

PCR OPTIMIZATION PROTOCOL ALGORITHM FOR IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS USING *Pasteurella multocida*

Amirgazin A.O.¹, Shvedyuk V.B.¹, Kuibagarov M.A.¹, Karibaev T.B.², Shevtsov A.B.¹

¹National Center for Biotechnology

13/5, Korgalzhyn road, Astana, 010000, Kazakhstan

²National Reference Center for Veterinary Medicine

22/3, 150 let Abaya str., Astana, 010000, Kazakhstan

ncbshevtsov@gmail.com

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is a multifunctional tool used extensively in molecular biology. PCR is modified in numerous ways for specific purposes, all of which rely on proper efficiency, specificity and sensitivity. Despite the general acceptance of the "classical" principle, there is no unified optimization scheme that takes into account the diversity of PCR applications. Such an optimization scheme would guide researchers toward the best optimization approaches for their specific PCR application. Currently, researchers are guided only by data from previously published authors who submitted their own PCR optimization schemes. Here, we describe a PCR protocol optimization algorithm for the detection of microorganisms using *Pasteurella multocida* as an example. *P. multocida*, which we have used extensively in the past, allows us to achieve the necessary PCR specificity and sensitivity to demonstrate the application of our algorithm. Our scheme differs from others as it uses an inductive method to learn the specificity of the protocol being developed. Our approach uses real-time PCR, with SYBR Green I, to monitor amplification during the optimization process. Furthermore, the simplicity of this approach means that it can be used to develop and optimize diagnostic PCR for a wide range of researchers and applications. As a proof of concept, PCR conditions were optimized for two pairs of primers which were tested on a collection of samples comprising DNA from 92 species of bacteria, three eukaryotic species, and with the sensitivity of at least five *P. multocida* genomic copy equivalents.

Keywords: PCR, optimization, *Pasteurella multocida*.

УДК 57.081

АЛГОРИТМ ОПТИМИЗАЦИИ ПЦР ПРОТОКОЛА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ *Pasteurella multocida*

Амиргазин А.О.¹, Шведюк В.Б.¹, Куйбагаров М.А.¹, Карибаев Т.Б.², Шевцов А.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии

Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

²Национальный референтный центр по ветеринарии

ул. 150 лет Абая, дом 22/3, Астана, 010000, Казахстан

ncbshevtsov@gmail.com

АБСТРАКТ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является многофункциональным инструментом в молекулярной биологии. Многочисленные модификации ПЦР оптимизированы под конкретные цели и стремятся достичь должной эффективности, специфичности и чувствительности. Несмотря на общий «классический» принцип, нет единой схемы оптимизации, учитывающей разнообразие применения ПЦР, по которой исследователь руководствовался бы в случае необходимости. Вместо этого у исследователя имеются данные ранее опубликованных авторов, представивших собственные схемы оптимизации ПЦР.

В данной статье мы описываем алгоритм оптимизации ПЦР протокола для выявления микроорганизмов на примере *Pasteurella multocida*, применяемый нами многократно и позволяющий достичь необходимую специфичность и чувствительность. Наша схема

главным образом отличается от других применением индуктивного метода познания специфичности разрабатываемого протокола, использование ПЦР в режиме реального времени с применением SYBRGreenI для мониторинга амплификации в процессе оптимизации, а также простотой и доступностью в разработке и оптимизации диагностической ПЦР, применимой для широкого круга исследователей.

В результате были оптимизированы условия ПЦР для двух пар праймеров, протестированных на коллекции образцов ДНК, включающих 92 вида бактерий, 3 вида эукариотических организмов и обладающие чувствительностью к не ниже 5 копиям в геномном эквиваленте *Pasteurella multocida*.

Ключевые слова: ПЦР, оптимизация, *Pasteurella multocida*.

ВВЕДЕНИЕ

ПЦР является одним из самых часто используемых методов в молекулярной биологии, различные модификации которого базируются на общем принципе и насчитывают десятки областей применения.

Зависимость кинетики нуклеиновых полимеров от условий буферных систем [1] и природы её последовательности [2] были описаны ещё до открытия ПЦР. Применение различных полимераз открыло новые возможности ферментативной амплификации. Влияние концентрации солей и ионов не только на поведение молекул ДНК, но и на работу полимераз включило новые переменные в «уравнение» по поиску оптимальных условий амплификации. В связи с этим возникла проблема определения стратегии оптимизации, идея которой в итоге была заимствована из инженерной промышленности. Именно применение методов Тагучи является одним из первых методов планирования эксперимента по оптимизации ПЦР [3]. Методы Тагучи позволили одновременно выявлять эффекты и взаимодействия большого множества компонентов реакции, используя лишь ограниченное число проведенных экспериментов. На момент применения методов Тагучи в оптимизации ПЦР существовало большое количество экспериментальных методов проектирования, которые стали отправной точкой для разработки последующих схем оптимизации ПЦР [4].

Несмотря на существование стандартных и оптимальных условий, для конкретных ПЦР состав может варьировать. Учитывая широкое разнообразие применений и модификаций ПЦР, способы и алгоритмы определения оптимальных условий ПЦР до сих пор являются актуальной задачей. Несмотря на большое количество статей, посвященных стратегии оптимизации ПЦР с электрофоретической детекцией, среди них мало конкретных примеров, описывающих ситуативные особенности схем авторов.

Целью данной работы была оценка эффективности использования предложенного нами алгоритма оптимизации ПЦР протокола для выявления микроорганизмов на примере *Pasteurella multocida*.

Pasteurella multocida это грамотрицательная бактерия, являющаяся возбудителем пастереллёза (острое септицемическое заболевание, характеризующееся высокой смертностью, а также тяжелыми экономическими потерями) у крупного рогатого скота, овец, коз и домашней птицы [5]. Ежегодно причиной падежа домашних и в особенности диких животных Казахстана признаётся пастереллёз [6]. Диагноз у сельскохозяйственных животных базируется на клинических признаках, определении патологических изменений и бактериологических методах идентификации возбудителя. Эффективность этих методов не всегда соответствует современным требованиям ветеринарной диагностической практики, поэтому применение молекулярных методов является наиболее действующим способом контроля заболевания и снижения экономических потерь [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн праймеров

В работе мы использовали в качестве мишеней гены, находящиеся в непосредственной близости к рибосомальному оперону, так как по нашему опыту праймирование в данных регионах является наиболее эффективным.

Поиск последовательностей, гомологичных генам-мишеням, содержащим консенсусные мотивы, выполнялся с помощью веб-ресурса NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), выравнивание последовательностей проводилось с использованием программного обеспечения BioEditSequenceAlignmentEditor 1997-2013 [8].

Дизайн праймеров и оценка вероятности образования вторичных структур (таких как шпильки и димеры) рассчитывались с применением программы PrimerSelect (DNASTAR). Специфичность праймеров, а также температура плавления была протестирована

insilico с использованием веб-сервиса Primer-BLAST [9]. Спроектированные праймеры приведены в таблице 1.

Получение бактериальной ДНК

В экспериментах использовалась геномная ДНК изолятов *P. multocida*, выделенных из биоматериалов от сайгаков, находящихся в коллекции РГП на ПХВ «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВКиН МСХ РК. Культивирование изолятов *P. multocida* проводили на мясо-пептонном агаре (HiMedia, Индия). ДНК выделяли с использованием набора реактивов «QIAamp DNA MiniKit» производства фирмы QIAGEN (США).

Для проверки специфичности протоколов была собрана коллекция образцов ДНК из 92 бактериальных видов микроорганизмов и 3 эукариотических многоклеточных видов организмов. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 и флуориметра Qubit®. 2.0 Fluorometer с набором Qubit dsDNA HS Assay Kits.

Видовая принадлежность и контаминация бактериальных ДНК образцов была подтверждена анализом нуклеотидной последовательности *16SrRNA* гена.

Проверка работоспособности праймеров

Проверку работоспособности проводили отдельно для каждой подобранной пары праймеров, с применением контрольной ДНК в концентрации 0,5 нг в реакции и отрицательным контролем (TE буфер), эксперимент проводился в трех повторах. Реакционная смесь содержала 10 pmol прямого и обратного праймеров 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40, 2.5 mM MgCl₂, 200 nM каждого dNTP, 1,25 Ед. Taq DNA полимеразы (Alphaferment, Russia). ПЦР выполнялась на термоциклере T-100 (Bio-Rad), программа включала первичную денатурацию 95°C–3 минуты; 42 цикла с денатурацией при 95°C – 30 секунд, отжиг праймеров при расчетной температуре в PrimerBlast 30 секунд, элонгация при 72°C в течение времени, необходимом для амплификации целевого фрагмента согласно инструкции производителя.

Оптимизация ПЦР

Оптимизацию ПЦР проводили по температуре отжига праймеров и концентрации ионов магния в реакционной смеси. При этом оптимизацию ионов магния проводили двухэтапно: 1 этап – грубый подбор концентрации магния в градиенте от 1,5 до 2,5 с шагом 0,5 mM; 2 этап – финальный подбор с концентрацией магния в диапазоне $\pm 0,5$ от оптимальной концентрации 1-го этапа оптимизации с шагом 0,2 mM. Реакционная смесь включала 10 pmol прямого и обратного праймеров 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40, 200 nM каждого dNTP, 1,25Ед. Taq DNA полимеразы (Alphaferment, Russia), 5 nM тетраметиламмония хлорида, 7%сахарозы, ксилен цианол 10 мг/мл, бетаин 0,2M. В качестве интеркалирующего красителя использовали SyberGreen I nunleic (Sigma, S9430) в 300 кратном разведении. Программа ПЦР включала первичную денатурацию при 95°C 3 минуты; 42 цикла с денатурацией при 95°C – 30 секунд, отжиг праймеров в градиенте температур от расчетной температуры в PrimerBlast $\pm 4^\circ\text{C}$ – 30 секунд, элонгация при 72°C в течение времени, необходимом для амплификации целевого фрагмента согласно инструкции производителя, и шаг учета флуоресценции при 75°C в течение 10 секунд. Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Для каждой реакционной смеси использовали два ряда: первый ряд включал ДНК *P. multocida* в концентрации 0,05 нг в реакции, второй ряд ДНК *E. coliv* концентрации 50 нг в реакции.

Оптимизация концентрации праймеров

Оптимизацию концентрации праймеров проводили, варьируя их соотношения в реакционной смеси в диапазоне от 200 до 600 nM с шагом 100 nM. С каждым соотношением ставили три повтора. Использовали оптимизированный состав реакционной смеси и программу амплификации с детекцией в режиме реального времени SyberGreen I nunleic (Sigma, S9430).

Электрофорез

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозе (ApplyChem A8963) и 1×TAE буфере при V=90, mA=400, в камере Sub-Cell model 192, в качестве источника питания применялся Electrophoresis Power Supply – EPS 601.

Оценка специфичности

Оценка специфичности разрабатываемого протокола проводилась на 95 образцах ДНК, включая 92 ДНК бактерий и 3 ДНК высших эукариотических организмов, постановку ПЦР проводили по оптимизированным условиям реакции.

Оценка чувствительности

Оценку чувствительности проводили на контрольных образцах ДНК 4 изолятов *P. multocida*: *P. multocida K-1* – выделенный от сайги, *Pasteurella multocida 11* – выделенный из печени 12-месячного бычка, *Pasteurella multocida КТП №PS-1-2006* – выделенный от лошади, *Pasteurella multocida СП-95/2* – выделенная от курицы. Концентрацию ДНК доводили до 2 нг/мкл, используя набор Qubit dsDNA HS Assay Kit, при трехкратном подтверждении результата. Для каждого образца ДНК делали ряд двукратных разведений от 1,46 до $1,74 \cdot 10^{-6}$ нг в мкл. Использовали в реакционной смеси 5 мкл, что в пересчете на количество копий соответствовало от 2,98 млн до 1 копии в реакции. Копийность рассчитывали с помощью интернет-ресурса [10]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизацию ПЦР проводили, следуя предлагаемому нами алгоритму (рисунок 1).

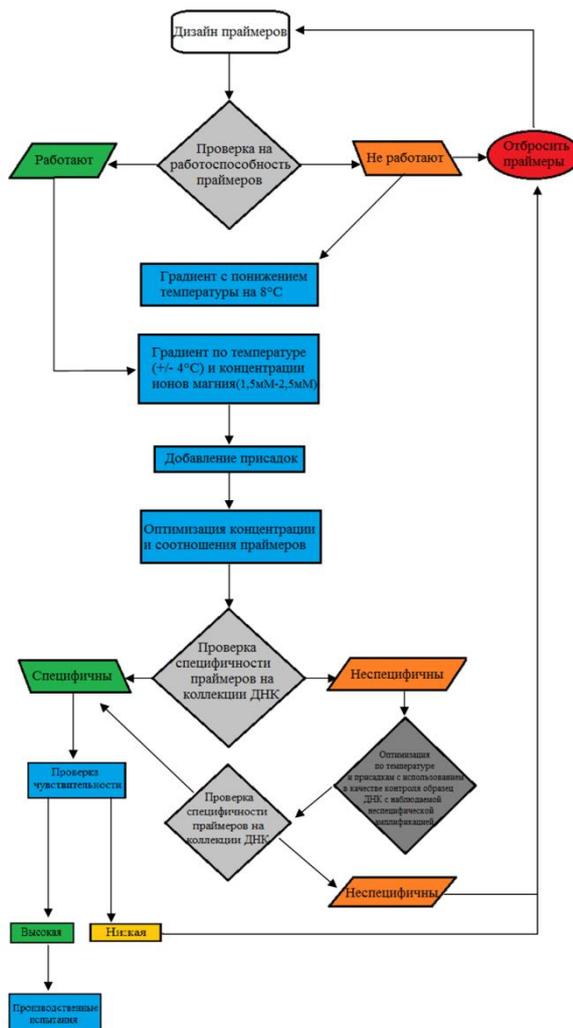


Рис. 1.Схема оптимизации ПЦР

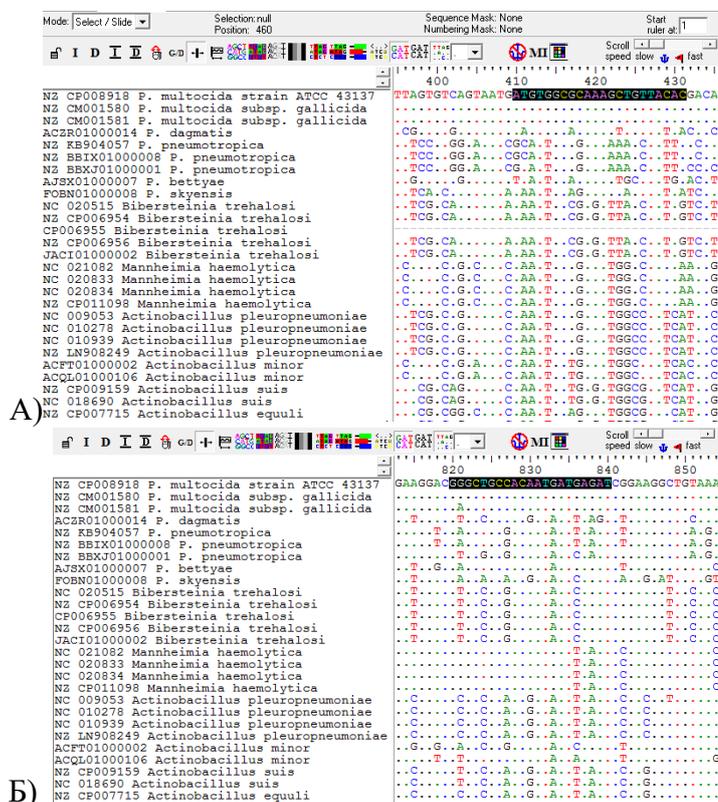
Fig. 1.PCR optimization scheme

Дизайн праймеров

Дизайн праймеров проводили к нуклеотидным последовательностям генов домашнего хозяйства: репликативной ДНКгеликазы субъединицы Бета (*dnaB*), АТФсинтазы субъединицы В (*atpB*), ДНК-зависимой РНКполимеразы субъединицы Бета (*rpoB*) и ДНК-зависимой РНКполимеразы субъединицы Бета' (*rpoB'*). Для подбора праймеров было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей целевых генов, взятых из полногеномных данных 78 штаммов, включающих: *P. multocida*–35, *Pasteurella dagmatis* – 1, *Pasteurella pneumotropica* – 3, *Pasteurella bettyae* – 1, *Pasteurella skyensis*–1, *Pasteurella gallinarum* – 1, *Pasteurella caballi* – 1, *Pasteurella aerogenes* – 1; *Bibersteinia trehalosi* – 5, *Mannheimia haemolytica* – 4, *Actinobacillus pleuropneumoniae* – 4, *Actinobacillus minor* – 2, *Actinobacillus suis* – 2, *Actinobacillus*

equilibsubsp. equili – 1, *Actinobacillus ureae* – 1, *Actinobacillus succinogenes* – 1, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*– 2, *Haemophilus ducreyi* – 2, *Haemophilus parasuis* – 2, *Haemophilus haemolyticus* – 2, *Basfia succiniproducens* – 1, *Aggregatibacter aphrophilus* – 2, *Aggregatibacter segnis* – 2, *Mannheimia granulomatis* – 1.

Выбор данных геномов был основан на генетической близости бактерий и наличия полногеномных последовательностей в базе данных [11]. Праймеры подбирались к консервативным участкам генов-мишеней у *Pasteurella multocida* (рисунок 2), но гипервариабельным у близкородственных видов. Всего было подобрано 7 пар праймеров (таблица 1).



А – прямой праймер, Б – обратный праймер

Рис.2. Регион подбора праймеров к генам-мишеням на примере *dnaB* гена

A is the forward primer, B is the reverse primer

Fig. 2. Selection region of primers for target genes using *dnaB* gene as an example

Таблица 1. Список подобранных праймеров

Table 1.List of selected primers

Наименование праймера The name of the primer	Последовательность, (5'-3') This sequence, (5'- 3 ')	Ген Gene	Размер ампликона (bp) The size of the amplicon (bp)	Расчетная температура отжига по ресурсу PrimerBlast [12], °C Estimated annealing temperature for PrimerBlast [12], °C
<i>dnaB</i> -Pmul-364-F	ggatgaggcagaacgaaaag	<i>dnaB</i>	364	56,8
<i>dnaB</i> -Pmul-364-R	acgcgataatgaagcaagaga			57,8
<i>rpoB</i> -Pmul-433-F	gccatattcgtgctttaga	<i>rpoB</i>	433	54,7
<i>rpoB</i> -Pmul-433-R	cctgtcttcatcaatgcc			56,2
<i>dnaB</i> -Pmut-674-F	gtctttgccatttcggag	<i>dnaB</i>	674	53,7

dnaB-Pmut-674-R	cggttaactgggataagg			52,7
rpoB-Pmut-435-5F	cgccatatccgtgcttag	<i>rpoB</i>	435	56,2
rpoB-Pmut-435-14R	acctgtcttctcatcaatgcc			58
dnaB-Pmut-410-9F	cgcaaagctgttacacgaca	<i>dnaB</i>	410	59,4
dnaB-Pmut-410-6R	acgcgataatgaagcaagaga			57,8
atpB-Pmut-622-2F	cccaatttctgtccagtg	<i>atpB</i>	622	52,8
atpB-Pmut-622-1R	tcttgacagaacacccatttc			56,2
dnaB_f-403	atgtggcgcgaaagctgttacac	<i>dnaB</i>	277	62,5
dnaB-r-680	gggctgccacaatgatgagat			62,5

Оптимизация условий ПЦР реакции

Первоначальную проверку работоспособности праймеров целесообразно проводить с использованием наиболее часто описываемого состава реакционной смеси, 1×ПЦР буфер, ионы магния в концентрации 2,5 мМ, а также параметры циклирования, приведенные в наставлении к используемой полимеразе. В случае отсутствия амплификации следует перепроверить качество синтеза олигонуклеотидов [13] и повторить проверку работоспособности с понижением рамки температур на стадии отжига праймеров на ~ 8°C относительно расчетной или поставить градиент в данных температурных диапазонах. При первоначальной проверке работоспособности подобранных праймеров были амплифицированы ПЦР продукты ожидаемых размеров.

Дальнейший шаг оптимизации подразумевает определение точной температуры отжига праймеров и концентрацию ионов магния, при которых отмечается высокая эффективность и отсутствует неспецифический отжиг на отрицательный контроль, которым является геномная ДНК генетически близкого организма в высоких концентрациях (более 1 млн. копий в реакции). Электрофоретическая детекция не даёт данных об эффективности протекания реакции, поэтому оптимизацию лучше проводить с использованием SyberGreen в режиме реального времени. В качестве контроля неспецифического отжига мы использовали ДНК *E.coli* в концентрации 50 нг в реакции (что составляет $2.04 \cdot 10^7$ копий), так как ДНК данного вида доступна в высоких концентрациях и он также входит в класс гамма протеобактерий [14]. Для этого проводится ПЦР в градиенте $\pm 4^\circ\text{C}$ от предсказанных температур плавления праймеров, и в концентрации ионов магния от 1,5 до 2,5 мМ с шагом 0,5 мМ.

На первом этапе оптимизации температуры отжига праймеров и концентрации ионов магния в диапазоне 1,5-2,5 мМ были исключены из дальнейшего анализа три пары праймеров: rpoB-435, dnaB-410, atpB-622, так как на электрофорезе были выявлены четко визуализированные дополнительные ПЦР продукты во всем диапазоне температур и всех концентраций магния (рисунок 3). Для оставшихся четырех пар праймеров были выбраны оптимальные значения температуры отжига праймеров и концентрации магния, на основании максимальной эффективности ПЦР. В выбранных условиях был наименьший порог и максимальный уровень плато, а также отсутствовал отжиг на неспецифическую ДНК (*E. coli*) (рисунок 4).

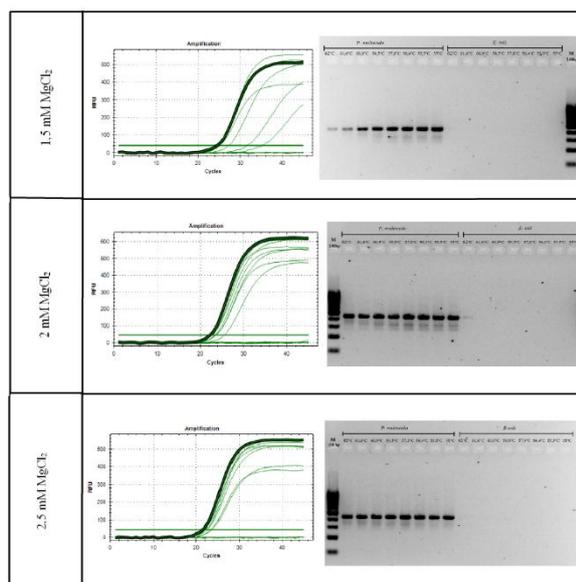


Рис. 3. Оптимизация температуры отжига и концентрации ионов магния праймеров rpoB-Pmut-435

Fig. 3. Optimization of annealing temperature and magnesium ion concentration of rpoB-Pmut-435 primers

Опираясь на оптимальную концентрацию магния, полученную на первом этапе оптимизации, был выполнен 2 этап, в диапазоне концентрации равной $\pm 0,5$ mM с шагом 0,2 mM. Это позволило установить концентрацию, относительно которой изменения на 0,2 mM не приводит к ухудшению эффективности (таблица 2). В результате был получен состав реакционной смеси, в котором потеря одного или нескольких компонентов в количестве $\sim 10\%$ не влияет на эффективность реакции. Это особенно полезно в тех случаях, когда ПЦР будет использоваться в условия диагностических лабораторий, где могут возникать систематические погрешности пепетирования [15].

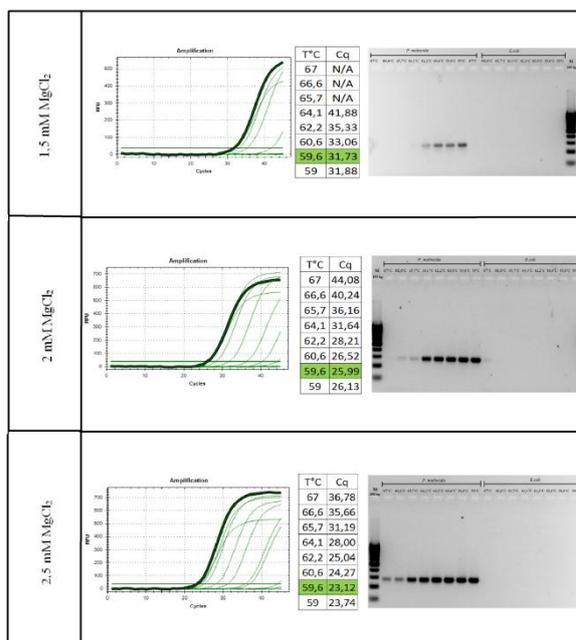


Рис. 4. Оптимизация температуры отжига и концентрации ионов магния праймеров dnaB_f/r-403-680

Fig. 4. Optimization of annealing temperature and concentration of magnesium ions of primers dnaB_f/r-403-680

Повышение эффективности и чувствительности позволяют добиться использования присадок [16, 17, 18]. В данной работе мы решили использовать основной состав, предложенный нами ранее, включающий в себя 5 nM тетраметиламмония хлорида, бетаин – до финальной концентрации 0,2M [19]. Включение сахарозы в последующем позволит использовать ПЦР продукт без смешивания с погрузочным буфером, что удобно в клинической практике. Оптимизация присадок подразумевает варьирование их в градиенте концентраций. При этом за одну постановку ПЦР целесообразно проводить оптимизацию одного компонента [20].

Так как ПЦР – это динамически напряжённая система, а динамика работы праймеров целиком зависит от энтальпийных и термодинамических характеристик молекулы, которые строго индивидуальны для разных олигонуклеотидов [21], то совершенно понятно, что динамика поведения праймеров в реакционной смеси различается. Таким образом, следующим шагом оптимизации является подбор динамически согласованного соотношения концентрации праймеров. Мы рекомендуем подбирать концентрацию праймеров от 200 nM до 600 nM прямого и обратного праймеров, а реакцию проводить в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SyberGreen. Приемлемым соотношением праймеров будет являться реакционная смесь, флуоресцентный сигнал которого будет начинаться раньше и уровень плато будет выше других. С каждым соотношением праймеров было поставлено 3 реакции, каждая из которых содержала ДНК *Pasteurella multocida* разных штаммов в концентрации 0,5 ng в реакции и отрицательный контроль – автоклавируемая деионизированная вода. Варьирование соотношением праймеров позволило повысить эффективность ПЦР. В среднем значение цикла, на котором началась экспоненциальная фаза амплификации, уменьшилось на 1,3 цикла. Оптимальные значения для 4 пар праймеров приведены в таблице 2.

Таблица 2. Оптимизированные условия постановки ПЦР

Table 2. Optimized PCR conditions

Наименование праймеров Name of primers	Оптимальная концентрация ионов магния 1-го этапа Optimum concentration of magnesium ions of the 1st stage	Оптимальная концентрация ионов магния 2-го этапа Optimum concentration of magnesium ions of the 2nd stage	Оптимальная температура отжига Optimal annealing temperature	Соотношение праймеров F/R (нМ) The ratio of primers F / R (nM)
dnaB-Pmul-364	2,5 mM	2,4 mM	59°C	500/500
rpoB-Pmul-433	2,5 mM	2,4 mM	58°C	600/300
dnaB-Pmut-674	2,5 mM	2,6 mM	57°C	400/600
dnaB_f/r-403-680	2,5 mM	2,6 mM	60°C	400/600

Оценка специфичности и чувствительности ПЦР реакции

Специфичность разработанных протоколов проверяется на коллекции образцов ДНК максимального количества видов бактерий с концентрацией в реакции не менее 1 млн. копий. Наилучшим вариантом является включение в коллекцию образцов ДНК филогенетически близких микроорганизмов к возбудителю, для которого разрабатывается ПЦР. Также коллекция должна содержать образцы ДНК многоклеточных эукариотических организмов (восприимчивых к данному возбудителю). Необходимо включать в коллекцию микроорганизмы сапрофитной микрофлоры хозяев и ДНК возбудителей с идентичной симптоматикой, которые могут контаминировать образец или иным образом увеличить вероятность неспецифического отжига праймеров и получения ложноположительного результата.

Используемая нами коллекция образцов ДНК включала в себя 92 вида бактерий, идентифицированных по последовательности гена *16S rRNA*. ДНК бактерий за исключением контрольного образца ДНК *Pasteurella multocida* бралась в концентрации от 5 до 50 нг в реакции, что соответствовало в геномном эквиваленте от восьми миллионов копий, а ДНК *Escherichia coli* использовалась в концентрации 200 нг на реакцию, что составило в геномном эквиваленте более 33 миллионов копий в реакции.

К высшим эукариотическим многоклеточным организмам в коллекции относились образцы ДНК: курицы, овцы и крупного рогатого скота, ДНК которых также брали в концентрации 200 нг на реакцию.

На данном этапе у пары праймеров dnaB-Pmul-364 был выявлен неспецифический отжиг к видам: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus aryabhatai*, *Serratia proteamaculans*, *Rhodococcus opacus*, *Lactobacillus plantarum*, *Flavobacterium balustinum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter jejuni*, *Brucella suis*, *Bacillus amyloliquefaciens*. А также у пары праймеров rpoB-Pmul-433 был выявлен неспецифический отжиг к видам: *Devosianeptunia* и *Campylo bacterconcisus* (таблица 3). Вследствие чего от этих пар отказались.

При апробации специфичности с праймерами dnaB-Pmut-674-F, dnaB-Pmut-674-R, dnaB_f-403 и dnaB-r-680 неспецифического отжига на геномную ДНК бактерий и многоклеточных животных выявлено не было.

Таблица 3. Специфичность праймеров

Table 3. Specificity of primers

Наименование вида Name of species	Концентрация ДНК в реакционной смеси, нг The concentration of DNA in the reaction mixture, ng	Наличие ПЦР амплификации с праймерами The presence of PCR amplification with primers			
		dnaB-Pmul-364	rpoB-Pmul-433	dnaB-Pmul-674	dnaB_f/r-403
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	50	No	No	No	No
<i>Aeromonas bivalvium</i>	50	No	No	No	No
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5	No	No	No	No
<i>Alcaligenes aquatilis</i>	50	No	No	No	No
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5	Yes	No	No	No
<i>Bacillus aryabhatai</i>	50	Yes	No	No	No

<i>Bacillus atrophaeus</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus axarquiensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus cereus</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus licheniformis</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Bacillus clausii</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus mojavensis</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus mycoides</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus pumilus</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus safensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus simplex</i>	5	No	No	No	No
<i>Bacillus sonorensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus stratosphericus</i>	5	Yes	No	No	No
<i>Bacillus subtilis</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus tequilensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5	No	No	No	No
<i>Bovinae (KPC)</i>	200	No	No	No	No
<i>Brucella abortus</i>	50	No	No	No	No
<i>Brucella canis</i>	50	No	No	No	No
<i>Brucella melitensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Brucella ovis</i>	50	No	No	No	No
<i>Brucella suis</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Campylobacter gracilis</i>	5	No	No	No	No
<i>Campylobacter concisus</i>	5	No	Yes	No	No
<i>Campylobacter coli</i>	5	No	No	No	No
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	5	No	No	No	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	5	Yes	No	No	No
<i>Campylobacter mucosalis</i>	5	No	No	No	No
<i>Campylobacter rectus</i>	5	Yes	No	No	No
<i>Campylobacter showae</i>	5	No	No	No	No
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	5	Yes	No	No	No
<i>Clostridium novyi</i>	5	No	No	No	No
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	5	No	No	No	No
<i>Dermococcus nishinomiyaensis</i>	5	No	No	No	No
<i>Devosia neptunia</i>	5	No	Yes	No	No
<i>Ensifer adhaerens</i>	5	No	No	No	No
<i>Enterococcus durans</i>	5	No	No	No	No
<i>Erwinia amylovora</i>	5	No	No	No	No
<i>Esherichia coli</i>	200	No	No	No	No
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	5	No	No	No	No
<i>Flavobacterium balustinum</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Gallus domesticus</i>	200	No	No	No	No
<i>Halomonas nitritophilus</i>	50	No	No	No	No
<i>Klebsiella michiganensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	No	No	No	No
<i>Lactobacillus brevis</i>	50	No	No	No	No
<i>Lactobacillus casei</i>	50	No	No	No	No
<i>Lactobacillus garvieae</i>	5	No	No	No	No
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	No	No	No	No
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Lactobacillus pontis</i>	5	No	No	No	No
<i>Listeria innocua</i>	5	No	No	No	No
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	5	No	No	No	No
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	50	No	No	No	No
<i>Ochrobactrum tritici</i>	5	No	No	No	No
<i>Ovis aries (Овечья)</i>	200	No	No	No	No
<i>P. multocida</i>	5	Yes	Yes	Yes	Yes

<i>Pedicoccus acidilactici</i>	5	No	No	No	No
<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas chengduensis</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas fluoresciens</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas mandelii</i>	5	No	No	No	No
<i>Pseudomonas marginalis</i>	5	No	No	No	No
<i>Pseudomonas mucedolens</i>	5	No	No	No	No
<i>Pseudomonas plecoqlossicida</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas putida</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas reactans</i>	50	No	No	No	No
<i>Pseudomonas syringae</i>	5	No	No	No	No
<i>Rahnella aquaticus</i>	50	No	No	No	No
<i>Rhizobium agrobacterium</i>	50	No	No	No	No
<i>Rhizobium pusense</i>	50	No	No	No	No
<i>Rhodococcus jostii</i>	50	No	No	No	No
<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	5	No	No	No	No
<i>Rhodococcus opacus</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	5	No	No	No	No
<i>Salmonella enterica</i>	5	No	No	No	No
<i>Salmonella enteritidis</i>	50	No	No	No	No
<i>Serratia liquefaciens</i>	50	No	No	No	No
<i>Serratia plymuthica</i>	50	No	No	No	No
<i>Serratia proteamaculans</i>	50	Yes	No	No	No
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	5	No	No	No	No
<i>Sphingomonas aerolata</i>	5	No	No	No	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	50	No	No	No	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	No	No	No	No
<i>Streptococcus salivarius</i>	5	No	No	No	No

Дополнительно для праймеров с неспецифическим отжигом может быть использована оптимизация по температуре отжига праймеров и составу реакционной смеси с использованием в качестве отрицательного контроля ДНК организмов, на которых выявлен неспецифический отжиг. В нашем случае мы не проводили данный этап, так как в конечном итоге у нас было две пары специфических праймеров.

Важной характеристикой разработанного ПЦР протокола является его чувствительность, оценку которой проводили только для специфических праймеров. В эксперименте использовался метод двукратных разведений (таблица 4), начиная с максимальной имеющейся стоковой концентрации контрольной ДНК, равной 7,3 нг (что соответствует 2980 тыс. копий в геномном эквиваленте в реакции) до $1,74 \cdot 10^{-6}$ нг (что соответствует 1 копии в геномном эквиваленте в реакции).

Таблица 4. Диапазон концентраций ДНК *P. multocida* при проверке чувствительности

Table 4. Range of *P. multocida* DNA concentrations in the sensitivity test

Лунка Well	Количество ДНК в реакции, нг The amount of DNA in the reaction, ng	Количество геномных копий в реакции The number of genomic copies in the reaction
A1	7,3	2980000
B1	3,65	1490000
C1	1,825	745000
D1	0,9125	372500
E1	0,45625	186250
F1	0,228125	93125
G1	0,1140625	46562,5
H1	0,05703125	23281,25
A2	0,028515625	11640,625
B2	0,014257813	5820,3125
C2	0,007128906	2910,15625

D2	0,003564453	1455,078125
E2	0,001782227	727,5390625
F2	0,000891113	363,7695313
G2	0,000445557	181,8847656
H2	0,000222778	90,94238281
A3	0,000111389	45,47119141
B3	5,56946E-05	22,7355957
C3	2,78473E-05	11,36779785
D3	1,39236E-05	5,683898926
E3	6,96182E-06	2,841949463
F3	3,48091E-06	1,420974731
G3	1,74046E-06	0,710487366
H3	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль

Чувствительность для пар праймеров dnaB-Pmut-674-F- gctttgccatttcggag, dnaB-Pmut-674-R- cgggttaactgggataaagg и dnaB_f-403- atgtggcgcaagctgttacac и dnaB-r-680- gggctgccacaatgatgagat была не ниже 5 копий или 13 фг в реакции (рисунок 5).

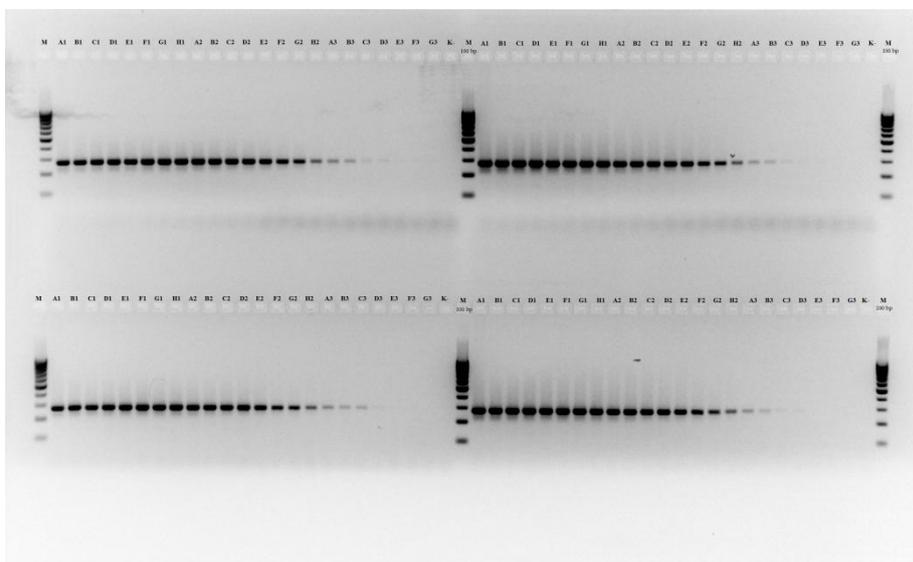


Рис. 5. Чувствительность ПЦР с праймерами dnaB_f/r-403-680

Fig. 5. PCR sensitivity with primers dnaB_f / r-403-680

Чувствительность разработанных ПЦР протоколов превышает ранее предложенный протокол на *toxA* ген [22, 23] с детекцией в агарозном геле и не уступает коммерческим наборам, основанным на ПЦР с детекцией в режиме реального времени [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный алгоритм позволяет поэтапно провести оптимизацию условий моноплексной ПЦР. Разработанные протокола ПЦР детекции *Pasteurella multocida* позволят с высокой степенью специфичности и чувствительности диагностировать пастереллёз у животных и птиц.

Финансирование

Работа выполнялась в рамках проекта «Разработка ПЦР тест-системы для выявления *Pasteurella multocida*» в рамках реализации государственного заказа по научно-технической программе «Создание диагностических препаратов и вакцин на основе использования молекулярно-генетических методов для обеспечения ветеринарной безопасности».

ЛИТЕРАТУРА

1. Schildkraut C., Lifson S. Dependence of the Melting Temperature of DNA on Salt Concentration // Biopolymers. – 1965. – Vol. 3. –P. 195-208.

2. Freier S.M., Kierzek R., Jaeger J.A., Sugimoto N., Caruthers M.H., Neilson T., Turner D.H. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability // *Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 9373-9377.
3. Cobb B.D., Clarkson J.M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods // *Nucleic Acids Research.* – 1994. – Vol. 22, №18. – P. 3801-3805.
4. Box G.E.P., W.G. Hunter and J.S. Hunter. *Statistics for Experimenters* // John Wiley & Sons. – 1978.
5. Prabhakar P., Thangavelu A., Prabhakar T.G., Kirubakaran J.J., Chandran N.D.J. Rapid virulence typing of *P. multocida* in sheep isolates of Tamil Nadu. *Indian J. Anim. Sci.* – 2012. – Vol. 82 (4). – P. 351-354.
6. Nurushev M.Z., Kerimbay N.N., Baytanayev O.A., Kerimbay B.N. Actual problems of preservation of the saiga (*saiga tatarica* L.) in Kazakhstan // *International journal of pure and applied zoology.* – 2019. – Vol.4.2. – P.246-254.
7. Rajeev-Gautam, Dutta T.K., Kumar A.A., Shivachandra S.B. Molecular typing of Indian isolates of *P. multocida* serogroup-A from different animal species // *Indian J. Anim. Sci.* – 2006. – Vol. 76 (11). – P. 867-872.
8. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* – 1999. – Vol. 41. – P. 95-98.
9. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
10. *Calculator for determining the number of copies of a template.* Available at: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.
11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.
12. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 13. – P. 134.
13. Domingues L. *PCR: Methods and Protocols.* Methods in Molecular Biology. – Springer-Verlag, New York, 2017. – 213 p.
14. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. – New York, Springer, 2005. – Vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria).
15. Sachse K., Frey J. *PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols.* Methods in Molecular Biology. – Totowa, NJ, © Humana Press Inc. – Vol. 216.
16. Pomp D., Medrano J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction // *BioTechniques* – 1991. – Vol. 10. – P. 58-59.
17. Newton C.R., Graham A. *PCR.* Bios Scientific Publishers. – Oxford, England, 1994.
18. Susan Frackman, Gary Kobs, Dan Simpson, Doug Storts Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR *Promega Notes* Number 65. – 1998. – P. 27.
19. Шевцов А.Б., Каиржанова А.Д., Абишева Г.Д., Шевцова Е.С., Камалова Д.К., Джайлбекова А.С., Карибаев Т.Б., Сытник И.И., Ахметова А.Е., Муқанов К.К. Разработка ПЦР-теста для видовой идентификации *S. coli*, *S. jejuni*, *S. fetus* // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* – 2014. – №3. – P. 59-65.
20. Kenneth H. Roux Optimization and Troubleshooting in PCR // *PCR Methods and Applications.* – S186. – Manual Supplement.
21. Breslauer K.J., Franks R., Blockers H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – June 1986. – Vol. 83. – P. 3746-3750.
22. Kamp E.M., Gertie C.A., Bokken M., Thea M.M. Vermeulen, Marten F. de Jong, Herma E., Buys C.M., Reek F.H., Smits M.A. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs // *J Vet Diagn Invest.* – 1996. – Vol. 8. – P. 304-309.
23. Lichtensteiger C.A., Steenbergen S.M., Lee R.M., Polson D.D., Vimr E.R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida* // *J Clin Microbiol.* – Dec. 1996. – Vol. 34(12). – P. 3035-3039.
24. Methodical recommendation. Available at: http://www.pcrmax.com/media/handbooks/p_multocida.pdf.

REFERENCES

1. Schildkraut C., Lifson S. Dependence of the Melting Temperature of DNA on Salt Concentration. *Biopolymers.*, 1965, vol. 3, pp. 195-208.

2. Freier S.M., Kierzek R., Jaeger J.A., Sugimoto N., Caruthers M.H., Neilson T., Turner D.H. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, pp. 9373-9377.
3. Cobb B.D., Clarkson J.M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, no. 18, pp. 3801-3805.
4. Box G.E.P., W.G. Hunter and J.S. Hunter. Statistics for Experimenters. *John Wiley & Sons*, 1978.
5. Prabhakar P., Thangavelu A., Prabhakar T.G., Kirubakaran J.J., Chandran N.D.J. Rapid virulence typing of *P. multocida* in sheep isolates of Tamil Nadu. *Indian J. Anim. Sci.*, 2012, vol. 82 (4), pp. 351-354.
6. Nurushev M.Z., Kerimbay N.N., Baytanayev O.A., Kerimbay B.N. Actual problems of preservation of the saiga (saiga tatarica L.) in Kazakhstan. *International journal of pure and applied zoology*, 2019, vol. 4.2, pp.246-254.
7. Rajeev-Gautam, Dutta T.K., Kumar A.A., Shivachandra S.B. Molecular typing of Indian isolates of *P. multocida* serogroup-A from different animal species. *Indian J. Anim. Sci.*, 2006, vol. 76 (11), pp. 867-872.
8. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 1999, vol. 41, pp. 95-98.
9. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
10. Calculator for determining the number of copies of a template. Available at: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.
11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, pp. 2731-2739.
12. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S. Madden T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012, vol. 13, pp. 134.
13. Domingues L. *PCR: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology (Springer-Verlag, New York), 2017, 213 p.
14. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. New York, Springer, 2005, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria).
15. Sachse K., Frey J. *PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, © Humana Press Inc., vol. 216.
16. Pomp D., Medrano J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 1991, vol. 10, pp. 58-59.
17. Newton C.R., Graham A. *PCR*. Bios Scientific Publishers, Oxford, England, 1994.
18. Susan Frackman, Gary Kobs, Dan Simpson, Doug Storts Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR *Promega Notes* Number 65, 1998, pp. 27.
19. Shevtsov A.B., Kairzhanova A.D., Abisheva G.D., Shevtsova E.S., Kamalova D.K., Dzhaibekova A.S., Karibaev T.B., Sytnik I.I., Ahmetova A.E., Mukanov K.K. Development PCR test for specific identification *C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetus* *Eurasian. Journal of Applied Biotechnology*, 2014, no. 3, pp. 59-65. doi: 10.11134/btp.2.2014.8.
20. Kenneth H. Roux Optimization and Troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications*, S186, Manual Supplement.
21. Breslauer K.J., Franks R., Blockers H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, June 1986, vol. 83, pp. 3746-3750.
22. Kamp E.M., Gertie C.A., Bokken M., Thea M.M. Vermeulen, Marten F. de Jong, Herma E., Buys C.M., Reek F.H., Smits M.A. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J Vet Diagn Invest.*, 1996, vol. 8, pp. 304-309.
23. Lichtensteiger C.A., Steenberg S.M., Lee R.M., Polson D.D., Vimr E.R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol.*, Dec. 1996, vol. 34(12), pp. 3035-3039.
24. Methodical recommendation. Available at: http://www.pcrmax.com/media/handbooks/p_multocida.pdf.

МИКРОАҒЗАЛАРДЫ АНЫҚТАУҒА АРНАЛҒАН ПТР ХАТТАМАСЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ АЛГОРИТІМІ МЫСАЛЫ, *Pasteurella multocida*

Амиргазин А.О.¹, Шведюк В.Б.¹, Куйбагаров М.А.¹, Карибаев Т.Б.², Шевцов А.Б.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

²Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық

Абайдың 150-жылдығына көшесі, 22/3 үй, Астана, 010000, Қазақстан

ТҮЙІН

Полимеразды тізбектік реакция молекулалық биологиядағы көп функциялы құрал болып табылады. ПТР-ның көптеген түрлендіруі нақты мақсат үшін оңтайландырылған және қажетті тиімділік, ерекшелік пен сезімталдылыққа қол жеткізуге ұмтылады. Жалпы «классикалық» принципке қарамастан, зерттеуші қажет болған жағдайда басшылыққа алатын ПТР қолданудың алуан түрлілігін есепке алатын бірыңғай оңтайландыру схемасы жоқ. Оның орнына зерттеушіде бұрын жарияланған авторлардың өздері ұсынған ПТР оңтайландыру схемасы бар.

Осы мақалада, өзіміз бірнеше рет пайдаланған және қажетті ерекшелік мен сезімталдыққа қол жеткізуге мүмкіндік беретін, микроорганизмдерді анықтауға арналаған ПТР хаттамасын оңтайландыру алгоритмі мысалы, *Pasteurella multocida* сипатталады.

Біздің схема ең бастысы басқалардан, әзірленген хаттаманың ерекшелігін танудың индуктивті әдісін қолдану арқылы, оңтайландыру кезінде амплификацияны бақылау үшін SYBRGreenI қолдану арқылы нақты уақыт тәртібіндегі ПТР пайдалануымен, сондай-ақ, зерттеушілердің кең ауқымында қолданылатын диагностикалық ПТР әзірлеу мен оңтайландырудағы қарапайымдылық пен қол жетімділігімен ерекшеленеді.

Нәтижесінде, бактериялардың 92 түрін және эукариотикалық ағзалардың 3 түрін қамтитын және геномдық эквивалентінде кемінде 5 көшірмесі бар сезімталдылыққа ие *Pasteurella multocida* ДНҚ үлгілерінің коллекциясына тестіленген екі жұп праймер үшін ПТР жағдайлары оңтайландырылды.

Негізгі сөздер: ПТР, оңтайландыру, *Pasteurella multocida*.