

**М.И. Богданова, В.М. Матвеева, В.М. Строчков, Г.Д. Сугирбаева, Ж.К. Кошематов,  
Н.Т.Сандыбаев, С.Ш. Нурабаев, А.С.Нурпейсова**

<sup>1</sup>*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности  
РГП НИИПББ КН МОН РК. Жамбылская обл., Кордайский р-н, пгт Гвардейский*  
<sup>2</sup>*Казахский Национальный Аграрный Университет, г. Алматы*

## ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ BRUCELLA ABORTUS

**Аннотация.** С помощью программы Primer-BLAST подобраны три пары праймеров для оптимизации постановки ПЦР по идентификации *Brucella abortus*. В процессе выравнивания с помощью программы BLAST выбрана пара видоспецифичных праймеров BrAf1 BrAg1, которая ограничивала участок ДНК размером 305 п.н, так как эта пара праймеров показала более чувствительные результаты в ПЦР. На основе данных праймеров оптимизированы условия постановки ПЦР для дифференциальной диагностики возбудителя бруцеллеза вида *Brucella abortus*.

*Ключевые слова:* ПЦР, ДНК, бруцеллез, проба, амплификатор.

### **Введение**

Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Казахстане на протяжении последних лет остается сложной. Бруцеллез широко распространенная инфекция и является основной причиной значительных экономических потерь в животноводческой отрасли сельского хозяйства, что усугубляется заболеванием людей, которое нередко приводит к потере трудоспособности и инвалидности. Одним из основных направлений в борьбе с бруцеллезом является его своевременная и эффективная лабораторная диагностика. Современная лабораторная диагностика бруцеллеза основана на бактериологическом, биологическом, серологическом и аллергическом методах. Бактериологический и биологический методы являются наиболее достоверными при выяснении этиологии и путей передачи инфекции, однако, они небезопасны для персонала лабораторий, требуют затрат значительного количества труда и времени. Срок бактериологического исследования составляет 15-30 сут., а при постановке биологической пробы он увеличивается вдвое [1, 2]. Серологические тесты обладают недостаточной специфичностью, вследствие структурной общности антигенов бруцелл и ряда других грамотрицательных микроорганизмов [3, 4]. Иммунохимические методы обнаружения антигенов бруцелл обеспечивают также невысокий уровень чувствительности — 104—105 м. к./мл и более [5]. Исходя из вышеизложенного, становится очевидной разработка новых методических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза, которые превосходили бы существующие методы по чувствительности, специфичности и скорости выполнения. Таким требованиям наиболее полно соответствует метод молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время использование метода ПЦР является наиболее эффективным средством инфекционного контроля, поскольку позволяет обнаруживать единичные клетки инфекционных агентов посредством заданного ферментативного увеличения специфичного участка генома микроорганизмов, что делает возможным исследование образцов разнообразного диагностического материала в короткий промежуток времени (4-6 часов) [6,7]. Метод позволяет не только идентифицировать возбудитель, но и дифференцировать, определять его происхождение и пути распространения. Опубликованы методы, позволяющие при

помощи ПЦР идентифицировать некоторые биовары вида *B. abortus* [8], отличать S19 и RB51 штаммы *B. abortus*, используемые для вакцинации, от патогенных штаммов [9, 10].

Цельданного исследования - подбор специфических праймеров и оптимизация метода ПЦР для дифференциации *Brucellaabortus*.

#### **Материалы и методы**

В эксперименте использовали агаровые культуры штаммов рода *Brucella*: *B. abortus*-19, 544; *B. melitensis*-16M; *B. ovis*- 63/290; *B. canis*- 1066; *B. suis*- 1330.

В качестве контрольных штаммов при постановке ПЦР использовали *E. coli*: BL-21.

*Выделение ДНК бруцелл для проведения ПЦР-анализа.* Выделение ДНК проводили с использованием набора «QIAamp® Viral DNA Mini and Blood Mini Handbook» в соответствии с наставлением по применению данного набора.

*Поиск полных нуклеотидных последовательностей отдельных генов возбудителя Brucellaabortus.* Поиск нуклеотидных последовательностей генов возбудителя *Brucellaabortus*S19 проводили в международной базе данных GenBank. Анализ и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием комплекта программ BioEdit и BLAST.

*Подбор праймеров.* Специфические олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения возбудителя *B. abortus* с помощью ПЦР, подбирали с помощью программы Oligo7. Праймеры подбирают, оперируя следующими параметрами: длина праймеров 17-28 н.; процентное содержание G+C пар – 40-60; избегать залипания праймеров самого на себя; образования димеров; температура плавления в пределах 52-58 °С.

*Синтез олигонуклеотидов.* Компьютерно-моделированные последовательности праймеров синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов «Expedite 8909» фирмы «Applied Biosystems».

*Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК.* Электрофорез продуктов амплификации ДНК *B. abortus* проводили в аппарате для горизонтального электрофореза G-100 фирмы Pharmacia, при напряжении 8 В/см. Для электрофореза использовали 1 % агарозу в TBE-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи фотографирования гелей в УФ-свете, в гелъдокументирующей камере XR фирмы BIO-RAD. В качестве маркера молекулярных масс использовали DNAPCRMarker, 50-2,000 bp фирмы Sigma.

*Проведение ПЦР.* Нарработку специфических участков ДНК проводили в термоциклере GeneAmpPCR 9700, Applied Biosystems.

#### **Результаты и обсуждение**

Для разработки любого ПЦР - протокола необходимы знания о нуклеотидных последовательностях (н.п.) изучаемого возбудителя. Анализ и поиск нуклеотидных последовательностей отдельных генов *B. Abortus* проводили в базе данных *GeneBank*. Далее было проведено выравнивание отобранных нуклеотидных последовательностей с целью их последующего анализа на вариабельность и поиска консервативных участков необходимых для выбора праймеров. В качестве идентифицирующего гена был выбран ген VAbS19 P01580, кодирующий белок, отвечающий за трансмембранный перенос. Данный ген имеет размер 5796 п.н. и несет в себе область отсутствующую у других видов *Brucella*. Эта область была использована для подбора праймеров, специфичных для *Brucellaabortus*.

Подбор праймеров проводили с использованием программы Primer-BLAST. В результате были получены 3 пары праймеров. Полученные с помощью программы праймеры, проверяли на специфичность с использованием компьютерной программы BLAST online (рисунок 1).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brucella abortus A13334 chromosome 2, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.083	100%	<a href="#">CP003177.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brucella abortus S19 chromosome 2, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.083	100%	<a href="#">CP000888.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brucella abortus biovar 1 str. 9-941 chromosome II, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.083	100%	<a href="#">AE017224.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brucella melitensis biovar Abortus 2308 chromosome II, complete sequence, strain 230</a>	40.1	40.1	100%	0.083	100%	<a href="#">AM040265.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Salpinx sp. ATCC 50818 hypothetical protein (PTSG_07426) mRNA, complete cds</a>	36.2	36.2	90%	1.3	100%	<a href="#">XM_004990870.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Pundamilia nyererei KH domain-containing, RNA-binding, signal transduc</a>	34.2	34.2	85%	5.1	100%	<a href="#">XR_312044.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Pundamilia nyererei KH domain-containing, RNA-binding, signal transduc</a>	34.2	34.2	85%	5.1	100%	<a href="#">XR_312043.1</a>

### Рисунок 1 – Сравнительный анализ праймеров с помощью программы BLAST

По результатам проверки были выбраны две пары праймеров, которые показали 100% специфичность к *B. abortus* и не было обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями каких-либо других бактерий или эукариот. Характеристика выбранных праймеров представлена в таблице 1.

Таблица 1- Основные характеристики специфических праймеров на гены *B. abortus* S19

	Последовательность	T плавления	GC, %	Размер продукта
BrA-1f	ATCTGAAGCTGGGTCTGGC	60,03	55	305
BrA-1r	CTGGGTGCCGTTCCAGTAAT	60,04	55	
BrA-2f	ATTACTGGAACGGCACCCAG	60,04	55	238
BrA-2r	TAGCCGGTGGTGATGAACTG	59,75	55	

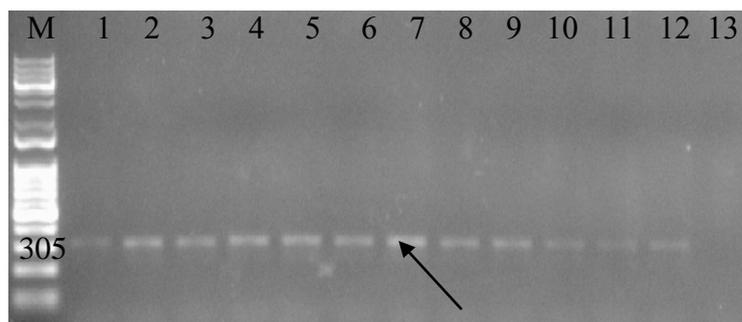
В дальнейших экспериментах из двух пар праймеров была выбрана только одна пара праймеров BrA1f/BrA1r, которая ограничивала участок ДНК размером 305 п.н, так как эта пара праймеров показала более чувствительные результаты в ПЦР.

Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-полимеразы, праймеров, dNTP и ионов Mg) и температурного режима ПЦР.

В наших экспериментах при подборе температурного режима для денатурации использовали стандартные условия – 94<sup>0</sup>С. Выбор такого режима гарантирует денатурацию матричной ДНК на первом шаге. С целью полного расхождения цепей ДНК проводили пре-денатурацию при температуре 94<sup>0</sup>С в течение 5 мин.

Считается, что температура отжига зависит от длины праймера и содержания в нем GC-пар. В наших экспериментах оптимальную температуру отжига определяли на термоциклире TC-512, Techne, используя градиент температур (55±25)<sup>0</sup>С. Полученные пробы анализировали в 1 % агарозном геле, приготовленном на TBE буфере. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что с увеличением температуры отжига повышается выход ПЦР-продукта. При температурах от 55,4 до 63 <sup>0</sup>С ПЦР-продукт нарабатывается в достаточных количествах, отсутствуют шлейфы. В дальнейших наших экспериментах при проведении ПЦР для детекции ДНК *Brucella abortus* использовали температуру отжига 55<sup>0</sup>С.



М – маркер ДНК 1 kb Fermentas, 1- 45,9<sup>0</sup>С, 2-46,3<sup>0</sup>С, 3-47,3<sup>0</sup>С, 4-48,9<sup>0</sup>С, 5-50,9<sup>0</sup>С, 6-53,1<sup>0</sup>С, 7-55,4<sup>0</sup>С, 8-57,6<sup>0</sup>С, 9-59,7<sup>0</sup>С, 10-61,4<sup>0</sup>С, 11-62,5<sup>0</sup>С; 12-63,1;  
13-отрицательный контроль

Рисунок 2 – Электрофореграмма амплифицированной ДНК *Brucella abortus* при различных температурах отжига праймеров

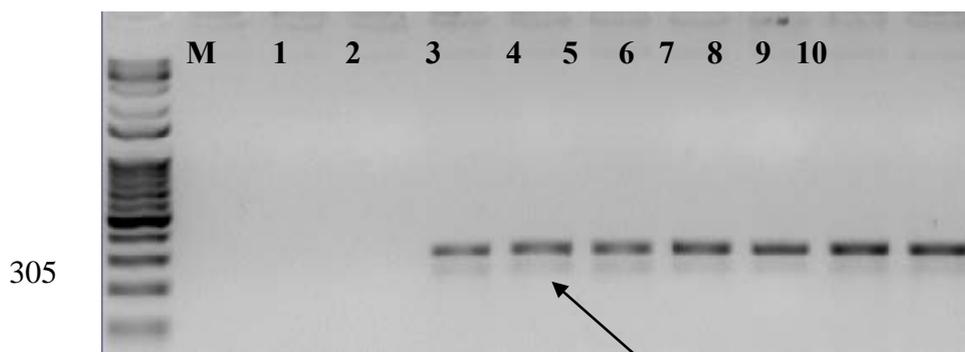
На основании подобранных, в процессе опытов, параметров времени и температур для всех стадий амплификации, был выбран следующий режим проведения ПЦР:

пре-денатурация: 5 мин, 94<sup>0</sup>С  
денатурация: 20 с, 94<sup>0</sup>С  
отжиг: 1 мин, 55<sup>0</sup>С 30 циклов  
синтез: 20 с, 72<sup>0</sup>С  
пост-репликация 5 мин, 72<sup>0</sup>С

После того как были определены оптимальные временные и температурные условия амплификации, проводили эксперименты по оптимизации содержания компонентов в реакционной смеси. Изменения компонентного состава буфера для реакции вызывают качественное или количественное изменение выхода амплификата.

Одним из важных компонентов буфера является хлорид магния, который необходим для поддержания активности Taq-полимеразы. Концентрация MgCl<sub>2</sub> также влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Однако его избыток может вызывать образование неспецифических продуктов. Трис-НСl обеспечивают необходимую ионную силу и рН смеси. Подбор оптимальных концентраций MgCl<sub>2</sub> и рН буфера может способствовать уменьшению выхода неспецифического продукта и увеличению выхода амплификата. Оптимальные концентрации перечисленных выше соединений подбираются эмпирическим путем в процессе оптимизации условий реакции. Результаты этих исследований представлены на рисунке 3.

Из рисунка 3 видно, что изменение концентрации соли в пределах 1,0-5,0 мМ влияет на процесс амплификации при использовании праймеров BrAf1 и BrAr1. Выход специфического ПЦР-продукта был обнаружен при концентрации MgCl<sub>2</sub> начиная с 2,0 и до 5,0 мМ. На основании полученных опытных данных в дальнейших экспериментах при проведении ПЦР, для приготовления реакционных смесей использовали концентрацию соли 2,5 мМ.



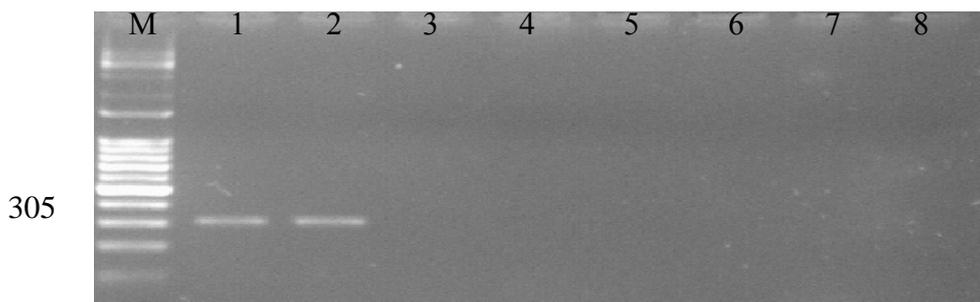
М – маркер ДНК 1kbFermentas; 1- отрицательный контроль; 2 – 1,0 мМ; 3 – 1, 5 мМ; 4 – 2,0 мМ; 5 – 2,5 мМ; 6 – 3,0 мМ; 7 – 3,5 мМ; 8- 4,0 мМ; 9 - 4,5 мМ; 10-5,0 мМ

Рисунок 3- Оптимизация концентрации  $MgCl_2$  в реакционной смеси при обнаружении ДНК *Brucella abortus* методом ПЦР спраймерами BrAf1 и BrAr1.

В результате проведенных нами далее исследований было установлено, что оптимальной концентрацией Taq ДНК-полимеразы является 2 -2,5ед, а лучший результат получен при использовании буферной системы прилагаемой к Taq ДНК полимеразе. При проведении экспериментов была определена также оптимальная концентрация праймеров составившая 0,5 мМ/мкл. Такая концентрация сделала тест-систему максимально чувствительной и одновременно с этим не давала ложно-положительных результатов.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была подобрана оптимальная концентрации реакционной смеси и праймеров для постановки ПЦР следующего состава:(50 мкл) x10 ПЦР буфер (200 мМТрисHCl, pH 8,4, 500 мМКCl) 5 мкл, 0,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$ , 0,5 мкл dNTP (10 мМ), по 0,5 мкл праймеров (20 пмоль каждый), 0,2 ед Taq-полимеразы в конечной концентрации, 2мкл ДНК.

Подобранная пара праймеров была проверена на специфичность обнаружения ДНК *B. abortus* в различных пробах возбудителя *Brucella*. Результаты данных исследований представлены на рисунке 4.



М – маркер ДНК 1kbFermentas, 1- эталонный штамм *B. abortus* 544; 2-вакцинный штамм *B. abortus* 19; 3 – эталонный штамм *B. melitensis* 16-M; 4 – эталонный штамм *B. suis* 1330; 5 - штамм *B. ovis*– 63/290; 6 – эталонный штамм *B. canis* 1066; 7 - штамм *E. coli*: BL-21*E. coli*; 8-вода.

Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов амплификации при определении специфичности праймеров BrAf1иBrAr1

Как видно из рисунка 3 подобранные олигонуклеотидные праймеры BrAf1иBrAr1 показали строгую специфичность к *B. abortus* в ПЦР, так как не давали перекрестных реакций с ДНК других испытанных видов рода *Brucella* (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*) и отрицательными контрольными пробами.

### Заключение

Подобраны видоспецифические к *B. abortus* праймеры BrAf1иBrAr1, на основе нуклеотидной последовательности гена VAbS19 П01580, кодирующего белок, отвечающий за трансмембранный перенос. Для данных праймеров оптимизированы параметры постановки ПЦР, предназначенной для детекции ДНК возбудителя *Brucella abortus*.

## Литература

1. Иванов М.М., Богданова Е.А. Некоторые вопросы диагностики бруцеллеза // Ветеринария. - 1967. - 1. - С. 32-33.
- 2 Скляр О.Д., Климанов А.И., Шумилов К.В. Выделение и идентификация культур *B. Canis* // ФГУ «ВГНКИ»: сб. науч. тр. - М.: ВГНКИ. - 2007. - Т. 68. - С. 125-126.
- 3 Соколова Е. Е. Изучение перекрестных серологических реакций, вызванных *Y. enterocolitica* серовара 09 и бруцеллами: Автореф. дис. канд. мед. наук. Саратов. 1986. – 22 с.
- 4 Нуратинов Р.А., Ургуев К.Р., Юсупов О.Ю., Нажалов М.И. Серологическая диагностика бруцеллеза крупного рогатого скота // Ветеринария. 1993. - № 2. - С. 25-28.
- 5 Плотникова Э. М. Оценка эффективности иммунологических тест-систем при бруцеллезной инфекции животных // Материалы научно-практической конференции. – Казань. - 2001. - Часть I - С. 66-68.
- 6 Белохвостов А.С. Полимеразная цепная реакция и лигазные реакции, принципы, традиционные методики и нововведения // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1995. - № 2. - С. 21-26.
- 7 Kattar MM., Zallouab PA., Araja GF., Samaha-Kfourya J., Shbakloe H., Kanjb SS., Khalifea S., Deebc M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2007. – 59. – P.23–32
- 8 Leal-Klevezas DS., Martinez-Vazquez IO., Garcia-Cantu J., Lopez-Merina A., Martinez-Soriano JP. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats // Vet Microbiol. – 2000. – 75. – P. 91-7.
- 9 Sangari FJ., Aguero J. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the *ery* locus. Vaccine. 1994; 12:6435-8.
- 10 Vemulapalli R., McQuiston JR., Shurig GG., Srirangnathan N., Halling SM., Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains // Clin Diagn Lab Immunol. – 1999. – 6. – P.760-4.

Богданова М.И, Матвеева В.М, Строчков В.М, Сүгірбаева Г.Д, Қошембетов Ж.Қ, Сандыбаев Н.Т, Нұрабаев С.Ш, Нұрпейсова А.С, Сұлтанқұлова К.Т, Червякова О.В.

### BRUCELLA ABORTUS АНЫҚТАУ ҮШІН ПТР ПРАЙМЕРЛЕРІН ТАҢДАУ МЕН ҚОЮЫНЫҢ ЖАҒЫДАЙЫН ТИІМДІЛЕУ

Primer-BLAST программасының *Brucella abortus* ПТР көмегімен айқындау үшін праймерлердің үш жұбы таңдалды. BLAST программасымен теңестіру кезінде ДНҚ 305 п.н. мөлшерін шектейтін BrAfl BrAr1 праймерлері таңдалынып алынды, өйкені осы праймерлер ПТР жоғарғы сезімталдылық көрсетті. Бруцеллез қоздырғышының *Brucella abortus* түрін салыстырмалы түрде анықтау үшін осы праймерлер негізінде ПТР қоюдың тиімді жағыдайы жасалынды

*Негізгі сөздер:* ПТР, ДНҚ, бруцеллез, сынама, амплификатор.

Bogdanova M.I, Matveyeva V.M, Stozkov B.M, Sugirbaeva G.D, Koshemetov Zh.K, Sandybayev N.T, Nurabayev S.Sh, Nurpeisova A.S, Sultankulova K.T, Chervyakova O.V.

## SELECTION OF PRIMER AND OPTIMIZATION OF METHOD OF PCR FOR AUTHENTICATION OF BRUCELLA ABORTUS

**Аннотация.** By means of the program Primer - BLAST is neat three pairs of primer for optimization of raising of PCR on authentication of Brucellaabortus. In the process of smoothing by means of the program BLAST the pair of species-specific primer of BrAf1 BrAr1 is chosen, that limited the area of DNA measuring 305п.н, because this pair of primer showed more sensible results in PCR. On the basis of these primer the terms of raising of PCR are optimized for differential diagnostics of causative agent of бруцеллеза of type of Brucellaabortus

*Key words:* PCR, DNA, brucella, test, amplifier

УДК 619:616-07/619.3

<sup>1</sup>Богданова М.И, <sup>2</sup>Нургазиев Р.З, <sup>1</sup>Кошеметов Ж.К, <sup>1</sup>Матвеева В.М,  
<sup>1</sup>Сугирбаева Г.Д, <sup>3</sup>Нурпейсова А.С.

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности РГП НИИПББ КН МОН РК. Жамбылская обл., Кордайский р-н, пгт Гвардейский

<sup>2</sup>Кыргызский Аграрный Университет, г. Бишкек

<sup>3</sup>Казахский Национальный Аграрный Университет, г. Алматы

## РАЗРАБОТКА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ

**Аннотация** В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные условия постановки ИФА (температурные и временные режимы, а также буферные растворы). Было установлено, что применение отработанных нами оптимальных параметров постановки непрямого варианта ИФА, позволяет получать достоверные данные о наличие антител, обладающих специфичностью к полипептиду VP7 внутреннего капсида вируса КЛЮ, который является общим для всех серотипов возбудителя.

*Ключевые слова:* ИФА, антиген, вирус катаральной лихорадка овец, сыворотки крови, конъюгат, субстрат, активность, специфичность.

### **Введение**

Одним из важных этапов для борьбы с инфекцией и предотвращения дальнейшего распространения вируса КЛЮ среди животных является своевременная диагностика данного возбудителя.

В лабораторной диагностике блютанга важное место занимают методы, основанные на обнаружении специфических к данному вирусу антител в сыворотке крови больных и переболевших животных.

Ретроспективную диагностику и серологический мониторинг КЛЮ ранее проводили, используя реакция связывания комплемента, реакция диффузионной преципитации, реакция нейтрализации, метод флуоресценции антител, реакцию радиального гемолиза и торможения гемагглютинации [1-3]. В указанных реакция антигены вирусов группы КЛЮ, как и специфические антитела, перекрестно реагируют со специфическими