



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **76648**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/06 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 07871**

(22) Дата подання заявки: **26.06.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.01.2013**

(46) Публікація відомостей **10.01.2013, Бюл.№ 1**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Бакурова Олена Михайлівна (UA),
Мішин Владислав Васильович (UA),
Ананьєва Мая Миколаївна (UA),
Ананьєва Олександра Володимирівна
(UA),
Шипов Данило Олегович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.
ГОРЬКОГО,
пр. Ілліча, 16, м. Донецьк-3, 83003 (UA)**

(54) СПОСІБ РЕСУСПЕНДУВАННЯ КУЛЬТУР *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

(57) Реферат:

Спосіб ресуспендування культур *Escherichia coli* для біохімічних досліджень шляхом вирощування культури бактерій в живильному середовищі, виділення її центрифугуванням, промивання осаду двічі в 50 мМ калій-фосфатного буфера рН 7,0, ресуспендування клітин в 5 мл такого самого буфера. Додатково до клітинної суспензії додають меркаптоетанол, суміш витримують при температурі -5 °С 30 хвилин.

UA 76648 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини, а саме до біохімії, та може бути використана для руйнування культур *Escherichia coli* та дезінфекції біологічного матеріалу під час проведення біохімічних досліджень.

Відомо спосіб ресуспендування бактеріальних клітин [1], шляхом змін кислотності середовища.

Недоліком способу є вплив кислотності середовища на ферментативну активність та зміни активності ферментів, що відрізняються від її в нативних (не зруйнованих) клітинах. Отже існує вірогідність отримання недостовірної інформації під час проведення біохімічних досліджень. До того ж, оброблений таким способом бактеріальний матеріал не є цілковито знезараженим (дезінфікованим), отже, безпечним.

Найбільш близьким по технічній суті до способу, що заявляється, є спосіб ресуспендування культур *Escherichia coli*, що включає їх виділення центрифугуванням при 3000 g протягом 10 хвилин [2]. Осад бактерій промивають двічі 10 мл 50 mM калій-фосфатного буфера з pH 7,0. Ресуспендують клітини в 5 мл такого самого буфера заморожуванням протягом 15-20 годин при -5 °C з наступним розморожуванням, а також обробляють ультразвуком (з частотою 22 Гц) протягом 8-10 хвилин за допомогою дезінтегратора УЗДН -2Т при 4 °C. Одержану суспензію центрифугують 10 хвилин при 4000 g і температурі 4 °C (центрифуга з охолодженням). Отриманий супернатант зберігають на льоду і використовують для визначення активності ферментів протягом 6 годин.

Недоліком цього способу є те, що він потребує забагато часу для реалізації, а також додаткового дорогого обладнання - ультразвуковий дезінтегратор УЗДН-2Т, центрифуга з охолодженням. Це підвищує його вартість, тривалість термінів його реалізації. Такий спосіб забезпечує знезараження суспензії, проте також впливає на каталітичні властивості ферментів. Також його недоліком є обмеженість термінів придатності виготовленої суспензії для визначень ферментативної активності - 6 годин.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб ресуспендування бактеріальних клітин нижчої вартості, що реалізується за короткий термін, а виготовлена суспензія є придатною для визначення каталітичної активності ферментів при більш тривалому її зберіганні.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі ресуспендування культур *Escherichia coli* для біохімічних досліджень, згідно з корисною моделлю, додатково додають меркаптоетанол.

Новим в способі, що заявляється, є те, що під час ресуспендування культур *Escherichia coli* для руйнування бактеріальних клітин на кожний 1 мл бактеріальної суспензії додають мінімальну кількість - 0,0075 мл меркаптоетанолу. Виготовлену таким способом суміш витримують при температурі -5 °C 30 хвилин. Після цього досліджують ферментативну активність або зберігають для подальших досліджень протягом 7 діб.

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки встановленому авторами науковому факту, що додавання мінімальної кількості меркаптоетанолу (0,0075 мл), експозиція супернатанту протягом 30 хв при -5 °C та подальше зберігання не пригнічує каталітичної активності ферментів (на прикладі дослідження активності аденозиндезамінази та лактатдегідрогенази). Досягнення руйнування бактеріальних клітин та знезараження біоматеріалу контролюють відсутністю росту культур при контрольному висіванні вже після 30 хвилинної експозиції суспензії на холоді. Мінімальну кількість меркаптоетанолу та тривалість експозиції бактеріальної суспензії нами встановлено експериментально на 3-х паралельних серіях досліджень з музейним штамом *Escherichia coli* M-17. Кожна серія дослідів складалась з 5-х проб, в яких тривалість експозиції суспензії з меркаптоетанолом на холоді складала 0, 15, 30, 60 хв та добу. В кожній серії проб мікрооб'єм меркаптоетанолу відповідно був 0,005 мл, 0,0075 мл, 0,01 мл. Відсутність росту при контрольному висіванні відмічається в пробах, що містять мінімальний об'єм меркаптоетанолу 0,0075 мл, з тривалістю експозиції 30 хвилин. Меркаптоетанол є своєрідним консервантом, що може стабілізувати ферментативну активність. Його застосування збільшує придатність знезараженої суспензії для досліджень каталітичної активності ферментів з 6 годин до 7 діб за умов її зберігання при -5 °C.

Реалізують спосіб ресуспендування культур *Escherichia coli* таким чином. В підготовлене середовище інкубації, що складається з м'ясо-пептонного агару, pH 7,0 (виробництва ДП "ЕЗМП ІБОНХ НАНУ", м. Київ), роблять посів газоном [3]. Культури *Escherichia coli* вирощують при 37 °C протягом 16-18 годин в 5 мл живильного середовища. Клітини виділяють центрифугуванням при 3000g на центрифугі протягом 10 хв. Осад двічі промивають 10 мл 50 mM К-фосфатного буфера pH 7,0. Ресуспендують клітини в 5 мл такого самого буфера. Для руйнування культур *Escherichia coli* застосовують модифікацію метода, пропонуваного раніше [2]. Суть модифікації полягає в тому, що до суспензії бактерій автоматичним мікродозатором

перемінного об'єму додають меркаптоетанол в мінімальній кількості 0,0075 мл на кожен 1 мл суспензії, витримують при температурі -5 °С 30 хвилин. Отриманий супернатант зберігають на льоду і використовують для визначення активності ферментів протягом 7 діб.

Конкретні приклади реалізації способу, що заявляється.

5 Приклад 1. Ресуспендування 3-х культур *Escherichia coli* музейного штаму М-17 пропонуванім способом реалізовано для визначення впливу катіонів металів на активність аденозиндезамінази (АДА), лактатдегідрогенази (ЛДГ). На 3 живильні середовища зроблено посіви газом музейного штаму М-17. В контрольному - без додавання металів, в способі руйнування культур *Escherichia coli*, проведені біохімічні дослідження ферментативної активності на спектрофотометрі СФ-46 ("ЛОМО", Ленінград) традиційним способом. Живильне середовище без вмісту металів - АДА 22323,0 нмоль/мин, ЛДГ - 42,20 нмоль/мин; середовище з цинком - АДА 20630,0 нмоль/мин, ЛДГ - 108,5 нмоль/мин; середовище з кобальтом - АДА 13603,4 нмоль/мин, ЛДГ - 105,5 нмоль/мин.

15 Приклад 2. Після зберігання виготовлених супернатантів 3-х культур *Escherichia coli* музейного штаму М-17 протягом одного тижня для вивчення впливу катіонів металів на активність аденозиндезамінази (АДА) при їх тривалій дії, були знову проведені біохімічні дослідження її ферментативної активності на спектрофотометрі СФ-46. Живильне середовище без вмісту металів - активність АДА знизилась до 16835,0 нмоль/хв; середовище з цинком - активність ферменту знизилась до 10732,4 нмоль/хв; середовище з кобальтом - активність АДА зросла до 24067,6 нмоль/хв. Отже був встановлений протилежний вплив цих металів на активність АДА під час їх тривалої дії.

25 Приклад 3. Руйнування 3-х культур *Escherichia coli* дикого штаму пропонуванім способом реалізовано для визначення впливу катіонів металів на активність АДА, ЛДГ. На 3 живильні середовища зроблено посіви газом дикого штаму *Escherichia coli*. В контрольному - без додавання металів, в другому містився цинк, в іншому - кобальт. Після реалізації пропонуваного способу руйнування дикого штаму *Escherichia coli* проведені біохімічні дослідження ферментативної активності традиційним способом. Живильне середовище без вмісту металів - АДА 13522,9 нмоль/хв, ЛДГ - 1,95 нмоль/хв; середовище з цинком - АДА 14650,0 нмоль/хв, ЛДГ - 19,0 нмоль/хв; середовище з кобальтом - АДА 8189,4 нмоль/хв, ЛДГ - 6,61 нмоль/хв.

30 Приклад 4. Після зберігання супернатантів культур дикого штаму *Escherichia coli* протягом одного тижня для вивчення впливу катіонів металів на активність аденозиндезамінази (АДА) при їх тривалій дії, були знову проведені біохімічні дослідження її ферментативної активності на спектрофотометрі СФ-46: живильне середовище без вмісту металів - активність АДА дещо знизилась до 11110,0 нмоль/хв; середовище з цинком - активність ферменту знизилась до 12557,0 нмоль/хв; середовище з кобальтом - активність АДА зросла до 11465,1 нмоль/хв. Отже, як в культурах музейного штаму, так і в культурах дикого штаму *Escherichia coli* був встановлений протилежний вплив цих металів на активність АДА під час їх тривалої дії.

40 Перевагою способу, що заявляється, є те, що його реалізація не потребує додаткового обладнання (ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т, центрифуги з охолодженням) та площі для його розташування. Термін реалізації пропонуваного способу скорочується з 20 годин до однієї. Ресуспендування одночасно може бути проведено більше ніж в 10 культурах бактеріальних клітин. Виготовлений супернатант є придатним для біохімічних досліджень мінімум протягом 7 діб.

45 Лабораторні випробування способу, що заявляється, проведені в 32 випадках висівання газом та культивування культур *Escherichia coli* музейних та диких штамів з подальшим їх ресуспендуванням пропонуванім способом та дослідженням в супернатантах ферментативної активності.

50 Таким чином досягають нижчої вартості, реалізують руйнування та одночасну дезінфекцію біоматеріалу за 30 хвилин, при цьому загальний час ресуспендування складає 1 годину, подовжують терміни придатності суспензії для досліджень каталітичної активності ферментів до 7 діб. Все це робить перспективним вживання способу в експериментальній медицині для мікробіологічних та біохімічних досліджень.

Джерела інформації:

55 1. Скляр Т.В. Генерация протондвижущей силы ($\Delta\mu\text{H}^+$) в клетках *Neisseria gonorrhoeae* // Укр. біохім. журн.-2002. - Том 74, № 1. – С. 49-53.

2. Семчишин Г.М., Дільовий М.В., Клименко А.О., Луцак В.І. Вплив руйнування клітин *Escherichia coli* каталітичні властивості каталази // Укр. біохім. журн.-2001. - Том 73, № 1. – С. 24-28.

60 3. Ширококов В.П. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія. - Вінниця: Нова книга, 2011.-296 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб ресуспендування культур *Escherichia coli* для біохімічних досліджень шляхом вирощування культури бактерій в живильному середовищі, виділення її центрифугуванням, промивання осаду двічі в 50 мМ калій-фосфатного буфера рН 7,0, ресуспендування клітин в 5 мл такого самого буфера, який **відрізняється** тим, що додатково до клітинної суспензії додають меркаптоетанол, суміш витримують при температурі -5 °С 30 хвилин.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601