

Крякунова Е. В., Хамидуллина Р. Г., Барабанщиков Б. И., Гимадутдинов О. А.

**ПОВЕДЕНИЕ ПЛАЗМИД PHISNUCSMAB РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI**

Адрес статьи: [www.gramota.net/materials/1/2008/5/32.html](http://www.gramota.net/materials/1/2008/5/32.html)

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

**Альманах современной науки и образования**

Тамбов: Грамота, 2008. № 5 (12). С. 76-78. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: [www.gramota.net/editions/1.html](http://www.gramota.net/editions/1.html)

Содержание данного номера журнала: [www.gramota.net/materials/1/2008/5/](http://www.gramota.net/materials/1/2008/5/)

**© Издательство "Грамота"**

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: [www.gramota.net](http://www.gramota.net)

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: [almanac@gramota.net](mailto:almanac@gramota.net)

**Материал и методы.** Исследования проводились на 250 мальчиках и 250 девочках в детсадах в возрасте от 3 до 7 лет. Объектом изучения служили сегменты свободной верхней конечности (плечо, предплечье, кисть), измерение которых проводилось по соответствующим антропометрическим ориентирам. При этом, произведено измерение линейных размеров и определена доля сегментов от длины конечности в процентах. Полученный цифровой материал обработан методами вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение. Исследования показали, что у детей 3-7 лет на верхней конечности наибольшую протяженность имеет плечевая кость, затем – лучевая и локтевая и наименьшая кисть (табл.). Как видно, из таблицы 1,2, что у девочек в возрасте 5 лет, по сравнению с мальчиками незначительно превосходит, а в остальных возрастах у мальчиков незначительно больше (от 0,2 до 0,5 см).

Нами отмечено, что максимальная изменчивость выявлена у плечевой кости, затем лучевой и локтевой, наименьше у кисти. Доля плечевой кости от длины верхней конечности справа у мальчиков в 3 года составляет 41,02 %, слева – 41,08 %, у девочек – соответственно: 40,59 % и 40,16 %. В последующих возрастах у мальчиков слегка уменьшается, а у девочек – почти остается без изменений. В возрасте 5 лет у девочек длина плечевой и лучевой кости, по сравнению с мальчиками, больше.

Таким образом, измерение длины сегментов верхней конечности, а также их сегментов в отношении ее длины свидетельствуют о неравномерности их развития. У детей 3-7 лет на верхней конечности наиболее зрелым сегментом является кисть, затем локтевой и лучевой кости и меньше всего плечевой.

**Вывод:** Свободная верхняя конечность как целостные образования, у детей дошкольного возраста находятся в различных фазах становления.

## ПОВЕДЕНИЕ ПЛАЗМИД *pHisNucSma* В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI*

Крякунова Е. В., Хамидуллина Р. Г., Барабанищikov Б. И., Гимадулдинов О. А.  
Казанский государственный университет

С развитием техники рекомбинантной ДНК и выяснением механизмов регуляции активности генов появилась возможность создавать генно-инженерные конструкции, содержащие структурные гены донора ДНК и регуляторные последовательности из генома реципиента, что способствует эффективной экспрессии структурных генов в гетерологичной системе клетки. Но даже в отсутствие индуктора существует определенный базальный уровень выражения гена, он может быть ниже (в присутствии большого количества белка-репрессора) или выше (если количество белка-репрессора уменьшено). В качестве клетка-хозяина при создании рекомбинантных штаммов широко используется бактерия *Escherichia coli*. Ее генетическая система хорошо изучена на молекулярном уровне, она легко идентифицируется, обладает высокой скоростью роста. Кроме того, *E. coli* способна секретировать чужеродные белки во внешнюю среду.

Целью настоящей работы явилось определение влияния базального уровня экспрессии эндонуклеазы *Serratia marcescens* на стабильность и копияность плазмид *pHisNucSma* в клетках рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*.

**Материалы и методы.** Компетентные клетки бесплазмидного штамма *E.coli TGE900* получали по методике Chung [Chung 1989: 2172-2175]. Для трансформации использовали heat shock метод [Van Die 1983: 663-670]. Об элиминации судили по потере клетками признака устойчивости к ампициллину после обработки этидиум бромидом.  $\beta$ -лактамазную активность определяли посредством метода йодометрического титрования [Perret 1954: 1012-1013].

**Результаты и обсуждения.** Клетки штамма *E.coli TGE900*, чувствительные к ампициллину и не обладающие нуклеазной активностью, трансформировались плазмидами *pHisNucSmaHis89Ala*, *pHisNucSmaArg57Ala* и *pHisNucSmaawt*, которые содержат гены эндонуклеазы *S.marcescens*, кодирующие ферменты с различной активностью. В этих генах замена гистидина в 89 положении на аланин (*His89Ala*) делает белок дефектным по каталитической функции. При замене аргинина в 57 положении на аланин (*Arg57Ala*) ферментативная активность белка понижается на 65% [Friedhoff 1994: 3280-3287]. После трансформации нами были отобраны клоны, которые приобрели устойчивость к ампициллину.

Для выяснения того, насколько стабильно данная плаزمид наследуется в ряду клеточных поколений, а также для доказательства того, что изменения в уровне резистентности к антибиотику у рекомбинантных штаммов не связаны с мутациями самого штамма-хозяина или с транспозицией гена устойчивости из плазмиды в хромосому, необходимо показать, что вместе с утратой плазмиды происходит и утрата способности расти на средах с ампициллином. Общий принцип действия элиминирующих агентов (в нашем случае EtBr) заключается в том, что они нарушают распределение плазмидных копий ДНК между дочерними клетками, ингибируя начало репликации, что ведет к тому, что часть из них оказывается лишенной плазмиды.

Интеркаляция молекулы EtBr в *origin*-сайт приводит к изменению угла между плоскостью оснований и

осью двойной спирали ДНК, что индуцирует переход из В-формы, образуемой АТ-богатыми последовательностями, в А-форму ДНК, характерную для GC-богатых последовательностей. По-видимому, ДНК-топоизомеразы не распознают топологически измененную область *origin*, что ведет к ингибированию процесса начала репликации. Известно, что эндонуклеаза *S. marcescens* предпочитительно расщепляет А-форму ДНК по сравнению с В-формой [Meiss 1995: 11979-11998]. Возможно, что нуклеаза разрезает модифицированную в А-форму область *origin*, тем самым заменяя иницирующее репликацию действие ДНК-топоизомеразы.

Таблица 1.

Элиминация плазмид из клеток *E.coli TGE900* под действием этидиум бромид

Штамм	Концентрация <i>EtBr</i> , мкг/мл	Выживаемость, %	Утрата устойчивости к Amp, %
<i>TGE900</i>	0	100	57,7
<i>pHisNucSmaHis89</i>	50	27,33	100
<i>Ala</i>	200	1,36	100
<i>TGE900</i>	0	100	12
<i>pHisNucSmaArg57</i>	50	2,15	20
<i>Ala</i>	200	0,04	68
<i>TGE900</i>	0	100	7
<i>pHisNucSmawt</i>	50	1,35	9
	200	0,006	28

Как видно из данных, представленных в Таблице 1, обработка этидиум бромидом приводит к снижению выживаемости бактерий. Выжившие клетки анализировали на потерю маркера устойчивости к ампициллину: с увеличением концентрации этидиум бромид происходит увеличение процента элиминации, т.е. существует обратная корреляция между активностью эндонуклеазы и элиминацией плазмид.

Определение активности неспецифических нуклеаз проводилось при использовании индикаторной среды, содержащей краситель толуидиновый голубой и высокополимерную ДНК [Meiss 2001: 37-48]. В зависимости от уровня активности нуклеазы площадь изменения окраски индикаторной среды, образующаяся вокруг точки нанесения пробы, будет увеличиваться. Нуклеазная активность, показанная штаммами, составляет 100% для нуклеазы дикого типа (*TGE900 pHisNucSmawt*) и 36% для мутанта *Arg57Ala* (рис. 1), что соответствует литературным данным [Friedhoff 1994: 3280-3287].

В ряде работ было показано, что существует линейная зависимость между устойчивостью к ампициллину и синтезом фермента и между синтезом фермента и копийностью *bla* гена [Uhlin 1977: 1-7]. Показано также, что увеличение числа копий плазмид сопровождается повышением уровня резистентности к ампициллину. Таким образом, изменение уровня устойчивости к антибиотику и активности β-лактамазы может служить косвенным доказательством изменения количества ее генов. В качестве референс-плазмиды с известным числом копий была взята плаزمиды *pAP42:Tn1*.

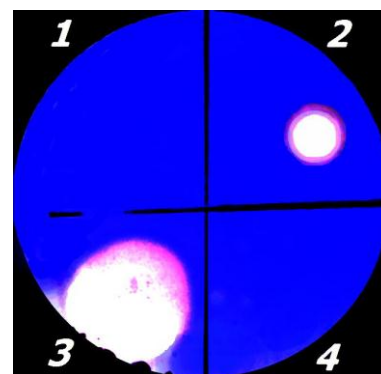


Рис. 1. Базальный уровень экспрессии генов мутантных эндонуклеаз на индикаторной среде:

- 1 – *TGE900 pHisNucSma His89Ala*;
- 2 – *TGE900 pHisNucSmaArg57Ala*;
- 3 – *TGE900 pHisNucSmawt*;
- 4 – *TGE900*

Таблица 2.

Зависимость между устойчивостью клеток к ампициллину, активностью β-лактамазы и копийностью плазмид *pHisNucSma* в рекомбинантных штаммах *E.coli TGE900*

Плаزمиды	Уровень резистентности к ампициллину, мкг/мл	Активность β-лактамазы (в условных ед., $2 \cdot 10^5$ кл)	Количество копий плазмиды
<i>pAP42:Tn1</i>	500	114,8	1-2
<i>pHisNucSmaHis89Ala</i>	1000	350,365	3-4
<i>pHisNucSmaArg57Ala</i>	13000	4191,74	40
<i>pHisNucSmawt</i>	>15000	10842,49	100

Как видно из таблицы 2, чем выше устойчивость клеток к ампициллину, тем больше копийность плазмиды. Также наблюдается увеличение копийности плазмиды с увеличением активности нуклеазы: копийность у плазмид с геном эндонуклеазы дикого типа выше, чем у плазмид, несущих ген неактивной нуклеазы.

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенных экспериментов были определены активности

мутантных нуклеаз *Serratia marcescens* при базальном уровне экспрессии их генов, находящихся в плазмиде *pHisNucSma*. Установлена обратная корреляция между элиминацией плазмид *pHisNucSma* и активностью эндонуклеаз *S. marcescens* при базальном уровне экспрессии их генов. Показано, что чем выше уровень активности мутантных эндонуклеаз *S. marcescens*, тем выше устойчивость рекомбинантных штаммов к ампициллину. Кроме того, выявлена корреляция между уровнем устойчивости к ампициллину, активностью  $\beta$ -лактамазы и количеством копий плазмид *pHisNucSma* в рекомбинантных штаммах *E. coli* TGE900.

#### Список литературы

- Chung C. T., Niemala S. L., Miller R. H.** One Step Preparation of Competent Escherichia Coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution // Proc. Natl. Acad. Scie. USA. – 1989. – V. 86. - № 7. – P. 2172-2175.
- Friedhoff P., Gimadutdinow O. and Pingoud A.** Identification of Catalytically Relevant Amino Acids of the Extracellular Serratia Marcescens Endonuclease by Alignment-Guided Mutagenesis // Nucl. Acids Res. – 1994. – V. 22. - № 16. – P. 3280-3287.
- Meiss G., Friedhoff P., Gimadutdinow O. et al.** Sequence Preferences in Cleavage of SSDNA by the Extracellular Serratia Marcescens Endonuclease // Biochemistry. – 1995. – V. 34. - № 37. – P. 11979-11998.
- Meiss G., Gimadutdinow O., Friedhoff P., Pingoud A.** Microtiter-Plate Assay and Related Assays for Nonspecific Endonucleases. Review. No Abstract Available // Methods Mol. Biol. – 2001. – V. 160. – P. 37-48.
- Perret C. J.** Iodometric Assay of Penicillinase // Nature (London). – 1954. – V. 174. - № 4439. – P. 1012-1013.
- Uhlir B., Nordström K.** R-Plasmid Gene Dosage Effects in Escherichia Coli K-12, Copy Mutants Of The R-Plasmid RI Drd-19 // Plasmid. – 1977. – V.1. – P. 1-7.
- Van Die I. M., Bergmans H. E. N., Hoekstra W. P. M.** Transformation in Escherichia Coli: Studies on the Role of the Heat Shock in Induction of Competence // J. Gen. Microbiol. – 1983a. – V. 129. - № 3. – P. 663-670.

## НЕКОТОРЫЕ СОЦИАЛЬНО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ГОРОДА

*Кузьмина С. С., Пелипенко О. Ф., Сизова М. Г.  
Южный Федеральный университет*

Здоровье населения является одним из основных показателей социально-экономического развития страны. Неслучайно, что во всех развитых странах оно рассматривается как критерий качества жизни и является одним из ведущих приоритетов в деятельности их правительств.

С точки зрения экологической физиологии и медицины концентрация населения на ограниченном пространстве создаёт ряд биологических и социальных аномалий условий существования человека. А если это пространство расположено вблизи промышленных предприятий – к ним добавляются неблагоприятные физические, химические, климатические и эдафические факторы [Березовский 1990: 103].

Право человека на благоприятную окружающую среду закреплено в Конституции Российской Федерации. Один из принципов Федерального закона «Об охране окружающей среды» – обеспечение благоприятных условий жизнедеятельности человека [2002: статья 3]. Чтобы добиться реальности права каждого на благоприятную среду, необходимо в первую очередь социально-экологическое знание как совокупности знаний о состоянии среды обитания, причинах её динамики, факторах дестабилизации, рисках и конфликтах [Яницкий 2006: 130].

В данной статье основное внимание сосредоточено только на изучении загрязняющих атмосферный воздух компонентов, как факторов, определяющих здоровье человека. По оценкам специалистов разных стран здоровье населения зависит: на 20 - 40% от состояния окружающей среды, на 15 - 20% – от генетических факторов, на 25 - 50%-от образа жизни, на 10% - от деятельности служб здравоохранения [цит. по Сидоренко, Крутько 1990: 760].

Ростов-на-Дону – крупный промышленный город и важный узел транспортных магистралей Юга России. Территория города имеет неоднородный рельеф с колебанием высот от 20 до 100 м над уровнем моря, что отражается на характере циркуляции атмосферы. Характерной особенностью микроклимата города являются ветры, преимущественно восточного, северо-восточного и западного направлений.

Ведущей отраслью промышленности города является машиностроение, а также предприятия теплоэнергетики, химические производства и др.

Разные районы города вносят различный вклад в загрязнения атмосферы.

Динамика валовых выбросов по городу обнаруживает тенденцию к снижению их в разных районах, хотя по-прежнему, остаётся высокой. Самой загрязнённой остаётся восточная часть города, приносящая 46% загрязнений, затем западная – 30%, северная – 13%, центральная – 11%.

Анализ состояния воздушной среды города показал, что всего в атмосферу в 2006 г. поступило 193,701 тыс. т загрязняющих веществ. Из них выбросы от автомобильного транспорта составляют 181,976 тыс. т (93,9%), от промышленности – 11,725 тыс. т (6,1%). Следовательно, основным источником загрязнения города остаётся автомобильный транспорт, отмечается возрастание выбросов от автотранспорта на 18,23 тыс.т. по сравнению с 2005 г.