

CHEESE PRODUCT WITH ECOLOGICALLY SAFE ADDITIVE

Chechetkina A.Y., Zabodalova L.A.

Keywords: *functional food, raw materials of a phyto genesis, soft cheeses, bean cultures, food fibers.*

Summary. *The purpose consists in solving a problem of use of goat milk as alternative raw materials. In article the main vegetable components used in the dairy industry are considered. Article provides the scientific basis of efficiency of use of food fibers by production of a cheese product.*

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р30 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

*Шабулкина Е.Н.**, студент 5 курса факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель - *Середа А.Д.***, кандидат биологических наук,
профессор; *Дубровская О.А.*, *Иматдинов И.Р.*, *Казакова А.С.*, *Иматдинов А.Р.*, научные сотрудники**; *Васильева Ю. Б.***, кандидат ветеринарных наук, доцент

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: *африканская чума свиней, рекомбинантный белок, хроматография, иммуноблоттинг.*

Аннотация. *Использование рекомбинантного белка р30 в качестве анти-гена в тест-системах для Асх serodiagnostika с помощью метода иммуноблоттинга свидетельствуют высокие титры антител к р30 в ранние сроки после экспериментального заражения поросят вирулентной или attenuirovanny штаммов вируса*

АЧС - контактиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. К АЧС восприимчивы домашние свиньи и дикие кабаны независимо от породы и возраста [1]. Поскольку вакцины против АЧС не разработаны, то лабораторная диагностика имеет решающее значение для принятия решений по ликвидации вспышек болезни. Наиболее информативными яв-

ляются методы определения антител к вирусным белкам в сыворотках крови животных.

Согласно рекомендациям Международного эпизоотического бюро (МЭБ) для подтверждения сомнительных результатов лабораторной диагностики АЧС непрямыми вариантами иммуноферментного анализа или реакции иммунофлуоресценции следует использовать метод иммуноблоттинга. Применение рекомбинантного белка р30 в качестве антигена в тест-системах для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга обосновано высокими титрами антител к р30 в ранние сроки после экспериментального инфицирования свиней вирулентными или аттенуированными штаммами вируса [2-4].

В ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии были получены генетические конструкции, в которых для повышения растворимости рекомбинантного белка р30 в их состав включена последовательность гена белка тиоредоксина, а для обеспечения очистки методом металлохелатной хроматографии - последовательность, кодирующая полигистидиновый участок. Разработанная методика очистки основана на использовании лизата бактериальных клеток после их разрушения замораживанием-оттаиванием и обработки ультразвуком. Вместе с тем, не была оценена доля рекомбинантного белка р30, оставшегося в клеточном детрите (дебрисе), и не изучена возможность его практического применения.

Целью данной работы было оптимизировать условия выделения из бактериальных клеток рекомбинантного белка р30e2_TgxA_6xHis для его использования при изготовлении иммунострипов в тест-систему для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга.

Объекты и методы исследований. Штамм продуцент *E. coli* рЕТ32b/ASFV/р30e2/1 высевали из аликвот в 20 см³ жидкой питательной среды SOB, содержащей 100 мкг/см³ ампициллина, культивировали на термошейкере 14 часов при 37 °С («ночная культура») M.R. Green & J. Sambrook (2012) [5].

Для приготовления лизата клеток бактериальную культуру рекомбинантного клона переносили в полипропиленовые пробирки объемом 50 см³, охлаждали до 4 °С, осаждали клетки центрифугированием при 3400 g в течение 30 мин и температуре 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок замораживали при минус 70°С. После размораживания клетки ресуспендировали из расчета на 1 г осадка 10 см³ лизирующего буферного раствора и переносили в стеклянные флаконы. Биомассу разрушали тремя сериями ультразвуковой обработки при частоте 18 кГц/сек, каждая серия - три раза по 40 сек с перерывом в 1 мин, с перерывом между сериями – 15 минут. Обломки клеток удаляли центрифугированием при 13000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и смешивали с двукратным буферным раствором для нанесения в соотношении 1:1, подводя рН пробы до значения 7,8±0,2.

Хроматографическую очистку рекомбинантного белка из лизата бактериальной культуры рекомбинантного клона проводили на хелатообразующем сорбенте из гидрофильной матрицы – Ni²⁺-сефарозой (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) при постоянной скорости подачи растворов 0,5 см³/мин. Для элюции рекомбинантного белка использовали буферный раствор (pH 7,8±0,2): ФБР с 300 мМ NaCl; 500 мМ Imidazol; 0,25 мг/см³ Pefablock SC (Roche). Фракцию с очищенным рекомбинантным белком диализовали в ФБР с 300 мМ NaCl и 0,25 мг/см³ Pefablock SC (Roche) (pH 7,8±0,2) в течение 16-18 часов при температуре 4 °С.

Качество очистки рекомбинантного белка оценивали методом электрофореза в 10 % ДСН-ПААГ (SDS-PAAG) по U.K. Laemmle (1970).

После электрофореза гель переносили на 4 часа в буфер с Coomassie brilliant blue R-250, после чего окрашенный гель отмывали кипячением в бидистиллированной воде в течение 20-30 мин.

Результаты исследований. По данным электрофоретического анализа из лизата трансформированных E.coli pET32b/ASFV/p30e2/1 методом металлохелатной хроматографии удается выделить препарат рекомбинантного р30 (трек 5, рис. 1) практически без примесей белков бактерии.

Оценку специфичности рекомбинантного белка р30e2_TrxA_6xHis осуществляли методом иммуноблоттинга. Разведения хроматографически очищенных белков р30e2_TrxA_6xHis подвергали разделению в 10 % ДСН-ПААГ (SDS-PAAG) электрофорезе по U.K. Laemmle (1970) [6] с последующим электропереносом полипептидов из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану в полусухой буферной системе по методам J. Kyhse-Andersen (1984) [7]. Мембрану после электропереноса блокировали 2,5 %-ным раствором обезжиренного сухого молока на фосфатном буферном растворе с 0,1 % твина-20 (ФБР-т) (pH 7,8±0,2) при 4 °С в течение 16-18 часов, после чего мембрану нарезали на единичные треки. Постановку реакции иммуноблоттинга осуществляли, основываясь на методиках МЭБ [8, 9].

Результаты, представленные на рис. 2 показали, что наличие последовательности тиоредоксина в р30e2_TrxA_6xHis не влияет на специфичность серологических реакций при использовании его в качестве антигена.

Далее было проведено сравнение серологической активности лизатов, полученных в результате обработки клеточных детритов ионными и неионными детергентами.

Осадок белка р30 ресуспендировали в фосфатном буферном растворе с pH 7,2 (ФБР), для исследования раствор разделяли 5 проб с добавлением различных детергентов: 1 - с ФБР (контроль), 2 – 1 % тритон X-100, 3 – 1 % октил-β-D-глюкоперенозид, 4 – 0,1 % додецилсульфат натрия (SDS), 5 – 0,1 % дезоксихолат Na. Затем полученные пробы центрифугировали 20 минут при 3000 г, отбира-

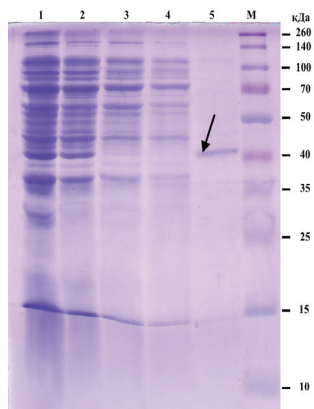


Рисунок 1 - Электрофореграммы исходного лизата клеток *E.coli* pET32b/ASFV/p30e2/1 (1), фракций в процессе отмывки сорбента (2-4) и фракции очищенного рекомбинантного белка (5). М и кДа – местоположение маркеров и их молекулярной массы.

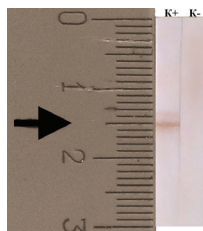


Рисунок 2 – Специфическое окрашивание иммунострипа (указано стрелкой) в результате взаимодействия рекомбинантного белка р30 вируса АЧС со специфическими антителами положительной контрольной сыворотки крови свиньи, иммунной к вирусу АЧС (K⁺), и отсутствие окрашивания иммунострипа после инкубирования его с сывороткой крови от интактной свиньи (K⁻).

ли супернатанты и раститровывали с 2-х кратным шагом от 1:2 до 1:4096, далее полученные растворы переносили по 5 мкл на нитроцеллюлозную мембрану. В течение 18 час проводили «блокировку» в растворе с 2,5 % молока и 0,1 % твин-20. Следующим этапом инкубировали нитроцеллюлозную мембрану с раствором специфической сыворотки свиньи в разведении 1:100 в течение 1,5 час, отмыва-



Рисунок 3 – Результаты оценки серологической активности лизатов клеточного детрита: 1 – ФБР, 2 – 2 % тритон X-100, 3 – 2 % октил-β-D-глюкоперенозид, 4 – 0,2 % SDS, 5 – 0,2 % дезоксихолат Na.

ли трехкратно ФБР-т, помещали в конъюгат протеина А с пероксидазой хрена (разведение 1:3000), 4-хкратно отмывали ФБР-т и окрашивали ДАБ.

Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют, что значительная доля, более 90 %, рекомбинантного белка остается в клеточном детрите после процедуры разрушения клеток замораживанием-оттаиванием и ультразвуковой обработки.

Поскольку металлохелатную хроматографию невозможно провести в присутствии SDS, а он, помимо всего прочего, не удаляется из раствора методом диализа, то для разрушения клеток были испытаны другие вещества - высокомолярные растворы мочевины и гуанидин-хлорида.

Суспензию продуцента после 16 часовой индукции разделяли на 6 проб объемом по 50 см³, центрифугировали при 3000 г в течение 30 мин. Осадки растворяли в 2 см³ растворов с 4 М и 8 М мочевины, 1 % SDS, 6 М гуанидин хлорида. В качестве контроля использовали бидистиллированную воду. После инкубирования при 4°C в течение 6 час растворы осветляли центрифугированием при 6000 г в течение 15 мин.

Результаты электрофоретического анализа полученных надосадков показали, что рекомбинантный белок р30 находится в цитоплазме E.coli в нерастворимой форме, возможно, в тельцах-включениях: на треке 2 (рис. 4) отсутствовала соответствующая полоса. Установлено, что растворы мочевины и гуанидин хлорида, которые можно использовать при металлохелатной хроматографии, переводили рекомбинантный р30 в растворимое состояние.

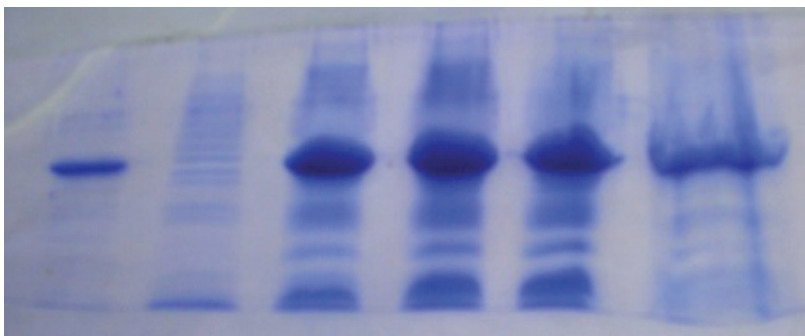


Рисунок 4 – Электрофоретический анализ осадков продуцента E.coli pET32b/ASFV/p30/2, обработанных различными детергентами:

1 – хроматографически очищенный белок p30; 2 – дистиллированная вода; 3 – 4 М мочевины; 4 – 8 М мочевины; 5 – 1 % SDS; 6 – 6 М гуанидин хлорид.



Рисунок 5 – Дотблоттинг с использованием разведений лизатов надосадков лизатов клеток, обработанных: 1 – 4 М мочевины; 2 - 8 М мочевины; 3 – дистиллированная вода; 4 – 6 М гуанидин хлорид.

Эти же надосадки исследовали методом дотблоттинга (рис. 5).

В результате металлохелатной хроматографии в растворах с 4 М мочевиной и 6 М гуанидинхлоридом были получены препараты рекомбинантного p30, которые выявляли на окрашенных Coomassie brilliant blue R-250 электрофореграммах в разведениях до 1:4096.

Выводы

1. Значительная доля рекомбинантного белка вируса АЧС р30, более 90 %, остается в клеточном детрите после процедуры разрушения трансформированных клеток *E.coli* замораживанием-оттаиванием и ультразвуковой обработки.

2. Лизис клеточного детрита 0, 1 % раствором додецилсульфата натрия или высокомолярными растворами мочевины и гуанидин хлорида переводит р30 из клеточного детрита в растворимую форму.

3. Процедура обработки клеточного детрита высокомолярными растворами мочевины и гуанидин-хлорида и последующей очистки методом металлохелатной хроматографии в присутствии 4 М мочевины или 6 М гуанидин хлорида позволяет увеличить выход рекомбинантного белка вируса АЧС р30 из трансформированных *E.coli* в 10 раз по сравнению с выходом из лизата после ультразвуковой обработки.

Библиографический список:

1. Sanchez-Vizcaino, J.M. (2006). African swine fever. In Diseases of Swine, 9 Edition, pp 93-102. Ed A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S Dallaire and D.J. Taylor. Iowa State University Press, 2000. – P. 159-165.
2. Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/CISA/ASF/IB/1/2008) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. - Загл. с экрана.
3. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.8.1. African swine fever/ Office International des Epizooties [Электронный ресурс – Paris, France, 2008. – 6th ed. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf. - Загл. с экрана.
4. Середа, А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней/ А.Д. Середа, Д.В. Колбасов // Научный журнал КубГАУ. -2012. -№ 77(03).- С .21 – 37.- 0421200012\0181. <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/48.pdf>.
5. Green, M.R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.-4th ed. / M.R. Green and J. Sambrook. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. – 2096 p.
6. Laemmle, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ U.K. Laemmli// Nature. – 1970. – Vol.227. – P.680-685.
7. Kyhse-Andersen, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose/ J. Kyhse-Andersen// J. of Biochem. and Biophys. Methods. – 1984. – Vol.10. – №3/4. – P.203-209.
8. Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/CISA/ASF/IB/1/2008) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. - Загл. с экрана.

9. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.8.1. African swine fever/ Office International des Epizooties [Электронный ресурс]. – Paris, France, 2008. – 6th ed. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf. - Загл. с экрана

IMPROVEMENT OF TECHNOLOGY OF RELEASE OF RECOMBINANT P30 PROTEIN OF THE VIRUS OF THE AFRICAN PLAGUE OF PIGS

Shabulkina E. N., Sereda A. D.

Key words: *African swine fever, recombinant protein, chromatography, immunoblotting.*

Summary. *Use of recombinant protein r30 as an anti-gene in test systems for AChS serodiagnostika by method of an immunoblotting is proved by high credits of antibodies to r30 in early terms after experimental infection of pigs with virulent or attenuovanny strains of a virus.*

УДК 619:612:636:4

РОЛЬ ВИТАМИНА Д В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

*Ширманова К.О., студентка 2 курса факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель - Любина Е.Н., доктор биологических наук,
профессор*

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *витамин Д, иммунитет, туберкулёз, кателицидины.*

Аннотация. *В статье представлены современные отечественные и зарубежные исследования посвященные изучению влияния витамина Д на иммунную систему и течение инфекционного процесса туберкулеза.*

Актуальность темы. Туберкулёз широко распространённое в мире инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое различными видами микобактерий из группы *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Несмотря на то, что туберкулез был открыт Кохом в 1882 году, он по-прежнему входит в число