

ВЫВОДЫ

1. Частота выявления отдельных групп микроорганизмов, в том числе доминирующих видов лактобацилл, статистически значимо не отличалась у пациенток с нормоценозом в группах с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища и у клинически здоровых женщин.

2. У клинически здоровых женщин с нормоценозом лактофлора чаще была представлена *L.iners* (46,4%) и *L.crispatus* (48,8%), как и у пациенток с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища - 53,4% и 43,9% соответственно.

3. У пациенток с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища и нормоценозом отмечали достоверно меньшую долю лактобацилл при достоверно более высоком количестве и доле энтеробактерий; однако, реальная клиническая значимость этих различий является сомнительной.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? / Е. Э. Плотко, А. Е. Донников, Е. С. Ворошилина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2011. – №1. – С. 66–70.
2. Зорников Д.Л. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища / Д.Л. Зорников, Л.В. Тумбинская, Е.С. Ворошилина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2015. – № 4 (55). – С. 99-105.
3. Antonio M.A. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. / M. A. Antonio, L. K. Rabe, S. L. Hillier // J Infect Dis. – 2005. – №192. – P. 394-398.
4. Микробиоценоз влагалища с точки зрения ПЦР в реальном времени. Возможности коррекции дисбиотических нарушений влагалища. / Е.С. Ворошилина, И.В. Лаврентьева, Д.Л. Зорников [и др.] // Учебное пособие. – 2018. – 76 с.
5. A cluster analysis of bacterial vaginosis associated with microflora and pelvic inflammatory disease. / R. B. Ness, K. E. Kip, S. L. Hillier [et al.] // Am J Epidemiol. – 2005. – №15. – P. 58-90.
6. Vaginal microbiome of reproductive-age women. / Ravel, Jacques [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108. – P. 4680–4687.
7. Voroshilina E.S. Normal vaginal microbiota: patient's subjective evaluation, physical examination and laboratory tests. / E.S. Voroshilina, D.L. Zornikov, E.E. Plotko // Bulletin of RSMU. – 2017;. – №2. P. 39–42.
8. Наумкина Е.В. Бактериально-вирусные ассоциации при дисбиозах вагинального биотопа. / Е.В. Наумкина, Е.В. Матущенко, Е.В. Пахалкова // Бактериология. – 2019. – №4(3). P. 49–52.
9. Микророзологические сочетания вагинального и кишечного биотопов у женщин с воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта и девочек-подростков с дисфункцией яичников / С.М. Попкова, Е.Б. Ракова, Е.Е. Храмова [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2013. – №4. – С. 77-84.
10. Gardnerella vaginalis Subgroups Defined by cpn60 Sequencing and Sialidase Activity in Isolates from Canada, Belgium and Kenya. / J.J. Schellenberg, T. Paramel Jayaprakash, N. Withana Gamage, M.H. Patterson, M. Vaneechoutte [et al.] // PLOS ONE. – 2016. – №11(1). – P. 1–12.

Сведения об авторах

А.Е. Карякина* – студент

Л.А. Кишиева – студент

В.И. Трошина – студент

Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, доцент

Information about the authors

A.E. Kariakina* – Student

L.A. Kishieva – Student

V.I. Troshina – Student

D.L. Zornikov – Candidate of (Medicine) Science, Associate Professor

E.S. Voroshilina – Doctor of (Medicine) Science, Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

kariakina05@mail.ru

УДК: 616-071

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ПРОТООНКОГЕНА МТОР

Корнилов Даниил Олегович¹, Симарзина Вероника Михайловна¹, Тряпицын Михаил Андреевич¹, Маслаков Георгий Павлович², Бехтер Алексей Андреевич¹, Зорников Данила Леонидович¹

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/Протеинкиназа В (АКТ)/Механическая мишень рапамицина (mTOR) у млекопитающих представляет собой сигнальный путь, участвующий на клеточном уровне в пролиферации, аутофагии, апоптозе, метаболизме глюкозы и репарации ДНК. Доказано существование связи между активацией передачи сигналов mTOR и формированием злокачественных новообразований. **Цель исследования** – разработать *in silico* мультиплексную ПЦР тест-систему для анализа экспрессии протоонкогена *mTOR* с нормализацией по генам домашнего хозяйства - ТАТА-связывающий белок (*TBP*) и Рибосомальный Р-протеин 0 (*RPLP0*). **Материал и методы.** С помощью программного обеспечения Geneious Prime 2019.2.1 (Biomatters Ltd., USA) был аннотирован ген. С помощью веб-сервисов PrimerQuest Tool и OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., USA) были разработаны и проверены системы праймеров и зондов. Были выбраны каналы для детекции продуктов амплификации. **Результаты.** Были проверены системы праймеров и зондов для амплификации и детекции генов *mTOR* и *RPLP0*, была разработана система праймеров и зондов для постановки ПЦР гена *TBP*. **Выводы.** Была разработана новая мультиплексная ПЦР тест-система в качестве инструмента для анализа уровня экспрессии протоонкогена *mTOR*.

Ключевые слова: mTOR, ген-нормализатор, мультиплексная ПЦР, праймеры, зонд.

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX PCR TEST SYSTEM FOR ANALYZING THE EXPRESSION OF THE MTOR PROTO-ONCOGENE

Kornilov Daniil Olegovich¹, Simarzina Veronika Michailovna¹, Tryapitsyn Michael Andreevich¹, Maslakov Georgy Pavlovich², Behter Aleksei Andreevich¹, Zornikov Danila Leonidovich¹

¹Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

²Saint Petersburg State University

Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Protein kinase B (AKT)/Mechanical target of rapamycin (mTOR) in mammals is a signaling pathway involved at the cellular level in proliferation, autophagy, apoptosis, glucose metabolism and DNA repair. The existence of a link between the activation of mTOR signaling and the formation of malignant neoplasms has been proved. **The aim of the study** was to develop a multiplex PCR the kit to determine the expression with normalization by housekeeping genes - TATA-binding protein (TBP) and Ribosomal P-Protein 0 (RPLP0). **Material and methods.** Genes were annotated using Geneious Prime 2019.2.1 software (Biomatters Ltd., USA). Primer and probe systems were designed and validated using PrimerQuest Tool and OligoAnalyzer Tool web services (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). Channels for detection of amplification products were selected. **Results.** The primers and probe systems for amplification and detection of mTOR and RPLP0 genes were tested, the primers and probe for PCR of TBP gene were designed. **Conclusion.** A new multiplex PCR kit was proposed as a tool to determine the expression level of the mTOR proto-oncogene.

Keywords: mTOR, normalizer gene, multiplex PCR, primers, probe

ВВЕДЕНИЕ

Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/Протеинкиназа В (АКТ)/Механическая мишень рапамицина (mTOR) у млекопитающих представляет собой сигнальный путь, участвующий на клеточном уровне в пролиферации, аутофагии, апоптозе, метаболизме глюкозы и репарации ДНК [1]. В генетике экспрессия генов является наиболее фундаментальным механизмом, при котором генотип порождает фенотип, то есть наблюдаемый признак. Измерение экспрессии генов является основным методом оценки изменений в живых организмах для изучения физиологических и патофизиологических процессов. Доказано существование связи между активацией передачи сигналов *mTOR* и формированием таких патологий как рак молочной железы, рак почек, остеосаркома, меланома и т.д. [2]. Соответственно, зная уровень экспрессии этого гена, есть возможность предположить наличие опухолевого процесса *de novo* или рецидив злокачественного новообразования.

Самым распространенным подходом для анализа уровня экспрессии генов является измерение количества мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) [3]. Однако, достоверности и значимости такого анализа можно достичь только нормализацией, с выбором подходящих генов [4]. В качестве генов-нормализаторов принято использовать гены “домашнего хозяйства”, как наиболее

стабильно экспрессирующие в большинстве клеток организма в нормальных и патологических процессах [5].

Ранее исследователями Quidville V. et al была предложена мультиплексная ПЦР тест-система для анализа уровня экспрессии *mTOR* с нормализацией по генам “домашнего хозяйства” – ТАТА-связывающий белок (*TBP*) и Рибосомальный Р-протеин 0 (*RPLP0*), которые являются одними из самых стабильных генов-нормализаторов из известных на данный момент [4, 6], но, к сожалению, в данном исследовании содержится грубая ошибка, так как зонд на ген *TBP* перекрывает его праймер, что не соответствует требованиям работоспособности ПЦР тест-системы.

Цель исследования – разработать *in silico* мультиплексную ПЦР тест-систему для анализа экспрессии протоонкогена *mTOR* с нормализацией по генам *TBP* и *RPLP0* с соблюдением всех требований к мультиплексной ПЦР тест-системе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Поиск последовательностей (FASTA) исследуемых генов осуществляли в открытой базе данных NCBI Nucleotide. Для аннотирования генов использовали алгоритм Assemble по CDS (NCBI Nucleotide) в программном обеспечении Geneious Prime 2019.2.1 (Biomatters Ltd., USA). Для проектирования праймеров и зондов использовали веб-сервис PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). При разработке праймеров использовали следующие критерии отбора: [7]

- Специфичность - праймеры комплементарны только одному участку;
- Длина праймеров около 20 нуклеотидов;
- Гуанин-цитозинное соотношение около 50%;
- На концах праймеров расположена как минимум пара оснований гуанина и цитозина;
- Между праймерами не должно быть комплементарных регионов;
- Температура плавления праймеров от 55 до 65 оС.

К зонду предъявлялись следующие требования:

- Длина около 20 нуклеотидов;
- Гуанин-цитозинное соотношение около 50%;
- Не более четырех повторов гуанина и цитозина;
- Зонд должен быть расположен как можно ближе к праймерам, но не перекрывать их;
- Температура плавления должна быть выше таковой для праймеров на 8-10°С.

Анализ специфичности, фланкинга и спанинга праймеров осуществляли в программном обеспечении Geneious Prime 2019.2.1 (Biomatters Ltd., USA) с помощью алгоритма BLAST. Проверку праймеров на димеризацию проводили с использованием веб-сервиса OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies, Inc., USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Амплификация мРНК проводится методом одношаговой ОТ-ПЦР-РВ. Одним из доступных методов исключения амплификации геномной ДНК является так называемый “спаннинг” - расположение одного из праймеров или зонда с захватом двух экзонов.

Для последующей проверки праймеров на выполнение данного условия, осуществляли поиск последовательностей (FASTA) генов *mTOR* (NM_004958.4), *RPLP0* (NM_001002.4) и *TBP* (NM_003194.5). В качестве референсных последовательностей использовали данные 1-й (NC_000001.11), 12-й (NC_000012.12), 6-й (NC_000006.12) хромосом человека, в которых, соответственно, расположены искомые гены. Далее, аннотировали гены с выделением в них интронов и экзонов.

С использованием последовательностей с кодирующими участками генов, взятыми из предыдущего шага, проверили зонды и пары праймеров на гены *mTOR* и *RPLP0*, взятые из исследования Quidville V. et al [6], и доказали их эффективность. Далее разработали 10 систем праймеров и зондов на ген *TBP*, из которых отобрали наиболее специфичную и подходящую под прочие условия пару праймеров и зонд. Последовательности и параметры всех выше указанных праймеров и зондов указаны в таблице (таблица 1).

Таблица 1.

Последовательности и характеристики систем праймеров и зондов.

№	Название	Последовательность	Длина ампликона	T плавления	GC %	Канал
Forward	<i>mTOR</i>	GCCCAGGCCGCATTGTCTCTAT	84	68	59,1	FAM
Reverse		GCAGTAAATGCAGGTAGTCATCCAGGTT		73	60	
Probe sense		TGGCTGCAATCCAGCTGTTTGGCGC		68	46,4	
Forward	<i>RPLP0</i>	GGCGACCTGGAAGTCCAATA	149	66	57,1	HEX
Reverse		CCATCAGCACCCACAGCCTTC		65	60	
Probe antisense		ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA		72	56	
Forward	<i>TBP</i>	CACGAACCACGGCACTGATT	89	65	55	ROX
Reverse		TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC		65	50	
Probe sense		TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA		69	52	

Следующим шагом был анализ фланкинга и спанинга праймеров (рис. 1). Праймеры на *mTOR* и *RPLP0* расположены с фланкингом 21 и 22 экзонов, 2 и 3 экзонов соответственно. Зонд системы для амплификации *TBP* расположен со спанингом интрона между 5 и 6 экзонами.

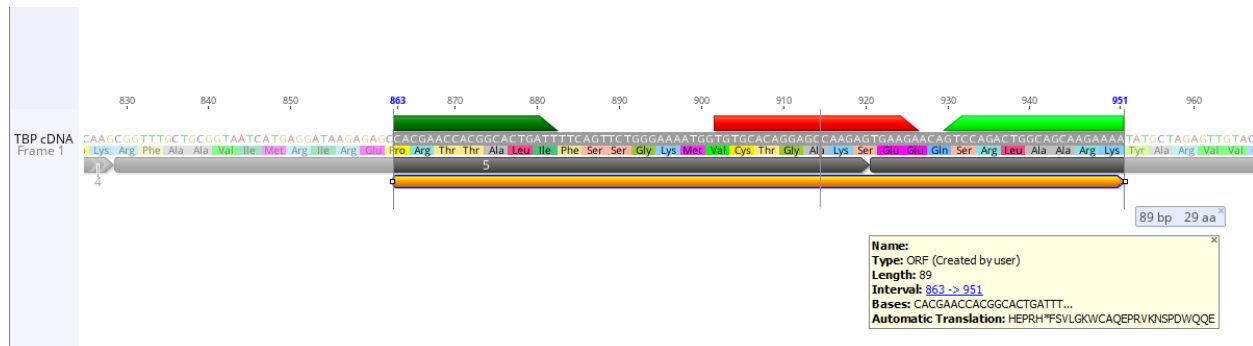


Рис. 1 Система праймеров и зонда для амплификации гена TBP со спанингом 5 и 6 экзона.

В завершение, проверили полученные праймеры на димеризацию (рис. 2). У праймеров на *mTOR*, *RPLP0* и *TBP* не образуется прочных димеров, что говорит о низком риске образования неспецифических продуктов амплификации.

Primary Sequence: 5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3'
Secondary Sequence: 5'-TTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3'
Maximum Delta G: -41.81 kcal/mol

Delta G: -8.16 kcal/mol **Base Pairs:** 4
5' CACGAACCACGGCACTGATT
: |||| :
3' CAGGTCTGACCGTCGTTCTTTT

Delta G: -5.09 kcal/mol **Base Pairs:** 3
5' CACGAACCACGGCACTGATT
: :: : ||| :
3' CAGGTCTGACCGTCGTTCTTTT

Delta G: -5.02 kcal/mol **Base Pairs:** 3
5' CACGAACCACGGCACTGATT
|||
3' CAGGTCTGACCGTCGTTCTTTT

Рис. 2 Проверка гетеродимеризации праймеров для гена TBP.

Для детекции продуктов амплификации *mTOR*, *RPLP0* и *TBP* выбрали наиболее широко используемые каналы FAM, HEX и ROX соответственно, с использованием флуоресцентных Taqman зондов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая онкогенный потенциал пути PI3K/AKT/mTOR, тест-система для анализа уровня экспрессии гена *mTOR* может иметь высокое клиническое значение в качестве скринингового метода определения активного опухолевого процесса таких новообразований, как рак молочной железы, рак почек, остеосаркома, меланома. Кроме того, предложенная тест-система может быть использована для оценки эффективности противоопухолевой терапии препаратами рапалогам (ингибиторами mTOR), при ведении пациентов в ремиссии вышеперечисленных заболеваний, для своевременной диагностики рецидива.

Следующим этапом работы над данной тест-системой станет разработка протокола амплификации и детекции исследуемых генов, определение аналитической чувствительности и специфичности тест-системы, эффективности ПЦР. В случае удовлетворительных показателей работы тест-системы, будет возможным приступить к оценке диагностической ценности уровня экспрессии гена *mTOR* для выявления PI3K-активных злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

С помощью биоинформатического анализа проверены уже существующие системы праймеров и зондов для амплификации и детекции генов *mTOR* и *RPLP0*. Разработана система праймеров и зондов для постановки ПЦР гена *TBP*. Предложена новая мультиплексная ПЦР тест-система в качестве инструмента для анализа уровня экспрессии протоонкогена *mTOR* с нормализацией по генам “домашнего хозяйства” *RPLP0* и *TBP*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects / D. Miricescu, A. Totan, I. Stanescu-Spinu [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Т. 22. – №. 1. – С. 173-194.
2. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges / Z. Zou, T. Tao, H. Li [et al.] // Cell & bioscience. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 31-42.
3. Adeola F. Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human cell line: comparison of 12 endogenous reference genes / F. Adeola // Ethiopian journal of health sciences. – 2018. – Т. 28. – №. 6. – P. 741-748.
4. Valid gene expression normalization by RT-qPCR in studies on hPDL fibroblasts with focus on orthodontic tooth movement and periodontitis / C. Kirschneck, S. Batschkus, P. Proff [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-13.
5. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets / B.W. Hounkpe, F. Chenou, F. de Lima [et al.] // Nucleic acids research. – 2021. – Т. 49. – №. D1. – С. 947-955.
6. Targeting the deregulated spliceosome core machinery in cancer cells triggers mTOR blockade and autophagy / V. Quidville, S. Alsafadi, A. Goubar [et al.] // Cancer research. – 2013. – Т. 73. – №. 7. – С. 2247-2258.
7. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods / V. Quidville, S. Alsafadi, A. Goubar [et al.] // PCR primer design. – 2015. – С. 31-56.

Сведения об авторах

Д.О. Корнилов* – лаборант-исследователь
 В.М. Симарзина – лаборант-исследователь
 М.А. Тряпицын – лаборант-исследователь
 Г.П. Маслаков – инженер-исследователь
 А.А. Бехтер – студент
 Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.O. Kornilov – Assay Assistant of Laboratory
 V.M. Simarzina – Assay Assistant of Laboratory
 M.A. Tryapitsyn – Assay Assistant of Laboratory
 G.P. Maslakov – Assay Assistant of Department
 A.A. Behter – Student of pediatrics
 D.L. Zornikov – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
 danilovkornil@gmail.com

УДК: 616-093/-098

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА И ПЦР-РВ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И СТАФИЛОКОККОВ В ОБРАЗЦАХ ФЕКАЛИЙ ДЕТЕЙ

Корнишева Анна Владимировна¹, Кейних Андрей Евгеньевич², Корнилов Даниил Олегович², Тряпицын Михаил Андреевич², Симарзина Вероника Михайловна², Аминева Полина Геннадьевна^{1,5}, Итани Тарек Мохамедович³, Зорников Данила Леонидович^{1,2}, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,4}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

²Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

³Лаборатория энтеральных вирусных инфекций

ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора

⁴Медицинский центр «Гармония»

⁵Медицинский центр «Кволити Мед»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Энтеробактерии и стафилококки являются самыми распространенными условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) кишечника. Идентификацию данных УПМ в фекалиях детей, как правило, проводят в рамках культурального исследования на дисбактериоз кишечника. На сегодняшний день в качестве альтернативы культуральному исследованию для этих целей может использоваться полимеразная цепная реакция (ПЦР), что требует исследования диагностической ценности этого метода. **Цель исследования** – провести сравнительный анализ культурального исследования и ПЦР-РВ в реальном времени для количественной оценки энтеробактерий и стафилококков в микробиоме кишечника детей. **Материал и методы.** 202 образца фекалий детей в возрасте от 0 до 14 лет, направленных для исследования на дисбактериоз кишечника в три разные лаборатории, были одновременно исследованы культуральным методом и методом ПЦР-РВ в