

патогенов во взаимосвязанных местообитаниях все еще довольно редки, а тем более математическое моделирование этих процессов.

Цель: Предсказать выживание *S. enterica* Var Typhimurium во взаимосвязанных местообитаниях (экскрементах животных, почве, воде и растениях) и оценивать риск загрязнения энтеропатогенами растений томатов, как снаружи, так и внутри.

Методы: Суспензии GFP-меченной канамицин-устойчивой популяции *Salmonella* Typhimurium (10^5 – 10^9 КОЕ/мл) были внесены в корм или экскременты животных. Экскременты затем были смешаны с почвой или внесены в воду. После этого различные растения были посеяны в смесь экскременты – почва или были инокулированы водной суспензией *Salmonella* Typhimurium. Интервалы между перемещениями из одной среды обитания в следующую, различались от одной до нескольких недель для разных экспериментов. Регулярно, ежедневно или еженедельно определяли количество КОЕ GFP-меченой *Salmonella* в различных местообитаниях путем учета колоний на агаризованной LB среде с канамицином. В каждой пробе определяли и водорастворимый органический углерод (ВОУ). Была создана математическая модель, предсказывающая выживание *S. enterica* в разных средах обитания при последовательных перемещениях.

Результаты: Количество КОЕ *S. Typhimurium* уменьшалось волнообразно в соответствующих местообитаниях. Наблюдалось неожиданное увеличение численности популяций на некоторых растениях по сравнению со смесью экскременты – почва. Моделируемые кривые выживания *S. Typhimurium* также имели волнообразный характер, вполне удовлетворительно отражая экспериментальные данные. Выживание и рост патогена положительно коррелировали с содержанием ВОУ. Для некоторых растений выявлена более высокая плотность патогена на листьях по сравнению с корнями. *S. Typhimurium* был обнаружен внутри листьев и плодов томатов, однако риск внутренней контаминации листьев и плодов томатов был низким.

Заключение. *S. enterica* может циклически перемещаться через ряд последовательных местообитаний, выживая или увеличиваясь в численности при высоких концентрациях ВОУ с поддержанием популяционной плотности превышающей уровень численности необходимый для инфицирования человека. Некоторые части растений как среды обитания энтеропатогена – ризосфера и плоды являются благоприятными для размножения патогена и их можно рассматривать как резервуары.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА K'177L (P22) ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.

А.А. Варенцова¹, аспирант, А.С. Казакова², аспирант,

Н.Н. Власова³, доктор биологических наук

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук

Тел/факс.: 8(49243)6-21-25, VNIVViM@niiv.petush.elcom.ru

¹E-mail Staffilokokk@yandex.ru

²E-mail anna-kazakova85@mail.ru

³E-mail vlanany@yandex.ru

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), клонирование генов, K'177L (p22), сиквенс.

Статья посвящена клонированию полноразмерного гена K'177L вируса АЧС в прокариотическом векторе для последующего конструирования рекомбинантного продуцента p22. Специфич-

Введение.

АЧС - вирусная инфекция, характеризующаяся высокой контагиозностью и летальностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. Обладает высокой степенью патогенности (смертность приближается к 100%), способна в короткие сроки (3-5 мес.) привести к огромным экономическим потерям в свиноводстве или даже полной депопуляции свиней.

В 2000г. возбудитель отнесен к семейству *Asfarviridae* [3]. Геном вируса представлен двуспиральной ДНК, размером от 170 до 190 т.п.о., имеет до 167 открытых рамок считывания [1]. В 2007 году АЧС зарегистрирована в Грузии, с 2008 года вспышки ее регистрируются на территории Российской Федерации. Актуальной является проблема совершенствования средств и методов диагностики данного вируса. Использование рекомбинантных технологий увеличивает безопасность приготовления препаратов специфических антигенов, а синтезируемые генно-инженерные белки устойчивы при хранении и стандартны в применении.

Анализ данных литературы показал, что р22 является одним из основных диагностически значимых белков вируса АЧС. р22-ранний структурный белок с молекулярной массой 22 kDa, расположенный во внешней мембране вирусной частицы. Белок содержит гидрофобный регион на N-конце с характеристикой сигнального пептида и временно обнаруживается в плазматической мембране на ранних этапах вирусной инфекции [2]. Поскольку р22 является и ранним, и поверхностным белком, то целесообразность его использования в диагностических реакциях очевидна [4].

Целью нашего исследования было клонирование полноразмерного гена K'177L вируса АЧС в прокариотическом векторе для последующего конструирования рекомбинантного продуцента р22.

Материалы и методы исследований.

В качестве вектора для клонирования нами была выбрана многокопийная плаزمиды рTZ57R/T, а носителя конструкции – компетентные клетки *E.coli* штамма XL-1 (Promega).

Подбор праймеров, фланкирующих ген K'177L (р22), осуществляли с использованием программ BioEdit 6.0 и Oligo 6 на основе анализа опубликованных в GenBank первичных последовательностей геномов изолятов возбудителя АЧС, проверив их в программе BLASTn на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Сиквенс проводился в ГНУ ВНИВВиМ Малоголовкиным А.С.

Для постановки ПЦР использовали: Taq- и Pfu- ДНК-полимеразы, буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5мМ MgCl_2 , смесь трифосфатов 0,125мМ, (Fermentas), праймеры, фланкирующие ген K'177L (по 10пМ каждого). В качестве матрицы для получения и накопления ПЦР-продукта использовали ДНК вируса АЧС штамма Magadi (100 мкг/мл) и штамма Kongo-73 (100 мкг/мл).

Температуру отжига праймеров подбирали постановкой реакции с градиентом температур от 42 до 62°C на приборе «Терцик» (ДНК-Технологии, Россия). Размер амплифицированного фрагмента – 755 п.о. Режим ПЦР: предварительная денатурация при 95°C-5мин × 1цикл; денатурация - 95°C-30с, отжиг - 52°C-30с, элонгация - 72°C-1 мин × 30 циклов; заключительная элонгация при 72°C-5мин × 1цикл. Учет результатов проводили методом электрофоретического детектирования в 1,5 %-ном агарозном геле с бромистым этидием.

Для очистки ПЦР-продукта от агарозного геля использовали Набор реагентов для извлечения ДНК из агарозных гелей (Fermentas).

Лигирование проводили с использованием 5 е.а. T4 ДНК-лигазы (Fermentas) при 6°C в течение 16 часов.

В работе использовали ряд молекулярно-биологических методов - ПЦР, клонирование в прокариотическом векторе, выделение нуклеиновой кислоты, рестрикционный анализ[5].

Результаты исследований и их обсуждение.

Для клонирования последовательности гена K'177L штамма Kongo-73 нами были проанализированы профили гидрофильности по алгоритму Norr и Woods. Согласно этому алгоритму ген K'177L

содержит гидрофобный регион на N- конце с характеристикой сигнального пептида в участке с 1 по 32-ю аминокислоту (Рисунок 1). Данная область гена К'177L является наиболее консервативной.

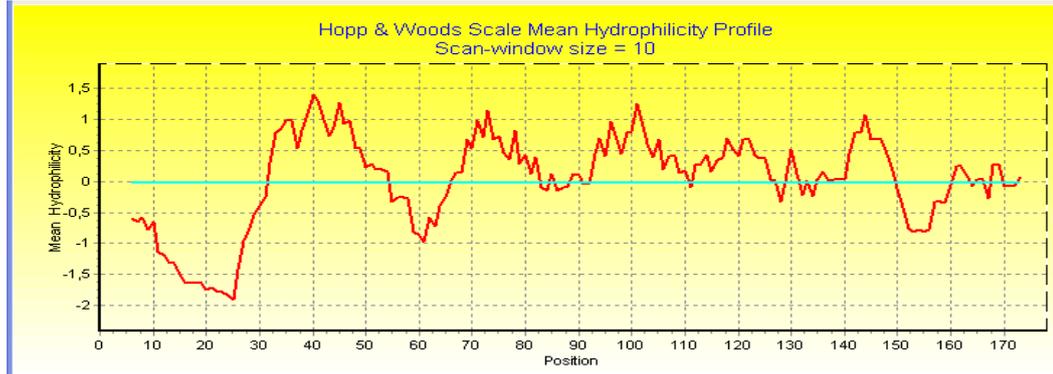
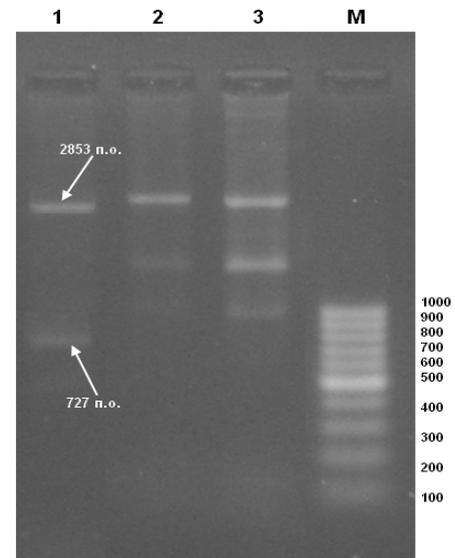
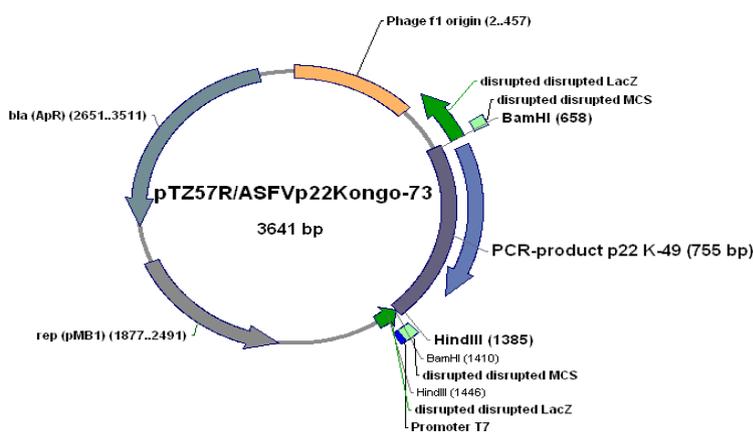


Рис.1. - Профиль гидрофильности полипептида p22 по алгоритму Hopp и Woods.

Для клонирования был накоплен и в последствие очищен от агарозного геля ПЦР-продукт полноразмерного гена К'177L (755 п.о.), кодирующего белок p22 вируса АЧС штамма Magadi и Kongo-73. После проведения лигирования смесью трансфицировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL-1. Получили 3 клона со встройкой гена К'177L штамма Magadi и 2 клона с геном К'177L штамма Kongo-73, из которых отобрали по одному к каждому штамму. Проверили их однородность, сделав посев штрихом на 1,8% SOB-агаре с ампициллином (100 мкг/мл) в присутствии IPTG и X-Gal.

Далее рекомбинантные клоны выращивали в жидкой питательной среде SOB с ампициллином, затем из бактериальной культуры выделяли плазмидную ДНК [5] и определяли ориентацию встройки в плазмиде. Рестрикцию проводили по сайтам *Bam*HI и *Hind*III одновременно в буфере E (Promega) в течение 2 часов при температуре +37°C. Данные сайты находятся в последовательности полилинкера плазмиды pTZ57R и в последовательности прямого (*Bam*HI) и обратного (*Hind*III) праймеров. В электрофореграмме рестрицированной плазмиды клона выявлялось 2 видимых фрагмента: один – 727 п.о., второй – 2853 п.о., что соответствует встройке и телу плазмиды pTZ57R соответственно. Фрагменты размером 25 п.о. и 36 п.о., также полученные в результате рестрикции на электрофореграмме не



А

Б

Рис. 2. - А. Схема рекомбинантной плазмиды pTZ57R/ASFVp22Kongo-73.

Б. Электрофореграмма разделения продуктов рестрикции плазмиды pTZ57R/ASFVp22Kongo-73 по сайтам *Bam*HI и *Hind*III: 1- pTZ57R/ASFVp22Kongo-73 /*Bam*HI/*Hind*III; 2, 3 - pTZ57R/ASFVp22Kongo-73 не рестрицированная; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

выявляются. Структура рекомбинантной плазмиды рTZ57R/ASFVp22Kongo-73 и электрофоретический анализ продуктов рестрикции клона представлены на Рисунке 2.

Специфичность встройки клонов рTZ57R/ASFVp22Kongo-73 и рTZ57R/ASFVp22Magadi определяли методом ПЦР. В качестве матрицы использовали обработанную рестриктазой EcoRI плазмиду. В электрофореграмме выявляли специфические продукты амплификации, соответствующие положительному контролю на уровне 755 п.о.

Нуклеотидную последовательность встройки К'177L штамма Kongo-73 вируса АЧС определяли секвенированием по Сэнгеру (Рисунок 3). Сиквенс К'177L штамма Kongo-73 в GenBank не опубликован. Максимальная степень гомологии 97% установлена с последовательностями гена К'177L штамма E75, Georgia 2007, Benin 97/1, Mkuzi 1979 и E70.

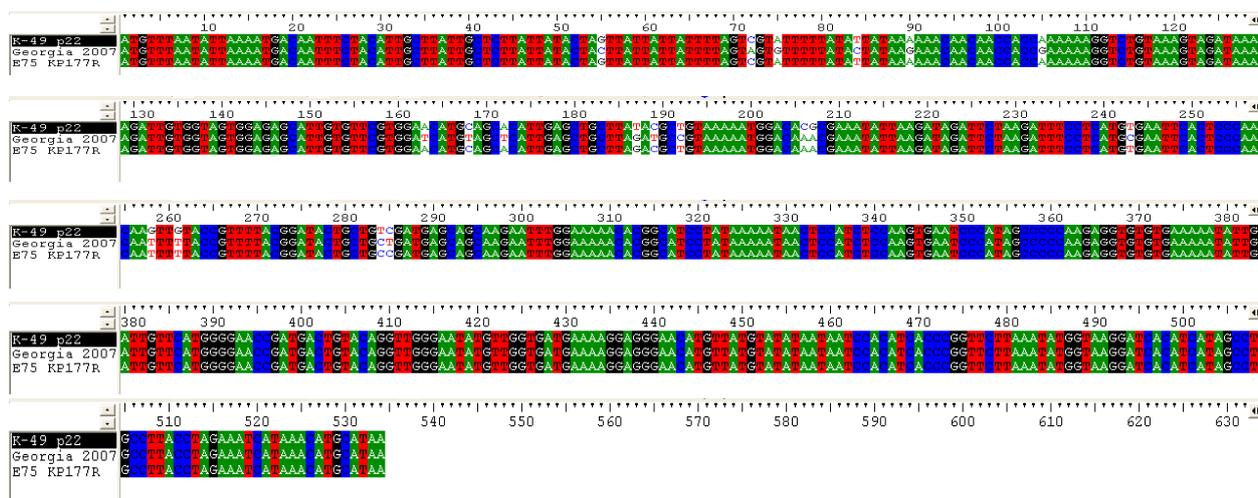


Рис. 3. - Нуклеотидные последовательности гена К'177L (p22) штаммов Kongo-73, E75, Georgia 2007 вируса АЧС.

Заключение.

В результате проведенных исследований сконструированы рекомбинантные плазмиды, несущие последовательность гена К'177L, кодирующего p22 штамма Magadi и штамма Kongo-73, пригодные для последующей разработки рекомбинантного продуцента гликопротеина p22. Впервые определена нуклеотидная последовательность ДНК гена К'177L (p22) штамма Kongo-73. Клонированная последовательность соответствует таковой К'177L вируса АЧС и максимальная степень гомологии 97% наблюдается с аналогичным геном штаммов Georgia 2007, E75, Benin 97/1, Mkuzi 1979 и E70.

Библиографический список.

1. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus/ R.J. Yanez, J.M. Rodriguez, M.L. Nogal, L. Yuste, C. Enriquez, J.F. Rodriguez, E. Vinuela// Virology. – 1995. – Vol. 208. – P. 249-278.
2. Camacho, A., Vinuela, E. Protein p22 of african swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells/ A. Camacho, E. Vinuela// Virology. – 1991. - № 181. – P. 251-257.
3. Family Asfarviridae. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses/ L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano, D.L. Rock, E. Vinuela, P.J. Wilkinson; edited by M.H.V Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L Bishop, E.B. Carestens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B.F.A. Wickner, C.M. Murphy, D.H.L. Fauquet, S.A. Bishop, A.W. Ghabrial, G.P. Jarvis, M.D. Martelli [et al.]// Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – Academic Press. – San

Diego, 2000. – P. 159-165.

4. General morphology and capsid fine structure of african swine fever virus particles/ J.L. Carrascosa, J.M. Carazo, A.L. Carrascosa et al.// *Virology*. – 1984. - № 132. – P. 160-172.

5. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*/ T. Maniatis, E.F. Fritsch, S. Sambrooks// Cold Spring Harbor Laboratory. – Cold Spring Harbor, New York, 2006.

УДК 619:579

ВЫДЕЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS FLUARESCENS*.

Викторов Д.А., аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Артамонов А.М. соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА,

Богданов И.И. к в н, доцент УГСХА

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии УГСХА, г. Ульяновск.

Pseudomonas fluorescens выделяют главным образом из недоброкачественных пищевых продуктов (яйца, мясо, рыба, молоко), что указывает на роль данных бактерий в порче пищевых продовольственных товаров и сырья. Могут быть выделены из клинического материала (Сидоров М.А., 1995). Является возбудителем псевдомоноза и лепидортоза прудовых рыб.

Наряду с другими видами бактерий неферментирующей группы, способны к биодegradации различных углеводов, что придаёт *Pseudomonas fluorescens* важное практическое значение при очистке почвы, воды и сточных вод промышленных предприятий от загрязнений нефтепродуктами. Особенно актуально применение психрофильной бактерии *Pseudomonas fluorescens* с этой целью в северных регионах страны при температуре 3-15°C (Биттеева М.Б., 1998).

Широко населяет ризосферу и способствует значительному улучшению роста и развития растений, являясь потенциальным объектом агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а так же биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений (Schroth M.N., 1982).

Целью исследования является разработка схемы выделения и системы тестов для идентификации *Pseudomonas fluorescens*. Данная цель достигалась путём предварительного изучения биологических свойств референс-штаммов *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525 IV-96), *Pseudomonas putida* (№901 VI-89; ATCC 12633 IV-87), *Pseudomonas aeruginosa* (128, 1677) полученных из музея кафедры микробиологии УГСХА, подбора имеющихся тестов и конструирования оригинальных питательных сред.

Результаты тестов, характерные для исследованных референс-штаммов бактерий рода *Pseudomonas* приведены в таблице 1.

Таблица 1. - Результаты тестов, характерные для референс-штаммов бактерий рода *Pseudomonas*

Тест	Ps.fluo-rescens 13525	Ps.putida №901	Ps.putida 12633	Ps.aerugi-nosa 128	Ps.aerugi-nosa 1677
Рост на бульоне с сукцинатом натрия	+	+	+	+	+
Реакция на элективной среде с глюкозой и фурадоном	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария	-	-	-	-	-