

О НОВОМ ТИПЕ АДГЕЗИНА У ЭНТЕРОБАКТЕРИИ

А. А. ДАЛАЯН, И. М. АРУТЮНЯН, С. Т. МНАЦАКЯНОВ, Ю. Т. АЛЕКСАНИЯ

НИИ эпидемиологии, вирусологии и мед. паразитологии
им. А. Б. Алексаняна МЗ Армении*Энтеробактерии—адгезины.*

Еще в 1966 г. были получены данные о связанном с фимбриями антигене K88, выделенном из многих энтеротоксигенных кишечных палочек, вызывающих диарею поросят [5]. В 1975 году был описан еще один тип фимбрий, ассоциированных с антигеном K99, общим для штаммов *E. coli*—возбудителей диарей телят, ягнят и поросят [6]. В том же 1975 году при анализе штаммов *E. coli*, выделенных при диареях у туристов, вернувшихся из путешествий по Мексике, Бангладеш, Гондурасу, Кении, Марокко, был обнаружен связанный с фимбриями антиген, названный антигеном фактора колонизации (СFAM), и установлена его роль в прикреплении обладающих им бактерий к энтероцитам крольчат-сосунков [3]. В 1978 г. был идентифицирован еще один фактор адгезии у штаммов *E. coli*, вызывающих диарею у человека—СFAM, отличающийся от СFAM серологическими и гемагглютинационными свойствами [4]. В последующие годы сочетанное применение РГА, серологического анализа и ряда других методик привело к выявлению дополнительных адгезинов.

Реакция гемагглютинации широко используется для выявления различных типов адгезинов, тогда как серологические методы применяются значительно реже, что связано с отсутствием коммерческих диагностических сывороток. Широкое использование эритроцитов морской свинки, человека, лошади, быка, барана, свиньи, цыпленка, кролика, обезьяны способствовало созданию соответствующих тест-наборов для определения 19 типов адгезинов [1]. Однако, по-видимому, выделенными типами адгезинов не исчерпывается их многообразие. Применение эритроцитов других видов животных, по всей вероятности, может привести к выявлению новых типов адгезинов. Выяснению этого вопроса посвящена настоящая работа.

Материал и методика. В РГА использовали эритроциты морской свинки, человека, лошади, быка, барана, свиньи, цыпленка, кролика, а также ранее неиспользованные эритроциты конины и козы. С помощью РГА было проверено 605 штаммов различных типов энтеробактерий, выделенных при диарейных заболеваниях детей раннего возраста.

Для постановки эксперимента были применены антисыворотки к известным стандартным штаммам энтеробактерий с антигенами СFAM/I, СFAM/II, СFAM/III и к штамму, выделенному нами от ребенка, больного диареей (антиген X). Кроликов иммунизировали вышеуказанными штаммами энтеробактерий. Для получения антисыворотки к каждому штамму использовали по 4 кролика, каждый массой 2 кг. Для иммунизации

Сокращения: РГА—реакция гемагглютинации, Д-МРГА—Д-машинорезистентная реакция гемагглютинации.

использовали бактериальную суспензию в концентрации 1 млрд в 1 мл физиологического раствора. Весь курс иммунизации состоял из 4 внутривенных инъекций антигена в возрастающих дозах с интервалами в 4—5 дней между введениями (0,5; 1; 2; 3 мл). На 9—12 день после иммунизации у кроликов забирали кровь и получали дитисыворотки.

Для обнаружения нового типа адгезина была применена реакция Каstellани [2]

Результаты и обсуждение. В процессе работы был выделен штамм, дававший положительную Д-МРГА с эритроцитами кошки, козы, и в то же время отрицательную Д-МРГА с эритроцитами человека, быка, барана, кролика, свиньи, цыпленка. Штаммы с подобным типом реакции гемагглютинации выделялись при острых кишечных заболеваниях неустановленной этиологии у детей раннего возраста ($18,3 \pm 1,6\%$). К указанному штамму была приготовлена антисыворотка по приведенной методике, и эта культура была проверена в реакции Каstellани.

Первоначально определяли титр полученных сывороток. Было установлено, что титр сывороток к антигенам СFA/II и СFA/III составлял 1:1280, а к антигенам СFA/III и X—1:2560. В дальнейшем испытуемые культуры для получения биомассы выращивали на 10 косяках простого агара, смывали физиологическим раствором, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и полученную биомассу использовали в экспериментах.

Испытуемые в разведении 1:100 сыворотки в количестве 5 мл смешивали с биомассой одной гомологичной и трех гетерологичных культур. Полученные смеси инкубировали при 37° в течение 6 ч и затем выдерживали при $+4^{\circ}$ 20 часов.

После истощения смеси центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин и ставили объемную реакцию агглютинации с гомологичными и гетерологичными культурами.

Истощенные антисыворотки не агглютинировались антигенами гомологичных культур. В то же время антисыворотка к антигену X, истощенная гетерологичными эталонными штаммами СFA/II, СFA/III, СFA/III, продолжала агглютинировать гомологичный штамм. Остаток полученной сыворотки после истощения гетерологичными антигенами был проверен на наличие антител к антигену X (титр 1:2560) и использован в дальнейшей работе.

Полученные результаты показывают, что выявленный нами новый адгезин действительно является новым типом антигена адгезина, не входящим в схему адгезинотипов, приводимую Даллиным и Фишем [1].

Мы далеки от мысли, что существующей схемой адгезинов и новым типом адгезина, выявленного нами, исчерпывается набор фимбриальных антигенов адгезина. Следует полагать, что дальнейшие исследования приведут к выявлению новых типов адгезинов и откроют возможности для выяснения механизмов процесса адгезии энтеробактерий к эпителию кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даллин М. В., Фиш Н. Г. Итоги науки и техники. 1965.
2. Лебедев М. И. Руководство к практическим занятиям по мед. микробиологии. М., 1963.

3. Evans D. G., Silver R. P., Evans D. Y., Chas D. G., Gorbach S. L. *Infect. and Immun.*, 12, 656—667, 1973.
 4. Evans D. G., Evans D. Y. *Infect. and Immun.*, 21, 2, 637—647, 1975.
 5. Zrskov I., Zrskov P. J. *Bacteriol.*, 91, 1, 69—73, 1966.
 6. Zrskov I., Zrskov P. J. *Med. Microbiol. and Immunol.*, 163, 1, 99—100, 1973.
- Поступило 26.III 1990 г.

МЕТОД МИКРОИНЪЕКЦИИ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В ИКРУ РЫБ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Г. К. ШАХБАЗЯН, И. Д. КАЗАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

ДНК экзогенная—икра рыб—трансгены

Для решения как фундаментальных, так и прикладных биотехнологических задач все большее распространение получает трансгенная технология. Трансгены часто экспрессируются и вызывают изменения в системе тканевой специфичности, физиологических реакциях и иногда во всей программе развития организма. Таким образом, открывается путь к изучению функциональной роли и регуляции экспрессии клонированных генов на уровне целого организма.

Разработан целый ряд методик, позволяющих вводить различные последовательности ДНК в клетки зародышевого пути животных. К одному из наиболее распространенных из них относится метод микроинъекций генетического материала в зиготы и ранние эмбрионы различных животных [3, 5].

Для микроинъекций используются рекомбинантные конструкции, содержащие индивидуальные гены, которые помещаются под контроль различных гетерологических промоторов, обеспечивающих тканеспецифичность экспрессии генов.

Целью настоящей работы явилось изучение интеграции и экспрессии экзогенного генетического материала.

Привлекательными моделями для подобного рода работ, ввиду достаточной изученности эмбриогенеза и сравнительной простоты методических подходов, являются рыбы [2, 4].

Материал и методика. Работу проводили на зрелой икре карпа (*Cyprinidae*), которую получали в ответ на инъекции самкам гормона гонадотропина. Яйцеклетки осеменяли суспензией спермы при 20° и помещали в аппарат на обескелешивание. В оплодотворенное яйцо карпа микроинъектировали рекомбинантную молекулу, которая состояла из слитного гена гомосеринкиназы и треоинисинтетазы под контролем промотора гена металлотенонина мыши.

Рекомбинантную ДНК выделяли из *E. coli* С 600 методом щелочного лизиса [1] и очищали 9М LiCl с последующим осаждением ДНК полиэтиленгликолем 6000. Дальнейшую очистку проводили на колонке с сефарозой 4В. Суперскрученную ДНК линейризовали при помощи рестриктазы KpnI и пересаждали этанолом. Препарат растворяли в 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 0,1 мМ ЭДТА, после чего использовали для микроинъекций.