

# Генетика *Bacillus anthracis*

- Плазмиды
- Генетический обмен
- Хромосома
- Молекулярная идентификация
- Генетическое типирование

## Геном *B.anthraxis*

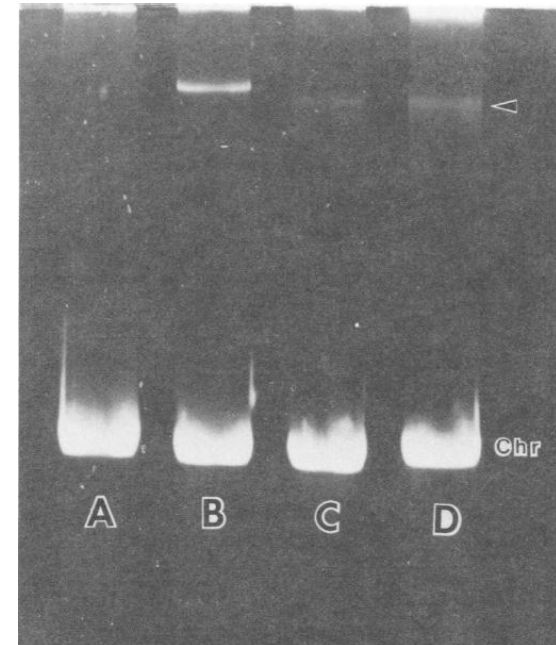
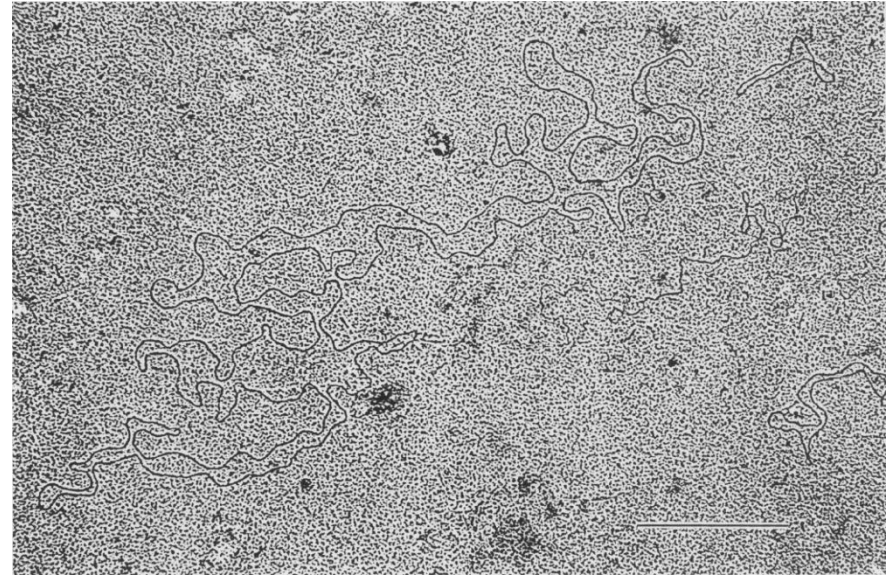
С тех пор, как два десятилетия тому назад было установлено, что продукция токсинов и капсулы сибиреязвенного микроба определяется генами плазмид рХО1 и рХО2, появилось много работ, посвященных геному сибиреязвенного микроба. Геном *B.anthraxis* состоит из хромосомы и внехромосомных элементов, или плазмид.

## Плазмиды

Впервые одна из плазмид возбудителя сибирской язвы была обнаружена в 1983 г. задолго до того, как стало известно что-либо о генетической организации хромосомы этого микроба. Оказалось достаточно сложным выделить интактную плазмидную ДНК, которая легко разрушалась при экстракции в силу очень больших размеров. Только щадящий метод лизиса прочной клеточной стенки дал возможность увидеть при электронной микроскопии неповрежденную кольцевую структуру плазмиды и определить ее контурную длину и молекулярную массу.

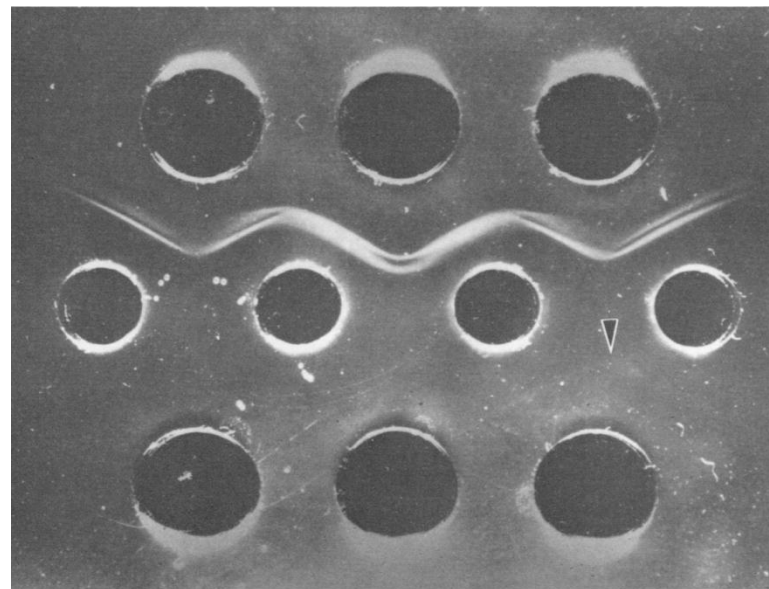
# Плазмиды

Следует отметить, что и в этих первых электронно-микроскопических препаратах уже можно было найти плазмидную ДНК меньших размеров, которая, как впоследствии оказалось, принадлежит второй плазмиде, и на которую поначалу не обратили должного внимания. Первая из плазмид получила название рВа1 (плазмида *B.anthraxis* 1), которое впоследствии было почему-то заменено на общепринятое теперь рХО1. Удалось также разработать метод плазмидного скрининга, дающий возможность обнаруживать плазмиды при геле-электрофорезе.



# Плазмиды

В той же работе Mikesell et al. был описан способ элиминации, или удаления плазмиды из клеток, который в точности повторял схему аттенуации, примененную L.Pasteur для получения первой вакцины против сибирской язвы. Элиминация происходила после 10-кратного пассирования микроба на питательной среде с культивированием при повышенной до 42,5 °C температуре. Одновременно был описан метод иммунодиффузионного определения продукции токсина, позволяющий отбирать колонии, не продуцирующие токсин.

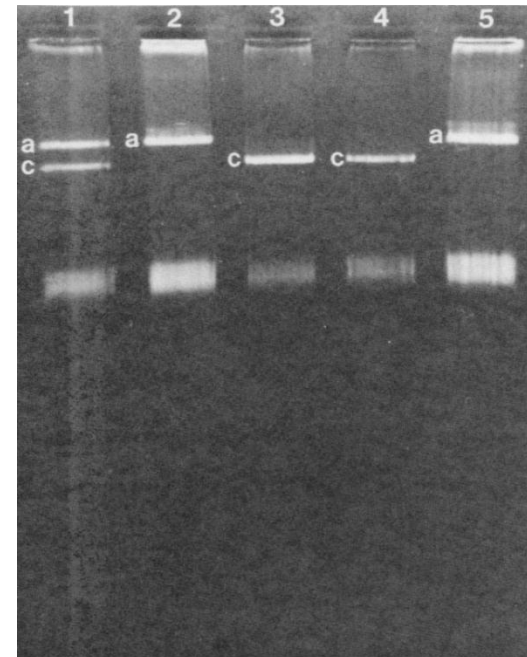
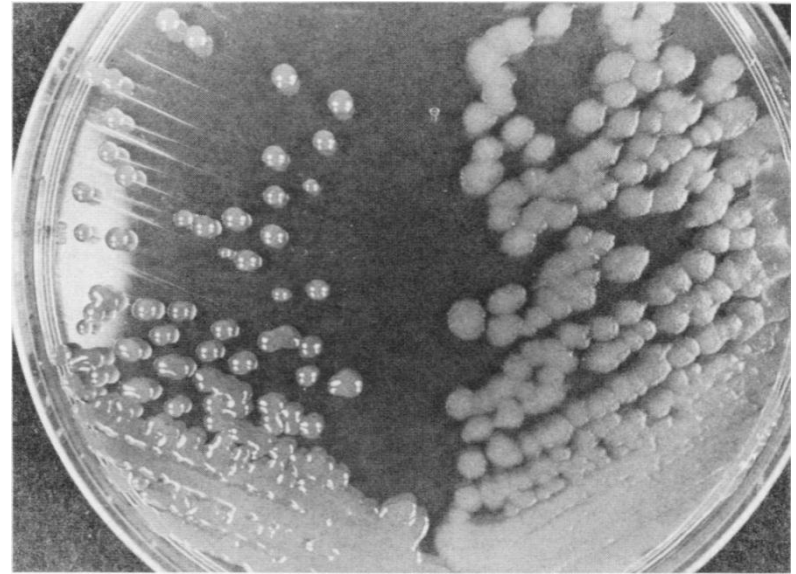


# Плазмиды

Сопоставив результаты электронной микроскопии, плазмидного скрининга, определения продукции токсина у вирулентного штамма, его производного, лишённого плазмиды, и штамма 2-й вакцины Pasteur, ученые пришли к выводу о том, что плазида рХО1 определяет синтез токсина сибиреязвенного микроба, что ее утрата делает штамм авирулентным, и что механизм аттенуации пастеровских вакцин мог объясняться также частичной утратой этой плазмиды.

# Плазмиды

В 1985 г. почти одновременно в печати появились работы V.Green et al. и Uchida I. et al., описывающие вторую плазмиду, рХО2, детерминирующую продукцию капсулы. Она имела меньшие размеры, чем рХО1, элиминировалась под воздействием антибиотика новобиоцина, а также спонтанно, при продолжительном культивировании на бикарбонатных средах в атмосфере CO<sub>2</sub>.



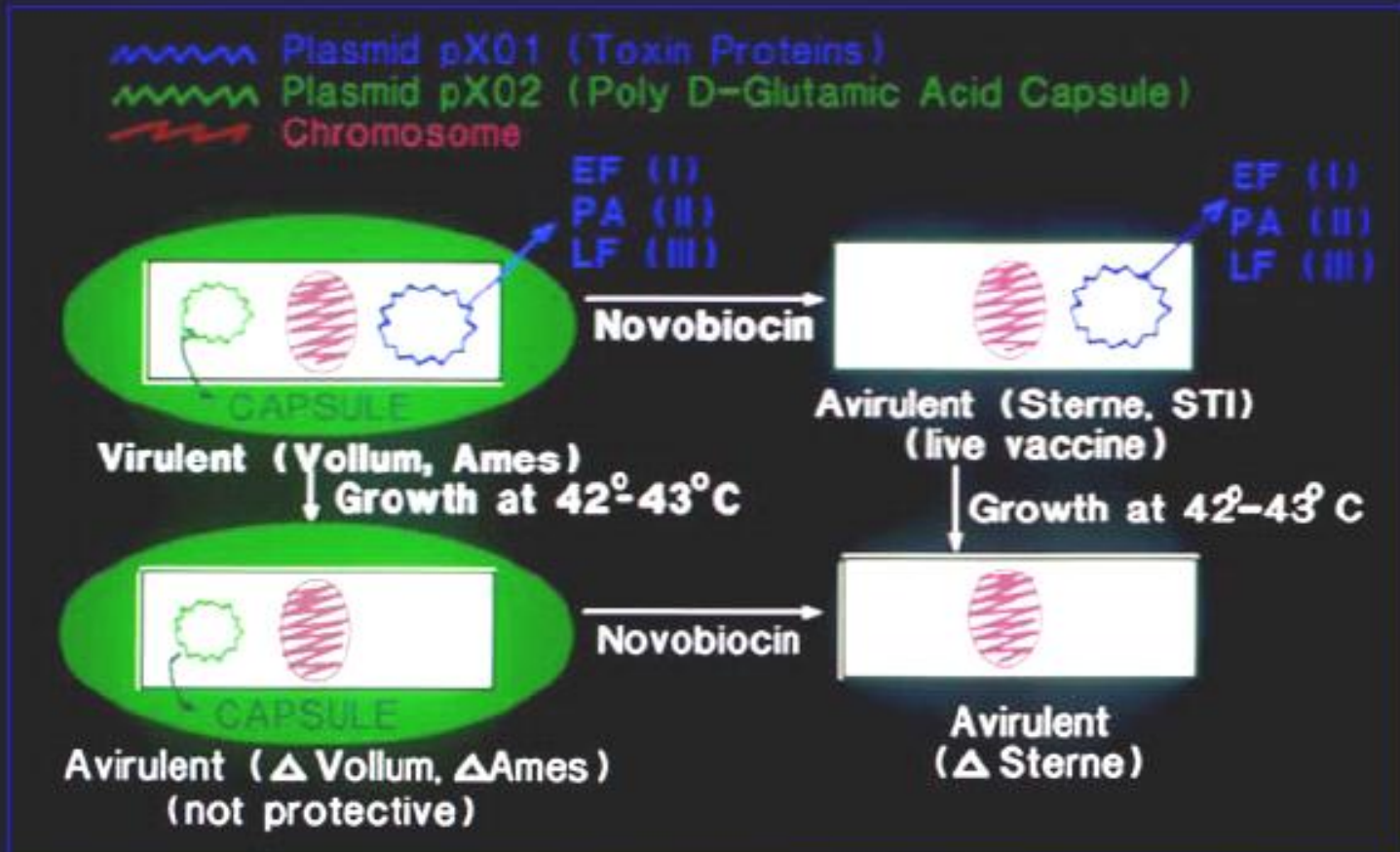
## Плазмиды

Выяснилось также, что ее утрата ведет к утрате способности продуцировать капсулу и резкому снижению вирулентности микроба. Все вакцинные бескапсульные штаммы типа вакцин Sterne, СТИ, 55, Ихтиман, 228/8 лишены плазмиды pXO2.

Таким образом, открытие плазмид сибиреязвенного микроба позволило понять генетические механизмы патогенности этого вида и объяснить образование давно известных вариантов и вакцинных штаммов.



## Variant Strains of *Bacillus anthracis*



# Плазмиды

По мере создания новых методов генетического и геномного анализа накапливалось все больше данных о структуре и функциях плазмид. Рестрикционный анализ плазмиды рХО1 уточнил ее размеры (около 184 kb), позволил локализовать три структурных гена, *rag*, *суа* и *lef* детерминирующих синтез ПА, ОФ и ЛФ, и выявил различия в рестрикционной карте области протяженностью 77 kb, кодирующей токсин у штамма Sterne, по сравнению с той же областью семи других вирулентных и вакцинных штаммов. Плаزمида рХО1 из этого штамма была уникальной в сравнении с плазмидами из других штаммов в том отношении, что гены токсина располагались на ней инвертировано, однако каких-либо фенотипических особенностей, связанных с этой инверсией, обнаружено не было.

## Плазмиды

На плазмиде рХО1 сначала не было выявлено иных, кроме структурных генов токсина, однако, в дополнение к утрате продукции токсина, производные штамма Weybridge A, излеченные от плазмиды, отличались от родительского штамма морфологией колоний, более ранней и массовой споруляцией, ослабленным ростом на минимальной среде и были более чувствительны к определенным бактериофагам *B.cereus*

## Плазмиды

Ген протективного антигена был клонирован впервые в *E.coli*, однако продукция ПА была на очень низком уровне и антиген не экскретировался во внешнюю. Затем ген был переклонирован в *B.subtilis*, получены два рекомбинантных клона, продуцирующие ПА на более высоком уровне, чем штамм *B.anthraxis*, из которого происходил этот ген. *B.subtilis* экскретировал ПА, причем синтез антигена не требовал добавления бикарбоната натрия в питательную среду, что необходимо для *B.anthraxis*.

# Плазмиды

Определена нуклеотидная последовательность гена ПА, открытая рамка считывания составляет 2292 bp, из которых 2205 кодируют 735 аминокислот, составляющих секретлируемый ПА (Welkos, S.L. et al., 1988).

Ген ОФ из штамма *B.anthraxis* Sterne клонировали в *E.coli* в двух лабораториях. Mock, M. et al.(1988) клонировали его в штамме, не синтезирующем аденилатциклазу, в который предварительно была трансформирована плаزمида, кодирующая синтез синтетической модели кальмодулина. ОФ<sup>+</sup> рекомбинанты отбирали на среде McConkey с мальтозой - клоны, синтезирующие цАМФ, ферментировали мальтозу и окрашивались в красный цвет. Область, кодирующая аденилатциклазу, имела протяженность 3-4 kb

# Плазмиды

Была определена нуклеотидная последовательность ОФ, клонированного в *E.coli*. Открытая рамка считывания составляла 2400 bp, из них 2301 кодировали зрелый белок ОФ, содержащий 767 аминокислот. Остальные 99 bp кодировали сигнальный пептид, содержащий 33 аминокислоты (Robertson D.L. et al., 1988). Ген ЛФ также был клонирован. Путем лигирования фрагментов с pUC8 и трансформирования *E.coli* создана рекомбинантная библиотека ДНК pXO1 из штамма Sterne. Колонии, несущие рекомбинантные плазмиды, были исследованы иммунологически на продукцию ЛФ. Транскрипция гена ЛФ происходила, очевидно, под контролем собственного промотора *B.anthraxis*. Белок ЛФ, продуцируемый *E.coli*, не секретировался, но обнаруживался в экстрактах ультразвуковых дезинтеграторов клеток. Он был биохимически активен - в присутствии ПА оказывал токсическое действие на мышинные макрофаги

# Плазмиды

- Была определена и нуклеотидная последовательность клонированной ДНК ЛФ. Открытая рамка считывания имела 2427 bp, из них 2328 кодировали 776 аминокислот зрелого секретируемого белка. Остальные 99 кодировали сигнальный пептид, состоящий из 33 аминокислот. N-концевые последовательности ЛФ и ОФ имели значительную гомологию, и D.L. Bragg и T.S. Robertson (1989) предположили, что гомологичные области представлены связывающими ПА доменами. Чтобы изучить способность ЛФ транслоцировать другие белки в цитозоль эукариотических клеток и охарактеризовать структурные потребности этого процесса, были сконструированы конъюгированные белки, содержащие часть ЛФ и каталитические домены дифтерийного или Шига-токсинов.

## Плазмиды

В этой работе было показано, что гибридные белки, содержащие домен рибозилирования АДФ дифтерийного токсина или инактивирующую рибосомы A1 субъединицу Шига-токсина, соединенные с карбоксильным или аминным концом фрагмента ЛФ<sup>1-254</sup>, высоко токсичны для клеток СНО. Получены данные о том, что комбинация ПА и гибридных с ЛФ белков может эффективно импортировать полипептиды из различных бактерий в цитозоль эукариотических клеток. Потенциально такие белки могут быть использованы в терапевтических целях, когда требуется разрушение определенного типа клеток, например, при лечении рака.



## Плазмиды

Uchida et al.(1993) клонировали и охарактеризовали ген, продукт которого является *транс*-активатором синтеза сибиреязвенного токсина. Ген *atxA*, локализованный в пределах фрагмента в 2 т.п.н. между генами *суа* и *lef*, кодирует белок около 53 кДа, и будучи клонирован, комплементирует опосредованные Tn917 инсерционные мутанты, дефектные по синтезу всех трех токсинных белков. Продукт *atxA*, таким образом, активирует транскрипцию не только гена *rag*, но также *суа* и *lef*.

## Плазмиды

- Гены для синтеза капсулы *B.anthraxis* были обнаружены на плазмиде pXO2 размерами приблизительно в 95 kb.
- Гены, необходимые для синтеза капсулы, были клонированы из капсульной плазмиды в *E.coli* с помощью челночного вектора pRH300PLK. Они были субклонированы в pUB110 и введены в *B.anthraxis* трансформацией протопластов. Гены *cap* экспрессировались в *E.coli* и *B.anthraxis*, оба микроорганизма при микроскопии имели капсулу, для образования которой требовалась CO<sub>2</sub>. Однако, количество капсульного вещества, продуцируемого рекомбинантными штаммами, было значительно меньшим, чем у *B.anthraxis*, несущего плазмиду дикого типа.

## Плазмиды

- Три гена (*capB*, *capC*, *capA*, в порядке расположения) вовлечены в синтез капсулы и кодируют синтез белков с молекулярной массой 44, 16 и 46 kDa соответственно (Makino, S. et al., 1989). Была определена нуклеотидная последовательность полной области *cap* (Makino, S. et al., 1989). Она содержит три открытые рамки считывания: *capB* (397 аминокислот, молекулярная масса 44872), *capC* (149 аминокислот, молекулярная масса 16522) и *capA* (411 аминокислот, молекулярная масса 46420). Три гена транскрибировались в одном направлении и каждый имел собственный промотор.

## Плазмиды

- Мутагенез транспозоном Tn917 дал возможность получить несколько классов мутантов, различающихся потребностью в бикарбонате и CO<sub>2</sub> для синтеза капсулы. Инсерция Tn917 в разные сайты rXO2 приводила к следующим изменениям фенотипа. Один класс в присутствии CO<sub>2</sub> и бикарбоната продуцировал большие количества капсульного вещества, чем дикий тип; второй класс был Car<sup>+</sup> при культивировании как в присутствии, так и без CO<sub>2</sub> и бикарбоната; третий класс был Car<sup>+</sup> как в присутствии, так и без CO<sub>2</sub>, но бикарбонат угнетал рост; четвертый класс требовал CO<sub>2</sub> для роста и был Car<sup>+</sup> только в присутствии CO<sub>2</sub> и бикарбоната; пятый класс был Car<sup>+</sup> при культивировании на воздухе и его рост угнетался CO<sub>2</sub>; шестой класс имел rXO2, но был Car<sup>-</sup> при любых условиях культивирования. Было установлено, что все эти мутанты имели инсерции в rXO2.

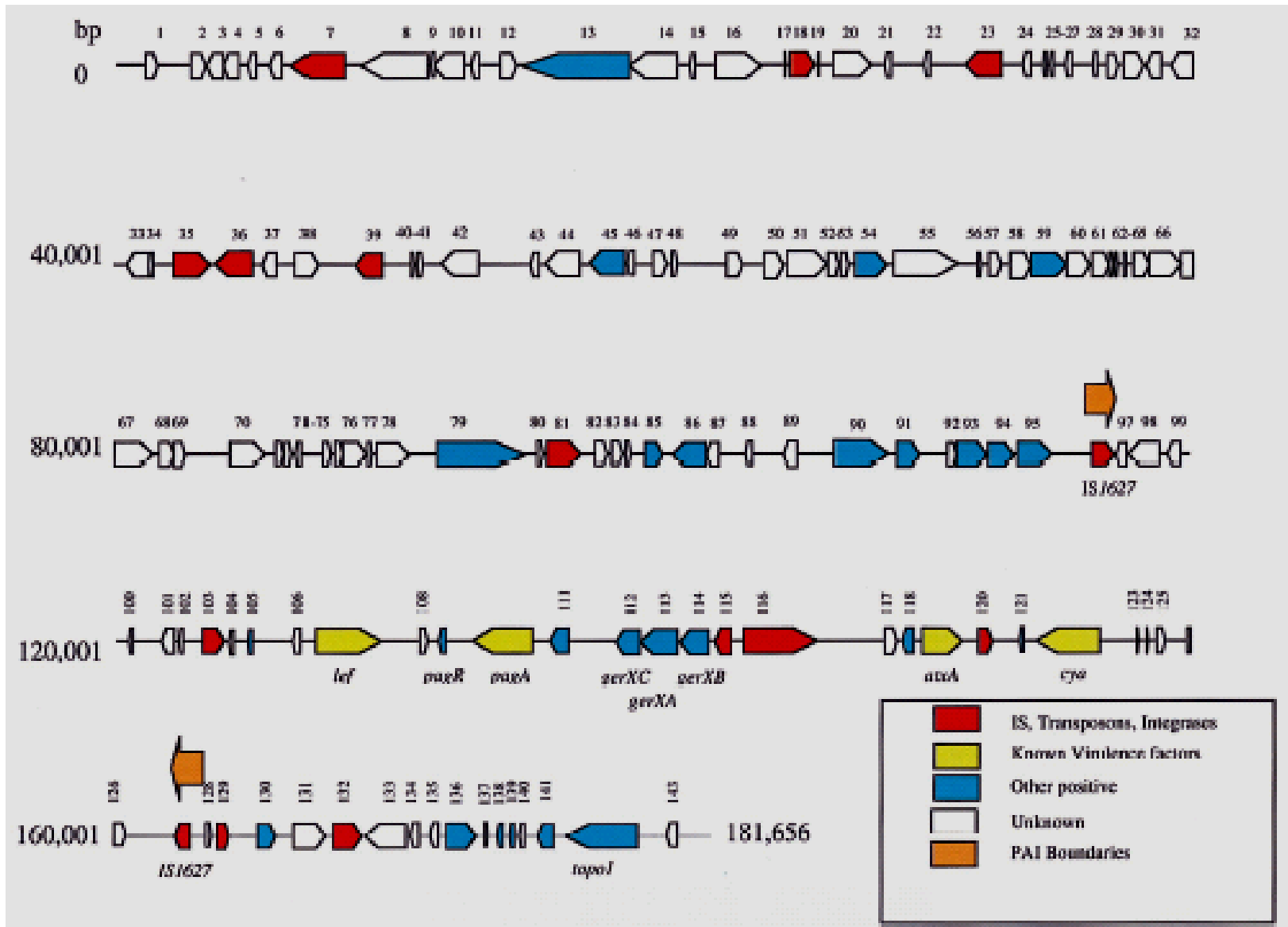
# Плазмиды

В 1999 г. Okinaka et al. была опубликована полная последовательность нуклеотидов плазмиды pXO1 штамма *B. anthracis* Sterne. Ее размеры составили 181 654 bp, из которых только 110,817 bp или 61% представляли собой 143 открытые рамки считывания (ОРС) возможных белков. Содержание Г+Ц составляло 32.5%. Наиболее примечательной особенностью плазмиды было наличие так называемого «острова патогенности», представляющего собой область размером 44.8-kb, ограниченную с обеих сторон инвертированными элементами IS1627. Эта область содержала три токсинных гена (*csa*, *lef*, и *pagA*), регуляторные элементы, контролирующие токсинные гены, три гена, занятые в прорастании спор и 19 дополнительных ОРС.

# Плазмиды

Около 70% ОРС на рХО1 не имели подобия с известными последовательностями в доступных базах данных. Среди ОРС с высокой степенью подобия известным последовательностям встречается набор возможных транспозаз, резолваз и интеграз, ферментов, связанных с транспозицией, что предполагает эволюцию с участием перемещения ДНК между видами. Кроме того, имеются три последовательности, которые могут кодировать синтез полисахаридной капсулы, обычно ассоциирующейся с вирулентными стрептококками. Предполагается, что «остров патогенности» и остальная часть плазмиды имеют разное происхождение

# Плазмиды



## Плазмиды

- Последовательность нуклеотидов плазмиды pXO2 была определена также Okinaka et al. Ее размеры составили 96.2 kb, на ней идентифицировано 85 ОРС и 5 генов, ассоциированных с капсулообразованием *B. anthracis* (*dep*, *capACB*, *acrA*). *capACB* являются структурными генами, ответственными за синтез элементов капсулы, ген *dep* обеспечивает деполимеризацию капсулы, а ген *acrA* выполняет роль позитивного транс-активатора синтеза капсулы.



# Генетический обмен

Основные способы горизонтальной передачи генетической информации или генетического обмена у бактерий:

1. Трансдукция – осуществляется посредством бактериофагов, последовательно инфицирующих клетки донора и реципиента
2. Трансформация происходит за счет проникновения ДНК через клеточную стенку внутрь клетки
3. Конъюгация возможна благодаря наличию плазмид фертильности, обеспечивающих перенос самих себя и переносимых ими генов или других плазмид

После проникновения любым способом новой ДНК внутрь клетки происходит ее рекомбинация с ДНК генома бактерии, приводящая к изменению ее генетических свойств.

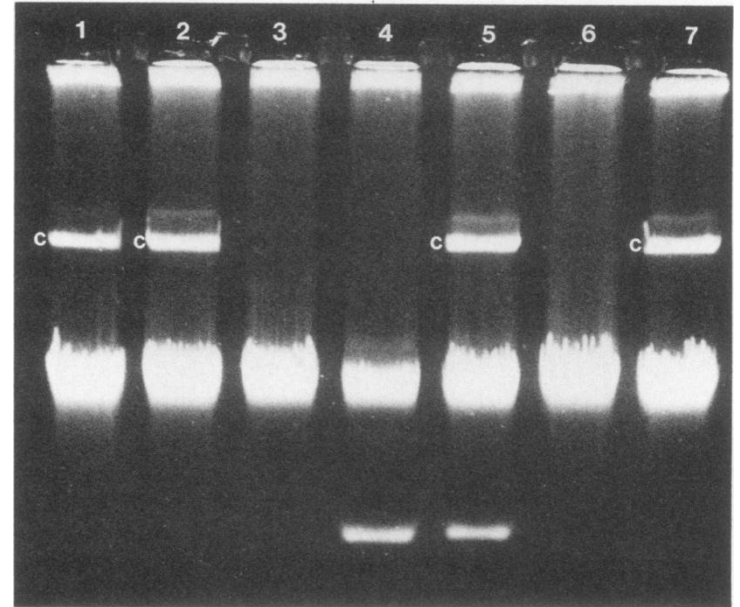
# Генетический обмен

## Трансдукция

Ранние исследования бактериофагов бацилл предвосхитили последовавшие за открытием плазмид *B. anthracis* работы над разными системами генетического обмена для этого микроорганизма. Из почвы были выделены бактериофаги CP-51 и CP-54, которые трансдуцировали хромосомные маркеры между *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. thuringiensis*. Эти два фага близки серологически, но не идентичны, оба обладают холодной лабильностью. Позднее использование температурочувствительного мутанта CP-51 уменьшило потери потенциальных трансдуктантов за счет лизиса.

# Генетический обмен

В дополнение к трансдукции хромосомных маркеров CP-51 пригоден также для трансдукции плазмид между *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis*. Молекулярная масса ДНК CP-51 около 60 Mda, поэтому фаг может упаковывать и переносить относительно большие плазмиды.



# Генетический обмен

А.Л.Буланцевым с соавт. был селекционирован вариант фага CP-54, получивший наименование “БФ” и обладающий рядом преимуществ перед исходным фагом (устойчивость при +4 °С, возможность репродукции без индукции ультрафиолетом). Ими была показана возможность внутривидового и межвидового переноса плазмид pVC16 и pXO2 и высокая частота передачи pXO2 в отдельные штаммы *B. anthracis* при внутривидовом переносе.

# Генетический обмен

## Трансформация

Для введения в реципиентные клетки сконструированных молекул ДНК наиболее распространенным методом является трансформация. *B.anthraxis* относится к природно-нетрансформабельным видам бацилл. Поэтому основной задачей является формирование компетентности.

О.Г.Логиновой и С.Я.Дитяткиным (1989) разработан способ плазмидной трансформации природно некомпетентных клеток *B.cereus*. Сущность метода заключается в обработке глицином периодической культуры реципиента *B.cereus* в определенной фазе роста с последующим замораживанием-оттаиванием образцов, содержащих реципиент и плазмидную ДНК.

# Генетический обмен

В 1989 г. О.Б. Пузанова с соавт.(Саратов) и И.И. Држевецкая с соавт.(Ставрополь) модифицировали метод глицинзависимой криотрансформации восковидных бацилл, что позволило осуществить эффективный перенос канамицинрезистентной рUB110 и тетрациклинрезистентной рBC16 плазмид в *B.anthraxis*. Stepanov et al. (1990) осуществили этим методом внутривидовой перенос капсульной плазмиды рХО2 *B.anthraxis*. При помощи модификации метода глицинзависимой криотрансформации в *B. anthracis* была перенесена плазида рTV1, содержащая транспозон Tn917 (Тарасова Т.Д., Липницкий А.В., 1992)

# Генетический обмен

Близко к нему стоит трансформация протопластов, посредством которой впервые был осуществлен внутривидовой обмен у *B.anthraxis* (Mikesell, P. et al, 1983). Т.Д. Тарасовой и А.В.Липницким (1992) для протопластирования была применена сочетанная обработка клеток уксусным ангидридом и лизоцимом. Т.А. Костюкова с соавт.(1990) описали получение протопластов *B. anthracis* комбинированным воздействием на клетки глицина и лизоцима

# Генетический обмен

Сейчас методом выбора в генной инженерии является электропорация, которая происходит при повышении проницаемости клеточной стенки под воздействием кратковременного разряда электрического тока на клетку и проникновении в этот период времени ДНК внутрь. Она оказалась вполне адекватной для введения относительно маленьких плазмид в *B.anthraxis*. Трансформация *B.anthraxis* хромосомной ДНК не установлена.



# Генетический обмен

Конъюгационноподобный обмен или трансцепция

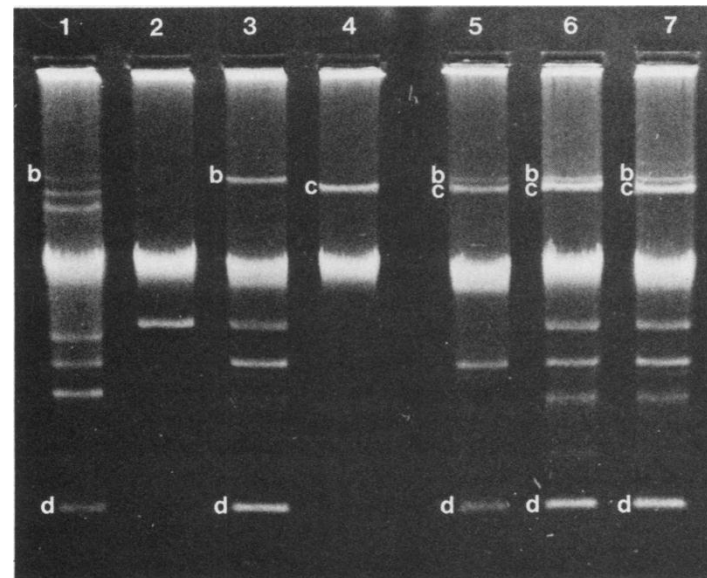
Плазмиды фертильности *B.thuringiensis* pXO11, pXO12, pXO13, pXO14, pXO15 и pXO16, выделенные из разных штаммов, эффективно функционируют в *B.anthraxis* (Battisti, L. et al., 1985; Reddy, A. et al., 1987). Реципиенты *B.anthraxis*, наследующие одну из плазмид фертильности *B.thuringiensis* являются, в свою очередь, эффективными донорами для других штаммов *B.anthraxis*, а также для *B.cereus* и *B.thuringiensis*. Обнаруженный перенос плазмид не подвержен влиянию добавляемой в конъюгативную смесь ДНКазы, а бесклеточные фильтраты донорных культур неэффективны, что исключает трансформацию и трансдукцию как возможные механизмы этого переноса.

# Генетический обмен

Необходимость межклеточного контакта свидетельствует о конъюгационноподобной природе передачи. Число трансципиентов, получаемых в скрещивании с *B.anthraxis* в качестве донора, возрастало в 164 раза за период между 2 и 4 часами совместной инкубации в бульоне и медленно увеличивалось после этого. До 2 часов совместной инкубации трансципиентов не обнаруживалось, что предполагает необходимость периода совместного выращивания донора и реципиента, прежде чем произойдет передача плазмиды. Частота передачи плазмиды тетрациклинрезистентности pBC16 размером 4,2 kb, опосредуемая pXO12, была высока и составляла  $8 \times 10^{-1}$  трансципиентов на донор.

# Генетический обмен

- Плазмиды больших размеров передавались со значительно меньшей частотой. Например, рХО2, которая была маркирована *Tn917*, что позволяло осуществлять прямую селекцию переносимой плазмиды, передавалась с частотой в 200-1000 раз меньшей, чем рВС16. Физический анализ переносимых плазмид дал основания полагать, что рВС16 переносилась посредством донации, а большие плазмиды *B.anthraxis* рХО1 и рХО2 - посредством кондукции (Green, V.D. et al., 1989).



# Генетический обмен

Еще одним методом генетического обмена является слияние протопластов. Этот метод не имеет ограничений по размерам передаваемых генов и воспроизведен на модели сибирезвеного микроба. Эффективное протопластирование и последующая регенерация клеток происходили под влиянием последовательного действия на растущую культуру пенициллина и лизоцима (Чернов В.С., 1984). В этом случае в продуктах слияния протопластов обнаруживается весь генетический материал двух участников процесса, которыми могли быть не только клетки разных штаммов сибирезвеного микроба, но и клетки *B.anthraxis* и *B.cereus*.

# Хромосома

До появления работ по прямому определению последовательностей нуклеотидов всего генома сибиреязвенного микроба, предпринятых в 2002 г., о его хромосоме почти ничего не было известно. Оказалось, что ее размеры составляют 5,23 Мbp и что большинство генов подобны генам близкородственного микроба *V.cereus*. Некоторые кодируемые хромосомными генами белки могут иметь функции, увеличивающие патогенность, например, фосфолипазы, гемолизины, супероксиддисмутазы, белки, связанные с приобретением железа. Нонсенс-мутация в гене плейотропного регулятора *plcR* может быть причиной низкой экспрессии практически идентичных *V.cereus* генов сибиреязвенного микроба, включая гены устойчивости к  $\beta$ -лактамным антибиотикам, синтеза экстрацеллюлярных протеаз и детерминанты подвижности

# Хромосома

- В конце 2001 г. в связи с актами биотерроризма в США, когда потребовалось определить происхождение штамма, использованного для атаки, с новой остротой встал вопрос о дифференциации штаммов сибиреязвенного микроба. Полное секвенирование генома трех штаммов штамма обнаружило 60 новых отличительных маркеров, включающих полиморфизм отдельных нуклеотидов (SNPs), вставки или делеции последовательностей и тандемные повторы. При этом были выявлены 11 различий в виде замен, инсерций или делеций отдельных оснований в последовательностях хромосомной ДНК, между штаммом из Флориды и двумя вариантами лабораторного штамма Ames, а также 7 различий тех же типов между этими вариантами.

# Хромосома

- Последнее говорило о том, что подобный полиморфизм может возникать уже через небольшое число генераций, так как оба варианта происходили от одного предшественника и хранились с 1980 г в замороженном виде (Read T. et al., 2002). Гораздо больше отличий, включая крупные вставки, инверсии и разное число тандемных повторов, наблюдалось между плазмидными ДНК флоридского штамма и вакцинных штаммов Sterne и Pasteur (Read T. et al., 2002).

# Хромосома

С развитием методов определения нуклеотидной последовательности ДНК, или секвенирования, появилось все больше данных о геномах разных штаммов сибиреязвенного микроба. Особенно быстрый прогресс в этом направлении заметен с внедрением метода полногеномного секвенирования. Сейчас в базах данных – например, GenBank, можно найти последовательности хромосомной и плазмидной ДНК более 130 штаммов *B.anthraxis*. В нашем институте секвенированы 15 штаммов сибиреязвенного микроба. Оказалось, что даже размеры хромосомы и плазмид у разных штаммов отличаются довольно существенно, не говоря уже о последовательностях нуклеотидов



# Молекулярная идентификация

Полимеразная цепная реакция – метод выбора

У нас разработаны ПЦР-тест системы для идентификации сибиреязвенного микроба

Первая тест-система с единственной мишенью – сначала с геном *capB*, затем с геном *rag* и электрофоретической детекцией, которая до сих пор выпускается

Сейчас имеется коммерческая система для ПЦР с детекцией в режиме реального времени с мишенями генами *rag* и *cap*

Экспериментальные тест-системы с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени с мишенями плазмидными генами токсинообразования, капсулообразования и специфичными хромосомными мишенями

# Генетическое типирование

Сибиреязвенный микроб относится к видам с высокой генетической мономорфностью, долгое время отличить штаммы не представлялось возможным, если не считать разницу в наборе плазмид.

Первое различие в геномах штаммов возбудителя сибирской язвы было обнаружено в результате исследования с использованием маркеров ПЦР с произвольными праймерами (Henderson et al., 1995). Это различие обусловлено существованием варибельного числа tandemных повторов (VNTR) размером 12 нуклеотидов в генетическом локусе, названном *vrrA*.

```
ATTTGCGCACCGATTTGCGCACCGATTTGCGCACCGATTTGCGCACCG
```

Jackson et al. (1997) установили существование пяти аллельных форм, соответствующих числу единиц этих повторов (от 2 до 6).

Наиболее результативной схемой молекулярного типирования штаммов сибиреязвенного микроба оказалось определение комбинаций аллелей по 6 хромосомным и 2 плазмидным локусам с варибельным числом tandemных повторов [MLVA](Keim et al., 2000).



# Генетическое типирование

- МОДИФИКАЦИЯ MLVA

## ОРИГИНАЛЬНЫЙ МЕТОД

## МОДИФИКАЦИЯ

Состав ПЦР - коктейлей (прямые и обратные праймеры к локусам)

1 – vrrA vrrB<sub>1</sub>\* CG3\*\*  
2 – vrrB<sub>2</sub>\* pXO2at\*\*\* pXO1aat\*  
3 – vrrC<sub>1</sub>\*  
4 – vvrC<sub>2</sub>\*\*\*  
праймеры помечены:  
\* Fam; \*\* Ned; \*\*\*Hex

1 – vrrA vrrB<sub>1</sub> CG3 pXO1aat  
2 – vrrB<sub>2</sub> pXO2at  
3 – vrrC<sub>1</sub>  
4 – vvrC<sub>2</sub>

Регистрация и анализ результатов

Perkin-Elmer Applied Biosystems 377  
automated fluorescent DNA sequencer

Система регистрации изображений в геле и  
обработки результатов EDAS 120 с программой  
Kodak 1D Image Analytic Software (Eastman Kodak  
Company, 2000)



# Генетическое типирование

| Маркеры локусов (размер ампликонов в п.о.) |            |            |            |            |            |            |            | Генотип по<br>P.Keim et al.<br>(2000) с<br>дополнениями |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|
| vrrA                                       | vrrB1      | vrrB2      | vrrC1      | vrrC2      | CG3        | pXO1       | pXO2       |   |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 132        | 137        | 13  |
| 325  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 132        | 137        | 17  |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 532        | 158        | 132        | 141        | 35  |
| 129  | 229        | 162        | 613        | 532        | 158        | 129        | 141        | 45  |
| <b>325</b>                                 | <b>229</b> | <b>153</b> | <b>613</b> | <b>604</b> | <b>153</b> | <b>129</b> | <b>137</b> | <b>90</b>   |
| <b>313</b>                                 | <b>229</b> | <b>162</b> | <b>613</b> | <b>532</b> | <b>153</b> | <b>132</b> | <b>137</b> | <b>91</b>   |
| 301  | 256        | 162        | 613        | 532        | 158        | 126        | 137        | 92  |
| 301  | 256        | 162        | 583        | 532        | 158        | 123        | 137        | 93  |
| 313  | 229        | 153        | 613        | 532        | 158        | 132        | 141        | 94  |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 135        | 137        | 95  |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 532        | 153        | 138        | 137        | 96  |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 129        | 137        | 97  |
| 325  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 135        | 137        | 98  |
| 325  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 129        | 137        | 99  |
| 313  | 229        | 162        | 538        | 604        | 158        | 132        | 137        | 100   |
| 313  | 229        | 162        | 538        | 604        | 158        | 126        | 137        | 101   |
| 325  | 229        | 171        | 613        | 604        | 153        | 129        | 135        | 102   |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 129        | 135        | 103   |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 604        | 153        | 129        | NA         | IC1   |
| 313  | 229        | 162        | 613        | 532        | 158        | 138        | NA         | IC2   |

Новые генотипы

# Генетическое типирование

MLVA-генотипы штаммов *B. anthracis*, выделенных на территории некоторых стран СНГ



## Генетическое типирование

Схема MLVA8 позволила разделить 426 штаммов на 89 генотипов, при этом, разумеется, у многих из них был одинаковый генотип. Тем не менее, можно было отметить привязку генотипов к определенным географическим регионам, где штаммы с этими генотипами были выделены. Также очевидным оказалось и то, что штаммы, выделенные в ходе одной вспышки сибирской язвы, имели один и тот же генотип. Это открывало возможность связать генотипы штаммов с их географическим происхождением, а также определить принадлежность штаммов, выделенных во время вспышки, к одному и тому же источнику.

## Генетическое типирование

В частности, все штаммы, выделенные в ходе вспышки, обусловленной биотерроризмом в США в 2001 году, имели одинаковый MLVA8 генотип, такой же, как у штамма Ames, выделенного в Техасе в 1981 году. Этот штамм широко использовался в разных лабораториях Запада, в том числе в разработках военного характера, что позволило установить местное происхождение штамма, использованного в акте биотерроризма и вероятную связь источника заражения с военной лабораторией.

MLVA8 широко использовалась в разных странах, в том числе и у нас, и выявляла новые генотипы.



## Генетическое типирование

Затем эта схема была расширена включением дополнительных VNTR-локусов.

P. Le Fleche с соавт. описали схему анализа 20 хромосомных VNTR-локусов, в которой 14 оригинальных локусов объединены с 6 локусами из MLVA8 P. Keim. В 2006 году E. Lista с соавт. дополнили схему P. Le Fleche. еще 4 новыми хромосомными VNTR-локусами и 2 плазмидными локусами системы P. Keim и исключили один хромосомный локус схемы P. LeFleche (MLVA25) Следующая схема - MLVA15 – предложена в 2007 году, в ней использованы 8 локусов схемы P. Keim и 7 новых VNTR-локусов. Наконец, в 2012 году разработана схема с анализом всех описанных VNTR-локусов (MLVA31).

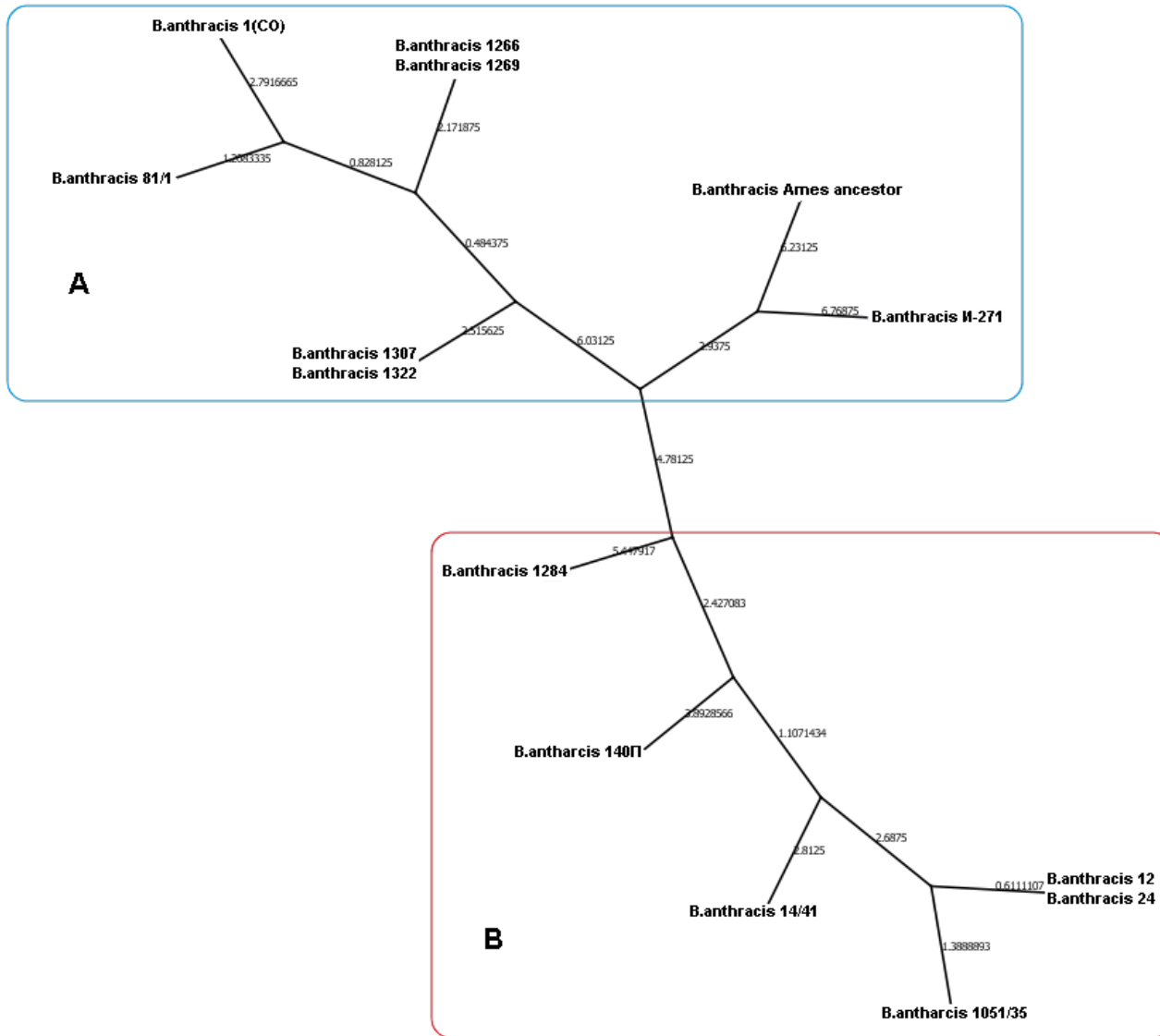
## Генетическое типирование

Складывалось впечатление, что чем больше VNTR-локусов использовалось при генотипировании, тем больше генотипов удавалось идентифицировать, тем более высокой дискриминирующей способностью обладает схема. По схеме MLVA15 типирование 1033 штаммов из 42 стран мира выявило 221 уникальный генотип. Однако наше сравнение MLVA15, MLVA25 и MLVA31 показало, что уровень дискриминации у них одинаков. При этом практически важным для эпидемиологического расследования вспышки является то, что генотипы всех штаммов из одной вспышки идентичны. Пример – исследование штаммов, выделенных на Ямале в 2016 году.

# Генетическое типирование

| Штамм<br>№  | vgA    | vgB1 | vgB2 | vgC1 | vgC2 | СЗ | pXO1aat | pXO2at | Bams01 | Bams03 | Bams05 | Bams13 | Bams15 | Bams21 | Bams22 | Bams23 | Bams24 | Bams25 | Bams28 | Bams30 | Bams31 | Bams34 | Bams44 | Bams51 | Bams53 | vgT12 | vgT16 | vgT17 | vgT19 | vgT23 | vgT35 |
|---|--------|------|------|------|------|----|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 11; 12;<br>23; 24;<br>25; 26;<br>27; 28;<br>29;<br>5876 | 3      | 23   | 14   | 53   | 17   | 2  | 9       | 7      | 14     | 27     | 7      | 27     | 45     | 10     | 15     | 10     | 11     | 13     | 12     | 17     | 85     | -1     | 8      | 6      | 6      | 6     | 21    | 3     | 4     | 3     | 5     |
| 1051/35   | 3      | 23   | 14   | 53   | 17   | 2  | 7       | 7      | 14     | 27     | 7      | 27     | 45     | 10     | 15     | 10     | 11     | 27     | 12     | 17     | 85     | -1     | 8      | 6      | 6      | 6     | 21    | 3     | 4     | 3     | 5     |
| 14/41   | 3      | 23   | 14   | 53   | 17   | 2  | 8       | 8      | 14     | 27     | 7      | 27     | 45     | 10     | 15     | 10     | 11     | 13     | 13     | 17     | 84     | -1     | 8      | 8      | 6      | 5     | 21    | 3     | 4     | 3     | 5     |
| 1284  | 3      | 23   | 16   | 53   | 17   | 2  | 9       | 8      | 14     | 26     | 7      | 7      | 45     | 10     | 15     | 9      | 11     | 13     | 14     | 17     | 84     | -1     | 8      | 6      | 8      | 5     | 22    | 3     | 5     | 3     | 5     |
| 140П  | 3      | 23   | 14   | 53   | 17   | 2  | 8       | 8      | 13     | 27     | 7      | 27     | 24     | 10     | 17     | 10     | 11     | 13     | 12     | 17     | 30     | -1     | 8      | 9      | 8      | 5     | 21    | 3     | 4     | 3     | 5     |
| 81/1  | 4      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 13     | 27     | 7      | 30     | 45     | 10     | 15     | 9      | 11     | 13     | 14     | 76     | 65     | 9      | 8      | 9      | 8      | 6     | 20    | 4     | 5     | 4     | 4     |
| 1266  | 5      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 13     | 30     | 7      | 30     | 45     | 10     | 15     | 9      | 11     | 13     | 14     | 76     | 65     | 9      | 8      | 9      | 8      | 7     | 20    | 4     | 5     | 4     | 5     |
| 1269  | 5      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 13     | 30     | 7      | 30     | 45     | 10     | 15     | 9      | 11     | 13     | 14     | 76     | 65     | 9      | 8      | 9      | 8      | 7     | 20    | 4     | 5     | 4     | 5     |
| 1(СО)   | 4      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 13     | 30     | 7      | 33     | 45     | 10     | 15     | 9      | 11     | 13     | 14     | 76     | 40     | 9      | 8      | 9      | 8      | 6     | 19    | 4     | 5     | 4     | 4     |
| 1307  | 4      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 14     | 30     | 7      | 30     | 45     | 10     | 15     | 10     | 11     | 13     | 14     | 76     | 65     | 9      | 8      | 9      | 6      | 6     | 20    | 4     | 5     | 4     | 5     |
| 1322  | 4      | 20   | 14   | 57   | 21   | 1  | 11      | 8      | 14     | 30     | 7      | 30     | 45     | 10     | 15     | 10     | 11     | 13     | 14     | 76     | 65     | 9      | 8      | 9      | 6      | 6     | 20    | 4     | 5     | 4     | 5     |
| И-271   | 4      | 20   | 14   | 53   | 17   | 2  | 7       | 11     | 16     | 28     | 7      | 5      | 45     | 10     | 16     | 11     | 13     | 7.3    | 57     | 64     | 8      | 11     | 8      | 9      | 8      | 6     | 20    | 4     | 4     | 4     | 5     |
| Ames<br>Ancestor  | 4      | 20   | 13   | 53   | 17   | 2  | 7       | 10     | 16     | 26     | 5      | 70     | 24     | 10     | 16     | 11     | 11     | 13     | 14     | 57     | 64     | 11     | 8      | 9      | 8      | 6     | 20    | 4     | 4     | 4     | 5     |
|   |        |      |      |      |      |    |         |        | MLVA25 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |
|   | MLVA8  |      |      |      |      |    |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |
|   | MLVA15 |      |      |      |      |    |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | MLVA15 |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |
|   |        |      |      |      |      |    |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |

# Генетическое типирование

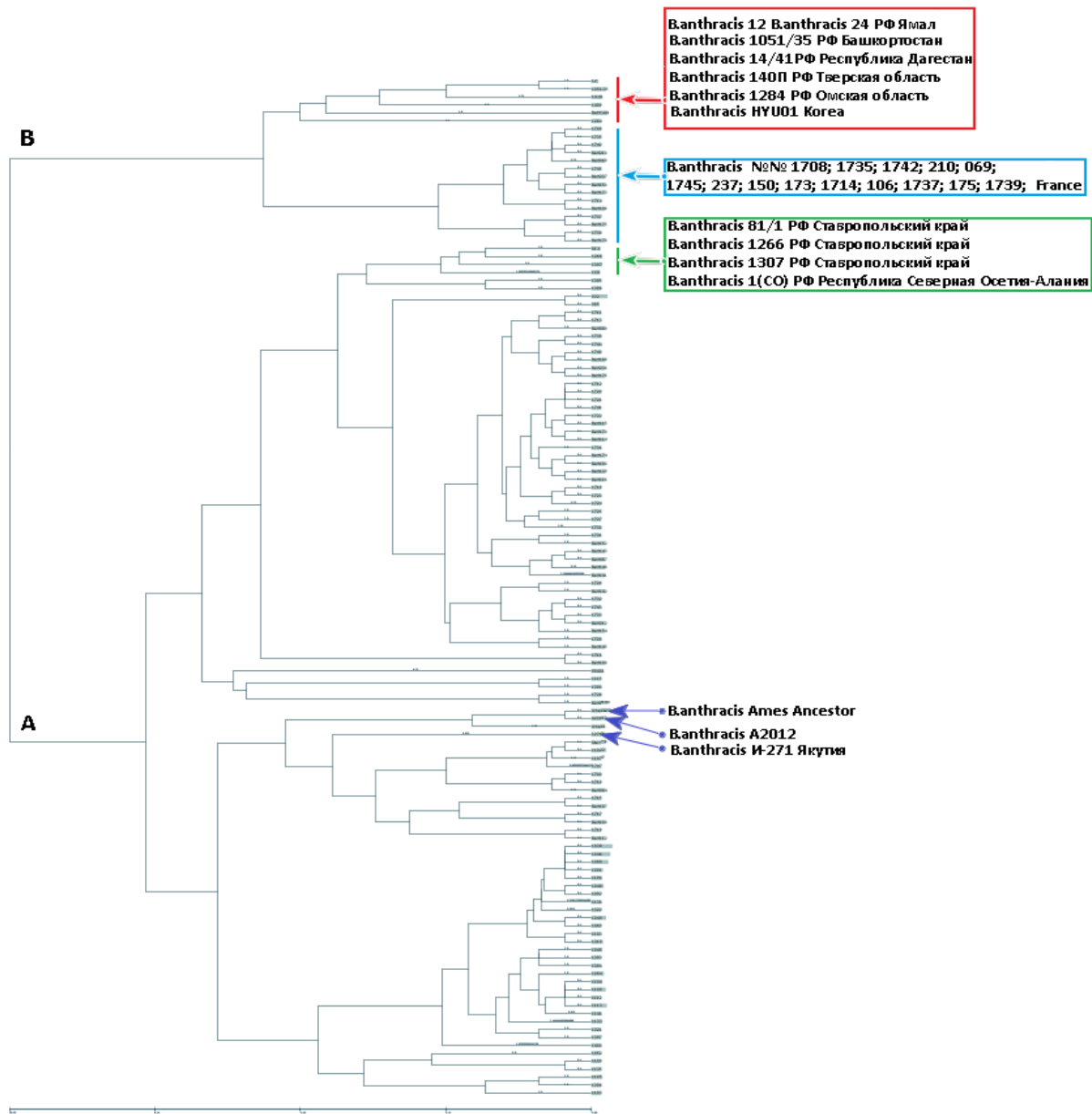


## Генетическое типирование

При генотипировании необходимо сравнивать получаемые генотипы с генотипами других штаммов. Для этого необходимы представительные базы данных MLVA генотипов, как собственные, так и международные, например, MLVA bank for Microbes Genotyping, поддерживаемая и обновляющаяся Парижским университетом.

При сравнении MLVA31-генотипа ямальских штаммов и еще 10 штаммов из нашей коллекции MLVA31-генотипами 511 изолятов, представленных в базе данных из ресурса MLVA bank for Microbes Genotyping, удалось идентифицировать 126 уникальных генотипов. Дендрограмма, построенная по результатам этого анализа, дает также представление о месте ямальских штаммов в данной выборке.

# Генетическое типирование



### **SNP-типирование**

Анализ генетически стабильных единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), так называемых «канонических» (canSNP), позволяет без исследования всего генома точно определить принадлежность штамма к одной из основных групп молекулярного разнообразия сибиреязвенного микроба. Этот анализ также дает возможность сделать предварительное заключение о географическом происхождении штамма и подтвердить идентичность изолятов из одной вспышки.

# Генетическое типирование

| Штамм<br>B. anthracis | Лocusы caпSNP |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | caпSNP генотип |
|-----------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
|                       | A.Br.001      | A.Br.002 | A.Br.003 | A.Br.004 | A.Br.006 | A.Br.007 | A.Br.008 | A.Br.009 | B.Br.001 | B.Br.002 | B.Br.003 | B.Br.004 | A/Br.001 |                |
| 12                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 23                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 24                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 25                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 26                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 27                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 28                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 29                    | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 5876                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 1051/35               | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 14/41                 | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 1284                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 140П                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 2        | 4        | 4        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 1        | B.Br.001/002   |
| 81/1                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| 1266                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| 1269                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| 1(CO)                 | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| 1307                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| 1322                  | 4             | 3        | 1        | 4        | 1        | 4        | 3        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.008/009   |
| И-271                 | 4             | 1        | 3        | 2        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.001/002   |
| Ames Ancestor         | 2             | 1        | 3        | 2        | 1        | 4        | 4        | 1        | 4        | 3        | 3        | 4        | 1        | A.Br.Ames      |



### **Полногеномное секвенирование**

Полногеномное секвенирование дает возможность определить место штаммов сибиреязвенного микроба в глобальной популяции *B. anthracis*. Кроме того, этот метод предоставляет исчерпывающую информацию о геноме, которая позволяет оценить корректность SNP- и MLVA-генотипирования, а также получить представление об особенностях конкретных генов и генетических областей. Изучение полногеномных нуклеотидных последовательностей 149 штаммов *B. anthracis* и одного штамма *Bacillus cereus* позволило получить представление о генетических взаимоотношениях штаммов с Ямала и их месте в глобальной популяции *B. anthracis*.

## Генетическое типирование

Из дендрограммы, построенной по результатам анализа, видно, что штаммы *B. anthracis* 12 и 24, выделенные в ЯНАО, группируются вместе со штаммами *B. anthracis* 14/41, *B. anthracis* 1284, а также со штаммом *B. anthracis* NYU01 (выделен в Корее в 2009 году). Штаммы сравнения *B. anthracis* 1(CO), 81/1, 1266, 1269, 1307 и 1322 группируются отдельно. Штамм *B. anthracis* И-237 является отдельной ветвью, связанной с группой Ames. Такой характер распределения штаммов соответствует данным *can*SNP-генотипирования и MLVA.



# Генетическое типирование

## SNR-анализ

Единичные нуклеотидные повторы (SNR) – это разной длины области ДНК, состоящие из повторений одного нуклеотида, в частности аденинового (A). Таких областей полиА в геноме сибиреязвенного микроба несколько, они крайне вариабельны, и если определить их протяженность, выясняется, что у разных штаммов, даже из одной вспышки, они могут быть разными. Это позволяет дифференцировать штаммы из одной вспышки и судить о ее продолжительности, так как чем она длительнее, тем больше изменений в этих областях может произойти. Данный подход позволил различить штаммы, выделенные от человека и от оленя, в ходе ямальской вспышки

# Генетическое типирование

| Штамм                                 | SNR локусы |      |      |
|---------------------------------------|------------|------|------|
|                                       | CL10       | CL12 | CL35 |
| <b>B. anthracis 12</b>                | 20A        | 13A  | 12A  |
| <b>B. anthracis 24</b>                | 18A        | 12A  | 11A  |
| <b>B. anthracis<br/>Ames ancestor</b> | 16A        | 15A  | 15A  |