УДК 579.62:577.2

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS VERONII* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Мастиленко А.В., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru
Минаева А.Н., аспирант,
тел. 8(8422) 55-95-47, lina.minaeva.11@mail.ru
Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Aeromonas, A.veronii, инфекции рыб, режим, подбор праймеров, полимеразно-цепная реакция.*

Работа посвящена подбору праймеров для индикации и идентификации бактерий Aeromonas veronii методом ПЦР с детекцией в агарозном геле. Подобраны последовательности праймеров: 5′- CAACCATCACAGGTGCAGGA -3′, 3′- GCGGTTTATCGCTTTGGTCA-5′. Разработан протокол для амплификации праймерной системы, изучена их специфичность в отношении бактерий гомологичного рода. Подобран режим проведения детекции результатов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Введение. По литературным данным, инфекционные процессы, вызванные бактериями рода *Aeromonas*, являются причиной экономических потерь в рыбоводстве [1-3]. Смертность, от заболеваний вызываемых аэроманадами, у рыб, подвергшихся температурному стрессу при определенных условиях окружающей среды, может достигать 80% [4].

Вид бактерий *Aeromonas veronii* – это один из тех недооцененных представителей рода, который является причиной эпизоотического язвенного синдрома и геморрагической септицемии у рыб. Кроме того, установлено, что *A. veronii* заражает беспозвоночных, водных позвоночных и млекопитающих. Есть сообщения, что бактерии *A. veronii*, вызывают инфекции у людей,

особенно у пожилых и детей с низким иммунитетом, вызывая сепсис, гастроэнтерит и другие заболевания [5-9].

В современных литературных источниках описаны родоспецифичные праймеры для идентификации бактерий рода *Aeromonas* методом ПЦР [8,10] что не дает возможности провести видовую идентификацию. Для видового типирования чаще всего используют метод секвенирования 16S рРНК [4,7], являющийся дорогостоящим.

Целью данной работы является подбор праймеров, специфичных в отношении *Aeromonas veronii.*

Материалы и методы исследований. Штаммы. В работе был использован референс-штамм *A. veronii* АТСС 9071, штаммы бактерий*: A. hydrophila, A. salmonicida, A.caviae*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Материалы. 2,5х реакционная смесь (Синтол, Россия), 10х трис-боратный буфер (Bio-Rad, Германия), агароза (Россия), набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия), 1% раствор бромистого этидия (AppliChem,США). Камера для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Германия), источник питания Powerpac Basic (Bio-Rad, Германия), гельдокументирующая система Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция), центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии СМ-50М (ELMI, Польша), ПЦР пробирки объемом 0,2 мл (Россия), амплификатор T100 (Bio-Rad, Германия), наконечники для дозаторов 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (Thermo,Финляндия); пипетка-дозатор одноканальный 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (HLT, Польша). Праймеры: 5'- CAACCATCACAGGTGCAGGA -3', 3'-GCGGTTTATCGCTTTGGTCA-5'

Методы. Выделение ДНК бактерий при использовании набора реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия). Для проведения амплификации были использованы параметры представление в инструкцией к набору «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия). Анализ генома *A. veronii* проводили в

базе NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome). Подбор олигонуклеотидов для постановки ПЦР осуществляли с применением ресурса NCBI BLAST-primer.

Результаты исследований и их обсуждение. Первым этапом нашего исследования был проведен анализ генома *A. veronii* в базе данных NCBI. Установлено, что исследуемый геном имеет размер 4.56Mb(4.59751 п.н.), 58,6% GC. В результате анализа в качестве целевого участка для ПЦР был выбран ген *ompA*.

На основании полученной последовательности ДНК указанного фрагмента были подобраны праймеры для проведения ПЦР. Последовательности праймеров были следующие: 5'-CAACCATCACAGGTGCAGGA -3', 3'- GCGGTTTATCGCTTTGGTCA-5'. Данная пара праймеров показала высокий процент специфичности в отношении бактерий *A. veronii*.

После синтеза системы праймеров были проведены эксперименты постановки ПЦР с бактериальными культурами. Был произведен подбор параметров амплификации для разработанной праймерной системы. Был отработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР в агарозном геле. В этом протоколе ПЦР использовали экстрагированную бактериальную ДНК бактерий в качестве матрицы при следующих показателях цикла ПЦР:

1. Предварительная денатурация-95^{0}C в течение 5 минут, 1 цикл.
2. Денатурация- 95^{0}C в течение 15 сек.
3. Отжиг- 65 ^{0}C в течение 40 сек, 40 циклов.

Следующим этапом работы была исследована с специфичность разработанной системы в отношении гомологичных представителей рода *Aeromonas* (*A. hydrophila, A. salmonicida, A.caviae*). После проведения амплификации и электрофореза в агарозном геле было установлено, что разработанные праймеры имеют высокую специфичность в отношении *A. veronii*.

Выводы. В результате проведенного исследования нами были разработаны видоспецифичные праймеры для идентификации бактерий *A. veronii* методом полимеразой цепной реакции с детекцией в агарозном геле. Разработан протокол для амплификации праймеров, подобран режимы

проведения электрофорезирования. Полученные результаты являются основой исследований по подбору зонда для постановки ПЦР-РВ.

Библиографический список:

1. Основные биологические свойства бактерий вида *Aeromonas veronii* / А.Н. Минаева, А.А. Ломакин, Д.А. Васильев, А.Г. Шестаков // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2021. – №. 6. – С. 31-35.

2. Dong, H.T. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.) / H.T. Dong et al. //Journal of Fish Diseases. – 2017. – Т. 40. – №. 10. – С. 1395-1403.

3. Peatman, E. Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (Ictalurus punctatus) / E. Peatman et al. // Aquaculture. – 2018. – Т. 482. – С. 1-8.

4. Abd El Latif, A.M. High mortalities caused by *Aeromonas veronii*: identification, pathogenicity, and histopathologicalstudies in Oreochromis niloticus A.M. Abd El Latif et al. //Aquaculture International. – 2019. – Т. 27. – №. 6. – С. 1725-1737.

5. Validation of a partial rpoB gene sequence as a tool for phylogenetic identification of *Aeromonas* isolated from environmental sources / B. Lamy, F. Laurent, A. Kodjo // Canadian journal of microbiology. – 2010. – Т. 56. – №. 3. – С. 217-228.

6. Lazado, C.C. Pathogenic characteristics of *Aeromonas veronii* isolated from the liver of a diseased guppy (Poecilia reticulata) / C.C. Lazado, D. Zilberg // Letters in applied microbiology. – 2018. – Т. 67. – №. 5. – С. 476-483.

7. Pei, C. Identification of *Aeromonas veronii* isolated from largemouth bass Micropterus salmoides and histopathological analysis / C. Pei et al. // Aquaculture. – 2021. – Т. 540. – С. 736707.

8. Puah, S.M. Development of a species-specific PCR-RFLP targeting rpoD gene fragment for discrimination of *Aeromonas* species / S.M. Puah et al. // Journal of medical microbiology. – 2018. – Т. 67. – №. 9. – С. 1271-1278.

9. Ragupathi, N. K. D. First hybrid complete genome of *Aeromonas veronii* reveals chromosome-mediated novel structural variant mcr-3.30 from a

human clinical sample / N. K. D. Ragupathi et al. // Access microbiology. – 2020. – T. 2. – №. 4. – P. 124-129.

10. Sen, K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR / K. Sen // Canadian journal of microbiology. – 2005. – T. 51. – №. 11. – C. 957-966.

SELECTION OF PRIMERS FOR *AEROMONAS VERONII* BACTERIAL TYPING BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Mastilenko A.V., Minaeva A.N., Feoktistova N.A.

Keywords: *Aeromonas, A. veronii, fish infections, regimen, primer selection, polymerase-chain reaction.*

The work is devoted to the selection of primers for the indication and identification of Aeromonas veronii bacteria by PCR with detection in agarose gel. Primer sequences were selected: 5 '- CAACCATCACAGGTGCAGGA -3', 3 '- GCGGTTATCGCTTTGTGTCA-5'. A protocol for amplifying the primer system has been developed, their specificity for bacteria of a homologous genus has been studied. Mode of detection of amplification results by method of agarose gel electrophoresis is selected.