

А. М. ДИЛАНЯН

## К ВОПРОСУ ПРОТЕОЛИЗА ПАТОГЕННЫХ И АПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Еще в 1934 году Райстрик и Топли [7] подвергли убитые ацетоном и высушенные в вакууме бактериальные тела триптического перевариванию с целью получения антигенов небелковой природы и изучения свойств эндотоксинов. Гостев и Карасева изучали растворимый антиген, полученный при быстром лизисе бактерий панкреатином, контролируя лизис бактериальных тел электрофотометром [1]. Косова, Замуховская и др. [3] занимались изучением вопроса об иммунологической характеристике комплексных антигенов бактерий кишечной группы, полученных методом триптического переваривания живых культур.

Применение метода триптического переваривания микробных тел имеет большое практическое значение для приготовления биологических препаратов; оно может иметь и прикладное значение для анализа иммунохимически активных и специфических компонентов микробной клетки.

Для получения растворимых антигенов и их фракционирования, а также изучения патогенных и апатогенных кишечных палочек необходимо предварительно выяснить оптимальные условия триптического переваривания этих культур. Этой задаче и посвящено данное сообщение.

Трипсин является эндопептидазой, его специфическое действие заключается в расщеплении пептидных связей, содержащих карбоксильные группы сильнощелочных аминокислот (лизин, аргинин) и эстеры аминокислот [6]. По литературным данным [5], патогенные штаммы кишечной палочки 055:В5 и 0111:В4 содержат меньше белка, чем апатогенные формы. При сравнении аминокислотного состава двух гидролизатов бактериальных тел кишечной палочки 0111:В4 и *E. coli* communiс 1715 нами было обнаружено на хроматограммах некоторое различие.

**Материал и методика исследования.** В качестве субстрата мы пользовались термоденатурированными белками бактериальных суспензий эталонных штаммов возбудителей колиэнтеритов и апатогенными штаммами кишечной палочки, которые были получены из Государственного центрального института биопрепаратов им. Тарасевича. Денатурация белковых компонентов кишечных палочек проводилась термической обработкой при 65, 75, 95 и 133° в течение 20 мин. Отмытые суточные агаровые культуры стандартизировали фотоэлектроколориметром ФЭК-М, суспензии затем нагревали и проверяли на стерильность. Протеолиз проводили при рН 5, рН 7, и рН 8 с 10 мг трипсина на 50 млд м/т, а при рН 8,0 определяли оптимальную концентрацию трипсина, добавляя от 0,25 до 15 мг трипсина к гретым суспензиям, разливали в кюветы рабочей длиной 5 мм и немедленно помещали в ультратермостат при 40°, где и происходил протеолиз; фотометрировали с интервалами 30 мин.

в течение трех часов наблюдения двумя повторностями каждую пробу. Приводим только начальные и конечные данные.

Полученные результаты этого экспериментального материала обработаны методом биологической статистики, которые статистически достоверны.

**Результаты исследования.** Протеолиз происходил в условиях рН 5 среды различной интенсивностью при нагревании бактериальных суспензий патогенных и апатогенных штаммов кишечной палочки при 65°. Сравнительно сильный протеолиз имел место у апатогенных культур кишечной палочки, чем у патогенных того же вида, что, по-видимому, связано со степенью денатурации белка. Можно предположить, что белковые компоненты энтеропатогенных штаммов кишечной палочки более резистентны, чем у апатогенных культур, что подтверждается также ростом на агаре при проверке стерильности гретых суспензий при 65°. Вышеуказанное предположение находит свое обоснование также при изложении результатов экспериментального материала при термической обработке бактериальных суспензий кишечных палочек при 75, 95 и 130°, а также при наблюдении протеолиза с различными концентрациями фермента.

Усиливается протеолиз при 40° термоденатурированных белков бактериальных суспензий кишечных палочек при 75°, в конце наблюдения данные оптической плотности почти выравниваются. С повышением степени термической обработки (95 и 133°) бактериальных суспензий более резкое падение оптической плотности наблюдается у патогенных культур.

Таким образом, степень термической обработки при рН 5 оказывает определенное влияние на кинетику триптического переваривания бактериальных суспензий кишечных палочек, особенно на патогенные формы.

Постановка опытов триптического переваривания при рН 7 показала, что патогенные бактериальные суспензии, гретые при 65°, также лизируются значительно слабее апатогенных культур кишечных палочек, т. е. имеется такое же различие, как при 65° термической обработке при рН 5.

Увеличивая степень нагрева суспензий, усиливается и протеолиз культур: гретые при 95 и 133° патогенные культуры лизируются интенсивнее апатогенных культур, что наблюдается как в начале, так и в конце наблюдений.

Следовательно, проведение протеолиза гретыми суспензиями кишечных палочек, термоденатурация белков бактериальных тел при 65° происходит слабее у патогенных форм кишечных палочек, что и сказывается на ходе ферментативного действия при рН 7.

Фотометрические определения оптической плотности исследуемых суспензий при рН 8 показали, что протеолиз патогенных культур, гретых при 65°, также отстает от лизиса апатогенных форм, но в меньшей степени. Гретые суспензии при 75° лизируются почти одинаково, с некоторым отставанием протеолиза патогенных культур от патогенных при 95 и 133° термической обработке.

Таблица 1

Протеолиз гретых суспензий кишечных палочек при различных температурных условиях и различных рН среды

Наименование культур	Термическая обработка при	Фотометрическое определение оптической плотности ФЗК—М						
		0 мин.	рН 5		рН 7		рН 8	
			30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	65°	2,04	1,23±0,26	0,95±0,26	0,93±0,18	0,79±0,15	0,76±0,14	0,64±0,13
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,90±0,10	0,68±0,11	0,62±0,11	0,51±0,10	0,57±0,10	0,50±0,09
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	75°	2,04	0,74±0,19	0,50±0,11	0,63±0,18	0,420	0,60±0,16	0,450
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,60±0,12	0,52±0,11	0,54±0,11	0,51±0,10	0,55±0,11	0,50±0,10
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	95°	2,04	0,50±0,08	0,38±0,06	0,44±0,06	0,37±0,04	0,43±0,06	0,38±0,06
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,59±0,10	0,44±0,07	0,50±0,08	0,46±0,07	0,42±0,08	0,33±0,09
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	133°	2,04	0,46±0,06	0,33±0,04	0,41±0,04	0,24	0,38±0,04	0,28
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,51±0,08	0,31±0,09	0,43±0,07	0,32±0,07	0,42±0,07	0,33±0,07

Таблица 2

Протеолиз гретых суспензий кишечных палочек при различных концентрациях трипсина

Наименование культур	Термическая обработка при	Экспозиция времени фотометра						
		0,25 мг		0,5 мг		1,0 мг		
		0 мин.	30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	65°	2,06	1,71±0,11	0,76±0,08	1,43±0,07	0,71±0,13	1,06±0,13	0,62±0,13
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	1,72±0,09	0,94±0,20	1,44±0,16	0,58±0,15	0,86±0,11	0,45±0,09
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	75°	2,06	1,66±0,08	0,66±0,08	1,26±0,08	0,41±0,06	0,77±0,12	0,39±0,07
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	1,71±0,06	0,94±0,20	1,47±0,15	0,53±0,10	1,47±0,15	0,53±0,10
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	95°	2,06	1,62±0,06	0,78±0,08	1,20±0,10	0,52±0,08	0,90±0,14	0,40±0,06
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	1,67±0,10	1,00±0,17	1,33±0,15	0,57±0,09	0,96±0,10	0,42±0,07
Энтеропатогенные штаммы . . . . .	133°	2,06	0,98±0,13	0,47±0,06	0,67±0,10	0,37±0,04	0,50±0,07	0,31±0,04
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	1,30±0,13	0,57±0,07	0,87±0,09	0,42±0,06	0,57±0,06	0,33±0,07

Таблица 3

Протеолиз густых суспензий кишечных палочек при различных концентрациях трипсина

Наименование культур	Термическая обработка при	5 мг		10 мг		15 мг		
		Экспозиция времени фотометра						
		0 мин.	30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.	30 мин.	180 мин.
Энтерпатогенные штаммы . . . . .	65°	1,99	0,74±0,19	0,62±0,15	0,84±0,18	0,71±0,15	0,84±0,19	0,73±0,16
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,64±0,12	0,46±0,08	0,60±0,10	0,51±0,11	0,63±0,12	0,56±0,11
Энтерпатогенные штаммы . . . . .	75°	1,99	0,41±0,06	0,37±0,05	0,46±0,06	0,43±0,05	0,52±0,06	0,48±0,06
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,59±0,09	0,43±0,10	0,53±0,11	0,47±0,11	0,58±0,12	0,54±0,11
Энтерпатогенные штаммы . . . . .	95°	1,99	0,39±0,03	0,32±0,04	0,42±0,04	0,37±0,04	0,48±0,04	0,42±0,04
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,54±0,08	0,41±0,07	0,48±0,08	0,43±0,08	0,52±0,08	0,35±0,07
Энтерпатогенные штаммы . . . . .	133°	1,99	0,34±0,04	0,25±0,09	0,37±0,03	0,28±0,04	0,43±0,03	0,31±0,05
Апатогенные штаммы . . . . .		2,07	0,42±0,06	0,28±0,07	0,42±0,06	0,31±0,07	0,44±0,08	0,36±0,07

Эти показатели оптической плотности гретых суспензий различных штаммов кишечных палочек при триптическом переваривании позволяют предполагать различие термостабильности белков патогенных и апатогенных форм кишечных палочек.

Для фракционирования кишечных палочек протеолиз целесообразно проводить при рН 8, а термическую обработку при 75° в течение 20 мин. При высоких температурных условиях термической обработки бактериальных суспензий кишечных палочек рН среды сравнительно меньше влияет на интенсивность протеолиза. Для определения ферментативной активности бактериальной биомассы считаем целесообразным учесть не только начальную скорость ферментативного действия, но и конечные результаты протеолиза, так как бактериальная клетка представляет сложную субстанцию со сложной архитектурой.

Для определения оптимальной концентрации трипсина были применены слабые (0,25 и 0,5 мг), средние (1,0 и 5,0 мг) и высокие концентрации его (10 и 15 мг). Результаты приведены в табл. 2 и 3. При добавлении 0,25 мг трипсина к грым бактериальным суспензиям патогенных и апатогенных штаммов кишечных палочек наблюдается ступенчатый протеолиз, с некоторым отставанием апатогенных штаммов. Наиболее низкие показатели оптической плотности получены при нагревании культур при 133°.

При добавлении 0,5 мг трипсина отмечен сравнительно ускоренный протеолиз, выраженный при термической обработке 75° и выше.

В той или иной мере имеются более низкие показатели оптической плотности суспензий патогенных культур, чем апатогенных культур во всех случаях фотометрии, за исключением патогенных суспензий, грым при 65°. Таким образом, низкие концентрации трипсина действуют относительно слабо, что наглядно даже через 30 мин. инкубации.

Средние концентрации трипсина оказывают сильное ферментативное действие как в начале, так и в конце наблюдения. Необходимо отметить, что степень термической обработки также влияет на ферментативный эффект при добавлении к бактериальным суспензиям 1—5 мг трипсина, т. е. при средних концентрациях этого фермента. Протеолиз патогенных и апатогенных штаммов, грым при 75° и выше, протекает активно, данные становятся очень близкими или же сходятся.

Таким образом, можно отметить, что от 1 до 5 мг трипсина на 50 мл. м/т кишечных палочек является оптимальным количеством для проведения триптического переваривания грым культур при 75° и выше при рН 8.

Наконец, при проведении протеолиза изучаемых культур применение высоких концентраций трипсина показало отсутствие различия в ферментативном эффекте по сравнению со средней концентрацией трипсина.

Ա. Մ. ԴԻԱՆՅԱՆ

ԱԽՏԱԾԻՆ ԵՎ ՈՉ ԱԽՏԱԾԻՆ ԱՂԻՔԱՅԻՆ ՅՈՒՊԻԿՆԵՐԻ ՊՐՈՏԵՆՈԼԻԶԻ  
ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՉԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկա աշխատության մեջ մենք նւրատակ ենք դրել պարզել ախտածին և ոչ ախտածին աղիքային ցուպիկների տրիպտիկ մարման ժամանակ օպտիմալ մի քանի պայմանները:

Վիճակագրության մեթոդով: Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ախտածին և ոչ ախտածին աղիքային ցուպիկները տարբեր աստիճանի ջերմային մշակման ժամանակ և միջավայրի որոշ պայմաններում պրոտեոլիզը ընթանում է տարբեր ինտենսիվությամբ, որը թույլ է տալիս ենթադրելու հետազոտվող կուլտուրաների սպիտաների ջերմակայունության տարբերության մասին: Տրիպսինների օպտիմալ քանակությունը որոշելու համար փորձերը տարվել են միջավայրի pH 8,0 պայմաններում, օգտագործելով թույլ, միջին և բարձր կոնցենտրացիաներ: Տրիպսինի միջին կոնցենտրացիաները ունենում են էնզիմատիկ ազդեցություն այդ ֆերմենտի ավելի բարձր կոնցենտրացիան չունի ավելի բարձր էնզիմատիկ էֆեկտ:

Մեր ուսումնասիրությունը թույլ է տալիս անելու հետևյալ եզրակացությունները.

1. Աղիքային ցուպիկների սուսպենզիաների 75° ջերմային մշակման միջոցով կարելի է ստանալ նրանց սպիտակուցային կոմպոնենտների մեղմ բնափոխում, իսկ 65° տաքացման ժամանակ մնում են ջերմակայուն ձևեր, որոնք և որոշ չափով արգելակում են պրոտեոլիզը:

2. Աղիքային ցուպիկների պրոտեոլիզի համար օպտիմալ կարելի է համարել pH 8,0, իսկ տրիպսինի օպտիմալ կոնցենտրացիան 1—5 մգ 50 մլ գ ախտածին և ոչ ախտածին աղիքային ցուպիկների համար:

3. Աղիքային ցուպիկների ավելի ինտենսիվ պրոտեոլիզ ընթանում է, երբ նրանց սպիտաները ենթարկվում են ավելի խիստ բնափոխման (95 և 133°):

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гостев В. С. и Чекин В. Ф. Лабораторное дело, 4, 54—58, 1958.
2. Бейли Н. (Norman G. J. Vaily, 1959). Статистические методы в биологии, ИЛ., М., 1—92, 1962.
3. Косова А. К., Замуховская А. Н. и др. Научн. основы произ. бакт. препаратов (Моск. ин-т вакцин и сывор. им. Мечникова), т. X, 33—42, 1961.
4. Ойвин И. А. Патологич. физиол. и эксперимент. терапия, 4, 76—85, 1960.
5. Ташпулатов Р. Ю., Колчинская Т. Я. Руков. по микр. клинике и эпидемиол. инфекцион. болезней, т. IV, стр. 129 (ссылка из работы Голубевой И. В.), 1964.
6. Штрауб Ф. Б. Биохимия, изд. АН Венгрии, Будапешт, 101 и 498, 1965.
7. Raistrick H. a. Topley W. Brit. J. of exper. pathol., 15, p. 113—130, 1934.