

УДК 619:579.25

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS*

Васильев Дмитрий Аркадьевич, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»
ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина»

Семёнов Александр Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Мастиленко Андрей Владимирович, научный сотрудник НИИЦМиБ.

Карамышева Наталья Николаевна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Золотухин Сергей Николаевич, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина»

432063, г.Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1.

Email: Natali – kar@inbox.ru

Ключевые слова: *Desulfovibrio desulfuricans*, ПЦР, праймеры, хромосомная ДНК, липополисахарид, ген.

Проведение ПЦР позволяет судить о наличии специфических участков гена для идентификации *Desulfovibrio desulfuricans*.

Введение

Особое внимание к бактериям *Desulfovibrio desulfuricans* стали проявлять только в последнее время, в связи с более детальным изучением их роли в процессах биоминерализации, деструктуризации нефти и биокоррозии металлов. Наличие необходимого комплекса тестов по выявлению ферментативных систем данных микроорганизмов позволяет отнести этот облигатный анаэробный микроорганизм к сульфатредуцирующим бактериям. Выделение и идентификация названных микроорганизмов по ферментативным тестам имеет ряд

сложностей и длится от 4 до 7 суток. Наличие солей железа и сульфатов в среде для культивирования *Desulfovibrio desulfuricans* приводит к почернению последней, что в свою очередь затрудняет учет результатов биохимических тестов. Кроме того, многие культуры *Desulfovibrio desulfuricans* имеют в составе ферментов деструкторы фенола и ароматических соединений, которые показывают схожие результаты биохимических тестов с другими группами микроорганизмов (например, анаэробной серопурпурной бактерии рода *Chromatium* (Lindstrom) 1972 г.). Одним из точных и чувствительных ме-

тодов идентификации микроорганизмов является молекулярно-генетический метод – ПЦР, который позволяет проводить идентификацию полученных культур в течение 3 часов. Исходя из выше изложенного, была поставлена цель: разработать оптимальные параметры проведения ПЦР для идентификации *Desulfovibrio desulfuricans*.

Для этого нам необходимо было решить следующие задачи:

- 1) провести подбор праймеров для идентификации *Desulfovibrio desulfuricans*;
- 2) определить оптимальные концентрации праймеров для проведения ПЦР;
- 3) оптимизировать протокол проведения ПЦР (температура отжига, количество циклов) при использовании данной системы праймеров.

Материалы и методы

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *Desulfovibrio desulfuricans* были использованы ресурсы базы данных GeneBank. Поиск уникальных последовательностей специфического гена проводили с использованием приложения GeneBank – on-line Blast nucleotides.

Подбор праймеров проводили с помощью программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

Для проведения амплификации были использованы амплификатор «Терцик» производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва) и стандартизированная реакционная смесь при проведении ПЦР в режиме реального времени с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активностью антителами производства ООО «Синтол» (г. Москва). Для выделения ДНК применяли реактивы «Проба ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва). Проведение подтверждающей

детекции продуктов амплификации осуществляли с помощью коммерческих наборов, содержащих готовые 2,3% агарозные гели с сухой навеской буферной смеси для проведения электрофореза производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва).

Апробацию предложенной методики проводили с использованием штаммов *Desulfovibrio desulfuricans* музея НИИЦМБ Ульяновской УГСХА.

Результаты исследований

Праймеры для ПЦР были синтезированы на базе ООО «Синтол» (г.Москва). После ряда проведенных анализов программами Gene Runner v.3.05 и Primer-Blast (в режиме on-line) были определены праймеры, фланкирующие участок размером 224 пар нуклеотидов (п.н.) (см. табл. 1).

Штаммы *Desulfovibrio desulfuricans* культивировали в пробирках, которые доверху заполняли средой Старки. Кислотность среды доводили до pH 7,5, нейтрализуя 5%-ным раствором соляной кислоты или углекислого натрия. Среда имела низкий окислительно-восстановительный потенциал, который в самом начале культивирования создавали добавлением восстановителя, сульфида натрия, в концентрации 1 мМ. Именно при таком потенциале создаются наилучшие условия для роста культуры, так как полностью имитируются облигатно-анаэробные условия развития бактерии в естественных условиях.

Изолированные колонии помещали в 0,5 мл стерильного 0,9% NaCl и использовали их для выделения нуклеиновых кислот.

Экстракцию ДНК проводили с использованием коммерческого набора «Проба ГС» с сорбентной технологией очистки в соответствии с инструкцией к набору.

Таблица 1.

Праймеры для участка гена липополисахарида

	Последовательность (5'→3')	Длина, пар оснований	Tm	GC%
Прямой праймер - LipF Обратный праймер – LipR Размер продукта амплификации	CCCGTAACGGCCTGCAGGTT	20	59.34	65.00%
	CAGGGGCATGACCGTACGCG	20	60.18	70.00%
	224 пар оснований			

Принцип, лежащий в основе этого метода, заключается в обратимой сорбции на носителе – силикогеле свободной ДНК из раствора после проведения предварительного лизиса бактериальных клеток. Для этого бактериальную культуру, рассуспендированную в растворе 0,9% стерильного NaCl, подвергали лизису с использованием лизирующего раствора. После инкубации при 65°C в течение 15 минут в пробы вносили сорбент в количестве 20 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут с постоянным встряхиванием пробирок на вортексе. После сорбции на носителе ДНК пробы центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 1 минуты. Затем проводили 3-х кратную отмывку носителя ДНК с помощью изопропилового спирта и ацетона. После удаления остатков лизирующего раствора и воды носитель с сорбированной ДНК высушивали в течение 5-10 минут при 65°C с открытыми крышками пробирок. После визуального контроля отсутствия влаги к осадку (сорбенту) добавляли элюирующий раствор, с помощью которого ДНК снимается с носителя и остается в растворе. После осаждения сорбента при 13 000 об/мин в течение 1 минуты получали надосадочный раствор, содержащий ДНК без посторонних примесей. ДНК, выделенная данным методом, может быть сохранена при минус 20°C в течение 6 месяцев.

Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции содержала: 125мкМ dNTP, 1,25u Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25мМ MgCl₂, а также 10хПЦР-буфер. Объем реакционной смеси составил 25 мкл, а объем пробы ДНК, вносимой в реакционную смесь, - 5 мкл.

Так как программа **Primer Blast** определила температуру плавления праймеров около 60°C, то для экспериментального

- | | |
|---------------------|------------|
| 1) 95°C – 5 минут | 1 цикл |
| 2) 95°C – 10 сек | } 5 циклов |
| (57-70)°C – 10 сек | |

ряда оптимизации температуры отжига мы использовали: 57°C, 60°C, 63°C, 65°C и 70°C. Нами был использован классический режим ПЦР без посадочных циклов:

После проведенной детекции полученных ампликонов с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле мы обнаружили, что в пробах, содержащих ДНК *Desulfovibrio desulfuricans*, наблюдается наличие до 10 полос, отличающихся по количеству нуклеотидных оснований (от 150 п.н. до 1000 п.н.), что свидетельствует о неспецифическом отжиге праймеров на матрице ДНК (рис.1).

Наличие специфической полосы, раз-

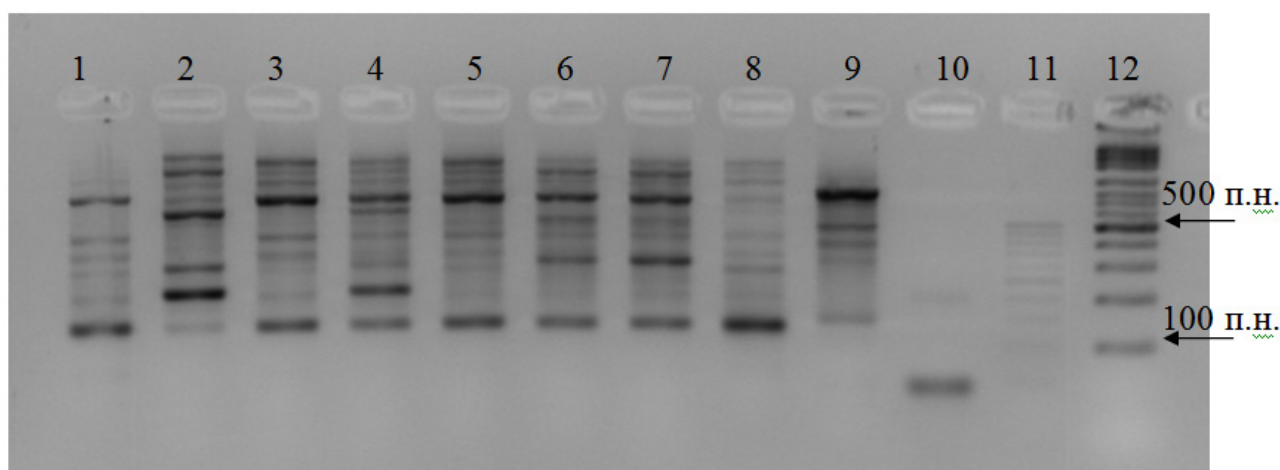


Рис. 1 - Электрофореграмма продуктов амплификации (57°C) с системой праймеров LipF/LipR к участку гена липополисахарида *Desulfovibrio desulfuricans*. 1-9 штаммы *Desulfovibrio desulfuricans*, 10- отрицательный контроль, 11- маркер молекулярного веса 50-500 п.н., 12- маркер молекулярного веса М (100-3000 п.н.).

мером 224 п.н., соответствующей расчетным величинам приложения Primer Blast базы данных GeneBank, наблюдается только у 2 штаммов *Desulfovibrio desulfuricans* (2 и 4 дорожки на электрофореграмме).

Таким образом, при использовании классического протокола ПЦР с разными температурами (57° - 70° C) мы не добились специфического отжига данных праймеров.

В последующих исследованиях мы использовали протокол проведения ПЦР с дополнительными посадочными циклами. Суть его состоит в том, что на первых 5-10 циклах происходит преимущественный специфический отжиг на матрице ДНК, после этого температура отжига повышается на 3-5°С и дальнейший отжиг на неспецифических фрагментах затруднен (рис.2-3).

После ряда экспериментов по оптимизации температурного режима специфического отжига праймеров и подбора концентраций их концентраций были определены следующие параметры проведения ПЦР:

концентрация каждого праймера - 5 pmol / реакцию (25 мкл);

- реж
- | | |
|--------------------|-------------|
| 1) 95° C – 5 минут | 1 цикл |
| 2) 95° C – 10 сек | } 5 циклов |
| 60° C – 10 сек | |
| 3) 95° C – 5 сек | } 40 циклов |
| 65° C – 15 сек | |

Расчетная величина размера ампликона (224 п.н.) наблюдалась только у штаммов

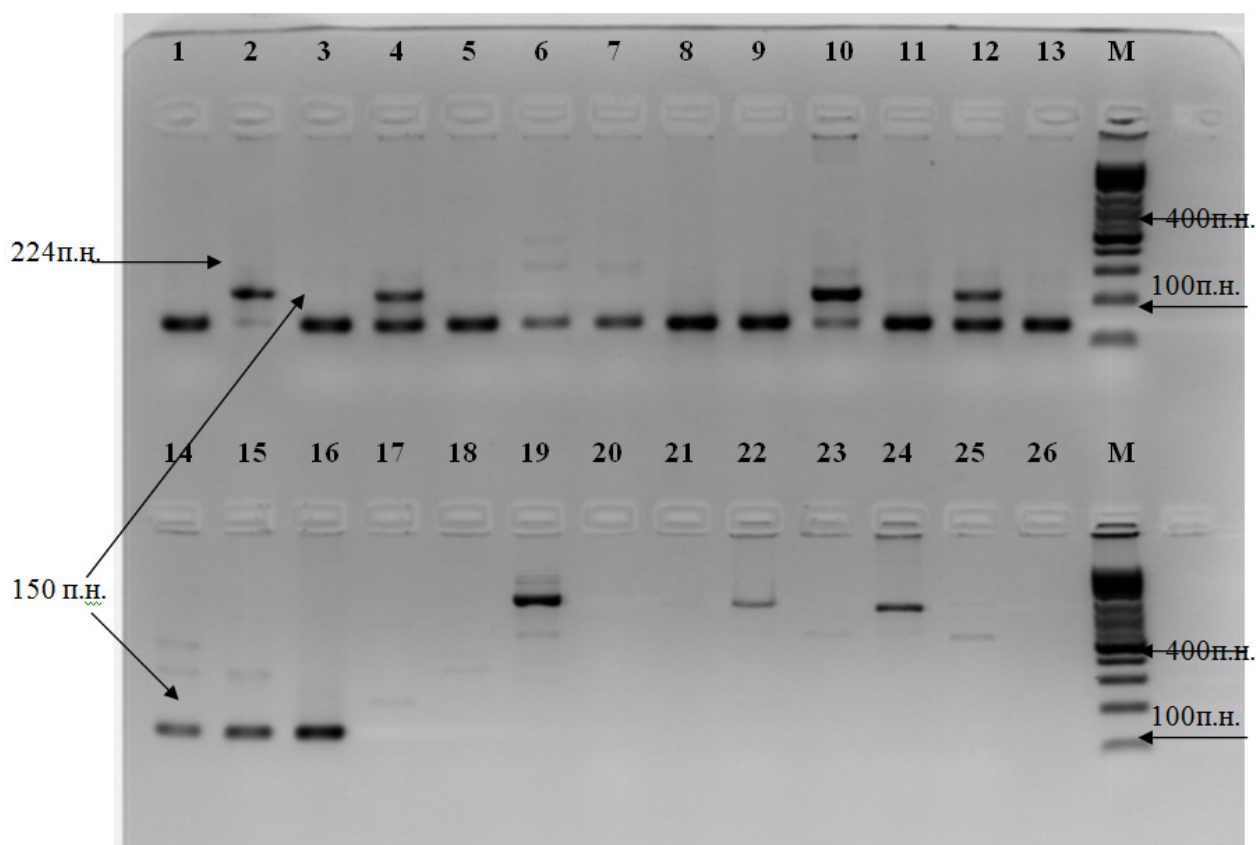


Рис. 2 - Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена липополисахарида *Desulfovibrio desulfuricans*. М-маркер молекулярного веса (100-3000 п.н.), 1- *D. desulfuricans* 1a, 2- *D. desulfuricans* Ca, 3- *D. desulfuricans* 1a, 4- *D. desulfuricans* 3/1a, 5- *D. desulfuricans* 2/P2a, 6- *D. desulfuricans* P3a, 7- *D. desulfuricans* 4/P4a, 8- *D. Desulfuricans* 0a, 9- *D. desulfuricans* 0b, 10- *D. desulfuricans* Cb, 11- *D. desulfuricans* 1b, 12- *D. desulfuricans* 3/1b, 13- *D. desulfuricans* 2/P2b, 14- *D. desulfuricans* P3b, 15- *D. desulfuricans* 4/P4b, 16- *D. Desulfuricans* 0c, 17- *E. faecium*, 18- *K. Pneumonia*, 19- *Clostridium* spp., 20- отрицательный контроль, 21- *Lactobacillus* spp., 22- *Enterobacter* spp., 23- *Gardnerella vaginalis*, 24- *Mycoplasma hominis*, 25- *S. aureus*, 26- *S. agalactiae*.

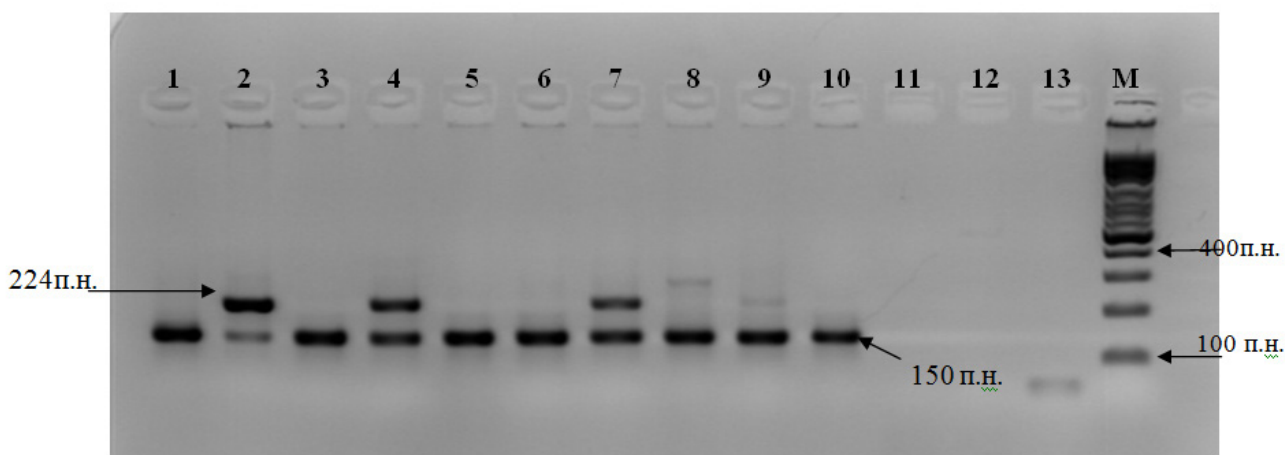


Рис. 3 - Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена липополисахарида *Desulfovibrio desulfuricans*. М-маркер молекулярного веса (100-3000 п.н.), 1- *D. desulfuricans* 1a, 2- *D. desulfuricans* Ca, 3- *D. desulfuricans* Ia, 4- *D. desulfuricans* 3/1a, 5- *D. desulfuricans* 2/P2a, 6- *D. desulfuricans* P3a, 7- *D. desulfuricans* Cb, 8- *D. desulfuricans* Ib, 9- *D. desulfuricans* 3/1b, 10- *D. desulfuricans* 2/P2b, 11- *K. Pneumonia*, 12- *Clostridium* spp., 13- отрицательный контроль.

D. desulfuricans Ca, 4- *D. desulfuricans* 3/1a, *D. desulfuricans* Cb и *D. desulfuricans* 3/1b. У остальных штаммов *Desulfovibrio desulfuricans* присутствовали специфические амплификаты размером 150 п.н. Однако стоит заметить, что остальные виды использованных бактериальных культур таких полос не образуют. Вероятно, наличие специфической полосы размером 224 п.н. имеют штаммы, сходные со штаммом *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774, единственный полный геном которого представлен в базе данных GeneBank. Наличие специфической полосы размером 150 п.н. наблюдается у всех штаммов *Desulfovibrio desulfuricans*, что может быть использовано при индикации и идентификации бактерий данного вида.

Выводы

1. В результате проведенной нами работы были определены специфичные праймеры, фланкирующие участок гена липополисахарида *Desulfovibrio desulfuricans* размером около 150 п.н (224 п.н. для штаммов, сходных с *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774)

2. Подобран оптимальный режим проведения ПЦР: 1) 95°C-5мин- 1 цикл, 2) 95°C-10сек, 60°C-10сек - 5 циклов, 3) 95°C-5сек,

65°C-15сек - 40 циклов.

3. Определена оптимальная концентрация праймеров LipF и LipR для участка гена липополисахарида *Desulfovibrio desulfuricans* по 5 pmol/ реакцию (25 мкл) при условии использования реакционной смеси, содержащей компоненты в концентрациях: 125мкМ dNTP, 1,25u Taq-ДНК-полимеразы с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25мМ MgCl₂, а также 10хПЦР-буфер.

Библиографический список

1.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.

2.Васильев, Д.А., Карамышева Н.Н., Шестаков А.Г. Изучение микробной контаминации пластовых жидкостей, образующихся при нефтедобыче. Отчет. Ульяновск, 2010.

3.Васильев, Д.А. Разработка методики выявления специфического участка ДНК в режиме «реального времени» /Д.А.Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Никульшина // Современный мир, природа и человек: Сборник научных трудов. – Томск, 2009. – С.115-117.