

Г.Н.Одинокоев, К.А.Никифоров

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДНК ЛОКУСОВ, ОТЛИЧАЮЩИХ ШТАММЫ СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ОТ ШТАММОВ ДРУГИХ БИОВАРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Проведен поиск переменных хромосомных локусов, отличающих штаммы *Yersinia pestis* средневекового и античного биоваров. У штаммов средневекового биовара выявлено наличие двух делеций размером 183 и 70 п.н. Показано, что первая делеция, локализованная в межгенном участке *aceA – aceK* после 22490 нуклеотида, присутствует у большинства изученных штаммов средневекового биовара, а вторая делеция в гене *y1694* (1869687–1870825 п.н.) выявляется у всех штаммов средневекового биовара, выделенных на территории России и сопредельных стран.

Ключевые слова: возбудитель чумы, биовары, генетические отличия.

G.N.Odinokov, K.A.Nikiforov

Detection of New Variable DNA Loci That Distinguish Medievalis Biovar Strains of Plague Agent from the Strains of Other Biovars*Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov*

Variable chromosome loci have been searched, that differentiate *Yersinia pestis* strains of medievalis from antiqua biovars. The strains of medievalis biovar are shown to possess two deletions – 183 and 70 bps. The first deletion, localized in the inter-gene region *aceA – aceK* is present in the majority of medievalis biovar strains, the second one, in the gene *y1694*, is determined in all medievalis biovar strains isolated in the territory of Russia and neighboring countries.

Key words: plague agent, biovars, genetic differences.

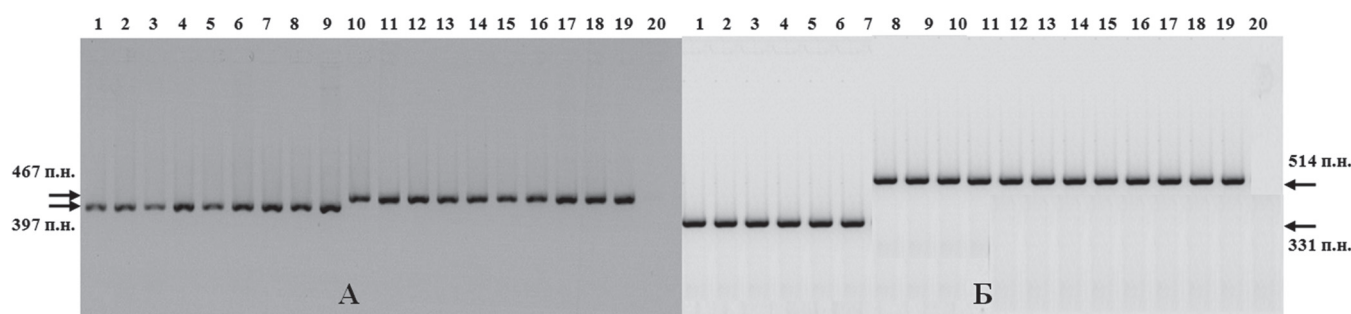
Штаммы *Yersinia pestis* основного подвида делят на три биовара – античный, средневековый и восточный, каждый из которых сформировался в различные периоды внутривидовой эволюции возбудителя чумы. На территории Российской Федерации и сопредельных стран действует 45 природных очагов чумы, в которых циркулируют штаммы *Y. pestis* античного и средневекового биоваров. Генетические отличия штаммов этих биоваров, циркулирующих в различных ландшафтно-географических зонах, исследованы далеко не достаточно. Дифференциацию штаммов проводят по биохимическому признаку – редукции нитратов, в основе различной экспрессии которого лежит переменность единичного нуклеотида в гене периплазматической нитратредуктазы *narA*. Штаммы античного биовара активны по этому признаку, в то время как изоляты средневекового биовара неспособны к денитрифицирующей активности.

Для выявления новых полиморфных ДНК локусов, отличающих штаммы средневекового и других биоваров возбудителя чумы, нами проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *Y. pestis* средневекового (KIM10), античного (Antiqua, Nepal516 Z176003, D182038, D106004) и восточного (CO92) биоваров, представленных в базе данных NCBI GenBank, с помощью алгоритма BLAST, который позволил выявить наличие двух переменных локусов у штамма KIM10, отличных от штаммов других биоваров. Первый локус у

штамма KIM10 содержал делецию размером 183 п.н. после 22490 нуклеотида в межгенном участке *aceA* (21134–22441 п.н.)–*aceK* (22514–24241 п.н.). Второй переменный локус был расположен в гене *y1694* (1869687–1870825 п.н.), который у штамма KIM10 включал делецию 70 п.н. после 811 нуклеотида от начала кодирующей последовательности.

На соответствующие переменные участки генома с помощью программы PrimerExpress были рассчитаны две пары праймеров, фланкирующие участки делеций в хромосомной ДНК. Они имели следующий состав: Med(-183)-S – CGTTGAGAAAGTCCAGCA, Med(-183)-As – GGCAGTGACCTCCAGAAA; Med(-70)-S – AAGACCTTCGCCACCAGA, Med(-70)-As – CCAGGATTCGCCGATTCA. Амплификацию с парами праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As в ПЦР осуществляли по следующей схеме: 1 цикл при 94 °C – 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C – 45 с, 55 °C – 1 мин, 72 °C – 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °C. Ожидаемые размеры образуемых амплификатов с парами праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As составляли у штаммов средневекового биовара 331 и 397 п.н., у античного и восточного – 514 и 467 п.н.

В дальнейшем анализ двух переменных ДНК локусов был проведен у 59 штаммов возбудителя чумы основного подвида (античного, средневекового и восточного биоваров), выделенных в природных очагах на территории России и зарубежных стран. В том числе средневековый биовар был представ-



ПЦР-анализ переменных локусов с парами праймеров Med(-70)-S-As (А) и Med(-183)-S-As (Б):

1–9 – штаммы средневекового биовара (М-567, М-956, М-928, С-528, С-781, С-761, С-763, С-765, С-621); 10–14 – штаммы античного биовара (А-744, 1/156, 14/1646, 1/220, 1691); 15–19 – штаммы восточного биовара (Sonche, Marsel, Israel, KM 715, Hamburg 15); 20 – отрицательный контроль

лен 9 штаммами: М-567 и М-956 (Волго-Уральский песчаный очаг), М-928 (Прикаспийский песчаный), С-528 (Северо-Западный Прикаспийский), С-781, С-761 (Центрально-Кавказский высокогорный), С-763, С-765, С-621 (Центрально-Кавказский высокогорный, Кубано-Малкинский район); античный – 5 штаммами: А-744, 1/156, 14/1646 (Аксайский высокогорный), 1/220 (Алайский высокогорный), 1691 (Верхненарынский высокогорный); восточный – 5 зарубежными штаммами: Sonche, Marsel, Israel, KM 715, Hamburg 15 (рисунок).

У большинства использованных в работе штаммов средневекового биовара в ПЦР с парой праймеров Med(-183)-S-As образовывались амплификаты ожидаемого размера – 331 п.н., за исключением изолятов (С-763, С-765, С-621) из Кубано-Малкинского района Центрально-Кавказского высокогорного очага, у которых отсутствовала делеция в 183 п.н., а размеры образуемых фрагментов составляли 514 п.н., как и у штаммов античного и восточного биоваров (рисунок, Б). Большую разрешающую способность показала вторая пара праймеров Med(-70)-S-As, с помощью которой характерная делеция выявлялась в ПЦР у всех штаммов средневекового биовара, у которых в ПЦР образовывались амплификаты размером 397 п.н., в то время как у изолятов античного и восточного – 467 п.н. (рисунок, А), что соответствовало ожидаемому результату.

Таким образом, нами были обнаружены новые переменные локусы, содержащие делеции размером 183 и 70 п.н., которые отличают штаммы средневекового от штаммов других биоваров возбудителя чумы. В дальнейшем требуется провести биоинформационный анализ этих сайтов для оценки их эволюционной значимости и возможности использования, совместно с ранее выявленными ДНК-мишенями, для реконструкции молекулярной генеалогии возбудителя чумы. Кроме того, в рамках проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга выделяемых штаммов *Y. pestis* совместное использование двух пар праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As позволит просто, надежно и эффективно разделять штаммы античного и средневекового биоваров методом ПЦР без применения дорогостоящих и трудоемких секвенационных технологий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-31908.

Authors:

Odinokov G.N., Nikiforov K.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Одиноков Г.Н., Никифоров К.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 25.10.12.