

**ЖУРНАЛ**  
**МИКРОБИОЛОГИИ**  
**ЭПИДЕМИОЛОГИИ**  
**И**  
**ИММУНОБИОЛОГИИ**

**3**

В. Н. Никандров, Л. С. Рудницкая, П. Г. Рытик,  
Г. С. Давыдова

### ДИНАМИКА БЕЛКОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РОСТЕ $\beta$ -ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ С

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава БССР, Минск

С учетом важной роли гемолитических стрептококков в инфекционной патологии человека [1], использования их для получения ряда физиологически активных метаболитов [9, 15] большое значение имеет исследование спектра внеклеточных белков стрептококков и динамики этого спектра. Причем, как правило,  $\beta$ -гемолитические стрептококки культивируют на питательных средах, включающих белки и их гидролизаты [2]. Тем не менее особенности динамики спектра белков культуральной жидкости изучены недостаточно, что диктует необходимость проведения подобных исследований.

Среди внеклеточных белков  $\beta$ -гемолитических стрептококков особый интерес представляют стрептокиназа и стрептолизины. Стрептокиназа является одним из сильнейших активаторов пламиногена, препараты ее широко используются в клинической медицине. Стрептолизины — сильные цитолитические токсины, высоколетальные для животных [4, 12], причем стрептолизин S обладает противоопухолевой активностью [15]. Однако несмотря на имеющиеся данные об особенностях биосинтеза этих белков [3, 7], все еще недостаточно ясен характер их накопления в различные фазы развития микробной популяции, а также вопрос о постоянстве свойств стрептокиназы и стрептолизинов в эти фазы.

В настоящей статье методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и изоэлектрофокусирования изучена динамика белков культуральной жидкости при выращивании  $\beta$ -гемолитических стрептококков штамма Н46А на питательной среде сложного состава.

Материалы и методы.  $\beta$ -гемолитические стрептококки штамма Н46А культивировали в ферментерах вместимостью 5 л установки САУ-4Ф-1 [11]

Изменение относительного содержания (в %) белковых фракций культуральной жидкости в динамике роста  $\beta$ -гемолитического стрептококка, штамм Н46А (n=3)

Фракция	R <sub>f</sub>	сразу после засева	Время роста, ч							
			1	2	3	4	6	7	8	
a	0,06±0,006	3,3±0,1	5,8±0,7	5,7±1,8	8,8±2,4	6,4±1,2	4,0±1,0	0	0	14,7±1,5
b	0,11±0,001	18,9±1,5	22,9±1,0	26,8±2,8	26,8±3,7	8,2±0,8	4,1±1,6	1,7±0,3	1,7±0,3	13,4±1,8
c	1,5±0,0	0	0	0	0	14,7±3,8	4,9±0,9	2,6±0,8	2,6±0,8	17,9±2,6
d	0,25±0,003	20,8±1,3	32,9±1,0	22,4±3,5	17,6±1,5	25,3±4,2	30,4±0,9	15,0±0,8	15,0±0,8	15,0±0,6
e	0,32±0,001	13,4±2,2	0	16,8±4,6	15,5±1,7	18,0±1,5	21,3±2,4	22,5±1,3	22,5±1,3	8,6±0,9
f	0,41±0,001	11,2±2,9	15,3±1,5	9,1±0,2	9,3±0,2	11,9±2,3	19,4±1,3	17,7±1,0	17,7±1,0	16,7±1,7
g*	0	0	0	0	0	0	8,6±1,3	16,5±0,9	16,5±0,9	5,4±0,2
h*	0	9,2±1,7	0	0	0	0	0	0	19,4±1,1	6,7±0,7
i	0,60±0,02	21,1±1,6	18,3±0,3	18,0±0,2	20,8±1,5	14,7±2,6	8,6±2,6	9,3±0,6	9,3±0,6	1,0±0,1
j	0,80±0,01	2,1±0,3	2,8±2,5	1,5±0,2	1,0±0,1	1,2±0,1	0,6±0,005	1,0±0,1	1,0±0,1	0,6±0,1

\* Фракции, первоначально отсутствующие в белковом спектре.

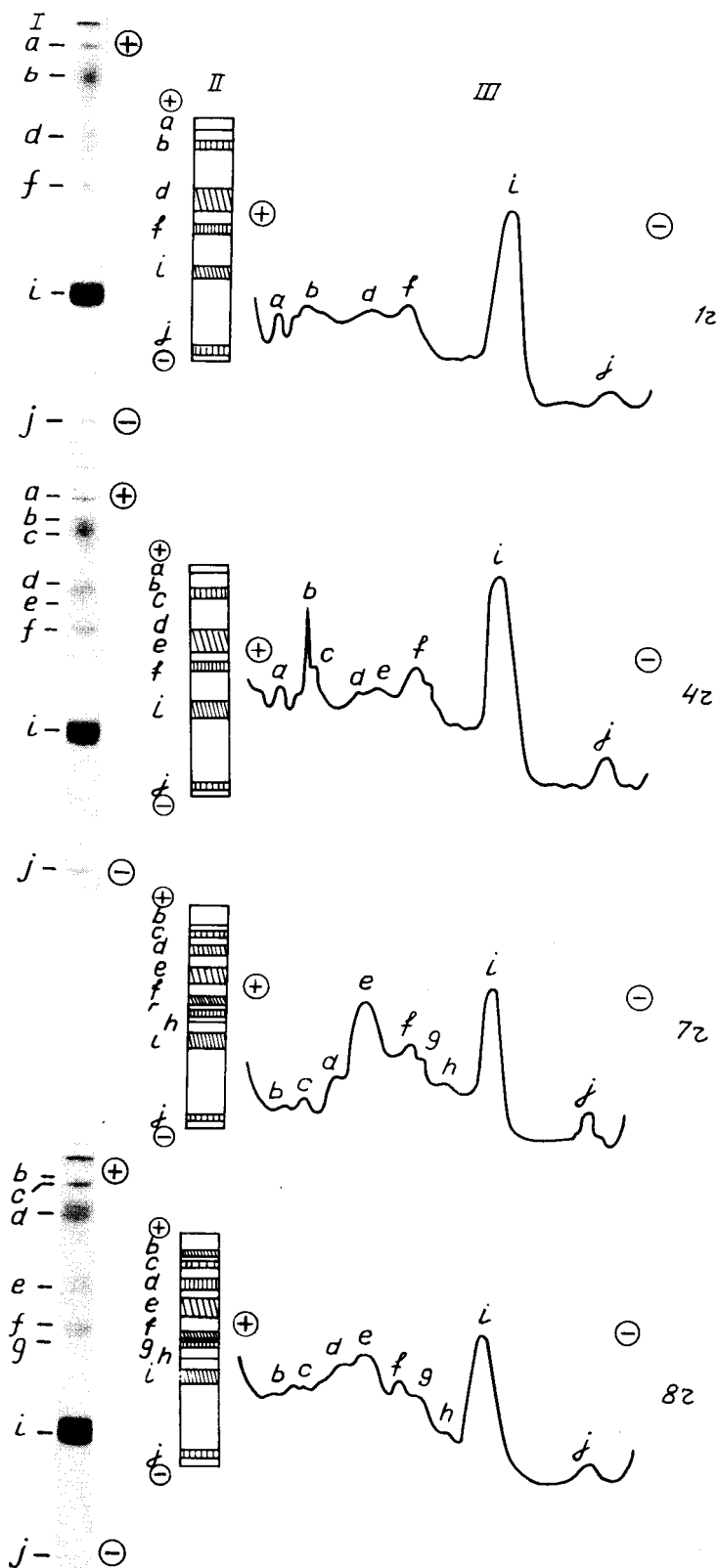


Рис. 1. Результаты электрофореза (I), схемы электрофорезов (II) и денситограммы (III) концентратов культуральной жидкости  $\beta$ -гемолитического стрептококка через 1, 4, 7 и 8 ч после засева культуры.

Латинскими буквами обозначены отдельные фракции.

в режиме рН-стата на питательной среде, включающей гидролизат казеина, глюкозу, лошадиную сыворотку, минеральные соли и витамины [2].

Пробы культуральной жидкости отбирали в динамике культивирования через каждый час, учитывали концентрацию (в lg оптической плотности) биомассы турбидиметрически по величине мутности, отделяли биомассу центрифугированием при 6000 об/мин и 4 °С, определяли активность стрептокиназы по лизису фибриновых сгустков [5], содержание белка по методу [14]. Лиофильно высушенные на установке LZ-9s пробы растворяли в дистиллированной воде и использовали для разделения.

Дисковый электрофорез проводили в градиенте ПААГ 5—9 % в трис-глициновом буфере рН 8,3 в течение 2,5 при 4 °С и силе тока 5 мА на столбик геля. На каждый столбик наносили пробу, содержащую 150 мкг белка. Белки фиксировали 30 % трихлоруксусной кислотой и окрашивали амидо черным 10В. Относительную подвижность ( $R_f$ ) рассчитывали по отношению расстояния миграции белковых фракций к половине расстояния миграции бромфенолового синего. Электрофореграммы денситометрировали на установке "Scan-400" (Великобритания). На электрофореграммах рассчитывали относительное содержание фракций (в %), используя для выявления границ между фракциями принцип построения гауссовых кривых [10]. Фракции белка обозначали буквами латинского алфавита в соответствии с их подвижностью к катоду.

Изоэлектрофокусирование проводили в столбиках 7 % ПААГ в системе амфолинов с градиентом рН 3,0—10,0 в течение 28 ч при 4 °С в режиме, описанном ранее [13]. Величину рН зон геля определяли на рН-метре рН-121 в микроячейке.

При исследовании локализации стрептокиназы и стрептолизина в гелевых столбиках последние не фиксировали, а разрезали на зоны по 3 мм, измельчали, элюировали белки 1М КСl и определяли активность стрептокиназы методом лизиса фибриновых пластин, как подробно описано нами ранее [8], а стрептолизина по лизису взвеси

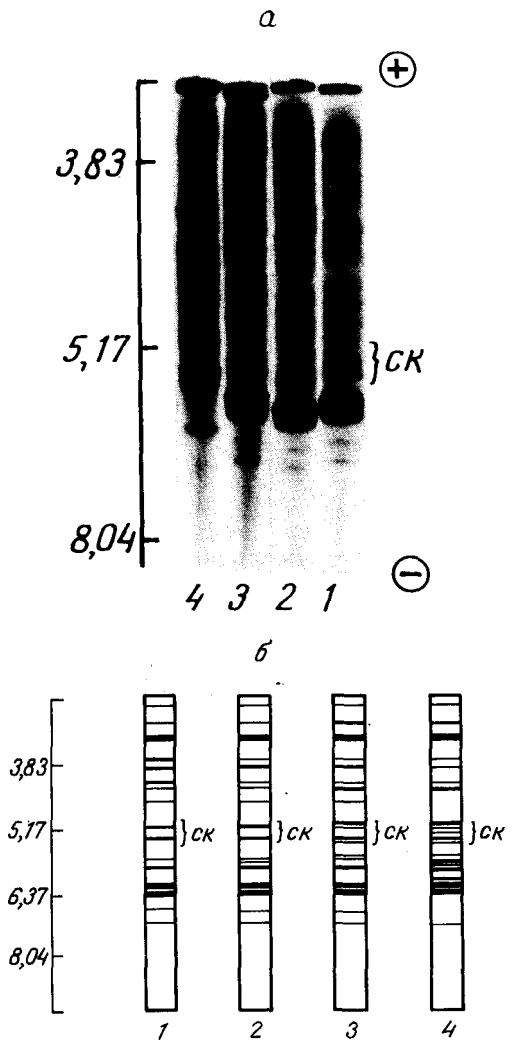


Рис. 2. Результаты изоэлектрофокусирования белков культуральной жидкости (а) через 1, 2, 3 и 4 ч от начала засева культуры и их схематическое изображение (б).

Фигурной скобкой отмечена зона локализации стрептокиназы (СК).

эритроцитов барана [7]. Анализ проводили в кислородной среде, восстановители не добавляли. В таких условиях регистрируется преимущественно активность стрептолизина S, ибо стрептолизин O неактивен в этих условиях [12]. Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно, результаты обработаны статистически с расчетом *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В культуральной жидкости на разных

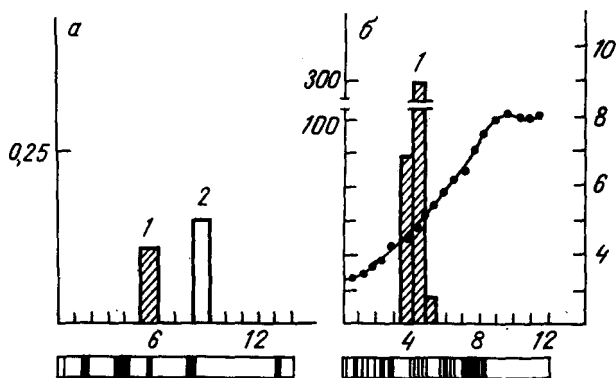


Рис. 3. Определение локализации стрептокиназы (1) и стрептолизина (2) в столбике ПААГ после электрофореза (а) и локализации стрептокиназы после изоэлектрофокусирования (б).

По оси абсцисс — номера фракций геля; по оси ординат (а) — гемолитическая активность при  $D_{360}$ , слева (б) — площадь (в  $\text{мм}^2$ ), справа (б) — рН.  
Кривая линия на б — градиент рН в геле.

стадиях развития микробной популяции обнаруживается до 10 электрофоретических фракций белка (рис. 1, см. таблицу) и до 22 фракций при разделении изоэлектрофокусированием (рис. 2). Количество фракций и относительная доля каждой фракции в процессе культивирования заметно изменяются. В питательной среде без инокулированного стрептококка нами обнаружены 4 электрофоретические фракции, идентичные фракциям b, d, i, j и являющиеся, по-видимому, белками собственно питательной среды. Это, однако, условно. Как показано ниже, при развитии микробной популяции могут образовываться белки, аналогичные по подвижности белкам питательной среды (во фракции i обнаруживается стрептолизин). Следует отметить, что существует по крайней мере три источника белков культуральной жидкости: компоненты питательной среды, внеклеточные белки микроба и продукты распада микробной клетки при ее гибели.

Идентификация стрептокиназы и стрептолизина после электрофореза показала (рис. 3), что стрептокиназная активность сосредоточена во фракции i ( $R_i=0,41$ ), а стрептолизиновая — во фракции i ( $R_i=0,80$ ). Но при изоэлектрофокусировании активность стрептокиназы определяется по крайней мере в 2 фракциях с  $pI$  5,2—5,5 (см. рис. 2). Эти результаты полностью согласуются с данными литературы и ранее полученными нами при исследовании очищенной стрептокиназы материалами о существовании множественных форм стрептокиназы [6]. Эти формы практически идентичны по молеку-

лярной массе, но различаются по  $pI$ , активности, стабильности, конформационной специфике [6]. Полученные материалы однозначно показывают, что множественные формы стрептокиназы присутствуют на всех стадиях развития микробной популяции и не являются следствием изменений белковых молекул в ходе очистки белка.

Анализ электрофореграмм белков культуральной жидкости позволяет выделить несколько стадий изменения белкового спектра в соответствии с фазами развития популяции. В период логарифмической фазы роста 1—3 ч (рис. 4) культуральной жидкости присутствуют 6—8 белковых фракций, причем наиболее велика доля фракций b, d, e и i. Как уже указывалось ранее, за исключением фракции e, все они присутствуют в питательной среде. Вместе с тем уже на ранних стадиях развития культуры присутствуют специфические компоненты а (вероятно, стрептококкового происхождения), i (стрептокиназа). Кроме того, в зоне i обнаруживается активность стрептолизина (по-видимому, их подвижность совпадает с таковой одного из компонентов культуральной жидкости). В фазе замедления роста культуры (4—6 ч) в культуральной жидкости обнаруживаются компоненты с и g, которые могут как являться продуктами расщепления других белковых компонентов культуральной жидкости, так и непосредственно выделяться микробной клеткой. Это требует дальнейших исследований. Доля компонентов а и i снижается, а i увеличивается. Это хорошо согласуется с ранее полученными нами данными

о динамике стрептокиназы и стрептолизина при росте гемолитического стрептококка [3, 7].

Наконец, в стационарной фазе полностью исчезает компонент а, заметно уменьшается относительная доля компонентов d, f, i, появляется новый компонент h. Можно думать, что последнее является следствием аутолиза микробных клеток, который заметно усиливается в эту фазу. Вместе с тем картина изменений белковых фракций далеко не однонаправленна. Так, динамика содержания компонента b довольно сложна, имеет фазы уменьшения и увеличения (см. таблицу).

Анализ электрофоретической подвижности белковых фракций, соответствующих стрептокиназе и стрептолизинам, свидетельствует о том, что в период фазы замедления роста продуцента (см. рис. 4) подвижность стрептокиназы заметно уменьшается. Следовательно, есть основания считать, что в процессе развития популяции молекулы белка изменяют свои свойства. Причины подобных изменений, которые а priori были предположены и проанализированы нами ранее [6], многообразны и могут включать модификацию молекулы фрагментами клеточной стенки микроба, частичное расщепление протеиназами, конформационные изменения и т. д. Выяснение типа таких изменений имеет большое практическое значение, но оно требует специальных исследований на образцах очищенного белка и выходит за рамки настоящей статьи.

#### Выводы

1. Установлено, что фракции, соответствующие стрептокиназе и стрептолизинам, обнаруживаются на всех стадиях развития микробной популяции ( $\beta$ ) гемолитического стрептококка группы С с выраженным снижением доли стрептокиназы в стационарной фазе, а стрептолизина в конце логарифмической фазы.

2. На всех стадиях развития микробной популяции обнаруживается гетерогенность фракции, соответствующей стрептокиназе, при изоэлектрофокусировании, что подтверждает возможность существования множественных форм стрептокиназы в культуральной жидкости.

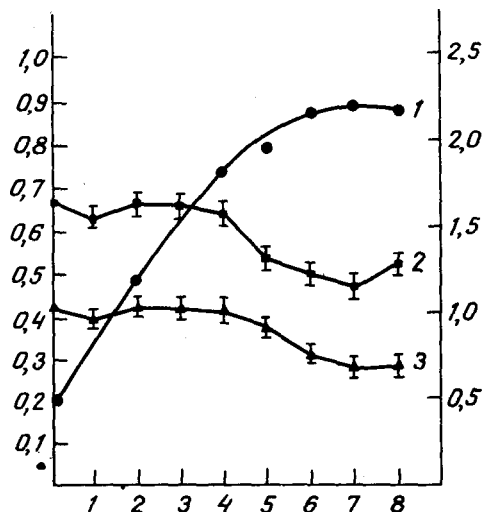


Рис. 4. Изменения относительной электрофоретической подвижности белковых фракций, содержащих стрептокиназу (2) и стрептолизина (3) в динамике роста (1) гемолитического стрептококка.

По оси абсцисс — время культивирования (в ч); по оси ординат слева —  $R_f$ , справа — концентрация биомассы (в lg оптической плотности).

3. Электрофоретическая подвижность стрептокиназы в конце логарифмической фазы заметно изменяется, что может свидетельствовать об изменении свойств молекулы стрептокиназы.

4. Изменения белкового спектра культуральной жидкости имеют фазный характер и в целом отражают состояние микробной культуры. Полученные материалы могут быть полезны при прогнозировании режимов получения физиологически активных веществ из стрептококков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В. Д., Ходырев А. П., Тотолян А. А. Стрептококковая инфекция.— Л., 1978.
2. Давыдова Г. С., Рытик П. Г., Бессчастнова А. П. и др. // Энзимология тромбозиса и стрептокиназа.— Минск, 1982.— С. 68—73.
3. Давыдова Г. С., Рытик П. Г., Шатило Н. Л. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови.— Минск, 1985.— С. 69—74.
4. Далин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов.— М., 1980.
5. Каневская М. И., Коников А. П. // Детские каплевидные инфекции.— Л., 1953.— С. 47—59.
6. Никандров В. Н., Кузина А. И., Дымонт Т. А.

- // Здравоохр. Беларуссии.— 1982.— № 7.— С. 34—36.
7. *Никандров В. Н.* // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови.— Минск, 1985.— С. 43—58.
  8. *Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И.* // *Вопр. мед. химии.*— 1987.— № 1.— С. 84—87.
  9. *Савченко Н. Е., Вотяков В. И., Никандров В. Н.* // *Здравоохр. Беларуссии.*— 1981.— № 7.— С. 8—12.
  10. *Троицкий Г. В.* *Электрофорез белков.*— Харьков, 1962.
  11. *Цвигун В. И., Рахманов Ю. П., Брель Г. Ф.* // *Энзимология тромболитизиса и стрептокиназа.*— Минск, 1982.— С. 82—85.
  12. *Alouf J. E.* // *Pharmacol. Ther. B.* (Oxford).— 1980.— Vol. 11.— P. 661—717.
  13. *Hugnes D. W., Galau G. A.* // *Analyt. Biochem.*— 1984.— Vol. 140.— P. 320—326.
  14. *Lowry O. H., Rosabrough N. J., Farr A. L., Randall J. R.* // *J. biol. Chem.*— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
  15. *Okamoto U.* // *Mechanisms in bacterial Toxinology.*— New York, 1976.— P. 237—258.

Поступила 05.02.88

#### DYNAMICS OF CULTURE FLUID PROTEINS DURING THE GROWTH OF $\beta$ -HEMOLYTIC STREPTOCOCCI, GROUP C, IN COMPLEX CULTURE MEDIA

*V. N. Nikandrov, L. S. Rudnitskaya, P. G. Rytik, G. S. Davydova*

The dynamic study of the protein spectrum of culture fluid during the growth of  $\beta$ -hemolytic streptococcal strain H46A has been carried out by the methods of electrophoresis and isoelectrofocussing in polyacrylamide gel. Changes in the protein spectrum have phasic character and, on the whole, reflect the state of the microbial population, the presence of fractions corresponding to streptokinase and streptolysins being detected at all phases of growth. The electrophoretic mobility of streptokinase perceptibly changes at the end of the logarithmic phase; as shown by electrofocussing, at all stages of the population growth the heterogeneity of streptokinase is observed.