

Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинокоев, Л.М.Куклева, А.И.Павлова, Н.Ю.Шавина,
Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ЛОКУСЫ ГЕНОВ *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ДНК-МИШЕНИ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

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

Выявлена изменчивость нуклеотидных последовательностей генов жизнеобеспечения *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* у природных штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов из различных природных очагов чумы. Установлено, что использование варибельных локусов этих генов позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя чумы и определять принадлежность изучаемого штамма к определенному подвиду или биовару.

Ключевые слова: возбудитель чумы, варибельность генов, молекулярное типирование.

Наличие многочисленных природных очагов чумы на территории Российской Федерации, неблагоприятное по чуме в граничащих с ней сопредельных странах, а также возможность использования возбудителя чумы в биотеррористических актах настоятельно требуют разработки эффективной системы молекулярной диагностики штаммов *Y. pestis*. Создание такой системы позволит проводить быструю дифференциацию штаммов возбудителя чумы от других близкородственных иерсиний, а также устанавливать источник происхождения штамма и определять его ландшафтно-географическую принадлежность. В настоящее время достаточно остро стоит проблема обнаружения высокоразрешающих генетических локусов, которые могут быть использованы в качестве ДНК-мишеней для генотипирования *Y. pestis*. Однако в литературе имеется ограниченное количество публикаций по этому вопросу [1, 2, 4, 5, 6]. Для генотипирования штаммов возбудителя чумы, как правило, используются достаточно консервативные гены, применение которых позволяет проводить разделение видов внутри рода *Yersinia*, но не внутривидовую дифференциацию штаммов *Y. pestis* [5, 6].

На основе проведения сравнительного компьютерного анализа более чем двадцати генов жизнеобеспечения *Y. pestis*, участвующих в азотном, углеводном, и аминокислотном обменах, нами выбраны гены *napA* (периплазматическая нитратредуктаза), *aspA* (аспартатаммонийлиаза), *rhaS* (активатор транскрипции L-рамнозного оперона), *zwf* (глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа) и *tcaB* (белок TcaB комплекса инсектицидных токсинов), использование которых позволяет проводить внутривидовое деление штаммов возбудителя чумы и определять их принадлежность к подвидам – основному, кавказскому, алтайскому, гиссарскому, улегейскому и к биоварам – античному, средневековому и восточному.

Выявление варибельных участков генов *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* проводили на основе сравнения их нуклеотидных последовательностей у всех штаммов *Y. pestis*, представленных в базе данных NCBI GenBank: KIM (б/в medievalis), CO92 (б/в orientalis), Antiqua, Angola, Nepal516 (б/в antiqua), 91001 (б/в mi-

crotus), Pestoides F (кавказский подвид) и *Y. pseudotuberculosis* PB1/+, IP 32953, IP 31758, YPIII. На выявленные варибельные участки этих генов с помощью программы PrimerExpress нами рассчитаны праймеры, которые использованы для амплификации этих локусов в ПЦР для их последующего секвенирования. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществляли на автоматическом синтезаторе ДНК «АСМ-800» (Биоссет, Россия) в РосНИПЧИ «Микроб». Полученные в ПЦР фрагменты генов анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* проводили на генетическом анализаторе модели «SEQ 8000» (Beckman Coulter) по методу Ф.Сэнгера (1977). Для сравнения нуклеотидных последовательностей генов природных штаммов *Y. pestis* с последовательностями этих генов у штаммов, представленных в базе данных NCBI GenBank, использовали алгоритм BLAST и программное обеспечение MEGA 4.0. Филогенетические деревья получали с помощью программы MEGA 4.0 с применением алгоритма UPGMA.

Изучение варибельности нуклеотидных последовательностей генов *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* проводили у 80 природных штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов из различных природных очагов Российской Федерации, ближнего и дальнего зарубежья (таблица). В варибельных локусах изученных генов выявлены различные типы мутаций, использование которых в методе мультилокусного сиквенс-типирования позволяет осуществлять эффективную дифференциацию штаммов *Y. pestis* по подвидам, биоварам и, частично, на групповом (популяционном) уровне.

Деление штаммов основного подвида по их принадлежности к одному из трех биоваров – античному, средневековому и восточному проводили на основе изменчивости нуклеотидных последовательностей генов *napA* и *tcaB* (таблица). В гене *napA* у всех штаммов средневекового биовара выявлена мутация, приводящая к замене нуклеотида G на T в позиции 613 от начала гена *napA*. Вторая мутация – делеция нуклеотида A в позиции 1037 гена *tcaB* обнаружена

Характеристика штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Штаммы	Локусы						
	<i>aspA</i> 1087–1089 (436)*	<i>rhaS</i> (822)*			<i>napA</i> 613 (719)*	<i>Zwf</i> 463 (305)*	<i>tcaB</i> (-A), 1037 (270)*
		482	494	671			

GenBank

<i>Y. pestis</i>							
CO92 (orientalis)	TTG	G	T	A	G	C	T
KIM (medievalis)	TTG	G	T	A	T	C	A
Antiqua	TTG	G	T	A	G	C	A
Nepal516 (antique)	TTT	G	T	A	G	C	A
Angola	TTT	G	T	G	G	C	A
91001 (microtus)	GTG	G	T	G	G	C	A
Pestoides F (кавказский п/в)	TCG	G	C	G	G	T	A
<i>Y. pseudotuberculosis</i>							
YPIII	GTG	G	C	G	G	T	A
PB1+	GTG	G	C	G	G	T	A
IP 32953	GTG	G	C	G	G	T	A
IP 31758	GTG	G	C	G	G	T	A

Эксперимент

<i>Y. pestis</i>							
243	TTG	G	T	A	G	C	T
65/23	TTG	G	T	A	G	C	T
Hamburg 15	TTG	G	T	A	G	C	T
Sonche	TTG	G	T	A	G	C	T
Основной п/в (<i>subsp. pestis</i>)							
A-1836, И-3223, A-100	TTG	G	T	A	G	C	A
A-161, KM 919, C-527, A-1793, A-1760, A-1702	TTG	G	T	A	T	C	A
231, 680	TCG	G	T	A	G	C	A
KM 776	TTT	G	T	A	T	C	A
Кавказский п/в (<i>subsp. caucasica</i>)							
1146, 376	TCG	G	C	G	G	T	A
Алтайский п/в (<i>subsp. altaica</i>)							
И-3000, 4857	GTG	G	T	G	G	C	A
Гиссарский п/в (<i>subsp. hissarica</i>)							
A-1249, A-1633	GTG	A	T	G	G	C	A
Улегейский п/в (<i>subsp. ulegeica</i>)							
И-2422, И-3068	TCG	G	T	G	G	C	A

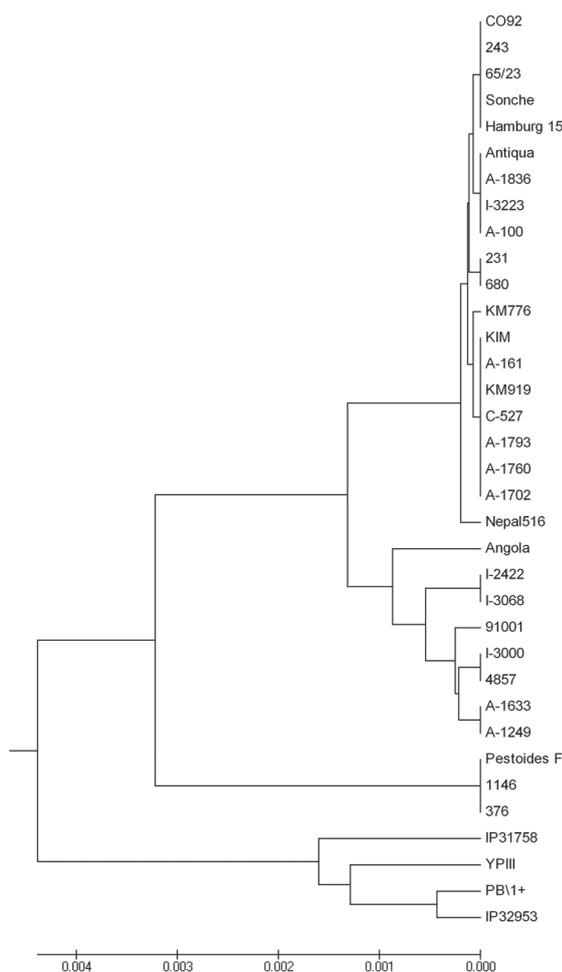
*Указаны размеры (в п.н.) секвенированного фрагмента гена.

только у штаммов восточного биовара. У штаммов античного биовара обе эти мутации отсутствуют, а гены *napA* и *tcaB* находятся в интактном виде.

Определение принадлежности штаммов возбудителя чумы к основному или неосновным подвидам осуществляли с помощью варибельного локуса гена *rhaS* в позиции 671 от начала гена (таблица). У штаммов неосновных подвидов в позиции 671 присутствует нуклеотид G, в то время как у всех штаммов основного подвида выявлена мутация со сменой нуклеотида G на A. Таким образом, штаммы *Y. pestis* основного подвида содержат в гене *rhaS* нуклеотид A, в то время как штаммы неосновных подвидов – нуклеотид G (таблица).

Варибельность нуклеотидной последовательности другого гена – *aspA* позволяет проводить дифференциацию внутри штаммов основного и неосновных подвидов возбудителя чумы. Все изученные нами штаммы кавказского и улегейского подвидов содержат

в позиции 1087–1089 гена *aspA* триплет TCG, который кодирует аминокислоту серин в положении 363 белка AspA. Штаммы алтайского и гиссарского подвида содержат в этой позиции триплет GTG, детерминирующий в белке AspA аминокислоту валин. Подавляющее большинство штаммов основного подвида содержит триплет TTG и аминокислоту лейцин в белке AspA. Однако часть штаммов из высокогорного очага чумы в Киргизии, как и штаммы кавказского и улегейского подвидов, имеют в этом локусе триплет TCG и аминокислоту серин в AspA (таблица). Еще один штамм основного подвида из высокогорного очага чумы на Кавказе содержит в этой позиции триплет TTT, который кодирует аминокислоту фенилаланин. Такую же мутацию имеют и два штамма – Nepal516 и Angola, представленные в базе данных NCBI GenBank (таблица). Таким образом, использование варибельности нуклеотидной последовательности гена *aspA* позволяет выделять дополнительные группы штаммов внутри



Дифференциация штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов на основе варибельности последовательностей генов *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB* (MEGA 4,0; алгоритм UPGMA)

основного подвида возбудителя чумы. На основе варибельности этого генетического локуса проводится также деление штаммов неосновных подвидов на две группы. Штаммы кавказского и улегейского подвидов содержат в позиции 1087–1089 гена *aspA* триплет TCG, а штаммы алтайского и гиссарского подвидов – триплет GTG.

Дальнейшее разделение филогенетически близкородственных штаммов гиссарского и алтайского подвидов проводят на основе варибельного нуклеотида в позиции 482 от начала гена *rhaS*. Штаммы гиссарского подвида содержат уникальную мутацию – замену нуклеотида G на A в положении 482 гена *rhaS*, отсутствующую у других штаммов *Y. pestis*, что позволяет проводить их идентификацию среди других подвидов *Y. pestis*. Разделение штаммов кавказского и улегейского подвидов проводят на основе наличия двух мутаций: замены C на T в позиции 494 от начала гена *rhaS* и замены T на C в позиции 463 от начала гена *zwf* у штаммов улегейского подвида (таблица). В штаммах кавказского подвида эти мутации отсутствуют, и гены *rhaS* и *zwf* находятся у них в интактном состоянии. Таким образом, в результате использования варибельности генов *aspA*, *rhaS*, *zwf* все штаммы неосновных подвидов можно четко раз-

делить на кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский подвиды.

Нуклеотидные последовательности варибельных локусов генов *napA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *tcaB*, выявленные нами у природных штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также последовательности этих генов у штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, представленные в NCBI GenBank, были использованы для построения дендрограммы на основе применения программы MEGA 4,0 с использованием алгоритма UPGMA [3]. Как видно из рисунка, разработанный нами способ дифференциации штаммов *Y. pestis* позволяет эффективно проводить деление штаммов основного и неосновных подвидов возбудителя чумы и близкородственной патогенной иерсинии – *Y. pseudotuberculosis*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00731.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Одинокоев Г.Н. и др. Структурно-функциональный анализ гена *araC* у штаммов *Yersinia pestis* различного происхождения. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2009; 3:21–6.
2. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Варибельность генов *aspA* у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):52–4.
3. Волков Ю.П., Ерошенко Г.А. Анализ эффективности некоторых методов построения филогенетических деревьев, используемых при оценке эволюционного родства микроорганизмов. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):35–41.
4. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е. и др. Изучение варибельности нуклеотидной последовательности генов *rha* локуса у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2008; 2:23–7.
5. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(24):14043–8.
6. Koteishvili M., Kreger A., Wauters G. et al. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(6):2674–84.
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74(12):5463–7.

G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, L.M.Koukleva, A.I.Pavlova, N.Yu.Shavina, Ya.M.Krasnov, N.P.Gouseva, V.V.Kutyrev

Variable Loci of the *napA*, *rhaS*, *zwf* and *tcaB* Genes as Effective DNA-Targets for *Yersinia pestis* Strains Genotyping

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Variability of the nucleotide sequences of the *napA*, *rhaS*, *zwf* and *tcaB* genes was elucidated in natural *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies from different natural plague foci. Use of variable loci of these genes enables to carry out intra-species differentiation of plague microbe strains and attribute the studied strain to certain subspecies or biovar.

Key words: plague agent, variability of genes, molecular typing

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Koukleva L.M., Pavlova A.I., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Gouseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 29.03.10.