

О.В. Громова, И.А. Кузьмиченко, М.Н. Киреев, С.А. Нижегородцев, В.Н. Корсуков

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОТЕОВИБРИНА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)*

Разработана технология выделения комплекса низкомолекулярных ферментов холерного вибриона, относимых к факторам патогенности, из отходов производства холерной вакцины с помощью концентрирующей ультрафильтрации. Данная технология позволяет получать стандартные серии препарата, названного протеовибрином, который свободен от основного иммуногена холерного вибриона — О-антигена и обладает высокой активностью протеазы и фосфолипаз A₂ и C. Показано, что протеовибрин хорошо растворим в воде и 0,14 М растворе NaCl, вызывает образование антител у кролика и токсичен для белых мышей. Является перспективным его дальнейшее исследование и возможное применение в качестве дополнительного источника ферментов холерного вибриона и трипсиноподобного препарата, пригодного для гидролиза белкового сырья при получении микробиологических питательных сред.

Ключевые слова: холерная вакцина, ферменты, протеовибрин, ультрафильтрация

NEW WAY OF ISOLATION OF ENZYME COMPLEX OF CHOLERA VIBRIO – PROTEOVIBRIN BY MEANS OF ULTRAFILTRATION

O.V. Gromova, I.A. Kuz'michenko, M.N. Kireev, S.A. Nizhegorodtsev, V.N. Korsukov

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

The technology of isolation of the cholera vibrio complex of low-molecular enzymes related to pathogenicity factors, from cholera vaccine production wastes by means of concentrating ultrafiltration was developed. This technology allows to obtain standard series of the preparation termed proteovibrin which is free from the basic *Vibrio cholerae* immunogen — O-antigen, and possesses high activity of protease and phospholipases A₂ and C. It is shown that proteovibrin is highly soluble in water and 0.14 molar NaCl solution, causes the production of antibodies in rabbits and is toxic for white mice. Its further examination seems to be promising, as well as its possible use as additional source of the cholera vibrio enzymes and as trypsin-like preparation, applicable for protein raw material hydrolysis in production of microbiological nutrient media.

Key words: cholera vaccine, enzymes, proteovibrin, ultrafiltration

ВВЕДЕНИЕ

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. В технологию производства холерной химической таблетированной вакцины института «Микроб» с целью повышения рентабельности производства внедрен способ концентрирования О-антигенсодержащей культуральной жидкости штамма *Vibrio cholerae* M41 серовара Огава на установке из шести ультрафильтрационных колонок УВА-20ПС-1040 [4]. При ультрафильтрации центрифугата формализированной культуральной жидкости холерного вибриона образуются две фракции, одна из которых — концентрат — обогащена нативным целевым продуктом — О-антигеном. Вторая фракция — ультрафильтрат — по объему значительно превосходит первую фракцию и в настоящее время является отходом производства холерной вакцины. Ранее нами было показано, что данный ультрафильтрат содержит ряд низкомолекулярных ферментов, среди которых преобладает активность протеазы и фосфолипаз A₂ и C [8]. Известно, что последние принимают участие в развитии инфекционного процесса, на что указывают многочисленные данные литературы [1, 7, 9, 12]. Некоторыми авторами также рассматривается возможность приме-

нения ферментов, в частности, протеаз холерного вибриона, в качестве компонентов бесклеточных холерных вакцин [11, 12]. Поэтому разработка щадящих методов получения комплекса факторов патогенности ферментативной природы является актуальной.

Целью данной работы явилась разработка технологии получения комплекса экзоферментов холерного вибриона с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах и его характеристика.

МЕТОДИКА

При выполнении работы использовали производственный штамм *Vibrio cholerae cholerae* M41 серовара Огава, продуцент О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в реакторе-ферментере Р170 (г. Фастов, з-д «Красный Октябрь», Украина) объемом 250 л на среде из ферментативного гидролизата казеина (ГОСТ 17626-81, ЗАО «Клейт», Москва) pH 7,6 в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Первичный ультрафильтрат получали при ультрафильтрации центрифугата формализированной культураль-

ной жидкости штамма М41 в процессе получения О-антигенного компонента на волоконном аппарате марки УВА-ПС-20-1040 (производитель ВНИИ полимерных волокон, г. Мытищи, Московской области).

Для определения активности протеазы и фосфолипаз A_2 и C использовали плотные тест-среды с молоком или яичным желтком соответственно. За единицу активности фермента принимали количество белка в мкг, дающее за 20 ч инкубации при 37 °С зону визуального изменения вокруг лунки шириной 2 мм. Удельную активность выражали количеством единиц на мг белка препарата [6]. Содержание белка в пробах контролировали методом Лоури, количество полисахарида определяли с помощью тимолового реактива. Для определения общих липидов использовали биотест «Lachema» (Чехия, Хемапол). Количество нуклеиновых кислот измеряли по методу, описанному А.С. Спириным [5]. Специфическую активность очищенных антигенов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД), антисыворотку к протеовибрину получали путем 3-кратной иммунизации кроликов породы шиншилла массой 2,5 кг. Токсичность определяли на белых мышах по LD_{50} , введение препаратов проводили внутрибрюшинно. Манипуляции с животными проводили в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2003). Белковый спектр препаратов и молекулярную массу белков определяли с помощью электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, используя стандартные маркеры молекулярных масс от 12 до 67 кДа («Serva», Германия). Белки на электрофореграммах окрашивали кумасси R-250. Наличие углеводов в препаратах определяли, окрашивая электрофореграммы аммиачным серебром с предварительным перйодатным окислением полисахаридов. Разделение белковых компонентов препарата проводили на TSK-геле HW-60 (Toyo Soda MFG, Co LTD, Япония) и сефакриле S-300 («Sigma», США), элюцию вели фосфатным буфером 0,01 М рН 7,2 и 0,01 М фосфатным буфером с 0,01 М NaCl рН 7,0 соответственно, а также методом проточного электрофореза на аппарате Эльфор — VAP 5 (Германия) в 0,01 М трис-буфере рН 8,75 при напряжении 500 В, токе 50 мА на скорости потока разделительного буфера 500 мл/ч и подаче образца 2 мл/ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первый этап работы был связан с выделением ферментного комплекса. Поскольку объем ультрафильтрата с одного реактора превышал 200 л, для дальнейшей работы его необходимо было сконцентрировать. В предварительных экспериментах ультрафильтрат штамма М41 концентрировали в лабораторных условиях на автоматической установке АУФ-01 (Россия). Однако низкая мощность установки и малые объемы не позволяли получить

значимые количества препарата. Для повышения эффективности процесса выделения препарата нами были использованы ультрафильтрационные колонки марки УВА-ПС-17-1040 (Россия) с меньшей селективностью волокон, с производительностью по воде 210 л/ч. С целью их калибровки нами была проведена ультрафильтрация растворов коммерческих ферментов и БСА. Выявлено, что α -амилаза (48 кДа) («Serva», Германия), пепсин (35 кДа) («Serva», Германия), трипсин (23 кДа) («Serva», Германия) поступали в ультрафильтрат, в то время как БСА (67 кДа) («Serva», Германия) оставался в концентрате, что дало нам основание использовать данные колонки для концентрирования белков с низкой молекулярной массой из ультрафильтрата штамма М41. Для этих целей была разработана и смонтирована установка фильтрационного модуля. Ультрафильтрационная установка состояла из полуволоконного аппарата; баллона с газообразным азотом вместимостью 40 л; регулятора давления азота БКО-54-4 (Россия); реактора (ферментера) РЗРЯ-6/630 (Россия); насоса с магнитным приводом НШМП (Россия); ротаметра РС — 250 (Россия) и приемной емкости для фильтрата. Объем полых волокон колонки составлял 800 мл, объем внутреннего контура — 130 мл, размер колонки — 140 см. Материал волокон — нейлон. Подача насоса — 1 л 800 мл в мин. Давление азота над препаратом — 0,3 атм, в конце фильтрации — 0,1 атм.

Концентрирование 240 л фильтрата культуральной жидкости штамма М41 Огава проводили при температуре 6–8 °С. Начальная скорость фильтрации составила 0,76 л/мин, затем она снизилась и конце достигла 0,35 л/мин. Время концентрирования одного реактора составило 11 ч при средней скорости фильтрации 0,43 л/ч.

С целью дальнейшей оптимизации процесса фильтрации (повышения скорости фильтрации, сокращения времени одного цикла) нами была смонтирована установка с использованием двух колонок, соединенных последовательно. На данной установке проведено концентрирование фильтрата штамма М41 в количестве 200 л в двух циклах. На установке из двух колонок начальная скорость фильтрации составляла 1,7 л/мин, конечная скорость фильтрации составляла 0,5 л/мин. Использование установки позволило сконцентрировать 200 л фильтрата до 10 л в течение 6 ч со средней скоростью 0,78 л/мин.

В процессе ультрафильтрации каждые 30 мин производили отбор проб вторичного фильтрата, который контролировали по мутности (что позволяло определять целостность волокон колонки) и содержанию ферментов холерного вибриона. В результате сравнительного анализа исходного и сконцентрированного ультрафильтрата, а также вторичного фильтрата выявлено, что ферменты, содержащиеся в исходном ультрафильтрате (протеаза, фосфолипазы) накапливались в процессе ультрафильтрации и при концентрировании их общая активность возрастала. Соответственно во вторичном ультрафильтрате они отсутствовали.

Таким образом, используя последовательную ультрафильтрацию на колонках с различной селективностью из исходного центрифугата культуральной жидкости штамма М41 получен материал, обладающий высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и C . В нем отсутствовали ферменты, обнаруженные нами ранее в культуральной жидкости штамма М41 — твиназа (липаза), лизофосфолипаза, ДНК-аза, РНК-аза и амилаза [3]. Выделение ферментного комплекса из сконцентрированного ультрафильтрата проводили путем осаждения сернокислым аммонием при 80 % насыщения, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на СГО-100 (Россия) при 15000 g, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Ферментный комплекс назван нами протеовибрином. В дальнейшем использовали три серии лиофилизированного комплекса ферментов, полученные из сконцентрированных ультрафильтратов после осаждения белков сернокислым аммонием. Ферментативная активность препаратов после двустадийной ультрафильтрации культуральной жидкости штамма М41 показана в таблице 1. Все препараты характеризовались высокой активностью протеазы, фосфолипазы A_2 и C и хорошей растворимостью. Результаты изучения химического состава, серологической активности и токсичности для белых мышей (табл. 2) полученных препаратов выявили, что основным компонентом ферментных комплексов являлся белок, помимо которого обнаружены углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты. По содержанию белка препараты трех серий были близки (68–72 %). Токсичность препаратов для белых мышей в трех сериях практически была однозначной (0,25–0,35 мг белка).

Как показали данные РИД с кроличьей анти-сывороткой, полученной на ферментный комплекс, выявлено, что препараты трех серий обладают иммунохимической идентичностью, образуя совпадающие двойные линии преципитации. Серологическая активность препаратов была практически одинаковой, титр реакции 1:32. При электрофоретическом разделении всех серий препарата обнаруживали белковые фракции, соответствующие 45, 40 и 25 кДа. Как известно, молекулярные массы таких ферментов холерного вибриона, как протеаза, фосфолипаза [10, 11, 3] лежат как раз в этом диапазоне. На окрашенной серебром электрофореграмме углеводы располагались единой компактной зоной, молекулярной массой около 25 кДа и менее.

Очистку протеовибрина и разделение его компонентов проводили различными методами. При геле-фильтрации препарата на TSK-геле HW-60 в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,2 профиль элюции имел два пика, при этом основную долю активности протеазы и фосфолипазы A_2 и C обнаруживали в первом пике, в одних и тех же пробах. При геле-фильтрации на другом носителе — на колонке с гелем сефакрила S-300 в 0,01 М фосфатном буфере с 0,01 М NaCl pH 7,0 профиль элюции имел 4 пика, самый крупный из которых — второй содержал все три изучаемых фермента с наибольшей активностью. Следовательно, разделить ферменты по молекулярной массе не удалось. Такой же отрицательный результат мы получили при попытке их разделить по заряду молекул. При проведении проточного электрофореза на аппарате Эльфор — VAR 5 в 0,01М трис-буфере pH 8,75 получено два разновеликих белковых пика, активность всех трех ферментов была сосредоточена в малом пике (рис. 1). На основании этих данных протеовибрин можно рассматривать как ферментный комплекс.

Таблица 1
Ферментативная активность препаратов, полученных при двустадийной ультрафильтрации культуральной жидкости штамма М41 холерного вибриона

Этап	Препарат	Содержание белка*, мг/мл	Удельная активность ферментов, ед/мг белка (среднее из 3-х серий)		
			Протеаза	Фосфолипаза A_2	Фосфолипаза C
I	Центрифугат	0,26	2066	2266	308
II	Первичный ультрафильтрат	0,07	2700	2590	262
III	Концентрат ультрафильтрата	0,57	2930	2957	285
IV	Ферментный комплекс протеовибрин	5,86	14200	12500	770

Примечание: * – среднее из 3–5 определений, средняя ошибка не превышает 12 %.

Таблица 2
Химический состав и серологические свойства ферментного комплекса – протеовибрина штамма *V. cholerae* М41

Серия	Химические компоненты в %				Титр в РИД	LD ₅₀ мг белка
	Белок	Углеводы	Липиды	Нуклеиновые кислоты		
1	72,7 ± 0,9	10,9 ± 0,4	5,2 ± 0,15	2,1 ± 0,1	16	0,25
2	69,3 ± 0,7	11,2 ± 0,35	3,9 ± 0,3	2,8 ± 0,15	32	0,3
3	68,4 ± 0,8	9,7 ± 0,4	4,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	32	0,35

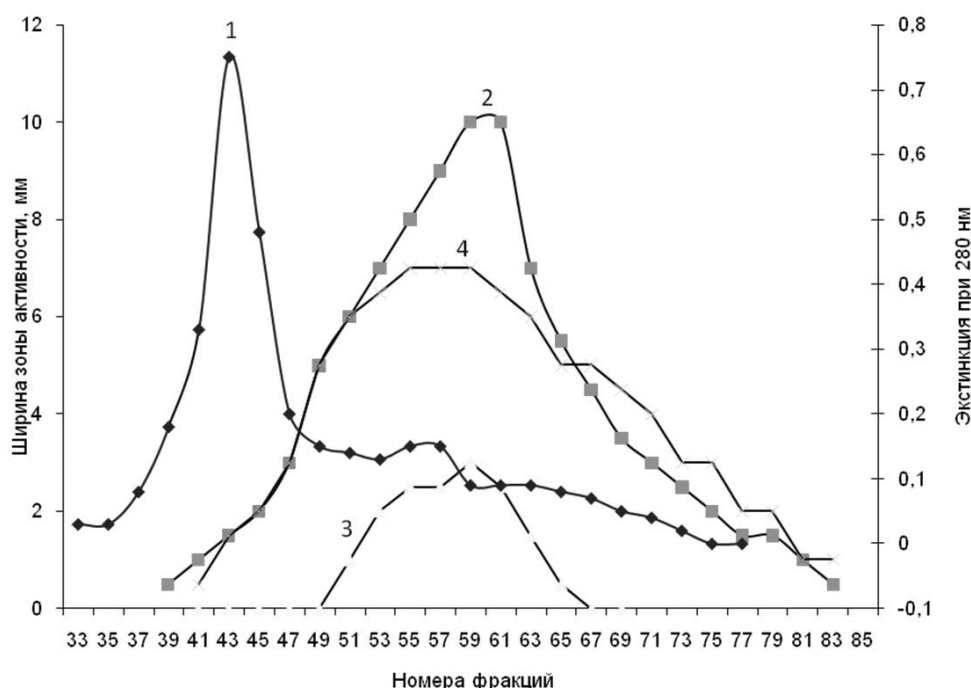


Рис. 1. Электрофоретическое разделение компонентов протеовибрина в свободном потоке. 1 — кривая экстинкции белка; 2 — активность протеазы; 3 — активность фосфолипазы A_2 ; 4 — активность фосфолипазы C.

В результате нами из трех серий сконцентрированного ультрафильтрата после осаждения белков сернокислым аммонием получен диализованный лиофилизированный комплекс ферментов с высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и C и хорошей растворимостью в воде и 0,14 М растворе NaCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом нами разработана технология выделения комплекса низкомолекулярных ферментов холерного вибриона, относимых к факторам патогенности, из отходов производства холерной вакцины с помощью концентрирующей ультрафильтрации, которая позволяет получать препараты с высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и C. Является перспективным его дальнейшее исследование и возможное применение в качестве дополнительного источника ферментов холерного вибриона. В практическом плане нами разработан способ получения питательной основы для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio* (патент № 2360962 Бюлл. № 19, 2009 г.) [2], в котором гидролиз белкового сырья производится протеовибрином, что позволяет сократить сроки гидролиза, уменьшить количество переваривающего агента и расширить ассортимент питательных сред.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимическая и иммунохимическая характеристика новой оральной холерной химической бивалентной вакцины и результаты испытания препарата на добровольцах // М.Н. Джапаридзе [и др.] // Журн. микробиол. — 1982. — № 11. — С. 29 — 33.

2. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Червякова Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В., изобретатели. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ № 2360962, МКП С 12N 1/20. Опубл. 10.07.09. Бюл. № 19.

3. Протеолитическая активность холерных вибрионов О1 и не О1 групп / С.Н. Дегтярева [и др.] // Холера. Матер. Росс. науч. конф. — Рн/Д; Изд. ПТК «Искусство». — 1992. — С. 129 — 133.

4. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцины / И.А. Дятлов [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — Саратов, 2001. — Вып. 2 (82). — С. 133 — 139.

5. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — Т. 23. — Вып. 5. — С. 656 — 662.

6. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — Саратов, 2002. — Вып. 1 (83). — С. 148 — 153.

7. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ продукции основных протективных антигенов у рекомбинантных и производственных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара // Журн. микробиол. — 2005. — № 1. — С. 53 — 57.

8. Экзоферменты ультрафильтрата культуральной жидкости вакцинного штамма М-41 холерного вибриона / И.А. Кузьмиченко [и др.]

// Холе́ра : материалы VIII Российской научн.-практ. конф., 4–5 июня 2003 г., Ростов-на Дону. — РН/Д, 2003 г. — С. 229–230.

9. Booth B.A., Finkelstein R.A. Presence of hemagglutinin/protease and other potential virulence factor in O1 and non O1 *Vibrio cholerae* // J. Infect. Dis. — 1986. — Vol. 154, N 1. — P. 183–186.

10. Cloning, characterization and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced

by *Vibrio cholerae* / A.E. Fiore [et al.] // Infect. Immunity. — 1997. — Vol. 65, N 8. — P. 3112–3117.

11. Stewart-Tull D.E., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens // Vaccine. — 2004. — Vol. 22, N 23–24. — P. 3026–3034.

12. Young D.B., Broadbent D.A. Extracellular protease activity of *Vibrio cholerae* // J. Pathol. — 1982. — Vol. 138, N 1. — P. 60–63.

Сведения об авторах

Громова Ольга Викторовна – к.м.н., с.н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212; e-mail: microbe@san.ru)

Кузьмиченко Инна Александровна – к.б.н., с.н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Нижегородцев Сергей Анатольевич – к.б.н., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Киреев Михаил Николаевич – к.м.н., зав. лабораторией биохимии и протеомики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Корсуков Владимир Николаевич – к.б.н., н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)