

УДК 619:616.98-076:579.852.11:577.2.08:579.252.5

БІЛОЙВАН О. В., аспірант, e-mail: Silverscreen91@gmail.com**СТЕГНІЙ Б. Т.**, д. вет. н., проф., академік НААН України, e-mail: Boris.Stegniy@gmail.com**СОЛОДЯНКІН О.С.**, к.біол.н., e-mail: olexii.solod@gmail.com**ГЕРІЛОВИЧ А. П.**, д. вет. н., проф., чл.-кор. НААН України e-mail: antger2011@gmail.com*Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», м. Харків*

РОЗРОБКА ПОЗИТИВНИХ ПЛР-КОНТРОЛІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПЛАЗМІД BACILLUS ANTHRACIS pXO1 ТА pXO2

*В статті наведено результати виготовлення рекомбінантних позитивних контрольних зразків для детекції плазмід pXO1 та pXO2 збудника сибірки за методом ТА-клонування та з використанням плазмідного вектора pTZ57R/T. Фрагменти генів *pagA* плазмиди pXO1 та *capC* плазмиди pXO2 були ампліфіковані методом ПЛР, мали довжину 201 та 171 п.н. відповідно та вбудовані до складу вектору pTZ57R/T. Було здійснено трансформацію компетентних клітин *E.coli* штаму DH5α отриманими ДНК. За результатами фінальної ПЛР доведено, що отримані рекомбінантні контрольні зразки придатні для використання та можуть бути включені до складу діагностичних наборів для детекції генетичного матеріалу вищезазначеного збудника.*

Ключові слова: сибірка, плазмиди, ДНК, клонування.

Вступ. На сьогодні, сибірка залишається одним з найнебезпечніших антропозоонозних захворювань, які представляють велику загрозу здоров'ю людей та тварин. Не зважаючи на те, що епізоотична ситуація щодо сибірки в Україні залишається стабільною, спорадичні випадки цього захворювання виникають в усіх областях нашої держави [1, 2]. Здатність спорової форми даного збудника залишатись життєздатною в навколишньому середовищі протягом десятиліть є одним з факторів, що зумовлює його патогенність, а також підвищує вирогідність його використання в якості біологічної зброї [3].

Вірулентні штами *Bacillus anthracis* містять дві великі плазмиди: pXO1, на якій розташовані гени, які кодують токсини, та pXO2, на якій локалізовані капсулоутворюючі гени. Капсула захищає бактерію від фагоцитозу макрофагами в організмі носія. Плазміда pXO1 містить три гени, кожен з яких зумовлює синтез основних компонентів сибіркового екзотоксину: ген *pag* - протективний антиген (РА), ген *суа* - фактор набряку (ЕФ) та ген *lef* - летальний фактор (ЛФ) [4, 5]. Протективний антиген зумовлює токсичну дію *B. anthracis* та утворює летальний та набряковий токсини в поєднанні з ЛФ та ЕФ відповідно [6].

Як правило, постановку діагнозу на сибірку проводять після постановки специфічної ПЛР на наявність геному *B. anthracis*, а також генів *pag* та *cap*, які є специфічними для плазмід pXO1 та pXO2 відповідно [7, 8]. Позитивні ДНК-контролі, виготовлені зі стандартних штамів *B. anthracis*, зазвичай входять до складу діагностичних ПЛР-наборів. Однак використання живих штамів *B. anthracis* потребує наявності лабораторії з рівнем біозахисту BSL-3 та з дотриманням підвищених заходів біобезпеки. Застосування ДНК *B. anthracis* в якості позитивного контролю для ПЛР також підвищує ризик крос-контамінації, що може негативно вплинути на достовірність результатів [3]. Для уникнення цих проблем, доцільно використання рекомбінантних контрольних зразків, виготовлення яких і було метою даної роботи.

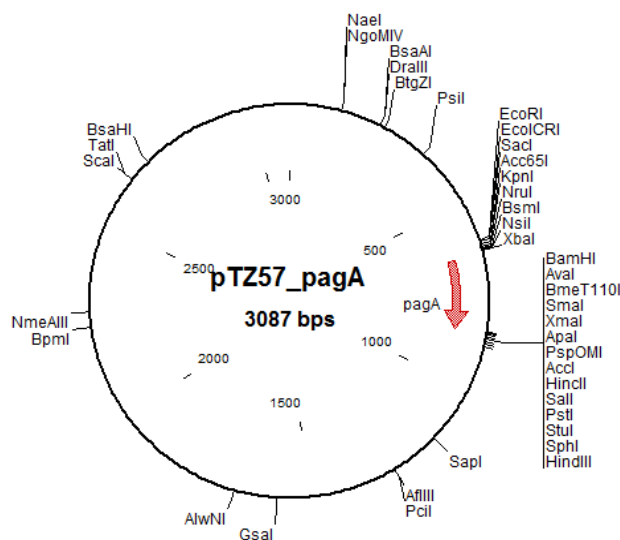
Мета роботи. Розробити та виготовити рекомбінантні позитивні контрольні зразки для детекції плазмід pXO1 та pXO2 збудника сибірки.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень використовували ДНК *B. anthracis* зі штаму Ames 3013, люб'язно наданий німецькими партнерами з Інституту мікробіології Бундесверу (м. Мюнхен, Німеччина), а також ДНК з термолізату бульонної культури *B. anthracis* №625, виділеної від хворої на сибірку людини в Херсонській області в 1999 році та отриманої з ДЗ «УЦКМЗ МОЗ» (м.Київ).

Ампліфікацію фрагмента *pagA* плазміди рХО1 довжиною 201 п.н. було проведено з 45-цикловою ПЛР з праймерами *pagA_for* 5'-GTACAAGTGCTGACCTACG-3' та *pagA_rev* 5'-CACTGTACGGATCAGAAGCC-3'. Фрагмент *capC* плазміди рХО2 довжиною 171 п.н. був ампліфікований з 45 циклами ПЛР. При цьому були використані праймери *capC_for* 5'-CCTGCAGGTTTAGTTGTACCT-3' та *capC_rev* 5'-ACCTGTAATTAGCGTTGCCG-3'. Праймерні системи були розроблені в Інституті мікробіології Бундесверу. Температура відпалу складала 60 °С, тривалість одного циклу ампліфікації - 1 хв.15 с.

Після проведення горизонтального електрофорезу одержуваний фрагмент був вирізаний з агарозного гелю, очищений з використанням комерційного набору “GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691, #K0692)” виробництва фірми “Thermo Scientific” (США) та вбудований до складу вектору рTZ57R/Т за допомогою набору для ТА-клонування “Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit (#K1213, #K1214)”. Було здійснено трансформацію компетентних клітин *E.coli* штаму DH5α з іонами Ca²⁺ отриманими плазмідними ДНК, з наступним висівом на LB-агар з додаванням 10 мкг/мл ампіциліну. Отримані білі колонії підростили в середовищі LB з додаванням ампіциліну на шейкері з доступом повітря протягом 4 годин, центрифугували та виділили плазмідні ДНК за допомогою комерційного набору “Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502)”. Концентрацію плазмідних ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра Nanodrop DS-11 фірми DeNovix.

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі досліджень були розроблені моделі векторної молекули на основі плазміди рTZ57R/Т для ТА-клонування та ДНК-фрагментів *pagA* та *capC* довжиною – 201 та 171 п.н. відповідно. Конструювання моделі молекули було проведено за допомогою програми Clone Manager. Отримані молекули рTZ_*pagA* та рTZ_*capC* мали довжину 3087 п.н. та 3057 п.н. відповідно (рис. 1, 2). Окрім того у складі зазначених векторів містився ген стійкості до ампіциліну, що при подальшому клонуванні у культурі *E. coli* штаму DH5α виступав маркером селективних ознак.



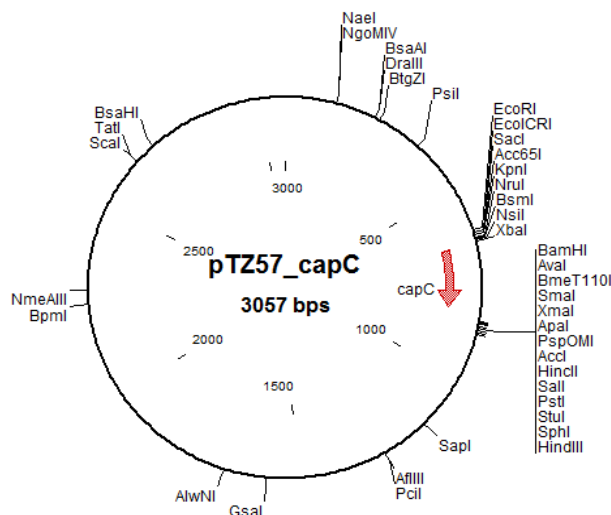


Рис. 1, 2 – Схеми плазмідних векторів pTZ57_pagA та pTZ57_capC

Фрагмент гену pagA був отриманий з двох зразків ДНК *B. anthracis*: зі штаму Ames 3013 та з термолізату бульйонної культури №625. Амплікон capC був отриманий зі зразка ДНК *B. anthracis* штаму Ames 3013. Зазначені фрагменти були успішно лігійовані з ДНК вектору pTZ57R/T, після чого клітини *E.coli* штаму DH5α були трансформовані отриманою біомасою плазмід.

Отримані колонії досліджували за методів ПЛР в режимі реального часу (рис.3).

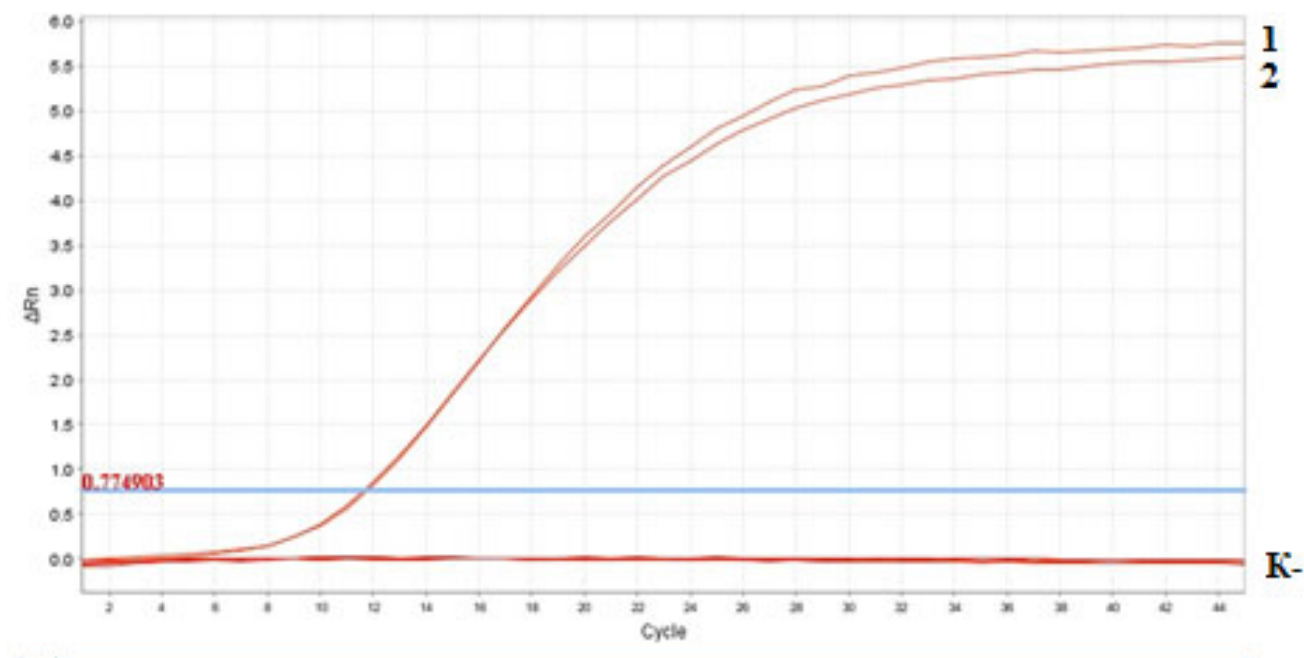


Рис. 3 – Результати ПЛР в режимі реального часу з колоніями компетентних клітин *E.coli*, трансформованими плазмідами pTZ57_pagA (1) та pTZ57_capC (2); К- – негативні контрольні зразки.

Після екстракції плазмідних ДНК, було виміряно їх концентрації, які склали:

- pTZ_pagA1 (Ames) – 61,88 нг/мкл;
- pTZ_pagA2 (№625) – 67,26 нг/мкл;
- pTZ_capC (Ames) – 45,87 нг/мкл.

Кожен зі зразків був розведений в концентраціях 1 тис. та 10 тис. копій ДНК в 5 мкл. За результатами фінальної ПЛР, було отримано фрагменти з довжиною 201 (pTZ_pagA1, 2) та 171 п.н. (pTZ_capC), які є характерними для генів *pagA* та *capC* плазмід рХО1 та рХО2 відповідно (рис. 4).

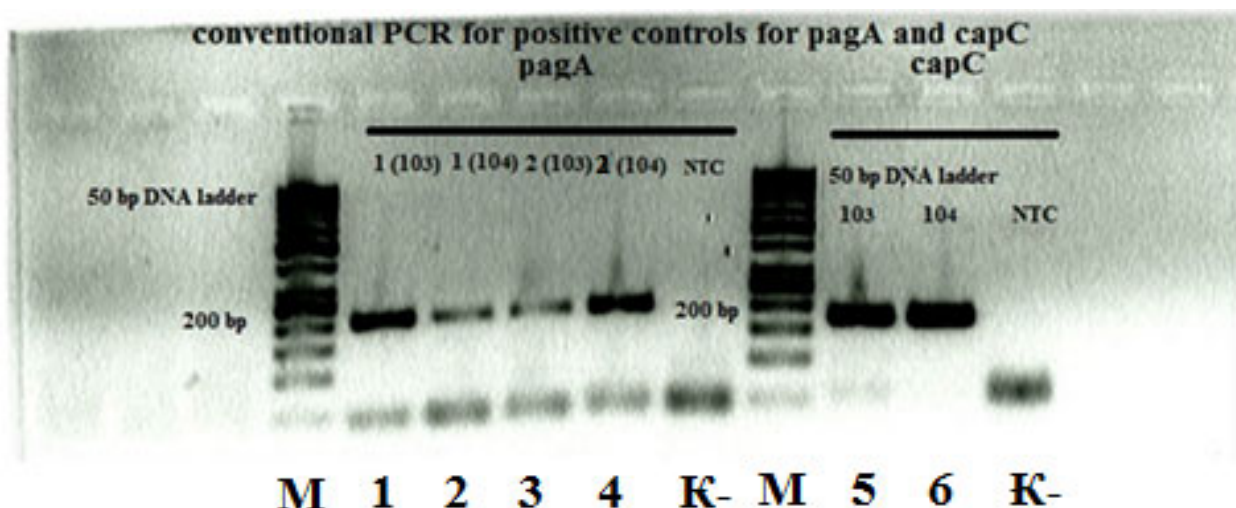


Рис. 4 – Результати ПЛР з позитивними клонами *pagA* та *capC*: М – маркер молекулярної маси ДНК довжиною 100-1000 п.н.; 1 - pTZ_pagA1 (Ames), 10^3 ; 2 - pTZ_pagA1 (Ames), 10^4 ; 3 - pTZ_pagA2 (№625), 10^3 ; 4 - pTZ_pagA2 (№625), 10^4 ; 5 - pTZ_capC (Ames) 10^3 ; 6 - pTZ_capC (Ames) 10^4 ; К- – негативні контрольні зразки.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За результатами молекулярного клонування, було отримано позитивні контрольні плазмідні ДНК для виявлення плазмід сибірки рХО1 (*pagA*), рХО2 (*capC*). За результатами горизонтального гел-електрофорезу після ПЛР, усі отримані плазмідні фрагменти ДНК мали характерну для кожного з них довжину (201 та 171 п.н. відповідно). Ці рекомбінантні контрольні зразки придатні для використання в ПЛР в режимі реального часу за температурах відпау від 57 до 62 °С, та можуть бути включені до складу діагностичних наборів для детекції геному та плазмід вищезазначеного збудника.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко О. П. Наявність спільних неблагополучних пунктів щодо сибірки та емфізематозного карбункулу – об'єктивна підстава для асоційованої імунізації тварин проти цих інфекцій (на прикладі західних областей України) / О. П. Бойко // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2013. – Вип. 14, № 3–4. – С. 121–126.
2. Скрипник В. Г. Стан біологічної безпеки щодо сибірки в Україні / В. Г. Скрипник, М. В. Безименний, А. В. Скрипник // Ветеринарна медицина. – 2012. – Вип. 96. – С. 58–60.
3. Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnostics / S. Inoue, A. Noguchi, K. Tanabayashi, A. Yamada // Japanese Journal of Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 57. – P. 29–32.

4. Bragg T. S. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (lef) from *B. anthracis* / T. S. Bragg, D. L. Robertson. // *Gene*. – 1989. – Vol. 81. – C. 45–54.
5. Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2 / R. Okinaka, K. Cloud, O. Hampton, A. Hoffmaster, K. Hill, P. Keim, T. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, D. Manter, Y. Martinez, D. Riche, R. Svensson, P. Jacksonat // *Journal of Applied Microbiology*. – 1999. – Vol. 87. – C. 261–262.
6. Ezzell J. W. Immuno-electrophoretic analysis, toxicity and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of *B. anthracis* toxin / J. W. Ezzell, B. E. Ivins, S. H. Leppla. // *Infection and immunity*. – 1984. – Vol. 45. – C. 761–767.
7. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis* / M. H. Antwerpen, P. Zimmermann, K. Bewley, D. Frangoulidis, H. Meyer // *Molecular and Cellular Probes*. – 2008. – Vol. 22. – C. 313–315.
8. Rapid detection method for *Bacillus anthracis* using a combination of multiplexed real-time PCR and pyrosequencing and its application for food biodefense / T. W. Janzen, T. C. Matthew, N. Goji, M. J. Shields, K. R. Hahn, K. K. Amoako // *Journal of Food Protection*. – 2015. – Vol. 78. – C. 355–361.

РАЗРАБОТКА ПОЗИТИВНЫХ ПЦР-КОНТРОЛЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПЛАЗМИД *BACILLUS ANTHRACIS* pXO1 И pXO2 / Белойван А.В., Стегний Б.Т., Солодянкин О.С., Герилович А.П.

*В статье приведены результаты изготовления рекомбинантных положительных контрольных образцов для детекции плазмид pXO1 и pXO2 возбудителя сибирской язвы методом ТА-клонирования и с использованием плазмидного вектора pTZ57R / Т. Фрагменты генов pagA плазмиды pXO1 и capC плазмиды pXO2 были амплифицированы методом ПЦР, имели длину 201 и 171 п.н. соответственно и были встроены в состав вектора pTZ57R / Т. Была осуществлена трансформация компетентных клеток *E.coli* штамма DH5α полученными ДНК. По результатам финальной ПЦР доказано, что полученные рекомбинантные контрольные образцы пригодны для использования и могут быть включены в состав диагностических наборов для детекции генетического материала данного возбудителя.*

Ключевые слова: сибирская язва, плазмиды, ДНК, клонирования.

DEVELOPMENT OF POSITIVE CONTROL ASSAYS FOR THE DETECTION OF *BACILLUS ANTHRACIS* PLASMIDS PXO1 AND PXO2 VIA PCR / Biloivan O.V., Stegnyy B.T., Solodianskin O.S., Gerilovych A.P.

Introduction. For today, anthrax remains to be one of the most dangerous anthroponozoonotic diseases, which pose a big threat to public and animal health. Despite the fact, that epizootic situation for anthrax in Ukraine remains stable, sporadic cases occur in all regions of the country. Capability of anthrax spores to remain viable in environment for decades is the one of factors affecting pathogenicity of this agent, and increases the possibility of its potential use as biological weapon. Generally, anthrax is diagnosed in cases, when amplicons with certain sizes are obtained after specific PCR for pag and cap genes, which encode pXO1 and pXO2 plasmids respectively. Positive controls prepared from standard *B. anthracis* strains are usually included into diagnostic PCR kits. However, using *B. anthracis* live strains requires BSL-3 laboratory to be available, as well as enhanced biosafety measures. Using of *B. anthracis* DNA as positive control for PCR also increases risk of cross-contamination and might negatively affect the results. To avoid such problems, it is reasonable to use recombinant control samples, and their production was a goal of our work.

Objective. To develop and prepare recombinant positive controls for the detection of pXO1 and pXO2 anthrax plasmids.

Materials and methods. *B. anthracis* DNA from Ames 3013 strain, as well as thermolysate of *B. anthracis* broth culture #625, obtained from Ukrainian Center of Diseases' Monitoring and Control (Kyiv).

Pag gene fragment of pXO1 plasmid was amplified using pagA_for and pagA_rev primers. As for cap gene fragment of pXO2 plasmid, it was amplified with capC_for and capC_rev primers. Both primer systems were developed at Bundeswehr Institute of Microbiology (Munich, Germany).

After gel-electrophoresis, obtained fragments were cut from agarose gel, purified and inserted into pTZ57R/T vector. *E. coli* DH5a competent cells were transformed with obtained inserts and seeded on LB-agar with 10 µg/ml of ampicillin. White colonies were transferred to LB-medium, centrifuged after 4 hours of growing and plasmids were extracted.

Results and discussion. Molecules were designed on the basis of pTZ57R/T cloning vector and inserts of *pagA* and *capC* with 201 and 171 bp length respectively. Molecules were constructed using Clone Manager software. Obtained pTZ_ *pagA* and pTZ_ *capC* molecules should have sizes 3087 and 3057 bp respectively.

PagA fragments were obtained via conventional PCR from two samples of *B. anthracis* DNA: Ames 3013 and sample from broth culture thermolysate #625. *CapC* fragment was obtained from one DNA sample of *B. anthracis* Ames 3013 strain. All samples were successfully ligated with DNA of pTZ57R/T and *E. coli* DH5a competent cells were transformed with obtained plasmids. Obtained colonies were studied in real-time PCR.

Plasmid DNA was extracted from each sample and diluted into concentrations of 1 thousand and 10 thousand copies per 5 µl. As the result of final conventional PCR, 201 bp (pTZ_ *pagA*1,2) and 171 bp (pTZ_ *capC*) fragments were obtained. These sizes are specific for *pagA* and *capC* genes of pXO1 and pXO2 plasmids respectively.

Conclusions and perspectives for further research. As the result of molecular cloning, positive DNA controls for the detection of pXO1 (*pagA*) and pXO2 (*capC*) anthrax plasmids were produced. As the result of gel-electrophoresis after PCR, all DNA fragments had specific length (201 and 171 bp respectively). These recombinant control samples are ready to use in conventional and real-time PCR with annealing temperatures from 57 to 62 °C. In addition, these samples will be included to diagnostic kits for anthrax genome and plasmid detection.

Keywords: anthrax, plasmids, DNA, cloning

REFERENCES

1. Bojko O. P. (2013) Najavnist' spil'nih neblagopoluchnih punktiv shhodo sibirki ta emfizematoznogo karbunkulu — objektivna pidstava dlja asocijovanoї imunizacii tvarin proti cih infekcij (na prikladi zahidnih oblastej Ukraini) [The presence of unsafety areas on anthrax and blackleg — is the reason for immunization of animals against these diseases (using the pattern of western regions of ukraine)]. *Naukovo-tehnichnij bjuleten' Institutu biologii tvarin i Derzhavnogo naukovo-doslidnogo kontrol'nogo institutu vetpreparativ ta kormovih dobavok* – Scientific and technical bulletin of the Institute of Animal Biology and the State Scientific and Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives, Vol. 14, 3-4, 121-126 [in Ukrainian].
2. Skripnik V. G., Bezimennij M. V. & Skripnik A. V. (2012) Stan biologichnoji bezpeki shhodo sibirki v Ukraini [The state of biological safety in relation to anthrax in Ukraine]. *Veterinarna medicina. – Veterinary medicine*, 96, 58-60 [in Ukrainian].
3. Inoue S., Noguchi A., Tanabayashi K. & Yamada A. (2004) Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnostics. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 29-32 [in English].
4. Bragg T. S. & Robertson D. L. (1989) Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *B. Anthracis*. *Gene.*, 81, 45–54 [in English].
5. R. Okinaka, K. Cloud, O. Hampton at all (1999) Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2. *J Appl Microbiol.*, 87, 261–262 [in English].
6. Ezzell J. W., Ivins B. E. & Leppla S. H. (1984) Immuno-electrophoretic analysis, toxicity and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of *B. anthracis* toxin, *Infect Immun.* – 45, 761–767 [in English].
7. Antwerpen M. H., Zimmermann P., Bewley K. at all (2008) Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Molecular and Cellular Probes*, 22, 313–315 [in English].
8. Janzen T. W., Matthew T. C., Goji N. at all. (2015) Rapid detection method for *Bacillus anthracis* using a combination of multiplexed real-time PCR and pyrosequencing and its application for food biodefense. *Journal of Food Protection*, 78, 355–361 [in English].