

Г.Н.Одинокоев, Г.А.Ерошенко, В.В.Кутырев

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГЕНА *inv*  
У ШТАММОВ ЧУМНОГО И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБОВ**

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

У чумного микроба основного и неосновных подвидов и у псевдотуберкулезного проведен структурно-функциональный анализ гена *inv*, кодирующего один из важных факторов патогенности возбудителя псевдотуберкулеза. Показано, что структура гена *inv* у всех изученных штаммов неосновных подвидов так же, как и у основного подвида *Yersinia pestis*, нарушена внедрением инсерционной последовательности IS1541, что свидетельствует о потере функциональной активности этого гена на ранних стадиях эволюции возбудителя чумы.

*Ключевые слова:* возбудители чумы и псевдотуберкулеза, фактор инвазии и адгезии, ген, мутация.

Возбудитель чумы ведет свое происхождение от псевдотуберкулезного микроба, с которым имеет высокий процент идентичности нуклеотидной последовательности гомологичных генов (97–99 %) [5]. Однако ряд генов, присутствующих в геноме *Yersinia pseudotuberculosis* в интактной форме, у *Y. pestis* существует в виде так называемых «молчащих», или псевдогенов, что является результатом адаптации чумного микроба к облигатному паразитизму [2].

От псевдотуберкулезного микроба возбудитель чумы получил ряд генетических детерминант факторов вирулентности, среди которых гены *inv* и *yadA*, играющие важную роль при энтеропатогенной инфекции, вызываемой *Y. pseudotuberculosis* [3, 4]. Кодированный геном *inv* белок внешней мембраны инвазин (Inv) взаимодействует с  $\beta_1$ -интегрином М-клеток пейеровых бляшек подвздошной кишки, обеспечивая колонизацию и инвазию возбудителем слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта [1, 6].

По данным проведенного нами сравнительного компьютерного анализа, ген *inv* у всех штаммов *Y. pestis* основного подвида, представленных в базе данных NCBI GenBank, инактивирован вставкой IS-элемента, что предполагает нарушение его функциональной активности. Однако остается не ясным, сохранилась ли структурная целостность гена *inv* у неосновных подвидов возбудителя чумы, занимающих эволюционно более близкое положение к возбудителем псевдотуберкулеза. Данные по этому вопросу в литературе отсутствуют, как и данные о структуре этого гена у штаммов основного подвида, циркулирующих на территории РФ и сопредельных государств. В связи с этим целью нашего исследования было изучение особенностей структурной организации гена *inv* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов различного происхождения в сравнении со штаммами псевдотуберкулезного микроба.

**Результаты и обсуждение**

В начале исследований был проведен сравнительный компьютерный анализ нуклеотидной последовательности хромосомного локуса, содержащего

ген *inv* у штаммов *Y. pestis* KIM (биовар *medievalis*), CO92 (биовар *orientalis*), Antiqua, Nepal516 (биовар *antiqua*), 91001 (биовар *microtus*), Pestoides F (кавказский подвид) и *Y. pseudotuberculosis* PB1/+, IP 32953, IP 31758, YPIII, представленных в базе данных NCBI GenBank. В результате было установлено, что размер гена *inv* у псевдотуберкулезного микроба составляет 2963 п.н. В отличие от него ген *inv* у штаммов *Y. pestis* имеет гораздо больший размер – 3669 п.н., что свидетельствует о внедрении инсерционной последовательности и его инактивации.

Обработка полученных результатов с использованием программного обеспечения NCBI BLAST показала, что инаktivация гена *inv* у возбудителя чумы происходит за счет вставки инсерционной последовательности IS1541 (708 п.н.) после 906 п.н. (302 кодона). С помощью программы Primer Express нами была рассчитана пара праймеров: *inv*839 (TACCTGCACTCCCAACAAC) – *inv*1007 (CCCATACGCTGATCTACC), фланкирующая область вставки IS1541 (рис. 1). Амплификацию фрагмента гена *inv* 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. Синтез олигонуклеотидных праймеров, проводили на автоматическом синтезаторе ДНК АСМ-800 (Биосет, Россия) в РосНИПЧИ «Микроб».

Для изучения структуры гена *inv* у основного и неосновных подвидов *Y. pestis* нами было использовано 18 штаммов, циркулирующих в природных очагах СНГ и Монголии. Основной подвид был представлен 5 штаммами из Устьюртского, Тувинского, Сарыджазского, Забайкальского и Приараксинского очагов чумы (таблица). Неосновные подвиды включали 13 штаммов, в том числе 3 изолята кавказского (Присеванский, Ленинанканский, Приараксинский очаги Кавказа и Закавказья), 3 – алтайского (Алтайский горный очаг), 3 – гиссарского (Гиссарский высокогорный очаг), 2 – улэгейского (Монголия) подвидов чумного микроба и 2 штамма из Таласского (Киргизия) высокогорного очага чумы (таблица). Кроме того, было изучено 12 штаммов

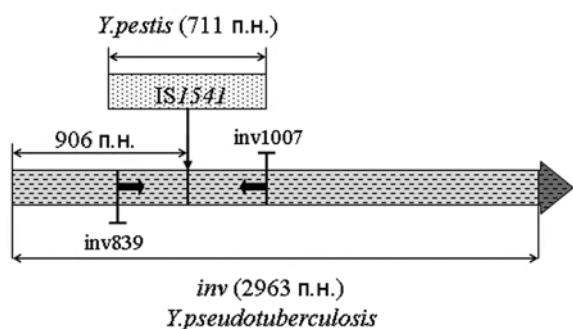


Рис. 1. Структура гена *inv* и место вставки *IS1541* у чумного микроба. Стрелками указаны места посадки использованных праймеров *inv839*–*inv1007*

*Y. pseudotuberculosis*, представленных в коллекциях Таля и Молляре, а также выделенных на территории Дальнего Востока и Туркмении (таблица). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», где они хранились в лиофильно высушенном состоянии.

У всех использованных в работе штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов проведено изучение гена *inv* с использованием рассчитанной нами пары праймеров *inv839*–*inv1007*. В ПЦР-анализе размер амплификата у всех штаммов *Y. pseudotuberculo-*

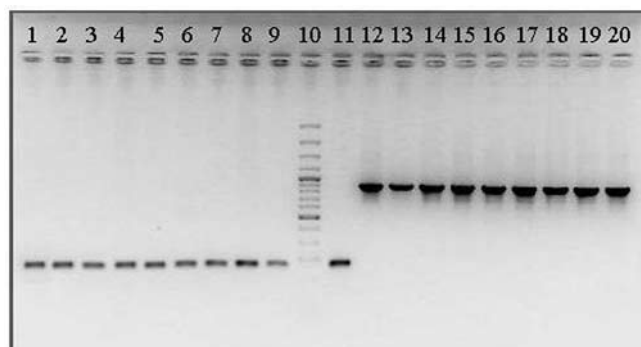


Рис. 2. ПЦР-анализ гена *inv* у штаммов возбудителя чумы и псевдотуберкулеза: 1–9, 11 – *Y. pseudotuberculosis*: V, 68(48), VI, IV, 110 (VI), 417, 67/16, 312, 69(32), 70(25); 12–13 – основной подвид: А-161, И-1270; 14–15 – кавказский подвид: 376, 3551; 16–17 гиссарский подвид: А-1728, А-1633; 18 – алтайский подвид: 4857; 19 – улэгейский подвид: И-3069; 20 – таласская группа: А-1807; 10 – маркер молекулярных масс (GenRuler TM 50 bp)

*sis* (рис. 2, дорожки 1–9, 11) составлял 169 п.н., что соответствовало размеру фрагмента, образуемого у интактного гена. Фрагменты гена *inv* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов имели большую молекулярную массу (877 п.н.), что свидетельствовало о наличии вставки *IS1541* (рис. 2, дорожки 12–20).

Штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, использованные в работе

Штаммы, серовары	Время и место (очаг) выделения	Источник выделения
<i>Y. pestis</i>		
Основной п/в		
А-161	1962 г., Устюртский пустынный	Блохи с большой песчанки
И-2638	1977 г., Тувинский горный	Вши с даурского суслика
А-1836	1983 г., Сарыджазский высокогорный	Серый сурок
И-1270	1966 г., Забайкальский степной	Даурский суслик
805	1968 г., Приараксинский низкогорный	Песчанки Виноградова
Кавказский п/в		
376	Ленинканский горный	Общественная полевка
3551	1979 г., Присеванский горный	Блохи обыкновенной полевки
818	1968 г., Приараксинский низкогорный	Блохи обыкновенной полевки
Улэгейский п/в		
И-3131	1984 г., Южно-Габийский аймак, МНР	Монгольская пищуха
И-3069	1982 г., Убурхангай, МНР	Полевка Брандта
Алтайский п/в		
КМ1205	1993 г., Алтайский горный	Монгольская пищуха
4857	1965 г., Алтайский горный	Труп пищухи
И-2359	1973 г., Алтайский горный	Блохи гнезда монгольской пищухи
Гиссарский п/в		
А-1728	1972 г., Гиссарский высокогорный	Арочная полевка
А-1730	1970 г., Гиссарский высокогорный	Блохи гнезда арочной полевки
А-1633	1970 г., Гиссарский высокогорный	Блохи арочной полевки
Таласская гр.		
А-1815	Таласский высокогорный	<i>Ceratophyllus caspans</i>
А-1807	Таласский высокогорный	<i>Ceratophyllus caspans</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
312	1973 г., Дальний восток	Человек
417	1976 г., холмоторье Бадхыз (Туркмения)	Краснохвостая песчанка
68(48), 110(VI), 67/16, 69(32), 70(25)	Коллекция Таля	
II, III, IV, V, VI	Коллекция Молляре	

Таким образом, с применением пары праймеров inv839–inv1007 в ПЦР-анализе нам удалось установить присутствие вставки IS1541 в гене *inv* у высоко-вирулентных штаммов основного, а также у неосновных подвидов *Y. pestis*, циркулирующих в природных очагах на территории РФ и сопредельных государств. По-видимому, отсутствие необходимости колонизировать слизистую кишечника при новом механизме развития инфекционного процесса привело к инактивации гена *inv* у чумного микроба. Обнаружение гена *inv* в состоянии псевдогена уже у более древних неосновных подвидов, занимающих промежуточное положение между псевдотуберкулезным микробом и основным подвидом возбудителя чумы, свидетельствует о потере его функционального значения на ранних этапах эволюции вида *Y. pestis*.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каратаев Г.М., Марков А.Р., Синяшина Л.Н. и др. Сравнительное изучение роли *yadA*, *invA* и *psaA*-генов в патогенности *Yersinia pseudotuberculosis*. Мол. генет. 2008; 4:10–8.
2. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Мол. генет. 2002; 1:3–7.
3. Хабаров А.В., Кутырев В.В. Характеристика инвазивных свойств возбудителей чумы и псевдотуберкулеза в отношении морских свинок и белых мышей. В кн.: Эпидемиол., микробиол. и иммунол. бактериальных и вирусных инфекций: Тез. докл. обл. науч. конф. молодых ученых; 17–20 октября 1989; Ростов-на-Дону. Ростов н/Д; 1989. С. 51–3.
4. Hoiczky E., Roggenkamp A., Reichenbecher M. et al. Structure

and sequence analysis of *Yersinia* *YadA* and *Moraxella* *UspAs* reveal a novel class of adhesions. EMBO. 2000; 19:5989–99.

5. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature. 2001; 413:523–7.

6. Simonet M., Riot B., Fortineau N. et al. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. Infect. Immun. 1996; 64:375–9.

#### Об авторах:

Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российской научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, Университетская, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.N.Odinokov, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

#### Comparative Analysis of *inv* Gene Structure in Strains of Plague and Pseudotuberculosis Agents

Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

Gene *inv* encoding one of the important pathogenicity factors of pseudotuberculosis agent was analyzed as regards its structure and function in plague microbe of the main and non-main subspecies and pseudotuberculosis microbe. The structure of gene *inv* was shown to be affected by introduction of insertion sequence IS1541 in all studied *Yersinia pestis* strains of non-main and main subspecies. This evidences that the loss of functional activity of this gene took place at initial stage of plague agent evolution.

**Key words:** plague and pseudotuberculous agents, invasion and adhesion factor, gene, mutation.

#### Authors:

Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.12.08.