

Денисова И.А., Андрющенко С.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза  
Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург  
E-mail: rattus000@gmail.com

## УСКОРЕННЫЙ АЛГОРИТМ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ НАЧАЛЬНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ РОДОВ ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ПЦР

Оптимизация алгоритма амплификации для тест-систем ПЦР-идентификации двух родов актинобактерий с использованием праймеров с высокой температурой отжига путем объединения и сокращения фаз отжига и синтеза позволила сократить время протекания полимеразной цепной реакции от 1 часа 10 минут до 32 минут.

Ключевые слова: множественная ПЦР, актинобактерии, бифидобактерии, пропионибактерии.

### Введение

ПЦР как наиболее простой и доступный метод молекулярно-генетического определения принадлежности выделяемых микроорганизмов к тому или другому таксону приобретает особое значение, особенно вследствие трудоемкости, а иногда невозможности культивации большинства представителей кишечных микробиоценозов человека [1], среди которых более 3/4 составляют облигатно-анаэробные бактерии [2]. В то же время, такой анализ более детально может быть проведен с использованием стандартных методов генотипирования по уровню изменчивости в последовательности гена малой рибосомальной РНК [3, 4], что значительно более затратно по трудовым и материальным ресурсам, так и путём поиска уникальных родоспецифичных последовательностей или целых генов, что имеет гораздо более узкий спектр применения и требует индивидуального подхода к разработке тест-систем для каждой таксономической группы [5].

С другой стороны, необходимость идентификации бактерий до уровня вида в условиях, когда известно, что горизонтальный перенос генов у прокариот является свором правилом, чем исключением, представляется неочевидной [6]. Первичная идентификация облигатных анаэробов вполне может быть осуществлена классическим методом полимеразной цепной реакции до уровня рода с модификациями в виде двухфазной и множественной полимеразной цепной реакции (мультиплекс-ПЦР). Такой подход позволяет многократно ускорить и оптимизировать рутинные исследования.

Таким образом, целью нашей работы стала дальнейшая оптимизация системы опреде-

ления бактерий до уровня рода *Bifidobacterium* или *Propionibacterium* с помощью ранее разработанной системы множественной ПЦР в двухфазном режиме.

### Материалы и методы

Нами в работе использовано 2 штамма бактерий *Bifidobacterium spp.* и 2 штамма *Propionibacterium spp.* коллекции лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН.

Проводилась дальнейшая оптимизация разработанной ранее тест-системы на базе праймерных пар для определения облигатно-анаэробных актинобактерий до уровня рода (табл. 1).

Матричная ДНК выделялась из каждого исследованного штамма для ПЦР в реагенте «ДНК-Экспресс» («Литех», Россия) объемом 0,1 мл, применяя в качестве твердотельного термо-

Таблица 1. Перечень праймеров, использованных в работе

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Длина, количество нуклеотидов
Bif F	ATGGGGTTCGCGT CCTATCAGG	21
Bif R	GGGCCCCACATC CAGCTTCGAG	26
Prb F	CGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAAGA	24
Prb R	GTAGCATGCGTG AAGCCCTGGAGA	24

Примечание: Bif – праймеры, родоспецифичные для *Bifidobacterium spp.*; Prp – праймеры, родоспецифичные для *Propionibacterium spp.*

стата амплификатор «Терцик МС-2+» («ДНК-технология», Россия) при температуре 98°C в течение 15 мин с последующим центрифугированием в микроцентрифуге «СМ-50» («Elmi», Латвия) при 15300 g в течение одной минуты. Супернатант, содержащий выделенную ДНК вносился в объеме 2,5 мкл. в подготавливаемую реакционную смесь для ПЦР.

Реакционная смесь для ПЦР конечным объемом 10 мкл готовилась из набора следующих праймеров и реагентов: 1 мкл 25 ммоль/л раствора магния сульфата, 0,2 мкл 10 ммоль/л раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкл 10 мкмоль/л смеси каждой из пар праймеров, 0,1 мкл раствора Таq-полимеразы (5 ед/мкл) и 6 мкл буфера «ДНК-экспресс». Реакция проводилась в том же ДНК-амплификаторе «Терцик МС-2+». Алгоритм амплификации: температура фазы денатурации – 93,6°C с длительностью 3 с; температура двояной фазы отжига и элонгации поэтапно увеличивались в диапазоне от 70 до 73°C, длительность элонгации – уменьшалась от 30 до 2 с [7]. Количество циклов реакции всегда составляло 30 [8].

Ампликоны, получаемые в результате реакции, были подвергнуты агарозному геле-электрофорезу [9]: весь объем (10 мкл) реакционной смеси дополняли 2 мкл буфера для внесения 10-кратной концентрации с красителем бромфеноловым синим, после чего вносили в лунки агарозного геля. Концентрация агарозы составляла 2%. Условия проведения электрофореза: форезная камера заполнялась 1x ТАЕ-буфером, содержащем 40 мкг/мл ботида этидия при напряженности поля до 14,8 в/см в течение 15 минут. Визуализация результатов разделения ампликонов проводилась в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

### Результаты и обсуждение

Алгоритм ПЦР с температурой отжига 73°C и при количестве 30 циклов показал положительный результат, а также отсутствие неспецифических ампликонов с одной парой праймеров при использовании как ДНК-матриц, полученных из бифидобактерий, так и в случае ДНК пропионибактерий.

При смешивании в одной пробе разных пар праймеров при вышеуказанной температуре также было показано отсутствие неспецифических результатов реакции в пробах с ДНК-мат-

рицей каждого из исследуемых штаммов. Дальнейшее повышение температуры отжига приводило к резкому снижению эффективности ПЦР.

Так как температура отжига, которую мы использовали, соответствовала диапазону значений, составляющих оптимум работы Таq-полимеразы, стала возможной реализация алгоритма двухфазной ПЦР, и продолжение дальнейшего сокращения фазы отжига-синтеза. Устойчивое образование ампликонов от праймеров для пропионибактерий в реакционной смеси используемого объема сохранялось вплоть до 15 секунд, отводимых на вторую фазу. В итоге нам удалось достичь еще большего снижения общего времени реакции: от 1 часа 10 минут в случае стандартной трехфазной ПЦР и 45 минут – ранее разработанной неускоренной двухфазной до 32 минут. В то же время амплификация с праймерами для рода *Bifidobacterium* происходила без видимого снижения эффективности вплоть до 6 секунд, отводимых на фазу отжига-синтеза.

Дальнейшее сокращение времени, отводимого на синтез ампликонов, показало постепенное снижение эффективности амплификации до полной не визуализируемости в диапазоне 3 секунд как для пропионибактерий (от 15 до 12 секунд), так и в случае бифидобактерий (от 6 до 3 секунд).

### Заключение

Предложенный способ оптимизации разработанного ранее алгоритма двухфазной

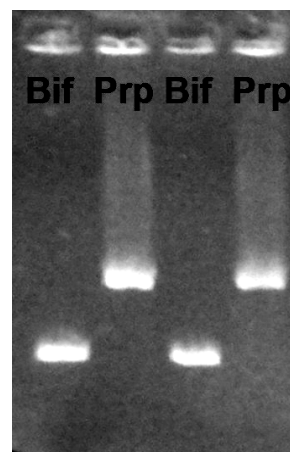


Рисунок 1. Электрофореграмма результата 29 циклов множественной двухфазной ПЦР с двумя парами праймеров с пробами матричной ДНК бифидобактерий (Bif) и пропионибактерий (Prp) при температуре отжига 70°C (первая и вторая дорожки) и 72°C (третья и четвертая дорожки)

мультиплекс-ПЦР позволяет еще более сократить время идентификации двух основных родов культивируемых облигатно-анаэробных актинобактерий, которые обычно выделяются из кишечника большинства всеядных млекопитающих, включая человека: применяя одну реакционную смесь на каждую анализируемую пробу.

Проведенная оптимизация системы скринингового определения облигатно-анаэробных бактерий существенно сокращает время, требующееся для проведения анализа. Сокращение объема реакционной смеси позволило ещё более сократить время, отводимое на синтез ампликонов до 15 секунд, даже с учетом большой длины получаемых цепей на матрице ДНК пропиони-

бактерий, который превышает 1,1 тысячу оснований. Этот факт позволяет использовать предложенное усовершенствование и для большинства других стандартных тест-систем ПЦР-анализа, содержащих праймеры с соответствующими значениями температуры отжига.

Таким образом, разработанный алгоритм двухфазной ПЦР с высокой температурой отжига, малым объемом реакционной смеси и предельно короткой длительностью фаз позволяет значительно ускорять ранее разработанную систему ПЦР-идентификации до уровня рода облигатно-анаэробных актинобактерий, которые обычно выделяются из кишечника человека: более чем в два раза по сравнению со стандартной процедурой.

30.09.2014

**Работа выполнена по проектам фундаментальных исследований программ Президиума РАН № 12-П-4-1015 «Инфектологические механизмы ассоциативного симбиоза человека» и № 12-П-4-1045 «Изучение интеграционных механизмов межмикробных взаимодействий микросимбионтов кишечной микробиоты в паре «доминант-ассоциант»**

**Список литературы:**

1. Sun Zh., Baur A., Zhurina D. Accessing the Inaccessible: Molecular Tools for Bifidobacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – V.78. – N.15. – P.5035–5042.
2. Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Вальшев А.В., Бухарин О.В. Видовая характеристика и факторы персистенции бифидофлоры кишечника в норме и при дисбиозах // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. – 2009. – №2. – С.89–93.
3. Krizova J., Shpanova A., Rittich B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of Bifidobacterium species // Systematic and Applied Microbiology. – 2006. – N.29. – P.36–44.
4. Collado M.C., Hernandez M. Identification and differentiation of Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium species in fermented milk products with bifidobacteria // Microbiological Research. – 2007. – V.162. – P.86–92.
5. Martin R., Jimenez E., Heilig H. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V.75. – N.4. – P.965–969.
6. Georgiades K., Raoult D. Defining Pathogenic Bacterial Species in the Genomic Era // Front. Microbiol. – 2010. – N.1. – P. 151.
7. Carman W.F., Kidd A.H. An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using *Thermus aquaticus* polymerase // J. Virol. Methods. – 1989. – V.23. – N.3. – P.277–289.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР “в реальном времени” // М.: БИНОМ. – 2009. – 223с.
9. Маниатис Т. Фрич Э. Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // М.: Мир. – 1984. – 480с.

Сведения об авторах:

**Денисова Ирина Александровна**, студент физического факультета  
Оренбургского государственного университета

**Андрющенко Сергей Валерьевич**, старший научный сотрудник  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения  
Российской академии наук, кандидат медицинских наук

460000, ул. Пионерская, 11, e-mail: rattus000@gmail.com