

Олигонуклеотидные праймеры в диагностике Ку-лихорадки методом ПЦР

Аннотация. Изложены данные о разработанных двух парах праймеров Com1ts1F и Com1ts1R; CoxF2 и CoxR4. Эти праймеры комплементарны последовательности консервативной области гена com1, который кодирует высококонсервативный белок наружной мембраны 27kDa, для выявления и идентификации C.burnetii и показаны результаты оптимизации условий и параметров ПЦР.

Ключевые слова: Ку-лихорадка, ген Com 1, C.burnetii, ПЦР, праймер.

Олігонуклеотидні праймери в діагностиці Ку-лихоманки методом ПЛР. ЛЮДМИЛА В. МАРУЩАК, ОЛЕГ М. НЕВОЛЬКО (Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ), м. Київ, Україна), ОЛЕНА В. ВОЛОСЯНКО (Національний університет природокористування України)

Анотація. наведені дані про розроблення двох пар праймерів Com1ts1F і Com1ts1R; CoxF2 і CoxR4. Ці праймери комплементарні послідовності консервативної ділянки гену com1, який кодує висококонсервативний білок зовнішньої мембрани 27kDa, для виявлення та ідентифікації C.burnetii методом ПЛР і показані результати оптимізації умов проведення ПЛР.

Ключові слова: Ку-лихоманка, ген Com1, C.burnetii, ПЛР, праймер.

Bioinformatic analysis for design oligonucleotide primers for diagnostic PCR test system Q fever. LYUDMYLA.V. MARUSHCHAK, OLEG.M. NEVOLKO (The State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (SSRILDVSE), Kiev, Ukraine), ELENA.V. VOLOSIANKO (National University of life and environmental sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine).

Abstract. The article present data about to develop two pairs primers Com1ts1F and Com1ts1R, CoxF2 and CoxR4. Primers are were designed from the nucleotide sequence of the gene Com 1 encoding a 27 kDa outer membrane protein for detection of C.burnetii and the identification of shedders. Results of optimization of PCR was shown.

Key words: Q-fever, gene Com1, C.burnetii, PCR, primer.

Л. МАРУЩАК, мл. научный сотрудник
О.М.НЕВОЛЬКО, канд. вет. наук
Государственный научно-исследовательский
институт по лабораторной диагностике
и ветеринарно-санитарной
экспертизе (ГНИИЛДВСЭ)
Е.В. ВОЛОСЯНКО, докт. вет. наук
Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины

Рецензенты:

кандидаты ветеринарных наук, **М.В. Бабкин** (Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов);
Н.П.Сытюк (Институт ветеринарной медицины)

Ку-лихорадка занимает первое место в группе зоонозных риккетсиозов, являясь наиболее распространенным эндемическим риккетсиозом в мире [3,4,5]. Такая распространённость обусловлена тем, что многие виды диких грызунов, а также паразитирующие на них клещи могут образовывать собственные резервуары возбудителя Ку-лихорадки, в биоценозе которых происходит циркуляция вирулентного возбудителя по замкнутому циклу [1,2,3].

Диагностика Ку-лихорадки в Украине базируется на серологических методах исследования, однако они обеспечивают лишь косвенную очевидность инфицирования и могут диагностировать болезнь на поздних

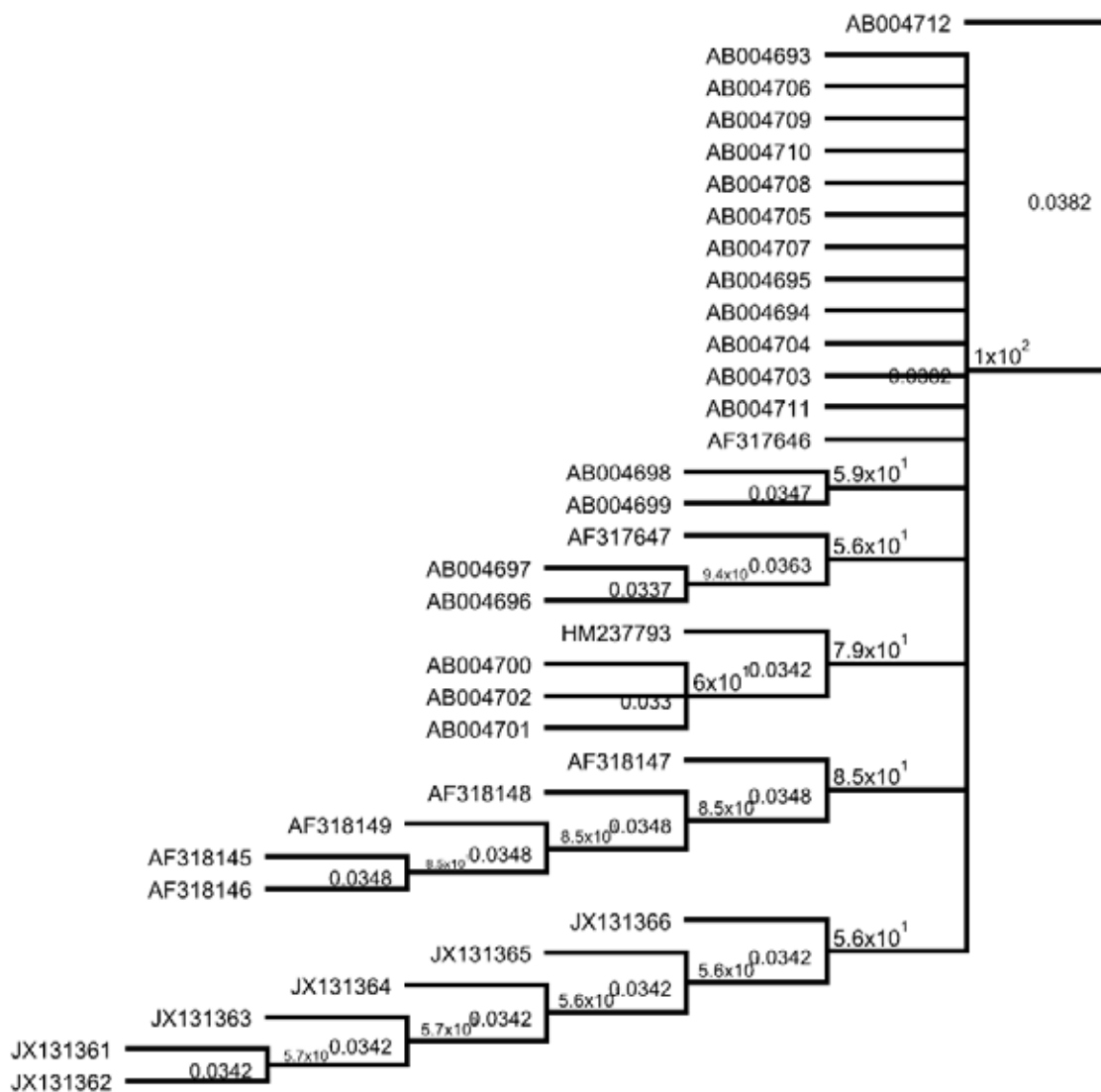


Рис. 1. Филогенетическое дерево последовательностей гена *Com1* *C. burnetii*, построенное методом минимальной эволюции в программе «Geneious» (Biomatters Ltd).

стадиях заражения и при проявлениях клинических признаков.

Молекулярно-биологические методы для определения *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) возбудителя Ку-лихорадки имеют ряд преимуществ: большая чувствительность и специфичность, короткий промежуток времени, необходимый для получения результата, отсутствие повышенных требований по биозащите к лаборатории, возможность диагностики на ранних сроках заболевания и возможность выявления *C. burnetii* в материале от животного в случае гибели [6].

Цель работы – провести биоинформатический анализ последовательности гена *Com1*, который кодирует высоко консервативный белок внешней мембраны 27kDa *C. burnetii* и разработать олигонуклеотидные праймеры для обнаружения и идентификации ДНК *C. burnetii* – возбудителя Ку-лихорадки с помощью полимеразной цепной реакции.

Работа проведена в научно-исследовательском отделе молекулярно-генетических методов исследований ГНИИЛДВСЭ.

Для проверки специфичности праймеров был использован ПЦР позитивный референс-контроль, сертификат № 5131, разработанный Genekam Biotechnology AG, Германия. Поиск нуклеотидных последовательностей проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США.

Для выявления и идентификации *C. burnetii* были рассчитаны оригинальные нуклеотидные последовательности (праймеры), которые комплементарны консервативной области гена *Com1*, который кодирует высококонсервативный белок наружной мембраны 27kDa возбудителя ку-лихорадки (ATCC AB004712).

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на варибельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью программы «Geneious» (Biomatters Ltd).

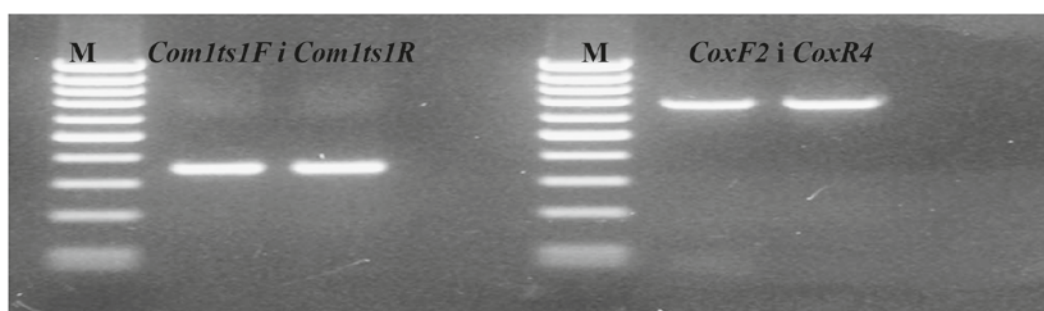
Праймеры были синтезированы в «Integrated DNA Technologies», США (www.idtdna.com).

Таблица 1

Основные параметры разработанных праймеров.

Название	Последовательность (5'→3')	Температура плавления, °C	GC, %
Com1ts1F	CAGAAGCGCAACAAGAAGAAC	54,7	47,6
Com1ts1R	GCGGTTTGAAGGGTGATTG	54,8	50,0
CoxF2	ACYGCAGGCGTGGCGATAG	58,4	65,8
CoxR4	TGAAGGTTTTGTTGTGAGGTGGC	57,7	48,7

где, Y=C/T

Рис.2. Продукт амплификации фрагмента гена *Com1* *S.burnetii* с праймерами Com1ts1F и Com1ts1R размер ампликона 355 п.н. и праймерами CoxF2 и CoxR4, размер ампликона 689 п.н.

M - маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1, 2 - ПЦР положительный референс-контроль, Genekam Biotechnology AG, Германия

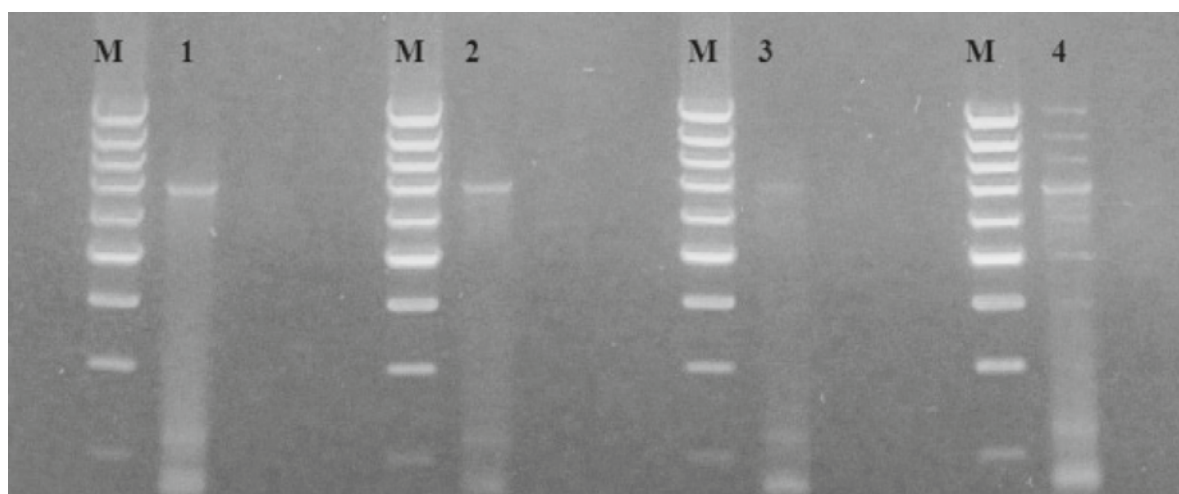


Рис. 3 . Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле для пары праймеров CoxF2 и CoxR4, размер ампликона 689 п.н.

M – маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1,2,3,4,5 - ПЛР позитивный референс-контроль, 1 - температура от жига праймеров 60°C, концентрация ионов магния 1,5 mM; 2 - температура от жига праймеров 62°C, концентрация ионов магния 1,5 mM; 3 - температура от жига праймеров 64°C, концентрация ионов магния 1,5 mM; 4 - температура от жига праймеров 65°C, концентрация ионов магния 1,5 mM.

Выделение ДНК проводили при помощи набора реактивов «High Pure PCR Template Preparation Kit» (Roche Diagnostics, Германия). Полимеразную цепную реакцию выполняли с помощью реактивов

AmpliAq Gold 360 Master Mix (Life Thechnologies). Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе «Mastercecler eppgradients Eppendorf AG», Eppendorf (Германия) и «Rotor Gene – 3000», Corbett Research

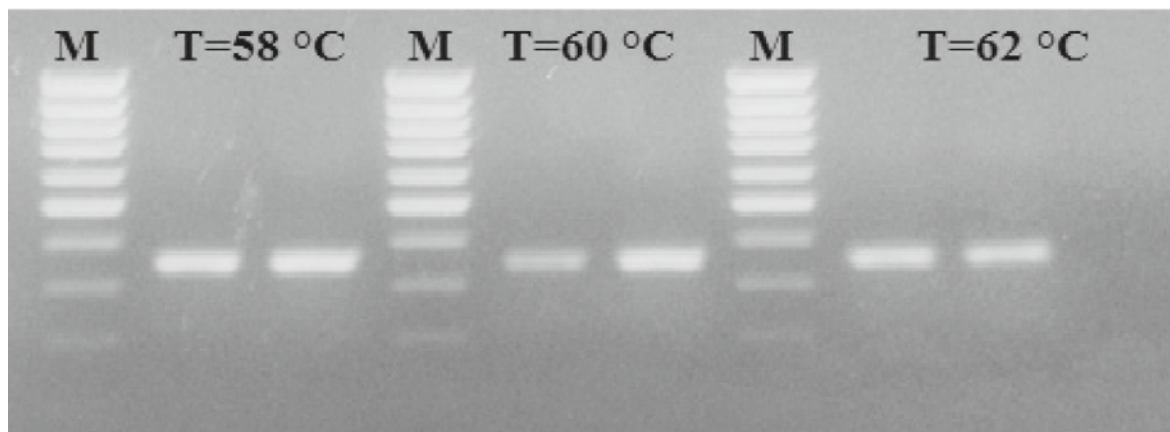


Рис. 4. Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле для пары праймеров Com1ts1F и Com1ts1R размер ампликона 355 п.н.

М – маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1,2,3,4,5 – ПЛР позитивный референс-контроль, 1 – температура отжига праймеров 58°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ; 2 – температура отжига праймеров 60°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ; 3 – температура отжига праймеров 62°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ.

(Австралия) согласно инструкции по его применению.

Концентрацию ДНК *C.burnetii* определяли на спектрофотометре «BioPhotometr» Eppendorf, Германия.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с интеркалятором – бромидом этидия. Результаты электрофореза учитывали визуально на транслюминаторе под УФ-светом с наличием или отсутствием фрагментов ДНК определенного размера. Специфичность амплифицированного фрагмента определяли его размером (положением) в отношении маркера «100 bp DNA Ladder», Fermentas (г.Латвия)

Результаты исследований. Для расчета праймеров и конструирования системы детекции *C.burnetii* в ПЦР использовались зарегистрированные в GenBank следующие нуклеотидные последовательности геномов изолятов *C.burnetii* для гена *Com1*(рис.1) (ATCC: AB004693, AB004694, AB004695; AB004696, AB004697, AB004698, AB004699, AB004700; AB004701, AB004702, AB004703, AB004704, AB004705; AB004706, AB004707, AB004708, AB004709, AB004710; AB004711, AB004712 [8]; AF317646; AF317647; AF318145; AF318146; AF318147; AF318148; AF318149; M88613 [7].

По результатам проведенного анализа, праймеры для проведения ПЦР были подобраны в 5'-концевой

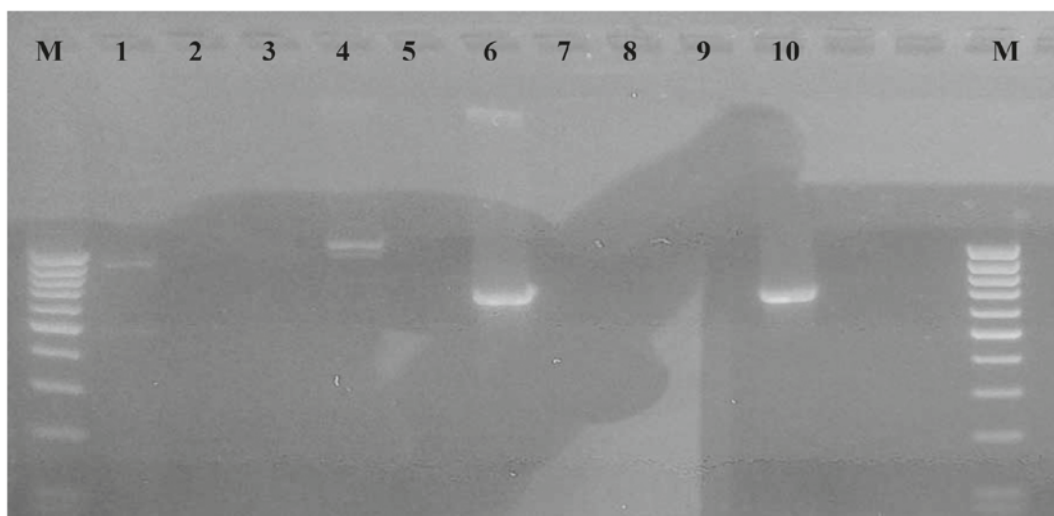


Рис . 5. Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле для пары праймеров SoxH2 и SoxH4, размер ампликона 689 п.н.

М – маркер «100 bp Plus DNA Ladder» (Fermentas); 1 – *Salmonella Typhimurium*; 2 – *Leptospiriosis*; 3 – *Listeria monocytogenes*; 4 – *Brucella abortus*; 5 – *Chlamydia*; 6, 10 – ПЦР референс-контроль ДНК *C.burnetii* № D0010; 7 – *Rhinotracheitis infectiosa bovis*; 8, 9 – негативный контроль амплификации.

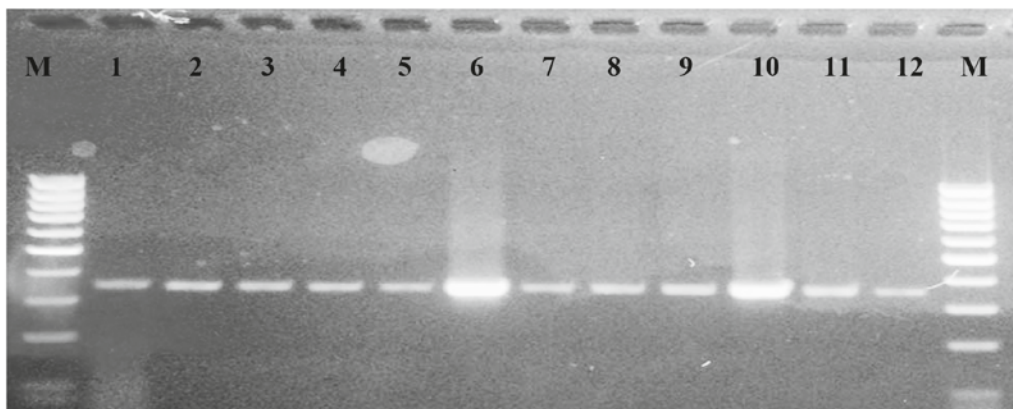


Рис. 6. Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле для пары кCom1ts1F и Com1ts1R размер ампликона 355 п.н.

М – маркер «100 bp Plus DNA Ladder» (Fermentas); 1 – *Salmonella* Typhimurium; 2 – *Leptospira*; 3 – *Listeria monocytogenes*; 4 – *Brucella abortus*; 5 – *Chlamydia*; 6 – ПЦР референс-контроль ДНК *C. burnetii* № D0010; 7 – *Rhinotracheitis infectiosa bovis*; 8, 9 – негативный контроль амплификации. 8, 9, 11, 12 – негативный контроль амплификации; 10 – *C. burnetii* штам «Грита».

части гена *Com1*, кодирующий консервативный белок внешней мембраны 27kDa возбудителя Ку-лихорадки. Были разработаны две пары «вырожденных» праймеров Com1ts1F и Com1ts1R, CoxF2 и CoxR4 (табл.1). Вырожденность олигонуклеотидных праймеров учитывает различия нуклеотидного состава гена *Com1* возбудителя Ку-лихорадки *C. burnetii* разных генотипов.

Пара праймеров Com1ts1F и Com1ts1R обеспечивают синтез фрагмента ДНК размером 355 п.н. Пара праймеров CoxF2 и CoxR4 обеспечивают синтез фрагмента ДНК размером 689 п.н. (рис. 2)

Оптимизация условий проведения ПЦР была проведена по следующим показателям: сравнительный анализ температуры отжига праймеров (рис.3), подбор оптимальной концентрации праймеров, ионов магния и полимеразы.

Для проверки специфичности разработанных праймеров для выявления ДНК *C. burnetii* методом ПЛР были исследованы ДНК и РНК различных возбудителей. (рис.5 и 6).

Выводы

1 Проведен биоинформатический анализ последовательности гена *Com1*, который кодирует высококонсервативный белок внешней мембраны 27kDa *C. burnetii*.

2. Рассчитаны две пары «вырожденных» праймеров: Com1ts1F, Com1ts1R и CoxF2, CoxR4, которые во время проведения ПЦР образуют продукты амплификации длиной 355 и 689 п. н. соответственно.

3. Пару праймеров Com1ts1F и Com1ts1R не возможно использовать для разработки диагностической тест-системы для выявления ДНК *C. burnetii* методом ПЛР, так как они образуют фрагмент ДНК размером 355 н.п. с гетерогенными образцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дайтер А.Б., Тарасевич И.В. Ржегачек И. Эпидемиология лихорадки Ку / Риккетсиозы: сб. науч. тр.; Ин-т им. Пастера.– Л., 1989.– Т. 66.– С. 5–36.
2. Здродовский П.Ф. Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах.– М., 1972.– С. 496.
3. Самуйленко А.Я. Соловьева Б.В., Непоклонова Е.А., Воронина Е. С. и др. Инфекционная патология животных.– М.: Академкнига, 2006.– Т.2.– 807 с.
4. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е. П. Риккетсиозы человека / Руководство для врачей.– СПб, 2002.– 475 с.
5. Марущак Л.В. Изучение распространения Ку-лихорадки на территории Одесской области // Ветеринарная медицина. Межведомственный тематический научный сборник.– Харьков, 2012 – Вып. №96.– С. 32.
6. Berri M., Laroucan K., Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction // *Veterinary Microbiology*.– 2000.– Vol. 72.– P. 285–293.
7. Hendrix L.R., Mallavia L.P., Samuel J.E. Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene *com1* // *Infect. Immun.*– 1993.– №61.– P. 470.
8. Zhang G.Q., To H., Yamaguchi T. et al. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein // *Microbiology and Immunology*.– 1997.– Vol. 41., Issue 11.– P. 871–877.