

УДК 579

О. А. Жданова, С. Н. Янов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ЧИСЛА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Методы молекулярно-генетического типирования в настоящее время приобретают актуальность в связи с их высокой разрешающей способностью, точностью, воспроизводимостью. Перспективным методом сравнения геномов бактерий является мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (VNTR-анализ). Метод VNTR-анализа был использован в данной работе для исследования 11 природных изолятов *E. coli*, выделенных от животных и человека. Были выбраны 4 VNTR-локуса, потенциально перспективные для типирования штаммов кишечной палочки. Разработан алгоритм, согласно которому для каждого VNTR-локуса были подобраны нуклеотидные последовательности специфических пар праймеров. Образцы ДНК, выделенные из изолятов кишечной палочки, были использованы для постановки полимеразной цепной реакции с каждой парой праймеров. Путём определения длины полученных ампликонов методом электрофореза в агарозном геле, было установлено количество тандемных повторов в четырёх выбранных локусах. На основании полученных данных были составлены VNTR-профили изолятов. Изоляты 1 и 3, 5 и 7, 10 и 11 имеют одинаковое количество повторов во всех четырёх локусах, то есть принадлежат к одному или близкородственным штаммам *E. coli*. Таким образом, показана возможность использования с VNTR-анализа для выявления генетических различий между штаммами кишечной палочки.

*Ключевые слова:* мультилокусный vntr-анализ, тандемные повторы, полимеразная цепная реакция, праймеры.

Целью исследования является разработка алгоритма подбора специфических праймеров и дифференциация природных изолятов кишечной

палочки с использованием мультилокусного анализа варибельного числа tandemных повторов.

Алгоритм выбора праймеров включал следующие этапы. Первоначально с использованием базы данных NCBI и программного обеспечения Tandem Repeats Finder были изучены и выбраны для дальнейшей работы 4 варибельных VNTR-локуса. Поиск VNTR проводили для штаммов *E. coli* IHE303, *E. coli* Nissle1917, *E. coli* O157:H7, полностью секвенированные геномы которых были получены из базы данных NCBI.

Поиск tandemных повторов был проведен согласно следующим критериям:

1. длина одного повтора: 90 – 120 п.н.;
2. число копий: 4 – 100;
3. процент гомологии tandemных повторов: 90 – 100.

Для последующей работы были отобраны 4 VNTR-локуса, которые наиболее оптимально подходили для разрабатываемого способа типирования.

В программном обеспечении Tandem Repeats Finder отображались нуклеотидные повторы VNTR локусов и отдельно последовательности, фланкирующие эти локусы. Для выбора праймеров эти участки были соединены в одну неразрывную нуклеотидную последовательность.

На следующем этапе исследований был осуществлён выбор праймеров с помощью компьютерной программы «Oligo-6». Было подобрано 4 пары праймеров, соответственно для каждой выбранной ранее VNTR-последовательности.

Выбор праймеров проводили согласно следующим критериям:

1. GC-состав праймеров в пределах ~ 40-60 %;
2. длина праймеров 17-35 нуклеотидов;
3. наличие 1-2 G/C на 3'-конце;
4. температура плавления ( $T_m$ ) 55-65 °C;

5. праймеры должны быть близкими по температуре плавления (допустимые отличия не более 5 °С);

6. отсутствие вторичных структур — шпилек и димеров.

Проверка соответствия всех выбранных праймеров указанным выше критериям была проведена в программе «Oligo-6». Специфичность праймеров была проверена в базе данных NCBI с помощью резидентной программы BLAST. В результате проверки было установлено, что выбранные праймеры способны гибридизоваться с фланкирующими последовательностями ДНК многих штаммов *E. coli*, что позволит использовать данные праймеры для типирования разных штаммов.

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики приведены в таблице 1.

Таблица 1

### Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Размер повтора	Наименование праймера	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	T <sub>m</sub> , °С	GC, %	Оптимальная температура отжига, °С
113	U1	ATCCACCCGGCAATGTGTG	73,7	57,9	59,4
	L1	TGGGCGGGAATGATGTTCTTA	73,1	47,6	
97	U2	ATTTGATGCCAGGTGAGGCTGTG	76,0	52,2	59,9
	L2	GGAAGTGAAGCGTCAGTTTTGTCGC	77,4	52,0	
94	U3	GGCGATGGAAGAGTAAGGTAT	65,7	47,6	57,8
	L3	TGTTATCTTGCGACACGAAAT	66,7	38,1	
93	U4	GGCGTTTGACCTACCTGTTCA	70,8	52,4	58,1
	L4	TTGATAATGCTGTTGCCACCA	70,8	42,9	

С использованием программного обеспечения «Oligo-6» и NCBI Blast были смоделированы условия проведения полимеразной цепной реакции с выбранными ранее праймерами. Постановка ПЦР *in silico* позволила до начала собственно эксперимента определить возможность проведения ПЦР с выбранными праймерами, рассчитать оптимальные температуры отжига, длину предполагаемого амплификата, предусмотреть возможное образование шпилек и неспецифических продуктов амплификации.

В работе исследованы 11 изолятов *E. coli*, выделенных из биологического материала человека и млекопитающих. Из них 7 были выделены от свиньи, 2 от мыши и 2 от человека.

Следующий этап исследования включал получение образцов ДНК каждого из исследуемых изолятов и постановку полимеразной цепной реакции с целью обнаружения в образцах ДНК исследуемых VNTR-локусов.

*E. coli* – это грамотрицательные микроорганизмы с тонкой клеточной стенкой, которая легко поддается классическому методу разрушения действием высокой температуры. Предложенная авторами методика изложена в таблице 2.

Таблица 2

### Схема выделения ДНК

Этап	Операции
Получение биомассы микроорганизма	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. В пробирки, содержащие по 5 мл стерильной жидкой питательной среды МПБ, вносили бактериологической петлей образцы микроорганизмов и суспендировали.</li> <li>2. Выращивали культуры изолятов в жидкой питательной среде МПБ при температуре 37°C. в шейкере-инкубаторе Es-20 (Латвия).</li> </ol>
Разделение клеток и культуральной жидкости	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. 1,5 мл суспензии вносили в пробирки типа эппендорф.</li> <li>4. Клетки осаждали в центрифуге Avanti J-E при 3000 g в течение 15 минут.</li> <li>5. Надосадочную жидкость удаляли с помощью насоса с колбой-ловушкой и устройства для пробоотбора NET0x7.</li> <li>6. При отсутствии достаточного количества осадка повторяли операции 3-4.</li> </ol>
Отмывка и разрушение клеточной стенки	<ol style="list-style-type: none"> <li>7. Клетки суспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды.</li> <li>8. Суспензию центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин.</li> <li>9. Клетки суспендировали в 0,5 мл дистиллированной воды.</li> </ol>

## Биологические науки

Этап	Операции
	10. Суспензию кипятили в течение 15 минут в термостате типа «Гном».
Отбор раствора ДНК	11. Разрушенные клеточные стенки осаждали в центрифуге при 3000 g в течение 10 минут. 12. Надосадочную жидкость собирали в стерильные пробирки типа эппендорф, считая объем.

Параметры проведения полимеразной цепной реакции с полученными образцами ДНК представлены в таблице 3.

Таблица 3

## Параметры проведения полимеразной цепной реакции

Аmplифицируемый VNTR-локус	Циклы ПЦР		
113	94°C – 2 мин	94°C – 30 с 59°C – 30 с 72°C – 60 с	72°C – 4 мин
97	94°C – 2 мин	94°C – 30 с 72°C – 30 с 72°C – 45 с	72°C – 4 мин
94	94°C – 2 мин	94°C – 30 с 57°C – 30 с 72°C – 60 с	72°C – 4 мин
93	94°C – 2 мин	94°C – 30 с 67,5°C – 30 с 72°C – 40 с	72°C – 4 мин

Продукты амплификации детектировали с помощью горизонтального гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Определив длину получившихся ампликонов путём сравнения с ДНК-маркером «SybEnzyme» 100 bp + 1,5 Kb, рассчитывали количество tandemных повторов в исследуемом VNTR-локусе. Различие повторов между образцами ДНК указывало на то, что данные образцы принадлежат разным штаммам [3; 7; 8].

Число повторов определялось по формуле, приведённой в работе О. А. Ждановой [4]. Результаты расчетов приведены в таблице 4.

Таблица 4

**Определение количества tandemных повторов у изолятов *E. coli*.**

Размер повтора	Обозначение изолята											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
113	Количество повторов	2,3	3,2	2,3	6,1	2,3	0,1	2,3	0,1	2,3	6,7	6,7
97		1,1	-	1,1	5,8	1,1	-	1,1	1,7	1,7	3,7	3,7
94		1,4	-	1,4	-	0,8	1,4	0,8	-	8,3	-	-
93		4,1	-	4,1	-	4,1	4,1	4,1	-	-	-	-

Полученные данные показывают, что изоляты 1 и 3, 5 и 7, 10 и 11 имеют одинаковое количество повторов во всех четырёх локусах. На основании этого можно говорить о том, что изоляты, которые имеют одинаковые VNTR-профили, соответственно, принадлежат к одному или близкородственным штаммам *E. coli*. Таким образом, с помощью VNTR-анализа были дифференцированы разные штаммы кишечной палочки.

Вывод. Полученные VNTR-профили выделенных культур позволили определить степень родства штаммов *E. coli*. В дальнейшем предполагается проследить их происхождение, источник и пути распространения, что является важной задачей при проведении экологического мониторинга и санитарно-эпидемиологического расследования.

**Список литературы**

1. Pei Y. Molecular Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / Y. Pei, J. Terajima, Y. Saito, R. Suzuki, N. Takai, H. Izumiya, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, M. Miura S. , Iyoda, J. Mitobe, B. Wang, H. Watanabe // Jpn. J. Infect. Dis. 2008. Vol. 61(1). P. 58–64.
2. Nadon C. A. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance / C. A. Nadon, E. Trees, L. K. Ng, N. E. Moller, A. Reimer, N. Maxwell, K. A. Kubota, P. Gerner-Smidt // Euro Surveill. 2013. Vol. 18(35). P. 205–265.

3. *Beranek A.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* / A. Beranek, C. Mikula P. , Rabold, D. Arnhold, C. Berghold, I. Lederer, F. Allerberger, C. Kornschober // *Int J Med Microbiol.* 2009. Vol. 299(1). P. 43–51.

4. *Жданова О. А.* Разработка метода типирования штаммов *Escherichia coli* на основе мультилокусного анализа варибельного числа тандемных повторов // ОБЩЕСТВО, НАУКА, ИННОВАЦИИ: всерос. ежегод. науч.-практ. конф.: сб. материалов 13–24 апреля 2016 г. / отв. ред. С. Г. Литвинец; Вят. гос. ун-т. Киров, 2016.

5. *Жданова О. А.* Значимость метода мультилокусного анализа варибельного числа тандемных повторов для внутривидового типирования штаммов *Escherichia coli* // ОБЩЕСТВО, НАУКА, ИННОВАЦИИ: всерос. ежегод. науч.-практ. конф.: сб. материалов 13–24 апреля 2015 г. / отв. ред. С. Г. Литвинец; Вят. гос. ун-т. Киров, 2015.

6. *Vergnaud G., Pourcel C.* Multiple locus variable number of tandem repeats analysis // *Methods Mol Biol.* 2009. Vol. 551. P. 141–158.

7. *Lindstedt B. A.* Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria // *Electrophoresis.* 2005. Vol. 26(13). P. 2567–2582.

8. *Myers P.* Tandem repeats and morphological variation // *Nature Education.* 2007. Vol. 1(1). P. 12–14.

**ЖДАНОВА Ольга Андреевна** – магистрант Института микробиологии и биотехнологии, кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: [olga.48667@gmail.com](mailto:olga.48667@gmail.com)

**ЯНОВ Сергей Николаевич** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: [yanov1947@mail.ru](mailto:yanov1947@mail.ru)