

ПОДБОР ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *RHODOCOCCUS JOSTII* И *RHODOCOCCUS FASCIANS*

А. И. КОНЕВ¹, М. К. СЕРЕБРЕНИКОВА²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

E-mail: cjkln.47@mail.ru

Актинобактерии рода *Rhodococcus* являются доминирующим компонентом микробных сообществ нефтезагрязненных сред [1]. В связи с этим возникает необходимость разработки методов их детекции и идентификации среди большого многообразия микроорганизмов в окружающей среде. Для идентификации микроорганизмов широко используется ПЦР-диагностика, что обусловлено высокой специфичностью и чувствительностью, хорошей воспроизводимостью результатов, технической простотой и непродолжительностью анализа. Ключевым моментом использования метода ПЦР является наличие родо- и видоспецифичных праймеров, для создания которых в качестве матрицы широко используют участки 16S рПНК гена [2].

Целью исследования было подобрать видоспецифичные праймеры к актинобактериям рода *Rhodococcus* и проверить их пригодность для дифференциации родококков. В работе использовали типовые штаммы актинобактерий родов *Rhodococcus* (7 видов), *Gordonia* (3 вида), *Nocardioideis* (3 вида), *Corynebacterium* (4 вида). При конструировании праймеров проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК родококков, депонированных в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Проверку видоспецифичности разработанных праймеров проводили с помощью программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и LASERGEN PrimerSelect (DNASTAR, США), а также путем постановки ПЦР в амплификаторе MJ Cyclor (BioRad, США). Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл содержала 10 мМ ПЦР-буфер для *Taq*-полимеразы; 2 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ); 0,4 ед. *Taq*-полимеразу; 0,2 мкМ прямой и обратный праймеры; 1 мкл ДНК; деионизированную воду. Все реактивы производства «Синтол» (Россия). Для проведения ПЦР использовали подобранный с помощью программы BLAST температурно-временной профиль: предварительная денатурация – 95 °С (5 мин); 35 циклов: денатурация – 95 °С (30 с), отжиг – 64 °С (30 с), элонгация – 72 °С (1 мин); конечная элонгация – 72 °С (10 мин). При оптимизации условий ПЦР с целью увеличения специфичности разработанных праймеров температуру отжига варьировали от 55 до 66 °С. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Визуализацию результатов ПЦР проводили с использованием трансиллюминатора Gel Doc XR (BioRad, США).

После выравнивания последовательностей нуклеотидов и их анализа подобраны две пары праймеров для *R. jostii* (табл. 1). Анализ показал, что подобранные пары праймеров потенциально амплифицируются только с представителями *R. jostii*, *Corynebacterium* spp., *Amycolatopsis* spp., *Mycobacterium* spp., *Micrococcus* spp., но не других видов родококков. Таким образом, разработанные праймеры теоретически пригодны для инициации специфической амплификации.

Таблица 1

Последовательность и характеристики праймеров для *R. jostii*

Обозначение	Позиция, п.н.	Содержание ГЦ, %	Температура плавления, °С	Последовательность праймера (5'→3')	Размер продукта, п.н.
Rjo1	151–172	50	60	GGAAACTGGGTCTAATACCGGA	430
Rjo2	580–561	55	61	CACAAACGACGCGACAAACC	430
Rjo3	151–172	50	60	GGAAACTGGGTCTAATACCGGA	431
Rjo4	581–562	50	60	TCACAAACGACGCGACAAAC	431

Теоретически предположенная видоспецифичность разработанных праймеров проверена с помощью ПЦР. При температуре отжига 55 °С фрагмент ДНК искомого размера (430 п.н.) не обнаруживался в исследуемых образцах, включая положительный контроль. Последующее увеличение температуры до 64 °С, привело, наряду с положительной амплификацией ДНК-матрицы из *R. jostii* ИЭГМ 951^Т, к перекрестным реакциям с типовыми штаммами *R. erythropolis* ИЭГМ 691^Т, *R. piridinivorans* ИЭГМ 1055^Т, *R. fascians* ИЭГМ 414^Т, *R. imtechensis* ИЭГМ 940^Т, *R. opacus* ИЭГМ 716^Т, *R. wratislaviensis* ИЭГМ 1112^Т. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные праймеры не являются видоспецифичными.

С учетом полученных результатов подобрана новая пара праймеров к *R. jostii* для амплификации последовательностей длиной 434 н.п.:

Rjo5 (182–207 п.н.): 5'-CGGCTGCATGGCTGAGGGTGGAAAGG

Rjo6 (590–615 п.н.): 5'-ATCGCCTGCAGGCTCACAGTTGAGCT.

При тестировании данной комбинации праймеров при температуре отжига 64 °С отмечено снижение неспецифической амплификации с ДНК гетерологичных видов родококков. Об этом свидетельствует отсутствие ПЦР-продуктов ожидаемой длины с ДНК *R. fascians*, *R. piridinivorans* и *R. wratislaviensis*, обнаруживаемых при использовании праймеров Rjo1-Rjo2 и Rjo3-Rjo4. Однако в отношении других исследуемых родококков сохранялся неспецифический отжиг праймеров на ДНК.

В результате анализа и выравнивания нуклеотидных последовательностей 16S рДНК была разработана пара праймеров для вида *R. fascians* (табл. 2).

Таблица 2

Последовательность и характеристики праймеров для *R. fascians*

Обозначение	Позиция, п.н.	Содержание ГЦ, %	Температура плавления, °С	Последовательность праймера (5'→3')	Размер продукта, п.н.
Rfa1	160–185	50	67	CACAGCATGCATGTGTTGTGGTGGAA	423
Rfa2	557–582	54	68	CGAAGTTGAGCCCCGGGTTTCACAA	423

Теоретическая специфичность синтезированных праймеров, проверенная экспериментально, не подтвердилась из-за образования неспецифических продуктов с *R. erythropolis*, *R. imtechensis* и *R. opacus*. Также установлено, что изменение температуры отжига (снижение до 60 °С и увеличение до 66 °С) не способствовало увеличению целевой амплификации разработанных праймеров для *R. jostii* и *R. fascians*.

В дальнейшем планируется тестирование праймеров с более широким кругом родококков, в том числе недавно опубликованных видов, и оптимизация параметров ПЦР для увеличения специфичности разработанных праймеров.

Исследования поддержаны грантом РФН 14-14-00643.

Литература

1. Ившина И. Б., Пшеничков Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. 125 с.

2. Bell K. S. [et al.] Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. 1999. Vol. 87. P. 472–480.

ADJUSTMENT OF SPECIES-SPECIFIC PRIMERS FOR *RHODOCOCCUS JOSTII* AND *RHODOCOCCUS FASCIANUS*

A. I. KONEV¹, M. K. SEREBRENNIKOVA²

¹*Perm State National Research University, Perm*

²*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
The Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm*

Summary. A pair of primers was designed for *R. fascians*. Theoretical specificity of synthesized primers was not confirmed due to the formation of non-specific products in *R. erythropolis*, *R. imtechensis* and *R. opacus*. It was also found that the change in annealing temperature did not lead to increase the target amplification primers developed for *R. jostii* and *R. fascians*.

СИНТЕЗ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ (R)-АРИЛАЛКИЛСУЛЬФОКСИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *GORDONIA TERRAE* ИЭГМ 136

Т. И. КЫЛОВА¹, А. А. ЕЛЬКИН²

¹*Пермский государственный национальный исследовательский университет*

E-mail: tat-kylosova@yandex.ru

²*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь*

E-mail: an220@mail.ru

Энантимерно чистые сульфоксиды используются в асимметрическом синтезе в качестве активного центра, способного с высокой степенью стереоселективности контролировать различные химические реакции. В современной медицине известны препараты на основе различных сульфоксидов с выраженными антибактериальными, противовоспалительными, противоревматическими и ноотропными свойствами [1, 4]. Для направленного синтеза энантимерно однородных сульфоксидов наряду с химическим синтезом используются биотехнологические методы, которые позволяют получать оптически чистые сульфоксиды без применения агрессивных реагентов [6]. Известно, что в качестве биокатализаторов процесса сульфоксидирования могут применяться актинобактерии, обладающие высокоактивным оксигеназным ферментным комплексом. Ранее показано, что представители рода *Gordonia* и *Rhodococcus* катализируют окисление фенилметилового сульфида в оптически чистые (R)- и (S)-сульфоксиды [3]. Цель данной работы – исследование особенностей окислительной трансформации арилалкилсульфидов штаммом *G. terrae* ИЭГМ 136.

В работе использовали культуру *G. terrae* ИЭГМ 136 (GenBank: KF134399) из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ [2]. Биотрансформацию арилалкилсульфидов проводили в минеральной