

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА CU-ZN SOD КАЗАХСТАНСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИИ РОДА БРУЦЕЛЛА

Казакстан штaммдарынын бруцелла бактериялардын Cu-Zn SOD ген молекулярдык-генетикалык изилдөө

Molecular genetic analysis of the gene (Cu-Zn SoD) of Kazakhstan bacteria strains of Brucella genus are submitted

Аннотация: в данной статье представлены результаты сравнительного анализа гена супероксид дисмутаза (Cu-Zn SOD) казахстанских штаммов бактерии рода бруцелла. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена Cu-Zn SOD штаммов *Brucella abortus*, выделенных в Жамбылской области показал, что штамм *Brucella abortus* 0002/Н относящийся к 3 биовару отличается от штамма *Brucella abortus* 0001/Н заменой нуклеотида А на G в позиции 393. Штаммы *Brucella melitensis* 0003/Н, *Brucella melitensis* 0004/Н, *Brucella melitensis* 0005/Н 3 биовара, выделенные в этой же области, отличаются от штаммов *Brucella abortus* заменой в позиции 300.

Аннотация: бул кагаз урууларына *Brucella* бактериялар жана шагылдар (Cu-Zn калыбы) Казакстан штaммдарды ген салыштырмалуу талдоонун жыйынтыктарын тартуулайт. Жамбыл аймактагы жалгыз Cu-Zn SOD ген *Brucella abortus* штaммдарды тизилишин нуклеотид салыштырма анализи *Brucella abortus* штaммды 0002/Н кызмат ордунда G үчүн нуклеотид А *Brucella abortus* штaммы 0001/Н алмаштыруу *Brucella* 3 айырмачылыктары биовар тиешелүү 393. *Brucella melitensis* штaммдарды 0003/Н, *Brucella melitensis* 0004/Н, *Brucella melitensis* 0005/Н 3 биовар эле аймакта бөлүнгөн, 300 кызмат ордунда *Brucella abortus* алмаштыруу түрлөрү ар кандай.

Annotation: in present article the results of comparative analysis of superoxide dismutase gene (Cu-Zn SOD) of Kazakhstani bacteria strains of *Brucella* genus are submitted. Comparative analysis of nucleotide sequences of the Cu-Zn SOD gene of *Brucella abortus* strains isolated in Zhambyl region showed that the *Brucella abortus* strain 0002/Н relative to biovar 3 differs from the *Brucella abortus* strain 0001/Н by A-to-G substitution at nucleotide position 393. The biovar 3 strains of *Brucella melitensis* 0003/Н, *Brucella melitensis* 0004/Н, *Brucella melitensis* 0005/Н isolated in the same region differ from the *Brucella abortus* strains by substitution at position 300.

Ключевые слова: бруцеллез; супероксид дисмутаза; полимеразная цепная реакция; секвенирование; сравнительный анализ.

Негизги сөздөр: бруцеллез; супероксид дисмутаза; полимераз чынжыр жооп; секвенирование; салыштырмалуу анализ.

Keywords: brucellosis; superoxide dismutase; polymerase chain reaction; sequencing; comparative analysis

Введение

Борьба с бруцеллезом является важной проблемой здравоохранения в развивающихся странах. Бруцеллез является основной причиной, тормозящей развитие животноводства.

Применяемые в настоящее время вакцины обладают недостаточной иммуногенностью, и не создают эффективной защиты против бруцеллеза. Поэтому проводятся исследования по конструированию и совершенствованию протективных свойств имеющихся вакцин, как для людей, так и для животных. В настоящее время для получения вакцины против бруцеллеза исследования начинаются с идентификации иммуногенных белков. Многие белки бактерии *Brucella abortus* исследованы для определения их роли в иммунном ответе против бруцеллеза. Одним из таких белков является супероксид дисмутаза (Cu-Zn SOD).

Супероксид дисмутаза относится к группе антиоксидантных ферментов металлоферментов. Она защищает организм от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов.

Периплазматический белок бруцелл Cu-Zn SOD активно участвует в индукции иммунного ответа и, следовательно, является потенциальным субстратом, на основе которых можно разработать эффективные препараты для диагностики и профилактики бруцеллеза [1,2]. Также, белок Cu-Zn SOD защищает организм от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. Супероксид дисмутаза катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода. Таким образом, он играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом. Вызывает напряженный иммунитет у КРС [3, 4].

Цель данной работы - изучение молекулярно-генетических свойств гена Cu-Zn SOD для использования при создании эффективной и безопасной вакцины против бруцеллеза.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований в работе использованы казахстанские штаммы *Brucella abortus* и *Brucella melitensis*, которые

представлены в таблице 1. Штаммы предоставлены лабораторией Микробиологии НИИПББ.

Наименование штамма	Регионы
<i>Brucella abortus</i> 0001/Н	Жамбылская область
<i>Brucella abortus</i> 0002/Н	
<i>Brucella melitensis</i> 0003/Н	
<i>Brucella melitensis</i> 0004/Н	
<i>Brucella melitensis</i> 0005/Н	
<i>Brucella abortus</i> 0006/В	Алматинская область
<i>Brucella abortus</i> 0007/В	
<i>Brucella abortus</i> 0008/В	
<i>Brucella abortus</i> в R-форме 0009/Х	Южно-Казахстанская область
<i>Brucella abortus</i> ЮКО 198 212 S -ф	
<i>Brucella abortus</i> ЮКО 2535 S -ф	
<i>Brucella abortus</i> ЮКО198767578 S-ф	
<i>Brucella abortus</i> Алаколь1, S -ф	Алматинская область, Галдыкорганский регион
<i>Brucella abortus</i> Алаколь 2, S -ф	
<i>Brucella abortus</i> Атырау 88, S -ф	Атырауская область
<i>Brucella abortus</i> СКО,S -ф	Северо-Казахстанская область
<i>Brucella abortus</i> 544, 7 пассаж в S -ф	

Таблица 1 – Казахстанские штаммы бактерии рода *Brucella*

Выделение бактериальной ДНК. Выделение бактериальной ДНК проводят с использованием PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent, фирмы Applied Biosystems.

Наработка и секвенирование фрагмента генома казахстанских штаммов бактерии рода бруцелла.

Амплификация фрагментов ДНК гена бактерии бруцелла проведена на термоциклере «GeneAmp PCR 9700», фирмы «Applied Biosystems» и использованы праймеры с нуклеотидной последовательностью PF: 5'-CGCTCGAGTTCGATCACGCCGCAGGCAAAA-3' PR: 5'-CGCTCGAGTTCGATCACGCCGCAGGCAAAA-3', размер получаемого продукта 530 п.о.

Амплификацию проводят в 50 ul, содержащих 5 ul 10X ПЦР буфера (Qiagen), 1 ul 10 mM dNTPs (NEB), 0,1 ul ДНК, 1 ul каждого праймера (20 pmol/ul), 0,25 ul Taq DNA полимеразы (2,5 units, Qiagen). Условия амплификации: 94°C 5 мин; затем 30 циклов 94°C, 1 мин; 50°C, 1 мин; 72°C, 2 мин и 1 цикл 72°C, 7 мин.

Электрофорез в агарозном геле. Продукты были проанализированы путем разделения амплифицированной ДНК электрофорезом на 2 % агарозном геле в 1x Трис-борат-ЭДТА буфера (0,445 М Трис борат, pH 8,3, содержащие 0,01 М ЭДТА, Sigma-Aldrich) при 60 V в течение 50 мин.

Секвенирование ДНК. Для секвенирования сегментов генома рекомбинантного вируса гриппа использован метод дидеоксисеквенирования по Сенгеру на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130xl, Applied Biosystems. В качестве полимера для капилляров используют POP-7. Нарботку терминирующих продуктов ДНК проводят методом циклического секвенирования. Сущность данного метода заключается в использовании набора для секвенирования ДНК (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) фирмы Applied Biosystems в состав которого помимо полимераз (AmpliTag DNA polymerase), свободных нуклеотидов входит также смесь флуоресцентно меченых свободных олигонуклеотидов.

Результаты и обсуждение

В результате амплификации получены ПЦР продукты фрагмента гена, кодирующие белки Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии бруцелла размером 530 п.о.



Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов фрагментов генов, кодирующие белки Cu-Zn SOD

Проведена экстракция фрагментов ДНК гена Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии бруцелла с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), согласно инструкции к набору для дальнейшего их секвенирования. После экстракции проведено прямое секвенирование полученных продуктов с использованием набора BigDye Terminator v.3.1.

М – 1 kb Маркер, Invitrogen; 1 – *Brucella abortus* 0001/Н; 2 – *Brucella abortus* 0002/Н; 3 – *Brucella melitensis* 0003/Н; 4 – *Brucella melitensis* 0004/Н; 5 – *Brucella melitensis* 0005/Н; 6 – *Brucella abortus* 0006/В; 7 – *Brucella abortus* 0007/В; 8 – *Brucella abortus* 0008/В; 9 – *Brucella abortus* 0009/Х; 10 – *Brucella abortus* ЮКО 198 212 S-форма; 11 – *Brucella abortus* ЮКО 2535 S-форма; 12 – *Brucella abortus* ЮКО 198 767578 S-форма; 13 – *Brucella abortus* Алаколь 1 S-форма; 14 – *Brucella abortus* Алаколь 2 S-

форма; 15 – *Brucella abortus* Атырау 88 S-форма; 16 – *Brucella abortus* СКО S-форма; 17 – *Brucella abortus* 544, 7 пассаж S-форма

бруцелла с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), согласно инструкции к набору для дальнейшего их секвенирования. После экстракции проведено прямое секвенирование полученных продуктов с использованием набора BigDye Terminator v.3.1.

Проведены исследования по сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей участка гена Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии бруцелла с имеющимися данными международного банка генов.

Следующим шагом при изучении фрагмента гена Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* является проведение сравнительного анализа нуклеотидной последовательности секвенированного участка генома с имеющимися генами данной бактерии в Генбанке.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых генов проводили с помощью компьютерных программ Vector NTI Suite 9 и BLAST (на сайте NCBI).

Результаты исследований по выравниванию и сравнительному анализу фрагмента гена Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии бруцелла представлены на рисунке 2.

	242	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370
0001/H Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
0002/H Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
0003/H Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
0004/H Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
0005/H Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
AE017224.1 Br.a str 9-941 Chrom.2	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
Alkali1 Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
Alkali2 Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
Alyea08 Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
KD1 Br.a SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
CP000888.1 Br.a S19 Chrom.2	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
CP003177.1 Br.a A13334 Chrom.2	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
G398381.2 Br.a Iznagar Cu-Zn SOD	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
UK0198212 Br.a SOD	238	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
UK01987578 Br.a SOD	244	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
UK02535 Br.a SOD	241	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									
Consensus	242	GGGCTTTC	TGCTCCGG	CGGCGG	CGGATATG									

	347	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
0001/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0002/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0003/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0004/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0006/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0007/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0008/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
0009/H Br.a SOD	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
544 Br.a SOD	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
AE017224.1 Br.a str 9-941 Chrom.2	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
Alkali1 Br.a SOD	346	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
Alkali2 Br.a SOD	346	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
Alyea08 Br.a SOD	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
KD1 Br.a SOD	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
CP000888.1 Br.a S19 Chrom.2	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
CP003177.1 Br.a A13334 Chrom.2	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
G398381.2 Br.a Iznagar Cu-Zn SOD	344	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
UK0198212 Br.a SOD	336	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
UK01987578 Br.a SOD	346	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
UK02535 Br.a SOD	343	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									
Consensus	347	ATGCTGAC	CGCAGG	TGAGTGA	AGCAGC	CGTCTT									

Рисунок 2 – Сравнительный анализ фрагмента последовательности гена Cu-Zn SOD различных штаммов бактерии рода *Brucella*, выделенных на территории Республики Казахстан

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности по гену Cu-Zn SOD показал, что штамм *Brucella abortus* 0002/Н относящийся к 3 биовару, выделенный в Жамбылской области, отличается от штамма *Brucella abortus* 0001/Н заменой нуклеотида А на G в позиции 393. Остальные штаммы *Brucella abortus*, выделенные в РК идентичны со

штаммами из Генбанка – *Brucella abortus*, str 9-941 (AE017223.1), *Brucella abortus*, str A13334 (CP003176.1), *Brucella abortus*, str S19 (CP000887.1) и *Brucella abortus* Cu-Zn SOD (GQ398381.2). Штаммы *Brucella melitensis* 0003/Н, *Brucella melitensis* 0004/Н, *Brucella melitensis* 0005/Н 3 биовара, выделенные в этой же области, отличаются от штаммов *Brucella abortus* заменой нуклеотидов А на G в позиции 300. Изучение молекулярно-генетических свойств кодирующего белка Cu-Zn SOD обладающего иммуногенными свойствами является актуальным решением при создании высокоэффективной противобруцеллезной вакцины.

В литературах встречаются данные о значительных протективных действиях фермента SOD. Например, SOD у *Brucella abortus* является Т-зависимым антигеном, который индуцирует пролиферацию Т-клеток и продукцию гамма-интерферона у инфицированных мышей [5]. Вакцинация мышей клетками *Escherichia coli*, экспрессирующего фермент Cu-Zn-SOD *B. abortus*, формировала существенную защиту против бруцелл [6]. Использование с этой же целью плазмидной ДНК, включающей ген Cu-Zn-SOD *Brucella abortus*, также индуцировало гуморальный и клеточный иммунный ответ против возбудителей бруцеллеза. Протективный эффект этой вакцинации был подобен с вакцинацией штаммом *Brucella abortus* RB51 [7].

Таким образом, антиоксидантные ферменты защищают микроорганизмы от окислительных субстратов, образующихся не только в

результате метаболических процессов, но и в процессе фагоцитоза фагоцитирующими клетками, и тем самым играют роль фактора патогенности.

Выводы

В данной работе были изучены молекулярно-генетические свойства кодирующего белка Cu-Zn SOD казахстанских штаммов бактерии бруцелла. По результатам исследования видно, что нуклеотидные последовательности гена Cu-Zn SOD штамма *Brucella abortus* 0002/Н, выделенный в Жамбылской области, отличается от штамма *Brucella abortus* 0001/Н нуклеотидной заменой А на G в позиции 393. Остальные штаммы *Brucella abortus*, выделенные в РК идентичны со штаммами из Генбанка. Штаммы *Brucella melitensis* 0003/Н, 0004/Н, и 0005/Н отличаются от штаммов *Brucella abortus* нуклеотидной заменой в позиции 300.

В настоящее время данный ген вызывает высокий интерес при конструировании эффективных и безопасных вакцин против бруцеллеза, так как, является иммуногенным и протективным.

Литературы

1. Bricker B.J., Tabatabai L.B., Judge B.A., Deyoe B.L., Mayfield A.E. Cloning, Expression, and Occurrence of the Brucella Cu-Zn Superoxide Dismutase // National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, and Zoology Department, Iowa State University: American Society for Microbiology. – 1990. – P. 2935-2939.

2. Louisa B.T. and Steven G.H. Cattle Serologically Positive for Brucella abortus Have Antibodies to B. abortus Cu-Zn Superoxide Dismutase // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1994. – P. 506-510.

3. Курбанов А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности // Международный медицинский журнал. – 2009. – №1. – С. 136-139.

4. Angel A. Onate, Sandra Cespedes, Alex Cabera, Rodolfo Ribers, Andrs Gonzalez, A DNA vaccine coding CU, Zn Superoxide Dismutase of Brucella abortus Induces Protective Immunity in BALB/c Mice // American Society for microbiology. – 2003. – Vol. 71, №9. – P. 4857-4861.

5. Gonzalez-smith A., Vemulapalli R., Andrews E., Onate A. Evaluation of brucella abortus DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to Il-2 // Immunobiology. – 2006. –Vol. 211, № 1-2. – P. 65-74.

6. Onate A., Vemulapalli R., Andrews E. et al. Vaccination with live escherichia coli expressing brucella abortus Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent B. abortus // Inf. Immun. – 1999. – Vol. 67, № 2. – P. 986-988.

7. Onate A., Cespedes S., Cabrera A. et al. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of brucella abortus induces protective immunity in balb // Inf. Immun. – 2003. – Vol. 71, № 9. – P. 4857-4861.

