

А.В.Степанов, Н.А.Осина, Н.В.Майоров

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель: оптимизация технологической схемы получения препарата для генной диагностики чумы с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, связанная с подбором условий синтеза и метода очистки входящих в состав набора олигонуклеотидных зондов, несущих метки флуорофора (6-карбоксихлорофлуоресцеин) и гасителя флуоресценции (Black Hole Quencher-1), оценка их качества и внедрения новой технологической линии в производство. **Материалы и методы.** Объектом для исследования являлся набор реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация–РГФ» и входящие в его состав праймеры и зонд, обеспечивающие амплификацию *hmsH* гена. Синтез праймеров и зондов осуществляли в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биосет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом. Для проведения исследований использовали очистку полученных зондов либо с помощью электрофореза в 20 % полиакриламидном геле размером 20×20 или 8×10 см с последующей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме на системе OPS-201 и вручную, либо только с RP-картриджами вручную, либо методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Специфическую активность полученных зондов проверяли в полимеразной цепной реакции с использованием ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Yersinia pestis* C-624 с концентрациями $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^6$ м.к./мл. **Результаты и выводы.** Оптимизирована технология синтеза и подобран метод очистки олигонуклеотидных зондов, несущих флуорофор-6-карбоксихлорофлуоресцеин и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1. Показана целесообразность использования для очистки таких олигонуклеотидов, либо комплекса ВЭЖХ, либо электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей хроматографией на RP-картриджах в ручном режиме. Внедрение оптимизированной технологической схемы при производстве препаратов для генной индикации идентификации особо опасных патогенов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией позволит сократить сроки их изготовления на 50 % и снизить себестоимость на 66 %.

Ключевые слова: Black Hole Quencher-1, генодиагностические препараты, детекция, 6-карбоксихлорофлуоресцеин, патогенные биологические агенты, синтез зондов.

Корреспондирующий автор: Степанов Андрей Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Stepanov, N.A.Osina, N.V.Mayorov

Optimization of the Technological Scheme for the Production of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases Using Polymerase Chain Reaction with Hybridization-Fluorescent Registration of Results

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study was to optimize technological scheme for the production of preparation for gene diagnostics of plague with hybridization-fluorescent registration (HFR) of results, which is associated with the assessment and selection of synthesis conditions and method of oligonucleotide probe purification included into the kit and carrying fluorophore (6-carboxyfluorescein) and quencher (Black Hole Quencher-1) tags, as well as to evaluate their properties and implement this new technological line into manufacturing. **Materials and methods.** The object of investigation was the reagent panel "Gene *Yersinia pestis* Identification-HFR" and its constituent elements, probes and primers, providing for *hmsH* gene amplification. Synthesis of the primers and probes was carried out in 8-well DNA synthesizer ASM-800 (BioSet, Russia), using solid phosphite amid method. For the experiments the probes obtained were purified either by means of electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel (size 20×20) or (size 8×10) with further purification through RP-cartridges in semi-automated mode in OPS-201 system and manually, or on RP-cartridges only in manual mode; or applying high-performance liquid chromatography (HPLC). Specific activity of the produced probes was tested by polymerase chain reaction using the DNA isolated from bacterial suspensions of *Yersinia pestis* C-624 strain, in concentrations up to $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^6$ mc/ml. **Results and conclusions.** Optimized has been synthesis technology; selected has been the method for oligonucleotide probe purification, carrying phluorophore-6-carboxyphluorescein and Black Hole Quencher-1. Demonstrated is viability of applying the stated oligonucleotides or HPLC, or electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel with 7 M urea and further purification through RP-cartridges in manual mode for purification purposes. Introduction of the optimized technological scheme in manufacturing of preparations for gene indication and identification of particularly dangerous pathogens with hybridization-fluorescent detection will allow for the reduction of lead time by 50 % and original cost – by 66 %.

Key words: Black Hole Quencher-1, gene diagnostic preparations, detection, 6-carboxyfluorescein, pathogenic biological agents, probe synthesis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Andrey V. Stepanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Stepanov A.V., Osina N.A., Mayorov N.V. Optimization of the Technological Scheme for the Production of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases Using Polymerase Chain Reaction with Hybridization-Fluorescent Registration of Results. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:105–109. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-105-109

К настоящему времени полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее совершенных диагностических методов молекулярной биологии и клинической лабораторной диагностики. Основными ее достоинствами являются высокая чувствительность, универсальность технологических процедур в виде использования единого набора оборудования, реактивов, подготовки проб и постановки анализа.

В настоящее время в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» освоен выпуск зарегистрированных в установленном порядке наборов реагентов для индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекционных агентов методом ПЦР с электрофоретической и гибридационно-флуоресцентной детекцией. При производстве препаратов с электрофоретическим учетом результатов технологическая схема состоит из пяти этапов: получение олигонуклеотидных праймеров (ОНП); препарата ПКО (положительного контрольного образца); приготовление компонентов набора; контроль готового препарата; маркировка, фасовка и упаковка комплектов набора.

При изготовлении наборов с учетом результатов в режиме реального времени необходим еще один дополнительный этап – получение зондов, меченых флуорофором и гасителем флуоресценции. Технология синтеза последних существенно отличается от классической схемы получения праймеров [5]. Одним из важных этапов в данном процессе является очистка модифицированных олигонуклеотидов, поскольку от этого напрямую зависит качество выпускаемого препарата [6].

Технология синтеза праймеров используется в институте с 2003 г., тогда как синтез зондов до сих пор оставался не внедренным в производство. В связи с этим очевидна необходимость проведения работ по освоению технологии введения флуоресцентных меток в состав олигонуклеотида, оптимизации способов очистки модифицированных зондов и внедрения подобранных технологических схем в практику.

В качестве объекта для исследования представляется перспективным использование набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* – идентификация», включающего в свой состав по два зонда, меченых флуорофорами FAM, R6G, ROX [1].

Целью данной работы явилась оптимизация технологической схемы производства препарата для генной диагностики чумы с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, направленная на подбор условий синтеза и методов очистки входящих в состав набора олигонуклеотидных зондов, несущих метки флуорофор-6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1 (BHQ1), оценка их качества и внедрения усовершенствованной технологической линии в практику.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований выбрали прай-

меры и зонд, входящие в состав набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ», и обеспечивающие амплификацию *hmsH* гена [1].

Синтез праймеров и зондов осуществляли в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биосет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом с использованием стандартных коммерческих реагентов: амидофосфитных производных нуклеозидов, нуклеозид-полимеров. Для получения зондов использовали 6-(3',6'-дипивалоилфлуоресценил-6-карбоксамидо)-гексил-1-О-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит и 4'-(2-нитро-4-толуилдиазо)-2'-метокси-5'-метил-азобензен-4''-(N-этил-2-О-(4,4'-дитетокситриил))-N-этил-2-О-гликолат-CPG.

Праймеры и зонды синтезировали в масштабе 200 нмоль. Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) на двухканальной системе очистки OPS-201 (Биосет, Россия). После этого их переосаждали 6 % перхлоратом лития (Fluka, Швейцария) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия). Очистку полученных зондов проводили либо с помощью электрофореза в 20 % полиакриламидном геле размером 20×20 или 8×10 см с последующей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме на системе OPS-201 и вручную, либо только с RP-картриджами вручную, либо методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для проведения ВЭЖХ использовали систему «Waters» с программным обеспечением «Breeze», включающую бинарный градиентный насос Waters 1525, ручной инжектор Rheodyne 7725i, нагреватель колонок Waters, двухволновой детектор Waters 2487, сканирующий программируемый флуоресцентный детектор Waters 2475, колонки Macherey-Nagel Nucleosil размером 250/4,6 мм с носителем C18, размером частиц 5 мкм и размером пор 300 Å. Подвижная фаза: А: 0,1 М водный раствор ацетата аммония; В: 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония. Градиент: с А/В (70:30) до А/В (30:70) за 30 мин. Скорость потока: 1 мл/мин.

Качество синтезированных классических олигонуклеотидов проверяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (с 7 М мочевиной) в 20 % ПААГ. В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленцианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 10 мМ NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос и визуализации результата использовали 0,75 % Stains-all (Serva, Германия) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность праймеров и зондов определяли при 260 нм на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия). Концентрацию олигонуклеотидов и зондов рассчитывали с помощью программы «Олиго Кальк» [2].

Аналитическую и специфическую активность праймеров и зондов проверяли с использованием реагентов, входящих в состав набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ». Для исследования готовили бактериальные суспензии штамма *Y. pestis* C-624 в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл. Обеззараживание бактериальных суспензий проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК осуществляли методом нуклеосорбции с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Работу проводили в соответствии с инструкцией к препарату. Полученную ДНК изучали в ПЦР с реакционной смесью, приготовленной по ТУ 9398-034-01898109-2011.

Термоциклирование осуществляли в приборах «RotorGene 3000», «RotorGene 6000» («Corbett Life Science», Австралия) и «RotorGene Q» QIAGEN (Германия) по следующей программе: предварительная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 10 циклов, включающих 3 шага по 30 с каждый: денатурация при 95 °С, отжиг при 60 °С и синтез при 72 °С; затем 35 циклов по 20 с каждый: денатурация при 95 °С, отжиг при 56 °С и синтез при 72 °С. Уровень флуоресценции определяли при 56 °С (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange. Для учета флуоресценции активировали функцию «Slope Correct»/«Коррек. уклона», функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 5 %, значения Threshold/Порог – 0,05. Полученные данные обрабатывали с применением стандартных статистических методов [3].

Результаты и обсуждение

Для исследования синтезировали зонд, компле-

ментарный нуклеотидной последовательности *hmsH* гена возбудителя чумы, длиной 24 нуклеотида, несущий на 5`-конце 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), а на 3`-конце – Black Hole Quencher-1 (BHQ1) [1].

В ходе ряда экспериментов установлено, что для синтеза зондов в традиционном реакционном цикле амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов время конденсации необходимо увеличить с 1 до 6 мин для того, чтобы максимально обеспечить присоединение флуорофора 6-карбоксихлорофлуоресцеина к олигонуклеотидной цепи, а для аммонолиза использовать концентрированный водный раствор аммиака при температуре 45 °С в течение 12 ч.

Очистка зондов от примесей является необходимым условием для освобождения от неполноценных олигонуклеотидов без флуорофора и гасителя, разрушившихся в ходе синтетических реакций и используемых при этом растворителей, присутствие которых в ПЦР может исказить результаты вплоть до полного ингибирования. Поэтому на следующем этапе нашей работы была проведена оценка эффективности различных методов очистки полученных меченых олигонуклеотидов (таблица).

В результате проведенных экспериментов установлено, что наибольший количественный выход зонда отмечен при использовании для его очистки RP-картриджей в ручном режиме – (27,9±0,81) ОЕ.

Практически одинаковое количество зонда получено при проведении электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле размером 8×10 см с 7 М мочевиной с дальнейшей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом и ручном режиме: (4,5±0,92) и (4,6±1,18) ОЕ соответственно. При использовании полиакриламидного геля размером 20×20 см увеличение выхода зонда не отмечено: (6,8±1,36) и (3,31±0,87) ОЕ соответственно. Более того, при очистке олигонуклеотидов после электрофореза на геле размером 20×20 см с помощью RP-картриджей в ручном режиме, их ко-

Использованные в работе методы очистки олигонуклеотидов, меченных флуорофорами FAM и BHQ1

Наименование зонда	Характеристика метода	Тип буфера	Тип элюата
hms_p1	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) в 20 % полиакриламидном геле (20×20 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах, с помощью системы OPS-201 (в полуавтоматическом режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p2	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) в 20 % полиакриламидном геле (20×20 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах (в ручном режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p3	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) 20 % полиакриламидном геле (8×10 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах, с помощью системы OPS-201 (в полуавтоматическом режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p4	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) 20 % полиакриламидном геле (8×10 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах (в ручном режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p5	Очистка на RP-картриджах (в ручном режиме)	водный раствор 2 М триэтиламиноацетата и 0,1 М триэтиламиноацетат в 8 % водном растворе ацетонитрила	20 % водный раствор ацетонитрила
hms_p6	Высокоэффективная жидкостная хроматография «Waters» на колонке Macherey-Nagel Nucleosil размером 250/4,6 мм с носителем C18 с размером частиц 5 мкм и размером пор 300 Å. Сбор фракций в течение 2,5 мин	0,1 М водный раствор ацетата аммония и 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония	0,1 М водный раствор ацетата аммония и 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония

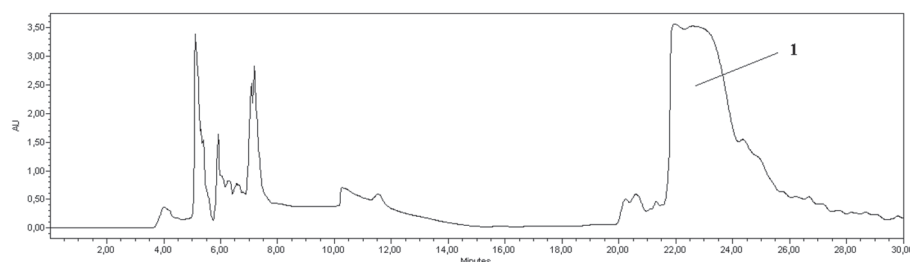


Рис. 1. Очистка зонда hms_p6 методом ВЭЖХ:
1 – пик выхода зонда меченного FAM и ВНQ1

личество было в два раза меньше, чем при работе в полуавтоматическом режиме.

Применение ВЭЖХ позволило получить до $(7,7 \pm 0,68)$ ОЕ зонда. Установлено, что элюция зонда отмечалась на 22-й минуте (рис. 1).

На следующем этапе экспериментов изучены аналитические свойства зондов. С этой целью готовили реакционные смеси, содержащие различные концентрации зонда: от 4 до 1 пмоль и праймеров – 8 и 6 пмоль. Для анализа использовали препараты ДНК, выделенные из бактериальных суспензий штамма *Y. pestis* C-624 (*hmsH+*) с концентрацией $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^3$ м.к./мл. С полученной ДНК проводили ПЦР на амплификаторах типа «RotorGene» (3000, 6000, Q) (рис. 2).

Установлено, что во всех случаях, вне зависимости от способа очистки зондов, чувствительность реакции $1 \cdot 10^3$ м.к./мл достигается при внесении в реакцию 6 пмоль праймеров и 3 пмоль зонда, что в полной мере соответствует требованиям ТУ 9398-034-01898109-2011 на «Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ)».

Максимальное накопление флуоресценции в пробирках – до 0,4 ед. – отмечено при проведении ПЦР с зондами hms_p6, hms_p2 и hms_p4, очистку которых проводили с помощью ВЭЖХ, в первом случае, и электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и на RP-картриджах в ручном режиме. При этом на эффективность очистки не влияли размеры используемого геля (20×20 или 8×10 см).

Применение зондов hms_p1 и hms_p3, очистка которых осуществлялась методом электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме, продемонстрировало меньший уровень флуоресцентного сигнала – до 0,35 ед. В ПЦР с зондами hms_p5, очистку которых проводили только с помощью RP-картриджей, интенсивность флуоресценции составляла не более 0,25 ед.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования для очистки зондов, меченых флуоресцентными метками FAM и ВНQ1, либо системы ВЭЖХ, либо комплексной схемы, предусматривающей проведение электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей очисткой на RP-картриджах в ручном режиме.

В процессе выполнения исследований, посвященных изучению качества модифицированных олигонуклеотидов, нами отмечалась особенность детекции их сигнала в диапазоне 510–555 нм. Из литературных источников известно, что карбоксифлуоресцеин имеет относительно широкий спектр 500–550 нм [4], и его флуоресценция может детектироваться по «JOE/Yellow» каналу. В проведенных исследованиях нами установлено, что присутствие в реакционной смеси одного зонда, имеющего флуорофор FAM и гаситель ВНQ1, сигнал с усилением (Gain) равным 10 может слабо детектироваться по «JOE/Yellow» каналу, но при добавлении второго зонда, содержащего флуорофор R6G, флуоресценция в этой части спектра не отмечается. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности при-

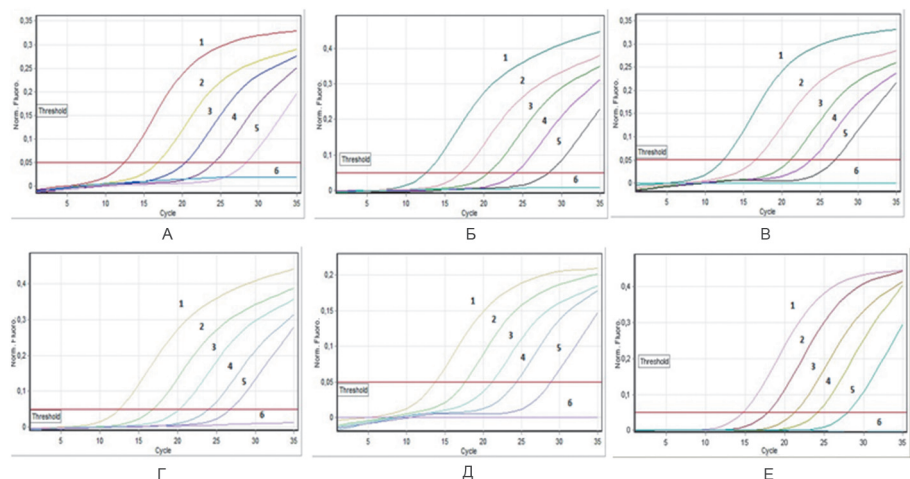


Рис. 2. Результаты амплификации *hmsH* гена с праймерами и зондами, очищенными различными способами:

1 – положительный контроль; 2 – *Y. pestis* C-624 ($1 \cdot 10^6$ м.к./мл); 3 – *Y. pestis* C-624 ($1 \cdot 10^5$ м.к./мл); 4 – *Y. pestis* C-624 ($1 \cdot 10^4$ м.к./мл); 5 – *Y. pestis* C-624 ($1 \cdot 10^3$ м.к./мл); 6 – отрицательный контроль. А – hms_p1 (электрофорез в геле размером 20×20 см и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме); Б – hms_p2 (электрофорез в геле размером 20×20 см и на RP-картриджах в ручную); В – hms_p3 (электрофорез в геле размером 8×10 см и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме); Г – hms_p4 (электрофорез в геле размером 8×10 см и на RP-картриджах в ручную); Д – hms_p5 (на RP-картриджах в ручную); Е – hms_p6 (ВЭЖХ)

менения синтезированных модифицированных олигонуклеотидов в составе наборов для постановки мультиплексной ПЦР-РВ.

Для изучения активности в отдаленных сроках наблюдения зонды помещали в морозильную камеру при температуре минус 20 °С. Затем, в течение двух лет с интервалом 3 месяца, образцы изучали в ПЦР-РВ. Специфическую и аналитическую активность модифицированных олигонуклеотидов проверяли посредством их использования в составе коммерческого препарата «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ» с ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Y. pestis* C-624 (*hmsH+*). За время наблюдения (2 года) зонды сохраняли свою аналитическую чувствительность, что превышает срок хранения препарата, составляющего 6 мес.

Таким образом, в РосНИПЧИ «Микроб» усовершенствована технология получения препарата для генной диагностики чумы с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов за счет оптимизации синтеза и подбора методов очистки олигонуклеотидных зондов, несущих флуорофор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1 (BHQ1). Определены их специфические и аналитические характеристики, соответствующие требованиям ТУ 9398-034-01898109-2011. Показана целесообразность использования для очистки таких олигонуклеотидов, либо комплекса ВЭЖХ, либо электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей хроматографией на RP-картриджах в ручном режиме. Используемые методические подходы получения зондов могут применяться для синтеза других олигонуклеотидов, несущих в своей структуре молекулы красителя и гасителя флуоресценции.

Внедрение оптимизированной технологической схемы производства препаратов для генной индикации и идентификации особо опасных патогенов с гибридационно-флуоресцентной детекцией, позволит сократить сроки их изготовления на 50 %, отказаться от приобретения зондов в сторонних организациях и существенно снизить финансовые затраты на 66 %.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куклев В.Е., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор и способ для ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент РФ № 2473701. 2013. Бюлл. 3 от 27.01.2013.
2. Олиго Кальк: Программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров). Интернет-портал биологического факультета Белорусского Государственного Университета. <http://bio.bsu.by/molbiol/index.php?pg=oligocalc> (дата обращения 24.04.2017).
3. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. М.: Финансы и статистика; 1982. 344 с.
4. Ke G., Zhu Z., Wang W., Zou Y., Guan Z., Jia S., Zhang H., Wu X., Yang C.J. A Cell-Surface-Anchored Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014; 6(17):15329–34. DOI: 10.1021/am503818n.
5. Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):1026–31. DOI: 10.1093/nar/26.4.1026.
6. Tatarinova O.N., Lukyanova T.N., Zaitseva M.A., Veremeev K.Y., Karpov V.A., Chuvilin A.N., Petrunin D.D., Pozmogova G.E. Significance of Methods for Purification of Oligodeoxyribonucleotide Probes for the Efficiency of Gene Diagnosis by Real-Time PCR. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2008; 145(3):312–6. DOI: 10.1007/s10517-008-0078-6.

References

1. Kuklev V.E., Osina N.A., Bugorkova T.V., Kutuyev V.V. [The kit and methodology for rapid identification of plague microbe with simultaneous differentiation between virulent and avirulent *Y. pestis* strains, and specification of their plasmid profile]. RF Patent No 2473701. 2013. Bulletin N 3 dated January 27, 2013.
2. [Oligo Calc: software for calculation of oligonucleotide properties (primers)]. Internet-portal of the Biology Department, Belorussian State University. (cited 24 Apr 2017). Available from: <http://bio.bsu.by/molbiol/index.php?pg=oligocalc>.
3. Pollard G. [Reference Book on Statistical Computational Methods]. M.; 1982. 344 p.
4. Ke G., Zhu Z., Wang W., Zou Y., Guan Z., Jia S., Zhang H., Wu X., Yang C.J. A Cell-Surface-Anchored Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014; 6(17):15329–34. DOI: 10.1021/am503818n.
5. Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):1026–31. DOI: 10.1093/nar/26.4.1026.
6. Tatarinova O.N., Lukyanova T.N., Zaitseva M.A., Veremeev K.Y., Karpov V.A., Chuvilin A.N., Petrunin D.D., Pozmogova G.E. Significance of Methods for Purification of Oligodeoxyribonucleotide Probes for the Efficiency of Gene Diagnosis by Real-Time PCR. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2008; 145(3):312–6. DOI: 10.1007/s10517-008-0078-6.

Authors:

Stepanov A.V., Osina N.A., Mayorov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Степанов А.В., Осина Н.А., Майоров Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 23.05.17.