

Подходы к геноидентификации видов бактерий рода *Campylobacter* методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами

Д. Л. Кирик*, Л. Н. Бурьяновский¹, Е. А. Шабловская,
И. В. Пинчук, Н. М. Кролевецкая, В. И. Кикоть

НИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громашевского МЗ Украины
252038 Киев, спуск Протасов Яр, 4

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

*Проведены предварительные исследования по разработке метода геноидентификации бактерий рода *Campylobacter* на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных олигонуклеотидных праймеров — REP (repetitive extragenic palindromic sequence). Для всех штаммов вида *C. jejuni* был характерен ПЦР-продукт длиной 600 п. н. Установлены пять групп ПЦР-сероваров у штаммов *C. jejuni* одного серовара (Lio 32), отличающихся по минорным фрагментам. Это может иметь значение для определения источника инфекции при эпидемиологическом анализе.*

Введение. За рубежом использование методов молекулярной диагностики кампилобактериозной инфекции приобретает все большее распространение в клинической практике [1, 2]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием универсальных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных определенным повторяющимся последовательностям и характерных для различных прокариотических геномов, позволяет анализировать целостность генома без предварительного изучения ДНК-последовательности кампилобактерий [3].

Как известно, геномы прокариот характеризуются наличием нескольких категорий повторяющихся последовательностей, таких как гены рРНК и тРНК, IS-элементы, а также большим количеством прямых и повторяющихся последовательностей длиной 20—50 пар нуклеотидов (п. н.). К этой последней категории повторов относятся REP-последовательности (repetitive extragenic palindromic sequences) — повторы длиной 32 п. н. локализованные вне кодирующих последовательностей [7]. Было показано [8], что праймеры, соответствующие консенсусной последовательности REP-повторов *Escherichia coli*, могут быть успешно использованы для анализа различных бактериальных геномов.

Задачей настоящего исследования была разработка метода геноидентификации бактерий рода *Campylobacter* на основе ПЦР с использованием

*Correspondence address.

Таблица 1
Штаммы кампилобактерий, используемые в работе

Штамм	Серовар по Н. Lior [6]	Источник выделения
<i>C. jejuni</i> M457Z (эталонный)	Lio 7	Человек
<i>C. coli</i> N602 (эталонный)	Lio 20	Свинья
<i>C. laridis</i> N729 (эталонный)	Lio 31	Человек
<i>C. jejuni</i> 11ЖБ	Lio 32	Курица
<i>C. coli</i> 78	Lio 20	Больной
<i>C. jejuni</i> 354	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 355	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 356	Lio 32	«
<i>C. coli</i> 362	Lio 8	Курица
<i>C. jejuni</i> 363	Lio 5	«
<i>C. jejuni</i> 366	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 367	Lio 10	«
<i>C. jejuni</i> 370	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 371	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 372	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 374	Lio 32	«
<i>C. coli</i> 375	Lio 8	«
<i>C. jejuni</i> 376	Lio 6	Больной
<i>C. jejuni</i> 377	Lio 32	Курица
<i>C. jejuni</i> 378	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 379	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 381	Lio 32	Больной
<i>C. jejuni</i> 382	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 383	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 385	Lio 32	«
<i>C. coli</i> 412	Lio 8	«
<i>C. jejuni</i> 413	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 416	Lio 2	«
<i>C. jejuni</i> 673	Lio 32	«
<i>C. jejuni</i> 677	Lio 32	«

универсальных олигонуклеотидных праймеров — REP и определение генетических различий внутри эпидемиологически ведущего серовара *C. jejuni* Lio 32.

Материалы и методы. В работе использованы 30 штаммов кампилобактерий, выделенных из различных источников (табл. 1).

Кампилобактерии культивировали при 42 °С в течение 24—48 ч на селективной питательной среде ЖЭКА [4] в микроаэрофильных условиях, создаваемых при помощи газогенерирующих пакетов «Кампилогаз» (НИИ «Синтез», Борислав Львовской области). Выделенные культуры идентифицировали в соответствии с инструкцией по лабораторной диагностике кампилобактериоза [5]. Серотипирование выделенных штаммов осуществляли по схеме Н. Lior [6].

Дезоксиолигонуклеотидные праймеры синтезированы фосфоамидным методом на синтезаторе «Виктория» (Новосибирск) И. Я. Дубеем (НИИ биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев):

REP 1

5'- III ICG ICGICA TCI GGC - 3';

REP 2

5' - ICG ICT TAT CIG GC TAC - 3',

где I — инозин [7].

Праймеры очищали в 20 %-м денатурирующем полиакриламидном геле. Концентрации очищенных праймеров проверяли спектрофотометрически. ПЦР проводили в объеме 35 мкл. Реакционная смесь содержала: 25 мМ трис-НСl, рН 8,8 (20 °С), 0,2 мМ каждый дезоксинуклеотидтрифосфат (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, ТТФ), 15 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,5 мМ ДТТ (дтитотриетол), 3,5 мМ MgCl₂, 50—100 нг ДНК-матрицы, по 12 пмоль каждого праймера REP 1 и REP 2 и 2,5 е. а. Био Tag-ДНК-полимеразы (Био Мастер, Москва). После прогрева реакционной смеси в течение 2—3 мин при 93 °С проводили 32 цикла ПЦР: 1 мин, 92 °С; 1 мин, 35 °С; 1,5 мин, 72 °С. Реакцию проводили на амплификаторе производства НПО «Био Люкс» (Шушино). Общее время реакции составляло около 3,5 ч.

Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1,2 %-м агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Полимеразную цепную реакцию с REP-праймерами осуществляли с хромосомной ДНК, выделенной из различных изолятов бактерий рода *Campylobacter* по методу [9]. Указанный способ выделения хромосомной ДНК предусматривает использование цетавлона, что, на наш взгляд, не лишено недостатков. Это отмечалось и другими авторами [10]. Поэтому часть более поздних экспериментов проводили с использованием непосредственно культур кампилобактерий в качестве источника ДНК в ПЦР. В анализ брали 1—3 мкл культуры (в зависимости от мутности образца) на стандартную реакцию ПЦР (35 мкл). Использование микробных клеток вместо очищенной хромосомной ДНК практически не влияло на результаты ПЦР. Некоторые вариации в электрофоретическом профиле ПЦР-продуктов, в частности, появление минорных (и, как правило, более высокомолекулярных) и субмажорных продуктов отмечалось время от времени и при повторном ПЦР-анализе одного и того же образца очищенной хромосомной ДНК. Такие вариации, скорее всего, связаны со сложными конкурентными взаимодействиями вырожденных праймеров с различными REP-локусами на хромосомной ДНК в процессе ПЦР.

Наиболее воспроизводимым по результатам REP-ПЦР был образец штамма *C. jejuni* 11ЖБ, выделенный от курицы. Во всех повторностях он продуцировал ПЦР-продукт размером около 600 п. н. Лишь в очень ограниченном числе ПЦР-анализов, к тому же при достаточно большой нагрузке ПЦР-образца на агарозный гель, отмечалось наличие набора минорных ПЦР-продуктов размерами от 700 до 2000 п. н. (рис. 1, дорожка 11). Большой же частью образец 11ЖБ производил ПЦР-продукт, представленный на рис. 2 (дорожка 2). Условия ПЦР оптимизировали на хромосомной ДНК именно этого образца. Таким образом, штамм *C. jejuni* можно считать эталонным.

Результаты генотипификации кампилобактерий приведены на рис. 1. Как видно, у всех представленных штаммов *C. jejuni* присутствуют два мажорных продукта — 550 и 1200 п. н. Исключение составляет лишь штамм

рис. 1. 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 тыс. п. н.

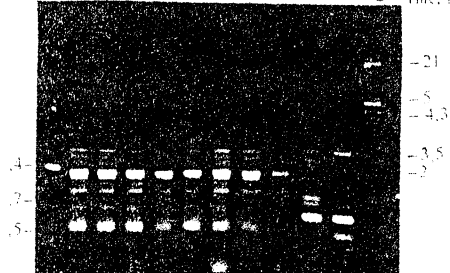


Рис. 1. Генотипификация вида *C. jejuni*: 1— маркер 1,4; 0,7; 0,5 тыс. п. н.; 2—*C. jejuni* 362; 3— *C. jejuni* 363; 4— *C. jejuni* 366; 5— *C. jejuni* 367; 6— *C. jejuni* 370; 7— *C. jejuni* 371; 8— *C. jejuni* 372; 9— *C. jejuni* 374; 10— *C. jejuni* 376; 11— *C. jejuni* 11 ЖБ; 12— маркер: 21; 5; 4,3; 3,5; 2; 1,9; 1,6 тыс. п. н.

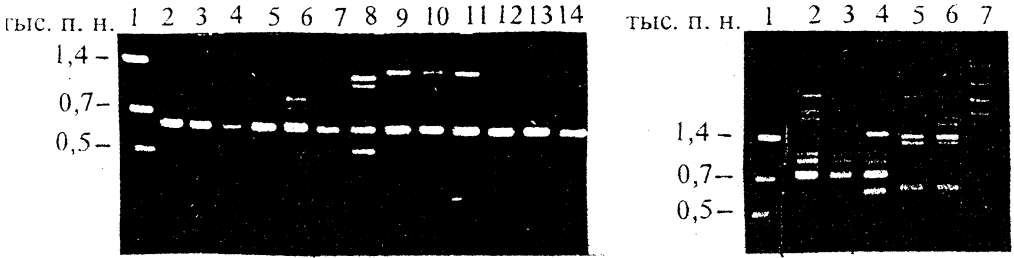


Рис. 2. Геноидентификация штаммов кампилобактерий одного серотипа (Lio 32): 1— маркер: 1,4; 0,7 и 0,5 тыс. п. н.; 2— *C. jejuni* 11 ЖБ; 3— *C. jejuni* 673; 4— *C. jejuni* 383; 5— *C. jejuni* 382; 6— *C. jejuni* 381; 7— *C. jejuni* 677; 8— *C. jejuni* 379; 9— *C. jejuni* 378; 10— *C. jejuni* 378; 11— *C. jejuni* 377; 12— *C. jejuni* 356; 13— *C. jejuni* 355; 14— *C. coli* 78 (Lio 20)

Рис. 3. Геноидентификация видов бактерий рода *Campylobacter*: 1— маркер молекулярной массы: 1,4; 0,7; 0,5 тыс. п. н.; 2— *C. jejuni* 457; 3— *C. jejuni* 457 (ПЦР в присутствии 5 % ДМСО); 4— *C. jejuni* 416; 5— *C. coli* 602; 6— *C. laridis* 729; 7— маркер молекулярной массы (фаг I, рестрицированный *Ava II*)

C. jejuni 76 (дорожка 10), профиль ПЦР-продуктов у которого идентичен таковому эталонного штамма *C. jejuni* 11ЖБ. Эти штаммы характеризуются одним мажорным продуктом 600 п. н. Следует отметить, что наличие мажорного ПЦР-продукта размером 1200 п. н. более типично для видов *C. coli* и *C. laridis* (рис. 3, дорожки 5 и 6).

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, для всех штаммов *C. jejuni* одного серовара по Н. Lio характерен один мажорный ПЦР-фрагмент — 600 п. н. Выявлены различия изученных штаммов по минорным фрагментам. При этом выделены пять групп ПЦР-типов внутри серовара. Первый ПЦР-тип содержит следующие минорные фрагменты (п. н.). 1500; 1400; 1300; 500; 250; 700; второй — 1400; 900; 800; 500; 250; третий — 1600; 1300; 900; 300; 250; четвертый — 1600; 1500; 850; 250; пятый — 1500; 1400; 1300; 800; 250. Таким образом, ПЦР позволяет обнаружить у *C. jejuni* тонкие генетические отличия внутри серовара. Последнее может иметь

Таблица 2
Продукты RFLP-ПЦР-анализа серовара Lio 32 *C. jejuni*

Фрагменты	Длина ПЦР фрагмента, п. н.											
	Штамм <i>C. jejuni</i> серовара Lio 32											
	355	356	673	677	378	378	377	378	379	381	382	383
Мажорный	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Субмажорные	—	—	—	—	1400	1400	1400	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	1300	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	1200	900	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	500	800	—	—	—
Минорные	—	—	—	—	1600	1600	1600	1600	1600	—	—	—
	1500	1500	—	—	—	—	—	1500	1500	1500	1500	—
	1400	1400	1400	1400	—	—	—	—	—	—	1400	1400
	1300	1300	900	900	1300	1300	1300	—	—	—	1300	1300
	500	500	800	800	900	900	900	850	850	800	800	—
	250	250	500	500	800	800	800	—	—	—	—	—
	700	700	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

значение для определения источника инфекции при эпидемиологическом анализе. Результаты геноидентификации кампилобактерий одного серовара приведены на рис. 2.

Следовательно, с использованием REP-праймеров можно проводить предварительную геноидентификацию кампилобактерий. ПЦР-профили каждого конкретного штамма, хотя и характеризуются некоторой вариабельностью, все же достаточно специфичны и позволяют идентифицировать различия внутривидовой изменчивости (ПЦР-серотипы).

Необходимо также отметить, что описанный способ ПЦР-геноидентификации кампилобактерий занимает 3,5—4 ч, выполняется на неочищенных клеточных лизатах, иногда на интактных микробных клетках и даже непосредственно в биологических субстратах, выделенных от больного в десятках параллельных проб.

Выводы. 1. ПЦР-генотипирование с универсальными REP-праймерами можно использовать в качестве экспертного теста видовой и сероваровой идентификации штаммов *C. jejuni*.

2. При помощи ПЦР-генотипирования установлены пять ПЦР-типов среди кампилобактерий одного серовара по Н. Liog. Это позволяет повысить качество эпидемиологического анализа при возникновении вспышек кампилобактериозной инфекции.

Д. Л. Кирик, Л. М. Бур'яновський, Е. О. Шабловська, І. В. Пінчук, Н. М. Кролевецька, В. І. Кікот

Підходи до геноідентифікації видів бактерій роду *Campylobacter* за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з універсальними праймерами

Резюме

В роботі розглянуто підходи до розробки методу геноідентифікації бактерій роду *Campylobacter* на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням універсальних олігонуклеотидних праймерів — REP (repetitive extragenic palindromic sequences). Для всіх штамів виду *C. jejuni* була характерна наявність ПЛР-продукту розміром 600 п. н. Виявлено п'ять груп ПЛР-сероварів у штамів *C. jejuni* одного серовару (Lio 32), що різняться за мінорними фрагментами. Це може бути важливим для встановлення джерела інфекції при епідеміологічному аналізі.

D. L. Kirik, L. N. Burianovsky, E. A. Shablovskaya, I. V. Pinchuc, N. M. Krolevetskaya, V. I. Kikot

Approaches to gene identification of *Campylobacter* genus bacteria by polymerase chain reaction with universal primers

Summary

Preliminary studies on development of gene identification method of *Campylobacter* genus bacteria on the base of polymerase chain reaction (PCR) with using universal oligonucleotide primers — REP (repetitive extragenic palindromic sequences). For all strains of *Campylobacter jejuni* PCR-product was peculiar 600 pairs of nucleotides. Five group of PCR-serovars in strains *C. jejuni*, one serovar (Lio 32) differed on minor fragments. It can be of importance for definition of infection source while epidemic analysis.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fox J. G., Taylor N. S., Penner J. L. et al. Investigation of xoonotically acquired *Campylobacter jejuni* enteritis with serotyping and restriction endonuclease DNA analysis // J. Clin. Microbiol.—1989.—27, N 11.—P. 2423—2425.
2. Nachamkin I., Bohachick K., Patton C. M. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis // Ibid.—1993.—31, N 6.—P. 1531—1536.
3. Giesendorf B. A. J., Belkum A., Koeken A. et al. Development of speciens-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting // Ibid.—P. 1541—1546.
4. Султанов Г. В., Черкасский Б. Л., Навамин С. М. и др. Новая среда для диагностики кампилобактериозов // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. шестой краевой науч. конф.— Ставрополь, 1987.—С. 276—278.

5. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза.— М., 1989.—25 с.
6. Lior H., Woodward D. L. Edgar et al. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by stide agglutination based on heat-labile antigenic factors // J. Clin. Microbiol.—1982.—15.—P. 761—768.
7. Higgins C. F., Ames G. F.-L., Barnes W. M. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons // Nature.—1982.—298.— P. 760—762.
8. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequences in enbacteria and application to finger-printing of bacterial genomes // Nucl. Acids Res.—1991.—19.—P. 6823—6831.
9. Ausubel F. M. Current protocols in molecular biology.—New York: Wiley, 1987.—P. 241.
10. Chen W.-P., Kuo P. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 9.—P. 2260.

УДК 579.61:579.22

Поступила в редакцию 08.06.95