

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

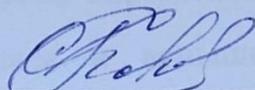
Кафедра биохимии и биофизики
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО
ПОДВИДА СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА МЕТОДОМ ПЦР С
ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЁТОМ
РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И SNP–
ТИПИРОВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студентки 5-го курса 531 группы
Специальности 06.05.01 – Биоинженерия и биоинформатика
Биологического факультета
Балыковой Алины Николаевны

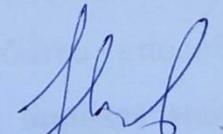
Научный руководитель:
Зав. кафедрой
биохимии и биофизики
д.б.н. профессор



подпись, дата
25.05.2018

С. А. Коннова

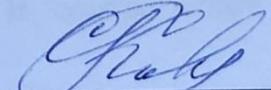
Научный консультант:
научный сотрудник
ФКУЗ РосНИПЧИ
«Микроб», к.б.н.



подпись, дата
19.05.2018

Н. Ю. Носов

Зав. кафедрой
биохимии и биофизики,
д.б.н, профессор



подпись, дата
25.05.2018

С. А. Коннова

Саратов, 2018

Введение. Чума – природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, возбудителем которой является грамотрицательная бактерия *Yersinia pestis*. Чума до сих пор представляет серьёзную проблему для общества, проявляя себя в виде вспышек и отдельных случаев заболевания.

Штаммы возбудителя чумы делятся на основной и неосновные подвиды. Высоковирулентными и эпидемически значимыми являются штаммы основного подвида. Среди представителей основного подвида наиболее эволюционно молодой является ветвь средневекового биовара. Многие исследователи предполагают, что штаммы именно этого биовара послужили причиной крупных вспышек чумы в Поволжье в конце 18 – начале 20 веков. Представители средневекового биовара широко распространены на территории Евразии и не встречаются на других континентах. Они циркулируют в 32 из 45 природных очагов стран СНГ, в том числе в 7 из 11 очагов Российской Федерации. Штаммы этого биовара также встречаются на территории Китая, Ирана, Индии и Монголии.

В связи с широким распространением штаммов *Y. pestis* средневекового биовара в очагах чумы в Евразии и их эпидемической значимостью актуальной является задача по разработке высокоэффективных средств их молекулярной диагностики и идентификации для установления источника и региона происхождения, определения путей заноса, проведения молекулярной экспертизы случаев и вспышек чумы, а также – для своевременного принятия мер по устранению эпидемических осложнений и санитарной охране территорий России.

Цель работы – разработка способов дифференциации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и методом SNP-типирования. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) провести анализ современной популяционной структуры средневекового биовара возбудителя чумы по данным полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis*;
- 2) разработать способ дифференциации штаммов филогенетической линии 2.MED4 методом SNP-типирования. Идентифицировать маркерные SNPs, оценить их эффективность;
- 3) разработать способ дифференциации штаммов различных филогенетических линий средневекового биовара: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР-РВ. Выбрать ДНК-мишени, рассчитать праймеры и оптимизировать условия проведения реакции.

Теоретической базой данной работы выступают научные труды отечественных и зарубежных учёных, освещающие основные тенденции филогенетических исследований в отношении вида *Y. pestis*. В работе использовались следующие методологические подходы: ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени, фрагментное секвенирование на платформе «ABI PRISM 3500XL» (Applied Biosystems, США), полногеномное секвенирование на платформе «Ion PGM» (Life technologies, США). Также применялись биоинформационные программы для построения дендрограммы (Wombac 2.0, RAUP 4.0, MEGA 7.0, FigTree 1.4.3.) и поиска SNP и Indel-мишеней (Mauve 2.4.0, MEGA 7.0.).

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает введение, три раздела: обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников.

Основное содержание работы. Исследование проводилось на базе лаборатории молекулярной микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». В работе было использовано 119 штаммов *Y. pestis*, 63 штамма были предоставлены Государственной коллекцией патогенных бактерий при

РосНИПЧИ «Микроб», полногеномные последовательности 56 штаммов были взяты в базе данных NCBI.

Для проведения филогенетического анализа и установления популяционной структуры средневекового биовара *Y. pestis* выполняли полногеномный SNP-анализ 103 штаммов из природных очагов РФ и сопредельных государств. Филогенетический анализ проводили с помощью метода *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ85 при помощи программы PhyML 3.1. В результате анализа было выявлено 1945 единичных нуклеотидных замен в коровом геноме использованных штаммов.

Как следует из дендрограммы (Рисунок 1) штаммы средневекового биовара (2.MED) кластеризуются в четыре основные филогенетические линии: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3.

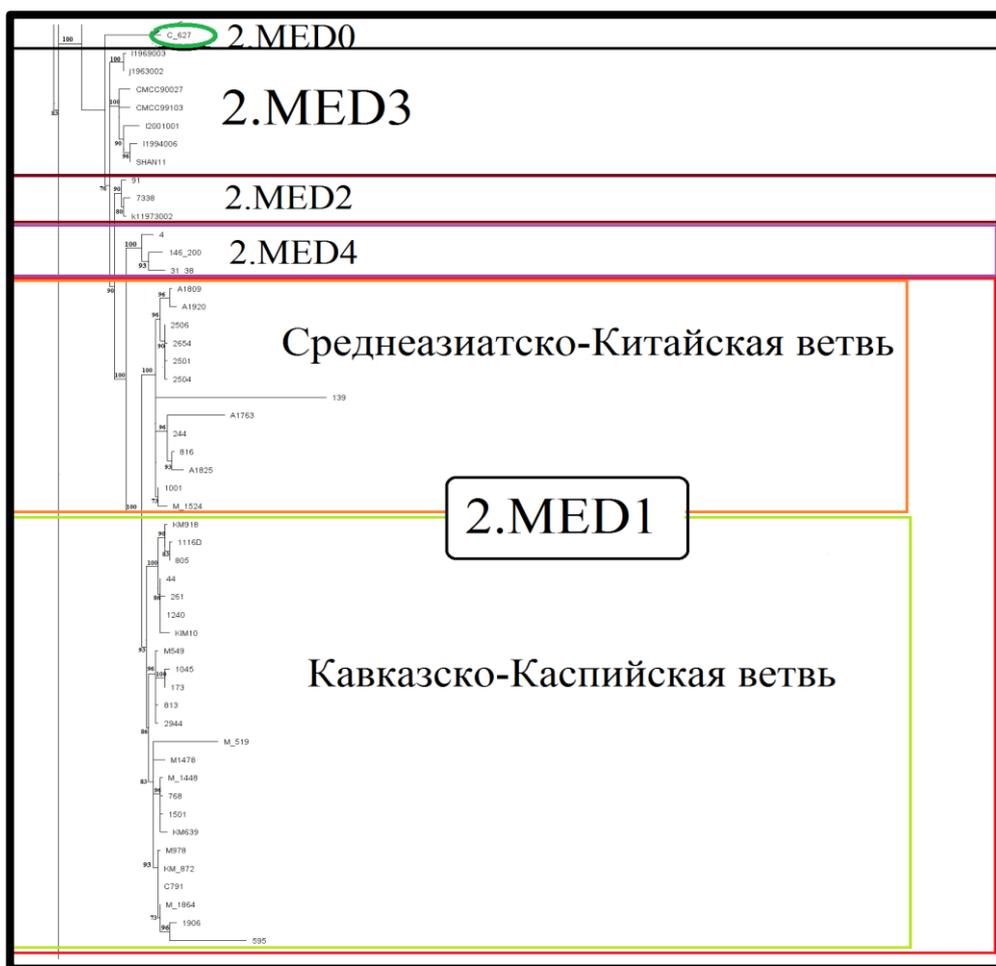


Рисунок 1– Филогенетический анализ и популяционная структура средневекового биовара (2.MED) по данным полногеномного SNP анализа 103 штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ, стран ближнего и дальнего зарубежья (1945 SNPs, метод *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ при помощи программы PhyML 3.1).

В основании эволюционного ствола 2.MED расположен штамм С-627, относящийся к ветви 2.MED0. Штаммы данной линии отличаются от других средневековых штаммов: для своего роста нуждаются в аминокислоте пролине, обладают уникальной плазмидой рСКФ и циркулируют только в Центрально-Кавказском высокогорном очаге в России. Далее от общего ствола эволюции последовательно ответвляются линии 2.MED3 и 2.MED2, штаммы которых циркулируют в некоторых провинциях Китая, граничащих со странами СНГ. Самой разнообразной филогенетической линией средневекового биовара является 2.MED1. Штаммы данной линии широко распространены на территории России, других стран СНГ, а также – в Туркмении, Грузии и других сопредельных государствах. Линия 2.MED1, как следует из дендрограммы (Рисунок 1), в свою очередь делится на два крупные ветви: Среднеазиатско-Китайскую и Кавказско-Каспийскую в соответствии с филогеографическим принципом, что совпадает с ранее полученными другими исследователями результатами.

При анализе филогенетического дерева нами впервые была выявлена еще одна отдельная эволюционная линия, ранее не представленная в филогении средневекового биовара. Мы обозначили ее как 2.MED4. Эту ветвь составили три штамма (4, 146_200, 31_38), выделенные в разное время в очагах Кавказа и Прикаспия: Зангезуро-Карабахском горном и Волго-Уральском песчаном.

Для выявления штаммов средневекового биовара, которые относятся к новой филогенетической линии 2.MED4, нами был проведен поиск уникальных для этой линии генетических маркеров – indel-мутаций и SNPs при помощи программ Mauve 2.4.0 и Mega 7.0. На первом этапе проводили сравнительный анализ полногеномных последовательностей в программе Mauve 2.4.0. По результатам данного анализа у представителей линии 2.MED4 indel-мутаций обнаружено не было. Следующим этапом был поиск специфических SNPs в программе Mega 7.0. при помощи функции

Phylogenetic analysis. Нами были выбраны 3 SNPs, расположенные в белок-кодирующих областях (Таблица 1).

Таблица 1 – Выбранные маркерные SNP мишени на штаммы *Y. pestis* линии 2.MED4

| Позиция маркерного SNP по геному референтного штамма <i>Y. pestis</i> CO92 | Замена нуклеотида | Локус, кодируемый продукт |
|--|-------------------|---|
| 117694 | A → G | <i>priA</i> - праймосома-связывающий белок |
| 522489 | C → A | <i>apaH</i> – диаденозин тетрафосфат |
| 3869329 | G → A | <i>phnL</i> – фосфонаты, транспортирующие АТФ-связывающий белок |

На данные мишени были рассчитаны праймеры с помощью программы Vector NTI 10 (Таблица 2). Праймеры были синтезированы в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Таблица 2 – Олигонуклеотидные праймеры на SNPs, маркерные для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара линии 2.MED4

| Праймеры | Последовательности праймеров 5' → 3' |
|---------------------------------|---|
| <i>apaH-S</i> <i>apaH-As</i> | GGGACCACGGGCAACTAAA TGGCTGCCTCGATGAAT |
| <i>phnL-S</i> <i>phnL-As</i> | ACGCTGCTACGCTCCCTCTA TGA CTGACCCAACCGACA |
| <i>priA-S</i> <i>priA-As</i> | TCAGCCGTTGCAGCAGTT GGCGTTATGGATTATGGG |

С их использованием с помощью метода ПЦР-РВ получали ампликоны, содержащие переменные нуклеотиды. Фрагментное секвенирование амплифицированных ПЦР фрагментов проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500XL». Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программ Mega 7.0 и алгоритма BLAST и по наличию маркерных нуклеотидов устанавливали принадлежность штаммов к ветви 2.MED4.

С помощью рассчитанных праймеров (Таблица 2) на принадлежность к ветви 2.MED4 было проверено 7 штаммов *Y. pestis*, близких по региону и времени выделения к штаммам этой ветви (102 (147), 118 (192), 27 (33), 47 (87), 525, 65 (98), M-1722). В результате удалось выявить еще два штамма (102(147) и 27(33)), относящиеся к Волго-Уральскому степному и Прикаспийскому Северо-Западному степному очагам соответственно, которые содержали все три SNPs, специфичных для 2.MED4.

Поскольку методы секвенирования требуют наличия дорогостоящего оборудования актуальным является поиск быстрых и эффективных методов идентификации и дифференциации штаммов *Y. pestis* с помощью более доступных методов молекулярно-генетического анализа. Нами был выбран метод ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов, который позволяет совместить амплификацию, детекцию и измерение количества целевой ДНК в образце на каждом этапе цикла амплификации. Детекция осуществляется благодаря использованию интеркалирующих флуоресцентных красителей, которые при гибридизации с комплементарными участками ДНК излучают сигнал.

Для разработки метода идентификации и дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара методом ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов были выбраны следующие ранее найденные ДНК мишени: Med24, 2.Med0, 2.Med1 и 2.Med3, ранее используемые в основном для разделения штаммов методом ПЦР с электрофоретическим учётом результатов. В рамках этого исследования выбранные ДНК мишени использовались для проведения ПЦР-РВ. На них были рассчитаны праймеры и зонды формата TaqMan (Таблица 3) и подобраны оптимальные условия проведения реакции.

Способ дифференциации штаммов средневекового биовара по принадлежности к филогенетическим линиям осуществлялся в две реакции ПЦР-РВ: реакцию с мишенью Med24 проводили в отдельной пробирке; с мишенями 2.Med1, 2.Med3 и рСКФ проводили мультиплексную ПЦР-РВ в

одной пробирке. Условия реакции для проведения ПЦР-РВ были следующими: 1 цикл 95°C 15 мин; 5 циклов 95°C 20 с, 60°C 20 с, 72°C 20 с; 30 циклов: 95°C 15 с, 58°C 45 с, 72°C 20 с.

Таблицы 3 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды для дифференциации штаммов *Y.pestis* средневекового биовара филогенетических линий 2.MED0, 2.MED1 и 2.MED3 методом ПЦР-РВ

| Праймер | Последовательность праймера, зонда 5'→3' |
|-----------------------|--|
| 2.Med1-S | AGCGGCACTCTCTACGAAAT |
| 2.Med1-As | TGACTCCATTGAAGACGCTATTG |
| 2.Med3-S | CCGTTGTACGATGGTGCTTT |
| 2.Med3-As | CCGTGAGGTCTGTGGTGTAT |
| Med(24)-(RealTime)-S | GCCAGTGTGTGTCTAAAG |
| Med(24)-(RealTime)-As | CGCAACATTCGTCGCAAA |
| pCKF(RealTime)-S | AACCGCCTAAGCACTTTAT |
| pCKF(RealTime)-As | CGTCAGGAACTCAACGAA |
| TaqMan зонд | Последовательность зонда 5'→3' |
| 2.Med1-Zond | FAM-TCACCCATCGGTAAAGCAGCAGCATACGA-RTQ1 |
| 2.Med3-Zond | Cy5-TGAGCCAGTGCGCCACCACT-BHQ2 |
| Med(24)-Zond | R6G -ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC- RTQ1 |
| pCKF(RealTime)-Zond | ROX -ATCAGAGAGCATTTGAGCGGTTG- BHQ2 |

Принадлежность исследуемого штамма к средневековому биовару устанавливали по отсутствию сигнала флуоресценции по жёлтому каналу R6G, по которому детектировали мишень Med24. По наличию сигнала флуоресценции по оранжевому каналу ROX, по которому происходило определение мишени pCKF, устанавливали принадлежность штаммов к линии 2.MED0. Отсутствие сигнала флуоресценции по зелёному каналу FAM по мишени 2.Med1 означало, что штамм принадлежит к линии 2.MED1. Отрицательный сигнал флуоресценции по красному каналу Cy5 по мишени 2.Med3 характерен для штаммов линии 2.MED3. Штаммы линии 2.MED2 дали сигнал флуоресценции по мишени 2.Med1 и по 2.Med3. По совокупности результатов по всем четырём ДНК-мишеням определяли

принадлежность штаммов *Y. pestis* к средневековому биовару и его филогенетическим линиям (Таблица 4).

Таблица 4 – Определение принадлежности исследуемого штамма *Y. pestis* к средневековому биовару и филогенетическим линиям по сводной таблице

| ДНК мишень / Филогенетические линии | Med24 | 2.Med1 | 2.Med3 | pCKF |
|-------------------------------------|-------|--------|--------|------|
| 2.MED0 | + | + | + | + |
| 2.MED1 | - | - | + | - |
| 2.MED2 | - | + | + | - |
| 2.MED3 | - | + | - | - |

Разработанный способ идентификации и дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара методом ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов показал 100% специфичность в ходе исследования 91 штамма средневекового биовара. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP-типирования обеспечивает дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогеографической принадлежности.

Заключение. Нами проведён анализ современной популяционной структуры штаммов средневекового биовара *Y. pestis* методом полногеномного SNP-анализа и обнаружена новая филогенетическая линия 2.MED4. На данную линию найдены уникальные SNPs, с помощью которых можно проводить определение принадлежности штаммов средневекового биовара к линии 2.MED4. Также разработан способ идентификации и дифференциации штаммов различных филогенетических линий средневекового биовара 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP-типирования обеспечивает дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогеографической принадлежности. Полученные результаты и

разработанный способ идентификации и дифференциации штаммов средневекового биовара *Y. pestis* могут быть полезны для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга очагов России и других стран СНГ и сопредельных государств, а также – для отнесения новых выделяемых изолятов *Y. pestis* к конкретной филогенетической линии средневекового биовара.

Выводы.

1. Проведён анализ современной популяционной структуры штаммов средневекового биовара *Y. pestis* методом полногеномного SNP-анализа с обнаружением новой филогенетической линии 2.MED4.

2. Выявлены маркерные SNP's, позволяющие определять принадлежность штаммов средневекового биовара к линии 2.MED4.

3. Разработан способ идентификации и дифференциации штаммов различных филогенетических линий средневекового биовара 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP-типирования обеспечивает дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогеографической принадлежности.

По результатам исследования в печати находятся работы:

1. Балыкова, А. Н. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и SNP типирования / А. Н. Балыкова // Сборник материалов итоговой конференции СГУ, 2018.
2. Балыкова, А. Н., Носов, Н. Ю., Никифоров, К. А., Ерошенко, Г. А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного подвида

средневекового биовара методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и SNP типирования // А. Н. Балыкова, Н. Ю. Носов, К. А. Никифоров, Г. А. Ерошенко. «Известия Саратовского университета: Химия, Биология, Экология». 2018

Исследования по теме представлялись на конференциях:

1. X Региональная научная конференция «Исследования молодых ученых в биологии и экологии», 16 – 20 апреля, 2018 г. Доклад: Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР в режиме реального времени и SNP типирования.
2. Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 7 – 8 мая, 2018 г.
3. Заключительное заседание студенческой научной конференции Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского (Саратов, СГУ имени Н.Г. Чернышевского, 17 мая 2018 г.)

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials 'АБС' followed by a stylized flourish.