

УДК 577.2:573.6

О.Ю. ЛИМАНСКАЯ^{1,2,*}, Л.А. МУРТАЗАЕВА¹, S. KLEE³, А.П. ЛИМАНСКИЙ¹

¹ ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины”, Харьков, 61057

² Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины Национальной академии аграрных наук Украины”, Харьков, 61023

³ Институт Роберта Коха, Берлин, Германия, D-13353

e-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Молекулярные технологии детекции возбудителя сибирской язвы посредством ПЦР различных форматов

Точная идентификация бактерий *Bacillus anthracis* остается сложной задачей при идентификации возбудителя сибирской язвы на фоне близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* ввиду высокой степени подобия нуклеотидных последовательностей представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* (*Bacillus cereus s.l.*), к которой принадлежат указанные микроорганизмы. В данном исследовании разработаны наборы праймеров и зонды для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с гибридно-флуоресцентной детекцией для отличия бацилл *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis*, а также наборы праймеров для стандартной ПЦР с электрофоретической детекцией. Для представителей группы *Bacillus cereus s.l.* проанализированы нуклеотидные последовательности генов *rpoB*, *plcr* и *ssp*, содержащихся в хромосомной ДНК, которые могут являться молекулярно-генетическими маркерами для их типирования. Мишенью для праймеров и зондов определен фрагмент гена *ssp* хромосомной ДНК, характеризующийся гексануклеотидной вставкой только у штаммов *B. anthracis*. Стандартная ПЦР с электрофоретической детекцией и разработанным набором праймеров позволяет надежно отличать бациллы *B. anthracis* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Использование ПЦР-РВ с зондами в форматах TaqMan и молекулярного маяка также дает возможность проводить точную идентификацию бацилл *B. anthracis*: сигнал флуоресценции для шпичечных проб в формате молекулярного маяка был положительным только для штаммов *B. anthracis*, а для других представителей группы *Bacillus cereus s.l.* — отрицательным. При использовании линейных проб TaqMan регистрировали высокоинтенсивный сигнал флуоресценции для всех изолятов *B. anthracis* и сигнал значительно более низкой интенсивности для других представителей группы *Bacillus cereus s.l.* Разработанные подходы могут быть полезными для клинических, эпидемиологических и эпизоотологических исследований.

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, молекулярный маяк, ПЦР в реальном времени, стандартная ПЦР, *Bacillus anthracis*.

Знания о молекулярных основах многих заболеваний неуклонно обогащаются, что обусловлено развитием биоинформатики, геномики, протеомики, нанотехнологии, а также дальнейшим

прогрессом молекулярной биологии, дисциплин, ставших основой медицинской биотехнологии. Последняя рассматривается правительствами ведущих стран как важнейшее направление научно-

Лиманская Ольга Юрьевна, Муртазаева Людмила Александровна, Klee Silke, Лиманский Александр Петрович.

Список сокращений: ПААГ — полиакриламидный гель; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов.

* Автор для переписки.

технического прогресса, которое может внести весомый вклад в улучшение системы здравоохранения. Благодаря непрерывно возрастающему числу полностью секвенированных геномов патогенов открываются новые перспективы разработки тестов для детекции мутаций, которые появляются при использовании лекарственных препаратов, а также генотипирования и дифференциации патогенов различной природы.

B. anthracis является членом группы *B. cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*), которая включает также *B. thuringiensis*, *B. cereus* и непатогенные *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* и *B. weihenstephanensis*. Эти близкородственные бактерии являются патогенами животных (*B. anthracis* и *B. cereus*) и насекомых (*B. thuringiensis*). Группа *B. cereus s.l.* является одной из наиболее таксономически сомнительных групп бацилл (ввиду необходимости реклассификации некоторых изолятов данной группы). Результаты ДНК—ДНК-гибридизации и электрофореза в пульсирующем поле свидетельствуют о наличии высокой степени сходства нуклеотидных последовательностей геномной ДНК среди бактерий *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и *B. cereus* [1]. Проведенное исследование белков посредством мультилокусного электрофореза показало, что члены этой группы относятся к одному общему роду *Bacillus*.

До недавнего времени считали, что возбудитель сибирской язвы отличается от других представителей группы *B. cereus s.l.* наличием плазмид рХО1 (размер которой составляет примерно 180 т.п.н.) и рХО2 (размер которой — примерно 90 т.п.н.), кодирующих синтез токсина и капсулы, соответственно, которые обуславливают вирулентность бациллы. Отсутствие любой из плазмид ведет к аттенуации штамма [2—4] или значительному уменьшению (хотя и не полному исчезновению) вирулентности.

Несколько лет назад для идентификации бактерий было предложено использовать ген *rpoB*, который кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы. Этот ген рассматривают как своеобразную “подпись” бактерий. Ген *rpoB* является высококонсервативным, и, как минимум, одна его копия присутствует в бактериях, поскольку он играет значительную роль в клеточном метаболизме. Этот ген вместе с геном *rpoC*, кодирующим β' -субъединицу, составляет основу пентамерной бактериальной РНК-полимеразы. Ген *rpoB* благодаря его идентификационному потенциалу был использован при разработке зондов для специфической детекции *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* и *Yersinia pestis*, а также *B. anthracis* [5]. Однако существенным недос-

татком применения данного маркера является получение ложноположительных результатов при проведении ПЦР-анализа с изолятами близкородственных видов *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, а также значительно более отдаленного вида *B. megaterium* [2, 4]. В то же время, анализ таких хромосомных генов, как ген 16SPHK, *gyrB*, рибосомных спейсеров 16S—23S, которые часто применяют для бактериального генотипирования и филогенетического анализа, показал, что они не обладают полиморфизмом, достаточным для отличия *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

В последние годы благодаря значительному финансированию проектов достигнут существенный прогресс в области ранней детекции биологических агентов. Однако информация в патентной литературе, как правило, намеренно представлена общими или неполными данными. Кроме того, соответствующие научные результаты публикуются довольно редко [2], поскольку в некоторых ведущих фирмах это не приветствуется. Например, после известных событий в США с отправкой в почтовых конвертах спор возбудителя сибирской язвы во всех почтовых отделениях страны были установлены системы SmartCycler System (Cepheid, США), аналогичные системе закрытого типа для детекции резистентных к рифампицину микобактерий туберкулеза с использованием варианта ПЦР в реальном времени [6]. Интересно, что представители фирмы Cepheid не раскрывают даже информацию о гене, фрагмент которого является мишенью для амплификации ДНК *B. anthracis* в указанной тест-системе. Поэтому исследования с использованием молекулярно-генетических методов на основе ПЦР с различными модификациями могут иметь как прикладное (диагностическое) значение для защиты от биотерроризма, так и фундаментальное значение — для изучения особенностей организации генома и развития молекулярной медицины и медицинской биотехнологии.

Таким образом, дифференциация *B. anthracis* и филогенетически близких видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* на основе хромосомных маркеров остается по-прежнему актуальной. Известно, что штаммы *B. cereus* и *B. thuringiensis* содержат более половины открытых рамок считывания в составе плазмид рХО1 и рХО2 *B. anthracis* [5, 7]. Относительно недавно показано, что горизонтальный перенос плазмид драматически меняет фенотипические свойства патогена [8]. А в последние годы от человекообразных обезьян получены изоляты *B. cereus*, содержащие обе плазмиды рХО1 и рХО2 [9]. Иными словами, наличие обеих плазмид рХО1 и рХО2 не является признаком, позволя-

ющим отличить штаммы *B. anthracis* от других близкородственных бацилл. Основой для успешной детекции штаммов *B. anthracis* может стать обнаружение специфических для *B. anthracis* хромосомных точечных мутаций, делеций и инсерций.

Целью данной работы было определение маркеров для видоспецифической детекции *B. anthracis* и установления отличий данных бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* на основе компьютерного анализа генов хромосомной ДНК с помощью стандартной ПЦР с электрофоретической детекцией и ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, используя зонды различных форматов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Множественное выравнивание последовательностей ДНК и последующий статистический анализ проводили на основе данных о структуре генов *rpoB*, *gyr*, *ssp* бактерий *B. anthracis* (11 изолятов), *B. cereus* (19 изолятов) и *B. thuringiensis* (19 изолятов) и их фрагментов с помощью лицензионного пакета прикладных программ GeneBee [10], а термодинамический анализ праймеров и ампликонов — с помощью программ MeltCalc [11], Exiqon (Exiqon, Дания; <http://www.exiqon.com>) и Oligo (версия 3.0, США) [12].

Дизайн системы праймеров и зондов был осуществлен по ранее апробированной авторами схеме: множественное выравнивание (для построения филогенетического дерева) → филогенетический анализ (для контроля надежности таксономической классификации анализируемых изолятов) → множественное выравнивание (с целью определения позиций однонуклеотидных полиморфизмов и фрагментов с высокой степенью подобия) [13—17].

ПЦР с электрофоретической детекцией. Стандартную ПЦР проводили на амплификаторе производства НПО “Точность” (Тула, Россия) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация — 95°, 3 мин; денатурация — 95°, 1 мин; отжиг — 60°, 1 мин; синтез — 74°, 1,3 мин; количество циклов — 45. Для проведения ПЦР использовали универсальный набор реагентов для ПЦР (“Изоген”, Россия), в состав которого входит термостабильная ДНК-полимераза, ингибированная антителами, что дает возможность проведения ПЦР с «горячим стартом». Объем реакционной смеси составлял 25 мкл при концентрации праймеров 0,5 мкМ. Синтезированные праймеры были очищены путем электрофореза в ПААГ (ЗАО “Синтол”, Россия).

Для амплификации фрагмента гена *sspE* *B. anthracis* использовали набор праймеров Banssp7A — Banssp8, их последовательности и позиции в гене приведены в таблице.

Праймеры и зонды для детекции фрагмента гена *ssp* у представителей группы *B. anthracis sensu lato* посредством ПЦР с электрофоретической детекцией (Banssp7A—Banssp8) и ПЦР в реальном времени

Праймер/зонд	Положение праймера в гене <i>ssp</i> , п.н.	Последовательность
Banssp7A	1—29	5'-gga ggt gag aaa gat gag taa aaa aca ac-3'
Banssp8	200—175	5'-aac tag cat ttg tgc ttt gaa tgc ta-3'
Banssp9	98—123	5'-gcgactgaacaatgtacaagcagt-3'
Banssp10	230—203	5'-cgtctgtttcagttgcaattctgtacc-3'
Линейный зонд	156—180	5'-FAM-cgcaagcttctggtgctagcattcaaacg-3'-RTQ1
Шпилечный зонд	962—944	5'-FAM-cggcgcgcaagcttctggtgctagcattcaaacgccc-3'-RTQ1

Примечание: FAM — флуорофор (флуоресцеин); RTQ1 — соответствующий ему гаситель флуоресценции (с максимумом спектра поглощения при длине волны 515 нм). У шпилечного зонда подчеркнуты комплементарные фрагменты, образующие стебель шпильки, а неподчеркнутая последовательность соответствует структуре узнаваемой мишени.

Рассчитанная длина ампликонов составляла 83 п.н. и 200 п.н. (однако для изолятов *B. anthracis* с полностью секвенированным геномом этот фрагмент в описании изолята не идентифицирован как ген *ssp*).

Визуализацию ампликонов осуществляли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (Serva, Германия) с последующей окраской этидием бромистым (Merck, США).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для тестирования набора праймеров при детекции *B. anthracis* с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией использовали образцы ДНК, экстрагированные из изолятов *B. cereus* (ATCC 14579, ATCC 10987, DSM 4312), *B. pseudomycooides*, *B. anthracis* (CDC 1014, 4463, B22/39, 13/38), *B. thuringiensis* (DSM 350, DSM 2046), *B. weihenstephanensis* (DSM 11821), *B. fluorescens* и *B. mycooides* (DSM 2048), предоставленных д-ром S. Klee (Институт Роберта Коха, Берлин, Германия). ПЦР-РВ осуществляли на термоциклере ABI7500 (Applied Biosystems, США) в следующих температурных и временных условиях: начальная инкубация для денатурации ДНК-матрицы и активации FastStart Taq ДНК-полимеразы — 95°, 4 мин; денатурация — 95°, 15 с; отжиг — 60°, 60 с; синтез — 72°, 20 с; количество циклов — 40. Для проведения ПЦР-РВ использовали универсальный набор реагентов TaqMan Environmental Master mix от фирмы Applied Biosystems, в состав которого входит референсный краситель ROX (6'-карбоксих-родамин). Объем реакционной смеси составлял 20 мкл; проба содержала 4 мкл реакционного буфера TaqMan, 0,8 мкМ концентрацию каждого праймера, 0,07 мкМ — шпилечного или линейного зонда и 5 мкл ДНК.

Для амплификации фрагмента гена *ssp* *B. anthracis* использовали разработанный авторами набор праймеров Banssp9 — Banssp10 и зондов, характеристики которых приведены в таблице:

Синтезированные праймеры и зонды получены от ЗАО “Синтол”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использованы два варианта ПЦР — стандартная с электрофоретической детекцией и ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

При поиске мишеней для праймеров перед исследователем может возникнуть вопрос — какой из многочисленных известных генов выбрать для этой цели из генома полностью секвенированных изолятов. В настоящее время полностью секвенировано 6 изолятов *B. anthracis*, 39 изолятов *B. ce-*

reus (геном которых размером 5840 т.п.н. может включать до шести репликонов — кольцевой хромосомы и пяти плазмид) и 19 изолятов *B. thuringiensis* (геном которой размером 5310 т.п.н. состоит из двух репликонов — кольцевой хромосомы размером примерно 5200 т.п.н. и плазмиды или кольцевого фага pALH1) [18, 19].

Среди биомаркеров, которые в последние годы определены для идентификации спор *B. anthracis*, распространение получили ген *ssp* и семейство белков SASP (small acid-soluble protein), которые он кодирует [20]. Множественное выравнивание последовательностей гена *ssp* из изолятов группы *B. cereus s.l.* позволило выявить несовершенный прямой повтор длиной 65 п.н. Внутри второго повтора гексануклеотидная вставка 5-tagcat-3' (выделена в консенсусной последовательности, рис. 1) является характерной только для *B. anthracis*; у *B. cereus* и *B. thuringiensis* она отсутствует. Это различие в геномной организации использовано для хромосомного маркирования при разработке системы видоспецифических праймеров (Banssp7A—Banssp8) для детекции *B. anthracis*, а частью мишени для обратного праймера Banssp8 на 3'-конце является указанный гексануклеотид. Важно, что на филогенетическом дереве для гена *ssp* подавляющее большинство изолятов *B. cereus* и *B. thuringiensis* находится внутри соответствующих кластеров (результаты не показаны), что свидетельствует о надежности данной системы таксономической классификации бацилл, а также позволяет надеяться на эффективность определенных мишеней для детекции *B. anthracis* на основе гена *ssp*.

Для того, чтобы детектировать гексануклеотидную вставку в гене *ssp* у изолятов *B. anthracis*, видоспецифический праймер (и зонд для ПЦР-РВ) сконструированы таким образом, чтобы гибридизация происходила только с ДНК-матрицей изолятов *B. anthracis*.

Видоспецифическая детекция *B. anthracis* с помощью стандартной ПЦР

После проведения стандартной ПЦР с набором праймеров Banssp7A—Banssp8, один из которых содержит характерную только для изолятов *B. anthracis* 3'-концевую гексануклеотидную инсерцию, оба ампликона ожидаемого размера (83 п.н. и 200 п.н.) действительно были детектированы только у изолятов *B. anthracis* (рис. 2, дорожки 8—12), в то время как у изолятов близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* был обнаружен только один ампликон (83 п.н., см. рис. 2, дорожки 1—7).

Зонд формата молекулярного маяка 5'-FAM-cggcgcgcaagcttctggtgctagcattcaaaagcgcg-3'-RTQ1

		Banssp8 3'-atcgtaagtttcgtgttacgatca-5'
		Зонд формата TagMan 5'-FAM-cgcaagcttctggtgctagcattcaaaagcgcg-3'-RTQ1
1	DQ146892 <i>B.anthr.</i>	СТААГАААГСГСААГСТТСТГГТГС TAGCATTCAAAGCACAAATGCTAGTTA
2	DQ146893 <i>B.anthr.</i>
3	DQ146894 <i>B.anthr.</i>
4	DQ146895 <i>B.anthr.</i>
5	DQ146896 <i>B.anthr.</i>
6	DQ146897 <i>B.anthr.</i>
7	DQ146898 <i>B.anthr.</i>
8	DQ146899 <i>B.anthr.</i>
9	DQ146900 <i>B.anthr.</i>
10	DQ146901 <i>B.anthr.</i>
11	AF359938 <i>B.anthr.</i>
12	DQ473425 <i>B.thur.</i>	.a a ----- atgc
13	DQ473426 <i>B.thur.</i>	.a a ----- atgc
14	DQ473427 <i>B.thur.</i>	.a a ----- atgc
15	DQ473428 <i>B.thur.</i>	.a a ----- atgc
16	DQ473429 <i>B.thur.</i>	.a a ----- atgc
17	DQ473420 <i>B.thur.</i> ----- atg
18	DQ473421 <i>B.thur.</i> ----- atg
19	DQ146903 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
20	AF359829 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
21	AF359830 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
22	AF359835 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
23	AF359836 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
24	AF359847 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
25	AF359848 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
26	AF359852 <i>B.cereus</i>	.a a ----- atgc
27	DQ146903 <i>B.cereus</i>	.g a ----- atgc
28	DQ146912 <i>B.cereus</i>	.g a ----- atgc
29	DQ146913 <i>B.cereus</i>	.g a ----- atgc
30	DQ146914 <i>B.cereus</i>	.g a ----- atgc
31	DQ146915 <i>B.cereus</i>	.g a ----- atgc
^ позиция 150		

Рис. 1. Фрагмент множественного выравнивания гена *ssp* для 1 изолята *Bacillus anthracis* (*B. anthr.*), 20 изолятов *B. cereus* и 25 изолятов *B. thuringiensis* (*B. thur.*), на основе которого созданы линейный и шпильчатый зонды в форматах TagMan и молекулярного маяка для ПЦР-РВ, соответственно, а также набор праймеров для стандартной ПЦР с электрофоретической детекцией (приведен обратный праймер Banssp8). Указаны номера изолятов в базе данных GenBank. У изолята *B. anthracis* DQ146892 выделена уникальная для *B. anthracis* инсерция длиной 6 н. У изолятов *B. cereus* и *B. thuringiensis* выделены нуклеотиды, не совпадающие с нуклеотидами изолята *B. anthracis* DQ146892, которые способствуют повышению специфичности зондов. Для шпильчатого зонда в формате молекулярного маяка подчеркнуты комплементарные фрагменты, образующие стебель шпильки. Подчеркнута комплементарная праймеру Banssp8 последовательность “+”-нити ДНК

Видоспецифическая детекция *B. anthracis* посредством ПЦР в реальном времени

Локализация разработанных праймеров и проб по отношению к “+”- и “-”-ниям ДНК приведена на рис. 3. Важной особенностью нуклеотидной последовательности гена *ssp* является наличие прямого повтора длиной 46 п.н., что учитывали при разработке как данного набора праймеров и зондов, так и набора праймеров для детекции возбудителя сибирской язвы с помощью стандартной ПЦР с электрофоретической детекцией. Наличие двух сайтов связывания для обратного праймера *Banssp8* только у изолятов *B. anthracis* (см. рис. 1 и рис. 3) привело к образованию двух ампликонов различной длины только у *B. anthracis* (см. рис. 2).

Как нами определено выше на основе компьютерного анализа ряда генов хромосомной ДНК представителей группы *Bacillus cereus s.l.*, ген *ssp* (длина которого составляет 301 п.н. для *B. anthracis* и 295 п.н. для *B. cereus* и *B. thuringiensis*) характеризуется достаточным идентификационным потенциалом, что позволяет установить молекулярные мишени и определить однонуклеотидные полиморфизмы, которые могут быть использованы при создании наборов праймеров и проб. Идентификационный потенциал (или дискриминирующую мощность — *discrimination power*) определяют на основе среднего значения (в процентах) подобия нуклеотидных последовательностей выбранного гена у представителей группы *B. cereus s.l.* Большое количество однонуклеотидных полимор-

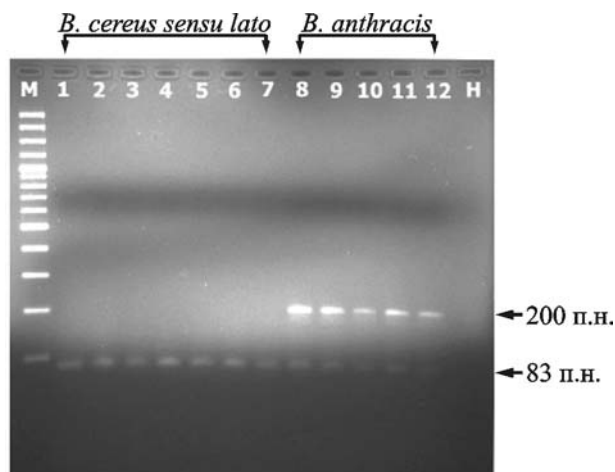


Рис. 2. Детекция продуктов амплификации геномной ДНК у представителей группы *B. cereus sensu lato* с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле после проведения стандартной ПЦР: М — маркеры молекулярной массы, 100 п.н.; дорожки 1—3 — ДНК из изолятов *B. cereus*; 4—7 — ДНК из изолятов *B. thuringiensis*; 8—12 — ДНК из изолятов *B. anthracis*; Н — отрицательный контроль амплификации

физмов отражает более низкий процент подобия последовательностей и, следовательно, более высокую дискриминирующую способность гена [21]. Гексануклеотидную вставку, которая характерна только для изолятов *B. anthracis* и deletирована у изолятов *B. cereus* и *B. thuringiensis*, в данной работе использовали в качестве хромосомного маркера для разработки видоспецифичных зондов при детекции *B. anthracis*, частью мишени для которых является указанный гексануклеотид (см. рис. 1).

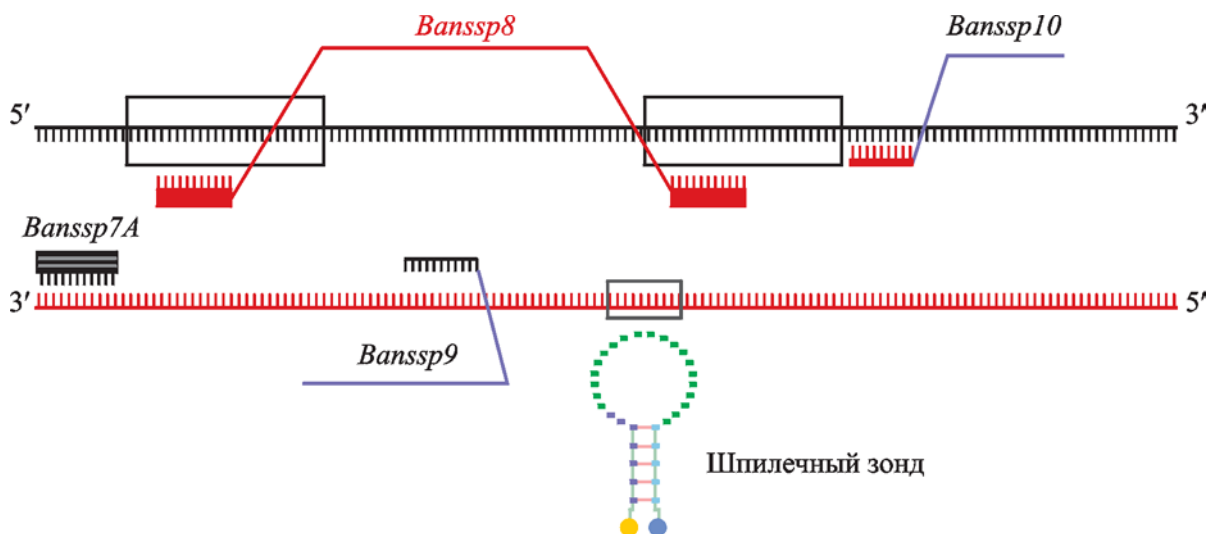


Рис. 3. Локализация праймеров и зонда на гене *ssp* хромосомной ДНК возбудителя сибирской язвы. Набор праймеров *Banssp9*—*Banssp10* позволяет амплифицировать фрагмент гена *ssp* длиной 133 п.н., содержащий целевую мишень для шпильчатого (или линейного) зонда, а набор праймеров *Banssp7A*—*Banssp8* фланкирует фрагменты длиной 83 и 200 п.н. при проведении стандартной ПЦР. Двумя прямоугольниками выделен прямой повтор; прямоугольник над шпилькой обозначает локализацию шпильчатого зонда

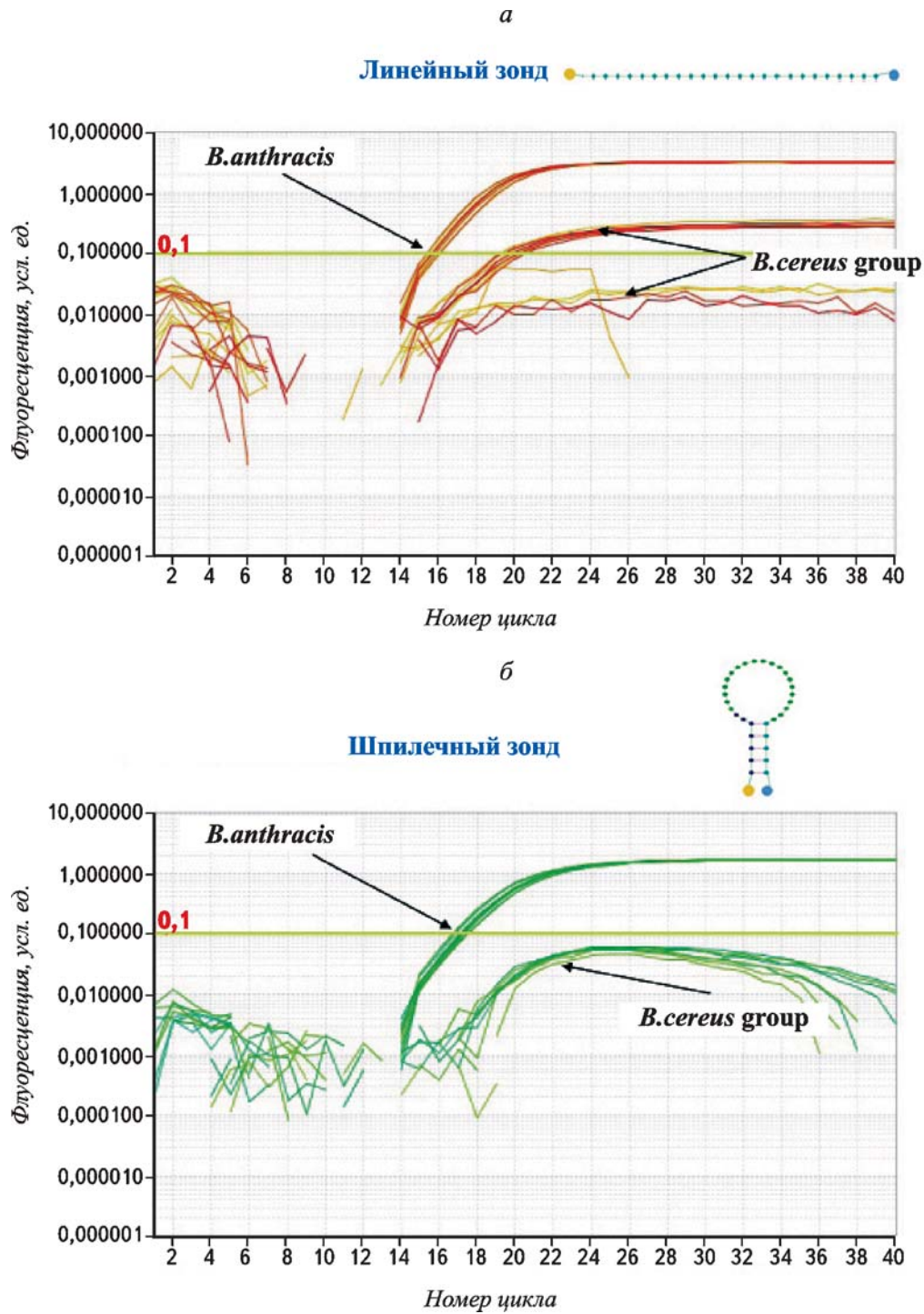


Рис. 4. График амплификации ДНК представителей группы *B. cereus sensu lato* с помощью ПЦР-РВ с разными форматами зондов: а — линейный зонд TaqMan; б — шпилечный зонд в формате молекулярного маяка

Для ПЦР-РВ с линейным зондом в формате TaqMan сигнал флуоресценции был высокоинтенсивным для всех изолятов *B. anthracis* и значительно ниже или вообще отсутствовал для других представителей группы *B. cereus s.l.* В тоже время при ПЦР-РВ с зондом в формате молекулярного

маяка сигнал регистрировали только для штаммов *B. anthracis* (рис. 4).

В отличие от ПЦР-РВ со шпилечным зондом при проведении ПЦР с линейным зондом TaqMan регистрировали разный уровень сигнала флуоресценции для разных представителей группы

B. cereus s.l. По мнению авторов, последующее секвенирование амплифицируемого фрагмента гена *ssp* позволит прояснить данный факт.

Технология ДНК-диагностики неуклонно движется от дорогостоящей низкоэффективной многоэтапной процедуры к недорогому высокоэффективному, автоматизированному протоколу. К числу современных технологий ПЦР-детекции и типирования патогенов можно отнести ПЦР с использованием зондов различных форматов — линейных TaqMan, шпилечных молекулярных маяков, скорпионовых праймеров-проб, LUX (light upon extension) праймеров-зондов, sunrise праймеров-зондов, LNA-модифицированных праймеров [17, 22—26].

Ген 16S рРНК использовали в течение довольно длительного времени в качестве “золотого” стандарта при проведении моногенного филогенетического анализа. Однако в настоящее время показано, что, например, гены *rpoB* и *apoE* характеризуются значительно большей (в 9 раз) дискриминирующей мощностью по сравнению с геном 16S рРНК при идентификации изолятов *B. thuringiensis* [21].

То пристальное внимание, которое уделено авторами определению целевых последовательностей, обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, литературные данные [27, 28] и наши дискуссии со специалистами в области детекции *B. anthracis* (в частности с проф. W. Weyer, частная информация) свидетельствуют, что например, ген *plcR* является нетривиальной мишенью и обладает достаточной дискриминирующей мощностью для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* [29]. Во-вторых, попытки воспроизвести надежную ПЦР-детекцию *B. anthracis* могут привести к ложноотрицательным результатам из-за ошибок в опубликованных последовательностях праймеров, либо отсутствие информации о последовательностях праймеров делает невозможным воспроизведение результатов исследования (ярким примером последнего варианта может служить работа [30], в которой «выявленные ДНК мишени ... позволяют осуществлять идентификацию штаммов *B. anthracis* с помощью амплификационных технологий», но последовательности использованных для этого праймеров не приведены).

При поиске молекулярно-генетических маркеров и разработке соответствующих наборов праймеров для детекции и типирования патогенов мы исходим из того, что ранее созданные тест-системы устаревают вследствие появления новой информации о молекулярной организации патогенов,

а также новых сиквенсов генов и их фрагментов в базах данных. Так например, в 2006 году компанией Cepheid (США) была разработана тест-система на основе ПЦР-РВ с использованием скорпионового зонда для детекции возбудителя сибирской язвы *B. anthracis* на основе выявления обеих плазмид рХО1 и рХО2. Такие системы могут, с одной стороны, служить альтернативой дорогостоящим референс-лабораториям, поскольку не требуют специализированного персонала и лабораторных помещений. С другой стороны, такие приборы закрытого типа ориентированы только на наборы реагентов от конкретного производителя и не позволяют использовать реакционные компоненты от других компаний. Созданные же в данной работе наборы праймеров и зондов для детекции возбудителя сибирской язвы могут быть использованы в системах открытого типа, включающих оборудование для проведения ПЦР-РВ, которое прочно вошло в практику исследовательских и клинических лабораторий во всем мире [11].

В работе также проведено сравнение зондов в форматах TaqMan и молекулярного маяка для детекции бацилл *B. anthracis* и их дифференциации от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ графиков амплификации с помощью ПЦР-РВ (см. рис. 4) показал, что шпилечный зонд в формате молекулярного маяка, молекулярной мишенью для которой является фрагмент гена *ssp* хромосомной ДНК, характеризуется положительным сигналом флуоресценции для изолятов *B. anthracis*, в то время как для других представителей группы *B. cereus s.l.* такой сигнал отсутствует. Высокая специфичность при проведении ПЦР-РВ со шпилечным зондом в формате молекулярного маяка при детекции *B. anthracis* обусловлена гексануклеотидной делецией в сайте связывания пробы в гене *ssp* хромосомной ДНК для изолятов *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Важным достоинством разработанного набора праймеров и зондов в сравнении с существующими наборами на основе хромосомных генов *rpoB* [4, 31], *gyrB* [32], *gyrA* [33], *16S rRNA* [4, 34], *plcR* [20, 35] является способность надежно дифференцировать возбудитель сибирской язвы от близкородственных видов, которые характеризуются высоким уровнем подобия нуклеотидных последовательностей. Действительно, сравнение графиков накопления ДНК как для шпилечного, так и для линейного зонда показывает, что интенсивность флуоресценции только для изолятов *B. anthracis* превышает фоновую люминесценцию, в то время как для остальных представителей группы *B. cereus s.l.* люминесценция для обоих вариантов

ПЦР-РВ остается на уровне фона. Кроме того, разница в пороговом числе циклов ($\Delta C_t = 4$) также делает возможной видоспецифическую детекцию *B. anthracis*.

Стандартная ПЦР с электрофоретической детекцией позволяет отбросить все сомнения: для *B. anthracis* характерны две полосы ампликонов, а для остальных представителей группы *B. cereus s.l.* — одна полоса.

Проведенные в работе эксперименты по ПЦР-детекции возбудителя сибирской язвы показали, что основой для успешной, высоконадежной детекции указанного патогена может быть определенная, специфичная только для него хромосомная вставка в гене *ssp* (кодирующем низкомолекулярный кислоторастворимый белок эндоспоры). Разработанная авторами тест-система для детекции *B. anthracis* на основе амплификации фрагмента гена *ssp* хромосомной ДНК может быть предложена для дальнейших лабораторных испытаний и повышения уровня безопасности населения, территории и экономики от возможных террористических вызовов.

Работа частично поддержана Национальной академией медицинских наук Украины (грант АМН 95/2010). Авторы выражают благодарность д-ру В.Н. Степаншиной (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Российская Федерация) за помощь в проведении исследований.

Получено 23.10.12

ЛИТЕРАТУРА

1. Dang, J. Bacillus spore inactivation methods affect detection assays / J. Dang, K. Heroux J., Kearney, A. Arasteh, M. Gostomski, P. Emanuel // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67. — P. 3665—3670.
2. Beyer, W. Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil samples—limitations of present published primers / W. Beyer, S. Pocivalsek, R.J. Bohm // Appl. Microbiol. — 1999. — V. 87. — P. 229—236.
3. Ellerbrok, H. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR / H. Ellerbrok, H. Nattermann, M. Ozel, L. Beutin, V. Appel, G. Pauli // FEMS Microbiol. Lett. — 2002. — V. 214. — P. 51—59.
4. Ko, K. Identification of *Bacillus anthracis* by rpoB sequence analysis and multiplex PCR / K. Ko, J.-M. Kim, J.-W. Kim, B. Jung, W. Kim, I. Kim, Y.-H. Kook // J. Clin. Microbiol. — 2003. — V. 41. — P. 2908—2914.
5. Pannucci, J. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species / J. Pannucci, R.T. Okinaka, R. Sabin, C.R. Kuske // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184. — P. 134—141.
6. Boehme, C. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance / C. Boehme, P. Nabeta, D. Hillemann, M. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S. O'Brien, D. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, M. Perkins // New Eng. J. Med. — 2010. — V. 363. — P. 1005—1015.
7. Coker, P. *Bacillus anthracis* virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality / P. Coker, K. Smith, P. Fellows, G. Rybachuck, K. Kousoulas, M. Hugh-Jones // J. Clin. Microbiol. — 2003. — V. 41. — P. 1212—1218.
8. Pannucci, J. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria / J. Pannucci, R.T. Okinaka, E. Williams, R. Sabin, L.O. Ticknor, C.R. Kuske // BMC Genomics. — 2002. — V. 3. — P. 34—41.
9. Kolsto, B. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus species*? / B. Kolsto, N.J. Tourasse, O.A. Okstad // Annu. Rev. Microbiol. — 2009. — V. 63. — P. 451—476.
10. Бродский Л.И. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee / Л.И. Бродский, А.Л. Драчев, Р.Л. Татузов, К.М. Чумаков // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7. — С. 10—14.
11. ПЦР “в реальном времени” [Под общей ред. Д.В. Ребрикова]. — М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2009.
12. Rychlik, W. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* / W. Rychlik, W. Spencer, R. Rhoads // Nucl. Acid. Res. — 1990. — V. 18. — P. 6409—6417.
13. Лиманская О.Ю. Видоспецифическая детекция микобактерий туберкулезного комплекса // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 10. — С. 49—56.
14. Лиманская О.Ю. Детекция провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции / О.Ю. Лиманская, М. Rola, L. Vicka, J. Kuzmak, А.П. Лиманский // Вопросы вирусол. — 2005. — № 2. — С. 38—43.
15. Лиманский А.П. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине / А.П. Лиманский, L. Geue, О.Ю. Лиманская, D. Beier // Вопросы вирусол. — 2004. — № 1. — С. 39—44.
16. Лиманский А.П. Видоспецифическая детекция ДНК *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* посредством полимеразной цепной реакции / А.П. Лиманский, В.В. Минухин, О.Ю. Лиманская, Н.В. Павленко, М.М. Мишина, А.Я. Цыганенко // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2005. — № 3. — С. 33—39.
17. Лиманская О.Ю. Детекция изолятов дикого типа и точечных мутаций в геноме устойчивых к изониазиду микобактерий туберкулеза / О.Ю. Лиманская, Т.Н. Мухина,

- В.Н. Степаншина, В.Н. Шемякин, X. Wu, J. Zhang, T.B. Фесенко, В.А. Покровский, А.П. Лиманский // Мол. биол. — 2010. — Т. 44. — С. 635—645.
18. *Challacombe, J.* The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam / J. Challacombe, M. Altherr, G. Xie, S.S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C.S. Campbell, M.L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland, M. Dimitrijevic, N.A. Doggett, J.J. Fawcett, T. Glavina, L.A. Goodwin, L.D. Green, C.S. Han, K.K. Hill, P. Hitchcock, P.J. Jackson, P. Keim, A.R. Kewalramani, J. Longmire, S. Lucas, S. Malfatti, D. Martinez, K. McMurry, L.J. Meincke, M. Misra, B.L. Moseman, M. Mundt, A.C. Munk, R.T. Okinaka, B. Parson-Quintana, L.P. Reilly, P. Richardson, D.L. Robinson, E. Saunders, R. Tapia, J.G. Tesmer, N. Thayer, L.S. Thompson, H. Tice, L.O. Ticknor, P.L. Wills, P. Gilna, T.S. Brettin // J. Bacteriol. — 2007. — V. 189. — P. 3680—3681.
 19. *Han, C.* Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis* / C. Han, G. Xie, J. Challacombe, M.R. Altherr, S.S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C.S. Campbell, M.L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland, M. Dimitrijevic, N.A. Doggett, J.J. Fawcett, T. Glavina, L.A. Goodwin, L.D. Green, K.K. Hill, P. Hitchcock, P.J. Jackson, P. Keim, A.R. Kewalramani, J. Longmire, S. Lucas, S. Malfatti, K. McMurry, L.J. Meincke, M. Misra, B.L. Moseman, M. Mundt, A.C. Munk, R.T. Okinaka, B. Parson-Quintana, L.P. Reilly, P. Richardson, D.L. Robinson, E. Rubin, E. Saunders, R. Tapia, J.G. Tesmer, N. Thayer, L.S. Thompson, H. Tice, L.O. Ticknor, P.L. Wills, T.S. Brettin, P. Gilna // J. Bacteriol. — 2006. — V. 188. — P. 3382—3390.
 20. *Hathout, Y.* Small, acid-soluble proteins as biomarkers in mass spectrometry analysis of *Bacillus* spores / Y. Hathout, B. Setlow, R.-M. Cabrera-Martinez, C. Fenselau, P. Setlow // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — V. 69. — P. 1100—1107.
 21. *Soufiane, B.* Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses / B. Soufiane, J. Cote // Antonie van Leeuwenhoek. — 2009. — V. 95. — P. 33—45.
 22. *Lukhtanov, E.* Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence / E. Lukhtanov, S. Lokhov, V. Gorn, M. Podyminogin, W. Mahoney // Nucl. Acid. Res. — 2007. — V. 35. — P. E30.
 23. *Chen, C.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen, D. Ridzon, A. Broomer, Z. Zhou, D. Lee, J. Nguyen, M. Barbisin, N. Xu, V. Mahuvakar, M. Andersen, K. Lao, K. Livak, K. Guegler // Nucl. Acid. Res. — 2005. — V. 33. — P. E179.
 24. *Afonina, I.* Improved bplex quantitative real-time polymerase chain reaction with modified primers for gene expression analysis / I. Afonina, A. Mills, S. Sanders, A. Kulchenko, R. Dempcy, S. Lokhov, N. Vermeulen, W. Mahoney // Oligonucleotides. — 2006. — V. 16. — P. 395—403.
 25. *Afonina, I.* Primers with 5' flaps improve real-time PCR / I. Afonina, I. Ankoudinova, A. Mills, S. Lokhov, P. Huynh, W. Mahoney // BioTechniques. — 2007. — V. 43. — P. 770—774.
 26. *Singer, A.* Nanopore-based sequence-specific detection of duplex DNA for genomic profiling / A. Singer, M. Wanunu, W. Morrison, H. Kuhn, M. Frank-Kamenetskii, A. Meller // Nano Lett. — 2010. — V. 10. — P. 738—742.
 27. *Ko, K.* Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the plcR gene / K. Ko, J. Kim, J. Kim, W. Kim, S. Chung, I. Kim, Y. Kook // Infect. Immun. — 2004. — V. 72. — P. 5253—5261.
 28. *Easterday, W.R.* Use of single nucleotide polymorphisms in the plcR gene for specific identification of *Bacillus anthracis* / W.R. Easterday, M.N. Van Ert, T.S. Simonson, D.M. Wagner, L.J. Kenefic, C.J. Allender, P. Keim // J. Clin. Microbiol. — 2005. — V. 43. — P. 1995—1997.
 29. *Патыка Т.И.* Филогенетические взаимосвязи серологических вариантов *Bacillus thuringiensis* / Т.И. Патыка, Н.В. Патыка, В.Ф. Патыка // Биополимеры и клетка. — 2009. — Т. 25. — С. 240—244.
 30. *Микшиц Н.И.* Определение различий в структуре генов биосинтеза метионина у штаммов *Bacillus anthracis* и филогенетически родственных видов бацилл / Н.И. Микшиц, Ю.Н. Живова, Л.В. Новикова, Н.А. Шарапова, Ю.А. Попов, В.В. Кутырев // Мол. генет. микробиол. вирусол. — 2012. — № 2. — С. 21—25.
 31. *Qi, Y.* Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* / Y. Qi, G. Patra, X. Liang, L.E. Williams, S. Rose, R.J. Redkar, V.G. DelVecchio // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67. — P. 3720—3727.
 32. *Лиманская О.Ю.* Маркеры для видоспецифической детекции бацилл группы *Bacillus cereus* / О.Ю. Лиманская, А.П. Лиманский // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 20—26.
 33. *Satterfield, B.* Tentacle Probes™: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR / B. Satterfield, D. Kulesh, D. Norwood, L. Wasieloski, M. Caplan, J. West // Clin. Chem. — 2007. — V. 53. — P. 2042—2050.
 34. *Bavykin, S.* Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms / S. Bavykin, Y. Lysov, V. Zakhariev, J. Kelly, J. Jackman, D.L. Stah, A. Cherni // J. Clin. Microbiol. — 2004. — V. 43. — P. 3711—3730.
 35. *Agaisse, H.* PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* / H. Agaisse, M. Gominet, O.A. Økstad, A.B. Kolstø, D. Lereclus // Mol. Microbiol. — 1999. — V. 32. — P. 1043—1053.

O.Yu. LIMANSKAYA^{1,2,*}, L.A. MURTAZAEVA¹,
S. KLEE³, and A.P. LIMANSKII¹

¹ The Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology,
Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine, 61057, Kharkov Ukraine

² The National Scientific Center *Institute of Experimental and
Clinical Veterinary Medicine*, Natl. Acad. Agrar. Sci. of Ukraine,
61023, Kharkov Ukraine

³ Robert Koch-Institut, D-13353, Berlin Germany

e-mail: olga.limanskaya@mail.ru.

Molecular Technologies for Detection of Anthrax Causative Agent by PCR of Different Formats

Accurate identification of *Bacillus anthracis* bacteria remains a challenge in discrimination of anthrax causative agent from closely related species of *B. cereus* and *B. thuringiensis* due to the high level of similarity of nucleotide sequences among the members of the *Bacillus cereus sensu lato* (*Bacillus cereus s.l.*) group, to which all the above bacteria belong. In this work, we have developed primer sets and probes for real-time PCR

(RT-PCR) with fluorescence and hybridization detection for the discrimination of *B. anthracis* from *B. cereus* and *B. thuringiensis* and primer sets for conventional PCR with the electrophoretic detection. For the members of the *Bacillus cereus s. l.* group, the nucleotide sequences of the chromosomal *rpoB*, *plcR*, and *ssp* genes, which may be molecular genetic markers for their typing were analyzed. The fragment of the chromosomal *ssp* gene that was only characterized by a hexanucleotide insertion in *B. anthracis* isolates was identified as a target for the primers and probes. The conventional PCR with electrophoretic detection and designed primer set can reliably discriminate *B. anthracis* bacilli from the closely related *B. cereus* and *B. thuringiensis* species. Application of real-time PCR with TaqMan and molecular beacon probes also permits to carry out an accurate discrimination of *B. anthracis* from the closely related bacilli: the fluorescence signal for hairpin molecular beacon probes was only positive for the *B. anthracis* strains, and it was negative for other members of the *Bacillus cereus s. l.* group. Using the TaqMan linear probes, high-intensity fluorescence signal was observed for all the *B. anthracis* isolates, whereas the signal of much lower intensity was fixed for the other members of the *Bacillus cereus s. l.* group. The developed approaches can be useful in clinical, epidemiological and epizootiological studies.

Key words: anthrax causative agent, *Bacillus anthracis*, conventional PCR, molecular beacon, real-time PCR.

* Author for correspondence.