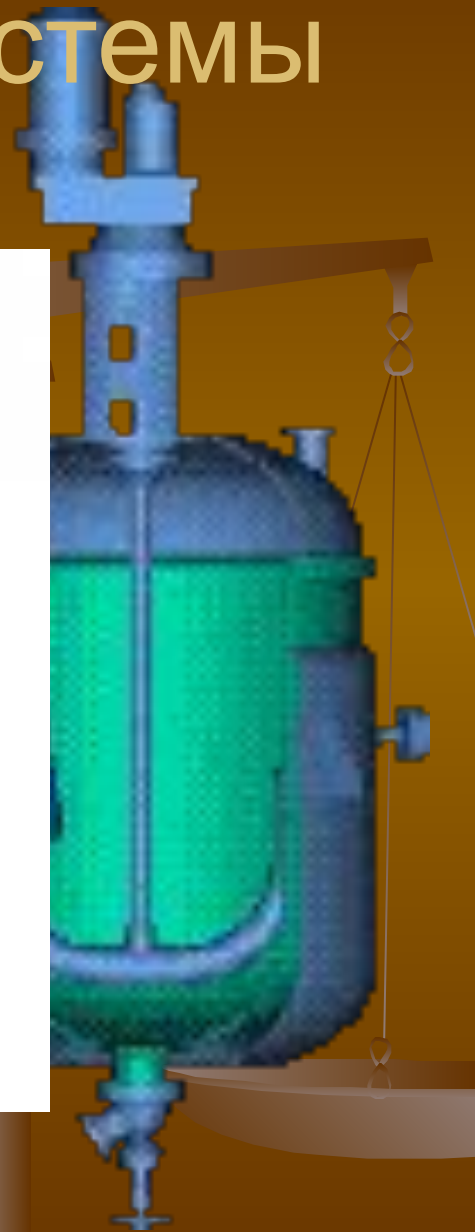


КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ В БИОТЕХНОЛОГИИ



«... Наука начинается, когда начинают измерять ...» Д.И.
Менделеев

Биотехнологические системы



ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ШТАММЫ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)



ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ШТАММЫ

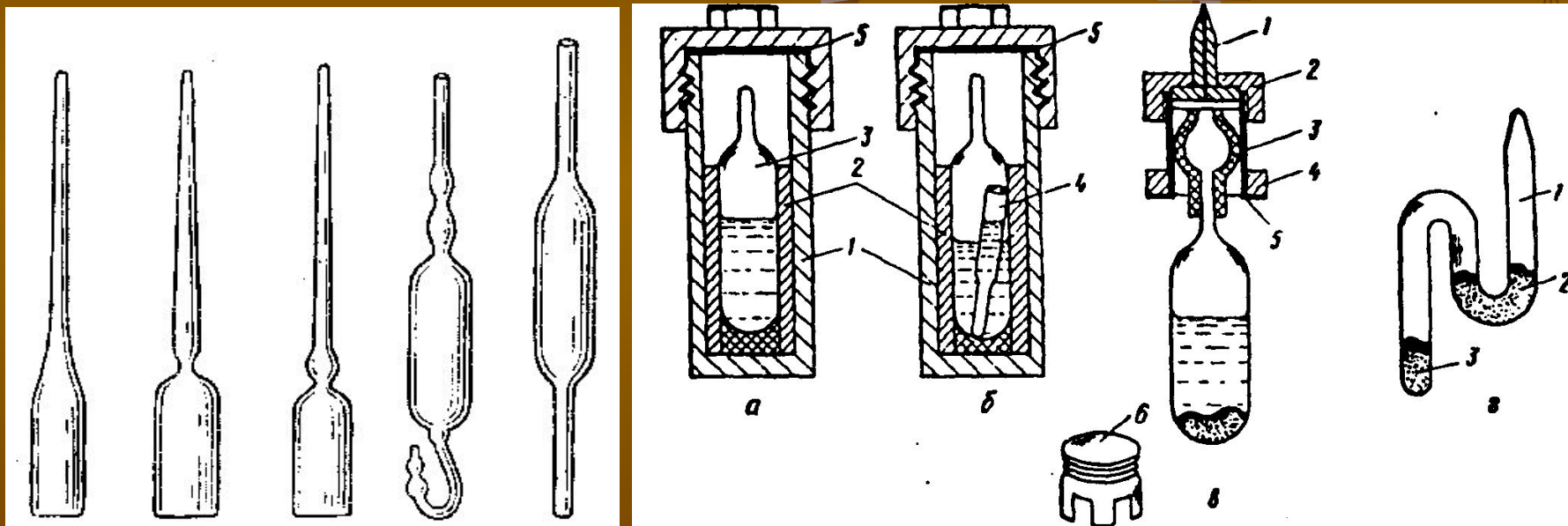
Хранение штаммов во флаконах
и ампулах



© ООО «Ветасек», 2011



КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ



Эталонные, или референтные, штаммы хранятся и поддерживаются на заданном уровне во ВГНКИ ветеринарных препаратов. Эти штаммы, в свою очередь, являются производственными, поскольку на их основе готовят вакцины и диагностикумы.

1



КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ

4 мл

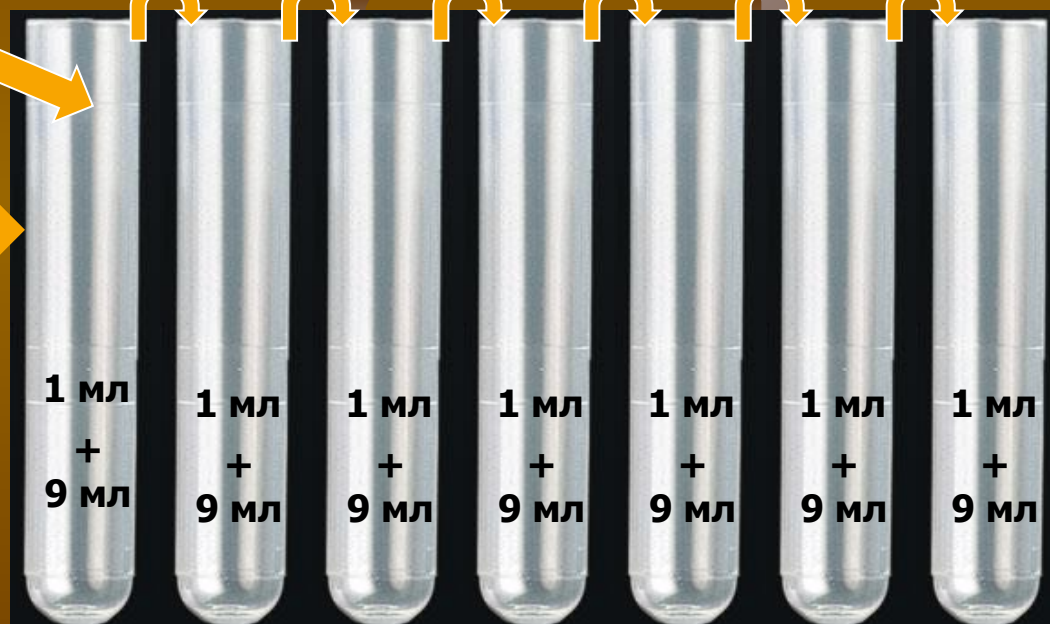
9 мл

1 мл



Фотометрия

1:10 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7}

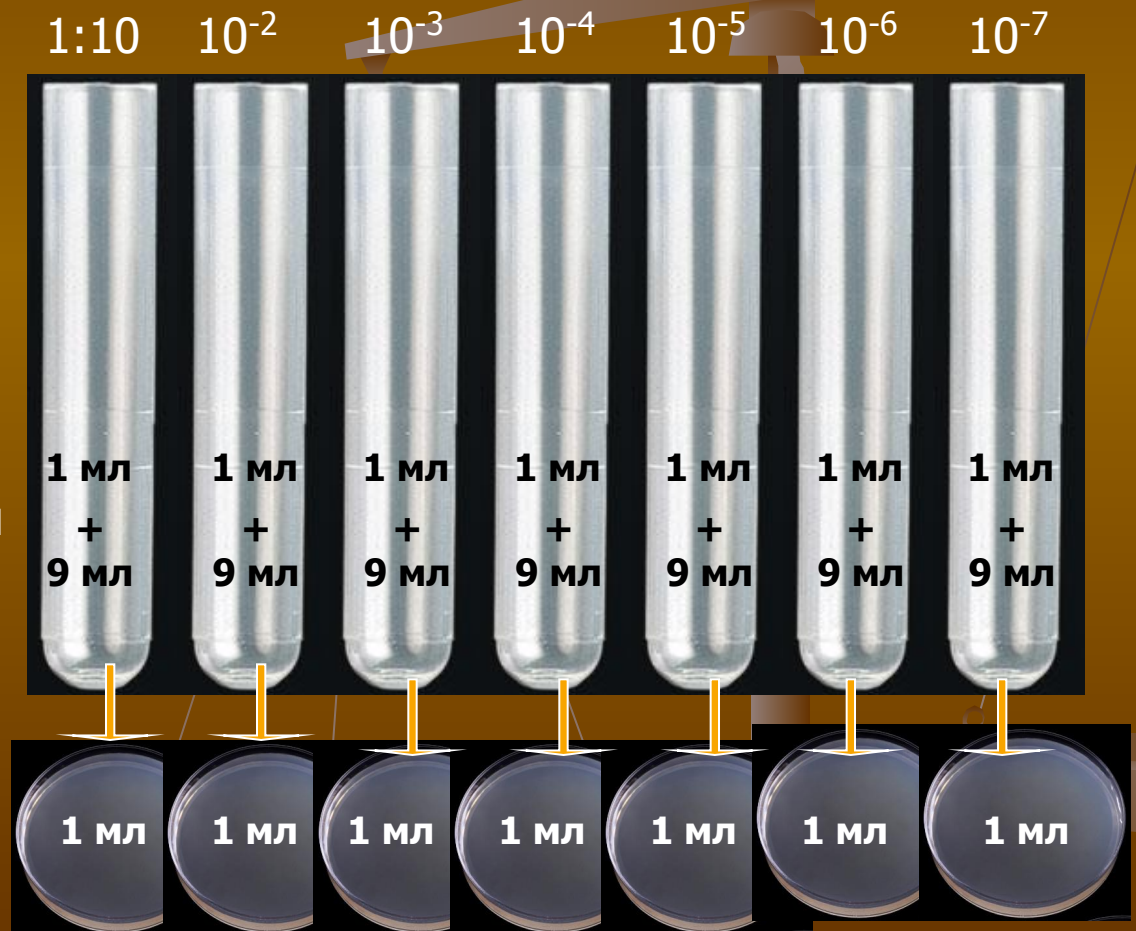


Обычно штаммы сушат в ампулах по 4 мл. При получении из ВГНКИ ампулу вскрываем и содержимое фотометрируем для контроля гомогенности взвеси и определения концентрации бактерий. Делаем 10^x серийные разведения для биологического контроля.

КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ

2

1. Из каждого разведения сеем по 1 мл на чашки Петри с плотной рекомендованной ВГНКИ средой;
2. Инкубируем посеы при 40°C – 24 часа;
3. Подсчитываем количество колоний бактерий.

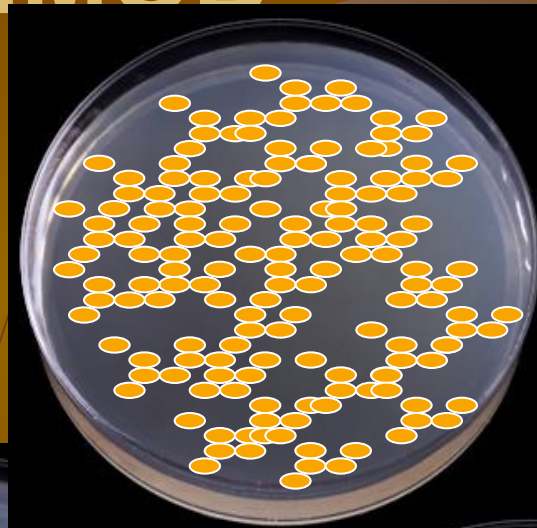


КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ

3

1. Подсчитываем количество колоний бактерии в тех чашках, где это можно сделать;
2. Умножаем полученное количество на первичное разведение культуры;
3. Получаем концентрацию штамма в КОЕ/мл.

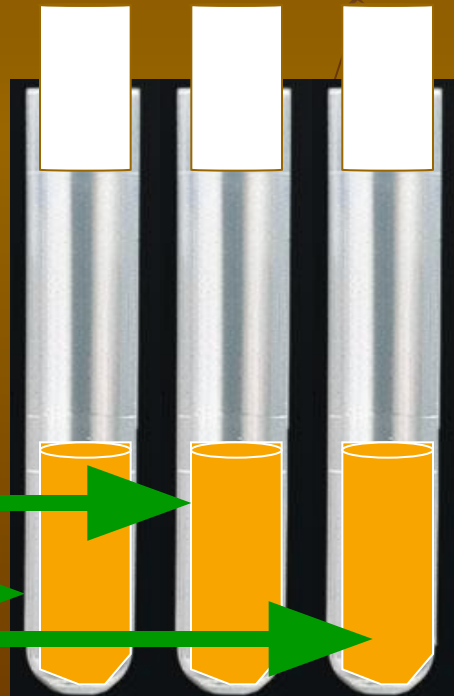
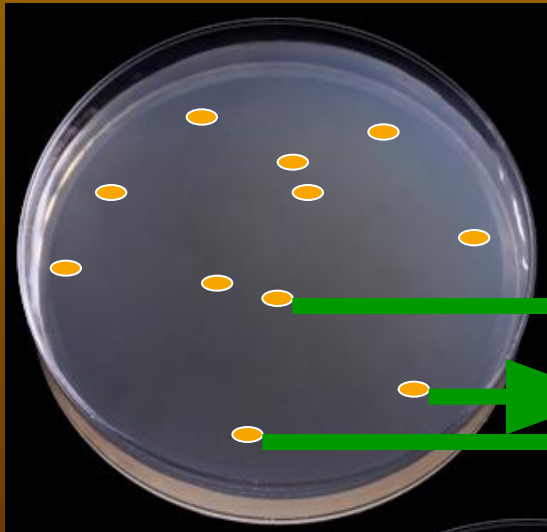
1:10 10^{-2}



10^{-6} 10^{-7}



ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАТРОВОЙ РАСПЛОДКИ



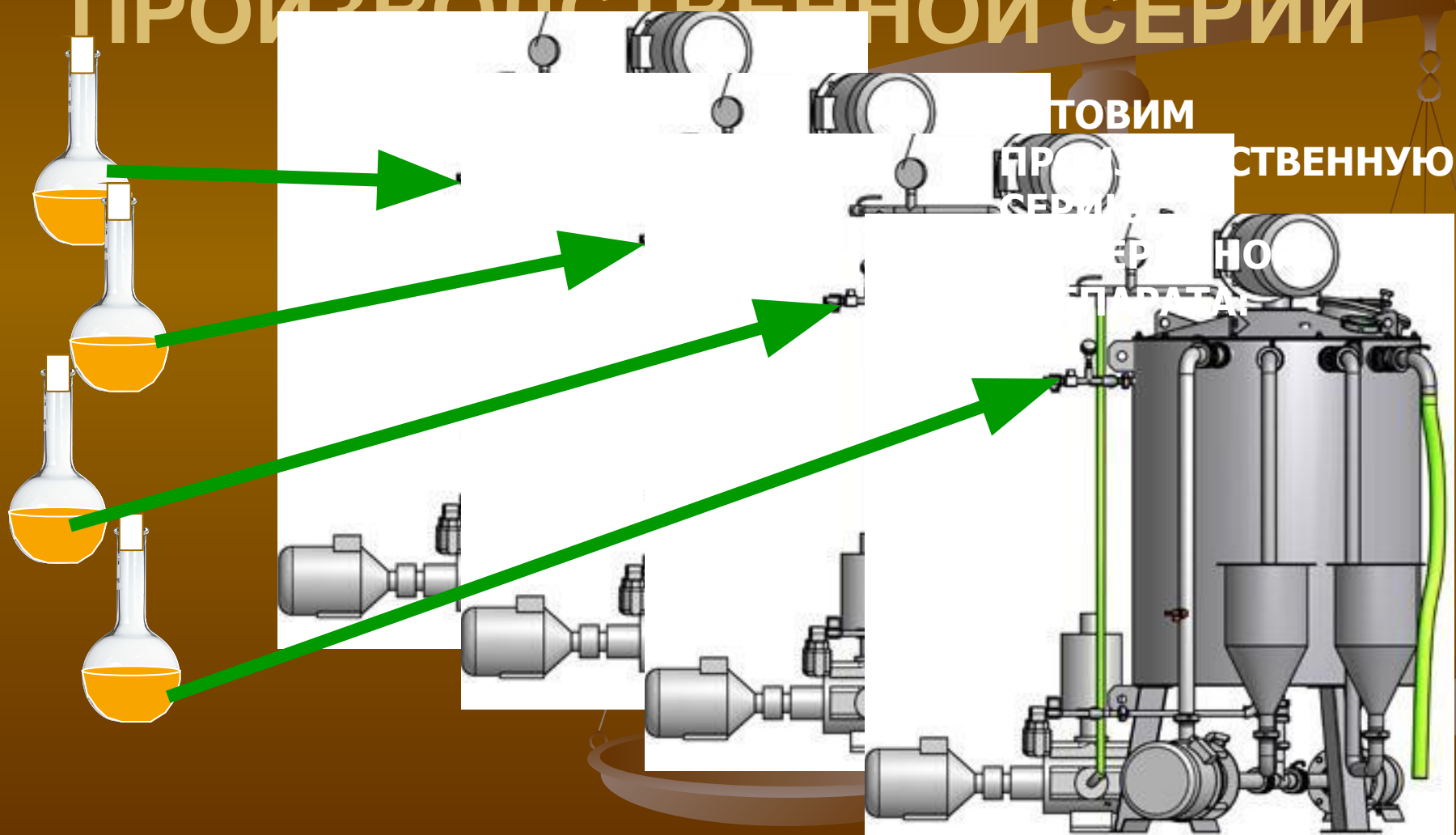
1. Типичные колонии сеем на жидкую питательную среду;
2. Инкубируем 40°C – 24 часа;
3. Отправляем на контроль.
Проверяем:
 1. Антигенные свойства;
 2. Иммуногенность;
 3. Безвредность.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАТРОВОЙ РАСПЛОДКИ

- Готовим матровую расплодку:



ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СЕРИИ



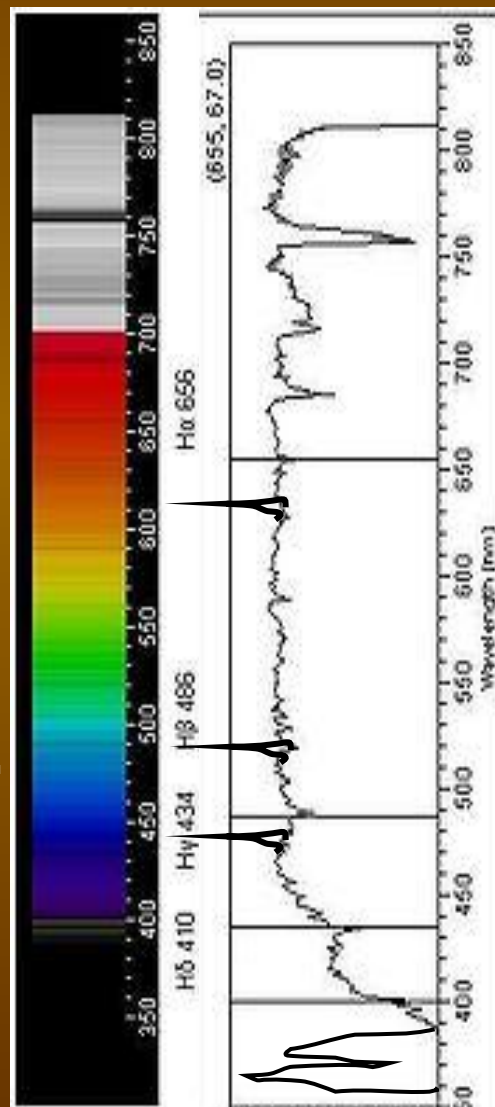
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЕННОЙ СЕРИИ



- **ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ СЕРИИ ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ:**
 - Роллерные культуры;
 - Суспензионные культуры;
 - Культуры на микроносителях;
 - В пластинчатых реакторах;
 - и др.

ИЗМЕРЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ БИОМАССЫ

1. Количество бактерий (грибов);
2. Количество живых бактерий (грибов);
3. Количество белка в культуре;
4. Количество нуклеиновых кислот в культуре
5. Количество целевого продукта.



1. Количество бактерий (грибов):
МТ/мл; мг/мл

Количество бактерий (всех живых + погибших), количество белка, нуклеиновых кислот проще всего определять спектрофотометрически как в экспериментальных пробах, так и в ферментере во время культивирования бактерий или грибов.

ИЗМЕРЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ БИОМАССЫ



М
ИЗМЕРЕНИЕ



МТ/мл	620 нм	480 нм	НК мг/л	280 нм	Белок мг/л	260 нм
1.6	1	0.9	5.0	1.2	6.4	0.9
1.5	1.3	1.2	4.7	1.5	6.0	1.2
1.4	1.6	1.5	4.4	1.9	5.6	1.5
1.3	1.9	1.8	4.1	2.2	5.2	1.8
1.2	2.2	2.0	3.8	2.6	4.9	2.0
1.1	2.5	2.3	3.5	2.9	4.5	2.3
1	2.8	2.6	3.2	3.3	4.1	2.6
0.9	3.1	2.9	2.9	3.6	3.7	2.9
0.8	3.4	3.2	2.6	4.0	3.3	3.1
0.7	3.7	3.4	2.3	4.3	2.9	3.4
0.6	4	3.7	2.0	4.7	2.6	3.7
0.5	4.3	4.0	1.7	5.0	2.2	4.0
0.4	4.6	4.3	1.4	5.4	1.8	4.2
0.3	4.9	4.6	1.1	5.7	1.4	4.5
0.2	5.2	4.8	0.8	6.1	1.0	4.8
0.1	5.5	5.1	0.5	6.4	0.6	5.1

ИЗМЕРЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ БИОМАССЫ

Проточные фотометрические
кюветы на 260 и 280 нм



МТ/мл	620 нм	480 нм	НК мг/л	280 нм	Белок мг/л	260 нм
1.6	1	0.9	5.0	1.2	6.4	0.9
1.5	1.3	1.2	4.7	1.5	6.0	1.2
1.4	1.6	1.5	4.4	1.9	5.6	1.5
1.3	1.9	1.8	4.1	2.2	5.2	1.8
1.2	2.2	2.0	3.8	2.6	4.9	2.0
1.1	2.5	2.3	3.5	2.9	4.5	2.3
1	2.8	2.6	3.2	3.3	4.1	2.6
0.9	3.1	2.9	2.9	3.6	3.7	2.9
0.8	3.4	3.2	2.6	4.0	3.3	3.1
0.7	3.7	3.4	2.3	4.3	2.9	3.4
0.6	4	3.7	2.0	4.7	2.6	3.7
0.5	4.3	4.0	1.7	5.0	2.2	4.0
0.4	4.6	4.3	1.4	5.4	1.8	4.2
0.3	4.9	4.6	1.1	5.7	1.4	4.5
0.2	5.2	4.8	0.8	6.1	1.0	4.8
0.1	5.5	5.1	0.5	6.4	0.6	5.1

ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК

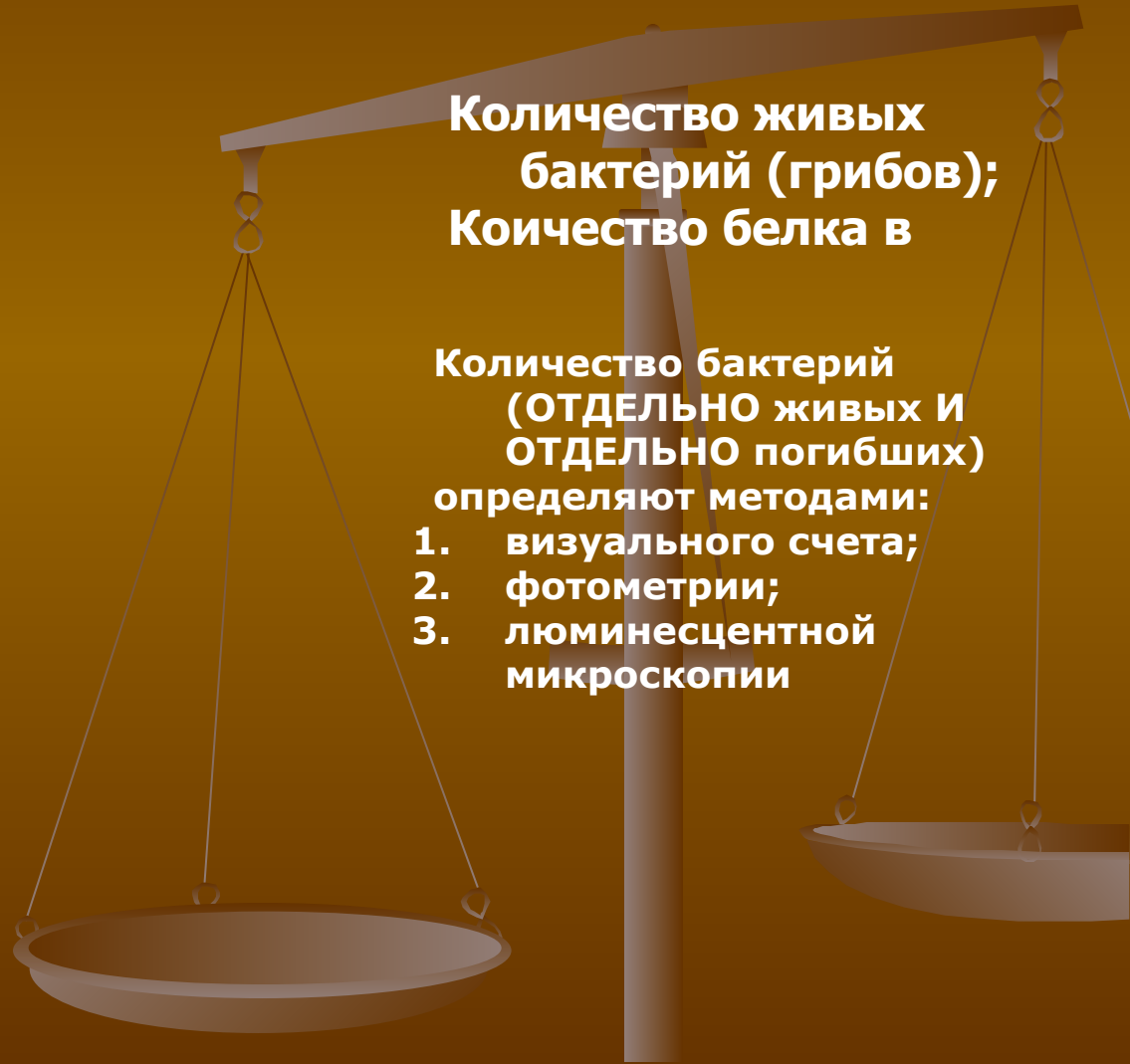
1. Количество бактерий (грибов);
2. Количество живых бактерий (грибов);
3. Количество белка в культуре;
4. Количество нуклеиновых кислот в культуре
5. Количество целевого продукта.

Количество живых бактерий (грибов);
Количество белка в

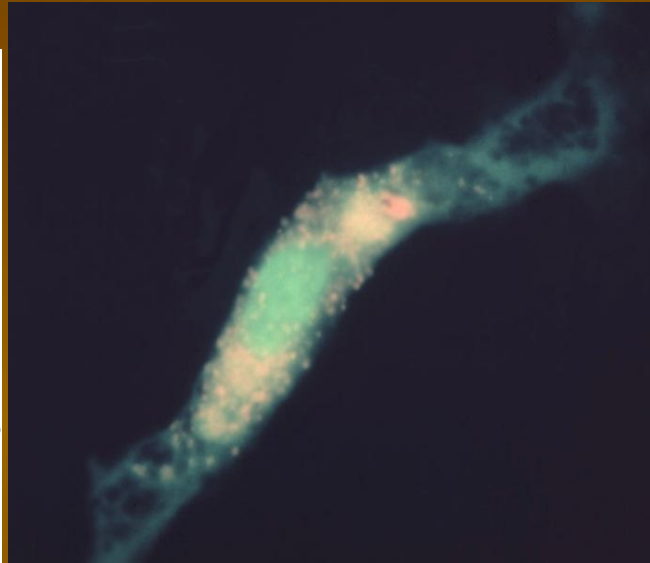
Количество бактерий (ОТДЕЛЬНО живых И ОТДЕЛЬНО погибших)

определяют методами:

1. визуального счета;
2. фотометрии;
3. люминесцентной микроскопии



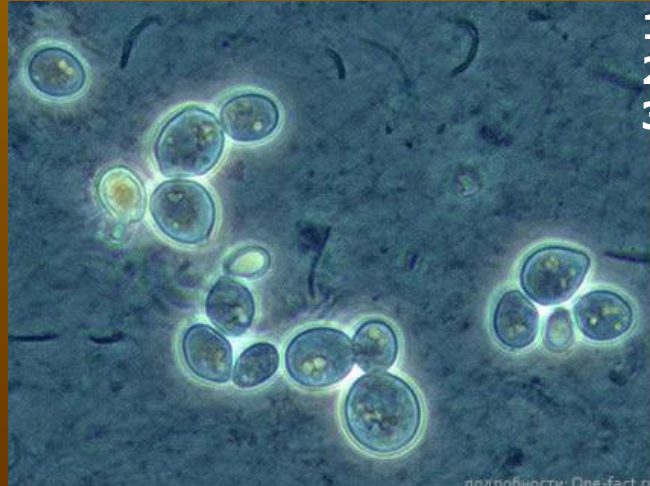
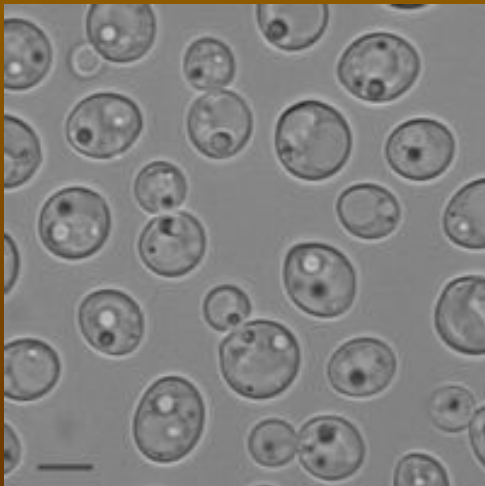
ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК



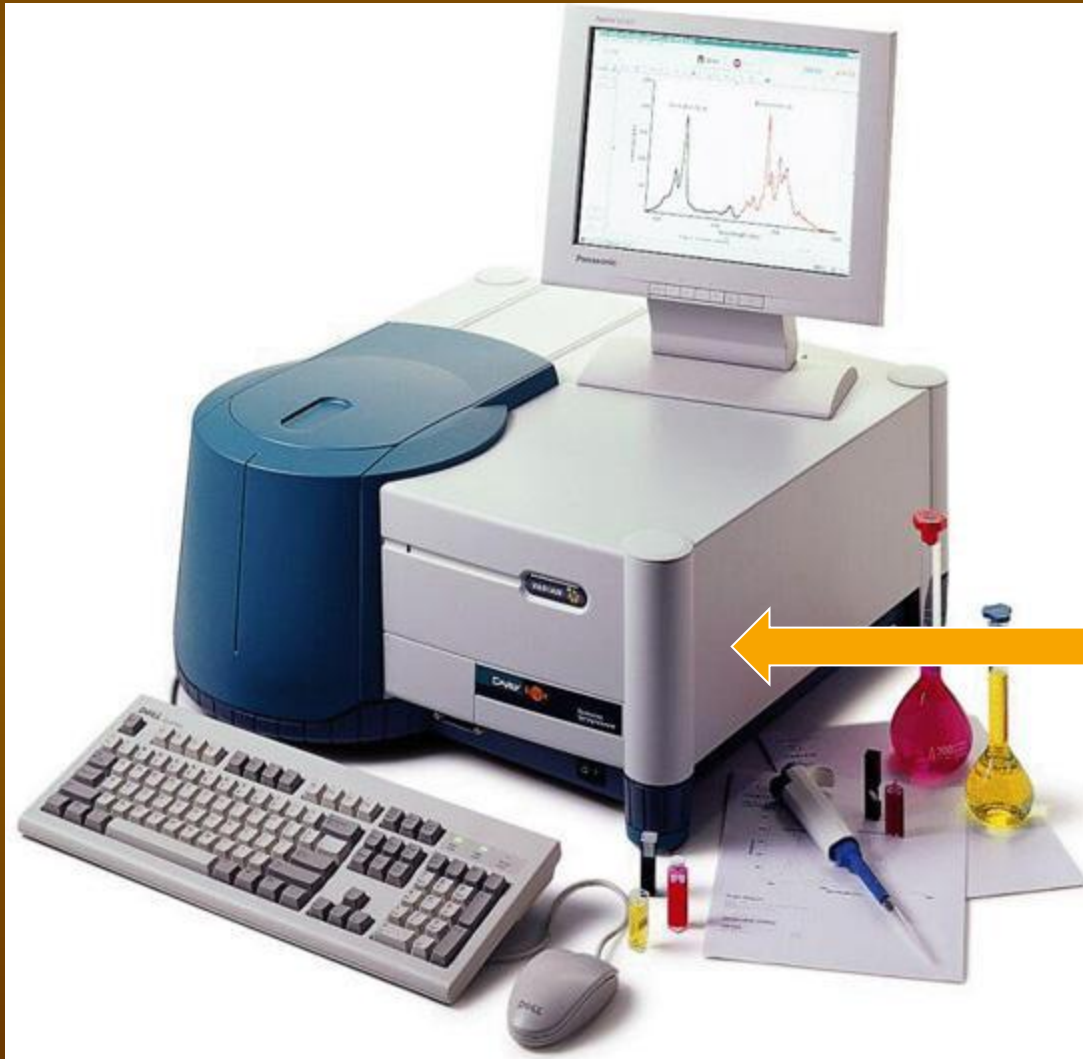
**Количество живых
бактерий (грибов);
Количество белка в**

**Количество бактерий
(ОТДЕЛЬНО живых И
ОТДЕЛЬНО погибших)
определяют методами:**

1. **визуального счета;**
2. **фотометрии;**
3. **люминесцентной
микроскопии**



ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК

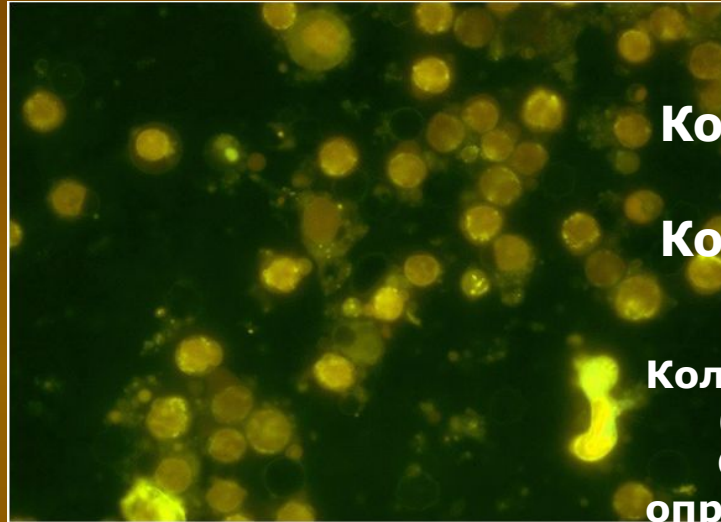


Количество живых
бактерий (грибов);
Количество белка в

Количество бактерий
(ОТДЕЛЬНО живых И
ОТДЕЛЬНО погибших)
определяют методами:

1. визуального счета;
2. фотометрии;
3. люминесцентной микроскопии

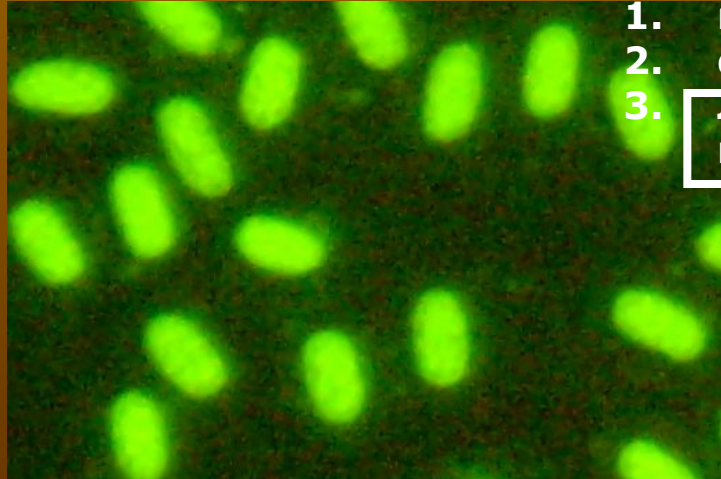
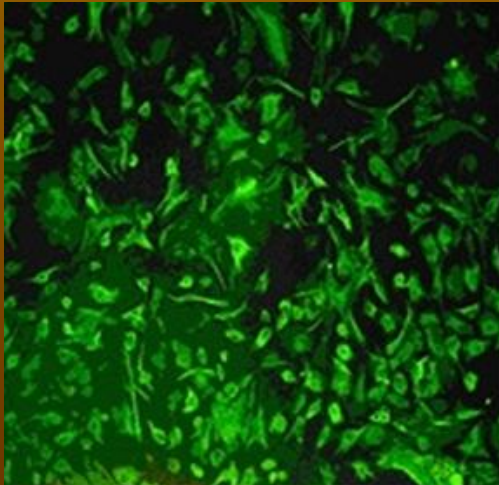
ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК



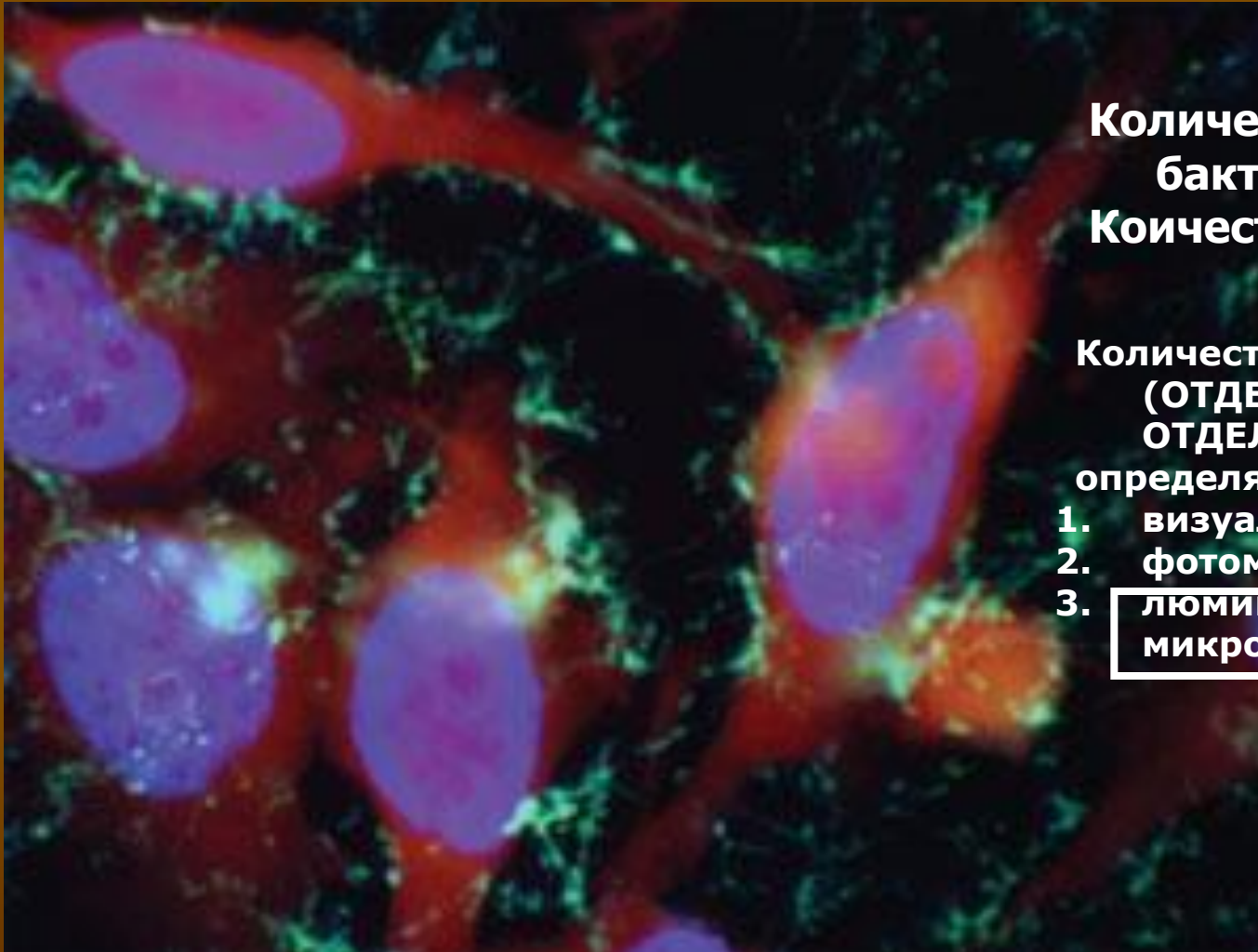
Количество живых
бактерий (грибов);
Количество белка в

Количество бактерий
(ОТДЕЛЬНО живых И
ОТДЕЛЬНО погибших)
определяют методами:

1. визуального счета;
2. фотометрии;
3. люминесцентной микроскопии



ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК



**Количество живых
бактерий (грибов);
Количество белка в**

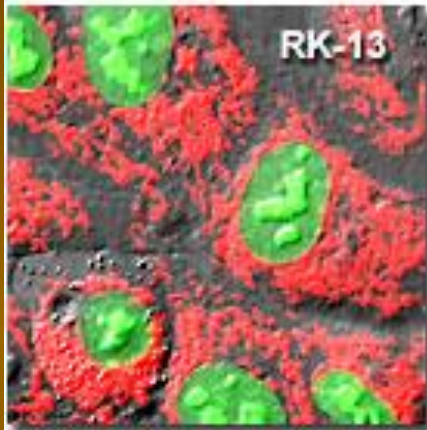
**Количество бактерий
(ОТДЕЛЬНО живых И
ОТДЕЛЬНО погибших)**

определяют методами:

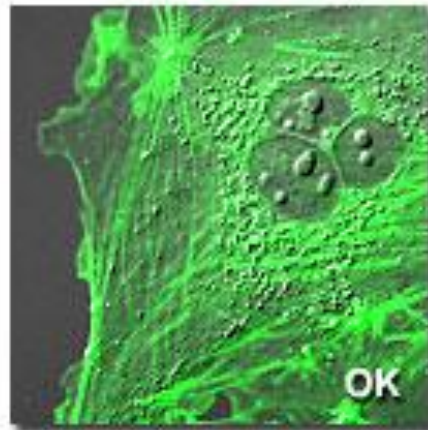
- 1. визуального счета;**
- 2. фотометрии;**
- 3. люминесцентной
микроскопии**

ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК

Live-Cell Imaging with Fluorescent Proteins and DIC



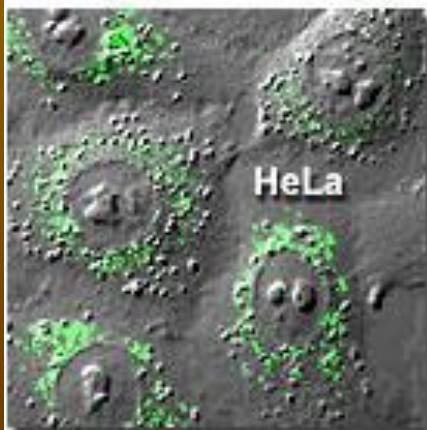
(a)



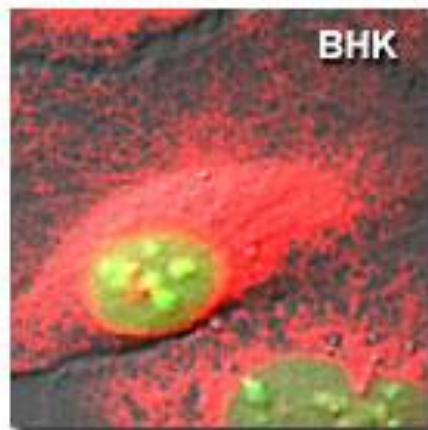
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 1

Количество живых бактерий (грибов);
Количество белка в

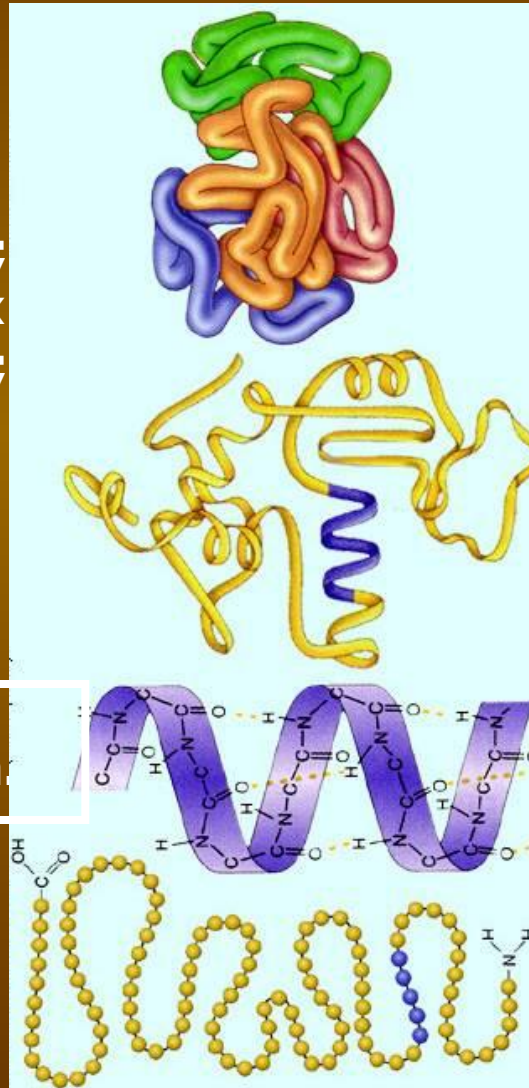
Количество бактерий (ОТДЕЛЬНО живых И ОТДЕЛЬНО погибших)

используют методами:

1. визуального счета;
2. фотометрии;
3. люминесцентной микроскопии

ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И ПОГИБШИХ КЛЕТОК

1. Количество бактерий (грибов);
2. Количество живых бактерий (грибов);
3. Количество белка в культуре;
4. Количество нуклеиновых кислот в культуре;
5. Количество целевого продукта



Количество живых бактерий (грибов);
Количество белка в

Количество бактерий (ОТДЕЛЬНО живых И ОТДЕЛЬНО погибших) определяют методами:

1. визуального счета;
2. фотометрии;
3. люминесцентной микроскопии