

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Станковцевой Елизаветы Валерьевны

Научный руководитель
зав. кафедрой:
профессор, доктор биол. наук


30.05.2023

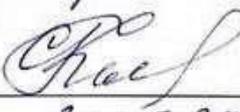
С.А. Коннова

Научный консультант:
вед. науч. сотр.,
канд. биол. наук.



Е. Г. Оглодин

Зав. кафедрой:
профессор, доктор биол. наук


30.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023

Введение. Возбудителем одной из самых опасных инфекционных болезней – чумы – является бактерия семейства *Yersiniaceae* рода *Yersinia*. Носителями чумы в природе являются около 363 видов животных, а переносчиками чумной палочки является более 280 видов и подвигов блох. Паразитизм эктопаразитов в популяциях грызунов и зайцеобразных способствует распространению инфекции в природных очагах, а также является одной из причин заражения человека при контакте с животными.

На период 2013-2022 года общее число случаев заражения во всем мире составило около 6000, из которых летальных случаев 699.

Природные очаги чумы расположены на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктиды. Только на территории России имеется одиннадцать действующих очагов.

Тувинский горный природный очаг, на территории которого распространены штаммы изучаемой филогенетической линии 4.ANT, характеризуется своей высокой эпизоотической активностью и эпидемическим потенциалом. Наблюдаемая динамика развития распространения возбудителя чумы на территории республики Тыва показывает, что с годами очаг не теряет активности. Ранее предполагалось, что Алтайский природный горный очаг чумы, на котором так же распространены штаммы линии 4.ANT, не характеризуется высоким эпидемическим потенциалом, однако обнаружение на его территории штаммов основного подвида *Y. pestis ssp. pestis* филогенетической линии 4.ANT в 2012 и последующих годах стало свидетельством его эпидемической активизации.

Благоприятные климатические и географические условия и наличие носителей являются причиной микроэволюции и генетической изменчивости штаммов *Y. pestis*. Наличие широких экономических связей и обширных транспортных узлов способствует заносу одних штаммов на различные территории, а также расширению границ действующих очагов. Таким

образом, актуальность темы исследования возбудителя чумы сохраняется и в наше время.

В настоящее время ведется пристальный контроль за эпидемической обстановкой действующих очагов. Осуществляются работы по мониторингу эпидемиологического и эпизоотического состояния различных очагов, включающие в себя плановую обработку территории, предотвращающую распространение переносчиков инфекции. Также важной задачей является быстрое и точное определение принадлежности того или иного штамма к определенной филогенетической линии, с целью выявления путей заноса, образования новых штаммов, и установления границ очагов чумы.

Цель настоящей работы состояла в разработке способа детекции штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* филогенетических линий 3.ANT и 4.ANT из различных мест выделения для выявления специфического хромосомного участка генома и проведения их дифференциации.

2. Выявление маркерных INDEL мутаций штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT и оптимизация условий проведения ПЦР с электрофоретическим способом детекции результатов для их дифференциации.

3. Поиск SNP мутаций для проведения филогенетического анализа штаммов линии 4.ANT.

4. Разработка алгоритма проведения дифференциации штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT на основе выявления специфических SNP и INDEL мутаций.

В качестве объекта исследования использовались полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенные на территории Тувинского горного природного и Горно-Алтайского высокогорного природного очагов чумы. Так же, для

филогенетического анализа *Y. pestis* использовались полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов других филогенетических линий.

Для поиска специфического хромосомного участка геномной последовательности штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT было произведено выравнивание полногеномных нуклеотидных последовательностей 9 штаммов линии 3.ANT на штамм M2085 из Тувинского природного горного очага (NCBI GenBank: CP064125.2), относящийся к филогенетической линии 4.ANT. Выравнивание производилось при помощи алгоритма Progressive Mauve в программе Mauve.

Найденные мутации сравнивались в программе Excel посредством ступенчатого вычленения мутаций, которые не являются общими по длине для всех штаммов филогенетической линии 3.ANT. Так, число общих по длине INDEL мутаций составило 69.

Поиск нуклеотидных последовательностей мутаций проводился при помощи программы UGENE 45.0 в последовательности штамма *Y. pestis* 7 (линия 3.ANT) с учетом координаты внутри контига, полученной при сравнении штаммов линии 3.ANT. После поиска последовательностей мутаций была проведена их проверка на специфичность в базе данных NCBI GenBank при помощи алгоритма BLAST.

Проверка специфичности найденных мутаций заключалась в том, чтобы при наличии уникальных последовательностей у штаммов линии 4.ANT эти мутации выступали бы в качестве делеций у штаммов 3.ANT. Таким же образом выбирались участки хромосомной нуклеотидной последовательности для штаммов линии 3.ANT по сравнению со штаммами линии 4.ANT. Также искали участки INDEL мутаций различной длины (в таком случае в ЭФ детектировались бы ампликоны разной молекулярной массы). Однако у штаммов других филогенетических линий мутация должна отсутствовать. Это будет устойчивой специфической хромосомной мишенью для детекции штаммов филогенетической линии 4.ANT.

Нами в качестве мишени был выбран участок генома, представленный делецией 49 п.н. для штаммов линии 4.ANT. По геному *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank NC_003143.1) участок расположен в гене *cysM* с координатами 3365079-3365127. Продукт гена – цистеинсинтаза *CysM*. Нуклеотидная последовательность участка:

CGAAAGAAGAGGGGATATTCTGTGGCGTCAGTTCTGGTGGTGCG
GTGGC.

ДНК-мишени было присвоено название «*CysM49*».

Для филогенетического анализа штаммов *Y. pestis* использовались нуклеотидные последовательности 85 штаммов. В выборку входили штаммы изучаемой линии 4.ANT, а также представители других филогенетических линий, выделенные их разных мест. Полногеномный поиск коровых SNP проводили с помощью программы Wombac версии 2.0 для получения файлов выравнивания и таблиц с координатами выявленных мутаций относительно референтного штамма CO92 (NCBI GenBank NC_003143.1).

Для визуализации филогенетического анализа было выполнено построение дендрограммы при помощи программы SeaView 5.0.5, которое проводилось с использованием полученной матрицы замен.

Анализируя дендрограмму, можно заметить образование трех кластеров внутри линии 4.ANT, которые характеризуются четкой принадлежностью штаммов к различным местам и времени выделения.

Для определения генетических особенностей представителей каждого кластера был проведен поиск SNP, определяющих образование филогенетических узлов. Поиск SNP проводился при помощи программы MEGA 11. Было произведено выравнивание нуклеотидных последовательностей всех штаммов линии 4.ANT, взятых в работу, на последовательность референтного штамма *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank NC_003143.1). После этого рассматривались выявленные коровые SNP штаммов каждого кластера линии 4.ANT, а затем все локусы, отличающие штаммы линии 4.ANT от других филогенетических линий.

Все найденные SNP проверялись на специфичность для выявленных групп штаммов, используя базу данных NCBI GenBank при помощи алгоритма BLAST.

Для расчета праймеров на хромосомную мишень и SNP для детекции штаммов линии 4.ANT использовался онлайн модуль GenScript. Олигонуклетидные праймеры были синтезированы в лаборатории генодиагностических препаратов РосНИПЧИ «Микроб».

Выделение ДНК *Y. pestis* для постановки ПЦР проводилось сотрудниками лаборатории молекулярной микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Проведение ПЦР с электрофоретическим учетом результатов на хромосомную мишень «*CysM49*» в сочетании с детекции специфической для штаммов линии 4.ANT плазмиды pTP33 включало в себя приготовление общей смеси, включающей реактивы на одну пробу с итоговым объемом 25 мкл:

1. Деионизированная вода – 1 мкл
2. 2X Encyclo GC буфер – 12,5 мкл
3. Смесь четырех дНТФ по 10 мМ каждого – 0,5 мкл
5. Прямой и обратный праймер по 10 пМ каждого
6. 50X смесь полимераз Encyclo 5 ед/мкл – 0,5 мкл
7. ДНК – 10 мкл (0,5-2 нг/мкл)

Готовые пробы устанавливали в амплификатор с заданной программой амплификации:

1. Начальная денатурация 95°C – 900 сек
2. Циклирование: 35 циклов
Денатурация – 95°C 20 сек
Отжиг праймеров – 56-58°C 40 сек
Элонгация – 72°C 20 сек
3. Завершающий цикл элонгации – 72°C. 60 сек

4. Режим сохранения – 12°C ∞.

Электрофорез проводили под напряжением в 90В в течение 45 минут в 2,5% агарозном геле длиной 7 см.

Обнаруженные SNP мутации детектировались с помощью ПЦР РВ. В работе использовалась 2.5x реакционная смесь для проведения ПЦР РВ в присутствии EVA Green «Синтол».

Для ПЦР РВ была приготовлена общая смесь, включающая реактивы на одну пробу объемом 25 мкл:

1. Деионизированная вода – 10 мкл
2. Реакционная смесь для ПЦР, включающая флуоресцентный краситель, смесь четырех дНТФ, Taq-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами – 10 мкл
3. 25 мМ/мкл. $MgCl_2$ – 1 мкл
4. Прямой и обратный праймер по 10 пМ
5. ДНК – 5 мкл (0,5-2 нг/мкл)

Готовые пробы устанавливали в амплификатор с заданной программой амплификации:

1. Начальная денатурация 95°C – 70 сек
2. Циклирование: 45 циклов
Денатурация – 95°C 15 сек
Отжиг праймеров – 59°C 30 сек
Элонгация – 72°C 20 сек
3. Плавление от 72° до 95°C, с шагом 1°C за цикл.

Бакалаврская работа включает содержание, список обозначений и сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 54 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 61 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 8 рисунками и 9 таблицами.

Научная новизна и значимость работы: изученные в работе штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT выделены на территории Тувинского горного природного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы Российской Федерации. Мониторинг данных территорий, проведение генетического анализа циркулирующих на них штаммов возбудителя особо опасной инфекции – чумы, и разработка способов их детекции является необходимой мерой, позволяющей сохранять благополучную эпидемическую обстановку в этом эпизоотически и эпидемически активном по чуме регионе.

На основе найденной INDEL мутаций и специфических SNP мутаций, в сочетании с детекцией плазмиды pTP33, стало возможно провести ПЦР для определения штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенных на территории Монгул-Тайгинского кожууна Тувинского горного природного и Алтайского высокогорного очагов чумы и дифференциации их

от Саглинского мезоочага Тувинского горного очага (Т1). Кроме того, наличие специфических SNP мутаций и подобранных условий проведения

ПЦР позволяет проводить и MLST анализ вновь выделяемых штаммов возбудителя чумы, используя секвенирование ампликонов по Сэнгеру или же с помощью платформ нового поколения. В дальнейшем, вновь выделенные с территорий очагов штаммы удастся быстро и точно идентифицировать по принадлежности к подвиду, биовару, филогенетической линии.

Основное содержание работы. В работе было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей штаммов филогенетических линий *Y. pestis* 3.ANT и 4.ANT с целью выявления маркерных INDEL мутаций, которые позволяют детектировать штаммы из Тувинского горного природного и Алтайского высокогорного очагов чумы. Из всех выявленных INDEL мутаций нами был выбран участок, представленный делецией 49 п.н. для штаммов линии 4.ANT. По геному *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank NC_003143.1) участок расположен в гене *cysM* с координатами 3365079-3365127. Продукт гена – цистеинсинтаза *CysM*. При помощи рассчитанных и сконструированных праймеров установлено, что данная мишень «*Cys49*», в

сочетании с специфической плазмидой рТР33, применима для детекции современных штаммов изучаемой линии, выделенных в XXI веке на территории Тувинского горного природного очага и Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Также в работе был проведён филогенетический анализ 85 штаммов *Y. pestis*, показавший разделение штаммов филогенетической линии 4.ANT на три кластера (T1, T2, A1). При построении карты распространения штаммов *Y. pestis* основного подвида филогенетической линии 4.ANT на территории Тувинского горного природного очага чумы отмечено, что штаммы, вошедшие в кластер T1 и выделенные в 1971-1987 гг. распространены преимущественно на территории Саглинского мезоочага, в то время как штаммы, которые вошли в кластер T2, циркулируют на территории Монгул-Тайгинского кожууна и выделены в XXI веке. В данный кластер так же входят современные штаммы, выделенные на территории Монгул-Тайгинского кожууна в 2015-2020 гг. Штаммы кластера A1 распространены на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и выделены в XXI веке.

Так, штаммы кластера T2, совместно с штаммами кластера A1, стало возможно детектировать при помощи выявленной INDEL мутации в сочетании с детекции плазмиды рТР33.

Можно предположить, что кластерное разделение штаммов линии 4.ANT связано с микроэволюцией ранних штаммов, выделенных в период 1971-1987 гг. С хозяйственной деятельностью человека и миграциями носителей и переносчиков могло произойти занесение возбудителя в места, где ранее циркуляция не наблюдалась (Монгул-Тайгинский кожуун). Так могли появиться штаммы кластера T2, выделенные в период с 1977-2020 гг.

В процессе филогенетического анализа было обнаружено 9 SNP, которые обуславливают отделение всей ветви штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT, 11 SNP, которые отделяют кластер T1, 4 SNP, которые отделяют кластер T2 и 6 SNP, которые отделяют кластер A1.

На основе проведенного исследования был разработан алгоритм проведения дифференциации штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT с использованием детекции специфических SNP и INDEL мутаций в сочетании с детекцией плазмиды pTP33 методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

Заключение:

Выводы: 1. По результатам анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* филогенетических линий 4.ANT и 3.ANT выявлена INDEL мутация в 49 п.н. в гене *cysM*. Мутация специфична для современных штаммов линии 4.ANT из Тувинского горного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы в России.

2. Филогенетический анализ 85 полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*, включающий построение дендрограммы, построение карты распространения штаммов линии 4.ANT на территории Тувинского горного природного очага чумы и поиск коровых SNP, лежащих в узлах разделения штаммов линии 4.ANT, установил наличие трех отдельных кластеров. Кластер T1 включает штаммы линии 4.ANT, выделенные на территории Тувинского горного очага в 1971-1984 гг. на территории Саглинского мезоочага. Кластер T2 включает современные штаммы, выделенные на территории Тувинского горного очага в XXI веке и распространенные на территории Монгул-Тайгинского кожууна. В данный кластер так же вошли штаммы, выделенные на территории Монгул-Тайгинского кожууна в 2015-2020 гг. В кластер A1 вошли штаммы, выделенные на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в XXI веке.

3. Разработанный алгоритм на основе специфической делеции в 49 п.н. в гене *cysM* и наличия маркерной плазмиды pTP33 обеспечивает детекцию методами ПЦР-ЭФ и ПЦР-РВ штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT и дифференциацию отдельных кластеров штаммов внутри этой линии по пространственно-временному принципу.

