

диаметром 0,5 - 1 мм и отсутствием зон неполного лизиса. Литическая активность выделенных фагов по методу Грация от 9×10^6 до 2×10^7 , а по методу Аппельмана от 10^{-5} до 10^{-7} . Для определения спектра литического действия бактериофагов использовали 8 штаммов *Aeromonas hydrophila*. Установлено, что фаги проявили литическое действие в отношении 80% всех исследованных культур. Обработка хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут полностью инактивировали фаги. Обработка фагов температурой 58°C - 60°C в течении 30 минут приводит к их полной гибели.

С целью конструирования диагностикума в дальнейшем необходимо более детально изучить биологические свойства выделенных фагов.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. – М, 1961. – с.521.
2. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – с.297.
3. Канаева Т.И., Васильев Д.А. Разработка бактериологической схемы диагностики аэромоназа рыб // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: Труды Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ВНИИВВиМ, 2-5 декабря 2008. – Покров, 2008. – С.111-114.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: «Урожай», 1978. – с.160. с.86
5. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Ф. //Определитель зоопатогенных микроорганизмов. Справочник – М., 1995.- с.227.

УДК 619:578.832.1

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО УЧАСТКА ДНК ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» DEVELOP A METHODOLOGY TO IDENTIFY SPECIFIC DNA SEQUENCE ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE BY PCR IN "REAL TIME"

**А.С. Разорвина, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Н.И. Молофеева, Е.Г. Логинова
A.S. Razorvina, A.V. Mastilenko, D.A. Vasilyev, N.I. Molofeeva, E.G. Loginova**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

The aim of this work was the development of specific primers for DNA Ornithobacterium rhinotracheale, the creation and validation of a PCR protocol.

Целью настоящей работы была разработка специфических праймеров к ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*, создание и апробация ПЦР-протокола.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* были использованы базы данных GeneBank и Afsa. Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast.

Для подбора праймеров были использованы программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

Для проведения амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология», г.Москва,

позволяющий проводить амплификацию и флуоресцентную детекцию в режиме «реального времени».

После синтеза олигонуклеотидов были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции (концентрация праймеров, температурные параметры и количество циклов амплификации). Для проведения амплификации использована коммерческая стандартизированная реакционная смесь для проведения ПЦР в режиме «реального времени» с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активностью антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (г.Москва). Для выделения ДНК применялись реактивы «Проба ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва). Для проведения электрофоретической детекции продуктов амплификации были использованы коммерческие наборы производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва), содержащие готовые 2,3% агарозные гели с сухой навеской буферной смеси.

Для апробации предложенной методики были использованы полевые штаммы *Ornithobacterium rhinotracheale* НИИЦМБ Ульяновской УГСХА и культура *Ornithobacterium rhinotracheale* (штамм № 51463, 51464).

Для дизайна праймеров нами было решено использовать 16s рибосомальный ген *Ornithobacterium rhinotracheale*.

В базе данных GeneBank была найдена полная нуклеотидная последовательность гена 16sRNA. Затем она была просканирована системой Blast этой базы данных на предмет совпадения с существующими данными секвенирования других микроорганизмов. 100% совпадения более не встречалось, следовательно, оставалось выбрать только уникальные последовательности, фланкирующие участок гена 16sRNA *Ornithobacterium rhinotracheale*. После ряда проведенных анализов программами Gene Runner v.3.05 и Primer-Blast (в режиме on-line) эти последовательности были определены; они фланкировали участок гена размером 302 пары нуклеотидных оснований.

Праймеры (16S-1 размером 19 п.о. и 16S-2 размером 19 п.о.) были синтезированы в «Компании «Синтол» (г.Москва).

Для самой полимеразной цепной реакции было решено использовать коммерческий набор с оптимизированной буферной системой, Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активностью антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (г.Москва), который содержал смесь: 125 мкМ dNTP, 1,25 у Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25 мМ MgCl₂, а также 10x ПЦР-буфер и минеральное масло. Объем реакционной смеси без матричной ДНК в конечном виде составлял 25 мкл. Объем пробы матричной ДНК, вносимой в реакционную смесь, составил 5 мкл.

Культуры *Ornithobacterium rhinotracheale* были подвергнуты этапу выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с сорбентной технологией очистки.

Затем нами был проведен ряд экспериментов для оптимизации протокола ПЦР.

Для процесса амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с возможностью флуоресцентной детекции во время амплификации (режим «реального времени»). Флуоресценцию дает интеркалирующий краситель SYBR Green I, который связывается в процессе амплификации в двухцепочечной ДНК (2). Таким образом, чем больше ампликонов образуется в процессе реакции, тем сильнее сигнал флуоресценции, а это, в свою очередь, можно применить для количественной оценки исходной матричной ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*. Единственный

недостаток применения интеркалирующего красителя заключается в том, что флуоресцирует не только специфический ампликон, но и связавшийся с неспецифическими продуктами SYBR Green I (3). Поэтому для точной оценки полученных продуктов амплификации мы применяли также метод горизонтально электрофоретической детекции в 2,3% агарозном геле.

Отчёт по результатам анализа ПЦР



13.03.2009

Настройки анализа: метод: Геометрический (Cp) (BF), lf=12, ne=7, cr=9, vt=10, nf=20, calibr=1, tp=0, tv=0

Тест: ...

Программа амплификации: **В (30мкл)**

1. 95,0 °C - 05:00	] *35]
2. 95,0 °C - 00:10	
60,0 °C - 00:20	
72,0 °C - 00:20	
3. 72,0 °C - 02:00	

Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
D1	51463	9,0		+
D2	51464	9,8		+
D3	51464/6.11	12,2		+
D4	18.11	17,7		+
D5	Or-20	9,7		+
D7	K-			-

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла

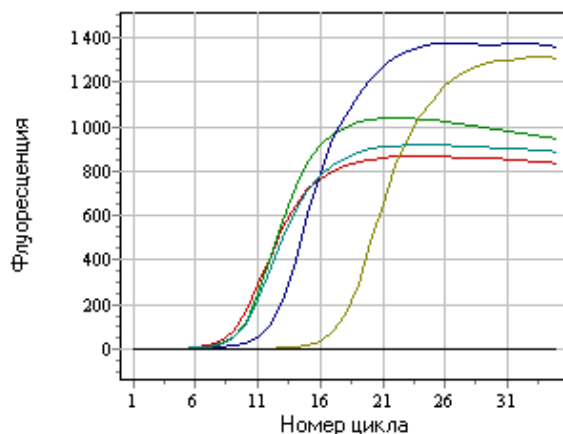


Рис 1. ПЦР-протокол детекции участка гена 16sRNA *Ornithobacterium rhinotracheale* в присутствии красителя SYBR Green I в режиме «реального времени».

Одновременный экспериментальный ряд содержал несколько реакционных пробирок, у которых температура отжига праймеров снижалась с 75°C до 60° с шагом в 5°C. Сам протокол проведения амплификации состоял из трех этапов: денатурации ДНК при 95°C, отжига праймеров на денатурированной ДНК, элонгации (синтеза новой цепи с помощью фермента Taq-ДНК-полимеразы, наибольшая активность которой проявляется при 72°C). Нами был выбран классический тип

протокола ПЦР без предварительных «посадочных» циклов. Однако для активации Taq-ДНК-полимеразы требовалась инактивация антител, ингибирующих ее действие. После ряда проведенных опытов нами было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров оказалась температура 60°C. При этой температуре наблюдался максимальный продукт амплификации.

Таким образом, в конечном варианте он имел следующий вид:

1. 95°C – 5 минут – 1 цикл
2. 95°C – 10 сек
60°C – 20 сек } 30 циклов
72°C – 20 сек
3. 72°C – 2 мин - 1 цикл

Аналогично опытам по оптимизации температурного режима были проведены эксперименты по оптимизации конечной концентрации праймеров в реакционной смеси. Нами было установлено, что избыток праймеров в реакции приводил к образованию неспецифических продуктов амплификации, имеющих размер продукта, не превышающего 100 п.о. Недостаток праймеров в экспериментальном ряде приводил либо к образованию продуктов амплификации слишком большой длины (>1000-2000 п.о.), либо видимой детекции не наблюдалось вовсе. Таким образом, была выявлена оптимальная концентрации праймеров в реакционной смеси – по 15 pmol 16S-1 и 16S-2.

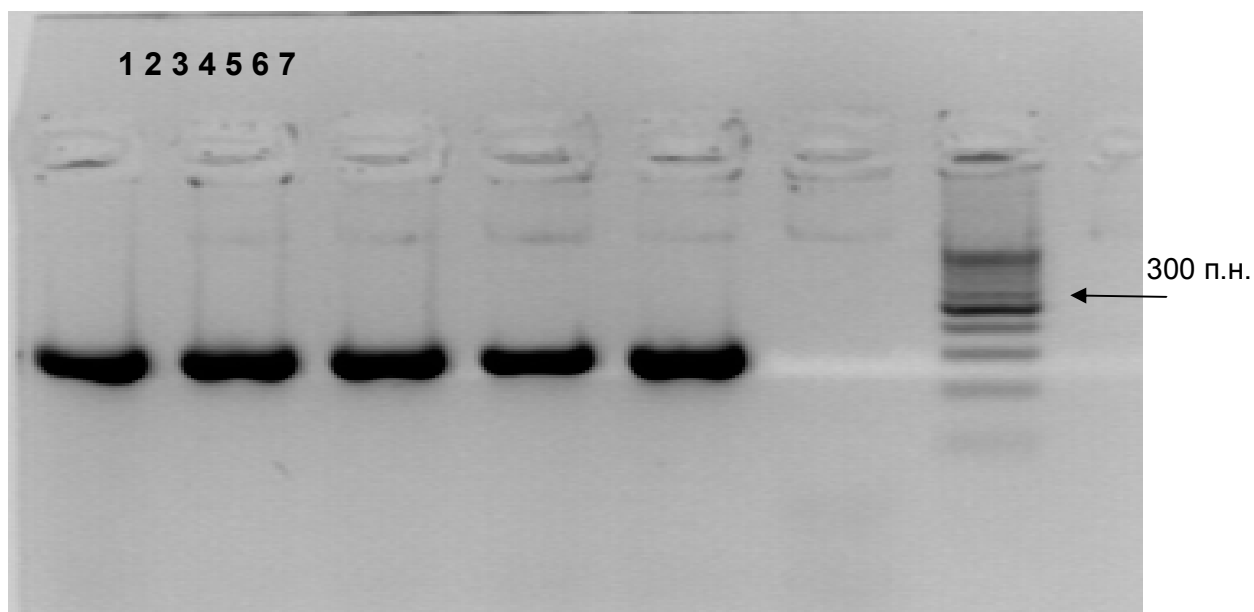


Рис.2 Электрофорез тех же продуктов амплификации в 2,3% агарозном геле (с конечной концентрацией праймеров по 15 pmol на реакционную смесь): ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* 1-штамм №51463, 2-штамм №51464, 3-штамм №51464/6.11, 4-штамм №18.11, 5-штамм №Ог-20; 6-отрицательный контроль; 7-маркер молекулярного веса М-100.

Из-за отсутствия количественных стандартов ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* нами были определены их относительные концентрации в предложенных пробах. В качестве единицы было предложено принять пробу с Ср-тах. Таким образом, мы получили величины концентраций ДНК относительно их минимального количества в эксперименте (см. табл.).

Определение относительной концентрации ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Концентрация
D1	51463	9,0		394
D2	51464	9,8		228
D3	51464/6.11	12,2		43,7
D4	18.11	17,7		1,0
D5	Or-20	9,7		250
D7	K-			

В результате проведенной нами работы были определены специфичные праймеры, фланкирующие часть гена 16sRNA генома *Ornithobacterium rhinotracheale*. Фланкируемый участок гена 16sRNA имеет длину 302 пары нуклеотидов.

Были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции с выбранной парой праймеров в режиме «реального времени» с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Детекция флуоресценции во время реакции позволила оценить относительное количество исходной матричной ДНК. Метод применения интеркаляторов при проведении ПЦР в режиме «реального времени» является не столь специфичным, как применение флуоресцентных зондов, но позволяет существенно снизить материальные затраты при проведении количественного исследования. Скомпенсировать этот недостаток мы смогли проведением вторичной детекции полученных амплификатов методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Литература

1. Красноженов Е.П. и др. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний // Ростов н/Д: Феникс, 2006.
2. Ребриков Д.В., Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. ПЦР в реальном времени. М: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
3. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of DNA sequences. *Biotechnology*, 1992, 10:413-417.