

О.В.Громова, И.А.Кузьмиченко, М.Н.Киреев, О.Д.Клокова, В.С.Бронникова

**ФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ И ЕЕ КОМПОНЕНТАХ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Представлены данные по выявлению и характеристике фосфомоно-эстеразной и фосфодиэстеразной активности в детоксицированной культуральной жидкости производственных штаммов 569В и М41 холерного вибриона, в компонентах вакцины – холерогене-анатоксине и О-антигенной фракции. Показано присутствие этих ферментов в таблетке холерной вакцины, что более полно характеризует ее биохимические свойства.

*Ключевые слова:* холерная вакцина, компоненты вакцины, фосфомоноэстераза, фосфодиэстераза.

O.V.Gromova, I.A.Kuz'michenko, M.N.Kireev, O.D.Klokov, V.S.Bronnikova

**Phosphatase Activity in Chemical Cholera Vaccine and its Components***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Presented are the data on detection and characterization of phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in detoxicated cultural fluid of production *Vibrio cholerae* strains 569B and M41, and in cholera toxin and O-antigenic fraction, the vaccine components. These enzymes were demonstrated to be present in the cholera vaccine tablet, thus its biochemical properties were characterized more completely.

*Key words:* cholera vaccine, vaccine components, phosphomonoesterase, phosphodiesterase.

Коммерческая химическая бивалентная холерная вакцина, помимо основных иммуногенов – холерогена-анатоксина и О-антигенов Инаба и Огава, имеет в своем составе ряд экзоферментов, поступающих в культуральную жидкость в процессе глубокого выращивания штаммов-продуцентов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава [2, 3]. Поскольку выделение двух специфических компонентов вакцины из центрифугатов формализованной культуральной жидкости проводят при достаточно широком диапазоне насыщения серноокислым аммонием, присутствие в этих фракциях других белков, в том числе ферментов, вполне объяснимо. Спектр ферментов, обнаруженных в целевом продукте холерной вакцины (таблетках), довольно обширен, в настоящее время есть сведения о присутствии в них протеазы, нейраминидазы, фосфолипаз А<sub>2</sub> и С, лизофосфолипазы, липазы (твиназы), ДНК-азы, РНК-азы, амилазы, АТФ-азы [1, 4]. Можно предположить наличие в вакцине и других ферментов. Мы остановили свое внимание на фосфатазах. Как известно, эти ферменты широко распространены в различных организмах, гидролизуя эфиры фосфорной кислоты, они обладают важными биологическими функциями, участвуют в регуляции метаболических реакций клеток и снабжении их неорганическим фосфатом [5]. При этом выделяют две группы фосфатаз, гидролизующих моно- и дизфиры фосфорной кислоты.

У возбудителя холеры серовара Эльтор и О139 серогруппы «Bengal» Е.С.Филякиной и соавт. обнаружены три внутриклеточных и два внеклеточных белка с фосфомоноэстеразной активностью при ис-

пользовании в качестве субстрата п-нитрофенилфосфата. Фосфатазная активность выявлена в нативном очищенном холерном токсине по отношению к различным субстратам, в том числе к синтетическим – п-нитрофенилфосфату и бис-п-нитрофенилфосфату [6]. Фосфатазную активность в холерной вакцине практически не изучали, имеются лишь сообщения об отсутствии активности щелочной фосфатазы в холерогене-анатоксине и наличии АТФ-азной активности в таблетках [1].

Цель работы состояла в выявлении и изучении некоторых свойств внеклеточной фосфомоноэстеразной и фосфодиэстеразной активности в белковых фракциях, выделенных из детоксицированной культуральной жидкости производственных штаммов холерного вибриона, в холерогене-анатоксине и таблетках холерной вакцины.

**Материалы и методы**

Детоксицированную культуральную жидкость, полученную после выращивания производственных штаммов холерного вибриона в реакторе, фракционировали путем осаждения сульфатом аммония для получения фракций, содержащих протективные антигены. Из культуральной жидкости штамма 569В серовара Инаба получали фракции 20–50 и 50–80 % насыщения, у штамма М41 серовара Огава – 0–50 и 50–80 % насыщения с последующим отделением осадков и их диализом. Кроме этих фракций, в опыты брали несколько серий лиофилизированного холерогена-анатоксина, а также получаемые после

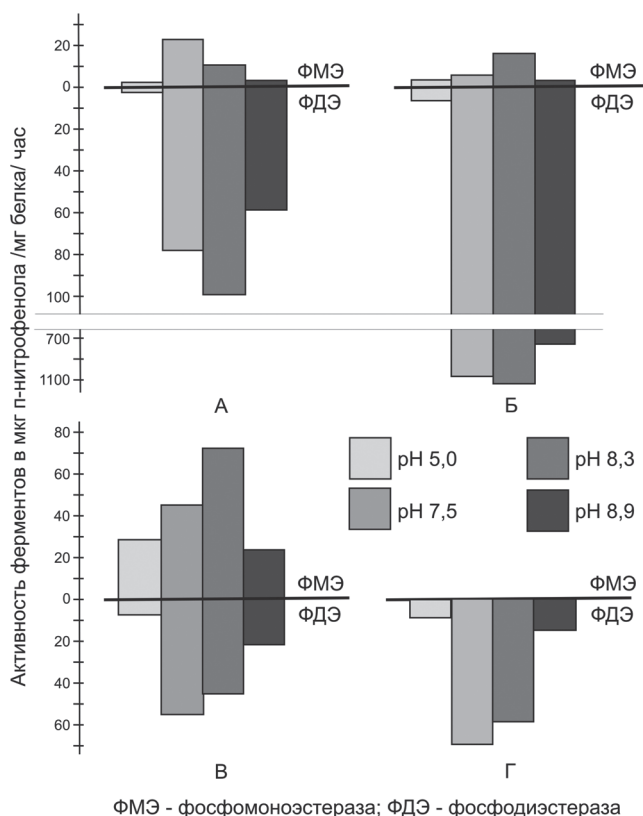
ультрафильтрации культуральной жидкости О-антигенный концентрат, ферментный комплекс протеовибрин и таблетки коммерческой вакцины разных серий. Таблетку измельчали в 2 мл 0,85 % раствора NaCl, настаивали в течение 4 ч при комнатной температуре, добавляли еще 2 мл и центрифугировали для отделения нерастворимой части.

Фосфатазную активность определяли общепринятыми методами с синтетическими хромогенными субстратами – п-нитрофенилфосфатом (Sigma) для фосфомоноэстеразы (ФМЭ) и бис-п-нитрофенилфосфатом (Serva) для фосфодиэстеразы (ФДЭ). Активность выявляли в 0,05 М трис-буфере при pH 5,0; 7,5; 8,3 и 8,9; в 0,05 М цитратном буфере (pH 4,8) и в 0,05 М глициновом буфере (pH 9,9). В качестве активатора фермента использовали ионы магния. Реакцию ставили в микропланшетах, раститровывая препарат двукратно при постоянном объеме субстратной смеси. Учет реакции по образованному п-нитрофенолу проводили на Titertek Multiskan Plus при 405 нм. Из показаний вычитали контрольные значения на окраску препаратов и субстрата. Активность выражали в мкг п-нитрофенола, образованного на 1 мг белка за 1 ч при 37 °С. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами.

**Результаты и обсуждение**

Во фракциях, выделенных из культуральной жидкости штамма 569В, присутствовали оба вида активности, максимально она проявлялась при pH 7,5–8,3 в трис-буфере (рисунок). Как правило, щелочная фосфатаза в различных органах и тканях имеет наибольшую активность при pH 9,0–10,0, однако в наших опытах в глициновом буфере (pH 9,9) ФМЭ-активность практически отсутствовала, поскольку, как оказалось, ее pH-оптимум в культуральной жидкости был смещен в менее щелочную область. Что касается кислой фосфатазы, активной при pH 4,5–5,0, то ее также не удалось обнаружить. Отсутствие данной активности может быть связано с тем, что детоксикация культуральной жидкости формальдегидом инактивирует некоторые экзоферменты частично или полностью, поэтому возможность инактивации должна быть учтена при выявлении ферментов после формализации.

Судя по полученным данным, такому воздействию не подвержена ФДЭ-активность. Наиболее значимым показателем было ее превосходство (более чем в 200 раз) над ФМЭ-активностью, особенно это характерно для фракции 50–80 % насыщения штамма 569В, белки которой входят в состав холероген-анатоксина. Такой высокой ФДЭ-активности не было в обеих фракциях из культуральной жидкости штамма М41, их особенностью была самая высокая среди других фракций ФМЭ-активность у фракции 20–50 % насыщения и полное ее отсутствие во фракции 50–80 % насыщения при сохранении в ней ФДЭ-активности.



Активность фосфатаз во фракциях из культуральной жидкости штаммов 569В и М41 холерного вибриона:

А, Б – фракции 0–50 и 50–80 % насыщения сульфатом аммония, штамм 569В; В, Г – фракции 20–50 и 50–80 % насыщения сульфатом аммония, штамм М41

Помимо различий в распределении активности по фракциям как у одного штамма, так и между двумя штаммами, разница между обоими ферментами проявлялась в отношении активатора – для ФМЭ-активности были необходимы ионы магния, у ФДЭ такой зависимости не обнаружено. Последнее свойство отмечено и другими исследователями [6].

Анализ активности непосредственно в компонентах вакцины и таблетках показал присутствие обоих видов фосфатаз во всех препаратах, однако следует учитывать, что О-антигенная фракция на стадии полуфабриката подвергается термической стерилизации, и вклад в активность таблетки вносит холероген-анатоксин (таблица). Комплексный ферментный препарат протеовибрин также обладал обоими активностями, однако ФДЭ-активность в нем оказалась неожиданно высокой, хотя во фракциях из

**Фосфатазная активность в компонентах вакцины, протеовибрине и в таблетках**

Штамм	Препарат	Активность в мкг п-нитрофенола/мг белка/ч	
		фосфомоноэстераза	фосфодиэстераза
569В	Холероген-анатоксин	17,2±3,1	280,7±16,2
М41	О-антиген концентрат	31,4±5,3	68,0±5,5
М41	Протеовибрин	19,1±1,7	1140,0±97,2
569В + М41	Таблетки холерной вакцины	5,9±0,9	364±27,4

культуральной жидкости штамма М41 ее уровень не так высок. Помимо того, концентрирование ФДЭ-азы в протеовибрине косвенно указывает на ее небольшую молекулярную массу, поскольку при ультрафильтрации через селективные волоконные фильтры в ультрафильтрат проникают молекулы с массой не выше 45 кДа [4].

Таким образом, в культуральной жидкости обоих производственных штаммов холерного вибриона при использовании синтетических хромогенных субстратов обнаружены два вида фермент – фосфомоноэстераза и фосфодиэстераза. Для конкретизации природных субстратов действия ферментов нужны дополнительные исследования, поскольку для фосфатаз, в целом, характерна широкая субстратная специфичность [5]. Фосфомоноэстеразы, наряду с гидролизом фосфорилированных сахаров, нуклеотидфосфатов, фосфопроизводных аминокислот, способны также катализировать перенос фосфорильных групп на другие молекулы, участвуя в регуляторных реакциях клетки. Значение фосфодиэстеразы проявляется в том, что она входит в состав важнейшей регуляторной системы циклического 3',5'-аденозинмонофосфата, гидролизуя этот метаболит до адениловой кислоты (АМФ). Кроме того, реакцию по типу фосфодиэстераз катализируют дезоксирибонуклеазы, расщепляя фосфодиэстеразную связь в полинуклеотидах, а также фосфолипазы С и Д в фосфолипидах [5].

Обнаружение и характеристика активности внеклеточных фосфомоноэстеразы и фосфодиэстеразы, их устойчивость, особенно у последней, к действию формальдегида и сохранение активности на этапах приготовления вакцины из производственных штаммов 569В и М41 позволяет более полно охарактеризовать биохимические свойства целевого продукта – таблеток холерной вакцины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джэпаридзе М.Н., Никитина Г.П., Иванов Н.Р., Рысцова Е.А., Удалова И.Б., Караева Л.П. и др. Биохимическая и иммунохимическая характеристика новой оральной холерной химиче-

ской бивалентной вакцины и результаты испытания препаратов на добровольцах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1982; 11:29–33.

2. Джэпаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В. Оральная химическая вакцина из гипертокси-генных штаммов КМ76 Инаба и КМ68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.

3. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Активность ферментов в динамике глубинного роста производственных штаммов холерного вибриона О1 и О139 серогрупп. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:86–9.

4. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Еремин С.А., Белякова Н.И., Клокова О.Д. и др. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной. Биотехнология. 2010; 2:87–92.

5. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. М.: Мир; 1980.

6. Мишанькин М.Б., Васильева Г.И., Шиманюк Н.Я., Шевченко Л.А., Козловский В.Н., Мишанькин Б.Н. Фосфатазная активность очищенных препаратов энтеротоксинов холерного вибриона. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:85–90.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Dzhaparidze M.N., Nikitina G.P., Ivanov N.R., Rystsova E.A., Udalova I.B., Karaeva L.P. et al. [Biochemical and immunochemical characteristics of a new oral, chemical cholera bivalent vaccine and results of a trial of the preparation on volunteers]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1982; 11:29–33.

2. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.B. [An oral chemical vaccine from the hypertoxigenic strains of the causative agent of cholera KM-76 Inaba and KM-68 Ogawa]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.

3. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Belyakova N.I. [Enzymatic activity in the dynamics of submerged cultivation of productional *Vibrio cholerae* strains O1 and O139 serogroups]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (86):86–9.

4. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Eremin S.A., Belyakova N.I., Klokova O.D. et al. [Monitoring of enzyme activities during production of cholera bivalent tablet vaccine]. Biotekhnologiya. 2010; 2:87–92.

5. Metsler D. [Biochemistry: the chemical reactions of living cell]. M.; 1980.

6. Mishan'kin M.B., Vasil'eva G.I., Shimanyuk N.Ya., Shevchenko L.A., Kozlovsky V.N., Mishan'kin B.N. [Phosphatase activity of purified preparations of *Vibrio cholerae* enterotoxin]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (85):85–90.

#### Authors:

Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Klokova O.D., Bronnikova V.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Клокова О.Д., Бронникова В.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 14.06.11.