

УДК 619:616-07

ПОДБОР МЕТОДА ДНК-ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЁЗА

*Ю.Б. Васильева, кандидат ветеринарных наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47, grant-ugsha@yandex.ru*

А.В. Мاستиленко, кандидат биологических наук, старший преподаватель

тел. 8(8422) 55-95-47, mav0608@mail.ru

*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru*

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

*И.И. Богданов, кандидат ветеринарных наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47, nic-ugsha@yandex.ru*

Ключевые слова: молекулярно-генетическая диагностика, ПЦР, бордетеллёз, *B.bronchiseptica*.

Работа посвящена подбору эффективных методов ДНК-диагностики бордетеллёза. Разработаны диагностические наборы для проведения полимеразной цепной реакции, определены оптимальные режимы проведения диагностических исследований. Мультиплексная ПЦР-система позволяет одновременно выявлять несколько 3 специфических фрагмента ДНК *B.bronchiseptica*, один из которых является общим для представителей рода *Bordetella*. Проведение ПЦР в режиме «реального времени» проводится без этапа детекции в электрофорезе, что снижает риск контаминации лаборатории и позволяет провести количественную оценку исходного уровня матрицы ДНК в исследуемых пробах.

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале. Метод основан на многократном избирательном копировании участка ДНК, который удовлетворяет заданным условиям, и только если он присутствует в исследуемом образце при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*) [1, 2, 12].

ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику инфекционных заболеваний.

В настоящее время для ПЦР-диагностики используют различные модификации реакции [2].

Вложенная ПЦР применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

Инвертированная ПЦР используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов. В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

ПЦР с обратной транскрипцией используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР.

Асимметричная ПЦР проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. При этом один из праймеров с низкой концентрацией подбирается с высокой температурой плавления, чем праймер с высокой концентрацией [16].

Количественная или ПЦР в реальном времени используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления; или используется флуоресцентный интеркалирующий краситель, который связывается с двухцепочечной ДНК [17].

Полуколичественный ПЦР является модифицированным методом количественного ПЦР с реакцией обратной транскрипции. Измеряют количество накопленного продукта только в одной точке — после окончания реакции. Далее, после электрофореза или саузерн-блота, можно измерить разницу в экспрессии нескольких образцов [5].

Ступенчатую ПЦР проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью.

Используя метод молекулярных колоний (ПЦР в геле) акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и

проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

ПЦР длинных фрагментов является модификацией ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз Taq-полимеразу и Pfu полимеразу.

RAPD или ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК используется тогда, когда нужно различить близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

Групп-специфическая ПЦР — это ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям.

При проведении уникальной ПЦР задача состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

ПЦР с использованием горячего старта — это модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95 °С в течение 10 минут.

Виртуальная, цифровая, электронная или е-ПЦР — это математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы, кольцевой ДНК или любого другого участка ДНК.

ДНК-диагностика позволяет обнаружить инфекционный агент сразу после заражения в инкубационный период болезни, задолго до того, как проявятся симптомы. Уникальность диагностического анализа методом ПЦР нередко оказывается эффективнее других методов и в поздние сроки заболевания, и на фоне лечения антибиотиками.

Метод ПЦР, применительно к бордетеллам был впервые описан в 1990 году. Зарубежными исследователями разработаны высокочувствительные тест-системы для идентификации близкородственных бактерий *B.perussis* и *B.parapertussis* [2-5].

В 2010 году была апробирована мультиплексная ПЦР «в одной пробирке» (Y. Xu, Q. Hou, 2010). В качестве мишеней были использова-

Таблица 1 – Протокол ПЦР для амплификаторов с активным регулированием (по раствору в пробирке) «Терцик» (НПО «ДНК–Технология», Россия)

№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Количество повторов
1	1	95°C	5 мин	1
2	1	95°C	10 сек	40
	2	62°C	10 сек	
	3	72°C	20 сек	
3	1	72°C	2 мин	1

ны промотор коклюшного токсина и вставочный элемент IS481 генома *B. pertussis*, а также вставочный элемент IS1001 ДНК *B. parapertussis* [12].

Целью наших исследований явилась разработка тест-системы ПЦР-диагностики бордетеллёза с детекцией бактерий вида *B. bronchiseptica*.

Материалы и методы исследований. Работа была проведена на базе НИИЦМиБ кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ. Разработанный нами набор для молекулярно-генетической детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, включает: комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб сорбентным методом («Проба ГС»), комплект реагентов для проведения амплификации участка ДНК, с подобранными системами праймеров (Pr1-1 (5' ccttcacgacacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' ccccgtagccgggtgcctggacctggcg 3') для гена BfrA ДНК *B. bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggacgaccaggatcacatcttcc 3'), Pr3-2 (5' gctttcctggtagttgg-cgtagg 3') для гена BfrZ; Pr4-1 (5' gcattgctccatcctgttggtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgscg 3') для гена Cytochrom-C-oxidase; флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена bfrZ); комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза [3-12].

Нами были подобраны оптимальные с точки зрения эффективности ПЦР параметры постановки реакции: температура отжига праймеров - 62°C, универсальная концентрация каждого из праймеров – 5 pmol на реакцию объемом 25 мкл (таблица 1).

В своей работе мы использовали следующие методы исследований: метод выделения нуклеиновых кислот из культур сорбентным способом, проведение моно- и мультиплексной полимеразной цепной реакции с оригинальными системами праймеров, детекция с помощью горизонтального электрофореза и в режиме «реального времени» [3-12].

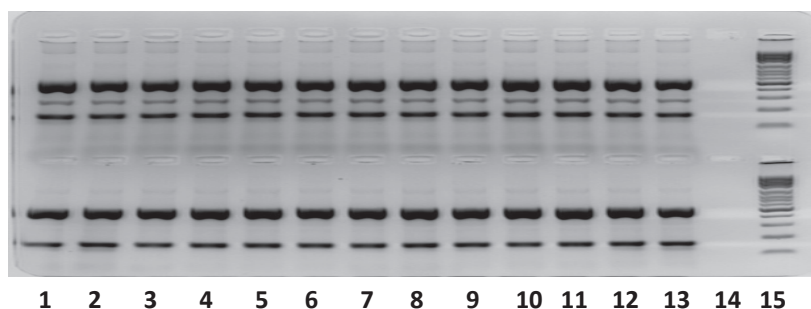


Рисунок 1 - Электрофореграмма мультиплексной ПЦР к участкам генов *BfrA*, *BfrZ* и *Cytochrom-C-oxidase*. 1-13 – штаммы *B. bronchiseptica*, выделенные из клинического материала; 14 – отрицательный контроль; 15– маркер молекулярного веса

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе опытов установили, что праймеры к участку гена *16S RNA* при внесении в общую реакционную смесь дают побочные продукты (димеры) с остальными праймерными системами. Для многокомпонентного формата ПЦР было решено использовать 2 системы праймеров к участкам генов *bfrA* и *сsox* и 3 системы праймеров к участкам генов *bfrA*, *bfrZ* и *сsox*. Количество и соотношение праймеров были подобраны экспериментальным путем: по 5 pmol праймеров системы для участков генов *bfrA* и *bfrZ* и 15 pmol для участка гена *сsox*. Для проведения ПЦР была использована выше-приведенная программа амплификации. Время, затраченное на выполнение программы на термоциклере, составило 70 минут (рис.1).

Таким образом, мультиплексный формат ПЦР позволяет в короткие сроки в одной пробе определить наличие участка ДНК, специфичного для трех представителей рода *Bordetella* (участок гена *сsox*) и отдельно выделить фрагменты ДНК *B.bronchiseptica* (участки генов *bfrA*, *bfrZ*).

Далее была апробирована ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» (Real Time) проводили с интеркалирующим красителем SYBR Green I на термоциклере «ДТ-322». Уровень флуоресценции фиксировался на каждом цикле амплификации. Начало экспоненциального роста уровня флуоресценции интеркалирующего красителя фиксируется детектором как значение Ct.

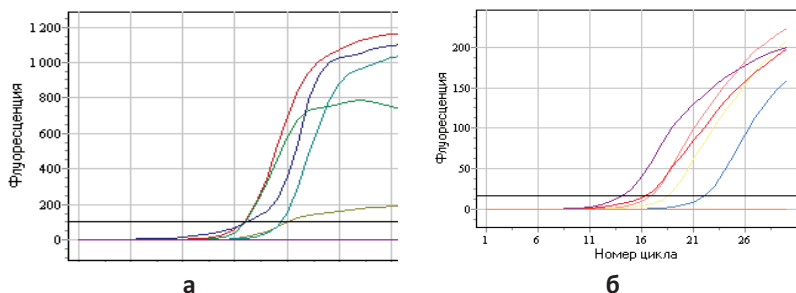


Рисунок 2 - Кривая роста флуоресценции по каналу FAM в эксперименте, где а - с праймерами к участку гена *bfrZ* *B.bronchiseptica*, б - с праймерами к участку гена *16S rRNA*

В качестве стандартов ДНК были использованы 24 ч культуры *B.bronchiseptica* №22-067 с определенным значением КОЕ/мл.

При проведении экспериментов с праймерами к участкам генов *bfrA*, *bfrZ*, *Cytochrome C-oxidase* и *16S rRNA*, было выявлено, что лучше работают праймеры к участкам генов *bfrZ* и *16S rRNA*. Результаты исследований приведены на рисунке 2.

В связи с трудностями культивирования и определения КОЕ бактерий *B.bronchiseptica* количественная ПЦР является исключительно своевременной.

Закключение. Так как актуальным является вопрос о сокращении себестоимости и времени проведения ПЦР в «поточном» режиме мы рекомендуем для этих целей использовать мультиплексный формат проведения ПЦР. Мультиплексная ПЦР-система позволяет одновременно выявлять несколько 3 специфических фрагмента ДНК *B.bronchiseptica*, один из которых является общим для представителей рода *Bordetella*.

Проведение ПЦР в режиме «реального времени» проводится без этапа детекции в электрофорезе, что снижает риск контаминации лаборатории и позволяет провести количественную оценку исходного уровня матрицы ДНК в исследуемых пробах.

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 230-232.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.

3. Васильева, Ю.Б. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, А.С. Скорик // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
4. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллёзной инфекции / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
5. Васильева, Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллёза – *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.2. – С. 334-338.
6. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). С. 46-51.
7. Мاستиленко А.В. Разработка идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 20 с.
8. Мاستиленко А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мастыленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №1. – С. 50-54.
9. Мастыленко, А.В. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мастыленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. III. - № 2. - С. 152.
10. Нафеев, А.А. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями / А.А. Нафеев, Н.И. Пелевина, Ю.Б. Васильева // Дезинфекционное дело. - 2014. - № 1. - С. 39-43.
11. Vasylyeva, Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.
12. Vasylyeva, Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.