

## 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.98-076:579.882.11:577.2.08

DOI 10.36016/VM-2020-106-13

### ПІДБІР ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ З МЕТОЮ ДЕТЕКЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ *CHLAMYDIA* SPP. ЗА ДОПОМОГОЮ РЕАКЦІЇ АМПЛІФІКАЦІЇ

**Павлов С. Л., Стегній Б. Т.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної  
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: psl600@i.ua*

У статті представлені результати біоінформатичного аналізу 112 послідовностей оперону 16s-23s рибосомальної РНК різних видів хламідій з метою пошуку консервативних ділянок, що є придатними для конструювання олігонуклеотидних послідовностей та флуоресцентного зонду для їх використання у ПЛР в режимі реального часу. Пошук послідовностей праймерів здійснювали за такою схемою: визначення таргетного гена та аналіз його варіабельності, пошук зон консервативності та обрання оптимальних регіонів для розрахунку праймерів. За результатами досліджень обрано послідовності, що фланкують ділянку довжиною 142 п. н. На підставі поглибленого *in silico* аналізу відповідності праймерів матриці та внутрішньовидової специфічності за допомогою FASTA *on-line* встановлено придатність для практичного використання двох праймерів та одного зонду для виявлення генетичного матеріалу хламідій різних видів

**Ключові слова:** хламідіоз, діагностика, ПЛР, праймери

Хламідійні інфекції є актуальною проблемою в багатьох галузях тваринництва. Іншим важливим аспектом цього комплексу захворювань є їхня потенційна зоонозність [1]. З метою діагностики хламідіозів запропоновано ряд тестів, орієнтованих на індикацію збудника (ізоляція в культурах клітин і курячих ембріонах), його антигену чи антитіл до нього (РЗК, ELISA) [2–4].

Розроблювані методики серологічної діагностики не дають можливості проводити пряме виявлення збудника в біоматеріалі, у той час як тривалість і трудомісткість культуральних тестів не дозволяють ефективно та швидко поставити діагноз. Можливості діагностики хламідіозів значно покращилися з впровадженням методів молекулярної діагностики.

ВООЗ та ряд ветеринарних служб різних країн (США, Канада) рекомендують з метою запобігання поширенню збудника проводити контролювання якості сперми (основного фактору передачі збудника) щодо контамінації хламідіями [4, 5]. Загалом ефективність детекції генетичного матеріалу збудників хламідіозів тварин було доведено великою кількістю досліджень щодо ПЛР-скринінгу різноманітних зразків клінічного матеріалу [5–7].

У зв'язку з вищезазначеним, актуальним і необхідним є поглиблене вивчення епізоотологічної ситуації щодо хламідіозу жуйних в Україні, дослідження тварин неблагополучних господарств з проведенням ізоляції збудника від хворих тварин і вивчення його властивостей, створення високоспецифічних тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у форматі реального часу, які дозволяють здійснювати раннє виявлення збудника хламідіозів та чинників ймовірних змішаних інфекцій.

**Метою роботи** було визначити перспективні послідовності консервативних ділянок геному хламідій з метою їх подальшого використання як праймерів у реакції ампліфікації.

**Матеріали та методи.** Пошук послідовностей праймерів здійснювали за такою схемою: визначення таргетного гена та аналіз його варіабельності, пошук зон консервативності та обрання оптимальних регіонів для розрахунку праймерів.

З метою обрання таргетного гена проводили завантаження вибірок послідовностей основних генів того чи іншого вірусу з баз даних нуклеотидних послідовностей GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

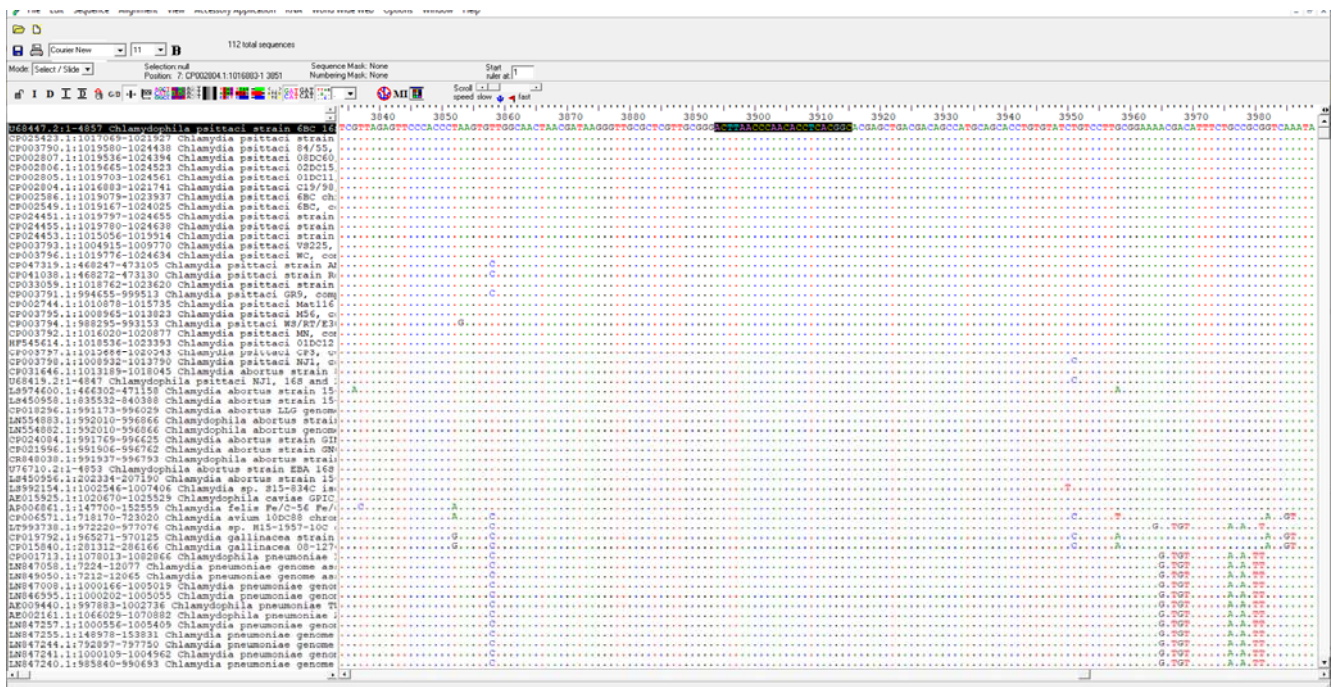
Кожну з вибірок аналізували у програмі BioEdit та проводили множинне вирівнювання із застосуванням модулю ClustalW (Boot Strap value = 1 000) [8]. Обрані консервативні ділянки аналізували з огляду на ступінь їхньої варіабельності.

Під час створення праймерних систем для індикації хламідій для розрахунку обирали консервативні ділянки генів, що відповідають за видо- і типоспецифічність, без вираженої варіабельності ( $\Delta H$  = від 0,00 до 0,40, сукупна варіабельність не більше 2 %). Розрахунок праймерних пар проводився за допомогою програми AmplifX v. 2.4 при параметрах різниці температур плавлення праймерів 3 °C та оцінці якості за здатністю утворювати димери у парі, аутодимери, GC-вміст, GC-вміст 3'-кінця, стабільності 3'-кінця тощо [9]. При цьому розраховані праймери аналізували щодо можливості відпаду на матриці всіх відомих секвенованих послідовностей у тій же програмі.

Пари, що були визначені як комплементарні до матриць, аналізували за допомогою програм BLAST та FASTA (on-line) з метою визначення показників якості та ймовірних перехресних реакцій з неспецифічними ДНК-матрицями (послідовності вірусів, фагів, бактерій, грибів, тварин, людини). Потім обирали 2–3 альтернативні пари з високими показниками якості та внутрішньовидової специфічності.

**Результати досліджень.** Для вибору перспективних ДНК-мішеней на першому етапі було проаналізовано роботи зарубіжних авторів, присвячених порівнянню повних геномів різних видів хламідій. Також вивчали опубліковані у відкритому доступі повні геноми та гени за допомогою баз даних послідовностей нуклеїнових кислот GenBank та біоінформатичних методів із застосуванням програмного забезпечення BioEdit v. 7.0. Було встановлено, що найбільш перспективним для подальшого дослідження є оперон 16s-23s рибосомальної РНК довжиною 4 857 п. н. [10, 11].

Для подальшого аналізу було завантажено 112 послідовностей зазначеного оперону різних видів хламідій та за допомогою програмного забезпечення BioEdit було здійснено множинне вирівнювання усіх послідовностей (рис. 1).



**Рис. 1.** Множинне вирівнювання послідовностей оперону 16s-23s rRNA *Chlamydia* spp.

Аналіз рівнів ентропії в досліджуваних послідовностях оперону після вирівнювання показав наявність двох загальноконсервативних ділянок. Сумарна ентропія ( $\Delta H$ ) за вказаними ділянками не перевищувала 0,2 на позицію. Довжина кожного з регіонів становила від 80 до 321 п. н. (рис. 2).

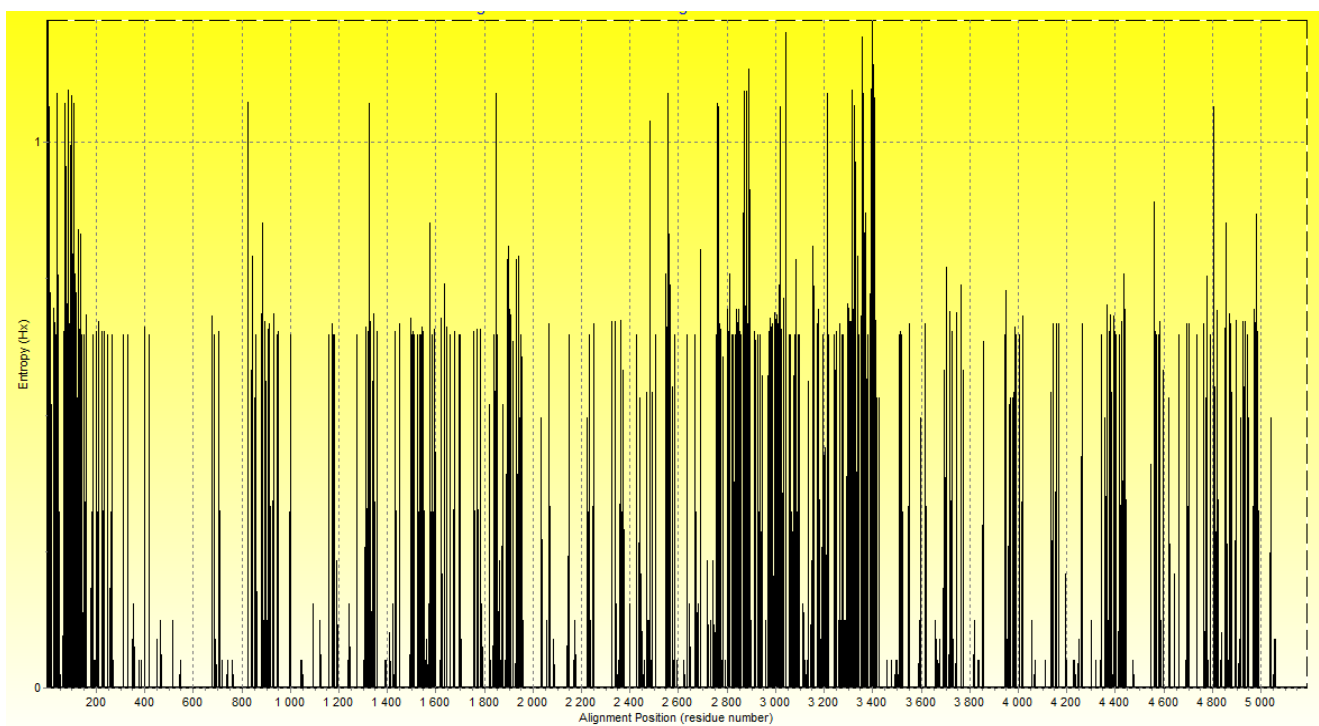


Рис. 2. Аналіз рівня ентропії послідовностей оперону 16s-23s rRNA *Chlamydia* spp.

Для конструювання праймерів було обрано регіон всередині оперону та за допомогою програми AmpliFх методом ітерацій визначили послідовності праймерів на основі їхніх термодинамічних характеристик — температури плавлення та ентальпії (рис. 3).

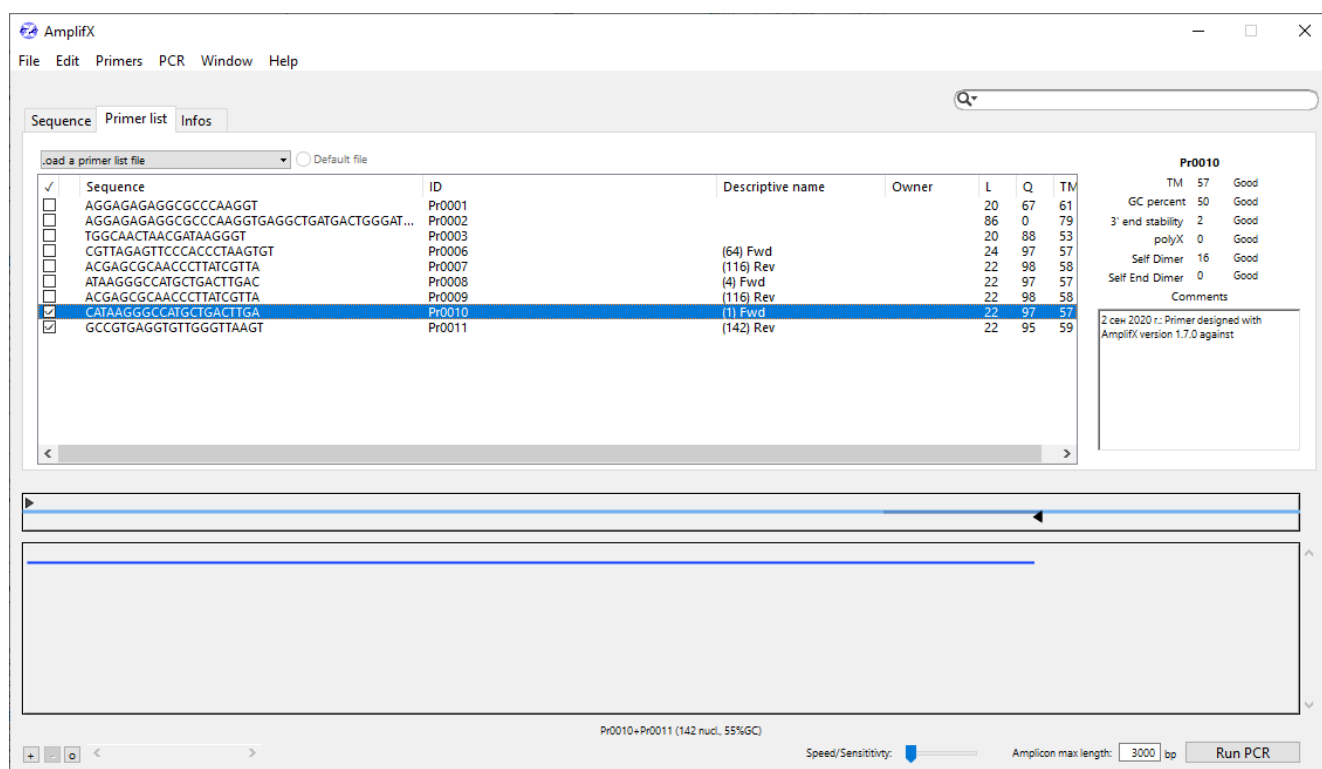


Рис. 3. Підбір праймерів за аналізу послідовностей оперону 16s-23s rRNA *Chlamydia* spp. у програмному забезпеченні AmpliFх.

Вибір праймерних послідовностей здійснювали таким чином, щоб вони фланкували ділянку від 100 до 150 п. н. та за можливості обрати послідовність зонду в її середині (рис. 4).

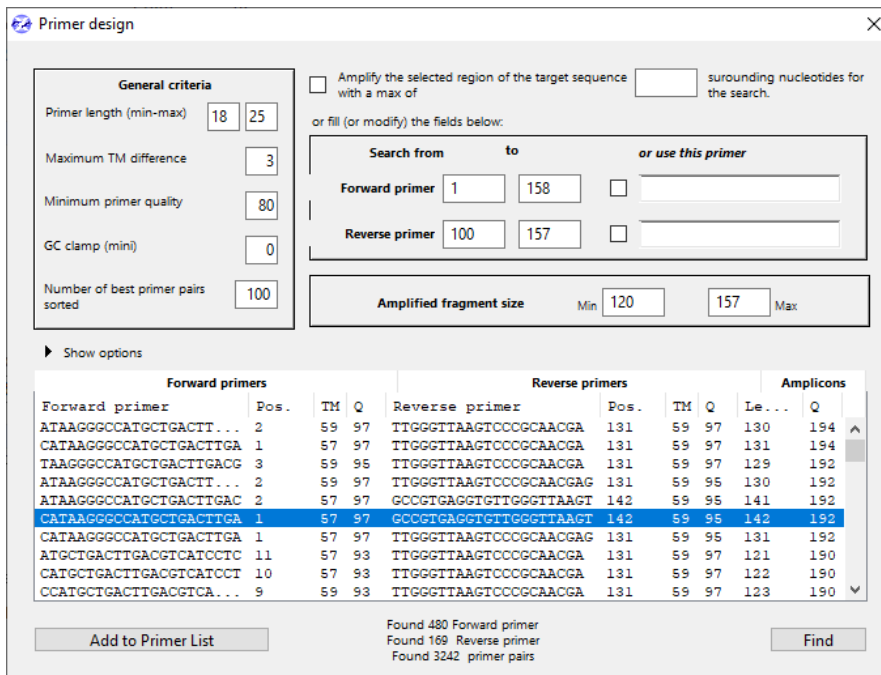


Рис. 4. Розрахунок пар праймерів за результатом опрацювання послідовностей оперону 16s-23s rRNA *Chlamydia* spp. у програмному забезпеченні AmpliFх.

Теоретичний аналіз отриманих пар щодо якості за параметрами утворення вторинних структур і термодинамічними характеристиками скоротив кількість передбачуваних праймерів до чотирьох варіантів.

На підставі поглибленого *in silico* аналізу відповідності праймерів матриці та внутрішньовидової специфічності за допомогою FASTA on-line встановлено придатність для практичного використання двох праймерів та одного зонду для виявлення генетичного матеріалу хламідій різних видів. Розраховані праймери мали температуру плавлення 57 та 59 °С, а фланковані ними фрагменти складали 142 п. н. (рис. 5).

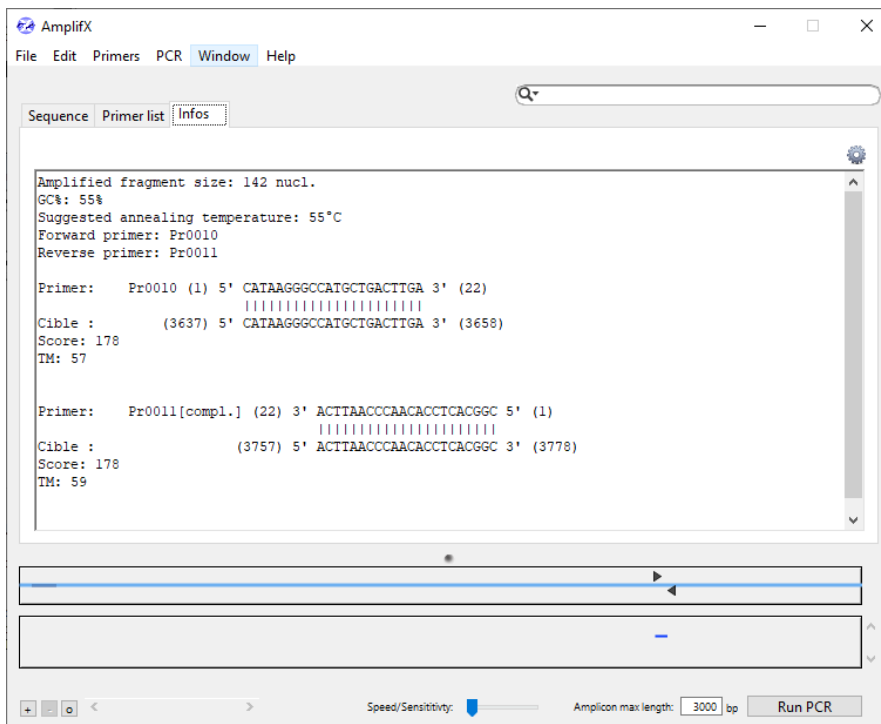


Рис. 5. Праймери для детекції генетичного матеріалу хламідій, розраховані у програмному забезпеченні AmpliFх.

Таким чином, оптимальними виявилися такі послідовності: прямий праймер Chlam\_F 5'-САТААГГССАТГСТГАСТТГА-3' (Tm = 57,18 °C), зворотній праймер ChlamR 5'-GCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGT-3' (Tm = 58,96 °C), які фланкують ділянку, довжиною 147 п. н. та олігонуклеотидний зонд Chlam\_Probe 5'-АСГАТААГГГТТГСГСТСГТТ-3' (Tm = 59,07 °C), який планується під час синтезу помітити флуоресцентним репортерним барвником FAM і гасителем флуоресценції ВНQ1.

**Висновок.** Проведені біоінформатичні дослідження дозволили сконструювати олігонуклеотидні послідовності та зонд на основі консервативних ділянок для оперону 16s-23s rRNA *Chlamydia* spp. для проведення ПЛР у режимі реального часу з метою виявлення генетичного матеріалу хламідій у зразках біологічного матеріалу тварин. Передбачається застосувати обрані послідовності для наступних випробувань в реакції ампліфікації.

### Список літератури

1. Krauss H. et al. Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, USA: ASM Press, 2003. P. 191–193. DOI: <https://doi.org/10.1128/9781555817787.ch2>.
2. OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 8<sup>th</sup> ed. Paris: OIE, 2018. 1833 pp.
3. Касич В. Ю., Фотина Т. И. Хламидиоз животных: этиология, распространение на северо-востоке Украины, средства специфической профилактики. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2010. № 3. С. 89–98.
4. Rodolakis A., Yousef Mohamad K. Zoonotic potential of *Chlamydia*. *Veterinary Microbiology*. 2010. Vol. 140, No. 3–4. P. 382–391. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.014>.
5. De Puyseleir K. et al. Development and validation of a real-time PCR for *Chlamydia suis* diagnosis in swine and humans. *PLoS One*. 2014. Vol. 9, No. 5. P. e96704. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096704>.
6. Wolff B. J., Morrison S. S., Winchell J. M. Development of a multiplex TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* in human clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018. Vol. 90, No. 3. P. 167–170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.014>.
7. Sachse K. et al. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*. 2009. Vol. 135, No. 1–2. P. 2–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>.
8. Tamura K. et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, No. 8. P. 1596–1599. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
9. Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S. A. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. P. 365–386. (Methods in Molecular Biology, Vol. 132). DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>.
10. Pantchev A. et al. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* from tissue samples. *Veterinary Journal*. 2009. Vol. 181, No. 2. P. 145–150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.025>.
11. Okuda H. et al. Detection of *Chlamydia psittaci* by using SYBR green real-time PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2011. Vol. 73, No. 2. P. 249–254. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0222>.

### SELECTION OF OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES FOR THE PURPOSE OF DETECTION OF GENETIC MATERIAL OF *CHLAMYDIA* SPP. BY THE REACTION OF AMPLIFICATION

**Pavlov S. L., Stegny B. T.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

*The article presents the results of bioinformatic analysis of 112 16s-23s rRNA operon sequences of different chlamydia species with the aim of conserved regions selection that are suitable for the construction of oligonucleotide sequences and a fluorescent probe for their use in real-time PCR. The search for primer sequences was carried out according to the following scheme: determination of the target gene and analysis of its variability, search for conserved regions and selection of optimal regions for primer design. According to the results of the research, the sequences flanking the 142 bp region were selected. Based on an in silico analysis of matrix primer correspondence and intraspecies specificity using FASTA on-line, suitability for the practical use of two primers and one probe for detection of chlamydia genetic material of different species was established*

**Keywords:** chlamydiosis, diagnostics, PCR, primers