

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ (RAPD-АНАЛИЗ) ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ ПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ

Романова Л.В., доктор биологических наук, с.н.с., alexvod@gmail.com

Мишанькин Б.Н., доктор медицинских наук, вед.н.с.

Кудрякова Т.А., доктор медицинских наук, вед.н.с.,

Бородин Т.Н., Македонова Л.Д., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Ключевые слова: ДНК-содержащие бактериофаги, универсальные праймеры, однопраймерная ПЦР (RAPD-анализ), генотипическая характеристика бактериофагов иерсиний
Показана возможность применения метода ОП-ПЦР (RAPD-анализ), для генотипической характеристики ДНК-содержащих бактериофагов патогенных иерсиний. Подбор оптимального набора праймеров будет способствовать углубленному анализу фагов на межвидовом и внутривидовом уровнях.

Введение. Одной из основных проблем медицинской микробиологии, имеющей теоретическое и практическое значение, является разработка новых методов диагностики и дифференциации возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, которые позволили бы установить источник инфекции, изучить механизмы и пути передачи возбудителя, резервуары и ареалы его распространения. Использование в эпидемиологическом анализе рутинных методов диагностики и типирования возбудителей, основанных на выявлении фенотипических признаков, часто неэффективно. Тогда как молекулярно-биологические методики позволяют надежно устанавливать степень гомологии или, наоборот, расхождения между отдельными микроорганизмами. Открытие ПЦР [1], ее внедрение в практику микробиологических и особенно эпидемиологических исследований внесли огромный вклад информации в этой области. Обычно классический метод ПЦР предусматривает амплификацию ДНК с использованием 2 специфических олигонуклеотидных праймеров. Однако, существует и другой способ амплификации ДНК в ПЦР, это так называемая однопраймерная ПЦР (ОП-ПЦР) с использованием универсальных, или случайных (random), праймеров. В зарубежной литературе этот способ амплификации обозначают - RAPD (random amplified polymorphic DNA) [2,3,4,5,6]. Каждые из выбранных праймеров или их комбинация дают возможность обнаружить специфические микролокусы в геноме изолята, которым свойственна различная степень нуклеотидной изменчивости на внутри - и межвидовом уровне.

Классификация бактериофагов на данном этапе является сложным и одним из наиболее трудных разделов современной биологии, так как бактериальные вирусы имеют эволюционно выработанные, присущие им структурные и биологические особенности. Современный этап развития систематики бактериофагов характеризуется расширением круга таксономических подходов, созданием системы, основанной на данных молекулярной биологии. Поэтому для повышения достоверности при выявлении тонких внутривидовых различий между фагами может оказаться полезным использование новых молекулярно-биологических методических приемов.

Материалы и методы исследований. В своих исследованиях по генотипированию возбудителей особо опасных заболеваний и их бактериофагов мы использовали преимущественно однопраймерный вариант ПЦР и следующий набор универсальных праймеров: Ар7

– GTG GAT GCG A [7], 45 – TGA CCG GCA GCA AAA TG [3], 2 –ATT GCG TCC A [8], pUC/M13 [9].

Исследовали ДНК следующих бактериофагов: 1030, 1055 (выделены из *Y.pestis*), 12253, 10623, 2339 (выделены из *Y.pseudotuberculosis*), 5531, 43, 12374, 826, 1998, 5423, 19 (выделены из *Y.enterocolitica*). ДНК фагов изолировали, как описано [10]. Качество нативной ДНК и результаты ПЦР контролировали электрофорезом в 5 %-ном полиакриламидном геле в аппарате для электрофореза типа «Midget» (Hoefer Scientific Instrument, США) в присутствии маркеров, представляющих собой смесь *MspI*-гидролизата плазмидной ДНК pUC19 и *PstI*-гидролизата ДНК фага λ .

Аmplификацию проводили на амплификаторе «Терцик» производства «ДНК-Технология» (Москва) в следующем режиме: 94°C (денатурация) - 15 сек; 42°C (отжиг) – 20 сек; 72°C (синтез) – 15 сек (всего 40 циклов). Инкубационная смесь (15мкл) для ПЦР содержала 20 mM трис-HCl, pH 8,6; 7mM MgCl₂; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5mM EDTA; 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, по 250 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (Serva), 0,1-1 мкМ соответствующего праймера, 2 ед. Taq-полимеразы и 1-10 нг ДНК исследуемого фага.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследования показали, что использованные праймеры оказались способны амплифицировать последовательности хромосомной ДНК исследуемых бактериофагов и образовывать ПЦР - профили в виде фрагментов ДНК количеством от 15 до 2 и размером от 1650 до 170 п.н. (Рис.1,2).

При использовании праймера AP7 (Рис.1) наблюдали следующее: картины распределения фрагментов ДНК чумных и псевдотуберкулезных фагов очень похожи как по их числу (примерно 11-12, в диапазоне 1650-100 п.н.), так и по интенсивности свечения полос. Имеются небольшие различия в картине амплификации ДНК псевдотуберкулезных фагов – у фага 10623 нет одной из сдвоенных полос в районе 690 п.н., присутствующей у фагов 12253 и 2339. Что касается амплификации ДНК фагов *Y.enterocolitica*, то для каждого вида наблюдали свою ему присущую картину распределения фрагментов. Диапазон полос распределялся от 1450 до 186 п. н. с различной интенсивностью свечения.

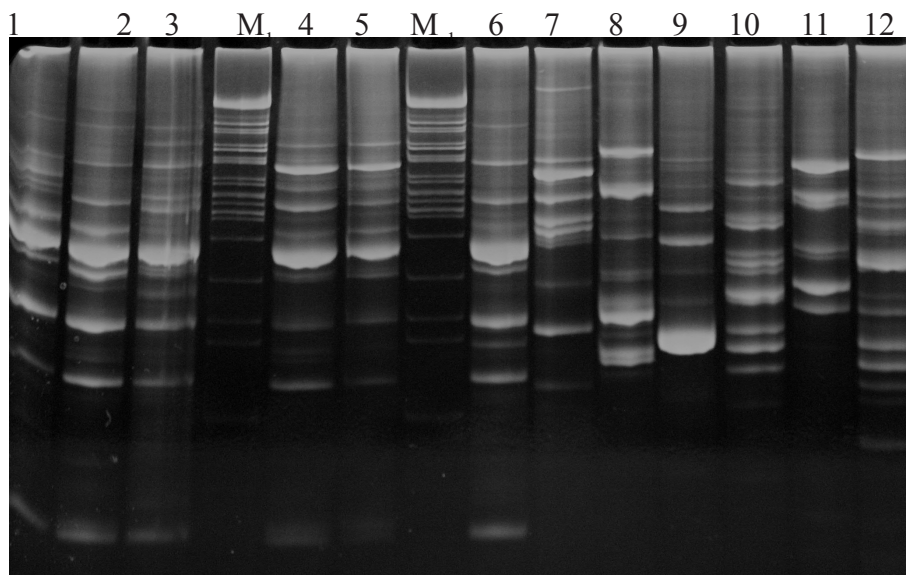


Рис. 1 - Амплификация ДНК бактериофагов патогенных видов иерсиний с праймером AP7: M –маркер молекулярных весов (M₁ – *Bgl I*-гидролизат ДНК фага λ); дорожка 1 – ДНК фага 12253; 2 -10623; 3 -2339 (выделены из *Y.pseudotuberculosis*); 4 - 1030; 5 -1055 (выделены из *Y.pestis*); 6-5531; 7-43; 8-12374; 9-826; 10-1998; 11-5423; 12- 19 (выделены из *Y.enterocolitica*).

При использовании в амплификации праймера 45 (Рис.2) ДНК псевдотуберкулезных фагов давала большее количество ампликонов, чем в случае Ар7 – их было 14-15. Картина амплификации у трех изученных видов почти одинаковая с небольшими различиями по минорным полосам, кроме того у фага 10623 наблюдали двойную интенсивно светящуюся полосу в районе 500 – 400 п.н. Картина распределения ампликонов чумных фагов резко отличалась от таковой как для псевдотуберкулезных фагов, так и внутри вида. Ампликон фага 1030 отличался от ампликона фага 1055 по следующим признакам – у 1055 наблюдаются мощные полосы в районе 780 и 404 п.н., у 1030 присутствует фрагмент размером 1140 п.н., которого нет у 1055, также у 1030 имеются минорные полосы в районе 210 и 186 п.н., которых нет у ДНК фага 1055. Ампликоны ДНК фагов выделенных от *Y.enterocolitica* сильно отличаются от ампликонов чумных и псевдотуберкулезных фагов (как по картине распределения фрагментов, так и по интенсивности свечения полос). Каждый фаг внутри вида имеет свою индивидуальную картину распределения полос. Например, у фага 5429 наблюдали только одну мощную полосу в районе 1140 п.н., а у фага 19 фрагментов было 10 в диапазоне 1250-210 п.н.

1 2 3 4 5 6 7 M, 8 9 10 M 11 12 M,

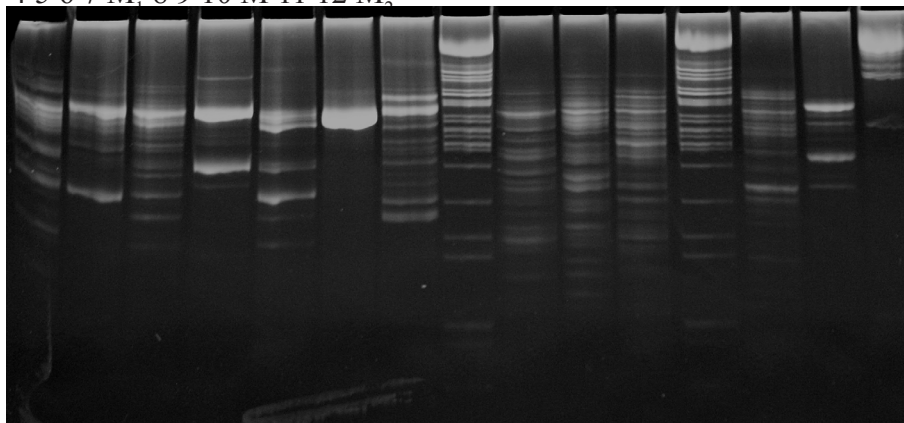


Рис. 2 - Амплификация ДНК бактериофагов патогенных видов иерсиний с праймером 45: M –маркер молекулярных весов (M_1 – *Bgl* I-гидролизат ДНК фага λ , M_2 – *Hind*III- гидролизат ДНК фага λ); дорожка 1-5531; 2-43; 3-12374; 4-826; 5-1998; 6-5423; 7- 19 (выделены из *Y.enterocolitica*); 8–ДНК фага 12253; 9 -10623; 10 -2339 (выделены из *Y.pseudotuberculosis*); 11 - 1030; 12 -1055 (выделены из *Y.pestis*).

Амплификация с праймером 2 и pUC/M13 (данные не представлены) выявила такие же различия между чумными, псевдотуберкулезными фагами и фагами, выделенными из *Y.enterocolitica*. Чумные и псевдотуберкулезные фаги сильно отличаются по числу амплифицированных фрагментов (у первых их много меньше -4-5 к 10-11). Кроме того, псевдотуберкулезные фаги 12253 и 10625 отличаются от фага 2339 по числу ампликонов – у последнего их больше -11.

Заключение. Таким образом, проведена генотипическая характеристика (паспортизация) каждого из изученных изолятов и выявлены различия на видовом и внутривидовом уровнях, которая проявляется в различной картине ПЦР ампликонов. Исследование показало возможность применения ОП-ПЦР для углубленной генотипической характеристики ДНК бактериофагов различных видов патогенных иерсиний, что, возможно, позволит уточнить таксономию ряда новых фагов, имеющих сходный цикл развития, морфологию и антигенную структуру, и предложить новый подход к их классификации и идентификации. Дальнейшие исследования по генотипированию фагов с использованием праймеров различной длины будут

способствовать подбору оптимальных вариантов набора праймеров для проведения углубленного анализа фагов на межвидовом и внутривидовом уровнях.

Библиографический список

1. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol.* - 1987. - Vol.155. - P. 335-350.
2. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* - 1990. - Vol.18. - P. 6531-6535.
3. Булат С.А., Кабоев О.К., Мироненко Н.В. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов // *Генетика.* - 1992. -Т. 28, №5. - С. 19-28.
4. Lin M., Payhe D.A., Schwaez J.R. Intraspecific diversity of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay water and Oyster as determined by randomly amplified polymorphic DNA PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003. - Vol.69, N.6. - P. 3170-3175.
5. Лукин Е.П., Воробьев А.А., Малеев В.В., Быков А.С. Лукин, Е.П. Молекулярно-генетическое разнообразие риккетсий // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* - 2006. - №1. - С. 92-99.
6. Викторов Д.В., Захарова И.Б., Меринова Л.К., Алексеев В.В. Молекулярное типирование штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различной чувствительностью к антибиотикам // *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* - 2006. -№1. - С. 7-11.
7. Martiocian G., van Belkum W., van Lecuwen A. et al. PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for the comparison of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from two Polish university hospital // *Clinic.Microbiol. Infect.*- 1997.- Vol.3.- N.1.- P.102-106.
8. Berche P., Poyart C., Abachin E. et al. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae* // *J. Infect. Dis.* -1994. - Vol.170. - N.3. - P. 701-704.
9. Валидов Ш.З., Панькова Н.В., Козлова Е.В. и др. Схема быстрого выделения и идентификации *Lactobacillus plantarum* с использованием НП-ПЦР// *Микробиология.*-1998.- Т.67,№3.-С.384-390.
10. Yamamoto K.R., Alberts B.M., Berzinger R., Lawhorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // *Virology.* - 1970. - Vol.40, N.3. -P. 734-744.

MOLECULAR TYPING (RAPD-ANALYSIS) OF PATOGENIC YERSINIA DNA-CONTAINING BACTERIOPHAGES

Romanova L.V., Mishankin B.N., Kudriakova T.A., Borodina T.N., Makedonova L.D., Gaevskaya N.E., Kachkina G.V.

Key words: *DNA-containing bacteriophages, random primers, one-primer PCR (RAPD - analysis), genotype characteristic of yersinia bacteriophages*

A comparison analysis of the genomes of DNA-containing yersinia bacteriophages has been carried out using one-primer PCR (RAPD - analysis). It was shown that one-primer PCR can be used for the genotype characteristics of the DNA-containing bacteriophages. The selection of the optimum primer set would provide the progress in the interspecies and intraspecies study of the phages.