

© Ю.Б. Иванов, А.С. Васильченко, 2015

УДК 579.62

Ю.Б. Иванов, А.С. Васильченко

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Разработка методов выделения катионных тромбоцитарных белков, конструирование люминесцирующих штаммов бактерий для тестирования активности тромбодифензинов.

Материалы и методы. Выделение тромбоцитарной массы, очистка тромбодифензинов методом ТФЭ, Создание генетической конструкции, эффективно экспрессирующей гены люциферазы (*luxAB*) природных люминесцирующих грамотрицательных микроорганизмов в клетках грамположительных бактерий. Использование атомно-силовой микроскопии (АСМ) для оценки морфо-функциональной реакции бактериальных клеток на воздействие тромбодифензинов.

Результаты. Разработана технология выделения, очистки и тестирования активности тромбодифензинов в биологических жидкостях и предложена панель репортерных штаммов для их определения. Дана оценка возможности их использования для исследования бактерицидной активности сыворотки крови в сравнении с традиционным методом оценки присутствия тромбодифензинов в данной биологической жидкости. Впервые методом АСМ проведен анализ эффектов тромбодифензинов человека в отношении морфо-функциональных характеристик модельных микроорганизмов.

Заключение. Полученный результат явился обоснованием для использования рекомбинантных люминесцирующих штаммов *Escheichia coli*, позволяющих специфично проводить количественное определение активности катионных антимикробных пептидов в биологических жидкостях сложного компонентного состава.

Ключевые слова: тромбодифензины, выделение, тестирование, биологическая активность.

I.B. Ivanov, A.S. Vasilchenko

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR MANAGEMENT OF NOVEL TEST-SYSTEMS ON THE BASE OF THROMBODEFENSINS FOR EXPRESS-DIAGNOSTIC INFECTIOUS DISEASES

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. The goal of a project is separation of the model platelet protein mixture on prepared monolithic ultrashort columns in comparison with reversed phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) and characteristic of the molecular and cellular mechanisms of the natural (innate) immunity, based on an assessment of the response of a bioluminescent bacterial test systems with constitutive or inducible light emission.

Materials and methods. Separation of light molecular weight PHP from the high molecular weight proteins by solid phase extraction procedure on different types of sorbents (normal phase, reversed phase, weak cation-exchangers, short monolithic columns), as well as in micro-preparative mode was studied.

Results. Ultracentrifuge and dialysis procedure for the preliminary isolation of PHP from the human platelets was developed. A genetic construction that effectively expressed the luciferase

genes (luxAB) of natural luminescent gram-negative microorganisms in gram-positive bacteria cells is created. Some action of thrombodefensins on morphological and mechanical properties of *Escheichia coli* cells were revealed by atomic force microscopy.

Conclusion. The results obtained were the experimental basis for the development of original bioluminescent technology assessment humoral bactericidal systems in the system of non-specific innate immune of humans and animals, which was based on the original panel of luminescent strains, which structural features of the surface structures allow to evaluate the consistency of molecular system.

Key words: thrombodefensins, isolation, testing, biological activity.