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. Вышеслесского, 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. Vysheslenskogo, 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 Т7-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>

Колибактериоз – это остро протекающая зоонозная болезнь, проявляющаяся септициемией, токсемией и энтеритом, обезвоживанием организма, поражением центральной нервной системы. В зависимости от наличия факторов вирулентности и характера взаимодействия со слизистой оболочкой кишечника, выделяют энтеротоксигенные, энтероинвазивные, энтеропатогенные и энтерогеморрагические кишечные палочки. Энтеротоксигенные штаммы *Escherichia coli* занимают одно из ведущих мест в этиологической структуре колибактериоза телят во многих животноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

Основными факторами вирулентности энтеропатогенных штаммов *E. coli* являются факторы адгезии, способствующие колонизации бактерий на энтероцитах тонкого отдела кишечника, а также способность к продукции термолabileного [1, 2] и термостабильного энтеротоксинов. Термолabileные (LT) и/или термостабильные (ST) энтеротоксины, вызывают секрецию жидкости и электролитов, что сопровождается водянистой диареей, истощением и гибелью человека или животного.

Термолabileный токсин *E. coli* функционально аналогичен холерному токсину и состоит из пяти В-субъединиц и одной активной субъединицы А. Субъединицы В энтеротоксина облегчают проникновение в клетку субъединицы А, что активирует аденилатциклазу, затем происходит увеличение концентрации цАМФ, что приводит к увеличению секреции хлоридов и воды, и уменьшению реабсорбции внутрь клетки ионов натрия. В просвете кишечника скапливается жидкость и развивается диарейный синдром. Термолabileный токсин имеет молекулярную массу 86 кДа, является антигеном и при попадании в организм стимулирует выработку нейтрализующих антител. Термостабильный токсин в связи с его низкой молекулярной массой (2–5 кДа) практически лишен иммуногенных свойств.

Из анализа литературных данных последних лет [3] следует вывод о том, что перспективным направлением инноваций в разработке вакцин для профилактики энтеропатогенных и энтеротоксигенных штаммов *E. coli* является включение в их состав факторов вирулентности и, в первую очередь, токсидов термолabileного токсина. Экспериментально доказано, что включение термолabileных токсидов *E. coli* в состав вакцинных препаратов обеспечивает защиту не только против LT-продуцирующих штаммом *E. coli*, но также повышает неспецифический иммунитет против некоторых других бактериальных патогенов (*Salmonella* spp., *Campylobacter* и др.) [4].

Таким образом, включение в состав поливалентных вакцин для профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят термолabileного анатоксина *E. coli* может существенно повысить профилактический эффект вакцинации и повысить экономический эффект от их применения.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилось создание генетической экспрессионной конструкции, содержащей ген, кодирующий субъединицу В термолabileного анатоксина *E. coli*.

Основой для создания целевой плазмиды использовали вектор pET42a(+) (Invitrogen, США), несущий ген резистентности к канамицину, сильный Т7-промотор, а также полилинкер с множественными сайтами клонирования. Ген субъединицы В *eLTb* был изолирован при помощи ПЦР из геномной ДНК бактерии *E. coli* O157:H7.

Полученный ген и линейную молекулу вектора отжигали друг на друга при помощи безлигазного клонирования, также известного как «метод продолжительной перекрывающейся ПЦР» (ПП-ПЦР) [5]. Плазмиды из бактериальных клеток выделяли путем щелочного лизиса [6]. Рестрикционный и ПЦР-анализ, а также секвенирование полученного клона проводили по стандартным методикам [6].

Последовательность гена *eLTb* длиной 372 п.о. выделили из геномной ДНК *E. coli* O157:H7 при помощи ПЦР. Затем проводили линейаризацию вектора pET-42a(+) длиной 4976 п.о. Полученные амплификаты анализировали при помощи 1% агарозного гель-электрофореза (рис. 1).

При постановке ПП-ПЦР в реакционную смесь вносили эквимольное количество линейаризованного вектора pET42a и очищенного гена *kerA*. Полученной ПЦР смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue (ThermoFisher, США).

ДНК, полученная из колоний бактериальных клеток, в дальнейшем подвергли ПЦР-анализу для подтверждения наличия целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры к последовательности Т7-промотора и к последовательности, кодирующей целевой белок. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены на рисунке 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-продуцента 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 экотоксичных 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