

УДК 619:615.373:636.22/28

Бабак В.А., кандидат ветеринарных наук**Гусев А.А.**, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАСХН**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор**Желиховская З.Л.**, младший научный сотрудник**Паскробко А.И.**, ветеринарный врач**Вересовая Е.Е.**, младший научный сотрудник*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск*

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Резюме

В статье представлены результаты по изучению метода очистки нормальной сыворотки крови КРС от гамма-глобулиновой фракции белка. Определена оптимальная концентрация ПЭГ в 6–8% с циклом замораживания-оттаивания, которая позволяет удалить из сыворотки до 94% γ -глобулиновой фракции белка. Очищенная с помощью ПЭГ сыворотка крови пригодна для выращивания перевиваемых культур клеток СПЭВ, Vero, ВНК-21/13, МДВК.

Summary

There are the results on studying of clearing of normal whey of blood livestock from γ -globulin fraction of protein. Optimum concentration of PEG in 6–8% with a cycle of freezing-thawing which allows removing from the whey about 94% γ -globulin fractions of protein is defined. Cleared by PEG whey of blood is suitable for cultivation of intertwined cultures of cells, as SPEV, Vero, ВНК-21/13 and MDBK.

ВВЕДЕНИЕ

Сыворотка крови, как компонент питательных сред, является необходимой составляющей сред для культивирования перевиваемых линий клеток животных и человека. Сыворотка крови является источником питательных и защитных веществ для клеток, выполняет роль физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, расплывания и миграции клеток, регулирует внутриклеточные процессы, выполняет детоксикационную функцию. Необходимость использования сыворотки крови заключается в содержании в ней обязательных для роста культур клеток компонентов: альбуминов, глобулинов, стероидных гормонов, ферментов, гликопротеидов, инсулина, фетуина, органических кислот, ростовых факторов, некоторых микроэлементов и витаминов [2].

В культуральной биотехнологической практике используются нормальная сыворотка крови крупного рогатого скота, сыворотка крови новорожденных телят, эмбриональная сыворотка крови, а также сыворотки крови человека, лошади, птицы, кролика, свиньи и других животных. По своему составу эмбриональная телячья сыворотка крови (ЭТС,

FBS) считается наиболее оптимальной для выращивания клеток, однако ее использование значительно удорожает проведение научных исследований и производство противовирусных вакцин.

Сыворотка крови является не только источником полезных ростовых факторов, но и источником микоплазм, вирусов, бактерий, токсинов, неспецифических ингибиторов и антител, представленных γ -глобулиновой фракцией. В первую очередь это относится к нормальной сыворотке крови КРС, которая используется при культивировании широкого спектра перевиваемых культур клеток.

По литературным данным для очистки сыворотки (изменения ее фракционного состава) наибольшее распространение получил полиэтиленгликоль в различных концентрациях [4, 5].

Целью наших исследований являлось: изучение возможности очистки нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота от гамма-глобулиновой фракции белка, а также оценка ростовых свойства некоторых перевиваемых культур клеток с использованием очищенной сыворотки крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований использовали нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота, полученную в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С.Н. Вышелесского», а также эмбриональную сыворотку крови телят (TFS, Ну-Clone, США), которая использовалась в качестве контроля. Используемые в работе сыворотки имели физико-химические показатели, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические показатели нормальной сыворотки крови различных серий

Показатель	Нормальная сыворотка серия №1 (С-1)	Нормальная сыворотка серия №2 (С-2)	Нормальная сыворотка серия №3 (С-3)	Нормальная сыворотка серия №4 (С-4)
Цвет	светло-желтый	желто-красный	желто-красный	светло-желтый
Оптическая плотность	0,348	0,431	0,483	0,380
рН	7,38	7,62	7,63	7,52
Общий белок, г/л	64,34	83,45	92,67	74,97
γ-глобулины, %	12,41	30,97	28,21	16,84
γ-глобулины, г/л	7,99	25,84	26,14	12,62

Для экспериментальной очистки применяли следующее оборудование и реактивы: система ультрафильтрации в тангенциальном потоке с порами мембраны 100 кДт (Millipore), аэросил гидрофобный (1,0 г/100мл), гель 6% гидроокиси алюминия (1,0 и 0,5 г/100мл), полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 кДт в концентрациях от 6 до 14%.

Полученную очищенную сыворотку оценивали по следующим показателям: внешний вид, оптическая плотность при длине волны 492 нм, показатель концентрации водородных ионов (рН), общий белок (г/л) и фракционный состав белков сыворотки крови (%), а также остаточное содержание полиэтиленгликоля [3].

Для электрофоретического разделения белков сыворотки крови использовали диагностический набор Cormay Gel Protein 100 (Польша), который позволяет получить на агарозном геле 5 фракций белков крови: альбумины, альфа (α) 1-глобулины, альфа 2-глобулины, бета (β)-глобулины, гамма (γ)-глобулины. Постановку теста и расшифровку результатов проводили согласно прилагаемой к набору инструкции [1]. Расшифровку проводили как визуально, так и с использованием денситометра.

Нормальную и очищенную сыворотки стерилизовали γ-облучением (25 кГр), что

позволяло получить сыворотку, не контаминированную вирусами, бактериями и микоплазмой.

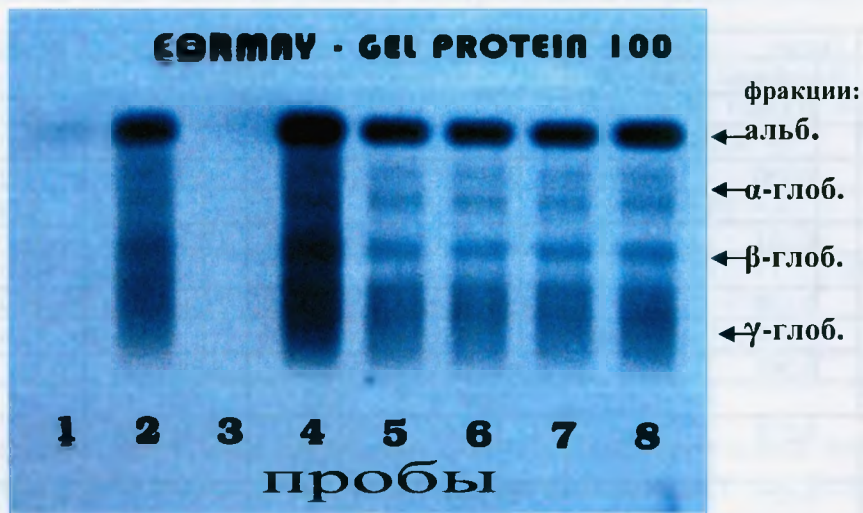
Экспериментально полученную сыворотку испытывали на ростостимулирующие свойства на культурах клеток СПЭВ, Vero, ВНК-21/13, МДВК, оценивая морфологию клетки и пролиферативную активность на протяжении 3-х пассажей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В предварительных исследованиях установлено, что использование геля гидроокиси алюминия в концентрациях 1,0 и 0,5 г/100мл (рисунок 1, пробы 5 и 6) и гидрофобного аэросила 1,0 г/100мл (проба 8) не позволяет осадить белки сыворотки крови, и, кроме того, они изменяют физические свойства сыворотки.

Результаты ультрафильтрации в тангенциальном потоке с порами мембраны 100 кДт также не дали результата: фильтрация отсекала практически весь белковый спектр сыворотки. Так, если в исходных образцах содержание общего белка было 64,34 г/л (С-1, проба 7) и 83,45 г/л (С-2, проба 2), то после ультрафильтрации только 2,82 и 4,93 г/л соответственно (пробы 1 и 3).

Результаты первой серии опытов представлены на рисунке 1.



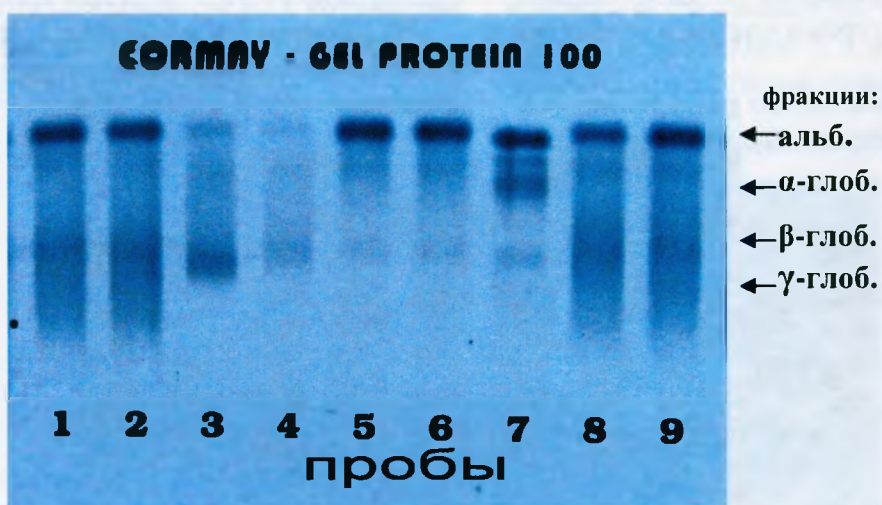
1, 3 – после ультрафильтрации; 2 – контрольная нормальная сыворотка С-2; 4 – продукты отгонки ультрафильтрации; 5, 6 – осаждение с ГОА; 7 – контрольная нормальная сыворотка С-1; 8 – осаждение с аэросилом

Рисунок 1 – Разделение белков сыворотки крови первой серии опытов

Во второй серии экспериментов использовали контрольную нормальную сыворотку крови С-1 (рисунок 2, пробы 1, 2), которую очищали добавлением 14% полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 кДт, выдерживали 4 часа при комнатной температуре с двукратным перемешиванием и 12 часов в холодильнике при +8°C, после чего де-

кантировали надосадок и центрифугировали образец 15 мин. при 3000 об/мин (пробы 3, 4). Контрольную нормальную сыворотку крови С-4 (пробы 8, 9) очищали добавлением 12% ПЭГ, и далее поступали по вышеописанной схеме (пробы 5, 6).

Результаты экспериментов представлены на рисунке 2 и в таблице 2.



1, 2 – контрольная нормальная сыворотка С-1; 3, 4 – очищенная сыворотка 14% ПЭГ; 5, 6 – очищенная сыворотка 12% ПЭГ; 7 – ЭТС; 8, 9 – контрольная нормальная сыворотка С-4

Рисунок 2 – Разделение белков сыворотки крови второй серии опытов

Таблица 2 – Физико-химические показатели контрольных и опытных сывороток крови второй серии опытов

Показатель	Оптич. плотность	Общий белок, г/л	альбум. % / г/л	α 1-глоб. % / г/л	α 2-глоб. % / г/л	β -глоб., % / г/л	γ -глоб., % / г/л
Нормальная сыворотка С-1	0,348	64,34	27,33 / 17,58	9,39 / 6,04	9,37 / 6,03	41,50 / 26,70	12,41 / 7,99
Нормальная сыворотка С-4	0,380	74,97	32,09 / 24,05	10,91 / 8,18	9,95 / 7,46	30,22 / 22,66	16,84 / 12,62
Очищенная ПЭГ 14% (проба 3)	0,361	11,24	13,58 / 1,53	7,48 / 0,84	17,24 / 1,94	6,32 / 0,71	55,38 / 6,23
Очищенная ПЭГ 14% (проба 4)	0,395	9,71	14,75 / 1,43	4,77 / 0,46	21,44 / 2,08	15,98 / 1,55	43,06 / 4,18
Очищенная ПЭГ 12% (проба 5)	0,308	24,1	69,72 / 16,80	14,20 / 3,42	8,88 / 2,14	6,35 / 1,53	0,85 / 0,21
Очищенная ПЭГ 12% (проба 6)	0,324	22,63	64,5 / 14,6	13,79 / 3,12	13,38 / 3,03	7,88 / 1,78	0,45 / 0,1
Эмбрионал. сыворотка	0,320	37,63	45,63 / 17,17	13,69 / 5,15	31,73 / 11,94	6,88 / 2,59	2,08 / 0,78

Из полученных данных видно, что использование 12–14 % ПЭГ удаляет чрезмерно большое количество общего белка – до 9,71–22,63 г/л. Отмечено что 14%-я концентрация в большей степени осадила альбуминовую и α -, β -глобулиновые фракции и аномально в низком количестве γ -глобулины. 12%-я концентрация ПЭГ позволила более равномерно осадить белковые фракции, при этом содержание γ -глобулинов было минимальным. Очищенная сыворотка с использованием 12–14 % ПЭГ была опалесцирующая, с небольшим выпадением осадка после хранения. Конечная концентрация ПЭГ в сыворотке крови составила 7,5 и 10% соответственно, что является довольно высоким показателем при использовании 10–15% сыворотки в работе с культурами клеток в следствии их ингибиции.

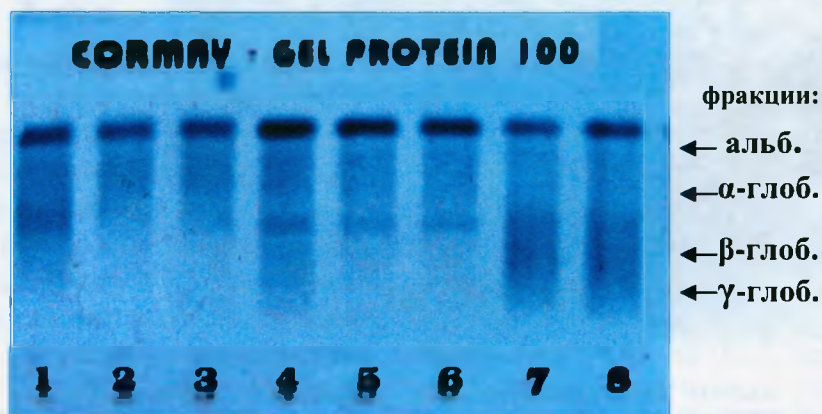
Данные, полученные по разделению белковых фракций эмбриональной сыворотки

крови телят и представленные в таблице 2, служили контролем по содержанию белков (рисунок 2, проба 7).

В третьей серии испытаний мы уменьшили концентрацию ПЭГ до 6–8–10% и изменили схему осаждения белков. Опытные образцы сывороток выдерживали 2 часа при комнатной температуре с однократным перемешиванием и 12 часов – в холодильнике при +8°C, после чего декантировали надосадов. Затем пробы сывороток замораживали на 24–48 часов, размораживали и центрифугировали образцы по 15 мин. при 3000 об/мин, а надосадов использовали для исследования.

Для испытаний выбрали нормальную сыворотку крови С-2 с высоким содержанием γ -глобулинов – 30,97% (25,84 г/л).

На рисунке 3 и в таблице 3 приведены результаты испытаний по очистке сыворотки с добавлением 6, 8 и 10 % ПЭГ.



1, 4 – очищенная сыворотка 6% ПЭГ; 2, 5 – очищенная сыворотка 8% ПЭГ; 3, 6 – очищенная сыворотка 10% ПЭГ; 7, 8 – контрольная нормальная сыворотка С-2

Рисунок 3 – Разделение белков сыворотки крови третьей серии опытов

Таблица 3 – Физико-химические показатели контрольных и опытных сывороток крови третьей серии опытов

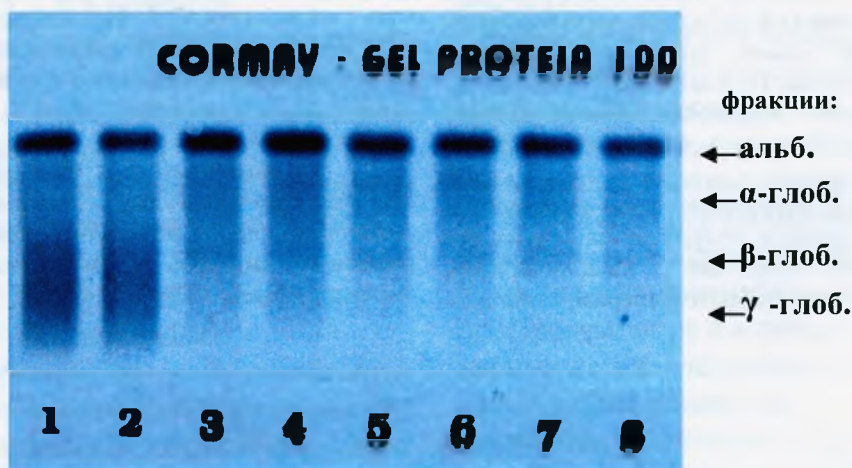
Показатель	Оптич. плотность	Общий белок, г/л	альбум., % / г/л	α1-глоб., % / г/л	α 2-глоб., % / г/л	β-глоб., % / г/л	γ-глоб., % / г/л
Очищенная ПЭГ 6% (проба 1)	0,411	75,97	46,81 / 35,56	14,36 / 10,91	12,76 / 9,7	13,99 / 10,63	12,09 / 9,18
Очищенная ПЭГ 8% (проба 2)	0,394	54,52	58,12 / 31,69	17,36 / 9,64	8,10 / 4,42	10,68 / 5,82	5,74 / 3,13
Очищенная ПЭГ 10% (проба 3)	0,363	44,63	78,16 / 34,88	9,86 / 4,40	11,11 / 4,96	0,01 / 0,0	0,86 / 0,38
Нормальная сыворотка С-2	0,431	83,45	39,0 / 32,55	5,68 / 4,74	4,87 / 4,06	19,49 / 16,26	30,97 / 25,84

Из таблицы 3 следует, что с увеличением концентрации ПЭГ с 6% до 10% увеличивается осаждение, в первую очередь, фракций γ- и β-глобулинов и в меньшей степени – фракция α-глобулинов. А содержание альбуминов в разных пробах после осаждения ПЭГ-Гом не имело достоверных различий. Показатель содержания общего белка при использовании 10% ПЭГ снизился в 1,9 раза, 8% ПЭГ – в 1,5 раза, 6% ПЭГ – в 1,1 раза. Наиболее близкой к эмбриональной сыворотке по составу была сыворотка очищенная с использованием 10% ПЭГ, однако 8% ПЭГ в меньшей степени осаждали фракции α- и β-глобулинов. Сыворотка, полученная с использованием 6–8–10 % ПЭГ, была слабо опалесцирующая, с незначительным выпадением осадка после хранения, а конечная концентрация ПЭГ в ней составила 4,0 5,2 и 6,4% соответственно. При добавлении такой сыворотки в питательные среды в количестве 10% конечная концентрация ПЭГ составит 0,4, 0,52 и 0,64% соответственно.

На заключительном этапе исследований седиментационных свойств ПЭГ-6000 при получении экспериментальных образцов мы увеличили время осаждения белков при низкой температуре: после 2-х часового контакта при комнатной температуре образцы ставили в холодильник при +8°C на «тающий лед» на 12 часов, затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин и замораживали 24–48ч. Размораживали пробы сыворотки в холодильнике при +8°C на «тающем льде» в течении 10–12 часов, после чего центрифугировали 15 мин. при 3000 об/мин и определяли содержание белковых фракций.

Для очистки использовали нормальную сыворотку крови С-3 с содержанием 28,2% (26,14 г/л) γ-глобулинов, которую, как и в предыдущем опыте, очищали с добавлением 6, 8 и 10% ПЭГ.

На рисунке 4 и в таблице 4 приведены результаты исследований по очистке сыворотки крови с добавлением 6, 8 и 10% ПЭГ с удлиненным циклом охлажденного осаждения.



1, 2 – контрольная нормальная сыворотка С-3; 3, 4 – очищенная сыворотка 6% ПЭГ; 5, 6 – очищенная сыворотка 8% ПЭГ; 7, 8 – очищенная сыворотка 10% ПЭГ

Рисунок 4 – Разделение белков сыворотки крови четвертой серии опытов

Таблица 4 – Физико-химические показатели контрольных и опытных сывороток крови четвертой серии опытов

Показатель	Оптич. плотность	Общий белок, г/л	альбум. % / г/л	α 1-глоб., % / г/л	α 2-глоб. % / г/л	β -глоб., % / г/л	γ -глоб., % / г/л
Очищенная ПЭГ 6% (проба 3)	0,396	45,17	51,73 / 23,38	28,95 / 13,09	12,67 / 5,73	3,49 / 1,58	3,16 / 1,40
Очищенная ПЭГ 8% (проба 5)	0,344	38,83	58,18 / 22,63	18,70 / 7,27	11,10 / 4,32	9,02 / 3,51	3,0 / 1,10
Очищенная ПЭГ 10% (проба 7)	0,321	33,38	60,17 / 20,08	16,03 / 5,35	13,44 / 4,49	8,40 / 2,80	1,96 / 0,65
Нормальная сыворотка С-3	0,483	92,67	25,83 / 23,93	7,27 / 6,73	21,74 / 20,15	16,96 / 15,71	28,21 / 26,14

Из таблицы 4 следует, что изменение цикла осаждения белков позволило значительно уменьшить содержание белковых фракций и, что особенно важно, содержание γ -глобулинов. Сравнивая полученные данные с третьей серии исследований (таблица 3), мы видим, что количественно содержание γ -глобулинов уменьшилось в 6,5 раз при использовании 6% ПЭГ, в 2,8 раза – при 8% ПЭГ. В сравнении с нормальной сывороткой С-3 получили осаждение (удаление) γ -глобулиновой фракции до 94,65–95,79% (6, 8% ПЭГ) и до 97,52% (10% ПЭГ).

Полученная сыворотка была прозрачная, светло-желтая, с незначительным выпадением осадка после длительного хранения, а конечная концентрация ПЭГ в сыворотке составила 3,2, 4,0 и 5,6% соответственно.

Сыворотки, полученные с использованием 6% и 8% ПЭГ, после гамма-стерилизации испытывали на ростостимулирующие свойства на культурах клеток СПЭВ, Vero,

ВНК-21/13, МДВК. Установлено, что очистка сыворотки с использованием 6% и 8% ПЭГ не изменяет ростостимулирующие свойства, а остаточное количество ПЭГ не является токсичным – клетки сохраняли типичную морфологическую структуру, формируя сплошной полноценный монослой на 48–72 часа.

ВЫВОДЫ

1 Изучена возможность очистки нормальной сыворотки крови КРС от гамма-глобулиновой фракции белка с помощью ПЭГ различных концентраций. Оптимальными является использование ПЭГ в 6–8%-ной концентрации в сочетании с циклами замораживания – оттаивания, что позволяет удалить из сыворотки до 94% γ -глобулиновой фракции белка.

2 Очищенная с помощью ПЭГ 6–8%-ная сыворотка крови пригодна для выращивания перевиваемых культур клеток СПЭВ, Vero, ВНК-21/13, МДВК.

ЛИТЕРАТУРА

1 Диагностический набор для электрофоретического разделения белков сыворотки крови на агарозе/ Comei Gel Protein, Польша, 2005. – 2 с.

2 Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситьков. – М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с.

3 Иванов, В.Е. Молозивные иммуноглобулины в профилактике и лечении желудочно-кишечных болезней новорожденных телят: дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.01 / В.Е. Иванов; НИИ эксперим. ветерина-

рии им. С.Н. Вышелесского. – Мн., 1986. – 195 с.

4 Костина, Г.А. Исследование свойств различных видов сывороток и разработка технологии их получения для использования в культивировании культур клеток: дис. ... канд. биол. наук: Г.А. Костина. – Новосибирск, 1990. – 133 с.

5 Шинкаренко, А.А. Особенности взаимодействия полиэтиленгликоля с белками плазмы крови и возможности использования этого полимера для фракционирования: автореф. дис. докт. биол. наук: А.А. Шинкаренко. – Киев, 1972. – 31 с.