УДК 616.981.455:616-093/-098

**Г.М.Вахрамеева, А.А.Лапин, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, Р.И.Миронова, И.А.Дятлов**

# ПЦР ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОДВИДОВ *FRANCISELLA TULARENSIS* С ПОМОЩЬЮ ОДНОГО ПРАЙМЕРА

*ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск*

Представлены экспериментальные данные распределения по размерам ампликонов, полученных с помощью праймера, содержащего chi-последовательность *Escherichia coli*, и ДНК из штаммов различных подвидов *Francisella tularensis*. Анализ данного распределения позволил выявить пять информативных областей картины электрофореграмм (в районах 190, 280, 500–570, 830 и 950 п.о.), дающих возможность проводить подвидовую дифференциацию штаммов туляремийного микроба. Несмотря на незначительную генетическую гетерогенность штаммов *F. tularensis*, ПЦР-анализ с использованием только одного праймера Chi 1f позволяет определять подвидовую принадлежность клинических изолятов возбудителя туляремии удобным, безопасным и быстрым способом.

*Ключевые слова*: *F. tularensis*, подвид, ПЦР, типирование, праймер.

Возбудителем туляремии является грамотрицательная факультативно-анаэробная внутриклеточная бактерия *Francisella tularensis*. Имеющиеся подвиды *F. tularensis*: *tularensis* (*nearctica*, тип А), *holarctica* (*palaearctica*, тип В), *mediasiatica* и *novicida* различаются по вирулентности для животных и человека. Поэтому создание надежного метода внутривидовой дифференциации *F. tularensis* имеет важное практическое значение по причине широкого распространения природных очагов данной инфекции на территории РФ, периодически возникающих вспышек этого заболевания и возможности использования его в качестве агента биотерроризма.

Существуют общепринятые серологические методы обнаружения возбудителя туляремии, однако из-за отсутствия существенных внутривидовых антигенных отличий невозможно использовать данные методы для подвидовой дифференциации [6]. Подвиды *F. tularensis* дифференцируются по биохимическим свойствам [1], однако этот подход является достаточно трудоемким и требует работы с живой культурой.

В настоящее время для внутривидового типирования *F. tularensis* широко применяется VNTR метод (Variable Number Tandem Repeat – вариабельные нуклеотидные тандемные повторы) [3]. Но данный метод требует использования целого набора праймеров для получения однозначного ответа о подвидовой принадлежности анализируемого генетического материала. Применение RAPD метода (Randomly Amplified Polymorphic DNA – ПЦР с использованием случайных праймеров) позволяет проводить относительно просто внутривидовую дифференциацию штаммов туляремийного микроба [7]. Однако до настоящего времени не предложены праймеры, которые позволяют надежно различать штаммы, относящиеся к различным подвидам.

В настоящей работе сконструирован праймер Chi 1f, позволяющий проводить методом ПЦР внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*. В качестве основы праймера нами была использована последовательность chi-сайта *Escherichia coli* 5`GCTGGTGG 3` [5]. Участки с chi-сайтами являются «горячими точками» для внутригеномной рекомбинации у кишечной палочки [2]. Праймер Chi 1f, помимо chi-последовательности, содержит также фланкирующие нуклеотиды: 5`CTAGG-GCTGGTGG-G 3`.

## Материалы и методы

*Штаммы*. В работе использовали штаммы из коллекции ФГУН ГНЦ ПМБ: *F. tularensis* различного географического происхождения (subsp. *tularensis* Schu, 8859 и B399, subsp. *holarctica* 15, 503 и 21/400, subsp. *holarctica* bv. japonica Jasoe и Miura, subsp. *mediasiatica* 117 и 120, subsp. *novicida* Utah 112), *Salmonella enteritidis*, *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, *Escherichia coli* JM83. Культуры туляремийного микроба выращивали на FT агаре (ФГУН ГНЦ ПМБ) с добавлением полимиксина В до 100 мкг/мл при температуре 37 °С в течение 24 ч. Культуры штаммов остальных микроорганизмов выращивали на агаре Лурия-Бертани [8] при температуре 37 °С в течение 18 ч.

*Выделение ДНК из F. tularensis*. Ночную агаровую культуру суспендировали в забуференном физиологическо растворе (ЗФР) (~10 мг биомассы в 250 мл раствора). Суспензию смешивали с равным объемом раствора, содержащего 200 мМ NaOH и 1 % додецилсульфата натрия (ДСН). Лизат переносили в 65 мкл 4 М $(NH_4)_2SO_4$, перемешивали, инкубировали в водяной бане при температуре 95 °С в течение 15 мин и помещали в лед с водой на 15 мин. В полученную суспензию добавляли равный объем изопропанола и инкубировали при температуре 4 °С в течение 30 мин. Нуклеиновые кислоты осаждали

центрифугированием при 10000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок промывали 70 % этанолом, ресуспендировали в 1 мл буфера ТЕ и прогревали при температуре 95 °С в течение 10 мин. Препарат хранили при температуре минус 20 °С.

*Выделение ДНК из S. enteritidis*, *Y. pestis*, *E. coli*. Проводили по методике, описанной выше.

*Постановка полимеразной цепной реакции*. Праймер Chi 1f был синтезирован в ЗАО «Синтол». Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10х буфер для ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) – 75 мМ трис-HCl (pH 8,8), 20 мМ $(NH_4)_2 SO_4$, 0,01 % Tween 20, 2,5 мМ $MgCl_2$; 0,4 пкМ праймера, 0,2 мкМ каждого дНТФ, 1 ед Taq ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) и 50–100 нг ДНК. Условия проведения ПЦР-амплификаци: начальная денатурация 94 °С (3 мин); 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С (30 с), отжига при 54 °С (30 с) и элонгации при 72 °С (1 мин); завершающая элонгация при 72 °С (5 мин). При подборе амплификации использовали два режима проведения ПЦР: градиентный (с использованием термоциклера «Mastercycler Gradient», Eppendorf, Германия) и обычный (с использованием термоциклера «Apllied byosystem 2700», США). Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле, гель готовили на буфере ТЕА [8]. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием [8]. Фотодокументирование проводили на системе для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция), при ультрафиолетовом освещении с помощью трансиллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов использовали маркер молекулярных весов GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, «Fermentas», Литва.

## Результаты и обсуждение

Ампликоны, получаемые с помощью праймера Chi 1f на матрицах штаммов *F. tularensis* различного географического происхождения, имеют характерное распределение полос по интенсивности и размерам (от ~100 п.о. до ~2000 п.о.), рис. 1.

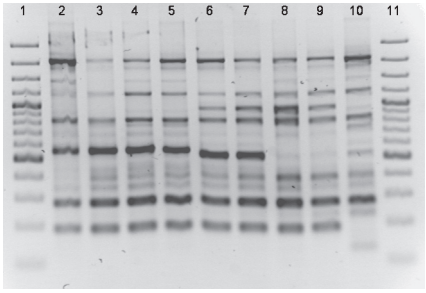


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi 1f и ДНК *F. tularensis*:
*1–11* – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; *2* – subsp. *holarctica* 15; *3* – subsp. *holarctica* 503; *4* – subsp. *holarctica* bv. japonica Miura; *5* – subsp. *holarctica* bv. japonica Jasoe; *6* – subsp. *tularensis* 8859; *7* – subsp. *tularensis* Schu; *8* – subsp. *mediasiatica* 120; *9* – subsp. *mediasiatica* 117; *10* – subsp. *novicida* Utah 112

Визуальное сравнение картины распределения ампликонов позволяет выделить пять характерных областей электрофореграмм: ~190, ~280, ~500–570, ~830, ~950 п.о.

Для оптимизации информативности получаемых электрофореграмм нами проведен сравнительный анализ распределения ампликонов по интенсивности и размерам при различных температурах отжига праймеров на ДНК. В качестве матриц в этих экспериментах использовалась ДНК из штаммов туляремийного микроба различной подвидовой принадлежности – subsp. *tularensis* Schu, subsp. *holarctica* 503, subsp. *mediasiatica* 120. Наиболее яркая картина распределения фрагментов ДНК по гелю была получена при температуре отжига 54 °С (данные не приведены). Эту температуру в дальнейшем применяли при проведении ПЦР.

Для выяснения уникальности электрофореграмм ампликонов, синтезируемых на матрицах *F. tularensis* с помощью праймера Chi 1f, были использованы ДНК ряда микроорганизмов: *S. enteritidis*, *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, *E. coli* JM83 (рис. 2).

Представленная на рис. 2 картина распределения ампликонов по подвижности и интенсивности позволяет сделать предположение, что праймер Chi 1f можно использовать не только для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*, но и, в определенных рамках, для межвидового и родового типирования генетического материала.

Сравнение подвижности доминирующих по интенсивности ампликонов различных подвидов *F. tularensis* позволило выявить общие для штаммов туляремийного микроба фрагменты ДНК размерами ~280 и ~830 п.о. Штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* отличается от других штаммов вида *F. tularensis* отсутствием полос в области ~190 п.о. (рис. 1). У среднеазиатского подвида туляремийного микроба отсутствует ампликон в области ~500–570 п.о. Штаммы голарктического подвида, в том числе японского биовара, отличаются от штаммов неарктического подвида *F. tularensis* наличием полосы размером ~570 п.о., тогда как для подвида *tularensis* характерен фрагмент размером ~500 п.о. У голарктического подвида отсутствует фрагмент размером ~950 п.о.,

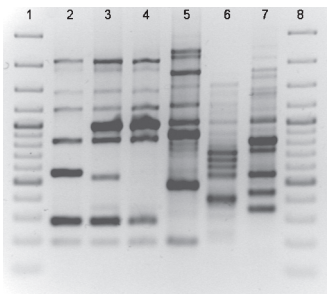


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi 1f и ДНК различных видов микроорганизмов:
*1–8* – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; *2 – F. tularensis* subsp. *holarctica* 503; *3 – F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu; *4 – F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120; *5 – S. enteritidis; 6 – Y. pestis* EV линии НИИЭГ; *7 – E. coli* JM83

**Распределение диагностически значимых ампликонов по размерам для штаммов различных подвидов *F. tularensis***

| Подвид | Штамм | Размер ампликона, п.о. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ~190 | ~280 | ~500 | ~570 | ~830 | ~950 |
| *tularensis* | Schu | + | + | + | - | + | + |
| | 8859 | + | + | + | - | + | + |
| | B399 | + | + | + | - | + | + |
| *holarctica* | 15 | + | + | - | + | + | - |
| | 503 | + | + | - | + | + | - |
| | 21/400 | + | + | - | + | + | - |
| *holarctica* bv. japonica | Jasoe | + | + | - | + | + | - |
| | Miura | + | + | - | + | + | -- |
| *mediasiatica* | 117 | + | + | - | - | + | + |
| | 120 | + | + | - | - | + | + |
| *novicida* | Utah 112 | - | + | - | - | + | - |

который присутствует у штаммов subsp. *tularensis* и subsp. *mediasiatica*. Сводные данные по распределению ампликонов на электрофореграммах приведены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования одного праймера для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*. Сходные результаты и выводы были представлены в работах [3, 4, 7].

Предлагаемй праймер, на наш взгляд, позволяет проводить не только внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*, но также определять однородность исследуемой ДНК на возможность присутствия генетического материала других микроорганизмов.

Картина распределения ампликонов ПЦР ДНК *F. tularensis* различных подвидов с использованием праймера Chi 1f свидетельствует о существенном отличии подвида *novicida* от других подвидов. Уникальное сходство ампликонов размером ~950 п.о., полученных с использованием ДНК штаммов подвидов *mediasiatica* и *nearctica*, согласуется со схожестью этих подвидов по ряду биохимических свойств (ферментация глицерина и продукция цитруллинуреидазы).

Для изучения подвидовой эволюции туляремийного микроба представляет интерес проведение тонкого структурного анализа электрофореграмм ПЦР-продуктов, полученных с помощью предлагаемого нами праймера, штаммов *F. tularensis*, выделенных из различных природных очагов туляремии.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д/2 от 16.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Олсуфьев Н.Г.* Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.

2. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. М.: Наука; 1984. 472 с.

3. *Johansson A., Farlow J. Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P.* Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J. Bacteriol. 2004; 186:5808–18.

4. *Johansson A., Ibrahim A., Goransson I., Eriksson U., Gurycova D., Claridge III J.E., Sjostedt A.* Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Franciseella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes two major subspecies of *Francisella tularensis*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(11):4180–5.

5. *Kobayashi I., Murialdo H., Crasemann J.M., Stahl M.M., Stahl F.W.* Orientation of cohesive end site *cos* determines the active orientation of χ sequence in stimulating recA-recBC-mediated recombination in phage λ lytic infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982; 79:5981–5.

6. *Nutter J.E.* Antigens of *Pasteurella tularensis*: preparative procedures. Appl. Microbiol. 1971; 22:44–8.

7. *De la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutierrez-Martin C.B., Garcia-Pena F.J., Ferri E.F.R.* Comparison of different Approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(3):1016–22.

8. *Sambrook J., Fritch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

G.M.Vakhrameeva, A.A.Lapin, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, R.I.Mironova, I.A.Dyatlov

**PCR Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies Using One Primer**

*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk*

Presented are experimental data of size distribution of amplicons obtained with the help of the primer consisting of *Escherichia coli* chi-sequence and DNA from different subspecies of *Francisella tularensis* strains. Analysis of this distribution permitted to determine five informative regions on the electrophoregrams (in the regions of 190, 280, 500–570, 830 and 950 b.p.), that made it possible to perform subspecies differentiation of tularemia microbe strains. Thus, the subspecies of *F. tularensis* clinical isolates can be identified by safe, fast and convenient method – the PCR analysis using only one primer Chi 1f despite the slight genetic heterogeneity of tularemia agent strains.

*Key words*: *F. tularensis*, subspecies, PCR, typing, primer.

**References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)**

1. *Olsuf'ev N.G.* [Taxonomia, microbiology and laboratory diagnostics of tularemia agent]. Moscow: Medicina; 1975. 192 p.

2. *Khesin N.B.* [Genome variability]. Moscow: Nauka; 1984. 472 p.

**Authors:**

*Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A.* State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

**Об авторах:**

*Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А.* Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 20.09.10.