

פיתוח משטחי זהב ייחודיים קושרי ברוצלה כבסיס לפיתוח ביוסנסורים לניטור וזיהוי חיידקי ברוצלה בחלב בקר וצאן

חוקרים:

פרופ' צביקה חיוקה, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה.

דר' שלמה בלום, המכון הוטרינרי, בית דגן.

תקציר מדעי

ברוצלוזיס היא מחלה זואונוטית הנפוצה באזורים רבים בעולם כמו גם בישראל וגורמת לנזקים כלכליים משמעותיים במשק הבקר והצאן. המחלה נגרמת על ידי חיידק תוך תאי מהסוג ברוצלה. קיימים מספר מינים של ברוצלה המסווגים על-פי המאכסן הטבעי כך ש- *Brucella abortus* מותאם לבקר בעוד ש- *Brucella melitensis* מותאם לצאן, כאשר ישראל היא אנדמית לחיידקי *B. melitensis*. בעקבות הנגיעות בצאן, המחלה מועברת גם לרפתות וגורמת לנזקים כלכליים משמעותיים. ואכן, בשנים האחרונות ישנן התפרצויות של המחלה גם ברפתות שלרוב מתגלות לאחר גל הפלות, שלב בו המחלה כבר נמצאת במצב מתקדם. לכן, הדרך הטובה ביותר למנוע את התפשטות המחלה היא לזהות אותה בשלבים המוקדמים ולא עם הופעת גל ההפלות המעיד על התפשטות והתבססות המחלה בעדר\רפת. המערך הסרולוגי של השירותים הוטרינריים מבצע בדיקות סרולוגיות לברוצלה בדוגמאות סרום המגיעות מהמשקים השונים בישראל הן בשגרה והן כמענה למקרים של התפרצות המחלה. משך הבדיקה הסרולוגית, החל משלב הדיגום ועד לזיהוי חיובי מוחלט הינו יחסית ארוך ולעיתים, לאור העומס הבלתי צפוי והצורך במענה מיידי, נדרש פתרון מהיר וזמין יותר כהשלמה למערך הבדיקות הנוכחי. כלי בעל פוטנציאל גדול להשגת מטרה זו, הוא פיתוח של ביוסנסורים מהירים יעילים ומדויקים. שימוש בביוסנסורים מאפשר לזהות פתוגנים בסביבתם הטבעית וחוסך זמן ומאמץ בזיהוי מכיוון שהתהליך לא מצריך שימוש בשיטות הזריעה המסורתיות שגורמת לבזבז זמן יקר בגידול וזיהוי חיידקים. בספרות, דיווחו על מערכות ביוסנסורים שונות שמשמשות בנוגדנים^{1,2} ובלקטינים³ כסמנים ביולוגיים. עם זאת, לנוגדנים וגליקופורוטיאנים יש מספר חסרונות בזיהוי חיידקים לדוגמה תגובה צולבת הגורמת לזיהוי מוטעה והליכים מסובכים הקשורים בפיתוח מערכת יציבה לאורך זמן. בניגוד לחלבונים, לפפטידים יש, בנוסף לפעילות ביולוגית, ספציפיות גבוהה, רעילות נמוכה ויציבות

¹ Massad-Ivanir N, Shtenberg G, Raz N, Gazenbeek C, Budding D, Bos MP, Segal E. "Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry". Sci Rep. 2016, 6, 38099.

² Byrne B1, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R., Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins, Sensors 2009; 9(6) 4407-45.

³ Baozhen Wang 1,2 and Jun-ichi Anzai, Recent Progress in Lectin-Based Biosensors, Materials 2015, 8(12), 8590-8607.

גדולה לאורך זמן ביחס לחלבונים. פפטידים קצרים משמשים ככלי מצוין לחקר אינטראקציות ביולוגיות כיוון שניתן לסנתז אותם בקלות יחסית, לבצע בהם שינויים כימיים מגוונים ובעזרתם ניתן להתמקד באינטראקציות ספציפיות ולכן סינתזת פפטידים קצרים כבר צוברת חשיבות בזיהוי חיידקים.⁴ **במחקר הנוכחי גילינו פפטידים קצרים הקושרים באופן סלקטיבי את חיידקי הברוצלה בעזרת שיטת הפאג' דיספליי.** פפטידים אלו סונתזו והוצמדו למשטחי זהב ייחודיים ונצפתה יעילות גבוה בקישור של חיידקי הברוצלה בהשוואה לחיידק הביקורת אי קולי. ממצאים אלו חשובים מאוד ויהוו את הבסיס לשיפור הפפטידים האלו על מנת שחיידקי הברוצלה ייקשרו באפיונות גבוה יותר. על סמך ידע זה ייבנה בעתיד ביוסנסור אלקטרוכימי שישמש כגלאי לזיהוי וניטור חיידקי הברוצלה בחלב בארץ ובעולם.

מבוא תיאור הבעיה

ברוצלה וברוצלוזיס - ברוצלוזיס היא מחלה זואונוטית הנפוצה באזורים רבים בעולם כמו גם בישראל. המחלה נגרמת על ידי חיידק תוך תאי מהסוג ברוצלה. לחיידק זיקה למערכת הרבייה במאכסן ולכן נחשב לגורם הפלות בבקר וצאן בשליש השלישי להריון. קיימים מספר מיני ברוצלה כאשר כל מין מיוחד למאכסן הטבעי שלו, *Brucella abortus* נפוץ בעיקר בבקר בעוד ש- *Brucella melitensis* נפוץ בעיקר בצאן. בעקבות הנגיעות בצאן, המחלה מועברת גם לרפתות וגורמת לנזקים כלכליים משמעותיים. בני אדם נדבקים במחלה בעיקר ממגע ישיר עם חומרים מזוהמים, בעלי חיים נגועים או מצריכה של מוצרי חלב לא מפוסטרים. בעקבות הנגיעות בצאן קיים סיכון להעברת והתרחבות המחלה גם לבקר, ואכן, ישנן התפרצויות ברוצלוזיס ברפתות (הדבקה ב- *Brucella melitensis*), דבר שגורם לנזקים כלכליים משמעותיים. אחת הדרכים היעילות ביותר למניעת התפשטות ברוצלוזיס בבקר ובצאן הנה חיסון בתרכיב המקנה לבקר ולצאן בעיקר עמידות מפני הפלות אך פחות יעיל בהגנה מחדירת החיידק למאכסן והדבקותו. אבחון סרולוגי של מחלת הברוצלוזיס בשלבים מוקדמים, לפני התרחשות ההפלה, הינה חיונית מאד מכיוון שהנפל, השליה, ורקמות העובר והנוזלים מכילים כמויות עצומות של החיידק, מה שיגרום להדבקה המונית בעדר/רפת ויחייב השמדה של בע"ח.

גישות אבחון המחלה - ישנן שתי גישות עיקריות לאבחון מחלת הברוצלוזיס. האחת, בידוד החיידק ואפיונו, והשנייה, בדיקת סרום למציאת נוגדנים סגוליים כנגד החיידק. הגישה הראשונה מהווה אֶבֶן פֶּתֶן - gold standard ומהווה אימות לקיום החיידק מחולל המחלה. שיטה זו מוגבלת בהיקפה בהיותה תלויה בבדיקת הפרט היחיד ומשום שהיא נמשכת זמן רב, לעיתים עד מספר שבועות. בנוסף, קיים קושי לבידוד החיידק בחלב בעקבות נוכחותם של חיידקים אחרים בחלב, הגדלים מהר יותר מברוצלה, מזהמים את צלחות

⁴ a) Disney, M. D. & Seeberger, P. H. The Use of Carbohydrate Microarrays to Study Carbohydrate-Cell Interactions and to Detect Pathogens. *Chemistry & Biology*, **2004**, 11, 1701-1707. b) Blixt, O., Hoffmann, J., Svenson, S. & Norberg, T. Pathogen specific carbohydrate antigen microarrays: a chip for detection of Salmonella O-antigen specific antibodies. *Glycoconjugate Journal*, **2008**, 25, 27-36. c) Adams, E. W. et al. Oligosaccharide and glycoprotein Microarrays as tools in HIV glycobiology: Glycan-dependent gp120/protein interactions. *Chemistry & Biology*, **2004**, 11, 875-881.

הגידול ובכך מונעים את צמיחת חיידקי הברוצלה. לכן, יש צורך בפיתוח כלים יעילים, מהירים וספציפיים, שיאפשרו את זיהוי חיידקי הברוצלה בחלב.

פפטידים לשימוש בפיתוח ביוסנסור – פפטידים משמשים ככלי מצוין לחקור אינטראקציות בין חלבונים כיוון שהם קלים לסינתזה, קלים לשינויים כימיים ומאפשרים להתמקד באתרי אינטראקציה ספציפיים. לפפטידים יש פעילות ביולוגית וספציפיות גבוהה וגם רעילות נמוכה. בנוסף, פפטידים בעלי מבנים שלישוניים ניתן לקיבוע קוולנטי על גבי משטחים, ולכן הם אידיאליים לשימוש בפיתוח ביוסנסור. תצוגת פאג' (phage-display) משמשת ככלי חשוב לסריקה וזיהוי של פפטידים שייקשרו לפני השטח של החיידק⁵. התהליך הזה יכול לאפשר בחירה של פפטיד מתוך ספרייה גדולה מאוד של פפטידים המתבטאים על פני הפאג'ים.

משטחי זהב משמשים כאלקטרודות בביוסנסורים רבים. קיבוע של פפטידים על גבי זהב נעשה על ידי תגובה ספונטנית פשוטה של תיול עם זהב ליצירת קשר סמי-קוולנטי. לאחר הספיחה הפפטידים מתארגנים לשכבה מסודרת על גבי המשטח בתהליך הנקרא Self assembly monolayer היוצר שכבת פפטיד פעילה המכסה את פני השטח⁶. תכונת המוליכות של הזהב מאפשרת את השימוש בו לפברקציה של אלקטרודות ולזיהוי חשמלי של האנליט הנקשר לשכבת הפפטיד⁷. סריקת הקישור של חיידקי הברוצלה למגוון רחב של פפטידים, תספק תבנית ייחודית לזיהוי חיידק הברוצלה⁸.

מטרות המחקר

טיפול בזיהומים חיידקיים שונים הפך להיות אחד הדאגות הגדולות בבריאות האדם ובעלי החיים במהלך העשורים האחרונים. העמידות ההולכת וגואה לאנטיביוטיקות שונות נגרם בין היתר ממתן אנטיביוטיקה לא מתאימה. אבחון יעיל רגיש וסלקטיבי של סוג החיידק יאפשר טיפול יעיל כנגדם וימזער את פיתוח עמידות החיידקים לאנטיביוטיקות. במחקר המוצע, נפתח אסטרטגיה שתאפשר סנתזה וגילוי פפטידים שקושרים את חיידק הברוצלה. המחקר המוצע, צפוי לשפר מאוד את הסלקטיביות והספציפיות הדרושות לזיהוי של חיידק הברוצלה.

התוכנית שלנו תתמקד בשלוש מטרות ספציפיות:

⁵ E.V. Olsen, I.B. Sorokulova, V.A. Petrenko, I.H. Chen, J.M. Barbaree, V.J. Vodyanoy. "Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of *Salmonella typhimurium*". *Biosens Bioelectron*, **2006**, *21*, 1434–1442.

⁶ Mandler, Daniel, and Shlomit Kraus-Ophir. "Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing." *Journal of Solid State Electrochemistry* *15*:7-8 (2011): 1535.

⁷ Mannoor, Manu S., et al. "Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides." *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*:45 (2010): 19207-19212.

⁸ Otten, L.; Fullam, E.; Gibson, M. I., Discrimination between bacterial species by ratiometric analysis of their carbohydrate binding profile. *Mol Biosyst* **2016**, *12* (2), 341-344.

1. זיהוי פפטיד מספריית פפטידים שייחשפו לפני שטח של חיידקי הברוצלה ואפיון הקישור של הפפטידים הנבחרים לחיידקי הברוצלה.
2. קיבוע הפפטידים למשטחי זהב ייחודיים.
3. אפיון ואופטימיזציה של יכולת הקישור של חיידקי ברוצלה וחיידקי ביקורת למשטחי הזהב בעזרת מיקרוסקופיה פלורסנטית.

תוצאות:

קישור חיידקים לפפטידים המקובעים על גבי משטח

במהלך המחקר הראנו בעזרת מערכת לקישור לא סלקטיבי של חיידקים בה השתמשנו בתערובות פפטידים רנדומאליים אנטי מיקרוביאליים המכילות פפטידים באורך 20 חומצות אמינו המורכבים מפניל אלנין וליזין ברצפים אקראיים (FK)⁹. לתערובות אלו ישנה פעילות אנטימיקרוביאלית יעילה מאוד ומנגנון הפעילות שלהם מתבסס על אינטרקציה אלקטרוסטטית והידרופובית עם ממברנת החיידק. במטרה לפתח פלטפורמה לביוסנסור מיקרוביאלי, לפפטידים הוסף ציסטאין והם עברו ספיחה למשטחי זהב דרך יצירת קשר ספונטאני של תיול-זהב. במטרה לבדוק את יכולת הקישור של ברוצלה להקשר לפפטיד מקובע על משטח, נשלחו דוגמאות של משטחים אלו למעבדת הברוצלה במכון הוטרינרי שם גודלו חיידקי הברוצלה, עברו קיבוע באצטון ונבדק הקישור שלהם למשטחי הזהב המצופים בפפטיד בעזרת מיקרוסקופ פלורסנטי. כפי שניתן לראות בתמונה 1, חיידקי הברוצלה נצמדו למשטח, דבר המעיד על הפוטנציאל לשימוש בשכבת פפטידים המאורגנת על זהב לזיהוי ופיתוח ביוסנסור חיידקי.

⁹ Hayouka, Zvi, et al. "Interplay among subunit identity, subunit proportion, chain length, and stereochemistry in the activity profile of sequence-random peptide mixtures." *Journal of the American Chemical Society* 135.32 (2013): 11748-11751.

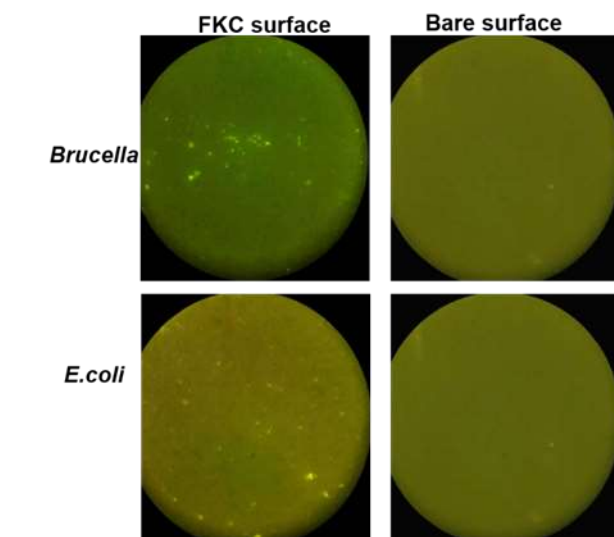


Figure 1: Fluorescence microscopy images of FK-Cys modified Au surfaces after exposure to *Brucella* and *E.coli*. Bacteria were fluorescently stained with DAPI. Images were taken in magnification of X100.

סריקת ספריות פפטידים לקישור פני שטח חיידקי ברוצלה

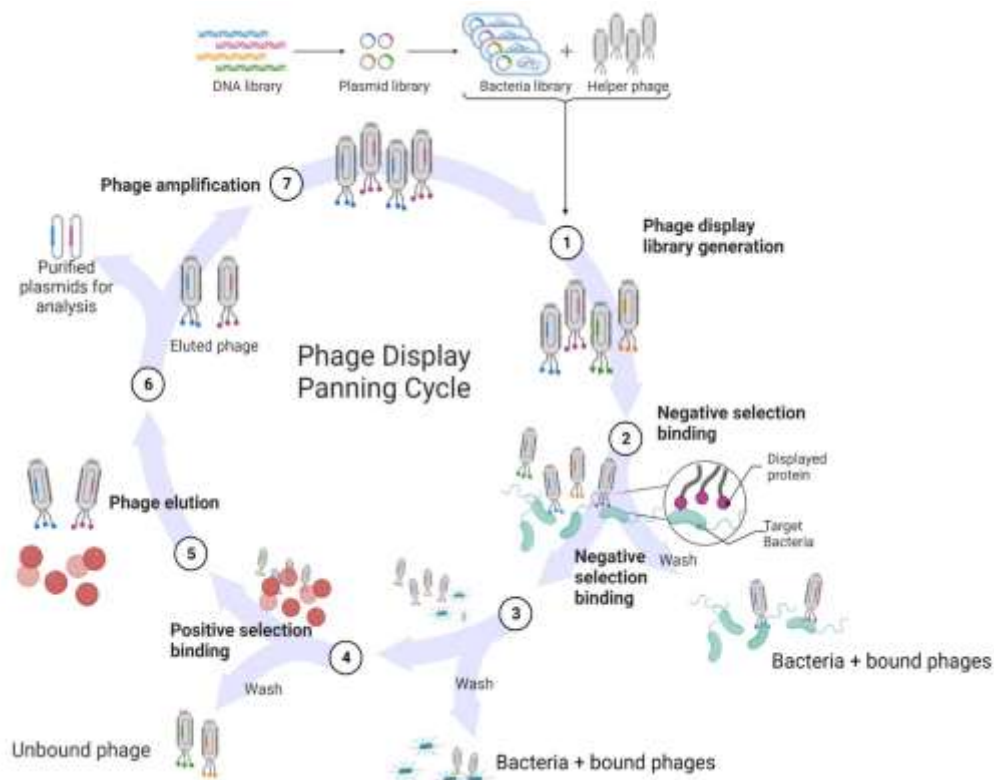
אחרי שהוכחנו את ההיתכנות לרעיון של קשירה של חיידקי הברוצלה על משטחי זהב המצופים פפטידים שמסוגלים לקשור סוגים שונים של חיידקים, השלב הבא מתמקד בסריקת ספריות פפטידים לקישור פני שטח חיידקי ברוצלה על מנת שנוכל לפתח ביוסנסור סלקטיבי שיזהה חיידק ברוצלה בלבד. לאחר מכן סינתזנו את הפפטידים שנמצאו בספרייה וקיבענו את הפפטידים על גבי משטחי זהב ובדקנו את הקישור של חיידקי הברוצלה למשטחים.

לצורך מציאת פפטידים שקושרים חיידקי ברוצלה השתמשנו בתצוגת פאג' (phage display) (איור 2) המקובלת עם מספר מודיפיקציות בכדי לבודד פפטידים קושרי ברוצלה בצורה סלקטיבית. ספריית תצוגת הפאג'ים התקבלה מפרופ' יונתן גרשוני מאוניברסיטת תל אביב והיא שימשה אותנו לסריקה במחקר הנוכחי^{11,10}. הפפטידים אשר הוצגו מבוטאים בחלק-N' טרמינאלי של pVIII. הספרייה מכילה $\sim 10^{13}$ רצפים רנדומליים באורך של בין 6 ל-12 חומצות אמינו, שמתוכם נוכל לגלות את הפפטידים שיקשרו את חיידקי המטרה, חיידק הברוצלה. כפי שמוצג באיור 2, לצורך הגברת ספציפיות הקישור לחיידקי המטרה, חשפנו

¹⁰ Roitburd-Berman A, Dela G, Kaplan G, Lewis GK, Gershoni JM. Allosteric induction of the CD4-bound conformation of HIV-1 Gp120. *Retrovirology*. 2013, 10, 147.

¹¹ Gershoni JM. Molecular decoys: antidotes, therapeutics and immunomodulators. *Curr Opin Biotechnol*. 2008, 19(6), 644-51.

את הספרייה לארבעה חיידקים שונים אשר היוו ברירה שלילית, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ו *Listeria monocytogenes*. כלומר, בכל שלב, חשפנו את הספרייה, או מה שנוותר ממנה לחיידקים שאינם חיידק המטרה, ובכך הוצאנו את הפאג'ים (רצפים) שנקשרו לחיידקים אלו, וצמצמנו את מספר הפאג'ים שייקשרו לחיידק הברוצלה אבל העלינו את הסלקטיביות שלהם. הפאג'ים שנתרו אשר לא קשרו אף אחד מחיידקי הברירה השלילית נשלחו למעבדה של דר' בלום, שם בוצעה החשיפה של הספרייה לחיידקי הברוצלה. הפאג'ים שנקשרו לחיידקי הברוצלה הופרדו מתאי החיידקים על ידי אילוציה בעזרת בופר חומצי (pH=2.2). לאחר ההפרדה, נאספו הפאג'ים, הדוגמה נבדקה לנוכחות של



איור 2: אילוסטרציה של תהליך תצוגת הפאג'. צעד מקדים: החדרת ה-די.אנ.אי לצורך יצירת ספריית הפאג'ים. שלבים 2-3 חשיפת הספרייה ומה שנוותר ממנה אל חיידקי הברירה השלילית, שלב 4 מהווה את הברירה החיובית עם חיידקי הברוצלה, שלב 5-6, אילוציה של הפאג'ים מהחיידקים, שלב 7 הגברת הפאג'ים הרלוונטים.

חיידקי ברוצלה, ונמצאה נקייה על ידי זריעות ונשלחה חזרה למעבדתנו ושם המשיך התהליך. פאג'ים שעברו אילוציה הוגברו בעזרת הדבקה של תאי אי.קולי DH5α+. הפאג'ים מחדירים את המטען הגנטי שלהם לתוך חיידקי האי.קולי, ומנצלים את משאבי התא להתרבות לאחר ההדבקה רק חיידקים אשר נדבקו ישרדו על ידי גן עמידות שמוחדר יחד עם המטען הגנטי של הפאג'ים.

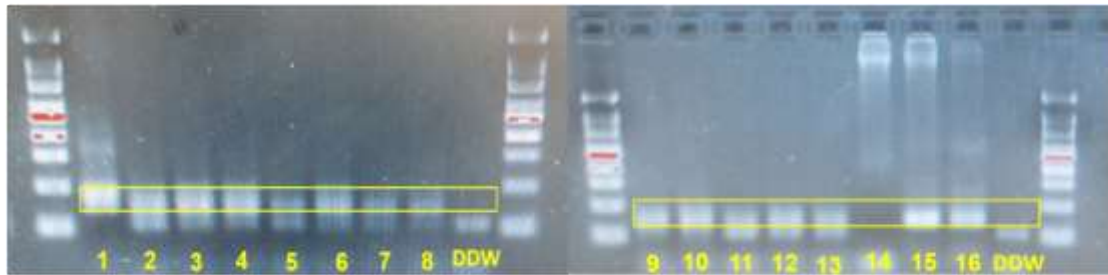
בנוסף לאילוציה של הפאג'ים שנקשרו לחיידקי הברוצלה, אספנו את הפאג'ים שנקשרו גם לחיידקים ששימשו כסלקצייה שלילית. על מנת לרצף את רצפי הפפטידים שמוצגים על גבי הפאג'ים, ביצענו הגברה

של הרצפים מתוך האיזור המקודד להם בגנום הפאג' בעזרת PCR. הרצפים הוגברו ישירות מגנום הפאג'ים עם הפריימרים המוצגים בטבלה מס' 1.

Forward primer	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGAAGGCGGCCAACGTGGC
Revers primer	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGGGTCGGCCCCAGAGGC

טבלה 1 רצפי הפריימרים שהשתמשנו בהם במחקר הנוכחי על מנת לרצף את המקטעים הרלוונטיים בפאג'ים.

בכל דוגמה, רצפי הפפטידים הוגברו והורצו על גבי ג'ל אלקטרופורזה (איור 3). הרצפים בגודל המתאים, באיור 3 המוקפים במלבן צהוב, נחתכו וחולצו מתוך הג'ל בעזרת ערכה למיצוי DNA מתוך ג'ל אגרוז. כל הרצפים, המכילים גם את אלו הנקשרו לחיידקי הסלקציה השלילית וגם אלו שנקשרו לחיידקי הברוצלה נשלחו לריצוף, באוניברסיטה העברית בירושלים. את האנליזה הביואינפורמטית ערכנו עם דר' יובל נבו. השתמשנו בשיטת ה Sequencing Next Generation כך שאנחנו מרצפים מיליוני רצפי פפטידים בכל



איור 3: תוצרי הגברת ה-PCR לאחר הרצה בג'ל אלקטרופורזה. דוגמה 1: ספריית הפאג'ים המקורית. דוגמאות 2-13: הרצפים שנקשרו לחיידקי הברירות השליליות. 14-16: רצפי הברירה החיובית, הרצפים הנקשרו לחיידקי הברוצלה. בתוך המלבנים הצהובים, התוצרים בגדלים התואמים את תוצרי ה-PCR, אלו חולצו מתוך הג'ל ונשלחו לריצוף.

דוגמא וחשוב מאוד להשוות בין הטיפולים השונים והשכיחות בה מופיע רצף מסוים על מנת שנוכל לזהות רצפים קושרי ברוצלה בצורה סלקטיבית. לאחר האנליזה זיהנו 3 רצפים שהראו סלקטיביות טובה לברוצלה לעומת החיידקים האחרים אליה נחשפה ספריית הפאג'ים. תהליך זה דרש אנליזות שונות והשוואות מרובות על מנת למצוא את הדרך הטובה ביותר למציאת הפפטידים הסלקטיביים ביותר. בטבלה 2 ניתן לראות שלוש רצפי פפטידים שזוהו במספר עותקים גבוהה בדוגמאות הברוצלה שרוצפו מתוך תצוגת הפאג', ובמספר עותקים נמוך בדוגמאות הברירה השלילית.

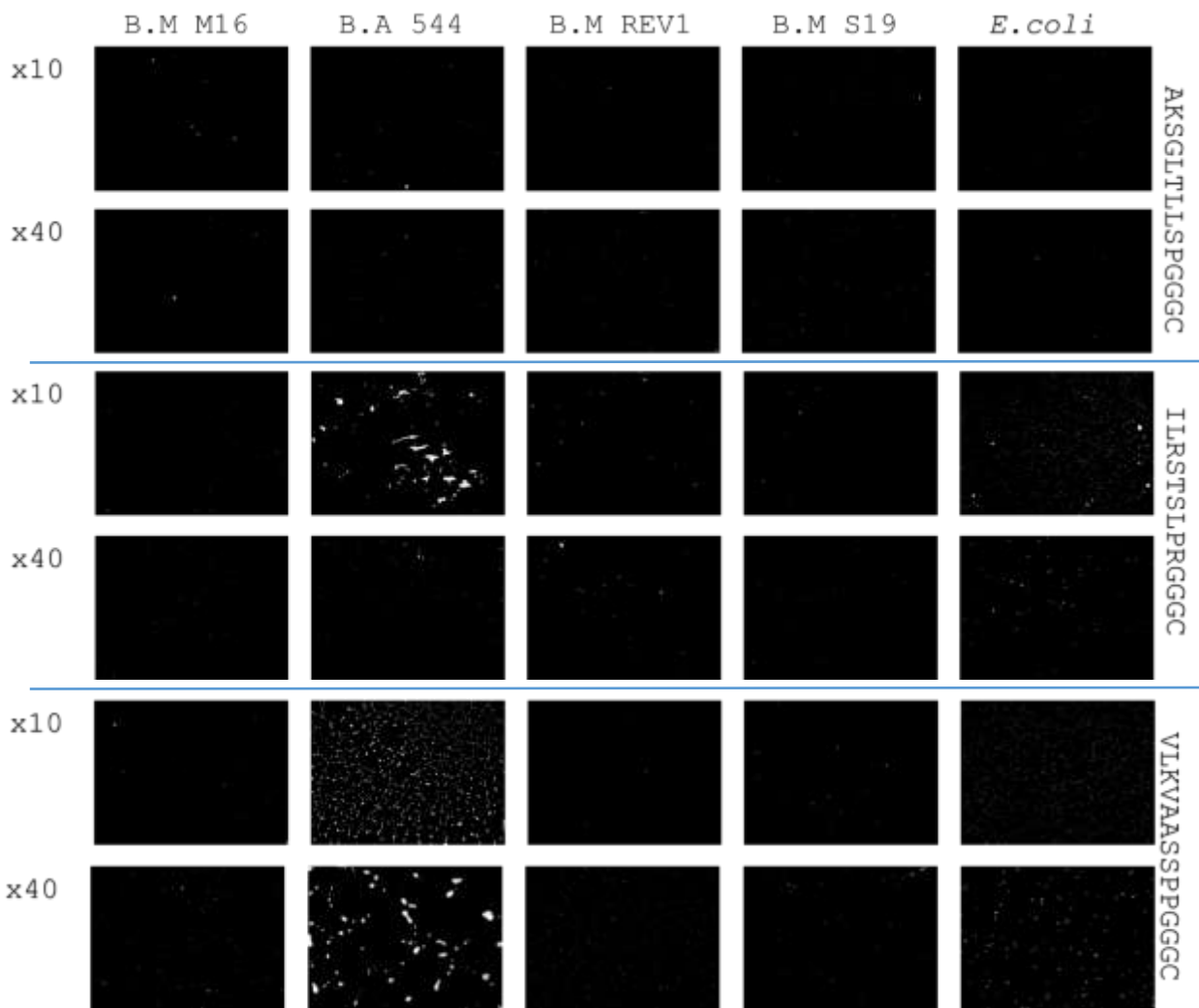
טבלה 2: רצפי הפפטידים שרוצפו וסונטזו מתוך תצוגת הפאג' עם הלינקר GGGC.

No.	Peptide name	sequences
1	AKS	AKSGLTLLSPGGGC
2	ILR	ILRSTSLPRGGGC
3	VLK	VLKVAASSPPGGGC

רצפים אלו סונתזו עם הלינקר GGC על מנת שנוכל לקבע את הפפטידים על משטחי סיליקון המצופים זהב. השייר של החומצה האמינית ציסטאין מכיל גופרית אשר נקשרת באופן קוולנטי למשטח הזהב וכך נוצר משטח זהב המצופה בשכבה של פפטידים.

החלטנו להרחיב את המחקר כדי ללמוד על הקישור של מספר זני ברוצלה למשטחים. ארבעת הזנים של חיידקי ברוצלה היו:

Brucella melitensis 16M (B.M M16), *Brucella abortus* 544 (B.A 544), *Brucella melitensis* REV1 (B.M REV1), *Brucella melitensis* S19 (B.M S19) וזן אחד של אי.קולי כביקורת שלילית *E. coli* RP (*E. coli*).

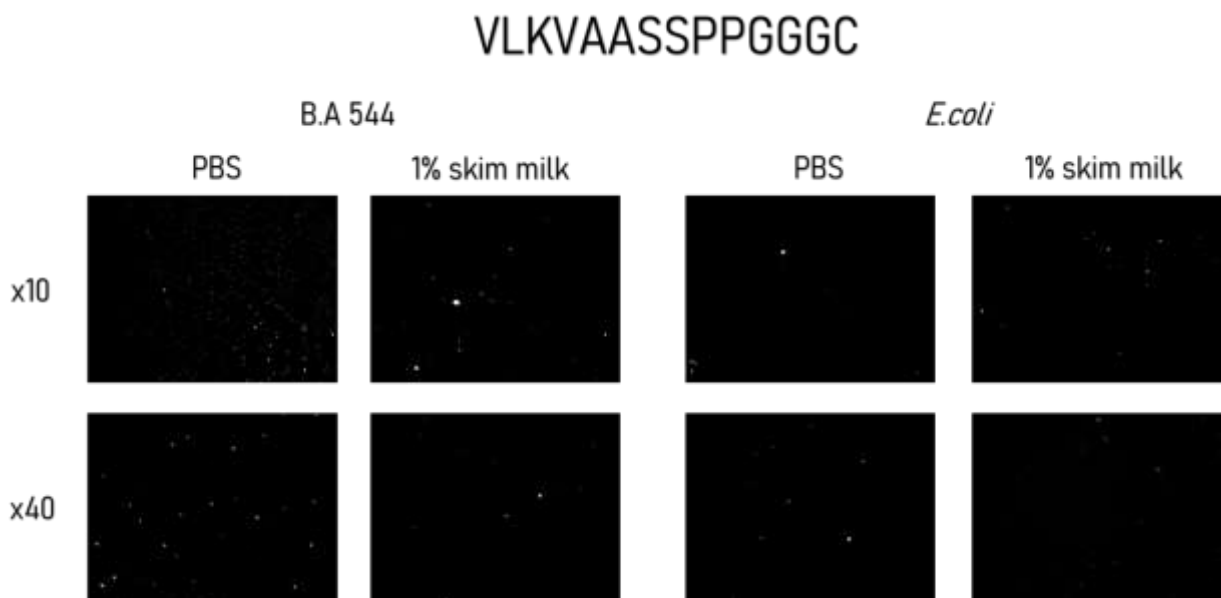


איור 4: מבחן קישור של החיידקים לפפטידים ע"י קיבוע הפפטידים על משטחי זהב: משטחי זהב המצופים ב-5 μ M של הפפטידים השונים (רצפי הפפטידים מצוינים מימין) אשר נחשפו לארבע זני ברוצלה וזן אי.קולי, *Brucella melitensis* 16M (B.M M16), *Brucella abortus* 544 (B.A 544), *Brucella melitensis* REV1 (B.M REV1), *Brucella melitensis* S19 (B.M S19), *Escheria coli* RP (*E. coli*) 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), הושארו באינקובציה של 10 דק' בטמפ' החדר ולאחר מכן נשטפו כל החיידקים שלא נקשרו למשטח. התמונות צולמו ב-EVOS.

אחרי סימון החיידקים בצבען DAPI החיידקים המורחפים ב-PBS (Phosphate-buffered saline) טופטפו על גבי המשטח, ושהו באינקובציה למשך 10 דק' בטמפ' החדר, לאחר מכן, החיידקים שלא נקשרו

למשטח נשטפו החוצה. המשטחים נצפו במיקרוסקופ פלאורסנטי (EVOS) על ערוץ ה-DAPI כך שנוכל לראות את החיידקים המסומנים. התוצאות מוצגות באיור 4.

באיור 4 ניתן לראות שהזן B.A 455 הראה את הקישור הגבוהה ביותר למשטחי ה-ILR ו-VLK לעומת שאר הזנים שהראו מעט קישור למשטחים, בנוסף לאי.קולי שגם הוא הראה קישור נמוך למשטחים השונים. אלו תוצאות מעניינות מאוד ומראות שיש צורך בהמשך המחקר לשיפור הפפטיד וחיזוק הקישור. מעבדתנו מומחית להכנסה של מודיפיקציות כימיות שונות שישפרו את הקישור של הפפטיד VLK שהראה היתכנות טובה מאוד להמשך המחקר. בנוסף מאוד מעניין ההבדל שנצפה בין הזנים השונים של החיידקים, ממצא שמרמז שפני השטח של החיידקים האלו שונה מאוד וזה יהיה מעניין מאוד להמשך המחקר.



איור 5: מבחן קישור של החיידקים לפפטידים ע"י קיבוע הפפטידים על משטחי זהב, השוואה בין חיידקים שהורחפו ב-1% skim milk לבין חיידקים שהורחפו ב-PBS: משטחי זהב המצופים ב-5 μM של הפפטיד VLK אשר נחשפו לזן הברוצלה (*Brucella abortus* 544 (B.A 544) ואי.קולי *Escheria coli* RP (*E. coli*). החיידקים נצבעו ב-4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), הושארו באינקובציה של 10 דק' בטמפ' החדר ולאחר מכן נשטפו כל החיידקים שלא נקשרו למשטח. התמונות צולמו ב-EVOS.

כדי לאתגר את המערכת אף יותר, בחנו את הקישור של זן הברוצלה B.A 455 לעומת ה-אי.קולי למשטחי הפפטיד VLK אשר מורחפים ב-1% Skim milk לעומת חיידקים מורחפים ב-PBS (איור 5) על מנת לדמות את המצב בו נפתח את הביוסנסור במחלבה עצמה ונדגום מהחלב ישירות. כמובן שהדרך לשם עוד ארוכה ויש לבצע אופטימיזציה רבה הן לפפטיד והן למערכת החישה עצמה. כפי שניתן לראות החישה נפגעה מהמצאות של החלב בתמיסה מה שצפינו אבל רק מחזק שיש עוד המשך מחקר להתגבר על המיסוך הזה.

לסיכום- במחקר הנוכחי הראינו את ההתיכנות לפיתוח ביונסוסור לחיידקי הברוצלה. השיתוף פעולה בין המעבדות של חיוקה ובלום איפשר לבצע את המחקר הנוכחי, הרי חיידק הברוצלה הינו חיידק הסגר וניתן

לעבוד איתו רק ב BSL3. השתמשנו בשיטת ה phage display לסרוק ולמצוא פפטידים הקושרים את חיידקי הברוצלה בצורה סלקטיבית. שיטה שפיתחנו במעבדתנו בשנים האחרונות ופיתחנו מספר פפטידים שקושרים חיידקי מטרה שונים. במחקר הנוכחי הראנו את היכולת שלנו לפתח פפטידים קושרי ברוצלה מתוך ספרייה של פאג'ים המכילה מיליוני רצפים שונים. בעזרת שיטת סלקציה שפיתחנו ואנליזה ביואינפורמטית הצלחנו לזהות שלושה רצפי פפטידים שהראו סלקטיביות גבוהה לחיידק הברוצלה ביחס לחיידקי הביקורת. סינתזנו את הרצפים תוך הוספה של לינק GGCC שנועד לאפשר את הקיבוע של הפפטידים על משטחי זהב דרך הציסטאין (C) ושלוש חומות אמיניות גליצין (GGG) שנועדו להרחיק את הפפטיד מהמשטח. לאחר הקיבוע חשפנו את המשטחים לזנים שונים של חיידקי ברוצלה ו אי. קולי כביקורת וראינו שישנו פפטיד אחד VLK שהראה קישור טוב לחיידק *Brucella abortus* 544. תוצאות אלו מחזקות מאוד את הרעיון של פיתוח ביוסנור וכעת שיש את הפפטיד ההתחלתי נדרש מחקר המשך לשפר את הפפטיד תוך ביצוע מודיפיקציות כימיות שונות לשיפור הקישור. כמו כן ישנה אפשרות גם לשפר את הכימיה של הקישור של הפפטיד לפני השטח על ידי הכנסת לינקרים שונים שיכולים מאוד לשפר את הקישור של החיידק למשטח. מעניין היה לראות את ההבדלים בקישור לחיידקים השונים תוצאה אשר מרמזת שפני השטח של החיידקים שונים ומאפשרים קישור שונה של הפפטידים למשטח. בעתיד יהיה מעניין לשפר כימית את הפפטיד ואת הקישור שלו לפני השטח ובנוסף לקבע את הפפטידים על אלקטרודות זהב ולהפוך את הקישור לאות חשמלי על ידי פיתוח ביוסנסורים אלקטרוכימיים שיוכלו להשתלב במערך המחלבות ולספק תוצאות מיידיות על המצאות של ברוצלה בחלב. כמובן שזו מטרה שאפתנית ויש צורך להתגבר על מספר מכשולים כמו המדיום של החלב עצמו שממסך מאוד את האינטראקציה כפי שהראנו (תמונה 5) אך עם שיפור הקישור של החיידקים למשטחים ניתן יהיה להתגבר על הקשיים האלו. לסיכום, במחקר הנוכחי הוכחנו את ההתכנות לפיתוח ביוסנסור לחיידק הברוצלה על ידי תכנון פפטידים קושרי ברוצלה וקיבועם על משטחי זהב עם עבודת המשך ניתן יהיה לשפר את הקישור ולפתח ביוסנסור אלקטרוכימי לזיהוי הקישור והתראה מיידית על המצאות החיידק.

סיכום:

במחקר הנוכחי הראנו את השלבים הראשונים בפיתוח ביוסנסור המסוגל לזהות חיידקי ברוצלה. השתמשנו בשיטת הפאג' דיספליי ואחרי ביסוס השיטה הצלחנו להעשיר את הספרייה בקישור סלקטיבי לחיידק המטרה ברוצלה. אחרי ניתוח ביואינפורמטי ראינו כי ישנם שלושה פפטידים קושרי ברוצלה היכולים לשמש לפיתוח הביוסנסור. סינתזנו את הפפטידים המובילים וקיבענו אותם על משטחי זהב בעזרת הוספת לינקר לפפטיד שמכיל את החומצה האמינית ציסטאין שדרך התיוול שבה ניתן לבצע קישור קוולנטי למשטח זהב. אחרי שייצרנו את משטחי הזהב, חשפנו את המשטחים הללו לחיידקי ברוצלה שעברו אינאקטיבציה בעזרת פיקסציה ובעזרת מיקרוסקופ פלורנסטי יכולנו להבחין בקישור של חיידק הברוצלה *Brucella abortus* (B.A 544) 544 למשטחי הזהב בעוד שהחיידק ביקורת מסוג אי קולי לא הראה קישור בכלל למשטח.

תוצאות אלו מעניינות מאוד ודורשות מחקר המשך על מנת שנוכל לשפר את הקישור לזנים נוספים ולהבין מדוע הקישור שהתקבל הוא מיוחד דווקא לזן הספציפי הזה. למיטב ידיעתנו לא נעשו ניסונות לפיתוח ביוסנסורים סלקטיביים מבוססי פפטידים לחיידקי הברוצלה והתוצאות שהתקבלו מעניינות וחשובות מאוד לתחום. השימוש בביוסנסור בעתיד ברפתות יוכל למנוע זיהומים ומחלות ברפתות ולחסוך נזקים עצומים לענף בארץ ובעולם.

Materials and Methods:

Bacterial strains

Name		Strain	Abbreviation	Gram
<i>Brucella melitensis</i> 16M	<i>B. melitensis</i>	M16	B.M M16	(+)
<i>Brucella melitensis</i> REV1	<i>B. melitensis</i>	REV1	B.M REV1	(+)
<i>Brucella melitensis</i> S19	<i>B. melitensis</i>	S19	B.M S19	(+)
<i>Brucella abortus</i> 544	<i>B. abortus</i>	544	B.A 544	(+)
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	1206	MRSA	(+)
<i>Escherichia coli</i> RP	<i>E. coli</i>	K12	<i>E. coli</i> RP	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 01	<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	PAO1	(-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	0403S	LM	(+)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i>	DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	(-)

Identification of specific *Brucella* binding peptides via phage display

We utilized phage display methodology to screen a randomized phage library for specific bacterial peptide binders. Our phage display libraries include 8, 10, and 12-mer randomized peptide sequences. Initially, the phage library was exposed to four bacteria strains, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* RP, *Pseudomonas aeruginosa* 01 and *Listeria monocytogenes*, used as "negative selection". Phages that did not bind to these negative selection bacteria were then tested against the target bacterial cells, *Brucella*. Phages that bound to *Brucella* were subsequently eluted and amplified using *E. coli* DH5 α . To identify the binding peptide sequences, we extracted phage DNA from both the *Brucella* samples and the negative selection samples and performed next-generation sequencing (NGS). Phages from each step were amplified through selective PCR with Illumina primers and sequenced using NGS.

Bioinformatics analysis was conducted on the sequences, and those showing high abundance in the Brucella samples but low abundance in the negative selection bacteria were selected, synthesized, and purified by HPLC for further investigation.

Peptide synthesis and purification

The selected peptides were synthesized through solid-phase peptide synthesis (SPPS) using a peptide synthesizer (Liberty Blue, CEM, USA). The crude peptides were then dissolved in DMSO and purified by semi-preparative RP-HPLC. To confirm their mass and purity, MALDI-TOF mass spectrometry was employed.

Immobilizing peptides on gold surfaces

Immobilizing the peptides enables us to assess their affinity for bacteria on a surface. We attached the peptides to a gold surface using a thiol-Au bond. Each peptide was synthesized with a Gly-Gly-Gly-Cys linker at the N-terminus to facilitate this bond formation.

Bacterial cells were cultured to a density of approximately 10^8 CFU/mL in Phosphate Buffer Saline (PBS) with or without 1% skim milk. These cells were then stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and incubated on the coated gold surface for 10 minutes. Following incubation, unbound bacterial cells were washed three times with PBS and distilled water (DDW). We then examined the surface with EVOS fluorescence microscopy to evaluate the number of bound bacterial cells. This process allowed us to compare the binding efficacy of various bacterial cells and different immobilized peptides.