

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПУШНОГО
ЗВЕРОВОДСТВА И КРОЛИКОВОДСТВА ИМ. В.А. АФАНАСЬЕВА



На правах рукописи

Тихонова Наталья Борисовна

**Роль генетического обмена в формировании
энтеротоксигенных вариантов вакцинных
штаммов *Escherichia coli***

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Московская область, п Родники

2004

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им В А Афанасьева (ГНУ НИИПЗК) РАСХН и в Государственном учреждении Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Козловский Юрий Евгеньевич

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук
Литвинов Олег Борисович

кандидат биологических наук
Гагарина Екатерина Юрьевна

Ведущая организация:

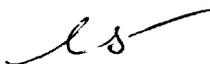
Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»

Защита диссертации состоится «27» декабря 2004 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета КР 006 047 53 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук при Государственном научном учреждении Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им В А Афанасьева (140143, Московская обл., Раменский район, п. Родники, ул. Трудовая, д. 6, тел. (095)501-53-55)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ НИИПЗК

Автореферат разослан «27» ноября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Лоснко Н.Н.

2006-4
843

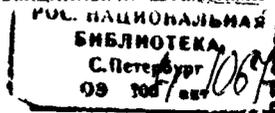
2097370

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема токсикоинфекций до сих пор остаётся одной из нерешённых в ветеринарии и медицине. Попытка создания вакцинных препаратов традиционным путём либо вообще не приводила к успеху, либо эффективность их применения была крайне мала, что объясняется физиологическими особенностями желудочно-кишечного тракта, играющего барьерную роль. Болезнь развивается при условии колонизации энтеротоксигенных *Escherichia coli* (EТЕС) тонкого кишечника и выработки ими энтеротоксинов. Основную защиту против EТЕС обеспечивают антитела класса IgA к фимбриальным факторам колонизации, LT-токсину и O-антигенам. В процессе заболевания вырабатывается как антибактериальный, так и антитоксический иммунитет. До недавнего времени считалось, что антитоксический иммунитет в первую очередь направлен против субъединицы В термолabileного токсина, однако, согласно имеющимся литературным данным, А-субъединица холерогена, близкого по структуре к LT-токсину, обладает выраженными суперантигенными свойствами. Логично было бы предположить, что и А-субъединица LT-токсина является суперантигеном.

Иммунный ответ на текущий инфекционный процесс является многосторонним и связан с выработкой специфических антител на различные новые антигенные раздражители, последовательно вступающие в действие в динамике заболевания, что существенно отличается от вакцинального, формируемого традиционными парентеральными вакцинами, направленного, как правило, на один антигенный раздражитель. В настоящее время наиболее перспективным путём создания современных эффективных препаратов является разработка генно-инженерных живых пероральных субъединичных вакцин на резидентном носителе.

Основной проблемой при создании таких препаратов является обеспечение их биологической безопасности. В данном случае имеется ввиду невозможность восстановления токсического фенотипа вакцинными штаммами и пре-



догращение появления высокотоксичных полирезистентных штаммов. В этом плане большой теоретический и практический интерес представляет изучение особенностей обмена генетической информацией между вакцинными и природными штаммами, а также создание генетических конструкций, делающих такой обмен невозможным.

Цели и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение роли генетического обмена в формировании энтеротоксигенных вариантов вакцинных штаммов *E.coli*, а также разработка теоретических и практических подходов к созданию пероральных биологически безопасных живых генно-инженерных вакцин.

В соответствии с изложенным были поставлены следующие задачи:

1. Создать генно-инженерную конструкцию на основе неконъюгативной стабильной плазмиды и детерминанты термолabileного токсоида.
2. Сконструировать вариант экспериментального потенциально вакцинного штамма на основе апатогенного высокоадгезивного резидентного штамма *E.coli* и полученной конструкции
3. Ввести в сконструированный штамм факторы обеспечивающие биологическую безопасность.
4. Провести конъюгативные скрещивания для оценки возможности восстановления токсической детерминанты путём рекомбинации *in vivo*.
5. Исследовать возможность восстановления токсического фенотипа *in vitro*

Научная новизна. Впервые изучена возможность восстановления токсического фенотипа у нетоксигенных штаммов *E.coli* – продуцентов токсоида, изучены факторы, влияющие на перенос генетических детерминант токсигенности между различными штаммами *E.coli*, а также сконструирован биологически безопасный продуцент токсоида, неспособный к восстановлению токсического фенотипа путём реверсии или обмена генетической информацией.

Практическая ценность. Разработаны теоретические и практические подходы к конструированию биологически безопасных рекомбинантных

штаммов для изготовления живых пероральных вакцин против токсикоинфекций. Сконструированы потенциально биологически безопасные штаммы для создания вакцинных препаратов. Данные полученные в ходе работы могут быть использованы в создании вакцинных препаратов против токсикоинфекций, а также в курсе лекций по микробиологии и молекулярной генетике.

Основные положения, выносимые на защиту.

- разработан подход к конструированию биологически безопасных рекомбинантных штаммов для изготовления пероральных вакцин против токсикоинфекций;
- изучены возможности восстановления токсического фенотипа генно-инженерного штамма путём рекомбинации;
- получена генетическая конструкция и штамм, созданный на её основе;
- разработаны подходы, предотвращающие восстановление токсичности.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертации доложены на

- II Московском международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» - 2003г;
- научной сессии РАМН «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии»;
- Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина – 2004» - Феодосия;
- на межлабораторном семинаре сотрудников ГНУ НИИ Пушного Звероводства и Кролиководства им. В. А. Афанасьева, 2004г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, отражающих основное содержание диссертации.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка использованной литературы. В тексте содержится 7 таблиц и 12 рисунков. Список использованной литературы включает 242 источника

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в лаборатории генно-инженерных препаратов отдела биотехнологии Государственного научного учреждения Научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (ГНУ НИИПЗК) РАСХН и ГУ НИИ морфологии человека РАМН

Штаммы бактерий и плазмиды. Вся работа проводилась со штаммами *E. coli* (табл 1) и плазмидами (табл 2) из коллекции лаборатории генно-инженерных препаратов ГНУ НИИПЗК. В исследовании также использовались производные этих штаммов, полученных в ходе работы путём введения в их геном рекомбинантных плазмид pLT5, pLTA2, pLTDAB124.

Таблица 1

Штаммы *E. coli*, использованные в исследовании

Штамм	Характеристика
C600	F-, supE44, thr1, thi-1, leuB6, lacY1, tonA21, λ-
C600Rif ^R	F-, supE44, thr1, thi-1, leuB6, lacY1, tonA21, λ-, Rif ^R
GM2313	dam-, dcm-
B-148	Amp ^R , lac-
XL-1	recA1, endA1, hcrA96, thi-1, hsdR17, r-m+, supE44, relA1, lac, {F' proAB, lacIq, γAM15, Tn10 (Tet ^R)}
№4	F-, диккий тип

Питательные среды. Для получения жидкой культуры *E. coli* использовали LB-бульон (1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl). В ка-

честве плотной среды для культивирования *E. coli* применяли LB-агар (1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 2% агар-агар).

Таблица 2

Плазмиды, использованные в экспериментах

плазми-да	размер	единичные сайты ре-стрикции	селективные маркёры
pBR322	4,3 kb	AvaI, PstI, BamHI, PvuII, ClaI, Sall, EcoRI, HindIII	Ap, Tc
pSC101	9,09 kb	EcoRI, HindIII, BamHI, Sall, XhoI, PvuII, SmaI	Tc
pCR1	11,4 kb	EcoRI, HindIII	Km
pB148	~70 kb		Ap
pLG74	н/о		$r^+ m^+$
pH74114	н/о		<i>elt</i>
F'	н/о		tra^+ , Tc
pLT5	н/о	AvaI, BamHI, PvuII, ClaI, Sall	<i>elt</i> , Tc
pLTΔA1 7		AvaI, BamHI, PvuII, ClaI, Sall	Tc
pLTΔA1 24			Tc
pLTA2			Tc
pLTA8			Km

Ap – ампициллин, Tc – тетрациклин, Km – канамицин, н/о – не определяли

Культивирование штаммов. Для выделения плазмидной ДНК в препаративных количествах культуру *E. coli* выращивали в 5 мл LB-бульона в течение 18 часов при 37 °С в условиях интенсивной аэрации. В селективные среды добавляли антибиотики: тетрациклин, ампициллин, канамицин, рифампицин.

Выделение и очистка плазмидной ДНК. Для получения плазмидной ДНК из культуры *E. coli* использовали метод быстрой щелочной экстракции (Birnboim H C , Doly J , 1979) с некоторыми модификациями, принятыми в лаборатории генно-инженерных препаратов. Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле с бромистым этидием. Элюцию ДНК из агарозного геля проводили с помощью сорбента GlassMilk.

Конструирование рекомбинантных плазмид. При конструировании рекомбинантных плазмид использовали эндонуклеазы рестрикции EcoRI, PstI, BclII, XbaI и PvuII, нуклеазу S1, ДНК-лигазу фага T4 производства MBI "Fermentas" (Литва). Обработку плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции и нуклеазой S1, лигирование рестриционных фрагментов проводили по методикам, описанным в руководстве по молекулярному клонированию (Маниацис и др 1984).

Трансформация штаммов E.coli плазмидной ДНК. В процессе работы использовали метод трансформации, предложенный Kushner, 1978, для штамма *E. coli* SK1590.

Конъюгационные скрещивания штаммов E.coli. Конъюгационные скрещивания проводили на плотной среде по методу Bradley D , 1980, с некоторыми модификациями для триродительского скрещивания.

Биопроба. В работе использовались мыши линии Balb/c. Оценку токсической активности IT-токсина проводили используя тест отёка лап белых мышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ.

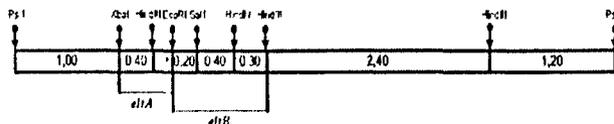
Клонирование *elt* оперона в плазмиде pBR322

Для исследования роли генетического обмена в восстановлении токсического фенотипа вакцинных штаммов *E. coli*, решено было сконструировать мо-

дельный потенциально вакцинный штамм, продуцирующий генно-инженерный токсин В ходе выполнения этой задачи необходимо было выделить *elt* оперон из природной плазмиды токсигенного штамма *E.coli* H74114 и клонировать в плазмиду pBR322. Проведённый ранее анализ физической карты токсигенной плазмиды из штамма *E.coli* H74114 показал, что гены токсинообразования расположены на PstI-PstI фрагменте Ent-плазмиды, размер которого составляет 6,08 т.п.н. (рис.1). Плазмида токсигенности природного штамма *E.coli* H74114 была выделена, очищена и гидролизована ферментом PstI. Фрагменты ДНК, полученные после гидролиза, были разделены с помощью электрофореза в агарозном геле, причём в качестве маркеров размеров фрагментов использовали ДНК фага λ, предварительно обработанную ферментами Eco1301 и MluI. Затем PstI-PstI фрагмент токсигенной плазмиды, соответствующий размеру 6,08 т.п.н., был элюирован. Этим же ферментом PstI расщепляли плазмиду pBR322. Полученной после обработки ДНК-лигазой смесью молекул трансформировали компетентные клетки штамма *E.coli* C600, которые высевали на LB-агар с тетрациклином (20 мкг/мл). При учёте результатов на чашках было обнаружено 263 колонии, из которых при повторном пересеве только 143 были резистентные к тетрациклину и чувствительны к ампициллину (100 мкл/мл). В отличие от pBR322 рекомбинантные плазмиды были чувствительны к ампициллину, так как вставка в сайт PstI плазмиды pBR322 инактивирует ген резистентности к ампициллину (рис.2). Каждая колония из 142 была проверена на наличие PstI-PstI фрагмента размером 6,08 т.п.н., содержащего *elt* оперон, путём выделения плазмидной ДНК с последующим гидролизом ферментом PstI. Электрофоретический анализ продуктов гидролиза показал, что пять колоний содержат плазмиду, PstI-PstI фрагмент которой соответствует по размеру фрагменту, включающему *elt* оперон. Из этих пяти колоний только одна дала положительный результат при постановке ПЦР. Кроме того, лизат культуры, полученной из отобранного клона, дал положительный результат на наличие LT-токсина в реакции Ухтерлони с антисыворотками против термолабильного токсина *E.coli*.

Рисунок 1

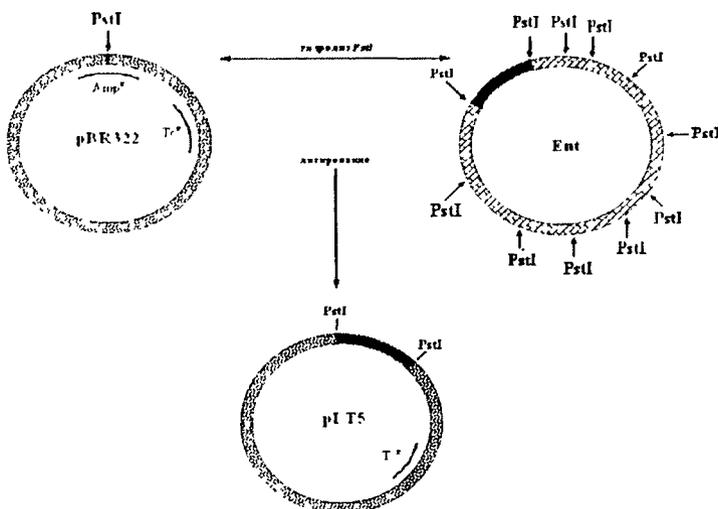
Рестрикционная карта PstI-PstI фрагмента Ent-плазмиды штамма E.coli H74114, содержащего *elt*-оперон



Размеры фрагментов между сайтами рестрикции указаны в т.п.н.

Рисунок 2

Схема конструирования плазмиды pLT5 из плазмиды pBR322 и Ent-плазмиды штамма E.coli H74114



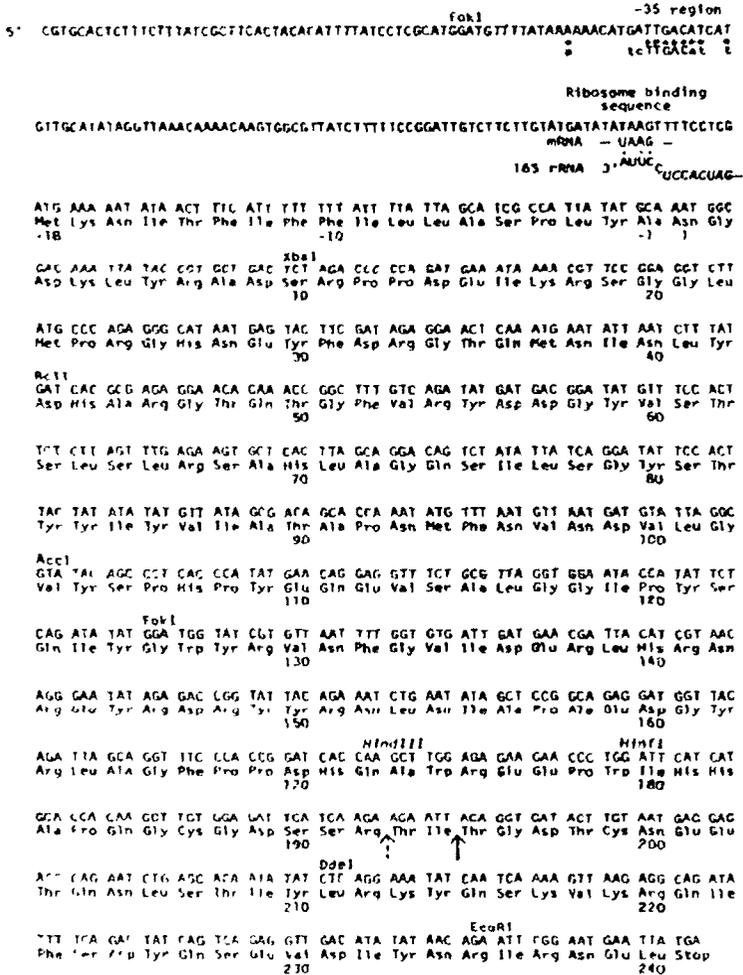
Таким образом, полученные результаты позволили утверждать, что нам удалось проклонировать в сайт PstI плазмиды pBR322 *elt*-оперон. Новую рекомбинантную плазмиду, на основе pBR322, содержащую *elt*-оперон, обозначили как pLT5.

Получение делеции в *elt* опероне

Согласно имеющимся данным первичная структура А-субъединицы термолabileного токсина содержит несколько участков, изменение которых ведёт к потере токсической активности. К таким участкам относится аминокислота гистидин (His) в положении 44 (рис.3). Учитывая эти обстоятельства, решено было для устранения токсической активности делетировать участок А-субъединицы, содержащий His-44.

Проанализировав физическую карту *elt*-оперона штамма *E.coli* H74114 мы обнаружили, что удаление участка ДНК между сайтами XbaI и BclI затрагивает и триплет кодирующий His-44 (рис. 4А). Плазмида pLT5 была введена путём трансформации в штамм *E.coli* GM2113 с фенотипом dam^+dcm^+ , затем выделена и очищена. Однако после обработки очищенной плазмиды pLT5 ферментами XbaI и BclI нами была получена линейная молекула ДНК с липкими, но некомплементарными концами (рис. 4Б). После удаления выступающих 5'-концов нуклеазой S1 и дезактивации нуклеазы было проведено лигирование по тупым концам и получена кольцевая молекула ДНК, содержащая *elt*-оперон с делецией участка между сайтами рестрикции XbaI и BclI, включая сами сайты (рис. 4В). Полученными рекомбинантными молекулами трансформировали компетентные клетки штамма *E.coli* GM2113. В результате было получено около 60 трансформантов. Из каждой полученной колонии была выделена плазмидная ДНК, очищена и обработана ферментами рестрикции XbaI и BclI. Практически все анализируемые плазмидные ДНК трансформантов, за исключением двух, показали на электрофореграмме отсутствие сайтов для XbaI и BclI и были использованы для дальнейшего анализа.

Нуклеотидная последовательность гена *eltA* и аминокислотный состав А-субъединицы LT-токсина

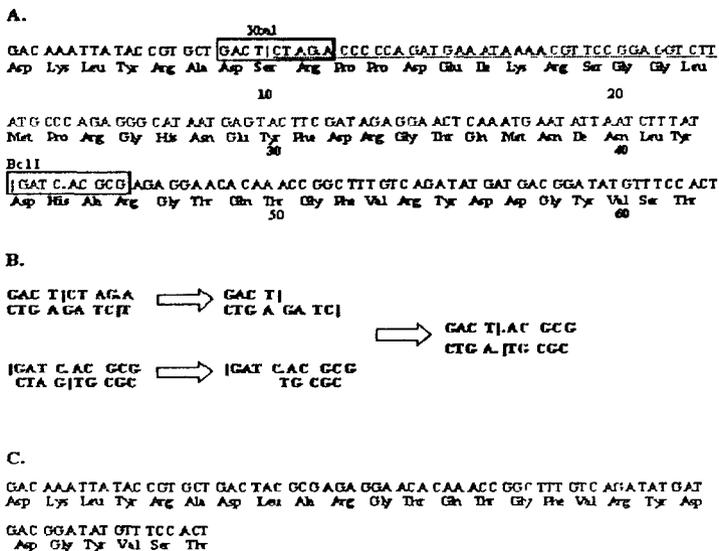


В результате анализа продуктов совместного гидролиза плазмидной ДНК ферментами PstI и EcoRI, было отобрано 24 трансформанта, плазмиды которых обладали характеристиками плазмиды pLT5. В соответствии с проведённым анализом, отобранные трансформанты содержали *elt*-оперон, утративший сайты

BclI и XbaI, что давало основание предполагать наличие в данном опероне делеции участка BclI-XbaI, включая сами сайты рестрикции. Теперь нам необходимо было доказать отсутствие сдвига рамки считывания гена *eltA* полученной генно-инженерной конструкции. Для этого ультразвуковой лизат каждого из отобранных трансформантов был проанализирован в реакции преципитации по Ухтерлони на наличие антигенных детерминант А-субъединицы LT-токсина. Наиболее чёткие полосы преципитации были получены с двумя трансформантами из 24 проанализированных. Плазмиды, выделенные из отобранных клонов, были обозначены pLTA17 и pLTA23. Для дальнейших исследований мы использовали плазмиду pLTA17.

Рисунок 4

Схема получения делеции в А-субъединице



Конструирование потенциально вакцинного штамма, продуцирующего токсин

Для получения потенциально вакцинного штамма необходимо было решить, по крайней мере, три основные задачи. Получить штамм *E.coli*, способный, во-первых, стабильно продуцировать иммуногенный токсин, во-вторых, колонизировать кишечник пушных зверей и, в третьих, этот штамм должен быть биологически безопасным. В ходе выполнения первой задачи было решено ввести детерминанту токсина в плазмиду pSC101. По литературным данным плазида pSC101, благодаря своим *pac*-участкам, достаточно стабильно наследуется в штамме-хозяине даже в отсутствие селективного давления. Кроме того, в штаммах *E. coli* случаи передачи данной плазмиды реципиенту крайне редки и отмечены лишь при участии в качестве мобилизующей плазмиды F-подобного депрессированного фактора переноса pAP42. Причём, по данным А.И. Нехова с соавт., 1984, в процессе мобилизации pSC101 происходит её физическое объединение с конъюгативной плазмидой и в результате формируются контеграты. По мнению Curtiss R. с соавторами вероятность мобилизации плазмиды pSC101 в условиях скрещивания трёх родительских клеток составляет 10^{-22} на каждую выжившую клетку.

PstI-PstI фрагмент плазмиды pLTA17, содержащий мутантный *elt*-оперон, был переклонирован в сайт PstI плазмиды pUC18. Новая рекомбинантная плазида была выделена, очищена и одновременно гидролизована эндонуклеазами рестрикции NdeI и XbaI, обработана нуклеазой S1 и подвергнута электрофоретическому анализу в процессе которого был определён фрагмент, содержащий *elt*-оперон. Этот фрагмент затем был вырезан и элюирован из геля.

Выделенная и очищенная плазида pSC101 была обработана ферментом PvuII, а затем лигирована с фрагментом, содержащим мутантный *elt*-оперон. Лигированной смесью протрансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* C600. Был проведен скрининг трансформантов на наличие детерминанты I₁-токсина и отобран клон, содержащий рекомбинантную конструкцию на

основе плазмиды pSC101 и мутантного *elt*-оперона. Ультразвуковой лизат ночной культуры отобранного трансформанта, в реакции преципитации по Ухтерлони дал чёткие полосы преципитации с антисыворотками против А-субъединицы и против В-субъединицы LT-токсина. Плазмида, выделенная из отобранного клона, обозначена pLTΔA124. Таким образом, нами была получена конструкция на основе природной неконъюгативной мультикопийной стабильной плазмиды pSC101, детерминирующий термолабильный токсин, который содержит антигенные детерминанты LT-токсина и не способен оказывать токсическое действие.

Для выполнения следующей задачи, полученный на предыдущем этапе вектор необходимо было ввести в штамм *E.coli*, способный колонизировать кишечник и персистировать в организме пушных зверей достаточно длительное время. В качестве такого штамма решено было выбрать высокоадгезивный бесплазмидный апатогенный резидентный штамм *E.coli* №4, ранее выделенный от норки и хранящийся в музее лаборатории генно-инженерных препаратов ГНУ НИИПЗК. Наша рекомбинантная конструкция была введена путём трансформации в штамм №4, чувствительный к тетрациклину. Трансформанты, выросшие на LB-агаре с тетрациклином, были отсеяны и проверены на наличие плазмиды pLTΔA124. Один из трансформантов, содержащий pLTΔA124, был отобран и обозначен *E.coli* LTΔA.

Последней задачей данного этапа стало введение в штамм *E.coli* LTΔA детерминанты, обеспечивающей биологическую безопасность данной конструкции. Поскольку рекомбинантная плазмида на основе pSC101 является неконъюгативной, она не способна самостоятельно передаваться от штамма *E.coli* LTΔA другому штамму, однако, существует опасность переноса в штамм *E.coli* LTΔA чужеродной ДНК, несущей участок, комплементарный делеции, введённой нами в *elt*-оперон. В результате генетической рекомбинации может произойти восстановление токсического фенотипа и возникнуть супервирulentный энтеротоксигенный штамм. Для уменьшения такой вероятности нами была принята попытка заблокировать возможность проникновения в наш реком-

бшиантный штамм чужеродной ДНК с помощью системы рестрикции и модификации. С этой целью плазмидой pLG74, которая несёт детерминанту системы рестрикции и модификации EcoRV, были протрансформированы компетентные клетки штамма E.coli L1AA. Среди выросших трансформантов был отобран один, содержащий плазмиды pLTA124 и pLG74. Полученный рекомбинантный штамм был назван E.coli RMLTAA. В опытах по конъюгативному скрещиванию полученного штамма с природными штаммами E.coli, содержащими конъюгативные плазмиды, нам не удалось получить переноса конъюгативных плазмид в наш штамм, в то время как в контрольном эксперименте частота их переноса из природных штаммов E.coli в штамм E.coli LTAA была достаточно высока и составляла 10^{-1} - 10^{-2} на одну клетку донора.

Апатогенность штамма E.coli RMLTAA была проверена в тесте отека лап у белых мышей. В качестве положительного контроля служил лизат штамма, несущего в своём составе плазмиду pLT5 с полноразмерным *elt*-опероном. Штамм E.coli RMLTAA во всех случаях показал отрицательный результат.

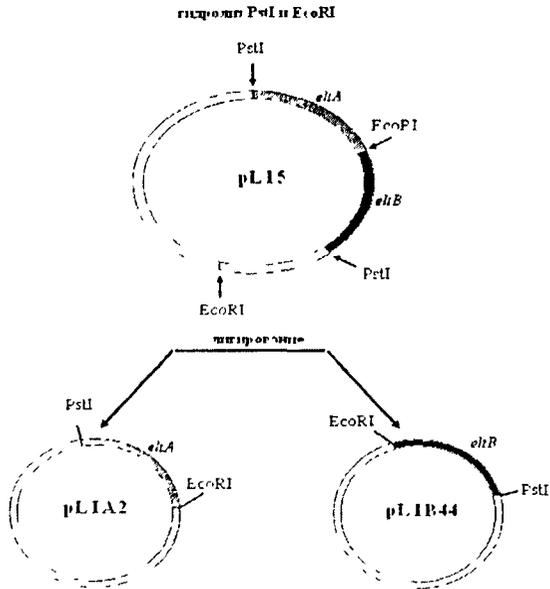
Клонирование генов *eltA* и *eltB* в отдельные векторные плазмиды

Следующей задачей стоящей перед нами было получение плазмиды, которая содержала бы делегированный ранее участок гена *eltA*. С этой целью было решено клонировать в плазмиду pBR322 PstI-EcoRI участок *elt*-оперона, содержащий ген *elt1*. Плазмидная ДНК pLT5 была выделена, очищена и одновременно обработана ферментами рестрикции PstI и EcoRI. Затем перевар был проанализирован путём электрофореза в агарозном геле. На электрофореграмме мы наблюдали 4 полосы, отличающиеся по размеру. В качестве маркеров размера фрагментов использовали EcoI301 и MluI рестрикты ДНК фага λ . Полоса размером примерно 1,6 г п н соответствовала участку, содержащему *elt1*, полоса размером примерно 4,5 г п н соответствовала участку, содержащему *eltB*, ос-

тальные два фрагмента (размер которых составлял примерно 3,4 т.п.н. и 1,0 т.п.н.) соответствовали участкам плазмиды pBR322. Полученная нами смесь фрагментов ДНК была пересажена и залигирована. Лигированной смесью проведена трансформация компетентной культуры штамма *E.coli* С600 с последующим высевом на LB-агар с тетрациклином. В результате проведённых манипуляций было получено 60 трансформантов, среди которых найдено 8 колоний, содержащих ген *eltA*, и одна колония, содержащая ген *eltB*. Из каждой колонии была выделена плазмидная ДНК, очищена, а затем проанализирована путём обработки ферментами рестрикции PstI и EcoRI с последующим электрофоретическим анализом продуктов гидролиза в агарозном геле. Для дальнейшей работы была отобрана плазида, в состав которой входил доминирующий участок гена *eltA*. Полученная плазида названа pLTA2.

На следующем этапе нашей работы необходимо было переклонировать ген *eltA* в плазмиду pCR1. Эта плазида является дериватом природной плазмиды ColE1, стабильно наследуется, прекрасно мобилизуется и обладает устойчивостью к канамицину. Другим важным для нас свойством являлось отсутствие гомологии между плазидами pCR1 и pSC101. Для успешного выполнения данной задачи ген *eltA* был вырезан из pLTA2 по сайтам EcoRI и PstI, выделен и лигирован с плазмидой pUC18, предварительно гидролизованной по тем же сайтам. После трансформации штамма С600 был выделен клон, содержащий рекомбинантную плазмиду с геном *eltA*. Из выделенной и очищенной рекомбинантной плазмиды ген *eltA* был вырезан по сайтам NdeI и EcoRI, обработан нуклеазой S1, выделен посредством электрофореза с последующей элюцией. Плазида pCR1 также была выделена, очищена и после рестрикции ферментом EcoRI и обработки нуклеазой S1 лигирована с предварительно выделенным геном *eltA*. После трансформации лигированной смесью компетентной культуры была получена рекомбинантная плазида pLTA8.

Схема конструирования рLTA2



Оценка возможности восстановления токсического фенотипа экспериментального штамма *E. coli* RMLTΔA

Основной проблемой при создании генно-инженерных препаратов является обеспечение их биологической безопасности, в данном случае неспособность вакцинного штамма к восстановлению токсического фенотипа. Поскольку при конструировании штамма *E. coli* RML1ΔA в полноразмерный *eli*-оперон была введена делеция, а мутации типа делеции к спонтанной реверсии не способны, единственно возможным путём восстановления токсического фенотипа является рекомбинация между вакцинным штаммом и штаммом, несущим участок ДНК, комплементарный делеции

В связи с тем, что в природных штаммах ЕТЕС термолабильный токсин детерминируется Ent-плазмидами, которые могут быть как конъюгативные, так и неконоъюгативные, но способные к мобилизации, основным путём распространения *elt*-оперона в популяциях бактерий является конъюгативный перенос. Поскольку два других пути обмена генетической информацией в популяциях энтеробактерий в случае *elt*-оперона не возможны. Трансформация в природных популяциях *E.coli* мало вероятна и требует очень специфических, нехарактерных для среды обитания ЕТЕС, условий. Нет данных и о случаях переноса *elt*-оперона между бактериями путём трансдукции.

Сконструированный нами потенциально вакцинный штамм содержит гибридную плазмиду pLTA124, которая является неконоъюгативной и неспособна к мобилизации. Кроме того, *E.coli* RMLTΔA обладает системой рестрикции и модификации *EcoRV*, препятствующей проникновению чужеродной ДНК. Экспериментальное подтверждение биологической безопасности штамма *E.coli* RMLTΔA было получено *in vitro*. В опытах по конъюгации ни одного случая переноса генетического материала из вакцинного штамма или в вакцинный штамм не наблюдалось. Нами было поставлено конъюгационное скрещивание между штаммом *E.coli* LTA и штаммом несущим плазмиду pLTA8 с полноразмерным геном токсической субъединицы А. Оба штамма были апатогенны, и токсический фенотип восстановился только в результате генетического обмена. Поскольку, единственным критерием отбора трансконоъюгантов с восстановившимся токсическим фенотипом, было их патогенетическое действие на организм экспериментальных животных конъюгационной смесью, мы заражали подопытных мышей линии Balb/c. О восстановлении токсичности говорила клиническая картина токсикоинфекции: угнетённое состояние, диарейный синдром и гибель подопытных животных. Культура, изолированная из желудочно-кишечного тракта погибших животных, давала положительную реакцию в биотесте с отёком лап мышей. Это позволило нам судить о восстановлении токсического фенотипа у нашего штамма (табл.3).

Таблица 3

Оценка возможности возникновения токсического фенотипа вакцинного штамма

№	используемые культуры <i>E. coli</i>	группы N=10	результаты заболело / погибло
1	LTA	Контрольная группа	- / -
2	LTΔA (r-m-)	Контрольная группа	- / -
3	C600 F'	Контрольная группа	- / -
4	B148	Контрольная группа	- / -
5	B801	Контрольная группа	- / -
6	RMLTΔA (r+m+)	Контрольная группа	- / -
7	C600 F' x LTA x LTΔA (r-m-)	Опытная группа	8 / 2
8	C600 F' x LTA x RMLTΔA (r+m+)	Опытная группа	- / -
9	B148 x LTA x LTΔA (r-m-)	Опытная группа	6 / 4
10	B148 x LTA x RMLTΔA (r+m+)	Опытная группа	- / -
11	B801 x LTA x LTΔA (r-m-)	Опытная группа	8 / 2
12	B801 x LTA x RMLTΔA (r+m+)	Опытная группа	- / -

Затем был поставлен опыт по конъюгации с модифицированным вакцинным штаммом *E.coli* RMLTΔA. Возникновения диарейного синдрома у мышей, которым была введена конъюгационная смесь ни в одном из трёх независимых экспериментов не было. Выжившие мыши были забиты, путём смещения шейных позвонков, от них выделена тотальная микрофлора с лизатом которой была поставлена биопроба с реакцией отёка лап мышей. Биопроба полностью подтвердила данные полученные при пероральном заражении.

Таким образом, нами продемонстрирована биологическая безопасность штамма *E.coli* RMLTΔA *in vitro*. Хотя контрольный штамм *E.coli* LTΔA оказался прекрасным реципиентом и показал возможность приобретения токсического фенотипа (таблица3).

Для изучения протективной активности рекомбинантного препарата подопытным мышам в течение одной недели дважды с трех дневным интервалом перорально вводили вакцинный штамм *E.coli* RMLTΔA в дозе 1×10^7 КОЕ на голову. Затем провели заражение природным токсигенным штаммом в дозе 1×10^9 КОЕ. В качестве контроля использовали интактных мышей, которым также вводили токсигенный штамм в дозе 1×10^9 КОЕ (табл. 4)

Таблица 4

Оценка протективной активности рекомбинантного препарата

экспериментальные группы N=10	количество заболевших животных	количество погибших животных
Контроль	10	4
Опыт	5	0

Через трое суток у подопытных животных клиническая картина соответствовала здоровым животным.

ВЫВОДЫ

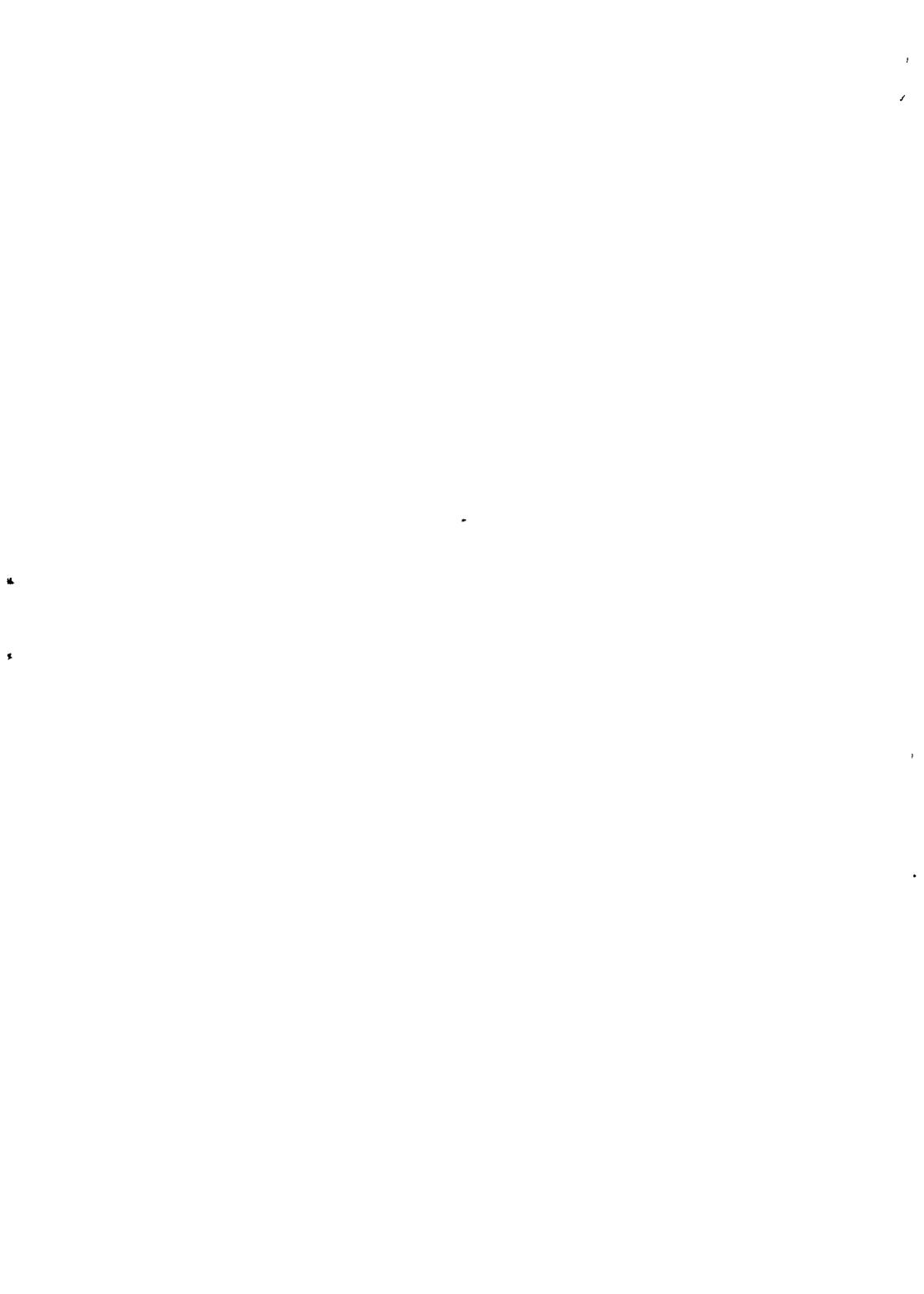
1. Осуществлено клонирование полноразмерного *elt*-оперона и Генов кодирующих отдельные субъединицы *eltA* и *eltB* термолabileного энтеротоксина *E. coli*.
2. Путём введения контрольной делеции в ген *eltA*, в положении 23-120 субъединицы, получен генно-инженерный токсоид, сохранивший иммуногенные детерминанты термолabileного токсина, но утративший его токсические свойства.
3. Получена генетическая конструкция на основе векторной плазмиды pSC101 и делетированного *elt*-оперона, кодирующая авирулентный иммуногенный токсоид.
4. На основе полученной конструкции и апатогенного штамма эшерихий сконструирован потенциальный вакцинный штамм для профилактики токсикоинфекций пушных зверей.
5. В опытах *in vivo* изучена возможность восстановления токсического фенотипа сконструированного штамма и доказана биологическая безопасность полученной конструкции и штамма в целом.

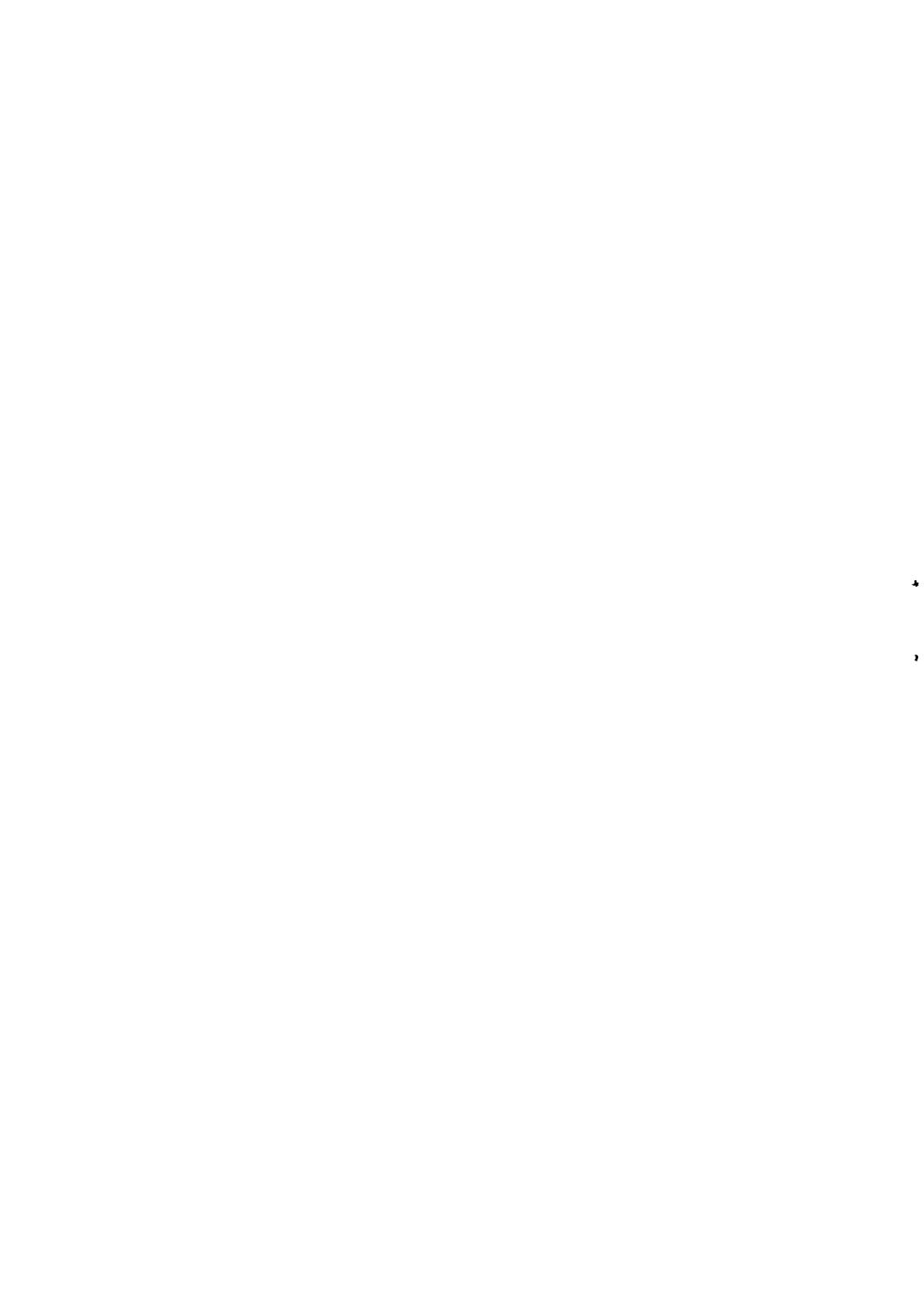
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Козловский Ю.Е., Гришина Л.Е., Тихонова Н.Б. Семейство ДНК-зондов для обнаружения генов токсинообразования в популяциях энтеробактерий // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии. Сб. науч. тр. / МГАВМВиБ им. К.И. Скрябина, 1997, с.73-77
2. Козловский Ю.Г., Серебряков С.Н., Плугина И.В., Барановская О.П., Тихонова Н.Б. Анализ токсигенности штаммов энтеробактерий изолированных в зверохозяйствах России // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2002, №3, с. 44-46.

3. Тихонова Н.Б., Козловский Ю.Е., Серебряков С.Н. Подходы к конструированию биологически безопасных антитоксических вакцин / Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Сб. науч. тр./ НИИ морфологии человека РАМН, 2003, с. 74-76.
- 4 Тихонова Н.Б., Плугина И.В., Емельяненко П.А., Тинаева Е.А., Балакирев Н.А., Серебряков С.Н., Козловский Ю.Е., Матевосян К.Ш., Пьянкова А.Н. Препараты с антитоксической активностью на основе резидентной микрофлоры// Международная научно-практическая конференция «Ветеринарная медицина – 2004», Феодосия, Меж. Тематический науч. сборник, 2004, №84, с. 857-860.
5. Козловский Ю.Е., Серебряков С.Н., Плугина И.В., Барановская О.П., Матевосян К.Ш., Тихонова Н.Б., Ефимов Б.А. Генетико-иммунологические особенности LT-подобных токсинов энтеробактерий. /Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Сб. науч. тр./ НИИ морфологии человека РАМН, 2002, с. 100-102

По заказу в печать 16.11.2004 Формат 60х90/16 объем
Печать цифровая Бумага "Performer"
Печ л 15 Тираж 100 экз Зак 142





#26656

РНБ Русский фонд

2006-4

843