

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Кафедра микробиологии и вирусологии

ВЕТЕРИНАРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Рекомендовано учебно-методическим объединением
в сфере высшего образования Республики Беларусь по образованию
в области сельского хозяйства в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений образования, обеспечивающих
получение специального высшего образования по специальности
7-07-0841-01 Ветеринарная медицина

Витебск
ВГАВМ
2025

УДК 573.6.086.83:619
ББК 30.16 + 48
В39

Авторы:

старший преподаватель, магистр ветеринарных наук *А. Г. Кошнеров*;
доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Е. А. Кирпанёва*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*;
старший преподаватель, магистр ветеринарных наук *О. Ю. Зыбина*;
ассистент, магистр ветеринарных наук *А. А. Карташова*;
ассистент, магистр ветеринарных наук *Д. Л. Жук*

Рецензенты:

заведующий кафедрой микробиологии и эпизоотологии учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет»,
кандидат ветеринарных наук, доцент *Л. С. Козел*;
заместитель генерального директора по инновационному развитию
ОАО «БелВитунифарм», кандидат ветеринарных наук, доцент
В. А. Машеро

Ветеринарная биотехнология : учеб.-метод. пособие для студентов учреждений образования, обеспечивающих получение специального высшего образования по специальности 7-07-0841-01 «Ветеринарная медицина» / *А. Г. Кошнеров, И. А. Красочко, Е. А. Кирпанёва [и др.]*. – Витебск : ВГАВМ, 2025. – 116 с.
ISBN978-985-591-232-4

Пособие написано в соответствии с программой дисциплины «Ветеринарная биотехнология» и предназначено для подготовки к практическим занятиям студентов по специальности «Ветеринарная медицина».

УДК 573.6.086.83:619
ББК 30.16 + 48

ISBN978-985-591-232-4

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной
медицины», 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Тема 1. Биологические объекты, используемые в биотехнологическом производстве. Сырьевая база биотехнологического производства	5
Тема 2. Аппаратурное оформление и слагаемые биотехнологического процесса	15
Тема 3. Технологические аспекты получения продуктов микробиологического синтеза	29
Тема 4. Молекулярно-генетические методы в биотехнологии	41
Тема 5. Гибридная технология получения моноклональных антител	67
Тема 6. Технологические аспекты производства вакцин	73
Тема 7. Технологические аспекты производства гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов	99
Тема 8. Менеджмент качества в биотехнологическом производстве	105
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	115

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биотехнология представляет собой биоиндустрию, которая включает в себя, с одной стороны, отрасли, в которых биотехнологические методы могут с успехом заменить широко используемые традиционные методы (в области химической промышленности относятся синтез искусственных приправ, полимеров и сырья для текстильной промышленности, в области энергетики – получение метанола, биогаза и водорода, в области биометаллургии – извлечение некоторых металлов из бедных руд), а с другой – отрасли, в которых биотехнология играет ведущую роль (производство продовольствия (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов и ферментов); увеличение продуктивности сельского хозяйства (клонирование и селекция сортов растений, исходя из тканевых и клеточных культур, производство биопестицидов и биоинсектицидов); фармацевтическую промышленность (разработка вакцин, синтез гормонов, интерферонов и антибиотиков); защиту окружающей среды и уменьшение ее загрязнения (очистка сточных вод, переработка хозяйственных отходов, изготовление компоста, производство соединений, поддающихся расщеплению микроорганизмами).

В соответствии с определением Европейской федерации биотехнологов (ЕФБ, 1984) под **биотехнологией** (от греч. *bios* – жизнь, *teken* – искусство, *logos* – слово, учение, наука) понимают отрасль научных знаний, которая базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей.

Уже в самом определении предмета отражено его местоположение как пограничного, благодаря чему результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических дисциплин приобретают выраженное прикладное значение.

Опираясь на знания микробиологии, биохимии, генетики, генной инженерии, иммунологии и используя современное оборудование и приборы, биотехнология создает возможность получения практически всех необходимых для жизнедеятельности человека веществ и соединений из доступных и возобновляемых материалов природного и искусственного происхождения.

Изучение студентами учебной дисциплины «Ветеринарная биотехнология» позволяет сформировать общее представление об основных направлениях и приоритетах развития современных биотехнологий, а также об особенностях технологии получения биологических препаратов, используемых в ветеринарной практике.

Тема 1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ. СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Цель занятия: ознакомиться с особенностями биологических объектов, используемых в биотехнологическом производстве, изучить особенности сырьевых ресурсов для биотехнологического производства и основные требования к сырью для процессов микробиологического синтеза.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить классификацию биологических объектов в зависимости от источников энергии, углерода и доноров электронов

Для промышленной биотехнологии наиболее важной является классификация биологических объектов по способам питания, поскольку вклад исходных продуктов (субстратов) в цену производимых продуктов в биотехнологии является определяющим.

С позиций сегодняшней экономики наиболее рентабельны продуценты, использующие в качестве источников энергии, углерода и доноров электронов соответственно свет и неорганические вещества, т.е. – *фотолитоавтотрофы*. К этой подгруппе относятся растения и бактерии (например, цианобактерии – значительная группа крупных грамотрицательных бактерий, способных к фотосинтезу, сопровождающемуся выделением кислорода, и азотфиксацией). Рассматривается возможное применение цианобактерий, в частности спирулины, в создании замкнутых циклов жизнеобеспечения, а также как массовой кормовой или пищевой добавки.

К *фотоорганогетеротрофам* относятся зеленые бактерии (хлоробактерии) – фотосинтетические анаэробные организмы, способные жить в отсутствие атмосферного кислорода.

К *хемолитоавтотрофам* относятся аэробные тиаобациллы рода *Thiobacillus*, которые окисляют сульфиды, серу, а некоторые из них – двухвалентное железо, используя углекислый газ в качестве источника углерода. Эти бактерии осуществляют бактериальное выщелачивание металлов из сульфидных руд.

Фотолитоавтотрофы и *хемолитоавтотрофы* растут на доступных питательных неорганических средах, однако применение их ограничено, они не способны продуцировать полезные продукты, кроме биомассы и ограниченного ряда веществ.

Большинство продуцентов важнейших биотехнологических продуктов являются *хемоорганогетеротрофами*, т.е. способны расти на сложных органических питательных средах. Многие из них используют в качестве источника углерода и энергии сахара, органические кислоты, спирты и др. Такие питательные среды дороги, поэтому в биотехнологии часто используются отходы пищевой, целлюлозно-бумажной и других отраслей промышленности, а также сельского хозяйства.

Таблица 1.1 – Деление биологических объектов на группы по источникам энергии, углерода и донорам электронов

Источник энергии	Донор электрона	Источник углерода	Способ существования*	Представители
Окислительно-восстановительные реакции	Неорганические соединения	Углекислый газ	Хемолитоавтотрофия	Нитрифицирующие, тионовые, ацидофильные железобактерии
		Органические вещества	Хемолито-гетеротрофия	Метанообразующие архебактерии, водородные бактерии
	Органические вещества	Углекислый газ	Хемоорганавтотрофия	Факультативные метилотрофы, окисляющие муравьиную кислоту бактерии
		Органические вещества	Хемоорганогетеротрофия	Большинство прокариот, из эукариот: животные, грибы, человек
Свет	Неорганические соединения	Углекислый газ	Фотолито-автотрофия	Цианобактерии, пурпурные, зеленые бактерии, из эукариот: растения
		Органические вещества	Фотолито-гетеротрофия	Некоторые цианобактерии, пурпурные, зеленые бактерии
	Органические вещества	Углекислый газ	Фотоорганавтотрофия	Некоторые пурпурные бактерии
		Органические вещества	Фотоорганогетеротрофия	Галобактерии, некоторые цианобактерии, пурпурные, зеленые бактерии

* Примечание: от греч. *fotos* – свет, *autos* – сам, *lytos* – камень, *trophia* – питание, *etheros* – иной, *organicos* – органический.

Задание 2

Изучить функции макро- и микроэлементов микроорганизмов

Таблица 1.2 – Макро- и микроэлементы микроорганизмов и их главные функции

Элемент	Источник	Функции
Макроэлементы		
<i>C</i>	Органические вещества, CO_2	Основные компоненты клеточного материала
<i>O</i>	Органические вещества, O_2 , CO_2 , H_2O	
<i>H</i>	Органические вещества, H_2 , H_2O	
<i>N</i>	Органические вещества NH_4^+ , NO_3^- , N_2	
<i>S</i>	Органические вещества SO_4^{2-} , HS^- , $S_2O_3^{2-}$, S^0	Компонент цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, кофермента А, биотина и др.
<i>P</i>	HPO_4^{2-}	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, нуклеотидов и др.
<i>K</i>	K^+	Основной неорганический катион в клетке; кофактор некоторых ферментов
<i>Mg</i>	Mg^{2+}	Кофактор многих ферментов (киназ); присутствует в клеточной мембране, в эфирах фосфорной кислоты, участвует в аминокислотном обмене
<i>Ca</i>	Ca^{2+}	Кофактор многих ферментов; присутствует в экзоферментах (амилаза, протеаза), важный компонент эндоспора
<i>Fe</i>	Fe^{2+} , Fe^{3+}	Содержится в цитохромах, железопорфириновых ферментах, ферридоксинах и других железосеропротеидах; кофактор многих ферментов
Микроэлементы		
<i>Zn</i>	Zn^{2+}	Присутствует в алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК-полимеразах
<i>Mn</i>	Mn^{2+}	Содержится в бактериальной пероксидазе; кофактор некоторых ферментов
<i>Na</i>	Na^+	Участвует в мембранных процессах
<i>Cl</i>	Cl^-	Необходим галофильным бактериям
<i>Mo</i>	MoO_4^{2-}	Содержится в нитратредуктазе, нитрогеназе, формил- и ксантиндегидрогеназах и др. ферментах
<i>Se</i>	SeO_3^{2-}	Содержится в глицинредуктазе, формилдегидрогеназе
<i>Co</i>	Co^{2+}	Содержится в коферменте витамина B_{12} , глутаматмутаза и др. ферментов
<i>Cu</i>	Cu^{2+}	Присутствует в цитохромоксидазе, оксигеназах и др.
<i>W</i>	WO_4^{2-}	Содержится в некоторых формилдегидрогеназах
<i>Ni</i>	Ni^{2+}	Присутствует в уреазе; требуется для автотрофного роста водородных бактерий

Задание 3

Изучить микроорганизмы, используемые для промышленного биосинтеза

Таблица 1.3 – Бактерии и археи, используемые в промышленном биосинтезе в качестве продуцентов

Продуцент	Целевые продукты	Продуцент	Целевые продукты
<i>Acetobacter</i>	органические кислоты, полисахариды	<i>Lactococcus</i>	пробиотики
<i>Acinetobacter</i>	полисахариды	<i>Leuconostoc</i>	полисахариды
<i>Aerobacter</i>	спирты	<i>Metanobacterium</i>	витамины
<i>Agrobacterium</i>	полисахариды	<i>Methanococcus</i>	витамины
<i>Alcaligenes</i>	полисахариды	<i>Methanosarcina</i>	витамины
<i>Arthrobacter</i>	аминокислоты	<i>Micrococcus</i>	витамины, аминокислоты
<i>Azotobacter</i>	полисахариды	<i>Propionibacterium</i>	органические кислоты, витамины, пробиотики
<i>Bacillus</i>	аминокислоты, спирты, витамины, антибиотики, пробиотики, ферменты	<i>Pseudomonas</i>	органические кислоты, полисахариды
<i>Bifidobacterium</i>	пробиотики	<i>Serratia</i>	аминокислоты
<i>Brevibacterium</i>	аминокислоты, витамины	<i>Streptobacterium</i>	полисахариды
<i>Clostridium</i>	полисахариды, спирты, органические кислоты, аминокислоты	<i>Streptococcus</i>	антибиотики, пробиотики
<i>Corynebacterium</i>	аминокислоты	<i>Thermoanaerobacter</i>	спирты, органические кислоты
<i>Dunaliella</i>	спирты	<i>Xanthomonas</i>	полисахариды
<i>Enterococcus</i>	пробиотики	<i>Zymomonas</i>	спирты, полисахариды, органические кислоты
<i>Escherichia</i>	аминокислоты, антибиотики, пробиотики, ферменты	<i>Actinoplanes</i>	ферменты
<i>Gluconobacter</i>	органические кислоты	<i>Micromonospora</i>	антибиотики
<i>Klebsiella</i>	ферменты	<i>Saccharopolyspora</i>	антибиотики
<i>Lactobacillus</i>	органические кислоты, пробиотики	<i>Streptomyces</i>	антибиотики

Таблица 1.4 – Дрожжевые и плесневые грибы, используемые в промышленном биосинтезе в качестве продуцентов

Продуцент (род)	Целевые продукты
Дрожжевые грибы (дрожжи)	
<i>Candida</i>	органические кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты
<i>Kluyveromyces</i>	спирты
<i>Saccharomyces</i>	спирты, витамины, полисахариды, пробиотики, ферменты
<i>Schizosaccharomyces</i>	спирты
Плесневые (мицелиальные) грибы	
<i>Ashbya</i>	витамины
<i>Aspergillus</i>	органические кислоты, витамины, ферменты
<i>Aureobasidium</i>	полисахариды
<i>Blakslea</i>	витамины
<i>Cephalosporium</i>	антибиотики
<i>Eremothecium</i>	витамины
<i>Fusidium</i>	антибиотики
<i>Mucor</i>	антибиотики, спирты, ферменты
<i>Penicillium</i>	антибиотики, ферменты
<i>Rhizopus</i>	органические кислоты, ферменты
<i>Schizophyllum</i>	полисахариды
<i>Trichoderma</i>	антибиотики, ферменты
<i>Yarrowia</i>	ферменты

Задание 4

Изучить методы селекционной работы и направленное получение микроорганизмов-суперпродуцентов целевых продуктов

Задачи направленного получения микроорганизмов-суперпродуцентов осуществляются получением у природных штаммов наследственных изменений – мутаций, приводящих к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также появлению новой способности – синтезировать вещество в избытке – сверх своих потребностей и продуцировать его.

Дальнейшее повышение уровня продукции того или иного вещества у микроорганизма является постоянной целью работы селекционеров, т.к. наиболее эффективный способ интенсификации микробиологического производства, не

требующий дополнительных капиталовложений, заключается в использовании более продуктивного штамма.

Синтез микроорганизмами первичных или вторичных метаболитов можно представить себе как процесс, начинающийся с поглощения клеткой субстрата (источников углерода и азота, микроэлементов и т.д.) и проходящий затем ряд этапов, катализируемых различными ферментами, часть которых участвует в регуляции синтеза нужного вещества или его предшественников.

На отдельных этапах промежуточные вещества могут служить предшественниками других метаболитов и расходоваться на их синтез. Предшественники определенного вещества могут быть промежуточными или конечными продуктами других путей синтеза, иметь собственную регуляцию и расходоваться на другие потребности клетки.

В регуляции и управлении метаболическими процессами используется принцип обратной связи.

Существует 2 уровня (механизма) регуляции биосинтеза конечного (целевого) продукта – ретроингибирование и репрессия.

На первом уровне образующийся в цепи последовательных реакций целевой продукт ингибирует активность одного из начальных ферментов собственного синтеза. Если этого механизма оказывается недостаточно и конечный продукт все равно присутствует в избытке, включается второй механизм регуляции, и в результате подавляется (репрессируется) образование всего комплекса ферментов соответствующей биосинтетической цепи.

Вместе с тем существуют бактерии, так называемые *ауксотрофные мутанты*, – микроорганизмы, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для построения всех компонентов своей клетки различные аминокислоты, а с другой – приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты. Такие мутанты получают либо путем воздействия различных мутагенов физической и химической природы на исходную культуру микроорганизма с последующей селекцией штамма по заранее заданным признакам, либо методами генной инженерии.

Кроме того, продуцируемое вещество должно преодолевать барьер проницаемости и накапливаться в среде культивирования, не подвергаясь деградации под действием ферментов, которые может синтезировать микробная клетка.

Теоретически мутации, способствующие сверхсинтезу продукта, могут затрагивать большое число структурных генов, кодирующих ферменты всех этапов синтеза, транспорта и катаболизма данного продукта, а также регуляторные гены. Результат таких мутаций может проявиться в различных изменениях метаболизма клетки:

- повышение скорости поглощения и утилизации субстрата клеткой;
- повышение уровня синтеза биосинтетических ферментов или их активности за счет нарушения негативного контроля синтеза и активности регуляторных ферментов в пути синтеза продукта или его предшественников;
- блокирование побочных реакций синтеза для снижения расхода общих предшественников на синтез других метаболитов;

- блокирование дальнейшего внутриклеточного превращения продукта, если оно происходит;
- обеспечение эффективной экскреции продукта из клетки;
- блокирование деградации продукта;
- усиление позитивных форм регуляции синтеза продукта.

Если желаемым продуктом является выделяемый клеткой фермент (чаще всего это гидролитические ферменты, хотя в последнее время большой интерес проявляется и к ряду оксидоредуктаз, в частности, участвующих в катаболизме аминокислот), то мутации, способствующие усилению его образования и активности, а также накоплению в среде, могут затрагивать:

- структурный ген, приводя к синтезу мутантного фермента, не чувствительного к ингибированию конечным продуктом реакции, и (или) повышая его активность (число оборотов, т.е. число молей превращаемого субстрата в минуту); мутация в промоторной части гена должна усилить частоту инициации транскрипции или вызвать синтез фермента;
- гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции синтеза данного фермента (в частности, по типу катаболитной репрессии, имеющей разнообразные формы проявления и в общем виде выражающейся в обратной зависимости синтеза катаболитчувствительного фермента от скорости роста клеток), мутации в этих генах должны устранить или ослабить факторы, ограничивающие синтез фермента;
- гены, кодирующие ферменты, которые могут гидролизовать и инактивировать нужный фермент, мутации должны уменьшить или устранить такую возможность;
- гены, ответственные за синтез компонентов клеточных мембран, которые участвуют в «сборке» (у эукариотов) и экскреции ферментов, мутации в этих генах могут повысить эффективность указанных процессов.

Чаще всего требуется сочетание нескольких мутаций, среди которых могут быть «главные» и «вспомогательные». Последние необходимы для проявления или наибольшего выражения первых. Вместе с тем возможно и отсутствие значительного уровня продукции даже в случае, когда большинство из теоретически необходимых для этого мутаций получено у микроорганизма и, наоборот, селекционер может быть избавлен от необходимости получать множество разных мутаций, если он удачно выбрал исходный природный тип микроорганизмов.

Разнообразие природных форм позволяет выбрать микроорганизм, который имеет меньшее число ограничений для сверхсинтеза какого-то вещества, хотя при этом и не продуцирует его.

В ряде случаев природные штаммы с менее сложными системами ограничений сверхсинтеза выделяют в среду некоторое количество первичного метаболита. Такие микроорганизмы становятся объектами селекции на повышение уровня продукции выделяемого вещества.

Пригодность микроорганизма (не выделяющего нужное вещество, обычно первичный метаболит, но привлекающего исследователя какими-то свойствами) для использования в качестве объекта селекции на получение продуцента этого вещества можно проверить, введя ему одну или несколько определенных, легко тестируемых мутаций, которые теоретически должны вызвать сверхсинтез данного вещества и, может быть, уже были «апробированы» на другом микроорганизме. Это самый надежный способ выбора исходного штамма, даже если для этого вида микроорганизма нет данных о регуляции синтеза желаемого вещества.

Для продуцентов вторичных метаболитов, а также ферментов или полисахаридов выбор исходного штамма предрешен способностью природного микроорганизма продуцировать какое-то количество нужного вещества. В тех случаях, когда одно и то же вещество выделяют природные штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам (например, грибы и бациллы), это может позволить выбрать более «технологичный» для будущего производства или более поддающийся селекции штамм.

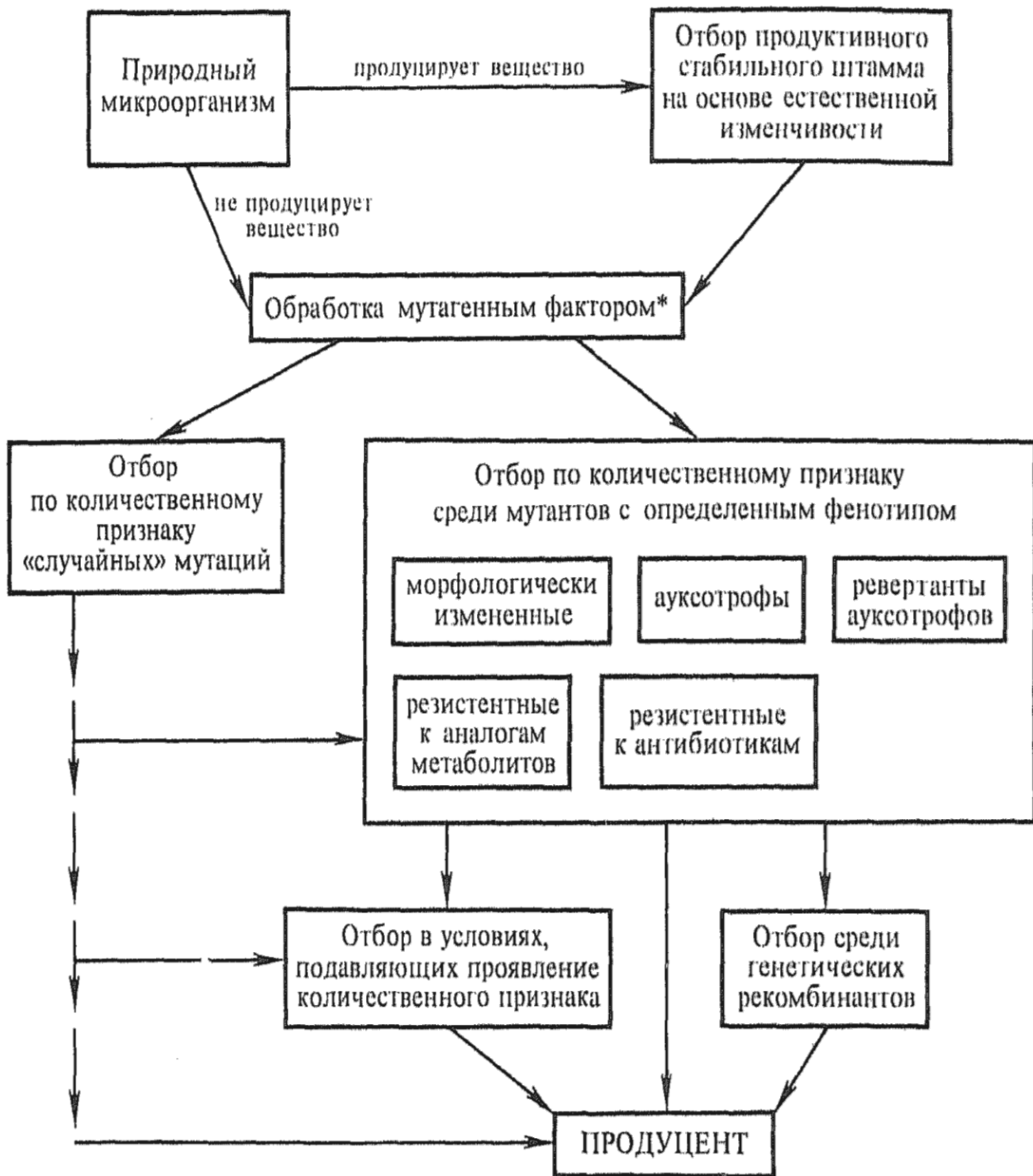
Таким образом, селекционер чаще всего не свободен в выборе исходного для селекции штамма и не может считать критерием такого выбора генетическую изученность микробного объекта и возможность применения к нему разнообразных генетических методов. Природные свойства штаммов, определяющие этот выбор, безусловно, облегчают и ускоряют селекционную работу. Однако отсутствие у многих промышленных микроорганизмов систем обмена информацией не позволяет ни изучить генетический контроль синтеза продуцируемого вещества, ни облегчить насыщение генома продуцента необходимыми для сверхсинтеза мутациями.

У микроорганизма, выделяющего продукт и взятого в качестве объекта селекции, необходимо изучить естественную изменчивость по морфологическим признакам и по количественному признаку – уровню продукции желаемого вещества.

После посева исходного штамма на чашки Петри среди не менее 100 (а лучше нескольких сотен) колоний выявляют типичную для данной культуры морфологическую форму и отклонения от нее. Затем изолированные на косяки колонии (клоны) как типичной формы (не менее 100 клонов), так и доступное число ее морфологических вариантов (убедившись предварительно, что эти варианты сохраняют свои особенности при пересевах) оценивают после соответствующего способа культивирования по уровню продукции вещества, применяя надежный аналитический метод. Такая оценка позволяет выявить вполне возможную корреляцию между способностью продуцировать данное вещество и морфологией колоний.

Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля, которым является исходная (не рассевавшаяся) культура, отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторных опытах, а затем отбирают 1 клон, характеризующийся высоким и воспроизводимым уровнем. Такая процедура, которую иногда называют «чисткой» исходной культуры,

довольно часто приводит к отбору клона с заметно повышенной продукцией, а в некоторых случаях – и с отклонением от типичной морфологии.



Примечание: * Обработка мутагеном может предшествовать всем этапам отбора

Рисунок 1.1 – Схема селекционной работы с микроорганизмами-продуцентами биологически активных веществ
[Егоров Н.С., 1989]

Контрольные вопросы

1. Какие группы биообъектов используются в биотехнологии как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств?
2. Какие принципы лежат в основе выбора биологических систем для биотехнологического производства?
3. Какие существуют методы совершенствования биообъектов?
4. В чем заключаются методы селекционной работы с микроорганизмами-продуцентами целевых продуктов?
5. На чем основано направленное получение микроорганизмов-суперпродуцентов целевых продуктов?
6. Какие макроэлементы необходимы для микроорганизмов? Какую функцию они выполняют?
7. Какие микроэлементы необходимы для микроорганизмов? Какую функцию они выполняют?

Тема 2

АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ И СЛАГАЕМЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Цель занятия: ознакомиться с устройством биологических реакторов, их классификацией, особенностями процессов массо- и теплообмена, пенообразования и пеногашения, подготовки стерильного и очистки отработанного воздуха в промышленном микробиологическом производстве.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить общую схему промышленной ферментации и классификацию процессов культивирования микроорганизмов

Общая схема промышленной ферментации представлена на рисунке 2.1.

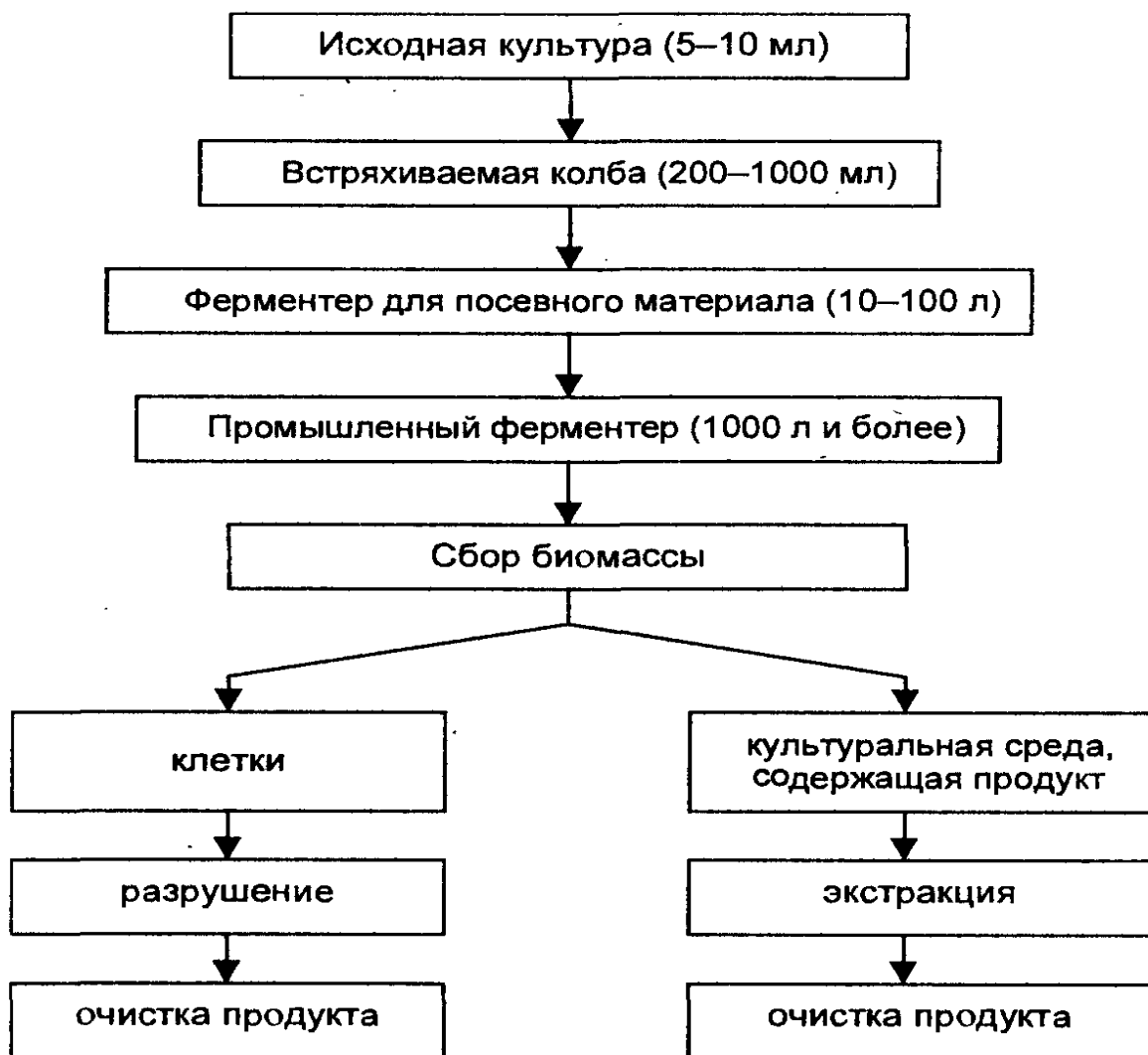


Рисунок 2.1 – Общая схема промышленной ферментации
[Прицен Т.П., 2006]

Процесс начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Вначале выращивают исходную культуру (5-10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200-1000 мл), далее переносят в ферментер для посевного материала (10-100 л), а затем в промышленный ферментер (1000-100000 л).

По завершении ферментации выделяемый продукт находится в клетках или в культуральной среде, но не в обеих фракциях одновременно, поэтому дальнейшие манипуляции проводят с одной из этих фракций.

Классификация процессов культивирования микроорганизмов представлена на рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 – Процессы культивирования микроорганизмов
[<http://www.myshared.ru>]

Задание 2

Изучить принципиальную схему устройства биореактора

Основным аппаратным элементом биотехнологического процесса является биореактор (ферментер, ферментатор).

Биореакторы предназначены для культивирования микроорганизмов, накопления биомассы, синтеза целевого продукта.

Типовые ферментеры представляют собой вертикальные емкости различной вместимости (малые – от 1 до 10 л, многотоннажные – более 1000 л) с минимальным числом штуцеров и передающих устройств, в которых

обеспечиваются оптимальные гидродинамические и массообменные условия. Биореакторы изготавливают из высоколигированных марок стали, иногда из титана. Внутренняя поверхность биореактора должна быть отполирована.

Ферментеры снабжены паровой рубашкой, мешалками, барботерами, стерилизующими воздушными фильтрами, отбойниками, обеспечивающими необходимые температурный, газовый режим, гидродинамическую обстановку в биореакторе (т.е. процессы массо- и теплообмена).

В биореакторах имеются пробоотборники для отбора проб культуральной жидкости в процессе биосинтеза. Могут быть и другие конструктивные особенности, учитывающие специфику биотехнологического процесса.

Работа отдельных узлов контролируется измерительными приборами, фиксирующими как параметры технологического процесса, так и отдельные физико-химические показатели культивирования (температуру стерилизации и культивирования, скорость вращения мешалки, давление, расход воздуха или газов на аэрацию, пенообразование, pH, eH, pO_2 , pCO_2 среды).

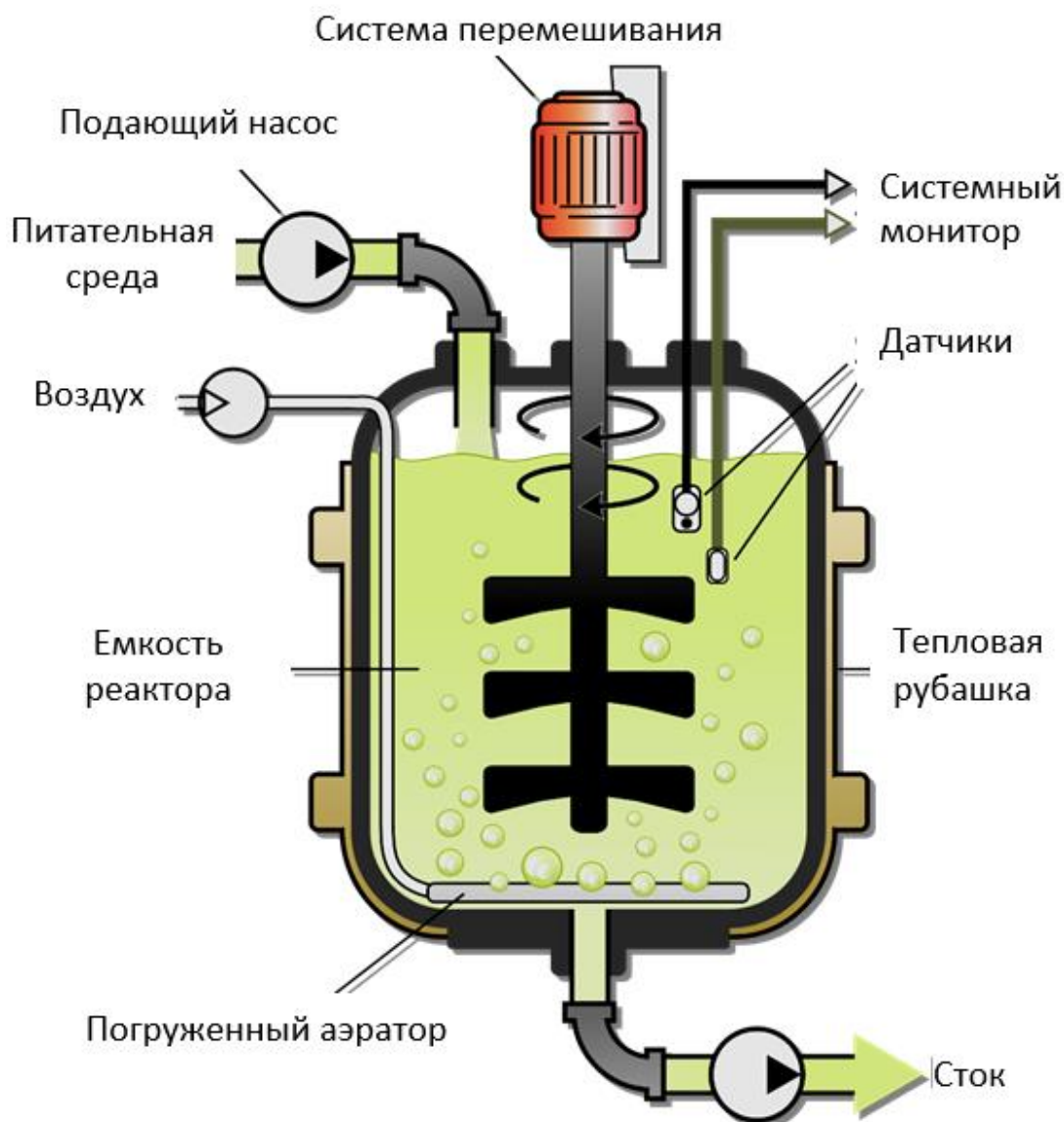


Рисунок 2.3 – Схема устройства биореактора
[<https://upload.wikimedia.org>]

Задание 3

Изучить классификацию биологических реакторов

В зависимости от *способа культивирования*, биологические реакторы подразделяются на:

- аппараты для анаэробной ферментации;
- аппараты для аэробной поверхностной ферментации;
- аппараты для аэробной глубинной ферментации.

Аппараты для анаэробных процессов применяются в процессах конверсии растительного сырья, а также различных других отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получения ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метантенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических дайджестеров или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Данные аппараты оборудованы системой подачи сырья, системой теплообменных труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдером) для сбора образуемого биогаза.

Аппараты для аэробной поверхностной ферментации широко применяются для производства органических кислот (жидкофазные) и ферментов (твёрдофазные).

Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80-150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха среду инокулируют порами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцеры и поступает на обработку.

При твёрдофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твёрдую среду слоем 10-15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструктивно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена.

Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициент массопередачи кислорода, т.к. кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы, в зависимости от типа углеродосодержащего сырья и степени его восстановленности, может составлять от 0,75 до 5,00

кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околочлеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям».

Кроме этого, концентрации клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате.

При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и, диспергируясь, увеличивают площадь контакта фаз «среда – клетка». Однако очень сильное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

Биологические реакторы для аэробной глубинной ферментации в зависимости от *подвода энергии для перемешивания* подразделяются на 3 группы:

- ферментеры группы ФГ (с подводом энергии газовой фазой);
- ферментеры группы ФЖ (с подводом энергии жидкой фазой);
- ферментеры группы ФЖГ (комбинированные).

В *ферментерах группы ФГ* подвод энергии в аппарат осуществляется через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода – менее $4 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{ч}$). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

В *ферментерах группы ФЖ* подвод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают более высокие по сравнению с группой ферментаторов ФГ значения коэффициента массопередачи кислорода (свыше $6 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{ч}$).

В *ферментерах группы ФЖГ* (с подводом энергии газовой и жидкой фазы) основными конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любое из известных значений.

Ферментеры периодического действия из групп ФЖГ применяют в промышленности для получения антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. Их конструкции обеспечивают стерильность ферментации в течение длительного времени (нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента.

Таблица 2.1 – Классификация биологических реакторов, предназначенных для аэробной глубинной ферментации, в зависимости от подвода энергии для перемешивания

Ферментеры	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
<i>Ферментеры с подводом энергии газовой фазой (ФГ)</i>	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	- барботажный; - барботажно-эрлифтный; - колоночный (колонный); - форсуночный
<i>Ферментеры с подводом энергии жидкой фазой (ФЖ)</i>	Обычно энергия передается жидкой фазе самовсасывающейся мешалкой или насосом	- эжекционный; - с циркуляционным контуром; - с всасывающей мешалкой
<i>Ферментеры комбинированные (ФЖГ)</i>	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	- барботажный с механическим перемешиванием

Задание 4

Изучить особенности массо- и теплообменных процессов при промышленном культивировании микроорганизмов

Массообменные процессы – это такие технологические процессы, скорость протекания которых определяется скоростью переноса вещества (массы) из одной фазы в другую конвективной и молекулярной диффузией. Движущей силой массообменных процессов является разность концентраций распределяемого вещества во взаимодействующих фазах.

В биосистемах массообмен связан с доставкой кислорода к клеткам, выведением углекислоты и транспортом различных соединений через мембраны клеток.

При выращивании биообъекта в ферментере образуется сложная система массопереноса кислорода: газ – жидкость – твердое тело (т.е. биообъект). Эту систему можно разделить на 3 части: газ – жидкость, жидкость – жидкость и жидкость – твердое тело.

В этих системах перемещение кислорода будет неравноценным и зависит от растворимости газа в жидкой фазе, мощности барботажа, размеров пузырьков, скорости вращения вала и формы мешалки, химического состава питательной среды, температуры и т.д. Поэтому необходим постоянный контроль содержания кислорода в среде, который осуществляют с помощью специальных приборов, обеспечивающих поддержание необходимого уровня растворимого кислорода.

Кислород нередко действует как реагент, а избыток растворенного кислорода может быть токсичен для биообъекта, т.к. кислород способен образовывать

свободные радикалы (супероксидный, пероксидный, гидроксильный и синглетный), которые имеют высокую химическую активность и являются потенциальными разрушителями липидов, белков и нуклеиновых кислот. Защита клеток от негативного действия свободных радикалов кислорода осуществляется с помощью ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также витамина Е.

Для эффективного переноса кислорода необходимо добиваться разности его концентрации в направлении от газового пузырька к клетке. С этой целью, учитывая низкую растворимость кислорода в воде и водных растворах, приходится подавать его в биореактор в повышенных количествах.

Следует добиваться, чтобы все аэробные клетки были насыщены кислородом. Причем общая потребность в кислороде достигает максимума в конце фазы логарифмического роста и начале стационарной фазы. Это означает, что удельная скорость размножения клеток достигает своего пика раньше, чем скорость использования кислорода.

Эффективная и адекватная доставка кислорода к биообъекту зависит от морфофункциональных особенностей культивируемого микроорганизма и условий его выращивания.

Скорость потребления кислорода биообъектом зависит от следующих факторов:

- возраст культуры (размножающиеся клетки потребляют больше кислорода);
- межклеточная адгезия (конгломераты клеток потребляют меньше кислорода, чем отдельные клетки);
- скорость накопления биомассы клеток (чем она выше, тем быстрее скорость поглощения кислорода);
- динамические изменения питательной среды (большая вязкость снижает поступление кислорода к клеткам);
- качество источников питания (отношение количества потребляемого кислорода к количеству превращенной глюкозы всегда меньше, чем аналогичное соотношение при окислении углеводов из нефти);
- продукты метаболизма (секретируемые белки снижают массопередачу кислорода);
- используемые пеногасители (лаурилсульфат натрия снижает коэффициент массопередачи кислорода).

В биосистемах массообмен связан не только с доставкой кислорода к клеткам, но и выведением углекислоты и транспортом различных соединений через мембраны клеток.

Диоксид углерода может находиться в среде в виде карбоната, гидрокарбоната, угольной кислоты и углекислого газа. Растворимость диоксида углерода зависит от рН жидкости. Диоксид углерода транспортируется через границу раздела фаз «газ – жидкость» только в растворенном виде.

Транспорт питательных веществ через мембраны клеток осуществляется пассивной диффузией, облегченной диффузией, за счет активного транспорта, а в ряде случаев у эукариот – путем эндоцитоза.

Теплообмен – это перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами.

Термостатирование ферментативного процесса, т.е. подвода или отвода тепла в ходе ферментации, является важной проблемой для многих биотехнологических производств. Это связано как с выделением значительного количества тепла при культивировании микроорганизмов, так и с узким температурным оптимумом роста культуры.

Узкий диапазон температур обуславливается резким спадом активности ферментов при снижении температуры, а также денатурацией биомолекул при значительном повышении температуры.

Поэтому в биотехнологических процессах всегда, с одной стороны, требуется подача тепла (стерилизация, культивирование анаэробов при $+55...+56^{\circ}\text{C}$), а с другой – отведение тепла, образующегося в ферментере.

В ферментерах 40-50% тепла образуется за счет жизнедеятельности продуцента, а также в результате работы мешалки. Еще одним источником тепла является горячий стерильный воздух, который необходим для аэробных микроорганизмов. При барботаже он мгновенно охлаждается и отдает превнесенное тепло.

Теплообмен зависит от следующих факторов:

- ламинарное и турбулентное движение теплоносителя;
- толщина и качество материала стенок биореактора;
- вязкость среды, скорость потока при полунепрерывном и непрерывном способах культивирования биообъектов;
- характер охлаждения биореактора.

Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется тем, что в биореакторе много контактирующих поверхностей: между клеткой и питательной средой, между средой и стенкой аппарата, между стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора, между рубашкой и наружной средой и т.д.

Большинство биотехнологических процессов протекает при температуре $+30...+50^{\circ}\text{C}$ (мезофильные условия). Поэтому всегда необходим отвод тепла, особенно в биореакторах, в которых выращивают аэробные клетки. Для отвода тепла используют рубашки аппаратов, змеевики, которые монтируют внутри биореактора, выносные теплообменники и др.

Для поддержания теплового режима в ферментере чаще всего используют артезианскую воду температурой $+12...+15^{\circ}\text{C}$ или смесь артезианской и оборотной воды, т.е. воды, которая прошла через ферментер, с температурой $+18...+20^{\circ}\text{C}$. Используют также «захоложенную» воду (с температурой $+10^{\circ}\text{C}$), получаемую на специальных установках.

Задание 5

Изучить особенности пенообразования и пеногашения при промышленном культивировании микроорганизмов

В процессе выращивания аэробных микроорганизмов, который сопровождается подачей воздуха в ферментер и перемешиванием среды, наблюдается сильное пенообразование. Возникновение пены в процессе биосинтеза обусловлено введением газовой фазы, а также содержанием в среде питательных субстратов, солей, продуктов метаболизма микроорганизмов и поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В чистой воде и других химически чистых жидкостях пены не бывает. Молекулы ПАВ образуют пленки на поверхности газовых пузырей, затрудняя их коалесценцию (слияние нескольких мелких пузырьков) и разрушение. В стойких пенах длительность существования пузырька составляет от 1 до 15 мин.

Пена в процессах культивирования микроорганизмов играет двойную роль: способствует повышению скорости абсорбции кислорода в среде вследствие образования большой поверхности массообмена, а также вынуждает снижать коэффициент заполнения ферментера жидкостью. Кроме того, может произойти выброс пены с выходящим воздухом, что приводит к потерям продукта и опасности инфицирования культуры.

От эффективности способов пеногашения зависят такие технологические показатели, как выход продукции с 1 м³ культуральной жидкости и ее себестоимость.

Самопроизвольный распад монодисперсных пен (с пузырьками равных размеров) происходит равномерно. Полидисперсные пены разрушаются быстрее, но неравномерно.

В настоящее время имеются разнообразные средства как для разрушения пены, так и для предупреждения ее образования.

Чтобы предупредить образование пены, в процессе культивирования можно удалить вспениватели из исходной питательной среды, вводя в нее адсорбенты (активный уголь, иониты), которые связывают белковые пенообразователи.

При составлении питательной среды целесообразно выбирать такие компоненты, которые имеют меньшую склонность к вспениванию. На вспениваемость некоторых питательных сред влияют не только состав, но и условия обработки (температура, длительность стерилизации и количество вносимого посевного материала), что необходимо учитывать при отработке технологии биосинтеза. Однако полностью избежать образования пены в процессах микробиологического синтеза все же не удастся.

Для регулирования уровня пены при культивировании микроорганизмов и предотвращения ее выброса из ферментера используют следующие методы:

1. Удаление из культуральной жидкости пенообразователей и воздействие на пену химическими и физико-химическими средствами:

- использование питательных сред с пониженными пенообразующими свойствами;

- добавление веществ, связывающих пенообразователи в поверхностно-неактивные комплексы;
 - добавление ПАВ, уменьшающих прочность пленок пены.
2. Разрушение пены механическими, гидро- и аэродинамическими способами:
- ударное воздействие поверхностей деталей и элементов;
 - воздействие жидкости или газа;
 - сепарирование пены инерционными, центробежными и другими методами;
 - резкое изменение давления газа в пене;
 - захват и разрушение пены потоками перемешиваемой жидкости.
3. Разрушение пены при физических воздействиях:
- колебания звуковой и ультразвуковой частоты;
 - термическое пеногашение острым паром или при помощи нагретой жидкости;
 - электрическое пеногашение.
4. Стабилизация уровня пены путем:
- временного уменьшения расхода аэрирующего воздуха;
 - отключения механической мешалки;
 - вывода избыточной пены из аппарата.
5. Комбинированные воздействия.

На практике применяются в основном химические и механические способы пеногашения, а также их сочетания.

Химический метод пеногашения состоит в добавлении в исходную питательную среду и (или) в культуральную жидкость по ходу ферментации специальных веществ-пеногасителей.

Химические пеногасители могут быть жировые (натуральные) и синтетические.

Действие *жировых пеногасителей*, к которым относятся легкоплавкие животные жиры (костный, свиной и др.), растительные масла (подсолнечное, соевое, оливковое и др.), основано на том, что в процессе самопроизвольного эмульгирования в ферментационных жидкостях жиры адсорбируют пенообразователи. Жиры, не обладающие способностью к эмульгированию, обычно не обладают пеногасящими свойствами.

Физико-химические и пеногасящие свойства жиров зависят главным образом от жирнокислотного состава. Важное значение имеет температура плавления жира: если она выше $+60^{\circ}\text{C}$, то жир не обладает пеногасящим действием из-за неспособности к эмульгированию в процессе ферментации. Особенность жировых пеногасителей состоит в том, что они одновременно могут быть источником углеродного питания для микроорганизмов. Оптимальный режим добавления пеногасителей с учетом их влияния на выход целевого продукта приходится подбирать индивидуально для каждого процесса.

Натуральные пеногасители обладают следующими недостатками:

- большой расход жировых пеногасителей (0,5-2,5% к объему питательной среды), являющихся ценным пищевым сырьем;
- высокая стоимость;
- добавление больших количеств жира в процессе ферментации затрудняет последующие процессы фильтрации и выделения целевого продукта;
- резкое снижение качества животных жиров при длительном хранении;
- непостоянный химический состав и, следовательно, технологические свойства жировых пеногасителей в различных партиях.

Действие *синтетических пеногасителей*, к которым относятся кремнийорганические полимеры (силоксаны), четырехзамещенные аммониевые основания, алкиламиносульфонаты, сложные эфиры, спирты и др., заключается в полном или частичном вытеснении молекул пенообразователя с поверхности пленок пены. Следовательно, пеногасители должны обладать большей поверхностной активностью, чем содержащиеся в культуральной жидкости пенообразователи. Поэтому пеногасители, как правило, нерастворимы в воде и в культуральной жидкости.

Синтетические ПАВ содержат гидрофильную группу, определяющую диссоциацию в культуральной жидкости. Большинство синтетических ПАВ рекомендуется использовать не в чистом виде, а в смеси с подходящим носителем (чаще всего свиным жиром или парафиновым маслом). Чем медленнее происходит высвобождение молекул ПАВ из носителя, тем выше его эффективность. На эффективность действия химических пеногасителей влияет степень их диспергирования в ферментационной среде. Применяют механические способы диспергирования, нередко для лучшего распределения применяют эмульсии пеногасящих препаратов.

Химические пеногасители часто вызывают нежелательные побочные явления, поэтому следует проводить биосинтез с минимальным расходом таких пеногасителей, а пену разрушать механическим способом.

Механические методы пеногашения основаны на том, что при контакте рабочего органа с пузырьками происходит их разрушение, уменьшение их в размере или происходит отброс уплотненной эмульсии в более отдаленные зоны, при этом выделяется газ (обработка в центробежном поле).

Механические методы пеногашения, в отличие от химических, не оказывают ингибирующего воздействия на культуру микроорганизмов. Однако их применение связано с большими затратами энергии, которые не всегда достаточно эффективны.

На практике обычно механические устройства для пеногашения применяют в сочетании с химическими пеногасителями. При этом достигается наилучший эффект пеногашения.

Пеногасящее устройство может быть вмонтировано в ферментер или присоединено к нему.

В биотехнологическом производстве широко применяются пеногасители, имеющие пакет конических тарелок на полом валу. Пеногаситель

устанавливают на самостоятельном валу, который не зависит от вала системы перемешивания. Устройства работают как в лабораторных, так и в пилотных и промышленных аппаратах. Пеногасители с коническими тарелками особенно рекомендуются для гашения мелкодисперсной пены, которая плохо поддается механическому разрушению. В этой ситуации наиболее эффективно сепарирование системы в центробежном поле (на поверхности сепарационных тарелок).

Известны конструкции пеногасителей с рабочими органами на горизонтальном валу.

Для разрушения пены используют также центробежные насосы и специальные насосы Фогельбуша для двухфазных смесей.

Разработаны ферментеры, в которых перемешивание и пеногашение обеспечивает одно устройство. В таких ферментерах концентрично приводному валу пеногасителя-мешалки установлена коническая воронка. Пена, переливаясь через верхний край воронки, стекает вниз на лопасти мешалки, где разрушается.

К статическим механическим устройствам для пеногашения относятся циклоны, вихревые сепараторы, пеноразрушающие колонны и отстойники.

Задание 6

Изучить принципиальную технологическую схему очистки и стерилизации воздуха

Получение сжатого, очищенного от микроорганизмов воздуха определенной температуры и влажности является сложной технологической задачей, осуществляемой в специальной системе, которая состоит из 3 частей, соединенных последовательно:

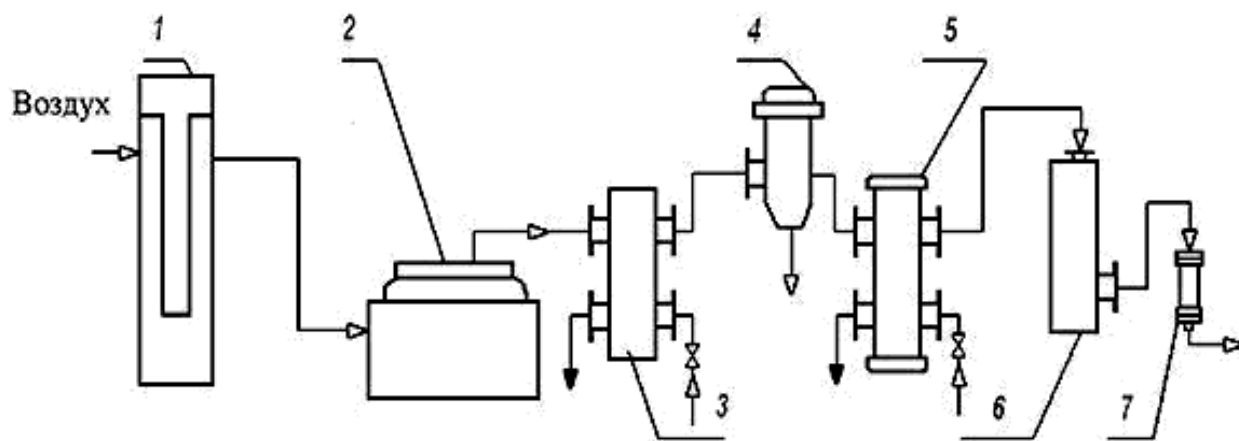
- в первой части происходит очистка атмосферного воздуха от пыли и его сжатие;
- во второй части происходит подготовка и поддержание воздуха в оптимальном термодинамическом состоянии по влажности и температуре;
- в третьей части происходит окончательная очистка воздуха (в фильтрах тонкой очистки) перед подачей в ферментеры.

Для защиты компрессора атмосферный воздух предварительно очищают от крупных частиц пыли, а затем сжимают до требуемого давления. При сжатии воздух нагревается до температуры $+100...+200^{\circ}\text{C}$, поэтому его необходимо охладить до оптимальной температуры культивирования микроорганизма-продуцента, т.к. температура воздуха, подаваемого на аэрацию, оказывает существенное влияние на накопление конечного продукта.

Поддержание определенной температуры сжатого воздуха обуславливается не только самой культурой микроорганизма, но и высоким влагосодержанием атмосферного воздуха. При охлаждении сжатого воздуха выпадает 50-70% исходной влаги, которая увлажняет волокна аэрозольных фильтров, и эффективность их действия резко снижается. Чтобы насадки аэрозольных

фильтров не увлажнялись, воздух после компрессора охлаждают до температуры $+25...+30^{\circ}\text{C}$. После отделения влаги воздух нагревается до температуры культивирования. Окончательное подсушивание воздуха может проводиться в сушилке между головным и индивидуальными фильтрами.

Принципиальная технологическая схема очистки и стерилизации воздуха представлена на рисунке 2.4.



1 – фильтр предварительной очистки воздуха; 2 – турбокомпрессор; 3 – теплообменник-охладитель; 4 – влагоотделитель; 5 – теплообменник-нагреватель; 6 – головной фильтр; 7 – индивидуальный фильтр тонкой очистки

Рисунок 2.4 – Технологическая схема очистки и стерилизации воздуха
[<https://medbe.ru>]

На предприятиях микробиологической промышленности очистка и стерилизация воздуха осуществляется с помощью системы различных фильтров: предварительной очистки периодического или непрерывного действия, грубой и тонкой очистки.

Фильтры предварительной очистки устанавливают на всасывающей линии перед компрессором. Путем инерционного осаждения такие фильтры очищают воздух от крупных частиц размером более 5 мкм. В фильтрующих материалах предусматриваются большие промежутки между улавливающими элементами для максимального снижения сопротивления потоку при высокой скорости фильтрации воздуха (1,5-3,0 м/с). Чтобы сухие частицы после осаждения при такой скорости потока не выносились из фильтра, его слои промасливают. Фильтры этого класса часто называют масляными, или висциновыми.

Фильтры грубой очистки предназначены для улавливания основной массы загрязнений, попавших в систему после прохождения фильтров предварительной очистки и компрессора, а также для удлинения срока службы фильтров тонкой очистки, выполняющих основной процесс стерилизации на стадии фильтрации. Как правило, это фильтры большой емкости. Они обслуживают несколько ферментеров и называются головными. Головной фильтр дублирует работу индивидуальных фильтров и повышает степень очистки и стерилизации воздуха.

Фильтры тонкой очистки и стерилизации необходимы для улавливания загрязнений, пропущенных другими фильтрами, а также попавших в систему по случайным причинам. Работа этих фильтров должна быть особенно надежной, т.к. это последняя ступень очистки и стерилизации воздуха на пути к ферментеру. Конструктивно фильтры тонкой очистки во многом похожи на фильтры грубой очистки, только они значительно меньше размерами и в них используются более эффективные фильтрующие материалы.

Для надежной работы всей технологической схемы очистки и стерилизации воздуха и ее отдельных узлов необходимы соблюдение определенных требований к технологической обвязке фильтров, поддержание определенного термодинамического режима воздуха в системе.

Контрольные вопросы

1. Что является основным аппаратным элементом биотехнологического производства?
2. Какие требования предъявляются к биореакторам, используемым для культивирования микроорганизмов?
3. Какие типы биореакторов-ферментеров применяются в биотехнологическом производстве и чем они характеризуются?
4. Что понимают под термином «массообмен»? От каких факторов зависит скорость потребления кислорода биообъектом?
5. Что понимают под термином «теплообмен»? От каких факторов зависит теплообмен?
6. Чем обусловлено образование пены при ферментации? Какие методы используют для регулирования уровня пены при культивировании микроорганизмов и предотвращения ее выброса из ферментера?
7. Какими способами осуществляется очистка и стерилизация воздуха, используемого для ферментации?

Тема 3

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

Цель занятия: ознакомиться с микроорганизмами, используемыми для получения антибиотиков, витаминов, пробиотиков, изучить особенности получения указанных групп препаратов.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить микроорганизмы, используемые в биотехнологической промышленности в качестве продуцентов антибиотиков

Таблица 3.1 – Промышленные продуценты основных групп антибиотиков

Антибиотик	Продуцент
<i>Антибиотики, продуцируемые бактериями</i>	
Грамицидин С	<i>Bacillus brevis</i>
Полимиксины	<i>Bacillus polymyxa</i>
Бацилтрацины	<i>Bacillus licheniformis</i> и <i>B. brevis</i>
Низин	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Антибиотики, продуцируемые актиномицетами</i>	
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>
Неомицин	<i>Streptomyces fradiae</i>
Канамицин	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i>
Сизомицин	<i>Micromonospora inyoensis</i>
Тобрамицин	<i>Streptomyces tenebrarum</i>
Хлортетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Окситетрациклин	<i>Streptomyces rimosus</i>
Амфотерецин В	<i>Streptomyces noolus</i>
Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Хлорамфеникол	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Эритромицин	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Спирамицин	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Тилозин	<i>Streptomyces fradiae</i>
Нистатин	<i>Streptomyces noursei</i>
Леворин	<i>Streptomyces levoris</i>
<i>Антибиотики, продуцируемые грибами</i>	
Пенициллины	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Цефалоспорин	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Циклоспорин	<i>Trichoderma polysporum</i>
Гризеофульвин	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Фузидин	<i>Fusidium coccineum</i>

Задание 2

Изучить особенности микробиологического синтеза антибиотиков

Процесс производства антибиотиков включает в себя следующие основные стадии (рисунок 3.1):

- 1) получение соответствующего штамма-продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства;
- 2) биосинтез антибиотика;
- 3) выделение и очистка антибиотика;
- 4) концентрирование, стабилизация антибиотика и получение готового продукта.

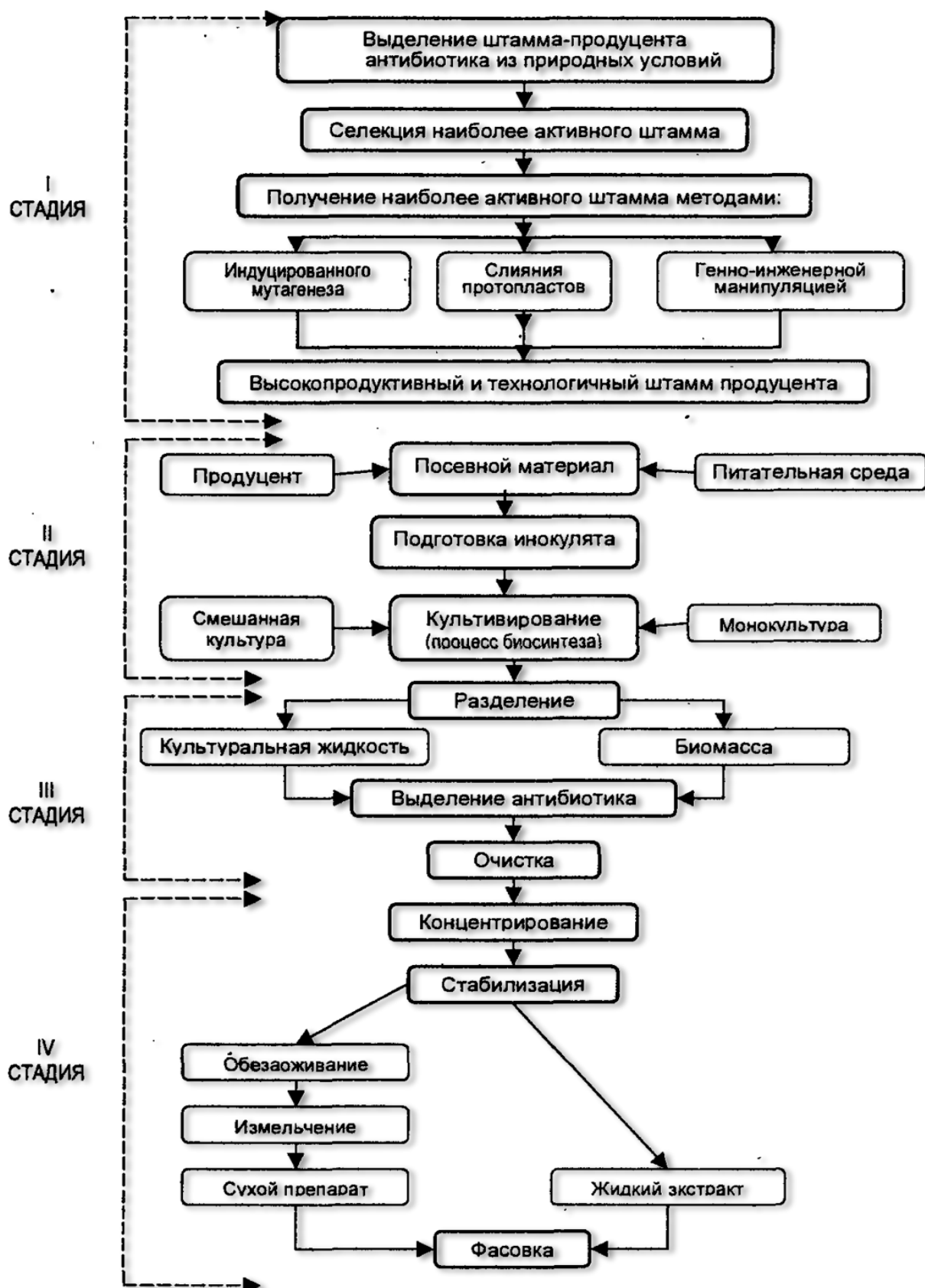
Стадия получения штамма-продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства. Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Для выделения актиномицетов, являющихся основными продуцентами антибиотиков, используют синтетические питательные среды, в которые в качестве источника углерода добавляют крахмал или глицерин. В качестве источника азота в среды добавляют нитратные соли. На этих средах рост бактерий подавляется, а грибы развиваются в малом количестве.

Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них антибиотических веществ, необходимых для практических целей. При этом методом хроматографии определяют наличие известных антибиотиков. Если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют первичное выделение и химическую очистку антибиотика, определяют его токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями различных заболеваний.

Выделенные штаммы-продуценты антибиотиков часто вариабельны и нестабильны. Поэтому методом селекции отбирают наиболее перспективные штаммы, а затем проводят отбор индуцированных мутантов. Культивируют мутантные штаммы на богатой питательной среде. Процесс контролируют либо по концентрации биомассы, либо по концентрации питательных веществ в среде.

На *стадии биосинтеза (образования) антибиотика* основной задачей является создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика. Высокая результативность этой стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающий подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования организма. Все это входит в понятие управляемый синтез.



I стадия – получение штамма-продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства; *II стадия* – биосинтез антибиотика; *III стадия* – выделение и очистка антибиотика; *IV стадия* – концентрирование, стабилизация и получение готового продукта

Рисунок 3.1 – Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза [Прицен Т.П., 2006]

На стадии подготовки инокулята большое значение имеет состав среды, в которой выращивается организм, возраст клеток или мицелия. На стадии биосинтеза, кроме состава среды, большую роль играет скорость потребления тех или иных ее компонентов, регуляция процесса аэрации, поддержание соответствующих рН и температуры и других показателей культивирования.

Выявление потенциальной возможности образовывать в процессе жизнедеятельности антибиотики связано с условиями культивирования организмов. В одних условиях организм образует антибиотик, а в других условиях тот же организм при хорошем росте не будет обладать способностью синтезировать антибиотическое вещество. Образование антибиотиков будет происходить только при развитии организма в специфической среде и при наличии особых внешних условий. Путем изменения условий культивирования можно получить больший или меньший выход антибиотика или создать условия, при которых антибиотик вообще не будет образовываться. Можно также путем изменения условий культивирования продуцента добиться преимущественного биосинтеза одного из антибиотиков, при условии образования изучаемым организмом нескольких антибиотических веществ, или же получить новые формы антибиотиков, но только в пределах тех соединений, которые способны синтезироваться этим организмом.

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков является метод глубинного культивирования, суть которого заключается в том, что микроорганизмы развиваются в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух, и среда перемешивается. Наибольшее распространение получила модификация глубинного культивирования, названная непрерывным культивированием, при использовании которого возможно поддержание развития микроорганизмов на определенной стадии роста.

В условиях глубинной культуры процесс развития микроорганизмов-продуцентов и синтеза антибиотика проходит в 2 фазы:

- в первой фазе развития культуры – *трофофазе* (фаза сбалансированного роста микроорганизмов) – наблюдается интенсивное накопление биомассы продуцента, связанное с быстрым потреблением основных компонентов среды и с высоким уровнем поглощения кислорода;
- во второй фазе развития – *идиофазе* (фаза несбалансированного роста микроорганизмов) – накопление биомассы замедлено или уменьшено; в этот период продукты метаболизма микроорганизмов лишь частично используются на построение клеточного материала, они в основном направляются на биосинтез антибиотика. Обычно максимум продукции антибиотика в среде наступает после максимума накопления биомассы.

Для изучения условий образования антибиотиков и их производства в промышленных условиях используются ферментеры, снабженные приспособлениями для достаточной аэрации и перемешивания культуры, поддержания необходимой температуры и контрольно-измерительными приборами.

Для каждого продуцента разрабатывается оптимальная среда, которая должна соответствовать определенным требованиям: обеспечивать

максимальный выход антибиотика, состоять из относительно дешевых компонентов, иметь хорошую фильтрующую способность, обеспечивать применение наиболее экономичных приемов для выделения и очистки антибиотиков.

При подготовке посевного материала микроорганизмы предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирках, затем делают высевы в колбы с жидкой питательной средой. На следующем этапе делают высеv в специальный инокулятор небольшого объема (10 л), из которого хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный (100-500 л) ферментер, откуда и делают высеv в основной ферментер. Для засева используется объемная доля инокулята 5-10%.

На *стадии выделения и очистки антибиотика*, особенностью которой является достигаемое увеличение концентрации антибиотика (примерно от 1% до 20-30%), осуществляется предварительная обработка культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрация (отделение культуральной жидкости от биомассы продуцента), эффективность которой определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, накоплением антибиотика в культуральной жидкости или внеклеточно.

Целью химической очистки является извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и освобождение от сопутствующих примесей. В качестве основных методов очистки антибиотика используется экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, выпаривание, сушка.

Если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами.

Если антибиотик содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, то вначале его переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно изолировать.

Одной из стадий химической очистки антибиотиков является концентрирование полученных растворов путем отгонки большей части растворителя, как правило, в вакууме.

Применяемые методы выделения и химической очистки, а также качество оборудования и используемых реактивов имеют большое значение для улучшения качества получаемого антибиотика и для увеличения его выхода.

Стадия получения готового продукта заключается в изготовлении лекарственных форм и расфасовке конечного продукта.

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить – удалить из полученного препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания необходимо применять методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие цвета препарата.

При промышленном получении антибиотиков используют различные методы обезвоживания препаратов: *лиофильная сушка* (проводится при температуре -8...-12°C), *распылительная сушка* (заключается в пневматическом

распылении раствора антибиотика до мельчайших капель в камере потоком нагретого воздуха в течение нескольких секунд), *сушка в вакуум-сушильных шкафах* или *методом взвешенного слоя* (производится при производстве зернистых и пастообразных антибиотических препаратов).

Антибиотики, предназначенные для инъекций, должны быть стерильными. Поэтому получение таких препаратов, приготовление различных лекарственных форм, расфасовка и упаковка осуществляются в асептических условиях.

Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю:

- при биологическом контроле ставится задача выяснения стерильности готового препарата, которая обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки препарата;
- при фармакологическом контроле предполагается исследование токсичности, пирогенности, аллергенности и других свойств препарата, определенных Государственной фармакопеей.

Задание 3

Изучить микроорганизмы, используемые в биотехнологической промышленности при производстве пробиотических препаратов

Таблица 3.2 – Микроорганизмы, используемые при производстве пробиотических препаратов

Группа микроорганизмов	Представители
Бифидобактерии	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. animals</i> , <i>B. thermophilum</i>
Лактобациллы	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. plantarium</i> , <i>L. casei</i> spp. <i>ramnosus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i>
Лактококки	<i>Lactococcus</i> spp. <i>cremonis</i> , <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>
Кишечная палочка	<i>Escherichia coli</i>
Энтерококки	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
Стрептококки	<i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. diaacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>
Пропионибактерии	<i>Propionibacterium acnes</i>
Бациллы	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i>
Сахаромицеты	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>

Задание 4

Изучить технологию производства препаратов пробиотиков, содержащих живые бифидобактерии

Организация массового производства пробиотиков в виде порошков, таблеток, капсул, суппозиториев, лиофильно высушенной массы или жидких суспензий требует решения ряда технологических вопросов:

- сохранение адгезивных свойств штаммов;
- подбор штаммов, устойчивых к антибиотикам;
- подбор оптимального состава штаммов, дополняющих друг друга и обеспечивающих максимальную биологическую активность препарата, высокую выживаемость микроорганизмов и их антагонистическую активность в отношении патогенной микрофлоры.

Схема получения различных форм препаратов, содержащих живые бифидобактерии, приведена на рисунке 3.2.

Получение питательных сред, растворов, криопротекторов. Для культивирования бифидобактерий используются такие среды, как среда Блаурокка и казеиново-дрожжевая среда.

Получение инокулята бифидобактерий. Флакон или ампулу с лиофилизированным штаммом бифидобактерий вскрывают в асептических условиях, вносят 2-5 мл среды Блаурокка. Растворяют содержимое флакона и осуществляют пересев на 2 пробирки, содержащие среду Блаурокка. Посевы инкубируют в термостате при температуре $+38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов.

На всех этапах производственного процесса проводят контроль стерильности материала, используя питательные среды для контроля бактерий и грибов.

Выросшую культуру бифидобактерий из пробирок пересевают в бутылки, содержащие 500-550 мл среды Блаурокка. Посевы второй генерации инкубируют при температуре $+38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 20-24 часов. Далее, убедившись в чистоте культуры, производят пересев бифидобактерий из бутылок в биореактор, содержащий 9,0-9,5 л среды Блаурокка. Посевы инкубируют при температуре $+38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов. Выросшая культура имеет вид рыхлого зернистого осадка. При микроскопии мазков, окрашенных по Граму, видны характерные микробные клетки в виде беспорядочных скоплений.

По окончании контроля маточную культуру используют для производственного посева и получения жидкого полуфабриката бифидобактерий.

Получение жидкого полуфабриката бифидобактерий. Производственную культуру выращивают методом глубинного культивирования в реакторах, снабженных механической мешалкой со скоростью вращения 200-1000 об./мин. Производственный посев осуществляется в реакторе, объем которого варьирует от 50 до 500 л. Реактор должен быть обеспечен опцией, позволяющей производить разлив препарата во флаконы или специальные контейнеры для проведения последующей лиофилизации.

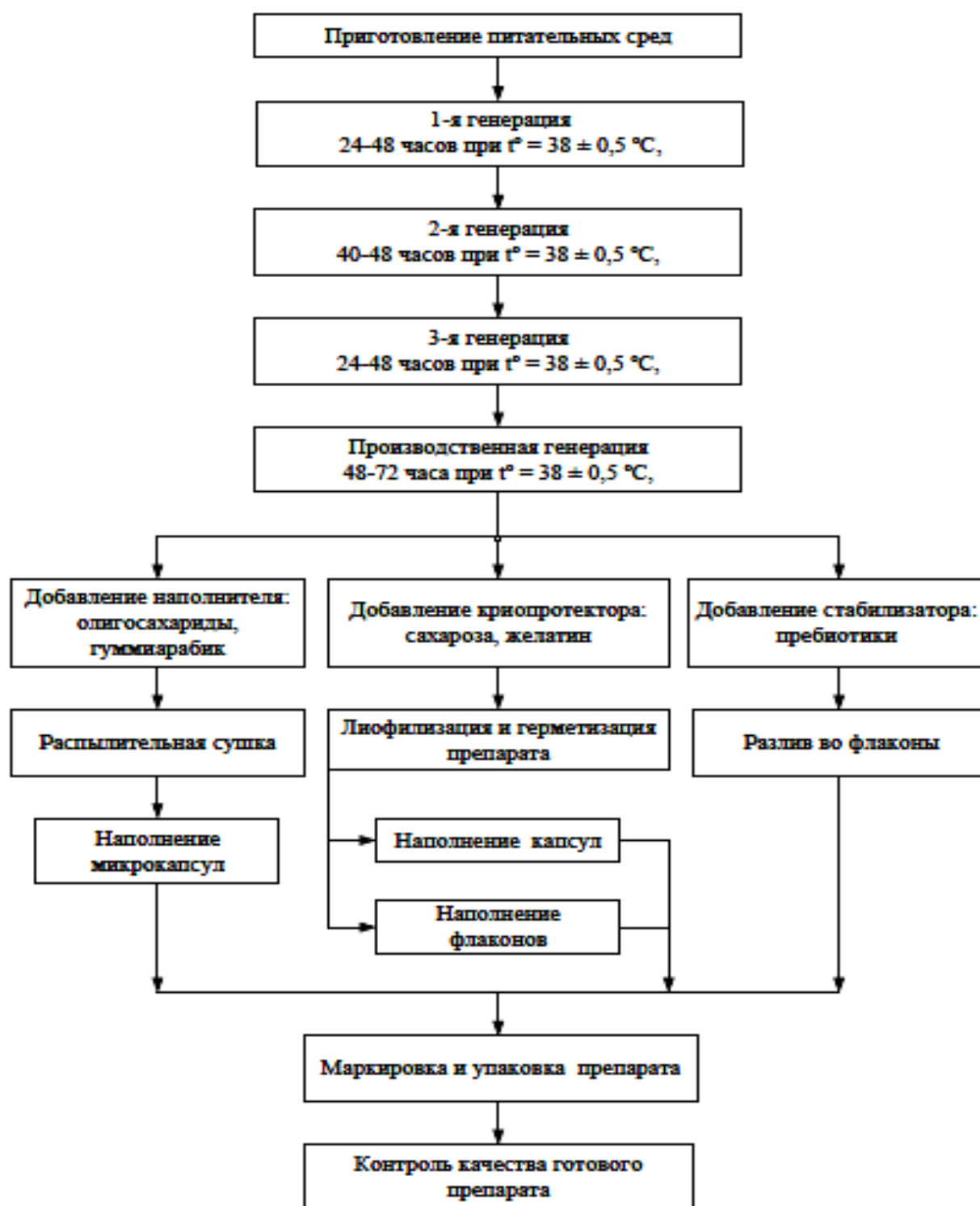


Рисунок 3.2 – Схема получения различных форм препаратов, содержащих живые бифидобактерии
[Краснопольский Ю.М., 2009]

В асептических условиях в реактор, содержащий 50 л казеиново-дрожжевой среды, переносят 10 л микробной взвеси (20% от объема среды). В реактор со смесью питательной среды и инокулята прибавляют 8-9 л 40%-ного стерильного раствора лактозы. Выращивание биомассы бифидобактерий в реакторе проводят при температуре $+38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 72 часов при периодическом перемешивании. В процессе культивирования проводят корректировку величины

pH при помощи 10%-ного раствора аммиака до значения $pH=6,6\pm0,5$. Стабилизация величины pH указывает на прекращение роста бактерий.

К жидкому полуфабрикату бифидобактерий производят добавление криопротекторов. В реактор последовательно добавляют защитную среду (сахарозно (5-10%) – желатиновую (до 3%)), обезжиренное молоко (5-10%), раствор лактозы (5-7%) и др. Содержимое реактора перемешивают и проводят взятие образца для проверки подлинности и чистоты культуры.

В контрольной пробе после добавления среды высушивания определяют:

- стерильность – отсутствие посторонней микрофлоры (бактерий и грибов);
- количество живых бифидобактерий – в 1 дозе препарата должно содержаться не менее 10^7 живых бактерий;
- активность кислотообразования – 1 доза препарата бифидобактерий должна образовывать кислоту не ниже $90^{\circ}T$;
- микроскопическое исследование – в мазках, окрашенных по Граму, должны быть типичные неподвижные грамположительные полиморфные палочки с бифуркациями на одном или двух концах, длиной 4-5 мкм.

Разлив жидкого полуфабриката бифидобактерий. Разлив препарата идет при непрерывном перемешивании шприцевым способом. В процессе разлива производится контроль на наличие посторонней микрофлоры.

При получении сухой субстанции бифидобактерий для получения капсул, суппозиторий или других форм препаратов бифидобактерий полуфабрикат разливают в контейнеры, которые, также как и флаконы, передают на лиофилизацию.

Лиофилизация и герметизация препарата. Кассеты с флаконами и контейнеры с препаратом загружают в аппарат для лиофилизации и замораживают препарат в течение 48 часов при температуре $-50...-60^{\circ}C$.

При этом существенное значение имеет количество клеток в бактериальной суспензии, ее эвтектические параметры, а также характер температур воздействия при замораживании и обезвоживании. Время и режим высушивания определяется в зависимости от марки сублимационного оборудования, толщины слоя биомассы, используемых криопротекторов и других факторов.

Полученный после лиофилизации препарат подвергают *герметизации, маркировке, упаковке и контролю качества*. Хранение препаратов бифидобактерий проводят при температуре $+2...+8^{\circ}C$.

Задание 5

Изучить сравнительную характеристику пребиотиков и пробиотиков

Таблица 3.3 – Сравнительная характеристика пребиотиков и пробиотиков

Пробиотики	Пребиотики
Содержат живые клетки нормофлоры кишечника: бифидобактерии, лактобациллы и др.	Содержат вещества, являющиеся нутрицевтиками (пищей) для нормофлоры кишечника
Заселяют кишечник экзогенной микрофлорой	Стимулируют рост индигенной (собственной) микрофлоры кишечника
Только 5-10% живых бактерий, содержащихся в пробиотиках, достигает толстой кишки	Не перевариваются в верхних отделах ЖКТ и в неизменном виде достигают толстой кишки
Нужно хранить в темном, прохладном месте: количество живых бактерий в пробиотиках зависит от условий и срока хранения	Представляют собой углеводы, условия и сроки хранения которых почти не влияют на их бифидогенные свойства
Из 500 видов нормофлоры кишечника препараты-пробиотики содержат только от 1 до 2 штаммов полезных бактерий	Пребиотики, будучи пищевым субстратом нормофлоры кишечника, стимулируют всю популяцию полезных бактерий

Задание 5

Изучить микроорганизмы, используемые в биотехнологической промышленности в качестве продуцентов витаминов

Таблица 3.4 – Промышленные продуценты витаминов

Витамин	Продуцент
<i>Водорастворимые витамины</i>	
Цианкобаламин (витамин В ₁₂)	<i>Metanobacterium formicum</i> <i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Methanococcus halophilus</i> <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i>
Рибофлавин (витамин В ₂)	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> <i>Micrococcus glutamaticus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida flaveri</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Ashbya gossypii</i> <i>Eremothecium ashbyii</i>
Никотиновая кислота (витамин В ₃ , РР)	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Аскорбиновая кислота (витамин С)	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Erwinia punctata</i> <i>Corynebacterium sp.</i>

Витамин	Продуцент
Жирорастворимые витамины	
Эргостерин (провитамин D ₂)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium westlingii</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida tropicalis</i>
β-Каротин (провитамин A)	<i>Blakslea trispora</i>

Задание 6

Изучить особенности биотехнологического производства витамина B₁₂

Витамин B₁₂ – (α-5,6-диметилбензимидазол)-цианкобаламин – полимер сложного строения, являющийся гематопоэтическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов.

Витамин B₁₂ регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т.п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10-15%.

Единственный способ получения витамина B₁₂ в настоящее время – это микробиологический синтез в промышленном масштабе.

Технологическая схема получения витамина B₁₂ путем микробиологического синтеза с помощью пропионовокислых бактерий представлена на рисунке 3.3.

Продуcentом витамина B₁₂ являются пропионовокислые бактерии из рода *Propionibacterium*. Применение мутантов и добавление в среду предшественника витамина B₁₂ – 5,6-диметилбензимидазола (5,6-ДМБ) – резко повышает продуктивность продуцента. Этому способствует также добавление в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки.

Выращивание пропионовых бактерий производится периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 часа после начала ферментации вносят предшественники (5,6-ДМБ). Длительность ферментации – 3 суток.

Полученную массу сепарируют, стабилизируют нитритом натрия, охлаждают, нейтрализуют, коагулируют белки и фильтруют. Очищают на ионообменной смоле, кристаллизуют и проводят химическую очистку продукта.

Далее следует получение различных лекарственных форм поливитаминных препаратов.



Рисунок 3.3 – Технологическая схема получения витамина B₁₂ путем микробиологического синтеза с помощью пропионовокислых бактерий
[Разговоров, П.Б., 2010]

Для увеличения производства витамина B₁₂ перспективным является применение генной инженерии при получении гибридных штаммов и использовании методов иммобилизации на полимерах.

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются биологические особенности антибиотиков? Какие существуют подходы к классификации антибиотиков?
2. В каких отраслях народного хозяйства используются антибиотики?
3. Какие группы микроорганизмов являются продуцентами антибиотиков?
4. В чем заключаются особенности производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза?
5. Какие вещества относятся к препаратам нормофлоры? Какое биологическое значение они имеют?
6. Что понимают под термином «пробиотики»? Какова роль пробиотиков в регулировании нормальной микрофлоры пищеварительного тракта?
7. Что понимают под термином «пребиотики»? Какова роль пребиотиков в регулировании нормальной микрофлоры пищеварительного тракта?
8. Что понимают под терминами «синбиотики» и «метабиотики»? С какой целью используются данные препараты?
9. Какое биологическое значение имеют витамины?
10. Какие особенности микробиологического синтеза витаминов?

Тема 4

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: ознакомиться с техникой секвенирования нуклеиновых кислот, блоттинга, полимеразной цепной реакции.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить технологии секвенирования нуклеиновых кислот 1-го поколения

Химический метод Максама-Гилберта

Секвенирование по Максаму-Гилберту – одна из самых ранних платформ секвенирования ДНК. Этот метод секвенирования широко известен как метод химического расщепления. Он был разработан в 1977 г. Алланом Максамом, студентом в Гарвардском университете, вместе с Уолтером Гилбертом, и основан на нуклеотид-специфичной химической деградации при обработке ДНК различными химическими агентами. Метод утратил актуальность из-за своей технической сложности.

Принцип метода. В 1976 г. А. Максам и В. Гилберт разработали метод секвенирования, основанный на специфической химической деградации фрагмента ДНК, меченного с одного конца. Метод секвенирования ДНК путем химической деградации основан на ограниченном расщеплении меченного фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Обязательным условием секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченного только на одном конце. Разделение продуктов деградации по размеру с помощью высоковольтного электрофореза в полиакриламидном геле высокого разрешения, способного разделять фрагменты ДНК, длина которых различается только на 1 нуклеотид, и последующая радиоавтография

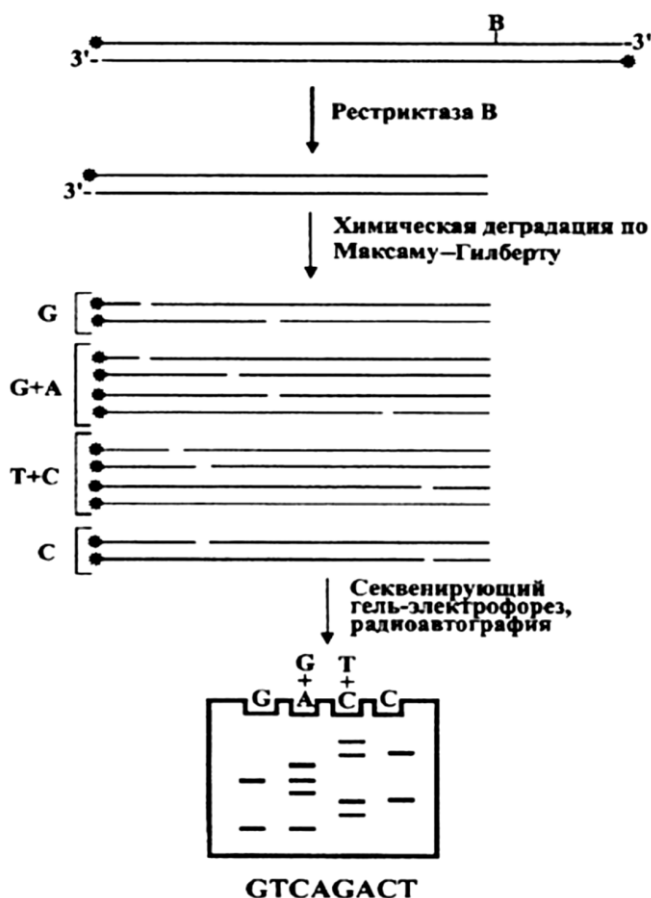


Рисунок 4.1 – Химический метод
Максама-Гилберта
[<https://vuzlit.com>]

геля позволяет определить нуклеотидную последовательность ДНК.

Первым шагом в проведении реакции химической деградации является ограниченная модификация определенных нуклеотидов различными химическими агентами. Концентрация агента и продолжительность его действия на молекулы ДНК подбираются таким образом, чтобы в каждой молекуле модифицировался только 1 нуклеотид. Для каждого типа нуклеотидов или их комбинации проводят отдельные реакции ограниченной модификации и количественного расщепления. Таким образом, в результате последовательности реакций образуется смесь молекул олигонуклеотидов, различающихся по размеру на 1 нуклеотид и несущих на одном из концов метку (обычно радиоактивную).

Помимо меченых молекул, в реакционной смеси будут присутствовать и олигонуклеотидные фрагменты, не несущие меток, но на этапе радиоавтографии они окажутся невидимыми. После разделения продуктов реакции в соседних дорожках секвенирования денатурирующего полиакриламидного геля и этапа радиоавтографии на рентгеновской пленке будет видна лестница из полос ДНК, считывание которой позволяет восстановить нуклеотидную последовательность ДНК.

Преимущества и недостатки. Основная привлекательность процедуры секвенирования Максама-Гилберта заключается в том, что матрица ДНК, используемая в этом методе, может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Метод Максама-Гилберта был предпочтительнее метода Сэнгера в определенный момент времени, потому что метод Сэнгера требовал клонирования одноцепочечной ДНК для каждого начала считывания. Метод Максама-Гилберта также можно использовать для анализа взаимодействия ДНК-белка и эпигенетических модификаций ДНК.

Основным ограничением в секвенировании Максама-Гилберта стало использование вредных химических веществ и таких методов, как рентгеновское излучение и радиоактивные метки. Трудность в расширении и использовании этих методов, а также необходимость использования гидразина, известного нейротоксина, сделали метод невыгодным и практически мало применимым в процессе дальнейшего развития технологий.

«Плюс-минус» метод

Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918-2013) – единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу 2 Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 гг.). Первую премию присудили за установление структур белков, особенно инсулина, а вторую награду ему вручили в том числе и за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот.

Методику секвенирования ДНК с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов и ДНК-полимеразы (или фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I) предложили Сэнгер и его коллеги в 1977 г., причем с течением времени этот метод прошел несколько модификаций и к настоящему моменту считается золотым стандартом современного секвенирования.

Принцип метода. Первоначально Ф. Сэнгер и Алан Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК, который можно подразделить на 2 основные стадии:

1) полимеразная цепная реакция, в которой используется ДНК, фермент (ДНК-полимераза), олигонуклеотидные праймеры и смесь 4 дезоксинуклеотидов (А, Т, G и С), причем 1 из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α -положению фосфата (^{32}P);

2) очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках). Смесь делят на 8 равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводят 4 ПЦР-реакции в присутствии каждого из 4 типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводят 4 ПЦР-реакции в отсутствии каждого из них. Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминатация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного дезоксинуклеозидтрифосфата, а в «минус»-системе – перед ним.

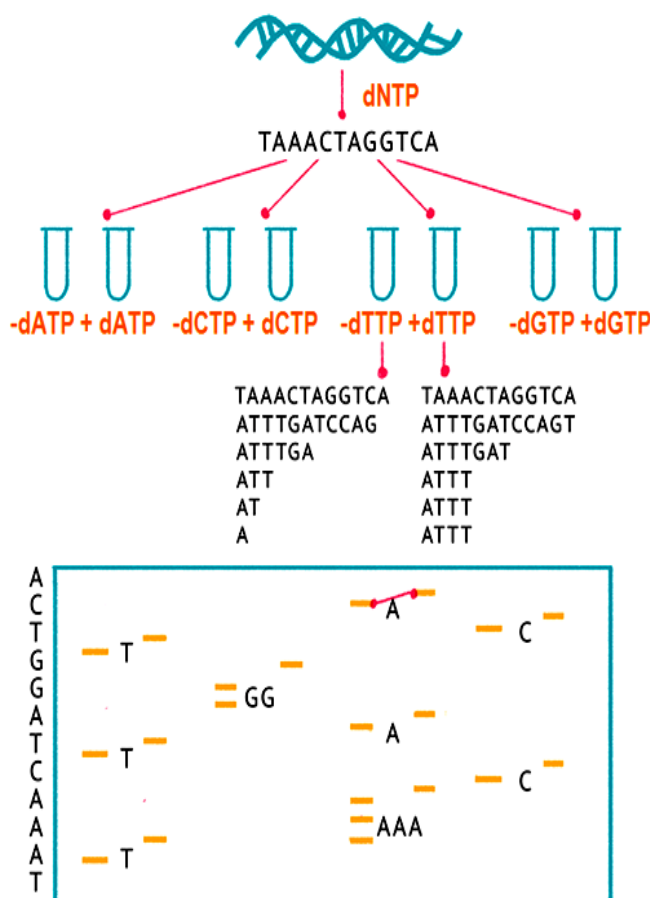


Рисунок 4.2 – «Плюс-минус» метод
[<https://biomolecula.ru>]

Метод получил название «плюс-минус», поскольку реакцию полимеризации в нем изначально проводили либо в отсутствие одного из 4 типов нуклеотидов («минус»-система), либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»-система), что ограничивает возможность наращивания полинуклеотидной цепи, т. е. останавливает (терминирует) ее синтез из-за недостатка соответствующего нуклеотида.

Метод «терминаторов» (метод «обрыва цепи»)

Спустя несколько лет Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов», или метода «обрыва цепи».

Принцип метода. Суть метода заключается в том, что в реакционную смесь добавляют аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксинуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности ее дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся «обломку» можно установить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК.

Химическая реакция проводится в 4 отдельных реакционных пробирках, каждая из которых содержит матричную ДНК, праймеры, ДНК-полимеразу и 4 dNTP, 1 из которых радиоактивно помечен. Образец ДНК делится на 4 отдельные реакции секвенирования, содержащие все 4 стандартных дезоксинуклеотида (dATP, dGTP, dCTP и dTTP) и ДНК-полимеразу. К каждой реакции добавляется только 1 из 4 дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddGTP, ddCTP или ddTTP), в то время как другие добавленные нуклеотиды являются обычными. После денатурации и отжига праймера фермент ДНК-полимераза начинает добавлять dNTP во вновь синтезированную цепь ДНК, и, если ddNTP включается, реакция прекращается. Это приводит к раздельному сбору нитей ДНК разных размеров во всех 4 реакционных пробирках.

Результат отдельной реакции затем помещают в отдельные лунки полиакриламидного геля. Радиоактивное пятно указывает на фрагменты ДНК с ddNTP, включенным в определенном положении. Нуклеотидная последовательность в разделяющем геле определяется снизу-вверх, а нуклеотидная последовательность в разных полосах терминатора дает шаблон нуклеотидной последовательности.

Преимущества и недостатки. Секвенирование по Сэнгеру помогло исследователям определить мутации и первопричину генетических заболеваний. Это лучший метод для идентификации коротких tandemных повторов и секвенирования отдельных генов. Однако самым большим недостатком этого метода является количество времени, которое он потребляет, что связано с низкой пропускной способностью. Метод может обрабатывать только относительно короткие последовательности ДНК (до 300-1000 пар оснований) одновременно.

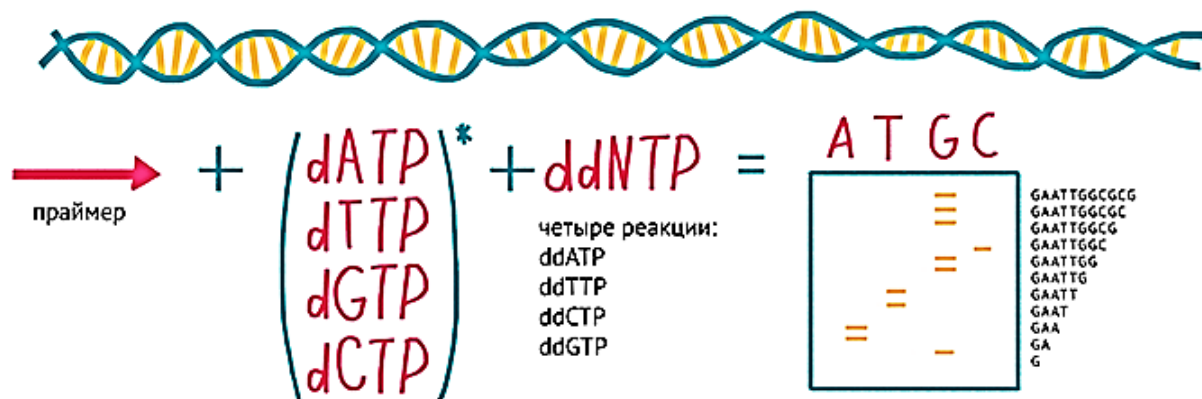


Рисунок 4.3 – Метод «терминаторов»

[<https://biomolecula.ru>]

Автоматический метод секвенирования ДНК

Оба метода секвенирования (Сэнгера и Максама-Гилберта) были трудоемкими и сложными. В 1986 г. Leroy Hood и его коллеги усовершенствовали метод секвенирования Сэнгера, используя флуоресцентные метки вместо радиоактивных меток. 1 из 4 флуоресцентных красителей используется для маркировки нуклеотидных праймеров. Каждый краситель используется в отдельной реакции секвенирования с 1 из 4 ddNTP. По завершении реакций секвенирования все 4 реакции смешивают и анализируют вместе в 1 полосе полиакриламидного

геля. Использование 4 различных ddNTP, меченных флуоресцентной меткой с 4 различными длинами волн, позволяет проводить реакцию секвенирования в 1 пробирке вместо 4 отдельных реакций.

Этот метод был усовершенствован в начале 1990-х гг., когда Harold Swerdlow и его коллеги использовали капилляры в методе секвенирования ДНК. Эти капилляры достаточно маленькие (с внутренним диаметром 50 мкм) и работают с более высокими напряжениями, чтобы уменьшить время работы. В 1993 г. В. L. Karger заменил полиакриламид разделительной матрицей с низкой вязкостью; позже, в 1995 г., Zhang разработал поп-cross-linked полимер, который стабилен даже при +60°C для получения высококачественной последовательности нуклеотидов.

Принцип метода. Основные принципы этого метода секвенирования похожи на секвенирование Сэнгера, но процедура автоматизирована, и реакции проводят в 1 пробирке, содержащей все 4 дидезоксинуклеотидтрифосфата, каждый из которых использует 4 различных флуоресцентных красителя, излучающих свет на определенной длине волны. Генерируемые данные последовательности собираются и анализируются с использованием компьютера.

Преимущества и недостатки. Автоматизированные секвенаторы ДНК дороги, а также ими сложно секвенировать повторяющиеся участки последовательности. Несмотря на новые открытия секвенаторов следующего поколения, автоматическое секвенирование по Сэнгеру по-прежнему считается «золотым стандартом» из-за его точности и длины чтения. При этом для массового использования данный метод секвенирования медлен и дорог.

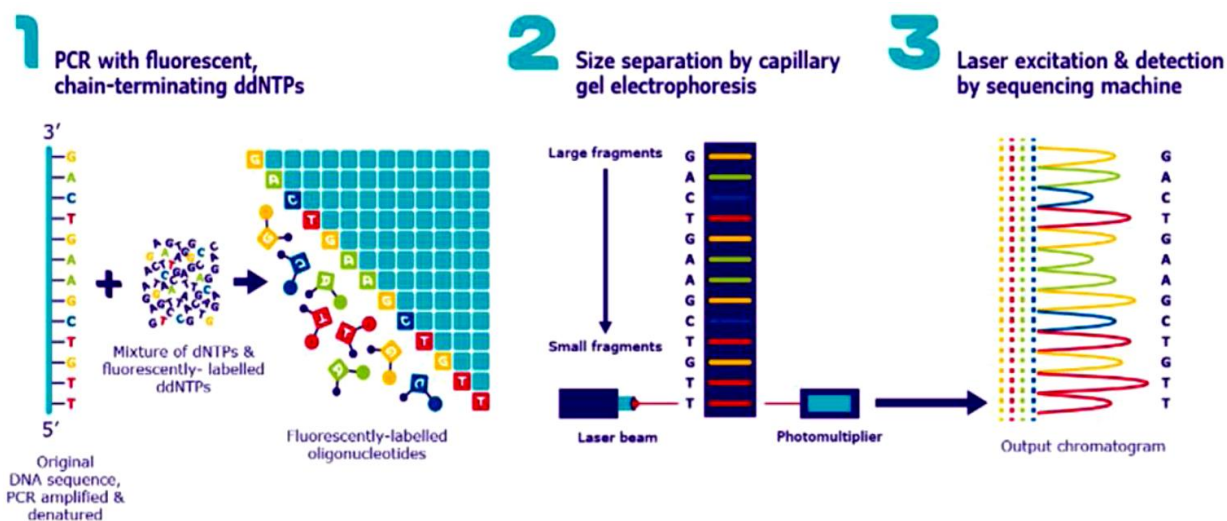


Рисунок 4.4 – Автоматический метод секвенирования ДНК

- 1 – ПЦР с флуоресцентными ddNTP с обрывом цепи;
 2 – разделение по размеру с помощью капиллярного гель-электрофореза;
 3 – лазерное возбуждение и обнаружение с помощью секвенатора
 [А. Г. Бородин и др., 2020]

Пиросеквенирование

Пиросеквенирование начало применяться в 1987 г. как метод, используемый для непрерывного мониторинга активности ДНК-полимеразы (Nyren, Lundin). В 1988 г. Edward Human продолжил работу по созданию метода секвенирования ДНК. В 1996 г. платформа пиросеквенирования была разработана Ronaghi et al. Спустя почти 10 лет, в 2005 г., Romberg и его коллеги представили первый коммерческий секвенатор следующего поколения, доступный на основе подхода пиросеквенирования, сделанного в 1996 г. Позже 454 Life Sciences разработали параллельную версию пиросеквенирования, которая с тех пор была приобретена Roche Diagnostics.

Принцип метода. Согласно этой технологии, растворы 4 типов нуклеотидов добавляются последовательно в процессе секвенирования фрагментов ДНК и отмываются после каждой реакции. При включении очередного нуклеотида в синтезируемую комплементарную цепь на подготовленной одноцепочечной ДНК-матрице происходит детекция высвобождающегося пирофосфата путем связывания его с белком люциферазой и получением светового сигнала в итоге. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается, а последовательность нуклеотидов определяется по световым сигналам в виде пиков на программе, интенсивность которых пропорциональна количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов одного вида из очередной реакционной смеси.

Основой модификации 454 Life Sciences явилось использование эмульсионной ПЦР с одновременной параллельной подготовкой многих сотен тысяч фрагментов ДНК для их секвенирования. После проведения всех предварительных этапов пробоподготовки каждый из 4 видов нуклеотидов, смешанный с другими реактивами для пиросеквенирования, подается последовательно в проточную камеру, куда помещается подложка, имеющая несколько миллиардов лунок, заполненных микросферами (1 лунка – 1 микросфера). Каждая микросфера содержит на своей поверхности после ПЦР многие сотни тысяч копий одного из исходных ДНК-фрагментов. Если в лунку попадает тип нуклеотидов, который комплементарен очередному нуклеотиду в достраиваемой 1-цепочечной цепи матрицы ДНК, то полимераза встраивает эти нуклеотиды, что приводит через каскад реакций к высвобождению пирофосфата и генерации общего светового сигнала из лунки.

Преимущества и недостатки. Основным преимуществом пиросеквенирования является существенная экономия времени, поэтому процедура может быть проделана в режиме реального времени. Метод экономически эффективен по сравнению с методами секвенирования терминации дидезоксинуклеотидных цепей и облегчает фазирование гаплотипов и идентификацию структурных генетических вариаций путем парного считывания, которые охватывают десятки килобаз последовательности геномной матрицы. Однако основным недостатком метода является наличие существенных ошибок смещения кадров, которые приводят к систематическим ошибкам при чтении. Также с помощью этого метода невозможно безошибочно секвенировать протяженные участки, состоящие из одного и того же нуклеотида. Метод позволяет получать лишь прочтения относительно небольшой длины.

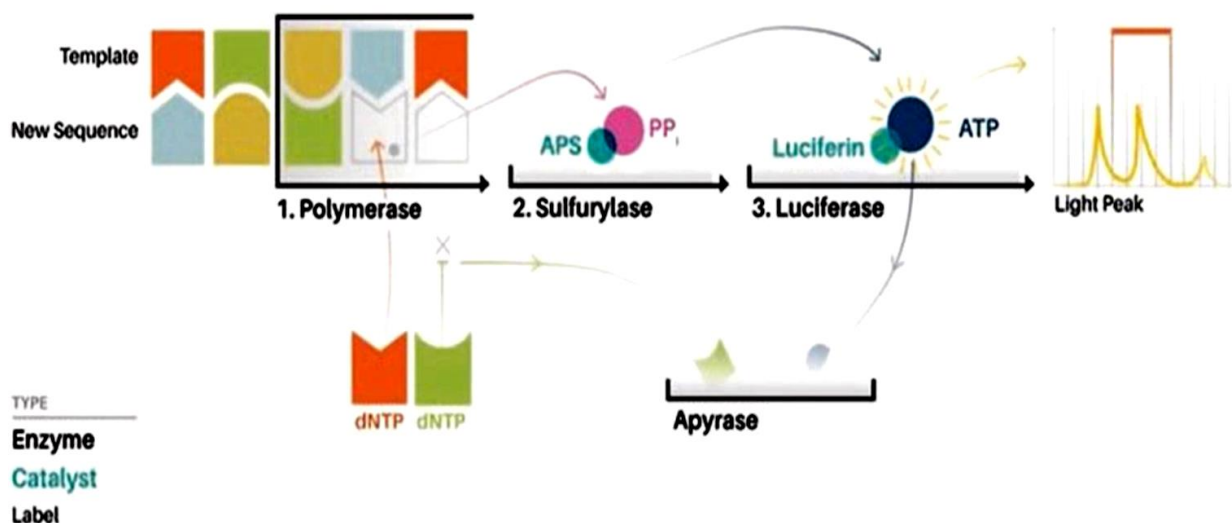


Рисунок 4.5 – Принцип пиросеквенирования
[А. Г. Бородин и др., 2020]

Задание 2

Изучить технологии секвенирования нуклеиновых кислот 2-го поколения

Технологии секвенирования второго поколения начали развиваться в середине 2000-х гг. и были направлены на снижение затрат, увеличение скорости и устранение необходимости в электрофорезе.

Секвенирование путем синтеза Illumina/Solexa (секвенирование на молекулярных кластерах)

Платформа Illumina/Solexa является детищем ученых Shankar Balasubramanian и David Klenerman из Кембриджского университета, которые внесли неоценимый вклад в первый проект генома человека. Оба они использовали свой проект по флуоресцентно-меченым красителям и синтезам комплиментарной цепи полимеразой для нового подхода к секвенированию, известному как секвенирование путем синтеза. Позже они основали компанию Solexa Inc (в июне 1998 г.). В 2004 г. Solexa приобрела технологию молекулярной кластеризации от Manteia. В 2006 г. Solexa выпустила свой первый секвенсор, Genome Analyzer, который революционизировал секвенирование ДНК, позволив секвенировать 1 гигабазу данных за 1 запуск прибора. Solexa была приобретена Illumina в 2007 г., и с тех пор платформа Illumina/Solexa остается одним из самых передовых и широко распространенных методов технологии секвенирования в мире.

Принцип метода. Платформа секвенирования с помощью синтеза (SBS) Illumina/Solexa основана на методе реверсивной терминации. Секвенирование путем синтеза состоит из 4 основных этапов: подготовка образца, генерация кластеров, секвенирование и анализ данных.

Подготовка библиотеки. ДНК цепочка случайно фрагментируется (200-600 пар оснований) ферментом транспозазой. Затем следует лигирование адаптеров (P5/P7) до 5' и 3' концов. В качестве альтернативы добавляются индексы из 6

пар оснований, которые создают уникальный штрих-код для образца, позволяющий упорядочивать разные образцы одновременно. Фрагменты, лигированные адаптером, амплифицируют с помощью реакции ПЦР и затем очищают.

Генерация кластеров. Образец загружают в проточную ячейку с газом из 2 типов олигозидов, которые дополняют последовательность адаптера P5/P7 фрагментов ДНК. Каждый гибридизированный фрагмент ДНК присоединен к комплементарному олигозиду, и фермент ДНК-полимераза создает комплементарную цепь. Двухцепочечная ДНК денатурируется, и исходный шаблон вымывается, в то время как новый фрагмент, который ковалентно присоединен к проточной ячейке, остается.

SsDNA (одноцепочечная ДНК) образует мостик путем гибридизации с соседним комплементарным праймером и удлиняется с помощью полимеразы, что приводит к образованию двухцепочечного ДНК-мостика. Мост DsDNA денатурируется, и конечным результатом являются 2 нити SsDNA, ковалентно присоединенные к проточной ячейке. Цикл амплификации повторяется много раз. Аналогично, каждый фрагмент амплифицируется в отдельные клональные кластеры посредством мостиковой амплификации, оставляя кластер с однородной последовательностью ДНК.

Секвенирование. После клональной амплификации обратная ssDNA отщепляется и вымывается, оставляя только прямую ssDNA, присоединенную к проточной клетке. Праймер отжигает переднюю нить и начинает добавлять флуоресцентно меченные ddNTP. Только 1 базовая пара добавляется за 1 раз с помощью обратимого терминатора, который предотвращает множественные добавления за 1 раз. Когда основание включено и флюорофор возбуждается лазером, излучение регистрируется. Флюорофор отщепляется, а терминатор удаляется. Цикл повторяется до тех пор, пока прямая нить не будет полностью секвенирована, что и дает последовательное секвенирование.

Анализ данных. Платформа секвенирования Illumina обеспечивает определение нуклеотидных последовательностей длиной в среднем 50-300 нуклеотидов, что намного короче, чем получаемые путем секвенирования по Сэнгеру, в результате секвенирования на платформах NGS создается огромный массив данных и возникает необходимость в автоматизации процесса обработки с помощью высокопроизводительной вычислительной техники. Процесс обработки данных включает следующие основные шаги: фильтрация последовательностей и коррекция ошибок, выравнивание и объединение, анализ результатов.

Преимущества и недостатки. Одним из главных преимуществ технологии SBS является то, что со стандартными реагентами она позволяет секвенировать до 96 образцов за цикл работы. Также SBS-технология имеет явное преимущество при секвенировании гомополимерных последовательностей по сравнению с 454 или Ion Torrent, поскольку позволяет включать 1 нуклеотид на реакцию. Существенным преимуществом технологии является возможность парноконцевого чтения последовательностей ДНК.

Одним из основных ограничений технологии SBS остается ограничение длины чтения, особенно когда речь идет о задачах расшифровки последовательности *de novo*. Ошибки замещения из-за увеличения фонового шума в каждом

цикле, смещение GC в ходе мостиковой амплификации также вносят известные ограничения данной технологии. К недостаткам можно отнести и высокую стоимость приборов данной технологии.

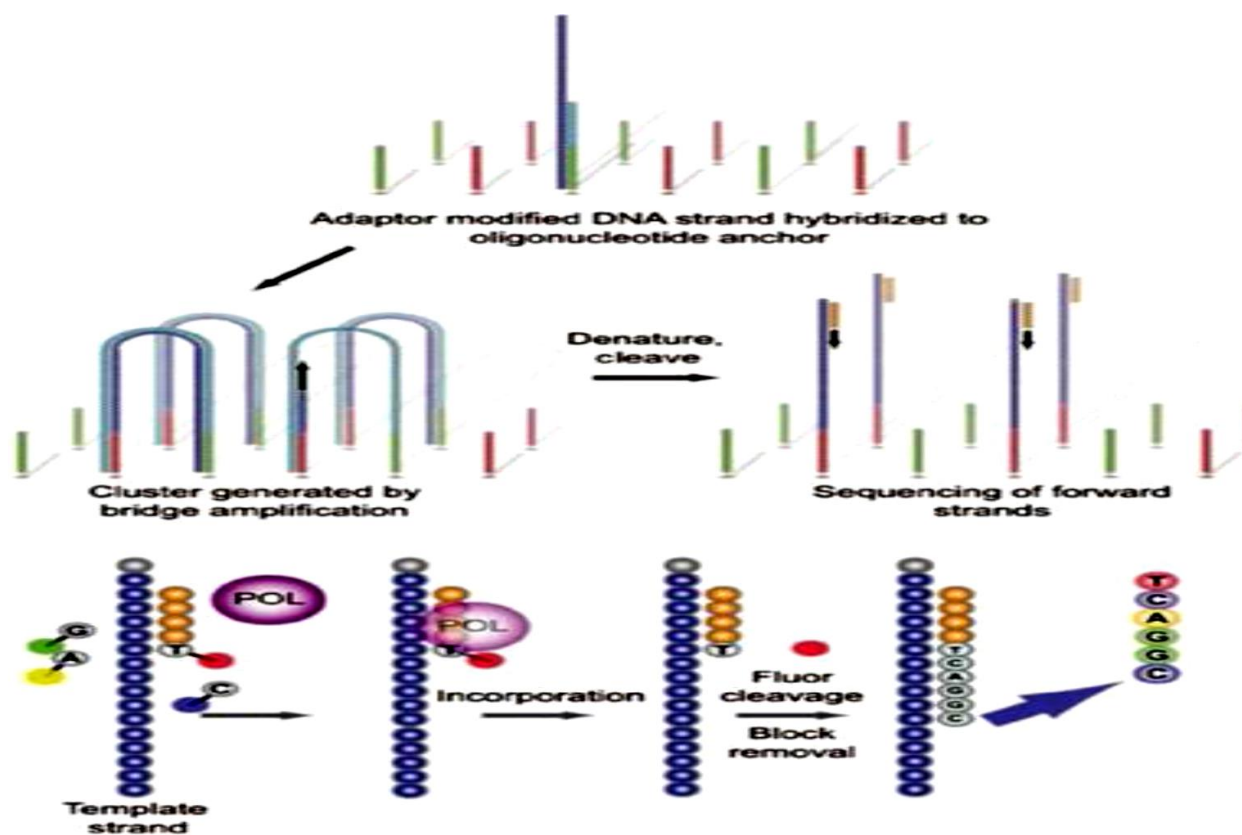


Рисунок 4.6 – Принцип секвенирования на молекулярных кластерах
[А. Г. Бородинов и др., 2020]

Секвенирование лигированием (ABI Solid)

Секвенирование ABI путем лигирования и обнаружения олигонуклеотидов (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection, SOLiD) основано на принципе лигирования с использованием ДНК-лигазы вместо ДНК-полимеразы. В 2008 г. SOLiD System заявила эту технологию как единственную технологию NGS с точностью прочтения >99,94%. Длина чтения в технологии ABI/SOLiD составляет от 25 до 35. Примерно 40 миллионов прочтений (рядов) может быть секвенировано, и соответствующие выходные данные секвенирования составляют от 2 до 4 гигабайт. Впервые прибор вышел на рынок в 2007 г., выпуск приборов закончен в мае 2016 г.

Принцип метода. Метод работает по принципу конструирования геномной библиотеки и лигирования с последующей реакцией секвенирования. Эта технология секвенирования применяет ДНК-лигазу вместо ДНК-полимеразы для секвенирования. Геном подвергается случайной фрагментации, а затем присоединяется к молекуле адаптера с последующим добавлением намагниченных гранул для клональной амплификации таким образом, чтобы только 1 фрагмент ДНК был доступен на поверхности магнитного шарика. Эмульсионная ПЦР используется для амплификации молекул ДНК, захваченных шариками.

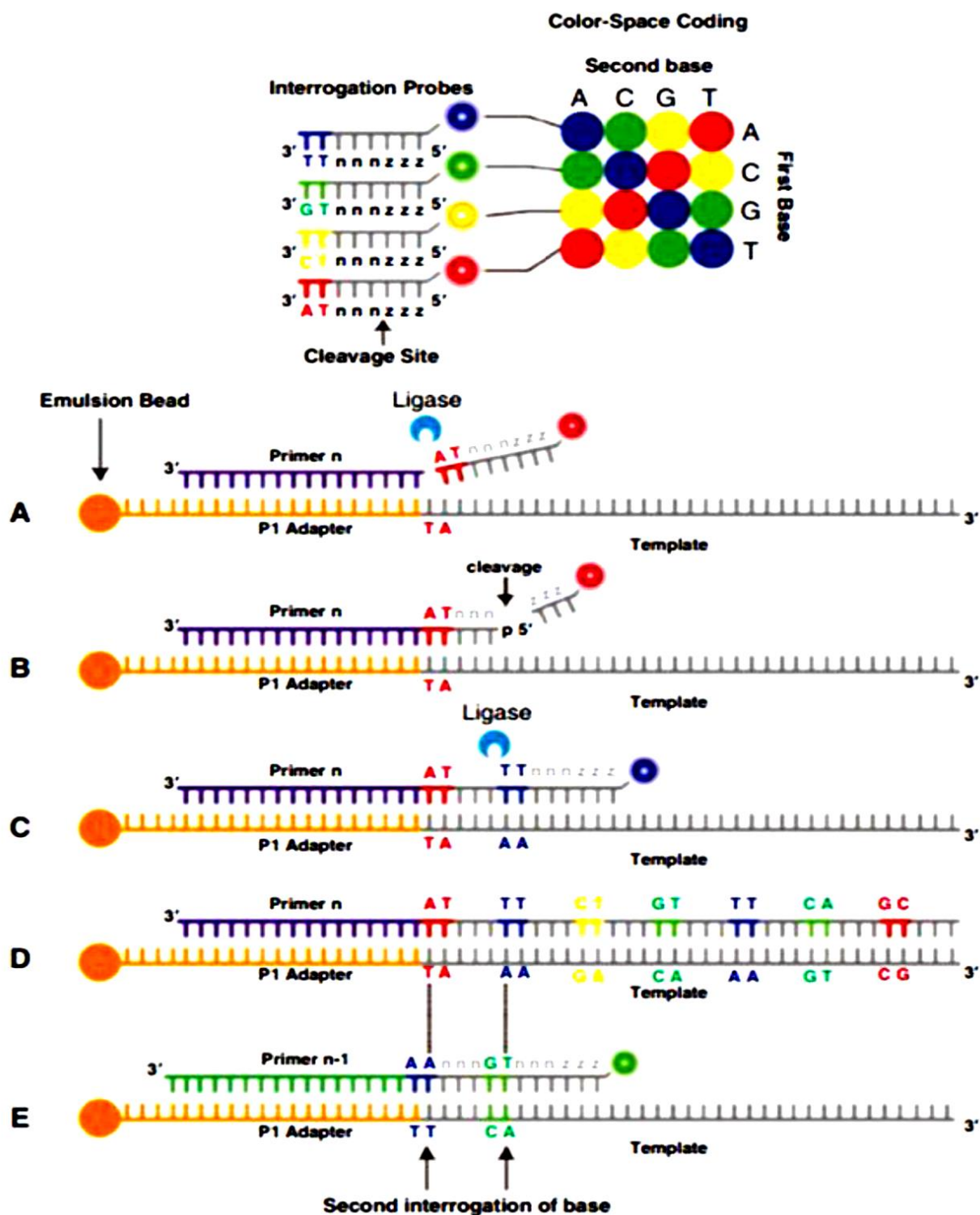


Рисунок 4.7 – Принцип секвенирования лигированием
[А. Г. Бородинов и др., 2020]

В этом методе используется эмульсионная ПЦР, после которой каждая из микросфер содержит на своей поверхности около миллиона копий одного из исходных фрагментов ДНК. Затем фрагменты ДНК денатурируются и модифицируются на 3'-конце, что позволяет миллиардам микросфер, покрытых фрагментами ДНК, ковалентно связываться с подложкой. После этого следует процесс циклического лигазного секвенирования. К матрице одноцепочечной ДНК прикрепляют праймер и добавляют синтезированные флуоресцентно меченные

8-членные олигонуклеотидные зонды. После того, как 1 из зондов комплементарно свяжется с первыми 5 основаниями праймера на одноцепочечной матрице ДНК, лигаза связывает его с праймером. В этом случае метка обнаруживается и удаляется вместе с последними 3 универсальными нуклеотидами зонда. Затем происходит перекрестное связывание (лигирование) другого зонда, комплементарного связанного со следующими 5 основаниями, от зонда, уже присоединенного ранее, и так далее до конца матрицы ДНК. После этого сконструированная комплементарная цепь удаляется, и к матрице добавляется праймер, который смещается в месте посадки на 1 нуклеотид относительно посадки предыдущего праймера, и весь процесс завершения второй цепи методов цитирования повторяется. Чтобы определить полную последовательность секвенированного фрагмента, необходимо провести эту процедуру с 5 праймерами, каждый из которых смещен относительно предыдущего праймера в месте посадки на 1 нуклеотид.

Преимущества и недостатки. Преимущество технологии секвенирования ABI/SOLiD заключается в том, что она является единственным из методов NGS секвенирования, в котором каждый нуклеотид прочитывается дважды, что повышает точность секвенирования.

Основным ограничением технологии секвенирования ABI/SOLiD является сложность в секвенировании палиндромных последовательностей, идентифицируя их как разные случайные последовательности.

Ионное полупроводниковое Ion Torrent секвенирование

Технология ионного полупроводникового секвенирования (Ion semiconductor sequencing) была лицензирована компанией DNA Electronics Ltd. Эта технология отличается от других технологий секвенирования тем, что не использует модифицированные нуклеотиды и оптические датчики. Ion semiconductor sequencing может также упоминаться как Ion torrent sequencing, pH-опосредованное секвенирование или полупроводниковое секвенирование. Ion Torrent позиционировали свои системы как быстрые, компактные и экономичные секвенаторы.

Принцип метода. Платформа Ion Torrent – это первая технология, которая не применяет оптические датчики. Свет в этой технологии работает как посредник. В этом методе используется полупроводниковая система обнаружения при секвенировании последовательности, основанная на обнаружении ионов водорода, которые являются побочными продуктами добавления нуклеотидов к шаблонной цепи во время полимеризации. Бусины, содержащие обогащенную ДНК, добавляются в микроячейку на чипе. Микролунки, содержащие предназначенную для секвенирования молекулу матричной ДНК, наполняют дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного вида. Если введенный dNTP является комплементарным к ведущему нуклеотиду шаблона, он включается в растущую комплементарную цепь. Это вызывает высвобождение ионов водорода, которое инициирует срабатывание ионного датчика ISFET, что указывает на то, что реакция произошла. Если в последовательности матричной цепи присутствует повтор одного нуклеотида, несколько молекул dNTP будут

присоединены в одном цикле. Это приводит к увеличению количества образовавшихся ионов водорода и пропорционально более высокому электрическому сигналу.

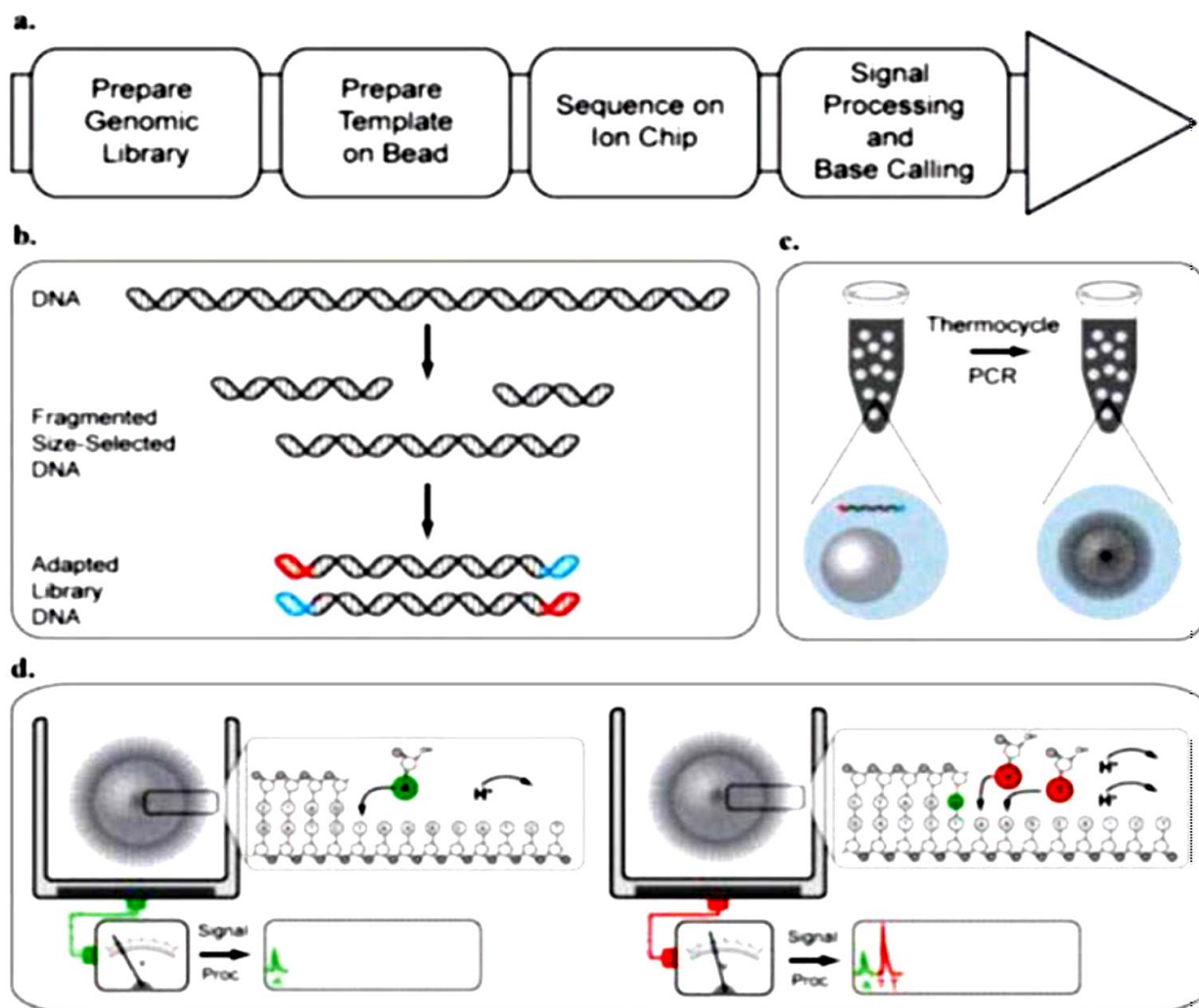


Рисунок 4.8 – Принцип полупроводникового секвенирования
[А. Г. Бородинов и др., 2020]

Пробоподготовка ДНК в данном методе практически не отличается от уже описанной для лигазного секвенирования. Проведение предварительной эмульсионной ПЦР здесь необходимо для усиления сигнала об изменении в значении рН. Это изменение рН в каждой отдельной лунке на чипе будет давать около миллиона копий одного из исходных ДНК-фрагментов, прикрепленных к поверхности микросферы. Для этого подготовленную таким образом библиотеку ДНК денатурируют и распределяют на микроэлектронный чип, имеющий миллионы микролунок (1 лунка – 1 микросфера) с иончувствительной поверхностью, связанной с датчиками. Затем последовательно добавляют реакционные ПЦР-смеси, отличающиеся по составу наличием в них только одного из 4 видов нуклеотидов, и детектируют изменение рН в лунках, где произошло встраивание этих нуклеотидов в комплементарные цепи ДНК.

Преимущества и недостатки. Основным преимуществом Ion Torrent секвенирования является то, что оно использует относительно простую химию в

процессе секвенирования и требует очень небольшого размера образца для анализа. Отсюда высокая скорость секвенирования при низких вложениях и эксплуатационных расходах.

В качестве недостатков следует отметить наличие значительного количества ошибок секвенирования в виде однонуклеотидных вставок и делеций. Для решения этой проблемы Life Technologies выпустила обновление программного продукта Ion Reporter. Другим недостатком этой системы является короткая длина читаемого фрагмента по сравнению с другими методами секвенирования, такими как секвенирование по Сэнгеру или пиросеквенирование. Большие длины читаемых фрагментов полезны особенно для сборки генома *de novo*.

Задание 3

Изучить технологии секвенирования нуклеиновых кислот 3-го поколения

Хотя технологии секвенирования второго поколения позволили секвенировать несколько геномов по сниженной цене, анализ больших структурных изменений и секвенирование *de novo* остаются сложными задачами для данных методов.

Последующая стадия в секвенировании ДНК фокусируется на устранении необходимости амплификации ДНК и производства более длинных чтений в одном запуске. Однако данные технологии все еще находятся в стадии исследований и разработок.

Одномолекулярное секвенирование в реальном времени (Single-molecule real-time sequencing (SMRT))

Этот метод используется для прочтения относительно длинных участков последовательности ДНК и позволяет делать это в режиме реального времени. Технология была разработана и запатентована Pacific Biosciences of California, Inc. в 2011 г., и PacBio RS стал первым продуктом, продаваемым на коммерческой основе.

В апреле 2013 г. компания выпустила новую версию секвенатора под названием «PacBio RS II», который имеет более высокую пропускную способность и дает возможность получать более длинные чтения. В сентябре 2015 г. компания объявила о выпуске модифицированного и инновационного секвенатора под названием Sequel System с 7-кратным увеличением производительности по сравнению с PacBio RS II.

Принцип метода. Технология SMRT-секвенирования основана на наблюдении в реальном времени за синтезом ДНК-полимеразой новой цепи на ДНК-матрице. Технология SMRT основывается на 2 ключевых новшествах: волноводах с нулевой модой и флюорофорах, пришитых к терминальной фосфатной группе нуклеотидов. Волноводы с нулевой модой подводят свет исключительно к нижней части ячейки, в которой иммобилизован комплекс (ДНК-полимераза – матрица для синтеза).

Нуклеотиды с флуоресцентными метками позволяют наблюдать за иммобилизованным комплексом, т.к. ДНК-полимераза синтезирует цепь ДНК.

Принцип, лежащий в основе Pacific biosystems SMRT, весьма отличается от других методов секвенирования. Он использует 1 молекулу для обнаружения, поэтому для подготовки библиотеки ампликонов не требуется никакого этапа амплификации.

Флюоресцентно меченные нуклеотиды добавляются в лунку, и флюоресцентная метка отсоединяется от нуклеотида, как только он включается в одноцепочечную ДНК, которая связана с иммобилизованной ДНК-полимеразой. Высвободившийся флюорофор детектируется. Секвенирование матрицы происходит путем мониторинга в режиме реального времени обработки дезоксинуклеотидтрифосфатов ДНК-полимеразой, меченной флюорофорами через концевую фосфатную группу, когда нуклеотиды включаются в растущую цепь ДНК.

Преимущества и недостатки. Метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени (SMRT) позволяет получать очень длинные чтения (в среднем около 20 000 нуклеотидов, до 60 000 нуклеотидов), что облегчает дальнейший анализ данных и позволяет избежать ряда проблем, возникающих при работе с короткими чтениями. Работает без предварительной амплификации исследуемой ДНК с помощью ПЦР. Этот метод обеспечивает высокую скорость секвенирования (теоретически она ограничивается только скоростью ДНК-полимеразы). Метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью: возможность выявления включений в смешанных выборках с частотой встречаемости менее 0,1%.

Одним из существенных недостатков SMRT-секвенирования является высокая частота ошибки, которая достигает 15%. Слабым местом технологии

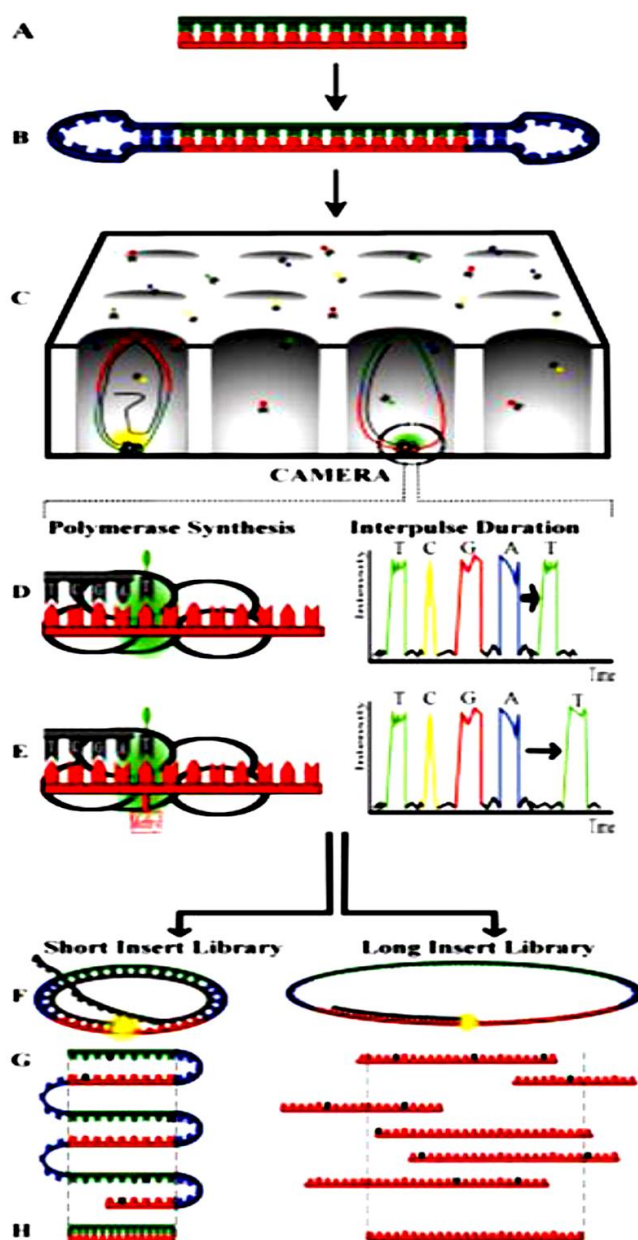


Рисунок 4.9 – Принцип одномолекулярного секвенирования в реальном времени
[А. Г. Бородинов и др., 2020]

является зависимость иммобилизации комплексов ДНК-полимеразы SMRTbell-матрицы от размера матрицы, что приводит к преобладанию коротких ДНК-фрагментов.

Нанопоровое секвенирование

Технология секвенирования нанопор была исследована еще до того, как были развиты технологии NGS-секвенирования. В начале 1990-х гг. David Dreamer и George Church независимо открыли, что одноцепочная ДНК (ssDNA) может быть секвенирована путем прохождения через нанопоры. В 1996 г. Dreamer, Branton и Kasiannowicz опубликовали свои результаты по обнаружению прохождения ДНК через нанопоры альфа-гемолизина.

Прорыв в технологии секвенирования нанопор пришел в 2001 г. с открытием твердотельных нанопор. В 2005 г. компания Oxford Nanopore Technologies была создана Hagan Bayley вместе со Spike Willcocks, David Norwood и Gordon Sanghera. Это первая компания, предлагающая коммерческие секвенаторы на основе технологии нанопор.

Принцип метода. Принцип работы секвенсоров ONT основан на измерении электрического тока при прохождении молекулы нуклеиновой кислоты через нанопору. Детектирование осуществляется в камере с разделенной мембраной, содержащей нанопору. К камере прикладывается напряжение, заставляющее ДНК или РНК двигаться через пору. По мере прохождения молекулы сечение поры уменьшается, в результате чего уменьшается сила тока. Таким образом, измеряя ток, можно определить тип нуклеотида, проходящего через пору в заданный интервал времени.

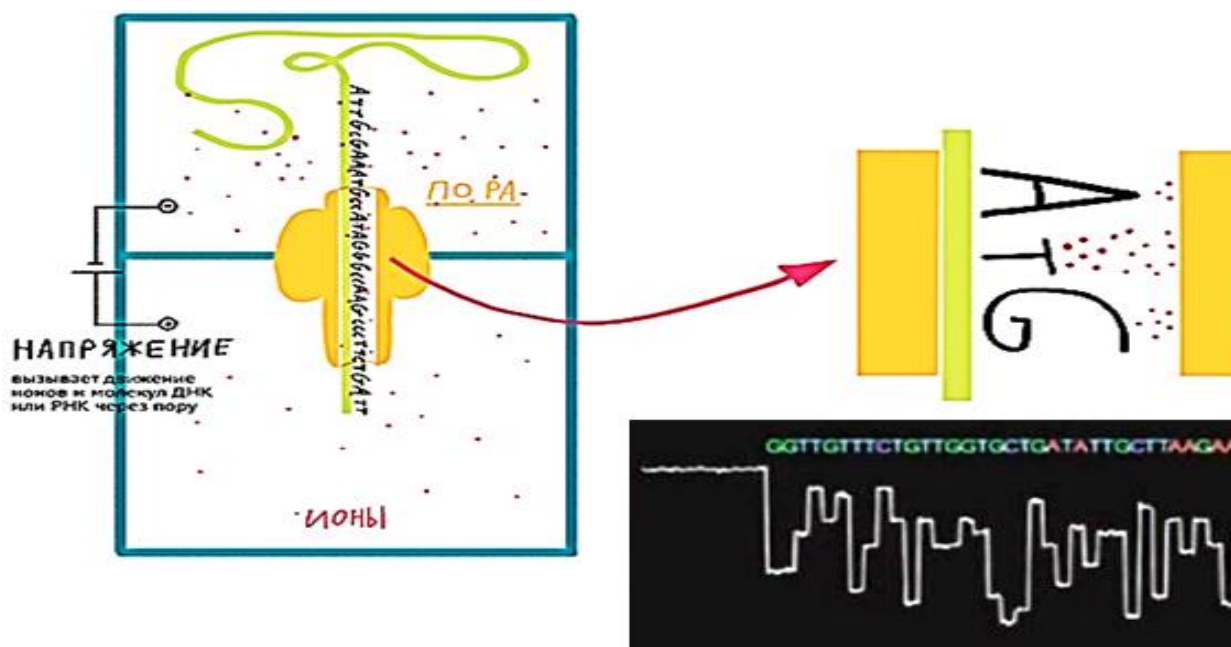


Рисунок 4.10 – Принцип нанопорового секвенирования

[<https://biomolecula.ru>]

Преимущества и недостатки. По сравнению с существующими методами секвенирования использование данного метода секвенирования имеет такие

преимущества, как низкая стоимость и простота использования, высокая чувствительность, высокая длина считывания (до десятков тысяч оснований), высокая портативность, быстрый анализ и отображение результатов в реальном времени.

К недостаткам можно отнести такие свойства, как низкое качество считываний по сравнению с технологиями секвенирования с короткими считываниями, утрата функциональных свойств для биологических пор со временем. Также замечено многообразное влияние факторов окружающей среды на скорость считывания последовательности и на ее качество.

Задание 4

Изучить особенности проведения полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, заключающийся в значительном увеличении малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе) с последующей их идентификацией.

Метод ПЦР используется для выборочного размножения определенной последовательности гена. В результате получают гомогенные популяции фрагментов, которые используются в исследованиях по молекулярной генетике или диагностике.

Для осуществления амплификации определенной последовательности необходимо знать первичную структуру нормального или мутантного гена и синтезировать специфические праймеры, комплементарные концам интересующих фрагментов. Праймеры представляют собой искусственно синтезированные одноцепочечные олигонуклеотиды (20-30 нуклеотидов).

ПЦР основана на гибридизации исследуемой последовательности ДНК - праймер и полуконсервативной репликации ДНК.

Преимущества метода ПЦР:

- могут использоваться минимальные количества ДНК;
- за несколько часов получают более миллиона копий одинаковых фрагментов;
- благодаря специфичности праймера амплифицируется только нужный фрагмент, который затем используется как зонд в других методах.

Для постановки ПЦР требуются следующие **компоненты**:

- *анализируемая ДНК* (это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, хромосома или геном клетки полностью. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка);
- *праймеры* – это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15-30 нуклеотидов), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи.

У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3'- и 5'-концы;

- *нуклеотиды* (дезоксинуклеотидтрифосфаты), необходимые для синтеза новых цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ. Обычно вносятся в реакционную смесь в равных концентрациях;

- *ДНК-полимераза* – фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (*Taq-полимераза*), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu-полимераза*) и *Pyrococcus woesei* (*Pwo-полимераза*). Первая – самая производительная, а две другие – более точные;

- *буферный раствор*, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с бычьим сывороточным альбумином (BSA) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер – диметилсульфоксид (ДМСО), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.

Техника проведения ПЦР состоит из 3 этапов:

- 1) выделение нуклеиновых кислот;
- 2) постановка ПЦР;
- 3) учет результатов.

1-й этап – выделение нуклеиновых кислот. В настоящее время разработано много методик выделения нуклеиновых кислот, которые отличаются по механизму выделения, скорости исполнения и качеству выделенных нуклеиновых кислот.

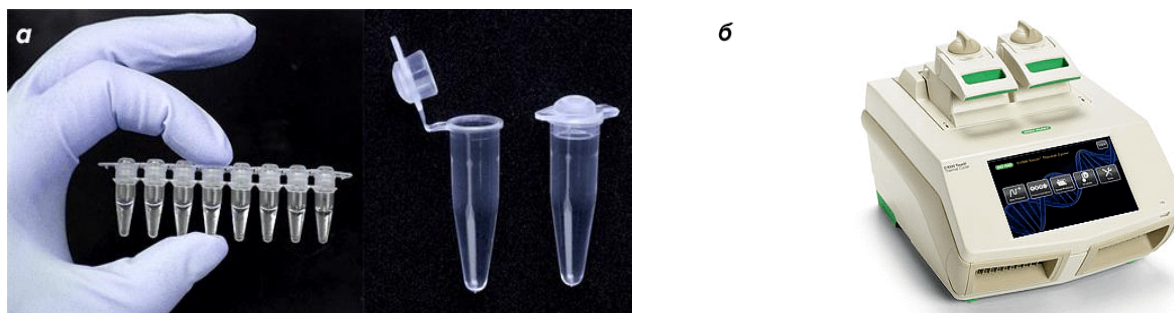
Классическим методом выделения ДНК считается фенол-хлороформная экстракция (или триазольная для РНК). Суть метода основана на растворимости ДНК или РНК в водной фазе и нерастворимости – в органической. Первоначально исследуемый материал подвергают воздействию протеиназы К (фермент, расщепляющий белки на более короткие пептиды). При этом происходит освобождение нуклеиновой кислоты от окружающих ее белков (реакция проходит в буферном растворе на основе воды). Далее добавляют органическую фазу, и содержащийся в ней фенол осаждает белки и растворяет в себе другие органические вещества, при этом нуклеиновая кислота остается в водной фазе. После центрифугирования водная и органическая фаза четко разделяются, водная фаза отбирается в чистую пробирку и к ней добавляется следующая органическая фаза (смесь фенола и хлороформа) для более глубокой очистки ДНК в водной фазе от лишних веществ. После нескольких отмывок органическими фазами проводят осаждение нуклеиновых кислот с помощью этилового или изопропилового спирта в водной фазе для отделения их от растворимых в воде побочных веществ (нуклеиновые кислоты в присутствии спиртов выпадают в осадок). Высушивая и растворяя нуклеиновую кислоту в деионизированной воде, получают ДНК или РНК. Данный способ выделения достаточно трудоемкий, длительный и связан с использованием токсических веществ, однако в результате получается высокоочищенная ДНК или РНК.

Наиболее распространенный метод экстракции нуклеиновых кислот основан на использовании сорбентов. Сорбент представляет собой мелкодисперсный порошок, нерастворимый в воде, обладающий свойством осаждать на своей поверхности нуклеиновые кислоты в присутствии сильных ионных растворов. Первоначально, как и в предыдущем методе, используют лизирующий раствор (протеиназа К или другие вещества) для разрушения белков. После осаждения нерастворимых частиц и переноса супернатанта в чистую пробирку добавляют сорбент и буферный раствор. Под воздействием буфера ДНК или РНК переходит в нерастворимое состояние и осаждается на сорбенте. После этого, ресуспендируя и осаждая сорбент, проводят его отмывку буферными растворами от примесей исследуемой пробы. По окончании этого процесса сорбент высушивают и добавляют деионизированную воду. При этом нуклеиновые кислоты переходят с сорбента в воду.

Для автоматизации процесса выделения нуклеиновых кислот используют специальный сорбент на основе магнитных частиц. Формирование осадка сорбента в этом случае достигается за счет магнитного поля, а не центрифугирования, как в случае обычного сорбента. Такие приборы значительно сокращают время выделения нуклеиновых кислот из большого количества образцов и избавляют этот процесс от человеческого фактора. Их используют в крупных лабораториях, куда ежедневно поступает более 50 проб на анализ.

Для некоторых модификаций ПЦР возможно использование материала без предварительной экстракции нуклеиновой кислоты, но при этом необходимо использовать высокостабильные разновидности Taq-полимеразы, которые не подвержены ингибированию веществами, содержащимися в исследуемом материале.

2-й этап – постановка ПЦР. Для этого готовят реакционную смесь компонентов с учетом их концентрации. Количество каждого компонента, необходимого для одной реакции, умножают на количество проб (сумма исследуемых образцов и контролей) плюс 1 (для компенсации погрешностей пипетирования) и вносят в таком объеме в реакционную смесь. Далее разносят смесь по отдельным пробиркам и после этого вносят выделенную ДНК или РНК. Пробирки плотно закрывают и помещают в амплификатор. В него вводят программу температурно-временных циклов реакции и запускают.



а – ПЦР-пробирки; б – Амплификатор C1000 Touch™ производства Bio-Rad

Рисунок 4.11 – Расходные материалы и оборудование для ПЦР

[<https://biomolecula.ru>]

Цель ПЦР – получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определенной длины (обычно не более 2-3 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.).

Для этого проводят 20-30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из 3 стадий (рисунок 4.9):

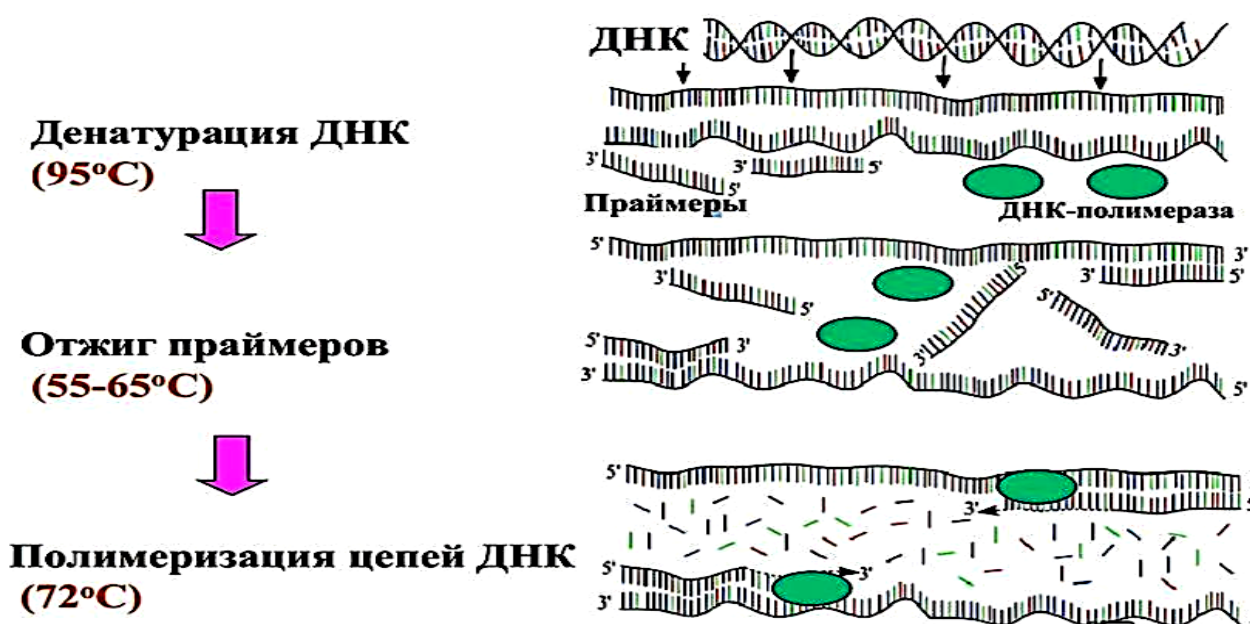


Рисунок 4.12 – Стадии ПЦР

[<http://www.myshared.ru>]

1-я стадия – денатурация. Чтобы полимераза могла работать, 2 цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до +94...+98°C. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

2-я стадия – отжиг праймеров. На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу. Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления – это расчетная температура, при которой половина праймеров присоединяется к целевому участку ДНК. Отжиг проводят при температуре на 1-5°C ниже температуры плавления, но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах +40...+72°C.

В идеале праймеры должны соответствовать следующим критериям: температуры плавления двух праймеров не должны различаться более чем на 5°C; ГЦ-состав их должен уложиться в интервал 40-60%; в структуре олигонуклеотидов не должно быть шпилек (участков, комплементарных друг другу); праймеры не должны образовывать дуплексы (спариваться) друг с другом; лучше, если на 3'-конце праймера будет гуанин или цитозин, так как они образуют с комплементарными основаниями 3 водородные связи (между А и Т образуются 2 связи), что делает комплекс праймер-матрица более стабильным.

В реальности редко получается соблюсти все условия из-за множества причин. Однако чем больше критериев соблюдено при создании праймеров, тем выше вероятность правильной их работы.

Чтобы разработать эффективные праймеры, необходимо знать последовательность ДНК у концов целевого участка и, руководствуясь упомянутыми критериями, выбрать подходящие фрагменты, которым будут комплементарны будущие праймеры. Все это удобно делать в специальных компьютерных программах (например, PrimerSelect).

3-я стадия – элонгация. Представляет собой синтез ДНК под действием фермента ДНК-полимеразы, которая последовательно выстраивает цепь ДНК (полимер) из нуклеотидов (мономеров), т.е. полимеризует их. Данный этап чаще проводят при температуре $+72^{\circ}\text{C}$, которая является оптимальной для работы Таq-полимеразы. Фермент присоединяется к комплексам праймер-матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера.

Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50-60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-цикла задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов.

Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально.

После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив» можно увидеть невооруженным глазом – проведя гель-электрофорез.

Через 25-30 циклов количество функциональных молекул полимеразы в реакционной смеси истощается. В связи с этим, чтобы добиться еще большего выхода продукта, содержимое пробирки можно разбавить, например, в 1000 раз и снова использовать для амплификации с уже новыми рабочими компонентами.

3-й этап – учет результатов. В зависимости от исполняемой методики ПЦР процесс учета результатов различается.

Классическая ПЦР после ее проведения требует проведения визуализации результатов, т.к. внешний вид реакционной смеси до и после реакции одинаков. Для этого используют электрофоретическое разделение продуктов амплификации в агаровом геле (рисунок 4.10).

В микроволновой печи расплавляется гель, и в него вносится бромистый этидий. Расплавленную агарозу заливают в камеру для заливки гелей и устанавливают гребенку, которая формирует лунки в геле. После застывания геля его переносят в камеру для электрофореза. Реакционную смесь смешивают с буфером для внесения, чтобы она после внесения в лунки не диффундировала в буферный раствор, и переносят в лунки геля. Камеру для электрофореза подключают к источнику тока, устанавливают силу тока и время и включают подачу напряжения в камеру. По окончании электрофореза гель переносят на трансиллюминатор (прибор, просвечивающий гель ультрафиолетом) и просматривают в ультрафиолетовом свете.

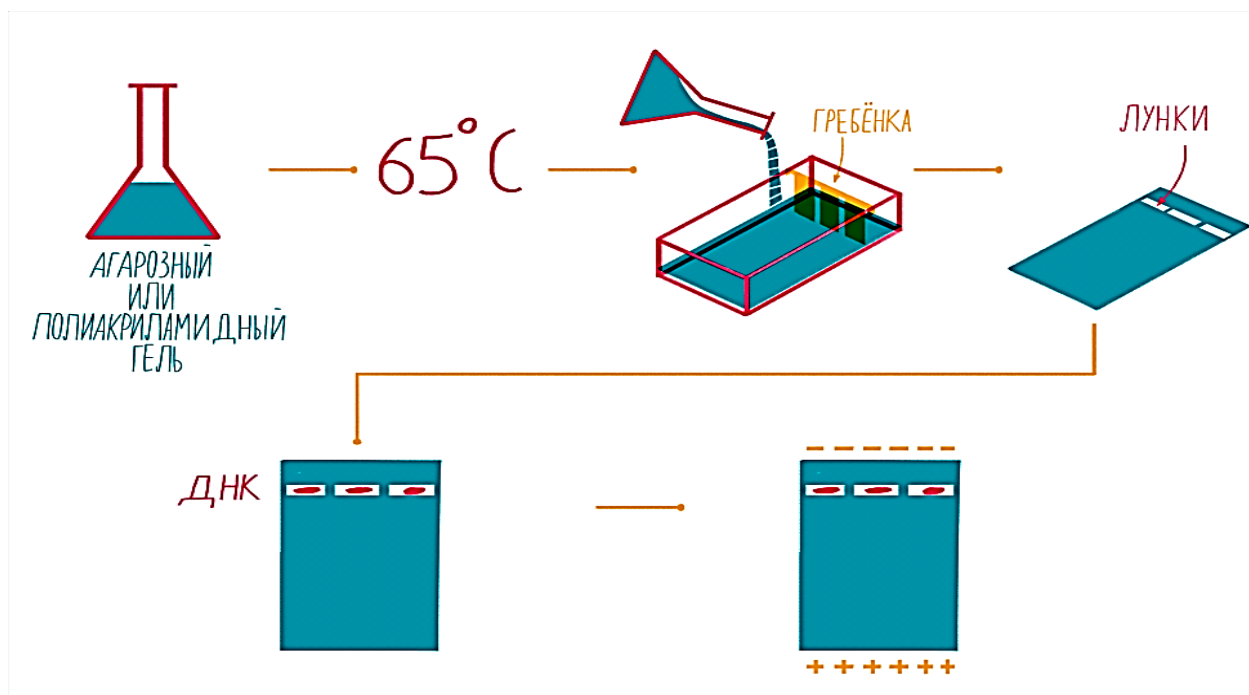


Рисунок 4.13 – Подготовка геля для горизонтального электрофореза
[\[https://biomolecula.ru\]](https://biomolecula.ru)

Под воздействием электрического поля ДНК будет двигаться в геле в зависимости от молекулярной массы (рисунок 4.11): чем длиннее фрагмент, тем медленнее будет его движение через гель. Таким образом, происходит разделение содержимого реакционной смеси на фракции.

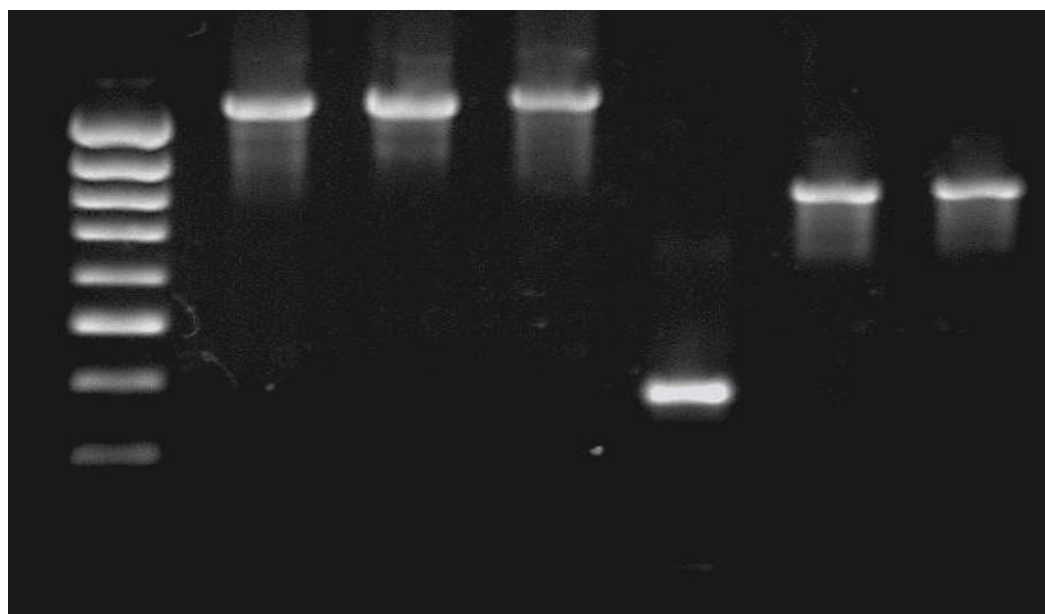


Рисунок 4.14 – Амплифицированные участки ДНК в агарозном геле после электрофореза:

вертикальные дорожки – отдельные пробы, соответствующие разным бактериальным штаммам; горизонтальные полоски на каждой дорожке – фрагменты ДНК разной длины
[\[https://upload.wikimedia.org\]](https://upload.wikimedia.org)

Содержащийся в геле бромистый этидий способен излучать оранжево-красное свечение в ультрафиолете и связываться с двухцепочечной ДНК, поэтому проходящие через гель ампликоны будут присоединять к себе молекулы этого вещества. Содержание бромистого этидия в геле очень низкое, поэтому сам гель не «светится». Но ампликоны, проходя через гель, встраивают в себя его молекулы и формируют зоны высокой концентрации бромистого этидия, которые в ультрафиолете проявляются в виде светящихся ярких оранжево-красных полос.

Наличие светящейся полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о наличии искомого фрагмента нуклеиновой кислоты в исследуемой пробе, т.е. проба положительная. Если полоса отсутствует или ее уровень не совпадает с положительным контролем, то она считается отрицательной. В отрицательном контроле не должно быть никаких светящихся полос. Если же они появляются, то это свидетельствует о нарушении правил работы или контаминации реактивов. Отсутствие специфической полосы в положительном контроле свидетельствует о неэффективной экстракции ДНК или неправильно приготовленной реакционной смеси.

Гель-электрофорез представляет собой трудоемкий процесс, требующий дополнительного времени на проведение анализа. Кроме того, разнесение продуктов амплификации может привести к загрязнению помещений ими.

ПЦР в реальном времени (*количественная ПЦР, real-time PCR*) позволяет не только обнаружить в пробе целевую нуклеотидную последовательность, но и измерить количество ее копий, а значит, и рассчитать, сколько же было исходной матрицы. Этой матрицей может быть как ДНК, так и РНК. В последнем случае первой стадией будет обратная транскрипция.

Метод *real-time* ПЦР не требует визуализации продуктов реакции с помощью гель-электрофореза – их накопление фиксируют в реальном времени оптические датчики, вмонтированные в амплификатор и настроенные на определенную длину волны, испускаемую флуоресцирующими метками.

При этом используют 2 типа меток: *интеркалирующие агенты* и *зонды с флуорофорами*.

Самый популярный интеркалирующий агент – SYBR Green – флуорофор, резко увеличивающий флуоресценцию (в 1000 раз) после связывания с двухцепочечной молекулой ДНК. Таким образом, увеличение флуоресценции будет пропорционально увеличению количества ДНК в каждом цикле ПЦР. К сожалению, интеркалирующие агенты обладают низкой специфичностью: они могут связываться и с «побочными» продуктами реакции, и с димерами праймеров.



Рисунок 4.15 – Амплификатор для real-time PCR (CFX384 Touch™)
[<https://biomolecula.ru>]

Однако тщательный подбор праймеров и условий ПЦР минимизирует этот недостаток.

Систем зондов с флуорофорами достаточно много. К наиболее распространенным относятся:

- *TaqMan* – это небольшой олигонуклеотид, комплементарный внутреннему участку амплифицируемого фрагмента ДНК, содержит два флуорофора: репортер и гаситель. Когда они находятся на одном зонде (т.е. близко друг к другу), гаситель поглощает сигнал от репортера. Во время амплификации движущаяся по ДНК полимераз разрушает зонд, репортер и гаситель отдаляются друг от друга, и флуоресценция репортера становится заметной;

- *молекулярные маяки* – это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, образующие петлю со шпилькой, на концах которой «пришиты» репортер и гаситель. Пока шпилька существует, гаситель находится рядом с репортером, подавляя его свечение. Как только зонд соединяется петлей с комплементарным участком ДНК, репортер и гаситель оказываются достаточно далеко друг от друга, чтобы началась флуоресценция, которая фиксируется на этапе отжига праймеров;

- *скорпионы* – это структуры, подобные молекулярным маякам, только на 3'-конце после гасителя к ним пришит праймер, с которого и начинается амплификация ДНК. Сигнал от репортера фиксируют в следующем цикле реакции: двухцепочечная молекула ДНК денатурирует, на этапе отжига праймеров раскрывается шпилька зонда, и он, изгибаясь как хвост скорпиона, комплементарно соединяется с цепочкой ДНК, синтезированной как продолжение его праймера. Таким образом репортер с гасителем разносятся в пространстве, и появляется свечение.

Процесс учета результатов при ПЦР в реальном времени сводится к анализу графика кривых флуоресценции (рисунок 4.13), который строится на основании данных, полученных с прибора после каждого цикла реакции.

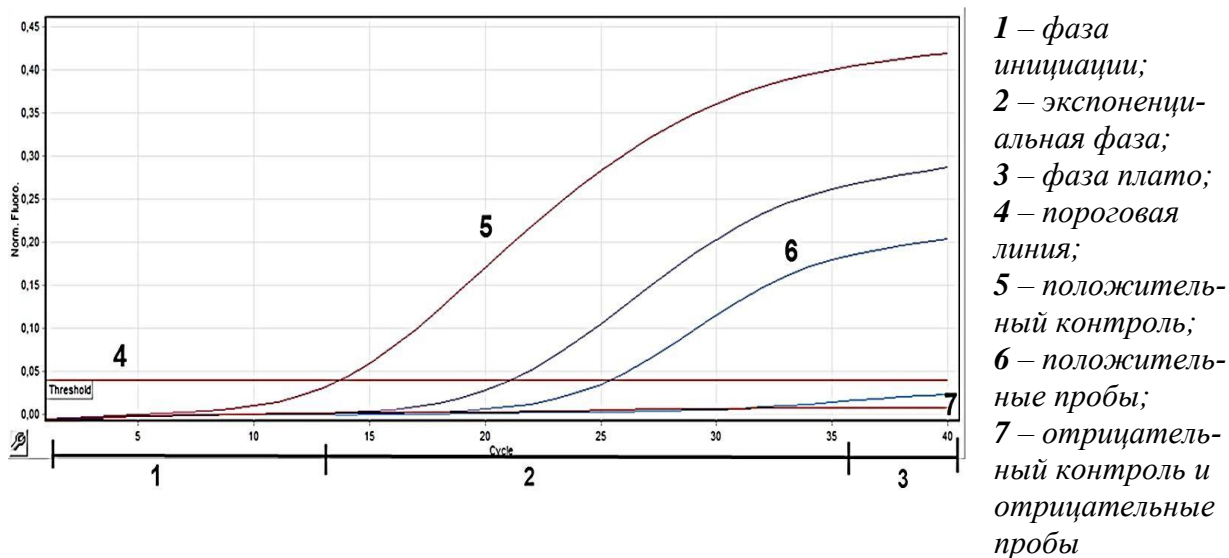


Рисунок 4.16 – График кривых амплификации
[НИИ ПВМ и Б УО ВГАВМ]

На графике ось абсцисс соответствует циклу реакции, ось ординат – уровень флуоресценции. В начале реакции количество ампликонов невелико, и поэтому флуоресценция в пробирке ниже предела детекции прибора и соответствует фоновому уровню.

С каждым циклом реакции количество ампликонов экспоненциально увеличивается и, соответственно, увеличивается флуоресценция. В определенный момент уровень флуоресценции преодолевает уровень чувствительности прибора и отмечается подъем графика. Эта фаза от начала реакции до начала подъема графика называется фазой инициации.

После этого идет экспоненциальная фаза, при которой количество ампликонов растет по экспоненциальному закону. При истощении реакционной смеси, когда один из компонентов реакции заканчивается, количество образуемых ампликонов уменьшается и флуоресценция остается неизменной – фаза плато.

По окончании реакции определяют пороговую линию, которая соответствует уровню фоновой флуоресценции. Все исследуемые образцы, чьи кривые амплификации пересекают пороговую линию, считаются положительными, остальные – отрицательными.

По сравнению с классической ПЦР модификация в реальном времени обладает следующими преимуществами:

- скорость проведения анализа увеличивается за счет отсутствия учета реакции методом электрофореза;
- отсутствие контаминации лабораторных помещений продуктами амплификации, т.к. не требуется открывать пробирки и проводить пипетирование амплифицированной ДНК;
- возможность наблюдения за ходом реакции и получения предварительных результатов до окончания реакции;
- при введении положительных контролей с заранее известной концентрацией можно получить количественные данные исследуемых образцов.

Недостатки данного метода связаны с возможностью получения ложноположительных результатов при использовании нестабильного зонда (при его самопроизвольном разрушении во время реакции), а также ложноотрицательных результатов (при изменчивости организма зонд может терять специфичность и не присоединяться к матрице ДНК).

Применяют ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов, одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) и хромосомных aberrаций, для обнаружения конкретных патогенов и белков (иммуно-ПЦР в реальном времени).

Задание 5

Изучить особенности анализа генов методами блот гибридизации

Таблица 4.1 – Особенности различных методов блот гибридизации

Характеристики	Блоттинг		
	Саузерн	Нозерн	Вестерн
<i>Мишень (что разделяется в зависимости от молекулярной массы)</i>	ДНК разрезается рестриктазами	Денатурация РНК формальдегидом	Денатурация ДНК додецилсульфатом натрия
<i>Зонд</i>	Радиоактивный ген X (ДНК)	Радиоактивный ген X (ДНК)	Антитело к белку X с радиоактивной или ферментной меткой
<i>Какую дает информацию?</i>	- рестрикционная карта гена X в хромосоме	- количество имеющейся мРНК гена X - длина мРНК гена X	- количество имеющегося белка X - величина молекулы белка X
<i>Этапы постановки</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Экстракция ДНК из клеток 2. Разрезание молекулы рестриктазами 3. Разделение в геле (обычно агарозном) 4. Денатурация ДНК щелочью 5. Перенос на нитроцеллюлозу (обычно посредством капиллярности) 6. Блокирование избытком ДНК 7. Гибридизация с меченым ДНК-зондом 8. Вымывание несвязанного зонда (использование «контролируемой строгости») 9. Ауторадиография 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Экстракция из клеток РНК 2. Денатурация формальдегидом 3. Разделение в геле (обычно агарозном) 4. Перенос на нитроцеллюлозу (обычно посредством капиллярности) 5. Блокирование избытком РНК 6. Гибридизация меченым ДНК-зондом 7. Вымывание несвязанного зонда (использование «контролируемой строгости») 8. Ауторадиография 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Экстракция из клеток белка 2. Денатурация додецилсульфатом натрия 3. Разделение в геле (обычно полиакриламидном) 4. Перенос на нитроцеллюлозу (обычно посредством электрофореза) 5. Блокирование избытком белка 6. Гибридизация с меченым зондом-антителом 7. Вымывание несвязанного зонда (использование «контролируемой строгости») 8. Ауторадиография или превращение хромогенного субстрата

Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «секвенирование»?
2. Какие разработаны подходы к секвенированию нуклеиновых кислот?
3. На чем основаны технологии секвенирования по Сэнгеру и технологии секвенирования «нового поколения»?
4. На чем основана полимеразная цепная реакция?
5. Каковы этапы проведения полимеразной цепной реакции?
6. Что понимают под термином «блоттинг»?
7. С какой целью применяется блот анализ в вариантах Саузерн, Нозерн и Вестерн?

Тема 5

ГИБРИДОМНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Цель занятия: ознакомиться с техникой секвенирования нуклеиновых кислот, блоттинга, полимеразной цепной реакции.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

**Изучить схему гибридомной технологии производства
моноклональных антител**

Технология получения моноклональных антител представлена на рисунке 5.1.



Рисунок 5.1 – Гибридомная технология производства моноклональных антител

[<https://research-journal.org>]

Обычно вся процедура от момента начала иммунизации до выделения антител занимает 3-4 месяца.

Задание 2

Изучить особенности иммунизации животных, используемых в гибридной технологии производства моноклональных антител

Назначение процесса иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности, и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителообразующие гибридные клетки.

Лабораторные животные подвергаются иммунизации путем нескольких инъекций антигена в течение 1-2 месяцев. Обычно для иммунизации используют мышей и крыс (это связано с тем, что подходящие миеломные клетки мышей и крыс широко распространены и, кроме этого, не представляет сложностей выращивание полученных гибридом в организме этих животных), другие животные практически не используются.

При иммунизации животных иммунный ответ вырабатывается на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала. Это значительно осложняет отбор клонов, продуцирующих антитела к интересующей антигенной детерминанте, т.к. их доля может быть крайне незначительной. Поэтому по возможности для иммунизации применяют очищенные антигены.

Конкретная схема иммунизации сильно зависит от природы антигена и его иммуногенности.

Обычно антиген вводят неоднократно, что необходимо для развития сильного иммунного ответа, но чрезмерная иммунизация может иметь обратный эффект, когда у клеток гипериммунизированных животных снижается способность образовывать гибридомы.

В некоторых случаях бывает достаточно и однократной иммунизации.

По ходу иммунизации необходимо определять титр антител к антигену. Обычно это делают перед последней иммунизацией. В опыт набирают животных с высоким титром антител.

В последнее время активно развиваются методы полной иммунизации вне организма с целью получения гибридомы.

Иммунизация *in vitro* имеет ряд существенных преимуществ:

- укорачивается период иммунизации до 4-5 суток;
- требуется существенно меньшее количество антигена;
- ко многим антигенам можно получить более выраженный иммунный ответ;
- повышается процент отвечающих клеток;
- легко проверять факторы, влияющие на эффективность иммунизации.

Задание 3

Изучить особенности слияния клеток и отбор клонов, индуцирующих специфические антитела, при производстве моноклональных антител

Из селезенки получают клетки, из которых выделяют плазмоциты. Их сливают с клетками миеломы, которую выбирают так, чтобы она сама по себе не производила антитела и не имела гена гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ), что делает ее чувствительной к селектирующему агенту ГАТ/НАТ (гипоксантин-аминоптерин тимидин / Hypoxanthine-Aminopterin Thymidine).

Суспензию лимфоидных клеток от иммунных мышей смешивают в одной пробирке в минимальном объеме среды с суспензией миеломных клеток и на 1-2 минуты добавляют нарушающий мембраны сливающий агент (полиэтиленгликоль или вирус Сёндай).

Существует 2 основных варианта добавления полиэтиленгликоля, используемые в настоящее время:

- в течение 1 минуты добавляют 1 мл 50%-ного раствора полиэтиленгликоля при +37°C с постоянным перемешиванием, а затем раствор постепенно разбавляют до 10 мл в течение нескольких минут средой без сыворотки, после чего клетки центрифугируют и ресуспенсируют в среде культивирования;
- к осадку клеток добавляется 30-35% полиэтиленгликоля при комнатной температуре, клетки центрифугируют 2 минуты, а затем их оставляют при комнатной температуре еще на 5-7 минут, после чего их разводят в большом объеме среды с сывороткой, обмывают и культивируют.

По прошествии 1-2 минут суспензию клеток, содержащую смесь неслившихся лимфоидных клеток (плазмоцитов), неслившихся клеток миеломы и гибридных клеток 3 вариантов («плазмоцит-плазмоцит», «миелома-миелома», «плазмоцит-миелома»; из них искомыми клетками являются только гибриды «плазмоцит-миелома»), отмывают и разводят в рассчитанном объеме селективной среды ГАТ (рисунок 5.2). Указанные 3 компонента в известных концентрациях вводят в полную культуральную среду.

После слияния клетки в течение 10-14 дней поддерживают в среде, содержащей ГАТ. В течение первых 7-10 дней культивирования названной смеси клеток в культуре происходит следующее:

- неслившиеся плазмоциты и гибриды «плазмоцит-плазмоцит» погибают в силу своей природной недолговечности;
- неслившиеся клетки миеломы и гибриды «миелома-миелома» погибают от невозможности осуществлять биосинтез своей ДНК в присутствии аминоптерина (метаболического яда, избирательно блокирующего ферменты биосинтеза пиримидиновых оснований из N₅N₁₀-метилен-тетрагидро-фолата), а биосинтез пуриновых оснований из гипоксантина в этих клетках также невозможен в связи с отсутствием ГГФРТ;

- единственные клетки, имеющие возможность выжить в среде ГАТ, это искомые гибридные клетки «плазмоцит-миелома»: биосинтез пуриновых оснований у них обеспечен ГГФРТ, ген которой получен из нормального лимфоцита, и средовым гипоксантином, а биосинтез пиримидиновых оснований осуществляется из средового тимидина с участием тимидинкиназы. От клеток миеломы данные гибридные клетки наследуют свойство неограниченной пролиферации. От нормальных иммунных В-лимфоцитов – биосинтез иммуноглобулинов.

Далее в среде над клетками определяют антитела и отбраковывают клеточные линии, не производящие антитела или недостаточно быстро размножающиеся.

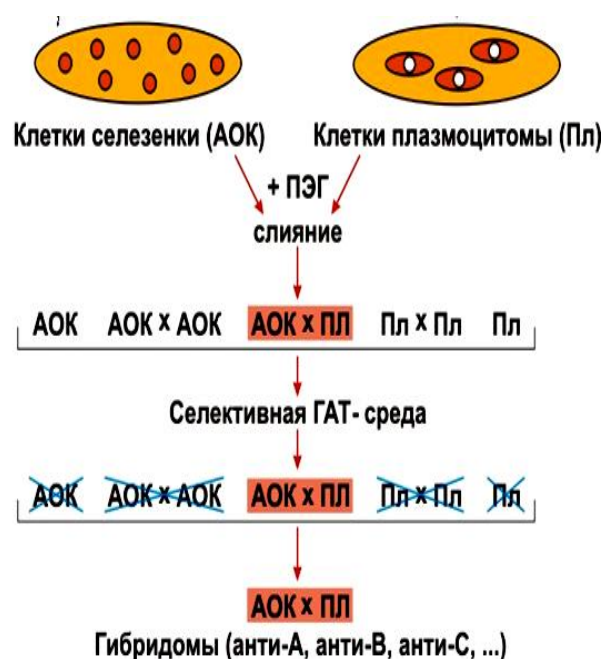


Рисунок 5.2 – Слияние плазмоцитов с клетками миеломы и отбор индуцирующих специфические антитела клонов
(<https://biomolecula.ru>)

Задание 4

Изучить особенности клонирования гибридных клеток при производстве моноклональных антител

Пролиферация «non-stop» позволяет клонировать гибридные клетки, т.е. рассеять по одной в лунку и подождать, когда из этой одной клетки при благоприятных условиях культивирования вырастет клон, т.е. много одинаковых клеток (с точностью до спонтанных мутаций).

Клонирование осуществляется для выделения стабильных клонов гибридных клеток.

Клонирование методом лимитирующих разведений. Если клетки посеяны в 96-луночные планшеты очень редко, то доля лунок, в которой наблюдается рост клеток, подчиняется распределению Пуассона, т.е. для того, чтобы получить разумную вероятность только 1 клон в лунке, в более 37% лунок не должно наблюдаться роста клеток. Поскольку эффективность клонирования редко бывает равной 100%, клетки необходимо засевать при плотности 10, 3 и 0,5 клеток на лунку. В тех планшетах, на которых наблюдается рост в половине лунок, содержатся изолированные клоны. При первом клонировании активной может оказаться только небольшая часть клонов. Необходимо всегда производить повторное клонирование, при котором доля положительных клонов будет возрастать.

Клонирование в полужидком агар-агаре. Для клонирования гибридом можно применять полужидкий агар. Обычно берется система, состоящая из 2 слоев: нижний (твердый) слой содержит 0,5% агар-агара в среде культивирования (ему дают затвердеть), а затем добавляют второй слой, мягкий, содержащий 0,3% агар-агара, в который включаются клонируемые клетки. Колонии становятся видимыми через 7-14 суток, далее их переносят на жидкую культуру.

Клонирование с помощью проточного цитофлуориметра. Приготавливают флуоресцентные микрошарики из латекса и покрывают их антигеном. Такие шарики адсорбируются на антигенспецифических гибридомных клетках, что позволяет выделять их на этом приборе. После выделения тем или иным способом положительных клонов клетки этих клонов размножают в достаточном количестве, и образцы их замораживаются.

Какие из получившихся «плазмоцит-миеломных» гибридных клеток продуцируют заданные антитела, выясняют, отбирая из лунок пробы супернатанта на соответствующий иммуноанализ.

Задание 4

Изучить особенности культивирования гибридомных клеток и очистки моноклональных антител

После отбора гибридомных клеток можно приступить к их массовому наращиванию с целью получения больших количеств моноклональных антител.

В начале культивирования гибридомные клетки могут расти медленно и плохо переносить низкую плотность посева. В связи с этим при пересеве клеток их надо разводить не более чем в 3-5 раз. Ускорению роста клеток может способствовать добавление клеток питающего слоя.

Гибридомные клетки необходимо поддерживать в логарифмической фазе роста и избегать повышения концентрации клеток выше 0,5 млн/мл. Клетки можно культивировать как в стационарной культуре, так и в роллерной, а также в различного рода ферментерах.

Для получения максимальной продукции моноклональных антител клеткам позволяют расти до предельной плотности. В такой культуре через определенное время наблюдается гибель гибридомных клеток. Надосадочная жидкость собирается, а клеточный осадок удаляется (оставшиеся живые клетки не пытаются культивировать дальше).

Для получения больших количеств антител вводят гибридомные живые клетки в организм животных и получают от них асцитную жидкость. Предварительно животным вводят агенты, повышающие способность гибридом расти в брюшной полости (пристан – 0,5 мл за 10-14 суток до введения клеток).

Для многих целей не требуется очистка антител, и они используются в виде культуральных жидкостей или асцитных жидкостей.

Грубую иммуноглобулиновую фракцию можно получить высаливанием белков сульфатом аммония с последующим диализом.

Если антитела необходимо выделить в чистом виде, то предварительно определяют их класс и подкласс, т.к. способы очистки различаются для антител разных классов. Это можно сделать с помощью метода иммунодиффузии по Ухтерлони.

Выделение чистых антител лучше всего проводить на иммуносорбентах. При этом методе, однако, есть опасность, что при фиксации изменяется антигенная структура клеточной поверхности.

Если не удастся выделить антитела прямым способом, то получают иммуноглобулиновую фракцию с помощью различных методов ионообменной хроматографии.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «моноклональные антитела»?
2. С какой целью применяются моноклональные антитела?
3. Что понимают под термином «гибридома»?
4. В чем заключается гибридная технология производства моноклональных антител?
5. Как осуществляется иммунизация животных для производства моноклональных антител?
6. Каким образом осуществляют слияние клеток и отбирают клоны, индуцирующие специфические антитела, при производстве моноклональных антител?
7. Какими методами осуществляется клонирование гибридных клеток при производстве моноклональных антител?
8. На чем основано культивирование гибридных клеток и очистка моноклональных антител?

Тема 6

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН

Цель занятия: ознакомиться с основными классами вакцин, технологией их производства, механизмом выработки иммунного ответа при их введении.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить отличительные особенности живых и инактивированных вакцин

Таблица 6.1 – Отличительные особенности живых и инактивированных вакцин

Вакцины живые	Вакцины инактивированные
вводятся чаще однократно	вводятся двух или трехкратно
небольшая доза	большая доза
иммунитет наступает быстро, более напряженный и продолжительный	менее напряженный и более короткий, медленно наступающий иммунитет
обладают остаточной реактогенностью, тератогенностью	слабая реактогенность
могут вызывать поствакцинальные осложнения и заболевания	уменьшена опасность поствакцинальных осложнений
в организме животных с низким иммунным статусом возможна реверсия живых вакцинных штаммов в исходное вирулентное состояние и возникновение заболевания	отсутствие реверсии у вакцинных штаммов к исходному вирулентному состоянию
живые вакцинные штаммы могут включаться в различные ассоциации, формируя в организме животных смешанные паразитоценозы, в состав которых могут входить бактерии, вирусы, микоплазмы, хламидии, возбудители паразитарных болезней	имеется возможность концентрировать антигены в небольшие объемы, адсорбировать их на различных веществах, применять адъюванты
могут быть контаминированы различными вирусами, бактериями, хламидиями	большая стандартность
некоторые вакцинные штаммы обладают иммунодепрессивным действием и приводят к активизации условно-патогенной микрофлоры в организме вакцинированных животных	можно применять бактерионосителям и больным животным
дифференциация вакцинного и эпизоотического штаммов в организме вакцинированного животного при большинстве инфекционных болезней не разработана (за исключением маркированных вакцинных штаммов)	не создают проблем в дифференциации вакцинных и эпизоотических штаммов, циркулирующих в организме вакцинированного животного

Живые вакцины – это вакцины, содержащие жизнеспособные штаммы патогенных микроорганизмов, ослабленные до степени, исключающей возникновения заболевания, но полностью сохранившие антигенные свойства, обуславливающие формирование специфического иммунитета.

Такие вакцины получают из дивергентных (естественных) штаммов микроорганизмов, обладающих ослабленной вирулентностью для животных и человека, но содержащих полноценный набор антигенов (например, вирус оспы крупного рогатого скота), и из искусственно ослабленных (аттенуированных) штаммов микроорганизмов.

Неживые вакцины (инактивированные, убитые) – это вакцины, изготовленные из микроорганизмов, инактивированных (убитых) воздействием физических или химических факторов.

Такие вакцины подразделяют на анатоксиновые, цельноклеточные, цельновирионные и фракционные.

Задание 2

Изучить особенности технологии производства живых вакцин

Наиболее просты в изготовлении живые вакцины, так как технология в основном сводится к выращиванию аттенуированного вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами (микоплазмы, онковирусы) с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата.

Вакцинальный процесс при введении живых вакцин сводится к размножению и генерализации аттенуированного штамма в организме привитого животного и вовлечению в процесс иммунной системы. Хотя по характеру поствакцинальных реакций при введении живых вакцин вакцинальный процесс и напоминает инфекционный, однако он отличается от него своим доброкачественным течением.

Иммунизация живыми вакцинами приводит к развитию вакцинального процесса, протекающего у большинства привитых без видимых клинических проявлений. Основное достоинство живых вакцин – полностью сохраненный набор антигенов возбудителя, что обеспечивает развитие длительной невосприимчивости даже после однократной иммунизации. Преимуществом живых вакцин считается активизация всех звеньев иммунной системы, вызывающая сбалансированный иммунный ответ (системный и локальный, гуморальный и клеточный). Для вакцинации используют небольшие дозы препарата, и поэтому вакцинацию легко организовать. Хотя живые вакцины требуют специальных условий хранения, они продуцируют достаточно эффективный клеточный и гуморальный иммунитет и обычно требуют только одного введения.

Однако живые вакцины имеют и ряд недостатков. Живые вакцины состоят из цельных живых микроорганизмов, поэтому помимо антигенов в них содержится до 99% балластных компонентов, из-за чего они достаточно реактогенны,

вызывают мутации клеток организма (хромосомные aberrации), что особенно небезопасно для половых клеток. К сожалению, живые вакцины тяжело дозируются и трудно подлежат биологическому контролю, очень чувствительны к действию высоких температур и требуют тщательного поддержания холодовой цепи. В живых вакцинах нет консервантов, при работе с такими вакцинами следует строго соблюдать правила асептики. Нарушение целостности ампул и потеря вакуума приводят к инаktivации препарата в связи с проникновением воздуха и влаги. Большинство живых вакцин вводится парентерально. Важным недостатком живых вакцин является возможность реверсии вирулентных форм, что может стать причиной заболевания вакцинированного, поэтому живые вакцины должны тщательно тестироваться и контролироваться.

Живые вакцины получают при использовании двух основных принципов, предложенных основателями учения о вакцинации Дженнером и Пастером:

- *принцип Дженнера* заключается в использовании генетически близких (родственных) штаммов возбудителей инфекционных заболеваний животных (осповакцина, вакцина БЦЖ, бруцеллезная вакцина);
- *принцип Пастера* основан на получении вакцин из искусственно ослабленных (аттенуированных) штаммов возбудителей (принцип заключается в получении штаммов с наследственно измененными признаками, т.е. низкой вирулентностью и сохранением иммуногенных свойств).

Вакцинные штаммы, предлагаемые для производства живых вакцин, должны удовлетворять следующим требованиям:

- относиться к авирулентным или слабовирулентным штаммам, независимо от способа их получения;
- обладать высокой антигенностью и иммуногенностью (для живых вакцин критерием иммуногенности является ее способность вызывать образование напряженного иммунитета не менее чем у 70% однократно вакцинированных животных);
- способность размножаться в определенных органах;
- кратковременная персистенция в организме привитого животного;
- генетическая стабильность фенотипических свойств (в особенности низкой вирулентности и высокой антигенности, даже при быстро сменяющихся друг за другом пассажах на естественно восприимчивых видах животных);
- наличие генетических маркеров, позволяющих идентифицировать их от эпизоотических (полевых) штаммов возбудителей (более двух и независимых друг от друга);
- отсутствие инфекционности (контагиозности) в случае выделения вакцинного штамма из организма привитого животного (безвредность для других видов животных);
- стабильность при хранении;
- большая широта в дозировании – между минимальной и максимальной иммуногенными дозами (прививочную (оптимальную) дозу

вакцины выражает количество живых микроорганизмов, содержащихся в единице объема; объем прививочной дозы должен быть не очень большим и не очень малым, чтобы обеспечить удобство введения препарата животному и точность дозирования);

- вакцинные штаммы вирусов должны иметь определенные титры активности (инфекционности) в конкретной биологической системе (макроорганизмах, эмбрионах птиц, культурах клеток и др.).

Живые ослабленные вакцины получают путем аттенуации вирулентности, с сохранением антигенной структуры и иммуногенности потенциально патогенных микроорганизмов (бруцеллы, возбудитель туляремии и др.).

Аттенуация (от лат. *attenuatio* – уменьшение) заключается в искусственном стойком ослаблении, уменьшении вирулентности возбудителей инфекционных болезней.

Аттенуация вирусов и бактерий широко используется при селекции штаммов, предназначенных для изготовления живых вакцин. Аттенуацию микроорганизмов осуществляют различными методами, основанными на адаптации возбудителя к организму невосприимчивых или мало восприимчивых в естественных условиях животных или же на приспособлении микроорганизма к неблагоприятным условиям культивирования, при которых последний подвергается воздействию химических, физических, биологических и других факторов.

Аттенуируются штаммы следующими способами:

- *физическим* (изменение температурного режима, осмотического градиента, воздействие ультрафиолетового излучения и др.);
- *химическим* (низкие концентрации антибиотиков, желчи, красителей и др.);
- *биологическим* (пассажем на невосприимчивых животных; пассажем на куриных эмбрионах и культуре тканевых клеток (в случае вирусов)).

При любом методе аттенуации снижается вирулентность вакцинного штамма для естественно восприимчивых к нему животных, и это вновь приобретенное свойство возбудителя должно быть наследственно закреплено.

При производстве живых вакцин предварительно подготавливается посевной материал и среда культивирования. Биомасса вакцинных штаммов нарабатывается в биореакторах глубинной ферментацией (бактерии, дрожжи) или поверхностной ферментацией на твердых питательных средах (мицелиальные грибы). Процессы выполняются в строго асептических условиях, исключающих контаминацию посторонней микрофлорой и фагами.

Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные среды) в ферментерах емкостью от 0,1 м³ до 1–2 м³. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов.

Вирусные и риккетсиозные живые вакцины получают выращиванием вакцинного штамма в эмбрионах кур или перепелов, свободных от вирусов лейкоза, либо в культурах клеток, лишенных микоплазм. Используют первично-трипсинизированные или перевиваемые диплоидные клетки.

Живые аттенуированные штаммы бактерий и вирусов, применяемые для приготовления живых вакцин, получены, как правило, из природных штаммов путем их селекции или пассажей через биологические системы (организм животных, эмбрионы кур, культуры клеток, питательные среды).

Биомассу аттенуированного штамма концентрируют, стандартизируют по количеству микроорганизмов в единице объема, лиофилизируют со стабилизирующей средой, фасуют в ампулы или флаконы.

Живые вакцины выпускаются в лиофилизированном виде. Срок хранения лиофилизированных живых вакцин 1-2 года при температуре +4...+8°C.

Особенности технологии производства рекомбинантных векторных вакцин

Рекомбинантная технология совершила прорыв в создании принципиально новых вакцин. Принцип создания рекомбинантных векторных вакцин заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий, дрожжей или клеток эукариотов встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого будет направлена вакцина.

В качестве вакцин используются сами модифицированные микроорганизмы или протективный антиген, образующийся при их культивировании в условиях *in vitro*. В первом случае иммунный ответ направлен не только против продуктов встроенного гена, но и на носитель вектора.

Примером рекомбинантной вакцины, состоящей из готового антигена, является вакцина против гепатита В, а примером векторных вакцин, антигены которых образуются *in vivo*, является антирабическая вакцина. Она получена на основе осповакцины и нашла широкое применение в профилактике бешенства среди диких животных с помощью приманки, содержащей эту вакцину.

Для создания **вирусных векторных вакцин** (рисунок 6.1) используют аттенуированный ДНК-содержащий вирус, в геном которого встраивается необходимый предварительно клонированный ген.

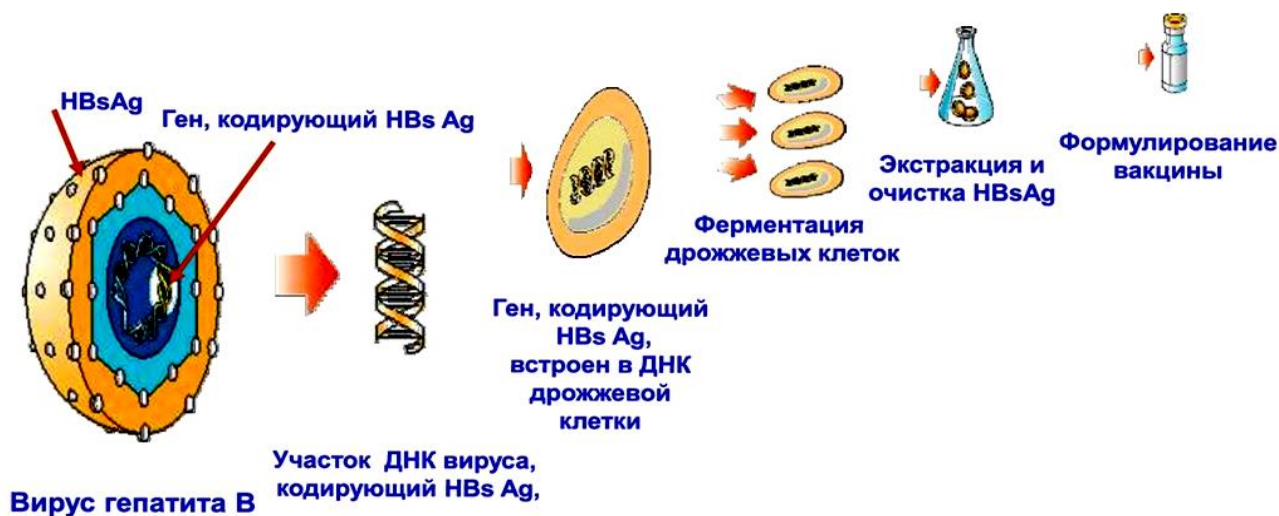


Рисунок 6.1 – Конструирование векторной вирусной вакцины

[<https://ppt-online.org>]

В качестве носителей вирусных векторов используют вирусы осповакцины, бакуловирусы, аттенуированные аденовирусы. Вирус, носитель вектора, активно размножается, а продукт встроенного гена обеспечивает формирование иммунитета. Вектор может содержать несколько встроенных генов, отвечающих за экспрессию соответствующих чужеродных антигенов.

Преимуществом использования вирусов в качестве вектора является более длительная персистенция вирусов в организме по сравнению с бактериями.

Принципы создания **бактериальных векторных вакцин** аналогичны. Важным этапом является клонирование генов и получение мутантных генов, кодирующих иммуногенные, но не токсические формы антигена. В качестве носителя бактериального вектора используется БЦЖ, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*.

Бактериальные векторные вакцины, в отличие от вирусных, можно контролировать с помощью антибиотиков.

Получать эффективную векторную вакцину на основе бактерий достаточно трудно из-за нестабильности трансфекции генного материала, токсичности чужеродного антигена для бактерий, малого количества экспрессированного антигена.

В настоящее время векторные вакцины широко используются в птицеводстве («Вакситек» – против болезней Марека и Гамборо; «Векормун» – против болезней Ньюкасла и Марека). Главным достоинством данных вакцин является то, что при подкожном применении у суточных цыплят происходит быстрая выработка иммунитета.

Сейчас стало очевидным, что многие рекомбинантные вакцины вызывают слабый иммунный ответ. Вероятно, причина в том, что в таких препаратах содержится «голый» белок и отсутствуют другие молекулярные структуры, часто необходимые для запуска иммунного ответа. Чтобы рекомбинантные вакцины вошли в практику, необходимо использование адъювантов, стимулирующих антигенную активность.

Задание 3

Особенности технологии производства инактивированных вакцин

При изготовлении неживых вакцин применяется инактивация патогенных микроорганизмов. При таком подходе все антигены возбудителя доступны для иммунной системы, в то время как сам он абсолютно безвреден. Этот метод приемлем в тех случаях, когда возбудитель не содержит высокотоксичных компонентов, а инактивация не нарушает структуры его антигенов.

Таким образом производится несколько антибактериальных и антивирусных вакцин, в том числе вакцины против гриппа, гепатита А, бешенства и др.

Из-за неспособности к размножению вакцины из убитых микроорганизмов в целом менее иммуногенны, чем препараты из ослабленных возбудителей. Для компенсации этого такие препараты обычно вводят в комплексе с адъювантом (например, солями алюминия), повышающим их эффективность.

Кроме того, убитые микроорганизмы не способны инициировать полноценный клеточный иммунитет (в особенности формирование цитотоксических Т-лимфоцитов) из-за недостаточной степени включения содержащихся в вакцинах экзогенных антигенов в механизм презентации эндогенных антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса. Несмотря на это, вакцины из убитых возбудителей особенно эффективны для презентации конформационных эпитопов антител поверхности микроорганизмов.

Инактивированные вакцины легче дозировать, удобнее очищать, они длительно сохраняются и менее чувствительны к температурным колебаниям.

Для получения инактивированных (убитых) вакцин необходимо сохранить антигенные свойства исходной культуры, что требует сложных питательных сред и щадящих способов инактивации микроорганизмов.

Инактивированные корпускулярные вакцины менее эффективны по сравнению с живыми, поэтому для достижения напряженного иммунитета их нужно вводить в организм многократно (это на длительное время продлевает иммунизацию, что особенно нежелательно в условиях неблагоприятной эпизоотической обстановки). Наличие у инактивированных вакцин большого количества балластных веществ является причиной аллергических и других побочных реакций и отклонений при их введении.

Производство вакцин, содержащих убитые микроорганизмы, отличается от производства живых ослабленных вакцин лишь тем, что выделенные из культуральной среды возбудители инактивируют с помощью химических соединений.

Когда для изготовления вакцины используются инактивированные вирусы или материалы, выделенные из них, то в отношении образования антител обычно отмечается слабая реакция. Иммуногенность некоторых неживых вакцин повышается за счет введения адъювантов (от лат. *adjuvant* – *помощник*) – неспецифических иммуностимуляторов неорганической и органической природы, повышающих специфический иммунный ответ на антигены.

В качестве **адъювантов** используют:

- минеральные адъюванты (гидроксид алюминия, гель фосфата алюминия или кальция);
- растительные адъюванты (сапонины);
- микробные адъюванты (корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахаридобелковые комплексы);
- цитокины и пептиды со свойствами цитокинов (естественные цитокины, пептиды);
- синтетические вещества (полинуклеотиды, пептиды, гликопептиды, липопептиды, полиэлектrolиты);
- препараты тимусного происхождения (Т-активин, тималин, тимолтин, тимактид, тимостимулин, вилозен);
- препараты костномозгового происхождения (миелопид и его пептиды);

- масляные эмульсии и составы на основе сурфактантов (адъювант Фрейнда и др.);
- химически чистые иммуномодуляторы (полиоксидоний);
- сложные искусственные адъювантные системы (липосомы, микрокапсулы).

Адъюванты, как правило, включают в состав субъединичных и молекулярных инактивированных вакцин.

Среди **механизмов действия** адъювантов выделяют следующие:

- образование депо в месте инъекции, что способствует увеличению времени контакта с антигеном;
- действие адъюванта в качестве системы доставки антигена, что стимулирует процессы поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками;
- активация системы врожденного иммунитета за счет передачи сигналов через мембранные и внутриклеточные паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), что приводит к активации транскрипционных факторов и адаптерных белков, опосредуя выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов типа I;
- индукция секреции цитокинов и хемокинов, участвующих в активации и миграции иммунокомпетентных клеток;
- активация инфламماسомы NLRP3 (способствует формированию воспалительной реакции и индукции выработки провоспалительных цитокинов);
- стимуляция активации и созревания антигенпрезентирующих клеток (повышение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул, что способствует эффективной активации наивных Т-клеток), стимуляция процесса презентации антигена;
- индукция развития клеточного и гуморального иммунного ответа;
- участие в реакции герминативных центров, стимуляция продукции высокоаффинных специфических IgG, стимуляция формирования В-клеток памяти при развитии гуморального иммунного ответа;
- стимуляция формирования центральных Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток памяти.

Особенности производства анатоксиновых вакцин

Анатоксиновые вакцины относятся к группе молекулярных вакцин, которые конструируют на основе специфических протективных антигенов, находящихся в молекулярном виде. В подобных препаратах антигенами служат молекулы метаболитов патогенных микроорганизмов. Наиболее часто в этом качестве выступают молекулы бактериальных экзотоксинов.

Анатоксины используют для активной иммунопрофилактики токсинемических инфекций (дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, стафилококковых инфекций и др.).

Целью применения анатоксинов является индукция иммунных реакций, направленных на нейтрализацию токсинов; в результате иммунизации синтезируются нейтрализующие антитела (антитоксины).

Обычным источником токсинов являются промышленно культивируемые естественные штаммы-продуценты (например, возбудители дифтерии, ботулизма, столбняка). Полученные токсины инактивируют термической обработкой либо формалином, в результате чего образуются анатоксины (токсоиды), лишенные токсических свойств, но сохранившие иммуногенность. Анатоксины очищают, концентрируют и для усиления иммуногенных свойств адсорбируют на адьюванте (обычно гидроксид алюминия). Адсорбция анатоксинов значительно повышает их иммуногенную активность. С одной стороны, образуется депо препарата в месте его введения с постепенным поступлением в кровоток, с другой – действие адьюванта стимулирует развитие иммунного ответа, в том числе и в регионарных лимфатических узлах.

Анатоксины выпускают в форме моно- (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый) и ассоциированных (дифтерийно-столбнячный, ботулинический трианатоксин) препаратов.

Технология получения анатоксина включает ключевые этапы:

- выращивание токсигенных культур бактерий, вызывающих у пораженных животных токсинемические инфекции (столбняк, ботулизм, стафилококкоз и др.), в жидких питательных средах в определенном режиме для максимального накопления экзотоксина;
- отделение экзотоксина от бактерий и его обезвреживание (с этой целью на токсин комбинированно воздействуют формалином (0,3-0,5%) и температурой (+39...+40°C) в течение 28-30 суток);
- очистка анатоксина от бактериальных протеинов, белков питательной среды (что увеличивает его реактогенность и сенсибилизирующие свойства);
- концентрирование анатоксина в небольшом объеме жидкости и адсорбция его на различных минеральных адсорбентах (например, на гидроокиси алюминия), что значительно повышает иммуногенную активность (это связано как с созданием «депо» препарата в месте введения, так и с адьювантным действием сорбента, вызывающего местное воспаление, усиление плазмоцитарной реакции в регионарных лимфатических узлах).

В настоящее время в качестве детоксицирующего средства, наряду с формальдегидом, широко используют β -пропиолактон, а также предложена обработка токсина протеолитическими ферментами (пепсином, трипсином, пролазой и папаином) с последующей фильтрацией на колонках с сефадексом Y-100 и Y-200.

Эффективность анатоксинов зависит не только от качества антигена, но также от формы препарата и метода применения. Анатоксины могут быть приготовлены в виде жидких, сухих, эмульгированных и сорбированных препаратов.

Анатоксины характеризуются достаточной иммуногенностью и специфичностью, создают прочный активный приобретенный иммунитет.

Особенности производства корпускулярных вакцин

Инактивированные корпускулярные *цельноклеточные* или *цельновирионные вакцины* получают соответственно из культур бактерий и вирусов, выращенных на тех же средах накопления, что и в случаях получения живых вакцин, и затем подвергнутых **инактивации** физическими (тепло, ультрафиолетовое и другие излучения) или химическими (фенол, спирт) методами.

Инактивированные корпускулярные вакцины, в отличие от живых, получают из производственных, предварительно отселекционированных, или свежeweделенных вирулентных и иммуногенных штаммов возбудителей.

Штаммы, предназначенные для изготовления инактивированных вакцин, должны отвечать следующим требованиям:

- должны представлять собой культуру типичного представителя определенного рода и вида микроорганизмов (обладать четко обозначенным набором свойств, позволяющих отнести этот штамм к данному роду и виду);
- должны сохранять высокую вирулентность (меру патогенности) в живом состоянии;
- производственные штаммы по антигенности и другим свойствам должны быть идентичными большинству культур, циркулирующих в естественных условиях и вызывающих инфекционные заболевания (эпизоотические штаммы);
- должны обладать высокими иммуногенными свойствами (т.е. вызывать состояние невосприимчивости к заражению живыми вирулентными культурами соответствующего вида или серологического варианта у соответствующих сельскохозяйственных и лабораторных животных).

Биохимический состав убитых бактерий, как правило, известен недостаточно хорошо, и они могут вызывать определенные побочные эффекты при попадании в организм. В отличие от них вирусы, выделяемые из надосадочной жидкости после разрушения выращенных в культуре клеток, практически не содержат клеточных компонентов. Кроме того, больший по сравнению с другими компонентами культуральных сред размер вирусных частиц обеспечивает возможность высокой степени очистки.

Эти характеристики инактивированных вакцин обеспечивают их выбор при необходимости индукции гуморального (антителозависимого) иммунитета против вирусных заболеваний.

Получение корпускулярных вакцин включает следующие этапы:

- подбор вакцинных штаммов;
- получение маточной культуры (посевного материала);
- приготовление и стерилизация питательной среды;

- выращивание биомассы (ферментацию осуществляют в асептических условиях в ферментерах периодическим методом глубинного культивирования);
- инаktivация микробной взвеси;
- отделение клеток от культуральной жидкости;
- титрование вакцины (стандартизация);
- контроль стерильности (отсутствие живых клеток патогенного микроорганизма), безвредности (определение переносимости и токсичности), эффективности (способность препарата формировать антибактериальный иммунитет);
- розлив в ампулы;
- лиофилизация;
- запайка ампул под вакуумом.

Особенности производства фракционных вакцин на основе белка

К этой группе вакцин относятся расщепленные (сплит) вакцины и белковые субъединичные вакцины (рисунок 6.2).

Расщепленные (сплит) вакцины содержат разрушенные инаktivированные вирионы вируса гриппа (как наружные, так и внутренние антигены вируса гриппа), при этом они избавлены от самого главного недостатка цельновирионных вакцин – наличия токсинов.

Вакцины из расщепленного вириона получают путем обработки эфиром цельной вирусной частицы. Такая вакцина содержит в себе осколки разрушенных вирусных частиц со всеми антигенами вируса, включая балластные примеси.

За счет высокой очистки в ней отсутствуют вирусные липиды и белки куриного эмбриона. Липиды при обработке вирионов этиловым эфиром в основном удаляются, что ведет к снижению пирогенных реакций и лучшей переносимости таких прививок.

Наличие открытых для иммунной системы внутренних антигенов вируса гриппа (нуклеокапсида и матриксного белка) делает сплит-вакцины уникальными. Они защищают не только от ежегодных мутаций вируса гриппа, но частично и от всех возможных разновидностей вируса, поскольку внутренние антигены подвержены лишь незначительным мутациям.

По сути дела, сплит-вакцины представляют собой «золотую середину» в профилактике гриппа, поскольку по уровню побочных реакций аналогичны субъединичным вакцинам, а по иммунологической эффективности – цельновирионным.

Белковые субъединичные вакцины состоят из одного или нескольких очищенных поверхностных иммуногенных белков возбудителя (эти части необходимы для выработки защитного иммунного ответа). Иммуногены могут быть взяты из разрушенного патогенного организма либо синтезированы в лабораторных условиях методами генной инженерии.

Недостаток данной технологии заключается в том, что изолированные белки при денатурации могут образовать связи с другими антителами, а не с белком патогена.

Субъединичные вакцины обладают высокой иммуногенностью только при условии правильного их приготовления. Высоко очищенная субъединичная вакцина почти полностью свободна от посторонних белков клеточной или вирусной природы.

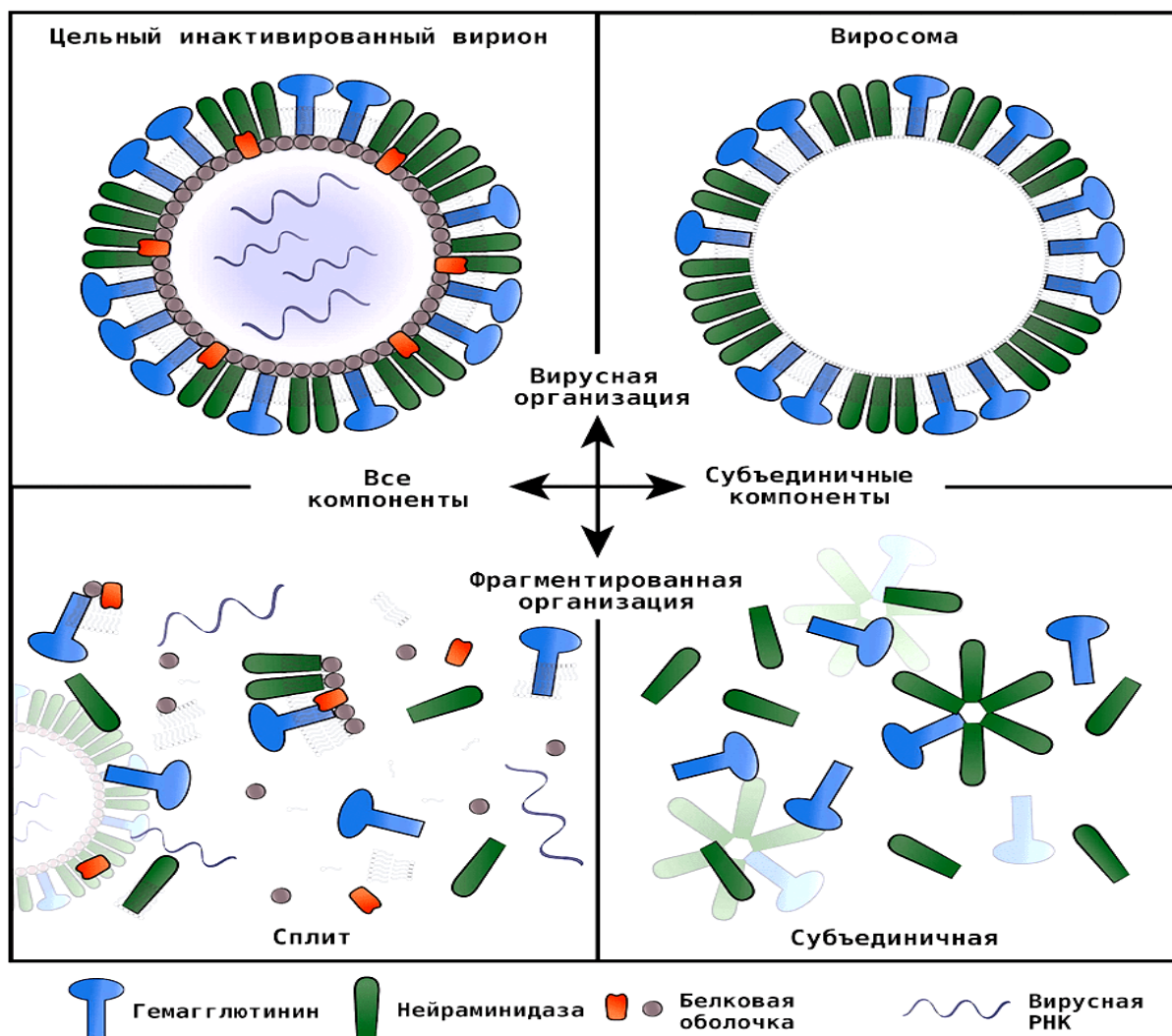


Рисунок 6.2 – Особенности конструирования фракционных вакцин
[<https://biomolecula.ru>]

Особенности производства фракционных вакцин, не содержащих генетической информации

К этой группе вакцин относятся вакцины из вирусоподобных частиц (VLP – virus like particles).

Вирусоподобные частицы (рисунок 6.3) – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. Они формируются в результате самосборки белков вирусных капсидов при их помещении в клеточную культуру.

Вирус SARS-CoV-2



Бетувакс-КоВ-2

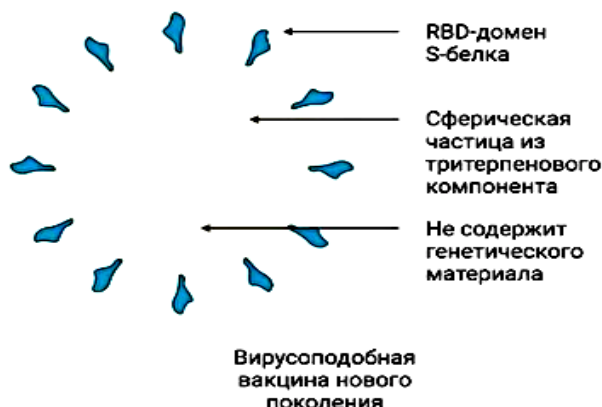


Рисунок 6.3 – Вирусоподобные частицы против коронавируса
[<https://avatars.mds.yandex.net>]

Вакцины на основе VLP обладают перед вакцинами других типов целым рядом преимуществ:

- сохраняется конформационная структура эпитопов, что обеспечивает эффективную активацию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, в том числе формирование специфических цитотоксических лимфоцитов;
- вирусоподобные частицы не содержат вирусных нуклеиновых кислот и не способны к самовоспроизведению, что обеспечивает их безопасность;
- эффективны при нанесении на слизистые оболочки, в том числе ротовой полости.

Существует много вариантов синтеза таких частиц. Для этого можно использовать культуры клеток млекопитающих, насекомых, растений, а также дрожжи и бактерии.

Это обеспечивает возможность подбора условий производства согласно специфическим требованиям, предъявляемым к каждому конкретному продукту.

Эффективная самосборка капсидов отдельных вирусов, а также корпускулярная природа вирусоподобных частиц значительно облегчают производство и очистку этого типа вакцин по сравнению растворимыми вакцинами на основе рекомбинантных белков.

На сегодняшний день сконструирован ряд VLP-вакцин (например, против ВИЧ, коронавирусов), которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический ответ.

Создание VLP-вакцин является перспективным направлением, т.к. сохраняется конформационная структура эпитопов, что имеет значение для иммуногенности вакцин, а также отсутствует риск получения вирулентных ревертантов, что имеет место при применении живых аттенуированных вакцин.

Особенности производства фракционных вакцин на основе полисахаридов

К этой группе вакцин относятся чистые полисахаридные и конъюгированные полисахаридные вакцины.

Чистые полисахаридные вакцины содержат цепочки молекул сахаров (полисахаридов), обнаруживаемых в клеточной стенке ряда бактерий.

Некоторые патогенные бактерии защищены полисахаридной капсулой, которая помогает микроорганизмам уклониться от защитной системы организма человека. Полисахаридные вакцины стимулируют выработку иммунного ответа против этой капсулы.

Иммуногенность, присущая очищенным полисахаридным антигенам, выделенным из клеточных стенок бактерий, и безопасность их использования, по сравнению с цельноклеточными бактериальными вакцинами, в 1970-1980 гг. легли в основу разработки и последующего широкого применения бактериальных полисахаридных вакцин.

В качестве субстанции для производства данных вакцин производители используют очищенные, лиофильно высушенные капсульные полисахариды. Полисахаридный антиген вызывает серотип-специфический Т-независимый иммунный ответ с образованием антител класса М.

Однако наряду с несомненным достоинством этого типа вакцин (низкой реактогенностью) были отмечены ограничения в их применении: недостаточная иммуногенность и слабая способность к формированию иммунологической памяти.

Примерами таких вакцин являются менингококковые и пневмококковые полисахаридные вакцины, которые содержат полисахаридную оболочку (капсулу) инкапсулированной бактерии, которая очищена и уже не является инфекционной.

Конъюгированные субъединичные вакцины связывают полисахаридную цепь с белком-носителем, чтобы вызвать и усилить иммунный ответ.

Если полисахаридные антигены химически связаны (конъюгированы) с белком, который распознается Т-клетками, то конъюгированные вакцины могут вызвать выработку мощного иммунного ответа и иммунной памяти.

Способы получения конъюгата полисахарид-белок разнообразны и зависят от конкретного производителя:

- взаимодействие полисахарида с цианогенбромидом, затем с дигидразином адипиновой кислоты и дальнейшее связывание с белком-носителем;
- восстановительное аминирование с образованием оснований Шиффа (N-замещенные имины) из восстанавливающих концов полисахарида и боковых аминокислотных групп белка, при дальнейшем восстановлении этих иминов с помощью цианоборогидрида натрия;
- связывание полисахарида с носителем через бигенерические спейсеры, содержащие ковалентную тиоэфирную группу.

Вакцины против гемофильной инфекции типа b (Hib), пневмококковой инфекции (ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13) и менингококковой инфекции типа А являются конъюгированными вакцинами.

Задание 4

Изучить современные подходы к конструированию вакцин

Синтетические пептидные вакцины

Синтетические пептидные вакцины – это препараты, содержащие искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов вируса, способные вызывать специфический иммунный ответ организма и защитить его от конкретного заболевания. Идентификация основных антигенных детерминант протективных антигенов многих вирусов позволила синтезировать антигенноактивные пептиды.

Синтетические пептидные вакцины являются одной из перспективных платформ для разработки средств профилактики инфекционных заболеваний. Технология создания пептидных вакцин предполагает использование современных биоинформатических средств, включая компьютерное моделирование.

Идея использования синтетических пептидов в качестве вакцин родилась при изучении клеточных и молекулярных механизмов развития иммунитета. Она исходила из логического представления, что экзогенные антигены путем эндоцитоза поступают в клетки организма, где расщепляются до пептидов, которые активируют клетки иммунной системы. Большинство природных антигенов представляют собой серию антигенных детерминант, каждая из которых способна вызывать иммунный ответ.

Изучение иммунизирующей активности коротких пептидных антигенов началось во второй половине XX века. Они оказались удобными аналогами для изучения природных антигенов, т.к. их введение в организм вызывало сходные иммунологические реакции.

В 1974 г. М. Села впервые описал искусственно полученный пептид, вызывающий образование антител к белку лизоциму.

Идентификация антигенных детерминант, ответственных за иммуногенность многих патогенов, позволила синтезировать идентичные пептиды. Благодаря этому в дальнейшем была показана способность различных искусственных конструкций, созданных на основе синтетических пептидов, вызывать образование специфических антител и защиту животных от инфекционных заболеваний.

Наиболее значительные исследования по созданию синтетических пептидных вакцин проведены на модели вируса ящура. Такие препараты вызывали образование вируснейтрализующих антител у морских свинок и защиту у значительной части свиней и крупного рогатого скота при экспериментальном заражении вирулентным вирусом.

При определенных условиях синтетические пептиды могут обладать такими же свойствами, как и естественные антигены, выделенные из

возбудителей инфекционных заболеваний. Молекула синтетических пептидных вакцин может содержать разнородные участки (эпитопы), которые способны формировать иммунитет к разным видам инфекций.

У синтетических пептидов нет недостатков, характерных для живых вакцин (реверсия вирулентности, остаточная вирулентность, неполная инактивация и т. п.). Синтетические вакцины обладают высокой степенью стандартности, слабой реактогенностью, они безопасны.

Анализ результатов лабораторных испытаний синтетических пептидов в качестве вакцин против различных инфекционных заболеваний показал, что многие из них обладают иммуногенными свойствами и вызывают образование специфических антител и защиту от заболеваний при экспериментальном заражении. Однако по выраженности они, как правило, значительно уступают существующим вакцинам.

Основная причина их недостаточной антигенной активности состоит в том, что короткие синтетические пептиды, в отличие от трехмерных эпитопов природных белков, не имеют соответственной конформационной организации (рисунок 6.4).

Считается, что для иммунного ответа конформация более важна, чем линейная последовательность аминокислот и даже последовательность антигенных детерминант. Этим объясняется известный факт, заключающийся в том, что циклизированные пептиды обладают большей иммуногенностью, чем их линейные аналоги.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против дифтерии, холеры, стрептококковой инфекции, гепатита В, гриппа, ящура, клещевого энцефалита, против пневмококковой и сальмонеллезной инфекций.

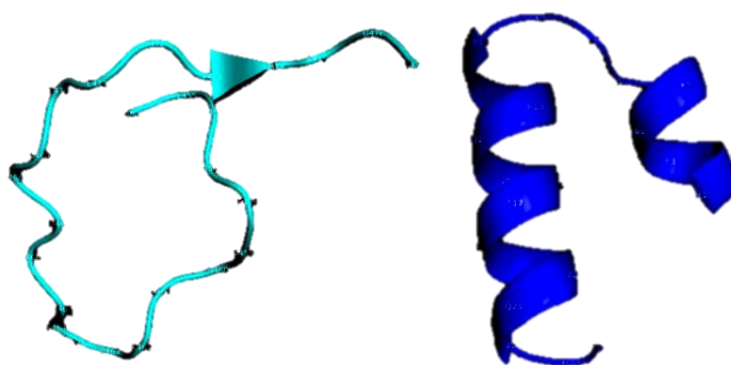


Рисунок 6.4 – Различия в пространственной структуре в белке реального вируса (слева) и пептида в вакцине (справа)
[<https://habrastorage.org>]

Форсифицированные вакцины

Форсифицированные вакцины относятся к препаратам нового поколения, получены путем химического ковалентного связывания (конъюгация) иммуномодуляторов с микробными антигенами, входящими в состав вакцин.

Использование иммуномодулирующих препаратов в вакцинопрофилактике диктуется необходимостью уменьшения дозы вводимого антигена. В качестве иммуномодуляторов используются некоторые синтетические полиэлектролиты, природные соединения и др. Эффект стимуляции антителогенеза полиэлектролитами связан с их способностью сорбироваться на клеточной мембране и прямо активировать деление и антигенонезависимую дифференцировку В-лимфоцитов.

К иммуномодуляторам, воздействующим на Т-систему иммунитета, относятся препараты, полученные из тимуса крупного рогатого скота (Т-активин и иммунофан), которые используются в качестве форсификаторов вакцинального процесса.

Перспективным может также оказаться совместное применение вакцинных препаратов и иммуотропных лекарственных средств, восстанавливающих реакции иммунитета, в том числе и способность к продукции антител.

Метод форсифицированной вакцинации можно считать актуальным, так как он открывает перспективы совершенствования вакцин в решении важного вопроса формирования протективного иммунитета, особенно при иммунодефицитных состояниях.

Микрокапсулированные вакцины

Микрокапсулированные вакцины созданы на основе инкапсуляции антигенов и антигенных эпитопов в биodeградируемые микросферы (рисунок 6.5), что позволяет доставить их к иммунокомпетентным клеткам и исключить возможность изменения их структуры под действием ферментов.

Преимуществом микросфер является возможность распадаться и освобождать антиген в заданное время.

Микрокапсулы состоят из нетоксичных неантигенных полимеров лактида или гликолида или их сополимеров, диаметр которых, как правило, не превышает 10 мкм.

Наиболее часто используют полимер *poly-DL-lactide-co-glycolide (PLGA)*. Он в организме подвергается биodeградации (гидролизу) с образованием молочной и гликолевой кислот, которые являются нормальными продуктами обмена веществ. В зависимости от размеров микросфер и от соотношения лактида к гликолиду в диполимере (чем больше лактида, тем медленнее процесс биodeградации) можно программировать скорость выделения антигена – от нескольких дней до нескольких месяцев.

Для инкапсулирования белковых антигенов с успехом применяют хитозановые частицы. *Хитозан* – природный полисахарид, получаемый из экзоскелета ракообразных, прост в производстве, инкапсуляция полипептидов может происходить как в процессе их образования, так и позднее – путем поверхностного поглощения, что значительно усиливает иммунный ответ организма на вакцинацию. Комбинированный с хитозаном материал повышает активацию антигенпрезентирующих клеток, усиливает синтез цитокинов и вызывает пролиферацию антигенспецифических Т-клеток, или лимфоцитов – активных участников иммунного ответа. Поглощение инкапсулированных в хитозан антигенов



Рисунок 6.5 – Схематическое строение микрокапсулы

[<https://cucaracha.od.ua>]

дендритными клетками и макрофагами зависит от размера частиц, концентрации антигена и времени экспозиции.

Использование биodeградируемых микросфер позволяет провести одномоментную комплексную вакцинацию против нескольких инфекций. Каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать несколько различных капсул, что позволит значительно сократить количество инъекций.

При однократном применении смеси микросфер с коротким и длительным временем распада можно их использовать не только для первичной, но и для последующей вакцинации. Этот принцип был использован при разработке препарата столбнячного анатоксина и микрокапсульной формы инактивированной гриппозной вакцины, предназначенного для парентерального применения.

При использовании непарентерального пути введения микрокапсулированных вакцин (орально, интраназально, интравагинально) развивается не только гуморальный, но и местный иммунитет, который обусловлен продукцией иммуноглобулинов класса А. При оральном поступлении микросфера захватывается и транспортируется эпителиальными клетками пейеровых бляшек (М-клетками) в зависимости от их размера: при диаметре микросфер более 10 мкм они выделяются пейеровыми бляшками, с диаметром 5–10 мкм – остаются в них и утилизируются, а с диаметром менее 5 мкм – диссеминируются по системе циркуляции.

В качестве примера можно привести микрокапсулированную форму живой коревой вакцины, которая представлена частицами размером 0,2–10 мкм и обладает стабильными характеристиками. Заслуживает внимания микрокапсулированный вариант интраназальной вакцины против пандемического гриппа H1N1 с длительным сроком хранения, аналогов которой в мире не существует.

Инкапсуляция полипептидных антигенов в микрочастицы имеет следующие преимущества: частицы предотвращают деградацию антигенов, облегчают поглощение химических агентов антиген-представляющими клетками, усиливают иммунный ответ непосредственно и с помощью воздействия адъювантов на основной антиген.

Липосомальные (липосомные) вакцины

Липосомальные (липосомные) вакцины представляют собой комплекс «антиген + липофильный носитель» (липосомы или липидсодержащие везикулы).

Липосомы (рисунок 6.6) – микроскопические пузырьки с двухслойной мембраной, состоящие из фосфолипидов, которые обеспечивают транспортирование антигенов к антигенпрезентирующим клеткам. Размеры липосом варьируют от 0,01 до 150 мкм. Для получения липосом широко используют технологию суперкритических растворов, которая позволяет получить многослойные липосомы, крупные и мелкие однослойные липосомы (от нескольких мкм до десятков нм – наносомы).

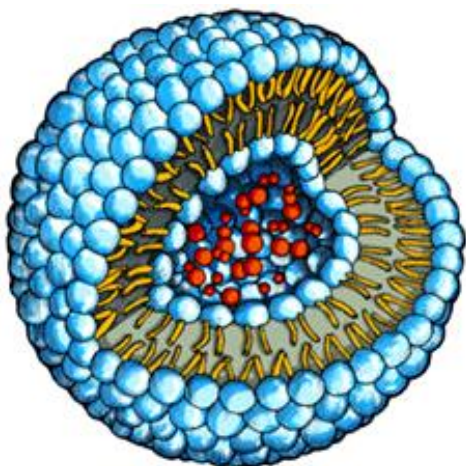


Рисунок 6.6 – Схематическое строение липосомы
[<http://himya.ru>]

Липосомы принято делить на анионные (заряженные отрицательно) и катионные (заряженные положительно).

Благодаря сходству с клеточными мембранами липосомы не токсичны, заключенное в них вещество защищено от разбавления и деградации в крови.

Антигены могут включаться в липосомы в растворимой водной фазе или прикрепляться к мембране, что обуславливает снижение их токсичности и более продолжительную циркуляцию. Антигены, включенные в состав поверхностной мембраны липосом, приобретают свойства адъюванта – потенцируют иммунный

ответ на включенный в них бактериальный, вирусный или паразитарный антиген.

Механизм адъювантного действия липосом на инкорпорированный антиген точно неизвестен. Предполагают, что адъювантное свойство возникает благодаря медленному освобождению антигена и способности везикул со связанным антигеном мигрировать в региональные лимфатические узлы в месте инъекции и потенцировать иммунный ответ.

Используют также пришивание адресных молекул к поверхности липосом (например, антитела – к поверхностным белкам клеток-мишеней) для направленной доставки содержимого липосом. Если пришивают молекулы полиэтиленгликоля, то помимо защиты самих липосом от захвата клетками иммунной системы, увеличивается время нахождения липосом в кровотоке. Липосомы могут захватываться макрофагами (путем эндоцитоза с последующей деградацией их мембран) или сливаться с мембраной макрофагов, что приводит к экспонированию антигена на их поверхности. Это позволяет обеспечить липосомам целенаправленную доставку протективных антигенов в макрофаги различных органов, тем самым способствует повышению эффективности презентации антигена. При необходимости, возможно в дальнейшем уточнить «адрес» доставки вакцины благодаря встраиванию в липосомную мембрану вспомогательных сигнальных молекул.

Липосомальные вакцины стимулируют образование гуморального и клеточного иммунитета, а антигены, введенные внутрь липосом, усиливают иммунный ответ в 1000 раз.

В ветеринарной практике используют липосомальные вакцины против болезни Ньюкасла и реовирусной инфекции птиц. В Швейцарии разработана лицензированная липосомальная вакцина против гепатита А (Eрахal-Berna). На стадии испытаний находятся липосомальные вакцины для парентеральной иммунизации против гриппа, гепатита А и В, дифтерии, столбняка. США проводят клинические испытания липосомальной гриппозной вакцины из гемагглютинаина и доклинические изучения липосомальной менингококковой В вакцины. Имеются публикации об успешной иммунизации липосомальными вакцинами

через слизистые ЖКТ (вакцина эшерихиозная, шигеллёзная Флекснера), в результате чего развивается не только общий, но и местный секреторный иммунитет.

ДНК-вакцины

Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена, привел к появлению нового типа вакцин – ДНК-вакцин.

Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм вводят не белок-антиген, а нуклеиновую кислоту (ДНК), в которой закодирована информация о белке. Фрагменты ДНК вирусов и бактерий, имплантированные в клетки животных, способны синтезировать собственные белки (антигены). Сами клетки, получившие гены другого организма, в ответ начинают вырабатывать антитела на вновь синтезируемые белки.

Эксперименты по созданию ДНК-вакцин преимущественно ведутся с бактериальными плазмидами, которые содержатся вне хромосом. Плазмиды хороши в том плане, что сами по себе не провоцируют развитие инфекции. Их используют в качестве вектора.

Для получения ДНК-вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина какого-либо микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Кроме гена, кодирующего вакцинирующий протеин, в плазмиду встраивают генетические элементы, которые необходимы для экспрессии («включения») этого гена в клетках эукариотов, в том числе животных, для обеспечения синтеза белка. Такую плазмиду вводят в культуру бактериальных клеток, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной (рисунок 6.7).

Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, что приводит к последующей выработке иммунитета против соответствующего возбудителя.

При этом плазмиды, содержащие соответствующий ген, не встраиваются в ДНК хромосом животных.

ДНК-вакцины вызывают более слабый иммунный ответ по сравнению с цельновирионными. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин применяют:

- включение иммуностимулирующих нуклеотидных последовательностей в ДНК-конструкцию;
- адъюванты;
- усовершенствованные методы доставки.

Доставка ДНК-вакцин осуществляется в антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты), в которых будет происходить синтез и посттрансляционная модификация антигена, после чего он будет встроен в мембрану клетки, чтобы привлечь внимание иммунной системы.

Методы доставки генетического материала в клетку обычно разделяют на 2 группы: вирусные (посредством векторов) и невирусные (микроинъекции, электропорация, сонопорация, баллистическая трансфекция и др.).

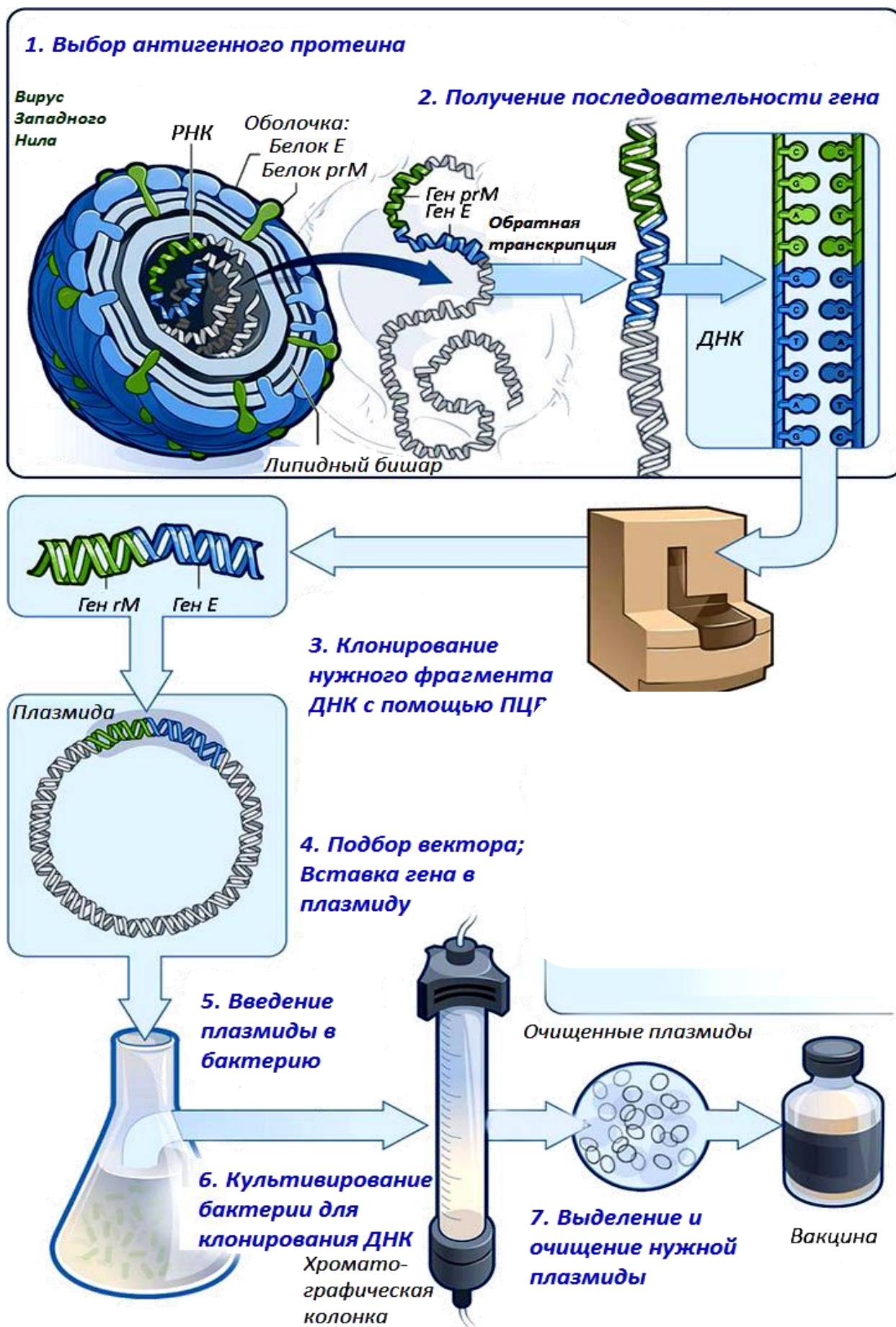


Рисунок 6.7 – Конструирование ДНК-вакцины против вируса Западного Нила
[<https://ru.wikipedia.org>]

ДНК-вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами:

- способствуют выработке антител к нативной молекуле вирусных протеинов;
- способствуют выработке цитотоксических Т-лимфоцитов;
- могут избирательно воздействовать на различные субпопуляции Т-лимфоцитов;
- способствуют формированию длительного иммунитета;
- устраняют риск инфицирования.

Реальная возможность использовать эту технологию в медицине и ветеринарии появилась в середине 90-х гг. XX века. Новый подход достаточно прост, дешев и, самое главное, универсален.

Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины против различных инфекционных болезней, меняя только последовательность, кодирующую необходимые белки-антигены. При этом отпадает необходимость работать с опасными вирусами и бактериями, становится ненужной сложная и дорогостоящая процедура очистки белков. Препараты ДНК-вакцин не требуют специальных условий хранения и доставки, они стабильны длительное время при комнатной температуре.

Уже разработаны и испытываются ДНК-вакцины против инфекций, вызываемых вирусами гепатитов В и С, гриппа, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, иммунодефицита человека (ВИЧ), японского энцефалита, а также возбудителями сальмонеллеза, туберкулеза и некоторых паразитарных заболеваний (лейшманиоз, малярия). Эти инфекции крайне опасны для человечества, а попытки создать против них надежные вакцинные препараты классическими методами оказались безуспешными.

ДНК-вакцинация – одно из самых перспективных направлений в борьбе с раком. В опухоль можно вводить разные гены: те, что кодируют раковые антигены, гены цитокинов и иммуномодуляторов.

РНК-вакцины

РНК-вакцины – вакцины, действующей частью которых является обычно матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК), кодирующая белок, характерный для патогена. Помимо собственно РНК, в вакцине присутствует липидная оболочка, защищающая РНК от разрушения и обеспечивающая проникновение РНК в клетку.

Когда вакцинная РНК попадает в клетку, клеточные механизмы синтеза белков продуцируют закодированный в РНК белок. Этот белок действует как антиген: его обнаруживает иммунная система организма и обучается на этом белке – в организме формируется иммунитет. В дальнейшем, при попадании в организм патогена, иммунная система опознает его по уже известному белку и уничтожает инфекцию, не давая развиваться заболеванию (рисунок 6.8).

РНК-вакцины могут быть разработаны против всех белковых антигенов, поскольку после вакцинации РНК-вакциной во время трансляции из матрицы

РНК образуется белок. Белки могут происходить, например, из вирусов, бактерий или опухолей (опухолевый антиген).

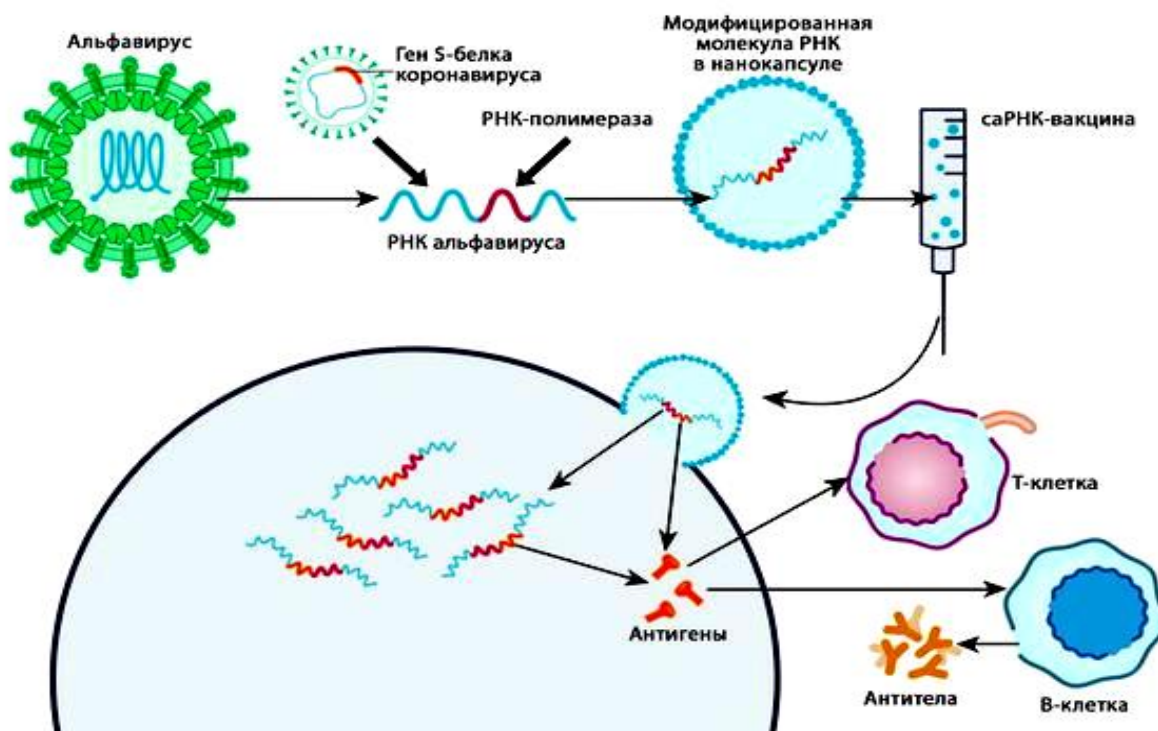


Рисунок 6.8 – Принцип действия РНК-вакцин
[<https://cdn21.img.ria.ru>]

Использование РНК-вакцин для иммунизации против вирусных инфекционных заболеваний означает, что в организм больше не вводятся репродуктивные патогены или их фрагменты, как в случае неживых вакцин, а только мРНК антигенов с вспомогательным веществом, которое вводит РНК в клетки (реагент для трансфекции). Если трансфицированные мРНК клетки временно представляют этот компонент вируса, с которым необходимо бороться, иммунная система учится расщеплять антиген и, в случае реальной инфекции, защищать его от естественного патогена, в результате чего человек или животное приобретают иммунитет.

Чтобы создать мРНК-вакцину против вируса, не нужен сам вирус, достаточно иметь его секвенированный и расшифрованный геном. Вакцинная мРНК создается на основе короткой генетической последовательности из генома вируса, которая кодирует белок вируса (обычно поверхностный, с помощью которого вирус проникает в клетку). Синтезированная мРНК помещается в липидную наночастицу, которая доставляет вакцинную мРНК внутрь клетки. Внутри клетки мРНК взаимодействует с генетическим механизмом клетки, и он синтезирует закодированный в ней вирусный белок. Затем этот белок выходит на поверхность клетки, и иммунная система организма начинает на него реагировать, в процессе этой реакции вырабатывается иммунный ответ на вирусный белок.

Для создания РНК-вакцин применяются 2 основных подхода:

- использование нереплицирующейся мРНК, кодирующей, как правило, только 1 антиген;

- получение самоамплифицирующегося РНК-репликона из одноцепочечных РНК вирусов, в геноме которых структурные гены заменены на гены, кодирующие необходимые антигены и РНК-полимеразу.

Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плаزمид, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов.

При использовании мРНК нет проблем с иммунным ответом на вектор, который часто препятствует повторному введению других вакцин. Кроме того, мРНК не может интегрироваться в геном клетки организма.

Вакцины, содержащие продукты генов гистосовместимости

Иммунный ответ к крупномолекулярным антигенам начинается с процессинга антигена вспомогательными клетками. Пептиды, образующиеся из антигена, не обладают выраженной иммуногенностью, но приобретают ее после взаимодействия с продуктами (антигенами) генов гистосовместимости I или II классов. Отсутствие таких продуктов является одной из основных генетических причин слабой иммунной реакции организма на вакцину.

Каждой инфекции соответствует свой набор антигенов гистосовместимости, отвечающий за высокий уровень иммунного ответа.

Отсутствие на клетках таких антигенов является одной из основных генетических причин слабой иммунной реакции. Введение в организм молекул гистосовместимости, несущих пептиды, соответствующие эпитопам инфекционных агентов, способствует усилению иммунитета.

При вакцинации протективные пептиды антигенов презентуются Т-лимфоцитам в комплексе с антигенами главного комплекса гистосовместимости. Причем, каждый протективный эпитоп может презентироваться с высоким уровнем иммунного ответа только определенным продуктам главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Для эффективной презентации антигена в состав вакцин рекомендуют вводить готовые антигены главного комплекса гистосовместимости или их комплексы с протективными эпитопами.

Доказана возможность индукции гуморального иммунитета с помощью конъюгатов, состоящих из пептидов (полученных из вирусов, бактерий, опухолей) и моноклональных антител к антигенам гистосовместимости класса II. Антитела доставляют вакцину к продуктам генов гистосовместимости. Вместо моноклональных антител можно использовать искусственно синтезированные пептиды, которые хорошо взаимодействуют с антигенами ГКГ.

На стадиях разработок находятся вакцины против цитомегаловирусной инфекции и онкологических заболеваний (меланомы, рака простаты, папилломы). Клинические испытания проходят вакцины следующих вариантов: комплекс антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса с антигенами вируса гепатита В; комплекс олигопептида и моноклональных антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости II класса.

По предварительным данным, вакцина, представляющая собой комплекс антигенов гистосовместимости класса I с антигенами вируса гепатита В,

вызывает сильный ответ цитотоксических лимфоцитов и может способствовать усилению иммунитета у больных гепатитом В.

Антиидиотипические вакцины

Антиидиотипические вакцины – вакцины, полученные из гомологичных или гетерологичных идиотипов (структур, характеризующих индивидуальные антигенные свойства V-области молекулы антител и клеточных рецепторов).

Когда нативный антиген непригоден для иммунизации, можно использовать антиидиотипические вакцины.

Антиидиотипические антитела являются зеркальным отражением антигена и поэтому способны вызывать образование антител и цитотоксических клеток, реагирующих с антигеном.

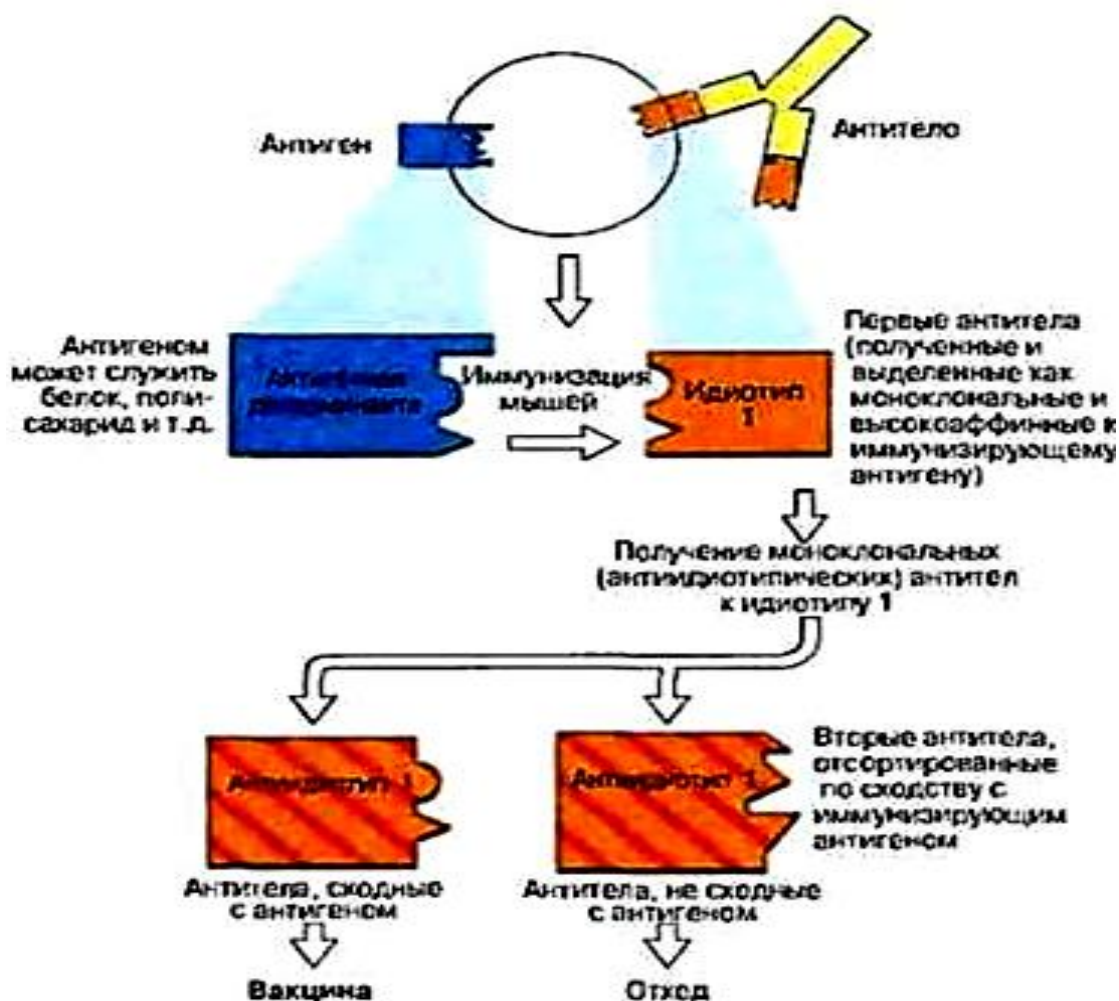


Рисунок 6.9 – Получение антиидиотипических вакцин

[<https://lifelib.info>]

Это единственный тип вакцин, созданный исключительно на основе теоретических представлений. Идея состоит в получении большого количества антиидиотипических моноклональных антител против V-области (идиотипа) иммуноглобулина, заведомо обладающего защитной активностью. Отобранные соответствующим образом антиидиотипические антитела будут по пространственной конфигурации подобны эпитопам исходного иммунизирующего антигена и пригодны для использования с целью активной иммунизации вместо него.

Такая стратегия, хотя и воспринимается нередко скептически, все же может оказаться действительно эффективной в тех случаях, когда сам по себе нативный антиген непригоден, т. е. не обладает иммуногенностью, как, например, некоторые бактериальные полисахариды или липид А из бактериального эндотоксина (липополисахарида). При этом моноклональные антитела имеют то преимущество, что они как белки должны индуцировать иммунологическую память, которой полисахариды и липиды обычно не вызывают.

Вакцины на основе антиидиотипических антител безопасны, т.к. идиотипы являются естественными эндогенными регуляторами иммунного ответа.

Получены экспериментальные антиидиотипические вакцины к возбудителям вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний.

Контрольные вопросы

1. Какие биологические препараты относят к вакцинам?
2. Какие компоненты входят в состав вакцин?
3. Какие объекты используют в качестве антигенов при конструировании вакцин?
4. Какие виды вакцин относятся к группе живых вакцин?
5. Какие основные этапы производства живых вакцин?
6. Какие виды вакцин относятся к группе инактивированных вакцин?
7. Какие основные этапы производства инактивированных вакцин?
8. Какие вакцины производят с помощью методов генной инженерии?
9. Какие вакцины нового поколения применяются в ветеринарии и медицине? На чем основаны подходы к их конструированию?

Тема 7

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Цель занятия: ознакомиться с технологией производства лечебно-профилактических гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

**Изучить требования, предъявляемые к животным-продуцентам,
используемым в сывороточном производстве**

Для приготовления гипериммунных сывороток чаще всего используют крупный рогатый скот (волы) и лошадей. При производстве сыворотки против рожи используют свиней.

Животных, применяемых для получения сывороток, завозят из стационарно благополучных по инфекционным болезням районов. При этом они должны быть клинически здоровыми, средней и выше средней упитанности, свободными от кожных паразитов.

Всех завезенных на биофабрику животных выдерживают в карантине 45 суток. За это время их всесторонне обследуют с ежедневным двукратным (утром и вечером) измерением температуры тела, проверяют на пораженность гельминтами и при необходимости дегельминтизируют. Всех животных исследуют на инфекционные болезни, согласно требованиям нормативно-технической документации.

Волов используют для получения лечебно-профилактических сывороток против пастереллеза, сибирской язвы, рожи, анаэробных и других инфекций. Чаще используют животных красностепной, калмыцкой, симментальской, швицкой, астраханской и других пород в возрасте от 3 до 8 лет и массой не менее 350 кг. Их подвергают обязательному исследованию на туберкулез, бруцеллез, лептоспироз.

Лошадей используют для получения некоторых гипериммунных сывороток (противостолбнячной, противоботулинической, противодифтерийной и др.), нормальной сыворотки, сыворотки жеребых кобыл и желудочного сока. Чаще используют помеси донской и казахской пород в возрасте от 3 до 12 лет и массой от 450 до 500 кг. Их подвергают обязательному исследованию на сеп, инфекционную анемию, трихомоноз, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы.

Свиней используют для получения противорожистой сыворотки. Чаще используют животных крупной белой породы в возрасте от 5 до 6 месяцев и массой не менее 80 кг. Их подвергают обязательному исследованию на туберкулез и бруцеллез.

Овец, баранов и валухов используют для получения некоторых диагностических (листериозных) и нормальных (для приготовления сывороточных сред с целью культивирования лептоспир) сывороток. Чаще используют животных в возрасте от 2 до 3 лет и массой от 30 до 45 кг. Их подвергают обязательному исследованию на бруцеллез, туберкулез, паратуберкулез.

Принято считать, что успех гипериммунизации в значительной степени зависит от породы и возраста животных. Более высокие титры антител получают при использовании для иммунизации породистых животных в возрасте от 3 до 10 лет. Пол животных не имеет существенного значения.

При отборе животных-продуцентов учитывают их физиологические и иммунобиологические показатели.

На активность выработки животным-продуцентом гипериммунной сыворотки антител влияют следующие факторы: тип нервной деятельности животного-продуцента, реактивность организма, порода, конституция, возраст.

Учитывая, что введение антигенов животным и периодическое кровопускание приводят к нарушению обмена веществ и анемии, а в ряде случаев – и к снижению титров антител, главное внимание уделяют вопросам полноценного, сбалансированного кормления животных-продуцентов.

Кормление животных-доноров отличается от кормления других животных и осуществляется по специально разработанным и утвержденным рационам. Такие рационы должны содержать по 11-12 к.ед. и по 1000-1200 г переваримого протеина, а также включать сочно-витаминные корма и быть строго сбалансированными по минеральному составу, что необходимо для восстановления крови после ее взятия.

Задание 2

Изучить схему гипериммунизации лошадей при получении гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки

Для получения гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки используют лошадей в возрасте от 3 до 10 лет. Вначале здоровым животным вводят 4-кратно вакцину Ценковского II для создания стойкого иммунитета (грудиммунизация), а потом лошадей подвергают гипериммунизации вирулентной суточной бульонной культурой возбудителя сибирской язвы. Всего используют 12 вирулентных штаммов возбудителя, комбинируя их по 4 в виде смеси для каждой иммунизации.

Гипериммунизацию лошадей начинают с малых доз (0,5; 1,0; 2,5 и 5,5 мл) с интервалом в 3 суток. Затем культуры возбудителя сибирской язвы вводят с интервалами в 3-4 суток и в дозах 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 110,0; 120,0; 130,0; 140,0; 150,0 мл.

Обычно бывает достаточным ввести антиген 13 раз, и сыворотка лошадей-продуцентов становится активной.

При введении доз от 10 до 80 мл к культуре добавляют 0,2% алюминиевых квасцов, а к дозам от 100 до 150 мл – 0,1% квасцов. При повышении у животных температуры тела интервал между инъекциями увеличивают до 4 или 5 суток.

Введение антигенов обычно не вызывает резких отклонений в состоянии здоровья животных, лишь иногда наблюдаются местные и общие реакции. Эффективность иммунизации животных повышается при дробном введении антигенов одновременно в различные участки тела с охватом возможно большего количества лимфатических узлов.

Задание 3

Изучить технику получения сыворотки крови

Если выпущенную в сосуд кровь не стабилизировать антикоагулятором, происходит ее свертывание и образуется сгусток, содержащий форменные элементы и выпавший в осадок белок фибриноген.

Сгусток постепенно уплотняется, стягивается и от него отделяется прозрачная желтоватого цвета жидкость – сыворотка (происходит процесс ретракции).

Сыворотка крови (рисунок 7.1) представляет собой плазму, лишенную белка фибриногена и других веществ, участвующих в свертывании крови.



Рисунок 7.1 – Плазма и сыворотка крови
[<https://studarium.ru>]

Для получения сыворотки кровь берут в стерильные пробирки, вымытые в растворе мыла и промытые дистиллированной водой. Сыворотка лучше

отделяется, если перед взятием крови стенки пробирок смочить теплым физиологическим раствором. Пробирки должны иметь комнатную температуру, т.к. кровь плотно пристает к стенкам пробирок и наступает частичный гемолиз эритроцитов.

После взятия крови пробирку ставят в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на 1 час. Затем переносят ее на холод. Через 4 часа сыворотка в виде прозрачной жидкости отделяется от кровяного сгустка. Для лучшего выделения сыворотки образовавшийся сгусток фибрина отделяют от стенок пробирок, обводя стеклянной палочкой или бактериологической петлей.

С целью быстрого получения сыворотки свернувшуюся кровь центрифугируют при 2000-2500 об/мин. в течение 15-20 минут. Готовую сыворотку сливают в чистую сухую пробирку.

Задание 4

Изучить особенности получения гамма-глобулина риваноловым методом

Риванол впервые был применен для фракционирования сывороточных белков в 1952 г. Было установлено, что при добавлении к сыворотке крови водно-риванолового раствора происходит осаждение альбуминов, бета- и альфа-глобулинов. Основная масса гамма-глобулинов остается в фильтрате. В дальнейшем были разработаны детали фракционирования сыворотки и предложена методика получения гамма-глобулина с помощью риванола.

Выделение гамма-глобулина этим методом проводится следующим образом (рисунок 7.2).

К 1 объему сыворотки крови постепенно добавляется 3 объема 0,4%-ного раствора риванола, в результате чего в осадок выпадают альбумины и основная масса альфа- и бета-глобулинов. Гамма-глобулин при таких условиях остается в растворе.

Кроме гамма-глобулина, в растворе остается риванол, который удаляется активированным углем и фильтрацией через бумажные фильтры в воронках. При этом добавляется 10 г угля на 100 мл раствора. Смесь тщательно перемешивается. Полученный прозрачный раствор гамма-глобулина подвергают лиофильному высушиванию.

Технология получения гамма-глобулина риваноловым методом очень проста, занимает мало времени, не требует дорогостоящего оборудования, однако имеет некоторые недостатки: полученная фракция гамма-глобулина содержит примеси бета- и альфа-глобулинов; необходимо очищать фильтрат от риванола активированным углем и последующей фильтрацией; необходимо высушивать большие объемы раствора гамма-глобулина (т.к. сыворотка на первом этапе получения гамма-глобулина разводится раствором риванола в 4 раза); невозможно получить другие фракции белков сыворотки (т.к. под воздействием риванола выпавшие в осадок белки денатурируют).

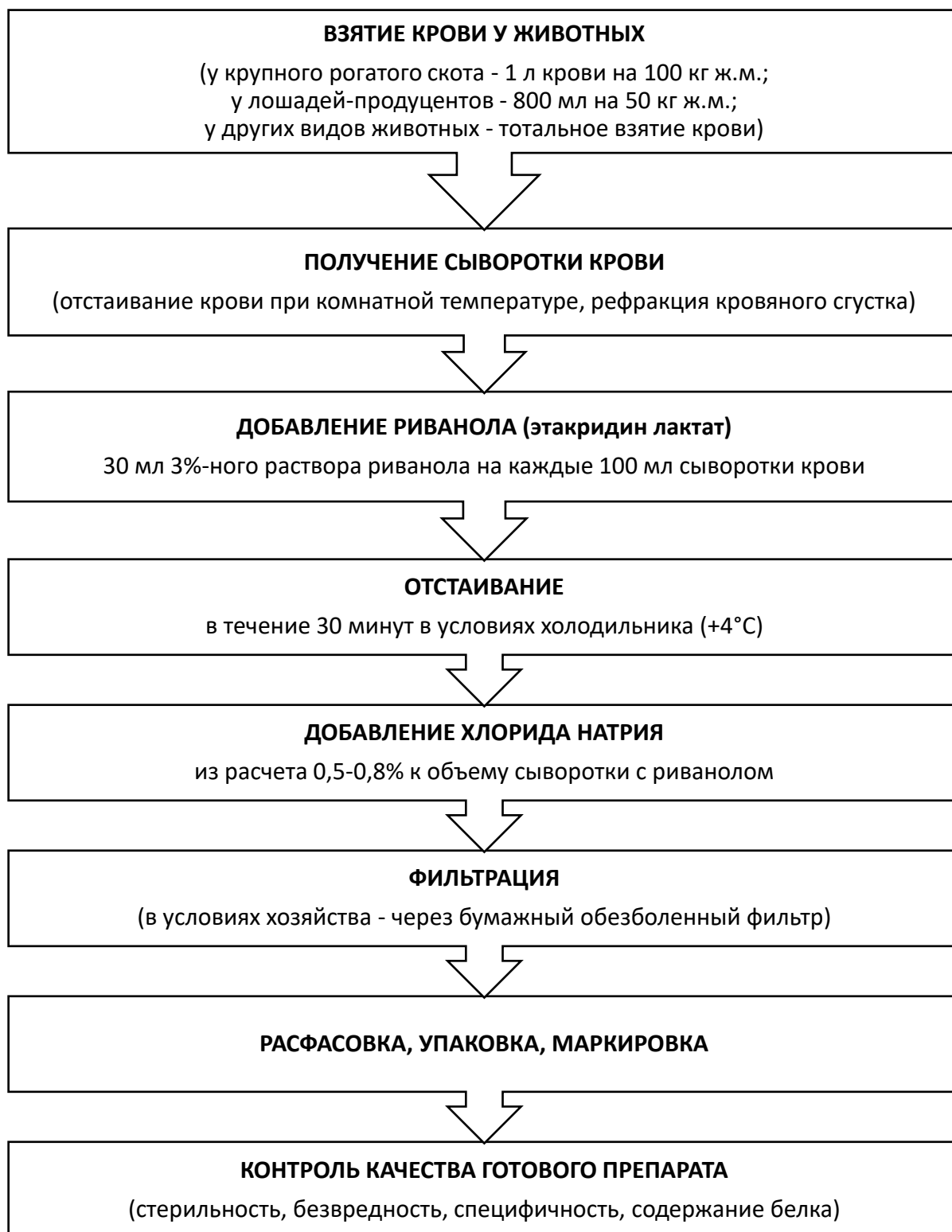


Рисунок 7.2 – Технология изготовления гамма-глобулина риваноловым методом

В 1960-1961 гг. была предложена модификация риванолового метода таким образом, в результате чего вместо активированного угля для освобождения сыворотки от риванола используется 0,85%-ный раствор хлорида натрия. Гамма-глобулин на последней стадии осаждается 96° спиртом с таким расчетом, чтобы конечная концентрация его в сыворотке составляла 25%.

Контрольные вопросы

1. Какие препараты относятся к гипериммунным сывороткам?
2. Какие виды гипериммунных сывороток и с какой целью выпускаются промышленностью?
3. Какие требования предъявляются к животным, используемым в качестве продуцентов в сывороточном производстве?
4. Что понимают под терминами «грундиниммунизация» и «гипериммунизация»?
5. Чем сыворотка крови отличается от плазмы?
6. Какие препараты относятся к иммуноглобулинам?
7. Какова роль глобулиновых препаратов в лечении инфекционных болезней животных?

Тема 8

МЕНЕДЖМЕНТ КАЧЕСТВА В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Цель занятия: ознакомиться с системой контроля качества в биотехнологическом производстве.

Время, отводимое на изучение темы: 2 часа.

Задание 1

Изучить гигиенические требования к персоналу биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP

Надлежащее производство лекарственных средств и биотехнологической продукции зависит от персонала. Поэтому на предприятии должно быть достаточное количество квалифицированного персонала для решения всех задач, относящихся к сфере ответственности производителя. Каждый сотрудник должен понимать индивидуальную ответственность, которая должна быть документально оформлена. Весь персонал должен знать принципы надлежащей производственной практики, касающиеся его деятельности, а также пройти первичное и последующее обучение в соответствии с его обязанностями, включая инструктаж по выполнению гигиенических требований.

На предприятии должны быть разработаны детальные программы по гигиене труда с учетом особенностей конкретного производства. Эти программы должны содержать процедуры, касающиеся здоровья, соблюдения гигиенических правил и требований к одежде персонала. Каждый сотрудник, обязанности которого предполагают пребывание в зонах производства и контроля, должен понимать и точно соблюдать эти процедуры. Руководство предприятия должно содействовать развитию программ по гигиене, которые следует обсуждать при обучении.

Лица, принимаемые на работу, должны пройти медицинский осмотр. Производитель обязан утвердить инструкции, обеспечивающие его осведомленность о состоянии здоровья персонала, которое может повлиять на качество продукции. После первичного медицинского осмотра должны проводиться регулярные последующие медицинские осмотры персонала.

Производитель должен принять меры, обеспечивающие недопущение лиц с инфекционными заболеваниями или открытыми повреждениями на открытых участках тела к производству лекарственных средств.

Лица, входящие в производственные зоны, должны носить защитную одежду, соответствующую выполняемым в этих зонах операциям.

В производственных и складских зонах запрещаются курение, прием пищи, питье, жевание, а также хранение пищевых продуктов, напитков, табачных изделий и личных лекарственных средств. Не допускаются любые действия, нарушающие гигиенические требования в производственных

помещениях (зонах) или других местах, которые могут оказать неблагоприятное влияние на качество продукции.

Необходимо избегать непосредственного контакта рук персонала с открытой продукцией, а также с любой частью оборудования, контактирующей с продукцией.

Персонал должен быть обучен правилам мытья рук.

Задание 2

Изучить требования к помещениям и оборудованию биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP

Помещения и оборудование следует располагать, проектировать, строить, оснащать и эксплуатировать таким образом, чтобы они соответствовали проводимым операциям. Их расположение и конструкция должны сводить к минимуму риск ошибок и обеспечивать возможность эффективной очистки и обслуживания в целях исключения перекрестной контаминации, накопления пыли или грязи и любых неблагоприятных факторов для качества продукции.

Функциональные зоны:

- производственная зона;
- складские зоны;
- зоны контроля качества;
- вспомогательные зоны.

Производственная среда помещений, учитывая все меры по защите производства, должна представлять минимальный риск контаминации материалов или продукции.

Следует проводить тщательное техническое обслуживание помещений, гарантируя, что ремонт и обслуживание не будут представлять никакой опасности для качества продукции. Помещения следует убирать и, где применимо, дезинфицировать в соответствии с подробными письменными инструкциями.

Освещение, температура, влажность и вентиляция должны быть соответствующими и не оказывать неблагоприятного воздействия (прямого или косвенного) ни на лекарственные средства во время их производства и хранения, ни на надлежащее функционирование оборудования.

Помещения должны быть спроектированы и оснащены таким образом, чтобы обеспечивать максимальную защиту от проникновения в них насекомых и животных.

Должны быть приняты меры, предотвращающие вход в помещения лиц, не имеющих права доступа в них. Зоны производства, хранения и контроля качества не должны использоваться как проходные для персонала, который в них не работает.

Задание 3

Изучить требования к документации биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP

Надлежащая документация составляет неотъемлемую часть системы обеспечения качества и является ключевым элементом работы в соответствии с правилами GMP.

В системе управления качеством производителя должны быть четко установлены различные виды используемой документации и носителей информации.

Документация может существовать в различных формах, в том числе на бумажном, электронном или фотографическом носителе.

Главной целью применяемой системы документации должно быть создание, управление, контроль и регистрация всей деятельности, которая может непосредственно или опосредованно влиять на все аспекты качества лекарственных средств и биотехнологической продукции.

В дополнение к надлежащему документальному оформлению различных процессов и оценки каких-либо наблюдений система управления качеством должна содержать достаточно подробные указания, которые способствуют общему пониманию требований таким образом, чтобы можно было продемонстрировать их постоянное соблюдение.

Существует 2 основных вида документации для выполнения требований правил GMP и регистрации их соблюдения:

1. Регламентирующие документы:

- *спецификации* – документы, содержащие подробные требования, которым должны соответствовать исходные и упаковочные материалы и продукция, использующиеся или получаемые при производстве (они являются основой для оценки качества продукции);
- *производственные рецептуры, технологические инструкции, инструкции по упаковке, методики испытаний* – документы, содержащие подробную информацию обо всех используемых исходных материалах, оборудовании и компьютеризированных системах (в этих документах должны содержаться все инструкции по осуществлению технологических процессов, упаковке, отбору проб и проведению испытаний; где применимо, следует указать все точки контроля в процессе производства, а также используемые процессно-аналитические технологии вместе с критериями приемлемости);
- *процедуры (стандартные операционные процедуры – СОП)* – документы, содержащие требования к выполнению определенных операций;
- *протоколы* – документы, содержащие требования к проведению и регистрации отдельных операций;

- *технические соглашения* – соглашения, заключенные между заказчиками и исполнителями относительно работ, которые выполняются сторонними организациями (аутсорсинг).

2. Регистрирующие документы:

- *записи* – свидетельства, подтверждающие выполнение различных действий для доказательства соответствия инструкциям (например, мероприятий, происшествий, расследований), для произведенных серий также содержат историю каждой серии продукции, включая информацию о ее реализации (записи содержат исходные данные, используемые для формирования других записей; записи, относящиеся к конкретной серии, могут быть собраны в досье на серию);
- *сертификаты анализа* – документы (паспорта, аналитические листки и др.), содержащие резюме результатов испытаний образцов продукции или материалов вместе с оценкой соответствия установленной спецификации;
- *отчеты* – документы, отражающие выполнение конкретных заданий, проектов или расследований вместе с результатами, выводами и рекомендациями.

Должен быть внедрен соответствующий контроль для обеспечения точности, целостности, доступности и четкости документов. Регламентирующие документы должны быть доступны в письменном виде и не должны содержать ошибок (понятие «в письменном виде» используется в значении «записанный или задокументированный на носителях информации, с которых данные могут быть получены в читаемой форме»).

Задание 4

Изучить требования к биотехнологическому производству в соответствии с правилами GMP

Технологические операции должны осуществляться по четко установленным процедурам, они должны отвечать требованиям правил GMP для получения продукции требуемого качества и соответствовать разрешению (лицензии) на производство и регистрационному досье.

Производственный процесс должен осуществляться и контролироваться квалифицированным персоналом.

Все действия, проводимые с материалами и продукцией (приемка и карантин, отбор проб, хранение, маркировка, выдача в производство, технологический процесс, упаковка и реализация), следует осуществлять согласно письменным процедурам или инструкциям и оформлять документально.

Все поступающие материалы должны быть проверены, чтобы гарантировать, что поставка соответствует заказу.

Тара должна быть очищена (при необходимости) и маркирована с указанием требуемой информации. Факты повреждения тары и упаковки и любые другие проблемы, которые могут неблагоприятно повлиять на качество

материалов, должны быть расследованы, оформлены документально, а информация о них должна быть доложена в подразделения контроля качества.

Поступающие материалы и произведенная готовая продукция должны немедленно помещаться в карантин, организованный по принципу раздельного хранения или за счет организационных мер, и содержаться в нем до получения разрешения на их использование или реализацию.

Приемку закупаемых промежуточной и нерасфасованной продукции проводят в соответствии с правилами, действующими для исходных материалов.

Все материалы и продукцию следует хранить в соответствующих условиях, установленных их производителем, в определенном порядке, обеспечивающем разделение по сериям и установленную очередность использования складских запасов.

Следует проводить проверки выходов и материального баланса, чтобы убедиться в отсутствии расхождений с допустимыми предельными значениями.

Не допускается одновременное или последовательное проведение операций с различными продуктами в одном и том же помещении, за исключением случаев, если не существует риска перепутывания или перекрестной контаминации.

Продукция и материалы должны быть защищены от микробной и другой контаминации на всех стадиях производства.

При работе с сухими материалами и продукцией необходимо принимать особые меры предосторожности по предотвращению образования и распространения пыли. Это особенно важно при работе с высоко активными и сенсibiliзирующими веществами.

В течение всего процесса производства все используемые материалы, тара для нерасфасованной продукции, основные единицы оборудования и, при необходимости, помещения должны быть маркированы этикетками или иным способом с указанием производимой продукции или обрабатываемых материалов, а также их дозировки (где применимо) и номера серии. Там, где это приемлемо, такая маркировка должна также указывать стадию технологического процесса.

Этикетки, прикрепленные к контейнерам, оборудованию или помещениям, должны быть четкими, однозначными, а также соответствовать установленной на предприятии форме. Рекомендуется в дополнение к информации на этикетках для указания статуса (например, «в карантине», «принято», «отклонено», «чистое» и др.) использовать цветовую маркировку.

Следует контролировать правильность соединения трубопроводов и других частей оборудования, применяемых для транспортировки продукции из одной зоны в другую.

Насколько это возможно, следует избегать любого отклонения от инструкций или процедур. Если происходит отклонение, оно должно быть письменно санкционировано лицом, имеющим соответствующие полномочия, с привлечением (при необходимости) подразделения контроля качества.

В производственные помещения может входить только персонал, имеющий право доступа в них.

Задание 5

Изучить требования к предотвращению перекрестной контаминации при производстве в соответствии с правилами GMP

Для оценки и контроля риска перекрестной контаминации производимой продукции должен быть использован процесс управления рисками для качества, включая оценку активности и токсикологическую оценку. Также следует принять во внимание такие факторы, как дизайн (проект) и использование помещений и оборудования, потоки персонала и материалов, микробиологический контроль, физико-химические характеристики активных веществ, параметры процесса, возможности процессов очистки и аналитические возможности в отношении соответствующих пределов, установленных исходя из оценки производимой продукции.

Результат процесса управления рисками для качества должен являться основанием для определения необходимости и уровня, до которого помещения и оборудование должны быть выделены для конкретного лекарственного средства или группы лекарственных средств. Уровень выделения может варьироваться от специально выделенных частей, контактирующих с продуктом, до выделения всего производства. Может быть приемлема локализация производственной деятельности в выделенных автономных производственных зонах на многоцелевом участке, где это оправдано.

Результаты процесса управления рисками для качества должны стать основой для определения уровня технических и организационных мер, необходимых для контроля рисков перекрестной контаминации.

Технические меры:

- выделенные производства (помещения и оборудование);
- автономные производственные площади, имеющие отдельное технологическое оборудование и отдельные системы вентиляции и кондиционирования воздуха (также может быть желательным изолировать определенные вспомогательные системы от тех, которые используются в других зонах);
- дизайн производственного процесса, помещений и оборудования, позволяющий свести к минимуму возможность перекрестной контаминации в процессе обработки, эксплуатации, технического обслуживания и очистки;
- использование «закрытых систем» для обработки и передачи материала (продукта) между оборудованием;
- использование систем с физическим барьером, в том числе изоляторов, как меры по локализации;
- контролируемое удаление пыли вблизи источника загрязнения, например через локальные вытяжные устройства;
- выделение технологического оборудования, частей, контактирующих с продуктом, или отдельных частей, которые труднее всего очищать (например, фильтры), инструментов для обслуживания;

- использование одноразовых технологий;
- использование оборудования, спроектированного с учетом облегчения очистки;
- надлежащее использование воздушных шлюзов и каскада давлений для локализации потенциального содержащегося в воздухе контаминанта в пределах определенной зоны;
- сведение к минимуму риска загрязнения, вызванного рециркуляцией или повторным использованием неочищенного или недостаточно очищенного воздуха;
- использование систем автоматической очистки на месте с валидированной результативностью;
- разделение зон мойки оборудования, сушки и хранения для общих зон очистки.

Организационные меры:

- выделение всего производства или автономных производственных площадей на основе кампаний (выделение с разделением во времени) с последующей очисткой с валидированной результативностью;
- хранение специальной защитной одежды внутри зон, где обрабатываются продукты с высоким риском перекрестной контаминации;
- верификация очистки после выпуска каждого продукта в целях поддержания эффективности подхода управления риском для качества в отношении продукции высокого риска;
- верификация очистки поверхностей, не контактирующих с продукцией, и мониторинг воздуха в производственной зоне и прилегающих зонах в зависимости от риска контаминации для подтверждения эффективности мер против контаминации взвешенными частицами или путем механического переноса;
- специальные меры по обращению с отходами, загрязненными промывными водами и загрязненной одеждой;
- регистрация случаев проливания и рассыпания, инцидентов или отклонений от процедур;
- разработка процессов очистки для помещений и оборудования таким образом, чтобы процессы очистки сами по себе не представляли риска перекрестной контаминации;
- разработка подробных форм для записей в процессе очистки для обеспечения выполнения очистки в соответствии с утвержденными процедурами и использование этикеток статуса очистки оборудования и производственных зон;
- использование общих зон очистки по принципу кампаний;
- надзор за поведением персонала для обеспечения уверенности в эффективности обучения и соответствия надлежащим мероприятиям процедурного контроля.

Мероприятия по предотвращению перекрестной контаминации и их эффективность следует периодически проверять в соответствии с установленными процедурами.

Задание 6

Изучить типовую модель управления рисками для качества биотехнологического производства

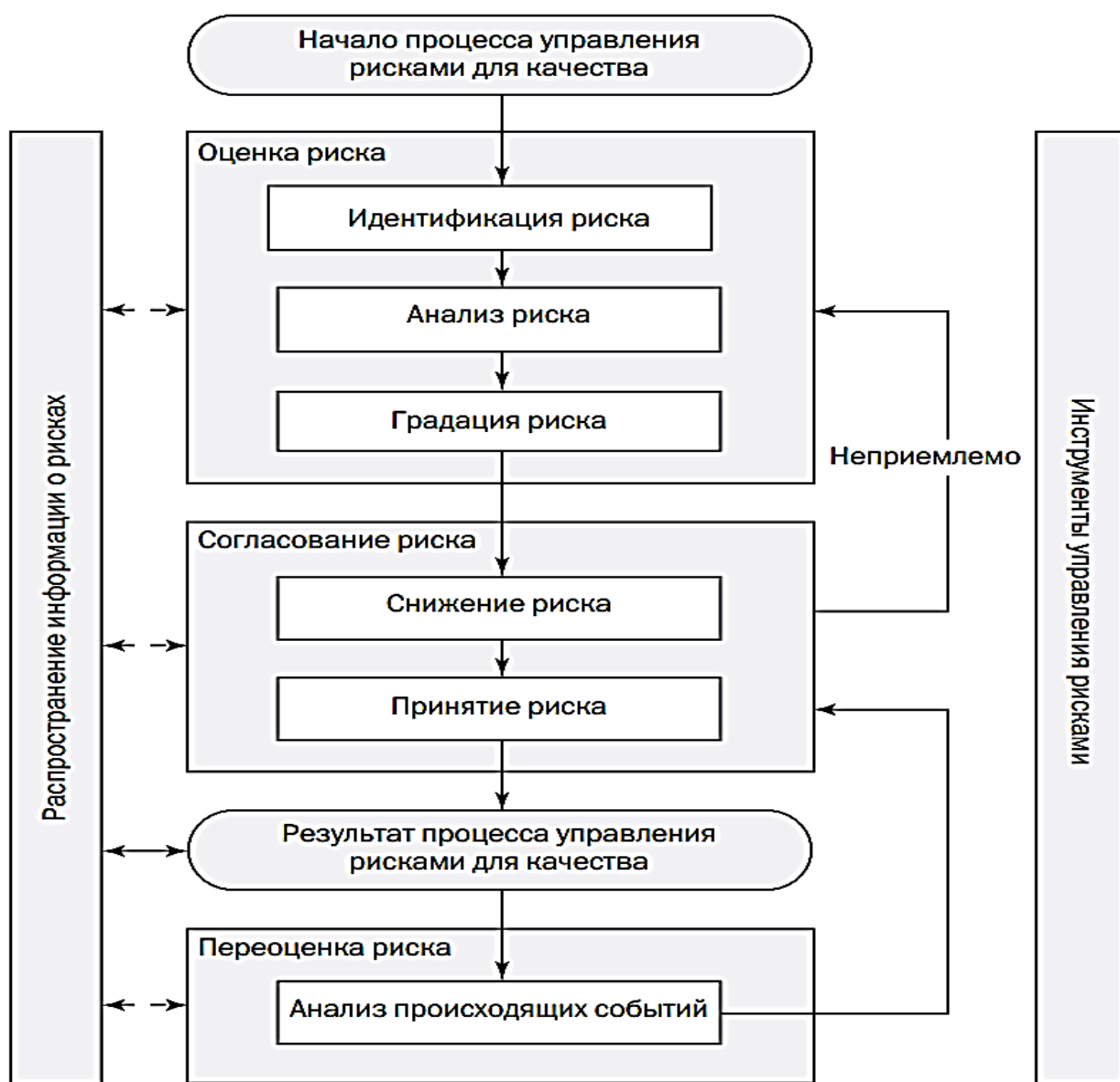


Рисунок 8.1 – Типовая модель управления рисками для качества
[<https://gmpnews.ru>]

Этапы, применяемые для **планирования** и **начала выполнения процесса управления рисками для качества**, могут включать:

- определение проблемного или представляющего риск вопроса, включая соответствующие предположения, устанавливающие возможность риска для качества;

- сбор исходной информации и данных о потенциальной опасности, вреде или влиянии на здоровье человека, имеющих отношение к общей оценке рисков;
- определение руководителя и необходимых ресурсов;
- создание графика, связывающего уровень принятия решения с возможностью осуществления процесса управления рисками для качества.

Общая оценка рисков состоит из идентификации опасностей, а также анализа и оценки рисков, связанных с воздействием этих опасностей.

Общую оценку рисков для качества начинают с четкого описания проблемы или аспекта риска. Если рассматриваемый риск для качества четко определен, будет легче установить соответствующий инструмент управления риском, а также виды информации относительно аспекта риска.

Для четкого определения рисков в целях общей оценки рисков, как правило, применяются 3 основных вопроса:

- что может происходить неверно;
- какова вероятность (возможность) того, что это будет происходить неверно;
- каковы последствия (их тяжесть).

Идентификация риска – систематическое использование информации для установления опасностей относительно аспекта риска или для описания проблемы.

Анализ риска – оценка риска, связанная с идентификацией опасностей (процесс установления качественной и количественной связи между вероятностью происшествий и тяжестью вреда).

Оценка риска – сравнение идентифицированного и проанализированного риска с установленными критериями приемлемости риска.

Результатом общей оценки рисков является либо количественная оценка рисков, либо качественное описание диапазона рисков.

Контроль рисков предполагает принятие решения по снижению или принятию рисков. Количество приложенных для контроля рисков усилий должно быть пропорционально важности рисков.

Контроль рисков должен сосредоточиться на следующих вопросах:

- превышает ли риск приемлемый уровень;
- что может быть сделано для снижения или устранения риска;
- каков приемлемый баланс между выгодой, рисками и ресурсами;
- возникают ли новые риски в результате проведения контроля установленных рисков.

Снижение рисков сосредоточено на процессах уменьшения или устранения рисков для качества при превышении установленного (приемлемого) уровня риска.

Принятие рисков – формальное решение принять окончательные риски или пассивное решение, если окончательные риски не установлены.

Информирование о рисках – передача информации относительно рисков и управления рисками лицам, ответственным за принятие решения, и другим заинтересованным лицам.

Обзор (мониторинг) рисков. Результаты процесса управления рисками следует пересматривать с учетом новых знаний и опыта. Частота любого обзора должна основываться на уровне рисков. Обзор рисков может включать пересмотр решения о принятии рисков.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под качеством биотехнологической продукции?
2. Какие составляющие включает в себя система управлением качества биотехнологического производства?
3. Какие основные требования предъявляются в соответствии с правилами GMP к биотехнологическому производству?
4. Каким образом должен быть организован контроль качества на биотехнологическом производстве?
5. Что понимают под рисками для качества?
6. В чем заключается управление рисками для качества?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси : монография / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов [и др.] ; под ред. Н. А. Ковалева. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 492 с.
2. Биотехнология. Ветеринарная иммунобиотехнология: учебно-методическое пособие для студентов по специальности «Ветеринарная фармация» / А. Г. Кошнеров, И. А. Красочко, Р. Б. Корочкин [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2023. – 92 с.
3. Ветеринарная биотехнология. Курс лекций : учебно-методическое пособие для студентов учреждений образования, обеспечивающих получение специального высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / И. А. Красочко, А. Г. Кошнеров, Р. Б. Корочкин [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Кафедра микробиологии и вирусологии. – Витебск : ВГАВМ, 2024. – 159 с.
4. Ветеринарная фармацевтическая биотехнология : учебно-методическое пособие для студентов по специальности «Ветеринарная фармация». Ч. 1. Промышленная организация биотехнологических процессов / А. А. Вербицкий, А. Г. Кошнеров, Р. Б. Корочкин, Е. Р. Велева. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 160 с.
5. Ветеринарная фармацевтическая биотехнология : учебно-методическое пособие для студентов по специальности «Ветеринарная фармация». Ч. 2. Промышленное получение целевых продуктов / А. А. Вербицкий, А. Г. Кошнеров, Ю. О. Асташенок, С. Н. Гвоздев. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 160 с.
6. Галиуллин, А. К. Ветеринарная биотехнология : учебное пособие / А. К. Галиуллин, Р. Я. Гильмутдинов, В. И. Плешакова. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2023. – 239 с.
7. Иммунохимические и молекулярно-генетические методы в биотехнологии и лабораторной практике : учебно-методическое пособие для студентов по специальностям «Ветеринарная медицина», «Ветеринарная фармация», магистрантов и аспирантов / А. А. Вербицкий, А. Г. Кошнеров, Р. Б. Корочкин [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 68 с.
8. Основы ветеринарной биотехнологии : учебно-методическое пособие для студентов по специальности «Ветеринарная медицина» / А. А. Вербицкий, И. А. Красочко, А. Г. Кошнеров [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 132 с.
9. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко, В. В. Максимович, В. А. Журба [и др.] ; под ред. П. А. Красочко. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с.

*При оформлении обложки использована иллюстрация с сайта
<https://www.nure.info>*

Учебное издание

Кошнеров Андрей Геннадьевич,
Красочко Ирина Александровна,
Кирпанёва Елена Анатольевна и др.

ВЕТЕРИНАРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск И. А. Красочко
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор Е. А. Капанова
Компьютерная верстка Е. А. Алисейко
Корректор Е. В. Морозова

Подписано в печать 14.05.2025. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография.

Усл. печ. л. 7,25. Уч.-изд. л. 5,61. Тираж 100 экз. Заказ 2561.

Издатель: учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.

Тел.: (0212) 48-17-82.

E-mail: rio@vsavm.by

<http://www.vsavm.by>