

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

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ *nar* ОПЕРОНА У ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* РАЗНЫХ ПОДВИДОВ

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

Проведен структурно-функциональный анализ генов *nar* оперона, кодирующего диагностически-значимый признак – редуцицию нитратов, у *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов. Установлено, что причиной неспособности части штаммов основного подвида восстанавливать нитраты является наличие замены нуклеотида (G на T в позиции 613 п.н.) в гене *narA*. Другая замена – G на A в позиции 1021 п.н. гена *narA* не может служить причиной отсутствия этого диагностического признака у неосновных подвигов и у биовара *microtus*, поскольку встречается как у денитрифицирующих, так и неденитрифицирующих штаммов *Y. pestis*.

Ключевые слова: возбудитель чумы, основной и неосновные подвиды, нитратредукция, структурный ген, мутации.

Способность редуцировать нитраты является одним из важнейших дифференциально-диагностических признаков, лежащих в основе современных схем внутривидовой классификации *Yersinia pestis*. По существующей зарубежной классификации штаммы античного (*antiqua*) и восточного (*orientalis*) биоваров чумного микроба обладают денитрифицирующей активностью, в то время как штаммы средневекового (*medievalis*), а также недавно предложенного D.Zhou *et al.* биовара *microtus* не способны восстанавливать нитраты [1, 3, 5]. Согласно имеющимся данным причиной отсутствия денитрифицирующей активности у биоваров *medievalis* и *microtus* является наличие единичных нуклеотидных замен в гене *narA* (в позиции 613 и 1021 п.н. соответственно), которые приводят к нарушению структуры кодируемого этим геном продукта – периплазматической нитратредуктазы [5].

Штаммы основного и неосновных подвигов чумного микроба, циркулирующие в различных природных очагах на территории РФ и стран ближнего зарубежья, также различаются по их денитрифицирующей активности [1, 2]. Штаммы высоковирулентного основного подвида неоднородны по этому признаку и отличаются по их способности редуцировать нитраты, что позволяет предположить их принадлежность к различным биоварам. Кавказский подвид восстанавливает нитраты, в отличие от других неосновных – алтайского, улегейского подвигов, а также штаммов таласской группы, которые не обладают этим свойством. Штаммы гиссарского подвида преимущественно лишены денитрифицирующей активности [1].

Генетические причины неспособности к денитрификации у некоторых штаммов основного и неосновных подвигов остаются до настоящего времени не выясненными. Данные по этому вопросу в литературе отсутствуют. В связи с этим целью нашей работы было изучение структурно-функциональной организации генов *nar* оперона для установления причины отсутствия редуцирующей активности у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов.

Материалы и методы

В работе использовано 22 штамма *Y. pestis* основного и неосновных подвигов из различных природных очагов Российской Федерации и ближнего зарубежья (таблица), которые получены из Государственной коллекции патогенных бактерий.

Для определения нуклеотидной последовательности переменных областей гена *narA* с помощью программы Primer Express нами рассчитаны праймеры Nap469 – TACGCGGCGTTGAAGTTG и Nap1187 – TTGCCGGTTAACAGGTGC. Амплификацию фрагмента гена *narA* в ПЦР осуществляли по следующей схеме: 1 цикл 94 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C – 45 с, 56 °C – 1 мин, 72 °C – 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °C.

Результаты и обсуждение

В начале исследований был проведен сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей пяти генов *nar* оперона, а также гена *narP*, участвующего в восстановлении нитратов [4], у штаммов *Y. pestis* KIM (*medievalis*), CO92 (*orientalis*), Antiqua, Angola. Nepal516 (*antiqua*), 91001 (*microtus*), Pestoides F (кавказский подвид) и *Yersinia pseudotuberculosis* PB1+, IP 32953, IP 31758, YPIII, представленных в базе данных NCBI GenBank. В результате установлено наличие единичных нуклеотидных замен в генах *narB* (в позиции 51, 135, 268 п.н. от начала гена), *narC* (54, 219, 507, 519) *narD* (69, 95, 192, 211), *narF* (322) и в гене *narP* (72, 139, 140, 198). Однако эти замены, по-видимому, не могли быть причиной нарушения проявления изучаемого признака, поскольку присутствовали у денитрифицирующих штаммов чумного и некоторых штаммов псевдотуберкулезного микробов.

Результаты компьютерного анализа нуклеотидной последовательности структурного гена *narA*, размер которого составляет 2493 п.н., показали присутствие в нем 27 единичных нуклеотидных замен у различных

Характеристика использованных в работе штаммов *Y. pestis*

Штамм	Природный очаг	Позиция в гене <i>napA</i>		Редукция нитратов
		613 п.н.*	1021 п.н.*	
<i>Основной подвид</i>				
A-161	Устюртский	T	G	-
A-1836	Сарыджазский	G	G	+
C-631	Центрально-Кавказский	T	G	-
И-3244	Монголия	G	G	+
A-1818	Таласский	T	G	-
<i>Кавказский подвид</i>				
818	Приараксинский	G	A	+
C-534	Северо-Западный Прикаспийский	G	A	+
C-533	Каракумский	G	A	+
6499		G	A	+
<i>Алтайский подвид</i>				
И-2377	Горно-Алтайский	G	A	-
И-3085	Убурхангай, МНР	G	A	-
И-2359	Горно-Алтайский	G	A	-
<i>Гиссарский подвид</i>				
A-1249	Гиссарский	G	A	-
A-1633	Гиссарский	G	A	-
A-1627	Гиссарский	G	A	-
A-1724	Гиссарский	G	A	-
A-1725	Гиссарский	G	A	+
A-1726	Гиссарский	G	A	+
<i>Улэгейский подвид</i>				
И-2422	Монголия	G	G	-
И-3130	Монголия	G	G	-
<i>Таласская группа</i>				
A-1802	Таласский	G	A	-
A-1814	Таласский	G	A	-

*Указана позиция значимых замен нуклеотидов в гене *napA*.

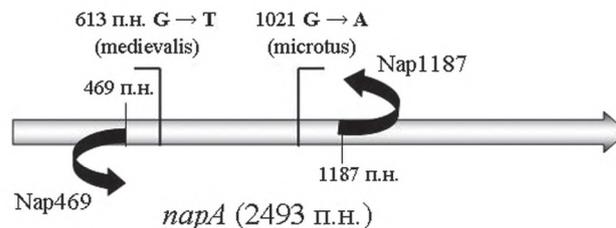
штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (GenBank). Наиболее значимой оказалась замена нуклеотида G на T в позиции 613 п.н. от начала гена, которая была выявлена у штамма K1M (биовар *medievalis*). По данным математического анализа, с использованием программы MEGA4 установлено, что она приводит к смене кодона GAA на TAA, который является стоп-кодоном и причиной преждевременной терминации трансляции полипептидной цепи (после 204-го аминокислотного остатка) молекулы периплазматической нитратредуктазы. Эти результаты подтверждают данные других исследователей о том, что причиной отсутствия редукции нитратов у чумного микроба биовара *medievalis* является наличие замены нуклеотида в позиции 613 п.н. гена *napA* [5].

Причиной неспособности редуцировать нитраты биоваром *microtus*, согласно данным D. Zhou *et al.* [5], является единичная нуклеотидная замена G на A в позиции 1021 п.н. от начала гена *napA*, приводящая

к смене кодона GCC на ACC и кодируемой аминокислоты аланина (Ala) на треонин (Thr) в позиции 341-го аминокислотного остатка. Однако данные проведенного нами компьютерного анализа свидетельствуют о том, что эта нуклеотидная замена не может быть причиной отсутствия денитрификации у биовара *microtus*, поскольку она встречается и у штаммов, способных восстанавливать нитраты – *Y. pseudotuberculosis* PV1/+, IP 32953, IP 31758, УРШ. Таким образом, генетические причины отсутствия способности к редукции нитратов у штаммов биовара *microtus* остаются не установленными.

Для выявления причин отсутствия денитрифицирующей активности у некоторых штаммов возбудителя чумы нами изучено 22 штамма основного и неосновных подвидов, циркулирующих в природных очагах на территории РФ и ближнего зарубежья (таблица). Основной подвид был представлен четырьмя штаммами из Устюртского, Центрально-Кавказского, Сарыджазского, Таласского очагов чумы и одним штаммом из Монголии. Неосновные подвиды включали 18 штаммов, в том числе 4 изолята кавказского (Приараксинский, Северо-Западный Прикаспийский, Каракумский очаги), 3 – алтайского (Алтайский горный очаг), 6 – гиссарского (Гиссарский высокогорный очаг), 2 – улэгейского (Монголия) подвидов чумного микроба, а также 2 штамма из Таласского высокогорного очага чумы. Все изученные штаммы кавказского подвида обладали денитрифицирующей активностью, в отличие от штаммов алтайского, улэгейского подвидов и таласской группы. В то же время штаммы основного и гиссарского подвидов были неоднородны по проявлению этого признака (таблица).

У всех использованных в работе штаммов проведено изучение гена *napA* с помощью рассчитанных нами праймеров Nap469-Nap1187 на переменный участок, содержащий значимые замены нуклеотидов в позиции 613 п.н. и 1021 п.н. (рисунок). В ПЦР был получен специфический амплификат фрагмента гена *napA*, имеющий размер 719 п.н., при секвенировании которого установлено, что штаммы основного подвида A-161, C631, A-1818, неспособные редуцировать нитраты, имели единичную нуклеотидную замену G на T в позиции 613 п.н., характерную для



Структура гена *napA*, кодирующего периплазматическую нитратредуктазу у штаммов *Y. pestis*. Стрелками указаны места посадки праймеров Nap469 и Nap1187, фланкирующих переменный участок гена. Также указано положение нуклеотидных замен (в позициях 613 и 1021 п.н.), которые, по литературным данным, приводят к нарушению функциональной активности гена *napA*

штаммов биовара *medievalis*, которая приводит к смене кодона (GAA на TAA) и преждевременной тер-минации трансляции полипептидной цепи молекулы периплазматической нитратредуктазы. В отличие от них, штаммы основного подвида И-3244 и А-1836, обладающие денитрифицирующей активностью, а также все штаммы неосновных подвигов независимо от наличия или отсутствия этой активности по-добного генетического дефекта в позиции 613 п.н. не имели.

У штаммов кавказского подвида, способного восстанавливать нитраты, в гене *napA* нами установ-лено наличие нуклеотидной замены G на A в пози-ции 1021 п.н., которая обнаружена и у алтайского, гиссарского подвигов и штаммов таласской группы, не обладающих таким свойством. У всех штаммов основного и улэгейского подвигов нуклеотидная за-мена в позиции 1021 п.н. отсутствовала. Эти данные подтверждают сделанный нами выше на основании данных компьютерного анализа вывод о том, что наличие замены нуклеотида в позиции 1021 п.н. не является причиной отсутствия редукции нитратов у биовара *microtus*, поскольку она выявлена нами и у штаммов разных подвигов *Y. pestis* как способных, так и неспособных редуцировать нитраты.

Таким образом, проведенное секвенирование нуклеотидной последовательности вариабельно-го фрагмента гена *napA*, полученного с помощью пары праймеров Nap469-Nap1187, показало нали-чие единичной нуклеотидной замены G на T в по-зиции 613 п.н. у части штаммов основного подвида, что коррелировало с отсутствием у них способности восстанавливать нитраты. Наличие уникальной ну-клеотидной замены в позиции 613 п.н., являющейся генетической меткой биовара *medievalis*, у штаммов А-161, С-631 и А-1818 основного подвида может служить основанием для отнесения их к биовару *medievalis*.

Нуклеотидная замена G на A в позиции 1021 п.н. обнаружена нами у всех неосновных подвигов *Y. pestis* как денитрифицирующих, так и не восста-навливающих нитраты, за исключением улэгейского, также неспособного к редукции нитратов, подвида. В связи с этим замена в позиции 1021 п.н., вопре-ки мнению D. Zhou *et al.* [5] не может являться при-чиной отсутствия денитрифицирующей активности у штаммов биовара *microtus*, так как обнаружена у

штаммов кавказского подвида, восстанавливающих нитраты, но не обнаружена у штаммов улэгейского подвида, не обладающих денитрифицирующей ак-тивностью. По всей видимости, генетические причи-ны отсутствия способности редуцировать нитраты у биовара *microtus* и у алтайского, улэгейского, части штаммов гиссарского подвигов, а также таласской группы штаммов следует искать за пределами *nap* оперона в других генах, функционально связанных с восстановлением нитратов. Работа поддержана гран-тами РФФИ № 07-04-00100, 08-04-00731a и 08-04-12082 офи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкуле-за. Мол. ген., микробиол. и вирусол. 2002; 1: 3–7.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Понов Н.В. с соавт. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырева. М.: Медицина; 2004.
3. Devignat, R. Varietes de l'espece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. Bull OMS. 1951; 4:247-63.
4. Richardson D.J., Berks B.C., Russell D.A. *et al.* Functional, biochemical and genetic diversity of procariotyc nitrate reductases. CMLS. 2001; 58:165–78.
5. Zhou D., Tong Z., Song Y. *et al.* Genetics metabolic varia-tions between *Yersinia pestis* biovar and the proposal of a new biovar, *microtus*. J. Bacteriol. 2004; 186:5147–52.

G.N.Odinokov, G.A.Eroshenko, N.A.Vidyaeva, Ja.M.Krasnov,
N.P.Gouseva, V.V.Kutyrev

Structural and Functional Analysis of *nap* Operon Genes in *Yersinia pestis* Strains of Different Subspecies

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out was structural and functional analysis of *nap* genes coding for a significant diagnostic feature – nitrate reduction in main and non-main subspecies of *Yersinia pestis*. The presence of a single nucleotide substitution (A for T in position 631) in gene *napA* was determined to be the reason for the lack of nitrate reduction in part of the main subspecies strains. Other mutation – single nucleotide substitution G for A in position 1021 of *napA* is not the reason for absence of this diagnostic feature in non-main subspecies and biovar *microtus* as this substitution is present in denitrifying and non-denitrifying strains.

Key words: plague agent, main and non-main subspecies, nitrate reduc-tion, structural gene, mutation.

Об авторах:

Одиноков Г.Н. (м.н.с.), Ерошенко Г.А. (вед.н.с.), Видяева Н.А. (н.с.), Краснов Я.М. (н.с.), Гусева Н.П. (с.н.с.), Кутырев В.В. (директор). Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 41005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 07.11.08.