

Министерство образования Республики Беларусь

Международный государственный экологический  
университет им. А.Д. Сахарова



---

Факультет экологической медицины

# **Типирование бактерий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

*Учебно-методические рекомендации  
к практическим занятиям по модулю  
специализации «Молекулярная эпидемиология»*

Минск  
2004

Автор-составитель:

кандидат биологических наук, доцент кафедры радиационной гигиены и эпидемиологии МГЭУ им. А. Д. Сахарова, ведущий научный сотрудник ИГЦ НАН Беларуси Д.П. Бажанов

Рецензент:

доцент, заведующая кафедрой генетики биологического факультета Белорусского государственного университета Н.П. Максимова.

Рекомендовано Советом Международного государственного экологического университета им. А.Д. Сахарова, №6 от 18.03.2004 г.

**Бажанов Д.П.**

**Типирование бактерий с помощью ПЦР.** Учебно-методические рекомендации к практическим занятиям по курсу «Молекулярная эпидемиология» / Автор-сост. Д.П. Бажанов. Мн. 2004. 16 с.

Методические рекомендации разработаны на основании базовой программы по модулю специализации «Молекулярная эпидемиология» и предназначены для проведения практических занятий по темам «Типирование бактерий с помощью ПЦР» (8 часов) для студентов Международного государственного экологического университета им. А.Д. Сахарова.

# СОДЕРЖАНИЕ

<i>Введение</i> -----	3
<i>Основы ПЦР-анализа</i> -----	4
<i>Подходы, используемые для типирования с помощью ПЦР</i> -----	8
<i>Материалы и оборудование</i> -----	10
<i>Ход работы</i> -----	11
<i>Контрольные вопросы</i> -----	12
<i>Дополнительная литература</i> -----	13
<i>Список сокращений</i> -----	14

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных методов молекулярно-генетического типирования бактерий является анализ генома с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ). По сравнению с традиционными подходами, основанными на изучении фенотипических признаков бактерий – их биохимических и серологических свойств, чувствительности к фагам, антибиотикам и т.д., ПЦР-анализ обладает рядом преимуществ, которые позволяют считать его наиболее эффективным. В первую очередь это более глубокий уровень дифференциации исследуемых штаммов, позволяющий различить близкородственные штаммы. Связано это с тем, что при использовании ПЦР анализируется непосредственно ДНК бактерий. В результате становится возможным выявление их индивидуальных генотипических особенностей даже в том случае, если фенотипические различия не были обнаружены.

ПЦР-анализ характеризуется универсальностью и может быть применен для типирования любых бактерий. При этом одна и та же система анализа может быть успешно использована при исследовании различных таксономических групп. Благодаря высокой чувствительности ПЦР позволяет проводить эпидемиологические исследования трудно культивируемых и некультивируемых микроорганизмов.

Несомненным достоинством ПЦР являются ее относительная простота и дешевизна по сравнению с другими методами генетического типирования, а также возможность быстрого анализа большого количества образцов.

# ОСНОВЫ ПЦР-АНАЛИЗА

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР)* – процесс амплификации фрагмента ДНК *in vitro* с помощью ДНК полимеразы, осуществляющей синтез ДНК на двух взаимно комплементарных матрицах.

Основной активностью ДНК-полимераз является наращивание (элонгация) нуклеотидной цепи, комплементарной матричной. Такая реакция легко воспроизводится *in vitro*. ДНК-полимераза способна достраивать недостающую цепь на одноцепочечной ДНК, используя в качестве затравки короткий фрагмент ДНК, связанный (гибридизовавшийся) с одноцепочечной матрицей.

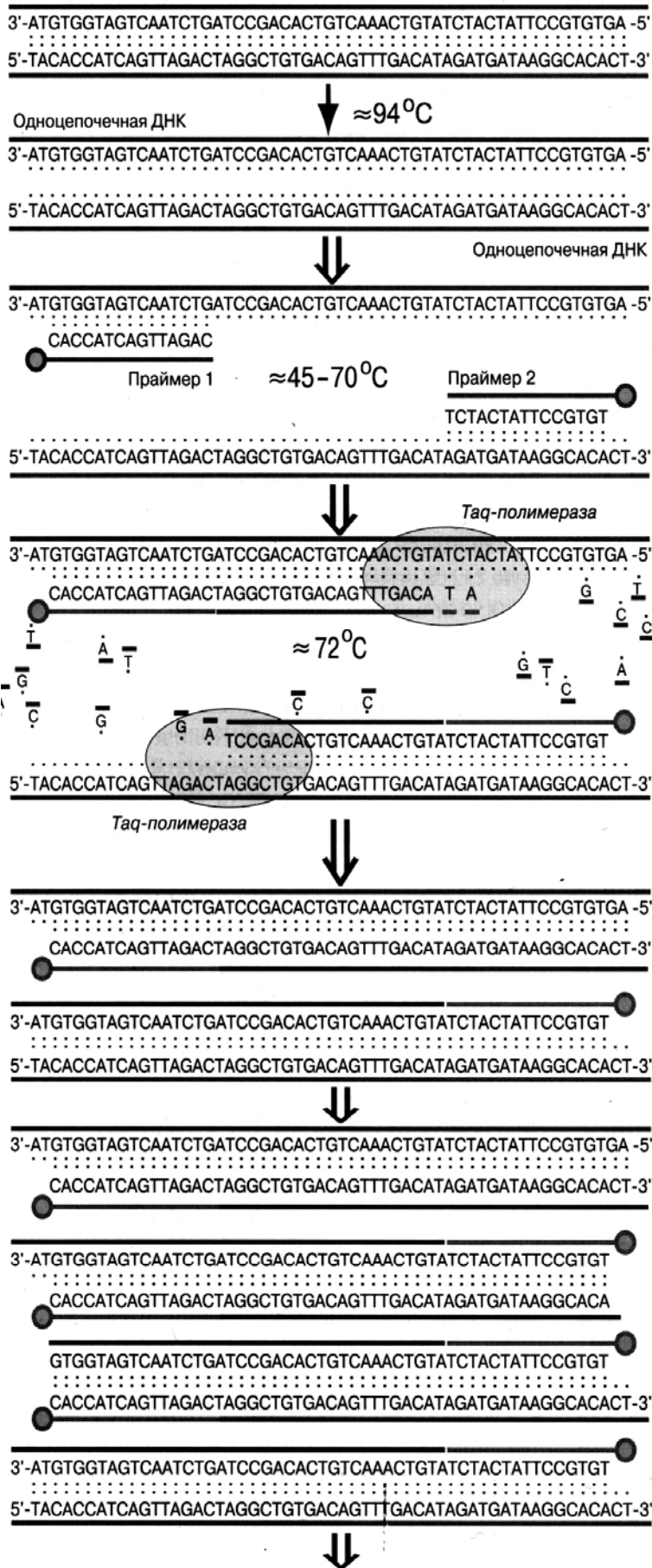
Такой короткий одноцепочечный фрагмент, комплементарный участку матричной молекулы ДНК и используемый для инициации элонгации нуклеотидной цепи ДНК-полимеразой, называют праймером. Обычно при проведении ПЦР используют праймеры длиной от 20 до 30 нуклеотидов.

Для осуществления ПЦР необходимы два праймера, с тем расчетом, чтобы они связывались с обеими цепями ДНК, ограничивая амплифицируемый фрагмент. Его длина обычно составляет около 500–2000 п.н., хотя можно достичь амплификации фрагмента до 10 000 п.н.

Чтобы провести ПЦР, в специальной пробирке смешивают буфер, матричную ДНК, праймеры, дНТФ и термостабильную ДНК-полимеразу. Существует большое количество буферов для ПЦР. Как правило, используют те, которые рекомендуются и поставляются производителем полимеразы. В любом буфере существенной является концентрация ионов магния, поскольку от нее зависит активность полимеразы и ее специфичность. Она также влияет на  $T_m$  ДНК. Концентрация ионов магния может варьировать в пределах от 0,5 до 5,0 ммоль/л, однако чаще используют концентрацию 1,5–2,5 ммоль/л. Повышение концентрации магния ведет к неспецифической амплификации, недостаток – снижает активность полимеразы.

Один цикл ПЦР состоит из 3 этапов (см. рис. 1):

1. Денатурация (плавление) матричной ДНК под действием высокой температуры.
2. Связывание (гибридизация или отжиг) праймеров с матричной ДНК.
3. Элонгация (наращивание) цепи.



**I. Плавление двухцепочечной ДНК:** перед началом реакции ДНК-мишень является двухцепочечной; при температуре  $94 - 95^{\circ}\text{C}$  комплементарные цепи ДНК расходятся

**II. Отжиг праймеров:** при температуре, оптимальной для выбранных праймеров, происходит их связывание с комплементарным участком ДНК-мишени

**III. Синтез новых цепей ДНК:** ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к праймерам, синтезируя новые цепи ДНК, которые становятся мишенью для праймеров в последующих циклах ПЦР

Количество копий ДНК-мишени растет экспоненциально в последовательных циклах ПЦР

1-й цикл

2-й цикл

N цикл

$X \cdot (2^N - 2N)$  копий

\*X – количество копий ДНК-мишени перед началом реакции

Рис. 1. Механизм полимеразной цепной реакции

Смена этапов цикла обеспечивается изменением температуры реакционной смеси. Для этого используют специальные приборы – термоциклеры, или амплификаторы.

Денатурацию проводят при температуре 94–95° С. Понижение температуры до 93° С приводит к неполной денатурации и невозможности осуществления ПЦР, повышение до 96° С и выше – к быстрому разрушению фермента. Перед осуществлением ПЦР проводят первоначальную денатурацию матричной ДНК при температуре 94–95° С в течение 4–10 мин.

Для связывания праймеров температуру понижают, чаще всего до 40–60° С. Однако точный выбор температуры связывания производят исходя из температуры плавления праймера и степени его комплементарности матрице. Повышение температуры, при которой проводится связывание, выше температуры плавления праймера резко снижает эффективность ПЦР или делает ее невозможной. Если праймер не на 100% комплементарен матрице, осуществление ПЦР возможно при понижении температуры связывания в случае, если нуклеотиды 3' конца праймера полностью соответствуют матрице.

Элонгацию чаще всего проводят при 72° С. Поскольку ДНК полимераза из *E.coli* при высокой температуре будет денатурирована, для ПЦР используют полимеразы термофильных микроорганизмов, чаще всего *Taq*-полимеразу, первоначально выделенную из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Оптимум активности *Taq*-полимеразы находится в области 75° С. Кроме того, *Taq*-полимераза позволяет амплифицировать достаточно протяженные последовательности (4–10 т.п.н.).

Следует отметить, что часто температуру элонгации уменьшают до 65° С при увеличении ее продолжительности, или же проводят в 2 этапа – сначала при пониженной температуре, а затем при 72° С. Необходимость этого может быть обусловлена низкой температурой плавления праймера или же низкой температурой плавления амплифицируемого участка.

Циклы полимеразной реакции повторяют многократно (обычно 20–40 раз), после чего проводят завершающую элонгацию, продолжительность которой увеличена.

Теоретически каждый цикл приводит к удвоению количества амплифи-

цируемого фрагмента, так как в качестве матрицы используются как старые, так и вновь синтезированные фрагменты. Таким образом, увеличение количества ДНК происходит в геометрической прогрессии. За 20 циклов реакции можно увеличить количество фрагмента ДНК в  $2^{20}$  раз, т.е. приблизительно в 1 000 000 раз. Длинные (не ограниченные с одной стороны) копии будут синтезироваться только с исходных родительских цепей – 20 копий за 20 циклов, что пренебрежимо мало по сравнению с количеством основного продукта.

Увеличение количества амплифицируемой ДНК в геометрической прогрессии обуславливает высокую чувствительность реакции. Для проведения ПЦР необходимо крайне малое количество матричной ДНК – может быть достаточно 1 молекулы. Такая чувствительность ПЦР предъявляет особые требования к чистоте материалов, применяемых при ее проведении. Все компоненты должны быть стерильными и свободными от посторонней ДНК.

При этом нет абсолютной необходимости в очистке матричной ДНК, так как специфичность амплификации обеспечивается специфичностью праймеров. Поэтому при проведении типирования бактерий возможно использование упрощенных методов лизиса. Это позволяет существенно снизить затраты материалов, труда и времени.

Один из наиболее простых и удобных методов подготовки образца – лизис бактериальных клеток путем их замораживания и оттаивания. Культуру бактерий выращивают в подходящей жидкой среде или на поверхности агара (рассев до единичной колонии). Если использовалась жидкая среда, то клетки отмывают дистиллированной водой или буфером, а затем ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде. Культуру, выросшую на твердой среде сразу же ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде (1–2 колонии на 100 мкл). Суспензию замораживают и хранят до использования при  $-20^{\circ}\text{C}$ . В реакционную смесь добавляют 1–2 мкл оттаявшей суспензии ( $10^4$ – $10^6$  клеток).

При использовании упрощенных методов получения матрицы следует учитывать, что добавление избыточных количеств неочищенного лизата может привести к ингибированию реакции.

# ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПЦР

При генетическом типировании целью проведения реакции является получение набора различных по размеру фрагментов ДНК, характерного для данного микроорганизма и отличающего его от других микроорганизмов, в том числе близкородственных. После электрофоретического разделения и визуализации этих фрагментов получают «фингерпринт», характерный для данной бактерии.

Для проведения ПЦР-анализа наиболее часто применяют следующие методические подходы: амплификация со случайными праймерами (RAPD), амплификация консервативных повторяющихся последовательностей (Rep-ПЦР) и риботипирование (ITS-ПЦР).

При проведении RAPD в качестве праймеров используют короткие (около 10 оснований) последовательности, предварительно подобранные эмпирически. Один и тот же олигонуклеотид служит в качестве как прямого, так и обратного праймера. Из-за низкой температуры плавления таких праймеров (см. табл. 1) реакцию отжига проводят при 40° С и ниже. Успешный подбор праймера позволяет получить набор продуктов амплификации различной длины, индивидуальный для каждого штамма и в определенной степени сходный у родственных штаммов.

Существенным недостатком этого подхода является очень высокая зависимость результатов реакции от условий ее проведения и, как следствие, зачастую плохая их воспроизводимость. Результат амплификации при использовании случайных праймеров в большой степени зависит от качества подготовки матричной ДНК и ее количества в реакционной смеси. Поэтому проведение RAPD-анализа сопряжено с дополнительными издержками, связанными с выделением и очисткой ДНК.

Гораздо более надежные результаты могут быть получены при амплификации консервативных повторяющихся последовательностей, или Rep-ПЦР. Примером Rep-ПЦР могут быть REP-, ERIC-, BOX-, SERE- ПЦР. Сокращение, как правило, отражает название бактерии, в которой была впервые обнаружена



данная последовательность, и/или особенности ее организации (см. список сокращений).

Повторяющиеся последовательности встречаются в геномах различных микроорганизмов. Количество и/или расположение Rep-элементов уникально для конкретной бактерии. Соответственно, использование праймеров гомологичных Rep-элементам приводит к получению уникального набора продуктов амплификации. При этом последовательность характерная для определенной таксономической группы может присутствовать и в геномах других, не родственных, бактерий. Так, с помощью ERIC-ПЦР было успешно проведено типирование не только многих бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, но и флуоресцентных *Pseudomonas*, штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus subtilis* и многих других микроорганизмов, а BOX-ПЦР, основанная на использовании праймеров гомологичных BOX-элементам грамположительных *Streptococcus pneumoniae*, применялась для типирования ряда грам-отрицательных бактерий.

Таблица 1

Характеристика некоторых праймеров, использующихся при типировании бактерий

Праймеры		5'-3' последовательность	Длина, п.н.	T <sub>m</sub> , °C	Молярная масса
Источник	Название				
Rep-элементы	ERIC IR-1	tagtaagctcctggggattcac	22	60,1	6750
	ERIC 2-I	aagtaagtgactgggggtgagcg	22	61,9	6904
	BG2	tacattcgaggaccctaagtg	22	60,1	6719
	BOX AIR	ctacggcaaggcgacgctgacg	22	67,5	6745
Случайные	D7	tggcacggg	10	41,0	3073
	M13	ggtggtcaag	10	36,9	3097

Риботипирование, или ITS-ПЦР, является наиболее универсальным подходом типирования бактерий. ITS-ПЦР основана на исследовании спейсера, расположенного между генами 16S и 23S рибосомных РНК. Этот спейсер является высоко полиморфным, то есть обладает повышенной способностью к изменчивости. Его полиморфизм хорошо воспроизводим и служит стабильным маркером, с помощью которого можно дифференцировать неродственные изо-

ляты или обнаружить высокую степень идентичности независимо изолированных штаммов внутри различных видов.

В то же время гены 16S и 23S рибосомных РНК высоко консервативны. Это позволяет использовать одну и ту же пару праймеров, комплементарных 16S и 23S генам, для амплификации этого спейсера у представителей разных таксономических групп домена «бактерии».

С целью более глубокой дифференциации штаммов продукт, полученный при ITS-ПЦР, часто подвергают расщеплению рестриктазами, а затем анализируют с помощью гель-электрофореза (ITS-RFLP).

## МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Термоциклер.

2. Замороженные суспензии клеток бактериальных штаммов: *E.coli*. С600, *E.coli* 5K, *E.coli* S17-1, *E. coli* J62, *Pseudomonas fluorescens* 49, *Burkholderia* sp.418, «неизвестные штаммы» соответствующие известным.

3. Концентрированный буфер для ПЦР ( $10^X$  или  $5^X$ ). Если концентрат буфера не содержит магния, то необходим также концентрированный (15 или 25 мМ) раствор  $MgCl_2$  или  $MgSO_4$ .

4. Концентрированная смесь дНТФ (по 2 мМ дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ).

5. *Taq*-полимераза.

6. Раствор праймера (50 пмоль/мкл).

7. Пробирки для ПЦР.

8. Дозаторы 1-10 мкл, 1-20мкл, 20-200 мкл с наконечниками.

9. Приборы и материалы необходимые для проведения гель-электрофореза (см. методические рекомендации «Исследование плазмидной ДНК»).

## ХОД РАБОТЫ

1. В стерильной пробирке приготовить смесь (на 100 мкл):

Буфер  $10^X$  – 10 мкл (или  $5^X$  – 20 мкл).

Концентрат соли магния – 10 мкл (если буфер не содержит Mg).

Смесь дНТФ – 10 мкл.

Раствор праймера ERIC IR-1 – 1 мкл.

*Taq*-полимераза – 1 мкл (5 ед.).

Вода очищенная – до 96 мкл.

2. В стерильные пробирки для ПЦР разлить по 24 мкл приготовленной реакционной смеси, добавить 1 мкл оттаявшей суспензии бактерий и перемешать.

3. Пробирки поместить в центрифугу и центрифугировать в течение 1 мин. для того, чтобы вся реакционная смесь собралась в нижней части пробирки.

4. Поместить пробирки в термоциклер.

5. Загрузить следующую программу:

<i>Первоначальная денатурация</i>	<i>95 °C, 5 мин.</i>
<i>30 циклов:</i>	<i>95 °C, 1 мин.</i>
	<i>51 °C, 1 мин.</i>
	<i>65 °C, 8 мин.</i>
<i>Завершающая элонгация</i>	<i>65 °C, 16 мин.</i>
<i>Охлаждение</i>	<i>4 °C, ∞</i>

6. Начать реакцию. По завершении реакции (приблизительно через 6 часов) пробирки можно хранить в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

7. Провести электрофоретический анализ продуктов ПЦР в соответствии с рекомендациями «Исследование плазмидной ДНК». Концентрацию трис-боратного буфера желательно уменьшить в 2 раза (0,5ТБ), концентрацию агарозы увеличить до 2%.

8. Сравнить профили, полученные при электрофоретическом анализе и сделать вывод о степени родства исследованных штаммов и о вероятной принадлежности «неизвестных штаммов».

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое праймер, и почему он необходим для синтеза цепи ДНК полимеразой?

2. Из каких этапов состоит цикл ПЦР, и каким образом осуществляется их смена?

3. Почему в ПЦР нельзя использовать ДНК-полимеразу из *E.coli*?

4. Каковы свойства фермента *Taq*-полимераза?

5. Каким образом концентрация ионов магния влияет на активность *Taq*-полимеразы, и как ее изменение может отразиться на результатах ПЦР?

6. Для чего необходимы дНТФ при проведении ПЦР?

7. Почему нельзя осуществлять связывание праймера D7 при температуре  $50^{\circ}\text{C}$ ?

8. В чем отличия RAPD и Rep-ПЦР?

9. На чем основана ITS-ПЦР?

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т.3, №2. С.96-106.
2. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. ПЦР-генетическое типирование патогенных микроорганизмов. // Генетика. 1995. Т.31, №5. С.600-610.
3. Jensen M.A., Webster J.A., Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V.58. P. 945-952.
4. Olive D.M., Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. // J. Clin. Microbiol. 1999. V.37. P.1661-1669.
- 5<sup>i</sup>. Rajashekara G., Koeuth T., Nevile S., Back A., Nagaraja K.V., Lupski J.R., Kapur V. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element. // J. Med Microbiol. 1998. V.47. P.489-497.
- 6<sup>i</sup>. Van Belkum A., Sluijter M., de Groot R., Verbrugh H., Hermans P.W.M. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J. Clin. Microbiol. 1996. V.34. P.1176-1179.
7. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.P. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. // Nucl. Acids Res. 1991. V.19. P.6823-6831.
8. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. // Nucleic Acids Res. 1990. V.18. P.6531-6535.

---

**i** - Бесплатные тексты этих статей, а также многих других по данной тематике, доступны через сервер Национальной медицинской библиотеки США: <http://pubmedcentral.gov/>

Много полезной информации можно найти на сервере <http://molbiol.ru>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат

дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат

дТТФ – дезокситимидинтрифосфат

дЦТФ – дезоксицитидинтрифосфат

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ERIC – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (sequences)

ITS – Intergenic Transcribed Spacer

PCR – Polimerase Chain Reaction

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

Rep – Repetitive (DNA elements)

REP – Repetitive Extragenic Palindromic (sequences)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SERE – *Salmonella enteritidis* Repetitive Element

*Taq* – *Thermus aquaticus*

T<sub>m</sub> – Temperature of melting

Учебное издание

Автор-составитель:

Дмитрий Петрович Бажанов

Типирование бактерий с помощью  
полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Учебно-методические рекомендации  
к практическим занятиям по модулю  
специализации «Молекулярная эпидемиология»

Учебно-методическое пособие

Технический редактор: *М.Л. Шимкевич.*

Корректоры: *О.В. Гуд, Н.М. Чайковский.*

Сдано в набор 05.04.2004. Подписано в печать 14.04.2004.

Бумага офсетная. Формат 60x80/16

Гарнитура Times. Тираж 30 экз.

Уч.-изд. л. 0,47. Ус. печ. л. 0,93.

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова  
ул. Долгобродская, 23, 220009 Минск, Республика Беларусь

