

# ОПТИМИЗАЦИЯ СХЕМЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ *TRICHOPHYTON RUBRUM* МЕТОДОМ ПЦР-РВ/ OPTIMIZATION OF TAQMAN SNP GENOTYPING ASSAY FOR MOLECULAR TYPING OF *TRICHOPHYTON RUBRUM* ISOLATES



Сташук А.А.

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Руководители

Пчелин И.М., Тараскина А.Е.

## Введение

Популяция дерматомицета *T. rubrum* на территории РФ представлена двумя генетическими линиями, которые можно дискриминировать по вариациям длины локуса TRS-1 нетранскрибируемого спейсера рибосомной ДНК и, независимо, по точечным мутациям в белок-кодирующих локусах TERG\_02941 и TERG\_03298.<sup>1</sup> Методы, используемые для их детекции в настоящее время, достаточно трудоемки. При этом, определение генетического варианта (точечной мутации) возможно методом ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными флуоресцентными зондами.

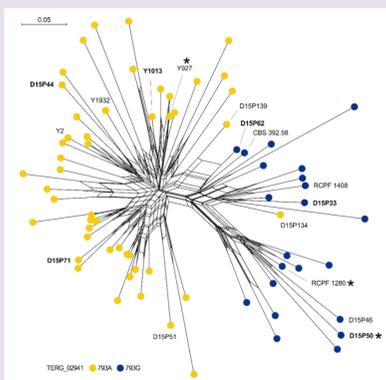
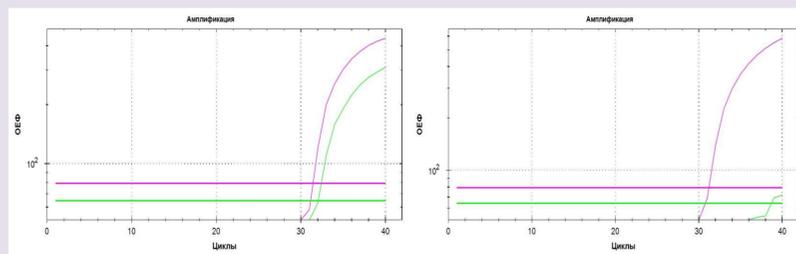


Рисунок 1. Результаты типирования 70 изолятов *Trichophyton rubrum* по мутации TERG\_02941 G793A.

## Результаты

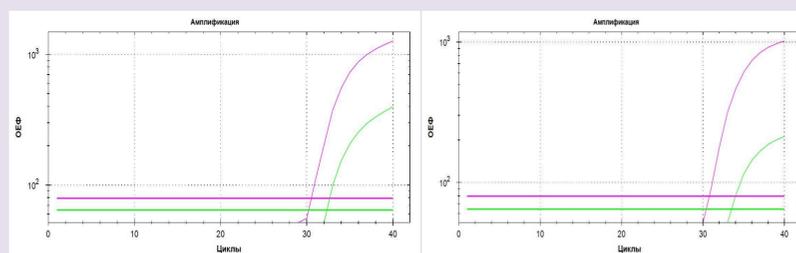
Средние различия между значениями  $C_t$  продуктов при температуре отжига 59,0 °С с набором I составляли примерно 4 цикла, а с набором праймеров II — 3 цикла (рисунок 2 Б, Г). То есть, при использовании набора олигонуклеотидов I неспецифичный сигнал запаздывал на большее количество циклов по отношению к специфичному, чем при использовании набора II (рисунок 2). Также мы наблюдали зависимость между температурой отжига праймеров и разницей между значениями  $C_t$  специфичных и неспецифичных продуктов ПЦР. При снижении температуры отжига на 2,0 °С наблюдалась тенденция к снижению запаздывания на один цикл.

Рисунок 2.



А) D15P44\_I\_55

Б) D15P44\_I\_59



В) D15P44\_II\_55

Г) D15P44\_II\_59

## Цель

Разработать быстрый метод типирования генетических линий изолятов *T. rubrum* на основе ПЦР в реальном времени.

## Материалы и методы

Для генотипирования изолятов *T. rubrum* было подобрано два набора олигонуклеотидов. В зондах из набора олигонуклеотидов I дискриминирующий нуклеотид находился в положении 2 относительно 3'-конца. В зондах из набора II дискриминирующий нуклеотид находился в положении 4. Сравнительное тестирование двух наборов праймеров и зондов проводили на четырёх образцах геномной ДНК *T. rubrum*, при температурах отжига праймеров 59,0, 56,6 и 55,0 °С. Эффективность наборов олигонуклеотидов определяли как разность пороговых значений  $C_t$  специфичного и неспецифичного продукта реакции.

### Набор олигонуклеотидов I

Прямой праймер TACCACGCCCGTCAAAGG  
AACCAGGCAAGGATTGTGGCCGGCCAGAACGATGGCTTACCACGCCCGTCAAAGGC/ACTCGCAAA  
GTGAAACGGAAGAAGACTTGGAGCCGGCAAGAACAAGTGCAGGACTTTACGAGCAAGAGTAAATTTCG  
Обратный праймер CCACTTGTTCCTTGCCGGCTT

Зонд 793A FAM-TCTTCCGTTTCACTTTGCGAGTG-BHQ1 зонд 793G ROX-TCTTCCGTTTCACTTTGCGAGCG-BHQ2

### Набор олигонуклеотидов II

Прямой праймер GGCTTACCACGCCCGTC  
AACCAGGCAAGGATTGTGGCCGGCCAGAACGATGGCTTACCACGCCCGTCAAAGGCC/ACTCGCAAA  
GTGAAACGGAAGAAGACTTGGAGCCGGCAAGAACAAGTGCAGGACTTTACGAGCAAGAGTAAATTTCG  
Обратный праймер CCACTTGTTCCTTGCCGGCTT

Зонд 793A FAM-TCCGTTTCACTTTGCGAGTGGC-BHQ1 зонд 793G ROX-TCCGTTTCACTTTGCGAGCGGC-BHQ2

## Выводы

Для генотипирования изолятов *T. rubrum* по мутации TERG\_02941 G793A методом ПЦР-РВ с аллель-специфичными зондами следует использовать набор олигонуклеотидов I, при температуре отжига праймеров 59,0 °С.

## Библиография

1. Pchelin I.M. et al. *Med. Mycol.* 2018.



**КОНКУРС НАУЧНЫХ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И СТУДЕНТОВ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС  
по медицинской микробиологии, эпидемиологии,  
клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения)  
9-11 ноября 2020 г., Санкт-Петербург, Россия**

