

С. Сейфуллиннің 125 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 15: Жастар, ғылым, технологиялар: жаңа идеялар мен перспективалар» атты халықаралық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии - новые идеи и перспективы», приуроченной к 125 летию С. Сейфуллина. - 2019. - Т.1, Ч.1 - С.89-91

РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПИСТОРХОЗА И МЕТОРХОЗА

Смагулова А. М., Киян В. С.

Молекулярные методы становятся все более важными в изучении и управлении генетическими ресурсами. Так при идентификации нуклеотидной последовательности разных представителей организмов данные методы позволяют определить генетические вариации в геноме, что в дальнейшем способствуют идентификации не только их видовой принадлежности, но и территориальной распространённости. Применение данных методов при изучении трематод семейства *Opisthorchiidae* облегчает расшифровку генома, и вносить большой вклад в филогению данного семейства [1,2].

Регулярное медицинское и паразитологическое обследование пострадавших пациентов обычно не позволяет различать описторхоз и меторхоз. В Казахстане обычный диагноз «описторхоз» ставится вне зависимости от того, каким из видов *Opisthorchiidae* заражен человек, что приводит к некорректному назначению лечения. Основной акцент лечения направлен на очистку печени, которая является основной локализацией *Opisthorchis felinus*, а локализация *Metorchis bilis* – это желчный пузырь и его протоки, что не учитывается при лечении [3-6]. Для решения данной проблемы необходима разработка специфических праймеров на основе перспективных участков генома для детекции и дифференциальной идентификации *O. felinus* и *M. bilis*.

Целью данной работы является разработка специфических праймеров для идентификации возбудителей описторхоза и меторхоза.

Проведя сравнительный анализ перспективных участков генома возбудителей описторхоза и меторхоза на территории Акмолинской области с нуклеотидными последовательностями из всемирной базы данных GenBank был разработан дизайн специфических праймеров (рисунок 1).

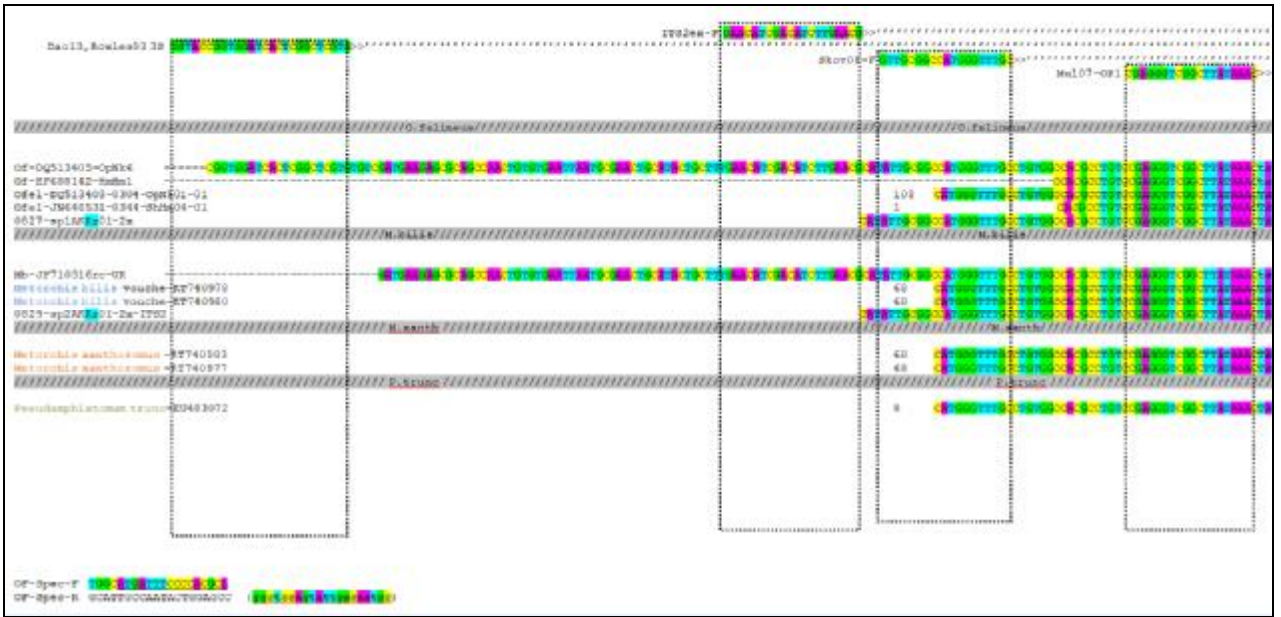


Рисунок 1 – Разработка дизайна праймеров

На данном рисунке изображена схема дизайна праймеров и их выравнивание согласно нуклеотидной последовательности и специфичности. В основе данного метода лежит сравнение нуклеотидных последовательностей ДНК, выделенные на территории Акмолинской области, с ДНК выделенные на территории стран ближнего и дальнего зарубежья.

Было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей для обнаружения перспективных участков генома возбудителя *O. felineus*, на основе которых были разработаны видоспецифические праймеры. Была проведена проверка праймеров на образования димеров (рисунок 2).

3' CCGAGGTCATAACCGTTACG 5'

5' TGGCATGATTTCCCCACGCCAANNNNNNNNNGGCTCCAGTATTGGCAATGCCAATC 3'

W H D F P T * * * * G S S I G N A F

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Activity [μg/100]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	91	1	20	67.3	55.0	33.5	1	--
Anti-sense	91	50	20	60.5	55.0	32.7	1	--
Product	67	--	50	81.2	54.0	--	--	50.0

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer	Most Stable Cross Dimer: ΔG = -10.1 [kcal/mol]
Sense	None	Found	None	Found	5' TGGCATGATTTCCCCACGCCA 3' 3' CCGAGGTCATAACCGTTACG 5'
Anti-sense	None	Found	None	Found	

Most Stable Dimer:
ΔG = -5.4 [kcal/mol]

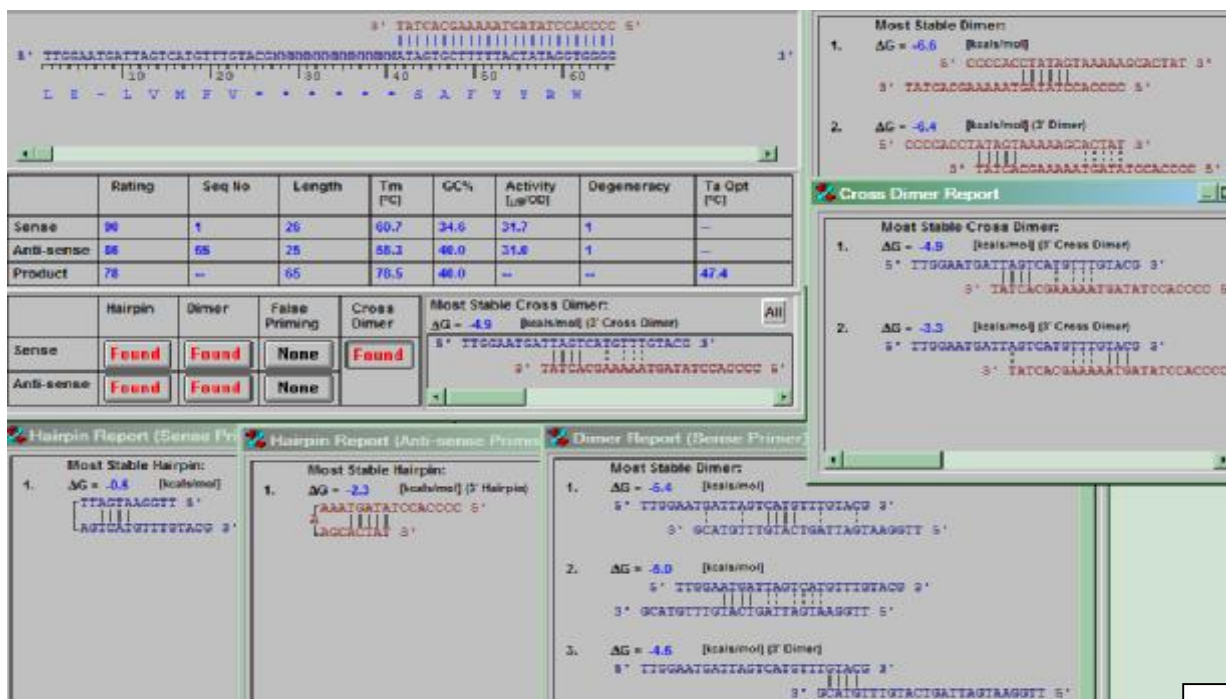
5' GCATTGCCAATACTGGAGCC 3'
3' CCGAGGTCATAACCGTTACG 5'

Dimer Report (Sense Primer)

Most Stable Dimer:
1. ΔG = -5.4 [kcal/mol]

5' TGGCATGATTTCCCCACGCCA 3'
3' ACGCACCCCTTATAGCGT 5'

A



Б

Рисунок 2 – Определение димеризации праймеров

На рисунке 2 изображены основные моменты работы в программе «SensePrimer», где проводят определение и устранение образования димеров между праймерами. Кроме этого, были определены основные характеристики разрабатываемых праймеров, среди которых их длина и оптимальная температура отжига.

В таблице 1 представлена уникальная нуклеотидная последовательность праймеров возбудителя *O. felineus*, позволяющая проводить дифференциальную диагностику по двум участкам генома - *ITS2* и *CO1*.

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательностей видоспецифических праймеров

Участок генома	Name	DNA (5' → 3')	Size	Tm (°C)
ITS2	OF-Spec-F	TGGCA-TGATT-TCCCC-ACGCA	20	60
	OF-Spec-R	GCATT-GCCAA-TACTG-GAGCC	20	57
	MB-Spec-F	TGGCA-TGATT-TCCCC-GCACG	20	61
	MB-Spec-R	CGCGC-ACATA-CACAA-CAATA-AG	22	55
CO1	CO1nOf-F	TTGGA-ATGAT-TAGTC-ATGTT-TGTAC-G	26	54
	CO1nOf-R	CCCCA-CCTAT-AGTAA-AAAGC-ACTAT	25	54
	COIn-Fw	TGTTA-ATATT-GCCGG-GGTTT-G	21	54
	COInMb-R	TTTAT-CCCAG-TAGGA-ACACC-	26	54

		ТАТАА-С		
--	--	---------	--	--

Таким образом, был разработан дизайн и проведен синтез видоспецифических праймеров на основе перспективных участков рибосомального (ядерного) и митохондриального генома для возбудителя *O. felineus* и *M. bilis*. С полученными праймерами отрабатываются параметры постановки ПЦР.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» на 2018–2020 гг

Список литературы

1. Young N.D., Jex A.R., Cantacessi C., Hall R.S., Campbell B.E., Spithill T.W., Tangkawattana S., Tangkawattana P., Laha T., Gasser R.B. A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, Fasciolagiganticae biological and biotechnological implications. // PLoSNegl. Trop. Dis. – 2011. –Vol.5. – P. 1004.
2. Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felineus*. // Parasitol. Int. – 2015. – Vol.65. – P.12-19.
3. Skrjabin K.I., Petrov A.M. Superfamily Opisthorchoidea Faust.// Essentials of Trematodology. – Moscow: Nauka. – 1950. – P. 81–328 (in Russian).
4. Sidorov E.G., Natural foci of opisthorchiasis. – Alma-Ata: NaukaKaz SSR, 1983 (in Russian).
5. Romashov B.V., Romashov V.A., Semenov V.A., Filimonova L.V. Opisthorchiasis in the Upper Don Basin (Voronezh Oblast): the liver fluke fauna, ecological and biological patterns of circulation and foci of Opisthorchiasis, Voronezh State University. – Voronezh, 2005 (in Russian).
6. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V., *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia.// Parasitol. Int. – 2012. – Vol.61. P. 25–31.