

Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинокоев, Я.М.Краснов,  
Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *aspA* У ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Показана вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов, выделенных в Российской Федерации и ближнем зарубежье. У штаммов алтайского и гиссарского подвидов, также как и у штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, в позиции 363 белка AspA находится аминокислота валин. У штаммов кавказского и улэгейского подвидов в этой позиции присутствует серин, а у штаммов основного подвида – лейцин. Вариабельность гена *aspA* может быть использована для генотипирования штаммов возбудителя чумы.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, вариабельность нуклеотидных последовательностей генов, аспартаза, генотипирование штаммов.

В настоящее время для создания эффективной системы молекулярного типирования возбудителя чумы, использование которой позволит с высокой достоверностью определять происхождение штамма и его принадлежность к одному из пяти подвидов *Y. pestis* (отличающихся по вирулентности), проводится поиск вариабельных ДНК-локусов в геноме этого возбудителя. Ранее нами была показана перспективность применения для этих целей хромосомных генов *rhaS* и *araC*, контролирующих ферментацию моносахаридов рамнозы и арабинозы [1, 2]. Недавно зарубежными исследователями у ряда штаммов *Y. pestis* выявлена вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA*, кодирующего биосинтез аспарат-аммониумлиазы (синоним аспартаза) – AspA [3, 6]. Белок AspA катализирует дезаминирование L-аспартата с образованием фумарата – компонента цикла трикарбоновых кислот [3].

Целью этой работы было изучение вариабельности нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, выделенных в Российской Федерации, других странах СНГ и Монголии, для установления возможности использования *aspA* в системе мультилокусного секвенирования штаммов возбудителя чумы разного происхождения. Всего исследовано 19 штаммов *Y. pestis* основного (3 штамма), алтайского (4), кавказского (4), улэгейского (4) и гиссарского (4) подвидов, изолированных в природных очагах России и ближнего зарубежья (таблица). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Кроме того, с помощью алгоритма BLAST проведен компьютерный анализ 7 штаммов *Y. pestis*: KIM (биовар *medievalis*), CO92 (биовар *orientalis*), Antiqua (биовар *antiqua*), Angola, Nepal516, 91001 (биовар *microtus*), Pestoides F (кавказский подвид) и 4 штаммов *Y. pseudotuberculosis*: PB1/+ (1 серовара), IP32953 (1 серовара), IP 31758 (1 серовара), YPIII (3 серовара), полные нуклеотидные последовательности геномов которых представлены

в базе данных NCBI GenBank. На основе сравнения последовательностей генов *aspA* у штаммов *Y. pestis* (GenBank) определен вариабельный локус гена *aspA* (в позиции 1087–1089 от начала гена) и рассчитаны олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие этот участок гена. Они имеют следующий состав: Asp 400S GAAGCGACCTCTGATTGC и Asp400As AAGTGACGATGCCTATGG. Амплификацию фрагмента гена *aspA* в ПЦР осуществляли по следующей схеме: 1 цикл 94 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C 45 с, 55 °C 1 мин, 72 °C 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °C. Определение нуклеотидной последовательности полученных фрагментов *aspA* проводили по методу F.Sanger *et al.* с использованием прямых и обратных праймеров [5]. Выравнивание и сравнение нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ MEGA4. Полученные экспериментальные данные, а также результаты проведенного компьютерного анализа суммированы в таблице.

В результате сравнения полученных последовательностей фрагментов гена *aspA* установлено, что у штаммов алтайского (*Y. pestis* 4857, И-2998, И-3085, KM1203) и гиссарского (*Y. pestis* A-1633, A-1730, A-1249, A-1728) подвидов в позиции 1087–1089 от начала гена *aspA* находится тот же триплет GTG, что и у штаммов *Y. pseudotuberculosis*, представленных в базе GenBank (таблица), который кодирует аминокислоту валин, расположенную в положении 363 в белке AspA. Таким образом, у штаммов алтайского и гиссарского подвидов в геноме присутствуют гены *aspA* «дикого» типа. В отличие от них у штаммов двух других подвидов – кавказского (*Y. pestis* 3551, 376, 1470, 818) и улэгейского (*Y. pestis* И-3069, И-3131, И-2422, И-3071) в этой позиции гена *aspA* находится другой триплет – TCG, который кодирует аминокислоту серин. По данным S.W.Bearden *et al.* [3] замена аминокислотного остатка валина на серин не оказывает влияния на активность белка AspA. Еще у двух штаммов *Y. pestis* Angola и Nepal516 (GenBank) в позиции

Вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Y. pestis*

Штамм	Источник выделения	Триплет в позиции 1087–1089	Аминокислотный остаток в позиции 363
<i>Y. pestis</i> основной п/в			
A-1836	Серый сурок	TTG	Leu
A-161	Блохи большой песчанки	«	«
2638	Полуденная песчанка	«	«
Кавказский п/в			
3551	Блохи гнезда обыкновенной полевки	TCG	Ser
376	Обыкновенная полевка	«	«
1470	Обыкновенная полевка	«	«
818	Блохи гнезда обыкновенной полевки	«	«
Улегейский п/в			
И-3069	Полевка Брандта	TCG	Ser
И-3131	Монгольская пищуха	«	«
И-2422	Блохи монгольской пищухи	«	«
И-3071	Монгольская пищуха	«	«
Алтайский п/в			
4857	Труп монгольской пищухи	GTG	Val
И-2998	Монгольская пищуха	«	«
И-3085	Полевка Брандта	«	«
КМ1203	Блохи монгольской пищухи	«	«
Гиссарский п/в			
A-1633	Блохи арчевой полевки	GTG	Val
A-1730	Блохи гнезда арчевой полевки	«	«
A-1249	Арчевая полевка	«	«
A-1728	Арчевая полевка	«	«
<i>Y. pestis</i> , данные GenBank			
К1М б/в <i>medievalis</i>		TTG	Leu
CO92 б/в <i>orientalis</i>		TTG	Leu
<i>Antiqua</i> б/в <i>antiqua</i>		TTG	Leu
Angola		TTT	Phe
Nepal516		TTT	Phe
91001 б/в <i>microtus</i>		GTG	Val
<i>Pestoides</i> F кавказский п/в		TCG	Ser
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , данные GenBank			
PВ1/+		GTG	Val
IP 32953		GTG	Val
IP 31758		GTG	Val
УРП		GTG	Val

363 находится аминокислота фенилаланин, наличие которой в этом локусе приводит к снижению (но не потере) активности фермента аспартазы [3].

У трех изученных нами штаммов основного подвида (*Y. pestis* A-1836, A-161 и 2638), а также у штаммов основного подвида, представленных в GenBank в позиции 1087–1089 гена *aspA* находится триплет TTG, который кодирует аминокислоту лейцин (таблица). R.E.Viola *et al.* [6] показали, что наличие аминокислоты лейцина в позиции 363 аспартазы является причиной отсутствия активности этого фермента у штаммов основного подвида. По гипоте-

зе R.R.Brubaker *et al.* [4], отсутствие активности фермента аспартазы приводит к развитию острой формы заболевания, вызываемой основным подвигом *Y. pestis*. Штаммы пестоидов (неосновных подвидов) обладают сниженной вирулентностью из-за наличия активного фермента – аспартазы [3, 4, 6].

Таким образом, нами показана вариабельность гена *aspA* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, выделенных на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья. Изменчивость последовательности гена *aspA* в сочетании с вариабельностью других генов, может быть использована для

проведения внутривидовой дифференциации возбудителя чумы, а наличие специфического триплета в позиции 1087–1089 гена *aspA* может служить генетической меткой штаммов *Y. pestis* разных подвидов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00100, 08-04-00731 и 08-04-12082 ОФИ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Одинокоев Г.Н. и др. Структурно-функциональный анализ гена *agaC* у штаммов различного происхождения. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2009; (2): (в печати).
2. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е. и др. Исследование вариабельности нуклеотидной последовательности генов *gha* локуса у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2008; 2:23–7.
3. Bearden S.W., Sexton C., Pare J. et al. Attenuated enzootic (pestiodes) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. Microbiology. 2009; 155:198–209.
4. Brubaker R.R. Intermediary metabolism  $\text{Na}^+$ , the low calcium response and acute disease. In: Perry R.D., editor. The genus *Yersinia*: from genomics to function. New York: Springer; 2007. P. 116–29.
5. Sanger F., Nicklen L., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.
6. Viola R.E., Yerman L., Fowler J.M. et al. A missense mutation causes aspartase deficiency in *Yersinia pestis*. Microbiology. 2008; 154:1271–80.

#### Об авторах:

Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, Ya.M.Krasnov, N.P.Gooseva, V.V.Kutyrev

#### Variability of the *aspA* Genes in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Demonstrated was variability of the *aspA* gene nucleotide sequence in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies isolated in the Russian Federation and neighboring countries. Strains of *altaica* and *hissarica* subspecies, just as *Yersinia pseudotuberculosis*, possess valine in position 363 of the AspA protein. Strains of *caucasica* and *ulegeica* subspecies carry serine in this position, while strains of the main subspecies carry leucine. The *aspA* gene variability is thought to be applicable for genotyping of plague agent strains.

*Key words:* plague agent, gene nucleotide sequence variability, aspartase, genotyping of the strains.

#### Authors:

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Krasnov Ya.M., Gooseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.02.09.