

MICROBIOLOGICAL GROUND THE USING OF GLAUCONITE AS FORAGE ADDITION

Kasiyanova L.V., Nazarova L.S.

Glauconite contains two types of aerobian grampositive rod bacterium strains one of which has spores and that is why belongs to bacillus, other is asporogenes. The pure culture of bacillus received from glauconite leads to diminish the size of E. coli cells. Nutrient medium prepared on glauconite extract suppresses the growth of opportunistic microbes: E. coli, P. aeruginosa, B. cereus and S. aureus and mould in cow stomach.

УДК 579.66

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

Новоселова М.В., 5 курс, факультет экономический

Асякина Л. К., ведущий инженер научно-образовательного центра

Научный руководитель: к.т.н., доцент Бабич О.О.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»

Лактоферрин представляет собой полифункциональный белок из семейства трансферринов, обладающий антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми, противопаразитарными, антиканцерными, противовоспалительными, иммуномодулирующими, антиоксидантными и регенеративными свойствами.

Лактоферрин представлен преимущественно в молоке человека и других млекопитающих [1].

Мировая потребность в лактоферрине сегодня значительно превышает предложение. Лактоферрин продолжает оставаться в ряду дорогостоящих белков вследствие большого интереса исследователей к уникальным свойствам этого лекарственного белка и имеющихся трудностей выделения его в чистом виде [5].

Российский рынок представлен импортными дорогостоящими препаратами высокоочищенного лактоферрина, предназначенными для биохимических, медицинских исследований, а также для фармацевтической промышленности.

Использование донорского женского молока, как источника лактоферрина, во многих странах ограничено, а в Российской Федерации, запрещено, в связи с возможностью вирусной контаминации (СПИД, гепатит) [3].

Белок содержится и в обычном коровьем молоке, но его очень мало и выделить его оттуда и сделать доступным для человека не так-то просто. Существующие на Западе технологии производства этого препарата довольно дорогие. В частности, коровий лактоферрин – один из тех молочных белков,

которые могут вызывать у аллергиков нежелательную реакцию. К тому же он не идентичен человеческому лактоферрину.

Целью является получение бактериального штамма, продуцирующего лактоферрин по своим свойствам максимально приближенный к природному лактоферрину человека.

Во многих странах уже развернут широкий фронт исследований по получению рекомбинантного лактоферрина человека в микроскопических грибах (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* -компания Agennix, США), растениях (табак, картофель, рис-Япония, компания Amgen -США). Делаются попытки организовать в промышленных масштабах выпуск рекомбинантного лактоферрина человека, выделенного из молока трансгенных коров – Южная Корея, группа компаний Pharming- Голландия), из молоко трансгенных коз (совместный проект российских и белорусских ученых «БелРоссТрансген»; Китай), а также из куриных яиц (Россия) [3; 4].

Однако, до сих пор предложенные технологические решения обладают рядом недостатков, таких как низкий выход целевого продукта, высокая себестоимость, низкая биодоступность и пр.

Преимуществами перед аналогами, делающие микробный синтез получения лактоферрина перспективным, являются: гибкость метаболизма и высокая способность микроорганизмов к адаптации, высокая скорость роста, простота культивирования, изученность генетики, разработанные методы направленного создания штаммов с заданными свойствами.

Новизна предлагаемого технического решения заключается в использовании оптимальной генной конструкции, позволяющей эффективно осуществлять индуцируемую экспрессию лактоферрина человека и сверхпродукцию белка в бактериальных культурах.

Для получения штамма-продуцента лактоферрина, трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* В F-dcm ompT hsdS (rB-mB-) gal (Stratagene, США) рекомбинантной плазмидной ДНК pTAC-MAT-Tag2 (Sigma, США).

В компетентных клетках *E. coli* отсутствуют *lon* и *ompT* протеазы для предотвращения расщепления рекомбинантного белка (стабилизации мРНК) в бактерии.

Генетическая конструкция плазмиды pTAC-MAT-Tag-2 представлена на рис.1

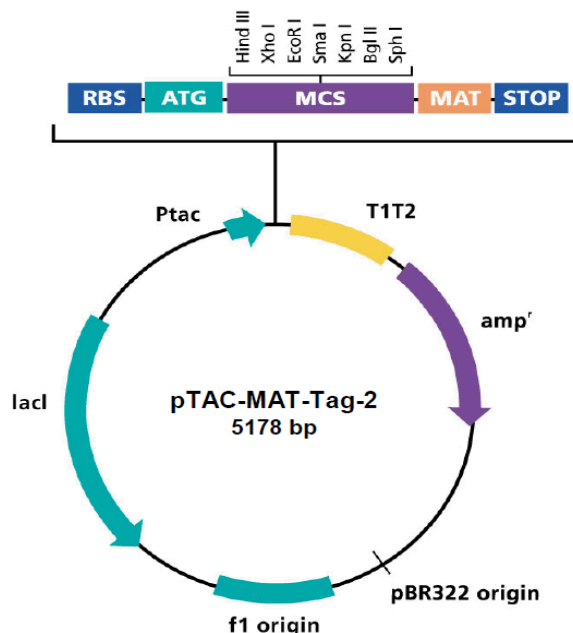


Рис.1. Физическая карта рекомбинантной плазмиды рТАС-МАТ-ТаgÒ-2

В область полилинкера MCS плазмиды рТАС-МАТ-ТаgÒ-2 по месту действия рестриктаз EcoRI - XhoI встроили мРНК гена лактоферрина человека, синтезированную компанией Евроген (Россия) исходя из последовательности базы данных GenBank (23268458) [6].

Синтезированную и встроенную в вектор изготовителя рAL-ТА мРНК, амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специально подобранных праймеров.

Для получения липких концов полученный фрагмент XhoI-мРНК-EcoRI (2136 п.о.) обрабатывали ферментами эндонуклеазами рестрикции XhoI и EcoRI с последующей электрофоретической очисткой в 1% агарозном геле. Необходимые участки вырезали и выделяли из агарозного геля.

При подготовке к клонированию выбранный вектор рТАС-МАТ-ТаgÒ-2 («Sigma», США), содержащий в своем составе ген резистентности к ампициллину, обработали эндонуклеазами рестрикции XhoI и EcoRI с образованием липких концов, комплементарных липким концам мРНК. Получаемые фрагменты исследовали и очищали методом электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле. Необходимые для клонирования участки вырезали из геля.

Далее электрофоретически очищенные фрагмент XhoI-мРНК-EcoRI и фрагмент вектора рТАС-МАТ-ТаgÒ-2 лигировали ферментом лигаза фага Т4 в течение 12 часов при 10 °С. После этого лигазу инактивировали прогреванием смеси в течение 5 минут при 70°С. Очистку от неслигированных фрагментов ПЦР проводили вырезанием из геля.

Таким образом, получили рекомбинантную конструкцию, которой впоследствии трансформировали компетентные клетки *E.coli*. Трансформацию компетентных клеток вели температурным шоком. Для этого 1 мл ночной

культуры клеток выращивали при температуре 30°C с интенсивной аэрацией в среде с SOB с добавлением 0,9% глицина, 0,02 М MgCl₂ и ампициллина на качалке. После охлаждения на льду в течение 10 минут клетки осаждали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл охлажденного буфера TB1, далее пробирки инкубировали на льду в течении 10 мин и помещали на 30 сек в водяную баню, предварительно нагретую до 42°C.

После температурного шока в пробирку добавляли 2М глюкозу и инкубировали 1 час при 37°C (или 1,5 часа при 30°C), затем высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Инкубировали в термостате при 37° С примерно 16 часов.

Таким образом, получили штамм *Escherichia coli*, способный продуцировать лактоферрин человека.

Библиографический список

1. Никишина, И.Н. Полифункциональная наночастица лактоферрин / И.Н. Никишина, С.В. Симоненко // Пищевая промышленность.- 2010.- №2.- С.10-11.
2. Бейкер, Е.Н. Лактоферрин: свойства и применение / Е.Н. Бейкер // Молочная промышленность.- 2006.- № 2.- С.38-39.
3. Сертификация рекомбинантного лактоферрина человека.// <http://www.transgen.ru>.
4. Найден, М. Козий реактор / К. Бочарский // Коммерсантъ Секрет Фирмы.-2010.- №8 (300).- С.8-10.
5. Костина Г. Лактоферрин: медленный бег с барьерами // Эксперт.- 2011.- №11.- С.2-4.
6. Новоселова, М.В. Получение лактоферрина человека микробным синтезом / М.В. Новоселова, Л.С. Солдатова // Материалы научной школы для участников программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса», под общей ред. В.П.Юстратова; КемТИПП.- Кемерово, 2011.- С. 42-46.

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR PRODUCING HIGHLY STRAIN-PRODUCER OF HUMAN LACTOFERRIN

Novoselova M.V., Asyakyna L.S., Babich O.O.

This paper describes a method for producing strain-producer of recombinant human lactoferrin *Escherichia coli*. Lactoferrin is a multifunctional protein of the transferrin family, presented mostly in the milk of humans and other mammals. For the producer of lactoferrin, transformed competent cells of *Escherichia coli* recombinant plasmid DNA pTAC-MAT-Tag2, containing in its composition of human lactoferrin mRNA.