

И.А.Кузьмиченко, О.В.Громова, М.Н.Киреев, Н.И.Белякова

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ ШТАММАМИ-ПРОДУЦЕНТАМИ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Выявлены определенные различия в биохимических свойствах производственных штаммов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава холерного вибриона. Разница заключалась в содержании белка в культуральной жидкости, в динамике ферментативной активности в процессе реакторного выращивания штаммов и касалась активности протеазы, фосфолипазы A₂ и C. Показана различная устойчивость ферментов обоих штаммов к детоксицирующему действию формальдегида. Установлена разница в ферментативной активности фракций, полученных методом изоэлектрического осаждения белков культуральной жидкости в диапазоне pH 3,5–4,4.

Ключевые слова: холерный вибрион, производственные штаммы, ферменты культуральной жидкости.

I.A.Kuz'michenko, O.V.Gromova, M.N.Kireev, N.I.Belyakova

Several Biochemical Differences between the Production Strains, Cholera Chemical Vaccine Producers

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Detected are several differences in biochemical properties of *V. cholerae* 569 B Inaba and *V. cholerae* M41 Ogawa productive strains. The differences are in the protein content in culture liquid, in the dynamics of enzyme activity in the process of reactor strain growth, and in the protease, phospholipase A₂ and C activity. Demonstrated is the diverse resistance of enzymes of both of the strains to formaldehyde detoxification effect. Identified is the difference in enzyme activity of fractions, which are obtained by means of isoelectric precipitation of culture liquid proteins within the limits of pH 3,5–4,4.

Key words: cholera vibrio, production strain, culture liquid enzymes.

Для производства коммерческой вакцины холерной бивалентной химической таблетированной используют в настоящее время два штамма *Vibrio cholerae* – 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава. Первый из них эффективно секретирует в культуральную жидкость холерный токсин и обладает слабой протеолитической активностью, второй, источник О1 антигена Огава, является нетоксигенным, однако отличается высокой активностью протеаз. Эти характеристики можно рассматривать как индивидуальные особенности метаболизма данных производственных штаммов, в связи с чем представляло интерес выяснить существование других биохимических отличий между ними. Компоненты вакцины, получаемые из их культуральной жидкости или её концентрата путем осаждения серноокислым аммонием в достаточно широком интервале насыщения, содержат в своем составе и другие сопутствующие биологически активные вещества. В частности, среди них обнаружены различные ферменты, обладающие определенной антигенной активностью [2, 3]. Целью настоящей работы явилось сопоставление активности ряда ферментов, присутствующих в культуральной жидкости у штаммов 569В и М41 холерного вибриона, что позволит более полно охарактеризовать материал, идущий на изготовление вакцины.

Материалы и методы

В культуральной жидкости и осажденных из нее при различных значениях pH фракциях определяли активность протеазы, фосфолипаз A₂ и C, лизофосфо-

липазы, твиназы (липазы), ДНК-азы и РНК-азы. Для этого использовали набор плотных тест-сред с включенными в них соответствующими субстратами [4]. За единицу активности принимали количество внесенного в лунки материала (в мкг белка или в млрд м.к.), дающее в тест-среде вокруг лунок за 18–20 ч инкубации при 37 °С зону визуального изменения шириной 2 мм. Удельную активность выражали количеством единиц на 1 мг белка препарата или на 100 млрд м.к. Белок определяли по Лоури после осаждения его из проб трихлоруксусной кислотой. В опытах по изоэлектрическому осаждению белков культуральной жидкости полученные осадки, отделенные центрифугированием и растворенные в 0,05 М трис-буфере (pH 8,0), и надосадочную жидкость, сконцентрированную в 10 раз и нейтрализованную до pH 7,0, использовали для определения активности ферментов и белка. Наличие холерогена-анатоксина и О-антигена определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) с антитоксической кроличьей сывороткой и кроличьей О-сывороткой при двукратном разведении препаратов и выражали в единицах – обратных титрах разведения, дающего видимую линию преципитации. Цифры в таблицах представляют собой среднее из данных по 3–5 реакторам. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

При производственном культивировании холерных вибрионов в реакторе глубинным способом на казеиновом бульоне (pH 8,0) с подкормкой глюко-

зой и добавлением аммиака длительность выращивания обоих штаммов была одинакова и составляла для достижения максимальной концентрации 10 ч. Конечная концентрация вибрионов по оптическому стандарту мутности была также практически одинакова – (73,7±4,0) млрд м.к./мл у штамма 569В и (75,9±3,4) млрд м.к./мл у штамма М41. За этот период в культуральную жидкость, наряду с целевыми антигенами, поступали внеклеточные соединения различной природы, в основном белковой. Как оказалось, по содержанию белка в культуральной жидкости штамм 569В в несколько раз превосходил штамм М41, показатели составляли соответственно (890±48) и (260±12) мг/л, что указывало на существенную разницу в способности экскретировать белоксодержащие компоненты во внешнюю среду, возможно, за счет холерогена.

Анализ микробных взвесей (равноценных по ферментативной активности культуральной жидкости) обоих штаммов показал, что в процессе выращивания в ней присутствовали все изучаемые ферменты, однако к окончанию выращивания уровень их активности заметно менялся. Показатели этой динамики даны в табл. 1.

Обращает на себя внимание существенное различие между штаммами не только по протеазной активности, но и по активности фосфолипаз А₂ и С, последняя во взвесах штаммов 569В вообще не обнаружена. Другим различием было поступательное нарастание удельной активности этих трех ферментов у штамма М41, чего не отмечали у штамма 569В. Активность остальных ферментов после достижения стационарной фазы роста заметно снижалась, возможно, за счет ослабления их биосинтеза или распада.

В процессе длительного (30 сут) детоксирования культуральной жидкости формальдегидом у штамма М41 происходила полная утрата активности ДНК-азы и РНК-азы и существенная утрата активности лизофосфолипазы. В то же время у штамма 569В эти ферменты, несмотря на продолжительность контакта с формальдегидом, стабильно сохраняли активность, которую позднее регистрировали на всех стадиях производственного цикла и в целевом продукте – таблетках.

В дальнейшем мы охарактеризовали активность ферментов культуральной жидкости во фракциях, полученных с помощью изоэлектрического осаждения путем изменения рН в области кислых значений [5]. Этот способ используется для получения холерного токсина [6]. Кроме того, известен способ выделения

О-антигена, остающегося в жидкой фазе, после предварительного осаждения белков из культуральной жидкости штамма М41 при рН 4,2 [1]. В смеси белков, какой является культуральная жидкость, при достижении изоэлектрической точки происходит соосаждение белков со сходными свойствами, поэтому представляло интерес выяснить, как ведут себя некоторые ферменты при изоэлектрическом осаждении у двух сравниваемых токсигенного и нетоксигенного штаммов. С этой целью мы в разных порциях культуральной жидкости штаммов 569В и М41 устанавливали с помощью 6 М НСl рН 3,5, рН 3,8, рН 4,1 и рН 4,4. Для лучшего формирования осадков к пробам добавляли гексаметофосфат до конечной концентрации 0,25 %.

У обоих штаммов, несмотря на установленное различное содержание белка в исходной культуральной жидкости, наблюдали общую закономерность – по мере ступенчатого повышения рН количество осажденного белка уменьшалось (в среднем от 83,7 % при рН 3,5 до 22,7 % при рН 4,4), в то время как количество неосаждаемого белка соответственно возрастало (в среднем от 12,9 % при рН 3,5 до 77,3 % при рН 4,4). Что касается активности, то из табл. 2 видно, что ее уровень у штамма М41 во всех вариантах опытов был в несколько раз выше, чем у штамма 569В, за исключением твиназы в осадке при рН 3,5. В этих опытах мы сравнивали активность четырех ферментов, поскольку у остальных активность после детоксирования падала.

Слабоактивная протеаза у штамма 569В частично осаждалась только при рН 4,4. Однако в основном она присутствовала в центрифугате с рН 3,5 и 4,4. Высокоактивная протеаза у штамма М41 обнаружена во всех осадках, но основная ее доля также оставалась в растворе. Сходную картину наблюдали и в отношении активности фосфолипазы А₂ – она лишь частично осаждалась при кислых значениях рН, но наибольшей активностью в каждом варианте обладали центрифугаты, что может свидетельствовать о более высокой степени чистоты фермента после осаждения балластных белков.

Определенный интерес представляют данные по фосфолипазе С – у штамма М41 этот фермент заметно уступал по активности фосфолипазе А₂, а у штамма 569В он не обнаружен ни в одной фракции. Существенно, что метод изоэлектрического осаждения у штамма М41 позволил разделить активность обеих фосфолипаз за счет отсутствия фосфолипазы С в надосадочной жидкости при рН 3,5 и 3,8.

Что касается двух основных антигенов холер-

Таблица 1

Начальная и конечная активность ферментов в культуральной жидкости штаммов 569В и М41 при выращивании в реакторе

Штамм	Удельная активность фермента на 100 млрд м.к.*						
	протеаза	фосфолипаза А ₂	фосфолипаза С	лизофос-фолипаза	твиназа	ДНК-аза	РНК-аза
569В	1,7–2,2	4,5–1,9	0	3,2–1,8	5,0–2,6	5,3–1,4	9,1–5,3
М41	2,9–14,3	4,5–25,0	2,4–14,3	3,6–1,9	5,3–1,5	9,1–1,6	10,0–3,6

*Первая цифра в графе указывает удельную активность при ее появлении в культуральной жидкости (от 5 до 7 ч), вторая – активность по окончании выращивания (10 ч).

Распределение ферментативной активности во фракциях, полученных из культуральной жидкости штаммов 569В и М41 осаждением при кислых значениях рН

Фермент	Белок из культуральной жидкости	осаждением при кислых значениях pH							
		pH, при котором проведено осаждение							
		pH 3,5		pH 3,8		pH 4,1		pH 4,4	
		Удельная активность фермента на мг белка у штаммов							
		569В	М41	569В	М41	569В	М41	569В	М41
Протеаза	Осажденный	0	6,4	0	31,7	0	35,8	3,9	77,8
	Неосаждаемый	52,6	454,5	0	312,5	0	222,2	6,8	1785,7
Фосфолипаза A ₂	Осажденный	0	12,8	2,3	31,7	2,6	71,9	7,8	155,0
	Неосаждаемый	833,3	3636,4	227,3	1234,6	72,5	666,7	54,5	1265,8
Фосфолипаза С	Осажденный	0	3,2	0	10,6	0	18	0	19,4
	Неосаждаемый	0	0	0	0	0	55,6	0	210,5
Твиназа	Осажденный	18,3	3,2	0	2,7	0	3,0	0	0
	Неосаждаемый	52,6	54,5	14,1	155,0	9,1	55,6	6,8	210,5

ной вакцины – холерогена-анатоксина и О-антигена, их распределение по изучаемым фракциям было следующим. Наибольшая серологическая активность холерогена-анатоксина была сосредоточена в осадке при рН 3,5 и составила 4–8 ед. Титры О-антигенов Инаба и Огава в осадках в основном были ниже (2–4 ед.), чем в надосадочной жидкости. В ней наибольшая серологическая активность отмечена при рН 3,5 для О-антигена Инаба (16–32 ед.) и при рН 3,5 и 3,8 для О-антигена Огава (32 ед.). Такой способ осаждения удобен именно для выделения О-антигенов, поскольку, как упомянуто выше, при этих значениях рН осаждалась большая часть сопутствующих белков культуральной жидкости.

Таким образом, выявлены определенные различия в биохимических свойствах производственных штаммов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава. Значительную разницу в содержании белка, экскретируемого в культуральную жидкость, можно рассматривать как положительный фактор – более высокое содержание белка у штамма 569В благоприятно для выделения белкового холерогена-анатоксина, а его низкое содержание у штамма М41 более благоприятно для выделения О-антигена. Основное различие в ферментативной активности между штаммами проявлялось уже на стадии выращивания вибрионов в реакторе и касалось протеазы, фосфолипаз A₂ и С. Последний фермент не обнаружен в культуральной жидкости штамма 569В, однако это не вызвано отсутствием его биосинтеза, так как после концентрирования материала серноокислым аммонием выявляли невысокую активность фосфолипазы С. В то время как у штамма М41 удельная активность протеазы, фосфолипазы A₂ и С нарастала до окончания выращивания, у штамма 569В она снижалась. Но при этом ряд ферментов штамма 569В оказался более устойчив к длительному контакту с формальдегидом по сравнению с аналогичными ферментами штамма М41. Метод изоэлектрического осаждения, примененный в данной работе, позволил не только выявить разницу между штаммами по фракциям, но и показал, что ферменты лишь частично соосаждаются с другими белками, а основная доля их активности остается в жидкой фазе. Кроме того, данный метод осаждения позволил

получить у штамма М41 препарат с активностью фосфолипазы A₂, свободный от фосфолипазы С, подтвердив самостоятельность этого фермента. Что касается О-антигена, то согласно полученным данным оптимальным для его очистки от белков культуральной жидкости является их изоосаждение при рН 3,5–3,8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280. Опубл. 27.12.99. Бюл. 36.
2. Джапаридзе М.Н., Сумароков А.А., Мартенс Л.А., Егорова В.Д., Караева Л.Т., Дертеева И.И. и др. Иммунохимическая и биохимическая характеристика профилактического препарата против холеры холерогена-анатоксина. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1976; 5:32–7.
3. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В., Доброва В.Г., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертоксигенных штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
4. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1(83):148–53.
5. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир; 1985. 358 с.
6. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of cholerae toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypotoxinogenic mutants. Infect. Immun. 1978; 20:552–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of obtainment of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 27 Dec 1999.
2. Dzharipidze M.N., Sumarokov A.A., Martens L.A., Egorova V.D., Karaeva L.T., Derteva I.I. et al. [Immunochemical and biochemical characteristics of prophylactic cholera-anatoxin preparation]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1976; 5:32–7.
3. Dzharipidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.V., Dobrova V.G., Zavorotnykh V.I. et al. [Oral chemical vaccine obtained from the hyper-toxicogenic cholera agent strains KM-76 Inaba and KM-68 Ogawa]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.
4. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Kireev M.N., Belyakova N.I., Klokova O.D. [Test-media for the identification of tweenase, protease and phospholipase activity in cholera chemical vaccine and its components]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2002; 83:148–53.
5. Skoups R. [Methods of protein purification]. M.: Mir; 1985. 358 p.

Authors:

Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Belyakova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.03.10.