

11. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. М., 2013.
12. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Буравцова Е.В. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень. М., 2010.
13. Покровский В.В., Юрин О.Г., Беляева В.В. и др. Клиническая диагностика и лечение ВИЧ-инфекции. М., 2001.
14. Рахманова А.Г., Виноградова Е.Н., Воронин Е.Е. и др. ВИЧ-инфекция. СПб, 2004.

Поступила 12.06.05

Контактная информация: Пузырева Лариса Владимировна, к.м.н.,
644050, Омск, ул. Химиков, 8А, р.т. (3812) 40-45-20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, А.С.Водопьянов, В.М.Сорокин

N-АЦЕТИЛ-β-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучить N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу (хитобиазу) (ЕС 3.2.1.30) у штаммов холерных вибрионов O1/неO1серогрупп различного происхождения, являющуюся составной частью хитинолитического комплекса с учетом объекта выделения и эпидемиологической значимости штаммов. *Материалы и методы.* Культуры штаммов *Vibrio cholerae* O1/неO1серогрупп получены из музея живых культур Ростовского НИПЧИ. Анализ ферментативной активности проведен на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2500 с использованием лицензионного программного обеспечения FL Solutions. При характеристике фермента привлекали базы данных NCBI. *Результаты.* Обнаружена, очищена колоночной хроматографией, изучена и охарактеризована по ряду физико-химических и биологических свойств N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза у штаммов *Vibrio cholerae* O1/неO1серогрупп. Сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности N-ацетил-β-D-глюкозаминидаз холерного вибриона (ген VC2217), *Serratia marcescens* и др. позволил отнести фермент из *V.cholerae* к гликозилгидролазам (хитобиазам) семейства 20 и классифицировать согласно номенклатуре ферментов как КФ 3.2.1.30. *Заключение.* Впервые изучена и охарактеризована N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза у холерных вибрионов O1/неO1серогрупп различного происхождения и эпидемиологической значимости, участвующая в утилизации хитина, а также показана ее возможная роль в биологии возбудителя холеры.

Журн. микробиол., № 2, С. 41—48

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, штаммы, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид (4-MUF-GlcNAc)

О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, А.С.Водопьянов, В.М.Сорокин

N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE OF *VIBRIO CHOLERAE*

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study N-acetyl-β-D-glucosaminidase (chitobiase) (EC 3.2.1.30) in strains of *Vibrio cholerae* of O1/non-O1 serogroups of various origin, that is a component of chitinolytic complex taking into account object of isolation and epidemiologic significance of strains. *Materials and methods.* Cultures of *V.cholerae* O1/non-O1 serogroup strains were obtained from the museum of live culture of Rostov RIPC. Enzymatic activity analysis was carried out in Hitachi F-2500 fluorescent spectrophotometer using FL Solutions licensed software. NCBI databases were used during enzyme characteristics. *Results.* N-acetyl-β-D-glucosaminidase in *V.cholerae* O1/non-O1 serogroup strains was detected, purified by column chromatography, studied and characterized by a number of physical-chemical and biological properties. Comparative computer analysis of

amino acid sequence of N-acetyl- β -D-glucosaminidases of *V.cholerae* (VC2217 gene), *Serratia marcescens* etc. has allowed to attribute the enzyme from *V.cholerae* to glycosyl-hydrolases (chitinobias) of family 20 and classify it according to enzyme nomenclature as EC 3.2.1.30. **Conclusion.** N-acetyl- β -D-glucosaminidase in *V.cholerae* of O1/non-O1 serogroups of various origin and epidemiologic significance, participating in chitin utilization was studied and characterized for the first time, and its possible role in biology of cholera causative agent was shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 41—48

Key words: *Vibrio cholerae*, strains, N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity, 4-methylumbelliferone-N-acetyl- β -D-glucosaminide (4-MUF. GlcNAc)

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель холеры даже в наше время продолжает представлять серьезную угрозу для здоровья человека. Особенности географического расположения России, глобализация и усиление интеграционных процессов с разными странами, интенсификация миграционных потоков населения являются предпосылками для возможного заноса холеры в Российскую Федерацию из стран с эндемичными очагами.

Учитывая ведущую роль водного фактора в распространении холеры, можно полагать, что продолжительность сохранения и свойства холерных вибрионов, включая их генотип, во многом зависят от состояния физико-химических и гидробиологических показателей воды открытых водоемов, качественной структуры и количественного содержания в них фито- и зоопланктона, факторов, определяющих особенности конкретной экосистемы. Для вибрионов характерна высокая адаптационная пластичность, которая связана с их жизненным циклом, с одной стороны, и функционированием мощного ферментативного хитинолитического комплекса — с другой [2]. В деградации хитина принимают участие, по крайней мере, шесть белков (три хитиназы, глюкозамин-связывающий белок, дезацетилаза олигосахаридов хитина, спиндолин-подобный хитин-связывающий белок) с использованием системы секреции второго типа и N-ацетилглюкозаминидазы, которая к настоящему времени у холерного вибриона не изучена и данные о ней носят предположительный характер, так как заимствованы из работ с использованием *Vibrio harvey*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio vulnificus* и *Vibrio parahaemolyticus*. Тем не менее, сведения о ферменте могут оказаться полезными для выяснения механизма его действия, возможного участия в биологии и экологии холерных вибрионов.

Цель работы — изучить N-ацетил- β -D-глюкозаминидазу (хитобиазу) (EC 3.2.1.30) у штаммов холерных вибрионов O1/неO1 серогрупп, являющуюся составной частью хитинолитического комплекса с учетом объекта выделения и эпидемиологической значимости штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В зависимости от решаемой в работе задачи использовали разные группы штаммов: 6 штаммов *V. cholerae* O1 классического (ctx+ tcp+); 6 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов *V. cholerae* O1 эльтор (Δ ctx Δ tcp), выделенных из воды поверхностных водоемов; 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (ctx+ tcp+) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных (Δ ctx Δ tcp) — из проб воды поверхностных водоемов; 6 штаммов *V. cholerae* non O1/nonO139 (ctx+ tcp+, Δ ctx tcp+, Δ ctx Δ tcp), выделенных из клинического материала; 6 атоксигенных

(Δ ctx Δ tcp) — из органов рыб, выловленных в акватории Азовского моря. Штамм P-5879 биовара эльтор (ctx+ tcp+) использовали в качестве положительного контроля, штамм *Escherichia coli* QD5003 — в качестве отрицательного при определении N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. Штаммы получали из музея живых культур Ростовского НИПЧИ, где их хранили в лиофилизированном состоянии. Для культивирования микроорганизмов использовали агар Мартена (pH 7,6), Хоттингера (pH 7,2) и эритрит-агар (pH 7,2). Ферментативную активность у холерных вибрионов выявляли качественно [7] и количественно с применением флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида (4-MUF. GlcNAc, Serva). Результат реакции оценивали на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2500 с использованием лицензионной программы FL Solutions. Измерение флуоресценции опытной пробы относительно контроля (4-MUF. GlcNAc) проводили в кювете из кварцевого стекла объемом 1 см при эмиссии 495 и экстинкции 365 нм. Количество (мкг) образовавшегося 4-метилумбеллиферона в результате отщепления от субстрата (4-MUF. GlcNAc) находили по калибровочной кривой, которую строили с использованием коммерческого препарата — 4-метилумбеллиферона (Serva). Активность выражали в мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час, отщепленного от субстрата 4-MUF. GlcNAc клетками холерного вибриона за 1 час инкубации при 37 или 28°C. Антимикробную активность очищенного препарата N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы исследовали в отношении штаммов ряда гетерологичных микроорганизмов: *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* EV, *Escherichia coli* HB101 и *E.coli* QD5003. Для этого на поверхность чашек с агаром Хоттингера (pH 7,2) и эритрит-агаром засеивали 10⁹ микробных клеток по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича и после распределения культуры шпателем устанавливали металлические колодцы диаметром 5 мм, в которые вносили испытуемый образец препарата в концентрации 0,05 — 0,7 мкг белка на пробу. Учет результатов проводили на 2 — 3 сутки роста при 37°C.

Для выделения и очистки фермента выращенные в течение 24 часов на агаре Мартена при 37°C и смытые физиологическим раствором клетки штамма *V. cholerae* eltor O1 18950 (Δ ctx Δ tcp) осаждали центрифугированием на холоде при 6000 об/мин. Клетки разрушали механическим растиранием с песком, и после удаления детрита (10000 об/мин) лизаты центрифугировали при 105 000 x g 1 час при 4°C (ротатор Sorvall AH 627, центрифуга модели Beckman L5-50B). Надосадочную жидкость концентрировали в 2 — 4 раза ультрафильтрацией (камера 10 PA, мембрана PM 30) в системе Amicon. Полученный концентрат использовали для выделения и очистки N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-100 (37x2 см) (Whatman, Англия), уравновешанную 0,01 М ацетатным буфером pH 6,0. Активные фракции объединяли и хроматографировали на фрактогеле TSK DEAE-650 (21x2 см) (Merk). Белок элюировали 0,2 М раствором NaCl, от которого избавлялись последующим диализом. Фракции собирали по 5 мл и проверяли на ферментативную активность, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (4-MUF. GlcNAc, Sigma). Белок определяли по методу Лоури или с использованием флуориметра Qubit TM фирмы Invitrogen (США).

Сыворотку получали четырехкратной внутримышечной иммунизацией кроликов по 0,05 мг белка в неполном адьюванте Фрейнда (Calbiochem) с двухнедельными интервалами.

Наличие гена N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у вибрионов тестировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью сконструированных праймеров: For:GGTTAACCATAAAGCGCTGAAC; Rev:TTGACCATCCAGTGAGTATTGC, размер фрагмента составил 193 п.н. Отжиг праймеров проводили при 60°C, предварительная денатурация — при 94°C 2 минуты, 40 циклов 94°C — 20 секунд, 60°C — 20 секунд, 72°C — 20 секунд и заключительная элонгация при 72°C — 2 минуты. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами [1] с использованием t-критерия Стьюдента и программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что большая группа генов, непосредственно участвующих в реминерализации хитина, образует так называемый хитинолитический комплекс. Часть генов этого комплекса мы охарактеризовали с помощью ПЦР с использованием оригинальных праймеров (это гены хитиназ, GlcNAc — связывающего белка, хитодекстриназы, хитопорина, хитинчувствительной гистидинкиназы и хитин-регулируемых пилей) [2], кроме одного гена VCA0140 (хитинсвязывающий белок), праймеры к которому взяты из [3]. Все штаммы O1 и O139 серогрупп клинического происхождения несли полный набор изучаемых генов хитиназного комплекса. Однако довольно пестрая картина результатов в ПЦР была выявлена у вибрионов водного происхождения. И хотя у всех исследованных водных штаммов *V. cholerae* O139 отсутствовали гены VC1073 (хитиназа), VC1952 (внеклеточная хитиназа, ChiA1), VCA0811 (GlcNAc-связывающий белок, glpA), VC0972 (хитопорин), VC2324 (ChiRP-хитин-регулируемые пилы, ген PilA), тем не менее, это не отразилось на ПЦР-детекции N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, которая у них регистрировалась довольно четко.

Прежде чем приступить к выделению и характеристике N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, был проведен биоинформационный анализ. Поиск в GenBank показал, что в нем содержится информация о трех β-гексозаминидазах (гликозилгидролазах, К.Ф.3.2.1.52), находящихся на первой хромосоме холерного вибриона. Они наделены разным молекулярным весом, зарядом, принадлежат к разным семействам гликозилгидролаз, что указывает на их индивидуальность. Выяснено, что ген VC 2217 из штамма *V.cholerae* El Tor 16961, детерминировал белок из 883 аминокислотных остатков мол. массой 97,9 кДа. Продукт этого гена является гликозилгидролазой семейства 20, а домен 2 проявлял сходство на 57,2% с геном NghA, кодирующим N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу *Yersinia pseudotuberculosis* 1123.

Среди различных модельных систем важное место занимает *Serratia marcescens*, у которой осуществлено клонирование и секвенирование гена chb (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы). Тщательно проведенные исследования позволили Tews I. et al. [8] выявить в белке структурно-функциональные домены, широко используемые другими исследователями при анализе свойств и идентификации вновь выделяемых белков. Фермент является мономером, состоит из 885 аминокислотных остатков, имеет мол. массу около 98,1 кДа и лидерную последовательность из 27 аминокислот.

При сравнительном компьютерном анализе аминокислотных последовательностей N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы *S. marcescens* и продукта гена VC2217 оказалось, что совпадение между ними составляет 54% и сходство 12,65%. Такая высокая степень близости (66, 65%) белков двух бактерий позволила идентифицировать у фермента из холерного вибриона активный центр

из двух консервативных аминокислот Asp₅₃₉ и Glu₅₄₀. Обнаружены также консервативные для β-N-глюкозаминидаз остатки Asp₃₄₆, Arg₃₄₉, Asp₃₇₈, Asp₃₇₉, Trp₆₁₆, Trp₆₈₅ и Trp₇₃₇, участвующие в связывании субстрата в фермент-субстратном комплексе. Белок гена VC2217 — гликопротеин с тремя сайтами гликозилирования. Высокая степень сходства ферментов из *Serratia marcescens* и холерного вибриона проявилась и при изучении их структурных доменов. Выполненный биоинформационный анализ позволил заключить, что продукт гена VC2217 является N-ацетил-β-D-глюкозаминидазой (КФ 3.2.1.30), участвующей в гидролизе хитина, и определил направление наших усилий по ее выделению, очистке и изучению некоторых свойств.

Одна из задач состояла в обнаружении фермента у холерных вибрионов, выделенных из различных источников с разным генотипом. В результате проведенного исследования установлено, что у всех штаммов *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров, *V. cholerae* O139, non O1/nonO139, выделенных из различных источников и с разным набором детерминант вирулентности (ctx+ tcp+, Δctx tcp⁺, ΔctxΔtcp), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность была четко зарегистрирована как качественным, так и количественным методами. Это позволило не только обнаружить фермент у всех штаммов, но и продемонстрировать вариабельность уровня N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной активности у штаммов в зависимости от объекта выделения и набора детерминант вирулентности. Обнаружено, что условия выращивания (температура) и индивидуальные особенности штаммов вибрионов влияли на уровень активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Так, клетки, выращенные на агаре Мартена при 28°C, обладали более высокой активностью по сравнению с выращенными при 37°C. Выявленное увеличение активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы при понижении температуры культивирования у штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, изолированных из воды, позволило предположить участие этого фермента в выживаемости/сохраняемости холерных вибрионов во внешней среде в условиях возможного контакта с хитинсодержащими объектами. Полученные данные могут указывать на эволюционно сложившуюся важность этого энзима для вибрионов различного происхождения. Клетки штаммов *V. cholerae* O1 эльтор биовара и O139 серогруппы (ΔctxΔtcp), выделенные из объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов) и выращенные на агаре Мартена при 28°C, обладали большей N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной активностью по сравнению со штаммами, выращенными при 37°C. Для штаммов *V. cholerae* O1, выращенных при 28°C, она составила в среднем 5,99±0,65 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час, а для штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы — 7,76±5,14 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час. В условиях культивирования при 37°C ферментативная активность для эльтор вибрионов (ΔctxΔtcp) составила в среднем — 3,57±0,92 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час и для штаммов *V. cholerae* O139 — 4,75±2,73 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час соответственно (при p=0,05). Исключение составили штаммы P-16072 (ctx+ tcp+) и P-17781 (ΔctxΔtcp), у которых отличий обнаружено не было, возможно, из-за индивидуальных особенностей штаммов. Подобная тенденция отсутствовала у штаммов вибрионов классического биовара (ctx+ tcp+), активность которых составила в среднем 7,81±3,22 при выращивании в условиях 28°C и 8,92±3,10 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час — при 37°C соответственно, что может свидетельствовать о большей экологической пластичности штаммов *V. cholerae* O1 эльтор и O139 серогрупп в условиях водного биоценоза. Интересно отметить, что у штаммов *V. cholerae* O139 (ctx+ tcp+), изолированных из кли-

нического материала и выращенных в условиях 28°C, было обнаружено увеличение ферментативной активности, что можно рассматривать как выработанный адаптационный механизм низкотемпературной регуляции метаболизма, направленный на реализацию стратегии выживания вибрионов в новых экологических условиях.

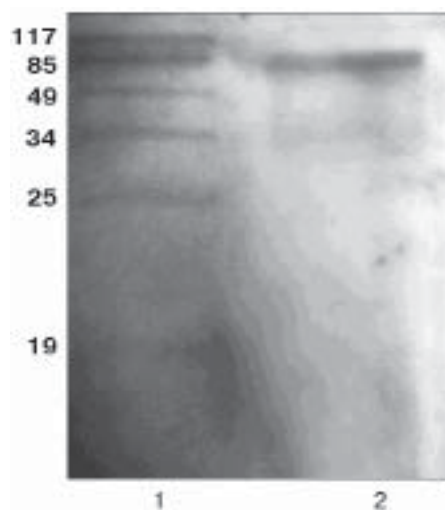
Не менее интересным объектом оказалась группа штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, часто выделяемых на различных территориях Российской Федерации. N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность четко проявлялась у всех исследованных штаммов холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп, выделенных из различных источников с разным набором детерминант вирулентности (ctx+ tcp+, Δctx Δtcp, Δctx tcp+), а также у штаммов Δctx tcp+ из клинического материала и содержащих профаг preCTX. В ходе анализа полученных результатов выявлено, что активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 из органов рыб, выловленных в акватории Азовского моря, составила в среднем 4,39±0,53 мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час. Данные были близки показателям этой активности у водных штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы. Однако активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных от людей, оказалась выше и составила в среднем 19,7±7,35 мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час (при p=0,05), что подчеркивает важность изучения роли этого фермента в биологии штаммов клинического происхождения.

Несмотря на нестабильность, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу удалось очистить в 4 раза с удельной активностью 53 мкг метилумбеллиферона/мг белка (табл.), что позволило охарактеризовать его некоторые физико-химические свойства. Согласно данным гель-электрофореза в 10% ПААГ геле (рис.), молекулярная масса очищенного мономера находилась в пределах 85 — 117 кДа, что было близко расчетным данным компьютерного анализа (97,9 кДа). При контакте с раствором субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида регистрировали интенсивную флюоресценцию геля в районе расположения полосы фермента.

Оптимальным для действия фермента оказался рН, равный 6,0 и температура 37°C, однако прогревание энзима в течение 15 мин при 50°C сопровождалось снижением его активности на 78%. При определении чувствительности фермента к действию реагентов различной химической природы выявлено ингибирующее действие ионов цинка, марганца, меди и же-

Очистка N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы из клеток штамма *V. cholerae* 18950

Этап очистки	Белок, мг/мл	Удельная активность, мкг метилумбеллиферона/мг белка
Клеточный экстракт	2,6	16,0
Фракция после центрифугирования при 105 000 g	1,6	44,25
Гель-фильтрация через сефадекс G-100	1,3	51,67
Хроматография на TSK-DEAE 650	0,5	53,0



Результаты гель-электрофореза в 10% ПААГ-SDS препарата очищенного белка N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (лунка 2) холерного вибриона. В лунке 1 — маркеры молекулярных масс.

леза. Присутствие в пробе ЭДТА и SDS (1 мМ) значительно снижало активность фермента. Вещества, нарушающие конформацию молекулы белка (8М мочевины и азид Na), вызывали полную инактивацию фермента. В концентрациях 0,05 — 0,1 М NaCl активировал ферментативную активность на 20%, а в концентрации 2 М подавлял на 45%. Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы ингибировалась на 50% после 15-минутной инкубации препарата с 1,5 мМ (250 мкг/мл) ацетилцистеина. Концентрация в 0,36 — 0,75 мМ подавляла активность на 25 — 30%, тогда как большая концентрация препарата (3 мМ и выше) полностью ингибировала активность фермента, что объясняется наличием в структуре его каталитического домена четырех остатков цистеина.

Константа Михаэлиса-Ментен (K_m) составила 0,03 мкМ, а V_{max} — 0,316 мкМ. При изучении субстратной специфичности очищенного препарата фермента использовали субстраты 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид, 4-метилумбеллиферил-Nацетил-β-D-глюкозаминид, 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид. Активность была обнаружена только в отношении 4-MUF. GlcNAc, хотя на разных этапах очистки в пробах четко регистрировалась галактозидазная активность, что может указывать на присутствие β-N-гексозаминидазы (КФ 3.2.1.52, ген VC0613). В результате очистки удалось получить препарат с активностью только N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Полученная к ферменту кроличья антисыворотка образовывала линии преципитации с исходным препаратом фермента.

Анализ полученных результатов показал, что испытуемый препарат обладал антибактериальным действием, подавляя в низких концентрациях рост ряда лабораторных штаммов *E. coli* HB101, *E. coli* QD5003, *M. luteus*, *S. typhimurium*, *Y. pestis* EV. Диаметр зон ингибирования роста был различным (3 — 10 мм), максимально выраженный антибактериальный эффект проявлялся в отношении *M. luteus* и *S. typhimurium*. Можно полагать, что препарат N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы может быть активен в отношении и других микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования у холерных вибрионов O1/неO1 серогрупп различного происхождения независимо от набора детерминант патогенности обнаружена, изучена и охарактеризована N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (хитобиаза), являющаяся составной частью хитинолитического комплекса. Наиболее высокую активность при этом наблюдали у штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп с генотипом Δctx Δtcr из объектов окружающей среды при культивировании в условиях 28°C. Полученные результаты могут указывать на значимость этого фермента для выживания и сохранения холерных вибрионов в объектах окружающей среды как в воде поверхностных водоемов, так и в морской рыбе в условиях контакта с хитинсодержащими объектами. У выделенных от людей штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, O1 классического биовара в условиях выращивания при 37°C наблюдали тенденцию к повышению активности фермента. Отдельно стоит вопрос о причинах неодинаковой активности у штаммов различного происхождения, которые могут быть связаны с особенностями регуляции синтеза или активности фермента, что предполагает необходимость изучения особенностей структуры генов и прилегающих к ним промотерных областей.

Выявленная антибактериальная способность фермента представляет интерес, так как перекликается с предположением Kaplan J.V. et al. [6] о возмож-

ном участии, например, N-ацетилглюкозаминидазы из *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* в качестве фактора колонизации в явлении устранения биопленок других бактерий с целью освобождения поверхности для собственного укоренения в конкретной экологической нише. Найденное можно рассматривать в качестве материальной основы конкурентных возможностей холерных вибрионов в сложных механизмах их циркуляции в разнообразных природных условиях.

Проведен сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы холерного вибриона (ген VC2217), *S. marcescens* и др., который вместе с другими характеристиками позволил отнести фермент из *V. cholerae* к гликозилгидролазам (хитобиазам) семейства 20 и классифицировать согласно номенклатуре ферментов как КФ 3.2.1.30. Проведенное исследование позволило дополнить хитинолитический комплекс холерного вибриона N-ацетил- β -D-глюкозаминидазой, ферментом, играющим важную роль в сохранении, выживании, питании возбудителя во внешней среде. Полученные данные могут найти применение в прикладных и фундаментальных работах по изучению тонких механизмов колонизации кишечника, сохранения и формирования новых форм вибрионов в окружающей среде, лучше адаптированных в различных экологических нишах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., Медицинская литература, 1962.
2. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О., Романова Л.В., Водопьянов А.С., Дуванова О.В., Атарова Г.Т., Демьяненко С.В. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
3. Bhowmick R., Ghosal A., Chatterjee N. S. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. J. Appl. Microbiol. 2007, 103: 97-108.
4. Henrissat B., Vairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolase based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 1993, 293:781-788.
5. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 (1): 44-51.
6. Kaplan J.B., Rangunath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. J. Bacteriol. 2003, 185 (16): 4693-4698.
7. O'Brien M., Colwell R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53 (7): 1718-1720.
8. Tews I., Vincentelli R., Vorgias C. N-acetylglucosaminidase (chitinase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. Gene. 1996, 170: 63-67.

Поступила 10.08.15

Контактная информация: Дуванова Ольга Викторовна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького 117/40, р.т. (863)240-22-66

МЕХАНИЗМЫ АТТЕНУАЦИИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА А/КРАСНОДАР/101/35/59 (H2N2)

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Изучение механизмов аттенуации холодоадаптированного (ХА) штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) вируса гриппа, связанных с нарушением функций белка NS1. *Материалы и методы.* Проведено изучение интерферогенной активности ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), его родительского варианта А/Краснодар/101/59 (H2N2), вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) и ряда одногенных и полигенных реассортантов между данными штаммами, полученных с помощью обратной генетики. Изучение динамики экспрессии гена ИФН β проводили с использованием методического подхода ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Было показано, что включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с реверсией к дикому типу не приводит к резкому изменению интерферогенной активности реассортанта. В то же время, аналогичное включение PB1-гена ХА штамма приводила к запредельному росту интерферогенной активности реассортанта. С другой стороны, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 NP-гена дикого штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) не отличалось по эффекту на интерферогенность реассортанта от включения NP-гена ХА штамма. *Заключение.* На формирование аттенуационного фенотипа реассортантов могут влиять как констелляция генов родительских вариантов, так и мутации, локализованных в этих генах. Полученные результаты позволяют предположить возможные механизмы аттенуации ХА штамма, связанных с нарушением функции NS гена.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 49–56

Ключевые слова: аттенуация, вирус гриппа, индукция интерферона, комплекс CPSF-30-NS1, белки полимеразного комплекса, мутации

S.G.Markushin, O.A.Svitich, A.R.Kinkulkina, I.B.Koptyaeva, K.V.Lisovskaya

MECHANISMS OF ATTENUATION OF COLD-ADAPTED STRAIN A/KRASNO-DAR/101/35/59 (H2N2)

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study of mechanisms of attenuation of cold-adapted (ca) influenza virus strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), associated with disruption of NS1 protein functions. *Materials and methods.* Study of interferonogenic activity of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), its parent variant A/Krasnodar/101/59 (H2N2), virulent strain A/WSN/33 (H1N1) and a number of single gene and multiple gene reassortants between these strains, obtained using reverse genetics, was carried out. Study of dynamics of IFN β gene expression was carried out by using a methodical approach of RT-PCR in real time mode. *Results.* Inclusion of PB-1 gene of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) with reversion to wild type into genome composition of virulent strain A/WSN/33 (H1N1) does not result in a sharp change of interferonogenic activity of the reassortant. At the same time, similar inclusion of PB-1 gene of ca strain resulted in an incredible growth of interferonogenic activity of the reassortant. On the other hand, inclusion of NP-gene of wild type strain A/Krasnodar/101/59 (H2N2) into genome composition of the wild type strain A/WSN/33 did not differ by effect on interferonogenicity of the reassortant from inclusion of NP-gene of ca strain. *Conclusion.* Both constellations of genes of parent variants and mutations localized in these genes could affect formation of attenuation phenotype of reassortants. The data obtained allow to assume possible mechanisms of attenuation of ca strains, associated with disruption of NS gene function.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 49–56