

УДК 579.869.1: 577.2

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ЛИСТЕРИЙ КОЛЛЕКЦИИ 1960-1970 ГГ. МЕТОДОМ ПЦР

**Гранкина А., магистрант факультета ветеринарной  
медицины и биотехнологии,  
Сульдина Е.В., ассистент кафедры МВЭиВСЭ  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

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

Работа посвящена выделению нуклеиновых кислот из коллекции штаммов листерий 1960-1970 гг. Методом PCR нами проведена идентификация анализируемых проб, и установлена или подтверждена видовая принадлежность штаммов к роду *Listeria*.

Для листерий характерна сложная таксономическая структура [1-7]. В настоящее время род *Listeria* включает 16 видов. Новые виды листерий (2010-2016 гг.) непатогенные, выделены только в США и зачастую представляют собой единственный штамм.

В связи с новыми данными и современными возможностями диагностики с помощью молекулярно-генетических методов мы решили провести анализ кафедральной коллекции листерий - установление (подтверждение) видовой принадлежности. Это еще связано и с тем, что коллекции входящие в кафедральную формировались еще в 60-70 гг. XX века, до момента открытия многих видов листерий (*L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanovii*), а также выделения в род *Jonesiaceae* вида *Jonesia denitrificans* в 1987 году.

**Цель работы** – провести анализ видовой принадлежности штаммов листерий из коллекций 60-70 гг. XX методом полимеразой цепной реакции.

**Материалы и методики исследований.** В работе использованы 58 штаммов бактерий рода *Listeria* из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ.

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» («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

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

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:

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

Учет результатов осуществляли отдельно по каждому из каналов, в соответствии с инструкцией к прибору. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне (0,05) пороговой линией (treshhold) значения порогового цикла «Ст» [2-5].

Анализ ПЦР-продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза. Электрофоретическую оценку проводили в 2%-ном агарозном геле. Электрофорез проводили используя Трис-ацетатный буфер при напряжении 8 В/см длины геля в течение 40 минут.

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.

**Результаты исследования.** Результаты исследования коллекции штаммов с помощью ПЦР в режиме «реального» времени представлены в таблице 1 и на рисунках 1-4.

При проведении электрофоретической детекции сохранение полученных результатов и более четкое изображение получили с помощью системы визуализации (рис. 5).

**Выводы.** В результате проделанной работы мы смогли провести внутривидовую идентификацию листерий методом полимеразой цепной реакции.

Таблица 1 – Анализ результатов PCR Real-time

Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат	Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
1	L. wel			-	23	L. in 33090			-
2	L. mon 9.72		16,3	+	24	L. mon 71			-
3	L. mur УГСХА			-	25	L. mon Y-640			-
4	L. in 1			-	26	L. seel			-
5	L. seel			-	27	L. mur			-
6	L. mon 56		16,9	+	28	L. mon 33			-
7	L. mon 17.57		18,4	+	29	L. mon 1221		17,9	+
8	L. mon 766		16,9	+	30	L. mon 10522		18,2	+
9	L. mon УГСХА1			-	31	L. iv 1	26,7		+
10	L. gr УГСХА			-	32	L. mon 129		18,9	+
11	L. iv	16,7		+	33	L. in C-644			-
12	L. mon 9/130		17,3	+	34	L. gr УГСХА			-
13	L. mon 9.127		16,0	+	35	L. mon C-52		16,0	+
14	L. mon 1324		18,4	+	36	L. mon Y-6		18,8	+
15	L. mon MD		17,3	+	37	L. in 2.12			-
16	L. mon 178П		19,9	+	38	L. iv Габр	17,4		+
17	L. mon x-1		20,1	+	39	L. in Габр			-
18	L. mon x-2		18,9	+	40	L. mon ECDE		18,3	+
19	L. mon C-670			-	30	L. mon 10522		18,2	+
20	L. gr 25401			-	41	L. Y-44		20,4	+
21	L. mon C-201		20,4	+	42	L. 324		17,9	+
22	L. mon C-214		22,7	+					

Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат	Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
43	L. den			-	51	L. mon в34		18,3	+
44	L. mur			-	52	L. 728			-
45	L. 132/34			-	53	L.13МП		19,5	+
46	L.C-644			-	54	L. mon 473			-
47	L. 80П		17,9	+	55	L.74-44		19,6	+
48	L. iv	17,8		+	56	L. 750			-
49	L. in			-	57	L.1913		18,8	+
50	L. mon 35ц		20,2	+	58	L.Лу-3			-

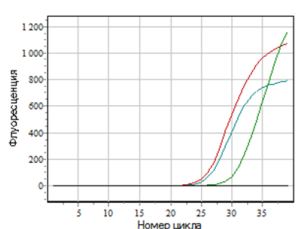


Рисунок 1 - Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла при исследовании коллекционных штаммов бактерий рода *Listeria* с праймерами для выявления *L.ivanovii*

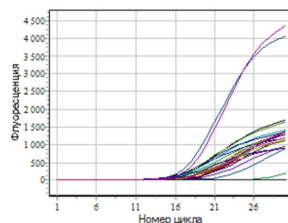


Рисунок 2 - Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла при исследовании коллекционных штаммов бактерий рода *Listeria* с праймерами для *L.monocytogenes*

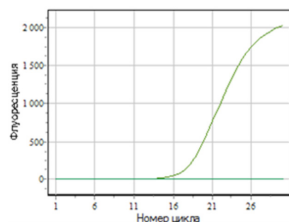


Рисунок 3 - Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла при исследовании коллекционных штаммов бактерий рода *Listeria* с праймерами для выявления *L.ivanovii*

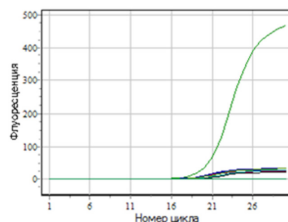


Рисунок 4 - Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла при исследовании коллекционных штаммов бактерий рода *Listeria* с праймерами для *L.monocytogenes*

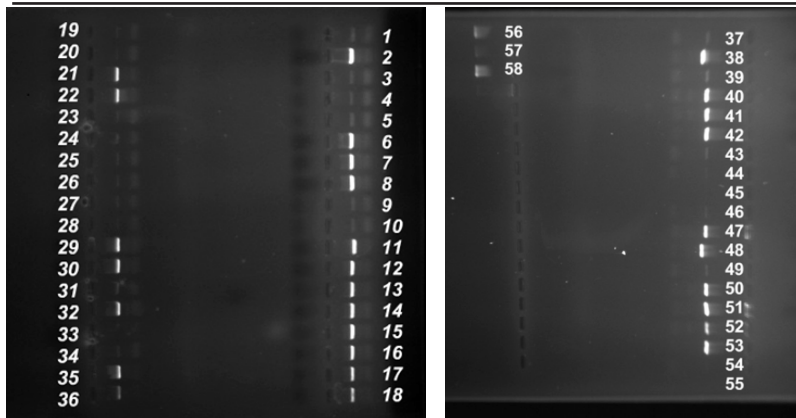


Рисунок 5- Электрофореграмма ПЦР-продуктов

Мы выяснили, что не все штаммы, входящие в коллекцию, принадлежат роду листерий, а так же видам *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*, как это указано было на этикетках ампул.

Так же данный метод позволил нам идентифицировать культуры, в маркировке которых было указано лишь родовое название, до вида *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*.

Для дальнейшей идентификации штаммов, не принадлежащих видам *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*, требуются дополнительные исследования.

#### Библиографический список:

1. 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.
2. Разработка системы фаготипирования листерий / Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 87-88.
3. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев,

- Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 69-70.
4. ульдина 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.
  5. ульдина 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.
  6. 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.
  7. 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.

## **IDENTIFICATION OF STAMPS FROM THE COLLECTION OF LISTERS 1960-1970 PCR METHOD**

***Grankina A., Suldina E.V.***

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

*The work is devoted to the isolation of nucleic acids from the collection of strains of listeria from 1960-1970. Using the PCR method, we performed identification of the analyzed samples, and the species belonging of the strains to the genus Listeria was established or confirmed.*