

- <https://e.lanbook.com/journal/issue/297923> (дата обращения: 28.03.2020). — Режим доступа: для авториз. пользователей. — С. 1.).
4. Гусейханов, М. К. Современные проблемы естественных наук : учебное пособие / М. К. Гусейханов, У. Г. Магомедова, Ф. М. Гусейханова. — 6-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — ISBN 978-5-8114-2523-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/103902> (дата обращения: 28.03.2020). — Режим доступа: для авториз. пользователей. — С. 200-201).
 5. (Получение трансгенных растений, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбини́на / Н.С. Захарченко, Е.В. Локтюшов, Е.Б. Рукавцова [и др.] // Известия ТулГУ. Естественные науки. — 2013. — № 3. — С. 287-296. — ISSN 2071-6176. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/294523> (дата обращения: 29.03.2020). — Режим доступа: для авториз. пользователей. — С. 2-5.).
 6. Попадьян, П.В. Наследование гена RS-AP и устойчивость к заболеваниям у трансгенных растений белокочанной капусты / П.В. Попадьян, В.Г. Лунин, Г.Ф. Монахос // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. — 2002. — № 2. — С. 98-110. — ISSN 0021-342X. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/295537> (дата обращения: 29.03.2020). — Режим доступа: для авториз. Пользователей. С. 3-6.

УДК 579.6

ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ШТАММА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО БЕЛОК-РЕЦЕПТОР К ПЛАЗМИНОГЕНУ ЧЕЛОВЕКА

Абилхадиров Арман Сабырович¹, Жантлеуова Айша Канатовна²
ah-s-ia@mail.ru

1 – Научный сотрудник Республиканской коллекции микроорганизмов, Нур-Султан, Казахстан; 2 – Магистрант Евразийского национального университета имени Л. Н. Гумилёва, Нур-Султан, Казахстан

Научные руководители – С. М. Шайхин, Т. Д. Укбаева

Введение. Пробиотические препараты на основе молочнокислых бактерий (МКБ) оказывают положительное влияние на организм человека и животных. Так, применение пробиотиков помогает восстановлению кишечной микрофлоры, снижает частоту аллергических реакций, а также риск образования рака толстого кишечника [1].

В настоящее время выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе полезных эффектов пробиотиков, является привлекательным полем деятельности в микробиологии кишечника. Среди различных факторов, ответственных за эти процессы, выделяют белки, секретируемые в окружающую среду пробиотическими бактериями. Внеклеточные белки (ВБ) активно транспортируются в бактериальное окружение через цитоплазматическую мембрану, и могут нековалентно связываться с бактериальной поверхностью. ВБ могут быть посредниками в определенных взаимодействиях, так как они напрямую взаимодействуют с эпителиальными и иммунными клетками [2].

Одним из таких белков является белок-рецептор к плазминогену (Plg-R) человека. Рецепция плазминогена (Plg) стала известна для патогенов более пятнадцати лет назад [3]. Иммунизация плазминогена на поверхности патогенных бактерий, создает условия для протеолитического перехода плазминогена в плазмин под действием активаторов организма хозяина [4]. Немногим позже было установлено, что ассоциация с Plg также возможна у безвредных комменсальных бактерий [5]. Причем биологические функции такого взаимодействия остаются в значительной степени неизвестными. Хотя некоторые штаммы

Lactobacillus и *Lactococcus* очень эффективны в повышении tPA -катализируемой активации плазминогена, тем не менее, активность плазмина в нейтральной среде низкая, так как он диссоциирует с поверхности МКБ [6]. Это позволяет предположить, что повышение активности плазмина с помощью лактобацилл остается локальным и может функционировать в случае ассоциации свободного плазмина с фибрином, например, при растворении сгустков фибрина или тромбов в ранах.

Применение штаммов *L. casei* при лечении мышей, страдающих от пневмококковой пневмонии, понижает фибриногеновые отложения в легких [7, 8]. В другой работе было показано, что *L. casei* способна снижать активность факторов про-коагуляции [9]. Эти немногочисленные работы показывают важность внеклеточных белков во взаимодействиях между МКБ и их хозяевами, а также демонстрируют новый вариант в механизмах взаимодействия бактерий с плазминогеном человека.

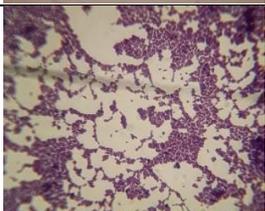
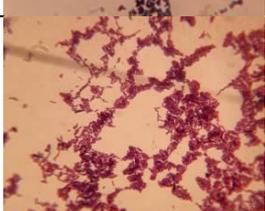
В связи с этим **целью данной работы** явилось выделение из традиционных казахских продуктов питания нового штамма молочнокислых бактерий, продуцирующего белок-рецептор к плазминогену человека, изучение пробиотических свойств штамма-продуцента и некоторых физико-химических свойств самого рецептора плазминогена.

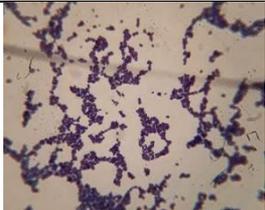
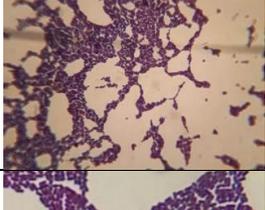
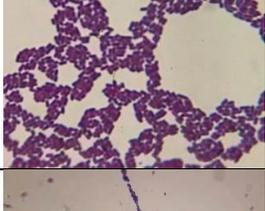
Материалы и методы исследования. Для получения чистых культур из жидких и полужидких гомогенных продуктов был использован метод десятичных разведений с последующим пересевом на твердую питательную среду (MRS, HiMedia) [10, 11]. Твердые продукты питания растирали ступкой до однородной кашеобразной массы, после чего также получали разведения и производили посев газонном на чашки. Чашки помещали в термостат на 2-е суток при 37 °С. Отбор и определение принадлежности выделенных изолятов к МКБ проводили окраской по Граму и микроскопии мазков [12]. Видовую принадлежность некоторых МКБ определяли с помощью предварительной видовой идентификации на основе сбраживания различных углеводов. Геномную ДНК из чистых культур МКБ выделяли методом K.Wilson. Для определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры: прямой 8F (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и обратный 806R (5' ggactaccagggtatctaat-3') [13]. Разделение фрагментов гена проводили с помощью автоматического генетического анализатора. Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с нуклеотидными последовательностями базы данных GeneBank [14].

Скрининг МКБ на плазминоген- связывающую активность проводили с помощью Вестерн - блот анализа, который включал электрофорез бесклеточных концентратов CFS с додецилсульфатом натрия (ДСН), электроперенос белков на мембраны PVDF (Immobilon-PSQ), и иммунозондирование. Для выявления антимикробной активности штаммов *Lactobacillus* была использована процедура отсроченного антагонизма Tagg et al с небольшими модификациями. Толерантность лактобацилл к стрессовым факторам в условиях симулированного желудочно-кишечного тракта была исследована в двухэтапном анализе в соответствии с работой Haller et al [15] с небольшими изменениями. Определение молекулярной массы белка-рецептора Plg проводили с помощью метода ПАА геле-электрофореза с ДСН по Лэмбли и построения графика зависимости десятичного логарифма молекулярной массы белков в дальтонах от относительного расстояния миграции (Rf) этих стандартных белков. Оценку изоэлектрической точки проводили с помощью FPLC анионообменивающей хроматографии на одной и той же колонке с Q- сефарозой и похожих условиях нанесения и элюции, поочередно БСА (1 мг) и препарата исследуемого рецептора Plg сравнивая профили двух белков:

Результаты исследования и их обсуждение. Из казахских традиционных продуктов питания домашнего производства было выделено 15 изолятов молочнокислых бактерий. Изучены основные культурально-морфологические свойства выделенных штаммов МКБ (таблица).

Таблица – Культурально-морфологические свойства изолятов МКБ

Рабочее название	Источник выделения	Микроскопия мазков	Культурально-морфологические признаки
1	2	3	4
Р 1	казы		Палочки, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1,5 мм.
Р 2	казы		Палочки, грамм+. Колонии молочного цвета, круглые, края ровные, блестящие, полупрозрачные, выпуклые, d=1-2 мм.
Р 3	казы		Палочки длин, грам +. Колонии круглые, молочно-белого цвета, непрозрачные, блестящие, выпуклые, края ровные, d=0,5-1,5 мм.
Р 4	балык (сазан)		Палочки, грам +. Колонии круглые, молочно-белого цвета, полупрозрачные, блестящие, выпуклые, края ровные, d=0,5-1 мм.
Р 5	балык (сазан)		Палочки тонкие, грамм +. Колонии круглые, молочно-белого цвета, полупрозрачные, блестящие, выпуклые, края ровные, d=0,5-1,5 мм
Р 6	балык (сазан)		Палочки классические, грамм +. Колонии круглые, молочно-белого цвета, полупрозрачные, матовые, выпуклые, края ровные, d=0,5-1 мм.
Р 7	кумыс		Кокковидные палочки, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1,5 мм.
Р 8	айран		Палочки длинные, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, полупрозрачные, выпуклые, d=1-2 мм.

Р 9	айран		Кокковидные палочки, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1 мм.
Р 10	сметана домашняя		Палочки короткие, грам +. Колонии круглые, молочно-белого цвета, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=1,5-3 мм.
Р 11	масло домашнее		Палочки классические, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1 мм.
Р 12	сметана домашняя		Кокковидные палочки, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1,5 мм.
Р 13	сметана домашняя		Палочки, грам+. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=1-2,5 мм.
Р 14	иримшик		Палочки короткие, грам +. Колонии белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1,5 мм.
Р 15	кумыс		Палочки, грам +. Колонии молочно-белого цвета, круглые, края ровные, блестящие, непрозрачные, выпуклые, d=0,5-1,5 мм.

В результате идентификации определено, что из 15 новых штаммов МКБ 11 штаммов являются лактобациллами, 2 – лактококками, 2 – педиококками. Получены фракции внеклеточных белков из 35 исследуемых штаммов, в том числе 15-ти изолированных из казахских традиционных продуктов питания и 20-ти коллекционных культур. Вестерн-блот анализ фракций внеклеточных белков показал 4 штамма с плазминоген-связывающей активностью и позволил выбрать новый штамм-продуцент белка-рецептора Plg *Lactobacillus plantarum* P11 из домашнего масла для дальнейшей работы (рисунок).

Изучены 3 пробиотических свойства штамма *Lactobacillus plantarum* P11: антимикробная активность, устойчивость к кислоте и устойчивость к желчи. Проведена очистка препарата белка-рецептора Plg из лизатов клеток *L. plantarum* P11, полученных после ультразвуковой гомогенизации и определены физико-химические свойства белка-

рецептора Plg: молекулярная масса, изоэлектрическая точка (pI) и субъединичная структура с помощью методов биохимии и молекулярной биологии. Сравнительный анализ результатов хроматографии FPLC на Q-сефарозе препарата белка-рецептора Plg и бычьего сывороточного альбумина (pI = 4.8) на основе проводимости элюатов двух белков позволил оценить pI белка-рецептора Plg, как ≤ 4.8 .

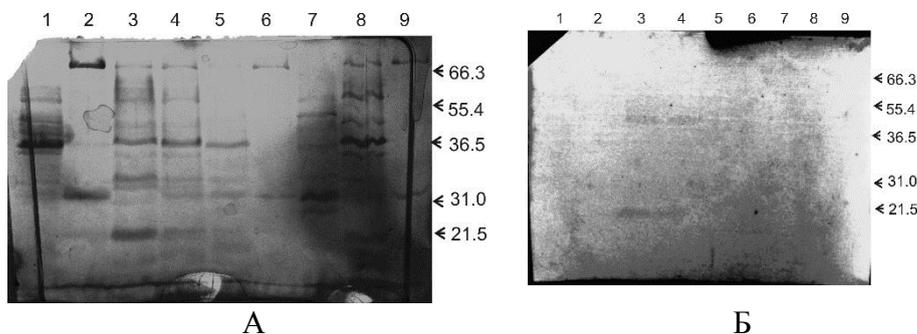


Рисунок – Результаты электрофореза (А) и скрининга на плазминоген связывающую активность (Б): 1 – *Lc. lactis* АМС-23 (0048); 2 – *Lc. lactis* 08ск-2 (0648); 3 – *L. plantarum* АТСС-8014 (0019); 4 – *Lactobacillus plantarum* P11; 5 – *Lactobacillus plantarum* 2 (0152); 6 – *Lactococcus lactis* АМ-2 (0150); 7 – *Lactobacillus plantarum* (0547); 8 – *Lactococcus lactis* L 6 (0358); 9 – *Lactococcus lactis* 026 ch (0573).

Результаты ДСН-ПАА гель- электрофореза и Вестерн- блот анализа указывают на то, что Plg-R с молекулярной массой 47 кДа и Plg образуют стабильный комплекс. Plg-R из *L. plantarum* P11 по физико-химическим свойствам имеет сходство с енолазой из *L. plantarum* LM3 [16].

Заключение. Таким образом, изучение нового штамма молочнокислых бактерий, продуцирующего белок-рецептор к плазминогену человека целесообразно проводить с привлечением микробиологических и молекулярно-генетических методов. Такой комплексный подход позволяет успешно идентифицировать штаммы по совокупности признаков на видовом уровне, провести скрининг на плазминоген- связывающую активность, протестировать пробиотические свойства штамма-продуцента и описать физико-химические свойства рецептора человеческого плазминоген. В дальнейшем возможно создание на основе нового штамма-продуцента белка-рецептора плазминогена человека *Lactobacillus plantarum* P11 эффективных биопрепаратов с направленным действием и новых продуктов, в качестве профилактических и терапевтических агентов для лечения заболеваний человека.

Список использованных источников

1. Ventura M. et al. Health benefits conferred by the human gut microbiota during infancy //Microbial biotechnology. – 2019. – Т. 12. – №. 2. – С. 243-248.
2. Sanchez B., Bressollier P., Urdaci M.C. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host //FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2008 – V. 54. – P.1–17.
3. Mölkänen T. et al. Enhanced activation of bound plasminogen on Staphylococcus aureus by staphylokinase //FEBS letters. – 2002. – Т. 517. – №. 1-3. – С. 72-78.
4. Lähteenmäki, K.; Edelman, S.; Korhonen, T.K. Bacterial Metastasis: The Host Plasminogen System in Bacterial Invasion //Trends Microbiol. – 2005. – V.13. – P. 79–85.
5. Hurmalainen V. et al. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen //Microbiology. – 2007. – Т. 153. – №. 4. – С. 1112-1122.
6. Antikainen J. et al. pH-dependent association of enolase and GAPDH of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids //Journal of Bacteriology. – 2007.- V.189. -

- P. 4539–4543.
7. Agüero G. et al. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* in malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation // *Nutrition*. – 2006. – Т. 22. – №. 7-8. – С. 810-819.
 8. Haro C. et al. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model // *Journal of Inflammation*. – 2009. – Т. 6. – №. 1. – С. 28.
 9. Bengmark, S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* - 2003. – V.17. – P. 833-848.
 10. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. - М.: МГУ. - 1995. - 186 с.
 11. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Академия. - 2005. – 119 с.
 12. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров Н.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.:Изографъ. - 2005. – 656 с.
 13. Clayton R. A. et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1995. – Т. 45. – №. 3. – С. 595-599.
 14. Clarridge J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clinical microbiology reviews*. – 2004. – Т. 17. – №. 4. – С. 840-862.
 15. Todorov S., Vaz-Velho M., Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2004. – Т. 35. – №. 1-2. – С. 157-160.
 16. Vastano V. et al. Identification of binding sites of *Lactobacillus plantarum* enolase involved in the interaction with human plasminogen // *Microbiological research*. – 2013. – Т. 168. – №. 2. – С. 65-72.

УДК 579.6

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОЛАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Абилхадиров Арман Сабырович¹, Исаева Динара Арстановна²
dinaro4ka1996@mail.ru

1 – Научный сотрудник Республиканской коллекции микроорганизмов, Нур-Султан, Казахстан; 2 – Магистрант Евразийского национального университета имени Л. Н. Гумилёва, Нур-Султан, Казахстан

Научные руководители – С. М. Шайхин, Т. Д. Укбаева

Аннотация. Лактобактерии, благодаря ряду свойств, которые принято относить к пробиотическим, поддерживают желудочно-кишечную экосистему в благоприятном состоянии. Препараты на основе пробиотических лактобактерий оказывают иммуномодулирующие и противоопухолевые действия, а также оказывают благоприятное воздействие на здоровье человека при различных заболеваниях, снижая содержание холестерина, частоту аллергических реакций, синтезируя витамины и другие биологически активные субстанции. Внеклеточные белки Msp1 и Msp2 обладают ферментативными активностями пептидогликановых гидролаз, которые необходимы в биосинтезе, распаде, модификации клеточной стенки. Белок Msp2 имеет особое значение поскольку были получены экспериментальные доказательства о том, что он трансактивирует передачу сигналов рецептору EGFR для ослабления апоптоза, вызванного цитокинами, и разрушения эпителиального барьера в клетках эпителия кишечника *in vitro* и у мышей [1].