

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

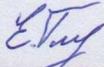
Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВЬЕТНАМЕ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Романова Никиты Ивановича

Научный руководитель:
доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к.б.н.


(подпись, дата)

Е. В. Глинская

Заведующий кафедрой:
д.б.н., профессор


(подпись, дата)

С. А. Степанов

Саратов 2018

Актуальность темы. Интерес к изучению штаммов чумы Вьетнама обусловлен их малой изученностью и недостаточной освещенностью вопроса в научной литературе, отсутствием в международных генетических базах данных их полногеномных последовательностей. Исследование филогении вьетнамских штаммов важно для анализа микроэволюции отдельных популяций *Y. pestis* на эндемичных территориях и в практических целях – для проведения их молекулярной диагностики [1].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было проведение филогенетического анализа штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Вьетнама. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме, для установления принадлежности к биовару.
2. Провести полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* из Вьетнама для определения их генетического родства со штаммами восточного биовара из других регионов мира.
3. Построить дендрограмму филогенетических связей исследованных штаммов.
4. Выполнить поиск SNPs, специфичных для ветвей, сформированных вьетнамскими штаммами, для выяснения филогенетической принадлежности других взятых в исследование штаммов.
5. Провести филогенетический анализ расширенной выборки штаммов *Y. pestis* из Вьетнама.
- 6.

Материал и методы исследования. Исследования проводились с 2017 по 2018 гг. Объектом исследования явились штаммы *Y. pestis*, полученные из коллекции РосНИПЧИ «Микроб», изолированные на плотных питательных средах. Штаммы *Y. pestis* выращивали при 28°C или 37 °C в течение 24-48 ч на агаре LB или в бульоне LB (pH 7,2). Всего в работе использовано 49 штаммов *Y. pestis*.

Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили в соответствии с требованиями [2] при непосредственном наблюдении автора. Для выделения ДНК использовали наборы AxyPrep (AXYGEN Biosciences, США) по прилагаемой методике. Полученные препараты ДНК использовали в реакциях ПЦР и для полногеномного секвенирования.

Для проведения ПЦР в объеме 25 мкл использовали следующую реакционную смесь: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР, 2,5 мкл раствора по 2 мМ дНТФ, 2 мкл 25 мМ MgCl₂, по 0,1 мкл (10 - 20 пМ) каждого праймера, 0,2 мкл (5 ед.) Taq полимеразы. После внесения Taq-полимеразы реакционную смесь тщательно перемешивали, доводили деионизованной водой до объема в 15 мкл и вносили по 15 мкл в каждую пробирку (0,6 мл), включая контроли. В пробирку, обозначенную как отрицательный контроль, вносили 10 мкл деионизованной воды, а в пробирку, обозначенную как положительный контроль - 10 мкл контрольной ДНК.

Продукты, полученные в ПЦР, анализировали методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле, приготовленном на 1хТАЕ с добавлением 0,3 мкг/мл бромида этидия при напряжении 10 – 15 В/см, и последующем просмотре в УФ-свете при длине волны 310 нм [3].

Секвенирование ПЦР фрагментов штаммов *Y. pestis* выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США) совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб» (заведующий лабораторией к.х.н. Я. М. Краснов). Обработку данных секвенирования осуществляли с помощью пакета программ Ion Torrent Suite software версии 5.2 и Newbler gsAssembler версии 2.6 [58]. В анализ брали нуклеотидные последовательности штаммов с не менее чем 30-кратной средней глубиной прочтения.

Сравнительный анализ геномов бактерий проводили с использованием нуклеотидных последовательностей штаммов, представленных в генетической базе данных NCBI GenBank. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI 10 и алгоритма BLAST [4].

Построение филогенетических деревьев штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* проводили с помощью компьютерной программы Mega 6.0 [5].

Полногеномный SNP анализ штаммов *Y. pestis* проводили с помощью программ Wombac версии 2.0 [6] и Bionumerics версии 7.5. Для построения

дендрограмм использовали Bionumerics 7.5, алгоритм Maximum Parsimony с логарифмической обработкой длины ветвей.

Поиск ДНК мишеней для дифференциации штаммов осуществляли с использованием программы Mega 6.0 [5], а так же алгоритма BLAST по базе данных полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI GenBank.

Расчет праймеров для ПЦР-ЭФ проводили с помощью программы Vector NTI 10 [7, 8].

Структура и объём работы. Работа изложена на 47 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 6 рисунками. Список использованных источников включает 70 наименований.

Научная новизна. Данное исследование направленно на разработку системы молекулярного типирования штаммов *Y. pestis* для определения принадлежности выделяемых штаммов возбудителя чумы к подвиду, биовару, филогенетической линии и природному очагу.

Практическая значимость. Установлено преобладание на всей территории Вьетнама штаммов *Y. pestis* восточного биовара филогенетической ветви 1.ORIV. Разработан способ SNP типирования вьетнамских штаммов на основе выявленных маркерных SNPs методом ПЦР и фрагментного секвенирования.

Апробация. Устный доклад на X Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2018).

Публикации.

1. Куклева Л. М., Никифоров К. А., Альхова Ж. В., Романов Н. И., Носов Н. Ю., Фадеева А. В., Малахаева А. Н., Шарапова Н. А., Ерошенко Г. А. Молекулярно-генетические и фенотипические особенности штаммов возбудителя чумы, выделенных во Вьетнаме // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. №80. ISSN 0370-1069 (Print)

Положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Y. pestis*, выделенные на территории Вьетнама, принадлежат к восточному биовару.
2. штаммы *Y. pestis* из природных очагов Вьетнама относятся к отдельной филогенетической ветви восточного биовара.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о возбудителе чумы, строении генома возбудителя, представлены направления внутривидовой эволюции возбудителя чумы.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о проведение внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* с использованием метода ПЦР, полногеномного секвенирования, поиска SNPs.

Для детекции штаммов восточного биовара в ПЦР используется маркерная *indel* мутация в вариабельном участке гена *glpD* глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы, который у штаммов восточного биовара несет делецию в 93 п.н., отсутствующую у других штаммов *Y. pestis*.

Выявление маркерной делеции проводили в ПЦР-ЭФ с использованием ранее рассчитанных праймеров, с которыми у штаммов восточного биовара образуются амплификаты размером 415 п.н., а у других штаммов – 508 п.н. У всех изученных нами штаммов, выделенных на территории Вьетнама, в гене *glpD* присутствовала делеция в 93 п.н.. что подтвердило их принадлежность к восточному биовару (рисунок 1).

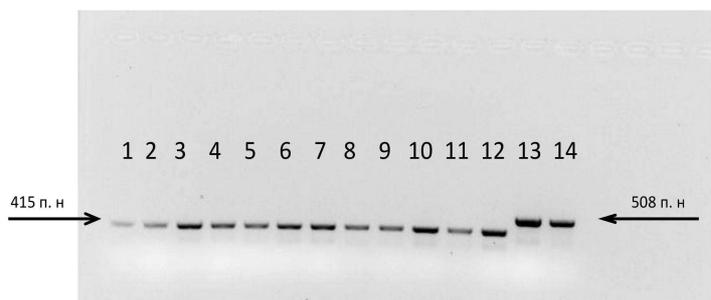


Рисунок 1 - Выявление маркерной *indel* мутации (делеции в 93 п.н в гене *glpD*) у штаммов *Y. pestis* восточного биовара, выделенных во Вьетнаме

Штаммы *Y.pestis*: 1.P-13242, 2.P-13250, 3.P-13272, 4.P-14713, 5.P-14720, 6.P-13270, 7.P-13223, 8.P-13227, 9. P-13228, 10.Saigon 64-1122, 11.Saigon 64-1198. Контрольные штаммы: 12. A-1122 – восточный биовар 13. 231 – античный биовар, 14. 1484 – средневековый биовар.

Для установления филогенетического положения штаммов из очагов Вьетнама и определения их генетического родства со штаммами восточного биовара из других регионов мира совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб» (заведующий лабораторией к.х.н. Я. М. Краснов) было проведено полногеномное секвенирование 8 исследованных штаммов *Y. pestis*, выделенных в разных провинциях Вьетнама в период 1955-1990 гг.: KM761, C453, KM751, 78054, P-13229, P-17273, P-132267, 8046. В филогенетический анализ при построении дендрограммы были включены также штаммы восточного биовара из различных регионов мира, полногеномные последовательности которых находятся в NCBI GenBank (таблица 1) [10, 11].

Таблица 1 – Штаммы *Y. pestis*, полногеномные последовательности которых использованы в работе

Штамм <i>Y. pestis</i>	Номер доступа нуклеотидной последовательности в NCBI GenBank
India 195	ACNR01
Algeria3	FMBU01
IP275	AAOS02
MG05_1020	AAYS01
9	AXDF01
113	AXDG01
EV76-CN	ADSA02
YN2179	ADTE01
YN2588	ADTG01
YN2551	ADTF01
CMССК110001	ADQK01
F1991016	ABAT01
CMССК100001	ADRR01
YN663	ADTI01
F1984001	ADSD01
KM761	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
C453	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
KM751	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
78054	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
P-13229	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»

P-17273	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
P-13226	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
78046	Секвенирован в РосНИПЧИ «Микроб»
24H	AXDI01
A-1122	NZ_CP009840.1
CA88_4125	NC_009595.1
El_dorado	NZ_CP009785.1
CO92	NC_003143.1
Shasta	NZ_CP009723.1
Dodson	NZ_CP009844.1

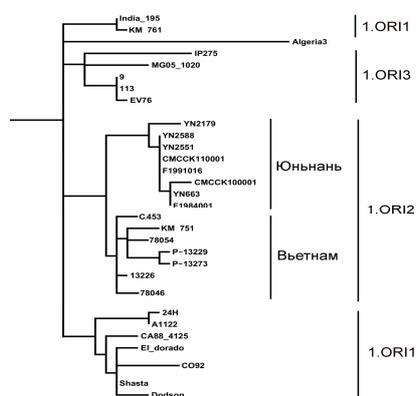


Рисунок 2 - Дендрограмма филогенетических связей штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме

Как следует из полученной дендрограммы (рисунок 2) все штаммы восточного биовара разделились на несколько отдельных кластеров, соответствующих филогенетическим ветвям 1.ORI1, 1.ORI2 и 1.ORI3 и географическим регионам их распространения. Все секвенированные штаммы *Y. pestis* из очагов Вьетнама вошли в ветвь 1.ORI2 восточного биовара, образовав в ней собственный подкластер, отдельный от других штаммов ветви 1.ORI2. Эта отдельная популяция восточного биовара обозначена 1.ORI2v (Vietnam).

Второй подкластер, вошедший в ветвь 1.ORI2, составили штаммы, выделенные в провинции Юньнань в Китае в 1955-1990 гг. Штаммы популяции 1.ORI2v, изолированные во Вьетнаме, филогенетически наиболее близки к штаммам из провинции Юньнань в Китае. Обе популяции представляют два родственных, но отдельных подкластера ветви 1.ORI2 и,

следовательно, имеют общее происхождение. Это означает, что чума могла быть завезена во Вьетнам в начале третьей пандемии из провинции Юннань в Китае.

Еще один исследованный штамм – *Y. pestis* KM761, выделенный в провинции Донг Най во Вьетнаме в 1981 г., вошел в подветвь 1.ORI1 вместе со штаммом India 195, нуклеотидная последовательность которого представлена в базе данных NCBI GenBank.

Таким образом, по результатам полногеномного секвенирования нами было установлено наличие двух филогенетических ветвей восточного биовара среди штаммов *Y.pestis* из очагов чумы во Вьетнаме. Семь штаммов принадлежали к ветви 1.ORI2v, один штамм – к ветви 1.ORI1 вместе со штаммом из Индии.

Для выяснения филогенетической принадлежности других взятых в исследование штаммов из Вьетнама (без проведения их полногеномного секвенирования) был выполнен поиск SNPs, специфичных для двух ветвей, сформированных вьетнамскими штаммами.

На основе таблицы SNPs был осуществлен поиск SNPs, характерных для двух описанных кластеров. В результате были найдены три SNPs, специфичные для кластеров штаммов, выделенных во Вьетнаме (таблица 2) [12].

Таблица 2 – SNPs, специфичные для кластеров штаммов, выделенных во Вьетнаме

Локус	№ позиции замены нуклеотида по геному CO92	Замена нуклеотида
YPO1896	2133712	G на A
YPO0258	260529	G на A
YPO1051	1192040	G на A

Первый SNP (замена G на A в позиции 196 от начала гена в YPO1896 или в позиции 2133712 от начала генома согласно номенклатуре штамма

CO92) характерен для штаммов, образующих кластер 1.ORI2v. Два других SNPs (замена G на A в позиции 282 от начала гена в YPO0258 (или в позиции 260529 от начала генома) и замена G на A в позиции 61 от начала гена в YPO1051 (или в позиции 1192040 от начала генома), специфичны для двух штаммов KM 761 и India-195, образующих кластер 1.ORI. На найденные локусы с маркерными SNPs с помощью программы Vector NTI 10 были рассчитаны праймеры, фланкирующие переменный нуклеотид (таблица 3).

Таблица 3 - Последовательности сконструированных праймеров для определения филогенетической принадлежности штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
YPO0258(761Ind)-S	GGATTAATGGTGCACAGC
YPO0258(761Ind)-AS	GCCATACCAATAAAGGGA
YPO1051(761Ind)-S	TACTCTGGAGCCTGGCTGCGTT
YPO1051(761Ind)-AS	ACACGGACACCACAGCGC
YPO1896(Viet)-S	CCATCGGGTTGTGGCAAA
YPO1896(Viet)-AS	AACACCATCGCCACACCA

С помощью рассчитанных праймеров был проведен филогенетический анализ расширенной выборки штаммов *Y. pestis* из Вьетнама. Было проведено фрагментное секвенирование других штаммов из Вьетнама, представленных в таблице 1. Методом ПЦР у этих штаммов были получены ампликоны, содержащие маркерные SNPs, которые были секвенированы. В полученных нуклеотидных последовательностях штаммов определяли наличие маркерной замены нуклеотида, по наличию которой устанавливали филогенетическую принадлежность исследованных штаммов.

В результате было установлено, что почти все штаммы содержат маркерный SNP, специфичный для популяции 1.ORI2v (замена G на A в позиции 196 от начала гена в гене YPO1896). Исключение составил штамм *Y. pestis* KM762, который содержал два маркерных SNPs, характерных для

ветви 1.ORI1, как и штамм KM761, что не удивительно, поскольку оба штамма выделены в провинция Донг Най в 1981 г.

Таким образом, значительное большинство, 44 из 46 исследованных штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме в 1955-1990 гг., принадлежали к одной популяции восточного биовара - 1.ORI2v. Это означает, что в этот временной промежуток в разных провинциях Вьетнама были распространены штаммы одной филогенетической ветви 1.ORI2v. Штаммы *Y. pestis* KM761 и KM762, вошедшие в ветвь 1.ORI1 вместе со штаммом *Y. pestis* India 95, могут представлять однократный завоз чумы из другого региона.

В результате проведенных в этой работе исследований определена популяционная структура и филогенетическая принадлежность 46 штаммов *Y. pestis*, циркулировавших во Вьетнаме в 1964-1990 гг. в период третьей пандемии чумы. Проведен анализ данных полногеномного секвенирования восьми штаммов и SNP анализ всех 46 штаммов. Установлено преобладание на всей территории Вьетнама штаммов *Y. pestis* восточного биовара филогенетической ветви 1.ORIv. Разработан способ SNP типирования вьетнамских штаммов на основе выявленных маркерных SNPs методом ПЦР.

Выводы

1. Выявление маркерной делеции в 93 п.н. в гене *glpD* у всех изученных штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Вьетнама, подтвердило их принадлежность к восточному биовару.

2. С помощью полногеномного секвенирования установлено, что большинство штаммов *Y. pestis* из природных очагов Вьетнама относится к отдельной филогенетической ветви восточного биовара, обозначенной 1.ORI2v. Штаммы 1.ORI2v филогенетически близки к штаммам *Y. pestis* из провинции Юньнань в Китае и имеют общее с ними происхождение.

3. Штамм *Y. pestis* KM761 из Вьетнама по данным полногеномного секвенирования отнесен к ветви восточного биовара 1.ORI1 вместе со штаммом India 195 из базы данных NCBI GenBank.

4. Найдены три маркерных SNPs и разработан способ дифференциации штаммов 1.ORI2v и 1.ORI1 из очагов Вьетнама с помощью ПЦР и фрагментного секвенирования. Установлено, что 44 из 46 исследованных штаммов относятся к ветви 1.ORI2v и два – к ветви 1.ORI1, что доказывает преимущественное распространение штаммов *Y. pestis* ветви 1.ORI2v во Вьетнаме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)». М.: Минюст, 2014. 47 с.
2. Лабинская, А. С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследований / А. С. Лабинская. М.: Медгиз, 1963. 463 с.
3. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. М.: Мир, 1984. 479 с.
4. Компания Applied Biosystems [Электронный ресурс]. URL: <http://home.appliedbiosystems.com> (дата обращения 10. 04.2018).
5. Корпорация Thermo Fisher Scientific [Электронный ресурс] URL: <https://www.thermofisher.com/> (дата обращения 10. 04.2018).
6. Molekular Evolutionary Genetics Analysis [Электронный ресурс]. URL: <https://www.megasoftware.net> (дата обращения 10. 04.2018).
7. Консорциум викторианской биоинформатики [Электронный ресурс]. URL: <http://www.vicbioinformatics.com/software.wombac.shtml> (дата обращения 10. 04.2018).
8. Компания Applied Maths NV [Электронный ресурс]. URL: www.applied-maths.com/ (дата обращения 10. 04.2018).
9. Султанов, Г. В. Чума. Микробиология, патогенез, диагностика / Г. В. Султанов. Махачкала: Изд-во Акад. сельск. наук, 1995. 223 с.
10. Motin, V. L. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD) / V. L. Motin [et al.] // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184(4). P. 1019 - 1027.
11. Mount, D. W. Bioinformatics. Sequence and genome analysis / D. W. Mount. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 2003. 550 p.
12. Huang, X. Z. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States / X. Z. Huang, M. C. Chu, D. M. Engelthaler // J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. P. 1164 - 1173.

