

Рисунок 3 – Влияние ревматоидного артрита на показатели степени тушения белковой флуоресценции (в %) плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови доноров

Согласно данным, полученным в ходе исследования, можно предположить, что при системных заболеваниях, в частности, при ревматоидном артрите, происходят изменения структуры и свойств биологических мембран клеток организма. При патологическом состоянии в мембранах лимфоцитов наблюдается нарушение микровязкости липидов на разной глубине липидного бислоя мембран, которое может сопровождаться модификацией структурно-функционального состояния мембранных белков. Данная реакция, по-видимому, имеет неспецифический характер, так как проявляется и при других заболеваниях (например ИБС, атеросклероз и т.д.). Установлено значительное снижение текучести плазматических мембран в зонах белок-липидных контактов, по сравнению с реакцией в липидном бислое. В ряде случаев степень выраженности изменений текучести плазматических мембран клеток крови была взаимосвязана с тяжестью течения заболевания. В отдельных работах было зафиксировано изменение поверхностного заряда плазматических мембран лимфоцитов с положительного на отрицательный, что свидетельствует об гиперполяризации мембран. Микровязкость (текучесть) мембраны сильно влияет на ее функционирование. При увеличении текучести мембрана становится более проницаемой для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков, что может привести к значительному изменению скорости метаболизма клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации. Ревматология/ под. ред. Е. Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2006. – 288 с.
2. Насонов, Е. Л. Современные стандарты фармакотерапии ревматоидного артрита / Насонов Е. Л., Каратеев Д. Е., Чичасова Н. В., Чемерис Н. А. // Клиническая фармакология и терапия. – 2005. – Т. 14. – № 1. – С. 72–75.
3. Каратаев, Д.Е. О классификации ревматоидного артрита / Д.Е. Каратаев, Ю.А. Олюнин// Научно-практическая ревматология. – 2008. – №1. – С. 5-16.
4. Добрецов, Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. М.: Наука. – 1980. – 320 с.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН СУБЪЕДИНИЦЫ В ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО АНАТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* ENGINEERING OF A GENETIC CONSTRUCTION CONTAINING SUBUNIT B OF THERMOLABILE *ESCHERICHIA COLI* ANATOXIN

**И. С. Казловский¹, И. В. Бельская², А. В. Соловьева³,
А. И. Зинченко¹, О. Н. Новикова³, Ю. Ломако³**

I. Kazlouski¹, I. Belskaya², A. Soloveva³, A. Zinchenko¹, O. Novikova³, Y. Lomako³

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

²РПНЦ микробиологии и эпидемиологии, г. Минск, Республика Беларусь

³Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого, г. Минск, Республика Беларусь
zinch@mbio.bas-net.by

¹Institute of Microbiology, NAS, Minsk, Republic of Belarus

²The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
Minsk, Republic of Belarus

³Institute of Experimental Veterinary Medicine S.N. Vyshelieskogo, Minsk, Republic of Belarus

Получена генетическая конструкция pET42a-eLTb, основанная на коммерческом векторе pET42a(+), включающая в себя нуклеотидную последовательность гена eLTb, который кодирует субъединицу В термолabile анатоксина *Escherichia coli*. Полученная конструкция проверена на отсутствие мутаций

в целевом гене и смещений в рамках считывания T7-РНК-полимеразы. В дальнейшем, предполагается использовать плазмиду pET42a-*eLTb* для получения рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего субъединицу В термолabileного анатоксина *E. coli*.

In this study, we obtained a genetic construction pET42a-*eLTb* based on the commercial vector pET42a(+), including the nucleotide sequence of the *eLTb* gene, which encodes the subunit b of thermolabile anatoxin of *Escherichia coli*. The resulting construct was tested for the absence of mutations in the target gene and biases within the reading of T7 RNA polymerase. In the future, it is proposed to use the plasmid pET42a-*eLTb* to obtain a recombinant *E. coli* strain producing the subunit b of thermolabile anatoxin of *E. coli*.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, ген *eLTb*, токсин, генная инженерия.

Keywords: *Escherichia coli*, *eLTb gene*, toxin, genetic engineering.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-66-69>

Колібактеріоз – це остро протікаюча зоонозна хвороба, проявляючись септицемією, токсемією і ендотоксемією, обезвоживанням організму, ураженням центральної нервової системи. В залежності від наявності факторів вирулентності і характеру взаємодії зі слизовою оболонкою кишечника, виділяють ентеротоксигенні, ентероінвазивні, ентеропатогенні і ентерогеморрагічні кишечні палички. Ентеротоксигенні штамми *Escherichia coli* займають одне з провідних місць в етіологічній структурі колібактеріозу телят в багатьох тваринницьких господарствах Республіки Білорусь.

Основними факторами вирулентності ентеропатогенних штамів *E. coli* є фактори адгезії, сприяючі колонізації бактерій на ентероцитах тонкого відділу кишечника, а також здатність до продукції термолabileного [1, 2] і термостабільного ентеротоксинів. Термолabileні (LT) і/або термостабільні (ST) ентеротоксини, викликають секрецію рідини і електролітів, що супроводжується водянистою діареєю, виснаженням і смертю людини або тварини.

Термолabileний токсин *E. coli* функціонально аналогічний холерному токсину і складається з п'яти В-суб'єдиниць і однієї активної суб'єдиниці А. Суб'єдиниці В ентеротоксину сприяють проникненню в клітку суб'єдиниці А, що активує аденілатциклазу, потім відбувається збільшення концентрації цАМФ, що призводить до збільшення секреції хлоридів і води, і зменшенню реабсорбції всередину клітки іонів натрію. В просвіті кишечника скапливается рідина і розвивається діарейний синдром. Термолabileний токсин має молекулярну масу 86 кДа, є антигеном і при попаданні в організм стимулює виробку нейтралізуючих антитіл. Термостабільний токсин в зв'язі з його низькою молекулярною масою (2–5 кДа) практично позбавлений імуногенних властивостей.

З аналізу літературних даних останніх років [3] випливає висновок про те, що перспективним напрямком інновацій в розробці вакцин для профілактики ентеропатогенних і ентеротоксигенних штамів *E. coli* є включення в їх склад факторів вирулентності і, в першу чергу, токсинів термолabileного токсину. Експериментально доведено, що включення термолabileних токсинів *E. coli* в склад вакцинних препаратів забезпечує захист не тільки проти LT-продуруючих штамів *E. coli*, але також підвищує неспецифічний імунітет проти деяких інших бактеріальних патогенів (*Salmonella* spp., *Campylobacter* і др.) [4].

Таким чином, включення в склад полівалентних вакцин для профілактики шлунково-кишкових захворювань телят термолabileного анатоксину *E. coli* може суттєво підвищити профілактичний ефект вакцинації і підвищити економічний ефект від їх застосування.

Виходячи з вищевикладеного, метою даної роботи стало створення генетичної експресійної конструкції, що містить ген, що кодує суб'єдиницю В термолabileного анатоксину *E. coli*.

Основою для створення цільової плазмиди використовували вектор pET42a(+) (Invitrogen, США), що несе ген резистентності до канамицину, сильний T7-промотор, а також полілінкер з багатьма сайтами клонування. Ген суб'єдиниці В *eLTb* був ізолюваний за допомогою ПЦР з геномної ДНК бактерії *E. coli* O157:H7.

Отриманий ген і лінійну молекулу вектора отжигали один на одного за допомогою безлігзатного клонування, також відомого як «метод продовжувальної перекриваючої ПЦР» (ПП-ПЦР) [5]. Плазмиди з бактеріальних кліток виділяли шляхом щелочного лізису [6]. Рестрикційний і ПЦР-аналіз, а також секвенування отриманого клону проводили за стандартними методиками [6].

Послідовність гена *eLTb* довжиною 372 п.о. виділили з геномної ДНК *E. coli* O157:H7 за допомогою ПЦР. Потім проводили лінеаризацію вектора pET-42a(+) довжиною 4976 п.о. Отримані ампліфікати аналізували за допомогою 1% агарозного гелю-електрофорезу (рис. 1).

При постановці ПП-ПЦР в реакційну суміш вносили еквімолярну кількість лінеаризованого вектора pET42a і очищеного гена *kerA*. Отриманою ПЦР сумішшю трансформували компетентні клітки *E. coli* XL1Blue (ThermoFisher, США).

ДНК, отримана з колоній бактеріальних кліток, в подальшому піддали ПЦР-аналізу для підтвердження наявності цільового гена в правильній орієнтації. Для цього використовували праймери до послідовності T7-промотора і до послідовності, що кодує цільовий білок. Отримані результати ПЦР-аналізу представлені на рисунку 2.

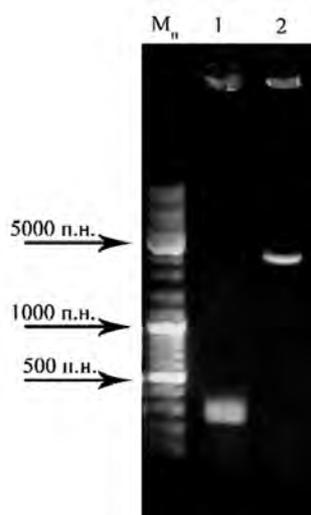


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена *eLTb* (1) и вектора *pET42a(+)* (2): M_n (здесь и далее) – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

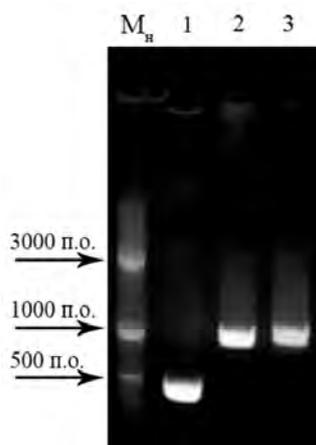


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, изолированной из трех колоний, образованных клетками-трансформантами

Из данной электрофореграммы следует, что только в одной из трех колоний присутствует ген *eLTb* в правильной ориентации. Такая колония была выбрана для дальнейшей работы.

Из выбранного штамма-трансформанта выделили плазмиду при помощи щелочного лизиса [6]. Выделенную кольцевую молекулу проверили рестрикционным анализом по сайту узнавания рестриктазы *Hind*III и секвенированием, для подтверждения факта отсутствия нежелательных спонтанных мутаций, появившихся в гене субъединицы В. По результатам этих анализов был сделан вывод о том, что полученная линейная молекула ДНК соответствует теоретически рассчитанной массе – 5386 п.о. и полинуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу В, совпадает с первоначальной последовательностью гена *eLTb*.

Полученную конструкцию можно использовать в дальнейшем для получения рекомбинантного штамма-продукта субъединицы В термолабильного анатоксина *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Characterization of heat-labile toxin-subunit B from *Escherichia coli* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / I. Sospedra [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2012. – Vol. 50, N 11. – P. 3886–3891.
2. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* / Q. Duan [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – 292 p.
3. Hur, J. Ontology-based literature mining of *E. coli* vaccine-associated gene interaction networks / J. Hur, A. Ozgur, Y. He // *J. Biomed. Sem.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – 12 p.
4. Th1-biased immunoadjuvant effect of the recombinant B subunit of an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen via intranasal immunization in mice / F. Su [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2019. – Vol. 81, N 10. – P. 1475–1484.

5. *Quan, J.* Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PloS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.

6. *Green, M. R.* Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition / M.R. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. – 2012. – 630 p.

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ И КЛАССА ОПАСНОСТИ ОТХОДОВ БОЯ ЗЕРКАЛ

APPLICATION OF ALTERNATIVE TEST SYSTEMS FOR DETERMINATION OF HAZARD DEGREE AND CLASS OF BROKEN MIRRORS WASTE

***С. Н. Камлюк, О. А. Борис, Т. Н. Гомолко,
Т. В. Лисовская, Т. В. Деменкова, В. И. Иода***

S. Kamliuk, O. Boris, T. Gomolko, T. Lisovskaya, T. Demenkova, V. Ioda

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь
Shevtsova308@gmail.com*

Republican Unitary Enterprise «Scientific practical center of hygiene», Minsk, Republic of Belarus

В статье изложены результаты испытаний отходов производства «бой зеркал при остеклении мебели» по показателю «экоотоксичность» с применением альтернативных тест-систем: культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, сельскохозяйственных культур (овса, огурца, редиса) в фитотесте. Описаны экспериментальные методы, приведено научное обоснование рациональных условий постановки эксперимента, критериев достоверности используемых тестов. Показана перспективность применения в практике биотестирования комплекса тест-моделей, поскольку данный подход наиболее адекватно моделирует процессы воздействия токсичных компонентов, содержащихся в отходах производства, на компоненты окружающей природной среды.

The article presents the results of tests of industrial wastes – broken mirrors waste according to the «ecotoxicity» indicator using alternative test-systems: protozoa *Tetrahymena pyriformis* culture as well as crops (oats, cucumber, radishes) on the phytotest. The experimental methods are described and the scientific substantiation of the rational conditions of the experiment, the reliability criteria of tests used are given. The prospects of using a complex of test models in practice for biotesting is shown, since this approach most adequately simulates the processes of the effects of toxic components contained in industrial wastes on environmental components.

Ключевые слова: отходы производства, класс опасности, экоотоксичность, токсичность, тест-система, *Tetrahymena pyriformis*.

Keywords: industrial wastes, hazard class, ecotoxicity, toxicity, test-system, *Tetrahymena pyriformis*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-69-72>

На сегодняшний день проблема масштабного захоронения отходов производства продолжает оставаться весьма актуальной, особенно это касается ситуации с отходами, содержащими значительное количество токсичных компонентов [1].

В процессе производства, хранения, транспортировки и эксплуатации различных предметов бытовой и офисной мебели, имеющих зеркальные вставки, неизбежно образуются отходы битого зеркала (осколки и листы зеркал со сколами и другими повреждениями). Данному виду отходов согласно классификатору отходов, образующихся в Республике Беларусь, присвоено наименование «бой зеркал при остеклении мебели», код 3140844 [2]. Несмотря на то, что отходы боя зеркал состоят по большей части из неорганического стекла – материала относительно инертного и не представляющего угрозу для окружающей природной среды, – их компонентами являются также такие элементы, как серебро и алюминий, входящие в состав отражающего слоя, наносимого на заднюю поверхность стекла при производстве зеркал. Кроме того, в составе боя зеркал присутствуют и лакокрасочные материалы, предупреждающие механическое повреждение отражающего слоя.

Таким образом, отходы «бой зеркал при остеклении мебели» являются многокомпонентными и согласно классификатору отходов, образующихся в Республике Беларусь [2], подлежат оценке не только по показателю «токсичность», но и «экоотоксичность». В свою очередь, процедура исследований экоотоксичных свойств отходов в нашей стране на сегодняшний день проводится на основании батареи тест-объектов [3]. Данный подход предполагает применение альтернативных тест-систем, представленных водными и почвенными организмами из различных таксономических групп: пресноводными ресничными инфузориями *Tetrahymena pyriformis*, вторичноводным