

УДК 616.34

ОТРИМАННЯ, ОЧИСТКА, ІДЕНТИФІКАЦІЯ СТАФІЛОКОКОВОГО ЕНТЕРОТОКСИНУ СЕРОТИПУ D

Петросова В. І., Петросов К. О.

Отримання, очистка, ідентифікація стафілококового ентеротоксину серотипу D. — В. І. Петросова, К. О. Петросов. — Запропоновано метод очистки стафілококового ентеротоксину серотипу D з використанням сефадексів G-100, G-75, G-200, який складається з чотирьох етапів. Сефадекси використовували відповідно до кожного етапу очистки. Контроль ступеня видалення супутніх білків відбувався за допомогою імунно-хімічних методів Оудена і Оухтерлоні. В якості референс токсинів були використані комерційні препарати фірми "Serva". Молекулярна вага отриманого препарату ентеротоксину дорівнювала 28700 атомних одиниць маси. Мінімальна блювотна доза ентеротоксину становила 6 мкг/кг.

Ключові слова: стафілококи, ентеротоксини, сефадекси, білки, етапи очистки.

Адреса: Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000; e-mail Bio@uzhgorod.ua

The obtaining, purification and identification of staphylococcus enterotoxin of D-serium type. — V. Petrosova, K. Petrosov. — Tse method of purification the staphylococcus enterotoxin of D serium type with the use of KMC rephadexins G-100, G-75 and G-200 has been suggested. The degree of the removal of accompanying proteins has been tested by immunochemical metods of Oudin and Ouchterlony. As reference – toxins the commerscal preparations of "Serva" firm have been used. The molecular weght pf the obtained enterotoxin preparaions totals 28700 atomic mass unit, the minimal djse pf vomitpng is eguil to 6 mcg/kg.

Key words: staphylococcus, enterotoxin, sephadexes, proteins, stages of purification.

Address: Uzhgorod National University, A. Voloshina str., 32, Uzhgorod, 88000; e-mail, Bio@uzhgorod.ua

Вступ

Серед харчових отруень, які уражають в першу чергу шлунково-кишковий тракт, стафілококові токсикоінфекції займають провідне місце через здатність до секреції ентеротропних білкових токсинів. Відомо декілька типів ентеротоксинів: A, B, C, D, E, які розрізняються як за своїми фізико-хімічними так і імунологічними властивостями [3]. За останні роки вчені різних країн вивчали шляхи отримання і очистки стафілококових ентеротоксинів і, на перших етапах розвитку методів очистки ентеротоксинів, зусилля були спрямовані на отримання їх у значних кількостях з метою визначення біологічних характеристик [1, 2, 5, 6, 8]. З часом Bergdoll з співавторами [10], повідомили про можливість отримання більш очищених препаратів ентеротоксинів при використанні іонообмінних смол, електрофорезу, тощо. Стафілококові ентеротоксини типу A і B вивчені більш докладніше, ніж серотипи C, D, E [8]. Однак, запропоновані схеми очистки стафілококових ентеротоксинів усіх серотипів дають низький вихід активного матеріалу, характеризуються багатоступеневими та трудомісткими процедурами, тривалим часом очистки, що ускладнює вилучення домішок. Крім того, на підставі хімічних і біологічних властивостей окремих серотипів ентеротоксинів розроблені методи очистки відносно кожного ентеротоксину окремо, які

потребують наявності майже унікального обладнання і матеріалів [10, 11]. Тому метою нашої роботи було розробка уніфікованого методу очистки стафілококового ентеротоксину з використанням доступних матеріалів і скороченням терміну очистки.

Матеріали і методи

В якості продуценту стафілококових ентеротоксинів використали еталонні штами, які отримані із лабораторії проф. Bergdoll. Для накопичення стафілококових ентеротоксинів використовували бульйон Хоттінгера – 180–240 мг/% амінного азоту – з додаванням 1% NaCl, 0,001% ніотинової кислоти і тіаміна – 0,0005% [1, 8, 14]. Дванадцятигодинну бульйонну культуру еталонних штамів стафілококів вносили у целофанові мішечки і інкубували протягом 18–24 годин при 37°C і постійному струшуванні. Отримані бактеріальні популяції вилучали з целофанових мішечків 10 мл 0,01 М фосфатного буферу, центрифугували при 5,0°C протягом 20 хв. і 6 тис.об./хв. Надосадову рідину, що вміщувала ентеротоксин, діалізували проти карбоваксу і водопровідної води протягом доби. Діалізований сконцентрований неочищений препарат зрівноважували H₃PO₄ до певних значень рН в залежності від типу ентеротоксину і усували нерозчинені солі за допомогою центрифугування (6 тис./об.–30 хв.). Супернатант фільтрували через

мембранні фільтри РМ-10 фірми "Duaflo" з метою згущення і усунення низькомолекулярних компонентів. Концентрацію отриманих препаратів ентеротоксину визначали методом преципітації по Oudin [7, 9, 14, 15]. За допомогою попередньо виготовлених референс-кривих вимірювали кількість ентеротоксину за довжиною преципітаційного тяжу. Для очистки ентеротоксинів використовували карбоксиметилцелюлозу (КМЦ), і сефадекси Г-75, Г-100, Г-150. КМЦ – на 1 і 2-ому етапах очистки, сефадекс – на третьому етапі, елюати обробляли 0,05 М розчином натрій-фосфатного буфера при відповідних значеннях рН. Для визначення ступеню чистоти препарату після кожного етапу використовували метод поліакриламідного дискового електрофорезу. Імунні сироватки, які використовували для визначення ступеня очистки СЕ (стафілококові ентеротоксини), були отримані шляхом імунізації кролів препаратами ентеротоксинів, за розробленими попередньо схемами [1]. Кількість і розташування лінії преципітації у поліакриламідному дисковому електрофорезі були орієнтиром для подальшого очищення препаратів стафілококових ентеротоксинів.

Результати і обговорення

Очистка стафілококового ентеротоксину D у нашому варіанті складалася з 4 етапів (табл. 1). На першому етапі виділення і очистки стафілококового ентеротоксину D, водну суспензію в об'ємі 500 мл і рН 5,7 заливали у колонку з карбоксиметилцелюлозою зрівноваженою 0,01 М розчином фосфату натрію до рН 8,5. Вміст колонки промивали буфером до оптичної щільності 0 при 280 мкм, після чого ентеротоксин елюювали 0,2 М Na₂HPO₄. Проби елюата, що вміщували ентеротоксин діалізували протягом 4 годин при 5,0⁰ С у дистильованій воді і ліофілізували. Ліофілізація допомагала не тільки підвищити концентрацію ентеротоксину в певному об'ємі рідини, але й конче необхідна була для збереження активності препарату при подальшій роботі з супернатантом. Порівняльний аналіз кількісного вмісту отриманого ентеротоксину методом простої гелдифузії з вмістом його після концентрації карбоваксом показав 80,0 % виходу ентеротоксину. Метод подвійної гелдифузії довів наявність 4-ох антигенних компонентів.

На подальшому етапі очистки, ліофілізований препарат ентеротоксину розчиняли приблизно у 50 мл дистильованої води, діалізували при 5,0⁰С протягом 8 годин і знову пропускали через колонку з карбоксиметилцелюлозою. Отриманий елюат фракції великого піку ліофілізували і використовували для остаточної очистки. Чистота препарату складала приблизно 70,0%, а вихід ентеротоксину дорівнював 60,0–65,0% [2].

На третьому етапі ліофілізований матеріал розчиняли 0,05 М розчином фосфату натрію і пропускали через сефадекс Г-100, ентеротоксин з сефадексу видаляли тим же буфером. Фракції ліофілізували, а подвійна гелдифузія виявила наявність

лише двох ліній преципітації. І на останньому етапі ліофілізований матеріал розчиняли у дистильованій воді і пропускали через колонку з сефадексом Г-150, зрівноважений 0,005 М розчином фосфату буфера при рН–6,80. Вихід ентеротоксину склав 38,0% відносно похідної, ступінь очистки – 95,0%. Результати гелдифузії виявили наявність слідів одного антигену. Методом дискового електрофорезу у поліакриламідному гелі виявлено лише незначну кількість домішок.

Таблиця 1. Етапи очистки ентеротоксину D

Table 1. The stades purification of enterotoxin D

№	Етапи очистки	Кількість антигенів	Дисковий електрофорез
1	надосадкова рідина	6	8
2	елюат після першого I	4	6
3	елюат після другого II	3	5
4	елюат після III	2	2
5	елюат після IV	1+сліди	1

При очистці ентеротоксину серотипу D завжди характерно присутність білків з великою молекулярною масою і ці білкові залишки майже повністю зникали після гелфільтрації на сефакрилі "S-200" [11].

В таблиці 2 представлена характеристика стафілококового ентеротоксину D на різних етапах очистки. Аналіз результатів, викладених у таблиці вказує, що кінцевий вихід ентеротоксину склав 34,5% (мг/мл).

Таблиця 2. Характеристика CED на різних етапах очистки

Table 2. The characteristics of enterotoxin D purification stades

Етапи очистки	Об'єм, мл	Титр в реакції гелдифузії	Кількість антигенів і рівень очистки	Вихід, %
Культуральна рідина	500	1:12	4	80,0
I	50	1:128	3	65,0
II	50	1:64	2	45,0
III	50	1:32	1	39,2
IV	50	1:16	1	34,5

Проведені дослідження дозволили встановити, що молекулярна маса стафілококового ентеротоксину D дорівнювала 28,700 atomic mass unit. Для визначення молекулярної маси CED використовували гел-електрофорез [4, 7, 10], ідентифікацію отриманого ентеротоксину D проводили за допомогою референс-токсину фірми "Serva". Проведені дослідження дозволили остаточно підтвердити імунологічну ідентичність отриманого CED з контролем за рахунок злиття смуг преципітації антитоксичної сироватки з отриманим нами препаратом ентеротоксину D. Позитивна реакція гелпреципітації спостерігалася лише за умов взаємодії антитоксину з специфічними антигенами (CED). Випробування дії отриманого ентеротоксину D на кошеня-

тах з'ясувало мінімальну отруйну дозу – 6,0 мкг/кг маси тіла [9, 12, 13].

Висновки

Розроблена основна схема очистки ентеротоксину D, яка складається з 4-х етапів, не потребує вартісного

обладнання і характеризується легким відтворенням на базі баклабораторій. Запропонована схема очистки CED, на відміну від попередніх, які склалися з 7–9 етапів, вміщує 4 етапи і надає можливість отримувати високо очищені препарати ентеротоксину. Молекулярна маса отриманого нами CED складала 28,700 atomic mass unit.

1. Волович Н. И., Ладаний М. М., Залукаева В. И. Изучение некоторых условий получения стафилококковых энтеротоксинов / Вопросы биохимии и физиологии м/о. Межвузовский сборник. – Саратов, –1975. – С. 89–95.
2. Езенчук Ю. В. Патогенность как функция биомолекул М.: Медицина, – 1985. – 191 с.
3. Наубетьяров Р. Б., Бейлбасва М. Л., Езенчук Ю. В. Стафилококковые энтеротоксины; выделение, очистка, идентификация // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1989. – №11. – С. 27–29.
4. Постовит В. А. Пищевые токсикоинфекции. М. Медицина, 1984. – 167 с.
5. Стафилококки. Под ред. акад. В.В. Смирнова. – Київ.: Наукова думка, 1988. – 29 с.
6. Флуер Ф. С., Прохоров В. Я., Веснина А. Я. Акатов А. К. иммуноферментная тест система для определения стафилококкового энтеротоксина С. // Микробиол. – 2002. – 6. – С. 65–68.
7. Шевельова С. А., Куваева И. В., Флуер Ф. С., Кузнецова Г. Г. Энтеротоксинообразование условно-патогенной микрофлоры как диагностический тест при дисбактериозах кишечника // Вопрос питания. – 2002, 3. – С. 23–25.
8. Balaban N., Rasooly A. Staphylococcus enterotoxin // Int. J. Food. Microbial. – 2000. – v. 6111. – P. 1–10.
9. Bergdoll M. S. Enterotoxins / Microbial. Toxins. New York. – 1970. – 265 p.
10. Chu T. S. Thadhani K., Schantz B. J., Bergdoll M. S. Purification and Characterisation of Staphylococcal enterotoxin // A. Bich, – 1966, – 5. – P 3281.
11. Casman R. Bennet R. Dorsey W. F. Issa J. T. Identification of fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D // Sbut. 1967. – 94. – №6. – P. 1875.
12. Marone G. Superantigens and Superallergens // Chemical Immunology and Allergy. – 2007. – v 93. – P. 24–58.
13. Oakley C. L. Fulthorpe A. J. Antigenic analysis by diffusion. // Path. Bacteriol. – 1953, – 65 – P. 49–60.
14. Oudin J. Specific precipitation in gels // Methods. – Med/ – Res. – 1952. – Res. – P. 335–378.
15. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in coordinated system of diffusion // Acta Path.– Microbiol. – Scand.– 1958. – 32. – P. 231–240.

Отримано: 11 червня 2010 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.