

УДК 578.4; 579.62

¹Н.К.Оразымбетова, ²Е.Д.Бурашев, ²С.Ш.Нурабаев, ²Ж.К.Кошеметов, ¹Г.Д.Наханова,
¹М.С.Сейсенбаева, ²Б.К.Умуралиев, ²Х.Б.Абеуов, ²А.Р.Әбдімұхтар, ¹А.Т.Жунушов, ¹
А.К.Мадумаров ¹

¹Институт биотехнологии НАН КР, E-mail: biotech.nas@gmail.com

²Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, п.г.т.
Гвардейский, Казахстан, E-mail: koshemetov2008@mail.ru

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ НА ГЕН *rpob* К ВОЗБУДИТЕЛЮ *MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSP. CAPRI*

Аннотация. В статье описаны результаты исследований по подбору специфических праймеров на основе гена *rpob* возбудителя контагиозной плевропневмонии коз (КППК). Для подбора специфических праймеров были использованы ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Синтез праймеров осуществлялся методом химического концентрирования на приборе «Synthesizer H-16» «K&A Laborgeraete». В результате проведенной работы были отобраны три пары праймеров для гена *rpob*, удовлетворяющих по всем параметрам.

Ключевые слова: контагиозная плевропневмония коз, ген, возбудитель

MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSP. CAPRI КОЗДУРГУЧУНУН *rpob* ГЕНИНЕ ПРАЙМЕР ТАНДОО

Аннотация. Макалада эчкинин контагиоздук плевропневмоний (кппк) козгогуч *rpob* генинин негизинде атайын праймерлерди тандоо боюнча изилдөөлөрдүн натыйжалары баяндалган. Атайын праймерлерди тандоо үчүн, NCBI ресурстар колдонулган: BLAST nucleotide жана PRIMER BLAST. Праймердин синтези «Synthesizer H-16» «K&A Laborgeraete» приборго химиялык концентрациялоо ыкмасы менен жүргүзүлдү. Жүргүзүлгөн иштердин натыйжасында *rpob* гени үчүн бардык жагынан канааттандырган үч жуп праймер тандалып алынган.

Негизги сөздөр: эчкинин жугуштуу плевропневмониясы, ген, патоген.

SELECTION OF PRIMERS FOR THE *rpob* GENE TO THE PATHOGEN *MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSP. CAPRI*

Abstract. The article describes the results of studies on the selection of specific primers based on the *rpob* gene of the causative agent of contagious goat pleuropneumonia (CBPP). For the selection of specific primers, NCBI resources were used: BLAST nucleotide and PRIMER BLAST. Primer synthesis was carried out by chemical preconcentration on a Synthesizer H-16 device (K&A Laborgeraete). As a result of the work carried out, three pairs of primers for the *rpob* gene were selected, satisfying in all respects.

Key words: goat contagious pleuropneumonia, gene, pathogen.

Введение. Контагиозная плевропневмония коз – (КППК) – чрезвычайно контагиозная микоплазменная болезнь коз. Заболевание характеризуется тяжелой серофибринозной плевропневмонией, очень высокой заболеваемостью (до 100 %) и смертностью (до 80-100 %) [1]. КППК поражает коз более чем в 40 странах мира, тем самым создавая серьезную угрозу для козоводства по всему миру. Характерными клиническими признаками КППК являются тяжелые респираторные расстройства, связанные с серомукоидными выделениями из носа, кашлем, одышкой, пирексией, плевродинией и общим недомоганием [2]. На более поздних стадиях наблюдаются тяжелая долевая фибринозная плевропневмония, обильное скопление жидкости в плевральной полости, сильная закупорка легких и образование спаек. [3, 4].

Контагиозная плевропневмония коз является эндемичной болезнью в Африке и Азии, в том числе в странах Центральной Азии, и наносит большой экономический ущерб [5, 6, 7, 8].

Болезнь широко распространена в Индии, Китае, Монголии, Испании и странах Среднего и Ближнего Востока [9.].

Возбудитель *Mycoplasma mycoides subsp. capri* по морфологическим и культуральным свойствам сходен с возбудителем КПП крупного рогатого скота, но по антигенной структуре отличается от него (в РСК регистрируют неполную перекрестную реакцию). Морфологически имеет форму кокков, палочек и нитей. Окрашивается неравномерно.

Возбудитель сохраняет жизнеспособность в легочном содержимом при температуре 10 °С в течение 40 сут, при 4 °С – 2 мес, при высушивании на воздухе активен 3 сут, при 2 °С – не менее 15 сут, при 58 °С инактивируется за 30 мин. Под воздействием 3 %-ного раствора креолина, 0,5 %-ного формальдегида, 2 %-ных растворов фенола и гидроксида натрия возбудитель погибает в течение 3 ч.

Многие факторы могут объяснить дли-

тельный период между описанием болезни и описанием возбудителя. Во-первых, *Mycoplasma capricolum subsp. capri pneumoniae* (MccF38) очень трудно выращивать *in vitro*, что объясняет, почему он был выделен только в 1976 году, тогда как возбудитель заразного крупного рогатого скота плевропневмония (СВРР), аналогичная микоплазменная болезнь крупного рогатого скота, была выделена в 1898 году. Более того, MccF38 относится к так называемому «кластеру микоидов», группе из шести видов или подвидов микоплазмы, которые имеют много общих антигенных и генотипических характеристик. Общие черты, проявляемые этими микоплазмами, часто приводили в замешательство диагностов или систематиков [10].

Геном *Mycoplasma mycoides subsp. capri* в зависимости от штамма состоит примерно из 93000-98000 п.о. [11].

В зарубежных странах метод ПЦР успешно применяют для диагностики болезни. Разработка эффективных, быстрых и надежных методов диагностики КППК является весьма актуальной проблемой для Казахстана.

Методы исследований

Поиск нуклеотидных последовательностей. Поиск нуклеотидных последовательностей полных геномов микоплазмы КППК проводили в международной базе данных GenBank на сайте NCBI. Выравнивание проводили с использованием программы MUSCLE, входящей в пакет программ UGENE v.36.0.

Подбор праймеров. Специфические олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения КППК с помощью ПЦР, подбирали с помощью программы «Pick Primers» из международной базы BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Анализ праймеров. Проверку проводили с использованием программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Синтетических олигонуклеотидов выбирали по следующим параметрам: длина прай-

меров 16-25 нуклеотидов; содержание GC-пар – 50-60 %; разница в температуре отжига обоих праймеров – не более 6 °С; праймеры не должны быть само- и взаимно-комплементарными; нуклеотиды 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матрице.

Синтез олигонуклеотидов. Компьютерно-моделированные последовательности праймеров в дальнейшем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов «Synthesizer H-16» «K&A Laborgeraete». Синтез ДНК проводили согласно протоколам, прилагаемым к прибору. Полученные олигонуклеотиды элюировали с колонок концентрированным раствором аммиака и выпаривали в вакуумном испарителе CentriVar Concentrator, LABCONCO. Преципитат праймеров растворяли в TE буфере и переосаждали этанолом. Полученные таким образом синтезированные праймеры использовали для отработки постановки ПЦР.

Результаты исследования

Эффективность метода ПЦР и ее специфичность зависит от многих параметров, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим, специфичность и чувствительность подобранных праймеров. Однако, наиболее критическим этапом при разработке метода ПЦР, сказывающимся в особенности на его специфичность, является правильный подбор праймеров, его локализация на исследуемой ДНК или РНК.

Поиск нуклеотидных последовательностей

Поиск нуклеотидных последовательностей полных геномов возбудителя КППК проводили в международной базе данных GenBank на сайте NCBI. В результате было получено 132 полных последовательностей генома для разных штаммов (рисунок 1).

1. [Mycoplasma mycoides subsp. capri strain PG3 RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA
Accession: EF071834.1 GI: 118426137
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

2. [Mycoplasma mycoides subsp. capri strain 2002-054 \(VP9L\) RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA
Accession: EF071838.1 GI: 118426145
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

3. [Mycoplasma mycoides subsp. capri strain 2003-045-C2 RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA
Accession: EF071837.1 GI: 118426143
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

4. [Mycoplasma mycoides subsp. capri strain N108 RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA
Accession: EF071836.1 GI: 118426141
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

5. [Mycoplasma mycoides subsp. capri strain L RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA
Accession: EF071835.1 GI: 118426139
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

6. [Mycoplasma mycoides subsp. capri LC strain WK354 RpoB \(rpoB\) gene, partial cds](#)
625 bp linear DNA

Find related data
Database: Select
Find items

Search details
subsp.[All Fields] AND capri[All Fields] AND rpoB[All Fields]
Search See more...

Recent activity
Turn Off Clear

Q Mycoplasma mycoides subsp. capri rpoB (132) Nucleotide

Q RpoB (1045254) Nucleotide

Sheeppox virus isolate Egy-BSU/MEVAC /2016-SPPV G-protein-coupled chem Nucleotide

Sheeppox virus isolate SPPV/Ahmedabad /2009/India/P5 L1R (L1R) gene, compl Nucleotide

Q SPPV (603) Nucleotide
See more...

Рис. 1. Штаммы КППК в международной базе данных

Подбор праймеров

Для подбора праймеров были выбраны области кодирующего гена *rpoB*.

Праймеры подбирали с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В качестве референтной последовательности был использован геном с GenBank. В результате были подобраны 10 пар праймеров на два штамма (рисунки 2, 3 и 4.)

GenBank KU852941.1

Mycoplasma mycoides subsp. capri strain LC105 DNA-directed RNA polymerase subunit beta (*rpoB*) gene, partial cds

GenBank: KU852941.1
[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to: ☺

LOCUS KU852941 796 bp DNA linear BCT 24-JUL-2016
 DEFINITION Mycoplasma mycoides subsp. capri strain LC105 DNA-directed RNA polymerase subunit beta (*rpoB*) gene, partial cds.
 ACCESSION KU852941
 VERSION KU852941.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Mycoplasma mycoides subsp. capri
 ORGANISM [Mycoplasma mycoides subsp. capri](#)
 Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 796)
 AUTHORS Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., de la Fe, C., Gomez-Martin, A., Paterna, A., Corrales, J. C., Contreras, A. and Sanchez, A.
 TITLE Multilocus sequence typing of Mycoplasma mycoides subsp. capri to assess its genetic variability in a contagious agalactia endemic area
 JOURNAL Vet. Microbiol. 191, 60-64 (2016)
 PUBMED [27374908](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 796)
 AUTHORS Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., Paterna, A., Gomez-Martin, A., Amores, J., Sanchez, A., Contreras, A., Corrales, J. C. and de la Fe, C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (01-MAR-2016) Animal Health, University of Murcia, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo s/n, Murcia 30100, Spain

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..796
 /organism="Mycoplasma mycoides subsp. capri"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="LC105"
 /sub_species="capri"
 /db_xref="taxon:40477"
[gene](#) <1..>796
 /gene="rpoB"
[CDS](#) <1..>796
 /gene="rpoB"
 /codon_start=2
 /transl_table=4
 /product="DNA-directed RNA polymerase subunit beta"
 /protein_id="ANT82767.1"
 /translation="NQDENGKILDEIIVSRFNGDDYMAKVEEIDYIDVSPKQIVSVATSGIPFLENDANRALMGANMQRQAVPLIRPESPIVATGIEFEAARD5GEAIVAKEDAI VKYVDSKTIITDGESGIRTYILSDYERSNNGTSLTQSPIVKVGDIKKGEEIADGPSM DQGLAIGQNVVAFSTYNGYNFEDAI VMSERIVIDDRFTSIHIDEYTLVNRNKKQG EEVREIPNMSEQAQRHLDAEGIVAIGTEVKVGDVVLVGVVTPKQVQ"

ORIGIN
 1 taatcaagat gaaaatggaa aaattttaga tgaattata gtttcacgtt ttaatggta
 61 tgactatagt gctaaagttg aagaattga ttatattgat gtttctcaa aacaaattgt
 121 ttcagttgct acaagtggta ttccatttt agaaaatgat gatgccaacc gtgctttaat
 181 ggggtgctaac atgcaacgtc aagcagtacc tctaattaga ccagaatcac caattgttgc
 241 aactgttatt gaatttgaag cagcagtgta ttcaggtgag gctattgttg caaagaaga
 301 tgcgaattgtt aaatattgtt attcaaaaac tattattact gatggagaat ctggaattag
 361 aacttatatt ctatcagatt atgaaagatc aataatgga acttcattaa ctcaatcacc
 421 aattgttaaa gttggagatg ttattaaaa aggtgaaatt attgctgatg gtccatcaat
 481 ggatcaaggt gaattagcaa ttggtcaaaa cgtagttgtt gcttttcaa cttataatgg
 541 atacaacttt gaagatgcta ttgttatgag tgaagaat gttattgatg atcgctttac
 601 ttcattcatc attgatgaat atactttaga agtaagaat acaaaacaag gtaagaaga
 661 agtaactaga gaaattccta atatgtcaga acaagctaaa agacatttag atgctgaagg
 721 aattqtaact attgttactg aaqttaaaq tqaagattt ttaattgaa aatgaactc

Change region shown
 Customize view
 Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence
 Related information
 Protein
 PubMed
 Taxonomy
 PopSet
 LinkOut to external resources
 Order *rpoB* cDNA clone/Protein/Antibody/RNAi [OriGene]
 Recent activity
 Turn Off Clear
 Mycoplasma mycoides subsp. capri strain LC105 DNA-directed RNA polymerase subunit beta Nucleotide
 Mycoplasma mycoides subsp. capri LC strain Y-goat RpoB (*rpoB*) gene, partial cds Nucleotide
 Mycoplasma mycoides subsp. capri strain N108 RpoB (*rpoB*) gene, partial cds Nucleotide
 Mycoplasma mycoides subsp. capri strain 2002-054 (VP9L) RpoB (*rpoB*) gene, partial cds Nucleotide
 Mycoplasma mycoides subsp. capri strain 2003-045-C2 RpoB (*rpoB*) gene, partial cds Nucleotide
 See more..

Рис. 2. Наименование и характеристика гена *rpoB* (штамм LC105)

GenBank Send to:

Мycoplasma mycoides subsp. capri strain PG3 RpoB (rpoB) gene, partial cds

GenBank: EF071834.1
[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS EF071834 625 bp DNA linear BCT 15-OCT-2015
DEFINITION Mycoplasma mycoides subsp. capri strain PG3 RpoB (rpoB) gene, partial cds.
ACCESSION EF071834
VERSION EF071834.1
KEYWORDS .
SOURCE Mycoplasma mycoides subsp. capri
ORGANISM [Mycoplasma mycoides subsp. capri](#)
 Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.
REFERENCE 1 (bases 1 to 625)
AUTHORS Manso-Silvan, L., Perrier, X. and Thiaucourt, F.
TITLE Phylogeny of the Mycoplasma mycoides cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group
JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57 (PT 10), 2247-2258 (2007)
PUBMED [17911291](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 625)
AUTHORS Manso-Silvan, L., Perrier, X. and Thiaucourt, F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-OCT-2006) EMT UPR 15: Control of Exotic and Emerging Animal Diseases, CIRAD, TA 30/G, Campus International Baillarguet, Montpellier, Cedex 5 34398, France

FEATURES
 source
 Location/Qualifiers
 1..625
 /organism="Mycoplasma mycoides subsp. capri"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="PG3"
 /sub_species="capri"
 /type_material="type strain of Mycoplasma mycoides subsp. capri"
 /db_xref="taxon:40477"
 /note="type strain of Mycoplasma mycoides subsp. capri"
 <1..>625
 /gene="rpoB"
 <1..>625
 /gene="rpoB"
 /codon_start=3
 /transl_table=4
 /product="RpoB"
 /protein_id="ABK90968.1"
 /translation="VSRFNGDDYMAKVEEIDYIDVSPKQIVSVATSGIPFLENDANR
 ALMGANMRQAVPLIRPESPIVATGIEFEAARDSGEAIVAKEDAIVKYVDSKTIITDG
 ESGIRTYILSDYERSNNGTSLTQSPIVKVDVVKKEIIDGSPMDGELAIQNVVV
 AFSITYNGYFEDAIVMSERIVIDDRFTSIHIDEYTLVRNTKQGQEEV"
 ORIGIN
 1 tagtttcacg ttttaatggt gatgactata tgcctaaagt tgaagaatt gattatattg
 61 atgtttctcc aaaacaaatt gtttcagttg ctacaagggt tattccattt ttagaaaaatg
 121 atgatgccaa ccgtgcttta atgggtgcta acatgcaacg tcaagcagta cctttaatta
 181 gaccagaatc accaattggt gctactgcta tgaatttga agcagcacgt gattcaggtg
 241 aagctattgt tgcaaaagaa gatgcaatcg ttaaatatgt tgattcaaaa actattatta
 301 ctgatggaga atctggaatt agaacttata ttctatcaga ttatgaagaa tcaaaataatg
 361 gaacttcatt aactcaatca ccaattgtta aagttggaga tgttgttaaa aaagtgaaa
 421 ttattgctga tggatcatca atggatcaag gtgaattagc aattgtgcaa aacgtggtg
 481 ttgcttttc aacttataat ggatacaact ttgaagatgc tattgttatg agtgaagaa
 541 ttgttataga tgatcgtttt actcaatc atattgatga atatacttta gaagtaagaa
 601 atacaaaaca aggtcaagaa gaagt
 //

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Protein

PubMed

Taxonomy

PopSet

LinkOut to external resources

Order rpoB cDNA clone/Protein/Antibody/RNAi
[OriGene]

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

Mycoplasma mycoides subsp. capri strain PG3 RpoB (rpoB) gene, partial cds Nucleotide

Mycoplasmamycodes subsp. capri rpoB (132) Nucleotide

RpoB (1045254) Nucleotide

Sheeppox virus isolate Egy-BSU/MEVAC /2016-SPPV G-protein-coupled chem Nucleotide

Sheeppox virus isolate SPPV/Ahmedabad /2009/India/P5 L1R (L1R) gene, compl Nucleotide

[See more...](#)

Рис. 3. Наименование и характеристика гена rpoB (штамм PG3)

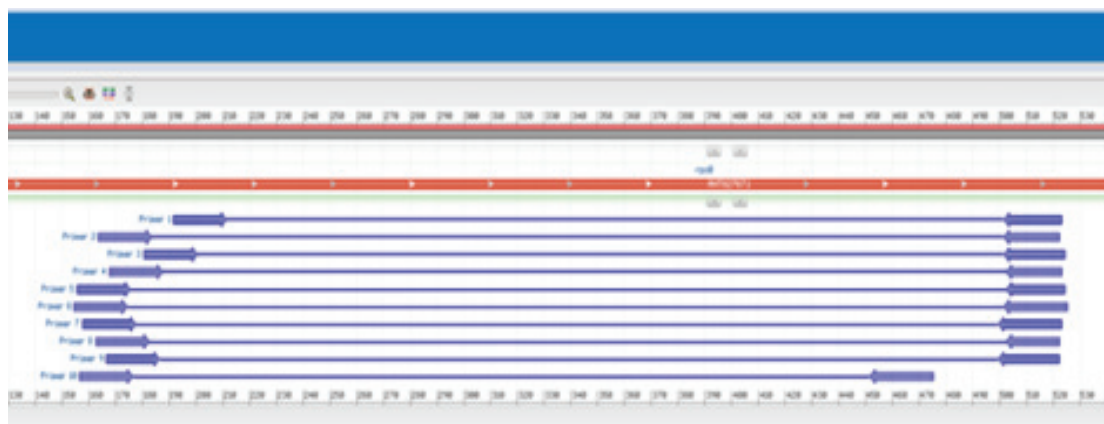


Рис. 4. Графическое представление подобранных пар праймеров к гену rpoB на геноме

Характеристики праймеров указаны ниже.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Len g th	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complementa rity	Self 3' complementa rity
Forward primer	TGCAACGTCAAGCA GTACCT	Plus	20	154	173	59.89	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	AGCAACAACCACGT TTTGACC	Minus	21	485	465	60.14	47.62	5.00	1.00
Product length	332								

Products on intended targets

[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 332

Forward primer 1 TGCAACGTCAAGCAGTACCT 20

Template 953063 953044

Reverse primer 1 AGCAACAACCACGTTTTGACC 21

Template 952732T..... 952752

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Templa te strand	Len g th	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complementa rity	Self 3' complementa rity
Forward primer	GCCAACCGTGCTT TAATGGG	Plus	20	126	145	60.11	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	GCAACAACCACGT TTTGACC	Minus	20	484	465	58.73	50.00	5.00	0.00
Product length	359								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 359

Forward primer 1 GCCAACCGTGCTTTAATGGG 20

Template 953091 953072

Reverse primer 1 GCAACAACCACGTTTTGACC 20

Template 952733T..... 952752

Primer pair 3

	Sequence (5'->3')	Templ ate strand	Len gth	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complemen tarity	Self 3' complemen tarity
Forward primer	GGGTGCTAACAT GCAACGTC	Plus	20	143	162	59.83	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GCAACAACCACG TTTTGACCA	Minus	21	484	464	60.40	47.62	5.00	2.00
Product length	342								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) Mycoplasma mycoides subsp. capri str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 342

Forward primer 1 GGGTGCTAACATGCAACGTC 20

Template 953074 953055

Reverse primer 1 GCAACAACCACGTTTTGACCA 21

Template 952733T..... 952753

Primer pair 4

	Sequence (5'->3')	Templ ate strand	Len gth	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complemen tarity	Self 3' complemen tarity
Forward primer	ACCGTGCTTTAAT GGGTGCT	Plus	20	130	149	60.25	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	AGCAACAACCACG TTTTGAC	Minus	20	485	466	57.73	45.00	5.00	3.00
Product length	356								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) Mycoplasma mycoides subsp. capri str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 356

Forward primer 1 ACCGTGCTTTAATGGGTGCT 20

Template 953087 953068

Reverse primer 1 AGCAACAACCACGTTTTGAC 20

Template 952732T..... 952751

Primer pair 5

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Leng th	Sta rt	Sto p	T _m	GC %	Self complementa rity	Self 3' complementa rity
Forward primer	AATGATGATGCCA ACCGTGC	Plus	20	117	136	59.54	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	AAGCAACAACCA CGTTTTGAC	Minus	21	486	466	58.40	42.86	5.00	3.00
Product length	370								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 370

Forward primer 1 AATGATGATGCCAACCGTGC 20

Template 953100 953081

Reverse primer 1 AAGCAACAACCACGTTTTGAC 21

Template 952731T..... 952751

Primer pair 6

	Sequence (5'→3')	Templa te strand	Leng th	Sta rt	Sto p	T _m	GC %	Self complementa rity	Self 3' complementa rity
Forward primer	TGCCAACCGTGCT TTAATGG	Plus	20	125	144	59.40	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	CAACAACCACGTT TTGACCA	Minus	20	483	464	57.36	45.00	5.00	2.00
Product length	359								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 359

Forward primer 1 TGCCAACCGTGCTTTAATGG 20

Template 953092 953073

Reverse primer 1 CAACAACCACGTTTTGACCA 20

Template 952734T..... 952753

Primer pair 7

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Leng th	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complement arity	Self 3' complement arity
Forward primer	AACCGTGCTTTAAT GGGTGC	Plus	20	12 9	14 8	59.4 0	50.0 0	4.00	2.00
Reverse primer	AAGCAACAACCACG TTTTGACC	Minus	22	48 6	46 5	60.6 7	45.4 5	5.00	1.00
Product length	358								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) Mycoplasma mycoides subsp. capri str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 358

Forward primer 1 AACCGTGCTTTAATGGGTGC 20

Template 953088 953069

Reverse primer 1 AAGCAACAACCACGTTTTGACC 22

Template 952731T..... 952752

Primer pair 8

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Leng th	Sta rt	Sto p	Tm	GC %	Self complement arity	Self 3' complement arity
Forward primer	ATGGGTGCTAACA TGCAACG	Plus	20	14 1	16 0	59.1 9	50.0 0	4.00	2.00
Reverse primer	AAAGCAACAACCA CGTTTTGAC	Minus	22	48 7	46 6	59.0 1	40.9 1	5.00	3.00
Product length	347								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) Mycoplasma mycoides subsp. capri str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 347

Forward primer 1 ATGGGTGCTAACATGCAACG 20

Template 953076 953057

Reverse primer 1 AAAGCAACAACCACGTTTTGAC 22

Template 952730T..... 952751

Primer pair 9

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Leng th	Sta rt	Sto p	T _m	GC %	Self complementa rity	Self 3' complementa rity
Forward primer	GGTGCTAACATGC AACGTCA	Plus	20	144	163	59.13	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	AAGCAACAACCAC GTTTTGA	Minus	20	486	467	56.98	40.00	5.00	3.00
Product length	343								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 343

Forward primer 1 GGTGCTAACATGCAACGTCA 20

Template 953073 953054

Reverse primer 1 AAGCAACAACCACGTTTTGA 20

Template 952731T..... 952750

Primer pair 10

	Sequence (5'→3')	Templ ate strand	Leng th	Sta rt	Sto p	T _m	GC %	Self complement arity	Self 3' complement arity
Forward primer	ACCGTGCTTTAAT GGGTGCTA	Plus	21	130	150	60.00	47.62	4.00	2.00
Reverse primer	AGTTGAAAAAGC ACAACCACG	Minus	22	494	473	58.75	40.91	4.00	2.00
Product length	365								

Products on intended targets

>[NZ_CP001668.1](#) *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* str. GM12 chromosome clone deltatypeIIIres, complete genome product length = 365

Forward primer 1 ACCGTGCTTTAATGGGTGCTA 21

Template 953087 953067

Reverse primer 1 AGTTGAAAAAGCAACAACCACG 22

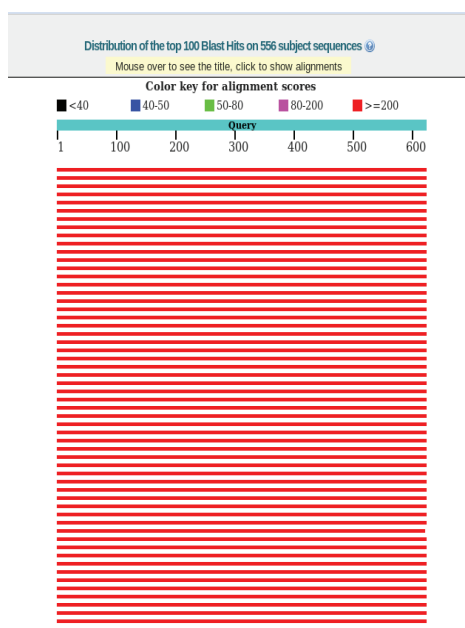
Template 952723T... 952744

Анализ праймеров

В дальнейшей работе проверяли термодинамические и структурные характеристики подобранных олигонуклеотидов. Праймеры не должны образовывать тугоплавких шпилек, гомо- и гетеродимеры. Было проведено множественное выравнивание гена *groV* с помощью UGENE v.36.0 для выявления консервативных участков.

Затем с использованием ресурсов программы NCBI BLAST nucleotide проверяли специфичность подобранных праймеров у всех доступных для изучения штаммов *Mycoplasma mycoides subs. Capri*. В итоге проведенного сравнения был получен результат со 100 %-ным совпадением нуклеотидного состава исследуемого гена у всех, доступных для исследования, штаммов *Mycoplasma mycoides subs. Capri*.

Пример такого анализа представлен на рисунке 6.



Sequences producing significant alignments:

Select: All | Size: Selected 0

Alignments | Download | Graphs | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Mycoplasma mycoides subs. capri L C strain Y-coat BcoB (groV) gene, partial cds	1155	1155	100%	0.0	100.00%	EF071429.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain L C95 DNA-directed RNA polymerase subunit beta (groV) gene, partial cds	1138	1138	100%	0.0	99.52%	U1892533.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig1	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig2	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489317.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig3	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig4	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig5	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig6	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig7	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig8	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig9	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig10	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig11	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig12	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig13	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig14	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig15	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig16	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig17	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig18	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig19	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1
Mycoplasma mycoides subs. capri strain CH2 genome assembly, chromosome, contig20	1127	1127	100%	0.0	99.20%	LS489318.1

Рис. 6. Фрагмент сравнительного анализа гена *groV* представленных в NCBI штаммов *Mycoplasma mycoides subs. Capri*

В результате проведенной работы были отобраны три пары праймеров для гена *groB*, удовлетворяющих по всем параметрам. Характеристика праймеров представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика отобранных праймеров

Ген	№		Последовательность (5'→3')	Длина	Старт	Конец	Tm	GC %	Размер продукта
<i>groB</i> (PG3)	1	Forward primer	ACCGTGCTTTAAT GGGTGCT	20	130	149	60.25	50	356
		Reverse primer	AGCAACAACCAC GTTTTGAC	20	485	466	57.73	45	
	2	Forward primer	ACCGTGCTTTAAT GGGTGCTA	21	130	150	60.00	47.6 2	365
		Reverse primer	AGTTGAAAAAGC AACAACCACG	22	494	473	58.75	40.9 1	
<i>groB</i> (LC1 05)	3	Forward primer	TGATGATGCCAAC CGTGCTT	20	157	176	60.61	50.0 0	319
		Reverse primer	TGGACCATCAGCA ATAATTCACC	24	475	452	59.60	41.6 7	

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью специальных приборов – ДНК-синтезаторов. Синтез праймера проводили поэтапным достраиванием нуклеотида, согласно его нуклеотидной последовательности.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований проведен поиск полных нуклеотидных последовательностей гена *groB*. Проведены сравнительный анализ и множественное выравнивание полных нуклеотидных последовательностей гена. И на основании анализа последовательностей гена возбудителя КППК, с использованием программы «Pick Primers» из международной базы BLAST, подобраны праймеры для

специфического выявления возбудителя КППК. Также произведен синтез специфических праймеров в необходимом количестве на синтезаторе олигонуклеотидов «Synthesizer H-16» («K&A Laborgeraete», Германия), согласно руководству производителя.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НТП «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» по целевому финансированию на 2021-2023 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Antunes N.T.* In Vitro Susceptibilities of *Mycoplasma putrefaciens* Field Isolates/ Antunes N.T. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007- Vol. 51.- No. 9.- PP. 3452-3454.
2. *Carson J.L.* Cell structural and functional elements. In: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., Basema J.B. (Editors) *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, Washington DC: American Society for Microbiology, USA, 1992.- PP. 63-77.
3. *Mohd. Iqbal Yattoo, Oveas Raffiq Parray, Shah Tauseef Bashir, Muheet, Riyaz Ahmed Bhat, Arumugam Gopalakrishnan, Kumaragurubaran Karthik, Kuldeep Dhama & Shoor Vir Singh* 2019, Contagious caprine pleuropneumonia—a comprehensive review // *Veterinary Quarterly*, Vol. 39.- NO. 1.- 1–25.
4. *Jones G. E. et al.* A review of experiments on the reproduction of chronic pneumonia of sheep by the use of pneumonic lung homogenate suspensions. // *Vet Bull*, 1986.- No. 56.- PP. 251-253.
5. *Avron A.* *Mycoplasma* stimulates the production of oxidative radicals by murine peritoneal macrophages. *J. Leukocyte Biol*, 1995.- No. 57.- PP. 264-268.
6. *Awan M. A.* Isolation and identification of *Mycoplasmas* from pneumonic lungs of goats. *J. App. Em*, 2004.- PP. 45-50.
7. *Bonnet F.* DNA relatedness between field isolates of *Mycoplasma* F38 group, the agent of contagious caprine pleuropneumonia, and strains of *Mycoplasma capricolum*. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*, 1993.- No. 43.- PP. 597-602.
8. *Houshaymi B.M.* Studies on strains of *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* isolated from outbreaks of contagious caprine pleuropneumonia. *Small Ruminant Res*, 2000.- vol.45.- No. 2.- PP. 139-143.
9. *Tariq M.A.* Studies on the incidence, epizootology and development of effective vaccines for the control of contagious caprine pleuropneumonia, contagious agalactia in sheep and goats in Balochistan (Annual report), Livestock Department Government of Balochistan, Pakistan, 1980.- PP. 132-139.
10. *F.Thiaucourt and G.Bölske*, Contagious caprinepleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*,1996.-15(4).-1397-1414.
11. *F. Thiaucourt, L. Manso-Silvan, W. Salah, V. Barbe, B. Vacherie, D. Jacob and others/ Mycoplasma mycoides*, from “mycoides Small Colony” to “capri”. A microevolutionary perspective/ *BMC Genomics*. 2011; 12: 114.