

СИБИРСКИЙ ВЕСТНИК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ НАУКИ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1971 г.

ВЫХОДИТ ЧЕТЫРЕ РАЗА В ГОД

2003 **январь—
март**



№ 1 (147)

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПАТОГЕННОГО БИОТИПА АВ
*FUSOBACTERIUM NECROPHORUM SUBSP. NECROPHORUM***

**В.И. СЕМЕНИХИН, кандидат ветеринарных наук,
М.Л. ФИЛИПЕНКО, кандидат биологических наук,
Н.В. НЕКРАСОВА, Е.А. ХРАПОВ, А.А. САМОЛОВОВ, доктор ветеринарных наук**

Описаны критерии, по которым было проведено генотипирование штамма «Чик» ИЭВСиДВ. По результатам генотипирования этот штамм идентифицирован как патогенный биотип АВ *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum*.

Некробактериоз — широко распространенное инфекционное заболевание, которым болеют все виды животных и птиц, а также человек, проявляющееся гнойно-некротическим поражением различных тканей (кожа, слизистые оболочки, копыта, абсцессы внутренних органов) под воздействием *Fusobacterium necrophorum*.

У *F. necrophorum* различают три основных (А, В и С) и один промежуточный биотип (АВ). Биотип А *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* чаще выделяют из абсцессов печени крупного рогатого скота. Биотип АВ в основном находят в пораженных

конечностях овец и крупного рогатого скота, биотип В *F. necrophorum subsp. fundiforme* постоянно выделяют из содержимого рубца, а также из очагов поражений, первично вызванных биотипами А и АВ. Биотип С выделен в новый вид *F. pseudonecrophorum*, его можно выявить в содержимом рубца и фекалиях [1-3]. Данная дифференциация основана на способности некоторых биотипов агглютинировать или лизировать эритроциты, синтезировать липазу [4, 5]. Главный фактор патогенности возбудителя биотипов А, В и АВ — секретируемый бактериями лейкотоксин большого молекулярного веса, проявляющий активность против гранулоцитов.

Цель наших исследований — разработать тест-систему определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ампликонов для генотипирования биотипа АВ *F. necrophorum* от других биотипов и провести сравнение генетического профиля депонированного штамма «Чик» ИЭВСидВ со штаммом FnsI *F. necrophorum subsp. necrophorum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наработку бактериальной массы *F. necrophorum* шт. «Чик» ИЭВСидВ проводили на питательных средах согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза животных» [6].

Выделение хромосомной ДНК осуществляли по ранее отработанной нами методике с применением протеолитических ферментов (проназа или протеиназа К 20 мг/мл при $t +55^{\circ}\text{C}$ в течение 20 ч) с дальнейшей экстракцией смесью фенол-хлороформ и переосаждением этанолом [7].

В работе мы использовали данные EMBL/Gen Bank/DBJ. Определение последовательностей олигонуклеотидных праймеров проводили по алгоритму выравнивания последовательностей в программах Alignment Service V. 4.0 и GENCNER [8]. Для анализа праймеров по уровню свободной энергии использовали программу OLIGO 4.0. С этой целью в процессе выбора праймеров, фланкирующих фрагмент в 556 н. п. был предусмотрен расположенный асимметрично центра фрагмента единственный сайт рестрикции эндонуклеазы MspI, делящий фрагмент на 2 части в 198 и 358 н. п. в соответствии с последовательностью штамма FsnI *F. necrophorum subsp. necrophorum*. (Австралия) как наиболее изученного. Химический синтез праймеров осуществлен амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U (Biosset Ltd, Новосибирск) Ю.А. Горбуновым в отделе химии природных соединений ГНЦ ВБ «Вектор». Праймеры имели сайты рестрикции EcoRI и BamHI.

Термоциклирование осуществляли на аппарате М105 фирмы «БИС» (Новосибирск). Анализ считали положительным, если размер ампликона соответствовал ожидаемому размеру фрагмента в 556 н. п. О результатах судили по размеру синтезированного фрагмента кДНК, мигрирующего в 0,8%-м геле агарозы. Маркером служила ДНК pUC18, рестриктированная AluI.

Гидролиз ампликона штамма «Чик» ИЭВСидВ эндонуклеазами EcoRI и BamHI, а затем лигирование фрагмента с вектором pBluescript KS и трансформирование клеток в *E. coli* JM103 рекомбинантной плазмидой осуществляли по общепринятым методикам [9]. Полученные клоны анализировали в 4%-м полиакриламидном геле.

Секвенирование клона проводили по двум цепочкам ДНК, используя общепринятую методику Максама-Гилберта [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После анализа последовательностей нуклеотидных повторов в 16SrPHK и межгенных спейсерных регионов 16S-23SrPHK *Fusobacterium necrophorum* нами была выбрана пара праймеров: № 1 верхний - 5'-GGCGTAGAAAATCAGATACT-3' и №2 нижний - 5'-CAGAATCTGATATTGTACAC-3'. Расчет свободной энергии их приведен в таблице.

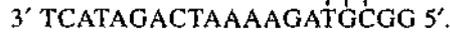
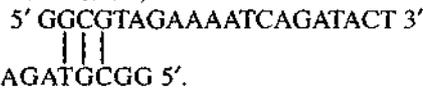
Результаты расчета свободной энергии выбранных праймеров

Праймер	Нуклеотиды				T _m , % CG (% CG-метод), °C	T _m суммарн. ATCG (2°C (A + T) + + 4°C (C + G))
	A + T	%	C + G	%		
№ 1 верхний	12	60,0	8	40,0	61,0	56
№ 2 нижний	13	65,0	7	35,3	56,3	54

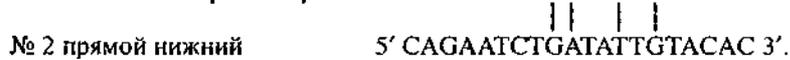
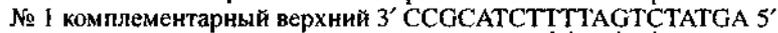
Выбранные праймеры имели по 3–4 димера: № 2 нижний праймер 5' CAGAATCTGATATTGTACAC 3'. Образование димеров: $\Delta G = -2.4$ kcal/mol (init. +, term. mism. -) 5' CAGAATCTGATATTGTACAC 3'



№ 1 верхний праймер 5' GCGTAGAAAATCAGATACT 3', комплементарная последовательность 3' CCGCATCTTTTAGTCTATGA 5'. Образование димеров: $\Delta G = -2.0$ kcal/mol (init. +, term. mism. -)



Возможность комплементарного соединения праймеров № 1 и № 2 низкая. Имеется только одна пара комплементарности с высокой энергией: C № 1 – G № 2.



Полимеразную цепную реакцию проводили следующим образом. Праймеры использовали для синтеза и амплификации участка генома бактерии в 556 н. п., проводя предварительную денатурацию при 95°C в течение 5,0 мин — 1 цикл и 30 циклов при следующем режиме: денатурация при 94°C — 0,8 мин, отжиг праймеров при 56°C — 0,8 мин, синтез при 72°C — 0,9 мин и один цикл (досинтез) при 72°C — 3,0 мин. В качестве матрицы использовали ДНК штамма «Чик» ИЭВСидВ.

Затем полученный ампликон был подвергнут гидролизу эндонуклеазой MspI. После электрофореза в 2%-м агарозном геле продуктов гидролиза был получен генетический профиль штамма «Чик» ИЭВСидВ, состоящего из двух фрагментов в 198 и 358 н. п. (рис. 1). Сравнительный анализ ожидаемых и полученных паттернов в ПЦР-ПДРФ ориентирует нас на принадлежность штамма «Чик» ИЭВСидВ к *E. necrophorum subsp. necrophorum* биотипу АВ. Для подтверждения результатов данного анализа мы провели клонирование синтезированного фрагмента на матрице ДНК шт. «Чик» в плазмиду pBluescript KS и потом осуществили трансформирование клеток *E. coli* JM103 рекомбинантной плазмидой. Определение нуклеотидной последовательности клонов проводили по двум цепочкам ДНК, используя общепринятую методику Максама-Гилберта. Затем последовательность фрагмента шт. «Чик» ИЭВСидВ сравнили с последовательностью нуклеотидного повтора шт. FsnI с помощью программы выравнивания (рис. 2).

На рис. 2 показано, что последовательность повтора шт. «Чик» ИЭВСидВ совпадает с последовательностью повтора шт. FsnI *F. necrophorum subsp. necrophorum* биотипа АВ, за исключением одной делеции и двух вставок. Так, в позиции 15 по шт. «Чик» выявлена делеция G, а в позициях 441 и 538 соответственно вставки А и G.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и сконструирован опытный образец тест-системы ПЦР-ПДРФ для генотипирования *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* биотипа АВ с использованием специфических праймеров и эндонуклеазы MspI.
2. Нуклеотидная последовательность повтора шт. «Чик» ИЭВСидВ совпадает с нуклеотидной последовательностью шт. FsnI (Австралия).
3. Протестированный в разработанной тест-системе ПЦР-ПДРФ штамм «Чик» ИЭВСидВ, депонированный по морфологическим и культуральным свойствам, относится к патогенному биотипу АВ *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*.

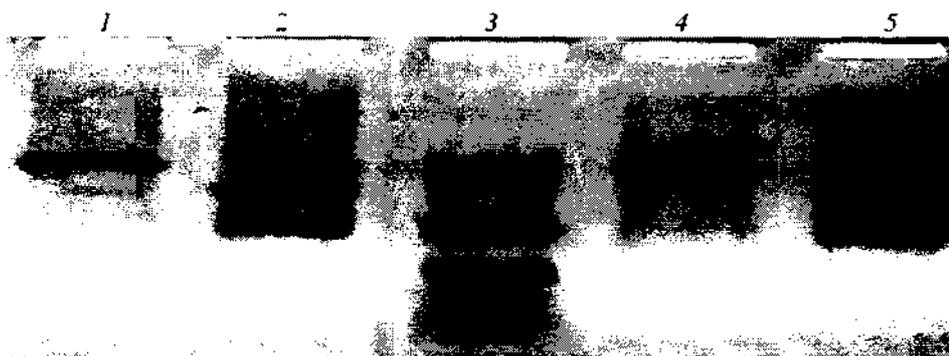


Рис. 1. Гидролиз ампликона рестриктазой HpaII (MspI):
 1 — продукт амплификации штамма «Чик» ИЭВСидВ, 4 — продукт амплификации штамма «Чик» ИЭВСидВ в разведении 1:100, 2, 5 — рестрикция ферментом HpaII (MspI), 3 — маркер (плазмида рUC18, рестриktированная AluI)

FnS1	aaacaatct	ttgattatca	gtttcagaat	actcataaaa	aacgaaaaag	aaaaaagaaa	60
FnS1	attgggaat	attccaaaa	ctattttaca	gaatctaata	ttgtacacta	tggactcata	120
Чик			ca	gaatctaata	tt-tacacta	tggactcata	32
FnS1	actgtaattc	atacccttgg	cagagactta	aaatggaatc	ctcatgtgca	tgcactcatt	180
Чик	actgtaattc	atacccttgg	cagagactta	aaatggaatc	ctcatgtgca	tgcactcatt	92
FnS1	tctttgggag	gatttaataa	acgttttgta	tggaaaaaat	tagactattt	tcatgtagat	240
Чик	tctttgggag	gatttaacaa	acgttttgta	tggaaaaaat	tagactattt	tcatgtagat	152
FnS1	gtcattgcca	atcaatggaa	atttatcgtc	ttacaactca	ttcaatccgg	aaattatcaa	300
Чик	gtcattgcca	atcaatggaa	atttatcgtc	ttacaactca	ttcaatccgg	aaattatcaa	212
FnS1	gateccatct	ggaaagaaaa	agcaaaaaca	gtagccaata	aactctacaa	agaaaatgca	360
Чик	gateccatct	ggaaagaaaa	agcaaaaaca	gtagccaata	aactctacaa	agaaaatgca	272
FnS1	cgactttttt	tctcggtggy	aagacaagaa	gtcaattctg	cggaaggact	cttgaaatat	420
Чик	cgactttttt	tctcggtggy	aagacaagaa	gtcaattctg	cggaaggact	cttgaaatat	332
FnS1	ctaggtagat	atcttgcgcy	tgctccgac	gctgattaca	aaatcgtgaa	tgttacagaa	480
Чик	ctaggtagat	atcttgcgcy	tgctccgac	actgattaca	aaatcgtgaa	tgttacagaa	392
FnS1	aaagaagtaa	ctttcttttt	tcatgatttg	gcaaatcaca	aaaaaaaa-a	catatatcac	540
Чик	aaagaagtaa	ctttcttttt	tcatgatttg	gcaaatcaca	aaaaaaaaa	catatatcac	452
FnS1	catgtctcga	gaaaaattta	ttcaacaagt	attgattcat	cttccccca	aacattttaa	600
Чик	catgtctcga	gaaaaattta	ttcaacaagt	attgattcat	cttccccca	aacattttaa	512
FnS1	aatgatttct	cgttttggtt	tttat-ggcy	tagaaaatca	gatactttas	aaatacatat	660
Чик	aatgatttct	cgttttggtt	tttatgggcy	tagaaaatca	gatact		558
FnS1	ggcattctta	caaaaaaaga	aaaagaagaa	tcttttttcc	ttttatgtcg	actc	712

Рис. 2. Выравненные последовательности повтора *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* штаммов FnS1 (австралийский) и Чик (ИЭВСидВ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hodgson A.L.M., Nicholson L.A., Doran T.J. et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Fusobacterium necrophorum* using a novel repeat DNA sequence and a 16S rRNA gene probe // FEMS Microbiol. Lett. — 1993. — V. 108. — P. 205-210.
2. Nicholson L.A., Moppow C.J., Corner L.A. et al. Phylogenetic Relationship of *Fusobacterium necrophorum* A, AB, and B Biotypes Based upon 16S rRNA Gene Sequence Analysis // Int. J. Svst. Bacteriol. — 1994. — V. 44, № 2. — P. 315-319.
3. Соломаха О.И., Кириллов Л.В., Кружков Н.Н. и др. Биотипы возбудителя некробактериоза и подбор штаммов для изготовления вакцины против некробактериоза животных // Аграрная Россия. — 2000. — № 3. — С. 62-66.
4. Fives L. Comparative study of strains of *Sphaerophorus necrophorus* isolated from man and animals // European Acad. Press. Brussels. — 1963. — P. 56-63.
5. Emery D.L., Vaughan J.A., Clark B.L. et al. Cultural characteristics and virulence of strains of *Fusobacterium necrophorum* isolated from the feet of cattle and sheep // Aust. Vet. J. — 1985. — V. 62. — P. 43-46.
6. Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза (Утвер. ГУВ Госагропрома СССР 1 июня 1987). — М, 1987. — С. 4.
7. Семенихин В.И., Самолов А.А., Лопатин С.В. Выделение хромосомной ДНК *Fusobacterium necrophorum* // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве / Сб. науч. тр. — Новосибирск, 2000. — С. 63-66.
8. Resenchuk S.M., Blinov V.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length // Comput. Appl. Biosci. — 1995. — № 11. — P. 7-11.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — С. 205-240.
10. Maxam A.M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology. — 1980. — V. 65. — Parti. — P. 499-550.

Поступила в редакцию
29.1 2003

Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока

GENE TYPING OF PATHOGENIC BIOTYPE AB *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* SUBSP. *NECROPHORUM*

V.I. Semenikhin, M.A. Filipenko, N.V. Nekrasova,
E.A. Khrapov, A.A. Samolovov

There have been described the criteria on the basis of which there was carried out the gene typing of strain «Chik ffiVSiDV». As a result of gene typing, this strain was identified as a pathogenic biotype AB *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum*.