

УДК 579.869.1: 577.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР

Гранкина А., студентка 3 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии,
Научный руководитель – Сульдина Е.В., ассистент
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: листерии, *L.monocytogenes*, идентификация, выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, электрофорез-грамма, электрофорез.

Работа посвящена выделению нуклеиновых кислоты из исследуемых образцов и в т.ч. из полевого штамма листерий, а также описанию результатов классической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией, с помощью которой мы провели идентификацию анализируемых проб, и установили принадлежность полевого штамма *L. ugsha* к виду *L.monocytogenes*.

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

Целью нашей работы являлось определение видовой принадлежности полевого штамма листерии методом полимеразной цепной реакции.

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

В качестве контрольных образцов использовали штаммы *L.ivanovii* и *L.monocytogenes*.

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

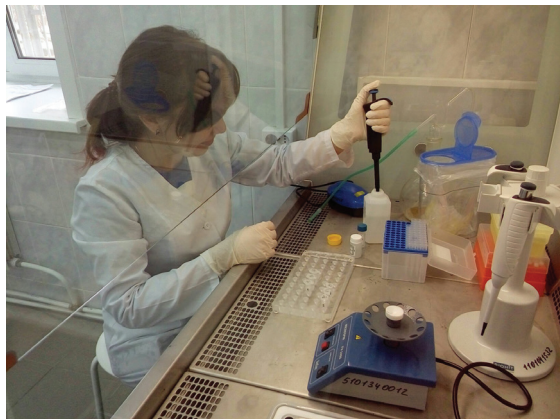


Рисунок 1 - Выделение ДНК

Для амплификации в работе использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами» («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва) [5].

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)
- 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.

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

- | | | |
|--|---|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> • 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) [2, 4].



Рисунок -2 – Результаты электрофореза на трансиллюминаторе

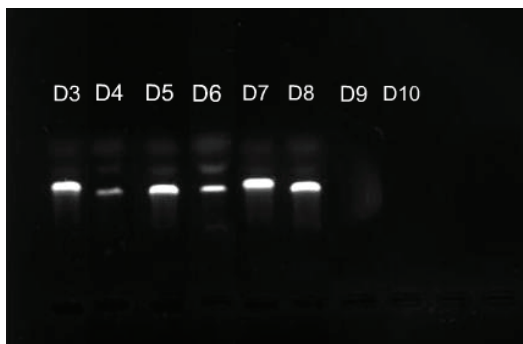


Рисунок - 3 Электрофореграмма ПЦР продуктов
(D3 -L.iv, D4 -L. ugsha, D5-L.m, D6 -L.ugsha, D7-L.iv, D8-L.m, D9-K-, D10-K-)

Анализ ПЦР-продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза. Электрофоретическую оценку проводили в 2%-ном агарозном геле, для приготовления которого смешивали 2 г. агарозы и 100 мл ТАЕ-буфера. Смесь помещали в микроволновую печь и доводили до кипения. Далее, в слегка охлажденную смесь добавляли 10 мкл 0,001 % бромистого этидия и тщательно перемешивали. Гель разливали в форму и устанавливали гребенки. В образовавшиеся в застывшем геле лунки вносили по 10 мкл ПЦР продуктов. Электрофорез проводили используя Трис-ацетатный буфер при напряжении 8 В/см длины геля в течение 40 минут [1, 3].

Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Амплифицированные

фрагменты ДНК выявлялись в виде светящихся оранжевых полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента в пробе положительного контроля (рис. 2.).

Сохранение полученных результатов и более четкое изображение получили с помощью системы визуализации (рис. 3.)

В ходе данной работы нам удалось выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых образцов. Методом классической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией мы провели идентификацию анализируемых проб, и установили принадлежность полевого штамма *L. ugsha* 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 ос-

нове 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 METHODS OF CLASSICAL PCR

Grankina A., Suldina E.V.

Key words: Listeria, L.monocytogenes, identification, DNA extraction, polymerase chain reaction, electrophoretogram, electrophoresis

The work is devoted to the isolation of nucleic acids from clinical samples and including from the field strain of Listeria, as well as a description of the results of the classical PCR with electrophoretic detection, by means of which we spent the identification of the analyzed samples, and established a field belonging to a strain of L. ugsha L.monocytogenes mind.