

УДК: 579.62

Ж.С. Абай, А.С. Нурпейсова, Р.Т. Абитаев, Г.Б. Токкарина,
К.А. Шораева, К.К. Жекебеков, М.М. Касенов, К.Д. Закарья

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
пгт. Гвардейский, Казахстан
e-mail: abaizh097@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ ПЦР ДЛЯ НАРАБОТКИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ

Аннотация. Туберкулез крупного рогатого скота – инфекционное респираторное заболевание крупного рогатого скота без особых клинических признаков, вызванное бактерией *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), которая может преодолевать межвидовой барьер, заражать и вызывать заболевания у многих других диких и домашних животных. Иммунизация крупного рогатого скота путем вакцинации является стандартной профилактической мерой при борьбе с туберкулезом. Единственной доступной в настоящее время вакциной против туберкулеза человека и крупного рогатого скота является живая аттенуированная бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ) и ее модифицированные варианты. Необходимость разработки отечественной вакцины, обеспечивающую более высокую и устойчивую защиту, чем вакцина БЦЖ, является актуальной. И целью данной работы является выбор оптимального компонентного состава реакционной смеси ПЦР для наработки протективных белков *M. bovis* Esat-6 и TB10.4. В результате работ по оптимизации постановки ПЦР для наработки микобактериальных генов *M. bovis* использовали в составе реакционной смеси Taq ДНК полимеразу, содержащую $MgCl_2$ – 0,3 мкл; 10х ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) по 1 мкл каждой, смесь dNTP (10 мМ) – 1 мкл; целевая ДНК – 5 мкл в общем объеме 25 мкл при оптимизированном режиме: 94°C – 5 мин, 94°C – 1 мин, 55/62°C – 40 сек, 72°C – 1,30 мин (35 циклов), и 72°C – 7 мин, 4°C – охлаждение и хранение бесконечно.

Ключевые слова: туберкулез крупного рогатого скота, вакцина, *M.bovis*, полимеразная цепная реакция.

Ж.С. Абай, А.С. Нурпейсова, Р.Т. Әбітаев, Г.Б. Тоққарина,
К.А. Шораева, Қ.Қ. Жекебеков, М.М. Қасенов, К.Д. Закарья

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»,
Гвардейский құк, Қазақстан

МИКОБАКТЕРИЯЛЫҚ ГЕНДЕРДІ АЛУ ҮШІН ПТР РЕАКЦИЯЛЫҚ ҚОСПАСЫНЫҢ ҚҰРАМЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Аннотация. Ірі қара мал туберкулезі – *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) бактериясынан туындайтын, ерекше клиникалық белгілері жоқ ірі қара малдың тыныс алу жолдарының жұқпалы ауруы. *M. bovis* тұраралық тосқауылдан өтіп, көптеген басқа жабайы және үй жануарларын жұқтырып, ауру тудыруы мүмкін. Ірі қара малды вакцинациялау арқылы

№8
2021

иммундау туберкулезге қарсы күресте стандартты профилактикалық шара болып табылады. Қазіргі уақытта адам және сиыр туберкулезіне қарсы жалғыз қол жетімді вакцина тірі әлсіретілген Кальмет-Герин бацилласы (БЦЖ) және оның модификацияланған нұсқалары болып табылады. БЦЖ вакцинасына қарағанда жоғары және тұрақты қорғанысты қамтамасыз ететін отандық вакцинаны әзірлеу қажеттілігі өзекті болып табылады. Бұл жұмыстың мақсаты *M.bovis* Esat-6 және TB10.4 қорғаныш ақуыздарын алу үшін ПТР реакциялық қоспасының оңтайлы құрамын таңдау болып табылады. *M.bovis* микобактериялық гендерін алу үшін ПТР параметрін оңтайландыру жұмыстарының нәтижесінде жалпы көлемі – 25 мкл реакциялық қоспаның құрамы: $MgCl_2$ бар Taq ДНҚ полимеразасы – 0,3 мкл; 10x ПТР буфері – 2,5 мкл; арнайы праймерлер (20 pM), әрқайсысы 1 мкл, dNTP қоспасы (10 mM) – 1 мкл; ДНҚ – 5 мкл анықталып, амплификацияның оңтайландырылған режимі анықталды: 94°C – 5 мин, 94°C – 1 мин, 55/62°C – 40 сек, 72°C – 1,30 мин (35 цикл), және 72°C – 7 мин, 4 °C – салқындату және шектеусіз сақтау.

Кілт сөздер: ірі қара мал туберкулезі, вакцина, *M. bovis*, полимеразды тізбекті реакция.

Zh.S. Abay, A.S. Nurpeisova, R.T. Abitaev, G.B. Tokkarina,
K.A. Shorayeva, K.K. Jekebekov, M.M. Kassenov, K.D. Zakarya

RSE «Research Institute for Biological Safety Problems», Gvardeyskiy, Kazakhstan

OPTIMIZATION OF THE PCR REACTION MIXTURE COMPONENT COMPOSITION FOR THE OBTAINING OF MYCOBACTERIAL GENES

Annotation. Bovine tuberculosis is an infectious respiratory disease of cattle without specific clinical signs, caused by the bacterium *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), which can cross the species barrier, infect and cause disease in many other wild and domestic animals. Immunization of cattle by vaccination is a standard preventive measure in the fight against tuberculosis. The only currently available vaccine against human and bovine tuberculosis is live attenuated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) and its modified variants. The need to develop a domestic vaccine that provides higher and more stable protection than the BCG vaccine is relevant. And the purpose of this work is to select the optimal component composition of the PCR reaction mixture for the production of protective proteins *M. bovis* Esat-6 and TB10.4. As a result of work to optimize the PCR setting for the obtaining mycobacterial genes of *M. bovis*, Taq DNA polymerase containing $MgCl_2$ – 0.3 μ l; 10x PCR buffer – 2.5 μ l; specific primers (20 pM) – 1 μ l each, dNTP mixture (10 mM)–1 μ l; target DNA – 5 μ l were used as part of the reaction mixture in a total volume of 25 μ l with optimized mode: 94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 55/62°C – 40 sec, 72°C – 1.30 min (35 cycles), and 72°C – 7 min, 4°C – cooling and storage indefinitely.

Key words: bovine tuberculosis, vaccine, *M. bovis*, polymerase chain reaction.

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота – инфекционное заболевание крупного рогатого скота (КРС), возбудителем которого является бактерия *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Туберкулез у КРС проходит как хроническое респираторное заболевание, но клинические признаки встречаются редко [1, 2].

Туберкулез КРС – зоонозное заболевание, которое может естественным образом передаваться от животных к человеку при определенных условиях. При наличии в мире всеобъемлющего плана ликвидации туберкулеза случаи заболевания людей, инфекцией

вызванным *M. bovis*, редки, но могут вызвать серьезные проблемы в развивающихся и некоторых развитых странах [3].

Возбудителем болезни является строго аэробная бактерия, которая неподвижна, не образует спор и устойчива к кислотам. За счет жирных элементов *M. bovis* обладает сильной устойчивостью к внешней среде и воздействию дезинфицирующих веществ [4, 5].

Для профилактики многих инфекционных заболеваний животных применяется их иммунизация вакцинами. Также и для туберкулеза КРС используется традиционная БЦЖ вакцина. Несмотря на значительные различия в эффективности вакцинации *M. bovis* БЦЖ у людей и КРС, она по-прежнему является единственной коммерчески доступной вакциной-кандидатом с потенциальными преимуществами в снижении распространения туберкулеза КРС в популяции КРС, а также снижает риск удаления целых стад. Одна из проблем, связанных с использованием БЦЖ для КРС, заключается в том, что вакцинированные животные могут реагировать на туберкулиновые кожные пробы.

Таким образом, целью настоящей работы является наработка микобактериальных генов *M. bovis* Esat-6 және TB10.4 для будущих работ по созданию рекомбинантных векторов, кодирующие вышеуказанные протективные белки.

Методы и материалы. В качестве объекта исследования был выбран штамм *M. bovis*-8.

Выделение ДНК. Микобактериальную ДНК выделяли стандартным тризольным методом. Для этого на 700 мкл Trizol (Invitrogen) добавили 300 мкл образца, вортексировали в течение 10-15 с, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее добавили 200 мкл хлороформа и вортексировали 10-15 с, затем инкубировали 2-3 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 15 мин при 12000 оборотах. Удалили супернатант, а в осадок добавили 300 мкл 96% этанола, вортексировали 10-15 с и инкубировали 2-3 мин при комнатной температуре, затем поставили на центрифугирование 10 мин при 1800 оборотах. Супернатант аккуратно удалили, в осадок добавили 1000 мкл цитрата Na⁺, вортексировали и центрифугировали 5 мин при 1800 оборотах (повторили еще один раз). В осадок добавили 1500 мкл 75% этанола, вортексировали и оставили 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 5 мин при 1800 оборотах. Супернатант удалили, а осадок сушили при 56°C в течение 10-15 мин до полного высыхания. Для элюции добавили 50 мкл деионизированной воды, вортексировали 10-15 с. Чистоту и количество выделенных образцов ДНК проверяли на микрообъемном спектрофотометре mySPEC (VWR) по отношению оптических плотностей при длинах волны 260 нм и 280 нм (E260/E280).

Праймеры были ранее синтезированы на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов DNA/RNA Synthesizer H-16 (K&A Laborgeraete, Германия) [6].

Проведение ПЦР. Для амплификации генов Esat-6 и TB10.4 использовали стандартную реакционную смесь объемом 25 мкл: Taq ДНК полимеразы, содержащая MgCl₂ – 0,3 мкл; 10x ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) Esat-6_FP_TAGATGACAGCAGCAGTGGGAATTTTCGCGGGTA и Esat-6_RP_AAGGAA TTCTGCGAACATCCCAGTGACGT – по 1 мкл каждой для Esat-6; Tb10.4_FP_CAGA TGTCGCAAATCACAACCTACCCCG и Tb10.4_RP_CAGTTGGCGGCTTCGGCGTGTCTG – по 1 мкл каждой для TB10.4; смесь dNTP (10 мМ) – 1 мкл; выделенная ДНК – 5 мкл; деионизированная вода – 14,2 мкл. Нарботка ПЦР продуктов проведена на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) согласно следующему режиму амплификации: 94°C – 5 мин, 94°C – 1 мин, 55/62°C – 40 сек, 72°C – 1,30 мин (35 циклов), и 72 °C – 7 мин, 4°C – охлаждение и хранение бесконечно.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК. Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в аппарате для горизонтального электрофореза Sub Sell GT (BioRad). Для электрофореза использовали 1,7% раствор агарозы в TAE-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи фотографирования

гелей, в гель документирующей системе GelDoc Go Imaging System (BioRad). В качестве маркера молекулярных масс использовали DNA Ladder 1kb фирмы Qiagen. Размер ПЦР продукта составляет 280 п.о. (TB10.4) и 285 п.о. (Esat-6).

Результаты и обсуждение. Проведено сравнительное изучение различных концентраций компонентов реакционной смеси ПЦР, так как качество и количество целевой амплифицируемой ДНК зависит от правильно подобранного температурного режима и концентрации компонентов реакционной смеси ПЦР.

Оптимизация концентрации смеси dNTP. Также провели ПЦР для определения оптимального расхода dNTP на одну реакцию (Рис.1).

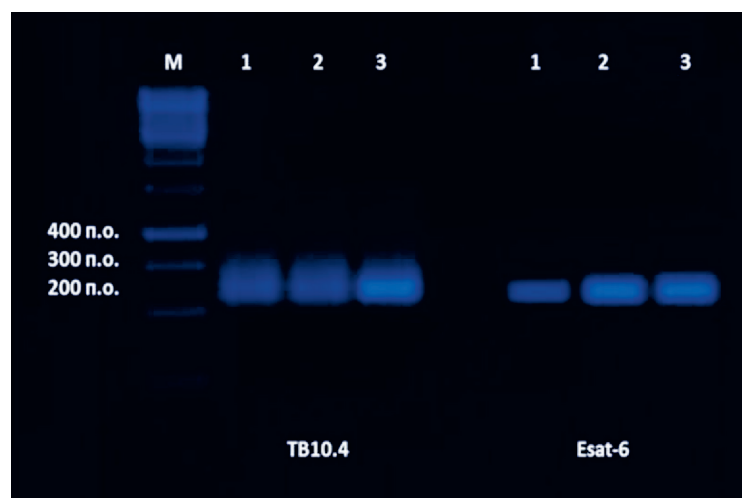


Рисунок 1 – Электрофореграмма оптимизации концентрации dNTP в реакционной смеси ПЦР
М – маркер «DNA Ladder 1kb» от Qiagen; 1 – 5 мМ; 2 – 10 мМ; 3 – 15мМ.

Как видно из электрофореграммы, различные концентрации смеси dNTP в пределах 5-15 мМ влияет на выход ПЦР-продукта. Для дальнейших постановок ПЦР в реакционной смеси использовали 10 мМ смеси dNTP.

Оптимизация концентрации Taq ДНК-полимеразы. Фермент ДНК-полимераза играет основную роль при проведении ПЦР. Концентрация Taq ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта (целевого гена). Для сравнения использовались 0.3, 0.5 и 1 мкл ДНК-полимеразы, содержащую в составе $MgCl_2$ (Рис.2).

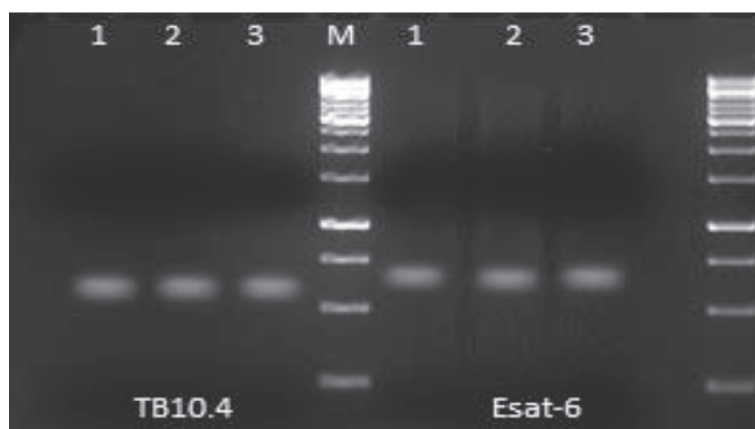


Рисунок 2 – Электрофореграмма оптимизации концентрации Taq ДНК-полимеразы, содержащую в составе $MgCl_2$, в реакционной смеси ПЦР
М – маркер «DNA Ladder 1kb» от Qiagen; 1 – 0.3 мкл; 2 – 0.5 мкл; 3 – 1 мкл.

Как видно из электрофореграммы все единицы ДНК-полимеразы активные по отношению выхода продукта. Учитывая ее стоимость, для дальнейших работ выбрано 0.3 мкл объема ДНК-полимеразы.

Выбор температурного режима. Канонические показатели температуры этапов амплификации: для денатурации – 90-95°C, для отжига праймеров – 40-65°C, для элонгации – 70-75°C. В результате проведенных нами работ для денатурации была выбрана – 94°C, как стандартную температуру плавления мДНК. Для преденатурации была выбрана 94°C в течение 5 мин.

Температура отжига праймеров является основным фактором, повышающая специфичность продуктов, при проведении ПЦР. У праймеров двух белков разная концентрация ГЦ связей, в соответствие разная температура отжига праймеров. Для использования при постановке ПЦР праймеры разводили до концентрации 20 пмоль (пМ). Для выбора оптимальной температуры отжига были выбраны следующие градусы для каждого белка: 52°C, 55°C, 58°C, 60°C и 62°C. Нарботка ПЦР продуктов проведена на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems). Полученные образцы анализировали в 1,7 % агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере (Рис.3, 4).

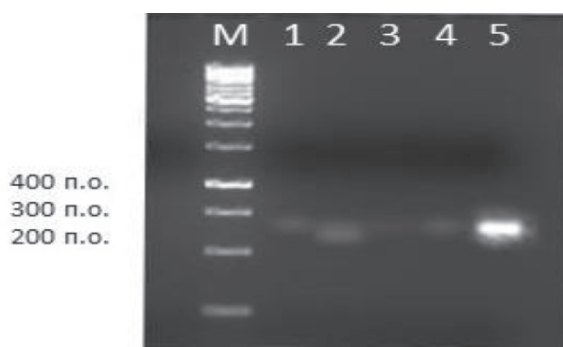


Рисунок 3 – Электрофореграмма оптимизации температуры отжига праймеров для Esat-6

М – маркер «DNA Ladder 1kb» от Qiagen;
1 – 52°C; 2 – 55°C; 3 – 58°C;
4 – 60°C; 5 – 62°C.

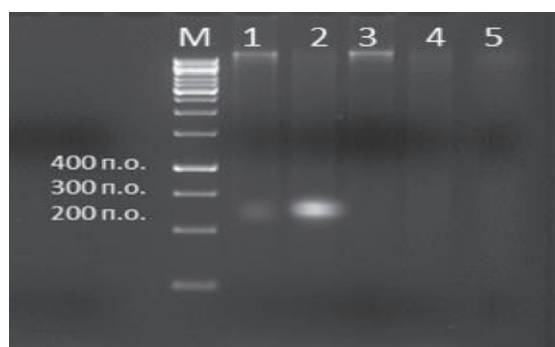


Рисунок 4 – Электрофореграмма оптимизации температуры отжига праймеров TB10.4

М – маркер «DNA Ladder 1kb» от Qiagen;
1 – 52°C; 2 – 55°C; 3 – 58°C;
4 – 60°C; 5 – 62°C.

В результате проведенных работ по оптимизации температурно-временного режима проведения ПЦР для наработки генов *M. bovis* были выбраны следующие параметры: пре-денатурация – 94°C – 5 мин, денатурация – 94°C – 1 мин, отжиг праймеров для Esat-6 – 62°C – 40 сек, отжиг праймеров для TB10.4 – 55°C – 40 сек, элонгация: 72°C – 1,30 мин (35 циклов), пост-элонгация – 72°C – 7 мин, охлаждение и хранение бесконечно при 4°C.

Таким образом, для наработки микобактериальных генов *M. bovis* методом ПЦР использовали реакционную смесь объемом 25 мкл: Taq ДНК полимеразы, содержащая $MgCl_2$ – 0,3 мкл; 10x ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) Esat-6_FP_TAGAT GACAGAGCAGCAGTGGGAATTTTCGCGGGTA и Esat-6_RP_AAGGAAT TC TGCGAACATCCCAGTGACGT – по 1 мкл каждой для Esat-6; Tb10.4_FP_CAGATGT CGCAAATCACAACCTACCCCG и Tb10.4_RP_CAGTTGGCGGCTTTCGCGTGTCTG – по 1 мкл каждой для TB10.4; смесь dNTP (10 мМ) – 1 мкл; выделенная ДНК – 5 мкл; деионизированная вода – 14,2 мкл. Постановка ПЦР была проведена по оптимизированному режиму: 94°C – 5 мин, 94°C – 1 мин, 55/62°C – 40 сек, 72°C – 1,30 мин (35 циклов), и 72°C – 7 мин, 4°C – охлаждение и хранение бесконечно.

Выводы. Правильная постановка ПЦР является основным источником наработки целевых генов для дальнейшей очистки и выделения из геля. Правильная постановка ПЦР очень важна для наработки целевых генов. С оптимизированным компонентным составом реакционной смеси ПЦР можно увеличить качество и количество выходящего продукта.

В процессе экспериментальных работ был получен оптимизированный протокол проведения ПЦР для наработки микобактериальных генов *M. bovis*, включающая в себя оптимальные концентрации праймеров по 20 пМ, смеси dNTP в 10 мМ, Taq ДНК полимеразы, содержащую $MgCl_2$ – по 0,3 мкл. Температурно-временной режим амплификации состоял из пре-денатурации при 94°C/5 мин, 35 циклов при 94°C/1 мин, 62-55°C/40 сек, 72°C/1,30 мин и пост-элонгации при 72°C/7 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pollock J.M., Neill S.D. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle // Vet J. – 2002. – P. 115-127.
2. Abbate J.M., Arfuso F., Iaria C., Arestia G., Lanteri G. Prevalence of Bovine Tuberculosis in Slaughtered Cattle in Sicily, Southern Italy // Animals (Basel). – 2020. – 1473 p.
3. Muller B., Durr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C.J., Parsons S.D., van Helden P.D., Zinsstag J. Zoonotic Mycobacterium bovis-induced tuberculosis in humans // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – P. 899-908.
4. Hewinson R.G., Vordermeier H.M., Smith N.H., Gordon S.V. Recent advances in our knowledge of Mycobacterium bovis: a feeling for the organism // Vet Microbiol. – 2006. – P. 127-139.
5. Domingo M., Vidal E., Marco A. Pathology of bovine tuberculosis // Res Vet Sci. – 2014. – P. 20-29.
6. Абитаев Р.Т., Шораева К.А., Нурпейсова А.С., Сырым Н.С., Абай Ж.С., Джекебеков К.К., Сармыкова М.К., Еспембетов Б.А., Касенов М.М. Подбор и синтез праймеров для наработки генов, кодирующих протективные белки *M. Bovis* // Евразийское Научное Объединение. Ветеринарные науки. – 2021. – С. 159-164.