

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПРОТЕИНА А ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

Еремец Н.К., Матвеева И.Н., Боро Л.К., Киш Л.К., Самуйленко А.Я.,
Еремец В.И., Попова В.М.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности РАСХН, г. Щелково, Московская обл., Россия

Предложены биотехнологические методы получения активного протеина А золотистого стафилококка.

Актуальность. Белок А встречается у 99 % штаммов золотистого стафилококка и составляет 1,7 % сухого веса клетки и 6,7 % веса клеточной стенки.

Благодаря уникальной биологической активности белка А вступать в селективное взаимодействие с Fc-фрагментами иммуноглобулинов многих видов млекопитающих его широко используют в экспериментальной и клинической иммунологии. При этом Fab-фрагменты антител класса G остаются свободными для реакции с гомологичными антигенными детерминантами.

Белок А применяют для хроматографического выделения бесколочатым способом Ig G непосредственно из сыворотки крови и очистки моноклональных антител, а также в качестве иммуносорбента для приготовления коагулинирующих реагентов и при других исследованиях в реакции непрямого иммунометода, конъюгируя белок А с флуорохромами ферментами, микроносителями.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось использование биореактора АК-210 для глубинного культивирования штамма золотистого стафилококка с последующим выделением биологически активного протеина А. Решали задачи:

— изучить динамику роста бактерий и значения параметров культивирования;

— выделить биологически активный протеин А из биомассы бактерий золотистого стафилококка.

Материалы и методы. В работе использовали два штамма: полевой изолят, любезно предоставленный сотрудниками бактериологической лаборатории Центра Госсанэпиднадзора в Щелковском районе, и метициллинрезистентный штамм А-676, полученный из НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

Для культивирования в биореакторе использовали питательную среду на основе перевара Хоттингера и мясо-пептонный бульон (МПБ). Посевную дозу определяли по оптическому стандарту мутности Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. В процессе культивирования изучали морфологию стафилококка в окрашенных по Грамму мазках, культурально — биохимические свойства — по особенностям роста на желточно-солевом агаре, по способности микроорганизма свертывать кроличью плазму.

Глубинное культивирование штамма проводили в 10-литровом биореакторе АК-210, оснащенных системами автоматического контроля и регулирования основных параметров роста (температура, pH, eH , pO_2).

Клетки золотистого стафилококка инактивировали 10% формалином или прогреванием при 60°C, 70°C и 80°C 30 мин. Динамику роста *S. aureus* изучали с помощью спектрофотометрического анализа с интервалом 1 час по общепринятой методике. Аэрацию осуществляли, начиная со 2 часа культивирования до окончания процесса с расходом воздуха 1,4 л/мин. Биологическую активность белка А определяли в реакции прямого твердофазного ИФА.

Извлечение белка А из клеточной стенки проводили методом солевой экстракции или воздействием ультразвуком.

Результаты. Проведены исследования по усовершенствованию процесса выращивания бактерий стафилококка в биореакторе. Изучена динамика роста бактерий

с использованием оптимизированной питательной среды на основе Хоттингера. Выявлены значения управляющих параметров культивирования pH, еН, концентрация глюкозы, режимы перемешивания. На примере бактерий стафилококка проведены исследования по разработке нового для промышленного производства непрерывного способа культивирования бактерий в биореакторах малых объемов (до 10 л). Этот способ позволяет интенсифицировать процесс в десятки раз по сравнению с периодическим неуправляемым культивированием, существующим в промышленном производстве биопрепаратов. При этом в биореакторе возможно создавать и длительно поддерживать культуры с постоянной и точно определенной концентрацией биомассы, фазой и скоростью роста, что обеспечивает получение стандартных по морфологии и биологической активности культур бактерий. Процесс культивирования стафилококка характеризовался следующими показателями: длительность фазы приспособления 0,5-1,5 часа, длительность фазы логарифмического роста -3,2-4,6 ч., максимальная удельная скорость роста 0,4 -0,7 1/час.

Результаты исследований показали, что максимум биологической активности протеина А при наиболее коротком сроке культивирования отмечали при посевной дозе 50 млн. клеток /мл и скорости перемешивания 100 об/мин, при температуре 37 °С. Конечная концентрация *S.aureus* составляла 1,9 млрд.кл. /см³.

В результате исследований оказалось, что дезинтеграция клеточных суспензий, инаktivированных формалином, на УЗДН-2Т при 22кГц в течение 10 секунд импульсивно 6 раз приводит к тому, что белок А теряет свою биологическую активность. В противоположность этому дезинтеграция клеточных суспензий, инаktivированных прогреванием указанной выше температурой, на УЗДН-2Т при 22 кГц в течение 10 секунд импульсивно 6 раз, позволяло получать биологически активный белок А в достаточных количествах. Извлечение белка А из клеточной стенки бактерий, инаktivированных формалином, методом солевой экстракции позволило получить биологически активный препарат-белок А, но малое количество – всего 10 мкг.

Аффинно-хроматографический метод был использован для одноступенчатой обработки дезинтегрированных ультразвуком клеточных суспензий стафилококка, инаktivированных прогреванием при 60 °С в течение 30 мин., с целью получения белка А. С этой целью применяли колонки, заполненные аффинным сорбентом – иммуноглобулины Ig G крупного рогатого скота, иммобилизованные на BrCN сефарозе-4В. Результаты исследований показали, что происходило полное связывание белка А на сорбенте с фиксированными Ig G крупного рогатого скота. Анализ чистоты выделенного протеина А в ПААГ показал наличие единственной белковой полосы с ММ 42 кД.

Выводы. Таким образом, полученные культуры стафилококка при управляемом культивировании в биореакторе, сохраняли свои культуральные свойства, были типичны по морфологии. Аффинная хроматография на сорбенте с иммобилизованным иммуноглобулином G крупного рогатого скота позволяет получать препараты белка А золотистого стафилококка в гомогенном виде и обладающие высокой биологической активностью в ИФА.

Перспективы дальнейших исследований. При промышленном изготовлении биопрепаратов использование биологически активного белка А золотистого стафилококка позволит сократить сроки изготовления и упростит технологические схемы получения компонентов.

Список литературы

1. Биотехнология : Под ред. Е.С.Воронина.-Санкт-Петербург, ГИОРД, 2005. – С.160.
2. Федоров, Т.В., Бороздина, М.А., Гусев, В.В., Падерин, Ю.П., Суровцев, В.И., Хатюшин, Ю.И., Чупрунов, В.П. Выделение и очистка лизостафина – фермента, разрушающего стафилококки // Тез. Докл. Всерос. научно-практич. Конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». –Шелково. – 2000. – С.318-319.
3. Сюрин, В.Н., Самуйленко, А.Я., Соловьев, Б.В., Фомина, Н.В. Вирусные болезни животных М, ВНИТИБП. – 1998. – с.285.
4. Клюкина, В.И. Промышленные технологии производства тест-систем для диагностики инфекционных болезней свиней: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – 2002. – Шелково. – 50 с.
5. Кузнецов, Д.П. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: диагностика на основе современных методов биотехнологии: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Шелково, 2002. – 40 с.

MODERN BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF RECEPTION AND ESTIMATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A QUALITY

Yeremets N.K., Matveeva I.N., Bero I.L., Kish L.K., Samuylenko A. Ya., Yeremets V.I.

All-Russian Federal Research and Technological Institute of Biological Industry,
Schelkovo, Moscow Region, Russia

Biotechnological methods of reception of active protein A of Staphylococcus aureus have been offered.

УДК 619:615:616.024: 612. 014. 4

ВПЛИВ ВІТАВАКСУ 200 ТА ВІТАВАКСУ 200 ФФ НА ОБМІН АЗОТИСТИХ І ФОСФОРНИХ СПОЛУК У ТКАНИНАХ КУРЧАТ

Жукова І.О.

Харківська державна зооветеринарна академія

У роботі наведені дані про вплив комбінованих протруйників насіння Вітаваксу 200 і Вітаваксу 200 ФФ на обмін азотистих і фосфорних сполук у тканинах курчат при тривалому експерименті. Встановлено, що Вітавакс 200 гальмує синтез білка, ДНК і РНК та стимулює синтез фосфатидів у печінці курчат і не впливає на ці процеси у м'язах, а Вітавакс 200 ФФ не має негативного впливу на синтез цих компонентів у тканинах птиці.

Біосинтез білків у тканинах залежить від багатьох обставин і, в першу чергу, від повного набору амінокислот, стану ферментної системи і наявності стимуляторів або інгібіторів реакції синтезу. До таких речовин відносять: різноманітні ксенобіотики, в тому числі і пестициди.

Протруйники насіння Вітавакс 200 і Вітавакс 200 ФФ належать до комбінованих речовин і складаються з Вітаваксу (карбоксину) і ТМТД (тіураму, тетраметилтіурамдисульфід) у різних співвідношеннях (37,5:37,5 і 20,0:20,0 відповідно). Їх використовують для протруєння насіння сільськогосподарських і декоративних рослин перед посівом. Ці пестициди на останньому етапі метаболізму розкладаються до сірковміщуючих речовин: вітавакс — до 2-вінілсульфоніл ацетаніліду, 2(2-гідроксиетил-сульфоніл) ацетату, амінофенолу і нітриту [1, 2, 3]; ТМТД — до тетраметилсечовини, диметиламіної солі карбамінової кислоти, сірковуглеця та елементарної сірки [4].

Основною метою роботи було визначення впливу складників комбінованих препаратів Вітаваксу 200 і Вітаваксу 200 ФФ на обмін азотистих і фосфорних сполук у тканинах курчат при тривалому експерименті.

Матеріали і методи. Дослід проводили на курчатах породи хайсекс коричневий. Для комплектації було відібрано 3 групи курчат добового віку по 30 голів у кожній: 2 піддослідні (n=60) і 1 контрольну (n=30). Птицю годували й утримували за двома раціонами: перший до 40-добового віку, а другий від 40 добового і до кінця досліду (90 діб).

Першій піддослідній групі (І) до корму додавали Вітавакс 200, другій (ІІ) — Вітавакс 200 ФФ в однаковій дозі — 1 мг/кг корму. Контрольна група одержувала корм без додавання препарату.

Об'єктами біохімічних досліджень слугували печінка та грудні м'язи, які аналізувалися у 30-добовому і 90-добовому віці.

У тканинах визначали вміст білкового та небілкового азоту фотоколориметричним методом з реактивом Несслера, сумарний вміст нуклеїнових кислот за фосфором [5] та концентрацію фосфоліпідів за фосфором за допомогою ФЕК-М [5, 6].

У кожній групі та серії дослідів використовували по 6 голів птиці, всі аналізи дублювались, отримані результати оброблялись статистично.

Результати досліджень. Проведений дослід показав, що маса курчат І піддослідної групи на 30-ту і 90-ту добу була на 4,9 % ($P<0,1$) і 12,0 % ($P<0,1$) вищою, ніж контрольної групи, а курчат ІІ піддослідної групи — на 15,3 % ($P<0,05$) та 28,8 % ($P<0,05$),