

© Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Иванов С.А., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., 2018  
УДК 579.843.1:575.25:612.017.4:002.5/6

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОСТРОВКА VcB V. CHOLERAЕ МЕТОДОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.А. Иванов,  
Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,  
ул. М. Горького, 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Проведен анализ экспрессии генов *V. cholerae*, входящих в состав островка патогенности VcB, с помощью приема полногеномного секвенирования транскриптома. Островок обнаружен только у *tcpA*<sup>+</sup> холерных вибрионов и расположен на второй хромосоме. В работе использовали два штамма *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup> и один штамм *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>. Пул суммарной РНК выделяли по методике, основанной на дифференциальном осаждении, в присутствии ионов лития. В суммарном пуле секвенированной РНК была идентифицирована транскрибируемая РНК более 3 500 известных генов холерного вибриона. В составе пула суммарной РНК, выделенной из двух токсигенных штаммов, обнаружены РНК-транскрипты пяти генов, входящих в островок патогенности VcB, исключая ген VCA0282, идентифицированный ранее как ISVch5-транспозаза. В составе пула суммарной РНК из штамма *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> не обнаружены транскрипты двух генов – ранее описанного VCA0282-транспозазы и VCA0283. Возможным объяснением может быть существование копий этих генов в других участках генома вибрионов *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>.

**Ключевые слова:** *V. cholerae*, островок VcB, транскриптом, полногеномное секвенирование.

S.O. Vodop'janov, A.S. Vodop'janov, R.V. Pisanov, S.A. Ivanov, B.N. Mishan'kin, I.P. Olejnikov □  
**TRANSCRIPTION ANALYSIS OF GENE EXPRESSION ISLAND VcB V. CHOLERAЕ BY METHOD OF FULL-GENOMIC SEQUENCING** □ Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40, M. Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russia.

The aim of the study was to analyze the expression of *V. cholerae* genes that are part of the VcB island by means of full-genomic sequencing of the transcriptome. The VcB island is localized on the second chromosome in all toxigenic vibrios studied and is absent in the atoxigenic apiliated strains. Two strains of *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup> and one strain *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> were studied. The pool of total RNA vibrios was isolated by a technique based on differential precipitation in the presence of lithium ions. In the total pool of sequenced RNA, RNA encoded in the order of 3 500 by known cholera vibrio genes was identified. In a pool of total RNA from two *ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup> strains RNA transcripts were found for the five genes included in the VcB island, excluding the VCA0282 gene, previously identified as the ISVch5-transposase. In the the pool of total RNA from the *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> strain no transcripts of the two genes previously described as VCA0282-transposase and VCA0283 were detected. A possible explanation may be the existence of copies of these genes in other parts of the genome of the *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> *V. cholerae*.

**Key words:** *V. cholerae*, VcB ISLAND, transcript, whole genomic sequencing.

На основании ежегодного мониторинга контаминации холерными вибрионами O1- и O139-серогрупп поверхностных водоемов Российской Федерации получены данные о возможности длительного сохранения нетоксигенных холерных вибрионов в некоторых водных объектах с определенными эколого-гигиеническими условиями, что, однако, не исключает вероятность их заносов [3, 5]. Анализ VNTR-генотипов выделенных культур позволил сделать вывод о возможном длительном пребывании вибрионов в водных объектах [3, 5].

Одним из генетических признаков аутохтонных *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> штаммов *V. cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации, является отсутствие островка патогенности VcB. У токсигенных штаммов эта генетическая структура локализована на второй хромосоме [1]. В составе островка VcB локализовано шесть генов, возможная роль которых в реализации патогенных свойств вибрионов остается неизученной, что делает целесообразным их углубленное изучение с использованием современных методов молекулярной биологии. Одним из таких методов является транскриптомный анализ экспрессии генов.

Транскриптом – совокупность всех транскриптов, синтезируемых клеткой, включая ин-

формационные РНК и некодирующие РНК. Анализ транскриптома с помощью приема полногеномного секвенирования является одним из наиболее точных и чувствительных методов оценки тонких регуляторных механизмов бактериальной клетки. Изучение транскриптома позволило охарактеризовать ответ различных вибрионов на условия внешней среды и макроорганизма [7, 13].

**Цель исследования** – анализ экспрессии генов *V. cholerae*, входящих в состав островка VcB, с помощью приема полногеномного секвенирования транскриптома.

**Материалы и методы.** В работе использовали клинические токсигенные (*ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup>) штаммы *V. cholerae* O1 № 569В, 5879 и атоксигенный (*ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>) штамм *V. cholerae* O1 № 20000, выделенный из реки Темерник в 2016 году. Культуру каждого штамма засеивали в 10 мл жидкой питательной среды (синказная, синтетическая, триптовная, LB, АК1) в концентрации 10<sup>8</sup>. Культивирование проводили с принудительной аэрацией на шейкере 1 200 об./мин при 33 °С в течение 16 часов [2]. Далее из каждой пробы отбирали по 1 мл культуральной среды, клетки в планктонной фазе осаждали центрифугированием при 14 000 об./мин при 4 °С и использовали для

выделения РНК по оригинальной авторской методике, основанной на дифференциальном осаждении в кислых условиях биополимеров бактерий в присутствии ионов лития. Синтез кДНК проводили с помощью набора «Реверта» (ИЛС, Москва). Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторе *MiSeq* (Illumina) [4].

Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы *FastQC* [6]. Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы *Trimmomatic* [8] и *Lighter* [10]. Анализ транскриптома проводили с помощью программ *TopHat* [11] и *Bowtie* [9]. Авторское программное обеспечение для обработки данных разрабатывали на языках программирования *Java* и *Python*.

Количественный анализ экспрессии генов проводили по показателю *FPKM* (*fragments per kilobase per million mapped reads*), рассчитываемому по алгоритму *Cufflinks* [12].

**Результаты исследования.** В суммарном пуле секвенированной РНК трех исследованных штаммов в планктонной форме, выращенных в различных условиях, с помощью авторской программной обработки была идентифицирована РНК, кодируемая примерно 3 500 известными генами холерного вибриона. Следует отметить, что спектр экспрессируемых генов у различных изученных штаммов несколько варьировал. Так, в структуре генома штамма 5879, использованного в настоящем исследовании, ранее было идентифицировано 3 699 генов (*GenBank Accession Number PQBQ00000000.1*). В то же время в геномах некоторых штаммов *V. cholerae* различными группами авторов выявлено от 3 504 (штамм 16961, *GenBank Accession Numbers AE003852.1, AE003853.1*) до 3 907 (штаммы 2012EL-2176, CP007634.1, CP007635.1) генов. На основании этого можно сделать вывод, что у вибрионов, изученных в условиях эксперимента, экспрессируется абсолютное большинство известных генов.

Далее нами был изучен профиль транскрипции генов, входящих в состав островка патогенности *VcB*. Данный островок локализован на второй хромосоме у всех изученных токсигенных вибрионов и отсутствует у атоксигенных апилированных штаммов [1]. В его состав входят шесть генов VCA0281—VCA0286 (табл. 1). В составе пула суммарной РНК из двух штаммов *ctxA+* *tcpA+* *V. cholerae* O1,

культивированных на всех питательных средах, РНК-транскрипты были обнаружены для всех генов, за исключением гена VCA0282, кодирующего ISVch5-транспозазу (табл. 2) [1]. Учитывая, что транспозаза – это фермент, катализирующий вырезание, перенос ДНК, связывающий одноцепочечную ДНК и встраивающий последнюю в геномную ДНК, возможно, что в изученных условиях культивирования транспозаза не экспрессируется клетками вибрионов и является «молчащим» геном, который не транслируется в белковую структуру. Это неудивительно, поскольку экспрессия подобных ферментов реализуется в условиях стрессового ответа и включается в ответ на стрессовые условия, сопровождающиеся появлением в клетках одноцепочечной деградированной ДНК. Кроме того, учитывая присутствие гена VCA0282 в составе суммарной ДНК вибрионов 5879 и 569В, необнаружение транскриптов свидетельствует об отсутствии примеси ДНК вибрионов в препарате суммарной РНК, использованной для секвенирования. Отсутствие транскриптов гена VCA0282 при наличии этого гена в геноме анализируемого штамма может служить своего рода «отрицательным контролем» при проведении дальнейших исследований подобного рода на холерном вибрионе.

В составе пула суммарной РНК из планктонной формы атоксигенного (*ctxA-* *tcpA-*) штамма *V. cholerae* № 20000 отсутствовали транскрипты двух генов (VCA0282 и VCA0283). При этом ген VCA0283 содержит варибельный тандемный повтор *VcB*, отсутствие которого ранее неоднократно было показано у всех *ctxA-* *tcpA-* штаммов холерного вибриона [1, 3, 5]. Обнаружение в пуле РНК-транскриптов у штамма *V. cholerae* № 20000 генов VCA0281 (кодирующий интегразу), VCA0284 (гипотетический уропатогенный белок) и VCA0285 (гипотетический белок) оказалось неожиданным, поскольку у штамма 20000 отсутствует островок *VcB*. Возможным объяснением этому может быть либо наличие близких аналогов указанных генетических структур, либо существование делетированного островка *VcB* в других участках генома вибрионов. Детальные дополнительные исследования на большом наборе *ctxA-* *tcpA-* штаммов, выделенных на территории Российской Федерации, позволят разобраться в этом интересном вопросе.

**Таблица 1. Характеристика генов и их продуктов, находящихся внутри островка патогенности *VcB V. cholerae***

**Table 1. Characteristics of genes and their products inside the island of pathogenicity *VcB V. cholerae***

Обозначение генов островка <i>VcB</i> в полногеномных сиквенсах штаммов			Размер (п.о.)	Ген, возможный продукт
<i>V. cholerae</i> 5879	<i>V. cholerae</i> N16061	<i>V. cholerae</i> MJ-1236		
–	VCA0281	CDS 23	972	Интеграса*
C3B50_12975	VCA0282	CDS 24	981	ISVch5-транспозаза*
C3B50_12970	VCA0283	CDS 25	1 242	Гипотетический белок. Содержит варибельный тандемный повтор <i>VcB</i>
C3B50_12965	VCA0284	CDS 26	531	Уропатогенный белок*
C3B50_12960	VCA0285	CDS 27	672	Гипотетический белок
C3B50_12955	VCA0286	CDS 28	351	Гипотетический белок

\* Функция генов определена по данным полногеномного сиквенса штамма *V. cholerae* MJ-1236.

\* The function of the genes identified according to the genome sequence of a strain of *V. cholerae* MJ-1236

Таблица 2. Количественный анализ экспрессии генов *V. cholerae*, входящих в островок VcB, рассчитанный по показателю FPKM, определенному по алгоритму Cufflinks [11]Table 1. Quantitative analysis of the genes expression of *V. cholerae* included in the island of VcB calculated by the index FPKM defined by the algorithm Cufflinks [11]

Ген	Штамм <i>V. cholerae</i> и среда инкубации										
	<i>V. cholerae</i> 20000					<i>V. cholerae</i> 5879			<i>V. cholerae</i> 569B		
	1	2	3	4	5	2	3	4	3	4	5
VCA0281	337	414	481	282	420	222	299	373	315	351	361
VCA0282	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VCA0283	0	0	0	0	0	68	210	267	225	111	166
VCA0284	530	321	128	718	403	372	652	195	245	230	219
VCA0285	471	305	260	458	333	289	304	241	203	357	217
VCA0286	333	219	187	0	231	272	0	0	247	225	218

Примечание. Жидкие питательные среды, использованные для культивирования: 1 – синказная, 2 – синтетическая, 3 – триптоновая, 4 – LB, 5 – среда АК1.

Note. Liquid culture media used for cultivation: 1 – sinkazny, 2 – synthetic, 3 – triptonew, 4 – LB, 5 – the AKI environment

**Заключение.** Таким образом, на модели островка патогенности VcB разработан прием анализа суммарного пула РНК холерного вибриона с помощью полногеномного секвенирования. В случае расширения спектра анализируемых генов и условий культивирования данный метод будет полезен при изучении закономерностей ответа холерного вибриона на различные внешние факторы, включая условия макроорганизма. Кроме того, этот подход перспективен для поиска генов, продукты которых принимают участие в реализации патогенных свойств вибрионов, и для выявления возможных мишеней для серодиагностики, поскольку позволяет на первоначальном этапе биоинформационного анализа исключить из дальнейшей работы «молчащие» гены. Данный способ может быть использован и на модели других патогенных микроорганизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п. 6–13 см. References)

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Дуванова О.В. Корреляция между наличием области варибельного тандемного повтора VcB и островком патогенности VPI-1 у *Vibrio cholerae* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. № 2. С. 49–52.
2. Кругликов В.Д., Ломов Ю.М., Рожков К.К., Мазрухо А.Б., Михась Н.К., Монахова Е.К., Каминский Д.И., Овсова Л.М. Влияние различных аминокислот и солей аммония в составе синтетической питательной среды на продукцию холерного энтеротоксина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003. № 3. С. 16–21.
3. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., Романова Л.В., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин М.Б., Черепанина И.Я., Дуванова О.В., Шишияну М.В. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2004. № 4. С. 28–33.
4. Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И. Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae* // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 2. С. 36–39.
5. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El-Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области с 2003–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 2 (263). С. 39–41.

#### REFERENCES

1. Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Mishan'kin B.N., Olejnikov I.P., Duvanova O.V. Korelyaciya mezhd u nalichiem oblasti variabel'nogo tandemnogo povtora VcB i ostrovkom patogennosti VPI-1 u *Vibrio cholerae* [Correlation between presence of field of variable tandem repetition of VcB and an island of pathogenicity of VPI-1 at *Vibrio cholerae*]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017, vol. 35, no. 2, pp. 49–52. (In Russ.)
2. Kruglikov V.D., Lomov Yu.M., Rozhkov K.K., Mazruho A.B., Mishan' N.K., Monahova E.K., Kaminskij D.I., Ovsova L.M. Vliyanie

- razlichnyh aminokislot i solej ammoniya v sostave sinteticheskoy pitatel'noj sredy na produkciju holernogo ehnterotoksina [Influence of various amino acids and salts of ammonium as a part of synthetic nutrient medium on production of a cholera enterotoxin]. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunobiologii*, 2003, no. 3, pp. 16–21. (In Russ.)
3. Mishan'kin B.N., Vodopyanov A.S., Lomov Yu.M., Romanova L.V., Vodopyanov S.O., Suchkov I.Yu., Mishan'kin M.B., Cherepanina I.Ya., Duvanova O.V., Shishiyanu M.V. Retrospektivnyj VNTR-analiz genotipov shtammov *Vibrio cholerae* O1, vydelennyh na territorii Rostovskoj oblasti v gody VII pandemii holery [The retrospective VNTR analysis of genotypes of strains of *Vibrio cholerae* O1 allocated for territories of the Rostov region in days of the VII pandemic of cholera]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*, 2004, no. 4, pp. 28–33. (In Russ.)
4. Pisanov R.V., Vodopyanov A.S., Simakova D.I. Rol' malykh RNK v kontrole ehkspressii genov, вовлеченных в realizaciyu patogennosti *Vibrio cholerae* [Role of small RNA in control of an expression of the genes involved in realization of pathogenicity of *Vibrio cholerae*]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*, 2017, no. 2, pp. 36–39. (In Russ.)
5. Titova S.V., Kruglikov V.D., Ezhova M.I., Vodopyanov A.S., Arhangel'skaya I.V., Vodopyanov S.O., Moskvitina E.A. Analiz dinamiki vydeleniya i biologicheskikh svojstv shtammov *V. cholerae* O1 El-Tor, izolirovannykh iz vodnykh obe'ktov na territorii Rostovskoj oblasti s 2003–2014 gg. [The analysis of dynamics of allocation and biological properties of the strains *V. cholerae* O1 El-Tor isolated from water objects in the territory of the Rostov region since 2003–2014]. *Zdorovyje naseleniya i sreda obitaniya*, 2015, no. 2 (263), pp. 39–41. (In Russ.)
6. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed: 30.01.2018).
7. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El-Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun.*, 2006, no. 74(6), pp. 3633–3642.
8. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 2014, no. 30 (15), pp. 2114–2120.
9. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 2009, 10:R25. DOI:10.1186/gb-2009-10-3-r25
10. Song L., Florea L., Langm B.. Lighter: Fast and Memory-efficient Sequencing Error Correction without Counting. *Genome Biology*, 2014, no. 15 (11), p. 509.
11. Trapnell C., Pachter L. and Salzberg S.L. TopHat: Discovering Splice Junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105–1111. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp120
12. Trapnell C., Williams B., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., Baren J., Salzberg S., Wold B., Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010. DOI:10.1038/nbt.1621
13. Williams T.C., Elliot R., Blackman E.R., Morrison S.S., Gibas C.J., Oliver J.D. Transcriptome Sequencing Reveals the Virulence and Environmental Genetic Programs of *Vibrio vulnificus* Exposed to Host and Estuarine Conditions *Plos one*. 2014, no. 1 (27). DOI: 10.1371/journal.pone.0114376

#### Контактная информация:

**Водопьянов** Сергей Олегович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»  
Роспотребнадзора  
e-mail: sergei100v@gmail.com

#### Contact information:

**Vodopyanov** Sergey, Doctor of medical sciences, head of the laboratory biochemistry of microbes «Rostov-on-Don protivochumny institute» Rospotrebнадзор  
e-mail: sergei100v@gmail.com