



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12499 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 1/00
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ АНТИГЕНІВ ІЗ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО ОПІКУ ПЛОДОВИХ

1

(21) u200507061

(22) 15.07.2005

(24) 15.02.2006

(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.

(72) Хом'як Мирослав Васильович, Голик Іван Васильович, Мельничук Ольга Мирославівна

(73) ПРИДНІСТРОВСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ САДІВНИЦТВА

(57) Спосіб виділення антигенів із збудника бактеріального опіку плодів, що включає застосуван-

2

ня фактора механічного розтирання бактерій та руйнування їх шляхом заморожування і розморожування, який **відрізняється** тим, що для руйнування фітопатогенних бактерій опіку плодів застосовують обидва вищезгадані фактори, якими діють на патоген по черзі в умовах фосфатного буфера рН 8,0, і одержаний при цьому екстракт антигенів очищають спочатку від важких домішок за допомогою центрифугування, а потім від низькомолекулярних речовин діалізом.

Корисна модель відноситься до області мікробіології, зокрема до виділення антигенів із збудника бактеріального опіку плодів *Erwinia amylovora* (Bun-ill) Winslow et al. і може бути використана для одержання імунної сироватки до цих антигенів та вивчення на цій основі імунологічних особливостей цього фітопатогена.

У науковій практиці антигени виділяють із бактеріальних клітин за допомогою фізичних, хімічних та біологічних методів [1]. Із них частіше використовують фізичні методи. Вони характеризуються тим, що бактерії спочатку руйнують, а потім екстрагують із них антигени з послідовною очисткою останніх фільтруванням та центрифугуванням.

За біологічними властивостями фітопатогенні бактерії роду *Erwinia* близькі до кишкових паличок *Escherichia coli* [2].

Найбільш близьким до нашої корисної моделі є також спосіб руйнування кишкових паличок *E. coli* і фракціювання їх вмісту [3]. Цей спосіб (прототип) характеризується тим, що дослідний зразок бактерій суспендують у буфері тріс-ЕДТА-сахарози рН 7,8 і руйнують їх клітини шляхом заморожування і розморожування з послідовним розведенням суспензії буфером тріс- $MgCl_2$ -дезоксирибонуклеази рН 7,8. При цьому незруйновані бактерії *E. coli* відділяють центрифугуванням при 5000g і знову використовують, а з одержаного супернатанту виділяють мембрани за допомогою центрифугування при 27000g протягом 20 хвилин.

Недоліком цього способу є те, що він досить трудомісткий та довготривалий, і не дозволяє ви-

ділити з бактерій *E. amylovora* повний комплекс антигенних біополімерів.

Мета - розробити спосіб виділення антигенів із збудника бактеріального опіку плодів.

Мета досягається тим, що антигени виділяють шляхом поєднання дій механічного руйнування бактерій з процесами заморожування і розморожування їх в умовах фосфатного буфера рН 8, і одержаний при цьому екстракт антигенів очищають спочатку від важких домішок за допомогою центрифугування, а потім - від низькомолекулярних речовин - діалізом.

Приклад

Бактерії *Erwinia amylovora* вирощують у пробірках на агаровому середовищі, яке готують з 20г пептону, 10мл гліцерину, 1,5г фосфату калію, 1,3г сульфату магнію і 30г агару в 1л дистильованої води шляхом нагрівання суміші до розплавлення агару. Розплавлений агар розливають у пробірки на 20мл по 5-8мл розчину в кожну і охолоджують його, формуючи скошену поверхню.

Вирощену на цьому середовищі однодобову культуру патогена змивають фосфатним буфером рН 8,0, який складається з 94,7мл 0,2М розчину натрію фосфорнокислого 1-заміщеного, 5,3мл 0,2М розчину натрію фосфорнокислого 2-заміщеного і 200мл дистильованої води. На кожну пробірку використовують 1,5-2мл буфера. Одержану суспензію бактерій доводять до концентрації 1,5-2 млрд. клітин в 1мл.

Для одержання розчину антигена використовують 8-10мл суспензії бактерій, яку поміщають у

(13) U
(11) 12499
(19) UA

фарфорову ступку, і додають до неї порошок скла у співвідношенні 5:1 за об'ємом. Фарфоровим товкачиком розтирають суспензію бактерій 4-5 хвилин і ставлять в морозильну камеру при температурі мінус 5-10°C на 1,5-2 години. Суспензію бактерій виймають з холодильника і розморожують при кімнатній температурі, а потім знову розтирають 4-5 хвилин. Процес розтирання бактерій з наступним заморожування і розморожування повторюють 4-5 разів, а потім гомогенат центрифугують при 5000g протягом 20 хвилин. Одержаний при цьому супернатант, який є розчином антигенів збудника опіку плодів, відокремлюють від осадку і зберігають у холодильнику в замороженому стані при мінус 5-8°C до початку досліджень.

Перед використанням розчин антигена розморожують і поміщають в мішечок з напівпроникної целофанової плівки, який ставлять на діаліз проти 1л фізрозчину на 2 години. В очищеному від низькомолекулярних речовин розчині вимірюють кон-

центрацію білка і використовують його як для імунізації тварин з метою одержання імунної сироватки, так і для імунологічних аналізів.

Запропонований нами спосіб розкриває широкі перспективи для вивчення імунологічних, біохімічних та інших особливостей збудника опіку плодів та розробки на цій основі заходів боротьби з ним.

Література:

1. Бочкарев М.В. и др. Справочник методов иммунологии. Кишинев, Штиинца, 1982. - С.42-46.
2. Сидоренко С.С, Захарова И.Я. Изучение антигенных свойств некоторых бактерий рода *Erwinia*. Бактериальные болезни растений и меры борьбы с ними. Труды первого Всесоюзного симпозиума по бактериальным болезням растений. К., Наукова думка, 1968. - С.76-81.
3. Герхард Ф. и др. Методы общей бактериологии. М., Мир, 1984. - С.138-148.