УДК 579.62:577.2

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PETRII* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ломакин А.А., аспирант,
тел. 8(8422) 55-95-47, artemy.lomakin@yandex.ru
Мастиленко А.В., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru
Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Bordetella, B.petrii, геном, анализ in-silico, праймеры, режимы, полимеразная-цепная реакция.*

Работа посвящена подбору праймеров для индикации и идентификации бактерий Bordetella petrii методом полимеразной ценой реакции с детекцией в агарозном геле. Разработан протокол для амплификации праймерной системы, изучена ее специфичность в отношении других видов бактерий. Подобран режим проведения детекции результатов амплификации методом электрофорезирования. Полученные результаты являются основой для подбора зонда для РВ-ПЦР.

Введение. Бактерии *Bordetella petrii*, впервые были выделены из дехлорирующего биореактора, обогащенного речным осадком. Это первый вид из рода *Bordetella*, выделенный из окружающей среды и описанный в научной литературе [1-2]. Бактерии *B.petrii* также были обнаружены в морских губках и травяных консорциумах, выделены из источников подземных вод и других объектов окружающей среды, в том числе из проб с полигона с отходами. На настоящий момент в литературе нет информации об инфекциях, вызванных *B.petrii,* у животных. Однако, по данным статьи M.F. Samy (2017) штаммы бактерий этого вида выделены из сырого верблюжьего молока [3]. Случаи инфицирования человека *B. petrii* с момента его первого обнаружения

в 2001 г. регистрировались редко. Из семи зарегистрированных случаев четыре были выделены из респираторных образцов, а три были извлечены из образцов гноя пациентов с костными инфекция [4-5].

На настоящий момент в отечественной и зарубежной литературе не представлены видоспецифичные праймеры для типирования бактерий вида *B. petrii* методом ПЦР. Описанные в статье Le Coustumier (2011) праймеры основаны на идентификации участков гена внешнего мембранный белок А (ompA) и регулятор ответа (risA) и не являются высокоспецифичными для данного вида бактерий [4].

Целью исследования - поиск и подбора видоспецифичных праймеров для индикации и идентификации вида *B. petrii* на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы исследований. Штаммы: в работе был использованы референс-штамм *Bordetella petrii* ATCC BAA-461, штаммы бактерий родов: *Eschrichia, Yersinia, Pseudamonas, Acinetobacterium, Serratia, Proteus, Sallmonella, Citrobacterium, Aeromonas, Alcaligenes, Klebsiella, Bacillus, Enterococcus, Listeria*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Материалы. 2,5х реакционная смесь в присутствии красителя SYBR GREEN (Синтол, Россия), 10х трис-боратный буфер (Bio-Rad, Германия), агароза (Россия), набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия), 1% раствор бромистого этидия (AppliChem,США), камера для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Германия), источник питания Powerpac Basic (Bio-Rad, Германия), гельдокументирующая система Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция), центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M (ELMI, Польша), ПЦР пробирки объемом 0,2 мл (Россия), амплификатор T100 (Bio-Rad, Германия), наконечники для дозаторов 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (Thermo,Финляндия); пипетка-дозатор одноканальный 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (HLT, Польша), прямой праймер (f)

5’-3’ GGCTTCATCATTCCCAGCCT, обратный праймер (r) 3’-5’ CTGCGTGAGCTCGTCACTAA.

Методы. Выделение ДНК бактерий при использовании набора реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия). Для проведения амплификации были использованы параметры представление в инструкцией к набору «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия). Анализ генома *A. veronii* проводили в базе NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome). Подбор олигонуклеотидов для постановки ПЦР осуществляли с применением ресурса NCBI BLAST-primer.

Результаты исследований и их обсуждение. Бактериальный геном представляет собой сложную структуру комплекса кодирующих и регулирующих участков ДНК. При его исследовании необходимо проведение сравнительного анализа с аннотированными прокариотическими геномами для выявления уникальных областей и фрагментов в целях разработки специфичных праймеров для постановки ПЦР [3]. Для этого в данной работе были использованы ресурсы NCBI. Установлено, исследуемый геном *Bordetella petrii* имеет размер 5.29Mb(5287950 п.н.), 65.5% GC, кодирующий 4,909 протеинов.

После представления генома был выбран регион для разработки системы молекулярно-генетической идентификации *B. petrii*: 32,718-33,644п.н. Этот участок ДНК кодирует регулятор транскрипции LysR. По данным in-silico анализа наибольшая идентичность данного региона соответствует фрагменту генома *B. petrii.* На основании полученной последовательности ДНК указанного фрагмента были подобраны праймеры для проведения ПЦР. С помощью ресурса NCBI BLAST-primer был проведен подбор и дизайн олигонуклеотидов для ПЦР представителей *B. petrii* (табл. 1). Данная пара праймеров показала высокий процент специфичности в отношении бактерий *B. petrii.* Экспериментально, применяя метод in-silico, было уставлено, что подобранные праймеры не образуют димеров

Таблица 1 - Праймеры для выявления фрагмента32,718-33,644п.н. генома *Bordetella petrii*

primer	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCTTCATCATTCCCAGCCT	20	60.11	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	CTGCGTGAGCTCGTCACTAA	20	59.96	55.00	4.00	0.00
Длина амплифицируемого участка (п.о.)		78				

После синтеза системы праймеров были проведены эксперименты постановки ПЦР с бактериальными культурами. Для проведения реакции ПЦР набор «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ». После серии экспериментов нами был отработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР в агарозном геле. В этом протоколе ПЦР использовали экстрагированную бактериальную ДНК в качестве матрицы при следующих показателях цикла ПЦР:

1. Предварительная денатурация-95^{0}С в течении 5 минут, 1 цикл.

2. Денатурация- 95^{0}С в течение 15 сек.

3. Отжиг- 61 ^{0}С в течении 40 сек, 45 циклов.

Детекцию результата постановки ПЦР проводили в 2% агарозном геле с добавлением 0,05% этидиума бромида. Электрофорез проводили на 100 Вт в течение 25 мин. Для визуализации полученных результатов использовали гельдокументирующую система Bio_print CX4 Edge.

Для проверки специфичности разработанных праймеров в качестве контроля нами были использованы бактерий родов: *Eschrichia, Yersinia, Pseudamonas, Acinetobacterium, Serratia, Proteus, Sallmonella, Citrobacterium, Aeromonas,Alcaligenes, Klebsiella, Bacillus, Enterococcus, Listeria.* После проведения амплификации и электрофорезирования было установлено, что разработанные праймеры имеют высокую специфичность для *Bordetella petrii.*

Заключение. В результате проведенного исследования нами была разработаны видоспецифичные праймеры для индикации и идентификации бактерий вида *B.petrii* методом полимеразой цепной реакции с детекцией в агарозном геле. Разработан протокол для амплификации праймеров, подобран

режимы проведения электрофорезирования. Полученные результаты являются основой для подбора зонда для РВ-ПЦР.

Библиографический список:

1. Мастиленко, А.В. Исследование метаболизма *Bordetella petrii* при росте на различных источниках углерода и азота / А.В. Мастиленко, А.А. Ломакин, А.Г. Шестаков А. Г. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 4 (48). – С. 117-122.

2. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schattke, R.A. Siddiqui, U. Rösick, U.B. Göbel, R. Gross, // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Т. 51. – №. 4. – С. 1257-1265.

3. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region/ M. F. Samy, E. H. Yasser, A.L. Othman & S.A. Amer // Journal of Camel Practice and Research. – 2017. – Т. 24. – №. 1. – С. 89-98.

4. *Bordetella petrii* infection with long-lasting persistence in human/ A. Le Coustumier, E. Njamkepo, V. Cattoir, S. Guillot, N. Guiso // Emerging infectious diseases. – 2011. – Т. 17. – №. 4. – С. 612.

5. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella spp*. and its bioremediation potential in soi / F. Wang, S. Grundmann, M. Schmid, U. Dörfler, S. Roherer, J.C. Munch, R.L. Schroll // Chemosphere. – 2007. – Т. 67. – №. 5. – С. 896-902.

DEVELOPMENT OF PRIMER SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF BORDETELLA PETRII BACTERIA BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Lomakin A.A., Mastilenko A.V., Feoktistova N.A.

Keywords: *Bordetella, B.petrii, genome, in-silico analysis, primers, modes, polymerase-chain reaction.*

The work is devoted to the selection of primers for the indication and identification of Bordetella petrii bacteria by the polymerase price method of reaction with detection in an agarose gel. A protocol for amplifying the primer system has been developed, its specificity for other species of bacteria has been studied. Mode of detection of amplification results by electrophoresis is selected. The results obtained are the basis for selecting a probe for RB-PCR.