

УДК 619:614.3:637:579.842.23

Ошакбаева Н.М., Чужебаева Г. Д., Тагаев О.О., Ульянов В.А.

*Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова¹
Национальный аграрный научно-образовательный центр²*

РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *Yersinia enterocolitica* В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Аннотация

В статье представлены результаты разработки протокола полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для идентификации *Yersinia enterocolitica* в пищевых продуктах. Разработанные праймеры и зонд позволяют генерировать уникальные фрагменты в ПЦР в реальном времени, которые накапливаются в процессе амплификации и в дальнейшем детектировать наличие или отсутствие *Yersinia enterocolitica* в исследуемых образцах.

Работа проводилась в рамках государственного грантового финансирования научных проектов МОН РК «Разработка отечественной тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для идентификации штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*» (№ гос. регистрации 0115РК01588).

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, ДНК, полимеразная цепная реакция, иерсиниоз, молоко, мясо.

Введение

Иерсиниоз – острое инфекционное заболевание людей и животных разных видов, включая птиц, характеризующееся преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта с тенденцией к генерализованному поражению различных органов и систем.

Возбудителю кишечного иерсиниоза особое внимание уделено в международной программе ФАО / ВОЗ по безопасности пищевых продуктов, созданной в рамках ООН [1].

Это обусловлено широким распространением возбудителя кишечного иерсиниоза во всем мире. Кишечный иерсиниоз регистрируется более чем в 30 странах: в Европе, США, Канаде, Бразилии, Южной и Северной Африке, Японии, Ираке, Израиле и др. [2]. Особенно часто болезнь выявляют в крупных городах с развитой пищевой промышленностью и высоким экономическим уровнем, на территориях с умеренным климатом [3].

По современным представлениям, кишечный иерсиниоз относится к пищевым зоонозам, то есть к болезням, источником инфекции при которых являются больные сельскохозяйственные, домашние и дикие животные, а факторами передачи — пищевые продукты (мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты), употребляемые в пищу в сыром виде, длительное время хранившиеся при низких температурах, также больные сельскохозяйственные животные (свиньи, крупный и мелкий рогатый скот) [4-5].

Иерсиниозы в Казахстане характеризуются территориальной неравномерностью, преимущественно спорадическим характером, волнообразной динамикой, весенне-летней сезонностью и преобладанием детского населения среди заболевших. Данные по заболеваемости иерсиниозами в Казахстане занижены, что специалисты связывают с неудовлетворительной лабораторной диагностикой и отсутствием официальной регистрации иерсиниозов, обусловленных *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*,

Y. intermedia, *Y. frederiksenii*. В настоящее время наиболее эффективным методом определения иерсиний являются метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6]. Данный метод в формате Real Time используется для количественного определения содержания специфической ДНК иерсиний в образце.

Цель настоящей работы – поиск участков ДНК, пригодных для использования в качестве маркеров для идентификации видов рода *Yersinia*, создание специфических праймеров и флуоресцентно-меченного зонда позволяющего детектировать *Yersinia enterocolitica* в исследуемых образцах.

Материалы и методы исследований

Для выделения возбудителя *Yersinia enterocolitica* в качестве исходного материала использовали штаммы микроорганизмов, предоставленных РГКП «Костанайский областной центр санитарно-эпидемиологической экспертизы» Комитета государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения РК.

Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, использовали биоинформационную базу данных GenBank NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, которая в числе прочего предоставляет сведения о структуре геномов микро- и макроорганизмов, структуре белков, олигонуклеотидов, tandemных повторов и др.

После анализа последовательностей ДНК в различных базах данных для подбора специфичных праймеров были выбраны гены: инсектицидный токсин комплекс (TC), ген холерного вибриона (RTX), ген белка холицина (E2), кластер генов жгутика (FLAG-2), острова патогенности (HPI), гены секреции (*ytst1* и *YSA*), ген, кодирующий метилтрансферазу (*ugo2088*), ген, кодирующий активатор плазминогена (PLA), ген прикрепления протеинов инвазионного локуса (*ail*), ген рибосомальной РНК (16sRNA), гены гипотетических белков (HP) и ген фермента ренил-фосфат-альфа-N ацетиламиносахарамилазы (*rfe*).

Далее было произведено выравнивание с помощью компонента программы «Vector NTI» – AlignX. При изучении результатов выравнивания по остальным отобранным генам, не удалось найти уникальные, специфические участки, которые подходили бы для создания олигонуклеотидов. В некоторых случаях, практически на всем протяжении нуклеотидных последовательностей, не было найдено специфических участков для целевых организмов (выделение желтым либо синим цветом).

В других ситуациях, когда были найдены подходящие участки, были получены неудовлетворительные результаты «BLAST-анализа», либо температура плавления оказывалась не подходящей требованиям проведения ПЦР, так же нами были отсеяны олигонуклеотиды содержащие дефектные области (так называемые димеры, хвосты и петли). В результате, подходящим оказался участок гена *ail*.

Результаты исследований и их обсуждение

Для определения наиболее близкородственных видов нами было построено филогенетическое дерево (рисунок 1).

Укоренённое консенсусное филогенетическое дерево, построено на основе выравнивания последовательностей нуклеотидов, с использованием комплекса программ Vector NTI (0,1 – эволюционное расстояние). После построения дерева производилось выравнивание, с использованием нуклеотидных последовательностей наиболее близких видов. Выравнивание последовательностей - биоинформатический метод, основанный на размещении двух или более последовательностей мономеров ДНК, РНК или белков друг под другом таким образом, чтобы легко увидеть сходные участки в этих последовательностях.

Сходство первичных структур молекул может отражать их функциональные, структурные или эволюционные взаимосвязи.

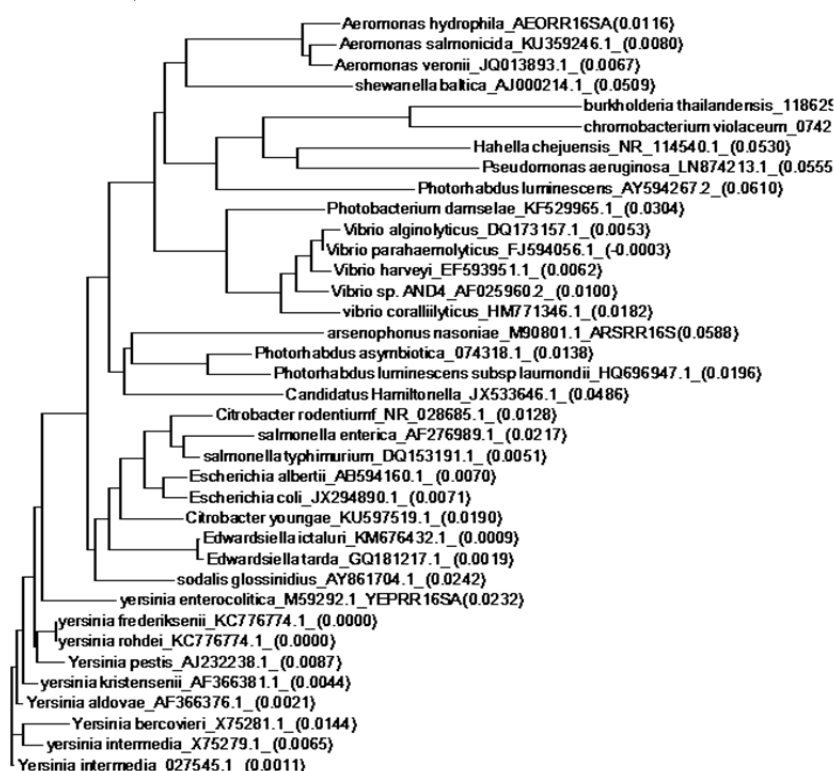


Рисунок 1 - Филогенетическое дерево рода *Yersinia* и близких к нему видов

Выравнивание проводилось в несколько этапов:

- 1 – поиск нужного гена среди определенных ранее родственных организмов;
- 2 – выравнивание среди всех найденных последовательностей, в случае обнаружения уникальных, специфических участков переходили к этапу №3;
- 3 – после обнаружения подходящих участков, проводили выравнивание внутри рода *Yersinia*, с использованием последовательностей нескольких штаммов от искомого вида (в нашем случае *Y. enterocolitica*), данный этап показан на рисунке 2.

На участки генов прикрепления протеинов инвазионного локуса была отобрана пара праймеров, при этом старались соблюдать ряд установленных эмпирически требований, выполнение которых позволяет добиться лучшей эффективности и специфичности реакции:

- длина праймеров – 18-25 п. о.;
- GC-состав праймеров, определяющий T_m (температуру плавления), должен находится в пределах 40-60% (оптимально 45-55%). При этом значения T_m обоих праймеров должны быть близкими;
- концевые 3'-нуклеотиды не должны быть комплементарны самому праймеру, другому праймеру пары, зонду, или другим синтетическим нуклеотидам, добавляемым в реакцию;
- если от праймеров требуется специфичность, то по крайней мере 2 нуклеотида на 3'-концах должны быть гомологичны ДНК анализируемого организма, и не гомологичны ДНК близкородственных организмов;
- желательно, чтобы T_m 5'-концевой части праймера превышала T_m 3'-концевой части.

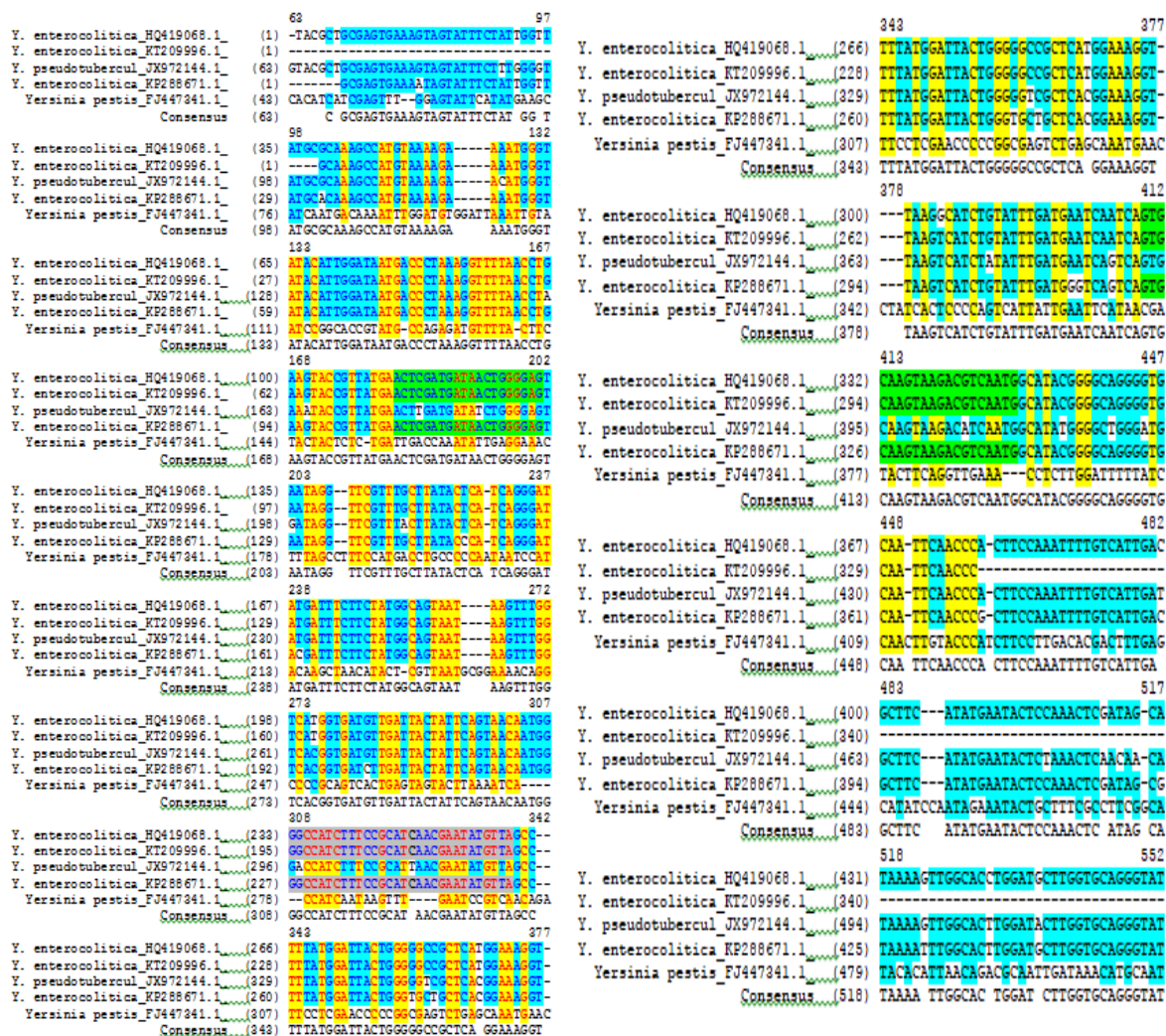


Рисунок 2 - Выравнивание фрагментов генов прикрепления протеинов инвазионного локуса (ail) у *Yersinia Enterocolitica*, *Yersinia Pseudotuberculosis* и *Yersinia Pestis* (праймеры отмечены зеленым цветом, зонды - серым), лист 1

Ниже, в таблице 1, представлены последовательности подобранных праймеров.

Таблица 1 – Перечень подобранных праймеров

Вид	Локус (код доступа в GenBank)	Последовательность, 5'-3'	Длина, п.н.	Температура плавления
Yersinia enterocolitica	KT209996.1	F- ACTCGATGATAACTGGGGAG	20	61
		R- CATTGACGTCTTACTTGCAC - (GTGCAAGTAAGACGTCAATG)	20	58,3

Следующим этапом создания детектирующей системы было конструирование флуоресцирующего зонда. Зонд выбирали из области, ограниченной праймерами. Брали фрагмент размером 25-35 пар оснований, который обладает температурой отжига на 15-20 градусов выше, чем у праймеров (обычно это около 80 °C). Обязательным условием при выборе участка для создания зонда, являлось наличие тимина через 10-12 пар оснований от 3' конца, так как именно к нему крепится флуоресцирующая метка (в используемом нами типе зондов), гаситель же присоединяется к самому 3' концу. Помимо этого, зонды проверялись на образование дефектов, так же, как и праймеры.

В таблице 2 приведена последовательность подобранного зонда TaqMan.

Таблица 2 - Характеристика подобранного зонда

Вид	Локус (код доступа в GenBank)	Последовательность, 5'-3'	Длина, п.н.	T ⁰ С плавления
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KT209996.1	(BHQ1)-TAACATATTCGT(FAMdT)-GATGCGGAAAGATGGCC	30	81

Сконструированные праймеры и зонд были синтезированы на автоматическом синтезаторе амидофосфитным методом в лаборатории компании «Синтол» г. Москва.

При тестировании праймеров для *Y. enterocolitica* с ДНК изолятов этого возбудителя, были получены ПЦР-продукты длиной около 420 п.н. (рисунок 3).

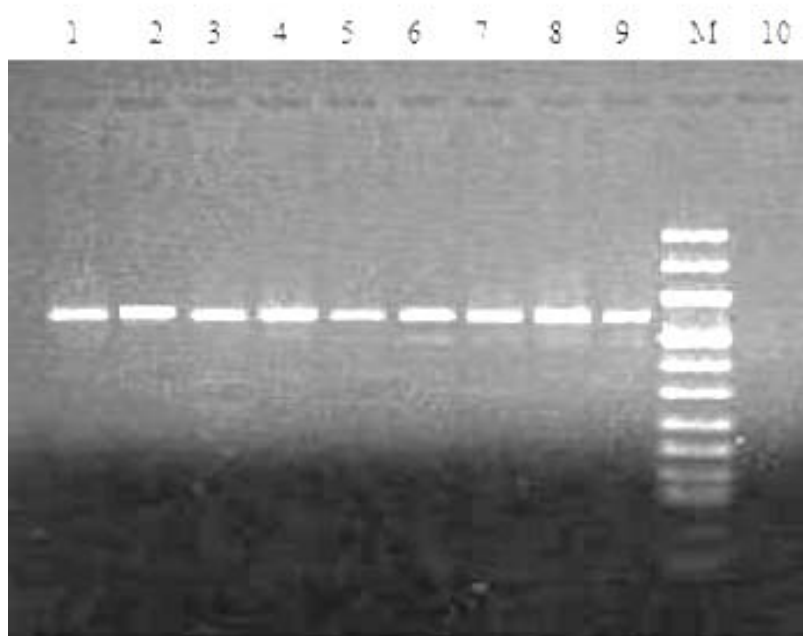


Рисунок 3 - Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами для *Y. enterocolitica* (дорожки 1-9), М – маркер молекулярного веса, 10 – отрицательный контроль.

На рисунке 3 показано, что при проведении ПЦР с разработанными праймерами, ПЦР продукты размером 420 п.н. нарабатывались только с ДНК *Y. enterocolitica*.

Для проверки специфичности разработанных праймеров использовали 5 образцов ДНК, близкородственных микроорганизмов. Результаты ПЦР-анализа приведены на рисунке 4.

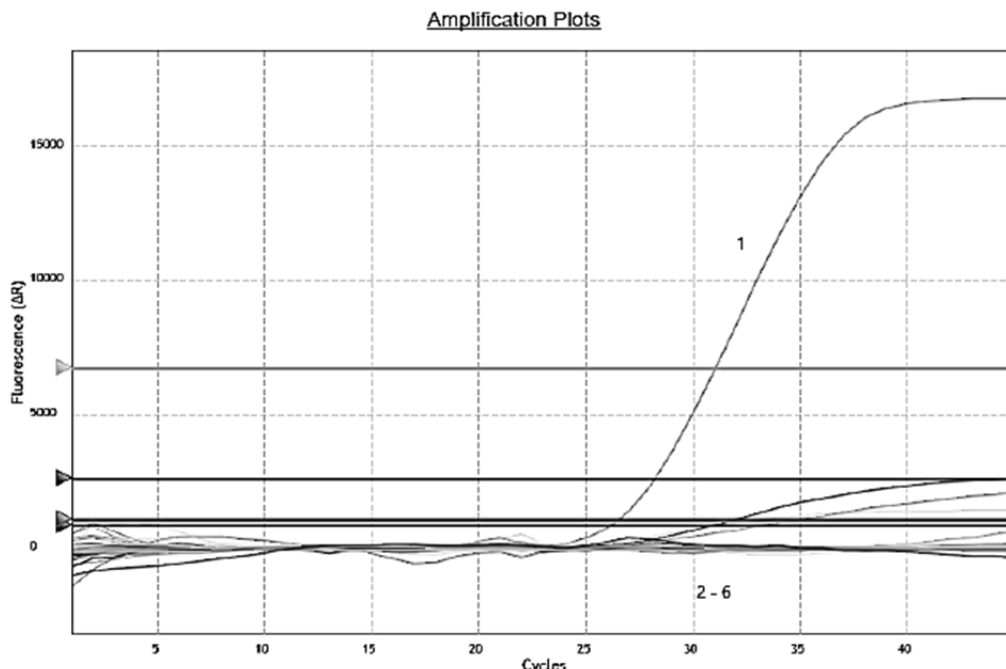


Рисунок 4 - График амплификации с праймерами подобранными для детекции *Y. enterocolitica* (1 - *Y. enterocolitica*, 2 - *Y. pseudotuberculosis*, 3 - *Y. frederiksenii*, 4 - *Y. intermedia*, 5 - *Y. kristensenii*, 6 – отрицательный контроль)

На рисунке 4 показаны результаты ПЦР RT. Как видно из представленного рисунка, подобранные праймеры не вызывают неспецифической реакции среди микроорганизмов рода *Yersinia*, наблюдается накопление флуоресцентного сигнала только с ДНК целевого организма. Также виден незначительный рост флуоресценции на поздних циклах амплификации, не выходящий за пределы порогового уровня, что не может учитываться при чтении результатов.

Выводы

Таким образом, с использованием современных компьютерных программ проведено компьютерное моделирование, конструирование праймеров и зонда.

Праймеры и зонд для *Yersinia enterocolitica*:

Upper primer 5'-ACTCGATGATAACTGGGGAG-3'

Lower primer 5'-

CATTGACGTCTTACTTGCAC -3' (GTGCAAGTAAGACGTCAATG)

Probe 5'-(BHQ1)-TAACATATTCGT(FAMdT)GATGCGGAAAGATGGCC-3'

(ggccatctttccgcatcaacgaatatgtta)

В результате проделанной работы были подобраны праймеры и зонд, которые могут послужить основой для создания стандартных наборов для идентификации иерсиниоза как в пищевых продуктах, так и в других исследуемых образцах.

Специфичность подобранных праймеров и зонда проверена методом ПЦР в «реальном времени».

Литература

1. *Ленченко Е.М.* Иерсиниоз. Этиология, диагностика, меры борьбы и профилактики // Проблемная лекция. Москва, 2002. - С. 14 - 19.
2. *Ющенко Г.В.* Современное состояние проблемы иерсиниозов // Эпидемиология и инфекционные болезни. 1998. - №.6. - С. 8 - 11.
3. *Шувалова Е.П.* Инфекционные болезни. Москва, 1982. С. 376 – 383
4. *Покровский В.И.* Руководство по инфекционным болезням -Москва, - 1993. - С. 133-148.
5. *Ющенко Г.В.* Особенности эпидемиологического процесса при псевдотуберкулезе и иерсиниозе// Материалы VII Съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов - М., 1997. - С. 100-101.
6. Gerty Vanantwerpen, Inge Van Damme, Lieven De Zutter, Kurt Houf. Within-batch prevalence and quantification of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in tonsils of pigs at slaughter // *Veterinary Microbiology* 169 (2014). – P. 223 – 227.

Ошақбаева Н.М., Чужебаева Г.Д., Тагаев О.О., Ульянов В.А.

АЗЫҚ ӨНІМДЕРІНДЕ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*-НЫ НАҚТЫ БІР УАҚЫТТА ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ ҮШІН ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ НЕГІЗІНДЕ ДАЙЫНДАУ

Аннотация

Мақалада азық өнімдерінде *Yersinia enterocolitica*-ны нақты бір уақытта идентификациялау үшін полимеразды тізбекті реакция негізінде хаттаманы дайындау көрсетілген. Дайындалған праймерлер мен зонд нақты бір уақытта ПТР-дің ерекше бөлектері қалыпқа келтіруге көмектеседі, олар амплификация процесінде жиналып, одан кейінгі зерттелетін үлгілерде *Yersinia enterocolitica*-дің болуы немесе болмауын анықтайды

«Қазіргі уақыттағы *Yersinia enterocolitica* және *Yersinia pseudotuberculosis* штамдарының идентификациялануы үшін полимеразды тізбекті реакцияға негізделі отырып отандық тест – жүйені өңдеп шығару» тақырыбы бойынша жұмыс ҚР БҒМ ғылыми жобаларды мемлекеттік грантық қаржыландыру аясында жүргізілді (мемлекеттік тіркеу № 0115PK01588).

Кілт сөздер: иерсиниоз, *Yersinia enterocolitica*, сүт, ет .

Oshakbayeva N.M., Chuzhebaeva G.D., Tagaev O.O., Ulyanov V.A.

DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME FOR IDENTIFICATION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN THE FOOD PRODUCTS

Annatation

The paper presents the development of a protocol based on polymerase chain reaction (PCR) in real time for the identification of *Yersinia enterocolitica* in food products. Primers and probe those have been developed allow the generation of unique fragments in reack-time PCR

than accumulate during amplification and further detect the presence or absence of *Yersinia enterocolitica* in the test samples

The work was carried out within the framework of state grant funding of scientific projects of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan "Development of a real-time polymerase chain reaction (PCR) test system for identifying strains of *Yersinia enterocolitica* and strains of *Yersinia pseudotuberculosis*" (State Registration No. 0115PK01588).

Keywords: yersiniosis, *Yersinia enterocolitica*, milk, meat.

УДК 634.1/.7;602.6:59;602.6:612

Ромаданова Н.В., Серадж Н.А., Нурманов М.М., Карашолакова Л.Н.

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы

Казахский национальный аграрный университет, Алматы

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ДИКОРАСТУЩЕЙ ЯБЛОНИ *MALUS SIEVERSII*

Аннотация

В статье приведены результаты введения в культуру *in vitro* дикорастущих форм яблони *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. Отработаны методики проращивания семян, стерилизации полученных проростков, проверки на наличие эндофитной инфекции на специализированной питательной среде 523, биотехнологии массового микроклонального размножения. Отработанная методика позволяет получать высокий коэффициент размножения растений; возможность получать саженцы класса супер-элита круглый год независимо от сезона. В результате сокращается селекционный процесс за счет отбора форм по нужным признакам непосредственно в культуре *in vitro*. Использование асептических оздоровленных растений *in vitro* от вирусной, бактериальной и микоплазменной инфекции в международном обмене гермоплазмой облегчает процедуру прохождения карантинного контроля.

Ключевые слова: семена яблони, дикорастущие формы, культура *in vitro*.

Введение

Основным условием генетического улучшения плодовых культур является наличие и сохранение генофонда культурных и дикорастущих форм растений, обладающих хозяйственно ценными признаками. Яблоня – одна из важнейших плодовых культур. Казахстан является одним из центров ее происхождения [1]. Дикорастущие формы яблони Заилийского Алатау обладают комплексом ценных качеств: высокой устойчивостью ко многим заболеваниям, высокой морозостойкостью, широкой экологической пластичностью. Однако в последнее время эти уникальные формы плодовых находятся под угрозой исчезновения. Поэтому сейчас одной из основных задач является сохранение и восстановление популяций дикоплодовых лесов Казахстана, как источника генофонда культуры яблони мирового значения.