

УДК 602.3:579.6

## РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДБОРА И АПРОБАЦИИ ПРАЙМЕРОВ НА ОСНОВЕ ГЕНА 16S РРНК ДЛЯ БАКТЕРИЙ «ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS*»

Кондрашин И.А., магистрант, Феоктисова Н.А., доцент,  
Мерчина С.В., доцент, Евина Д.А., студент, Сулейманова М.И., студент,  
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru  
Научный руководитель - проф. Васильев Д.А.  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия

**Ключевые слова:** *Bacillus cereus*, праймеры, группа, олигонуклеотиды, идентификация

В работе представлены результаты исследований по подбору специфических праймеров на основе гена 16S рРНК для бактерий «группы *Bacillus cereus*». Установлены олигонуклеотиды, способные специфически связываться со всеми представителями «группы *Bacillus cereus*» - GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGGACTACCA.

**Введение.** «Группа *Bacillus cereus*» включает бактерии следующих видов: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus weihenstephanensis*). По литературным данным представители рода *Bacillus*, за исключением *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*, в норме не оказывают патогенного действия, но при ослаблении защитных сил макроорганизма могут вызывать острый, клинически выраженный патологический процесс у человека, животных и рыб [1-4].

**Цель работы** - подобрать специфические для бактерий «группы *Bacillus cereus*» праймеры на основе гена 16S рРНК.

**Материалы и методика исследований.** В строго контролируемых экспериментах использовали чистые штаммы культур бактерий, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ: *Bacillus anthracis* СТИ-1, 55-ВНИИВВиМ, Шуя-15, Sterne 34 F2, 1007, 1190R, 104; 94; Ichtiman, «Девис», М-71; *Bacillus mycoides* - 12 штаммов, *Bacillus cereus* – 106 штаммов; *Bacillus thuringiensis* – 3 штамма; *Bacillus subtilis* – 16 штаммов, *Bacillus megaterium* – 6 штаммов, *Bacillus pumilus* – 18 штаммов, *Bacillus coagulans* – 5 штаммов, *Paenibacillus polymixa* – 2 штамма, *Paenibacillus larvae* – 2 штамма, *Listeria monocytogenes* – 3 штамма. Бактериальные культуры хранились в столбике 0,7 % мясо-пептонного агара, засеянного уколом, при температуре 2-4 °С.

Для подбора и оптимизации праймеров, специфичных в отношении изучаемых бактерий и бактериофагов, были использованы ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Синтез праймеров и зондов осуществлялся методом

химического концентрирования на приборе ASM-800 (фирма «Биоссет», г. Новосибирск) с использованием реагентов: мономеров (dA-CE фосфорамидид, dC(Bz) CE фосфорамидид, dG-CE фосфорамидид, dT-CE фосфорамидид), активатор 5- Ethylthio-1H-Tetrazole, полимеры CPG, колонки 100nmol/ 12 ul (dA, dC, dG, T). Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов EX 511 «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол», г. Москва), для постановки ПЦР применяли набор реагентов R-412 «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ», имеющий состав дезоксирибонуклеотидтрифосфаты - 2,5 мМ, 10-кратный ПЦР буфер, MgCl<sub>2</sub> – 25 мМ, Taq ДНК-полимераза с ингибирующей активностью фермента антителами-5 Е/мкл (ООО «Синтол», г. Москва).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Сравнение и разработка системы индикации, специфичной для представителей «группы *Bacillus cereus*», были проведены с использованием данных геномов, доступных для изучения в системе NCBI. Первоначально была определена позиция и полный нуклеотидный состав гена 16S ribosomal «группы *Bacillus cereus*». Далее с использованием ресурсов NCBI Blast nucleotide было проведено прямое сравнение исследуемого гена у всех доступных для изучения штаммов к «группе *Bacillus cereus*». В итоге проведенного сравнения были получены данные о 99% совпадении нуклеотидного состава исследуемого гена у всех, доступных для исследования, штаммов «группы *Bacillus cereus*».

Затем с помощью ПО UGENE было проведено множественное выравнивание гена 16S ribosomal для выявления консервативных участков, которые могут быть использованы при дизайне праймеров при индикации бактерий «группы *Bacillus cereus*». После определения консервативных регионов для данных фрагментов были определены олигонуклеотиды, способные специфически связываться с представителями всей «группы *Bacillus cereus*» (рисунок 1). В результате ряда проведенных экспериментов по оптимизации были определены параметры постановки полимеразно-цепной реакции, при которой наблюдается амплификация максимального количества специфического продукта реакции: температура отжига праймеров – 60°C, а их количество – по 8 пмоль/реакцию.

При использовании 15 референс и 117 выделенных из окружающей среды штаммов исследуемой «группы *Bacillus cereus*» была проведена валидация ПЦР.

**Заключение.** В результате проведенных исследований были подобраны специфические праймеры на основе гена 16S rPHK для бактерий «группы *Bacillus cereus*» GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGGACTACCA. Установлена принадлежность вышеназванных штаммов бактерий к «группе *Bacillus cereus*». Первичная дифференциация представителей рода *Bacillus*, проведенная в течение 2,5 - 3,0 часов, позволит исследователям разработать оптимальный алгоритм действий для дальнейшей идентификации, так как методика

PrimerID	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Primer_Quality(%)	Fragment_Size (bp)/Tm(°C)	Topt (°C)
1F26_1_366-389	agtaggaatctccgcaatggac	58,3	95	806/85	65
1R37_1_1149-1171	cagtcacctagatgcccact	58,0	90		
1F26_1_366-389	agtagggaatctccgcaatggac	58,3	95	283/84	64
1R82_1_628-648	aatgacctccacggtgac	58,8	90		
1F26_1_366-389	agtaggaatctccgcaatggac	58,3	95	1013/86	65
1R13_1_1357-1378	ggcatcgatcccggtattact	59,5	90		
1F26_1_366-389	agtagggaatctccgcaatggac	58,3	95	148/80	63
1R93_1_490-513	ggctttctggttaggtaccgtcaa	58,4	89		
1F20_1_278-298	tcaccaaggcaacgatcgcta	58,5	91	122/83	63
1R103_1_377-399	tcagaattctccattgaggaa	58,3	93		
1F26_1_366-389	agtagggaatctccgcaatggac	58,3	95	212/82	63
1R87_1_553-577	caatactccggataaacgcttgcca	58,0	88		
1F39_1_476-497	aataagctggcaccttgacggt	58,2	93	173/82	63
1R82_1_628-648	aatgacctccacggtgac	58,8	90		
<b>1F37_1_538-557</b>	<b>GGCTAATACCTAGTGGCA</b>	<b>59,9</b>	<b>93</b>	<b>291/85</b>	<b>60</b>
<b>1R37_1_809-828</b>	<b>GTTTACGGCGTGCATACCA</b>	<b>60,0</b>	<b>90</b>		
1F39_1_476-497	aataagctggcaccttgacggt	58,2	93	903/86	65
1R13_1_1357-1378	ggcatcgatcccggtattact	59,5	90		
1F37_1_466-489	gtgctagttagaataagctggcacc	58,4	93	183/83	64
1R82_1_628-648	aatgacctccacggtgac	58,8	90		

**Рисунок 1 - Варианты праймерных систем для амплификации фрагмента гена 16S ribosomal *Vacillus cereus* group**  
(красным выделена пара олигонуклеотидов, которая была использована в дальнейших исследованиях)

бактериологического типирования опирается на схему идентификации представителей первой морфологической группы по R. Gordon (1973) («Ключ для определения типичных штаммов видов рода *Bacillus*»), которая до настоящего времени является основой видовой идентификации вышеназванных микроорганизмов, описанной в «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2015) [5-6].

*Библиографический список:*

1. Cerif, A. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A.A. Pizzi [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – vol.69. - №1. – P. 33-40.
2. Еременко, Е.И. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл / Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, А.Г. Рязанова А.Г. [и др.] // Журн. гиг., эпид., микробиол. и иммунолог. - 2009. - № 3. - С. 76–80.
3. Daffonchio D. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera / Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A. [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 2003; 69. – P. 5128-5137.
4. Васильев Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – С. 24.
5. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / William B. Whitman, Paul DeVos, Jonsik Chun, Sveltlana Dedysh, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred Rainey, Martha Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530>. – дата обращения 12.07.2018.
6. Феоктистова, Н.А. Бактериофаги рода *Bacillus*: биология и практическое применение / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: 2017. – 112с.

## RESULTS OF SELECTION AND APPROBATION OF PRIMERS ON THE BASIS OF THE GENE 16S RRNK FOR BACTERIA OF “*BACILLUS CEREUS* GROUP”

**Kondrashin I.A., Feoktistova N.A., Merchina S.V., Evina D.A., Suleymanova M.I.**

**Keywords:** *Bacillus cereus*, primers, group, oligonukleotida, identification.

*In work results of researches on selection of specific primers on the basis of a gene 16S of RRNK for bacteria of “Bacillus cereus group” are presented. The oligonukleotida capable to contact specifically all representatives of “Bacillus cereus group” - GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGACTACCA are established.*