

НАҚТЫ УАҚЫТ РЕЖИМІНДЕГІ ПТР СЫНАҚ ЖҮЙЕЛЕРІН ЖАСАУДА НУЛЛОМЕРЛІК ДНҚ ТІЗБЕГІН ПАЙДАЛАНУ

Тынысбеков Б.К.¹, Ауганов А.Н.¹, Ахметоллаева А.С.¹, Ахметоллаев И.А.^{1*}¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын шоссе 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

*Автор-корреспондент: akhmetollayev@biocenter.kz

ТҮЙІН

Бұл зерттеуде нулломерлік ДНҚ тізбектерін пайдалана отырып *Pasteurella multocida* серотиптерін анықтауға арналған нақты уақыттағы ПТР (RT-PCR) сынақ жүйесі әзірленді. *P. multocida* жануарлар арасында кең таралған патоген болып табылады және оның әртүрлі серогруппалары (А, В, D, Е және F) аурудың ауырлығы мен таралуына тікелей әсер етеді. Серотипке тән диагностика ветеринарлық практикада аурудың алдын алу мен бақылау шаралары үшін аса маңызды.

Жаңа әдістің негізгі ерекшелігі – праймер мен зондтардың дизайнында нулломерлерді пайдалану арқылы жалған-оң сигналдарды барынша азайту. Зерттеу барысында синтетикалық праймерлер мен зондтар синтезделіп, олардың ерекшелігі *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* және *Salmonella enterica* сияқты бөтен ДНҚ үлгілерімен тексерілді. Оптимизация нәтижелері бойынша ең тиімді параметрлер: $MgCl_2$ – 2,5 mM, dNTP – 0,5 mM, праймер мен зонд концентрациясы – 0,5 pM екендігі анықталды.

Жаңа qPCR жүйесі жоғары ерекшелік пен сезімталдық көрсетті: талдау *P. multocida* ДНҚ-ның әртүрлі концентрацияларын (10^6 көшірмеден 1 дана/мкл дейін) сенімді түрде анықтады, ал аналитикалық шекті анықтау шамамен 100 000 көшірме деңгейінде болды. Серотипке тән праймерлердің қолданылуы айқын амплификация қисықтарын көрсетті және кросс-реактивтілік байқалған жоқ.

Алынған нәтижелер нулломерлерге негізделген праймерлерді қолдану нақты уақыттағы ПТР диагностикасында тиімді әдіс екендігін дәлелдейді. Бұл тәсілдің артықшылықтары оның эпидемиологиялық мониторингте, ветеринарлық диагностикада және болашақта портативті qPCR жүйелерінде қолдану мүмкіндіктерін кеңейтеді. Әзірленген жүйе *P. multocida* серотиптерін жедел әрі дәл анықтауға мүмкіндік береді және басқа да бактериялық қоздырғыштарды айқындау үшін үлгі бола алады.

Негізгі сөздер: *Pasteurella multocida*, А, В, D, Е және F- серогруппалар, нақты уақыттағы ПТР (real-time PCR), qPCR, нулломерлер, праймер дизайны, флуоресцентті зондтар, молекулалық диагностика.

КІРІСПЕ

Pasteurella multocida-*Pasteurellaceae* тұқымдасына жататын грамтеріс, қозғалмайтын, факультативті анаэробты коккобактерия. Бұл әдетте ені 0,3-тен 1,0 микрометрге дейін және ұзындығы 1,0-ден 2,0 микрометрге дейін болатын кішкентай бактерия. Оның айрықша сипаттамаларының бірі оның биполярлық бояуы болып табылады, ол метилен көк немесе Giemsa дақтарын пайдаланған кезде айқын көрінеді, бұл оған микроскоп астында қауіпсіздік түйреуіш тәрізді көрініс береді. Бұл мүмкіндік оны клиникалық және қоршаған орта үлгілерінде анықтауды жеңілдетеді [1].

P. multocida жіктелуі оның полисахарид және липополисахарид (LPS) капсуласына сүйенеді. Картер капсуласын теру жүйесі деп аталатын бастапқы жіктеу жүйесі *P. multocida*-ны бес серогруппаға бөледі: А, В, D, Е және F. Бұл серогруппалар иммундық жүйеден жалтару мен вируленттілікте шешуші рөл атқаратын бактериялық капсуланың антигендік қасиеттеріне байланысты анықталады. Капсулалық а серогруппасы гиалурон қышқылынан, в серогруппасында арабиноза, манноза және галактоза, D серогруппасы гепариннен, Е серогруппасы сипатталмаған күйінде қалады, ал F серогруппасында хондроитин бар [2]. А серогруппасының капсулалық полисахаридтері гиалурон қышқылынан тұрады, ол бактерияны иесінің жасушадан тыс компоненттеріне еліктеу арқылы иммунитеттен жалтару қасиеттерімен қамтамасыз етеді.

Бұл молекулалық мимика *P. multocida*-ға хосттардың иммундық реакцияларынан аулақ болуға көмектеседі, бұл инфекцияларды тұрақты және жоюды қиындатады [3]. D серогруппасы, ең алдымен, шошқалардың үдемелі атрофиялық ринитімен байланысты, бұл мұрын турбиналарының атрофиясымен сипатталатын ауру, тыныс алудың бұзылуына және өсудің тежелуіне әкеледі. Ол сондай-ақ ірі қара малдың, ұсақ күйіс қайыратын малдардың және қояндардың респираторлық инфекцияларына қатысады [4]. Эпидемиологиялық зерттеулер көрсеткендей, Е серогруппасының штамдары вируленттіліктің аймақтық ауытқуларын көрсетеді, кейбір изоляттар жоғары патогендік потенциалды көрсетеді, ал басқалары жеңіл инфекцияларды тудырады. Бұл өзгергіштік айналымдағы штамдарды үздіксіз бақылау және молекулалық сипаттау қажеттілігін көрсетеді [5]. F серогруппасының инфекциясы А, В, D немесе Е серогруппалары сияқты кең таралмағанымен, олардың қоян және құс фабрикаларында болуы мақсатты бақылау мен алдын алу шараларының қажеттілігін көрсетеді. F серогруппасы мен басқа *P. multocida* серотиптері арасындағы генетикалық және құрылымдық айырмашылықтар арнайы вакциналар мен емдеу стратегияларының қажеттілігін көрсетеді [6].

Нақты уақыттағы ПТР (real-time PCR) дамуы ДНҚ-ның күшеюін нақты уақыт режимінде бақылауға мүмкіндік беру арқылы молекулалық диагностикада айтарлықтай прогреске қол жеткізді. Бұл технология ДНҚ-ның күшеюін өлшеу үшін SYBR Green сияқты флуоресцентті бо-

яғыштарға немесе ТаqМаn сияқты фторофор таңбаланған зондтарға сүйенеді. Күшейтуден кейінгі талдауды қажет ететін кәдімгі ПТР-дан айырмашылығы, qPCR бір реакция ішінде сандық нәтижелерді қамтамасыз етеді, бұл оны жылдамырақ және тиімдірек етеді. Нақты уақыттағы ПТР патогендерді анықтау және сандық анықтау, генетикалық мутациялар және ген экспрессиясын талдау үшін кеңінен қолданылды. Жұқпалы ауруларды диагностикалауда qPCR жоғары сезімталдығы бар бактериялық және вирустық қоздырғыштардың кең спектрін анықтау үшін қолданылады. SARS-CoV-2 анықтау үшін Sybr Green негізіндегі нақты уақыттағы ПТР қолдануды бағалайтын зерттеу бұл әдіс дәстүрлі зондтарға негізделген талдауларға үнемді және сенімді балама беретінін көрсетті. qPCR-дің вирустық жүктемені сандық бағалау қабілеті АИВ және гепатит сияқты жұқпалы ауруларды емдеуде ерекше құнды болды, мұнда емдеу шешімдерін қабылдау үшін вирустың репликациясын бақылау өте маңызды [7].

Бактериялық қоздырғыштардың серотиптелуі нақты уақыттағы ПТР әдісімен де күшейтілді. Мысалы, *Streptococcus agalactiae* үшін ПТР негізіндегі серотиптік талдауды әзірлеу көбінесе латекс агглютинациясына немесе геномдық реттілікке сүйенетін дәстүрлі серотиптеу әдістеріне тиімдірек балама берді. Сол сияқты, qPCR эпидемиологиялық қадағалауға және вакциналарды әзірлеуге ықпал ететін жұқпалы аурулармен байланысты бактериялық серотиптерді анықтау және жіктеу үшін пайдаланылды [8].

Нулломерлер белгілі бір геномда жоқ қысқа ДНҚ тізбегі ретінде анықталады. Әдетте ұзындығы 8-ден 15-

ке дейін болатын бұл тізбектер көптеген түрлерде, соның ішінде адамдарда, бактерияларда және вирустарда анықталды [9, 10]. Синтетикалық биологияда нулломерлерді жасанды генетикалық тізбектер мен молекулалық штрих-кодтарды жобалау үшін пайдалануға болады. Бұл тізбектер табиғи геномдарда болмағандықтан, олар бар генетикалық элементтермен байқаусызда әрекеттесу қаупінсіз синтетикалық құрылымдарды таңбалаудың бірегей әдісін қамтамасыз етеді. Нулломерлер ДНҚ негізіндегі аутентификация жүйелерін әзірлеу үшін пайдаланылды, мұнда нулломерлер тізбегі бар синтетикалық ДНҚ тегтері бақылау және контрафактілікке қарсы мақсаттар үшін өнімдерге енгізіледі. Бұл тәсіл таңбаланған ДНҚ-ның табиғи түрде пайда болатын тізбектермен қателеспеуін қамтамасыз етеді, бұл оны жеткізу тізбегінің қауіпсіздігі мен сот сараптамасын қолданудың қуатты құралына айналдырады [10].

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Праймерлер мен зондтардың синтезі

Өндіруші хаттамасына сәйкес 20 нм концентрацияда орнатылған Biosset ASM-800et арқылы ДНҚ/РНҚ синтезаторының көмегімен синтезделді. Депротекция процедурасы 36% аммиак ерітіндісінде 45°C температурада 10 сағатта орындалды. Олигонуклеотид ерітіндісінен қалған аммиакты буландыру үшін Eppendorf центрифуга концентраторы қолданылады. Сонымен қатар, олигонуклеотидтер Cytiva алдын ала оралған G-25 бағандарымен тұзсыздандырылды.

Нулломерлі праймерлерді теріс бақылауға сынау

Кесте 1: Жұмыста қолданылған праймерлер мен зондтар сиквенстары

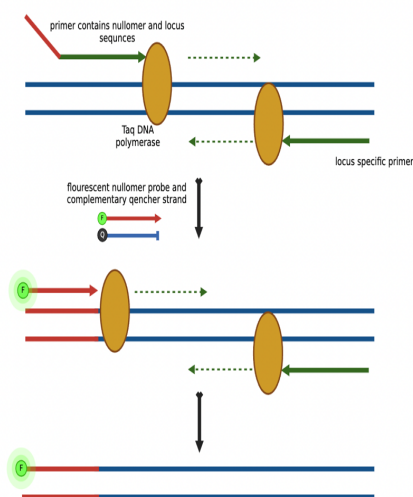
#	Праймердің атауы	Сиквенс (5'-3')
1	SPz1	CAGTCGGCTGACC
2	SPz2	CTGACGGCAGTC
3	SPz3	CAGTCGGCTGAC
4	SPz4	AAATTGGCGCAGG
5	SPz5	CGCTCGACGTAC
6	SPz6	CGACGAACGGTC
7	SPz3kmt	CAGTCGGCTGACaccgacaagcccactcaca
8	SPz3serB	CAGTCGGCTGACactctcctgagtcaattaaacagcttt
9	SPz3serA	CAGTCGGCTGACAacacaagctagcgttttatctttt
10	SPz3serD	CAGTCGGCTGACactgcacaaccaagcatcgg
11	SPz3serE	CAGTCGGCTGACagcagcaagctatgccaatgg
12	SPz3serF	CAGTCGGCTGACaggcgcgtcacagaaggaatg
13	Kmt1-R	GCCACAAGCCAAATAAAAG
14	SerB-R	GCGTTACACCAATGTAGG
15	SerE-R	CCACACATAGTCTCAAAG
16	SerA-R	GCAGTTGAACTGTGTTTA
17	SerF-R	GGAACCAAATATCTTCAGTA
18	SerD-R	TGTCCCTAGATTTGAGTTTA
19	Fam-SPz3-BHQ1	GTCAGCCGACTG
20	ROX-SPz3-BHQ2	GTCAGCCGACTG
21	FluSPz3	CAGTCGGCTGAC

Нулломер негізіндегі праймерлердің жалған оң нәтиже бермейтініне көз жеткізу үшін *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ДНҚ үлгілерімен сынап көрдік (1-Кестедегі 1-6 праймерлер), ПТР нәтижелері № 3 праймермен (деректер берілмеген) ешқандай спецификалық емес күшейтуді көрсетпеді, бұл бізге осы нулломермен одан әрі эксперименттер жүргізуге мүмкіндік берді.

Серотиптерге оң бақылау жасау

Жаңа нақты уақыттағы ПТР талдауын сынау үшін *P. multocida*-ның 6 түрлі құрылымы жасалды, олардың құрамында 5 серогруппадан тұратын 200 н.к. мақсатты реттілігі және *P. multocida* идентификациясының маркері болып табылатын *kmt1* генінің мақсатты реттілігінен тұратын бір құрылым жасалды. Барлық мақсатты тізбектер синтетикалық болып табылады. ПТР бірінші айналымында 20нт қабаттасуы бар 4 ~60нт олигонуклеотидтер арқылы жүргізілді. ПТР екінші раундында соңғы 200 н.к. мақсатты өнімді алу үшін қапталдағы праймерлер қолда-

Nullomer extension based Real-Time PCR principle



Сурет 1. Нулломерге негізделген нақты уақыттағы ПТР принципі

нылады және магниттік бөлшектермен тазартылады. Әрі қарай, ТА-клондау өндірушінің хаттамасына негізделген Promega компаниясының pGem®-T Easy векторлық жүйесі арқылы жүзеге асырылды.

Жаңа нақты уақыттағы ПТР әдісін сынау

Бұл тәсілдің негізгі принципі-ПТР-дің алғашқы бес циклі кезінде күшейткішті нулломерге де, локусқа да тән тізбектерді қамтитын праймерді қолдану арқылы кеңейту. Кейінгі циклдарда күшейту үшін флуоресцентті нулломерлі зонд қолданылады (1-ші суретте көрсетілген). Әрбір күшейту циклінен кейін зонд тудыратын флуоресценцияны өлшеу арқылы салыстырмалы флуоресценция бірлігінің (RFU) деректері жиналады. Нақты уақыттағы ПТР жағдайларын оңтайландыру үшін Mg^{2+} , dNTP, Taq ДНҚ полимеразасының, ДНҚ шаблонының және праймерлердің әртүрлі концентрациясы сыналды.

Сезімталдықты анықтау

Pasteurella multocida серотиптерін анықтауға әзірленген ПТР сынақ жүйесінің сезімталдығы нақты уақыттағы ПТР көмегімен бағаланды. ДНҚ-ның сериялық сұйылтулары бар оң бақылау үлгілері 1 мкл-ге 84×10^6 көшірме концентрациясынан бастап бір данаға дейін қолданылды.

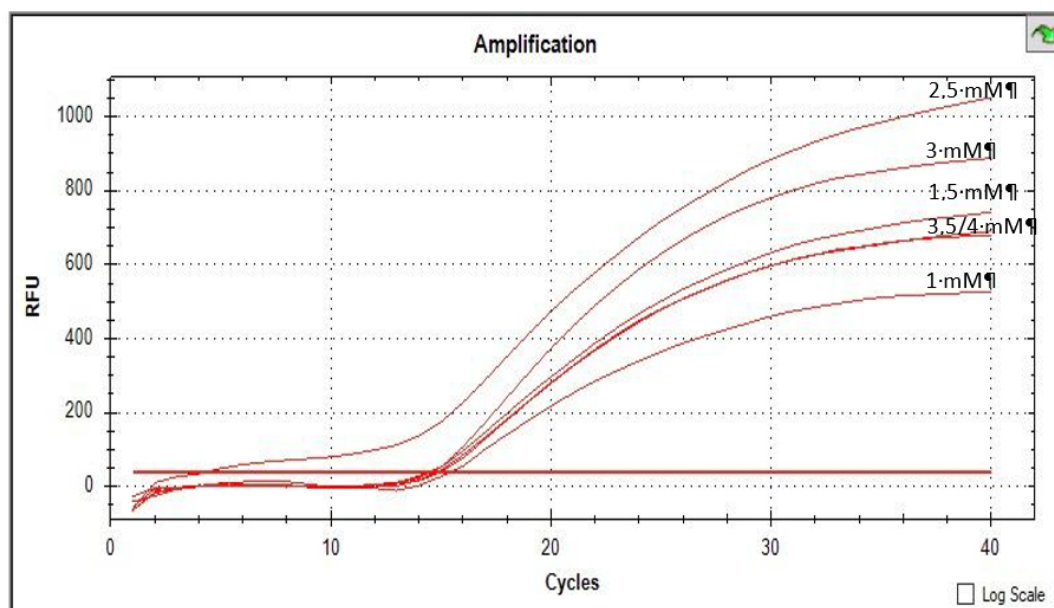
Статистикалық талдау

Нақты уақыттағы ПТР эксперименттерінен алынған барлық сандық деректер CFX Manager™ ағдарламалық жасақтамасының көмегімен статистикалық талдаудан өтті. Цикл шегі (C_T) мәндері үштік реакциялар үшін $\pm$ стандартты ауытқу (SD) құралы ретінде көрсетілген. Сезімталдық пен ерекшелік шаблондық ДНҚ-ның сериялық сұйылтуларындағы күшейту қисықтарын салыстыру арқылы бағаланды.

НӘТИЖЕЛЕР

Синтезделген олигонуклеотидтерді талдау

Олигонуклеотидтердің сәтті синтезі мочевино-полиакриламидті гель электрофорезімен расталды (PAGE). Синтезделген праймерлер мен зондтар 6 М несепнәрі



Сурет 2. Әр түрлі $MgCl_2$ концентрациясының амплификация қисығына әсері

бар 12% полиакриламидті гелді қолдану арқылы талданды және нәтижелер олигонуклеотидтердің күтілетін мөлшеріне сәйкес келетін әртүрлі жолақтарды көрсетті. Көрінетін деградация немесе қайталама құрылымдар байқалмады, бұл синтездің жоғары тиімділігін көрсетеді.

Нақты уақыттағы ПТР оңтайландыру

Нақты уақыттағы ПТР жағдайларын оңтайландыру $MgCl_2$ (1мМ-3мМ), dNTPs (0,5 мМ-2 мМ) және флуоресцентті зондтардың (0,5 пМ- 4пМ) әртүрлі концентрацияларын сынау арқылы жүзеге асырылды. 2-4 суреттерге сүйене, күшейтудің ең жақсы тиімділігі соңғы $MgCl_2$ концентрациясы 2,5 мМ және нулломерлі праймер концентрациясы 0,5 пМ көмегімен, dNTP 0,5 мМ концентрациясында алынды.

Оңтайландырылған термиялық цикл протоколы бастапқы денатурацияны 2 минут ішінде 95°C температурада, одан кейін 95°C үшін 20 с, 60°C үшін 20 с және 72°C үшін 20 с 5 циклды қамтыды. Кейінгі күшейту фазасы флуорес-

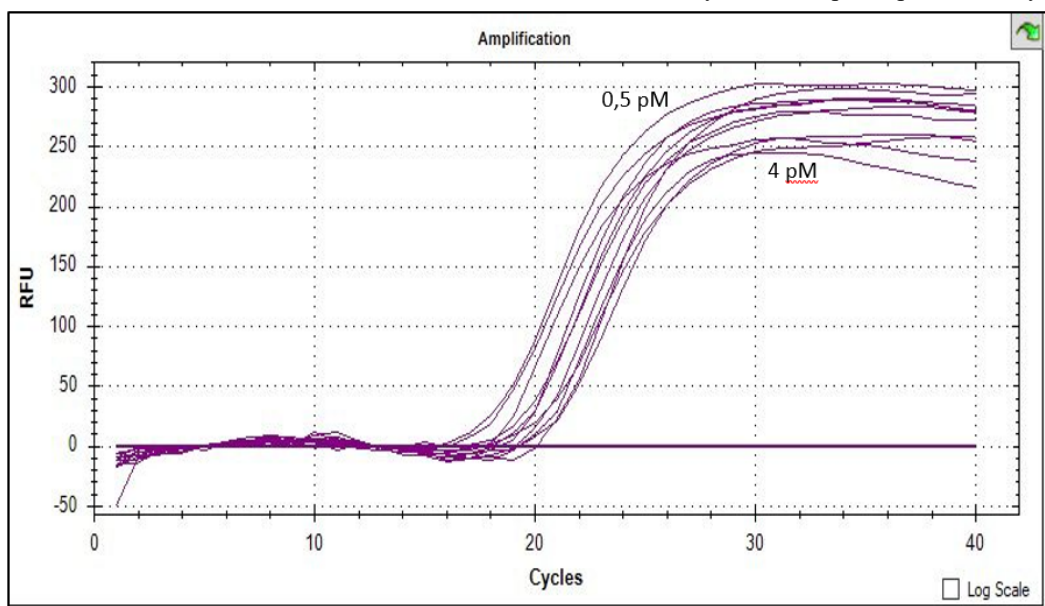
центті деректерді жинаумен 40 циклден тұрды.

Талдаудың сезімталдығы

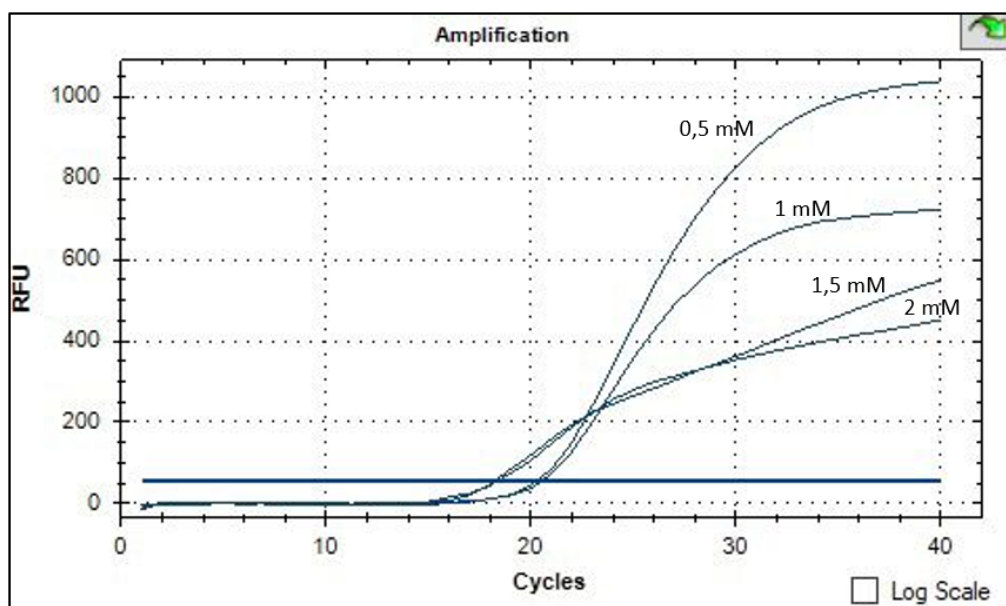
Жаңадан әзірленген нақты уақыттағы ПТР жүйесінің сезімталдығын анықтау үшін мақсатты ДНҚ-ның сериялық сұйылтулары сыналды, бір мкл үшін 100×10^9 данадан бір данаға дейін. 5 суретте көрсетілгендей ең төменгі анықталатын концентрация бір реакцияға шамамен 100.000 дананы құрайтыны анықталды, бұл жоғары сезімталдықты көрсетті. Сұйылту қатарындағы күшейту қисықтарының сызықтығы жүйенің *P. multocida* ДНҚ-ның әртүрлі концентрацияларын дәл сандық түрде анықтай алатынын көрсетеді.

ТАЛҚЫЛАУ

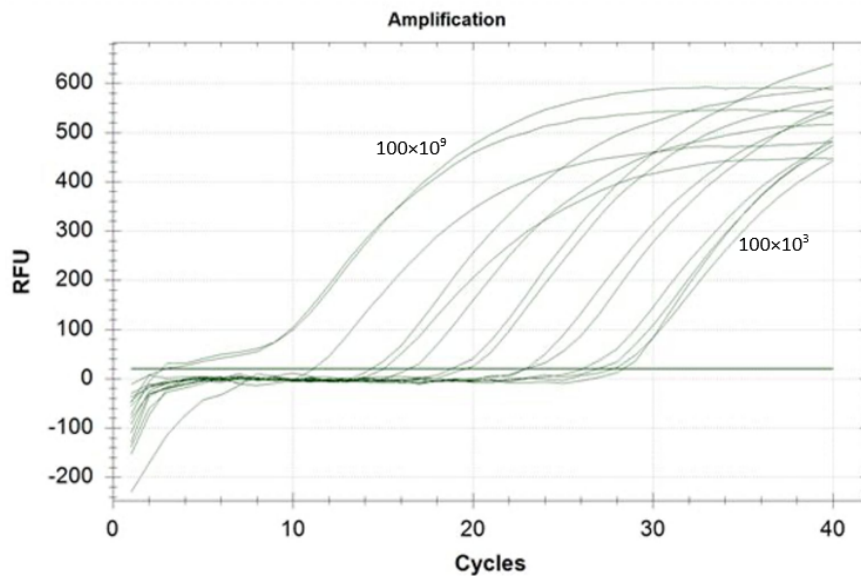
Бұл жұмыстың басты әдістемелік жаңалығы – праймер мен зонд құрылымына нулломерлі модуль енгізу арқылы спецификалық емес амплификацияны басу стратегиясы. Нулломерлер – белгілі бір геномда кездеспейтін қысқа олигонуклеотидтер; оларды қолданудың логикасы



Сурет 3. Әр түрлі зонд концентрациясының амплификация қисығына әсері



Сурет 4. Әр түрлі dNTP концентрациясының амплификация қисығына әсері



Сурет 5. Сезімталдықтың амплификация қисықтары.

– табиғи тізбектермен гомология азайып, кездейсоқ немесе фоновый байланыстар төмендейді, соның нәтижесінде жалған-оң сигналдар кемиді. Нулломерлердің теориялық және алгоритмдік негіздері соңғы онжылдықта жақсы сипатталған: олардың геномнан «жоқ болуы» кездейсоқтықтан бөлек эволюциялық/іріктеу факторларымен де түсіндіріледі және оларды биоинформатикалық әдістермен жүйелі түрде анықтау мүмкіндігі бар. Бұл бағыттағы жұмыстар нулломерлерді диагностикалық маркерлер, молекулалық штрих-кодтар немесе ерекше таңбалытын «таза» реттіліктер ретінде пайдалануға мүмкіндік беретінін көрсетеді [10-13].

Осы зерттеуде нулломерлі праймерлер мен флуоресцентті зондтарды біріктіру арқылы *P. multocida* серогруппаларына (A, B, D, E, F) тән амплификация сенімді алынған және кросс-реактивтілік байқалмағаны көрсетіледі. Бұл нәтижелер клиникалық/ветеринарлық үлгілер құрамында аралас микробиота болғанда да сәйкестілік сақталатынын меңзейді, яғни серотип-спецификалық дәлдік жоғары. Мұндай қатаң спецификалық дизайн классикалық qPCR серотиптеу платформаларымен (мысалы, *Streptococcus agalactiae* үшін әзірленген qPCR-қа негізделген серотиптеу) идеялық тұрғыда ұқсас: серотиптік антигендік/капсулалық локустарды нысанаға алу және көпплексті форматқа бейімдеу арқылы қымбат немесе сирек қолжетімді баламаларды (латекс-агглютинация, WGS) алмастыру [8, 14]. Бұл ұстаным соңғы жылдары көпплексті qPCR серотиптеу жүйелерінің клиникалық іске жарамдылығын көрсеткен бағалаулармен де үйлеседі [15].

Сонымен қатар, *P. multocida*-ға тікелей қатысты жаңа зерттеулер серотоп-спецификалық qPCR жүйелерінің ветеринарлық практикада сұранысы жоғары екенін растайды. Мәселен, ірі қара пастереллезімен байланысты A, B және E серогруппаларын бірқадамды көпплексті qPCR арқылы сенімді анықтау мүмкіндігі көрсетілді; бұл эпизоотологиялық мониторинг пен жедел скрининг үшін аса маңызды. Біздің жұмыста нулломерлік модуль енгізілуі мұндай көпплексті талдаулардағы

фондық сигналды одан әрі төмендетіп, айырым қабілетін арттыруға теориялық алғышарт жасайды [16]. Қоян шаруашылығындағы серогруппа F штамдарының патогеномдық сипаттамасы туралы соңғы баяндамалар да серотипке бағытталған молекулалық скринингтің көкейкестілігін, сондай-ақ жануар иесі-арнайы вируленттілік ерекшеліктерін ескеретін панельдер қажет екенін айғақтайды [17].

Нулломерлерді қолданудың артықшылықтары диагностиканың өзімен шектелмейді. Соңғы жұмыстарда нулломерлер/«nullpeptide»-тердің геномдар мен протеомдарда болмауы жиі теріс іріктеумен байланыстырылып, оларды ерекше «фонсыз» штрих-код ретінде қолдану идеясы күшейіп келеді, ал клиникалық биомаркерлік ізденістерде (мысалы, айналымдағы РНҚ-да нулломерлерді айқындау) ерте диагностиканың бағыттары ашылуда. Демек, нулломерлік модульдер болашақта үлгі аутентификациясы, ластану мониторингі, «internal control» конструкциялары үшін де пайдалы [13, 18].

Біздің тәжірибелік дизайнда кросс-реактивтіліктің болмауы және серотип-спецификалық қисықтардың айқындығы – күшті жақтар. Лимитацияларына (LOD жоғарырақ болуы және клиникалық матрикстердегі валидация көлемінің шектілігі) қарамастан, ұсынылған тәсіл *P. multocida* серотиптерін жедел саралауға мүмкіндік береді және далалық (портативті) платформаларға енгізуге бейім. Пастереллез бойынша серогруппаға бағытталған вакцинация стратегиялары кеңейіп келе жатқанын ескерсек, серотип-спецификалық жедел диагностика эпизоотологиялық шешім қабылдауды жылдамдатады [19].

Түйіндей айтқанда, нулломерге негізделген праймер/зонд тұжырымдамасы *P. multocida* серотиптерін нақты уақыт ПТР-мен айқын әрі селективті анықтауға мүмкіндік берді. Оңтайландырылған режимдер ($MgCl_2$, dNTP, праймер/зонд концентрациялары және термоцикл) келесі буын көпплексті панельдер мен портативті платформаларға көшу үшін мықты негіз қалайды; ал сезімталдықты арттыруға бағытталған молекулалық (LNA/2'-OMe), ферменттік және цифрлық детекция стратегиялары клиникалық жарамдылықты кеңейтеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Бұл зерттеуде нулломерлі тізбектерге негізделген жаңа qPCR сынақ жүйесі әзірленіп, *Pasteurella multocida* серотиптерін (A, B, D, E және F) жедел әрі нақты анықтау мүмкіндігі көрсетілді. Зерттеу барысында нулломерлік праймерлердің қолданылуы жалған-оң нәтижелерді азайтып, серотип-спецификалық амплификация қисықтарын айқын әрі сенімді етуге мүмкіндік берді. Бұл әдіс эпизоотологиялық мониторинг пен ветеринарлық диагностикада инфекцияның таралуын нақты бақылауға жаңа мүмкіндіктер береді.

Практикалық тұрғыдан алғанда, әзірленген жүйенің артықшылығы – кросс-реактивтіліктің болмауы және серотипке тән нақты амплификация. Бұл эпидемиологиялық қадағалауда қате интерпретация ықтималдығын төмендетіп, аурудың таралуын дәл анықтауға көмектеседі. Сонымен қатар, оңтайландырылған реакция шарттары (MgCl₂ – 2,5 mM, dNTP – 0,5 mM, праймер және зонд концентрациясы – 0,5 nM) әдістің қайталанымдылығын арттырып, стандартталуына ықпал етеді.

Алайда, анықтау шегінің (~10⁵ көшірме/реакция) салыстырмалы жоғары болуы – болашақ зерттеулерде жетілдіруді қажет ететін маңызды шектеу. Сезімталдықты арттыру үшін ферменттік жүйелерді жетілдіру, LNA немесе 2'-ОМе модификацияларын енгізу, сондай-ақ цифрлық ПТР (dPCR) платформаларына бейімдеу қарастырылуы мүмкін. Бұл бағыттағы даму диагностика жүйесін клиникалық үлгілерде аз мөлшердегі патогенді де сенімді анықтайтындай деңгейге көтереді.

Ғылыми маңыздылығы тұрғысынан, нулломерлік тізбектерді қолдану молекулалық диагностикаға жаңа көзқарас ұсынады. Бұл тәсіл тек *P. multocida* емес, басқа да бактериялық және вирустық қоздырғыштарды айқындауда кеңейтіліп қолданылуы мүмкін. Нулломерлердің ерекше «геномда кездеспейтін» қасиеті оларды диагностикалық праймерлер мен зондтардан бөлек, биологиялық үлгілерді аутентификациялау, контаминацияны бақылау және синтетикалық ДНҚ конструкцияларына штрих-код ретінде енгізу салаларында да қолдануға мүмкіндік береді.

Болашақ зерттеулерде ұсынылған әдісті портативті qPCR платформаларына енгізу маңызды бағыт болуы мүмкін. Бұл ауылдық аймақтардағы ветеринарлық пункттерде немесе далалық жағдайда жылдам тест жүргізуге жол ашады. Сонымен бірге, серотипке тән праймерлер панельдерін кеңейту арқылы нулломерлік архитектураны көпшілекті талдауларға бейімдеуге болады, бұл бір реакцияда бірнеше серотипті анықтау тиімділігін арттырады.

Қорыта айтқанда, нулломерлік тізбектерді qPCR диагностикасына енгізу – молекулалық микробиологияда жаңа сапалы қадам болып табылады. Бұл тәсілдің нәтижелері пастереллезді және басқа да жұқпалы ауруларды жылдам, дәл және сенімді диагностикалауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, әдістің жетілдірілуі және кеңейтілуі оны ветеринарлық практикадан бөлек, клиникалық медицина мен биологиялық қауіпсіздік салаларында да қолдануға жол ашады.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Зерттеу Қазақстан Республикасының Ғылым және

жоғары білім министрлігінің Ғылым комитетінің қаржылай қолдауымен жүзеге асырылды (грант № BR218004/0223 «Қазақстандағы биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету шараларын жетілдіру: қауіпті және аса қауіпті инфекцияларға қарсы күрес»).

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР

1. Peng Z., Wang X., Zhou R., Chen H., Wilson B. A., Wu B. *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2019. – Vol. 83, №4. – <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-19>.
2. Christensen H., Sajid S. M., Bisgaard M., Magistrali C. F., Massacci F. R., Liman M., Menke T., Bischoff H., Olsen J. E. Prediction of *Pasteurella multocida* serotypes based on whole genomic sequences // *Veterinary microbiology*. – 2022. – Vol. 271:109492. - <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109492>.
3. Pasomboon P., Chumnannpuen P., E-kobon T. Comparison of Hyaluronic Acid Biosynthetic Genes From Different Strains of *Pasteurella multocida* // *Bioinformatics and biology insights*. – 2021. – Vol. 15. – P. 1-14. - <https://doi.org/10.1177/11779322211027406>.
4. Guan L. J., Yang J. Q., Xu Q. Y., Feng Y. F., Zhang X. C., Tang B., Zhao Z. Q. Immunogenicity and Efficacy of Serogroup A and D Bacterins against *Pasteurella Multocida* in Mice // *Frontiers in veterinary science*. – 2023. – Vol. 10.1132536. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1132536>.
5. Richardson N. I., Ravenscroft N., Kuttel M. M. Conformational comparisons of *Pasteurella multocida* types B and E and structurally related capsular polysaccharides // *Glycobiology*. – 2023. – Vol. 33, №9 – P. 745-754. - <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad049>.
6. Wang J., Sun S., Chen Y., Chen D., Sang L., Xie X. Pathogenic and genomic characterisation of a rabbit sourced *Pasteurella multocida* serogroup F isolate s4 // *BMC Vet Res*. – 2022. – Vol. 18(1), №288. – P. 1-12. - <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03381-7>.
7. Harshitha R., Arunraj D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. – 2021. – Vol. 49, №5. – P. 800–812. - <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>.
8. Breeding K. M., Ragipani B., Lee K. D., Malik M., Randis T. M., Ratner A. J. Real-time PCR-based serotyping of *Streptococcus agalactiae* // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. - <https://doi.org/10.1038/srep38523>.
9. Vergni D., Santoni D. Nullomers and high order nullomers in genomic sequences // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11(12). – P. 1-15. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164540>.
10. Hampikian G., Andersen T. Absent sequences: Nullomers and primes // *Pacific Symposium on Biocomputing*. – 2007. – Vol. 12. – P. 355-366. - https://doi.org/10.1142/9789812772435_0034.
11. Vergni D., Santoni D. Nullomers and High Order Nullomers in Genomic Sequences // *PLOS One*. – 2016. – Vol. 11(12). – pp. 1-15. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164540>.
12. Acquisti C., Poste G., Curtiss, D., Kumar S.

Nullomers: Really a matter of natural selection // PLOS One. – 2007. – Vol. 2(10). – P. 1-3. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001022>.

13. Georgakopoulos-Soares I., Yizhar-Barnea O., Mouratidis I., Hemberg M., Ahituv N. Absent from DNA and protein: genomic characterization of nullomers and nullpeptides across functional categories and evolution // Genome Biology – 2021. – Vol. 22, №245. - <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02459-z>.

14. Furfaro, L. L., Chang, B. J. & Payne, M. S. A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect Streptococcus agalactiae presence and serotypes Ia, Ib, and III // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2017. – Vol. 89, №1. – P. 7-12. - <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.003>.

15. Handigund M., Lee J. Performance Evaluation of Novaplex™ Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Streptococcus agalactiae Serotypes // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12, №10: 2043. - <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102043>.

16. Wang H., Xin L., Wu Y., Liu Y., Yao W., Zhang H., Hu Y., Tong R., Zhu L. Construction of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of serogroups A, B, and E of Pasteurella multocida associated with bovine pasteurellosis // Frontiers in Veterinary Science. – 2023. – Vol. 28, №10: 1193162. – P. 1-10. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1193162>.

17. Wang J., Sang L., Sun S., Chen Y., Chen D., Xie X. Characterization of Pasteurella multocida isolated from dead rabbits with respiratory disease in Fujian, China // BMC veterinary research. – 2019. – Vol. 15, №438. - <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2191-3>.

18. Montgomery A., Tsiatsianis G. C., Mouratidis I., Chan, C. S. Y., Athanasiou M., Papanastasiou A. D., Kantere V., Syrigos N., Vathiotis I., Syrigos K., Yee N. S., Georgakopoulos-Soares I. Utilizing nullomers in cell-free RNA for early cancer detection // Cancer gene therapy. – 2024. – Vol. 31. – P. 861–870. - <https://doi.org/10.1038/s41417-024-00741-3>.

19. Casalino G., D'Amico F., Bozzo G., Dinardo F. R., Schiavitto M., Galante D., Aceti A., Ceci E., Romito D., D'Onghia F. P., Dimuccio M. M., Camarda A., Circella E. In field evaluation of impact on clinical signs of an inactivated autogenous vaccine against Pasteurella multocida in rabbits // International Journal of Veterinary science and Medicine. – 2024. – Vol. 12(1). – P. 39–47. - <https://doi.org/10.1080/23144599.2024.2348900>.

REFERENCES

1. Peng Z., Wang X., Zhou R., Chen H., Wilson B. A., Wu B. Pasteurella multocida: Genotypes and Genomics // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2019. – Vol. 83, №4. – <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-19>.

2. Christensen H., Sajid S. M., Bisgaard M., Magistrali C. F., Massacci F. R., Liman M., Menke T., Bischoff H., Olsen J. E. Prediction of Pasteurella multocida serotypes based on whole genomic sequences // Veterinary microbiology. – 2022. – Vol. 271:109492. - <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109492>.

3. Pasomboon P., Chumnanpuen P., E-kobon T. Comparison of Hyaluronic Acid Biosynthetic Genes From Different Strains of Pasteurella multocida // Bioinformatics and biology insights. – 2021. – Vol. 15. – P. 1-14. - <https://doi.org/10.1177/11779322211027406>.

4. Guan L. J., Yang J. Q., Xu Q. Y., Feng Y. F., Zhang X. C., Tang B., Zhao Z. Q. Immunogenicity and Efficacy of Serogroup A and D Bacterins against Pasteurella Multocida in Mice // Frontiers in veterinary science. – 2023. – Vol. 10.1132536. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1132536>.

5. Richardson N. I., Ravenscroft N., Kuttel M. M. Conformational comparisons of Pasteurella multocida types B and E and structurally related capsular polysaccharides // Glycobiology. – 2023. – Vol. 33, №9 – P. 745-754. - <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad049>.

6. Wang J., Sun S., Chen Y., Chen D., Sang L., Xie X. Pathogenic and genomic characterisation of a rabbit sourced Pasteurella multocida serogroup F isolate s4 // BMC Vet Res. – 2022. – Vol. 18(1), №288. – P. 1-12. - <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03381-7>.

7. Harshitha R., Arunraj D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification // Biochemistry and Molecular Biology Education. – 2021. – Vol. 49, №5. – P. 800–812. - <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>.

8. Breeding K. M., Ragipani B., Lee K. D., Malik M., Randis T. M., Ratner A. J. Real-time PCR-based serotyping of Streptococcus agalactiae // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. - <https://doi.org/10.1038/srep38523>.

9. Vergni D., Santoni D. Nullomers and high order nullomers in genomic sequences // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11(12). – P. 1-15. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164540>.

10. Hampikian G., Andersen T. Absent sequences: Nullomers and primes // Pacific Symposium on Biocomputing. – 2007. – Vol. 12. – P. 355-366. - https://doi.org/10.1142/9789812772435_0034.

11. Vergni D., Santoni D. Nullomers and High Order Nullomers in Genomic Sequences // PLOS One. – 2016. – Vol. 11(12). – pp. 1-15. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164540>.

12. Acquisti C., Poste G., Curtiss, D., Kumar S. Nullomers: Really a matter of natural selection // PLOS One. – 2007. – Vol. 2(10). – P. 1-3. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001022>.

13. Georgakopoulos-Soares I., Yizhar-Barnea O., Mouratidis I., Hemberg M., Ahituv N. Absent from DNA and protein: genomic characterization of nullomers and nullpeptides across functional categories and evolution // Genome Biology – 2021. – Vol. 22, №245. - <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02459-z>.

14. Furfaro, L. L., Chang, B. J. & Payne, M. S. A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect Streptococcus agalactiae presence and serotypes Ia, Ib, and III // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2017. – Vol. 89, №1. – P. 7-12. - <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.003>.

15. Handigund M., Lee J. Performance Evaluation of Novaplex™ Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection

of *Streptococcus agalactiae* Serotypes // *Microorganisms*. – 2024. – Vol. 12, №10: 2043. - <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102043>.

16. Wang H., Xin L., Wu Y., Liu Y., Yao W., Zhang H., Hu Y., Tong R., Zhu L. Construction of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of serogroups A, B, and E of *Pasteurella multocida* associated with bovine pasteurellosis // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2023. – Vol. 28, №10: 1193162. – P. 1-10. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1193162>.

17. Wang J., Sang L., Sun S., Chen Y., Chen D., Xie X. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from dead rabbits with respiratory disease in Fujian, China // *BMC veterinary research*. – 2019. – Vol. 15, №438. - <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2191-3>.

18. Montgomery A., Tsiatsianis G. C., Mouratidis I., Chan, C. S. Y., Athanasiou M., Papanastasiou A. D., Kantere V., Syrigos N., Vathiotis I., Syrigos K., Yee N. S., Georgakopoulos-Soares I. Utilizing nullomers in cell-free RNA for early cancer detection // *Cancer gene therapy*. – 2024. – Vol. 31. – P. 861–870. - <https://doi.org/10.1038/s41417-024-00741-3>.

19. Casalino G., D'Amico F., Bozzo G., Dinardo F. R., Schiavitto M., Galante D., Aceti A., Ceci E., Romito D., D'Onghia F. P., Dimuccio M. M., Camarda A., Circella E. In field evaluation of impact on clinical signs of an inactivated autogenous vaccine against *Pasteurella multocida* in rabbits // *International Journal of Veterinary science and Medicine*. – 2024. – Vol. 12(1). – P. 39–47. - <https://doi.org/10.1080/23144599.2024.2348900>.

УДК: 577

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НУЛЛОМЕРНОЙ ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЦР ТЕСТ СИСТЕМ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Тынысбеков Б.К.¹ , Ауганов А.Н.¹ , Ахметоллаева А.С.¹ , Ахметоллаев И.А.^{1*} ¹ Национальный центр биотехнологии, 010000, Казахстан, г. Астана, Коргалжын шоссе, 13/5

*Автор-корреспондент: akhmetollayev@biocenter.kz

АБСТРАКТ

В данном исследовании разработана система ПЦР в реальном времени (RT-PCR) для идентификации серотипов *Pasteurella multocida* с использованием нулломерных ДНК-последовательностей. *P. multocida* является широко распространённым патогеном среди животных, и различные серогруппы (А, В, D, Е и F) напрямую связаны с тяжестью и распространением заболевания. Серотип-специфическая диагностика имеет важное значение для профилактики и контроля заболеваний в ветеринарной практике.

Ключевой особенностью нового метода является применение нулломеров при дизайне праймеров и зондов, что позволяет минимизировать вероятность ложноположительных сигналов. В ходе исследования были синтезированы синтетические праймеры и зонды, их специфичность проверена с использованием ДНК *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella enterica*. Оптимизация показала, что наиболее эффективными условиями являются: $MgCl_2$ – 2,5 мМ, dNTP – 0,5 мМ, концентрация праймеров и зондов – 0,5 пМ.

Разработанная qPCR-система продемонстрировала высокую специфичность и чувствительность: она надёжно определяла различные концентрации ДНК *P. multocida* (от 10^6 копий до 1 копии/мкл), при этом порог детекции составил примерно 100 000 копий. Применение серотип-специфичных праймеров показало чёткие амплификационные кривые без перекрёстных реакций.

Полученные результаты подтверждают, что использование нулломерных праймеров является эффективным подходом в ПЦР-диагностике в реальном времени. Преимущества данного метода открывают перспективы его применения в эпидемиологическом мониторинге, ветеринарной диагностике, а также в портативных системах qPCR. Разработанная система позволяет быстро и точно идентифицировать серотипы *P. multocida* и может служить моделью для диагностики других бактериальных патогенов.

Ключевые слова: *Pasteurella multocida*, серогруппы А, В, D, Е и F, ПЦР в реальном времени (real-time PCR), qPCR, нулломеры, дизайн праймеров, флуоресцентные зонды, молекулярная диагностика.

UDC: 577

USE OF NULLOMERIC DNA SEQUENCE IN DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR TEST SYSTEMS

Tynysbekov B.K.¹ , Auganov A.N.¹ , Akhmetollayeva A.S.¹ , Akhmetollayev I.A.^{1*} ¹ National Center for Biotechnology, 13/5, Korgalzhyn hwy., Astana, 010000, Kazakhstan

Corresponding author: * akhmetollayev@biocenter.kz

ABSTRACT

This study describes the development of a real-time PCR (qPCR) system for the identification of *Pasteurella multocida* serotypes using nullomeric DNA sequences. *P. multocida* is a widespread animal pathogen, and its different serogroups (A, B, D, E, and F) are directly linked to disease severity and distribution. Serotype-specific diagnostics are of great importance for disease prevention and control in veterinary practice.

The main novelty of this approach lies in the use of nullomers in primer and probe design, which minimizes the risk of false-positive signals. Synthetic primers and probes were synthesized and their specificity tested against DNA from *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica*. Optimization experiments showed the most effective conditions were: $MgCl_2$ – 2.5 mM, dNTP – 0.5 mM and primer/probe concentration – 0.5 pM.

The newly developed qPCR system demonstrated high specificity and sensitivity: it reliably detected different concentrations of *P. multocida* DNA (ranging from 10^6 copies down to 1 copy/ μ L), with a detection threshold of approximately 100,000 copies. Serotype-specific primers produced clear amplification curves with no cross-reactivity observed.

These results confirm that the use of nullomer-based primers is an effective strategy for real-time PCR diagnostics. The advantages of this method highlight its potential for application in epidemiological monitoring, veterinary diagnostics, and integration into portable qPCR platforms. The developed system enables rapid and accurate identification of *P. multocida* serotypes and may serve as a model for detecting other bacterial pathogens.

Keyword: *Pasteurella multocida*, serogroups A, B, D, E and F, real-time PCR, qPCR, nullomers, primer designs, fluorescent probes, molecular diagnostics.