

К.А.Никифоров, Д.В.Уткин, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЧИПА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И БИОВАРОВ ОСНОВНОГО ПОДВИДА *YERSINIA PESTIS*

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель исследования:** разработка ДНК-чипа для дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида. **Материалы и методы.** Анализ эффективности разработанного способа проведен на 62 штаммах *Y. pestis* разных подвидов и биоваров, выделенных в природных очагах России, ближнем и дальнем зарубежье. **Результаты и выводы.** Выбраны ДНК-мишени, рассчитаны праймеры и зонды, оптимизирована методика подвидовой и биоварной дифференциации штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа. Использование ДНК-чипа с мишенями «Med24», «glpD(-93)» и «45» позволяет проводить быструю дифференциацию штаммов основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида по наличию и отсутствию сигнала флуоресценции по специфическим для основного подвида и его биоваров ДНК-мишеням.

*Ключевые слова:* ДНК-чип, ДНК-мишень, биовар, *Y. pestis*.

*Корреспондирующий автор:* Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

K.A.Nikiforov, D.V.Utkin, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko

## Construction of a DNA-Microarray for Differentiation between the Main and Non-Main Subspecies and Biovars of the Main Subspecies of *Yersinia pestis*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study is to design the DNA-microarray for differentiation of *Y. pestis* strains of the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies. **Materials and methods.** Efficiency analysis for the devised means was conducted using 62 *Y. pestis* strains of various subspecies and biovars, isolated in the natural foci of Russia and neighboring countries. **Results and conclusions.** Selected have been the DNA-targets, probes and primers – calculated. Enhanced is the method of sub-specific and biovar differentiation of *Y. pestis* strains by means of DNA-microarray. DNA-chip with “Med24”, “glpD(-93)”, and “45” targets allows for prompt differentiation of the strains of the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies based on the presence and absence of fluorescent signal by the specific for the main subspecies and its biovars DNA-targets.

*Key words:* DNA-microarray, DNA-target, biovar, *Y. pestis*.

*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Konstantin A. Nikiforov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Citation:* Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Construction of a DNA-Microarray for Differentiation between the Main and Non-Main Subspecies and Biovars of the Main Subspecies of *Yersinia pestis*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:32–35. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-32-35

Чума – одна из наиболее опасных бактериальных инфекций, летальность при которой может достигать 30–50 %. По данным ВОЗ, за период 2010–2015 гг. в мире зарегистрировано 3248 случаев чумы человека [10].

Штаммы *Yersinia pestis* имеют различную вирулентность, эпидемическую значимость и регионы распространения. Особенности штаммов основного подвида являются их высокая и универсальная вирулентность в отношении различных видов носителей и человека и высокая эпидемическая значимость. Именно они явились этиологическими агентами трех пандемий чумы в античные и средние века и современную эпоху [4, 9]. Штаммы основного подвида широко распространены в природных очагах различных ландшафтно-географических зон. Они включают три биовара: античный, средневековый и восточный. Установление принадлежности штаммов к основному подвиду и определенному биовару поз-

воляет оценить эпидемический потенциал, происхождение штамма и возможный путь его заноса при проведении эпидемиологического расследования.

В настоящее время решение задачи по определению внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* и географическому региону происхождения можно проводить с использованием высокоразрешающей технологии ДНК-чипов. Эта технология позволяет выполнять мультилокусный анализ генома исследуемого штамма по большому числу ДНК-маркеров за счет использования специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на твердом носителе.

Целью нашего исследования было конструирование ДНК-чипа для разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также биоваров основного подвида; оптимизация методики гибридизации на ДНК-чипе для штаммов *Y. pestis*.

Ранее нами найдены ДНК-мишени для внутри-

видовой дифференциации возбудителя чумы, одна из которых – «45» – обеспечивает разделение штаммов основного подвида от штаммов неосновных подвигов по наличию у первых в этом хромосомном локусе маркерной делеции в 45 п.н. [2]. Другая найденная ДНК-мишень – «Med24» – позволяет отделять штаммы средневекового биовара от двух других биоваров основного подвида – античного и восточного ввиду делеции в 24 п.н. у средневековых штаммов [1]. По данным литературы, для выявления штаммов восточного биовара может быть использована вариабельность последовательности гена *glpD*, в котором у штаммов восточного биовара выявлена делеция в 93 п.н. [7]. С использованием этих ДНК-мишеней («Med24» и «glpD(-93)», а также «45») нами сконструирован образец ДНК-чипа для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*. В литературных источниках отсутствуют данные по разработке ДНК-чипов для дифференциации штаммов *Y. pestis* по подвидам и биоварам.

### Материалы и методы

В работе использовано 42 штамма *Y. pestis* основного подвида и 20 – неосновных подвигов, выделенных в природных очагах России, ближнем и дальнем зарубежье. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли стандартным методом в соответствии с МУ 1.3.2569-09 [3].

Расчет олигонуклеотидных праймеров и зондов на мишенях «Med24», «glpD(-93)», «45» для ДНК-чипов осуществляли с использованием программы Vector NTI 10 (Invitrogen Corporation, США) и алгоритма BLAST. Зонды содержали аминокислотную группу на 5'-конце для их иммобилизации на стекле (слайде). Обратный праймер включал флуоресцентный краситель Cy5. Последовательности используемых в работе праймеров и зондов приведены в табл. 1.

Нанесение зондов на слайд проводили с применением буфера для печати. Для приготовления 100 мкл этого буфера использовали 75 мкл 5М раствора бетаина, 25 мкл PBS буфера, 0,2 мкл 10 % раствора твина-20.

Олигонуклеотидные зонды разводили буфером для печати в соотношении 1:1 до концентрации 50 пкмоль/мкл, затем с помощью миниплоттера «Xact Microarrayer» (LabNEXT, США) наносили на поверхность аминослайдов GAPS II Coated Slides (Corning, США) методом контактной печати в виде отдельных спотов по вертикали в четырех повторах. Группа спотов формировала эрреи, предназначенные для анализа конкретных образцов. Для иммобилизации нанесенных зондов слайды инкубировали 20 мин при температуре 60 °С и при комнатной температуре в течение 18 ч.

Получение образцов штаммов *Y. pestis* для анализа в ДНК-чипах проводили методом амплификации в ПЦР выбранных ДНК-мишеней.

Амплификацию образцов по трем ДНК-мишеням проводили в одной реакции. Использовали следующую программу амплификации: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин; затем 35 циклов при 94 °С, 30 с; 57 °С, 50 с; 72 °С 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °С.

Основные этапы анализа образцов штаммов *Y. pestis* в ДНК-чипах проводили согласно методикам, описанным ранее зарубежными коллегами [5, 6, 8]. В качестве трафаретов использовали 16-луночные гибридизационные камеры «16-well incubation chamber» (Whatman, Германия). Слайды с нанесенными трафаретами помещали в рамки-держатели «FAST-Frame» (Whatman, Германия).

Перед гибридизацией осуществляли предварительную блокировку ДНК-чипов. Во избежание неспецифического связывания в гибридизационные камеры вносили по 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 97 мкл 20х SSPE-буфера, 2 мкл 1х раствора Дейнхардта, 1 мкл ДНК спермы лосося в конечной концентрации 0,2 мг/мл. Блокирование проводили при температуре 42 °С в течение 30 мин с использованием термошейкера при скорости вращения платформы 250 об./мин. Затем слайды отмывали при температуре 42 °С в течение 5 мин 0,1х раствором SSPE-буфера с 0,2 % SDS при скорости вращения платформы 250 об./мин.

На этапе гибридизации в ячейки гибридизационной камеры вносили 80 мкл прогретой при 95 °С в течение 5 мин гибридизационной смеси, включающей 10 мкл амплификата и 70 мкл буфера для гибридизации (63 мкл 20х SSPE-буфер, 7 мкл формамида). Ячейки камер заклеивали самоклеящейся пленкой для предотвращения испарения. Гибридизацию осуществляли при 42 °С в течение 5 ч на термошейкере со скоростью вращения платформы 250 об./мин. Потом содержимое ячеек с помощью вакуумного медицинского отсасывателя отбирали, а слайды отмывали 2х раствором SSPE-буфера при температуре 42 °С в течение 2 мин при скорости 250 об./мин, затем 0,1х раствором SSPE-буфера с добавлением 0,2 % SDS. После этого слайды ополаскивали дистиллированной водой и высушивали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 1 мин, хранили при 4 °С.

Таблица 1

ДНК-мишени, последовательности праймеров и зондов для дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов, биоваров основного подвида методом ДНК-чипа

Праймеры, зонды	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
Chip-Med(-24)-S	GCCAGTGTGTGTCTAAAG
Chip-Med(-24)-As	(Cy5)-CGCAACATTCGTCGCAAA
Chip-Med(-24)-Zond2	(NH2)-ACATGTGTCTGGACTCACAGCCCC
Chip-glpD(-93)-S	CAAGGCTTCACTTACCAAG
Chip-glpD(-93)-As	(Cy5)-CAGAGGAAGGTAACATGGA
Chip-glpD(-93)-Zond	(NH2)-TACCGACAGGCCACGCCACG
Chip-45-S	GTGGATGAGAAAGTTACCC
Chip-45-As	(Cy5)-ATCACACCTGGATGGTTAC
Chip-45-Zond	(NH2)-ACTCAGCAAGCATCTGCTCAACATG

Учет результатов проводили с использованием сканера слайдов GenePix 4100A (США) с помощью программного обеспечения GenePix Pro 6.0.

Критический уровень сигнала флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$C_{кр} = 2,2 \cdot K^{-}$$

где  $K^{-}$  – значение флуоресценции отрицательно-го контроля при 635 нм.

Результат считали положительным, если среднее значение флуоресценции при длине волны 635 нм для четырех спотов одного зонда было больше или равно критическому уровню флуоресценции, и отрицательным, если среднее значение флуоресценции было меньше критического уровня. Реакцию учитывали при отрицательном результате в лунке с отрицательным контролем (гибридизационный буфер).

### Результаты и обсуждение

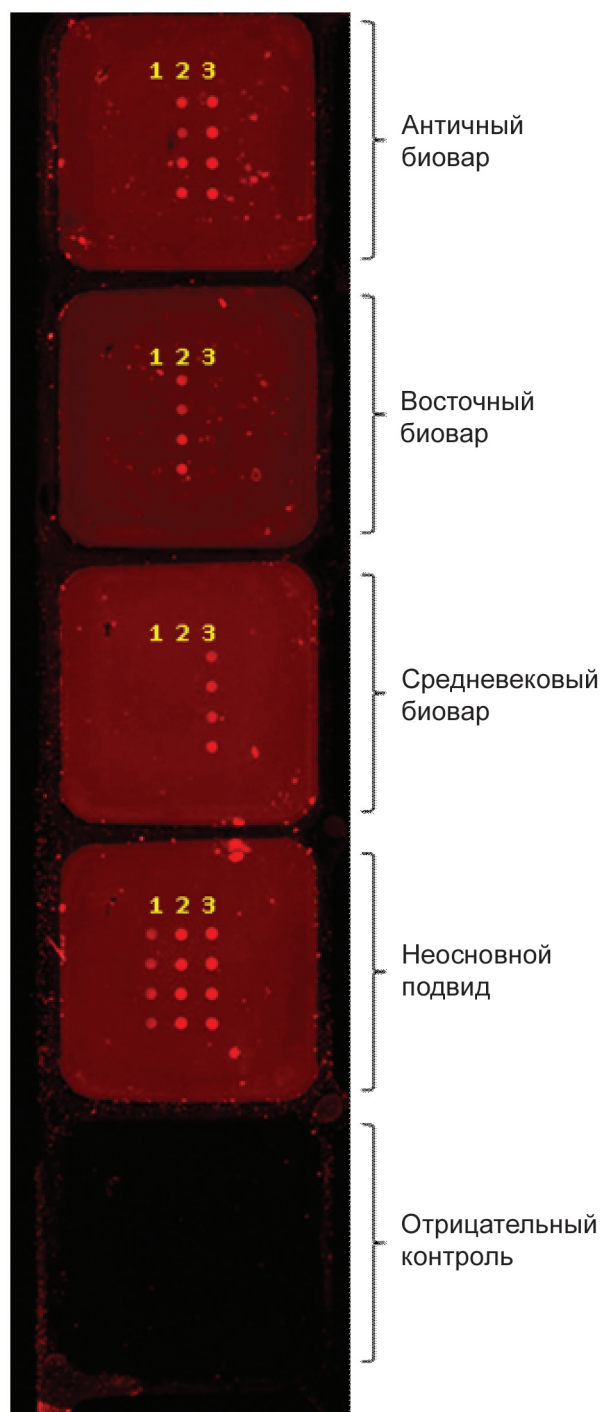
Полученные результаты по разработке ДНК-чипа для проведения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* с использованием ДНК-мишеней «Med24», «glpD(-93)», «45» представлены в табл. 2 и на рисунке. Конструирование зондов на эти ДНК-мишени проводили таким образом, чтобы их нуклеотидные последовательности были комплементарны участкам специфических делеций.

У всех использованных в данной работе 12 штаммов *Y. pestis* античного биовара основного подвида отсутствовал сигнал флуоресценции по мишени «45», но выявлялся по мишеням «Med24» и «glpD(-93)».

15 использованных в данной работе штаммов *Y. pestis* восточного биовара основного подвида характеризовались отсутствием сигнала флуоресценции по мишени «45» и «glpD(-93)», однако выявлялся по мишени «Med24».

Штаммам *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида было специфично отсутствие сигнала флуоресценции по мишени «45» и «Med24», однако он выявлялся по мишени «glpD(-93)».

У всех использованных в данной работе штаммов *Y. pestis* неосновного подвида сигнал флуоресценции выявлялся по всем трем мишеням.



Определение внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа:

1-й ряд – мишень 45, 2-й ряд – Med24, 3-й ряд – glpD(-93)

Таблица 2

Определение внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа

Штаммы <i>Y. pestis</i> , их принадлежность	ДНК-мишени, наличие сигнала флуоресценции на ДНК-чипе		
	«45»	«Med24»	«GlpD(-93)»
Основной подвида античный биовар (проверено 12 штаммов)	-	+	+
Основной подвида средневековый биовар (15 штаммов)	-	-	+
Основной подвида восточный биовар (15 штаммов)	-	+	-
Неосновные подвида (20 штаммов)	+	+	+

Таким образом, нами сконструирован ДНК-чип для одновременного разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвида и биоваров основного подвида, оптимизирована методика проведения анализа на ДНК-чипе. Специфичность и эффективность данного ДНК-чипа подтверждена на 62 штаммах *Y. pestis* разных подвида и биоваров, из которых 12 штаммов античного биовара основного подвида, 15 – средневекового биовара основного подвида, 15 – восточного биовара основного подвида, 20 штаммов неосновного подвида.

В дальнейшем предстоит включить в ДНК-чип другие мишени для разделения по отдельным подвидам (основной, кавказский, алтайский, гиссарский, улегейский) и отдельным популяциям штаммов *Y. pestis* из различных географических регионов.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Одинок Г.Н., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвигов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RU 2425891. Оpubл. 10.08.2010.
2. Одинок Г.Н., Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного подвида средневекового и античного биоваров методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение № 2496882. Оpubл. 27.10.2013 г., бюл. № 30.
3. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569–09. М., 2009. 31 с.
4. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.
5. Jin D.Z., Xu X.J., Chen S.H., Wen S.Y., Ma X.E., Zhang Z., Lin F., Wang S.Q. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infect. Agent Cancer*. 2007; 2:23. DOI: 10.1186/1750-9378-2-23.
6. Marcy Y., Cousin P.Y., Rattier M., Cerovic G., Escalier G., Béna G., Guéron M., McDonagh L., le Boulaire F., Bénisty H., Weisbuch C., Avarre J.C. Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. *Biotechniques*. 2008; 44(7):913–20. DOI: 10.2144/000112758.
7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*). *J. Bacteriol.* 2002; 184 (4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.
8. Tomioka K., Peredelchuk M., Zhu X., Arena R., Volokhov D., Selvapandiyam A., Stabler K., Mellquist-Riemenschneider J., Chizhikov V., Kaplan G., Nakhasi H., Duncan R. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7(4):486–94. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60579-X.
9. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14:319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
10. World Health Organization. Plague. Fact sheets № 267. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/>. Дата обращения: 22.06.2016.

#### References

1. Odinokov G.N., Pavlova A.I., Anisimova L.V., Eroshenko G.A., Kutuyev V.V. [Method for differentiation of plague agent strains of the main and non-main subspecies and pseudotuberculosis agent, using polymerase chain reaction]. RF Patent 2425891, 10.08.2010.
2. Odinokov G.N., Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Kutuyev V.V. [Method for differentiation between plague agent strains of the main subspecies of medieval and antique biovars, using polymerase chain reaction]. RF Patent 2496882. 27.10.2013.
3. [Management of laboratories applying methods of nucleic acid amplification while working with samples containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. MR 1.3.2569-09. M.; 2009. 31 p.
4. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.
5. Jin D.Z., Xu X.J., Chen S.H., Wen S.Y., Ma X.E., Zhang Z., Lin F., Wang S.Q. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infect. Agent Cancer*. 2007; 2:23. DOI: 10.1186/1750-9378-2-23.
6. Marcy Y., Cousin P.Y., Rattier M., Cerovic G., Escalier G., Béna G., Guéron M., McDonagh L., le Boulaire F., Bénisty H., Weisbuch C., Avarre J.C. Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. *Biotechniques*. 2008; 44(7):913–20. DOI: 10.2144/000112758.
7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*). *J. Bacteriol.* 2002; 184 (4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.
8. Tomioka K., Peredelchuk M., Zhu X., Arena R., Volokhov D., Selvapandiyam A., Stabler K., Mellquist-Riemenschneider J., Chizhikov V., Kaplan G., Nakhasi H., Duncan R. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7(4):486–94. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60579-X.
9. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14:319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
10. World Health Organization. Plague. Fact sheets № 267 (cited 22 Jun 2016). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/>.

#### Authors:

Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

#### Об авторах:

Никифоров К.А., Уткин Д.В., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 21.07.16.