

# ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИИ *Vibrio cholerae*

- ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ
- ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ
- МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ

**ИНДИКАЦИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ  
*Vibrio cholerae* В ПЦР**

# ЭТАПЫ ДИАГНОСТИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР

## Подготовка пробы

## Выделение ДНК



## Амплификация ДНК (ПЦР)



## Регистрация результатов

# ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Исследуемый материал:

- *клинический материал*

- испражнения (нативные или 1% п.в.)
- рвотные массы (нативные или 1% п.в.)
- мазок содержимого прямой кишки (в 1% п.в.)

- *объекты окружающей среды*

- вода поверхностных водоемов
- сточные воды

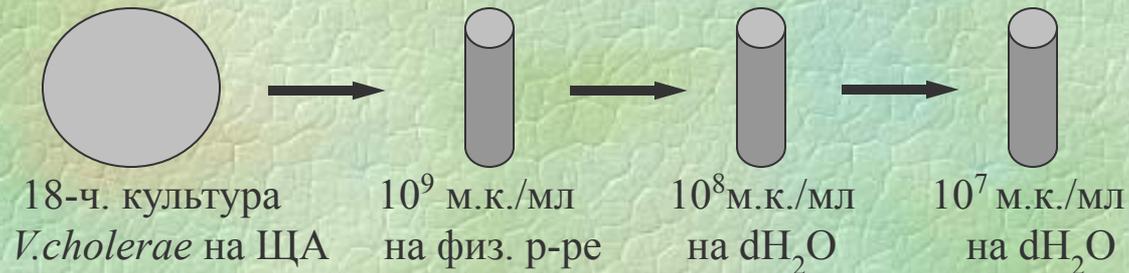
} *объем пробы - 1 литр*  
*концентрирование пробы:*  
- центрифугированием  
- фильтрацией

- смывы с поверхностей (берут стерильным зондом, помещают в 1,5 мл. пробирку с 0,5 мл. 1 % п.в.)

- **I-я и II-я пептонная вода**

центрифугирование в течение 10 мин. при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 300 мкл физ. раствора.

- **микробная взвесь  $10^6$ - $10^7$  м.к./мл**



## **ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ПРОБ**

добавление мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при 56 °С 30 мин.

# ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

## Применение стандартных наборов для выделения ДНК (по протоколу)

Изготовители: - РосНИПЧИ «Микроб»

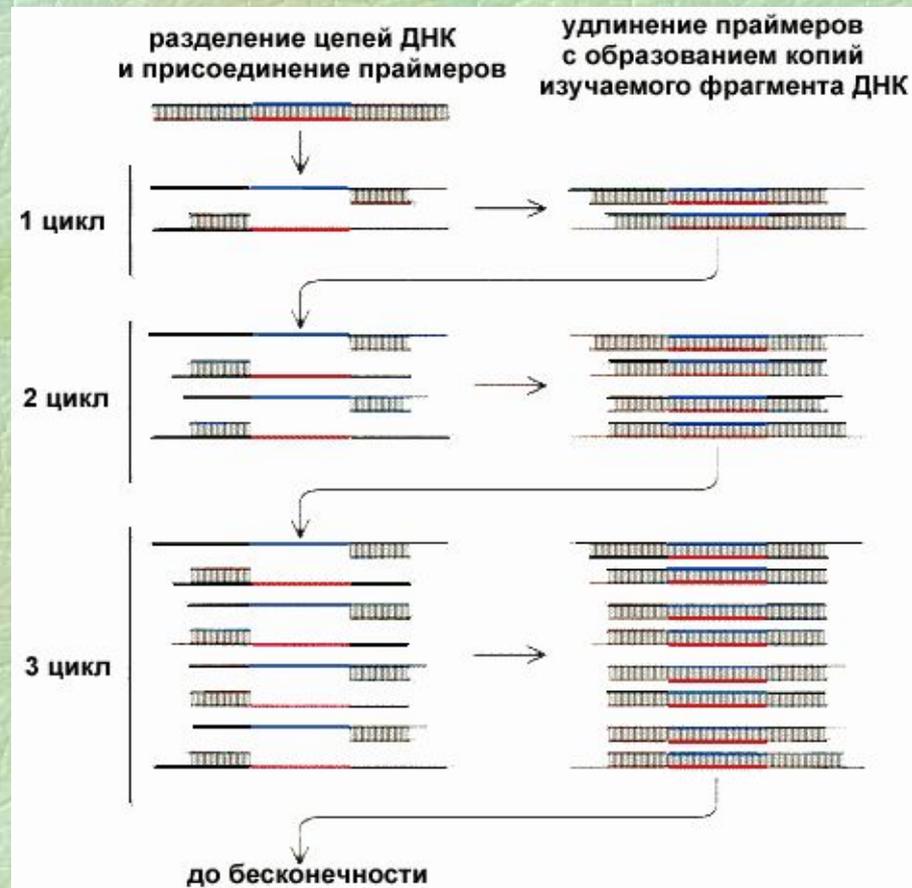
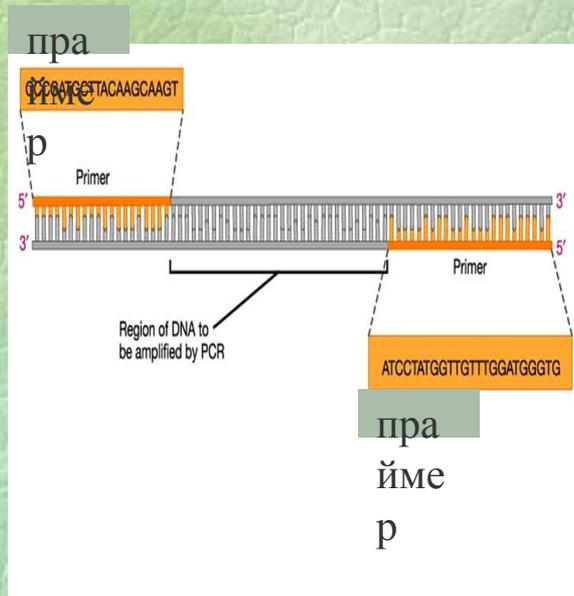
- ДНК-Технология

- Интерлабсервис (ДНК-сорб, Рибо-преп)

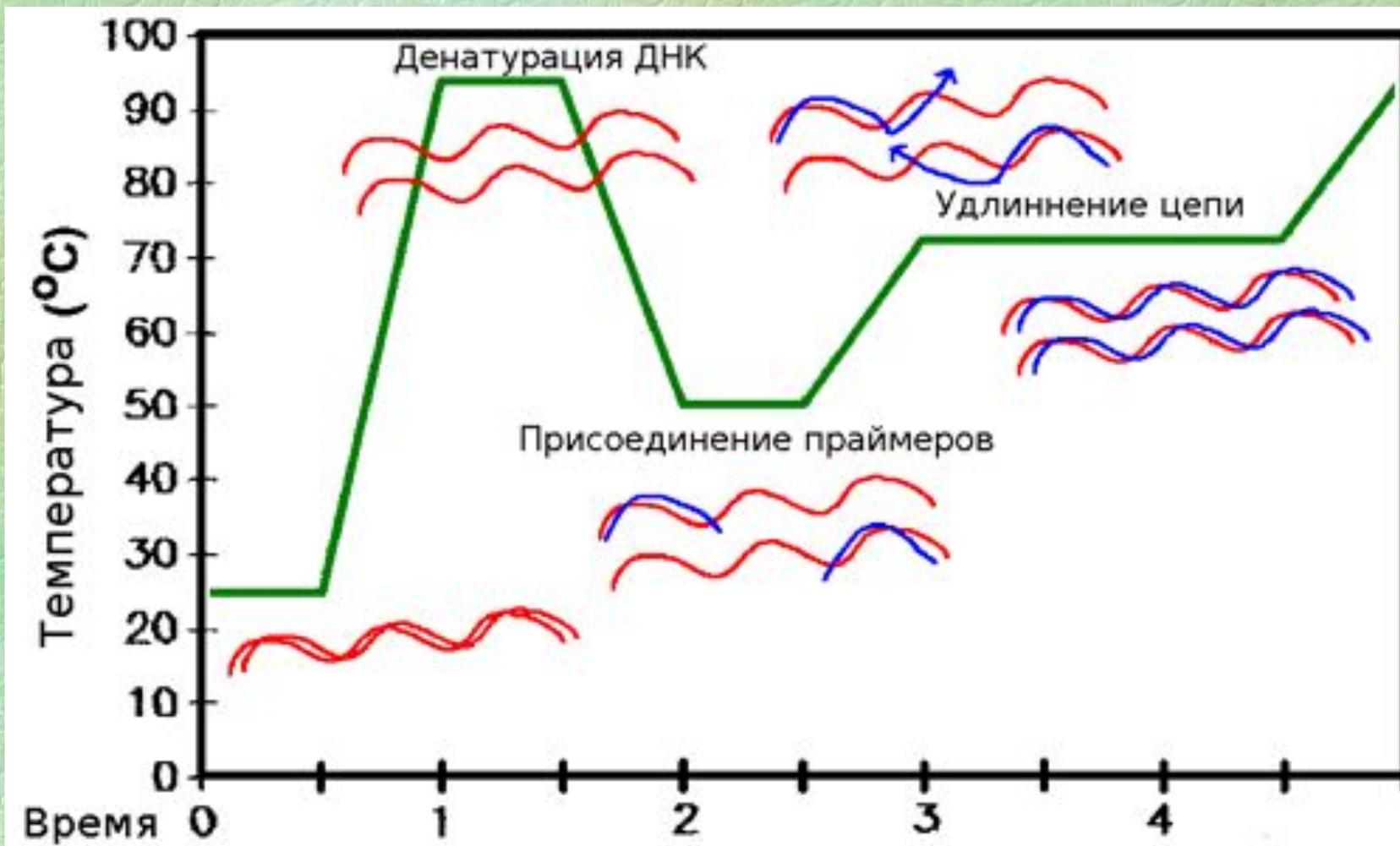


# АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК (ПЦР)

ферментативная циклическая реакция синтеза *in vitro* относительно коротких (от нескольких десятков до нескольких тысяч п.о.) двухцепочечных фрагментов ДНК на ДНК-матрице

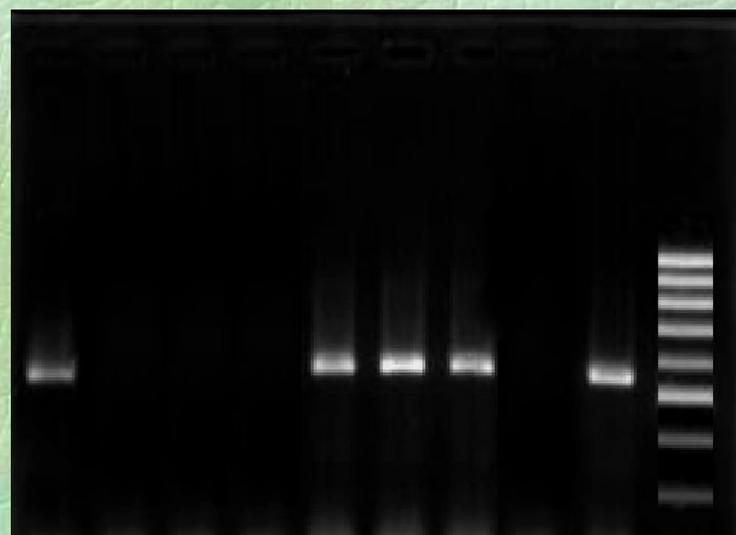


# СТАДИИ ПЦР



**Выявление ДНК *V. cholerae* в  
ПЦР с электрофоретическим  
учетом реакции**

# Тест-система для выявления *V.cholerae* **ctxA+** (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1000 н.п.

←

564 н.п.

←

300 н.п.

←

1. *V.cholerae* eltor И-449 (б-ой)
2. *V.cholerae* eltor И-1321 (вода)
3. *V.cholerae* eltor И-1355 (вода)
4. *V.cholerae* eltor И-1283 (вода)
5. *V.cholerae* eltor И-1263 (б-ой)
6. *V.cholerae* eltor И-1298 (б-ой)
7. *V.cholerae* eltor И-1345 (б-ой)
8. Дистил. вода (- контр.)
9. *V.cholerae* eltor М-878 (+ контр.)
10. Маркер молекулярного веса

1, 5-7 пробы - *ctxA*<sup>+</sup> → культуры эпидемически опасные  
2- 4 пробы - *ctxA*<sup>-</sup> → культуры эпидемически неопасные

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ (ГЕН *VIBRIO CHOLERAЕ* - ИДЕНТИФИКАЦИЯ – РЭФ)**

Рег. уд. № ФСР 2012/13430 - 210512

ТУ 9398-039-01898109-2011

(РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)

**ПЦР-смесь-«ctx-tcp»,**

определение эпидемической значимости:

фрагменты генов *ctxA* (569 п.н.) *tcpA* (218 п.н.)

**ПЦР-смесь-«O1-биовар»**

определение принадлежности к O1 серогруппе биовара

Эльтор: фрагменты генов *wbeN* (420 п.н.) и *hlyAeltor/ne-O1* (264 п.н.)

**ПЦР-смесь-«O139»**

определение принадлежности к O139 серогруппе

фрагмент гена *wbfR* (439 п.н.)

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬТОР БИОВАРОВ, ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЭЛЬТОР ВИБРИОНОВ НА ТИПИЧНЫЕ И ИЗМЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ (ГЕН *VIBRIO CHOLERAE* ВАРИАНТ СТХВ-РЭФ)**

Рег. уд. № ФСР 2012/13427 - 210512

ТУ 9398-032-01898109-2011

(РосНИПЧИ «Микроб», Саратов)

**Типичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара** фрагменты генов *wbO1* (кодирует биосинтез O1-антигена), *cas3* (хеликаза CRISPR/CAS-системы), *ctxBClass* (аллель гена *ctxB* классического типа).

**Типичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор вибрионов** фрагменты генов *wbO1*, *rtxC* (кластер *rtx* генов, кодирующих биосинтез RTX-токсина), *ctxBEltor* (аллель гена *ctxB* Эль Тор типа).

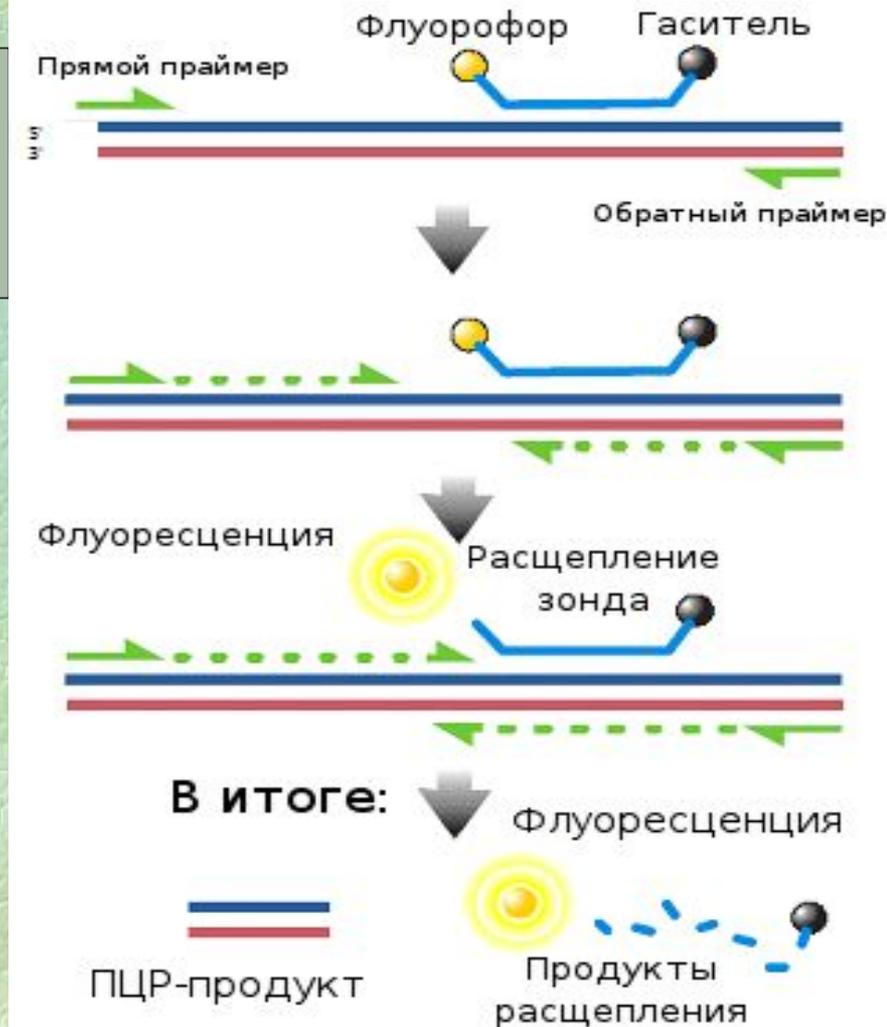
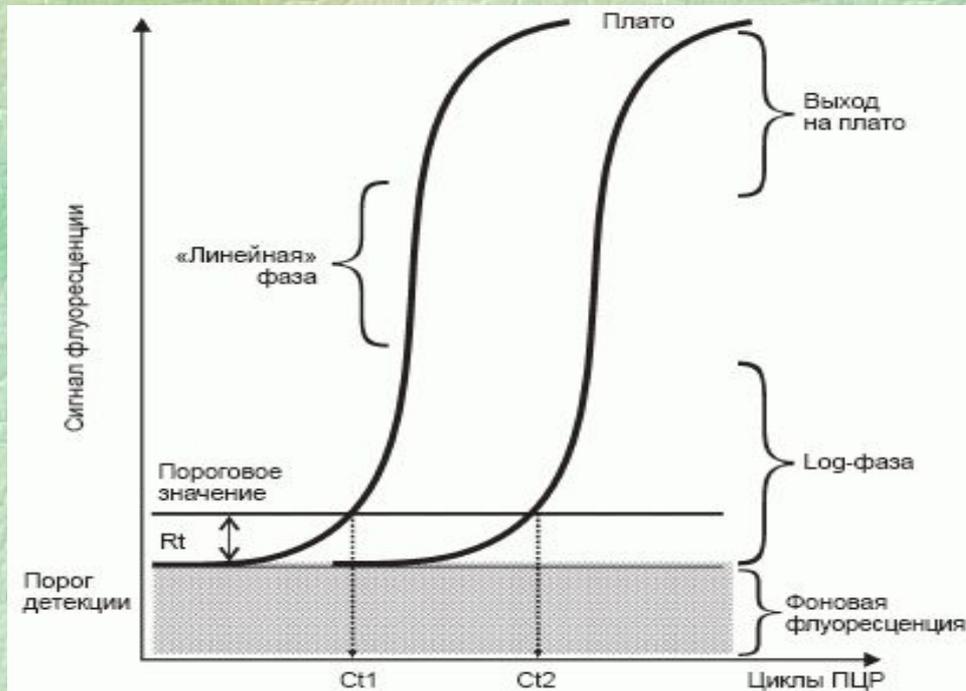
**Измененные варианты Эль Тор вибрионов** наряду с генами *wbO1* и *rtxC* характерно наличие ампликона *ctxBClass*.

**Выявление ДНК *V.cholerae* в  
ПЦР с учетом результатов в  
режиме реального времени  
(real-time PCR)**



# ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (real-time PCR) (ДИНАМИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ В ПРОЦЕССЕ ПЦР)

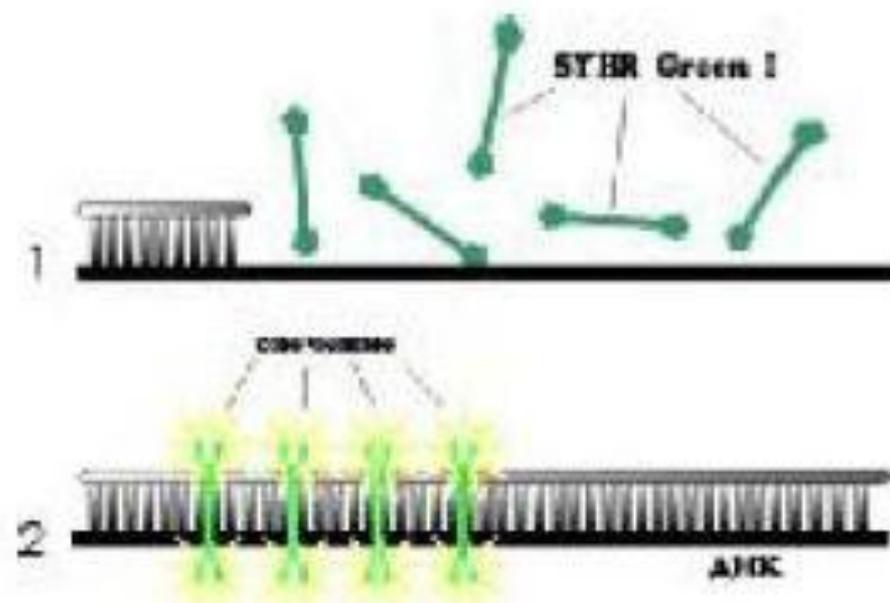
Сигнал флюоресценции  
пропорционален количеству  
молекул ДНК





# Использование интеркалирующих красителей

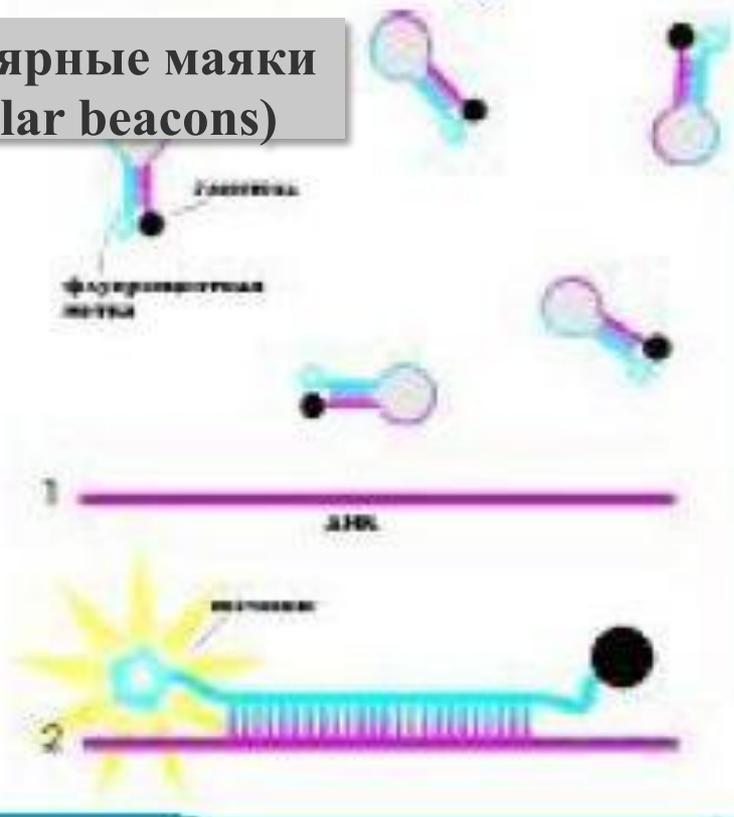
- Уровень флуоресценции интеркалирующих агентов в свободном состоянии низкий.
- При связывании с двухцепочечной ДНК их флуоресценция резко возрастает
- Чем больше образуется молекул ДНК в ходе ПЦР, тем сильнее флуоресценция.



# Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями («молекулярные маяки»)

- Наличие комплементарных концевых последовательностей приводит к образованию шпильки и к тушению флюоресценции.
- При связывании зонда с ДНК матрицей происходит расхождение флюоресцентной метки и гасителя

Молекулярные маяки  
(molecular beacons)



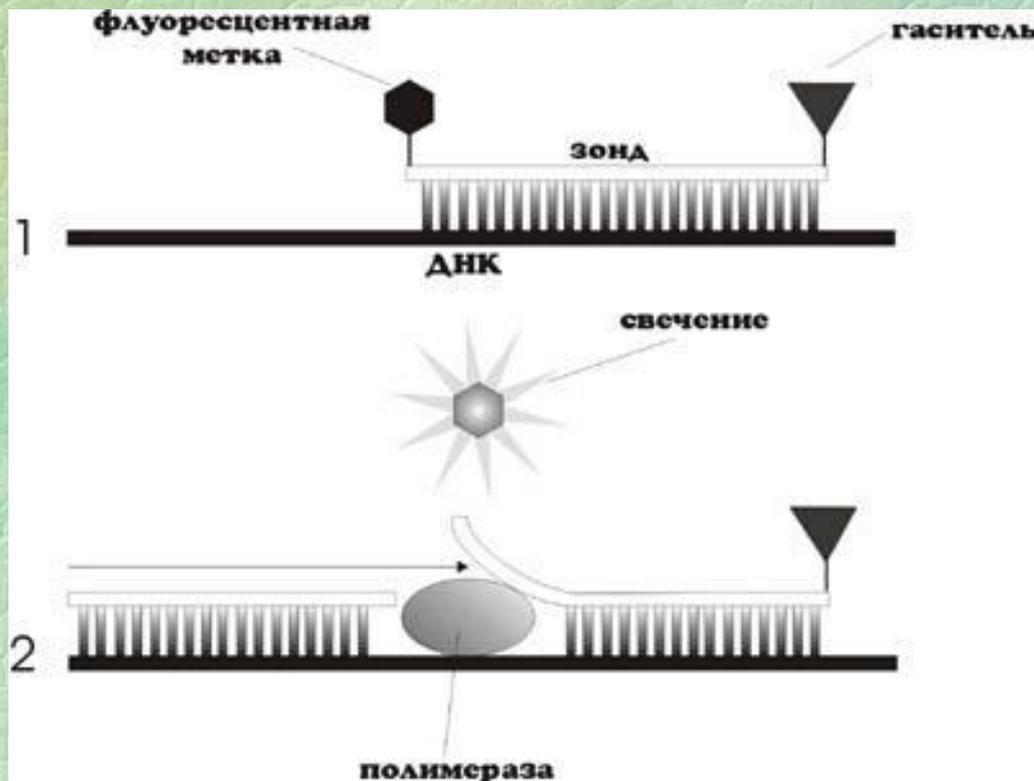
# **ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ флуоресцентных методов детекции результатов ПЦР**

- 1. Высокая чувствительность**
- 2. Специфичность (гибридизационные методы)**
- 3. Возможность количественного анализа**
- 4. Упрощение аналитического процесса**
- 5. Скорость**
- 6. Уменьшение вероятности контаминации**
- 7. Стандартная интерпретация результатов**

- 1. Стоимость (флюорофоры, зонды)**
- 2. Высокая чувствительность (контаминация, исходное количество материала)**
- 3. Дополнительное оборудование**

# Индикация, идентификация и определение эпидемической значимости *V. cholerae* в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени

## СУЩНОСТЬ МЕТОДА



В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды с флуоресцентной меткой в 5' и гасителем флуоресценции в 3' положении. Зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области.

## НАБОР РЕАГЕНТОВ

для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией

**«АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL»**

Предназначен для:

- выявления ДНК *V. cholerae* (по наличию последовательности гена *hly*)
- идентификации патогенных штаммов *V. cholerae* (по наличию основных факторов патогенности – *ctxA*, *tcpA*)
- определение принадлежности к серогруппе O1 (по наличию амплификации мишени *wbeT*) или к серогруппе O139 (по наличию амплификации мишени *wbfR*).

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ В  
МУЛЬТИПЛЕКСНОМ ФОРМАТЕ В ДВУХ ПРОБИРКАХ:

Пробирка «Скрин» - амплификация мишеней

*ctxA* (FAM/Green)

*tcpA* (ROX/Orange)

внутреннего контрольного образца (JOE/Yellow/HEX)

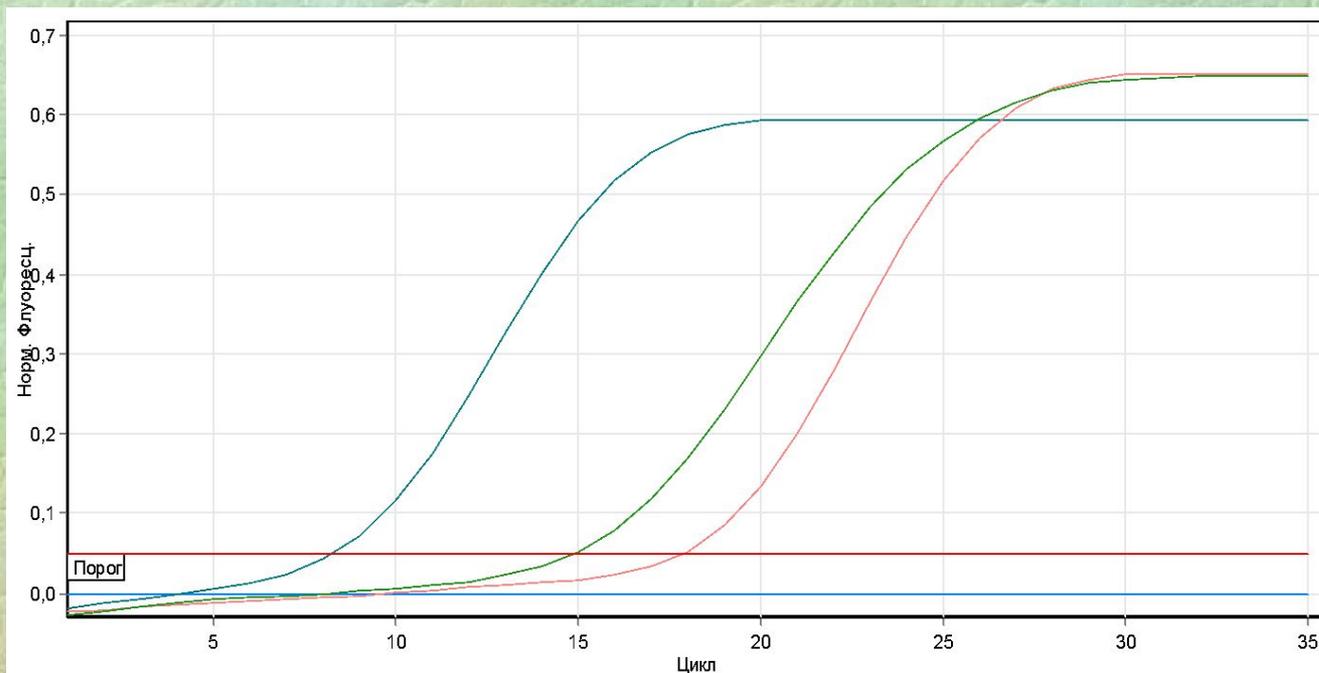
Пробирка «Тип» - амплификация мишеней

*wbeT* (FAM/Green )

*wbeF* (ROX/Orange)

*hly* (JOE/Yellow/HEX )

# УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ



| № | Имя | Тип      | СТ    | Конц. Стандарта | Конц. Расч. (Кон) | Коефф. Ва | Сред. Ct |
|---|-----|----------|-------|-----------------|-------------------|-----------|----------|
| 6 | к-т | Отрицате |       |                 |                   |           |          |
| 7 | 1   | Образец  | 8,28  |                 |                   |           | 8,28     |
| 8 | 2   | Образец  | 17,86 |                 |                   |           | 17,86    |
| 9 | к-т | Положит  | 14,92 |                 |                   |           | 14,92    |

**Учет результатов** – на основании пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (указывается пороговый цикл - Ct)

|  | ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> <u>скрин</u> |                                     |                      | ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> <u>тип</u> |   |                      |
|--|---|-------------------------------------|----------------------|---|---|----------------------|
| Варианты   | Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу       |                                     |                      |   |   |                      |
|  | FAM/Green<br>(ctxA)                                 | JOE/Yellow<br>(BKO)                 | ROX/Orange<br>(tcpA) | FAM/Green<br>(O1)                                 | JOE/Yellow<br>( <i>V.cholerae</i> )<br>(hlyA) | ROX/Orange<br>(O139) |
| <i>V.cholerae</i> O1<br>токсигенный  | < 33  | Любое<br>значение или<br>отсутствие | < 33                 | < 33  | < 33  | Нет значений         |
| <i>V.cholerae</i><br>O139<br>токсигенный   | < 33  | Любое<br>значение или<br>отсутствие | < 33                 | Нет значений                                      | < 33  | < 33                 |
| <i>V.cholerae</i> O1 НЕ<br>токсигенный, но<br>содержащий<br>последовательн-<br>ость tcpA   | Нет значений  | < 33                                | < 33                 | < 33  | < 33  | Нет значений         |
| <i>V.cholerae</i> O139 НЕ<br>токсигенный, но<br>содержащий<br>последователь-<br>ность tcpA | Нет значений  | < 33                                | < 33                 | Нет значений                                      | < 33  | < 33                 |
| <i>V.cholerae</i> O1 НЕ<br>токсигенный   | Нет значений  | < 33                                | Нет значений         | < 33  | < 33  | Нет значений         |
| <i>V.cholerae</i> O139 НЕ<br>токсигенный   | Нет значений  | < 33                                | Нет значений         | Нет значений                                      | < 33  | < 33                 |
| <i>V.cholerae</i> НЕ O1 и<br>НЕ O139   | Нет значений  | < 33                                | Нет значений         | Нет значений                                      | < 33  | Нет значений         |
| Холерные<br>вибрионы НЕ<br>обнаружены  | Нет значений  | < 33                                | Нет значений         | Нет значений                                      | Нет значений                                  | Нет значений         |

# Определение генов, отвечающих за синтез **O1** и **O139** антигенов

| Наименование микроорганизма          | "АмплиСенс V. cholerae - FL"                                | "Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"  | "Ген Vibrio cholerae вариант ctxB-РЭФ"           |
|--------------------------------------|---|--|--|
| <b>V. cholerae O1</b>                | Наличие амплификации по каналу FAM и JOE с ПЦР-смесью "Тип" | Наличие амплификации фрагмента wbeN размером 420 п.н. с ПЦР-смесью "O1-биовар" | Наличие амплификации фрагмента размером 638 п.н. |
| <b>V. cholerae O139</b>              | Наличие амплификации по каналу JOE и ROX с ПЦР-смесью "Тип" | Наличие амплификации фрагмента wbf R размером 439 п.н. с ПЦР-смесью "O139"     | Не определяет                                    |
| <b>V. cholerae non O1 / non O139</b> | Наличие амплификации по каналу JOE с ПЦР-смесью "Тип"       | Не определяет  | Не определяет                                    |

# Определение **биоварспецифичных маркеров** методом ПЦР

| Наименование микроорганизма                     | "АмплиСенс cholerae - FL" V.                             | "Ген V. cholerae - идентификация - РЭФ"   | "Ген Vibrio cholerae вариант ctxB-РЭФ"                                    |
|---|--|---|---|
| <b>V. cholerae классического биовара</b>        | Не определяет  | <u>Наличие</u> амплификации фрагмента <b>wbeN</b> размером 420 п.н. и <u>отсутствие</u> образования фрагмента гена <b>hlyA<sup>eltor/не-01</sup></b> размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-биовар" | Наличие амплификации гена cas 3 размером 415 п.н. с Реакционной смесью 1. |
| <b>V. cholerae (ctxA+ tcpA+) биовара эльтор</b> | Наличие флуоресценции по каналу ROX с ПЦР-смесью "Скрин" | <u>Наличие</u> амплификации фрагментов <b>wbeN</b> размером 420 п.н. и <b>hlyA<sup>eltor/не-01</sup></b> размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-биовар"   | Наличие амплификации гена rtxC размером 265 п.н. с Реакционной смесью 2.  |
| <b>V. cholerae (ctxA- tcpA-) биовара эльтор</b> | Не определяет  | Наличие амплификации фрагментов <b>wbeN</b> размером 420 п.н. и <b>hlyA<sup>eltor/не-01</sup></b> размером 264 п.н. с ПЦР-смесью "01-биовар"  | Наличие амплификации гена rtxC размером 265 п.н. с Реакционной смесью 2.  |

# Определение **эпидемической значимости** холерных вибрионов на основании выявления ***ctxA*** и ***tcpA*** генов методом ПЦР

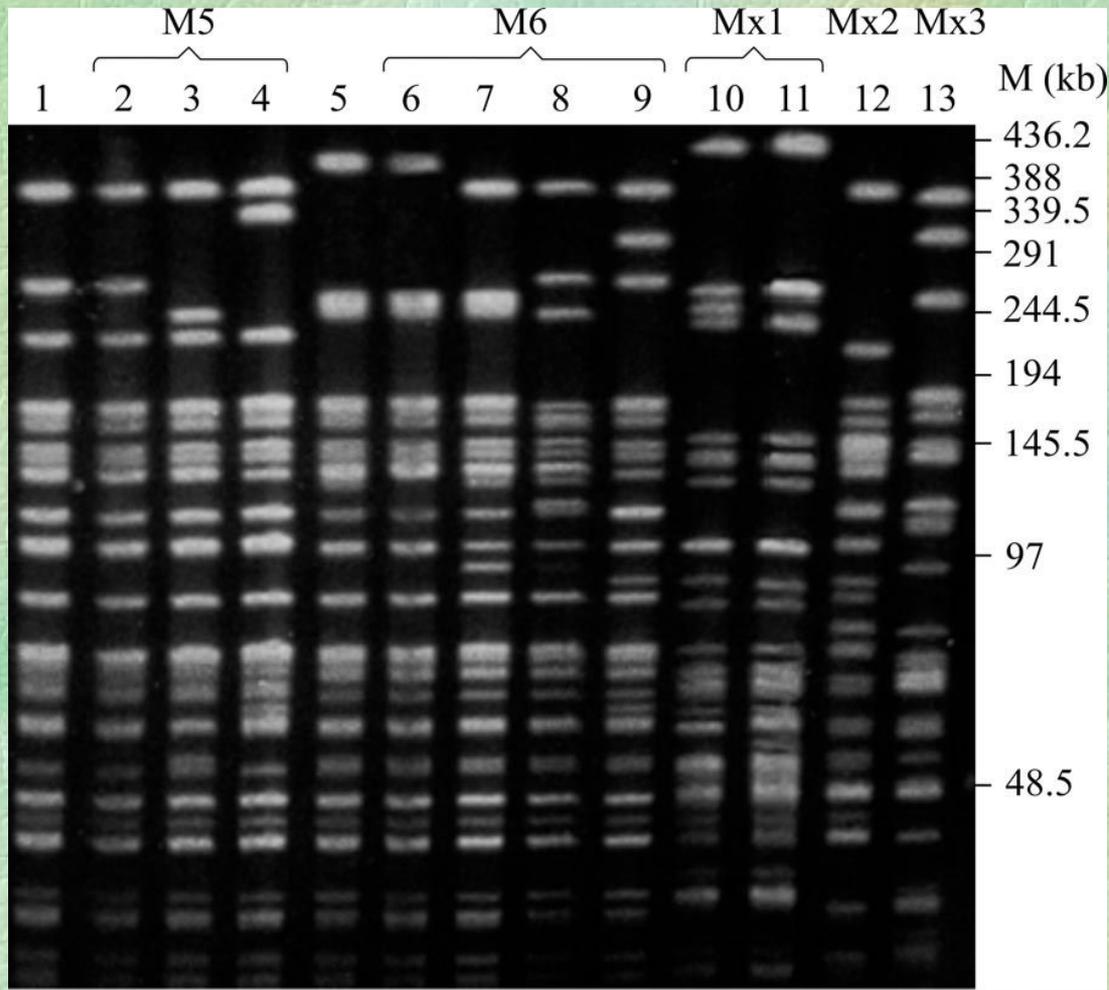
| Наименование микроорганизма  | "АмплиСенс <i>V. cholerae</i> - FL"   | <i>V. cholerae</i> - "Ген <i>V. cholerae</i> - идентификация - РЭФ"  | "ГенХол"  |
|--|---|--|---|
| <b><i>V. cholerae</i> (<i>ctxA</i>+<br/><i>tcpA</i>+) эпидемические значимые</b>                     | Наличие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"                       | Наличие образования фрагментов <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н., <i>tcpA</i> - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"   | Наличие образование фрагмента <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н.    |
| <b><i>V. cholerae</i> (<i>ctxA</i>-<br/><i>tcpA</i>+) эпидемическая значимость требует уточнения</b> | Наличие флуоресценции по каналу ROX и отсутствие - по каналу FAM с ПЦР-смесью "Скрин" | Наличие образования фрагмента гена <i>tcpA</i> размером 218 п.н., отсутствие образования фрагмента гена <i>ctxA</i> размером 564 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp" | Не определяет   |
| <b><i>V. cholerae</i> (<i>ctxA</i>-<br/><i>tcpA</i>-) эпидемические безопасные</b>                   | Отсутствие флуоресценции по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью "Скрин"                    | Отсутствие образования фрагментов <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н., <i>tcpA</i> - 218 п.н. с ПЦР-смесью "ctx-tcp"  | Отсутствие образование фрагмента <i>ctxA</i> гена размером 564 п.н. |

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ

(выяснение источников, путей и факторов распространения холерного вибриона, установления эволюционных взаимосвязей между штаммами):

- **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** – анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов
- **PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)** - метод электрофореза в пульсирующем поле
- **Ribotyping** – Ириботипирование
- **AFLP (amplification fragment length polymorphism)** - полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
- **RAPD (random amplified polymorphic DNA)** - произвольно амплифицированная полиморфная ДНК
- **MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis)** - мультилокусный анализ переменных тандемных повторов
- **MLST (Multilocus sequence typing)** - мультилокусное секвенирование
- **секвенирование** отдельных участков генома
- **SNP-типирование (Single nucleotide polymorphism)**
- **WGS whole genome sequencing**

# PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)



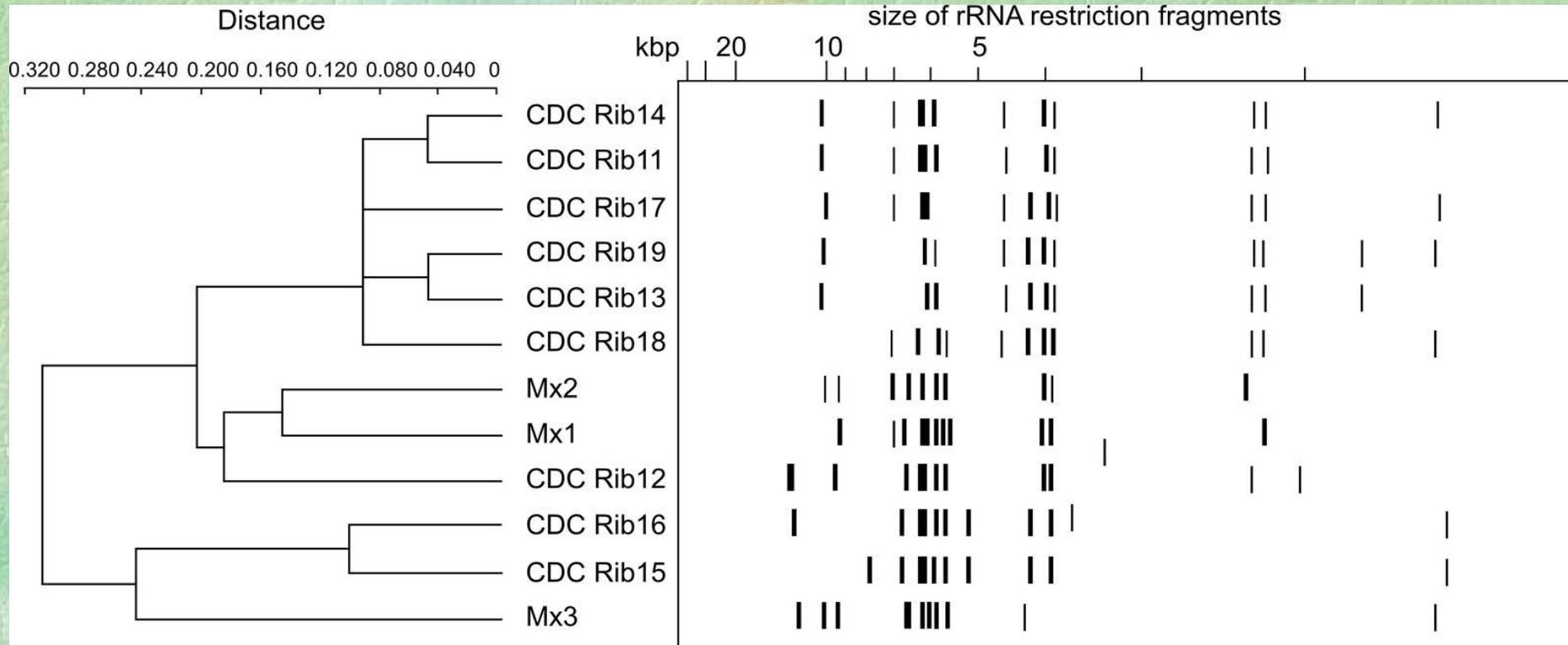
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ:

- *NotI* 5'...GC<sup>^</sup>GGCC GC...3'  
3'...CG CCGG<sup>^</sup>CG...5'

- *SfiI* 5'...GGCCN NNN<sup>^</sup>NGGCC...3'  
3'...CCGGN<sup>^</sup>NNN NCCGG...5'

# RIBOTYPING

Изучение структуры генов рибосомальной РНК (16S и 23S рРНК)



Эндонуклеазы рестрикции:

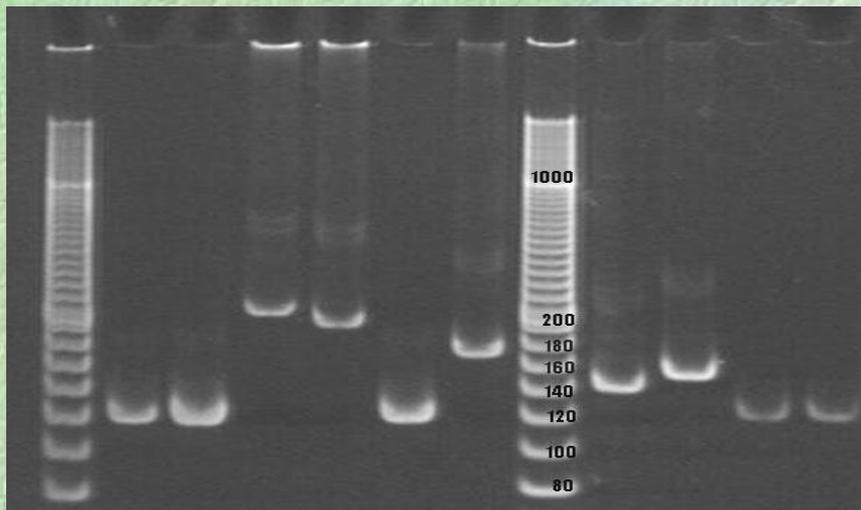
- *HindIII* 5'...A<sup>^</sup>AGCT T...3'

3'...T TCGA<sup>^</sup>A...5'

- *BglII* 5'...GCCN NNN<sup>^</sup>NGGC...3'

3'...CGGN<sup>^</sup>NNN NCCG...5'

# MULTIPLE-LOCUS VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSIS (MLVA)



Электрофорез в 8% ПААГ  
продуктов амплификации локуса  
VcA штаммов *V. cholerae eltor O1*

| Локализация | Исследуемый локус              | Функция                                | Нуклеотидная последовательность повтора | Длина повтора (п.н.), число повторов <sup>1</sup> |
|-------------|--------------------------------|--|---|---|
| 2           | <b>VcA</b><br><b>(VCA0171)</b> | Кодируют белки с неизвестной функцией  | <b>TGCTGT</b>                           | 6 (23)  |
|             | <b>VcB</b><br><b>(VCA0283)</b> |  | <b>ACCAGA</b>                           | 6 (14)  |
| 1           | <b>VcC</b><br><b>(VC0147)</b>  | Кодирует белок клеточного деления FtsY | <b>AACAGA</b>                           | 6 (9)   |
|             | <b>VcD</b><br><b>(VC0437)</b>  | Некодирующая межгенная область         | <b>GACCCTA</b>                          | 7 (7)   |
|             | <b>VcG</b><br><b>(VC1650)</b>  | Кодирует белок коллагеназу             | <b>GATAATCCA</b>                        | 9 (7)   |

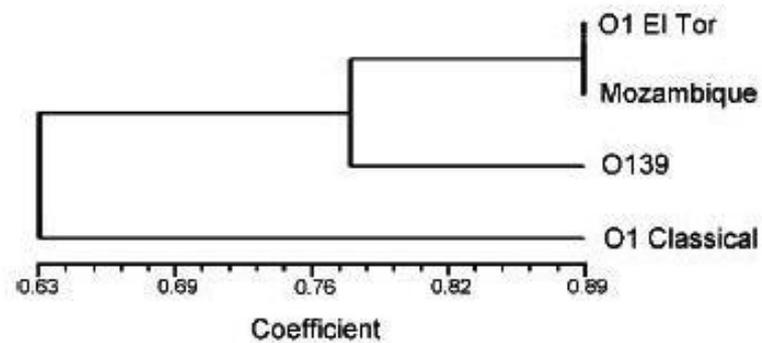
# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

## Типирование на основе секвенирования генов «домашнего хозяйства» (*housekeeping gene*)

**Table 2.** Allele profiles of *V. cholerae* O1 classical, O1 El Tor and O139 strains, and Mozambique isolates of this study

Numbers are previously reported allele profile numbers (Garg *et al.*, 2003). N, New allele type identified in this study.

| Strain or isolate | Locus       |            |             |            |             |            |             |            |            |
|-------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
|                   | <i>dnaE</i> | <i>lap</i> | <i>rstA</i> | <i>gmd</i> | <i>recA</i> | <i>pgm</i> | <i>gyrB</i> | <i>cat</i> | <i>chi</i> |
| O1 El Tor         | 1           | 1          | 2           | 2          | 1           | 1          | 1           | 1          | 1          |
| O1 classical      | 1           | 1          | 12 (N)      | 2          | 3 (N)       | 1          | 1           | 1          | 6 (N)      |
| O139              | 1           | 1          | 13 (N)      | 1          | 1           | 1          | 1           | 1          | 1          |
| Mozambique        | 1           | 1          | 1           | 2          | 1           | 1          | 1           | 1          | 1          |
| O1 El Tor N16961  | 1           | 1          | 1           | 2          | 1           | 1          | 1           | 1          | 1          |

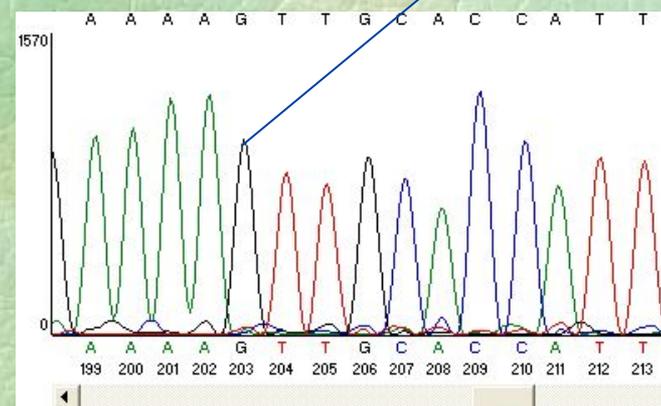
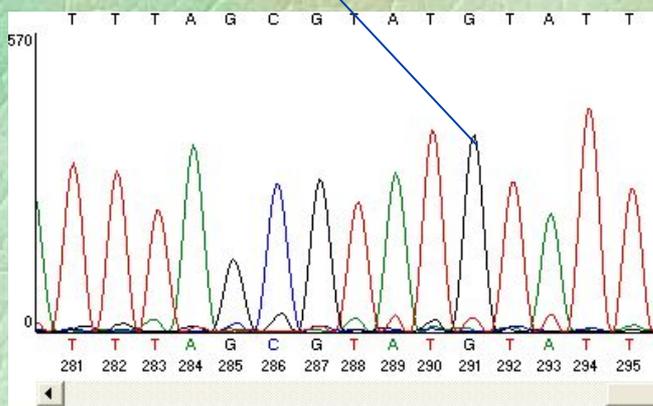


**Fig. 1.** Dendrogram of *V. cholerae* strains based on allele profiles created by using unweighted pair grouping with mathematical averaging (UPGMA). *V. cholerae* isolates from Mozambique were closely related to *V. cholerae* O1 El Tor strains.

# СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *ctxB*

Нуклеотидная последовательность гена *ctxB*  
в штаммах *V. cholerae*, изолированных в **90-е годы**  
(в Сибири и на Дальнем Востоке)

|            | 115 | 120   | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 203 |  |
|------------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| ctxB 16961 | 111 | A T A T A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A T T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1264   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1187   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1184   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1181   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ctxB 569B  | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1335   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1324   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1300   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| » I-1336   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Contig 1   | 111 | A T A C A T A C G C T A A A T G A T A A G A T A T T T T C G T A T A C A G A A T C T C T A G C T G G A A A A A G A G A G A T G G C T A T C A T T A C T T T T A A G A A T G G T G C A A C T T T T |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |



Фрагменты хроматограммы, полученной при секвенировании гена *ctxB*  
(*V. cholerae* eltor И-1324 (Владивосток, 1999 г.), комплементарная цепь)