

ISSN 2304-9081

Учредители:  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2014 \* № 3**

On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© И.А. Денисова, С.В. Андрющенко, 2014

УДК 579.873.13, 579.872.1

*И.А. Денисова, С.В. Андрющенко*

## **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ПЦР ДЛЯ РОДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ АКТИНОБАКТЕРИЙ**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Цель.* Оптимизация тест-системы идентификации бактерий родов *Bifidobacterium* и *Propionibacterium* с помощью системы двухфазной множественной ПЦР.

*Материалы и методы.* Выделенная из 8 штаммов бактерий *Bifidobacterium spp.* и 6 штаммов бактерий рода *Propionibacterium* из коллекции лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН матричная ДНК подвергалась тесту на родовую принадлежность методом множественной ПЦР с помощью праймеров, разработанных на основе вариабельности гена 16S РНК с помощью ДНК-амплификатора «Терцик МС2» (НПФ «ДНК-Технология»). Отладка алгоритма амплификации проводилась в управляющей программе «TherCyc 2.1». Детекция ампликонов производилось методом агарозного гель-электрофореза.

*Результаты.* Проведенная оптимизация алгоритма ПЦР путем повышения температуры отжига до 72°C и сокращения всех фаз процесса позволило уменьшить общее время протекания реакции с 60 до 40 минут.

*Заключение.* Оптимизация алгоритма амплификации применительно к возможностям конкретного оборудования и праймеров позволяет добиться сокращения времени амплификации на 1/3.

*Ключевые слова:* множественная ПЦР, облигатные анаэробы, актинобактерии, бифидобактерии, пропионибактерии

---

---

*I.A. Denisova, S.V. Andryuschenko*

## **THE OPTIMISATION OF MULTIPLEX PCR ALGORITHM FOR GENUS IDENTIFICATION OF ACTINOBACTERIA**

Institute of cellular and intracellular symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

*Aim.* To optimize PCR test-system of identification of Actinobacteria genus: *Bifidobacterium* and *Propionibacterium*.

*Materials and methods.* DNA matrix extracted from 8 strains of *Bifidobacterium spp.* and 6 strains of *Propionibacterium* (ICIS UrB RAS) and tested by multiplex PCR with primers to 16S RNA gene, in Thermal Cycler "MC2" ("DNA-technology", Russia). Amplification algorithm optimization was performed in «TherCyc 2.1» software. Detection of amplicons was performed by agarose gel electrophoresis.

*Results.* Amplification algorithm optimization by increase of the annealing temperature to 72C and by decrease of duration of all phases allowed us to reduce the time of reaction from 60 to 40 minutes.

*Conclusions.* Amplification algorithm optimization in accordance with properties of using equipment and primers is allow to decrease the amplification time on 1/3.

*Key words:* multiplex PCR, obligate anaerobes, actinobacteria, bifidobacteria, propionibacteria.

## **Введение**

Современные молекулярно-генетические способы определения таксономической принадлежности выделяемых микроорганизмов приобретают особое значение, прежде всего, в силу трудоемкости или невозможности культивирования многих представителей кишечной микробиоты человека [1], среди которых основу составляют облигатно-анаэробные бактерии [2]. Такой анализ может быть осуществлен как с использованием стандартных методов генотипирования по последовательности гена малой рибосомальной РНК [3, 4], так и путём поиска особых родоспецифичных генов [5].

Современные методы видовой идентификации живых организмов предполагают все еще достаточно затратный подход секвенирования последовательностей, полученных при помощи ПЦР с неспецифическими праймерами [4]. В то же время сама необходимость видовой идентификации бактерий в условиях чрезвычайной распространенности горизонтального переноса генов у прокариот представляется неочевидной [6]. Наиболее доступным для первичной (родовой) идентификации облигатных анаэробов представляется классический метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с родоспецифичными праймерами и его модификации: двухфазная и множественная полимеразная цепная реакция (мультиплекс-ПЦР), позволяющие значительно ускорить и оптимизировать рутинные исследования.

В связи с изложенным целью нашей работы стала оптимизация системы идентификации бактерий родов *Bifidobacterium* и *Propionibacterium* с помощью системы двухфазной множественной ПЦР.

## **Материалы и методы**

В работе использованы 8 штаммов бактерий *Bifidobacterium spp.* и 6 штаммов бактерий рода *Propionibacterium* из коллекции лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН.

Для оптимизации была использована тест-система на основе разработанных ранее пар праймеров для родовой идентификации облигатно-анаэробных актинобактерий (табл. 1).

Выделение матричной ДНК каждого исследованного штамма для ПЦР проводилось с использованием 0,1 мл смеси реагентов «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия) в программируемом твердотельном термостате «Терцик МС-2» (ООО «ДНК-технология», Россия) в течение 20 мин при тем-

пературе 98°C с последующим центрифугированием в микроцентрифуге «5415 D» («Eppendorf», Германия) при 16100 g в течение 0,5 мин. Полученный супернатант вносился в подготовленную реакционную смесь для ПЦР в объеме 5 мкл.

*Таблица 1.* Перечень праймеров, использованных в работе

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Длина, количество нуклеотидов
Bif F	ATGGGGTTCGCGTCCTATCAGG	21
Bif R	GGGCCCCACATCCAGCTTCGAG	26
Prb F	CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGA	24
Prb R	GTAGCATGCGTGAAGCCCTGGAGA	24

*Примечание:*

Bif – праймеры, родоспецифичные для *Vifidobacterium* spp.

Prp – праймеры, родоспецифичные для *Prorionibacterium* spp.

Реакционная смесь для ПЦР в объеме 15 мкл готовилась из набора праймеров и реагентов в составе: 2 мкл 25 мМ раствора магния хлорида или сульфата, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б, 1,6 мкл 2,5 мМ раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкл 10 мкМ смеси каждой пары праймеров, 0,2 мкл 5 ед/мкл раствора Taq-полимеразы и 8,2 мкл деионизованной воды. Реакция проводилась в ДНК-амплификаторе «Терцик МС-2». Температура фазы денатурации составила 92°C с длительностью от 10 до 5 с, температура фазы отжига-элонгации плавно увеличивались в диапазоне от 70 до 72,5°C, длительность элонгации – уменьшалась от 40 до 25 с [7]. В то же время количество циклов реакции было увеличено с 25 до 30 [8].

Получаемые ампликоны подвергались агарозному гель-электрофорезу [9]. С этой целью 18 мкл раствора, содержащего амплифицированную ДНК смешивали с 5 мкл 10-кратного буфера для внесения с бромфеноловым синим, и вносили в лунки 2 % агарозного геля. Электрофорез проводился в TBE-буфере однократной концентрации с 50 мкг/мл этидия бромида в качестве люминесцентного красителя при напряженности поля 10 в/см в течение 17 мин. Визуализация результатов разделения нуклеиновых кислот проводилась на установке гель-документирования «Vilber Lourmat» (Франция).

Экспериментальным контролем специфичности ПЦР тест-системы послужил модельный штамм облигатно-аэробного *Micrococcus luteus* № 2665

(ГИСК им. Л.А. Тарасевича), поскольку род *Micrococcus* филогенетически наиболее близок изучаемым бактериям и принадлежит тому же классу *Actinobacteria*.

### **Результаты и обсуждение**

Использование алгоритма ПЦР с температурой отжига 72°C и в количестве 30 циклов показало положительный результат и отсутствие неспецифических продуктов реакции во всех пробах с одной парой праймеров как для бифидобактерий, так и в случае пропионибактерий. В контрольных отрицательных пробах с ДНК-матрицей *Micrococcus luteus* ампликоны не обнаруживались.

Мультиплексирование разных праймерных пар в одной пробе при данной температуре показало отсутствие неспецифических ампликонов, образующихся в пробах с ДНК-матрицей бифидобактерий. После дальнейшего повышения сокращения длительности фаз ПЦР до указанных значений, специфические ампликоны сохранялись.

Поскольку применяемая температура отжига достигла оптимального значения для работы Taq-полимеразы, мы реализовали ускоренный алгоритм двухфазной ПЦР, что позволило в итоге достичь сокращения общего времени реакции с 70 до 45 минут. В то же время проведение отжига при температуре 72°C уже приводило к некоторому снижению количества получаемых ампликонов на ДНК-матрице бифидобактерий (рис. 1), однако это снижение компенсировано увеличением количества циклов амплификации до 30.



Рис. 1. Электрофореграмма результата 25 циклов множественной двухфазной ПЦР с двумя парами праймеров.

На следующем этапе работы проводилось последовательное сокращение времени фазы элонгации, начиная с 30 до 4 с, в результате чего установлено, что эффективность амплификации, определяемая по яркости люминесценции окрашенных бромидом этидия ампликонов, практически не снижалась вплоть до 16 с времени, отводимого на синтез новых цепей ДНК. В сочетании с уменьшением времени фазы денатурации с 10 до 5 секунд удалось достигнуть суммарной длительности процесса амплификации не более 40 минут.

### **Заключение**

Таким образом, предложенный алгоритм множественной двухфазной ПЦР позволяет ускорить работу системы родовой ПЦР-идентификации облигатно-анаэробных актинобактерий, выделяемых из кишечника человека на одну треть всего времени этапа амплификации ДНК.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Sun Zh., Baur A., Zhurina D. Accessing the Inaccessible: Molecular Tools for Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. 78(15): 5035–5042.
2. Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Вальшев А.В., Бухарин О.В. Видовая характеристика и факторы персистенции бифидофлоры кишечника в норме и при дисбиозах. *Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол.* 2009. 2: 89-93.
3. Krizova J., Shpanova A., Rittich B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of Bifidobacterium species. *Systematic and Applied Microbiology*. 2006. 29: 36–44.
4. Collado M.C., Hernandez M. Identification and differentiation of Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiological Research*. 2007. 162: 86-92.
5. Martín R., Jiménez E., Heilig H. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75 (4): 965-969.
6. Georgiades K., Raoult D. Defining Pathogenic Bacterial Species in the Genomic Era. *Front. Microbiol.* 2010. 1: 151.
7. Carman W.F., Kidd A.H. An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using *Thermus aquaticus* polymerase. *J Virol Methods*. 1989. 23 (3): 277-289.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР “в реальном времени”. М. БИНОМ. 2009. 223с.
9. Маниатис Т. Фрич Э. Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480с.

*Поступила 30.07.2014.*

*(Контактные данные: Андрющенко Сергей Валерьевич – кандидат мед. наук, старший научный сотрудник ИКВС УрО РАН; адрес: 460000, ул. Пионерская, 11; Тел.: (3532) 77590, 8-919- 846-56-61; E-mail: [rattus000@gmail.com](mailto:rattus000@gmail.com))*