

А.А.Крицкий, Н.Б.Челдышова, И.В.Тучков, Н.И.Смирнова

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *CTXA* И *TOXR* *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ОТ-ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

Цель. Создание алгоритма оценки экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности *Vibrio cholerae* на модели генов *ctxA* и *toxR*, кодирующих и контролирующих биосинтез холерного токсина. **Материалы и методы.** В работе использовано 10 штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров. Клонирование фрагментов генов проводили путем лигирования и трансформации. ОТ-ПЦР проводили на амплификаторах «БИС M112» и «Rotor-GeneQ». Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения к прибору Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5). **Результаты и выводы.** Разработан алгоритм оценки уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Указанный алгоритм позволяет быстро и эффективно проводить статистически значимое определение экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности *V. cholerae* и может быть использован для оценки вновь выделяемых штаммов холерного вибриона.

Ключевые слова: *V. cholerae*, холерный токсин, гены *ctxA* и *toxR*, ОТ-ПЦР, уровень экспрессии.

Корреспондирующий автор: Крицкий Андрей Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.A.Kritsky, N.B.Cheldyshova, I.V.Tuchkov, N.I.Smirnova

Development of the Algorithm for Identification of the Level of *Vibrio cholerae* *ctxA* and *toxR* Gene Expression Using RT-PCR with Real-Time Hybridization-Fluorescent Registration of Results

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

Objective of the study is to design the algorithm for assessment of expression of the structural and regulatory virulence *Vibrio cholerae* genes by the model of *ctxA* and *toxR* genes encoding and controlling biosynthesis of cholera toxin. **Materials and methods.** Utilized were 10 strains of *Vibrio cholerae*, classical and El Tor biovars. Cloning of gene fragments was carried out through transformation and ligation. RT-PCR was done in "BIS M112" and "Rotor-GeneQ" amplifiers. Processing of the results was performed by means of the software package in set with Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5). **Results and conclusions.** Developed has been the algorithm for evaluation of the level of expression of *V. cholerae* *ctxA* and *toxR* genes applying RT-PCR with real-time hybridization-fluorescent registration of results. The stated algorithm allows for rapid and effective statistically significant specification of the expression of structural and regulatory virulence *V. cholerae* genes and can be used for evaluation of newly discovered cholera vibrio strains.

Key words: *V. cholerae*, cholera toxin, *ctxA* and *toxR* genes, RT-PCR, level of expression.

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

Corresponding author: Andrey A. Kritsky, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Development of the Algorithm for Identification of the Level of *Vibrio cholerae* *ctxA* and *toxR* Gene Expression Using RT-PCR with Real-Time Hybridization-Fluorescent Registration of Results. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:53–57. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57

Возбудителем седьмой пандемии холеры, продолжающейся в настоящее время, является *Vibrio cholera* O1 биовара Эль Тор. Для генома данного возбудителя характерна высокая пластичность, обусловленная входящими в его состав мобильными генетическими элементами (МГЭ), которые несут гены вирулентности, пандемичности и антибиотикорезистентности. Одним из таких генов, расположенных в геноме профага СТХφ, является ген *ctxA*, ответственный за синтез А-субъединицы холерного токсина (ХТ), вызывающего основной клинический симптом холеры – профузную диарею. Регуляция экспрессии гена *ctxA*, согласно последним исследованиям, осуществляется генной сетью вирулентности, состоящей из нескольких регуляторных генов. Одним из глобальных генов-регуляторов, координирующих работу указанной генной сети, является ген *toxR* [6].

Следует отметить, что экспрессия гена *toxR* и регулируемого им через генную сеть гена *ctxA* не является постоянной и зависит от ряда факторов внешней среды (температуры, аэрации, наличия питательных веществ и др.). В то же время уровень экспрессии указанных структурных и регуляторных генов определяет степень вирулентности того или иного штамма *V. cholerae*. В связи с этим, исследование экспрессии генов, ответственных за вирулентность, представляет особый интерес.

На сегодняшний день существует большое количество различных методов оценки уровня экспрессии генов. Большинство из них основаны на количественном определении транскриптов. Среди них можно выделить гибридационные (гибридизация *in situ*, Нозерн-блот гибридация, микрочипы и др.), амплификационные методы (NASBA, ОТ-ПЦР, лигазная цепная реакция и др.) и методы секвени-

рования (высокопроизводительное параллельное секвенирование РНК). Одним из наиболее распространенных является метод обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). Преимущества данного метода заключаются в его высокой чувствительности (на 3–4 порядка выше, чем Нозерн-блот гибридизация), специфичности, способности определять единичные копии транскрипта, отсутствии дополнительных манипуляций с продуктом амплификации, а также в относительной дешевизне проводимого исследования [4, 8, 11].

Метод ОТ-ПЦР предусматривает последовательное использование ОТ и ПЦР. При этом экспрессия гена оценивается по количеству молекул кДНК, полученных в результате обратной транскрипции из молекул РНК исследуемого гена, относительно ПЦР-стандартов с установленной концентрацией. Для повышения точности полученных результатов окончательная оценка уровня экспрессии генов осуществляется методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [3], который учитывает уровень экспрессии какого-либо гена «домашнего хозяйства», считающийся постоянным.

Указанный метод оценки относительной экспрессии генов, широко используемый зарубежными и отечественными исследователями, сравнительно прост в выполнении и более экономически выгоден, чем вышеназванные методы при той же точности и воспроизводимости результатов [5, 7, 9, 10]. Однако до настоящего момента четкого алгоритма исследования экспрессии структурных и регуляторных генов у штаммов *V. cholerae* этим методом не разработано.

В связи с этим целью данной работы явилось создание алгоритма оценки уровня экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности холерного вибриона на модели генов *ctxA* и *toxR*, полностью адаптированного для работы с возбудителем холеры, относящимся ко II группе патогенности.

Материалы и методы

В работе использовали 20 штаммов *V. cholerae* классического (10 штаммов) и Эль Тор (10) биоваров, выделенных на территории России и зарубежных стран в различные временные периоды, и коммерческий штамм *Escherichia coli* TOP10. Штаммы культивировали на агаре и бульоне LB и АК1 при 30 или 37 °С. Все работы, связанные с культурами *V. cholerae* и *E. coli*, проводились в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Выделение тотальной (тДНК) и плазмидной ДНК (пДНК) проводили с использованием коммер-

ческих наборов «AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» (для тДНК) и «Invitrogen PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kit» (для пДНК) в соответствии с протоколом производителя и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Для выделения и очистки РНК использовали набор «Promega Total RNA Isolation System». Качество выделенной плазмидной ДНК и РНК оценивали с помощью спектрофотометра «Biowave DNA» («Biochrom Ltd», Великобритания), проводя измерение оптической плотности при разной длине волн и оценивая соотношения результатов измерений.

ПЦР для наработки фрагментов ДНК проводили в объеме 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей по 6 п/моль каждого праймера, 1,5 ед. Taq-pol, 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (рН 8,4), 25 мМ раствора MgCl₂, 2 мМ дНТФ, деионизованную воду и 10 мкл ДНК. ПЦР осуществляли на амплификаторе с горячей крышкой «БИС M112» («БИС-Н», Россия) по следующей программе: шаг 1: 95 °С – 5 мин (1 цикл), шаг 2: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с (35 циклов). После последнего цикла амплификации пробирки прогревали при 72 °С в течение 6 мин 2 цикла для образования «липких концов». Качество наработанного продукта оценивали методом электрофореза в 2 % агарозном геле.

Клонирование фрагментов генов проводили в два этапа (лигирование и трансформация) с помощью набора «Invitrogen TOPO® TA Cloning® Kit» в соответствии с инструкцией. Колонии трансформантов, содержащих плазмиду, отбирали путем посева на LB-агар, содержащий ампициллин (50 мкг/мл).

Для подготовки ПЦР-стандарта рассчитывали количество копий плазмиды на единицу объема в соответствии с руководством [2]. Далее из образца плазмидной ДНК готовили семь серийных разведений (10^{-1} – 10^{-7}), с которыми ставили ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами и TaqMan зондами (табл. 1), рассчитанными с помощью on-line программы «PrimerQuest Tool» IDT («Integrated DNA Technologies»). Оценку эффективности реакции производили по значениям коэффициентов корреляции R и R², а также коэффициентов вариации образцов (КВО). По результатам ПЦР для дальнейшей работы подбирали 3–5 разведений стандартов с минимальными КВО и коэффициентами корреляции около 0,99, при эффективности ПЦР ($1 \pm 0,15$).

Реакцию ОТ выполняли с использованием набора «Реверта» вариант 100 согласно инструкции. Определение продукции ХТ осуществляли с помощью иммуноферментного метода GM1 ELISA, описанного ранее [1].

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием амплификатора «Rotor-GeneQ» («QIAGEN», ФРГ) по следующей программе: шаг 1:

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемых для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*

Название праймера/зонда	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Авторы
<i>ctxA-F</i> <i>ctxA-R</i> <i>ctxA-probe</i>	TGCCAAGAGGACAGAGTGAG ATCCATCATCGTGCCTAACA (FAM)-TCCCGTCTGAGTTCCTTGCATG-(BHQ1)	Рассчитаны авторами
<i>recA-F</i> <i>recA-R</i> <i>recA-probe</i>	ACGGGTAACCTCAAGCAATC TATCCAAACGAACAGAAGCG (FAM)-CCACTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1)	Рассчитаны авторами
<i>toxR-F</i> <i>toxR-R</i> <i>toxR-probe</i>	CGGAACCGTTTTGACGTATT CTCGCAATGATTTGCATGAC (FAM)-TAAACCAAGCCATTTCGAC-(BHQ1)	Fykse E.M., 2007 [12]

95 °С – 5 мин (1 цикл); шаг 2: 95 °С – 15 с, 60 °С – 60 с (35 циклов), с детекцией флуоресцентного сигнала на канале Green во время стадии отжига/элонгации. ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей по 12 пмоль/мкл каждого праймера, 6 пмоль/мкл зонда (табл. 1); 1,5 ед. Taq-pol; 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (рН 8,4), 25 мМ раствора MgCl₂, 2 мМ дНТФ; 2,5 мкл образца кДНК; деионизованную воду до конечного объема.

Статистическую обработку данных проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Предлагаемый нами алгоритм определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* включает пять этапов: подготовка ПЦР-стандартов плазмидной ДНК с известной концентрацией; выделение и очистка РНК из исследуемых штаммов; синтез кДНК на матрице РНК путем ОТ; проведение ПЦР в режиме реального времени; обработка и анализ полученных данных.

Подготовка ПЦР-стандартов плазмидной ДНК с известной концентрацией заключается в наработке требуемых фрагментов генов путем амплификации со специфическими праймерами на гены *ctxA* (*ctxA-F*, *ctxA-R*), *toxR* (*toxR-F*, *toxR-R*) и *recA* (*recA-F*, *recA-R*) (табл. 1); лигировании полученного фрагмента в плазмиду рСR 2.1; трансформации лигированной плазмиды в клетки *E. coli* TOP10; отборе трансформированных клонов и их проверке на наличие требуемых фрагментов генов с помощью ПЦР; выделении и очистки плазмидной ДНК; расчете копийности плазмид; подготовке серийных разведений.

Выделение и очистка РНК из исследуемых штаммов осуществлялась последовательно: после подбора с помощью спектрофотометра «BiowaveDNA» достаточного количества клеток (8×10^8 КОЕ/мл) проводили их лизис, удаление ДНК с помощью ДНКазы и очистку РНК. Для предотвращения быстрого разрушения РНК рибонуклеазами, последние ингибировали с помощью гуанидинизотиоцианата или набора RiboLock. Далее с помощью спектрофотометра определяли количество выделенной РНК.

Синтез кДНК на матрице РНК методом ОТ выполняли с использованием набора «Реверта» вари-

ант 100. В реакцию ОТ брали 950 нг РНК (в соответствии с инструкцией), на основе которой получали кДНК.

Для оценки уровня экспрессии генов проводили ПЦР в режиме реального времени. В качестве ПЦР-стандартов использовали три разведения плазмидной ДНК, содержащей участок исследуемого гена. Детекцию уровня сигнала осуществляли во время стадии отжига/элонгации на канале Green.

Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения к прибору Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5), учитывая коэффициенты корреляции R и R², КВО и эффективность ПЦР. В качестве штамма-калибратора выбрали штамм *V. cholerae* классического биовара 569В, гиперпродуцент ХТ, чья экспрессия была принята за единицу (табл. 2).

Для определения эффективности разработанного алгоритма исследовали 20 штаммов *V. cholerae*: 10 штаммов классического биовара, 7 штаммов природных генетических вариантов биовара Эль Тор, 2 типичных штамма биовара Эль Тор и 1 предпандемический штамм биовара Эль Тор, выделенных в разные периоды времени. В качестве альтернативного метода использовали методику ИФА GM1-ELISA, позволяющую определить уровень продукции ХТ в мкг/мл (табл. 2).

Полученные результаты уровня экспрессии гена *ctxA* показали значимый уровень корреляции с продукцией ХТ, определенного методом ИФА GM1-ELISA ($r_s=1$). Так, наиболее высокая экспрессия структурного гена *ctxA* и регуляторного гена *toxR* наблюдалась у штамма-гиперпродуцента ХТ *V. cholerae* М-29. Штаммы биовара Эль Тор отличались более низкими показателями экспрессии указанных генов и уровнем продукции ХТ по сравнению со штаммами холерного вибриона классического биовара, что согласуется с данными литературы [1, 5]. Наиболее низкой продукцией ХТ и экспрессией генов *ctxA* и *toxR* отличался типичный штамм *V. cholerae* О1 биовара Эль Тор М-887, в отличие от штаммов-геновариантов. При этом уровень экспрессии регуляторного гена *toxR* показал статистически значимую корреляцию с экспрессией структурного гена *ctxA* ($r_s=0,991$) и продукцией ХТ ($r_s=0,991$). Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффектив-

Значения относительной экспрессии генов *ctxA*, *toxR* и продукции холерного токсина у штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор биоваров

Штаммы	Место и год выделения	Относительная экспрессия генов		Продукция ХТ GM-1 ELISA, мкг/мл
		<i>ctxA</i>	<i>toxR</i>	
<i>V. cholerae</i> classica 569B	Индия, 1950	1	1	10 ± 1
<i>V. cholerae</i> classica M-8	Сталинград, 1942	0,45 ± 0,05	0,70 ± 0,05	4,3 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-9	Астрахань, 1942	0,25 ± 0,05	0,60 ± 0,05	2,3 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> classica M-14	Саратов, 1942	0,70 ± 0,05	0,90 ± 0,05	6,5 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-16	Саратов, 1942	0,55 ± 0,05	0,70 ± 0,05	4,8 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-19	Саратов, 1942	0,45 ± 0,05	0,65 ± 0,05	4,2 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-24	Саратов, 1942	0,30 ± 0,05	0,55 ± 0,07	2,6 ± 0,6
<i>V. cholerae</i> classica M-29	Астрахань, 1942	1,35 ± 0,06	1,55 ± 0,08	14 ± 0,9
<i>V. cholerae</i> classica M-30	Астрахань, 1942	0,45 ± 0,04	0,6 ± 0,05	3,9 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> classica B 1307	Пакистан, 1964	0,40 ± 0,05	0,55 ± 0,05	3,5 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> eltor Mac757	Индонезия, 1937	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-818	Балаково, 1970	0,03 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-887	Астрахань, 1970	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,01
<i>V. cholerae</i> eltor M-1270	Набережные Челны, 1993	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-1326	Дагестан, 1994	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor P17644	Ачинск, 1997	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,5 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor M-1429	Белорецк, 2004	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,5 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor P18899	Мурманск, 2006	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor J3226	Москва, 2010	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,6 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor 301	Таганрог, 2011	0,13 ± 0,02	0,2 ± 0,04	1,2 ± 0,5

ности разработанного нами алгоритма определения уровня экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности холерного вибриона.

Таким образом, разработанный алгоритм оценки уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени позволяет быстро и эффективно провести статистически значимое сравнительное определение экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*. Возможность количественной оценки экспрессии сразу двух генов, ответственных за продукцию ХТ, дает основание рекомендовать использование алгоритма для сравнительного определения токсигенности вновь выделяемых штаммов холерного вибриона.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смирнова Н.И., Чельдышова Н.Б., Заднова С.П., Кутырев В.В. Молекулярно-генетические особенности штаммов *Vibrio cholerae* classica, вызвавших эпидемию азиатской холеры в России в 1942 г. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2001; 4:12–6.
- Creating Standard Curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Applied Biosystems; 2003.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Malinen E., Kassinen A., Rinttila T., Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and

dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology.* 2003; 149(Pt 1):269–77. DOI: 10.1099/mic.0.25975-0.

5. Marashi S.M., Bakhshi B., Fooladi A.A., Tavakoli A., Sharifnia A., Pourshafie M.R. Quantitative expression of cholera toxin mRNA in *Vibrio cholerae* isolates with different CTX cassette arrangements. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1071–3. DOI: 10.1099/jmm.0.038752-0.

6. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):554–29. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.

7. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques.* 2002; 32(6):1372–9.

8. Palmer S., Wiegand A.P., Maldarelli F., Bazmi H., Mican J.M., Polis M., Dewar R.L., Planta A., Liu S., Metcalf J.A., Mellors J.W., Coffin J.M. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10):4531–6.

9. Sharkey F.H., Banat I.M., Marchant R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(7):3795–806. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3795–3806.2004.

10. Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009; 67(1):6–20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.

11. Wang T., Brown M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 1999; 269(1):198–201. DOI: 10.1006/abio.1999.4022.

12. Fyke E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.

References

- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Zаднова S.P., Kutyrev V.V. [Molecular-genetic peculiarities of *Vibrio cholerae* classica strains that caused epidemic of Asian cholera in Russia in 1942]. *Mol. Genet. Mikrobiol., Virusol.* 2001; 4: 12–6.
- Creating Standard Curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Applied Biosystems; 2003.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression

- data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
4. Malinen E., Kassinen A., Rinttila T., Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 2003; 149(Pt 1):269–77. DOI: 10.1099/mic.0.25975-0.
5. Marashi S.M., Bakhshi B., Fooladi A.A., Tavakoli A., Sharifnia A., Pourshafie M.R. Quantitative expression of cholera toxin mRNA in *Vibrio cholerae* isolates with different CTX cassette arrangements. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1071–3. DOI: 10.1099/jmm.0.038752-0.
6. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):554–29. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
7. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques*. 2002; 32(6):1372–9.
8. Palmer S., Wiegand A.P., Maldarelli F., Bazmi H., Mican J.M., Polis M., Dewar R.L., Planta A., Liu S., Metcalf J.A., Mellors J.W., Coffin J.M. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10):4531–6.
9. Sharkey F.H., Banat I.M., Marchant R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(7):3795–806. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3795–3806.2004.
10. Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009; 67(1):6–20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
11. Wang T., Brown M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 1999; 269(1):198–201. DOI: 10.1006/abio.1999.4022.
12. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.

Authors:

Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Крицкий А.А., Чельдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 11.07.17.