjih dveh urah smo pufer zamenjali še enkrat in nato pustili, da je dializa potekala čez noč.
9. Vzorec smo z injekcijsko brizgo iz kasete prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko.

### 3.2.9 Preverjanje biotinizacije bakteriofagov

Za preverjanje biotinizacije bakteriofagov smo izvedli test ELISA (opisan pri metodi 4). Namesto pAb RN v drugem koraku smo v vdolbinice vezali streptavidin (SA). Sicer je bil postopek enak prejšnjemu.

### 3.2.10 Vrednotenje vezave biotiniranih fagov na pAb RN

1. Na mikrotitrsko ploščico smo čez noč vezali 250 ng pAb RN (v 50 µL PBS) pri 4°C.
2. Vdolbinice smo 2 uri blokirali s 5 % BSA ob rahlem stresanju na sobni temperaturi.

3. Vdolbinice smo spirali trikrat z 0,1 % PBST.
4. V vdolbinice smo nanegli  $5 \times 10^9$  pfu biotiniliranih klonov NL8 in 7S1 in 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi.
5. Vdolbinice smo petkrat sprali z 0,1 % PBST.
6. Dodali smo streptavidin konjugiran s hrenovo peroksidazo (SA-HRP), ki smo ga redčili z 1 % BSA v razmerju 1:3000. Inkubirali smo eno uro pri sobni temperaturi.
7. Vdolbinice smo petkrat sprali z 0,1 % PBST.
8. Dodali smo 200  $\mu$ L TMB in pustili, da je reakcija potekala 3 minute, nato pa smo jo prekinili z dodatkom 50  $\mu$ L  $H_2SO_4$  v vsako vdolbinico.
9. Izmerili smo absorbanco pri 450 nm s čitalcem Tecan Genios.

### 3.2.11 Vrednotenje vezave bakteriofagov na pAb RN s qPCR

#### PRIPRAVA VZORCEV

1. V mikrotitrne ploščice smo vezali 250 ng pAb RN (v 50  $\mu$ L PBS). Ploščice smo čez noč pustili v hladilniku pri 4°C.
2. Vdolbinice smo 2 uri blokirali s 5 % BSA pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju.
3. Vdolbinice smo spirali trikrat z 0,1 % PBST.
4. V vsako vdolbinico smo dodali bakteriofagne klone NL 8 in 7S1 v koncentracijah  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  in 0 pfu/vdolbinico, jih rahlo stresali 1 uro pri sobni temperaturi, da je potekla vezava.
5. Nevezane bakteriofage smo odstranili tako, da smo vdolbinice petkrat spirali z 0,1 % PBST.
6. Vezane bakteriofage smo eluirali s kislim pufrom, v vsako vdolbinico smo odpipetirali 100  $\mu$ L pufru in 10 minut močno stresali na sobni temperaturi.
7. V mikrocentrifugirke, ki so vsebovale 10  $\mu$ L nevtralizacijskega pufru smo prenesli 50  $\mu$ L vzorca iz mikrotitrne ploščice in takoj premešali z vibracijskim mešalnikom. Vzorce smo alikvotirali in do analize shranili pri -20°C. Koncentracijo bakteriofagov v vzorcih smo določili s qPCR.



## qPCR - PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili bakteriofagni klon NL8, ki smo ga v PBS razredčili tako, da smo dobili redčitveno vrsto od 0 do  $10^{12}$  pfu/mL.

Pripravili smo naslednje zmesi za reakcijo PCR:

- 12,5  $\mu$ L SYBR Green/ROX Master mix
- 1,5  $\mu$ L F-M13
- 1,5  $\mu$ L R-M13
- 8,5  $\mu$ L vode brez nukleaz
- 1  $\mu$ L bakteriofagov

Najprej smo zmešali osnovno zmes (SYBR Green/ROX Master mix), oba začetna oligonukleotida in vodo. Končna koncentracija vsakega izmed začetnih oligonukleotidov je znašala 0,3  $\mu$ M. Nato smo dodali 1  $\mu$ L ustrezno razredčenih bakteriofagov in v vdolbinice mikrotitrne ploščice napipetirali 25  $\mu$ L zmesi. Vse reakcije smo izvajali v triplikatih. Za negativno kontrolo smo uporabili vodo. Vzorce v mikrotitrski ploščici smo analizirali z aparaturo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System.

Program pomnoževanja:

- 2 minuti  $50^{\circ}\text{C}$
  - 10 minut  $95^{\circ}\text{C}$
  - 10 sekund  $95^{\circ}\text{C}$
  - 30 sekund  $60^{\circ}$
- } ponovimo 40x

Za vsako reakcijo smo izmerili  $C_t$ , t.j. število cikla, pri katerem fluorescenca preseže signal ozadja in v linearnem območju odziva od koncentracije bakteriofagov določili enačbo umeritvene premice.

Umeritvena premica:

$$y = kx + c$$

kjer je:

y - Izmerjena  $C_t$

k- Naklon krivulje

n- Presečišče premice z x-osjo

x- desetiški logaritem koncentracije bakteriofagov

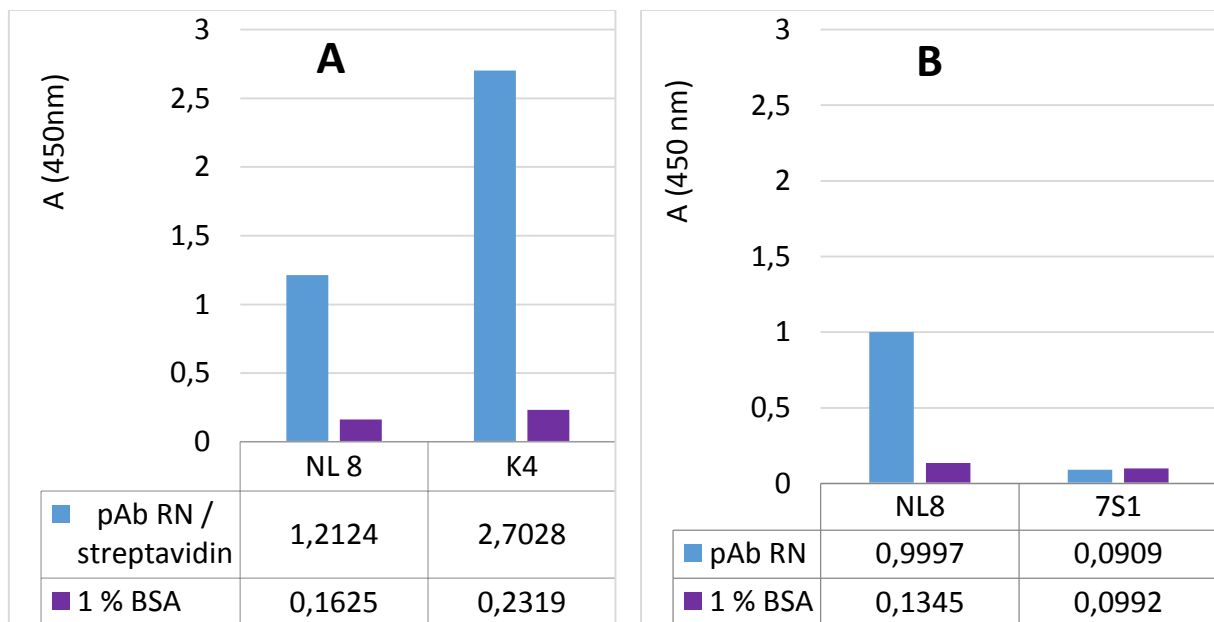
#### qPCR – DOLOČITEV KONCENTRACIJE BAKTERIOFAGOV V ELUATIH

Eluatov pred analizo nismo dodatno redčili. Pripravili smo enake reakcijske zmesi kot za pripravo umeritvene premice, pri čemer smo dodali 1  $\mu\text{L}$  eluatov. Naredili smo tri replikate in izračunali povprečni  $C_t$ . Nato smo s pomočjo enačbe umeritvene premice izračunali koncentracijo bakteriofagov v 1  $\mu\text{L}$  eluata.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ELISA – preverjanje ustreznosti modela vezave

S testom ELISA smo preverili, ali se bakteriofagi, ki smo jih izbrali za model vezave, vežejo na ustrezno tarčo. Bakteriofage NL8, K4 in 7S1 smo pomnožili, izolirali in določili njihovo koncentracijo z mikrobiološko titracijo. V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo adsorbirali tarče (pAb RN za NL8 in 7S1, streptavidin za K4), nekatere pa smo pustili prazne za slepo kontrolo. V vdolbinice smo dodali  $5 \times 10^9$  bakteriofagov v 100  $\mu\text{L}$  1 % BSA. Vezane bakteriofage smo nato označili z anti-M13/HRP, dodali reagent TMB in izmerili absorbanco pri 450 nm. Iz slike 5A je razvidno, da je bil odziv veliko višji v vdolbinicah, kjer smo vezali tarče, kot pa pri slepih kontrolah. Iz tega lahko sklepamo, da se bakteriofaga NL8 in K4 vežeta na pAb RN oz. streptavidin in sta zato primerna za model vezave. V ločenem testu ELISA smo primerjali še vezavo klonov NL8 in 7S1 na pAb RN, pri čemer smo ugotovili, da se klon 7S1 na omenjena protitelesa ne veže (slika 5B). Odločili smo se, da bomo klon 7S1 uporabljali kot negativno kontrolo pri naših poskusih.



Slika 5: Preverjanje ustreznosti modela vezave s testom ELISA. A) Vezava bakteriofagnega klona NL8 na pAb RN in klona K4 na streptavidin (modri stolpci). Z vijoličnimi stolpci je prikazana vezava na prazne blokirane vdolbinice. B) Vezava bakteriofagnih klonov NL8 in 7S1 na pAb RN (modri stolpci) in prazne blokirane vdolbinice (vijolični stolpci).

## 4.2 Fluorescenčno označevanje bakteriofagov

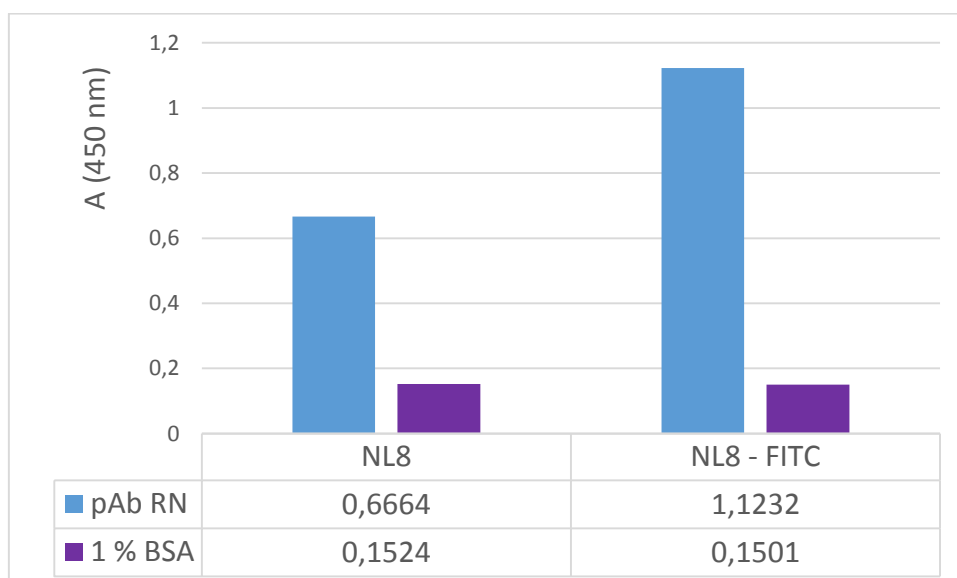
Bakteriofag NL8 smo na novo pomnožili, določili koncentracijo z mikrobiološko titracijo in označili s FITC (NL8-FITC). Označene bakteriofage smo nato ponovno titrirali. Ugotovili smo, da se z označevanjem njihova koncentracija zmanjša za približno desetkrat (preglednica I). Do tega je najverjetneje prišlo, zaradi izgub med postopkom označevanja (obarjanja) ali pa bakteriofagi zaradi vezanega FITC niso viabilni in jih z mikrobiološko titracijo ne zaznamo.

Preglednica I: Koncentracija bakteriofagov pred in po označevanju s FITC.

	Koncentracija pred označevanjem (NL8)	Koncentracija po označevanju (NL8-FITC)
Poskus 1	$2,77 \times 10^{12}$ pfu/mL	$1,98 \times 10^{11}$ pfu/mL
Poskus 2	$1 \times 10^{13}$ pfu/mL	$1 \times 10^{12}$ pfu/mL

### 4.2.1 Vezava NL8-FITC na pAb RN - ELISA

Odločili smo se preveriti, ali se s FITC označen bakteriofag NL8 še vedno veže na pAbRN, saj bi lahko FITC, vezan na prikazan peptid, motil to vezavo. V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo nanесли  $5 \times 10^9$  pfu neoznačenega NL8 in označenega NL8-FITC. Vezane bakteriofage smo detektirali z anti-M13/HRP in reagentom TMB.



Slika 6: ELISA s FITC – označenim in neoznačenim bakteriofagom

Iz slike 6 lahko razberemo, da se NL8–FITC veže na protitelesa celo močnejše kot NL8, medtem ko se nespecifična vezava na ozadje ne razlikuje. Navidezno močnejša vezava NL8 je lahko posledica prisotnosti neinfektivnih fagov in posledično lažno nižje koncentracije, določene z mikrobiološko titracijo. Sklepamo, da označevanje fagov s FITC ne zmanjša sposobnosti vezave na tarčo.

#### 4.2.2 Vezava NL8-FITC na pAb RN – merjenje fluorescence

Ko smo potrdili, da se NL8-FITC veže na tarčna protitelesa, smo preverili ali lahko vezan bakteriofag zaznamo tudi z merjenjem fluorescence. V prvem poskusu (preglednica II) smo na tarčna protitelesa vezali različne količine NL8-FITC in izmerili fluorescenco. Izmerjene fluorescence vzorcev se ne razlikujejo od slepih vzorcev (BSA). Da so bakteriofagi ustrezno fluorescenčno označeni, sklepamo po odzivu vdolbinice, v katero smo direktno nanесли NL8-FITC in izmerili višjo fluorescenco od ozadja. V drugem poskusu (preglednica II) smo uporabili še višjo koncentracijo NL8-FITC, vendar tudi v tem primeru nismo zaznali signala. Vrednosti fluorescence so v tem poskusu višje kot v prejšnjem, ker smo uporabili nekoliko drugačne nastavitve aparature.

Preglednica II: Izmerjene fluorescence vzorcev.

Poskus 1			Poskus 2		
Količina NL8-FITC (pfu/vdolbinico)	pAb RN	BSA	Količina NL8-FITC (pfu/vdolbinico)	pAb RN	BSA
$1 \times 10^9$	50	51	$5 \times 10^{10}$	97	96
$1 \times 10^8$	50	49	$5 \times 10^9$	95	101
$1 \times 10^7$	49	52	$5 \times 10^8$	99	94
0	51	49	$5 \times 10^7$	97	99
Direktno nanešen NL8-FITC	68		0	100	95

## 4.3 Biotinilirani bakteriofagi

### 4.3.1 Označevanje bakteriofagov z biotinom

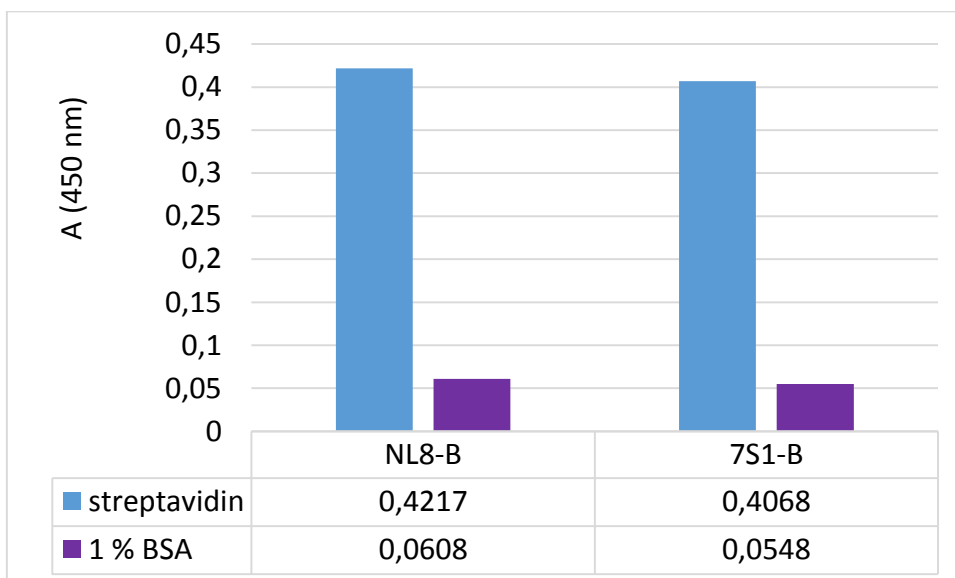
Bakteriofaga NL8 in 7S1 smo pomnožili in določili koncentracijo s titracijo. Bakteriofage smo nato biotinilirali po opisanem postopku in ponovno titrirali. Tukaj ni prišlo do znižanja koncentracije kot pri označevanju s FITC (preglednica III). Pri klonu NL8 je koncentracija po označevanju celo višja, verjetno zaradi zmanjšanja volumna raztopine pri dializi.

Preglednica III: Rezultati titracij bakteriofagov pred biotinizacijo in po njej.

	NL 8 (pfu/mL)	7S1 (pfu/mL)
Nebiotiniliran	$2,74 \times 10^{12}$	$5,02 \times 10^{12}$
Biotiniliran	$5,02 \times 10^{12}$	$4,34 \times 10^{12}$

### 4.3.2 Preverjanje biotinizacije bakteriofagov - ELISA

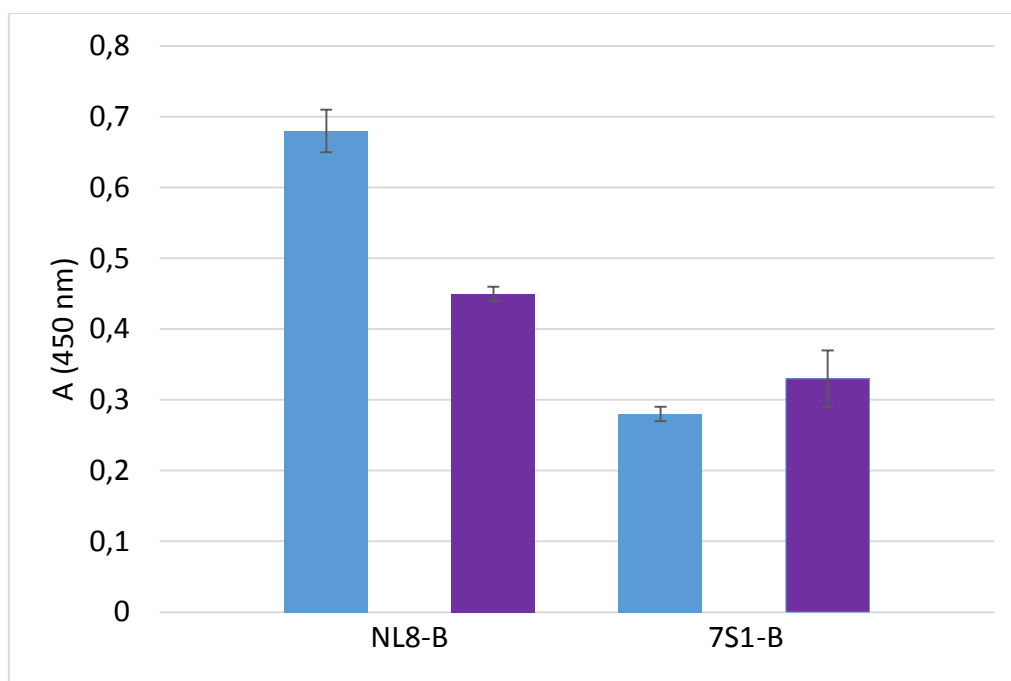
S testom ELISA smo preverili, ali so bakteriofagi ustrezno biotinilirani. Biotinizacijo smo preverili tako, da smo na streptavidin vezali z biotinom označene bakteriofage in jih detektirali z anti-M13/HRP. Iz slike 7 lahko razberemo, da smo bakteriofage uspešno biotinilirali, saj smo opazili visok odziv v primerjavi s slepimi vzorci.



Slika 7: Preverjanje biotinizacije bakteriofagov. V vdolbinice mikrotitrskih ploščic, prekrte s streptavidinom (modri stolpci), in v prazne vdolbinice (vijolični stolpci) smo vezali  $5 \times 10^9$  pfu/mL NL8-B in 7S1-B.

### 4.3.3 Vezava biotiniliranih bakteriofagov na pAb RN – detekcija s SA-HRP

Najprej smo primerjali vezavo biotiniliranega bakteriofaga NL8 (NL8-B) in negativne kontrole 7S1-B na tarčna protitelesa pAb RN. Bakteriofage, vezane na pAb RN, smo detektirali s SA-HRP. Izvedli smo tri paralelne ponovitve poskusa pri koncentraciji  $1 \times 10^8$  pfu/vdolbinico. Ugotovili smo, da lahko pri tej koncentraciji bakteriofagov zaznamo razliko med NL8-B, ki je vezan na tarčna protitelesa in slepim vzorcem (slika 8 in preglednica IV). Vrednosti absorbanc vezanega klona 7S1-B in slepih vzorcev so zelo podobni, iz česar lahko sklepamo, da je 7S1 ustrezná negativna kontrola. S temi rezultati smo pokazali, da lahko s to metodo razlikujemo med bakteriofagi, vezanimi na tarčo in ozadje ter bakteriofagnimi kloni, ki se na tarčo vežejo in tistimi, ki se ne.



Slika 8: Vezava NL8-B in 7S1-B na pAb RN. Rezultat je prikazan kot povprečje treh ponovitev, intervali napak pa predstavljajo standardno deviacijo (SD).

Preglednica IV: Izmerjene absorbance pri vezavi NL8-B in 7S1-B na pAb RN.

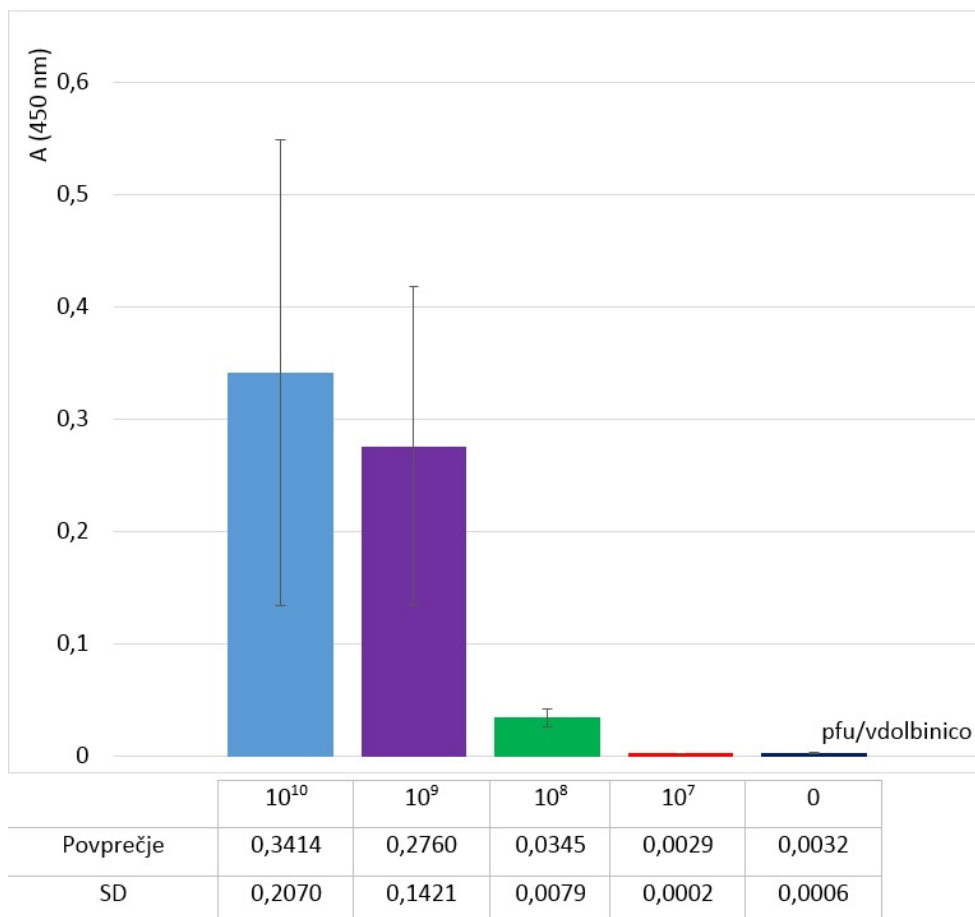
		1. pon	2. pon	3. pon	Povprečje	SD
NL8-B	pAb RN	0,7163	0,6649	0,6649	0,68	0,03
	BSA	0,4362	0,4543	0,4497	0,45	0,01
7S1-B	pAb RN	0,2649	0,2904	0,2714	0,28	0,01
	BSA	0,3409	0,373	0,29	0,33	0,04

Nato smo izvedli poskus z različnimi koncentracijami NL8-B, da bi ugotovili, kako nizke koncentracije vezanih bakteriofagov lahko zaznamo. Uporabili smo koncentracijsko območje  $10^7 - 10^{10}$  pfu/vdolbinico. Poskus smo ponovili trikrat, pri čemer smo pri drugi in tretji ponovitvi uporabili novo zalogo NL8-B. Za detekcijo smo uporabili SA-HRP.

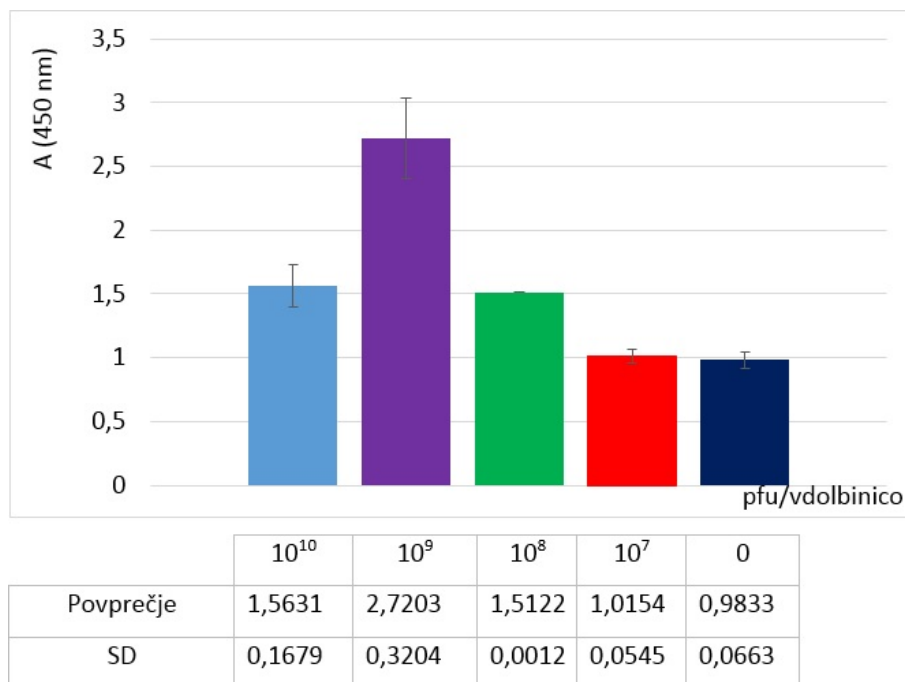
Preglednica V: Izmerjene absorbance pri 450 nm

1. ponovitev				
Količina NL8-B (pfu/vdolbinico)	Absorbanca (A)	Absorbanca slepega vzorca (A')	Razlika A-A'	Razmerje A/A'
$10^{10}$	1,7617	1,1892	0,5725	1,4814
$10^9$	0,6542	0,2143	0,4399	3,0523
$10^8$	0,1285	0,0849	0,0436	1,5135
$10^7$	0,0815	0,0784	0,0031	1,0395
0	0,1779	0,0807	0,0028	0,9653
2. ponovitev				
$10^{10}$	0,5567	0,3835	0,1732	1,4516
$10^9$	0,3202	0,1327	0,1875	2,4129
$10^8$	0,0886	0,05886	0,03	1,5119
$10^7$	0,0548	0,0575	0,0027	0,9530
0	0,0502	0,0541	0,0039	0,9279
3. ponovitev				
$10^{10}$	0,6459	0,3678	0,2784	1,7562
$10^9$	0,32	0,1196	0,2004	2,6756
$10^8$	0,0887	0,0587	0,03	1,5111
$10^7$	0,0548	0,052	0,0028	1,0538
0	0,054	0,0511	0,0029	1,0568





Slika 9: Grafični prikaz povprečij treh rezultatov pri posamezni koncentraciji in intervali napak, ki predstavljajo standardno deviacijo (SD).



Slika 10: Grafični prikaz povprečnih razmerij med odzivi po posameznih koncentracijah in intervali napak, ki predstavljajo standardno deviacijo.

Najnižja količina bakteriofagov, pri kateri smo zaznali razliko med slepim vzorcem in vzorcem je bila  $10^8$  pfu/vdolbinico, z naraščanjem koncentracije pa se je odziv absorbance povečeval. Razmerja so bila pri vsaki koncentraciji v vseh treh ponovitvah zelo podobna, zato sklepamo, da je bila ponovljivost poskusa dobra.

## 4.4 Določanje deleža vezanih bakteriofagov s qPCR

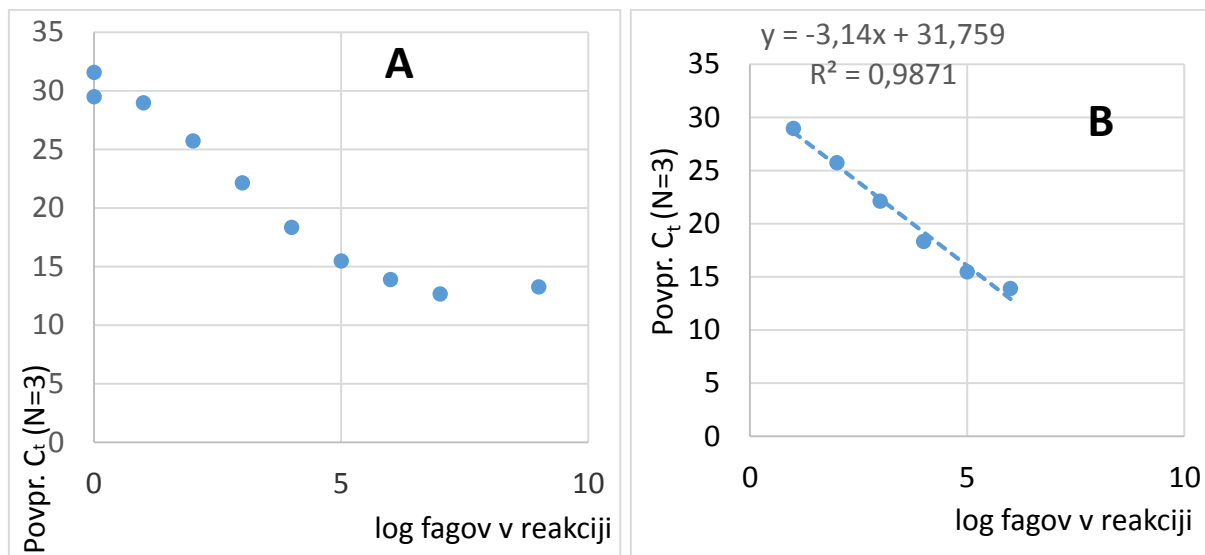
### 4.4.1 Priprava umeritvene premice qPCR

Pripravili smo redčitveno vrsto bakteriofagov NL8 v PBS s koncentracijami od  $10^3$  do  $10^{12}$  pfu/mL. Nato smo pripravili reakcijske zmesi z različnimi koncentracijami bakteriofagov in izmerili  $C_t$ , da bi ugotovili odvisnost odziva od količine bakteriofagne DNA.  $C_t$  je definiran kot cikel PCR, pri katerem fluorescenčni signal preseže prazno vrednost. Vrednosti  $C_t$  so obratnosorazmerne količini nukleinskih kislin v vzorcu. Manjša kot je vrednost  $C_t$ -ja, večja je količina nukleinskih kislin. Rezultati so podani v preglednici VI.

Preglednica VI: Redčitvena vrsta bakteriofagov NL8 in izmerjene vrednosti  $C_t$ .

Konc. fagov v vzorcu (pfu/mL)	Količina fagov v reakciji (pfu)	log (pfu) fagov v reakciji	$C_t$ 1	$C_t$ 2	$C_t$ 3	Povp. $C_t$	SD
$10^{12}$	$10^9$	9	/	16,33	16,23	16,28	0,07
$10^{11}$	$10^8$	8	/	/	/	/	/
$10^{10}$	$10^7$	7	12,63	12,63	12,76	12,67	0,08
$10^9$	$10^6$	6	13,86	13,88	13,98	13,91	0,06
$10^8$	$10^5$	5	15,60	15,47	15,42	15,49	0,09
$10^7$	$10^4$	4	18,29	18,41	18,35	18,35	0,06
$10^6$	$10^3$	3	22,29	22,08	22,07	22,15	0,12
$10^5$	$10^2$	2	25,69	25,96	25,55	25,73	0,21
$10^4$	10	1	28,29	29,55	29,11	28,98	0,64
$10^3$	$10^0$	0	31,70	31,63	31,43	31,59	0,14
0	0	0	30,53	29,76	28,21	29,50	1,18

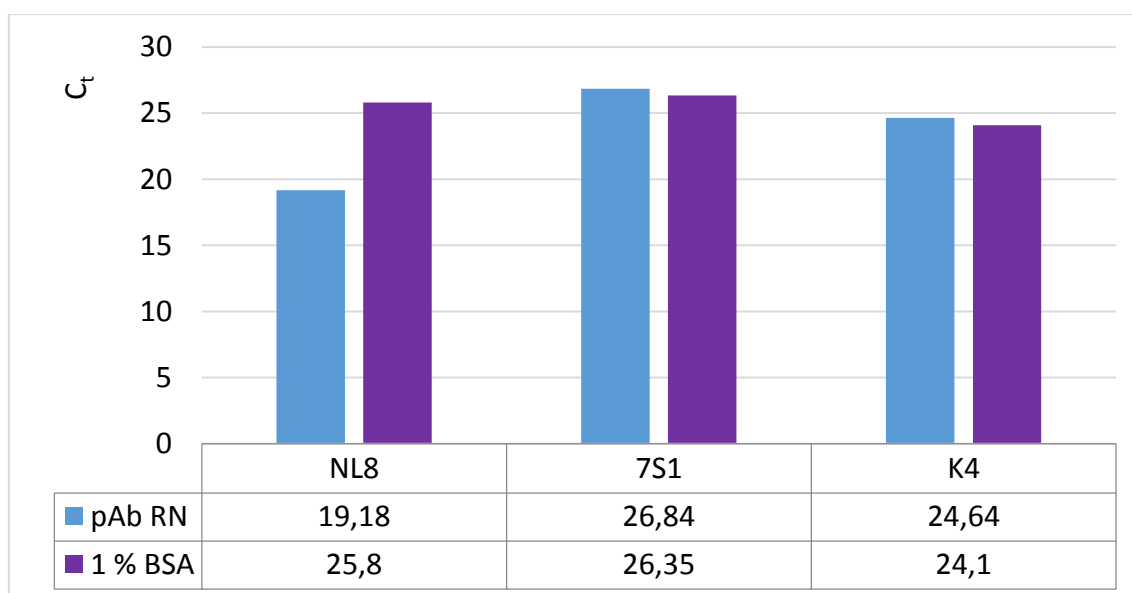
Iz rezultatov lahko razberemo, da je meja detekcije qPCR metode pri koncentraciji vzorca  $10^4$  pfu/mL oz. pri 10 fagov na reakcijo. Na sliki 11 lahko vidimo, da je linearno območje od 10 do  $10^6$  pfu/reakcijo. Najvišja koncentracija, katero lahko zanesljivo določimo je  $10^9$  pfu/mL. Za linearno območje smo določili enačbo premice, ki je prikazana na sliki 11B.



Slika 11: A) Umeritvena krivulja za qPCR. B) Lineano območje umeritvene krivulje. Koncentracij bakteriofagov  $10^{12}$  in  $10^{11}$  pfu/mL ni na grafu, saj je iz preglednice VI razvidno, da pri tako velikih koncentracijah pride do težav z merjenjem fluorescence.

#### 4.4.2 Primerjava vezave bakteriofagov NL8, 7S1 in K4 na pAb RN

V mikrotitrsko ploščico smo vezali protitelesa pAb RN in dodali  $10^9$  pfu/vdolbinico NL8, 7S1 in K4. Nevezane bakteriofage smo spirali, vezane pa eluirali in njihovo koncentracijo v eluatu določili s qPCR. Znotraj linearnega območja smo z qPCR testirali vzorce. Za izračun koncentracije smo uporabili enačbo umeritvene premice. Na ta način smo posredno primerjali vezavo posameznih klonov bakteriofagov na pAb RN.



Slika 12: Odzivi qPCR ( $C_t$ ) bakteriofagov NL8, 7S1 in K4 po vezavi na pAb RN (modri stolpci) in BSA (vijolični stolpci).

Na sliki 12 vidimo, da se pri klonih 7S1 in K4 odzivi med vzorcem in slepo kontrolo skoraj ne razlikujejo. Pri klonu NL8 pa je vrednost  $C_t$  vzorca manjša kot njegova slepa kontrola, kar nam pokaže, da lahko tudi s to metodo razločujemo bakteriofage, ki se na tarčo vežejo od tistih, ki se ne.

#### 4.4.3 Redčitvena vrsta klonov NL8 in 7S1

Tudi z metodo qPCR smo preverili, pri kako nizkih koncentracijah bakteriofagov lahko zaznamo razliko med vezanimi in nevezanimi bakteriofagi. Uporabili smo količine bakteriofagov NL8 in 7S1 znotraj linearnega območja, in sicer od  $10^7$  do  $10^9$  pfu/vdolbinico. Naredili smo dve ponovitvi poskusa in vsako reakcijo izvedli v treh tehničnih ponovitvah. Iz rezultatov smo izračunali povprečno vrednost  $C_t$  in standardno deviacijo treh tehničnih ponovitev. Za izračun koncentracije smo uporabili enačbo umeritvene premice (slika 11B). Rezultati so podani v preglednicah VII, VIII in IX.

$$\log_{10}(pfu) = \frac{povp.Ct - 31,759}{-3,14}$$

$$\frac{pfu}{reakcija} = 10^{\log_{10}(pfu)}$$

Preglednica VII: Redčitvena vrsta bakteriofagnega klona NL8. Različne količine NL8 (stolpec količina) smo vezali na tarčo, sprali in vezane bakteriofage eluirali. V eluatu smo s qPCR določili  $C_t$  in izračunali število bakteriofagov v pfu/reakcijo.

<b>Tarča</b>	<b>Količina NL8 (pfu)</b>	<b><math>C_t</math> 1</b>	<b><math>C_t</math> 2</b>	<b><math>C_t</math> 3</b>	<b>Povp. <math>C_t</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>\log_{10}</math> (pfu)</b>	<b>pfu/reakcijo</b>
RN 1	$10^9$	23,27	22,73	22,82	22,94	0,29	2,81	643,57
RN 2	$10^9$	20,13	20,05	20,18	20,12	0,07	3,71	5089,65
RN 1	$10^8$	20,45	20,24	20,34	20,34	0,11	3,64	4320,79
RN 2	$10^8$	20,22	20,84	20,75	20,60	0,34	3,55	3570,76
RN 1	$10^7$	23,12	23,18	23,26	23,19	0,07	2,73	537,08
RN 2	$10^7$	23,64	23,45	23,34	23,48	0,15	2,64	434,20
RN 1	0	29,74	27,64	29,12	28,83	1,08	0,93	8,55
RN 2	0	27,86	28,33	28,22	28,14	0,25	1,15	14,24
BSA 1	$10^9$	25,70	25,88	26,14	21,22	0,22	1,86	73,08
BSA 2	$10^9$	25,09	28,51	28,51	20,33	1,97	1,40	24,99
BSA 1	$10^8$	27,29	27,84	27,43	20,50	0,29	1,35	22,39
BSA 2	$10^8$	27,48	27,96	28,20	20,80	0,37	1,23	17,19
BSA 1	$10^7$	27,24	26,56	27,28	21,74	0,40	1,51	32,14
BSA 2	$10^7$	29,03	28,69	29,02	22,60	0,19	0,91	8,06
BSA 1	0	30,00	28,05	29,85	25,54	1,09	0,78	6,07
BSA 2	0	28,49	28,86	28,26	24,80	0,30	1,03	10,62

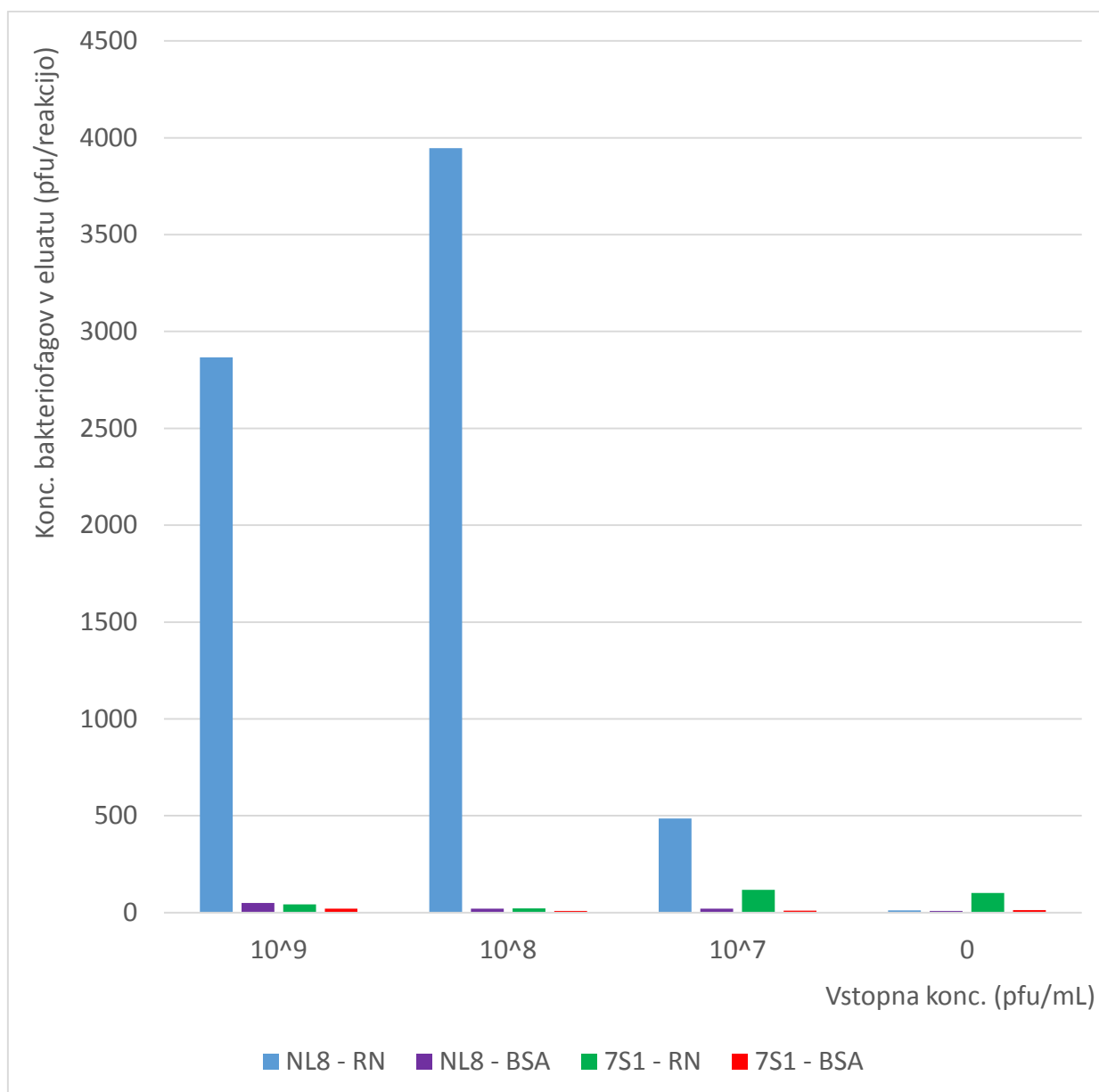
Preglednica VIII: Redčitvena vrsta bakteriofagnega klon 7S1. Različne količine 7S1 (stolpec količina) smo vezali na tarčo, sprali in vezane bakteriofage eluirali. V eluatu smo s qPCR določili  $C_t$  in izračunali število bakteriofagov v pfu/reakcijo.

<b>Tarča</b>	<b>Količina 7S1 (pfu)</b>	<b><math>C_t</math> 1</b>	<b><math>C_t</math> 2</b>	<b><math>C_t</math> 3</b>	<b>Povp. <math>C_t</math></b>	<b>SD</b>	<b><math>\log_{10}</math> (pfu)</b>	<b>pfu/reakcijo</b>
RN 1	$10^9$	27,17	27,05	27,09	27,10	0,06	1,48	30,39
RN 2	$10^9$	26,36	26,25	26,43	26,35	0,09	1,72	52,93
RN 1	$10^8$	27,66	27,19	27,64	27,50	0,27	1,36	22,77
RN 2	$10^8$	28,05	27,02	27,78	27,62	0,53	1,32	20,86
RN 1	$10^7$	28,35	27,17	25,78	27,10	1,29	1,48	30,46
RN 2	$10^7$	24,46	24,50	24,57	24,51	0,06	2,31	203,52
RN 1	0	26,84	27,05	23,61	25,83	1,92	1,89	77,12
RN 2	0	25,16	25,41	24,91	25,16	0,25	2,10	126,36
BSA 1	$10^9$	28,36	28,24	29,31	28,64	0,59	0,99	9,87
BSA 2	$10^9$	26,93	27,05	27,22	27,07	0,15	1,49	31,22
BSA 1	$10^8$	28,45	28,82	29,01	28,76	0,28	0,96	9,02
BSA 2	$10^8$	29,25	28,77	29,04	29,02	0,24	0,87	7,45
BSA 1	$10^7$	28,51	28,92	28,95	28,79	0,25	0,94	8,80
BSA 2	$10^7$	29,14	28,60	28,17	28,64	0,48	0,99	9,87
BSA 1	0	28,01	28,31	27,92	28,08	0,20	1,17	14,85
BSA 2	0	28,90	28,92	28,26	28,69	0,37	0,98	9,47

Preglednica IX: Povprečje  $C_t$  dveh ponovitev poskusa.

Klon	Količina bakteriofagov (pfu/vdolbinico)	Povprečna vrednost dveh ponovitev poskusa
NL8 - RN	$10^9$	21,53
	$10^8$	20,47
	$10^7$	23,33
	0	28,49
NL8 - BSA	$10^9$	26,64
	$10^8$	27,70
	$10^7$	27,97
	0	28,92
7S1- RN	$10^9$	26,73
	$10^8$	27,56
	$10^7$	25,81
	0	25,50
7S1 - BSA	$10^9$	27,85
	$10^8$	28,89
	$10^7$	28,72
	0	28,39





Slika 13: Grafični prikaz odvisnosti koncentracije bakteriofagov v eluatu od vstopne količine bakteriofagov pri določanju deleža vezanih bakteriofagov s qPCR. Podano je povprečje dveh ponovitev poskusa.

Modri stolpci prikazujejo odziv NL8-RN in kot lahko vidimo na grafu se njihov odziv spreminja glede na vstopno koncentracijo. Pri vseh ostalih vzorcih pa je odziv praktično nič. S to metodo lahko zaznamo razliko med vezanimi in nevezanimi bakteriofagi že pri  $10^7$  pfu/vdolbinico.

## 5 RAZPRAVA

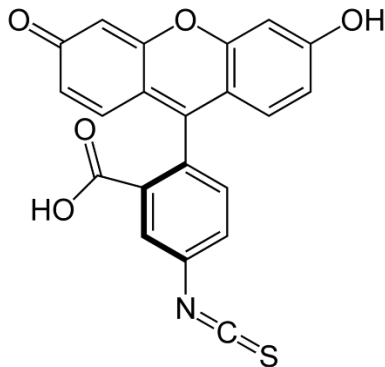
Z afinitetno selekcijo lahko iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic izoliramo bakteriofage, ki imajo na svoji površini predstavljene peptide, z afiniteto do različnih tarčnih molekul. Po izolaciji posameznih bakteriofagnih klonov njihovo afiniteto do tarče običajno določamo z encimsko imunskim testom (ELISA) (16). Test ELISA je enostaven, zato se rutinsko uporablja za kvalitativno vrednotenje afinitete izoliranih klonov do tarče. Sočasno lahko ovrednotimo večje število bakteriofagnih klonov (96 v standardnem formatu mikrotitrne ploščice). Ker pa imajo nekatere proteinske tarče afiniteto do protiteles, testa ELISA ne moremo vedno uporabiti. V takih primerih lahko uporabimo alternativne metode, kot so površinska plazmonska resonanca (SPR), titracijsko določanje deleža vezanih bakteriofagov in izotermna titracijska kalorimetrija (ITC). Te metode niso primerne za rutinsko preverjanje vezave, saj bodisi zahtevajo posebno opremo, ki v večini laboratorijev ni dostopna, bodisi niso primerne za sočasno analizo velikega števila bakteriofagnih klonov. Naš namen je bil razvoj enostavne in cenovno ugodne metode, ki ne vključuje uporabe protiteles, s katero bi lahko ovrednotili vezavo bakteriofagnih klonov na tarče, ki vežejo protitelesa. Preizkusili smo tri različne metode: 1) bakteriofage smo fluorescenčno označili s FITC, 2) bakteriofage smo označili z biotinom in za detekcijo uporabili konjugat SA-HRP in 3) določanje deleža vezanih bakteriofagov s qPCR.

Kot modelni sistem vezave za preizkus novih metod smo uporabili bakteriofag NL8, ki ima na svoji površini protein s sekvenco GLVDVLF in se veže na poliklonska protitelesa proti grelinu (pAb RN) ter bakteriofag K4 s sekvenco GTFAHPQ, ki posnema biotin in se veže na streptavidin (16, 18, 38). Za negativno kontrolo smo uporabili bakteriofag 7S1 s prikazanim peptidom NEISFHA.

Za potrditev ustreznosti modelov vezave smo izvedli test ELISA. Ugotovili smo, da se bakteriofaga NL8 in K4 močno in specifično vežeta na ustrezni tarči (pAb RN in streptavidin) in da se izmerjene absorbance bistveno razlikujejo od slepih kontrol (slika 5A). Zato smo sklepali, da sta bakteriofaga primerna za model vezave. Preverili smo tudi vezavo klona 7S1 na pAb RN, ki pa se ni razlikovala od odziva slepe kontrole (slika 5B). S tem smo potrdili, da je klon 7S1 primeren za negativno kontrolo.

## 5.1 Označevanje bakteriofagov s FITC

FITC (fluorescien izotiocianat) je derivat fluoresceina z dodano funkcionalno skupino izotiocianata ( $-N=C=O$ ) (slika 14).



Slika14: Fluorescien izotiocianat (29). Molekula ima maksimum absorpcije pri 495 nm, pri relaksaciji pa oddaja elektromagnetno valovanje z maksimumom pri 525 nm.

Izotiocianatna skupina reagira z nukleofili, kot so aminske in sulfhidrilne skupine na proteinih, zato lahko z njimi označimo tudi proteine na kapsidi bakteriofagov (30).

Za detekcijo označenih bakteriofagov lahko uporabimo fluorescenčni spektrofotometer, ki je standardna oprema večine laboratorijev.

Postopek označevanja bakteriofagov s FITC je enostaven in ne zahteva posebne opreme. Suspenziji bakteriofagov v mikrocentrifugirki smo postopoma dodajali FITC. Ker so bakteriofagi zelo veliki delci, smo dosegli velik presežek FITC (1:40000), kar je pogoj za ustrezno označevanje. Presežni FITC, ki se ni vezal na bakteriofage smo odstranili z obarjanjem, bakteriofagov s PEG/NaCl (30, 39). Označene bakteriofage smo titrirali in ugotovili, da se je število bakteriofagov po označevanju zmanjšalo (preglednica I). Možnih vzrokov za znižanje titra bakteriofagov je več. Določen delež bakteriofagov se zagotovo izgubi med samim postopkom obarjanja. Zelo verjetno pa označevanje s FITC zmanjša tudi infektivnost bakteriofagov, medtem ko z mikrobiološko titracijo zaznamo samo infektivne. Po označevanju smo s testom ELISA preverili še sposobnost vezave s FITC označenih bakteriofagov na tarčna protitelesa pAb RN. Obstajala je namreč možnost, da bi molekule FITC, vezane v bližini ali na samem peptidu, ovirale vezavo bakteriofaga na tarčo. Iz slike 6 je razvidno, da do tega ni prišlo; vezava FITC označenega bakteriofaga NL8 je bila celo močnejša od neoznačenega. To je najverjetneje posledica prisotnosti s FITC označenih, a neinfektivnih bakteriofagov, ki pa se lahko še vedno vežejo na tarčo. V literaturi smo namreč zasledili podatek, da označevanje s fluorokromi zmanjša viabilnost bakteriofagov (30). Takih

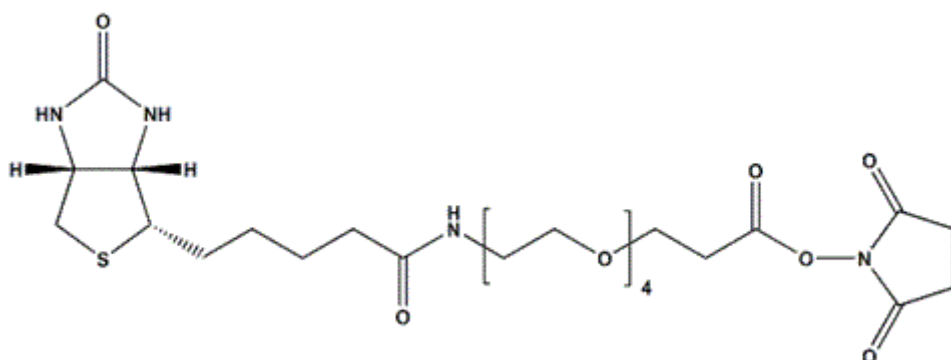
bakteriofagov s titracijo nismo mogli zaznati, zato je bila koncentracija navidezno nižja od dejanske, posledično pa smo v vdolbinico nanegli več označenih kot neoznačenih bakteriofagov.

Nato smo označene bakteriofage vezali na protitelesa in jim izmerili njihovo fluorescenco, da bi ugotovili, ali lahko tudi na tak način zaznamo vezane bakteriofage. Naredili smo dva poskusa (preglednica III). Prvič smo izmerili fluorescenco bakteriofagom v koncentracijskem območju  $10^7$ - $10^9$  pfu/vdolbinico. Izmerjene fluorescence označenih bakteriofagov se niso bistveno razlikovale od fluorescence ozadja, zato smo poskus ponovili v višjem koncentracijskem območju  $5 \times 10^7$  do  $5 \times 10^{10}$  pfu/vdolbinico; največ kar smo lahko dosegli. Prilagodili smo tudi nekatere nastavitve aparature, vendar se rezultati vzorcev in slepih vzorcev niso razlikovali.

S to metodo torej nismo dosegli pričakovanih rezultatov. Najverjetnejši vzrok je prenizka občutljivost metode. Fluorescenco s FITC označenih bakteriofagov smo zaznali le, ko smo v vdolbinico neposredno nanegli 100  $\mu$ L bakteriofagov. V tem primeru je v vdolbinicah veliko označenih bakteriofagov, kar zagotavlja močan signal. Kadar pa bakteriofage vežemo na tarčo, ostanejo v vdolbinici le tisti, ki se pritrdijo na površino, vsi ostali pa se iz vdolbinice sperejo. Pri testu ELISA vezane bakteriofage detektiramo s HRP in reagentom TMB, kjer se signal s časom pomnožuje in lahko samo počakamo dovolj časa, da nastane dovolj obarvanega produkta. Pri fluorescenci pa pomnoževanja signala s časom ni.

Možno je tudi, da uporabljena oprema in/ali nastavitve niso bile primerne za tak način detekcije. Poleg tega bi lahko nespecifična vezava FITC na ozadje zbrisala razlike pozitivnih signalov. Znano je, da se lahko pri nevtralnem pH negativno nabit FITC nespecifično veže na pozitivno nabite površine (40). Vendar v našem primeru to ni verjeten vzrok, saj smo presežni FITC odstranili med obarjanjem bakteriofagov. Rezultat je lahko negativen tudi zaradi neustrezno označenih bakteriofagov. Če se je na bakteriofage vezalo premalo FITC-a, se njihova fluorescenca ne more razlikovati od fluorescence ozadja. Vendar pa smo v našem primeru zaznali fluorescenco, ko smo v vdolbinico mikrotitrške ploščice direktno nanegli NL8-FITC.

## 5.2 Označevanje bakteriofagov z biotinom



Slika 15: NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin (33)

Za označevanje smo kot reagent uporabili NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin (slika 15). Molekula je sestavljena iz biotina, polietilen glikola, ki služi kot hidrofilni distančnik in iz *N*-hidroksisukcinimida (NHS). Hidrofilni PEG distančnik omogoča dobro topnost molekule v vodi, ta lastnost pa se prenese tudi na celotno označeno molekulo. Podobno kot FITC, se tudi NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin veže na aminske skupine na proteinih, pri čemer tvori amidno vez s primarnimi aminskimi skupinami proteinov bakteriofaga, molekula NHS pa se odcepi. Biotinilacija je enostavna, hitra in specifična. Biotin je majhna molekula, zato je malo verjetno, da bi vezava biotina vplivala na funkcijo označene molekule. Več molekul biotina se lahko veže na en sam protein, kar povečuje občutljivost metode. Biotin (vodotopen vitamin B7) se z visoko specifičnostjo veže na streptavidin, pri čemer lahko streptavidin veže do štiri molekule biotina (34).

Kompleks streptavidin-biotin je ena izmed najmočnejših poznanih nekovalentnih interakcij med proteinom in ligandom ( $K_D = 10^{-14} - 10^{-15}$  M) (43). Vez med njima se vzpostavi zelo hitro in je odporna na spremembe pH, temperature, na dodatke denaturacijskih sredstev ali organskih topil. Zaradi teh lastnosti je biotinilacija zelo uporabna tehnika za detekcijo proteinov. Proteine, ki so označeni z biotinom, lahko detektiramo s konjugatom streptavidin-HRP (SA-HRP) na podlagi barvnih reakcij s kromogenimi substrati (enako kot pri testu ELISA).

Postopek označevanja bakteriofagov z biotinom je enostaven. Bakteriofagom smo dodali 12-kratni molarni presežek reagenta in inkubirali, da se je biotin lahko vezal na bakteriofage. Po inkubaciji smo z dializo odstranili presežek biotina.

Ugotovili smo, da označevanje z biotinom ne vpliva bistveno na viabilnost bakteriofagov in da pri postopku biotinilacije ni večjih izgub (preglednica III). Ustreznost biotinilacije bakteriofagov smo potrdili, tako da smo označena bakteriofaga NL8 in 7S1 vezali na streptavidin in detektirali s protitelesi proti bakteriofagom.

Nato smo preizkusili, ali lahko z biotinom označene bakteriofage uporabimo za razlikovanje med bakteriofagi, ki se tarčno molekulo vežejo in tistimi, ki se ne. Na mikrotitrne ploščice smo vezali tarče pAb RN, dodali označena bakteriofaga in vezane bakteriofage detektirali s konjugatom SA-HRP, ki se veže na biotin. Vrednosti absorbanca negativne kontrole se od slepih vzorcev niso bistveno razlikovale, medtem ko je bila absorbanca, biotiniziranih bakteriofagov NL8 bistveno višja (slika 8). Absorbance slepih vrednosti obeh bakteriofagov so bile zelo visoke v primerjavi z ELISO. Kljub temu pa smo še vedno zaznali razliko med vezavo NL8 in negativno kontrolo 7S1. S tem smo potrdili, da je metoda primerna za vrednotenje vezave bakteriofagov.

Dalje nas je zanimalo, kako nizke koncentracije bakteriofagov lahko zaznamo in kakšna koncentracija je najprimernejša za uporabo.

Izmerili smo absorbance vzorcev znotraj koncentracijskega območja  $10^7 - 10^{10}$  pfu/vdolbinico (preglednica V). Najnižja koncentracija bakteriofagov, pri kateri smo lahko zanesljivo potrdili razliko med signalom vezave bakteriofaga NL8 na tarčo in ozadjem, je bila  $10^8$  pfu/vdolbinico. Z naraščanjem koncentracije se absorbance povečujejo, pri čemer razlika signalov narašča do koncentracije  $10^9$ , pri  $10^{10}$  pa se ponovno zniža. Zato sklepamo, da je optimalna koncentracija za vrednotenje vezave  $10^9$  pfu/vdolbinico. Naredili smo tri ponovitve poskusa in ugotovili, da se razlike absorbanca med poskusi razlikujejo (med poskusoma 1 in 2 približno za faktor 2,3). Najverjetnejši vzrok za odstopanje je pomnoževanje in določanje koncentracije bakteriofagov s titracijo, saj smo v vsakem poskusu uporabili nov vzorec bakteriofagov. Ugotovili pa smo, da se razmerja odzivov med posameznimi poskusi ohranijo, zato predlagamo, da se kot merilo za vezavo namesto razlik raje uporablja razmerje izmerjenih absorbanca (slika 10).

### 5.3 Vrednotenje vezave bakteriofaga z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)

Najprej smo pripravili vzorce. V mikrotitrne ploščice smo vezali tarče pAb RN, vdolbinice blokirali s 5 % BSA in nato dodali bakteriofage. Nevezane bakteriofage smo sprali, vezane pa eluirali s kislim pufrom. V mikrocentrifugirke, v katere smo predhodno dodali nevtralizacijski pufar, smo prenesli eluirane bakteriofage in mikrocentrifugirke premešali. Običajno se za določanje koncentracije v eluatih uporablja mikrobiološka titracija, mi pa smo se odločili za qPCR.

qPCR je izpeljanka verižne reakcije s polimerazo, ki omogoča določitev začetne koncentracije nukleinske kisline v vzorcu (31). V našem primeru smo določali koncentracije bakteriofagne

ssDNA (32). Za izvedbo smo potrebovali poleg vzorca DNA, dveh začetnih oligonukleotidov in termostabilne DNA polimeraze še barvilo SYBR Green, ki se veže v novonastale dvovijačne DNA in fluorescira sorazmerno s količino DNA.

Najprej smo pripravili umeritveno premico, pri čemer smo s qPCR izvedli z vzorci s koncentracijami od 0 do  $10^{12}$  pfu/vdolbinico. Ugotovili smo linearni odnos med povprečnim  $C_t$  in logaritmom bakteriofagne DNA v reakciji v območju  $10^4 - 10^9$  pfu/mL (slika 11 A). Najnižja koncentracija, pri kateri smo še opazili odziv, različen od ozadja, je  $10^4$  pfu/mL, kar ustreza 10 kopijam bakteriofagne ssDNA na reakcijo (preglednica IV). Tudi izmerjena absorbanca ozadja je bila dokaj visoka ( $C_t=31,59$ ), čeprav v to vdolbinico nismo dodali bakteriofagov. Najverjetnejši vzrok je kontaminacija osnovne zmesi s sledovi bakteriofagne DNA. V raznih študijah so ugotovili, da Taq DNA polimeraza, ki jo proizvajajo v *E. coli*, vsebuje sledove bakteriofagne in bakterijske DNA (35, 36, 37). Zaradi tega ne moremo zaznati koncentracij bakteriofagov, nižjih od  $10^4$  pfu/mL. Kljub temu pa smo pokazali, da lahko s to metodo razlikujemo med bakteriofagi, ki se na tarčo vežejo in tistimi, ki se ne (slika 12). Primerjali smo vezavo treh različnih fagov na tarčo pAb RN. Razliko med odzivom vzorca in slepo kontrolo zaznamo zgolj pri klonu NL8. Odzivi bakteriofagnih klonov 7S1 in K4 pa se ne razlikujejo od odzivov njihovih slepih kontrol.

Pripravili smo redčitveno vrsto bakteriofagov NL8 v PBS s koncentracijami od 0 do  $10^9$  pfu/mL in izvedli qPCR (preglednica VII in VIII). Zaradi tehničnih težav smo meritve ponovili le dvakrat, vendar so razlike med posameznimi koncentracijami bakteriofagov očitne in v obeh ponovitvah podobne. Ta metoda se je izkazala za še občutljivejšo od biotinizacije, saj smo razlike med kloni zaznali že, ko smo uporabili  $10^7$  bakteriofagov/vdolbinico.

#### 5.4 Primerjava preizkušenih metod

Metoda vrednotenja vezave s FITC označenih bakteriofagov se je izkazala za neustrezno, saj nismo zaznali nobenih razlik med vzorci in slepimi kontrolami.

Z drugima dvema metodama smo potrdili pričakovane rezultate, saj smo z obema uspešno ločili klon z afiniteto do tarče od negativne kontrole.

Označevanje bakteriofagov z biotinom se je izkazalo za razmeroma dolgotrajen postopek, predvsem zaradi čiščenja vzorcev z dializnimi kasetami. V primerjavi z ELISO se postopek podaljša za skoraj en dan, ob upoštevanju dialize, ki poteka čez noč. Z eno dializno kaseto lahko očistimo samo en vzorec, zato lahko nastopijo težave pri primerjavi več različnih bakteriofagov. Temu bi se lahko izognili, če bi namesto dialize za čiščenje uporabili obarjanje bakteriofagov s PEG/NaCl, s čimer bi tudi znižali stroške za dializne kasete in pufre. Kot dodatna

pomanjkljivost se je pokazala visoka nespecifična vezava biotiniziranih bakteriofagov in/ali konjugata SA-HRP na ozadje, kar bi lahko onemogočilo detekcijo bakteriofagov z nižjo afiniteto do tarče. Problem pri delu z biotinom je endogeni biotin, ki je prisoten v nekaterih tkivih in ekstraktih (mleko, jajca, koruza, jetra,...), saj povzroča prevelik signal ozadja in zmanjša specifičnost testov. Enako velja za vzorce, ki vsebujejo proteine, ki vežejo biotin (avidin – jajca, streptavidin – *Streptomyces avidinii*).

qPCR zahteva manj časa, vendar moramo prej še pripraviti vzorce. Celotna metoda tako vzame približno toliko časa kot ELISA. Prednost qPCR je v občutljivosti in dejstvu, da označevanje bakteriofagov ni potrebno. Zaznamo lahko zelo nizke koncentracije bakteriofagov, kar odpravi potrebo po večkratnem pomnoževanju in čiščenju le-teh. Pri qPCR je potrebno izvesti še ločen poskus, v katerem pripravimo umeritveno premico, kar pa kljub vsemu odtehta zamudnost in nenatančnost mikrobiološke titracije v titracijskem določanju deleža vezanih bakteriofagov. Za izvedbo testa potrebujemo drago aparaturo in več dragih reagentov kot pri biotinizaciji. Problem pa lahko predstavlja tudi kontaminacija reagentov.



## 6 SKLEP

Preizkusili smo tri metode, s katerimi bi lahko kvalitativno ovrednotili afiniteto bakteriofagnih klonov do proteinskih tarč, ki imajo same po sebi afiniteto do protiteles. Obstoječe metode namreč zahtevajo dražjo in nadstandardno opremo. Razviti smo želeli metodo, ki je enostavna, cenovno ugodna in ne vključuje uporabe protiteles.

Merjenje fluorescence s FITC označenih bakteriofagov se je izkazalo za neuspešno, saj se izmerjene fluorescence niso razlikovale od ozadja. Metodo smo skušali prilagoditi, vendar nismo dosegli želenega rezultata. Več uspeha smo dosegli z bakteriofagi označenimi z biotinom in z določanjem deleža vezanih bakteriofagov s qPCR. V obeh primerih smo zaznali razliko v vezavi modelnega bakteriofaga in negativne kontrole na tarčna protitelesa. Obe metodi sta razmeroma enostavni, primerni za analizo več vzorcev in dobro ponovljivi. S tem smo tudi dosegli zastavljene cilje raziskovalnega dela.

## 7 LITERATURA

1. Mc Grath S, Van Sinderen D: Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology, Caister Academic Press, Norfolk, 2007.
2. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard K: Introduction to Modern Virology sixth edition, Blackwell Publishing, Malden, 2007.
3. Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farmacevtski vestnik 2008; 59: 129-34.
4. Nelson D: Phage Taxonomy: We Agree to Disagree. Journal of Bacteriology 2004; 21: 7029-31.
5. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB: Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, London, Waltham, San Diego, 2012.
6. Ackermann H-W: Bacteriophage taxonomy. Microbiology Australia 2011; 2: 90-4.
7. Clokie MRJ, Kropinski AM: Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Humana Press, New York, 2009.
8. Bacteriophage M13. Pridobljeno 1.9.2014, s <http://ntmf.mf.wau.nl/cor/m13.htm>.
9. Brown TA: Gene cloning & DNA analysis an introduction, sixth edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2012.
10. Karlsson F: The biology of filamentous phage infection. Doktorska disertacija, Lund: Univerza v Lundu, Oddelek za imunotehnologijo, 2004.
11. Replication of M13 phage DNA. Pridobljeno 10.9.2014, s [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Prokaryotic\\_DNA\\_Replication12-Replication\\_of\\_M13\\_Phage\\_DNA.htm](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Prokaryotic_DNA_Replication12-Replication_of_M13_Phage_DNA.htm)
12. Russel M, Lowman HB, Clackson T: Introduction to phage biology and phage display. Pridobljeno 6.10.2014, s [http://129.70.32.113/km/lehre/kurs/Genkurs\\_2009/Russel%20Lowman%20Clackson%20Phage%20Display%20Practical%20Approach%202004.pdf](http://129.70.32.113/km/lehre/kurs/Genkurs_2009/Russel%20Lowman%20Clackson%20Phage%20Display%20Practical%20Approach%202004.pdf)
13. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. Chem. Rev. 1997;97(2):391-410.

14. Phage Display technology review. Pridobljeno 10.9.2014 s <http://phagedisplay.net/>
15. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.™ Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L. Version 1.0 (6/11).
16. Lunder M, Bratkovič T, Anderluh G, Štrukelj B, Kreft S: Affinity Ranking of Phage-Displayed Peptides: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Surface Plasmon Resonance, *Acta chim. Slov.*, 2007; 55: 233-5.
17. Masilo K: Izbor peptidnih ligandov stafilokoknega proteina A iz bakteriofagnih peptidnopredstavitvenih knjižnic. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
18. Vodnik M: Razvoj peptidnih učinkovin za poseganje v delovanje grelina in vpliv estrogenih snovi na njegovo izražanje. Doktorska disertacija. Medicinska fakulteta. Univerza v Ljubljani, 2013.
19. Površinska plazmonska resonanca. Pridobljeno 11.9.2014 s <http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html>.
20. Campbell CT, Kim G: SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials* 2007;28: 2380-90.
21. ) Naidu BR, Ngeow Y-F, Wang L-F, Chan L, Zhi-Jian Yao, Pang T: An immunogenic epitope of *Chlamydia pneumoniae* from a random phage display peptide library is reactive with both monoclonal antibody and patients sera. *Immunology Letters* 1998;62(2):111-115. doi:10.1016/S0165-2478(98)00029-7.
22. Scott JK, Loganathan D, Easley RB, Gong X, Goldstein IJ: A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *PNAS* 1992;89(12):5398-5402. doi:10.1073/pnas.89.12.5398.
23. Vodnik M, Štrukelj B, Lunder M: HWGMWSY, an unanticipated polystyrene binding peptide from random phage display libraries. *Analytical Biochemistry* 2012;424(2):83-86. doi:10.1016/j.ab.2012.02.013.
24. Milev S: Isothermal titration calorimetry: Principles and experimental design. Pridobljeno 15.10.2014, s [http://bcmp.med.harvard.edu/sites/bcmp.med.harvard.edu/files/facilities/ITC200%20training\\_pdf.pdf](http://bcmp.med.harvard.edu/sites/bcmp.med.harvard.edu/files/facilities/ITC200%20training_pdf.pdf)

25. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. Pridobljeno 15.10.2014, s <http://strubi.uni-graz.at/teaching/keller/ITC.pdf>
26. Soykut EA, Dudak FC, Boyacı İH: Selection of staphylococcal enterotoxin B (SEB)-binding peptide using phage display technology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;370(1):104-108. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.065.
27. Scholle MD, Collart FR, Kay BK: In vivo biotinylated proteins as targets for phage-display selection experiments. *Protein Expression and Purification* 2004;37(1):243-252. doi:10.1016/j.pep.2004.05.012.
28. Kelley BD, Booth J, Tannatt M, et al.: Isolation of a peptide ligand for affinity purification of factor VIII using phage display. *Journal of Chromatography A* 2004;1038(1–2):121-130. doi:10.1016/j.chroma.2004.03.041.
29. Fluorescein isothiocyanate. Pridobljeno 5.10.2014, s [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/f7250pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f7250pis.pdf)
30. Kelly KA, Waterman P, Weissleder R: In Vivo Imaging of Molecularly Targeted Phage. *Neoplasia* 2006;8(12):1011-1018. doi:10.1593/neo.06610.
31. Hunt M: Real time PCR. Pridobljeno 1.9.2014, s <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.
32. Brammer LA, Bolduc B, Kass JL, Felice KM, Noren CJ, Hall MF: A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site. *Analytical Biochemistry*, 2007; 373: 88 – 98.
33. Biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS. Pridobljeno 8.10.2014, s [http://www.chempep.com/ChemPep\\_Products\\_PEGylation\\_Reagents.php?id=271611.htm](http://www.chempep.com/ChemPep_Products_PEGylation_Reagents.php?id=271611.htm)
34. Kontermann R, Dübel S: *Antibody Engineering*. Volume 1, Springer Heidelberg Dordrecht, London, New York, 2010.
35. Ehricht R, Hotzel H, Sachse K, Slickers P: Residual DNA in thermostable DNA polymerases – a cause of irritation in diagnostic PCR and microarray assays. *Biologicals* 2007; 35(2): 145-7.

36. Newsome T, Li BJ, Zou N, Lo SC: Presence of bacterial Phage-Like DNA Sequences in Commercial Taq DNA Polymerase Reagents. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 2264-7.
37. Rueckert A, Morgan HW: Removal of contaminating DNA from polymerase chain reaction using ethidium monoazide. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 68: 596-600.
38. Dudak FC, Boyaci IH, Orner BP: The Discovery of Small-Molecule Mimicking Peptides through Phage Display. *Molecules* 2011;16: 774-89.
39. Shoyer ML: Bacterial Detection Using Phage Display for the Differentiation of Pre- and Post- infection Bacteriophages: A Model M13. Doktorska disertacija. Univerza Purdue. West Lafayette, 2006.
40. Fluorescein Isothiocyanate. Pridobljeno 5.10.2014, s: [http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/\(webtds2\)/100276](http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/(webtds2)/100276)
41. Freyer MW, Lewis EA: Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology* 2006; 84: 79-113.
42. Phage Capture Assay: Micropanning. Pridobljeno 7.9.2014, s <http://www.koko.gov.my/CocoaBioTech/Phage%20display18.html>.
43. Barat B, Wu AM: Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. *Biomolecular Engineering* 2007; 24(3): 283-91.