

А.В.Фадеева, Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинок, Н.А.Шарапова, Т.В.Валова, В.В.Кутырев

РАЗРАБОТКА ПЦР С УНИВЕРСАЛЬНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *tcpA*

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

Разработана ПЦР для выявления структурных генов токсинорегулируемых пилей адгезии – *tcpA* различных типов. Рассчитаны универсальные праймеры, использование которых обеспечивает детекцию этих генов у *V. cholerae* разных серогрупп. С помощью разработанной ПЦР определен новый вариант гена *tcpA* у токсигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогруппы.

Ключевые слова: возбудитель холеры, гены патогенности, ПЦР детекция.

A.V.Fadeeva, G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, N.A.Sharapova, T.V.Valova, V.V.Kutyrev

Development of the PCR Assay with Universal Primers for the Detection of Different *tcpA* Gene Variants

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

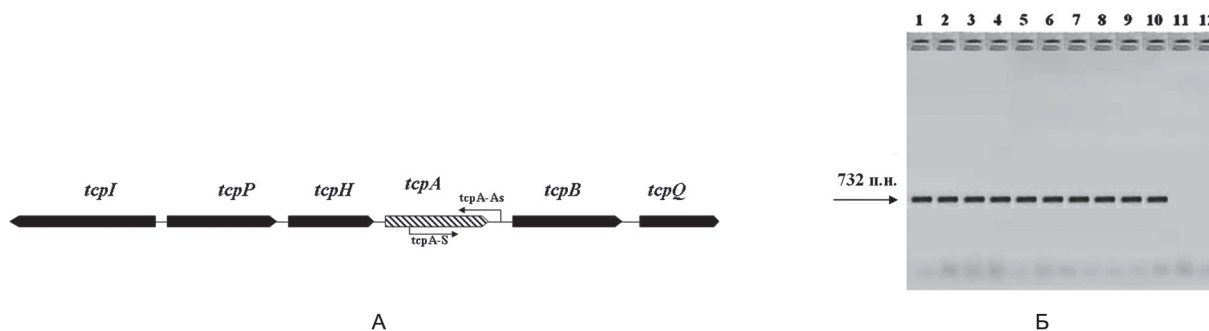
Developed is the PCR assay for the detection of the structural genes of toxin co-regulated adhesion piluses – *tcpA* of different types. Determined are the universal primers, the usage of which provides for the detection of the stated above genes in *V. cholerae* of various serogroups. With the help of this PCR assay identified is a new variant of *tcpA* gene in toxigenic cholera vibrio of non-O1/non-O139 serogroup.

Key words: cholera agent, pathogenicity gene, PCR detection.

Токсинорегулируемые пили адгезии (ТКПА) являются одним из основных факторов патогенности *Vibrio cholerae* и необходимы для колонизации холерными вибрионами тонкого кишечника [4]. Последовательность гена *tcpA*, кодирующего синтез основного белка ТКПА – пилина ТсрА, отличается значительной вариабельностью у холерных вибрионов разных серогрупп, в том числе и у близкородственных холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, которые имеют лишь 75 % идентичности аминокислотной последовательности кодируемого белка [1]. У холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп также выявлено несколько вариантов ТсрА и кодирующих их генов [3, 4]. В настоящее время для детекции *tcpA* используются праймеры, комплементарные этому гену у *V. cholerae* серогруппы O1, которые могут выявлять только гены классического

или эльтор типов [2]. Поскольку это может привести к ошибкам в определении наличия гена *tcpA* и неправильной оценке патогенного потенциала исследуемых изолятов, целью нашего исследования была разработка ПЦР с универсальными праймерами, обеспечивающими выявление разных вариантов гена *tcpA*.

На основе компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей генов *tcpA* у штаммов *V. cholerae* разных серогрупп, представленных в базе данных NCBI GenBank, нами выявлены консервативные участки ДНК, один из которых расположен в последовательности гена *tcpA* ближе к 5' концу, кодирующему N-терминальную часть молекулы пилина ТсрА, а второй высококонсервативный участок лежит за пределами этого гена и примыкает к гену *tcpA* с 3' конца (рисунок, А). На выявленные консервативные участки сконструированы праймеры, кото-



Положение рассчитанных праймеров для детекции различных вариантов гена *tcpA* на схеме *tcp* оперона *V. cholerae* (А), выявление генов *tcpA* в ПЦР с помощью универсальных праймеров у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп O1, классический биовар (Б):

1 – Дакка35; 2 – МАК154, биовар эльтор; 3 – Т4; 4 – 4А, O139; 5 – МО45; 6 – РО-7, O9; 7 – P16136, O28; 8 – P16132, O37; 9 – 1322-69, O74; 10 – P16152, O50; 11 – P-8845; 12 – отрицательный контроль

рые имеют следующий состав:

tcpAuniv-S GAA GAA CAC GAT AAG AAA AC
tcpAuniv-AS CCT TGT TGG TAT TTT CTC AT

Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С – 45 с, 56 °С – 1 мин, 72 °С – 45 с и завершающий цикл – 72 °С – 3 мин.

Проведенный анализ эффективности разработанной ПЦР на 130 штаммах *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации (Астраханская, Саратовская, Самарская, Ростовская области, Калмыкия) и за рубежом в период с 1960 по 2006 год, показал, что ее использование обеспечивает детекцию генов *tcpA* у штаммов разных серогрупп (рисунок, Б). С ее помощью выявляются гены *tcpA* у штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров (рисунок, дорожки 1–4), O139 серогруппы (дорожки 5–6) и у токсигенных вибрионов других серогрупп (дорожки 5–10). У нетоксигенных холерных вибрионов (дорожка 11) ген *tcpA*, как правило, отсутствует, хотя иногда встречаются нетоксигенные штаммы не O1/не O139 серогруппы, содержащие различные варианты этого гена. Среди последних нами выявлены два штамма с геном *tcpA* классического типа, один из которых был выделен в Астраханской области в 1974 г., а второй – в Ростовской области в 1976 г. Три штамма *V. cholerae* не O1/не O139 серогруппы с геном *tcpA* типа эльтор выделены в Ростовской области в 1974–1975 гг. Значительно большее число штаммов с генами *tcpA* классического и эльтор типов обнаружено у *V. cholerae* не O1/не O139 зарубежного происхождения. Среди штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 из O-типизирующей коллекции Саказки выявлено 5 изолятов с генами *tcpA* классического и 7 – с генами эльтор типов. Один токсигенный штамм *V. cholerae* серогруппы O62 с геном *tcpA* классического типа был выделен в 1971 г. в Узбекистане, а второй штамм не O1/не O139 серогруппы, полученный на этой же территории в 1986 г., содержал этот ген типа эльтор.

С применением рассчитанных универсальных праймеров нам впервые удалось выявить наличие гена *tcpA* у группы токсигенных штаммов, выделенных в Узбекистане в 1987–1990 гг. (рисунок, дорожки 7–8, 10), которые, как считалось ранее, не содержат генов ТКПА. Проведенное секвенирование генов *tcpA* у этих токсигенных штаммов показало, что их последовательность имеет существенные отличия (165 замен единичных нуклеотидов на ПЦР фрагменте размером около 730 п.н.) от штамма O1 серогруппы *V. cholerae* 16961, а также от других штаммов, представленных в NCBI GenBank.

Таким образом, нами разработана ПЦР с универсальными праймерами, применение которой обеспечивает детекцию генов *tcpA* различных типов. С ее помощью нами выявлен новый вариант (аллель) этого гена у токсигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогруппы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bertran P., Delgado G., Navarro A., Truhillo F., Selander R.K., Gravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:581–90.
2. Keasler S.P., Hall R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet. 1993; 341:1661.
3. Nandi B., Nandy R.K., Vicente A.C., Ghose A.C. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (*tcpA*) in a toxigenic non-O1/non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2000; 68:948–52.
4. Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J. Use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84:2833–7.

Authors:

Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Sharapova N.A., Valova T.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Шарпова Н.А., Валова Т.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.02.12.