

Разработка и апробация ПЦР-тест-системы для выявления гемолитических штаммов аэромонад

Доколин Дмитрий Андреевич
Студент (магистр)

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия
E-mail: dimondokolin@yandex.ru

Бактерии рода *Aeromonas* - группа грамотрицательных палочковидных факультативно-анаэробных микроорганизмов. Представители данного рода являются возбудителями инфекционных заболеваний рыб, земноводных и млекопитающих. Контаминированная аэромонадами рыбная продукция представляет собой источник пищевых инфекций человека [2]. Разработка средств экспресс-диагностики материала на присутствие представителей данного рода является важной задачей.

Данное исследование посвящено разработке тест-системы на основе мультиплексной ПЦР для быстрого обнаружения гемолитических штаммов бактерий рода *Aeromonas*. Альфа- и бета-гемолизины аэромонад представляют собой порообразующие белки, нарушающие целостность мембран эритроцитов, эпителиоцитов кишечника и других клеток-мишеней. Синтез данных белков детерминируют гены *hlyA* и *aerA* соответственно [1].

В работе использовали штаммы бактерий рода *Aeromonas* из коллекции лаборатории биотехнологии и прикладной биоэлементологии ЯрГУ. ДНК бактерий выделяли с использованием коммерческого набора (Диа-М). ПЦР проводили на приборе GE-96G GeneExplorer Thermal Cycler (Bioer Technology Co., LTD.) с использованием набора БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (Биолабмикс) при следующих параметрах: предварительная денатурация 5 мин при 94 °С ; денатурация 25 с при 94 °С , отжиг праймеров 30 с при 62 °С и элонгация 40 с при 72 °С (25 циклов); финальная элонгация в течение 5 мин при 72 °С . Анализ продуктов амплификации осуществляли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (10 мг/мл), в трис-ацетатном буфере (рН 8,4).

Были сконструированы 2 пары праймеров для амплификации участков генов *hlyA* и *aerA* (размером 260 п.н. и 560 п.н. соответственно). Специфичность тест-системы была доказана при тестировании видов бактерий, не относящихся к роду *Aeromonas* (представителей родов *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*). Оптимальная температура отжига праймеров определялась с помощью градиентной ПЦР и составила 62 °С. Аналитическая чувствительность тест-системы оценивалась при тестировании серийных разведений геномной ДНК референтных штаммов и составила 1 нг/мкл.

Таким образом, надежность и специфичность результатов диагностики с использованием разработанной тест-системы были экспериментально доказаны. Разработка может быть использована для обнаружения гемолитических штаммов бактерий рода *Aeromonas* в образцах воды, рыбы и других продуктов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-26-20123.

Источники и литература

- 1) Epple, H.J. et al. *Aeromonas hydrophila* Beta-Hemolysin Induces Active Chloride Secretion in Colon Epithelial Cells (HT-29/B6) // *Infection and Immunity*. 2004, №72(8). p. 4848–4858.
- 2) Praveen, P.K. et al. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review // *Veterinary World*. 2016, №9(1). p. 6–11.