

УДК 579.25

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PETRII* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

**Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**
**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**
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

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

Работа посвящена подбору праймеров для индикации и идентификации бактерий видом *B.petrii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в «реальном времени». Проведен сравнительный анализ с аннотированными прокариотическими геномами в NCBI. Разработан протокол для амплификации праймерной системы, изучена их специфичность в отношении других видов бактерий. Произведен подбор и дизайн олигонуклеотидов для разрабатываемых праймеров в BLAST-primer. Прямой праймер (f) 5'-3' TGGCCAACAGTAGTTCGCTC, обратный праймер (r) 3'-5' CGTCGATATGCGCGTTTGAA, флуоресцентный зонд: FAM TCCCAGCCTGGCGCGCT BHQ1. Разработан протокол для амплификации праймеров, подобран режим амплификации. Чувствительность разработанного метода составляет 4*10² копий генома.

Введение. Бактерии вида *B.petrii*, первоначально выделенные из хлорирующего биореактора, обогащенного речным осадком, представляют собой первый описанный бактериальный вид из окружающей среды в пределах рода *Bordetella* [1]. Штаммы *B.petrii* также были обнаружены в морских губках, в травяных консорциумах, в источниках подземных вод и в других образцах из окружающей среды. Есть данные о выделении вышеуказанных бактерий из проб, полученных с полигона с промышленными отходами [2].

По данным статьи М.Ф. Саму (2017) штаммы бактерий этого вида были 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 костной инфекцией [4].

На настоящий момент в отечественной и зарубежной литературе не представлены видоспецифичные праймеры для индикации и идентификации вида *B. petrii* на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Опубликованные праймеры в статье Le Coustumier (2011) основаны на идентификации участков гена внешнего мембранный белок A (*ompA*) и регулятор ответа (*risA*). Но представленные праймеры не высокоспецифичные к отношению бактерий [5].

Поэтому целью нашего исследования, является выполнение поиска 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 использован референс-штамм *Bordetella petrii* ATCC BAA-461, полученный из микробиологического музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Для проверки специфичности разработанных праймеров в качестве контроля были использованы следующие виды бактерий: *Bordetella hinzii* ATCC 51783, *Bordetella avium* ATCC BAA-1003, *Bordetella trematum* ATCC 700309, *Bordetella bronchiseptica* 22067, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Alcaligenes* spp B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Citrobacter freundii*-2, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Salmonella infantis* 3, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* 103.

Материалы. 2,5x реакционная смесь в присутствии красителя SYBR GREEN (Синтол, Россия), 10x 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 (Лам-Систем, 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 (НЛТ, Польша).

Методы. Выделение ДНК бактерий при использовании набора реагентов «РеалБест УниМаг» для выделения ДНК (Вектор Бест, Россия). В

работе нами была использована культура *V. petrii* после 24 культивирования при 35°C. Концентрация бактерий в 1 мл составила $4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для проведения амплификации были использованы параметры представление в инструкции к набору «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия). Проведение сравнительного анализа с аннотированными прокариотическими геномами для выявления уникальных областей и фрагментов в целях разработки специфичных праймеров для ПЦР были использованы ресурсы NCBI. Подбор и дизайн олигонуклеотидов для ПЦР BLAST-primer.

Результаты исследований и их обсуждение. После представления генома был выбран регион для разработки системы молекулярно-генетической идентификации *V. petrii*: 32,718-33,644 п.н. Этот участок ДНК кодирует регулятор транскрипции *LysR*. По данным *in-silico* анализа наибольшая идентичность данного региона соответствует фрагменту генома *V. 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 *V. petrii*. Прямой праймер (f) 5'-3' TGGCCAACAGTAGTTCGCTC, обратный праймер (r) 3'-5' CGTCGATATGCGCGTTTGAA, флуоресцентный зонд: FAM TCCCAGCCTGGCGCGCT BHQ1.

После синтеза системы праймеров были проведены эксперименты 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 режиме «реального времени». В этом протоколе ПЦР использовали экстрагированную бактериальную ДНК в качестве матрицы при следующих показателях цикла ПЦР:

- предварительная денатурация-95 °C в течение 5 минут, 1 цикл,
- денатурация- 95 °C в течение 15 сек,
- отжиг- 60 °C в течение 40 сек,
- элонгация 72 °C на 10 сек, 42 цикла.

Использование детектирующего амплификатора позволило в данной работе регистрировать уровень роста флуоресцентного сигнала на каждом цикле реакции. В методе ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» основной величиной является не количество флуоресцентного сигнала, а номер цикла, на котором уровень сигнала начал экспоненциальный рост по сравнению с фоновой величиной. При этом в данной работе нами была учтена также эффективность самой реакции, которая составила более 95%. Однако применяемый в большинстве случаев метод оценки

результатов с использованием порогового уровня (Сt) был заменен нами на метод прямого сравнения графиков накопления флуоресцентного сигнала с использованием первой и второй производной (Ср). Преимуществом использования производных является то, что при умножении кривой на любые множители положение максимумов производных не меняется. Это позволило нам избежать неоднородности расчета коэффициента пропорциональности числа молекул ДНК в реакции к уровню сигнал флуоресценции. В результате изучения чувствительности, установлено, что чувствительность разработанного протокола составила $4 \cdot 10^2$ копий генома.

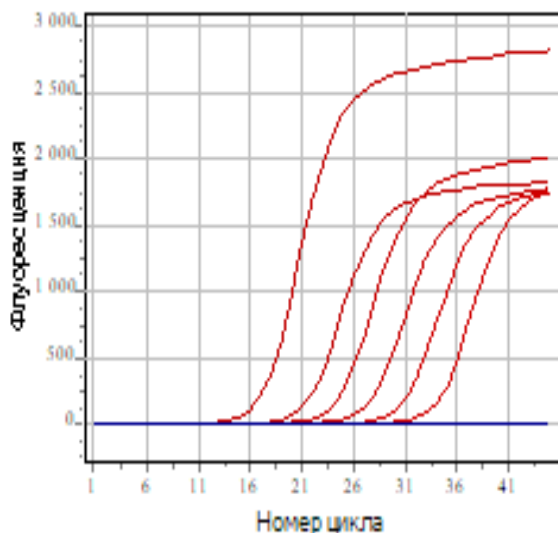


Рисунок - Результаты изучения чувствительности разработанного протокола для индикации и идентификации *B. pertussis* методом РВ-ПЦР с дедукцией по каналу FAM

Для проверки специфичности разработанных праймеров в качестве контроля нами были использованы различные виды бактерий. После проведения амплификации было установлено, что разработанные праймеры имеют высокую специфичность в отношении использованных штаммов *Bordetella hinzii*, *Bordetella avium*, *Bordetella trematum*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes spp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella infantis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*.

Заключение. В результате проведенного исследования нами были разработаны видоспецифичные праймеры для индикации и идентификации бактерий вида *B.petrii* методом полимеразой цепной реакции в режиме «реального времени». Разработан протокол для амплификации праймеров, подобран режим амплификации. Чувствительность разработанного метода составляет $4 \cdot 10^2$ копий генома. Полученные результаты будут положены в основу схемы выделения, индикации и идентификации бактерии *B.petrii* из объектов окружающей среды.

Библиографический список

1. Мاستиленко А. В., Ломакин А. А., Шестаков А. Г. Исследование метаболизма *Bordetella petrii* при росте на различных источниках углерода и азота // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 4 (48). – С. 117-121.
2. von Wintzingerode F., Schattke A., Siddiqui R. A., Rösick U., Göbel U. B., Gross R.. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Т. 51. – №. 4. – С. 1257-1265.
3. Samy M. F., Yasser E. H., Othman A. L., & Amer S. A. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region // Journal of Camel Practice and Research. – 2017. – Т. 24. – №. 1. – С. 89-98.
4. Wang, F., Grundmann, S., Schmid, M., Dörfler, U., Roherer, S., Munch, J. C., Schroll, R. I Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil // Chemosphere. – 2007. – Т. 67. – №. 5. – С. 896-902.
5. Le Coustumier A., Njamkepo E., Cattoir V., Guillot S., Guiso N. *Bordetella petrii* infection with long-lasting persistence in human/ // Emerging infectious diseases. – 2011. – Т. 17. – №. 4. – С. 612.

SELECTION OF PRIMERS FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF BORDETELLA PETRII BACTERIA BY "REAL-TIME" POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

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

Keywords: *Bordetella*, *B.petrii*, genome, in-silico assay, polymerase-chain reaction, PB-PCR.

The work is devoted to the selection of primers for the indication and identification of bacteria of the species *B.petrii* by the polymerase reaction price (PCR) method with real-time detection. Comparative analysis was performed with annotated prokaryotic genomes in NCBI. A protocol for amplifying the primer system has been developed, their specificity for other species of bacteria has been studied. Oligonucleotides were selected and designed for the primers being developed in BLAST-primer. Direct primer (f) 5 "-3" TGGCCAACAGTAGTTCGCTC, return primer (r) 3 "-5" CGTCGATATGCGCGTTTGAA, fluorescent probe: FAM TCCCAGCCTGGCGCGCT BHQ1. A protocol for amplifying primers has been developed, an applification mode has been selected. The sensitivity of the developed method is $4 * 10^2$ copies of the genome.