С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2.** - С.21-25

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ И ТИПИРОВАНИЯ *LEPTOSPIRAINTERROGANSHA* ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

***Ермагамбетова С.Е.**, к.в.н., профессор*
***Киркимбаева Ж.С.**, д.в.н., профессор*
***Нургожаева Г.М.**, к.в.н.*
Казахский национальный аграрный университет, г.Алматы

Введение. Наиболее перспективным способом выявления лептоспир от животных – бактерионосителей, продуктов животных является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на амплификации invitro специфических последовательностей ДНК и отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью. Преимуществом этого метода является возможность диагностики заболевания на ранних стадиях развития, в инкубационном периоде и при течении в скрытой, нетипичной форме, а также определять генетическое родство возбудителей [1,2].

Материалы и методы. Объектом исследования явились 8 штаммов лептоспир (L. pomona, L. tarassovi, L. grippotyphosa, L. hebdomonas, L .serjoe, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. australis) для использования их для идентификации возбудителей инфекционных болезней на основе выявления их генетического материала в пробах. Штаммы депонированы в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (РГП КН МО и Н РК).

Морфологические свойства лептоспир изучались путем микроскопирования препаратов “раздавленная капля” в темном поле микроскопа. Для этого нами использованы современные микроскопы LevenchukMT 42002 с темнопольным фильтром для конденсора, Levenchuk Д870Т, микроскоп LEICA DM 4000 B.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования по качественному и количественному анализу показали, что при выделении ДНК из клеток лептоспир хорошие результаты дают использование автоматической станции выделения НК -ThermoScientificKingFisher, метод обработки бактериосодержащей суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К, а также метод выделение ДНК из клеток лептоспир с помощью тритона Х-100. Способы позволяют получить высокоочищенную хромосомную ДНК из клеток

лептоспир в препаративном количестве пригодный для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для клонирования.

Образцы ДНК из клеток лептоспир, полученные выше указанными методами были высокого качества, которые использованы для проведения рестрикционного анализа с целью фрагментации бактериальной ДНК лептоспири определения ее молекулярной массы.

Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК.

Были проведены эксперименты по выбору оптимальных ферментов рестрикции ДНК Leptospirainterrogans и подбору оптимальных условий рестрикции. В экспериментах при выборе ферментов для расщепления ДНК Leptospirainterrogans использовали рестриктазы HpaI, EcoRI, HindIII. Характеристики рестриктаз представлены в таблице 1.

После расщепления ферментом HpaI, у всех изолятов были идентичные шаблоны к серогруппы Leptospirainterrogans. Различия между штаммами были четко обнаружены при использовании HpaI, чем при использовании фермантаEcoRI. Аналогичные результаты наблюдались, когда использовались другие ферменты рестрикции, но лучшие идентификации были получены с HhaI и EcoRI.

Результаты этого исследования показывают, что HpaI может быть использован в качестве надежного инструмента для классификации лептоспир серогруппы Leptospirainterrogans. Наше исследование показывает, что не было никакой разницы в рестрикционной среде штаммах серогруппы Leptospirainterrogans. Обнаружены незначительные различия между сероварами Pomona, Tarassovi, Hebdomadis. Это приводит к мысли о стабильности генома организмов.

Таблица 1 - Характеристика использованных в работе рестрикционных эндонуклеаз

Рестриктазы	Изошизо-меры	Ионная сила	Сайты узнавания	образование концов	Температура инкубации, С
HpaI	—	Высокая	GTTAAC	тупые	37-
EcoRI	—	Средняя	CTTAAG	липкие	37
HindIII	—	Низкая	TTCGA	липкие	37

Дальнейшие наши исследования посвящены конструированию оптимальных специфических праймеров для амплификации участка геномной ДНК возбудителей лептоспироза.

Конструирование праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме Leptospira interrogans. Первоначально необходимо выбрать ген-мишень к которому будут подбираться специфические праймеры. Как правило, праймеры подбираются к наиболее консервативным участкам генома возбудителя.

Подбор олигонуклеотидных последовательностей пар праймеров производили на основании результатов анализа опубликованной нуклеотидной последовательности гена, кодирующего синтез липопротеина наружной мембраны лептоспир LipL32, а праймерв синтезированные на основании – гена, кодирующего синтез липопротеина LipL32 (GenBank – L46794) с помощью компьютерной программы DNASIS MAX 1.0. Для моделирования праймеров использовалось программное обеспечение Lasergene 6.0.

При подборе праймеров учитывали все возможные критерии, влияющие на дальнейшую амплификацию, а именно: длина праймера в пределах 18-24 нуклеотидов; высокая специфичность на 3'-конце праймера; состав GC оснований не более 60 % и не менее 40 %; отсутствие димеров, повторов и вторичных структур; разница не более 3-5 ^{0}C между температурами плавления праймеров и размер ПЦР продукта в пределах 200-600 п.о.

В ходе экспериментов была отобрана одна пара праймеров, которая была обозначена LipL32 (прямой) и LipL32- R(обратный). Данные праймеры ограничивали участок ДНК размером 474 п.о. Краткая характеристика данных праймеров и их последовательности представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Структура праймеров на ген LipL32 серогруппы Leptospira interrorgans

Праймеры	Поседовательность праймеров	Длина	$T_{плав}$
LipL32 прямой	5'- ATCTCCGTTGCACTCTTTGC -3'	20	54,3
LipL32 обратный	5'- ACCATCATCATCATCGTCCA -3'	20	53,2

Фланкирующий праймерами участок ДНК размером порядка 474 п.н был проверен с помощью программы BLAST (on-linefree).

Результаты проверки показали, что нуклеотидная последовательность теоретически образуемого ПЦР-продукта соответствует Leptospira interrorgans.

Синтез праймеров проводился стандартным фосфоамидитным методом на автоматическим синтезаторе ДНК/РНК, модель «Н6» немецкой компании «K&ALaborgeraete».

Очистка продукта (праймеров) от побочных примесей проводился путем гель-фильтрации на колонках Centri•Pure N10 (empBiotechGmbH, Германия). Полученные таким образом синтезированные праймеры разводили до концентрации 20 пмоль и использовали для проведения ПЦР.

Концентрацию праймеров в маточном растворе определяли спектрофотометрическим методом.

Далее концентрацию праймеров подбирали экспериментально (от 10 до 30 пикомолей). Диапазон температур отжига праймеров определяли заданной программой OLIGO 4.0±3-5^{0}C.

Очень важным и сложным этапом при разработке метода ПЦР является подбор и отработка параметров температуры и времени циклов амплификации.

Подбор температуры отжига праймеров осуществлялся экспериментально в интервалах от 52 до 67^{0}C. В результате остановились отжига праймеров 60 ^{0}C.

На основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров времени и температур для всех стадий амплификации, был составлен следующий режим для проведения ПЦР: Преденатурация - 94 ^{0}C – 3 минут; Денатурация -94^{0}C- 1 минут, отжиг - 90 секунд; Синтез -72 ^{0}C – 20 минут; Всего 30 цикл; Пост-репликация 72 ^{0}C – 10 минут.

После того как были определены временные и температурные условия амплификации, проводили оптимизацию содержания компонентов в реакционной смеси и отработку ПЦР.

Концентрация $MgCl_2$,KCl и pH буфера в значительной степени определяют специфичность и чувствительность ПЦР. В случае изменения параметров буфера для ПЦР происходит качественное или количественное изменение получаемого амплификата.

Концентрация $MgCl_2$ влияет на отжиг праймеров, денатурацию образца, кроме того, $MgCl_2$ необходим для поддержания активности Taq-полимеразы. Однако, избыток хлорида магния может вызывать получение неспецифического амплификата. Трис-HCl и KCl обеспечивают необходимую ионную силу и pH смеси. Хлорид калия является активатором ПЦР и его добавляют для улучшения отжига праймеров. Предельной концентрацией KCl является 50 мМ, так как последующие увеличение может привести к ингибированию полимеразы.

Оптимизация концентраций $MgCl_2$, KCl и pH буфера может приводить к увеличению выхода амплификата и уменьшению выхода неспецифического продукта.

В настоящее время имеются наборы для оптимизации ПЦР, разработанные различными фирмами. Рабочие концентрации перечисленных выше соединений подбирали экспериментальным путем в процессе оптимизации условий реакции, используя набор для оптимизации ПЦР – "PCROptimizationKitII" фирмы "Sigma".

В результате экспериментов по оптимизации концентрации компонентов реакционной смеси позволили использовать реакционную смесь для амплификации ДНК объемом 25 мкл следующего состава: KCl – 2,5 мкл;$MgCl_2$ - 1 мкл; Taq полимераза - 0,5 мкл; dNTP -0,5 мкл; H_2O -17,5 мкл; Праймер LipL32 F (20 пмоль) – 0,5 мкл; Праймер LipL32 R (20 пмоль) – 0,5 мкл и ДНК патогенных штаммов лептоспир - 2 мкл.

Амплификацию специфического участка проводили на термоциклере Mastercyclergradient при следующих режимах.

По завершению наработки ДНК, полученные пробы детектировали электрофорезом в 2 % агарозном геле, приготовленной на ТБЕ буфере в присутствии бромистогоэтидия.

Полученные результаты показывают, что при использовании различных буферных систем происходит наработка ПЦР-продукта размером 474 п.о., представленная на рисунке яркими и четкими полосами.

Аналитическую чувствительность ПЦР определяли путем внесения в реакционную смесь 10-ти кратные разведения ДНК штамма Leptospira Pomona от 5 нг до 0,005 пг. При этом использовали разработанные оптимальные температурные и временные условия реакции, с целью определения преимущества метода ПЦР по сравнению с традиционными методами.

Разведенный ДНК штамма L. Pomona: 1- 0,005 пг; 2 – 0,05 пг; 3-0,5 пг; 4-5 пг; 5-50пг; 6- 500 пг; 7-5 нг; М – ДНК маркер pUC19 DNA/Mslp (Hpall).

Порог чувствительности метода ПЦР для выявления ДНК лептоспир составил 0,5 пг в пробе. Полученные нами данные показывают высокую специфичность разработанного метода ПЦР.

Специфичность разработанной тест-системы ПЦР подтверждается отрицательными результатами исследования ДНК организмов других таксономических групп.

Изучена распространенность гена LipL32 у различных возбудителей болезней, с использованием «исторической коллекции» нашей лаборатории полевых и референтных штаммов: Escherichia coli, Salmonella dublin, Salmonella typhimurium, Lysteria monocytogenes, а также у сапрофитных геном видов лептоспир: L. Biflexa.

При исследовании специфичности ПЦР тест-системы с использованием выше перечисленных штаммов фрагмент гена размером 474 п.н., кодирующего липопротеин LipL32 не выявлялся.

Так как повторы опытов проводились не менее трех раз с каждым образцом ДНК, то утверждение о том, что данный ген выявляется у патогенных геномвидов лептоспир и не выявляется у сапрофитных (L. Biflexa), является статистически значимым.

Полученные нами результаты соласуются с данными HaakeD.A. и соавт. (2000), Земская М.С. (2009), показавшим наличия экспрессии липопротеина у 14 штаммов – представителей геномвидов L. Interrogans и отсутствия ее у представителей геномвидов L. Biflexa.

Результаты наших исследований по определению чувствительности и специфичности не уступают аналогичным работам зарубежных ученых. Значение порога чувствительности 0,5 пг в пробе, длина ПЦР-продукта составляет порядка 474 п.о. и сокращение времени проведения диагноза повышают диагностическую ценность отработанного метода.

На основании разработанного метода ПЦР был составлен опытный образец тест-системы для выявления лептоспироза животных в биологическом материале, с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Выводы. Разработанные нами тест-системы ПЦР обладают высокой чувствительнсотью, специфичностью и воспроизводимостью, которые дают возможность проведения индикацию лептоспир в клиническом материале и в объектах окружающей среды.

Список литературы

1.Otaka, D. Y., G. Martins, C. Hamond, B. Penna, M.A. Medeiros, W. Lilenbaum. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. Veterinary.2012. Record published online, March 16. doi: 10.1136/vr.100490.

2.ПавленкоА.Л. Особенности эпидемиологи и лептоспирозана современном этапе // Симферополь, Запорожский медицинский журнал.- 2013. №6. С. 63-69.