

ПЦР-ИНДИКАЦИЯ *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

Барсукова Т.А., 2 курс, Воротников А.П.

3 курс факультета ветеринарной медицины.

Научные руководители: к.б.н., ст. преподаватель Викторов Д.А.,

д.б.н., профессор Васильев Д.А.,

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *Flavobacterium psychrophilum*, холодноводная болезнь рыб, диагностика, ПЦР, молекулярная биология, генетика.

Работа проведена на базе лаборатории молекулярной биологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Апробирована разработанная коллективом авторов схема полимеразной цепной реакции для индикации *Flavobacterium psychrophilum*. В процессе исследования были оптимизированы параметры амплификации: подобрана температура гибридизации праймеров и скорректировано количество циклов.

Введение

Бактерии *F. psychrophilum* являются возбудителями флавобактериоза – болезни рыб, которой подвержены все лососевые, а также другие виды рыб. Наиболее часто болезнь встречается при температуре воды 4-12 °С. Отход мальков, сеголетков и годовиков при флавобактериозе достигает 10-20 %. Флавобактерии, как и другие возбудители бактериальных болезней рыб могут играть роль секундарной инфекции, поражая открытые раны и проникая в мышцы тела ослабленных и травмированных рыб [1,2,4,7].

Для предупреждения флавобактериоза необходимо соблюдать зоогигиенические требования, создавать для выращивания рыб наиболее благоприятные условия содержания и кормления, предотвращать попадание сорных рыб. В настоящее время в России диагностика флавобактериозов рыб не осуществляется, так как не разработаны доступные диагностические средства. При обнаружении больной рыбы назначаются большие дозы антибиотиков широкого спектра действия. Однако своевременная и точная диагностика позволит рыбводам снизить количество применяемых антибиотиков и повысить тем самым экологичность продукции и рыбоводческих прудов [2,4].

Наиболее прогрессивным в настоящее время методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на выявлении специфической нуклеотидной последовательности в геноме возбудителя [2,3,5,6].

Цель исследования – апробация разработанной коллективом авторов схемы полимеразной цепной реакции для индикации *F. psychrophilum*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали культуры штаммов *F.*

psychrophilum 1, 2, 5, 12, 16, 18, 30, 31, 32, 35, 37, 39, 568, 571, 572, 573, 574, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина». Для выделения ДНК использовали «ПРОБА–ГС» («ДНК–Технология», Москва). В работе были использованы олигонуклеотиды, разработанные коллективом авторов. Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР использовали камеру для горизонтального электрофореза («Helicon», Москва), источник постоянного тока ЭЛЬФ-8 (НПО «ДНК–Технология», Россия), ультрафиолетовый трансиллюминатор с длиной волны 260-280 нм («Vilborn», Франция), гель-документирующая система (Россия), трис-борат буфер, агарозный гель (2,0 %) с этидиум бромидом, маркеры молекулярного веса 100-1000 («СибЭнзим», Новосибирск).

Для амплификации в работе использовали «НАБОР базовый с Taq ДНК полимеразой» («СибЭнзим», Новосибирск), амплификатор ДТ-96 («ДНК–Технология», Москва).

Программа амплификации:

1. Денатурация ДНК – 95 °С – 5 мин – 1 цикл;
35 циклов:
2. Денатурация ДНК – 95 °С – 10 сек,
3. Отжиг праймеров – 60 °С – 20 сек,
4. Элонгация – 72 °С – 10 сек;
5. Заключительная элонгация – 72 °С – 2 мин – 1 цикл.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом гель-электрофореза. После проведения электрофореза выявляли ампликоны размером 224 п.о. (рис. 1).

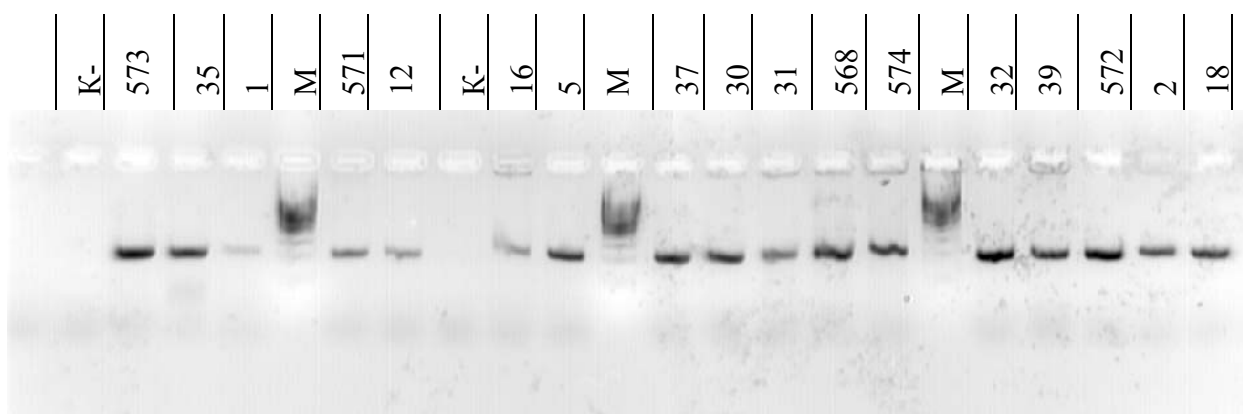


Рис. 1. Результаты гель-электрофореза продуктов амплификации.

Примечание: «М» - маркеры молекулярного веса,

«К-» - отрицательный контрольный образец

Заключение

В результате проведённых исследований апробирована разработанная коллективом авторов схема полимеразной цепной реакции для индикации *F. psychrophilum*. В процессе работы была оптимизирована программа

амплификации: 95 °С – 5 мин. (1 цикл), 95 °С – 10 сек., 60 °С – 20 сек., 72 °С – 10 сек. (35 циклов), 72 °С – 2 мин. (1 цикл). Были получены стабильные результаты ЦПР на 17 штаммах *F. psychrophilum* с детекцией продуктов амплификации размером 224 п.о. методом геле-электрофореза.

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – №2(52). – С. 79-82.
2. Викторов Д.А. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб / Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев, А.М. Артамонов, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 162-164.
3. Викторов Д.А. Мультиплексная ПЦР-система для индикации *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* / Д.А. Викторов, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, И.Р. Насибуллин, Т.А. Гринева // Молекулярная диагностика: Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 2014. – Т. 2. – М.: ООО "Издательство МБА", 2014. – С. 506-507.
4. Куклина, Н.Г. Разработка инновационных подходов решения проблем аэромонозов в рыбоводстве / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, И.Р. Насибуллин // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы Международной научно-практической конференции, Курган, 25-26 апреля 2013. – Курган: Изд-во Курганской ГСХА, 2013. – С. 243-247.
5. Мاستиленко А.В. Разработка идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 20 с.
6. Мاستиленко А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Научно-теоретический журнал Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №1(25) январь-март. – С. 50-54.
7. Насибуллин И.Р. Применение реакции нарастания титра фага для индикации аэромонад в рыбной продукции / И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 158-161.

PCR-INDICATION FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM

Barsukova T.A., Vorotnikov A.P.

Work was performed on the basis of the laboratory of molecular biology, Department of Microbiology, Virology, epizootology and veterinary-sanitary examination of the Ulyanovsk state agricultural Academy named. P.A. Stolypin. Tested was developed by a team of authors scheme polymerase chain reaction for indication *Flavobacterium psychrophilum*. During the study were optimized

parameters amplification: chosen temperature hybridization primers and adjusted the number of cycles.