

**Национальная академия наук Беларуси
Отделение биологических наук
Институт микробиологии
Концерн «Белбиофарм»
Белорусский республиканский
фонд фундаментальных исследований**

**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ
МИКРОБИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ**

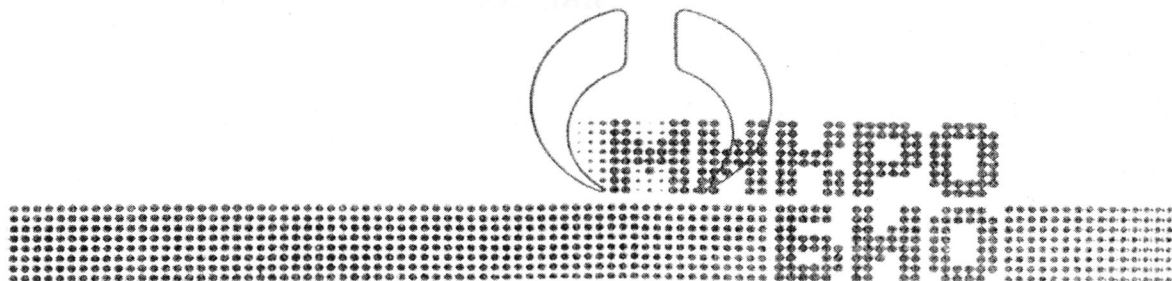
*Материалы
Международной конференции
26-28 мая 2004 г.*

Минск

Национальная академия наук Беларуси
Отделение биологических наук
Институт микробиологии
Концерн «Белбиофарм»
Белорусский республиканский
фонд фундаментальных исследований

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

*Материалы
Международной конференции
26-28 мая 2004 г.
Минск*



НАЦИОНАЛЬНАЯ
АКАДЕМИЯ НАУК
БЕЛАРУСИ

УДК 579.22 [579.222.3+579.64:631.46]+
576.57.085.23+577.11/15

ББК 28.4
М35

Ответственные редакторы:

Лобанок А.Г., академик НАН Беларуси
Михайлова Р.В., докт. биол. наук

Программная комиссия Оргкомитета:

Алещенкова З.М., докт. биол. наук
Астапович Н.И., член-корр. НАН Беларуси
Бабицкая В.Г., докт. биол. наук
Зинченко А.Н., член-корр. НАН Беларуси
Коломиец Э.И., член-корр. НАН Беларуси
Михайлова Р.В., докт. биол. наук
Образцова Н.В., канд. биол. наук
Самсонова А.С., докт. биол. наук
Сапунова Л.И., канд. биол. наук
Стефанович Л.И., канд. биол. наук
Суховицкая Л.А., канд. биол. наук

УДК 579.22 [579.222.3+579.64:631.46] +
576.57.085.23 + 577.11/15

ББК 28.4

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК
CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE: ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ**

Пыжова Н.С., Никандров В.Н., Шатило Н.Л.

*НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь,
Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Дифтерия – тяжелое инфекционное заболевание в последние годы актуальное не только для детской патологии, но биологические свойства коринебактерии дифтерии изучены далеко не полностью. Немногочисленные данные литературы посвящены протеолитической активности клеток *Corynebacterium diphtheriae* [1, 2]. Полагают, что их протеиназы имеют отношение к патогенезу дифтерии и к токсиногенезу [2]. Однако сведения об этих протеиназах дифтерии фрагментарны и скудны.

Цель настоящей работы – изучить особенности набора внутриклеточных протеиназ токсигенных и нетоксигенных штаммов коринебактерий дифтерии.

Клетки *Corynebacterium diphtheriae* (шт. 4895, 10648, PW-8, BB-1-9) культивировали в стеклянных флаконах емкостью 50 мл, содержащих по 10 мл питательной среды: бульона Лингуда (панкреатический гидролизат говядины с последующим дрожжевым дображиванием) или бульона Мартена (пептический автолизат свиных желудков). В ряде экспериментов в питательную среду добавляли 10% телячьей или лошадиной сыворотки крови. Флаконы с инокулированной средой инкубировали при 37°C при периодическом взбалтывании. Рост биомассы учитывали турбидиметрически при 650 нм. Ежедневно отбирали аликвоты культуральной жидкости, отделяли клетки от жидкой фазы центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин, отмывали их 0,15 М раствором NaCl, разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Протеолитическую активность определяли по лизису фибриногена или казеина в тонком слое агар-агара как подробно описано в нашей статье [3]. Концентрация казеина составляла 10 г/л, агар-агара – 15 г/л. В качестве растворителя для приготовления пластин использовали 0,15 М раствор NaCl pH 7,4. Пластины с нанесенными пробами инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой пластин 2 н трихлоруксусной кислотой. Содержание белка определяли колориметрически [4]. Все исследования выполнены не менее, чем 4-кратно. Результаты обработаны статистически.

В динамике роста коринебактерий на бульоне Мартена казеинолитическая активность (КА) различных штаммов проявляла разную чувствительность к группоспецифическим ингибиторам (10^{-3} М) протеиназ. В целом, фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ) слабо ингибировал КА внутриклеточных протеиназ: угнетение активности, как правило, не превышало 30%. Более того, у штамма PW-

8 в первые сутки роста этот эффектор вызвал увеличение данной активности на 42%. К действию р-хлормеркурибензоата (ПХМБ) были более чувствительна КА шт. 4895 и ВВ-1-9, где угнетение активности достигало 60% и 53% соответственно. КА разрушенных клеток РВ-8 была резистентна к этому ингибитору, и лишь на 5 сутки роста угнетение составило 30%. ЭДТА подавлял протеолитической активности, как правило, не менее, чем на 60%. Причем, к действию ЭДТА протеиназы были чувствительны (особенно шт. 10648 и ВВ-1-9) на протяжении всех 5 суток культивирования микроорганизмов. Наиболее сильно подавлял КА внутриклеточных протеиназ коринебактерий о-фенантролин. Демонстративнее всего он действовал на протеиназы шт. 4895: 77-100% угнетения. Сильно действовал этот ингибитор и на клетки шт. РВ-8 (особенно начиная с 3-их суток роста), в меньшей степени, на клетках 10648. Наиболее резистентна к о-фенантролину КА протеиназ шт. ВВ-1-9.

Дальнейшие исследования особенностей системы внутриклеточного протеолиза коринебактерий шт. РВ-8 показали, что фибриногенолитические внутриклеточные протеиназы (ФЛП) клеток 3-х суточной культуры полностью угнетались ионами Hg^{2+} ($10^{-3}M$) независимо от использованной для культивирования среды. Вне такой зависимости, в целом, вызвали увеличение фибриногенолитической активности (ФА) ионы Fe^{2+} : на 50-65%. На данную активность слабо влияли ионы Pb^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . Действие остальных ионов зависело от использованной питательной среды: ионы Co^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} в случае бульона Лингуда вели к увеличению протеолитической активности на 20-30%, а ионы Ca^{2+} угнетали ее на 50%. Если культивирование вели на бульоне Мартена, ФЛП подавлялись ионами Cr^{3+} на 24% и активировались ионами Zn^{2+} на 30%. ФА внутриклеточных протеиназ шт. РВ-8 полностью подавлялась добавками о-фенантролина. Действие остальных ингибиторов зависело от использованной для культивирования среды: на бульоне Мартена эта активность подавлялась на 50% ФМСФ, на 35% и на 25% соответственно ПХМБ и ЭДТА. Протеиназы же клеток, выращенных на бульоне Лингуда, были малочувствительны к добавкам указанных ингибиторов. Действие перехватчиков ($10^{-2}M$) активных форм кислорода на активность ФЛП проявлялось следующим образом. Вне зависимости от использованной питательной среды, их активность была малочувствительна к добавкам гистидина, триптофана, метионина, формиата. Протеиназы полностью блокировались нитротетразолиевым синим и азидом. При культивировании же микроорганизмов на бульоне Мартена внутриклеточные протеиназы на 40% подавлялись добавками адреналина, маннита и тиомочевины. Внутриклеточные ФЛП были активны не только при рН 7,4. Вне зависимости от питательной среды их активность проявлялась при рН 3 и 10: она составляла 75% и 70% соответственно от определяемой при рН 7,4. Активность подобных протеиназ угнеталась добавками цистеина. Однако клетки, выращенные на бульоне Лингуда, проявляли чувствительность цистеину лишь в концентрации $10^{-2}M$ (угнетение составило 20%). Культивирование на бульоне Мартена вело к образованию протеиназ, отличающихся сложной концентрационной зависимостью реакции на добавки цистеина. Причем, степень угнетения ФА достигла 60%. Выращенные на бульоне Мартена клетки имели внутриклеточные протеиназы, ФА которых была мало чувствительна к добавкам неорганического ортофосфата, но изменялась в присутствии неорганического пирофосфата. Причем, ингибиторное действие усиливалось при более низких концентрациях фосфата и достигало 25% при концентрации $10^{-6}M$. Культивирование же на бульоне Лингуда вело к образованию протеиназ, активность которых подавлялась неорганическим ортофосфатом на 25% ($10^{-3}M$) и пирофосфатом на 22% ($10^{-2}M$). Культивирование клеток шт. РВ-8 на обеих средах вело к проявлению фибриногенолитических протеиназ на 20-32% подавляемых добавками NADP или NADPH, на 25-35% - 2,3-AMP, GTP и резистентных к UDP. Именно клетки, выращенные на бульоне Лингуда обладали ФЛП, активность которых подавлялась ADP и 3,5-AMP на 25%, AMP - на 35%, а АТР - на 50%.

Итак, судя по действию группспецифических ингибиторов, набор внутриклеточных протеиназ, расщепляющих использованные нами белковые субстраты, у коринебактерий дифтерии имеет специфические черты в зависимости от штамма, используемой питательной среды и фазы развития культуры.

Список литературы

1. Смирнова Е.А., Машилова Г.М.// Журнал микробиол. эпидемиол. иммунобиол. - 1962. - № 5. - С. 10-14.
2. Мельников Н.И., Мельников В.Н., Гимранов М.Г. "Ферменты патогенности" и токсины бактерий. Медицина. М., 1969, 252 с.

3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. // Роль антропогенных и природных катионов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты проблемы. Матер. Междунар. конф. Минск, 1999. С. 326-342.
4. Bradford M.M. // Anal Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| ЛОБАНОК А.Г. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ В БЕЛАРУСИ..... | 4 |
| СТЕЛЬМАХ В.А., ДОРОГУШ В.М., ЛОБАНОК А.Г., ШОЛОМИЦКАЯ Н.Ф. ОСВОЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВА НОВЫХ БИОПРОДУКТОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В РАМКАХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ»..... | 6 |
| МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ..... | 9 |
| ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ..... | 38 |
| СЕЛЕКЦИЯ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ. НАПРАВЛЕННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК..... | 132 |
| МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 183 |
| БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ..... | 226 |
| БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, МЕДИЦИНЫ И СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА. ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ..... | 268 |
| ПОЧВЕННАЯ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ..... | 355 |
| ПРИБОРЫ И РЕАКТИВЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ; ПРОДУКТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА..... | 392 |
| АВТОРСКИЙ ИНДЕКС..... | 398 |

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ: материалы Международной конференции

Технический редактор канд. биол. наук Л.И. Сапунова

Материалы предоставлены в виде,
готовом для осуществления полиграфического исполнения издания

Подписано в печать 12.05.2004. Формат 60x84 в 1/8. Гарнитура Times. Бумага офсетная 65 г/м².

Печать офсетная. Усл. печ. л. 47,14. Уч.-изд. л. 38,79. Тираж 150 экз. Заказ № 581. 2004 г.

Типография ОДО «НоваПринт», ЛП 02330/0056647 от 27.04.2004.

Выдана Министерством информации РБ

220007 Республика Беларусь, Минск-7, а/я 16, ул. Купревича, 2. Тел./факс (017) 228 04 27

