

*На правах рукописи*



ГРЯДСКИХ ДИАНА АНАТОЛЬЕВНА

**СИНТЕЗ КОМПОЗИЦИОННЫХ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ  
С МАГНИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ  
И ИХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ЧУМНЫХ  
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

03.00.23 — биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ставрополь - 2004

Работа выполнена в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
**Тюменцева Ирина Степановна**

**Официальные оппоненты:** доктор фармацевтических наук  
**Кузякова Людмила Михайловна**

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Чижова Людмила Николаевна**

**Ведущая организация:** **Северо-Кавказский государственный  
технический университет**

Защита состоится 7 июля 2004 года в 12<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.04 при Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1, корпус 2, ауд. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета по адресу: 355009, г.Ставрополь, ул. Пушкина, д.1, корпус 1.

Автореферат разослан « 4 » июня 2004 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Т.И. Джандарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** На современном этапе развития биотехнологии весьма актуальными являются исследования, направленные на решение проблемы разработки высокоэффективных методов экспресс-диагностики особо опасных инфекций и индикации их возбудителей. Для достижения цели широко используют методы твердофазного иммунохимического анализа, основанные на применении магноиммуносорбентов.

Перспективно практическое использование магнитоуправляемых адсорбционных материалов для иммобилизации микроорганизмов в качестве инокулята при глубинном аппаратном культивировании. Разработка данной технологии обеспечивает получение биологически активных компонентов, которые необходимы на последующих этапах при конструировании диагностических тест-систем применяемых в иммуноанализе микроорганизмов.

Научно-практический интерес в данном направлении связан с повышением чувствительности, специфичности и достоверности иммунохимической диагностики особо опасных инфекций, что во многом определяется качественными показателями магносорбентов. В настоящее время существуют проблемы с оптимизацией компонентного состава органокремнеземных композиционных сорбентов, а также весьма интересен аспект количественного регулирования магнитных свойств данных сорбционных материалов. Решение указанных проблем открывает возможности создания новых высокоэффективных диагностических тест-систем, применяемых в медицине и ветеринарии.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилось системное решение научных проблем получения композиционных аффинных сорбентов и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов.

При выполнении работы предстояло решить следующие задачи:

1. Разработать технологию хитозанкремнеземных сорбентов, исследовать их состав и физико-химические свойства;
2. Получить элементоксидные кремнеземные сорбенты с заданным составом и строением;
3. Исследовать и установить наиболее эффективные методы иммобилизации белковых лигандов на поверхности композиционных магносорбентов;



4. Исследовать иммобилизацию на композиционных магносорбентах живых бактериальных клеток вакцинного штамма чумного микроба и разработать технологические этапы глубинного культивирования микроорганизмов штамма *Y. pestis EV*;

5. Разработать технологические аспекты конструирования твердофазных тест-систем для диагностики чумы и индикации ее возбудителя методом иммуоферментного анализа.

**Научная новизна работы.** Впервые разработана технология получения магноиммуносорбентов методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии хитозана, аэросила А-380 и оксалата железа. Установлено, что в процессе синтеза сорбента образование магнетита осуществляется при разложении оксалата железа, и активирующее воздействие данного процесса приводит к увеличению объема пор сорбентов до величины 1,55-1,63 см<sup>3</sup>/г.

Впервые количественно исследованы магнитные свойства композиционных магносорбентов, получаемых методом формирования пористой кремнеземной матрицы в присутствии аэросила А-380, хитозана и магнетита, и определено, что величина удельной намагниченности насыщения возрастает с увеличением содержания магнетита в составе сорбентов.

Иммобилизацией на поверхности композиционных хитозан-кремнеземных магносорбентов чумных иммуноглобулинов получены магноиммуносорбенты и установлено, что показатели их чувствительности, специфичности определяются стандартностью структурных характеристик сорбентов, ковалентным способом связывания лигандов.

На основе разработанных композиционных магноиммуносорбентов (КМИС) сконструированы диагностические тест-системы для экспресс-диагностики чумы и индикации ее возбудителя, которые в иммуоферментном анализе характеризуются чувствительностью  $1 \cdot 10^2$  м.к./мл по корпускулярным антигенам. Магноиммуносорбенты по чувствительности в иммуоферментном анализе (ИФА) по сравнению с применением полистироловых планшет превосходят известный метод более чем в 1000 раз, и при этом время постановки ИФА сокращается в 6-7 раз. Тест-системы сохраняют стабильность без потери активности в течение 1 года (срок наблюдения).

Проведены исследования по иммобилизации на разработанных композиционных магносорбентах живых бактериальных клеток

вакцинного штамма чумного микроба, изучены технологические возможности использования иммобилизованной формы инокулята для глубинного аппаратного выращивания биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

**Практическое значение работы.** На основе разработанных композиционных хитозанкремнеземных сорбционных материалов с магнитными свойствами сконструированы твердофазные тест-системы для экспресс-диагностики чумы и индикации ее возбудителя в иммуноферментном анализе, которые успешно апробированы в лабораторных и полевых условиях.

Методические приемы аппаратного культивирования *Y. pestis* EV с применением МИС-инокулята изложены в одобренных ученым советом (протокол № 3 от 29.03.04 г.) и утвержденных директором Ставропольского научно-исследовательского противочумного института методических рекомендациях «Глубинное культивирование вакцинного штамма чумного микроба с использованием магнитоуправляемых иммобилизованных систем».

Технология получения композиционных хитозанкремнеземных магносорбентов прошла промышленную апробацию в производственных условиях в специализированном ЗАО НПФ «Люминофор», что подтверждено соответствующим актом.

Практическая значимость и приоритетность выполненных исследований подтверждена выдачей дипломов 1 степени за разработку диагностической тест-системы, присужденных на выставках: Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология 2003» в г. Сочи, а также на Всероссийской конференции «Новейшие технологические решения и оборудование» в г. Кисловодске в 2004 году.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Разработка технологии получения композиционных хитозанкремнеземных магносорбентов методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы с образованием в процессе синтеза магнитного компонента из оксалата железа. Получение и исследование элементсодержащих сорбционных материалов.

2. Результаты количественных характеристик магнитных свойств магносорбентов с установлением закономерности возрастания удельной намагниченности насыщения, с увеличением содержания магнетита в составе сорбентов.

3. Разработанные условия иммобилизации на композиционных сорбентах живых бактериальных клеток вакцинного штамма чумного микроба и технологических этапов глубинного культивирования.

4. Разработка методами иммобилизации чумных иммуноглобулинов и антигенов магноиммосорбентов и конструирование на их основе высокочувствительных тест-систем для диагностики чумы и индикации ее возбудителя методом **ИФА**.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на научно-практических конференциях: в Ставропольском НИПЧИ, 2002, 2003 гг.; Международной конференции «Повестка дня на XXI век: программа действий — экологическая безопасность и устойчивое развитие» (Ставрополь, 2002 г.); Всероссийской конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2002 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии» (Ставрополь, 2002 г.); Всероссийской конференции «Биотехнология 2003» (Сочи, 2003 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 20 рисунков, приложения. Состоит из введения, обзора литературы, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 218 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении работы были использованы 14 штаммов микроорганизмов I, III и IV групп патогенности видов *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*.

Для синтеза композиционных кремнеземных сорбентов использовали аэросил А-380 (ГОСТ 14922-77 х.ч.) с содержанием основного вещества  $\text{SiO}_2$  — 99%; в качестве модификатора — хитозан  $M_w = 200000$ , степенью дезацетилирования 0,8 и степенью кристалличности 75% (завод им. Войкова, Москва); в качестве магнитного компонента применяли магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

В опытах применяли магнетит 50 белых мышей и 10 кроликов породы «Шиншилла».

Контроль общей и специфической стерильности проводили бактериологическим и биологическим методами согласно СП 1.2.011-94.

Фракцию 1 (Ф1) чумного микроба из бакмассы получали по Е.Е. Baker et al. (1952); Ф1 из культуральной жидкости изолировали методом изоэлектрической преципитации (Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С., 1983).

Водорастворимый белковый антигенный комплекс чумного микроба изолировали по схеме Е.Н. Афанасьева (2000).

Иммунизацию кроликов проводили по схеме, разработанной И.С. Тюменцевой (1996).

Постановку иммунодиффузии в агаровом геле проводили по методике О. Ouchterlony (1949).

Иммуноглобулины из гипериммунных чумных кроличьих сывороток выделяли фракционированием каприловой кислотой по методу (Steibuch G., Andran P., 1969).

Непрямой метод окраски чумного микроба флуоресцирующими иммуноглобулинами осуществляли по методу Т.Н. Weller, А.Н. Соус (1954).

Иммунопероксидазные чумные конъюгаты получали методом периодатного окисления по методике Р.К. Nakane, А. Kawaoi (1974) с использованием иммуноглобулинов G (Ig), выделенных из чумной гипериммунной кроличьей сыворотки крови.

Количество белка в биопрепаратах определяли спектрофотометрически на СФ-46 (Warburg O., Christian W., 1941).

Удельную поверхность сорбентов определяли по низкотемпературной адсорбции азота, используя методику А.А. Клячко-Гурвича (1961). Объем пор и их распределения по размерам — методом ртутной порометрии (Плаченев Т.Г., 1965).

Микроструктуру сорбентов исследовали на сканирующем электронном микроскопе IMZ—Т3000 при увеличении в 10000 раз (Фрайфельдер Я., 1980).

Спектроскопию сорбентов в УФ-области проводили в отраженном диффузно-рассеянном свете в диапазоне 290—700 нм на приборе AQV-50 «Shimadzu» (Япония) (Русин Г.Г., 1990). ИК-спектры сорбентов исследованы на спектрофотометре Specord-75IR (Германия) в диапазоне волновых чисел 500-4000 см<sup>-1</sup>. Идентификацию поверхностных функциональных групп сорбентов проводили используя корреляционную диаграмму отнесения полос поглощения основных групп и связей (Киселев А.В., 1972).

При анализе элементоксидных слоев сорбентов проводили определение титана, алюминия, циркония (Нечипоренко А.П., Шевченко Г.К., Кольцов СИ., 1981), гидроксильных групп сорбентов (Кольцов СИ., Кузнецова Г.Н., Алесковский В.Б., 1967).

С целью подтверждения достоверности и воспроизводимости результатов, полученных при экспериментальных исследованиях, применяли математические методы (Зайцев Т.Н., 1991).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Синтез композиционных магноиммуносорбентов и исследование их свойств**

Целью начального этапа исследований явилось получение ферромагнитных сорбентов, обладающих заданным составом, адсорбционными и магнитными свойствами, для использования их при проведении иммуноанализа микроорганизмов на основе ИФА. Другой задачей было исследование возможности использования магнитоуправляемых сорбционных материалов для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба.

Синтез магносорбентов с высокой сорбционной активностью осуществлен методом формирования пористой структуры носителя в присутствии полисахарида хитозана. Синтезы элементсодержащих сорбентов проведены методами молекулярного наслаивания и деструкционно-эпитаксиального осаждения.

Непористый кремнезем-аэросил использован в качестве основного структурного компонента, формирующего остов композиционного сорбционного материала, имеющего развитую пористую структуру.

В качестве органического компонента синтеза применяли 3% раствор хитозана в 3% уксусной кислоте. Хитозан представляет собой полимер с цепью р—1—4—соединенных—2—ацетамид—2—дезоксид—2—глюкозных остатков. Благодаря своей химической природе, хитозан способен к образованию 4 основных типов связей: ионных, водородных, гидрофобных, связей по типу комплексообразования. В качестве магнитной составляющей при синтезе применялся магнетит ( $Fe_3O_4$ , кроме этого разработан способ получения магносорбентов путем введения на стадии получения гидрогеля оксалата железа (II).

Схема получения магноиммуносорбентов включает 8 стадий и представлена на рисунке 1.

Стадии 1—3 характеризуют процесс синтеза магносорбента на основе формирования пористой структуры органокремнеземной матрицы в присутствии компонентов синтеза.

На стадии 1 за счет протекающих процессов конденсации с участием силанольных групп кремнезема — аэросила образуется гидрогель. На стадии 2 при созревании и синерезисе гидрогеля протекают дегидратационные процессы, что приводит к уменьшению объема гидрогеля, его уплотнению.

На стадии 3 при термообработке гидрогель превращается в ксерогель, при этом объем его уменьшается в 8-15 раз, благодаря дей-



ствию капиллярных сил. На стадиях 4–8 завершается процесс синтеза композиционных магносорбентов, обеспечивающий выделение высокодисперсной фракции, получение стерильного сорбционного материала, а также его активирование функциональными группами с последующей иммобилизацией лигандов.

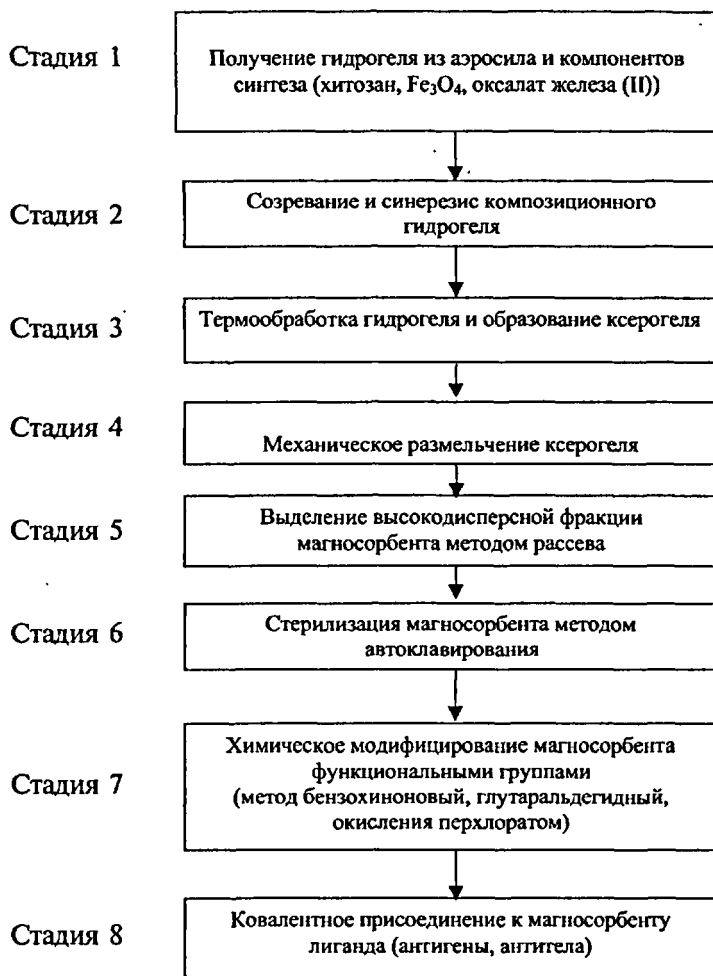


Рисунок 1. Схема получения магниоиммосорбентов

Структура композиционных сорбентов представлена корпускулярной системой, которая состоит из частиц кремнезема, покрытых полимером — хитозаном. Размер корпускул определяет величину удельной поверхности, а плотность их упаковки — объем и радиус пор. Механизм образования пористых хитозанкремнеземных магносорбентов можно представить как сложный процесс, сопровождающийся формированием корпускулярной структуры кремнеземного остова из непористых частиц аэросила А-380 и включением в него органического полимера хитозана и магнетита.

Проведены исследования структурных характеристик магносорбентов. Методом, основанным на низкотемпературной сорбции азота, была определена удельная поверхность сорбционных материалов. Суммарный объем пор и диаметр пор определены методом ртутной порометрии на приборе АУТО PORE 9200.

В таблице 1 представлены структурные характеристики сорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии органического полимера хитозана и использовании магнетита.

Таблица 1. Характеристики магносорбентов в зависимости от количества магнетита, используемого в синтезе

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Время гелеобразования, ч	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Диаметр пор, нм
	SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Хитозан				
МХКС <sub>2,5</sub>	5	2,5	1,5	4	68	1,5	35
МХКС <sub>1,5</sub>	5	1,5	1,5	4	74	1,4	32
МХКС <sub>0,5</sub>	5	0,5	1,5	4	82	1,2	26

Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что при увеличении количества магнетита, вводимого в компонентный состав сорбента, наблюдается некоторое снижение величины удельной поверхности сорбентов и увеличение объема пор.

В таблице 2 представлены структурные характеристики хитозанкремнеземных магносорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимера хитозана и оксалата железа.

Таблица 2. Характеристики магносорбентов в зависимости от количества оксалата железа, используемого в синтезе

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Время гелеобразования, ч	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Диаметр пор, нм
	SiO <sub>2</sub>	Хитозан	Оксалат железа				
МХКС <sub>3</sub>	5	1,5	3	4	70	1,63	37
МХКС <sub>2,5</sub>	5	1,5	2,5	4	73	1,55	34
МХКС <sub>2</sub>	5	1,5	2	4	78	1,35	30

При сравнительном анализе данных таблиц 1 и 2 следует отметить, что с использованием в качестве компонента для синтеза сорбентов оксалата железа получаемые магносорбенты имеют несколько меньшую удельную поверхность и большее значение объема пор. Это объясняется, по-видимому, разрыхляющим и активирующим влиянием газообразных продуктов, выделяющихся при разложении оксалата железа, с образованием FeO, далее Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и магнетита.

В последующем проведены исследования по количественной оценке магнитных свойств разработанных композиционных магносорбентов. При этом использовали вибрационный метод. Для определения магнитных свойств сорбент закреплялся на конце тонкого стержня из немагнитного материала, который с помощью цангового зажима соединялся с вибрационной системой, приводящей образец в колебательное движение. Образец магносорбента располагался между четырьмя измерительными катушками, которые неподвижно закреплялись на полюсах электромагнита. Магнитный момент сорбента определяли по магнитному моменту эталона — пластинки из никеля.

Результаты исследований, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что величина удельной намагниченности насыщения возрастает с увеличением содержания магнетита в составе композиционных хитозанкремнеземных сорбентов.

Таблица 3. Магнитные свойства хитозанкремнеземных магносорбентов

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Удельная намагниченность насыщения, МН, А х м <sup>2</sup> /кг
	SiO <sub>2</sub>	Хитозан	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		
МХКС <sub>2,5</sub>	5	1,5	2,5	68	17,4
МХКС <sub>1,5</sub>	5	1,5	1,5	74	10,2
МХКС <sub>0,5</sub>	5	1,5	0,5	82	4,3

На сканирующем электронном микроскопе IMZ-T3000 проведены исследования микроструктуры полученных композиционных магносорбентов по сравнению с известными кремнеземными материалами, такими как макропористое стекло МПС 200 ВГХ, силихром С-120 и гидротермальный силихром.

Для силихрома С-120 характерна однородная глобулярная структура с размером сросшихся корпускулярных частиц оксида кремния около 20 нм. В отличие от силихрома, топография поверхности макропористого стекла представлена губчатой структурой. Измененную глобулярную структуру имеет композиционный хитозанкремнеземный сорбент. Особенностью его структуры является сочетание обширных участков аморфных образований с губчатой структурой.

Разработана технология получения элементсодержащих кремнеземных сорбентов на основе аэросила А-380 методом деструкционно-эпитаксиального осаждения (ДЭО), с использованием аэросила А-380 и растворов солей: сульфатов железа, кобальта, магния, меди.

Количественный химический анализ полученных сорбентов подтвердил образование поликремневых солей химических элементов, таких как медь, магний, марганец, кобальт.

По данным спектров диффузного отражения, выполненных на приборе AQV-50 «Shimadzu», наиболее активное влияние химического модифицирования кремнеземного сорбента проявилось в спектральной области 250–400 нм. Спектр диффузного отражения кремнеземов, имеющих в составе кальций и магний, близки к спектру аэросила А-380. Хромофорные металлы, содержащиеся в элементсодержащих кремнеземах, приводят к резкому увеличению поглощения в спектральной области 250–400 нм, причем кобальт и марганец дают широкую полосу поглощения, а медь способствует сдвигу полосы поглощения в коротковолновую область. Полученные результаты по спектрам диффузного отражения, на наш взгляд, можно использовать для оптимизации условий синтеза элементсодержащих сорбентов, их идентификации.

Проведены исследования кислотных свойств поверхности композиционных сорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимера хитозана, а также элементсодержащих сорбентов, синтезированных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения.

В таблице 4 представлены данные по кислотным свойствам элемент-кремнеземных сорбентов, полученных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения содержащих, медь-, кобальт-,

железооксидные слои. Синтез элементсодержащих кремнеземных сорбентов методом деструкционно-эпитаксиального осаждения, в отличие от общеизвестных методов синтеза твердых веществ, протекает не путем хаотичного межуатомного и межмолекулярного взаимодействия, а путем переноса и закрепления на заранее подготовленной поверхности каждый раз только одних, избранных структурных единиц. Данным методом по оригинальному синтезу получены магносорбенты, обладающие магнитными свойствами.

Таблица 4. Расчет концентрации Бренстедовских кислотных центров и констант равновесия ионного обмена для сорбентов

№ п/п	Наименование сорбента	$V_0 \times 10^{-3}$ мг-экв/м <sup>2</sup>	$K_{ср.} \times 10^{-5}$
1	Аэросил А-380	1,1	1,02
2	Аэросилогель Со	0,74	0,63
3	Аэросилогель Fe	0,78	0,71
4	Аэросилогель Al	1,2	1,12
5	Аэросилогель Си	0,64	0,7
6	*ФХКС	1,2	0,84

\*ФХКС – феррохитозанокремнеземный сорбент.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен набор композиционных сорбентов с оптимизированным составом и структурными характеристиками, изучены их спектральные характеристики, микроструктура поверхности, кислотные свойства, что позволяет целенаправленно использовать сорбционные материалы для последующего получения на их основе специфичных иммуносорбентов.

С целью дальнейшего активирования композиционных сорбентов функциональными группами нами разработаны три варианта модифицирования носителей: бензохиноновый, окислением перхлоратом натрия, глутаровым альдегидом.

Для получения магноиммуносорбентов проведены исследования по иммобилизации чумных иммуноглобулинов на поверхности носителей, активированных указанными методами.

Иммобилизацию чумных иммуноглобулинов на поверхности магносорбентов проводили следующим образом: к 0,2 мл 10% взвеси магносорбента приливали 1 мл Ig G, варьируя количество белка от 0,5 до 10 мг/мл, ковалентное связывание проводили в течение 1–24 часов, при температуре 5°C; 22°C и 38°C.

Проведены исследования по установлению значений констант иммобилизации чумных иммуноглобулинов на магносорбентс, активированном методом окисления и содержащим альдегидные группы. Значение константы иммобилизации равно  $0,93 \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ .

Для оптимизации условий получения магноиммуносорбентов проведены исследования влияния таких факторов, как температура, значение рН раствора иммуноглобулинов на свойства магноиммуносорбентов, специфическую активность и чувствительность.

Результаты, представленные в таблице 5, свидетельствуют, что максимальная адсорбционная емкость композиционных магносорбентов наблюдается при температуре 5°C и 22°C. Повышение температуры до 55°C в процессе иммобилизации иммуноглобулинов приводит к снижению уровня специфической активности и чувствительности композиционных сорбентов, применяемых в ИФА.

Таким образом, в соответствии с экспериментальными данными, оптимальными факторами, которые обеспечивают получение иммуносорбентов, обладающих высоким уровнем специфической активности и чувствительности, являются следующие: время иммобилизации специфических иммуноглобулинов 1,5 часа при значении рН раствора белка 7 и температуры от 5° до 22°C.

На основе хитозанкремнеземных сорбентов, активированных бензохиноном и окислением с помощью перхлората натрия, разработаны эффективные композиционные магноиммуносорбенты, имеющие преимущества по уровню чувствительности и специфичности, технологичности получения перед глутаральдегидным методом получения активированных сорбционных материалов.

Таблица 5. Зависимость чувствительности хитозанкремнеземных композиционных магноиммуносорбентов от количества иммобилизованного белка и температуры при иммобилизации лиганда

Наименование иммуноглобулинов	Температура иммобил. белка, °С	Количество иммобилизованного белка, %	Время иммобилизации, ч.	Чувствительность м.к./мл
Чумные	5	68	1,5	$10^2$
	22	65	1,5	$10^2$
	37	65	1,5	$10^2$
	55	26	1,5	$10^3$

Таблица 6. Чувствительность композиционных чумных магноиммуносорбентов

Значение pH иммуноглобулинов	Метод синтеза КМИС	Чувствительность м.к./мл
9,0	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^3$
	АХА	$10^2$
7,0	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^4$
	АХА	$10^2$
5,5	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^3$
	АХА	$10^2$
7,0	FeKC	$10^3$

БХА — бензохинонхитозаноаэросилогель;

ГХА — глутаральхитозаноаэросилогель;

АХА — альдегидохитозаноаэросилогель

FeKC — железокремнезёмный элементсодержащий сорбент

Разработанные магноиммуносорбенты сохраняли стабильность свойств при хранении ( $4^{\circ}\text{C}$ ) в течение 1 года (срок наблюдения).

Вышеизложенные научные разработки легли в основу заявки на изобретение № 2003136322/15 «Способ получения иммуносорбента» (положительное решение формальной экспертизы ФИПС от 13.01.04г).

Таким образом, разработана технология получения магноиммуносорбентов иммобилизацией на поверхности хитозанкремнезёмных материалов чумных иммуноглобулинов и установлено, что показатели их чувствительности, специфичности определяются стандартностью структурных характеристик сорбентов, методом иммобилизации лиганда.

### **Использование магнитоуправляемых иммобилизованных систем для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба**

Одним из современных направлений научных исследований в области биотехнологии является использование иммобилизованных клеток. Иммобилизация биообъекта способствует увеличению продуктивности и производительности биотехнологического процесса, стабилизации свойств продуцента, возможности использования и быстрого удаления микробиологической системы из зоны

культивирования (Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д., 1987; Сеницын А.П., Райкина Е.И., Лозинский В.Н. и др., 1994; Владимцева И.В., 2002; Naihu J., 1987). Магнитное манипулирование микроорганизмами — продуцентами, фиксированными на магнитных носителях, весьма перспективно, однако до настоящего времени разработке этих технологий уделялось мало внимания. Это и определило характер следующего направления наших исследований: изучение возможности и эффективности использования хитозанкремнеземного магноиммуносорбента для глубинного культивирования вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Лигандом для получения МИС служили иммуноглобулины G, выделенные из гипериммунной кроличьей сыворотки крови, полученной при иммунизации животных водорастворимыми антигенами, изолированными из биомассы *Y. pestis* EV, выращенной при 28°C. Для получения иммобилизованных на магнитном носителе бактериальных клеток использовали производственную культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV. После контакта микробных клеток с магнитным носителем происходила прочная иммобилизация чуждого микроба на поверхности магнитоуправляемого хитозанкремнеземного иммуносорбента на основе реакции «антиген-антитело».

Магноиммуносорбент с фиксированными микробными клетками вносили в лабораторный ферментер (LKB, Швеция) и использовали в качестве инокулята, который удерживали на соленоиде путем создания электромагнитного поля. Для выращивания микробной взвеси в ферментере в качестве питательной среды использовали бульон Хоттингера pH 7,2, инкубирование проводили при температуре 28°C с дискретным добавлением глюкозы согласно регламенту производства РП №702-97.

Контролем служило глубинное культивирование *Y. pestis* EV по методике периодического выращивания в ферментере без иммобилизованного сорбента.

Анализируя динамику накопления биомассы производственного штамма *Y. pestis* EV в процессе глубинного культивирования с использованием магнитоуправляемых иммобилизованных систем, можно отметить, что при первом выращивании lag-фаза в среднем длилась 8-9 часов, после чего наступала экспоненциальная фаза, во время которой отмечались интенсивный рост и размножение клеток. Через 18-20 часов наступала стационарная фаза роста, в начале которой производили слив культуральной жидкости, оставляя со-



леноид в рабочем состоянии. В сосуд заливали свежую порцию бульона Хоттингера и проводили повторное выращивание биомассы, не внося дополнительное количество инокулята.

Анализ динамики роста повторных выращиваний иммобилизованных клеток вакцинного штамма чумного микроба показал, что lag-фаза практически отсутствовала, а стационарная фаза роста наступала через 15 часов. При этом «урожай» биомассы при первом и повторных глубинных культивированиях был фактически одинаковым и составил в среднем  $7 \times 10^{10}$  м.к./мл среды. По сравнению с контролем (без иммобилизованного инокулята) количество биомассы увеличилось на  $40 \pm 5\%$ . Описанные эксперименты были проведены на пяти сериях ферментативного бульона Хоттингера (рисунок 2).

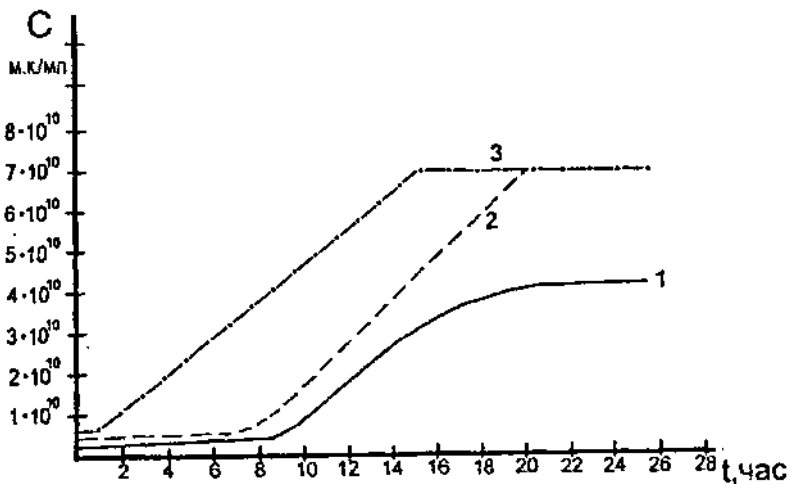


Рисунок 2. Кривые роста популяции Y.pestis EV при глубинном культивировании

1. Выращивание без МИС- инокулята (контроль)
2. Первичное выращивание с МИС-инокулятом
3. Повторное выращивание с МИС-инокулятом

Изучение свойств вакцинного штамма Y.pestis EV, выращенного в условиях глубинного аппаратного культивирования при использовании иммобилизованного на магнитном сорбенте инокулята, проводили в соответствии с фармакопейной статьей

ФС 42-3877-99. Морфологические, тинкториальные, биохимические свойства, иммуногенность, термостабильность вакцины соответствовали нормативной документации (НД). Результаты изучения жизнеспособности (опытных и контрольных образцов) свидетельствуют, что при глубинном культивировании в электромагнитном поле с использованием иммобилизованного инокулята на магнитном носителе процент живых микробных клеток достигает не менее  $(55,4+5,8)\%$ , в то время, как в контрольных образцах этот показатель — не более  $(30\pm 5)\%$  (таблица 7).

Таблица 7. Характеристика чумной вакцины EV, выращенной при глубинном культивировании

Серия	Количество живых микробных клеток, %	Потеря в массе при высушивании, %	Термостабильность, сутки
Первичное выращивание с МИС-инокулятом	54,0 ± 4,4	2,3	10,0
Повторное выращивание с МИС-инокулятом	57,3 ± 3,9	2,1	10,5
Контрольное выращивание без МИС-инокулята	28,9 ± 2,6	1,9	9,4

Вышеизложенное дает основание высказаться в пользу перспективности использования этого способа глубинного культивирования при производстве живой чумной вакцины.

Кроме того, при глубинном культивировании чумного микроба появляется возможность использовать как микробную биомассу, так и культуральную жидкость для получения его капсульного антигена ( $\Phi 1$ ), что значительно увеличивает выход целевого продукта высокого качества, который является основой при конструировании различных чумных иммунобиологических препаратов.

Методы твердофазного ИФА основаны на использовании серологически активных компонентов, иммобилизованных на нерастворимых носителях, что обеспечивает их быстрое и эффективное разделение. Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твердой фазы, которая должна сохранять иммунологические свойства и стабильность в иммобилизованном

состоянии, обладать минимальной активностью к неспецифическому связыванию компонентов анализируемой системы.

Проведенные эксперименты показали, что хитозанкремнеземный магносорбент полностью отвечает перечисленным требованиям.

### **Иммуноферментные тест-системы для диагностики чумы и индикации ее возбудителя**

Синтезированный нами композиционный магносорбент, активированный перхлоратом натрия, был использован в качестве матрицы при конструировании антительной и антигенной чумной диагностических тест-систем для иммуноферментного анализа. При этом лигандами служили иммуноглобулины G, выделенные из гипериммунной чумной кроличьей сыворотки, и Ф1 чумного микроба, изолированной из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией.

Для получения чумных иммуноферментных конъюгатов и магноиммуносорбента были использованы иммуноглобулины из антифракционной гипериммунной сыворотки.

В исследованиях использованы иммунопероксидазные чумные конъюгаты с рабочим титром 1: 200 — 1: 400. Все серии конъюгатов давали отрицательные результаты с водорастворимыми антигенами из гетерологичных штаммов *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, что свидетельствовало об их специфичности.

Все манипуляции с магноиммуносорбентом в наших экспериментах производились с применением ряда технических устройств, разработанных сотрудниками Ставропольского и Волгоградского научно-исследовательских противочумных институтов. Данные технические средства обеспечивают фиксацию магносорбентов, их сепарацию, перенос, эффективное перемешивание в заданном режиме. Устройства размещены в компактной укладке, транспортируемой ручным способом и позволяющей осуществлять работу с ней как в лабораторных, так и в полевых условиях. В состав укладки входят магнитные ловушки различных конструкций для забора проб из объектов внешней среды, контейнеры для транспортировки магнитных сорбентов с фиксированными на их поверхности микроорганизмами, их антигенами, устройство для переноса магносорбентов с магнитной поверхности ловушки, устройство для отделения магносорбентов от жидкой фазы. Исследования проводили с обеззараженными клетками вакцинного штамма *Y. pestis* EV, а также с использованием вирулентных штаммов чумного микроба и

в модельных опытах на почве, контаминированной исследуемым возбудителем. После пропускания проб через техническое устройство, в результате которого осуществлялось селективное концентрирование патогена на магноиммуносорбенте, проводили иммуноферментный анализ.

Чувствительность чумного антительного магноиммуносорбентного диагностикума, оцененная в ИФА, всех изготовленных серий была не менее  $1 \times 10^2$  м.к. в пробе. Специфичность препаратов позволяла проводить анализы без перекрестных реакций с исследованными гетерологичными микроорганизмами.

Кроме антительного иммуносорбентного хитозанкремнеземного сорбента, был изготовлен антигенный КМИС, лигандом для получения которого служила Ф1 чумного микроба. Данный КМИС применялся для обнаружения специфических антител в экспериментальных сыворотках от лабораторных животных, зараженных чумой.

Для учета результатов проведения ИФА производили измерения оптической плотности исследуемых проб на приборе «Мультискан» при длине волны 492 нм. Анализ считали положительным при превышении оптической плотности опытного раствора над контрольным в 1,5 и более раза.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность применения хитозанкремнеземных иммуносорбентов с магнитными свойствами для диагностики чумы и индикации ее возбудителя в экспрессном иммуноанализе (ИФА).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При получении магноиммуносорбентов на основе хитозана рекомендуем следующие параметры: соотношение компонентов синтеза 0,5:5:1,5, соответственно магнетит, аэросил А-380, хитозан; время гелеобразования 4 часа, значение рН гелеобразования 7,0; время иммобилизации с лигандом 1,5 часа при значении рН раствора белка 7 и температуры от 5° до 22° С. Для прочной иммобилизации лиганда рекомендуем использовать перхлоратное окисление и бензохиноновый метод.

## ВЫВОДЫ

1. Проведены исследования по синтезу композиционных магносорбентов методом формирования пористой структуры кремнезе-

ма в присутствии полимера хитозана, имеющих стандартные структурные характеристики - удельную поверхность в пределах 68-82 м<sup>2</sup>/г, объем пор 1,2-1,5 м<sup>3</sup>/г. При этом достигнут результат количественного регулирования магнитных свойств сорбентов с изменением величины удельной намагниченности насыщения от 4,3 до 17,4 МН, А х м<sup>2</sup>/кг, достигаемые увеличением содержания магнитной составляющей в составе магносорбентов.

2. Впервые разработана технология получения пористых магносорбентов из кремнеземного материала аэросила — А-380, хитозана и оксалата железа. Изучены их структурные характеристики, химический состав в сопоставлении с данными ИК-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения: Синтезированы элементосодержащие кремнеземные сорбенты методом молекулярного на-слаивания и деструкционно-эпитаксиального осаждения для координационной иммобилизации белковых лигандов.

3. Разработана технология получения магноиммуносорбентов иммобилизацией на поверхности композиционных хитозанкремнеземных носителей чумных иммуноглобулинов и капсульного антигена чумного микроба (Ф1) методами окисления и бензохиноновым.

4. Использование хитозанкремнеземного композиционного иммуносорбента с магнитными свойствами с иммобилизованными на нем живыми микробными клетками *Y. pestis* EV в качестве инокулята при глубинном культивировании позволило существенно сократить время выращивания биомассы вакцинного штамма (до 15 часов) при значительном увеличении ее выхода на (40+5%) и повышении жизнеспособности микробных клеток (с 30% до 55%), при этом инокулят можно использовать многократно. Выращенная таким методом чумная вакцина соответствует всем требованиям нормативной документации.

5. Выращивание *Y. pestis* EV при глубинном культивировании с использованием магноиммуносорбентного инокулята существенно повышает выход капсульного антигена Ф1 за счет возможности его извлечения как из биомассы, так и из культуральной жидкости.

6. На основе хитозанкремнеземного магносорбента сконструированы высокочувствительные специфичные диагностические чумные тест-системы (антительная и антигенная) для иммуноферментного анализа. Установлено, что основным фактором повышения их чувствительности являются иммунохимические свойства магноиммуносорбента, определяемые качеством носителя, способом иммобилизации белкового лиганда.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Градских Д.А. Композиционные сорбенты для иммобилизации микроорганизмов // Современные достижения биотехнологии: Материалы II международной конференции. — Ставрополь, 2002. — С. 68-69.
2. Градских Д.А., Тюменцева И.С. Синтез сорбентов для иммобилизации биологически активных соединений и микроорганизмов // Химия твердого тела и современные микро- и нанотехнологии: Международная научная конференция: тезисы докладов 13-18 октября. — Кисловодск, 2002. — С. 135-136.
3. Тюменцева И.С., Градских Д.А. Синтез и исследование биосовместимых композиционных сорбентов для иммобилизации микроорганизмов // Повестка дня на 21 век: программа действий — экологическая безопасность и устойчивое развитие: Материалы международной научной конференции. — Ставрополь: СтГАУ, 2002. - С. 191.
4. Градских Д.А. Хитозанкремнеземные сорбенты для конструирования диагностических тест-систем // Биотехнология — 2003: Материалы. Всероссийской научной конференции. — Сочи, 2003. — С. 80.
5. Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Применение магноиммуносорбента для глубинного культивирования чумного микроба // Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения качества и здоровья сельскохозяйственных животных. Материалы II международной научно-практической конференции: Тезисы докладов 22-24 октября. - Ставрополь: СтГАУ, 2003. - С. 302-303.
6. Брыкалов А.В., Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Синтез и исследование магнитосорбционных органокремнеземных материалов для конструирования твердофазных диагностических тест-систем // Химия твердого тела и современные микро- и нанотехнологии: Международная научная конференция: Тезисы докладов 14-19 сентября. — Кисловодск, 2003. — 98 с.
7. Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Магноиммуносорбенты для глубинного культивирования чумного микроба // Биотехнология — 2003: Материалы Всероссийской научной конференции. — Сочи, 2003. — С 79-80.
8. Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Технологическое использование магноиммуносорбентов для глубинного культивирования чумного микроба // Современные достижения в химии, биологии, и экономике: Сборник научных трудов. — Ставрополь: СтГАУ, 2004. — С 52.
9. Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Синтез хитозанкремнеземных сорбентов для твердофазных диагностических систем в ИФА // Современные достижения в химии, биологии, и экономике: Сборник научных трудов. - Ставрополь: СтГАУ, 2004. - С 53.
10. Градских Д.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. Получение биотехнологических сорбционных материалов и их использование для конструирования тест-систем и глубинного культивирования микроорганизмов // Проблемы развития биологии и экологии на Северном Кавказе: «Университетская наука — региону»: Материалы научной конференции. — Ставрополь: СГУ, 2004. — С 60-61.

Подписано в печать 3.06.2004. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 1,3.  
Гарнитура «Таймс». Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 100 экз. Заказ 348.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфического  
комплекса СтГАУ «АГРУО», г. Ставрополь, ул. Мира, 302

№ 1 2 4 5 3