

УДК 612.853-205  
© Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЦИТОХРОМА CYP51 В КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММАХ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

А.С.Шавкунов<sup>1</sup>, В.Н.Лазарев<sup>1</sup>, Л.Н.Чернаусова<sup>2</sup>, А.В.Кузьмин<sup>2</sup>, В.М.Говорун<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической медицины МЗ РФ, 119828, Москва, ул.Малая Пироговская, 1а; факс (095) 246-45-01; эл. почта: a\_s\_shavkunov@hotmail.ru

<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 4.

В настоящее время наличие информации о полной первичной структуре геномов ряда организмов открывает принципиально новые возможности для разработки высокоэффективных антимикробных препаратов. Актуальной задачей остается поиск эффективных средств противотуберкулезной терапии в связи с ростом в последние годы заболеваний, вызываемых микроорганизмами группы *Mycobacterium tuberculosis*. В этой связи представляет интерес Cyp51-подобный ген *Rv0764c*, кодирующий стерол-14 $\alpha$ -деметилазу из суперсемейства цитохромов P450, выявленный при анализе генома *M. tuberculosis*. Продукт данного гена может стать мишенью для новых противотуберкулезных препаратов на основе производных имидазола. Представляется целесообразным исследование генетического полиморфизма Cyp51-деметилазы в клинических штаммах *M. tuberculosis*. Нами был проведен скрининг клинических изолятов *M. tuberculosis* на наличие функционально значимых мутаций в кодирующей последовательности гена Cyp51-деметилазы с помощью ПЦР-амплификации сегментов гена, анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) соответствующих сегментов относительно референтного штамма H37Rv и секвенирования фрагментов, отличающихся по профилю SSCP. Анализ структуры гена у 64 изолятов показал отсутствие мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка. У 10 изолятов была выявлена незначительная нуклеотидная замена 114 GCT→GCC. Кроме того, при анализе последовательности гена Cyp51 штамма CDC1551 нами была обнаружена аналогичная нуклеотидная замена, о чем ранее не упоминалось в литературе. Полученные данные свидетельствуют о высокой консервативности последовательности гена, что подтверждает целесообразность разработки противотуберкулезных препаратов, действующих на его белковый продукт. Обнаруженный нами однонуклеотидный полиморфизм в кодирующей последовательности гена может найти применение в популяционно-генетических исследованиях *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** цитохром P450, ген *cyp 51*, стерол-14 $\alpha$ -деметилаза, *Mycobacterium tuberculosis*, генетический полиморфизм.

**ВВЕДЕНИЕ.** К началу 60-х годов сложилось представление о туберкулезе как об исчезающем заболевании. Однако этот прогноз не оправдался. По данным ВОЗ, в настоящее время туберкулез лидирует в качестве фактора смертности от инфекционных заболеваний среди взрослого населения. По наиболее благоприятным прогнозам в ближайшее десятилетие ожидается по меньшей мере 80 миллионов новых случаев заболевания туберкулезом (из них около 20 миллионов - со смертельным исходом). При этом значительная доля заболевших

оказывается инфицированной антибиотикорезистентными штаммами *Mycobacterium tuberculosis*, обладающими устойчивостью по отношению к традиционно используемым препаратам [1, 2].

Современная химиотерапия туберкулеза, как правило, предполагает использование комбинаций из нескольких препаратов основной группы, в число которых входят изониазид и рифампицин; однако даже комбинации традиционных препаратов не могут гарантировать успешность лечения, поскольку все чаще встречаются инфекции, вызванные мультирезистентными штаммами *M. tuberculosis*, обладающими устойчивостью к нескольким, а иногда и сразу ко всем препаратам основной группы. Альтернативные курсы химиотерапии могут включать фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин), аминогликозиды (капреомицин), циклосерин, тиацетазон, парааминосалициловую кислоту; их использование по большей части дорого, кроме того, многие из них обладают выраженными побочными эффектами [3].

До последнего времени поиск антимикобактериальных препаратов велся, главным образом, эмпирически. Однако расшифровка генома ряда штаммов *M. tuberculosis* (H37Rv, CDC1551) открывает принципиально новые возможности рациональной разработки новых веществ с противотуберкулезной активностью на основании информации о первичной структуре генов предполагаемых мишеней для лекарственной терапии. Как правило, поиск и отбор таких генов ведется по наличию гомологии с уже изученными генами других организмов, продукты которых обладают жизненно важными функциями. В частности, в качестве потенциальной мишени для противотуберкулезных препаратов нового поколения рассматривается продукт гена *Rv0764 M. tuberculosis* - стерол-14 $\alpha$ -деметилаза (*Cyp51*) из суперсемейства цитохромов P450. Ген был обнаружен в 1997 году при анализе генома штамма H37Rv [4]; в настоящее время это единственный представитель генного семейства *cyp51*, обнаруженный у прокариот. У эукариот стерол-14 $\alpha$ -деметилаза выполняет жизненно важные функции, принимая участие в биосинтезе стероидов клеточной мембраны, а также некоторых регуляторных стероидов [5]. Ингибиторы стерол-14 $\alpha$ -деметилазы из группы азолидов широко используются в клинической практике для лечения грибковых инфекций, при этом было показано, что некоторые мутации в гене *cyp51* обеспечивают резистентность патогенных грибов к азолидам [6].

В работах [7, 8] показано, что белковый продукт гена *Rv0764 M. tuberculosis* обладает спектром поглощения, характерным для цитохромов P450, способен осуществлять деметилирование субстратов *Cyp51*-деметилаз эукариот в положении 14 $\alpha$  и ингибируется при связывании азолидов. Кроме того, продемонстрировано наличие антимикобактериальной (бактериостатической и бактерицидной) активности ряда азолидов *in vitro* [8, 9]. Таким образом, продукт гена *Rv0764* действительно является стерол-14 $\alpha$ -деметилазой *Cyp51* (MT *Cyp51* [7, 8]).

Одним из важных критериев выбора мишени для новых антимикробных препаратов является ее консервативность в ряду клинических изолятов одного вида [10]. На текущий момент в литературе отсутствует информация о вариабельности гена *mt cyp51* в природных популяциях *M. tuberculosis*. Вместе с тем, данная информация может иметь значение для оценки перспективности разработки новых противотуберкулезных препаратов - ингибиторов стерол-14 $\alpha$ -деметилазы, поскольку ранее в гене *cyp51* патогенных микроорганизмов (в частности, *Candida albicans*) были обнаружены мутации, обеспечивающие резистентность к азолидам [6].

Целью настоящей работы была оценка генетической гетерогенности гена *cyp51* в клинических изолятах *M. tuberculosis*.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали геномную ДНК, выделенную из культур клинических изолятов *M. tuberculosis*. Всего в работе был использован материал из 64 клинических изолятов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью.

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ *СУР51 M. TUBERCULOSIS*

Для сравнения нуклеотидных последовательностей использовали программу AliBee - Multiple Alignment 2.0 ([http://www.genebee.msu.su/services/malign\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html)).

Клетки *M. tuberculosis* лизировали в буфере ТТЕ (1% Тритон X-100, 0,2 М трис-НСl, рН 8,3, 0,2 М ЭДТА), инкубируя при 95°C в течение 20 минут. ДНК из лизатов выделяли с использованием набора для выделения из тест-системы "Политуб" (ООО НПФ "Литех").

Для ПЦР-амплификации фрагментов кодирующей последовательности гена *mt sur51* были выбраны специфические праймеры и температурные условия амплификации. Кодирующая последовательность гена была разбита на 5 перекрывающихся фрагментов (номера фрагментов присвоены по порядку их расположения в гене - фрагменты 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно). Положение фрагментов в полноразмерной кодирующей последовательности: фрагмент 1 - 1-298 п.н., фрагмент 2 - 171-371 п.н., фрагмент 3 - 284-628 п.н., фрагмент 4 - 611-927 п.н., фрагмент 5 - 916-1356 п.н. Для амплификации использовали праймеры: фрагмент 1 - праймеры MT1-1 5'ATGAGCGCTGTTGCACTACC и MT1-2 3'CCTTGCCGCATTTCTCTACG; фрагмент 2 - MT1-9 5' CGCCAACGAATCTTCTTCC и MT1-10 3' GCTTCTAGTTCAGGCTGCCT; фрагмент 3 - MT1-3 5'GGCGTAAAGAGATGCTGCAC и MT1-4 3'TGACCAACGCCTGTAGTACT; фрагмент 4 - MT1-5 5' TGGTTGCGGACATCATGAAC и MT1-6 3' TCTAAGGCGTTCGACSTTTTG; фрагмент 5 - MT1-7 5'AGCTGGAAAACGTGCTGAAA и MT1-8 3'CTTGCCSCTCAAATTGCTACC. Температурные условия амплификации были одинаковыми для фрагментов 1, 3, 4 и 5: 95°C-3 мин; 95°C-30 с, 65°C-30 с, 72°C-30 с (30циклов); 72°C-5 мин. Амплификацию фрагмента 2 проводили в сходных условиях, но отжиг праймеров проводили при 62°C. Электрофоретическое разделение ампликонов в 2% агарозном геле проводили по стандартной методике [11]. Для клонирования и секвенирования целевых фрагментов вырезали соответствующие участки геля и выделяли ДНК с помощью набора Wizard PCR Preps DNA Purification System ("Promega", США).

Праймеры метили присоединением  $\gamma$ -фосфата [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] АТФ к 5'-концу праймера с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 ("Promega") по протоколу фирмы-производителя. 10 пМ праймера, 10 пМ [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] АТФ и 5 ед. Т4-полинуклеотидкиназы инкубировали в 10 мкл буфера для прямой реакции кинирования в течение 1 ч при 37°C, после чего фермент инактивировали нагреванием до 90°C в течение 2 мин.

Для получения радиоактивно меченых ампликонов в реакционную смесь для амплификации добавляли 1,5 пМ <sup>33</sup>P-меченого праймера (одного из пары), полученного, как описано выше.

*Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP).* К 3 мкл амплификационной смеси, содержащим ~0,5 мкг ампликона, добавляли 4 мкл 0,06% раствора бромфенолового синего в формамиде и инкубировали в течение 10 минут при 94°C, после чего быстро охлаждали на льду в течение 5 минут. В качестве контрольного образца использовали продукт амплификации соответствующего фрагмента полноразмерного гена *sur51 M. tuberculosis* штамма H37Rv, клонированного в составе плазмиды pGEM-T/easy ("Promega"). Готовые образцы наносили на 8% полиакриламидный гель (С=37,5; 10% глицерин). Электрофорез проводили в буфере ТВЕ (89 мМ трис-борат, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА) в условиях термостатирования (4°C) (напряженность поля 10 В/см) в течение 12 ч.

В случае радиоактивно меченых ампликонов гель высушивали между листами целлофановой пленки, после чего экспонировали с рентгеновской пленкой AGFA CP-BU New в закрытой кассете при комнатной температуре в течение ~1 сут.

В случае немеченых ампликонов по окончании электрофореза гель окрашивали 0,002% раствором SybrGreen в буфере ТЕ (10 мМ трис-НСl, рН 7,4; 1

мМ ЕДТА, рН 8,0) в течение 30 мин, после чего наблюдали и документировали распределение одноцепочечных фрагментов в длинноволновом ультрафиолетовом освещении по флуоресценции связавшегося красителя.

Ампликоны, отличающиеся от контроля по электрофоретической подвижности одноцепочечных фрагментов, отбирали для дальнейшего анализа.

**Клонирование амплифицированных фрагментов.** Амплифицированные фрагменты, отобранные для анализа, клонировали в вектор pGem-T/easy. Лигирование проводили в течение ночи при 4°C. Для клонирования использовали *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ . Для выделения плазмиды использовали метод лизиса кипячением ([11], с модификациями).

**Определение первичной структуры фрагментов гена.** Первичную структуру фрагментов гена, предположительно несущих мутации, определяли по методу дидезоксианалогов Сэнгера с использованием набора для термоциклического секвенирования *fmol* DNA Sequencing System ("Promega"). Для прямого секвенирования предварительно очищенных ПЦР-фрагментов использовали те же праймеры, что и для амплификации, для секвенирования фрагментов, клонированных в pGEM-T/easy - стандартные универсальные праймеры к последовательностям промоторов T7 и SP6, фланкирующих место встраивания фрагмента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Всего в работе был использован материал, полученный из 64 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от

Таблица 1. Спектр резистентности клинических изолятов *M. tuberculosis*, использованных в работе.

Резистентность к противотуберкулёзным препаратам	Число штаммов n=64
НЕТ (чувствительный)	1
S	1
I	1
SR	1
IR	4
SRE	1
SRK	1
SIR	15
SIRK	16
SIRE	8
SIREt	4
SIREK	3
SIRKEt	1
SIRKEZ	1
SIRKEEt	1
SIRKECp	1
SIRKEAZ	2
SIRKETAZ	1
SIRKEEtRbTAZ	1

Обозначения антибиотиков: А - амикацин, Ср - капреомицин, Е - этамбутол, Et - этионамид, I - изониазид, К - канамицин, R - рифампицин, Rb - рифабутин, S - стрептомицин, Т - таривид, Z - пиазинамид.

пациентов из разных регионов СНГ. 48 из них были ранее генотипированы [12]. Данные изоляты относились к 33 различным кластерам по номенклатуре Национальных институтов здоровья (США). Диапазон резистентности изолятов

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ *cyp51 M. TUBERCULOSIS*

варьировал от 1 до 10 противотуберкулезных препаратов (табл. 1).

В ходе SSCP-анализа по критерию измененной электрофоретической подвижности одноцепочечных фрагментов гена *mt cyp51* был отобран 21 изолят, предположительно несущий мутации в кодирующей последовательности гена. Была определена нуклеотидная последовательность 30 фрагментов, отличающихся по электрофоретической подвижности от референтного штамма H37Rv.

У 11 из проверенных изолятов нуклеотидная последовательность фрагментов *mt cyp51* оказалась идентичной нуклеотидной последовательности соответствующих участков Rv0764 штамма H37Rv. У 10 изолятов (№№ 50, 72, 102, 111, 124, 163, 377, 389, 392, 507) была обнаружена нейтральная нуклеотидная замена 114 GCT→GCC. Информация по данным изолятам приведена в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика клинических изолятов *M. tuberculosis*, содержащих нуклеотидную замену 114 GCT→GCC в кодирующей последовательности гена *mt cyp51*.

R.№	устойчивость	мутации <i>rpoB</i>	мутации <i>katG</i>	генотип
50	HR	531 S-L tcg-ttg	315 S-T agc-acc	W154
72	SHKRE	516 D-V gac-gtc	н/о	1
102	SER	531 S-L tcg-ttg	н/о	W148
111	SHR	526 H-R cac-cgc	н/о	W189
124	SHKR	531 S-L tcg-ttg	315 S-T agc-acc	BW33
163	HR	526 H-Y cac-tac	н/о	BJ24
377	SHRE	н/о*	н/о	LB
389	SHR	н/о	н/о	W148
392	SHRE	н/о	н/о	AI12
507	HSR	531 S-L tcg-ttg	н/о	AI32

Обозначения антибиотиков: E - этамбутол; H - изониазид; K - канамицин; R - рифампицин; S - стрептомицин, \*н/о - не определено

При сравнении нуклеотидной последовательности гена *cyp51 M. tuberculosis* штамма H37Rv и штамма CDC1551, для которых известна полная нуклеотидная последовательность генома, у штамма CDC1551 нами также был обнаружен полиморфизм, аналогичный описанному выше - факт, ранее не отмеченный в литературе.

Вариабельность гена *mt cyp51* в изученной нами группе изолятов *M. tuberculosis* оказалась весьма незначительной (в частности, не было обнаружено ни одной значащей нуклеотидной замены, приводящей к аминокислотной замене в белковом продукте гена). Это согласуется с литературными данными о низкой частоте встречаемости нуклеотидных замен в кодирующей последовательности генов *M. tuberculosis*, не связанных непосредственно с чувствительностью к противотуберкулезным препаратам. Так, анализ последовательности 26 структурных генов у 842 различных изолятов, принадлежащих к комплексу *M. tuberculosis*, выявил всего 32 полиморфных сайта, в которых нуклеотидные замены не были прямо связаны с антибиотикорезистентностью; из них 30 были синонимичными [13]. В этой связи следует отметить, что согласно данным, полученным в экспериментах *in vitro*, микобактерии практически нечувствительны к флюконазолу и относительно малочувствительны к кетоконазолу - распространенным препаратам, применяемым в лечении оппортунистических грибковых инфекций у больных туберкулезом [9]; применение этих препаратов в клинике не могло оказать существенного селективного давления на популяцию *M. tuberculosis* и на изменчивость соответствующей молекулярной мишени, что косвенно подтверждается полученными нами данными о частоте встречаемости мутаций в гене *mt cyp51* у клинических изолятов.

Одним из важнейших критериев в разработке новых антимикробных препаратов является консервативность их молекулярной мишени в природной популяции патогенных микроорганизмов. Следует отметить, что наличие мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в определенных участках стерол-14 $\alpha$ -деметилазы, является распространенным механизмом, участвующим в развитии резистентности к азолидам у патогенных грибов. В частности, в работе Perea с соавт. [14] мутации в гене *sup51*, приводящие к функционально значимым аминокислотным заменам, были обнаружены у 65% изученных клинических изолятов *Candida albicans* с высоким уровнем резистентности к флюконазолу. В связи с вышесказанным, низкая изменчивость и отсутствие функционально значимых мутаций в гене *mt sup51* у исследованных нами клинических изолятов в целом подтверждают целесообразность разработки противотуберкулезных препаратов, действующих на его белковый продукт. Наличие информации о кристаллической структуре МТ Сур51 в комплексе с азолидами, исследованной Podust с соавт. [15], позволяет использовать рациональные подходы к разработке новых, высокоселективных ингибиторов данного фермента.

Вместе с тем, необходимо помнить, что резистентность к азолидам может обеспечиваться различными механизмами. В частности, было показано, что у *Candida albicans* резистентность может развиваться вследствие мутаций в гене стерол-С5,6-десатуразы; данный фермент участвует в образовании токсичного для клеток продукта в отсутствие стерол-14 $\alpha$ -деметилазной активности. Кроме того, одним из установленных механизмов резистентности является усиление активного выброса азолидов из клетки, обеспечиваемое мутациями в генах эффлюксных белков MDR1 и CDR [6]. Таким образом, для всесторонней оценки перспективности применения азолидов в качестве антимикобактериальных препаратов необходимо выявить и изучить весь спектр генов, продукты которых могут оказывать влияние на эффективность действия данной группы препаратов на *M. tuberculosis*.

Низкая частота встречаемости единичных незначущих нуклеотидных замен у *M. tuberculosis* позволяет также предполагать, что обнаруженный нами полиморфизм в перспективе может быть использован в качестве признака при генотипировании клинических изолятов *M. tuberculosis* и установлении их филогенетического родства.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kato-Maeda M., Bifani P.J., Kreiswirth B.N., Small P.M. (2001) J. Clin. Invest., **107**, 533-537.
2. Ramaswamy S., Musser J.M. (1998) Tubercle and Lung Disease, **79**, 3-29.
3. Sepkowitz K.A., Raffalli J., Riley L., Kiehn T.E., Armstrong D. (1995) Clin. Microbiol. Rev., **8**, 180-199.
4. Yoshida Y., Noshiro M., Aoyama Y., Kawamoto T., Horiuchi T., Gotoh O. (1997) J. Biochem., **122**, 1122-1128.
5. Rozman D., Waterman M.R. (1998) Drug Metabolism and Disposition, **26**, 1199-1201.
6. Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E. (1999) Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes., New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 157-172.
7. Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 8937-8942.
8. Guardiola-Diaz H.M., Foster L.A., Mushrush D., Vaz A.D. (2001) Biochem. Pharmacol., **61**, 1463-1470.
9. Jackson C.J., Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. (2000) FEMS Microbiol. Lett.,

- 192, 159-162.
10. Read T.D., Gill S.R., Tettelin H., Dougherty B.A. (2001) DDT, **6**, 887-892.
  11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. (1984) М.: Мир.
  12. Генерозов Э.В., Акопян Т.А., Говорун В.М., Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Савинкова С.Н., Смирнова Т.Г., Гольшевская В.И., Хоменко А.Г. (2000) Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, **1**, 11-17.
  13. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S., Musser J.M. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 9869-9874.
  14. Perea S., Lopez-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., McAtee R.K., Santillan R.A., Martinez M., Calabrese D., Sanglard D., Patterson T.F. (2001) Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 2676-2684.
  15. Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M. R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 3068-3073.

Поступила 11.04.02

#### ANALYSIS OF CYTOCHROME CYP51 GENETIC HETEROGENEITY IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES.

A.S.Shavkunov<sup>1</sup>, V.N. Lazarev<sup>1</sup>, L.N. Chernousova<sup>2</sup>, A.V. Kuzmin<sup>2</sup>,  
V.M. Govorun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physico-Chemical Medicine, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119828 Russia;  
fax: (095) 246-45-01, e-mail: a\_s\_shavkunov@hotmail.ru

<sup>2</sup>Central Institute for Tuberculosis Research RAMS, Yauzskaya all. 4,  
Moscow 107564 Russia

Information on the complete genome sequences of a number of organisms available recently offers essentially new opportunities for the development of new, highly effective antimicrobial compounds. In particular, the search for new effective antituberculosis drugs remains an important problem, due to the recent increase of number of patients suffering with tuberculosis. In this respect considerable attention is paid to the *cyp51*-like gene *Rv0764c* encoding sterol-14 $\alpha$ -demethylase belonging to the cytochrome P450 superfamily, which has been discovered by computer analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome sequence. We have screened 64 clinical isolates of *M. tuberculosis* for functionally relevant mutations in the coding sequence of the gene encoding Cyp 51-demethylase by single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and sequencing of PCR-amplified gene fragments. Structural analysis of the gene in the isolates revealed no mutations leading to amino acid substitutions in the corresponding protein. 10 isolates had a silent nucleotide substitution 114 GCT→GCC. Computer analysis of *cyp51* sequence of the CDC1551 strain also revealed a similar nucleotide substitution, which has not been mentioned previously. The data obtained demonstrate that the sequence of the gene is highly conserved, supporting the advisability of *M. tuberculosis* Cyp51 protein to be considered as a molecular target for new antitubercular drugs. The SNP found in the gene coding sequence may be employed in the studies of *M. tuberculosis* population genetics.

**Key Words:** cytochrome P450, *cyp 51*, sterol-14 $\alpha$ -demethylase, *Mycobacterium tuberculosis*, gene polymorphism.