

УДК 619:578

ПОЛУЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ АНТИГЕНОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор,
Хлынов Дмитрий Николаевич, ассистент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»
Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии
432063, г.Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1. Тел.:8(84663)56-78-94
e-mail: dmitriy_khlynov@mail.ru

Ключевые слова: *листерия, бактериальная масса, дезинтеграт, дезинтеграция, антиген, биопрепарат, фракционирование, фракция цитоплазмы, препарат клеточной стенки.*

Разработана схема получения различных типов антигенных препаратов. Лучшим способом разрушения бактериальной суспензии оказался метод ультразвуковой дезинтеграции. Подобраны оптимальные параметры дезинтегрирования, разработана схема фракционирования дезинтеграта для получения фракции цитоплазмы и препарата клеточной стенки.

Большое разнообразие методов и аппаратов, применяемых для физической дезинтеграции микроорганизмов, позволяет решить проблему выбора адекватного способа разрушения клеток при решении конкретных экспериментальных задач. Решающий критерий выбора обусловлен тем, что механические свойства микроорганизмов, определяемые главным образом прочностными характеристиками стенки клеток бактерий, варьируют в широких пределах.

Перед нами стояла задача получить разные по структурным компонентам типы листериозного антигена:

- *дезинтеграт листерий;*
- *препарат клеточной стенки;*
- *препарат фракции цитоплазмы.*

Полученные антигенные препараты мы планируем использовать в дальнейшем изучении их возможности применения в

иммуноферментном анализе.

Ключевым пунктом в решении этого вопроса является дезинтеграция микробных тел. Известно, что при этом процессе изменяются свойства, а следовательно, теряется часть той информации, которую несёт в себе микроорганизм. Поэтому необходимо было провести весь комплекс экспериментов таким образом, чтобы свести к минимуму изменения сохранившихся морфологических структур и их биологических свойств.

Тест-объектами в проводимых опытах служили клетки *Listeria monocytogenes*. В качестве критериев для оценки гомогенатов были использованы показатели:

- 1) количество разрушенных клеток;
- 2) однородность антигенного препарата;
- 3) стерильность полученного гомогената.

Наработку бактериальной массы *Listeria monocytogenes* проводили на мясопептонном агаре с 1% глюкозы и 1% глицерина. 24-часовую бульонную культуру по 5 см³ с примерной концентрацией 1×10⁶ м. т/см³ вносили в матрас с питательной средой, расплодочный материал равномерно распределяли по поверхности агара путем покачивания матраса, оставляли при комнатной температуре на 15 мин., затем матрасы переворачивали агаром вверх и помещали в термостат с температурой 37°C на 24 часа.

Микробиологическую чистоту выращенных культур оценивали визуально по характеру роста и микроскопией мазков, окрашенных по Граму.

Если культура не содержала посторонней микрофлоры, то ее смывали с поверхности агара физиологическим раствором. Полученный смыв культуры листерий центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе и вновь центрифугировали при указанном режиме (отмывание остатков питательной среды). Затем удаляли надосадочную жидкость и осадок ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде при pH 7,2.

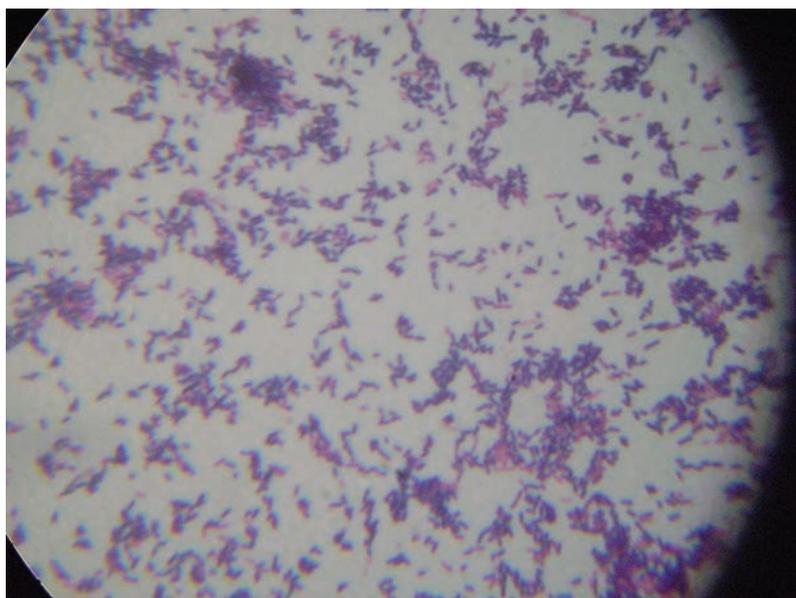


Рис.1. Дезинтеграт клеточной суспензии листерий, полученный по способу Грассе, окраска по Граму. Ув. 7х90.

Далее проводили определение концентрации исходной суспензии с применением стандарта мутности ОСО 42-28-85(10МЕ). Из исходной суспензии готовили рабочие бактериальные взвеси с концентрациями 1 млрд. микр тел в 1 мл.

Согласно литературным данным, наиболее оптимальным вариантом для решения поставленной задачи явилось бы применение криогенного метода дезинтеграции, позволяющего получить клеточные компоненты при минимальной потере их биологических свойств. Одним из методов криогенной дезинтеграции является способ разрушения бактериальных клеток, предложенный Грассе.

Проведённая нами проверка данного способа с целью применения его для собственных исследований показала, что 24-кратное замораживание и оттаивание листериозной культуры не обеспечивает высокого процента разрушения бактериальных клеток.

Это видно на фотографии дезинтеграта листериозной культуры, подвергнутой обработке указанным методом (рис.1).

Увеличение числа манипуляций по замораживанию – оттаиванию не принесло значительного увеличения процента разрушенных клеток.

Выход их был по-прежнему низок (до 20%) и не мог удовлетворить потребность в клеточных компонентах, необходимых для проведения исследований.

Поэтому возникла необходимость перейти к другому способу дезинтеграции, который бы позволил получить больший процент разрушенных клеток, а значит, и больший выход клеточных компонентов.

Одним из таких способов явилась дезинтеграция бактерий с помощью ультразвука.

Метод ультразвуковой дезинтеграции является одним из наиболее широко распространенных. Он позволяет получить

дезинтеграторы, в которых выявляются различные клеточные структуры и широкий спектр антигенов разной химической природы. Устойчивость микроорганизмов к ультразвуковой вибрации различна. Каждый вид требует отработки определенного режима.

При обычной ультразвуковой дезинтеграции микроорганизмов кавитация является основной причиной разрушения клеток. Объясняется это тем, что при возникновении кавитации происходит резкое перераспределение акустической энергии; образующиеся вокруг кавитационных полостей градиенты давления и скорости жидкости

на много порядков выше, чем в исходной акустической волне. При отсутствии же кавитации не происходит нарушения целостности микробной клетки из-за малости её размера (по сравнению с длиной ультразвуковой волны).

Режимы УЗ-дезинтеграции листериозных клеток подбирали в экспериментах. В 14 проведённых опытах варьировали показатели концентрации бактериальной суспензии, время воздействия, амплитуду зонда, способы охлаждения суспензии.

Образцы бактериальной суспензии озвучивали при амплитуде 2 мк, 4 мк, 6 мк, 8 мк, 10 мк, 12 мк, 14 мк. Варьировали временем экспозиции до 20 мин. В течение всего времени из образцов делали мазки и окрашивали их по Граму для фиксации степени разрушения бактериальных клеток в

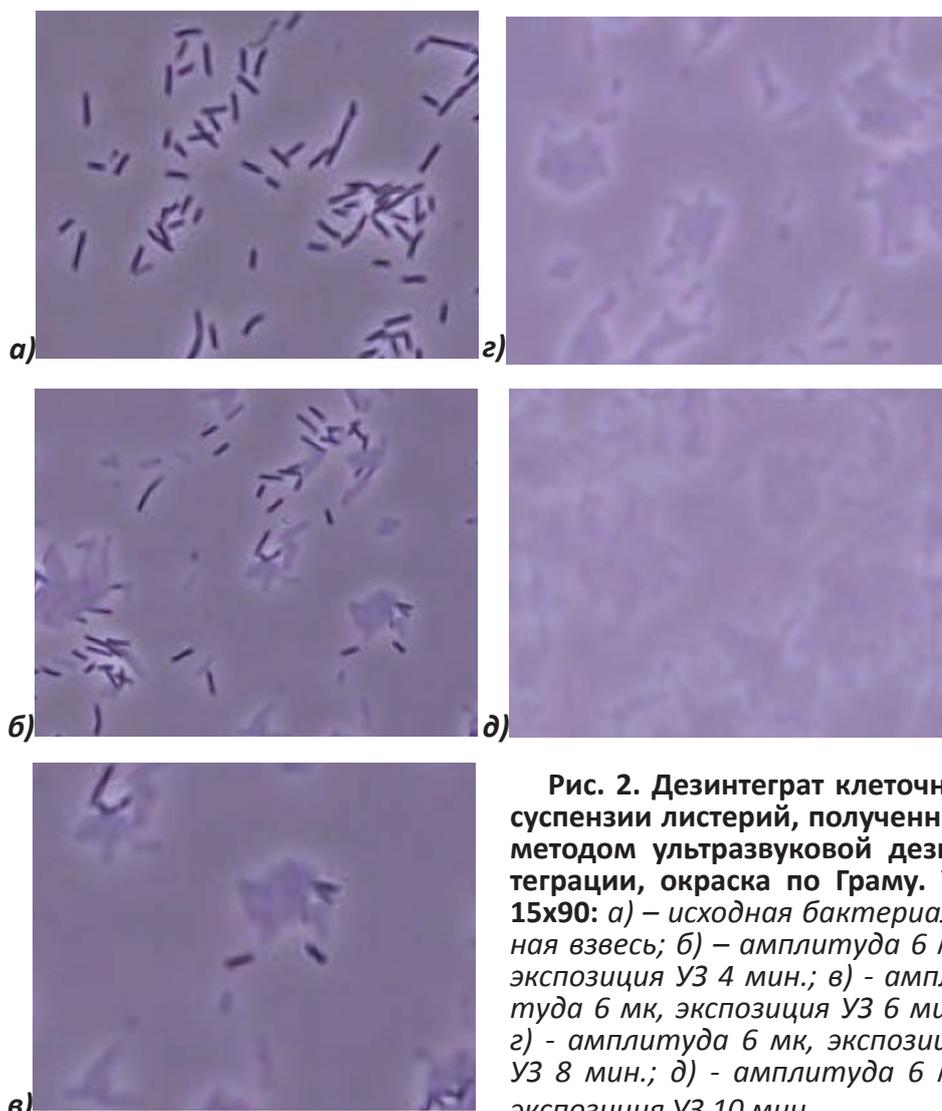
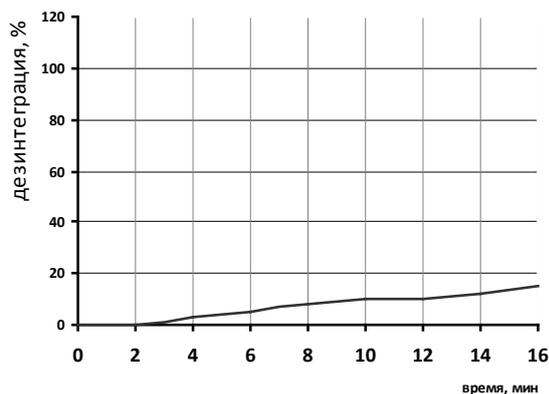


Рис. 2. Дезинтегратор клеточной суспензии листерий, полученный методом ультразвуковой дезинтеграции, окраска по Граму. Ув. 15х90: а) – исходная бактериальная взвесь; б) – амплитуда 6 мк, экспозиция УЗ 4 мин.; в) - амплитуда 6 мк, экспозиция УЗ 6 мин.; г) - амплитуда 6 мк, экспозиция УЗ 8 мин.; д) - амплитуда 6 мк, экспозиция УЗ 10 мин.

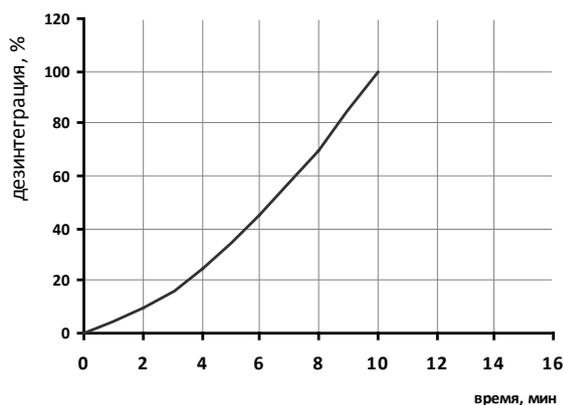
озвучиваемой суспензии (рис.2.).

При озвучивании бактериальной суспензии ультразвуком с амплитудой волны в 8 мк. в течение длительного времени мы не добились высокого процента разрушения бактерий. При воздействии ультразвуком с амплитудой в 12 мк. клетки бактерий разрушались в течение 2 минут, но в связи с быстрым перегревом образца произошла денатурация белка.

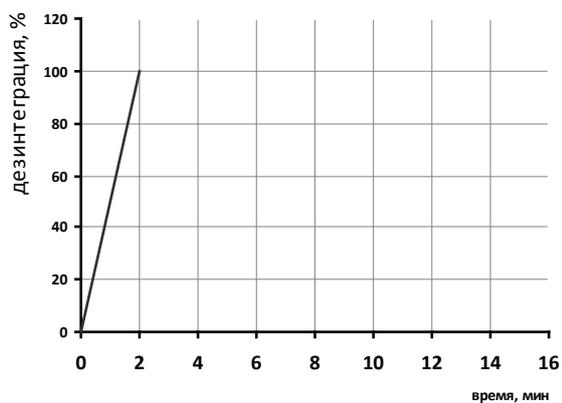
Был определён оптимальный режим разрушения бактериальной клетки (рис. 3.), заключающийся в следующем: бактериальную суспензию концентрацией 1 млрд микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды с рН – 7,2 подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Soniprep 150 фирмы MSE (Англия) с амплитудой зонда - 6



а)



б)



в)

Рис. 3. Графики разрушения бактериальной суспензии с помощью ультразвуковой дезинтеграции. Озвучивание бактериальной суспензии: а) - при амплитуде 2 мк; б) - при амплитуде 6 мк; в) - при амплитуде 12 мк.

мк, экспозицией обработки – 10 мин, объём суспензии – 1 мл.

В качестве охлаждающей смеси стакана дезинтегратора использовали смесь спирта со льдом.

Эффективность разрушения листериозных клеток оценивали по данным световой микроскопии, а также по данным под-

счёта жизнеспособных клеток в исходной и разрушительной клеточной суспензии путём посева их на питательные среды.

Микроскопическое изучение «ультразвуковых» гомогенатов выявило заметное повреждение структур клеток *Listeria monocytogenes*.

Таким образом, мы подобрали оптимальные условия получения дезинтеграта листерий.

Следующим этапом нашей работы, согласно поставленной задаче, явилось фракционирование дезинтеграта для получения изолированного препарата клеточной стенки и однородного препарата фракции цитоплазмы. Данная задача решалась несколькими методами. Проанализировав литературные данные, в основу разработанной нами схемы выделения клеточных компонентов листерий из дезинтегрированной суспензии мы положили принцип дифференциального центрифугирования, предложенный Salton (1964). Этот метод основан на различиях в скорости седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Разделяемый материал центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определённая фракция из дезинтеграта.

В результате шести проведённых опытов были подобраны схема и режимы дифференциального центрифугирования, позволяющие выделять из дезинтеграта листерий чистые и однородные препараты клеточной стенки и фракции цитоплазмы. (Рис.4). В связи с этим следует отметить, что только первоначальное центрифугирование в режиме 2000g проводили в роторе углового типа. Центрифугирование при режиме в 14000 g происходило в роторах с подвесным стаканом типа «Basket». Это было вызвано стремлением избежать так называемого «пристеночного эффекта», характерного для угловых роторов.

Полученные препараты необходимо было проверить на однородность и нативность. Только после этого можно было

с уверенностью сказать, добились мы ожидаемых результатов или нет.

Цитологическое изучение фракций клеточной стенки и цитоплазмы с помощью световой микроскопии подтвердило их однородность. В суспензии клеточной стенки отсутствуют цельные клетки и примеси цитоплазмы. В препаратах фракции цитоплазмы мы не обнаружили обломков клеточных стенок. Однородность клеточной стенки подтверждена результатами спектрофотометрического изучения полученной клеточной структуры.

Спектрографический анализ полученной фракции клеточной стенки показал, что кривые его адсорбированного спектра не имеют пика в ультрафиолетовой части (260-280 нм) (рис.5). Спектр фракции цитоплазмы, в отличие от других клеточных компонентов, имеет пик в пределах волны длиной 260 нм, что связано с присутствием нуклеиновых кислот.

Отсутствие бактериального роста при высеве полученных клеточных компонентов на питательные среды подтверждает факт их стерильности.

Решающим критерием нативности изучаемых клеточных компонентов является сохранение ими биологической активности.

Для определения нативности клеточной стенки была проверена её способность сорбировать на себе специфический листериозный бактериофаг. В опыте использовали препарат клеточной стенки листерий, живые бактерии того же штамма и фаг L2A- первой серогруппы, выделенный И.А.Бакуловым, Н.А.Капыриной (1971). Исходный титр каждого из фагов был равен 10. В качестве контроля использовали живую культуру штамма листерий 1/2а (первая серогруппа). Че-

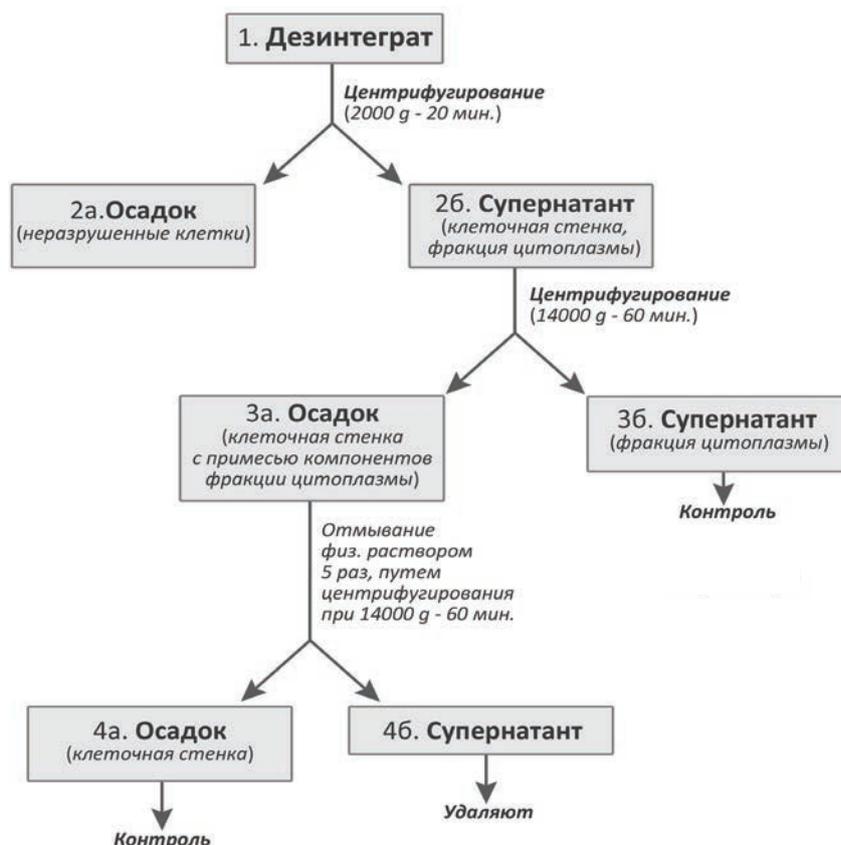


Рис. 4. Схема дифференциального центрифугирования для получения фракции цитоплазмы и клеточных стенок листерий.

рез 24

часа после начала опыта в суспензии клеточной стенки штамма 1/2а фаг 2А в свободном состоянии не был обнаружен. В живой культуре штамма листерий 1/2а титр этого фага повысился на 2 логарифма. Результаты опыта свидетельствуют, что в суспензии клеточной стенки штаммы листерий 1/2а гомологичный фаг L2А адсорбируется на клеточной стенке и не продуцируется. На живой листериозной культуре штамма 1/2а, взятый для контроля, гомологичный фаг L2А продуцируется (повышение титра фага на 2 логарифма).

Этот опыт показывает, что изолированные клеточные стенки, полученные согласно разработанной методике, сохраняют специфические рецепторы фага и являются нативными.

Для определения нативности фракции цитоплазмы была проверена активностью ферментов окислительно-восстановитель-

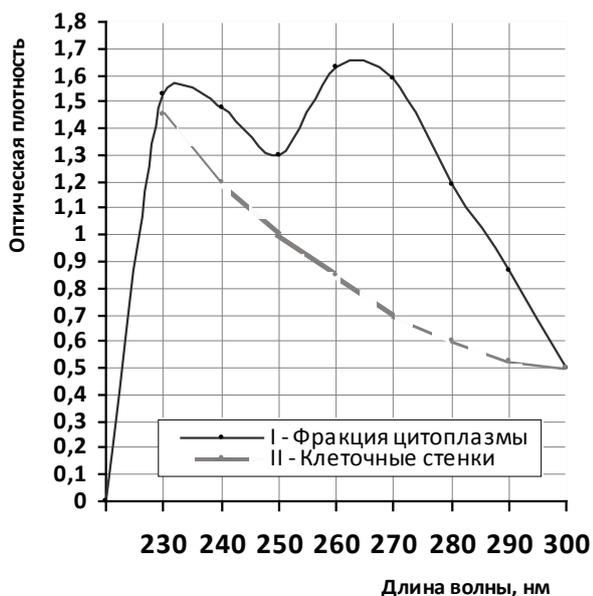


Рис. 5. Спектрограмма препаратов клеточной стенки и фракции цитоплазмы.

ного комплекса и, в частности, каталазы.

Результаты исследований показывают, что активность каталазы у фракции цитоплазмы достаточно высока и в среднем равна 12 мг перекиси водорода на 1 мг белка за одну минуту при активности 10-12 мг перекиси водорода на 1 мг белка за 1 минуту у живых листериозных клеток.

Указанная активность каталазы дает основание утверждать, что нативность цитоплазменного препарата в процессе его получения сохраняется, так как данный фермент не инактивируется.

Таким образом, проведённые экспериментальные исследования позволили разработать методы получения различных типов антигена:

- дезинтеграт;
- препарат клеточной стенки;
- фракция цитоплазмы.

Наработанные по указанным выше методам препараты из листериозной бак-массы в дальнейшем будут использованы при разработке метода иммуноферментного анализа листериоза.

Библиографический список

1. Бакулов И.А., Васильев Д.А. Получение фракции цитоплазмы и клеточных стенок листерий. // «Ветеринария» №3. 1981. с. 34-36
2. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Использование листериозных бактериофагов при диагностике и индикации листерий. В сб. Листериоз на рубеже тысячелетий. Покров, 1999: 64-67.
3. Станиславский Е.С., Жванецкая М.И. Использование методов дезинтеграции в научных исследованиях и производстве бактериальных препаратов. /Дезинтеграция микроорганизмов, Пущино-на-Оке, 1972
4. Paterson I.S. Flagellar antigens of organisms of the genus *Listeria*. J. Path. Bact. 1939, 48:25-32.)
5. Sheehan B., Kocks C., Dramsi S., Gouin E., Klarsfeld A.D., Mengaud J., Cossart P. Molecular and Genetic Determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. 1994., Current Topics in microbiology and immunology., 192: 187-216.
6. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernar G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. 2001. Clin. Microbiol. Rev. 14: 584-640.