

ЗАЙНУЛЛИН

Ленар Ильгизарович

**ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА
ПОЛИПЕПТИДОВ САЛЬМОНЕЛЛ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ИХ ГЕНОМОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИЕЙ**

03.00.07 – микробиология

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2003

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте (г. Казань).

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РТ,
доктор ветеринарных наук, профессор
Алимов Азат Миргасимович

Научный консультант: доктор ветеринарных наук
Фаизов Тагир Хадиевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Филимонова Мария Николаевна
доктор ветеринарных наук
Галиуллин Альберт Камилович

Ведущее учреждение: Казанский институт биохимии
и биофизики КНЦ РАН

Защита состоится “ 27 ” января 2004 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте (420075, г. Казань, Научный городок – 2, ВНИВИ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань).

Автореферат разослан “ 27 ” декабря 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
ст. научный сотрудник



В.И. Степанов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Инфекционные болезни наносят существенный экономический ущерб животноводству. Одной из наиболее распространенных остается сальмонеллез, который вызывает заболевание и падеж молодняка сельскохозяйственных животных и представляет определенную опасность для здоровья людей [Токаревич К.Н., 1979; Ахмедов А.М., 1983; Покровский В.И., Ющук Н.Д., 1986; Шустер Б.Ю., 1987; Храповицкий А.Н., 1990; Куликовский А.В., 1991; Табаева А.А. и др., 2001].

Сальмонеллы относятся к числу убикваторных микроорганизмов [Пухлякова Г.Л., 1994]. К заболеванию восприимчивы млекопитающие, птицы, холоднокровные и даже насекомые. Переболевшие животные и люди длительный период времени остаются носителями и могут инфицировать окружающую среду.

Наличие широкого круга естественных носителей (млекопитающих, птиц, рептилий и человека), длительное пребывание в заражённом организме, высокая устойчивость против неблагоприятных условий внешней среды обусловлены большой пластичностью биологических свойств этих микроорганизмов [Волина Е.Г., 1999; Бошнаков Р.Х. и др., 2001].

Кроме того, из-за широкого применения живых вакцин возникает необходимость идентификации вакцинных и эпизоотических штаммов.

Дифференциацию и идентификацию сальмонелл осуществляют на основании культурально-биохимических, морфологических свойств и типоспецифическими сыворотками, биопробой на лабораторных животных, что является весьма трудоемким.

Распространенность, наносимый ущерб, угроза здоровью людей и сложность диагностики, определяет необходимость разработки более совершенных методов идентификации и дифференциации сальмонелл. В связи с этим представляет определенный интерес исследование геномов возбудителей сальмонеллеза, отличающихся по антигенным и вирулентным свойствам, с использованием современных методов молекулярной биологии и иммунохимии.

1.2. Цель и задачи исследований. Целью работы явилось изучение электрофоретических и антигенных свойств полипептидов сальмонелл, отличающихся по антигенным и вирулентным свойствам, индикация и идентификация их геномов полимеразной цепной реакцией. Для достижения данной цели решали следующие задачи:

1. Изучить полипептидный состав разных штаммов сальмонелл.
2. Определить антигенные свойства полипептидов сальмонелл, различных сероваров.
3. Провести геноидентификацию штаммов сальмонелл методами ПЦР и RAPD-ПЦР.

1.3. Научная новизна работы. Впервые методами диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН и иммуноблоттинга установлены сходства и различия в качественном и количественном составе полипептидов и выявлены специфические антигенно-активные фракции в зависимости от антигенных и вирулентных особенностей штаммов.

Разработан фенольно-детергентный метод выделения тотальной ДНК сальмонелл, позволяющий получать чистые, нативные и концентрированные препараты нуклеиновых кислот возбудителя, на который подана заявка на изобретение (приоритетная справка от 08.04.2002г. №2002109103/13 (009486)).

Создан ПЦР-диагностикум со специфичными праймерами, позволяющий проводить экспресс-индикацию сальмонелл.

Разработан эффективный вариант ПЦР с произвольными праймерами для геноидентификации представителей рода *Salmonella*.

1.4. Практическая ценность. Результаты проведенных исследований рекомендуется учитывать при индикации и дифференциации штаммов возбудителей сальмонеллеза. Выявленные антигенно-активные фракции могут быть использованы для получения высокоспецифичных антигенов и сывороток при создании более совершенных серологических тест-систем диагностики сальмонеллеза.

1.5. Апробация работы. Материалы диссертации доложены на:

- III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 26 июня – 1 июля 2002);
- Научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (Казань, 2002);
- Международной научно-практической конференции по актуальным проблемам болезней молодняка в современных условиях (Воронеж, 2002);
- Международной научно-практической конференции ВНИИВВиМ (Покров, 16-18 апреля 2002);
- IV Всероссийской научно-практической конференции “Генодиагностика инфекционных заболеваний” (Москва, 2002);
- Международной научно-производственной конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса, посвященной 130-летию КГАВМ им. Н.Э. Баумана (Казань, 30-31 мая 2003);
- Международной научно-практической конференции по актуальным проблемам ветеринарной медицины, посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины УГСХА (Ульяновск, 25-26 сентября 2003);
- ежегодных заседаниях ученого совета ВНИВИ при обсуждении отчетов о НИР (2002, 2003 гг.).

1.6. Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 работ. Разработаны и утверждены директором ВНИВИ “Методические рекомендации по определению электрофоретических и антигенных свойств полипептидов сальмонелл методами диск-электрофореза в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинга”, “Методические рекомендации по индикации сальмонелл методом ПЦР”.

1.7. Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- Электрофоретические профили и антигенные свойства полипептидов сальмонелл варьируют в зависимости от их антигенных и вирулентных особенностей.
- Фенольно-детергентный метод выделения хромосомальной ДНК сальмонелл позволяет получать нативные и чистые препараты нуклеиновых кислот возбудителей, пригодные для молекулярно-генетических исследований.
- Индикация и геноидентификация сальмонелл методом ПЦР со специфичными и произвольными праймерами.

1.8. Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 157 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические предложения, библиографический список использованной литературы (248 источников, в том числе 122 иностранных, 6 ссылок на сайты Internet) и приложения. Диссертация содержит 15 таблиц и 17 иллюстраций.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории биохимического и молекулярного анализа биологических средств в объектах ветнадзора Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань) в период с 2000 по 2003 годы.

В экспериментальной работе использовались следующие микроорганизмы: *Salmonella choleraesuis* – шт. 370, TC-177, *Salmonella typhimurium* – шт. 371, 3, *Salmonella enteritidis* – шт. 418, *Yersinia enterocolitica* – шт. “Шойбулакский”, *Escherichia coli* – шт. 1257, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. onarimon* – патогенные изоляты сальмонелл, выделенные в районах Республики Татарстан и любезно предоставленные нам кандидатом ветеринарных наук, с.н.с. Р.М. Ахмадеевым.

Все штаммы микроорганизмов обладали типичными для них культурально-морфологическими, биохимическими, антигенными и биологическими свойствами.

Сальмонелл культивировали на мясо-пептонном бульоне (МПБ, ГОСТ 29730-75) и мясо-пептонном агаре (МПА, ТУ 46-12-252-78).

Концентрацию микробных клеток определяли по оптической плотности суспензии микроорганизмов, которую устанавливали колориметрически на КФК-2 при длине волны 440 нм, с использованием калибровочного графика, построенного в соответствии со стеклянным оптическим стандартом ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Изолированные структуры микробной клетки (жгутики, клеточная стенка) получали методом механической дезинтеграции на конструкции, предложенной Л.М. Евстюговым-Бабаевым и М.И. Жванецкой [Станиславский Е.С., 1971] с последующей их очисткой ультрацентрифугированием.

Электрофоретические свойства полипептидов сальмонелл исследовали методом диск-электрофореза [Ornstein L., 1964; Маурер Г., 1971] в присутствии додецилсульфата натрия [Laemmli U., 1970].

Пробы для электрофоретического разделения обрабатывали лизирующей смесью (трис(гидроксиметил)аминометан – 62,5 мМ, рН 6,8; с содержанием 2% додецилсульфата натрия, 5% 2-меркаптоэтанола), тщательно пипетируя автоматической микропипеткой. Затем пробы прогревали на водяной бане при 100 °С в течение 5 минут. Концентрацию белка в пробах после обработки лизирующей смесью определяли спектрофотометрически на сканирующем спектрофотометре Perkin Elmer 402, выравнивая ее до одинаковых показателей. Перед нанесением в лунки геля к пробам приливали глицерин с бромфеноловым синим до конечной концентрации 10% и 0,001% соответственно. В качестве белков – стандартов молекулярных масс использовали калибровочный набор белков для электрофореза фирмы Pharmacia Biotech (USA).

Пробы в лунки концентрирующего геля наносили в количестве 100-150 мкг по белку. До вхождения проб в зону разделяющего геля сила тока составляла не более 40 мА. Дальнейший электрофорез проводили при силе тока 100 мА в течение 2,5-3-х часов, с постоянным напряжением 160-180 В.

Разделенные в полиакриламидном геле фракции полипептидов выявляли окраской Кумасси ярко-голубым R-250 или импрегнацией серебром [Гребиножко Э.И. и др., 1986].

Антигенные свойства полипептидов микробных клеток и изолированных клеточных структур изучали методом иммуноблоттинга. При этом руководствовались соответствующими методиками [Towbin H. et al., 1979; Gershoni J. et al., 1983; Tsang V. et al., 1983] с нашими модификациями.

При постановке иммуноблоттинга электрофоретический перенос разделенных полипептидных фракций с пластин полиакриламидного геля на твердофазный носитель осуществляли с помощью графитовых пластин, диаметром 200 мм в буфере для переноса (0,025 М трис(гидроксиметил)аминометан рН 7,8-8,4; 0,192 М глицин; метиловый спирт – 20% по объему). В качестве твёрдофазного носителя применяли нитроцеллюлозные фильтры с величиной пор 0,22 мкм (Millipor, USA). Перенос макромолекул проводили в течение 3-3,5 часов при силе тока 250-300 мА, постоянном напряжении 100 В и размерах полиакриламидного геля $\approx 12 \times 12$ см.

Листы нитроцеллюлозы с иммобилизованными макромолекулами подвергали иммунохимическому анализу противосальмонеллезными гипериммунными кроличьими сыворотками, выявляя иммунные комплексы антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом против Ig G кролика (МТО “Инициатива”, г. Щелково) с 3,3'-диаминобензидином тетрагидрохлоридом в качестве субстрата (50 мг 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида; 10 мкл 30%-ной H_2O_2 ; 50 мМ трис(гидроксиметил)аминометан, рН 7,4 – до 100 мл).

Для получения противосальмонеллезных гипериммунных кроличьих сывороток кроликов иммунизировали внутривенным введением инактивирован-

ных фенолом 1 млрд. суспензии сальмонелл на 0,89% растворе хлористого натрия. Гипериммунизация проводилась по следующей схеме: первое введение – 0,5 мл, второе введение – 1 мл, третье введение – 2 мл, четвертое – 2 мл, интервал между введениями – 4 дня. Через 30 дней цикл повторяли, после чего на 5-й день проводили тотальное обескровливание животных.

Титры противосальмонеллезных антител в сыворотках крови определяли в РА гомологичными и гетерологичными антигенами.

Полученные результаты (окрашенные гели и блоты) обрабатывали математически, с использованием программно-аппаратного комплекса на базе компьютера IBM PC, слайд-сканера Sharp JX-330 и программы ImageMaster 1D Prime v.3.00 (*Amersham Pharmacia biotech*, © 1996-1998).

Выделение ДНК сальмонелл проводили разработанным нами фенольно-детергентным методом, эффективность которого была установлена на основании сравнительного изучения с тремя методами: метод щелочного лизиса по Birnboim и Doly [Birnboim H., Doly J., 1979], метод Marmur [Marmur J., 1961], модифицированный метод Gafford и Randall [Садриев А.Р. и др., 1999].

Спектрофотометрические характеристики препаратов ДНК определяли по отношениям оптической плотности при длине волны 260 нм и 280 нм на сканирующем спектрофотометре Perkin Elmer 402.

Хранение препаратов ДНК, выделенных всеми описанными методами осуществляли при минус 20°C.

Для ПЦР индикации представителей рода *Salmonella* в объектах ветеринарного надзора пробы искусственно контаминированного образца (5-10 г) или патматериала (печень, селезенка, легкие белой мыши) растирали в ступке с кварцевым песком до гомогенного состояния с добавлением, в зависимости от консистенции материала, небольшого количества стерильной дистиллированной воды.

Затем автоматической микропипеткой отбирали 5 мкл в микропробирку “Eppendorf” и суспензировали стерильной дистиллированной водой до объема 200 мкл. Подготовленные таким образом пробы обрабатывали по следующей схеме: к 200 мкл суспензии добавляли 10 М NaOH до конечной концентрации 0,2 М, тщательно пипетировали автоматической микропипеткой, добавляли 2 М tris-HCl (pH 7,8) до конечной концентрации 0,66 М и еще раз тщательно смешивали. После лизиса пробы десятикратно разводили дистиллированной водой и использовали для постановки ПЦР.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием реактивов производства НПО “СибЭнзим” (г. Новосибирск).

В качестве специфичных для рода *Salmonella* праймеров нами были использованы олигонуклеотиды, предложенные *Nguyen* с соавт. (1994) со следующей последовательностью:

NK1 5' - CAG TGG TGT CAT ATC ATT GCC -3'

NK2 5' - GTA AGA AGG TGC TTA TAC ATC TGC -3'

Эти праймеры, по данным авторов, фланкируют область гена *invA*, продукты экспрессии которого (протеины инвазии) обеспечивают проникновение

сальмонелл в организм через желудочно-кишечный тракт.

Реакционная смесь для праймеров NK1 и NK2 имела следующий состав: 5 мкл исследуемого материала, 60 мМ tris-HCl (pH 8,5), 2,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1% тритона X-100, 200 мкМ dNTPs, 0,9 мкМ каждого праймера и 0,625 ед. акт. Taq SE ДНК полимеразы. Режим амплификации представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Режим амплификации со специфичными праймерами NK1 и NK2

Температура (°C)	Время (мин)	Количество циклов
95	5	–
94	1	40
55	1	
74	2	
74	10	–

При постановке RAPD-PCR для дифференциации сальмонелл в качестве произвольных праймеров были опробованы олигонуклеотиды:

#128 5' - GCATATTCCG -3', #129 5' - GCGGTATAGT -3',

V1 5' - CCAGAGTCTACACCATAAC -3', V3 5' - AACGATCGCAGCGATGAC -3', сконструированные *Pudjiatmoko* с соавт. (1997).

Амплификацию полиморфных локусов ДНК (ПП-ПЦР) с отобранными произвольными праймерами (#128, #129, V1, V3) осуществляли по оптимизированным нами режимам.

ПЦР со специфичными и произвольными праймерами проводили в объеме 25 мкл на программируемом термоциклере «Логос-М». Компоненты реакционной смеси разливали в пробирки в следующей последовательности:

- деионизированная вода
- dNTPs смесь
- 10-кратный ПЦР буфер
- ДНК полимеразы
- Праймер(ы)
- Исследуемая проба

Тщательно перемешивали содержимое пробирок пипетированием, избегая вспенивания и образования аэрозолей.

Сверху на реакционную смесь наслаивали 30 мкл минерального масла.

При постановке ПЦР соблюдали регламент, нормы и требования предъявляемые к лабораториям ПЦР-анализа согласно “Методическим рекомендациям по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции” [Москва, 1995].

После проведения реакции продукты амплификации смешивали с буфером для нанесения проб (0,25% бромфенолового синего, 40% (вес/объем) сахарозы в H₂O) в соотношении 6:1. Полученную смесь вносили в лунки 2% агарозного геля, приготовленного на TAE буфере (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА,

pH 8,0) с содержанием бромистого этидия 0,5 мкг/мл и подвергали горизонтальному электрофорезу в ТАЕ буфере при напряжении 5 В/см в течение 1,5-2 часов [Маниатис Т. и др., 1984] с последующим просматриванием в УФ-трансиллюминаторе (290...330 нм) и фотографированием, используя оранжевый светофильтр. В качестве маркеров использовали препараты производства НПО "СибЭнзим" (г. Новосибирск) – *1 Kb ДНК-маркеры* с длинами фрагментов ДНК (Kb): 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 и *100 bp+1.5 Kb ДНК-маркеры* с длинами фрагментов ДНК (bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500.

Длину амплифицированных фрагментов определяли посредством компьютерного анализа программой ImageMaster 1D Prime.

Полученный цифровой материал обрабатывали с использованием принятых статистических методов [Лакин Г.Ф., 1990; Тукшаитов Р.Х., 2001].

2.2. Анализ полипептидов различных штаммов сальмонелл методом диск-электрофореза в ПААГ-ДСН

В предварительных опытах путем разгонки лизатов сальмонелл в однородных и градиентных системах была установлена наиболее высокая разрешающая способность разделения полипептидов в градиентном полиакриламидном геле с концентрацией мономеров 10-20%. Поэтому, сравнительное изучение полипептидных профилей сальмонелл проводили с использованием электрофореграмм, полученных в этой системе.

При разделении лизатов сальмонелл в градиенте концентрации ПААГ (10-20%) и окрашивании Кумасси ярко-голубым R-250 выявлялись от 32 до 41 полипептидных фракций с молекулярными массами от 12,6 до 227,6 кД. Основное количество полипептидов распределялось в пределах молекулярных масс от 20,1 до 94,0 кД, где у них обнаруживалось до 27 фракций: *S. choleraesuis* 370 – до 21 фракции, у *S. choleraesuis* TC-177 – 25 фракций, а у *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371 – 27 и 22 фракции, соответственно. Выявлялись, также различия в содержании белков между штаммами сальмонелл в зависимости от их вирулентности, и серовариантной принадлежности.

Для всех исследованных штаммов сальмонелл характерным являлось наличие крупно- и среднемолекулярных полипептидов в интервалах молекулярных масс 219-227 кД, 97-99 кД, 76-85 кД, 50-53 кД. Обнаруживались также сравнительно одинаковые по процентному содержанию полипептидные фракции в диапазоне молекулярных масс 28,0-37,0 кД.

У представителей серовара *S. choleraesuis* присутствовала фракция с молекулярной массой 149 кД, которая не обнаруживалась у *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371. Для представителей *S. enteritidis* и *S. typhimurium*, характерным являлось относительно равномерное распределение полипептидных фракций в диапазоне молекулярных масс 30-67 кД, а так же наличие 13 сравнительно сходных по молекулярной массе, но различающихся по процентному содержанию фракций (103,1-103,5 кД; 97,3-97,6 кД; 76,1-76,4 кД; 61,1-61,4 кД; 53,3-

53,5 кД; 41,0-41,4 кД; 31,3-31,4 кД; 29,0-29,3 кД; 22,2-22,4 кД; 20,3-20,5 кД; 18,5-18,9 кД; 18,0-18,1 кД; 16,6-16,7 кД).

Электрофоретические профили шт.370 (вирулентный) и шт.ТС-177 (вакцинный) характеризовались наличием 13 общих мажорных фракций с молекулярными массами 15,8; 17,5; 18,5; 20,5; 28,0; 29,0; 37,0; 42,0; 45,0; 50,0; 53,0; 149,0; 219,2 кД, при этом содержание каждой из этих фракций преобладало у штамма 370. В частности, у вирулентного штамма *S. choleraesuis* 370 концентрация полипептидов составляла 3,46; 6,69; 5,28; 5,59; 2,77; 2,92; 7,31; 6,69; 6,59; 5,29; 7,88; 5,78 и 2,60% соответственно, тогда как у вакцинного ТС-177 эти полипептиды обнаружены относительно в малом количестве (2,32; 3,46; 1,00; 4,84; 2,09; 1,93; 4,80; 4,99; 3,97; 1,30; 5,70; 0,15 и 2,42%).

Сравнительный анализ полипептидных профилей штаммов *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371 выявил у них четыре общие фракции с молекулярной массой 23,6; 37,0; 43,0 и 46,0 кД, содержание фракций 23,6 и 37,0 кД у них было практически одинаковое (5,67-5,69% и 3,40-3,42% соответственно). По молекулярной массе и содержанию остальных фракций штаммы различались между собой. У *S. typhimurium* 371 не обнаруживались низкомолекулярные фракции с молекулярными массами менее 16,0 кД, выявляемые у представителей *S. choleraesuis* и *S. enteritidis*. Штамм *S. typhimurium* 371 имел сходство с обоими представителями *S. choleraesuis* (шт. 370 и шт. ТС-177) по трем полипептидным фракциям – 18,5; 37,0 и 219,2 кД, а с электрофоретическим профилем *S. choleraesuis* ТС-177 – еще по четырем полипептидам с молекулярными массами 23,6; 24,9; 76,4 и 88,4 кД.

С целью повышения разрешающей способности выбранной разделяющей системы ПААГ и улучшения качества получаемых электрофореграмм нами был использован метод импрегнации серебром.

Этот метод окраски позволил выявить до 49 фракций в диапазоне молекулярных масс от 12,4 до 238,9 кД. Можно отметить то, что у всех исследованных сальмонелл при импрегнации азотнокислым серебром наблюдается наличие высокомолекулярных полипептидов, имеющих молекулярную массу от 219,0 до 238,9 кД. Наиболее четко выявлялись дополнительные фракции в зонах молекулярных масс от 12 до 22 и от 30 до 100 кД. Этот метод окраски позволял обнаруживать дополнительно от 8 до 16 полипептидных фракций у исследуемых штаммов сальмонелл.

При окраске азотнокислым серебром в районе молекулярных масс 43-240 кД у *S. choleraesuis* 370 выявлялось 9 дополнительных полипептидных фракций, у *S. choleraesuis* ТС-177 – 6, у штаммов *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371 – по 7. Данным методом окраски у всех изученных штаммов сальмонелл нам удалось обнаружить дополнительные высокомолекулярные фракции, находящиеся в диапазоне молекулярных масс 90-240 кД, не выявляемые при окраске Кумасси ярко-голубым R-250.

Анализ процентного содержания белковых фракций после окраски азотнокислым серебром показал, что количественное содержание высокомолекулярных фракций с молекулярными массами более 215 кД колеблется от 2,42 до

6,23%, а у низкомолекулярных полипептидных фракций процентное содержание составляет от 0,02 до 9,05%.

Обобщая результаты проведенных исследований, можно отметить, что фракционированием общего лизата сальмонелл разных серовариантов и штаммов диск-электрофорезом в ПААГ-ДСН в подобранной разделяющей системе установлены серовариантные и межштаммовые отличия в качественном и количественном составе белковых фракций.

2.3. Изучение антигенных свойств белков различных штаммов сальмонелл методом иммуноблоттинга

Для анализа антигенной структуры изучаемых штаммов сальмонелл нами использовались две гипериммунные противосальмонеллезные кроличьи сыворотки, полученные на штаммы *S. choleraesuis* 370 и *S. enteritidis* 418.

У штамма *S. choleraesuis* 370 гомологичная гипериммунная кроличья сыворотка в иммуноблоте взаимодействовала в среднем с 9 антигенно-активными фракциями, с молекулярными массами 60 кД (5,2% от общего содержания серо-активных фракций), 53 кД (34,8%), 48 кД (12,5%), 45 кД (6,3%), 43 кД (2,1%), 42 кД (11,0%), 37 кД (16,0%), 29 кД (4,7%) и 28 кД (7,4%). У вакцинного штамма *S. choleraesuis* TC-177 с гипериммунной кроличьей сыворотки на шт. *S. choleraesuis* 370 было выявлено также 9 антигенно-активных фракций – 53 кД (37,0%), 49 кД (7,9%), 45 кД (5,4%), 44 кД (4,1%), 42 кД (5,3%), 37 кД (10,5%), 36 кД (4,0%), 29 кД (5,3%), и 28 кД (20,5%). У патогенного *S. choleraesuis* 370 отмечено наличие выраженной антигенно-активной фракции с молекулярной массой 60 кД, отсутствующая у вакцинного штамма. У вакцинного штамма *S. choleraesuis* TC-177 доминирующую серологическую активность проявлял полипептид с молекулярной массой 28 кД (20,5%), тогда как у патогенного штамма ее активность была значительно ниже (7,4%).

Необходимо отметить наличие характерной для обоих штаммов *S. choleraesuis* серо-активной фракции с молекулярной массой 53 кД, содержание которой было у них наибольшим – 34,8-37,0%, у других штаммов сальмонелл данная фракция сывороткой на шт. *S. choleraesuis* 370 не выявлялась.

С гипериммунной сывороткой крови кроликов, полученной на штамм *S. choleraesuis* 370, реагировали меньшее количество полипептидных фракций гетерогенных штаммов – *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371. У них выявлялись по 5 и 8 серологически активных фракций соответственно. Необходимо отметить, что антигенно-активная фракция с молекулярной массой 37 кД обнаруживалась у всех исследованных представителей сальмонелл, содержание ее варьировало в пределах 10,5-24,6% от общего количества серо-активных полипептидов. Кроме того, общими для всех исследованных штаммов оказались серологически активные фракции, расположенные в диапазонах молекулярных масс 48-50 и 35-37 кД. По-видимому они относятся к родоспецифическим.

При взаимодействии гипериммунной кроличьей сыворотки, полученной на шт. *S. enteritidis* 418, с полипептидами этого же штамма на нитроцеллюлозной мембране обнаруживалось 15 серо-активных фракций – 103 кД (3,8% от

общего содержания серо-активных фракций), 76 кД (5,2%), 61 кД (3,8%), 58 кД (1,7%), 51 кД (24,3%), 49 кД (8,1%), 46 кД (2,3%), 43 кД (12,0%), 41 кД (7,6%), 39 кД (7,0%), 37 кД (7,9%), 35 кД (2,9%), 33 кД (2,7%), 31 кД (2,5%) и 29 кД (8,2%). Количество выявленных серо-активных структур с данной сывороткой у штаммов других сероваров (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*) варьировало от 6 до 12 в диапазонах молекулярных масс от 28 до 76 кД. С данной сывороткой у *S. typhimurium* 371 как и у других штаммов взаимодействовали 6 полипептидов (37, 41, 50, 53, 59 и 76 кД), что, по-видимому, обусловлено их антигенным родством.

Результаты исследований антигенной структуры лизатов клеток сальмонелл методом иммуноблоттинга с гипериммунными противосальмонеллезными сыворотками позволили выявить серологически активные компоненты, которые у штаммов различных сероваров имели сходства и отличия по качественному и количественному соотношению.

2.4. Изучение состава и свойств антигенных комплексов изолированных клеточных структур сальмонелл (жгутики, клеточная стенка)

Для точного установления локализации антигенных комплексов, их специфической активности и степени участия в формировании иммунного ответа необходимо провести иммунохимический анализ изолированных бактериальных структур. Поэтому наши дальнейшие исследования были направлены на получение и анализ изолированных структур микробной клетки сальмонелл.

С этой целью проводили механическую дезинтеграцию микробных клеток с последующим разделением компонентов ультрацентрифугированием.

Разделение полипептидов изолированных клеточных структур сальмонелл осуществляли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с градиентом концентрации мономеров 10-20%. Выявление антигенных комплексов проводили методом иммуноблоттинга на листах нитроцеллюлозы с гипериммунной кроличьей сывороткой полученной на штамм *S. choleraesuis* 370.

В составе изолированных клеточных структур выявлялось больше антигенных комплексов, чем при анализе общего клеточного лизата сальмонелл. В составе жгутиков штамма 370 содержалось до 20 мажорных антигенно-активных фракций в диапазоне молекулярных масс 25-57 кД, у штамма ТС-177 – 19 антигенно-активных фракций в диапазоне молекулярных масс 27-51 кД. Кроме того, у обоих представителей присутствовала одна минорная серо-активная фракция с молекулярной массой 109 кД. В жгутиках *S. typhimurium* 371 обнаруживалось 12 антигенно-активных фракций в диапазоне молекулярных масс 26-50 кД, у *S. enteritidis* 418 – 14 серо-активных полипептидов с молекулярными массами от 25 до 74 кД и одна минорная фракция с молекулярной массой 104 кД.

Антигенные профили очищенных клеточных стенок сальмонелл, выявляемые гипериммунной кроличьей сывороткой на штамм *S. choleraesuis* 370, ха-

рактизовались следующим образом: у *S. choleraesuis* 370 – выявлялись 20 фракций с молекулярной массой от 16 до 100 кД, у *S. choleraesuis* TC-177 – 18 фракций с молекулярной массой от 22 до 99 кД, *S. typhimurium* 371 – 18 фракций с молекулярной массой от 16 до 73 кД, *S. enteritidis* 418 – 18 фракций с молекулярной массой от 18 до 94 кД.

Большинство антигенно-активных полипептидных фракций, обнаруживаемых иммуноблоттингом в клеточных лизатах сальмонелл присутствовали и в изолированных структурах, главным образом в жгутиках: у *S. choleraesuis* 370 это были полипептиды с молекулярными массами 28, 29, 37, 42 и 43 кД, у *S. choleraesuis* TC-177 – 28, 29, 36, 37, 43 и 49 кД, у *S. enteritidis* 418 – 37 и 49 кД, у *S. typhimurium* 371 – 37, 41, 43 и 50 кД.

Таким образом, антигенные профили клеточных стенок имеют серовариантную специфику, тогда как антигенные профили жгутиков из-за их высокой серо-активности более сложны для анализа в дифференциальном отношении. Результаты наших исследований согласуются с общепринятой схемой дифференциации штаммов сальмонелл, которая основана именно на различиях в антигенном строении жгутиков, а антигены клеточной стенки используются лишь как групповой фактор [Киселева Б.С., Голубева И.В., 1977].

Результаты по иммунохимическому изучению изолированных клеточных структур сальмонелл могут быть использованы для получения антигенных препаратов поверхностных структур сальмонелл и высокоспецифичных диагностических сывороток (иммуноглобулинов), создания тест-систем для индикации возбудителя сальмонеллеза. Подобные результаты получены G. Rajashekara et al. (1999) при использовании изолированных поверхностных структур сальмонелл (фимбрии и жгутики) в иммунохимических тестах [Rajashekara G. et al., 1999].

2.5. Исследование геномов сальмонелл

2.5.1. Разработка модифицированного способа выделения ДНК сальмонелл для молекулярно-генетических исследований

При проведении генотипирования микроорганизмов возникает необходимость выделения ДНК. Чистота и концентрация выделенных нуклеиновых кислот обуславливают успех дальнейших исследований.

На основании сравнительного изучения 4-х методов выделения ДНК, установлено, что разработанный нами фенольно-детергентный метод является наиболее эффективным и простым способом выделения ДНК сальмонелл.

Принцип метода заключается в том, что разделения реакционной смеси на две фазы (фенол-вода) не происходит за счет наличия в лизирующем растворе фенолята натрия, образующегося в результате взаимодействия фенола с гидроксидом натрия. Фенол, как сильный акцептор протонов, разрушает водородные связи между нуклеиновой кислотой и белками, способствуя диссоциации нуклеопротеидного комплекса. Кроме того, фенол вызывает денатурацию белков, что еще более снижает их растворимость в воде.

Высокая депротеинизирующая активность используемой смеси позволяет заменить резкое встряхивание препарата осторожным медленным перемешива-

нием и тем самым свести к минимуму гидродинамические воздействия на освобождающиеся нуклеиновые кислоты.

Спектрофотометрические показатели полученных препаратов ДНК (A_{260}/A_{280}) варьировали в пределах 1,8-2,0, что говорит о высокой степени чистоты их от примесей белков и фенола.

Практический выход ДНК сальмонелл составил 18,8-20,4 мкг/мг сухой массы микроорганизмов.

Преимущества предложенного нами фенольно-детергентного метода заключаются в том, что метод прост в применении, непродолжителен по времени и дает приемлемые результаты в отношении нативности, чистоты и концентрации препаратов ДНК сальмонелл, что явилось основанием для оформления заявки на изобретение и получение патента.

2.5.2. Подбор праймеров для индикации представителей рода *Salmonella* методом ПЦР

На основании анализа информационных источников [Светличкин В.В. и др., 1994; Хмеляускайте В.Г. и др., 1995; Кононенко А.Б., Бритова С.В., 1998; Подколзин А.Т. и др., 2002; Nguyen A. et al., 1994; Noah D. et al., 1994; Yoshihiro I. et al., 1997; Yong-Ku W. et al., 1997; Hoorfar J. et al., 1999; Lin J., Tsen H., 1999; Makino S. et al., 1999; Amavisit P. et al., 2001; Scholz H. et al., 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>], свой выбор для экспресс-выявления представителей рода *Salmonella* остановили на праймерах, предложенных Anh V. Nguyen с соавт. (1994).

С данными праймерами в предварительных опытах определяли оптимальный режим проведения ПЦР. Затем испытали ПЦР с дезоксирибонуклеиновыми кислотами, выделенными из сальмонелл (рисунок 2.1). Для оценки специфичности теста параллельно в опытах испытали препараты ДНК гетерологичных микроорганизмов. На электрофореграммах продуктов ПЦР со специфичными праймерами в присутствии ДНК сальмонелл выявлялся фрагмент длиной 2000 пар нуклеотидов.

О специфичности ПЦР свидетельствовало отсутствие синтеза данного фрагмента с ДНК, выделенными от других микроорганизмов и тканей животных (треки 9-12 и К-).

При определении чувствительности ПЦР-теста с праймерами НК1 и НК2 с визуальной оценкой результатов реакции установили, что чувствительность ПЦР с очищенной ДНК сальмонелл составляет ≥ 440 fg (или около 26 геномных эквивалентов ДНК сальмонелл в пробе).

Для оценки эффективности ПЦР индикации сальмонелл в объектах ветеринарного надзора проводили модельные опыты с искусственно контаминированными образцами и патологическим материалом от экспериментально зараженных лабораторных животных.

Проведенные исследования показали преимущество метода ПЦР перед бактериологическим методом, при котором положительные результаты не превышали 80%.

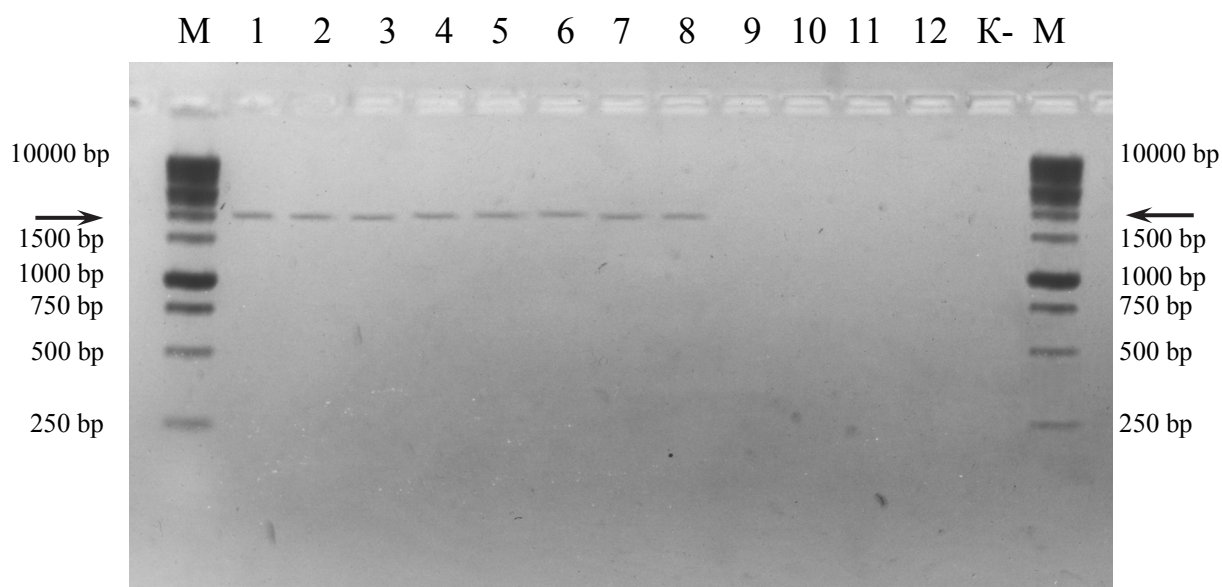


Рис. 2.1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами NK1 и NK2 в 2% агарозном геле.

Обозначения: М – маркеры длин фрагментов ДНК: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp;

1. – ДНК штамма *S. typhimurium* 371
 2. – ДНК штамма *S. typhimurium* 3
 3. – ДНК штамма *S. choleraesuis* 370
 4. – ДНК штамма *S. choleraesuis* ТС-177
 5. – ДНК штамма *S. enteritidis* 418
 6. – ДНК *S. choleraesuis* (патогенный изолят)
 7. – ДНК *S. dublin* (патогенный изолят)
 8. – ДНК *S. onarimon* (патогенный изолят)
 9. – ДНК *Yersinia enterocolitica* шт. “Шойбулакский”
 10. – ДНК *Escherichia coli* шт. 1257
 11. – ДНК *Listeria monocytogenes* шт. “АУФ”
 12. – ДНК *Chlamydia psittaci* шт. 250
- «К-» – отрицательный контроль (H₂O).

Стрелками отмечена область расположения специфического продукта амплификации (2000 bp)

Таким образом, результаты проведенных исследований показали специфичность подобранных праймеров NK1 и NK2 к локусу ДНК сальмонелл, присутствующего у всех исследованных геномов представителей рода *Salmonella* и эффективность разработанного режима ПЦР для индикации ДНК этих микроорганизмов в объектах ветеринарного надзора.

2.5.3. Выявление гипервариабельных областей генома сальмонелл методом ПЦР с использованием произвольных праймеров

Одним из подходов для межштаммовой дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний является ПЦР с произвольными праймерами (RAPD-ПЦР) [Булат С.А. и др., 1992; Романова Л.В., Мишанкин Б.Н., 1994; Vioiano S. et al., 1996; Фаизов Т.Х., Равилов А.З., Алимов А.М., 2000]. Для установления возможности геноидентификации сальмонелл нами опробованы четыре произвольных праймера: V1, V3, #128 и #129.

Праймер #128 при опробованных нами различных температурных режимах и составах реакционной смеси не приводил к амплифицированию участков ДНК исследуемых сальмонелл. Поэтому следующие серии опытов проводили с праймерами V1, V3 и #129.

Путем варьирования количеством компонентов, температуры, времени и количества циклов в предварительных экспериментах определили оптимальный режим проведения ПЦР с каждым из праймеров.

Подготовку проб для ПП-ПЦР проводили по следующей методике: суспензии микроорганизмов каждого штамма (концентрация 1 млрд. м.к./мл) лизировали воздействием 10 М NaOH до конечной концентрации 0,2 М с последующим осторожным перемешиванием и добавлением через 10-20 секунд 2 М tris-HCl (pH 7,4) до конечной концентрации 0,66 М.

После центрифугирования при 7000 g – 3 мин, 10-кратно разведенный супернатант использовали в качестве пробы для ПЦР.

Амплификацию полиморфных локусов ДНК (ПП-ПЦР) с произвольным праймером #129 выполняли в объеме 25 мкл с содержанием 2 мкл ДНК содержащей пробы, 60 мМ tris-HCl (pH 8,5), 2,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1% тритона X-100, 200 мкМ dNTPs, 1 мкМ праймера и 0,625 ед. акт. Taq polymerase.

Для произвольных праймеров V1 и V3 реакционная смесь имела следующий состав: 2 мкл ДНК содержащей пробы, 60 мМ tris-HCl (pH 8,5), 3,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1% тритона X-100, 200 мкМ dNTPs, 5 мкМ праймера и 0,625 ед. акт. Taq polymerase.

Режимы амплификации для праймеров V1 и V3 были одинаковыми, и состояли из предварительной денатурации при 94⁰С в течение 4 мин, затем 40 циклов с последовательностью: плавление 94⁰С – 1 мин, отжиг 55⁰С – 1 мин, синтез 72⁰С – 2 мин; по прошествии всех циклов – досинтез при 72⁰С в течение 10 мин. ПП-ПЦР с праймером #129 проводили по режиму: предварительная денатурация при 94⁰С в течение 4 мин, затем 40 циклов с последовательностью: плавление 94⁰С – 1 мин, отжиг 36⁰С – 1 мин, синтез 72⁰С – 2 мин; по прошествии всех циклов – досинтез при 72⁰С в течение 10 мин.

Продукты амплификации вносили в лунки 2% агарозного геля с содержанием бромистого этидия 0,5 мкг/мл и подвергали горизонтальному электрофоруезу в буфере ТБЕ при напряжении 10 В/см в течение 1,5-2 часов с последующей визуализацией в УФ-трансиллюминаторе и фотографированием.

Праймер V1 в ПП-ПЦР со всеми исследуемыми геномами сальмонелл генерировал появление одного ампликона, с длиной 1200 пар нуклеотидов.

Использование праймера V3 обеспечило возможность серовариантной дифференциации исследуемых сальмонелл, не позволяя при этом различать штаммы одного сероварианта, в данном случае – вакцинные и патогенные. Полученные результаты ПЦР показаны на рис. 2.2 и в таблице 2.2.

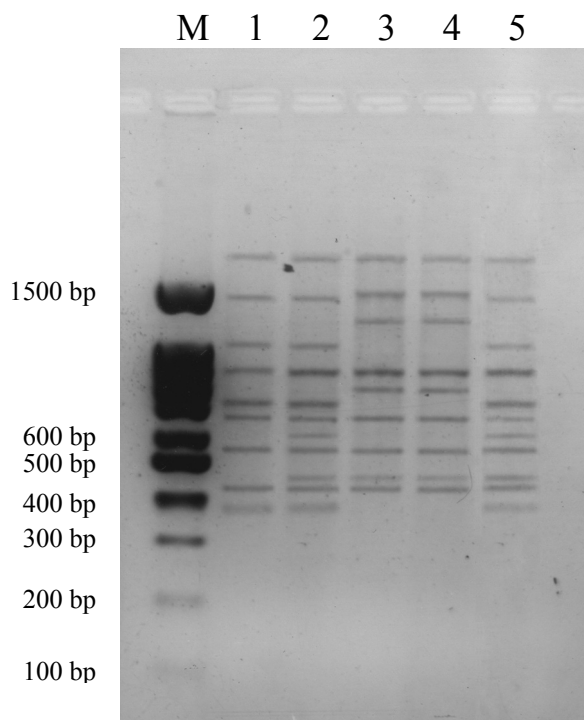


Рис. 2.2 – Электрофореграммы продуктов ПП-ПЦР с праймером V3 в 2%-ном агарозном геле.

Обозначения: М – маркеры длины фрагментов ДНК: 1500 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp;

1. – ДНК штамма *S. enteritidis* 418 (вирулентный)
2. – ДНК штамма *S. typhimurium* 371 (вирулентный)
3. – ДНК штамма *S. choleraesuis* 370 (вирулентный)
4. – ДНК штамма *S. choleraesuis* TC-177 (вакцинный)
5. – ДНК штамма *S. typhimurium* 3 (вакцинный)

Таблица 2.2 – Результаты ПЦР-анализа сальмонелл с праймером V3

ПОКАЗАТЕЛИ	<i>S. choleraesuis</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. enteritidis</i> штамм 418
	штамм 370	штамм ТС-177	штамм 371	штамм 3	
Количество фрагментов	9	9	11	11	9
Размеры ампликонов (п.н.)	2019	2019	2019	2019	2019
	1602	1602	—	—	—
	—	—	1546	1546	1546
	1317	1317	—	—	—
	—	—	1162	1162	1162
	955	955	955	955	955
	843	843	785	785	785
	718	718	718	718	718
	—	—	644	644	—
	568	568	568	568	568
	442	442	442	442	—
	419	419	419	419	419
	—	—	376	376	376

В продуктах амплификации геномов исследованных штаммов сальмонелл с праймером V3 выявлено по 6 одинаковых мажорных ампликонов, состоящих из 2019, 955, 718, 568 и 419 пар нуклеотидов. Кроме того, у сероваров *S. choleraesuis* и *S. typhimurium* имелось по одному одинаковому ампликону длиной 442 п.н., а у *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* содержалось по 4 идентичных фрагмента: 1546, 1162, 785 и 376 п.н.

При проведении ПП-ПЦР с ДНК штаммов *S. choleraesuis* 370 и *S. choleraesuis* ТС-177 праймер V3 генерировал образование 9 ампликонов с длиной 2019, 1602, 1317, 955, 843, 718, 568, 442 и 419 п.н. Электрофореграмма продуктов ПП-ПЦР с ДНК *S. choleraesuis* отличалась от таковых *S. typhimurium* (штаммы 371 и 3) – наличием ампликонов длиной 1602, 1317 и 843 п.н. и отсутствием фрагментов длиной 1546, 1162, 785, 644 и 376 п.н.; и от *S. enteritidis* 418 – отсутствием ампликонов длиной 1546, 1162, 785, и 376 п.н. и наличием ампликонов длиной 1602, 1317, 843 и 442 п.н.

В ПП-ПЦР с ДНК штаммов *S. typhimurium* 371 и *S. typhimurium* 3 с праймером V3 образовывалось по 11 ампликонов, состоящих из 2019, 1546, 1162, 955, 785, 718, 568, 644, 442, 419 и 376 п.н.

S. typhimurium отличался от *S. choleraesuis* (штаммы 370 и ТС-177) наличием ампликонов длиной 1546, 1162, 785, 644 и 376 п.н. при отсутствии фрагментов ДНК с длиной 1602, 1317 и 843 п.н., а от *S. enteritidis* 418 – наличием ампликонов длиной 644 и 442 п.н.

Праймер V3 в ПП-ПЦР с ДНК штамма *S. enteritidis* 418 генерировал образование 9 ампликонов длиной 2019, 1546, 1162, 955, 785, 718, 568, 419 и 376 п.н., которые имели сходства и существенные отличия от других изучаемых культур сальмонелл.

Отличительной особенностью *S. typhimurium* (штаммы 371 и 3) было наличие ампликона с длиной 644 п.н., который отсутствовал у других представителей сальмонелл.

ПП-ПЦР с одиночным праймером #129 обеспечивала межштаммовую дифференциацию сальмонелл. Результаты одного из характерных опытов представлены на рис. 2.3 и в таблице 2.3.

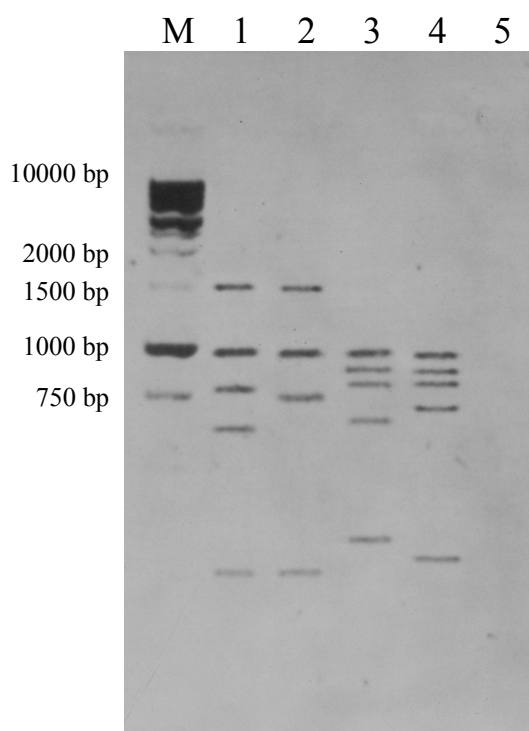


Рис. 2.3 – Электрофореграммы продуктов ПП-ПЦР с праймером #129 в 2%-ном агарозном геле.

Обозначения: М – маркеры длин фрагментов ДНК: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp;

1. – ДНК штамма *S. choleraesuis* TC-177 (вакцинный)
2. – ДНК штамма *S. choleraesuis* 370 (вирулентный)
3. – ДНК штамма *S. typhimurium* 371 (вирулентный)
4. – ДНК штамма *S. typhimurium* 3 (вакцинный)
5. – ДНК штамма *S. enteritidis* 418 (вирулентный)

Таблица 2.3 – Длина и количество ампликонов ПЦР-анализа штаммов сальмонелл с праймером #129

ПОКАЗАТЕЛИ	<i>S. choleraesuis</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. enteritidis</i> шт. 418
	шт. 370	шт. ТС-177	шт. 371	шт. 3	
Количество фрагментов	4	5	5	5	—
Размеры ампликонов (п.н.)	1635	1635	—	—	—
	980	980	980	980	
	—	759	868	868	
	747	—	785	785	
	—	577			
	324	324	—	723	
	—	—	639	—	
			365	—	
			—	339	

При проведении ПП-ПЦР с праймером #129 у всех исследованных представителей *S. choleraesuis* и *S. typhimurium* на электрофореграмме появлялся один общий мажорный фрагмент длиной 980 пар нуклеотидов, что может быть использовано в качестве маркера для этих сероваров.

У представителей *S. choleraesuis* (шт. ТС-177 и шт. 370) выявлено 3 общих фрагмента с длинами 1635, 980 и 324 п.н. Вирулентный штамм 370 отличался от вакцинного (ТС-177) наличием ампликона 747 п.н. и отсутствием ампликонов длиной 759 и 577 п.н.

У представителей *S. typhimurium* (шт. 371 и 3) в результате амплификации с этим праймером синтезировались по 3 общих фрагмента, состоящие из 980, 868 и 785 п.н. Дифференциальным признаком между ними было – отсутствие у штамма *S. typhimurium* 371 ампликонов длиной 723 и 339 п.н. и наличие ампликонов длиной 639 и 365 п.н.

Как показали проведенные исследования из пяти штаммов сальмонелл с помощью праймера #129 удается дифференцировать четыре, тогда как на матрице генома шт. *S. enteritidis* 418 не происходила амплификация фрагментов, что может быть объяснено иной организацией его генома.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что с использованием произвольных праймеров V3 и #129 в полимеразной цепной реакции установлена принципиальная возможность применения и перспективность данного способа в таксономических исследованиях и для идентификации штаммов сальмонелл.

Из четырех опробованных нами праймеров наиболее информативными оказались олигонуклеотиды V3 и #129, позволяющие при параллельном использовании определить межштаммовые различия геномов сальмонелл. Однако нельзя не отметить близкое генетическое родство изучаемых инфекционных агентов и как следствие большие сходства на электрофореграммах продуктов ПП-ПЦР с их геномами.

В отличие от общепринятых серологических, биохимических и иных фенотипических способов дифференциации штаммов возбудителя, методу идентификации при помощи полимеразной цепной реакции с использованием произвольных праймеров характерна быстрота получения результата (5-6 часов). В связи с чем данный метод может быть успешно использован для генотипирования штаммов сальмонелл различного происхождения.

3. ВЫВОДЫ

1. Методом электрофореза в 10-20% градиентной концентрации ПААГ в лизатах клеток сальмонелл обнаружены до 49 полипептидов, количественный и качественный состав которых варьировал в зависимости от серовара и штаммовой принадлежности. Для всех исследованных штаммов сальмонелл характерно наличие крупно- среднемолекулярных полипептидов с молекулярными массами 219,2-227,6 кД, 97,3-98,7 кД, 76,0-85,0 кД, 50,0-53,5 кД.

У представителей *S. choleraesuis* специфичной особенностью является наличие 13 идентичных полипептидных фракций и они отличаются от *S. enteritidis* 418 и *S. typhimurium* 371 присутствием высокомолекулярного полипептида с массой 149 кД. Отличительной особенностью *S. enteritidis* 418 от других культур является присутствие двух высокомолекулярных фракций (133,1 и 227,6 кД), а у *S. typhimurium* 371 обнаруживается полипептид с молекулярной массой 99,2 кД. Метод импрегнации электрофореграмм азотнокислым серебром в отличие от окраски Кумасси R-250 выявляет дополнительно от 8 до 16 полипептидных фракций.

2. Методом иммуноблоттинга установлены серологически активные полипептиды и антигенные различия у разных сероваров и штаммов сальмонелл. С гипериммунной кроличьей антисывороткой на штамм *S. enteritidis* 418 в иммуноблоттинге у всех исследованных представителей рода *Salmonella* взаимодействовали фракции с молекулярными массами 76, 58-60, 51-53, 48-50, 41-42 и 37 кД. У представителей *S. choleraesuis* с сывороткой, полученной на штамм *S. choleraesuis* 370, выявлялась высокоактивная фракция с молекулярной массой 53 кД и вирулентный штамм 370 отличался от вакцинного (ТС-177) наличием антигенно-активного компонента с молекулярной массой 60 кД.

3. Механической дезинтеграцией с последующим ультрацентрифугированием получены клеточные стенки и жгутиковые фракции сальмонелл и методом иммуноблоттинга изучена серологическая активность их полипептидов. С гомологичной гипериммунной сывороткой наиболее высокую серологическую активность проявляли полипептиды жгутиковых структур сальмонелл, тогда как в клеточных стенках выявлялись более разнообразные в антигенном отношении полипептиды.

4. С праймерами “NK1” и “NK2” оптимизированы условия проведения ПЦР (температура отжига праймеров 55°C; концентрация MgCl₂ 2,5 мМ, KCl 25 мМ) и продемонстрировано, что они являются родоспецифическими и фланкируют участок гена *invA* сальмонелл длиной 2000 п.н., обеспечивая экспресс-индикацию представителей рода *Salmonella* с чувствительностью ≥ 440 fg

ДНК (≈ 26 микробных клеток сальмонелл) в различных объектах ветеринарного надзора (патологический материал, корма, продукты животноводства).

5. Проведением ПП-ПЦР с произвольными олигонуклеотидами, состоящими из 10, 18 и 19 нуклеотидных оснований, показано, что праймер V1 вызывает образование у всех исследуемых штаммов одного ампликона, состоящего из 1200 пар оснований. При амплификации ДНК сальмонелл в ПЦР с произвольным праймером V3 выявлялись 9-11 фрагментов ДНК, состоящих из 376...2019 п.н., количество и длина которых обеспечивают дифференциацию сероваров.

При использовании произвольного праймера #129 в ПЦР выявлялись 4-5 фрагментов ДНК с длиной 339...1635 п.н., их количество и размеры позволяют проводить идентификацию сальмонелл по штаммовой принадлежности.

6. Разработанный фенольно-детергентный метод выделения ДНК обеспечивает получение препаратов дезоксирибонуклеиновых кислот сальмонелл высокой степени чистоты и нативности, пригодных для молекулярно-генетических исследований.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований внесены следующие практические предложения:

1. Штаммовую дифференциацию сальмонелл рекомендуется осуществлять с использованием “Методических рекомендаций по определению электрофоретических и антигенных свойств полипептидов сальмонелл методами диск-электрофореза в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинга”, одобренные научно-методическим советом и утвержденные директором ВНИВИ (г. Казань), протокол №3 от 4 октября 2002 года.
2. Экспресс-индикацию представителей рода *Salmonella* в объектах ветеринарного надзора целесообразно проводить методом ПЦР с олигонуклеотидными праймерами NK1 и NK2 по разработанным нами методическим рекомендациям “Индикация сальмонелл методом ПЦР”, одобренные научно-методическим советом и утвержденные директором ВНИВИ (г. Казань), протокол №4 от 3 ноября 2003 года.
3. Для ускоренной идентификации сальмонелл рекомендуется использовать RAPD-ПЦР с произвольным праймером V3, а для дифференциации на уровне штаммов праймер #129.
4. Фенольно-детергентный метод выделения ДНК микроорганизмов целесообразно использовать для получения препаратов нуклеиновых кислот сальмонелл высокой степени чистоты и нативности, пригодных для молекулярно-генетических исследований.

5. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Алимов А.М., Ахмадеев А.М., Зайнуллин Л.И. Сравнительная оценка полипептидных профилей различных штаммов сальмонелл // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Тез. докл. на междунар. научно-практической конф. ВНИИВВиМ 16-18 апреля 2002 г. – Покров, 2002. – С. 261-262.
2. Алимов А.М., Ахмадеев А.М., Зайнуллин Л.И., Ахмадеева Х.Р. Электрофоретические и антигенные свойства полипептидов сальмонелл // III съезд биохимического общества: Тез. научн. докл. 26 июня – 1 июля 2002 г. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 133.
3. Ахмадеев Р.М., Зайнуллин Л.И., Алимов А.М. Изучение полипептидных профилей различных штаммов сальмонелл // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Тез. докл. на междунар. научно-практической конф. 23-25 сентября 2002 г. – Воронеж, 2002. – С. 109-110.
4. Ахмадеев Р.М., Зайнуллин Л.И., Алимов А.М. Локализация антигенных комплексов у сальмонелл // Мат. междунар. научно-практической конф. по актуальным проблемам ветеринарной медицины, посвящ. 60-летию фак-та вет. мед. УГСХА: Тез. докл. 25-26 сентября 2003 г. – Ульяновск, 2003. – Т.1. – С. 140-141.
5. Вафин Р.Р., Равилов Р.Х., Зайнуллин Л.И., Фаизов Т.Х., Алимов А.М., Вафин Р.Р. Фенольно-детергентный метод выделения ДНК хламидий и сальмонелл // Мат. Всероссийской научно-производственной конф. по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии: Тез. докл. – Казань, 2002. – Ч.1. – С. 18-19.
6. Зайнуллин Л.И., Ахмадеев Р.М., Алимов А.М. Дифференциация штаммов сальмонелл методом ПП-ПЦР // IV Всероссийская научно-практическая конференция “Генодиагностика инфекционных заболеваний”: Сборник тезисов 22-24 октября 2002 г. – М., 2002. – С. 337-338.
7. Зайнуллин Л.И. Сравнительное изучение антигенного состава представителей *Salmonella spp.* методом иммуноблотинга // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2003. – Т.174. – С. 87-92.
8. Зайнуллин Л.И., Ахмадеев Р.М., Алимов А.М. Детекция сальмонелл методом ПЦР // Мат. междунар. научно-производственной конф. по актуальным проблемам АПК, посвященной 130-летию вет. академии: Тез. докл. 30-31 мая 2003г. – Казань, 2003. – Ч.1. – С. 48-50.
9. Зайнуллин Л.И., Ахмадеев Р.М., Алимов А.М. Возможность дифференциации штаммов сальмонелл методом RAPD–PCR // Ветеринарный врач. – 2003. – №1 (13). – С. 84-86.