УДК 579.8.06

Новый метод высокоразрешающего геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий

А.С. Исаева, Е.Е. Куликов, К.К. Тарасян, А.В. Летаров*
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2
*E-mail: letarov@gmail.com

РЕФЕРАТ **Нами разработана оригинальная система геномного ПЦР-фингерпринтинга для дифференциации штаммов энтеробактерий, использующая единственный олигонуклеотид, специфичный к инвертированным терминальным повторам инсерционного элемента IS1 (IS1-профилинг). Эта система обладает большей разрешающей способностью, чем широко применяемый метод BOX-ПЦР; она позволяет дифференцировать близкородственные штаммы, идентичные по профилям BOX-ПЦР и риботипам, но различающиеся по чувствительности к фагам. По сравнению с аналогами наша система значительно менее чувствительна к качеству используемого оборудования и материалов. В то же время система BOX-ПЦР является более универсальной и пригодна для группировки штаммов и установления их ближних филогенетических отношений. Таким образом, предложенная нами система IS1-фингерпринтинга энтеробактерий является существенным дополнением к существующему инструментарию молекулярной дифференциации энтеробактерий, позволяющим решать задачи, связанные с детализированным исследованием высокогетерогенных и быстро эволюционирующих естественных популяций этих бактерий, в т.ч. в ходе работ по экологии колифагов.**

Однако некоторые штаммы не могут быть надежно дифференцированы с помощью IS1-профилинга из-за малого количества полос в паттернах, генерируемых на матрицах их ДНК. Для улучшения технических характеристик системы нами предложена модификация системы с использованием дополнительного праймера TR8834, специфичного к нуклеотидной последовательности гена транспозазы, распространенного в геномах колиформных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **геномный фингерпринтинг, ПЦР-фингерпринтинг на целых клетках, инсерционный элемент, разнообразие энтеробактерий, дифференциация штаммов.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **IS – инсерционная последовательность (insertion sequence), ERIC – энтеробактериальная повторяющаяся интрагенная последовательность (enterobacterial repetitive intergenic consensus), REP – повторяющаяся экстрагенная палиндромная последовательность (repetitive extragenic palindromic sequence), dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфат (deoxyribonucleotide triphosphate), OTUs – операционные таксономические единицы (operational taxonomic units).**

ВВЕДЕНИЕ

Тело человека и животного содержит значительное количество различных экологических ниш, колонизированных разнообразными популяциями микроорганизмов и их вирусов, составляющими нормальную микрофлору. Для многих видов микробов тело животного или человека является если не единственным, то основным местом обитания [1], но возможно и присутствие нетипичных микроорганизмов [4]. Кишечник животных относится к наиболее плотно колонизированным участкам тела, и здоровье животного или человека напрямую зависит от состава и состояния его кишечной микрофлоры [2]. Одним из наиболее общих для всех млекопитающих животных кишечным микроорганизмом являются *Escherichia coli* – кишечная палочка и родственные ей энтеробактерии, способные в некоторых случаях вызывать миграторные бактериальные заболевания у животных [2].

В настоящее время роль условно-патогенных индигенных микроорганизмов в инфекционной патологии животных оценивается как весьма значительная. Поскольку многие существенные физиологические и биохимические свойства (чувствительность к фагам, антибиотикорезистентность, продукция токсинов и др.) микроорганизмов являются штаммовыми признаками, необходимы системы, способные надежно дифференцировать микробы на основании их принадлежности к той или иной генетической линии. Анализ популяционных событий, происходящих в природных микробных системах с высокой плотностью жизни, например в толстом кишечнике животных, важен также и для фундаментальных исследований по экологии симбиотических микробных сообществ. Поэтому существует потребность в простых и дешевых молекулярных методах дифференциации штаммов бактерий, пригодных для массового анализа изолятов и в то же время обладающих высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью.

Существующие в настоящее время методы типирования штаммов микроорганизмов, основанные на определении фаговой чувствительности и антибиотикорезистентно-

сти, имеют характерные и труднопреодолимые недостатки. Например, фаготипирование бактерий – это весьма трудоемкий и материалоемкий процесс, не пригодный для массового скрининга изолятов, требующий создания и поддержания типирующих коллекций бактериофагов, что сложно осуществимо в виду огромного штаммового разнообразия индигенной флоры [5, 6, 11, 12, 16]. Гены резистентности к антибиотикам зачастую содержатся в плазмидах, легко теряющихся или приобретаемых в ответ на изменения окружающей среды и на появление новых штаммов микроорганизмов в системе, что вызывает вопросы о стабильности ряда «классических» фенотипических признаков для различных штаммов и зависимости факторов резистентности от состояния окружающей среды [11].

Для молекулярной дифференциации штаммов в настоящее время широко используются универсальные системы ДНК-фингерпринтинга, такие как риботипирование и ПЦР-анализ повторяющихся экстрагенных BOX (rep-ПЦР) и интрагенных (ERIC) последовательностей геномной ДНК [11, 16]. BOX-фингерпринтинг с праймером BOXA1R, специфичным к нуклеотидной последовательности локуса boxA, так же как и ERIC-ПЦР, применяется для определения источников загрязнения воды, для классификации изолятов *E. coli*, выделенных из сточных вод, фекалий лошадей, коров и собак [5, 12]. Сравнительно высокое (70 %) содержание GC-пар в праймерах для BOX и ERIC-ПЦР [10, 11] приводит к тому, что при используемой температуре отжига (52 ^{0}C) эти праймеры могут гибридизоваться и инициировать синтез ДНК с частично комплементарной последовательности нуклеотидов. Такой неспецифический отжиг праймеров нестабилен, сильно зависит от температуры, следовательно, высокочувствителен к незначительным отклонениям от режима амплификации, что делает результаты сильно зависящими от качества используемого ДНК-амплификатора. Метод может быть усовершенствован путем повышения температуры отжига, однако тогда параметры BOX и ERIC-ПЦР утрачивают свою универсальность, и праймеры должны быть оптимизированы для каждого рода бактерий в отдельности [10]. Эти особенности делают затруднительным сравнительный анализ профилей BOX и ERIC, полученных различными исследователями и в различных сериях.

Риботипирование аутоштаммов *E.coli* основано на объединении штаммов в группы (риботипы) по признаку общности последовательностей генов 16S рРНК, которые являются универсальными генетическими маркерами [4]. Варианты этого метода включают системы с анализом профилей гидролиза ПЦР-амплифицированного гена 16S рРНК эндонуклеазами рестрикции и системы с секвенированием этих же амплификатов. Гены, кодирующие рРНК, весьма консервативны внутри каждого вида бактерий, что делает практически невозможной внутривидовую дифференциацию. Этот метод не обладает достаточной для вышеизложенных целей разрешающей способностью, зачастую не позволяет получать информацию о таксономическом положении исследуемого микроорганизма глубже видовой принадлежности, равно как и затруднителен с технической точки зрения (стоимость исследования, количество стадий, интерпретация получаемых данных [5]).

Целью нашей работы было создание надежного и удобного в использовании универсального молекулярного метода экспресс-дифференциации штаммов энтеробактерий, основанного на ПЦР-амплификации последовательностей их геномной ДНК, и апробация нового метода на изолятах, выделенных из реальной микробной системы кишечника животного.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение штаммов колиформных бактерий. Пробы фекалий лошадей отбирали немедленно после дефекации в стерильные пластиковые контейнеры и сохраняли при температуре -70 ^{0}C до обработки. Для выделения колиформных бактерий отбирали пробу массой 15–20 г, размораживали при комнатной температуре в течение 30 мин и добавляли к ней физиологический раствор в соотношении 1 : 4 (вес : объем). Инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре на шейкере для суспензирования микроорганизмов. Далее проводили посевы в разведении 1 : 100 и 1 : 1000 на селективную для энтеробактерий среду LTA следующего состава: бакто-триптоза (Difco, США) – 20 г, лактоза – 5 г, NaCl – 5 г, K_2HPO_4 (безводный) – 2.75 г, KH_2PO_4 (безводный) – 2.75 г, додецил-сульфат натрия – 0.1 г, дистиллированная вода – до 1000 мл, pH 6.8.

По 20 выросших на чашках со средой LTA колоний аутоштаммов колиформных энтеробактерий из 3 разных образцов перекалывали зубочистками на чашки со средой LB: триптон (Amresco, Испания) – 10 г, дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5 г, NaCl – 5 г, бакто-агар (Difco, США) – 15 г, дистиллированная вода – до 1000 мл.

Приготовление матриц для постановки ПЦР. В стерильные пробирки Eppendorf добавляли по 100 мкл деионизованной воды. Кончиком бактериальной петли переносили часть бактериальной колонии в пробирку, инкубировали в течение 20 мин в термостате Eppendorf Termostat 5320 при температуре +95 ^{0}C, перемешивали на смесителе Vortex, центрифугировали 1 мин при 13000 rpm на настольной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5414. Супернатант использовали в качестве матрицы.

IS1-фингерпринтинг. Созданный нами праймер IS1tr (Golomidova et al., 2007) имеет следующую последовательность нуклеотидов: (5'ATCAGTAAGTTGGA(G/A)(T/G) CATTACC -3') и отжигается на инвертированные концевые повторы IS1-элементов. ПЦР-смесь (20 мкл) содержала: 67 мМ Tris-HCl (pH 8.3), 17 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.001 % Tween 20, 2.5 мМ $MgCl_2$, 25 пкм праймера IS1tr, 0.2 мМ dNTP и 1.25 единицы *Taq* полимеразы (Sigma) и 1 мкл исследуемой матрицы. ПЦР проводилась в Mini Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) и в циклерах предыдущих поколений Терцик («ДНК-Технология») и Perkin-Elmer Cetus (Perkin-Elmer).

Параметры программы были следующими: денатурация при 94 $^\circ$C – 30 с; далее 30 циклов, включающих инкубацию при 94 $^\circ$C, – 15 с, 56 $^\circ$C – 30 с и 72 $^\circ$C – 45 с, завершающая стадия проходила при 72 $^\circ$C – 2 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле.

Для улучшения параметров дифференциации штаммов (см. раздел «Результаты и обсуждение») в ряде реакций использовали также следующие разработанные нами праймеры: IS2tr (5'-CAGATGTCTGGARATWYAGGGG-3'), IS3tr-L (5'- CCATATTACGTGGGTAGGATCA-3'), IS3tr-R (5'-CCACTATTGCTGGGTAAGATCA-3'),

IS4tr (5'-TSCTTAACTGACTGGCATTA-3'), IS5tr (5'SSRCTTRTTCGCACCTTCC-3'), IS30tr (5'-TGTTGCRTTGACMRATTGAATCTACA-3'), TR8D (5'- ATGCACGTCATACTCTTTTTT-3'), TR8R (5'AAGAGTATGACGTGCATCCTA-3'), TR8834 (5'-ATCGGCGATGCGTTGACGAAT-3').

Rep-ПЦР. BOX-фингерпринтинг осуществлялся, как это описано авторами метода [15]. Для постановки реакции использовали праймер BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'). В остальном реакционная смесь имела тот же состав, что и для IS1-ПЦР, однако программа амплификации существенно отличалась. Реакция начиналась с прогрева смеси при 95 °C – 2 мин, далее 30 циклов инкубации при 94 °C – 3 с, 92 °C – 30 с, 50 °C – 1 мин, 65 °C – 8 мин и завершающая стадия – 8 мин при 65 °C, полная программа в 30 циклов занимала около 7 ч. Детекцию результатов ПЦР проводили описанным выше стандартным способом.

Риботипирование аутоштаммов E.coli. Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием универсальных для эубактерий праймеров 27F (5'-AGA GTT GAT CMT GGC TCA G -3') и 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [4]. Для гидролиза продуктов амплификации использовали рестриктазы Hind III и Hae III (Fermentas. Литва) Анализ результатов рестрикции проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Оценку чувствительности изолятов колиформных бактерий к фагам проводили двуслойным методом Грациа на среде LB. В качестве верхнего агара использовали среду LB с 0.6 % бакто-агара.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как нами была поставлена цель создания надежной и удобной ПЦР-системы высокоразрешающего геномного типирования штаммов колиформных бактерий, очевидной являлась и необходимость тестирования новой системы на сериях полевых изолятов колиформных бактерий. Таким образом, объектом для исследования послужили индигенные энтеробактерии, выделенные из образцов фекалий трех лошадей. Из общего числа колоний, выросших на селективной для энтеробактерий среде LTA, было отобрано 80 различных клонов.

Система IS1-фингерпринтинга. Нами была разработана оригинальная система геномного ПЦР-фингерпринтинга [6]. Реакция выполняется на целых клетках, разрушенных нагреванием, без предварительного выделения ДНК. В ней используется только один олигонуклеотид, отжигающийся на инвертированных терминальных повторах инсерционного геномного элемента IS1, наиболее широко представленного в геноме энтеробактерий [3], причем 3'-конец праймера направлен вовне элемента. Таким образом, происходит амплификация ДНК, находящейся между копиями элемента IS1 и/или присутствующими в геноме сайтами потенциальной гибридизации праймера, не связанными с копиями IS1, которые, возможно, являются остатками утраченных инсерционных элементов. Длина получаемых в реакции продуктов специфической амплификации определяется взаимным расположением IS-элементов и (или) других сайтов гибридизации праймера в хромосоме бактерии и лимитируется максимально возможной длиной фрагмента, синтезируемого в данных условиях ПЦР. Продукты, получаемые в ходе реакции, могут быть разделены и проанализированы обычным ДНК-электрофорезом в агарозном геле [6].

Анализ результатов ПЦР с праймером IS1 показал, что для каждого исследованного аутоштамма колиформных бактерий характерен определенный паттерн полос ПЦР-продукта. Все получаемые полосы хорошо разделяются в агарозном геле. Их число в среднем составляет от двух до десяти, что упрощает процесс сравнения спектров между собой для выявления идентичных или близкородственных IS1-профилей. Так, например, среди аутоштаммов, выделенных из первого образца фекалий, обнаружено 2 идентичных профиля (*рис. 1*, дорожки 12, 19), а среди выделенных из второго образца – 2 пары идентичных спектров (*рис. 1*, дорожки 28, 31; дорожки 37, 39). Кроме этого, можно отметить 2 одинаковых паттерна между аутоштаммами из первого и второго образца фекалий (*рис. 1*, дорожки 20, 30).

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ IS1-ФИНГЕРПРИНТИНГА

Проверка устойчивости амплификации геномной ДНК-матрицы к различным физико-химическим факторам показала, что прогревание матрицы при 100 ^{0}C в течение 10 мин не оказывает влияния на результат IS1-фингерпринтинга по сравнению с контролем, таким образом, возможные отклонения от режима прогрева при приготовлении образцов не будут иметь существенного влияния на результат. Можно отметить, что матрицы на протяжении всего эксперимента (около 3 мес.) хранились в морозильной камере и часто подвергались оттаиванию и замораживанию – качество и количество ПЦР-продукта IS1-фингерпринтинга

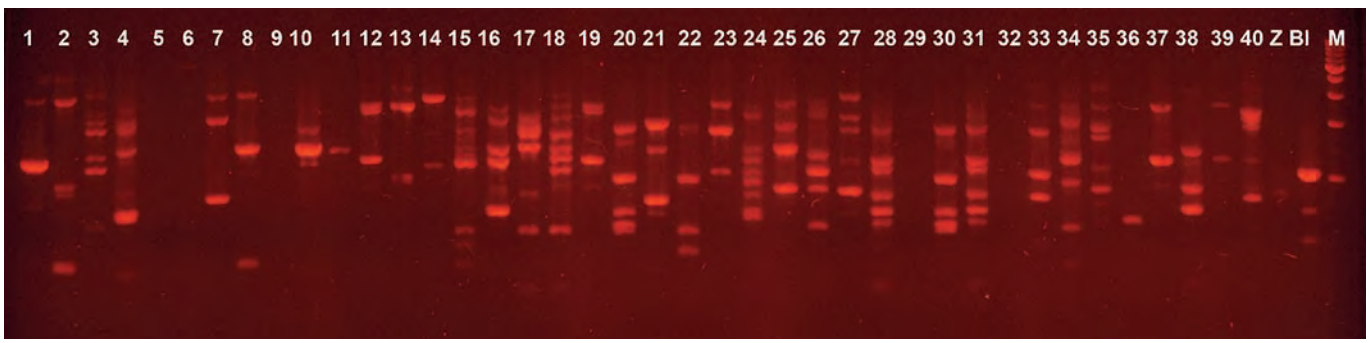


Рис. 1. IS1-фингерпринтинг полевых изолятов колиформных бактерий. Дорожки 1–20 – штаммы, полученные из образца фекалий № 1. Дорожки 21–22 – штаммы, полученные из образца фекалий № 2. Z – *E.coli Z85;* Bl – *E.coli BL21.* Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

при этом не менялось, равно как не менялся и получаемый паттерн полос. Вместе с тем следует отметить, что внесение чрезмерно большого количества лизированной нагревом биомассы бактерий может приводить к ингибированию ПЦР, что требует постановки положительного контроля в каждой серии матриц с использованием штамма, заведомо дающего специфический паттерн.

Для проверки стабильности IS1-фингерпринта в ряду поколений был проведен следующий эксперимент: был выбран аутоштамм с легко читаемым IS1-паттерном, который затем провели через 5 последовательных пассажей в жидкой среде LB. Разведения культуры из первого и последнего пассажей были рассеяны шпателем на чашках с твердой средой LB для получения отдельных колоний. IS1-ПЦР случайной выборки клонов (по 20 шт.) показал отсутствие изменений в паттернах субклонов по сравнению с исходным штаммом (*рис. 2*). Различная интенсивность отдельных полос ДНК после гель-электрофореза связана с ненормированным количеством матрицы в ПЦР. Отсутствие различий между геномными паттернами исходного штамма и его потомков при небольшом числе генераций (около 50) делает предлагаемую систему пригодной для долгосрочных исследований динамики численности отдельных бактериальных штаммов в экотопах кишечника и в других системах.

Система IS1-фингерпринтинга работает одинаково хорошо как в амплификаторе производства компании BIO-RAD (MJ mini Personal Thermal Cycler), так и в широко распространенном в России приборе «Терцик» компании «ДНК-Технология». Для постановки реакции в отечественном приборе «Терцик» необходимо добавление минерального масла поверх ПЦР-смеси во избежание испарения компонентов. Как выход ПЦР-продукта, так и получаемые паттерны полос вполне совпадают. Использование различных видов полимераз *Taq* и *Pfu*, а также их смеси не повлияло на результат (данные не приведены). Таким образом, кинетические характеристики приборов для проведения ПЦР-амплификации не имеют определяющего значения для получаемого результата, что представляется преимуществом перед существующими альтернативными системами штаммового типирования микроорганизмов, такими как BOX-ПЦР, более требовательными к качеству используемого оборудования и реактивов. Самый первый коммерчески доступный ПЦР-амплификатор Perkin-Elmer Cetus (год выпуска — 1989) дал сходный выход и идентичный паттерн полос ПЦР-продуктов.

Сравнительная характеристика методов IS1-фингерпринтинга, BOX-фингерпринтинга и риботипирования энтеробактерий. Новый метод геномного IS1-фингерпринтинга мы сравнивали с уже существующими методами молекулярного BOX-фингерпринтинга и риботипирования. Для этого были использованы те же ДНК-матрицы, что и для IS1-ПЦР, и рекомендованные авторами метода [15] сложные оптимизированные программы амплификации. Анализ результатов BOX-ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле показал, что амплифицированные фрагменты ДНК слабо разделяются, и их число составляет в среднем от 15 до 20 полос, что затрудняет поиск идентичных профилей без использования специального программного обеспечения. Выход ПЦР-продукта получается меньше, чем при IS1-ПЦР. При оценке профилей были выявлены 4 идентичные группы (по 2–7 профилей) среди аутоштаммов, выделенных из третьего образца фекалий (*рис. 3*). Таким образом, дискриминирующая способность этой системы, равно как и ее чувствительность, оказываются ниже, чем у предложенной нами системы.

Проведение риботипирования оказалось наиболее трудоемким и требующим материальных затрат процессом по сравнению с ПЦР-системами – BOX- и IS1-фингерпринтингом. Этот метод включает в себя как ПЦР-амплификацию необходимого участка ДНК, так и последующий ферментативный гидролиз обессоленного ПЦР-продукта. Полученный результат не дал возможности выделить отдельные группы в пределах данной серии полевых изолятов *E.coli*, что свидетельствует о низкой разрешающей способности метода. Это связано с консервативностью последовательности гена 16S рРНК у отдельных штаммов одного вида бактерий, равно как и с неполным учетом возможных мутаций локуса – при рестрикционном анализе оказывается возможным обнаружить только мутации, затрагивающие тот или иной сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, анализа всей последовательности, таким образом, не происходит. Альтернативой рестрикции в этом случае может служить секвенирование ДНК – дорогой и медленный метод исследования.

Использование IS1-ПЦР для различения близких штаммов, отличающихся по чувствительности к бактериофагам. Восприимчивость к инфицированию отдельными расами фагов является одним из наиболее динамичных свойств бактерий, быстро эволюционирующим как в естественных, так и в лабораторных микробных сообществах. Для того чтобы определить, достаточна ли разрешающая способность

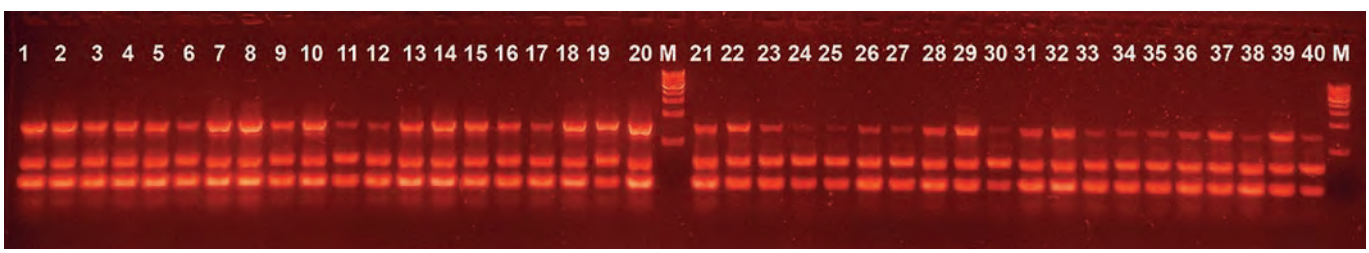


Рис. 2. Проверка стабильности IS1-профиля при пассировании штамма в жидкой среде. Отсутствие клональной изменчивости между субклонами исходного штамма (дорожки 1–20) и его субклонами, полученными после серии из 5 пассажей в жидкой культуре (дорожки 21–40). Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

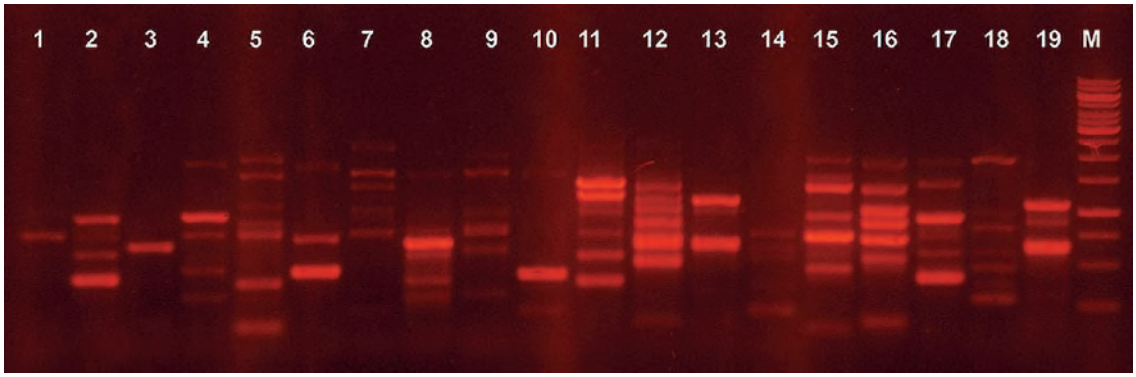


Рис. 3. BOX-фингерпринтинг. Штаммы колиформных бактерий, выделенные из образца фекалий № 3. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

системы IS1-фингерпринтинга для надежного различения близкородственных природных изолятов, различающихся по чувствительности к фагам, присутствующим в тех же сообществах, нами был поставлен следующий эксперимент.

Были выбраны четыре пары аутоштаммов энтеробактерий, выделенных из фекалий лошади: 2 пары идентичных по IS1-профилям (в то же время они имеют одинаковые BOX-профили) и две – идентичных по профилям BOX-ПЦР. Эти аутоштаммы были протестированы на чувствительность к панели из 20 различных по специфичности фагов, ранее выделенных из фекалий лошадей в нашей лаборатории [6]. Зоны фагового лизиса были обнаружены только у изолятов, идентичных по IS1-профилям под действием колифагов № 12 и 17. Следующим шагом было выделение собственных фагов из тех же образцов фекалий, из которых ранее были высеяны исследуемые аутоштаммы энтеробактерий. Было проведен посев экстрактов фекалий на газоны исследуемых штаммов двуслойным методом на среде LB, в результате которого было отобрано 200 фаговых бляшек. Каждый аутоштамм был протестирован на чувствительность к этой выборке фагов. Эксперимент показал, что штаммы, имеющие идентичные профили по BOX-ПЦР, обладают разной чувствительностью к данной выборке фагов и, что интересно, имеют различные IS1-профили. При этом штаммы, идентичные по IS1-профилям, проявляют одинаковую чувствительность к бактериофагам.

Штаммы колиформных бактерий, не дающие ПЦР-продукта с нашей системой, относительно редки и составляют в образцах высокогетерогенных сообществ фекалий лошадей лишь 5–10 % от всех проанализированных штаммов. Однако штаммы, дающие небольшое количество полос, иногда не могут быть дифференцированы с достаточной уверенностью.

Для того чтобы увеличить количество полос в паттерне и тем самым улучшить дифференцирующую способность системы, нами были разработаны праймеры, специфичные к инвертированным концевым повторам других, менее распространенных в геноме колиформных бактерий, инсерционных элементов (IS2, IS3, IS4, IS5, IS30), а также праймеры TR8D, TR8R и TR8834, комплементарные последовательностям нуклеотидов в гене транспозазы, который представлен значительным числом копий в геномах многих штаммов *E.coli*.

Постановка ПЦР с этими праймерами проводилась согласно методике, описанной выше. Реакции были поставлены с различными комбинациями олигонуклеотидов, однако наилучший результат был получен при использовании одновременно праймеров IS1 и TR8834. Аутоштаммы, дававшие при IS1-фингерпринтинге 2–3 полосы на электрофорезе ПЦР-продукта (*рис. 4*), после ПЦР с парой праймеров IS1+TR8834 могли быть намного легче дифференцированы благодаря паттернам из 5–7 полос (*рис. 5*). Программа ПЦР с данной комбинацией праймеров не отличается от программы использованной для IS1-фингерпринтинга. Мы сравнили усовершенствованную систему с BOX-ПЦР и методом риботипирования, поставив реакции с теми же матрицами, и убедились в преимуществе ее использования перед этими методами.

Столь высокая разрешающая способность системы маскирует более дистантное родство все же генетически родственных штаммов. Это обстоятельство делает практически невозможным классификацию профилей IS1 фингерпринтинга на операционные таксономические единицы (OTUs) или построение на их основе филогенетических деревьев,

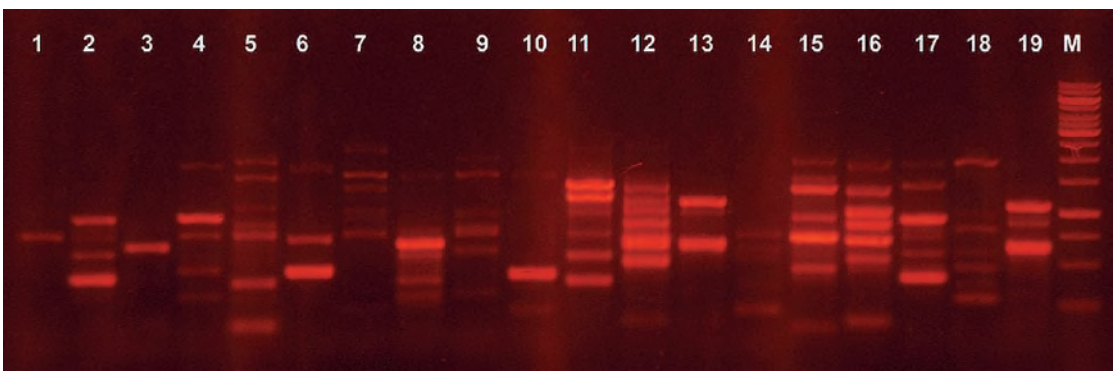


Рис. 4. IS1-фингерпринтинг. Штаммы, идентичные штаммам с рис. 3. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

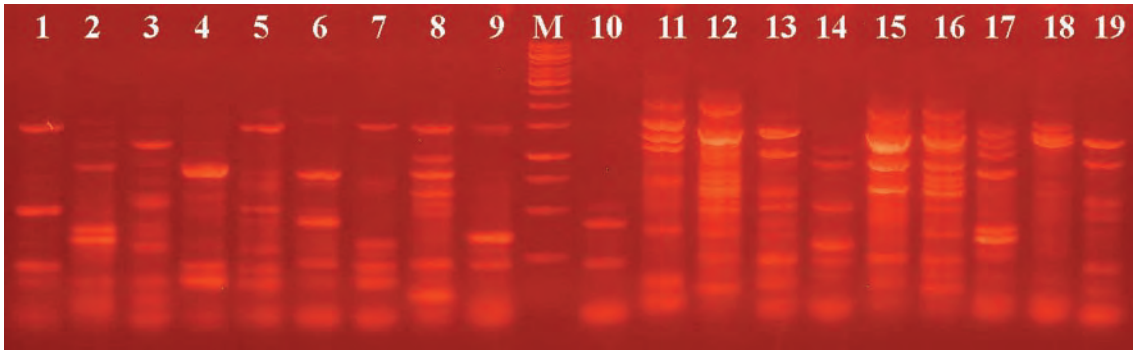


Рис. 5. Фингерпринтинг с праймерами IS1 и TR8834. Штаммы, идентичные штаммам с рис. 3, 4. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

как это принято при использовании других систем ПЦР-фингерпринтинга – таких как ERIC-ПЦР [9] или BOX-ПЦР. Это ограничивает применимость нашей системы для ряда приложений, таких как поиск санитарно-показательных штаммов энтеробактерий, указывающих на источник фекального загрязнения [5]. Кроме того, IS1-профилинг, ориентированный на энтеробактерии группы кишечной палочки, является менее универсальным по спектру исследуемых микробов, чем вышеперечисленные системы. Несмотря на введенные нами усовершенствования, имеется определенная небольшая доля штаммов, нетипируемых нашим методом (ПЦР- амплификация отсутствует).

В то же время высокая разрешающая способность разработанной нами системы, сравнимая с фаготипированием, делает ее «методом выбора» при исследовании микроэкологии бактериофагов энтеробактерий в естественных микробных системах, таких как кишечник животных или сточные воды. В таких местообитаниях часто создаются условия, способствующие быстрой совместной микроэволюции фагов и их хозяев, что приводит к необычно высокой степени гетерогенности популяций бактерий на штаммовом уровне [14, 20]. В результате даже близкородственные штаммы могут существенно различаться по чувствительности к присутствующим в экосиситеме бактериофагам [6, 8]. Очевидно, что высокая разрешающая способность системы, наряду с отличной воспроизводимостью результатов, могут быть крайне полезны и для целого ряда других задач, например, при прослеживании эпидемиологических цепочек распространения штаммов патогенных энтеробактерий среди людей или животных.

ВЫВОДЫ

Таким образом, предложенная нами система быстрого геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий является существенным дополнением к существующему инструментарию молекулярной дифференциации энтеробактерий, позволяющим решать задачи, связанные с детализированным исследованием высокогетерогенных и быстро эволюционирующих естественных популяций этих микробов. ●

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0313), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-01482-а) и программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч. 1. Общая микробиология // М.: КолосС, 2006. С. 124–129.
2. Berg R.D. The indigenous gastrointestinal microflora // Trends in Microbiology. 1996. Vol. 4. № 11. P. 430–435.
3. Blot M. Transposable elements and adaptation of host bacteria // Genetica. 1994. 93. P. 5–12.
4. Daly K., Stewart C.S., Flint H.J. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes // FEMS Microbiology Ecology. 2001. № 38. P.141–151.
5. Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerly S.T. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources // Applied and Environmental Microbiology. 2000. V. 66. № .6. P. 2572–2577.
6. Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A., Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // Applied and Environmental Microbiology. 2007. V. 73. №.19. P. 5975–5981.
7. Hartl D.L., Boyd E.F. Nonrandom location of IS1 elements in the genomes of natural isolates of *Escherichia coli* // Molecular Biology and Evolution. 1997. 14. P. 725–732.
8. Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their *Flavobacterium* hosts // Applied and Environmental Microbiology. 2007. 73. P. 6730–6739.
9. Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* and other enterobacteria // Molecular Microbiology. Apr. 1991. V. 5. № 4. P. 825–834.
10. Johnson J.R., Clabots C. Improved repetitive – element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Mar. 2000. P. 258–264.
11. Johnson J.R., O'Bryan T.T. Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli* // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 2000. P. 265–273.
12. Johnson L.K., Brown M.B., Carruthers E.A. Sample size, Library composition, and Genotipic Diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determing sources of fecal pollution // Applied and Environmental Microbiology. 2004. P. 4478–4485.
13. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In «Nucleic acid techniques in bacterial systematics» // Stackebrandt E. and Goodfellow M. (eds.), United Kingdom, Chichester, John Wiley and Sons. 1991. P. 115–147.
14. Poullain V., Gandon S., Brokhurst M.A., Buckling A., Hochberg M.E. The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage.// Evolution. 2008. V. 62. № 1. P. 1–11.
15. Rademarker J.L.W., and de Bruijn F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computerassisted pattern analysis. In «DNA markers: protocols, applications, and overviews» // Caetano-Anolles G. and Gresshoff P.M. (eds.). New York, 1997. P. 151–171.
16. Seurinck S., Verstraete W., Siciliano S.D. Use of 16S – 23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources // Applied and Environmental Microbiology. 2003. P. 4942–4950.
17. Shapiro J.A. Mobile genetic elements // Academic Press, Inc. New York, 1983. P. 192.
18. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic Acids Res. 1991. 19. P. 6823–6831.
19. Vizvaryova M., Valkova D. Transposons – the useful genetic tools // Biologia. Bratislava. 2004. 59. № 3. P. 309–318.
20. Weitz J.S., Hatman H., Levin S.A. Coevolution arms races between bacteria and bacteriophage // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102. P. 9535–9540.
21. Woods C.R., Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Whole – cell repetitive element sequence – based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates // Journal of clinical microbiology. 1993. P. 1927–1931.