

УДК 579.869.1: 577.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Гранкина А., студентка 3 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии,
Научные руководители – Сульдина Е.В., ассистент,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: листерии, *L.monocytogenes*, идентификация, выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, ПЦР в режиме реального времени

Работа посвящена выделению нуклеиновых кислоты из исследуемых образцов и в т.ч. из полевого штамма листерий. Методом Real time PCR нами проведена идентификация анализируемых проб, и установлено видовая принадлежность полевого штамма *L. ughsa* к виду *L.monocytogenes*.

Листерии – грамположительные палочковидные бактерии. Для листерий характерна сложная таксономическая структура. В настоящее время род *Listeria* включает 16 видов:

- *Listeria aquatica* DEN BAKKER ET AL. 2014
- *Listeria booriae* WELLER ET AL. 2015
- *Listeria cornellensis* DEN BAKKER ET AL. 2010
- *Listeria fleischmannii* BERTSCH ET AL. 2013
- *Listeria grandensis* DEN BAKKER ET AL. 2014
- *Listeria grayi* ERREBO LARSEN AND SEELIGER 1966 EMEND. RO-COURT ET AL. 1992
- *Listeria innocua* (EX SEELIGER AND SCHOOF 1979) SEELIGER 1983
- *Listeria ivanovii* SEELIGER ET AL. 1984 *Listeria marthii* GRAVES ET AL. 2010
- *Listeria monocytogenes* (MURRAY ET AL. 1926) PIRIE 1940
- *Listeria newyorkensis* WELLER ET AL. 2015
- *Listeria riparia* DEN BAKKER ET AL. 2014
- *Listeria rocourtiae* LECLERCQ ET AL. 2010
- *Listeria seeligeri* ROCOURT AND GRIMONT 1983

- *Listeria weihenstephanensis* LANG HALTER ET AL. 2013
- *Listeria welshimeri* ROCOURT AND GRIMONT 1983

Хочется отметить, что новые виды листерий непатогенные, выделены только в США и зачастую представляют собой единственный штамм.

Из биологического материала нами был получен полевой штамм, который мы отнесли к листериям по его морфологическим и культуральным признакам, но результаты биохимических тестов для установления его видовой принадлежности нельзя было интерпретировать однозначно.

В виду этого целью нашей работы являлось определение видовой принадлежности полевого штамма листерии методом полимеразой цепной реакции в режиме «реального» времени.

Для работы нами был взят полевой штамм предположительно относящийся к бактериям рода *Listeria* - *L. ugsha*.

В качестве контрольных образцов использовали штаммы рода.

Для выделения ДНК использовали «ДНК-сорб-АМ» («ИнтелЛабСервис», Москва), в основе метода лежит лизис бактериальных клеток, сорбция ДНК на силикагеле и отмывка ДНК спиртово-солевым буфером [1].

Для амплификации в работе использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами» (состав набора: дезоксинуклеозидтрифосфаты, 2,5 мМ, 500 мкл; 10-кратный ПЦР буфер, 500 мкл; MgCl₂, 25 мМ, 500 мкл; Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами, 5 Е/мкл, 50 мкл; деионизированная вода, 2x1,7 мл.) («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

Постановку полимеразной цепной реакции проводили в стрипах емкостью 0,2 мл.

Состав смеси для проведения ПЦР:

- 2,5X реакционная смесь - 5 мкл
- MgCl₂ (25 мМ) - 0,5 мкл
- смесь праймеров 10 пкмоль/каждого - 0,5 мкл (в случае мультиплексной реакции, в одну пробирку помещается 2 набора праймеров)
- Флуоресцентный зонд 10 пкмоль/каждого - 0,2 мкл
- ddH₂O- до 12,5 мкл
- ДНК - матрица - 5 мкл

Пробирки с готовой ПЦР-смесью встряхивали на смесителе, все капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
D3	L.iv	21,9		+
D4	L. ugsha		26,8	+
D5	L.m		21,1	+
D6	L.ugsha		28,7	+
D7	L.iv	20,6		+
D8	L.m		18,6	+
D9	K-			-
D10	K-			-

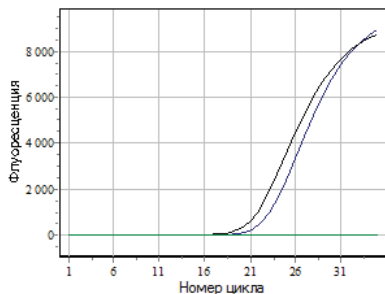


Рисунок.2 - Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла

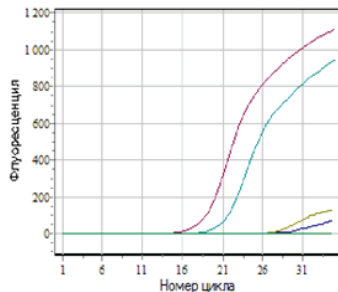


Рисунок 3 - Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла

Переносили пробы в амплификатор и проводили ПЦР при следующих температурных режимах:

- активация TaqF-полимеразы при 95°C - 5 мин.
 - денатурация при 95°C-10 сек;
 - отжиг при 57°C-20 сек.,
 - элонгация при 72°C-10 сек.
 - элонгация при 72°C-2 мин
- } 35 циклов

Параллельно с исследуемыми образцами ставили отрицательный контрольный образец (с деионизованной водой).

Учет результатов осуществляли отдельно по каждому из каналов, в соответствии с инструкцией к прибору. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне

(0,05) пороговой линией (treshhold) значения порогового цикла «Ct» [2-5].

Образец считали отрицательным, если значение «Ct» по каналу Fam для *L.ivanovii* и по каналу Hex для *L.monocytogenes* отсутствовало.

Результаты исследования образца полевого штамма с помощью ПЦР в режиме «реального» времени представлены на рисунках (рис. 1-3).

В ходе данной работы нам удалось выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых образцов. Методом Real time PCR мы провели идентификацию анализируемых проб, и установили видовую принадлежность полевого штамма. Штамм *L. ugsha* принадлежит к виду *L. monocytogenes*.

Библиографический список

1. Сульдина Е.В. Применение метода молекулярно-генетического анализа для видовой идентификации мяса/Е.В. Сульдина, О.Л. Колбасова, С.В. Мерчина//Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновск. -2012. -С. 227-231.
2. Сульдина Е.В. Применение метода Real-time PCR для видовой идентификации мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах/Е.В. Сульдина, О.Л. Колбасова, С.В. Мерчина//Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновск. -2012. -С. 236-240.
3. Сульдина Е.В. Определение видовой принадлежности мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах методом ДНК-диагностики/Е.В. Сульдина, О.Л. Колбасова, С.В. Мерчина//Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновск. -2012. -С. 231-235.
4. Сульдина Е.В. Определение видовой принадлежности мяса методом полимеразной цепной реакции в режиме «Реального» времени/Е.В. Сульдина, О.Л. Колбасова, С.В. Мерчина//Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновск. -2012. -С. 241-244.

5. Васильев, Д.А. Разработка параметров количественного определения бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* на основе мультиплексной пцр в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных». Покров. - 2014. - С. 91-96.

IDENTIFICATION OF LISTERIA BY PCR IN REAL TIME

Grankina A., Suldina E.V., Vasiliev D.A.

Key words: *Listeria*, *L.monocytogenes*, identification, DNA isolation, polymerase chain reaction, PCR, real-time

The work is devoted to the isolation of nucleic acids from clinical samples and including from the field strain of *Listeria*. Real time PCR method we carried out the identification of the analyzed samples, and found species belonging field strain *L. ugsha* to *L.monocytogenes* mind.