DOI: 10.17117/na.2016.08.01.309

<http://ucom.ru/doc/na.2016.08.01.309.pdf>

Поступила (Received): 27.08.2016

**Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.З., Тюпкина О.Ф.,
Баязитова Л.Т., Ризванов А.А.**

Изучение распространенности однонуклеотидных полиморфизмов гена *isdB* у изолятов *Staphylococcus aureus*

**Tyurin Yu.A., Khayrullin R.Z., Tupkina O.F., Bayazitova L.T., Rizvanov A.A.
The study of the prevalence of SNPs *isdB* gene in isolates of
*Staphylococcus aureus***

*Изучена встречаемость однонуклеотидных полиморфизмов внутренних фрагментов гена *isdB*, кодирующего один из гем связывающих доменов поверхностного белка (*IsdB*) у штаммов *S. aureus* с различными адгезивными свойствами. Показано, что у изолятов с низкой адгезивностью к гемоглобину выявлено большее число замен (мутаций) в области фрагмента гена *isdB*, кодирующего один из доменов *IsdB* белка, содержащего гем связывающие сайты*

*SNPs studied the occurrence of internal *isdB* gene fragments encoding one of a heme binding protein surface domains (*IsdB*) *S. aureus* strains with different adhesive properties. It is shown that isolates with low adhesiveness to hemoglobin revealed a greater number of substitutions (mutations) in *isdB* gene fragment encoding one protein domain *IsdB*, containing a heme binding sites*

Ключевые слова: золотистый стафилококк, полиморфизм гена, адгезия

Key words: *staphylococcus aureus*, gene polymorphism, adhesion

Тюрин Юрий Александрович

Кандидат медицинских наук, зав. лабораторией
Казанский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
Роспотребнадзора;
Казанский государственный медицинский
университет
г. Казань, ул. Большая Красная, 67;
г. Казань, ул. Бутлерова, 49

Tyurin Yuriy Aleksandrovich

Candidate of Medical Sciences, Head of Laboratory
Kazan scientific research institute of epidemiology
and microbiology;
Kazan state medical university
Kazan, Bolshaya Krasnaya st., 67;
Kazan, Butlerov st., 49

Хайруллин Руслан Зуфарович

Кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник
Казанский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
г. Казань, ул. Большая Красная, 67

Khayrullin Ruslan Zufarovich

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
Kazan scientific research institute of epidemiology
and microbiology
Kazan, Bolshaya Krasnaya st., 67

Тюпкина Ольга Феликсовна

Врач-бактериолог

Казанский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
г. Казань, ул. Большая Красная, 67

Tupkina Olga Feliksovna

Physician-bacteriologist

Kazan scientific research institute of epidemiology
and microbiology
Kazan, Bolshaya Krasnaya st., 67

Баязитова Лира Табрисовна

Кандидат медицинских наук, зав. лабораторией

Казанский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
г. Казань, ул. Большая Красная, 67

Bayazitova Lira Tabrisovna

Candidate of Medical Sciences, Head of Laboratory

Kazan scientific research institute of epidemiology
and microbiology
Kazan, Bolshaya Krasnaya st., 67

Ризванов Альберт Анатольевич

Доктор биологических наук, профессор

Казанский федеральный университет
г. Казань, ул. Кремлёвская, 8

Rizvanov Albert Anatolievich

Doctor of Biological Sciences, Professor

Kazan federal university
Kazan, Kremlevskaya st., 8

Ключевая роль в связывании с гемоглобином человека у *S. aureus* принадлежит *IsdB* белку [1-3]. Нами было проведено молекулярно-генетическое исследование гетерогенности фрагментов гена *isdB*, кодирующего один из гем-связывающих доменов NEAT (NEAr Transporter, pfam05031) у клинических изолятов *S. aureus*, различающихся адгезивными свойствами.

Цель исследования – изучить особенности встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов внутренних фрагментов гена *isdB*, кодирующего один из гем связывающих доменов поверхностного белка *IsdB* у клинических изолятов *S. aureus* с различными адгезивными свойствами к полистиролу с иммобилизованным гемоглобином человека.

Экспериментальная часть

Было изучено 48 изолятов *S. aureus*, выделенных с непоражённой кожи здоровых лиц различного возраста за 5 летний период (2006-2011г).

Бактериологические исследования. Идентификацию штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи, проводили стандартными классическими методами и подтверждали дополнительным проведением видовых биохимических микротестов с помощью набора API Staph 20 («bioMérieux SA», Франция) в лаборатории микробиологии ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (зав. лаб. Л.Т. Баязитова). Контроль качества проводили на референс-штаммах *S. aureus* ATCC 29213 и NCTC 8325. Культивирование штаммов *S. aureus* проводили в мясопептонном бульоне (МПБ, Россия) в течение 18 ч. in vitro определяли адгезию изолятов стафилококка, применяя оригинальный способ [4]. Из полученной чистой культуры исследованных штаммов стафилококков выделяли бактериальную ДНК с помощью наборов «ZR Genomic DNA II Kit™».

Молекулярно-генетические методы исследования. Специфические участки *isdB* гена *S. aureus* выявляли методом мультипраймерной полимеразной цепной реакцией (ПЦР), используя оригинальные подобранные праймеры: *isdB-F*: 3-TGCTTCGCTAGAACCTGCTG-5, *isdB-R*: 3- AAYYCCTGCTACAAAACCYAC-5; и специфичные для гена *yqiL* (праймеры из работы [4]): *yqiL-R*: 5-CAGCATACAGGACACCTATTGGC-3, *yqiL-F*: 5-CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC-3. Ген *yqiL* кодирует фермент фосфат-ацетилтрансферазу [КФ 2.3.1.9] и является конститутивным. Синтез праймеров осуществлен в ЗАО «Синтол», Москва, Россия.

Амплификацию исследуемых фрагментов ДНК выполняли, используя 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 mM tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂, по 250 мкМ каждого дНТФ, 2,0U TaqF полимеразы и по 25 нмоль каждого праймера. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 95°C – 3 мин, 30 циклов: 94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин. Продукты амплификации (праймер-специфические ампликоны для гена *isdB* – 157 п.н. и *yqiL* – 393 п.н.) анализировали методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, используя для визуализации интеркалирующий краситель этидиум бромид и маркеры FastRuler Low Range DNA Ladder. Визуализацию и фотосъемку гелей проводили с использованием транслюминатора «Vilber Lourmat», Франция и системы обработки изображений «Биотест-1», Россия. Секвенирование амплифицированных областей гена *isdB*, включая предварительные этапы по выделению и очистке ДНК, были выполнены в ЗАО «Синтол», Москва. Для секвенирования использованы те же праймеры – *isdB-F* и *isdB-R*, что и для амплификации, и тот же протокол программы амплификации.

Методы биоинформационного анализа данных. Анализ и выравнивание последовательностей внутреннего фрагмента гена *isdB* проводили с использованием программы BLASTN v2.2.27+ на сайте NCBI (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bblast.cgi>). Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей проводили с помощью набора статистических функций программы DnaSP v. 5.10.

Результаты и их обсуждение

Методом мультипраймерного ПЦР-анализа выявлены праймер-специфические ампликоны (~157 п.н.) *isdB* гена и праймер-специфические ампликоны (~395 п.н.) гена *yqi* (гена "домашнего хозяйства") у всех 48 изолятов *S. aureus*. Определены показатель адгезии (ИА) *S. aureus* ATCC №25923 к гемоглобину (табл. 1).

Таблица 1. Показатель адгезии (ИА) референс-штамма *S. aureus* ATCC N 25923 к подложке с иммобилизованным гемоглобином

Вид микроорганизма	ИА	
	SD	$M \pm m$ (95% CI)
<i>S. aureus</i> ATCC N 25923	0,06	0,25±0,02 (0,19-0,28)

Методом случайной выборки из 48 изолятов, выделенных с непоражённой кожи здоровых лиц, были сформированы 3 группы в зависимости от адгезивности к полистиролу с иммобилизованным гемоглобином (Hb):

1 группа ($n_1=5$) – изоляты с высокой адгезивностью к гемоглобину, ИА (Hb) > 0,31, (штаммы №, 7, 3, 33, 299, 55);

2 группа ($n_2=5$) – изоляты с низкой адгезивностью к гемоглобину, ИА (Hb) < 0,19 (штаммы № 14, 13, 39, 201, 314);

3 группа ($n_3=6$) – изоляты с типичной адгезивностью к гемоглобину, $0,19 \geq$ ИА(Hb) $\leq 0,31$, (штаммы № 117, 456, 346, 323, 101, 75);

Секвенирование ампликонов фрагментов гена *isdB* выбранных изолятов показало высокую степень гомологии (98,0%) с фрагментом генома штамма *S. aureus* NCTC8325. При анализе однонуклеотидных полиморфизмов в ампликонах фрагментов ДНК клинических штаммов рассчитывали показатель нуклеотидного разнообразия (P_i), характеризующий число нуклеотидных различий на определенном участке между двумя сравниваемыми последовательностями [5]. Установлено, что показатель нуклеотидного разнообразия (P_i) в 1 группе ($n=5$) изолятов с низкой адгезивностью к гемоглобину был выше, чем во 2 и 3 группах с высокой и типичной адгезивностью к гемоглобину (табл. 2).

Таблица 2. Показатель нуклеотидного разнообразия (P_i) ампликонов *isdB* гена *S. aureus*

Фенотип, группа	P_i (M±SD)	Число мутаций, Eta	Число нуклеотидных последовательностей	Число нуклеотидов
Типичный, 3	0,011±0,002 ³⁻¹	5	6	157
Низкий, 1	0,020±0,004*	7	5	157
Высокий, 2	0,012±0,002	4	5	157

* $p<0,001$, ³⁻¹ $p>0,05$, $t=2,26$

Установлено, что у изолятов с низкой адгезивностью к гемоглобину выявлено большее число замен (мутаций) в области фрагмента гена *isdB*, кодирующего один из доменов *IsdB* белка, содержащего гем связывающие сайты.

Число полиморфных однонуклеотидных участков (мутаций) в 1-й группе изолятов было выше и составило 7, по сравнению с группами изолятов с типичной и высокой адгезивностью к гемоглобину, при этом стоп-кодонов выявлено не было.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что выявленные нами генетические особенности штаммов являются, вероятно, основой адаптации бактерий к конкретным биологическим нишам в организме человека, а также могут приводить к изменению некоторых штаммовых характеристик, таких как способность к адгезии и утилизации микроэлементов.

Некоторые молекулярно-генетические исследования проведены на базе НОЦ ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет".

Список используемых источников:

1. Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.З., Салафутдинов И.И. Масс-спектрометрическая идентификация стафилококковых пептидгидролаз // Вестник Казанского технологического университета. 2015. Т. 18. № 16. С. 287-289.
2. Хайруллин Р.З., Тюрин Ю.А., Баязитова Л.Т., Григорьева Т.В. Адгезия штаммов бактерий рода *Staphylococcus* spp. к белкам человека, иммобилизованным на поверхности полистирола // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 23. С. 232-236.
3. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.З. Антибактериальная активность хитозана в отношении энтеробактерий и стафилококков, выделенных у пациентов с дисбактериозом кишечника // Казанский медицинский журнал. 2010. Т. 91. № 5. С. 656-660.
4. Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Мустафин И.Г. Патент РФ № 2393229. Способ определения адгезии *Staphylococcus* spp. к гемопротеинам // Бюл. изобр. № 18 от 27.06.2010.

5. Nei M., Miller J.C. A Simple Method for Estimating Average Number of Nucleotide substitutions within and between populations from restriction data // *Genetics* 1990 125: P. 873-879.

© 2016, Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.З., Тюпкина О.Ф.,
Баязитова Л.Т., Ризванов А.А.

*Изучение распространенности однонуклеотидных
полиморфизмов гена isdB у изолятов Staphylococcus
aureus*

© 2016, Tyurin Yu.A., Khayrullin R.Z., Tupkina O.F.,
Bayazitova L.T., Rizvanov A.A.

*The study of the prevalence of SNPs isdB gene in
isolates of Staphylococcus aureus*