



УДК 547.962.616.9—098

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА  
СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА ТИПА А*Езенчук Ю. В., Николаева И. С., Бугрова В. И.**Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи;  
Институт питания Академии медицинских наук СССР, Москва*

Предлагается метод выделения и очистки стафилококкового энтеротоксина типа А. Он включает концентрирование, диализ, осаждение двумя объемами этанола, гель-фильтрацию через биогель Р-60 и на последнем этапе — фильтрацию через сефадекс G-75 материала, предварительно обработанного 6 М мочевиной. Очистка энтеротоксина по предлагаемой схеме составляет  $> 99\%$  по показателям общего азота; энтеротоксическая активность препарата возрастает в 100 раз. Полученный индивидуальный компонент стафилококкового энтеротоксина типа А ( $M$  32 000) однороден по физико-химическим параметрам и антигенному составу. Определен аминокислотный состав энтеротоксина. Молекула энтеротоксина состоит из 254 аминокислотных остатков, N — концевая аминокислота — аланин.

Для выделения стафилококкового энтеротоксина типа А были использованы современные препаративные методы, в том числе ионообменная хроматография, гель-фильтрация и электрофорез в полиакриламидном геле [2, 3].

Шантц с соавт. [4] получили высокоочищенный энтеротоксин типа А, применив метод многостадийной очистки, при этом выход токсина не превышал 20% от исходного препарата энтеротоксина.

Отсутствие отечественных работ по стафилококковому энтеротоксину типа А поставило перед нами задачу разработать метод выделения этого токсина применительно к конкретным условиям и возможностям (питательная среда, культивирование и т. д.), а также попытаться найти более простые пути его очистки. Выделение и очистка стафилококковых энтеротоксинов, в том числе энтеротоксина типа А, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

На первом этапе выделения, как правило, возникает проблема концентрирования энтеротоксина, находящегося в культуральной жидкости. Некоторые авторы [2] использовали для этой цели полиэтиленгликоль; при этом происходило как концентрирование, так и очистка энтеротоксина от сопутствующих низкомолекулярных примесей. Однако необходимо отметить, что при использовании этого способа нельзя обрабатывать большие количества культурального материала, и поэтому в более поздних работах для концентрирования и удаления компонентов питательной среды использовали смолу Сg-50 [4].

В наших исследованиях эта задача решена путем лиофильного высушивания культуральной жидкости, последующего растворения ее в небольшом объеме дистиллированной воды и диализа против дистиллированной проточной воды. Изучение полноты диализа в зависимости от времени его

Показатели этапов очистки стафилококкового энтеротоксина типа А

Показатели очистки	Диализ		Осаждение 2 объемами этанола	Гель-фильтрация на биогеле Р-60 (1-я фракция)	Гель-фильтрация на сефадексе G-75 в 6 М мочеви- не (1-я фракция)
	до	после			
Общий азот, мг %	245	140	25,0	6,3	0,8
Очистка, %					
по отношению к предыдущему этапу	100	40	80	74	87
по отношению к исходному препарату			90	97	>99
Минимальная энтеротоксическая доза, мг азота/кг веса кошки	0,25	0,16	0,03	0,01	0,0025
Выход активного энтеротоксина, %					
по отношению к предыдущему этапу	100	90	95	75	50
по отношению к исходному материалу			84	70	33

проведения показало, что наиболее интенсивное удаление азотистых компонентов происходит в первые сутки; спустя 36—48 ч показатели общего азота в диализуемом материале стабилизируются. Приблизительно такую же тенденцию можно отметить и в отношении углеводов компонентов.

На основании полученных данных для дальнейшей работы было избрано время диализа исходного материала, равное 36 ч. Анализируя очистку энтеротоксина путем диализа, видим, что в результате диализа удалено до 40% балластных азотистых компонентов (табл. 1).

На следующих этапах выделения стафилококкового энтеротоксина типа А большинство исследователей применяли колоночное фракционирование. Мы же на втором этапе осаждали энтеротоксин этанолом в соотношении 2 : 1. Это соотношение было выбрано на основании соответствующей экспериментальной разработки [5], позволившей выявить оптимальные соотношения компонентов смеси.

Как следует из табл. 1, осаждение этанолом дало возможность очистить препарат энтеротоксина на 80% от азотистых компонентов по отношению к диализованному материалу и на 88—90% по отношению к исходному препарату. Препарат энтеротоксина, полученный путем осаждения этанолом, характеризовался минимальной энтеротоксической дозой, равной 0,03 мг азота на 1 кг веса кошки.

По данным электрофореза Тизелиуса, энтеротоксин, осажденный этанолом, делился на 3 фракции. Методом дискового электрофореза в препарате обнаружено 4 белковых компонента.

Неоднородность состава препарата токсина, выделенного с помощью этанола, вызывала необходимость его дальнейшей очистки. С этой целью была применена гель-фильтрация на колонке с биогелем Р-60.

Как видно на кривой распределения (рис. 1), материал, проходя через колонку, делился на 2 фракции. Обе фракции интенсивно поглощали при длине волны 280 нм. В 1-ю фракцию переходило до 25—31% белка. По биологической активности 1-я фракция отличалась минимальной энтеротоксической дозой 0,01 мг азота/кг веса от 2-й фракции — 0,15 мг азота/кг.

Таким образом, минимальная энтеротоксическая доза 2-й фракции в 15 раз превышала соответствующую дозу 1-й фракции. Полученные результаты позволили сделать вывод, что основная часть токсического вещества в результате фракционирования переходила в 1-ю фракцию, соответствующую на кривой распределения 1-му пику.

Как следует из табл. 1, с помощью гель-фильтрации на биогеле Р-60 токсин был очищен еще на 74% по отношению к препарату, осажденному этанолом. В итоге после стадии колочного фракционирования общая очистка токсина составляла 96—97% от всего первоначального количества азотистых компонентов в исходном материале. В результате после всех трех этапов очистки минимальная энтеротоксическая доза препарата уменьшилась в 25 раз.

Анализ материала 1-й фракции с помощью дискового электрофореза в полиакриламидном геле и электрофореза Тизеллуса показал, что изучаемый препарат однороден.

В диск-электрофорезе он давал одну белковую полосу, в аппарате Тизелиуса — один симметричный пик.

При ультрацентрифугировании материал 1-й фракции седиментировал одним равноплечным пиком (рис. 2), что также свидетельствовало об однородности его состава. В противоположность физико-химическим методам иммуно-химическое изучение 1-й фракции в реакции гель-диффузии с гомологичной анти-токсической сывороткой выявило в исследуемом препарате токсина 2—3 антигенных компонента (рис. 3).

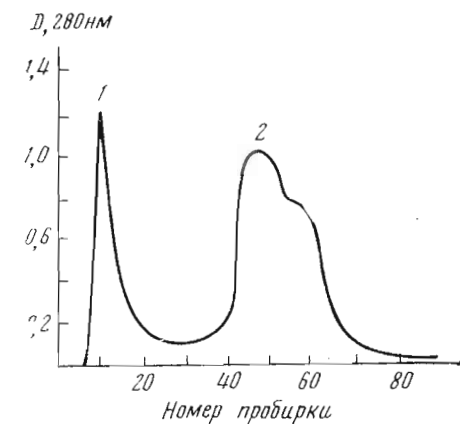


Рис. 1. Гель-хроматография энтеротоксина типа А на колонке с биогелем Р-60 (на колонку нанесено 20 мг белка): 1 и 2 — фракция содержит соответственно 6,3 (31%) и 8,64 мг белка (43%)

Таким образом, несмотря на гомогенность энтеротоксина по ряду физико-химических параметров, гель-фильтрация через биогель Р-60 не обеспечивает получение препарата, однородного по антигенным свойствам.

На следующем этапе очистки для разделения антигенных компонентов, входящих в состав 1-й фракции, была проведена обработка их 6 М мочевиной. Как видно на кривой распределения (рис. 4), материал 1-й фракции, подвергнутый воздействию мочевины, при прохождении через сефадекс G-75 делился с образованием двух пиков. После отделения мочевины на сефадексе G-25 было установлено, что энтеротоксической активностью обладала только фракция, соответствующая первому пику. По содержанию белка она составляла 20% от всего нанесенного на колонку материала. Вторая фракция (2-й пик), на долю которой приходилось 25—30% белка, энтеротоксической активностью не обладала.

Минимальная энтеротоксическая доза активной фракции составляла 0,0025 мг азота/кг веса кошки, что в 4 раза меньше, чем доза взятого для фракционирования материала. Методами дискового электрофореза и гель-диффузии с гомологичной антисывороткой (рис. 5) показано, что активная фракция представляет собой один компонент.

Итак, обработка мочевиной и гель-фильтрация через сефадекс G-75 позволяют освободить энтеротоксин от сопутствующих антигенов и получить его в виде индивидуального компонента.

После стадии фракционирования очистка энтеротоксина составляет > 99% с учетом удаления балластных азотистых компонентов. Минималь-

ная энтеротоксическая доза для кошек снижается с 0,25 мг азота до 0,0025 мг азота на кг веса животного. Выход активного материала при этом составляет 30—33% по отношению к активности исходного препарата токсина (табл. 1).

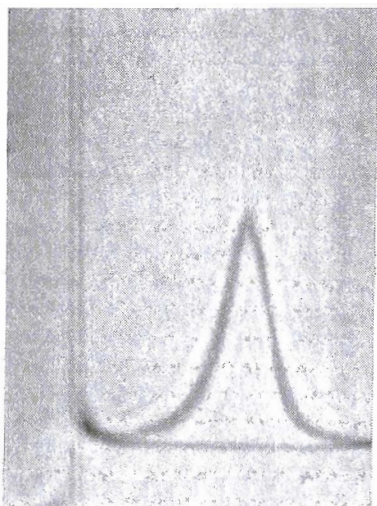


Рис. 2

Рис. 2. Аналитическое ультрацентрифугирование энтеротоксина типа А при 50 000 об/мин в течение 2 ч

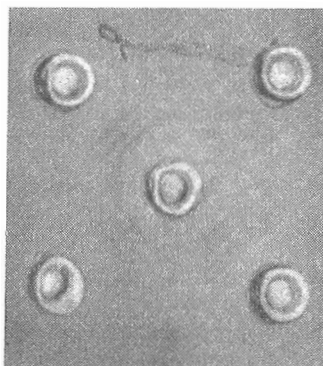


Рис. 3

Рис. 3. Исследование энтеротоксина типа А после гель-хроматографии на биогеле Р-60 в реакции двойной гель-диффузии (в центре — гомологичная антисыворотка, по периферии — препарат энтеротоксина)

Хорошее отделение энтеротоксина от сопутствующих антигенных компонентов после обработки 6 М мочевиной является, видимо, результатом расщепления комплекса, в котором токсин связан с нетоксическими примесями. Подобный эффект наблюдался и в отношении стафилококкового энтеротоксина типа Е, когда Борджиа с соавт. [6] с помощью 6 М мочевины удалось разрушить устойчивый антигенный комплекс и разделить входящие в него компоненты.

Сравнительная простота препаративных приемов в предлагаемой схеме выделения стафилококкового энтеротоксина типа А (см. схему) позволяет надеяться на возможность широкого применения ее в лабораторных условиях для получения значительных количеств этого препарата. Заслуживает внимания, с нашей точки зрения, и выход активного материала. Он составляет 30—33% от активности исходного материала, в то время как метод получения стафилококкового энтеротоксина типа А, разработанный Шантц с соавт. [4], обеспечивает выход токсина не более 20%.

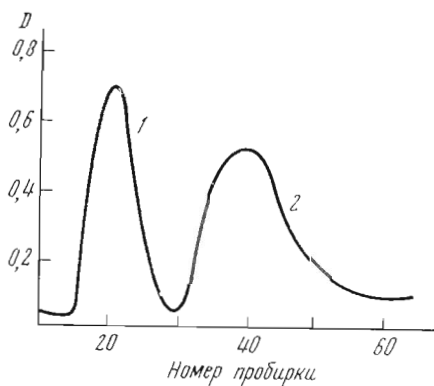
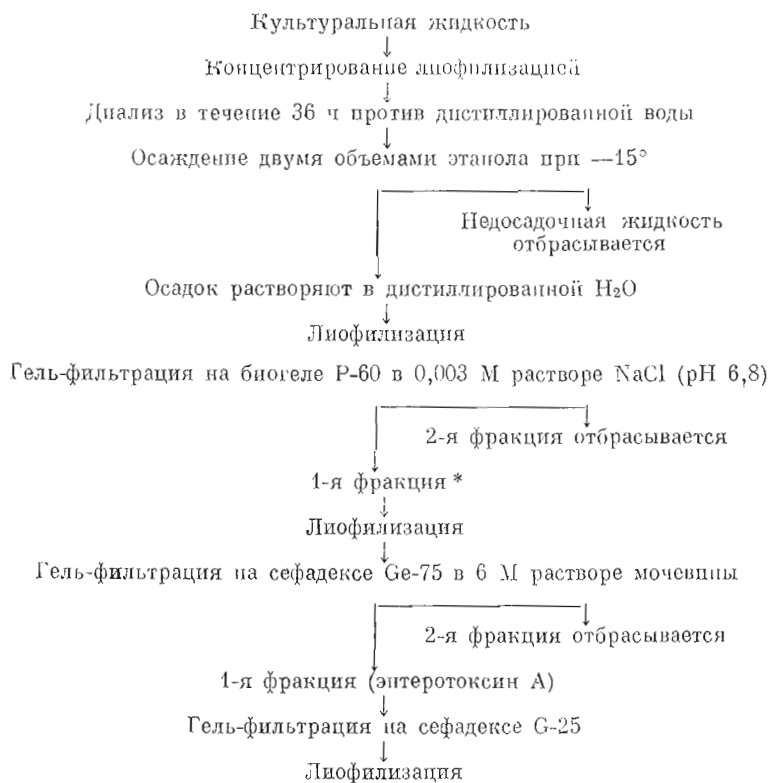


Рис. 4. Гель-хроматография энтеротоксина типа А на колонке с сефадексом G-75 в 6 М растворе мочевины: 1 и 2 — соответственно выход белка 20 и 25—30% от нанесенного

### Схема выделения стафилококкового энтеротоксина типа А



\* Фракция, обладающая энтеротоксической активностью.

Молекулярный вес выделенного препарата стафилококкового энтеротоксина типа А, определенный методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, был равен

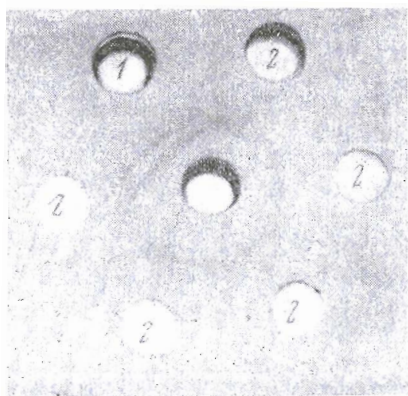


Рис. 5. Исследование энтеротоксина типа А в 6 М растворе мочевины в реакции двойной гель-диффузии: 1 — энтеротоксин типа А до обработки мочевиной; 2 — после гель-хроматографии на сефадексе G-75 в 6 М растворе мочевины; в центре — гомологичная антисыворотка, содержащая антитела к трем антигенным компонентам

32 000 (рис. 6). Эти данные лучше всего соотносятся с данными Бергдолл [17] и Чу с соавт. [2]. По данным Шантц с соавт. [4], молекулярный вес токسينа равен 28 000.

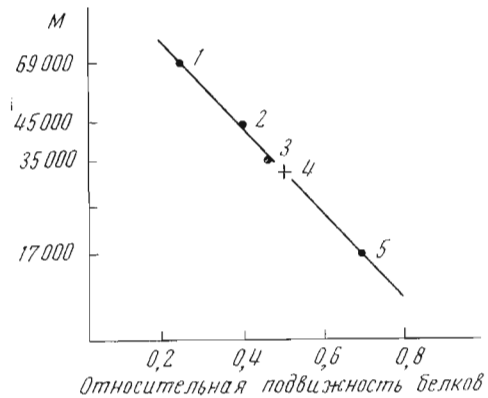
В результате аминокислотного анализа энтеротоксина типа А было идентифицировано 18 аминокислот, среди которых количественно преобладают аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты, глицин, валин,

Аминокислотный состав стафилококкового энтеротоксина типа А

Аминокислота	Количество остатков в расчете на $M$ 32 000	Аминокислота	Количество остатков в расчете на $M$ 32 000
Asp	32	Met]	8
Thr	16	Pe	26
Ser	14	Leu	16
Glu	19	Phe	15
Pro	5	His	3
Gly	20	Lys	26
Ala	6	Arg	4
Cys	2	Tyr	20
Val	20	Trp	2

изолейцин, лизин и тирозин (табл. 2). Количество аминокислотных остатков равно 254. В качестве N-концевой аминокислоты определен аланин. C-концевую аминокислоту методом отщепления карбоксипептидазой установить не удалось. Результаты аминокислотного состава полученного

Рис. 6. Зависимость относительной подвижности белков от молекулярного веса: 1 — бычий альбумин, 2 — яичный альбумин, 3 — лепсин, 4 — стафилококковый энтеротоксин типа А, 5 — миоглобин



препарата энтеротоксина совпадают по существу с результатами других исследователей. Как и в наших экспериментах, N-концевой аминокислотой в молекуле токсина является аланин [7].

Итак, анализ наших исследований и опубликованных данных убеждает в том, что разработанный метод выделения и очистки позволяет получать индивидуальный компонент стафилококкового энтеротоксина типа А.

### Экспериментальная часть

В качестве продуцента энтеротоксина типа А был использован штамм 100 *Staphylococcus aureus* из коллекции Байд — Паркера (Юбилейверская исследовательская лаборатория, Бедфорд, Англия). Культивирование проводили в течение 48 ч при 37° на среде, содержащей солянокислый гидролизат казеина и такие аминокислоты, как L-цистин и L-триптофан [8]. Аминый азот среды составлял 150—160 мг%. После выращивания микробные клетки отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 6000 об/мин.

Безмикробную культуральную жидкость, содержащую энтеротоксин, концентрировали лиофилизацией. Из 1 л жидкости получали 25—30 г сухого материала. Порошок растворяли в 30 мл дистиллированной воды, помещали в целлофановую мембрану и диализовали против проточной



дистиллированной воды в течение 36 ч. Объем жидкости после диализа составлял 120—150 мл. Содержание общего азота в жидкости определяли микрометодом с реактивом Несслера [9], содержание углеводов — методом Грогера [10].

Биологическую активность на этой стадии очистки, как и на последующих, исследовали на кошках весом 3,0—3,5 кг. Энтеротоксин вводили внутривенно в объеме 0,5 мл. За реакцией животных наблюдали в течение 5 ч. Рвота считалась положительной реакцией, жидкий стул — сомнительной, отсутствие вышеуказанных симптомов — отрицательной. Энтеротоксическую активность характеризовали минимальной энтеротоксической дозой (МЭД), представляющей собой минимальное количество материала (по общему азоту), вызывающее у животных вышеуказанные симптомы.

Из диализованного материала энтеротоксин осаждали этанолом, охлажденным до  $-15^{\circ}$ , концентрацию которого в смеси доводили до 66,6% (или два объема этанола к одному объему диализованного материала). Образовавшийся осадок тотчас отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин при  $-10^{\circ}$ . Осадок растворяли в 10 мл дистиллированной воды. В полученном материале определяли содержание общего азота и энтеротоксическую активность по методикам, указанным выше. Кроме того, препарат энтеротоксина анализировали методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле и методом электрофореза в аппарате Тизелиуса. Электрофорез в аппарате Тизелиуса проводили с помощью прибора «Электрофорез 35» в системе веронал-мединалового буфера (рН 8,4) в течение 1,5 ч. Концентрация препарата, взятого для электрофореза, составляла 1,0—1,2% белка. Дисковый форез проводили по методу Рейсфельд с соавт. [11], используя  $\beta$ -аланиновый буфер (рН, 4,3). Количество белка, взятого для анализа, составляло 200 мкг на трубочку. Окрашивание проводили кумаси голубым.

На следующей стадии очистки препарат энтеротоксина, осажденного этанолом, подвергали гель-хроматографии на колонке с биогелем Р-60 (использовали биогель фирмы «Bio-Rad», США). Размер колонки  $1,5 \times 95$  см; элюент — 0,003 М NaCl (рН 8,6). На колонку наносили 20—25 мг белка. Фракции отбирали на автоматическом коллекторе фирмы «ЛКВ» (Швеция) в объеме 2,5—3,0 мл. Фракции, соответствующие пикам на кривой распределения, характеризовали по содержанию общего азота, белка и изучали на энтеротоксическую активность в опытах на кошках. Однородность токсинсодержащей фракции исследовали методами дискового электрофореза, электрофореза в аппарате Тизелиуса и ультрацентрифугирования. Ультрацентрифугирование проводили в центрифуге MOM-3170 (Венгрия) методом подвижной границы при 50 000 об/мин в течение 2 ч при температуре  $+20^{\circ}$  в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0). Концентрация белка — 0,7%.

Иммуно-химическое изучение токсинсодержащей фракции проводили методом гель-диффузии по Оухтерлони [12]. В качестве источника антител использовали гомологичную кроличью антисыворотку. На следующем этапе очистки для разделения антигенных компонентов, входящих в состав токсинсодержащей фракции, указанный материал обрабатывали 6 М мочевиной. Материал выдерживали в растворе 6 М мочевины в течение 45 ч при  $+4^{\circ}$ . Фракционирование проводили на колонке с сефадексом G-75 в том же растворе мочевины. Размер колонки  $1,2 \times 9,5$  см. На колонку наносили 15—20 мг белка. Фракции отбирали в объеме 2,5—3,0 мл. Для удаления мочевины фракции, соответствующие пикам, пропускали через колонку с сефадексом G-25, после чего каждую фракцию лиофилизировали. Материал испытывали на животных, а также изучали на однородность с помощью метода дискового электрофореза и реакции двойной гель-диффузии, как это описывалось выше.

Молекулярный вес энтеротоксина типа А определяли при помощи дискового электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил-

сульфата натрия [13]. В качестве маркеров использовали бычий альбумин, яичный альбумин, пепсин, миоглобин.

Аминокислотный состав индивидуального компонента стафилококкового энтеротоксина типа А изучали в аминокислотном анализаторе фирмы «Bio-Cal» BC-201 [14].

N-концевую аминокислоту определяли методом дансильирования [15], C-концевую аминокислоту — методом отщепления при помощи карбокси-пептидазы. (Общий аминокислотный анализ и анализ концевых аминокислот был проведен в Институте биоорганической химии им. Шемякина М. М.)

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Friedman M. E. (1971) *J. Bacteriol.*, **106**, 289—291.
2. Chu F. S., Thadhani K., Schantz E. P., Bergdoll M. S. (1966) *Biochemistry*, **5**, 3281—3288.
3. Denny C. B., Tan P. L., Bohrer C. B. (1966) *J. Envir. Health*, **29**, 222—230.
4. Schantz E. J., Roessler W. G., Wagman J., Spero L., Dunnery D. A., Bergdoll M. S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 360—365.
5. Николаева И. С., Езепчук Ю. В., Бугрова В. И. (1973) *Журнал микробиол., эпидемпол. и иммунологии*, **1**, 134.
6. Borja C. B., Fanning E., I — Jin Huang and Bergdoll M. S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2456—2463.
7. Bergdoll M. S. (1972) *Clin. Toxic.*, **5**, 441—445.
8. Casman E. P. (1958) *Public. Health Rep.*, **73**, 599—603.
9. Грищенко Е. Д. (1962) *Лабораторное дело*, **1**, 36—40.
10. Groger W. K. L. (1964) *Clin. Chimic. Acta*, **6**, 866—873.
11. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. S. (1962) *Nature*, **195**, 281—283.
12. Ouchterlony O. (1950) *Acta med. Scand.*, **138**, 76—79.
13. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2456—2460.
14. Speakman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) *Analyt. Chem.*, **30**, 1190.
15. Gray W. R. (1968) in *Methods in Enzymology*, Acad. Press. N.Y., **11**, 139.

Поступила в редакцию  
25.VI.1974

#### ISOLATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A IN INDIVIDUAL STATE

EZEPCHUK Yu. V., NIKOLAEVA I. S., BUGROVA V. I.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,  
and Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

Enterotoxin A purification was accomplished by the following steps: (1) concentration of supernatant and dialysis against distilled water; (2) precipitation with ethanol; (3-5) gel filtration through Biogel P-60, Sephadex G-75 (in 6M urea), and Sephadex G-25. Total nitrogen tests indicated a toxin purity of better than 99%. The overall yield of purified toxin usually amounted 30-33% per cent on the original culture. Disc-electrophoresis in polyacrylamide gel and Ouchterlony test showed one component. The enterotoxin has a molecular weight of 32000 as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Alanine was identified as the N-terminal residue, but no free C-terminal residue was found. The minimum enterotoxin dose upon intravenous treatment to produce emesis and diarrhea in cats is 0.0025 mg N/kg.