

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
И ГЕНЕТИКАМОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
И ГЕНЕТИКАMOLECULAR
BIOLOGY
AND GENETICS

УДК 619:576.8.078:616.981.42

К.К. Акылбаева*, Г.О. Шыныбекова, С.О. Садикалиева,
К.Т. Султанкулова, В.М. Строчков, Б.А. Еспембетов,
Н.Т. Сандыбаев,
А.Р. Сансызбай, А.М. Мелисбек

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Республика Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский
*E-mail: karla8408@mail.ru

**Молекулярно-генетический анализ
внешнего мембранного белка Omp19 бактерии
Brucella abortus, выделенной в Республике Казахстан**

В данной статье представлены результаты выполненных работ по молекулярно-генетическому анализу гена, кодирующего внешний мембранный белок *Omp19* штаммов бактерии *Brucella abortus*, выделенных на территории Республики Казахстан. Анализ нуклеотидной последовательности казахстанских штаммов бактерии *Brucella abortus* по гену *Omp19* показал 100% идентичность между собой. Штамм Алаколь2 *Brucella abortus*, выделенный в Талдыкорганском регионе Алматинской области, штамм СКО *Brucella abortus*, выделенный в Северо-Казахстанской области, и штаммы *Brucella abortus* из Генбанка с ID номерами L27997, CP003176.1 и U35742.1 отличаются наличием одной нуклеотидной замены, А на Г, в позиции 334 и степень идентичности составляет 99%.

Также выявлено, что штаммы *Brucella abortus*, выделенные в различных регионах Республики Казахстан, отличаются от штаммов из Генбанка с ID номерами: E017223.1, CP000887 наличием множественных замен в нуклеотидной последовательности.

Ключевые слова: внешний мембранный белок, бактерия *Brucella abortus*, ПЦР (полимеразная цепная реакция), секвенирование, нуклеотидная последовательность.

K.K. Akylbayeva, G.O. Shynybekova, S.O. Sadikaliyeva,
K.T. Sultankulova, V.M. Storchkov, B.A. Espembetov, N.T. Sandybayev,
A.R. Sansyzbay, A.M. Melisbek

**Molecular genetic analysis of the external membrane protein Omp
19 bacteria *Brucella abortus*, isolated in the
Republic of Kazakhstan**

This article presents the results of performed work on the molecular genetic analysis of the gene encoding the outer membrane protein Omp19 strains of bacteria *Brucella abortus*, isolated in the territory of the Republic of Kazakhstan. Nucleotide sequence analysis of Kazakhstan strains of bacteria *Brucella abortus* Omp19 gene showed 100 % identity with each other. Alakol 2 strain *Brucella abortus*, highlighted in Taldykorganskiy region of Almatinskaya oblast, SKO *Brucella abortus* strain, highlighted in the North-Kazakhstan oblast and *Brucella abortus* strains from Genbank with ID numbers L27997, CP003176.1 and U35742.1 are characterized by a single nucleotide substitution, A to G, at position 334 and a degree of identity is 99 %.

Also it is found that *Brucella abortus* strains, isolated in different regions of the Republic of Kazakhstan are different from the strains of the Genbank with ID numbers: E017223.1, SR000887 in presence of multiple substitutions in the nucleotide sequence.

Key words: outer membrane protein, bacteria *Brucella abortus*, PCR (polymerase chain reaction), sequencing, nucleotide sequence.

К.К. Акылбаева, Г.О. Шыныбекова, С.О. Садикалиева,
К.Т. Султанкулова, В.М. Строчков, Б.А. Еспембетов, Н.Т. Сандыбаев,
А.Р.Сансызбай, А.М. Мелисбек

**Қазақстан Республикасында бөлініп алынған
Brucella abortus бактериясының Omp
19 сыртқы мембраналық ақуызын молекулалы-генетикалық талдау**

Осы мақалада *Brucella abortus* бактериясының қазақстандық штамдарының Omp19 сыртқы мембраналық ақуызы молекулалы-генетикалық талдаудың нәтижелері көрсетілген. Нуклеотидті тізбектің талдауы қазақстандық штамдарының *Brucella abortus* бактериясының Omp19 гені бойынша өзара 100% ұқсастығын көрсетті. Алматы облысының Талдықорған аймағында бөлініп алынған *Brucella abortus* Алакөл 2 штамы, сонымен қатар Солтүстік Қазақстан облысында бөлініп алынған *Brucella abortus* СКО штамы және Генбанктан алынған ID нөмірлері: L27997, CP003176.1 және U35742.1 *Brucella abortus* штамдары 334 позициядағы А-нен G-ге бір нуклеотидті ауысыммен ажыратылады және оның ұқсастық деңгейі 99%-ды құрайды.

Сондай-ақ, Қазақстан Республикасының әртүрлі аймақтарынан бөлініп алынған *Brucella abortus* штамдары, Генбанктан алынған ID нөмірлері: E017223.1, CP000887 штамдарынан нуклеотидтік тізбектегі көптеген ауысыммен ерекшеленетіні анықталды.

Түйін сөздер: сыртқы мембраналық ақуыз, *Brucella abortus* бактериясы, ПТР (полимеразды тізбекті реакция), секвенирлеу, нуклеотидті тізбек.

Бруцеллез – особо опасная и социально значимая инфекция, вызываемое бактериями рода *Brucella*. Данная болезнь приносит значительный экономический ущерб и представляет собой мировую проблему для медицины и ветеринарии [1, 2]. Естественным резервуаром бруцелл в природе являются животные.

По данным Объединенного комитета экспертов ВОЗ по бруцеллезу (1986), эта болезнь среди животных регистрируется в 155 странах мира. Наиболее широко бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Юго-Восточной Азии, Африки, Центральной и Южной Америки [3, 4].

При создании вакцины основным действующим началом являются иммуногенные белки, ответственные за выработку иммунитета. Многие белки бактерии *Brucella abortus* исследованы, и определены их роли в иммунном ответе против бруцеллеза.

В наших экспериментах в качестве объекта исследования был выбран ген, кодирующий белок Omp19 бактерии *Brucella abortus*.

Белок Omp19 (мол.масса 19 кДа) является белком наружной мембраны, представляет собой липопроtein, и это выражается во всех видах и известных биоварах *Brucella abortus* [5].

В связи с этим проведение молекулярно-генетических исследований гена *Omp19* бактерии *Brucella abortus*, выделенной от больных животных на территории Республики Казахстан, является актуальным.

Материалы и методы

В данной работе использованы штаммы бактерии *Brucella abortus*, выделенные на территории Республики Казахстан, которые представлены в таблице 1.

Выделение бактериальной ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора «PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent» фирмы Applied Biosystems, согласно протоколу производителя.

ПЦР постановка. Амплификацию фрагментов ДНК генов бактерии *Brucella abortus* проводили на термоциклере «GeneAmp PCR 9700», фирмы «Applied Biosystems». Для амплификации фрагментов ДНК генов бактерии *Brucella abortus* использован праймер с нуклеотидной последовательностью:

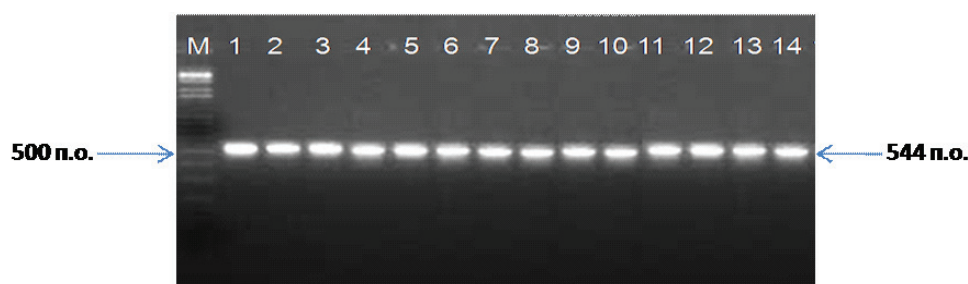
5'-CGCATATGGGAATTTCAAAAGCAAGTCT-3';

5'-CGCTCGAGGCGCGACAGCGTCACGGCCT-3'.

Размер продуктов составляет 544 п.о.

Амплификацию проводили в 50 µl, содержащих 5 µl 10X ПЦР буфера (Qiagen), 1 µl 10 mM dNTPs (NEB), 0,1 µl ДНК, 1 µl каждого прайме-

ра (20 pmol/µl), 0,25 µl 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.



М – 1 kb Маркер, Invitrogen; 1 – положительный контроль *Brucella abortus* 544; 2 – *Brucella abortus* 0001/H; 3 – *Brucella abortus* 0002/H; 4 – *Brucella abortus* 0006/B; 5 – *Brucella abortus* 0007/B; 6 – *Brucella abortus* 0008/B; 7 – *Brucella abortus* 0009/X; 8 – *Brucella abortus* ЮКО 198 212; 9 – *Brucella abortus* ЮКО 2535;

10 – *Brucella abortus* ЮКО 198 767578; 11 – *Brucella abortus* Алаколь 1; 12 – *Brucella abortus* Алаколь 2; 13 – *Brucella abortus* Атырау 88; 14 – *Brucella abortus* СКО

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов фрагментов генов, кодирующих белок внешней мембраны *Omp19* штаммов бактерии *Brucella abortus*, выделенных на территории Республики Казахстан

Таблица 1 – Штаммы бактерии *Brucella abortus*, выделенные на территории Республики Казахстан

Наименование штамма	Регионы
<i>Brucella abortus</i> 0001/H	Жамбылская область
<i>Brucella abortus</i> 0002/H	
<i>Brucella abortus</i> 0006/B	Алматинская область
<i>Brucella abortus</i> 0007/B	
<i>Brucella abortus</i> 0008/B	
<i>Brucella abortus</i> в R-форме 0009/X	Южно-Казахстанская область
<i>Brucella abortus</i> ЮКО 198 212	
<i>Brucella abortus</i> ЮКО 2535	
<i>Brucella abortus</i> ЮКО198767578	
<i>Brucella abortus</i> Алаколь 1	Алматинская область, Талдыкорганский регион
<i>Brucella abortus</i> Алаколь 2	
<i>Brucella abortus</i> Атырау 88	Атырауская область
<i>Brucella abortus</i> СКО	Северо-Казахстанская область
<i>Brucella abortus</i> 544	контроль, эталонный штамм

Анализ ПЦР продуктов. Детекцию ПЦР продуктов провели на 1% агарозном геле в ТАЕ буфере с бромистым этидием.

Секвенирование. Для секвенирования гена *Omp19* штаммов бактерии *Brucella abortus*, выделенных на территории Республики Казахстан,

использовали метод дидеоксисеквенирования по Сенгеру на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, Applied Biosystems. В качестве полимера для капилляров использовали POP-7. Нарботку терминирующих продуктов ДНК проводили методом циклического секвенирования.

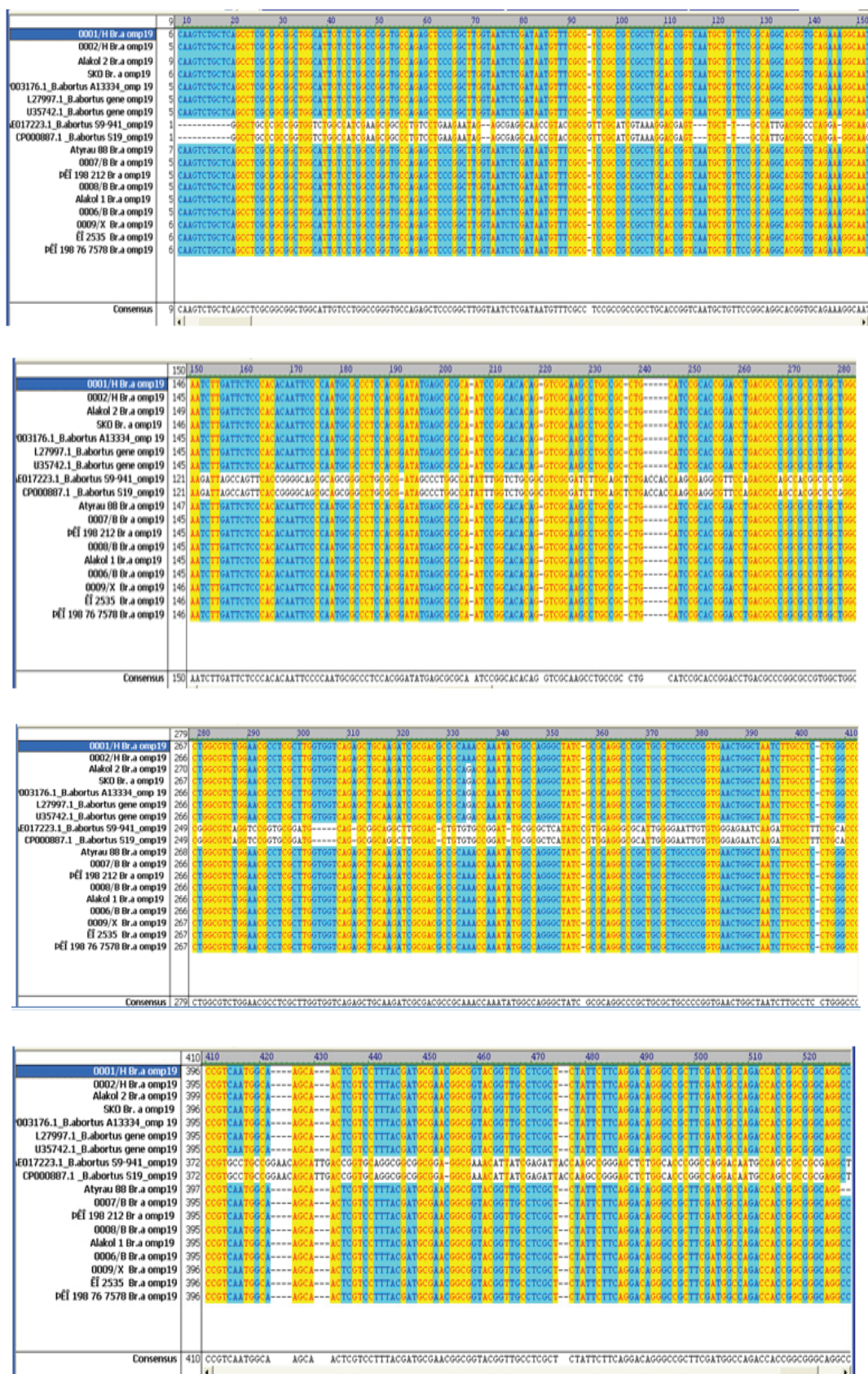


Рисунок 2 – Сравнительный анализ фрагмента последовательности гена *Omp 19* различных штаммов возбудителя *Brucella abortus*, выделенных на территории Республики Казахстан

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности исследуемого участка гена *Omp19* штаммов бактерии бруцеллы проведен с помощью компьютерных программ Vector NTI Suite 9 с данными Генбанка.

Результаты и их обсуждение

Внешние мембранные белки бруцеллы были идентифицированы Dubray и Bezard в начале 1980-ых и представлены как потенциальные иммуногенные и защитные антигены [6].

В литературных источниках встречаются публикации по созданию вакцин против бруцеллеза на основе данных белков [7, 5].

В данной работе объектом исследования является белок внешней наружной мембраны *Omp19*, который используется при создании вакцины против бруцеллеза и характеризуется как защитный и иммуногенный белок.

С целью изучения гена *Omp19* штаммов бруцелл, выделенных на территории Республики Казахстан, был проведен ПЦР анализ.

На рисунке 1 представлены результаты амплификации фрагментов ДНК генов, кодирующий белок внешней мембраны *Omp19* штаммов возбудителя *Brucella*.

В результате проведенного ПЦР анализа установлено, что размеры ПЦР продукта гена *Omp 19* соответствуют 544 п.о.

Исследования по сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей участка гена *Omp19* штаммов бактерии *Brucella abortus*, выделенных в Республике Казахстан, с имеющимися данными международного банка

генов «GenBank» проводилось с помощью компьютерной программы *Vector NTI*.

Результаты исследований по выравниванию и сравнительному анализу фрагментов генов *Omp19* штаммов бактерии *Brucella abortus* с данными генбанка представлены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что сравниваемые последовательности штаммов, выделенных в различных регионах, не отличаются между собой и идентичны на 100%. Штамм Алаколь2 *Brucella abortus*, выделенный в Талдыкорганском регионе Алматинской области, штамм СКО *Brucella abortus*, выделенный в Северо-Казахстанской области, и штаммы *Brucella abortus* из Генбанка с ID номерами L27997, CP003176.1 и U35742.1 отличаются от остальных штаммов наличием одной нуклеотидной замены, А на Г, в позиции 334, степень идентичности составляет 99%.

Выявлено, что казахстанские штаммы *Brucella abortus* отличаются от штаммов из Генбанка с ID номерами: E017223.1, CP000887 наличием множественных замен в нуклеотидной последовательности.

Таким образом, в результате молекулярно-генетических исследований штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Республики Казахстан, по гену *Omp19* было выявлено, что данные штаммы имеют высокую гомологичность между собой. Штамм Алаколь2 *Brucella abortus*, выделенный в Талдыкорганском регионе Алматинской области, и штамм СКО *Brucella abortus*, выделенный в Северо-Казахстанской области, отличаются наличием одной нуклеотидной замены, степень идентичности составляет 99%.

Литература

- 1 England T., Kelly I., Jones RD, MacMillan A., Wooldridge M. A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. // Prev Vet Med. – 2004. – V. 63 (1-2). – P. 63-73.
- 2 Hubalek Z., Scholz HC, Sedlacek I., Melzer F., Sanogo YO, Nesvadbova J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*) // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2007. – V.7(4). – P.679-87.
- 3 Ременцова М.М. Эпидемиология и задачи борьбы с бруцеллезом // Здоровоохранение Казахстана. 1988. – №2. – С.5-7.
- 4 Navarro E., Fernandez J. A., Escribano J. et al. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. J. Clin. Microbiol. 1999. – V. 37. – P. 1654-1657.
- 5 Pasquevich K.A., Estein S.M., Garcia Samartino C., Zwerdling A., Coria L.M., Barrionuevo P., Fossati C.A., Giambartolomei G.H., Cassataro J. Immunization with recombinant *Brucella* spp. outer membrane proteins Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD41 and CD81 T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection // Infect Immun. – 2008. – 77. – P. 436-445.
- 6 Dubray G., Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell wall anti-genes protective in murine experimental Brucellosis // Ann. Rech. Vet. – 1980. – V. 11. – P. 367-373.
- 7 Alexandrova G.I., Polezaev F.I., Budilovsky G.N., Garmashova L.M., Topuria N.F., Egorov A.Y., Romejko-Gurko Y.R., Koval T.A., Lisovakaya K.V., Klimov A.I., et al. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: reactogenicity and antigenic activity of cold-adapted recombinants and analysis of isolates from the vaccines // Infect Immun. – 1984. – V.44. – P.734-739.

References

- 1 England T., Kelly I., Jones RD, MacMillan A., Wooldridge M. A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. // *Prev Vet Med.* – 2004. – V. 63 (1-2). – P. 63-73.
- 2 Hubalek Z., Scholz HC, Sedlacek I., Melzer F., Sanogo YO, Nesvadbova J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*) // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2007. – V.7(4). – P.679-87.
- 3 Remencova M.M. Jеpidеmiоlоgiја i zadachi bor’by s brucellezom // *Zdravооhranеniе Kazahstana.* 1988. – №2. – P.5-7.
- 4 Navarro E., Fernandez J. A., Escribano J. et al. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 1999. – V. 37. – P. 1654-1657.
- 5 Pasquevich K.A., Estein S.M., Garcia Samartino C., Zwerdling A., Coria L.M., Barrionuevo P., Fossati C.A., Giambartolomei G.H., Cassataro J. Immunization with recombinant *Brucella* spp. outer membrane proteins Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD41 and CD81 T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection // *Infect Immun.* – 2008. – 77. – P. 436–445.
- 6 Dubray G., Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell wall anti-genes protective in murine experimental Brucellosis // *Ann. Rech. Vet.* – 1980. – V. 11. – P. 367-373.
- 7 Alexandrova G.I., Polezaev F.I., Budilovsky G.N., Garmashova L.M., Topuria N.F., Egorov A.Y., Romejko-Gurko Y.R., Koval T.A., Lisovakaya K.V., Klimov A.I., et al. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: reactogenicity and antigenic activity of cold-adapted recombinants and analysis of isolates from the vaccines // *Infect Immun.* – 1984. – V.44. – P.734-739.