

# СТОРІНКА МОЛОДОГО ВЧЕНОГО

---

УДК 597-12:576.85.08

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ У РИБ МЕТОДОМ ПЛР-ПДРФ ГЕНУ 16S рРНК

Ю. П. Рудь

Інститут рибного господарства НААН України

---

*Розроблено комплексний метод полімеразної ланцюгової реакції та поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) гену 16S рРНК для ідентифікації найпоширеніших грамнегативних (Г) бактерій – збудників інфекційних захворювань риб. Показано специфічність та ефективність універсальних олігонуклеотидних праймерів для гену 16S рРНК (Г) бактерій, а також можливість диференціації цих бактерій за допомогою набору ендонуклеаз рестрикції.*

**Ключові слова:** ПЛР-ПДРФ, 16S рРНК, грамнегативні (Г) бактерії.

---

Захист об'єктів аквакультури від бактеріальних інфекцій є актуальною проблемою в сучасному рибництві. Незважаючи на певні успіхи, досягнуті в останні роки при розробленні заходів профілактики та лікування інфекційних хвороб риб, бактеріальні захворювання залишаються досить поширеними і наносять значні економічні збитки рибницьким господарствам [1].

Серед чисельних мікробних популяцій водного середовища та об'єктів аквакультури особливе місце посідають грамнегативні (Г) бактерії, до складу яких входять як умовно-патогенні, так і патогенні бактерії – збудники інфекційних захворювань риб. Такі інфекційні захворювання риб як фурункульоз (*Aeromonas salmonicida*), хвороба “червоного рота” лососевих риб (*Yersinia ruckeri*), бактеріальна геморагічна септицимія (*Aeromonas hydrophila*), колумнарна хвороба (*Flavobacterium columnarum*), бактеріальна септицимія сома (*Edwardsiella ictaluri*), псевдомоноз *Pseudomonas sp.* та хвороба “холодної води” (BCWD) (*Flavobacterium psychrophila*) широко поширені у всьому світі і призводять до значних економічних збитків в рибному господарстві [2]. Тому виявлення хвороботворних мікроорганізмів в популяціях об'єктів рибництва – це важливий крок до запобігання інфекційних захворювань.

Традиційно діагностика бактеріальних захворювань проводилась за допомогою бактеріологічних посівів на щільні поживні середовища з наступною ідентифікацією фенотипових чи серологічних властивостей досліджуваних штамів. Але ці методики є трудомісткими та низькочутливими, до того ж вони потребують обов'язкового попереднього виділення патогену [3]. Використання методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та рестрикційного аналізу ампліфікованих продуктів (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів,



ПДРФ) гену 16S рРНК ( $\Gamma^-$ ) бактерій дозволяє ідентифікувати ці мікроорганізми до роду, а в деяких випадках і до виду. До того ж такий різновид методу ПЛР- ПДРФ зменшує витрати на реагенти для реакцій та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника [4].

Тому метою даного дослідження було підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену 16S рРНК ( $\Gamma^-$ ) бактерій, та набір рестрикційних ендонуклеаз, які визначатимуть родову приналежність досліджуваних бактерій.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

*Мікробіологічні дослідження.* Первинний посів мікроорганізмів з патологічного матеріалу (хворі цьоголітки райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss*) здійснювали на м'ясо-пептонний агар (МПА). Дослідження морфології колоній та клітин проводили за загальноприйнятими методиками. Виділення чистої культури здійснювали за методом Дригальського [5].

*Виділення ДНК.* ДНК виділяли з колоній чистих культур. Для цього готували бактеріальні суспензії. У 100 мкл фосфатного буферу (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) стерильною голкою вносили ( $\Gamma^-$ ) бактерії. Потім додавали 500 мкл лізуючого буферу (10мМ TRIS-HCl pH=8,0, 0,1М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5% ДСН) та 3 мкл протеїнази К (~600 од/мкл), ретельно перемішували та інкубували 1 годину за температури 37<sup>0</sup>С. ДНК екстрагували фенолом (pH=8,0) та центрифугували 5 хвилин при 13 400 об/хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ – ізоаміловий спирт (24:1). Суспензію центрифугували на мікроцентрифузі упродовж п'яти хвилин за 13 400 об/хв. До супернатанту додавали 0,1 об'єм 3М натрій ацетату (pH 5,2) та 2,5 об'єми охолодженого до -20<sup>0</sup>С етанолу. Преципітацію ДНК проводили за кімнатної температури упродовж 1 год. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі за 13 400 об/хв упродовж 10-ти хвилин. Осад ДНК промивали 70% етанолом. ДНК розчиняли у деіонізованій воді вільній від нуклеаз [6].

*Підбір олігонуклеотидів.* Для розроблення олігонуклеотидних праймерів, специфічних до фрагменту гену 16S рРНК ( $\Gamma^-$ ) бактерій, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10 та Primer Premier 5. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Послідовність праймерів була такою:

16SrDNA\_F 5- CGTAACTGGTCTGAGAGGRT -3 та

16SrDNA\_R 5- GCTGGTAACTAAGGAYARGG -3.

*ПЛР.* Ампліфікацію проводили на термоциклері “Eppendorf MasterCycler”. До складу реакційної суміші входило: 25 мкл PCR MasterMix (Fermentas), олігонуклеотидні праймери (Metabion) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 2 мкл ДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 50 мкл. Ампліфікація фрагменту гена 16S рРНК ( $\Gamma^-$ ) бактерій включала 1 цикл попередньої денатурації за 94<sup>0</sup>С (3 хвилини) та 35 циклів денатурації за 94<sup>0</sup>С (30 секунд), відпалу праймерів за 59<sup>0</sup>С (30 секунд), елонгації за 72<sup>0</sup>С (1 хвилини) та додатковий останній цикл синтезу за 72<sup>0</sup>С (2 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували в 2%-



му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором [7].

**Рестрикційний аналіз.** Під час проведення рестрикційного аналізу використовували ендонуклеази рестрикції *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* та *SmaI* (Fermentas). У мікропробірку вносили 8 мкл ампліфікованої ДНК, 2 мкл буфера та 2 мкл відповідної рестриктази. Сумарний об'єм доводили до 20 мкл стерильною деіонізованою водою. Суміш залишали для реакції на ніч у термостаті за температури 37<sup>0</sup>С. Продукти рестрикції аналізували в 2% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/см<sup>3</sup>. Електрофорез проводили в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА) на приладі для горизонтального електрофорезу "Scie-Plus" у режимі 100 В упродовж двох годин з використанням 100 пар нуклеотидів (п.н.) ДНК-маркера (Fermentas). Результати фіксували фотографуванням в ультрафіолетовому випромінюванні на транслюмінаторі UVT1 "Biokom". Аналіз електрофореграм проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 v2008.01.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На підставі проведених досліджень, підібраними олігонуклеотидними праймерами, специфічними до фрагменту гену 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) бактерій, було ампліфіковано очікувані за розміром фрагменти ДНК. Розмір ампліконів становив близько 850 п.н. (рис. 1). Фрагмента довжиною 650 п.н., який характерний бактерії *F. columnarae* не було виявлено в жодному з зразків, що свідчить про відсутність даного інфекційного агента в досліджуваних зразках (табл. 1). Збудника колумнарної хвороби також не було виявлено під час мікроскопічного дослідження.

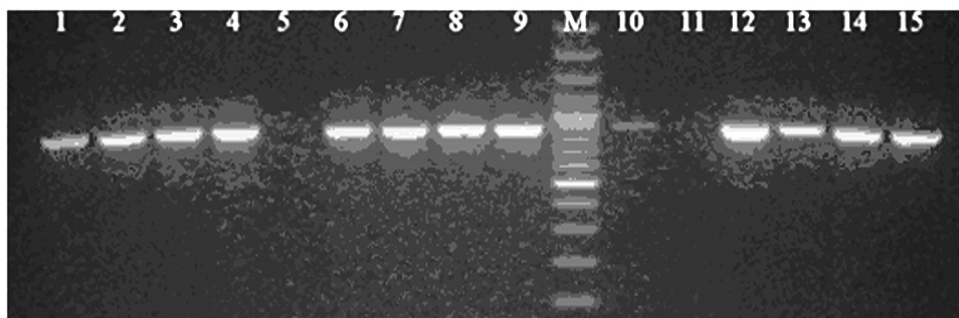


Рис. 1. Ампліфікація фрагментів гену 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) бактерій

Як показано на рисунку 1 в зразках №5 та №11 не відбулась ампліфікація фрагменту гену 16S рРНК. Зміна параметрів реакції не привела до позитивного результату, продукти ампліфікації були відсутні, що може свідчити про некомплементарність наших праймерів до гену-мішені даних видів бактерій. Ідентифікація цих бактерій за допомогою біохімічних методів була неможливою, оскільки при повторному посіві на щільне поживне середовище не спостерігався ріст колоній. Це можна пояснити тим, що не всі види бактерій здатні культивуватись на поживних середовищах в лабораторних умовах [8].



Таблиця 1. Положення олігонуклеотидних праймерів\*, довжини ампліконів та сайти рестрикції фрагментів гену 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) бактерій – збудників інфекційних захворювань риб.

Мікроорганізм	Положення праймерів		Довжина амплікону, п.о.	Сайти рестрикції амплікону
	Forward	Reverse		
<i>Aeromonas caviae</i>	280-299	1108-1127 3'-end №3 G/A**	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395), PstI (724-729)
<i>A. hydrophila</i>	256-275	1084-1103 3'-end №3 G/A	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395), PstI (724-729)
<i>A. salmonicida</i>	279-298	1107-1126 3'-end №3 G/A	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395), PstI (724-729)
<i>A. sobria</i>	260-279	1088-1107 3'-end №3 G/A	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395),
<i>Acinetobacter sp.</i>	272-291	1101-1120 3'-end №5 A/C	849	AvaI (329-334), EcoRI (391-396)
<i>Citrobacter freundii</i>	248-267	1076-1095 3'-end №5 T/C	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395)
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	260-279	1088-1107 3'-end №5 T/C	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395)
<i>E. tarda</i>	260-279	1088-1107 3'-end №5 T/C	848	Smal (328-333), EcoRI (390-395)
<i>Flavobacterium columnare</i>	276-295 3'-end #1 A/T, #2 G/A	1094-1113 3'-end №3 G/A	650	BamHI (64-69)
<i>F. psychrophilum</i>	241-260 3'-end #1 A/T, #2 G/A	1056-1075	835	Відсутні
<i>Flexibacter sp.</i>	233-252	1049-1068 3'-end №3G/A, №5 T/C	836	HindIII (171-176)
<i>Pasteurella sp.</i>	240-259	1068-1087	845	AvaI (327-332), EcoRI (389-394)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	238-257	1066-1085	848	Smal (328-333), BamHI (552-557)
<i>P. fluorescens</i>	240-259	1068-1087	848	Smal (328-333), AvaI (327-332)
<i>Shewanella sp.</i>	240-259	1068-1087	848	AvaI (328-333), EcoRI (390-395)
<i>Vibrio salmonicida</i>	278-297	1106-1125 3'-end №5 T/C	848	Smal (327-332), EcoRI (719-724)
<i>Yersinia sp.</i>	232-251	1060-1079 3'-end №5 T/C	848	EcoRI (390-395, 719-724)

Примітка: \* Специфічність праймерів та послідовність генів 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) бактерій перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

\*\*При створенні дегенеративних праймерів зверталась увага на 3'-кінець: №3 G/A – на 3'-кінці праймера у положенні №3 замість аденіну (A) гуанін (G).



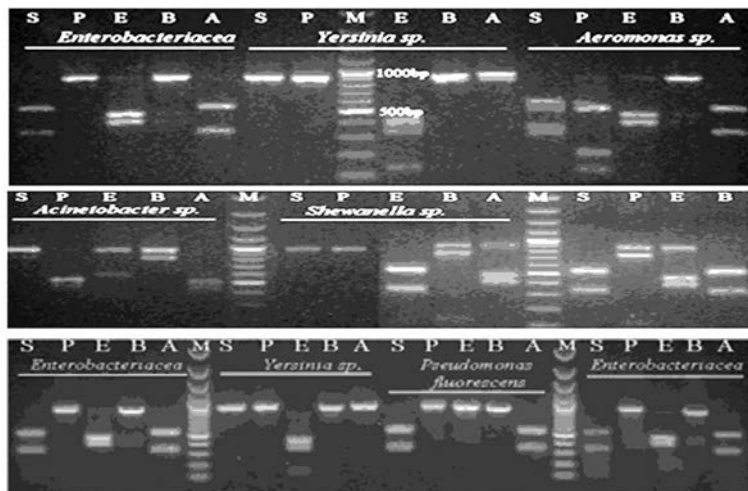


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційного аналізу фрагментів гену 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) бактерій: М – 100 п.н. ДНК маркер; ендонуклеази рестрикції: А – *Ava*I, В – *Bam*HI, Е – *Eco*RI, Р – *Pst*I та S – *Sma*I.

Електрофореграми гідролізів продуктів ПЛР фрагменту гену 16S рРНК показали відмінність у кількості фрагментів рестрикції для п'яти видів (Г<sup>-</sup>) бактерій та групи бактерій з родини *Enterobacteriaceae* (рис. 2). Так для групи ентеробактерій в ампліфікованому фрагменті гену 16S рРНК були виявлені сайти для рестриктаз *Ava*I, *Eco*RI та *Sma*I. Для іншого представника родини *Enterobacteriaceae*, бактерії *Yersinia sp.* були характерні два сайти для рестриктази *Eco*RI. У збудника псевдомонузу, бактерії *P. fluorescens*, спостерігали сайти рестрикції для *Ava*I та *Sma*I. У бактерій роду *Aeromonas* були присутніми сайти для рестриктаз *Ava*I, *Eco*RI, *Pst*I та *Sma*I. Бактерії *Acinetobacter sp.* та *Shewanella sp.* було ідентифіковано завдяки сайтам рестриктаз *Ava*I і *Pst*I та *Ava*I і *Eco*RI відповідно (табл. 2).

Таблиця 2. Рестрикційні схеми фрагментів гену 16S рРНК (Г<sup>-</sup>) досліджуваних бактерій.

Вид бактерій	Рестриктази				
	<i>Ava</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I	<i>Sma</i> I
<i>Acinetobacter sp.</i>	+			+	
<i>Aeromonas sp.</i>	+		+	+	+
<i>Enterobacteriaceae</i>	+		+		+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+				+
<i>Shewanella sp.</i>	+		+		
<i>Yersinia sp.</i>			++		

Полімеразна ланцюгова реакція стала невід'ємним інструментом в сучасних молекулярно-біологічних дослідженнях. Цей універсальний метод може бути пристосований для виконання різноманітних завдань в біологічних дослідженнях, а особливо в сучасній рибницькій науці. Сьогодні ПЛР змінила наш підхід до дослідження генів і геномів. Використовуючи ПЛР, ми можемо ізолювати будь-який ген від будь-якого організму. Беззаперечний успіх ПЛР здобула у



діагностиці інфекційних захворювань риб завдяки її швидкості в порівнянні з багатьма іншими діагностичними методами. Так, виявлення та ідентифікація збудників бактеріальних та вірусних хвороб риб можуть бути прискорені від декількох днів до одного робочого дня, коли будуть тестуватися безпосередньо клінічні зразки. Інші збудники інфекційних захворювань, яких важко або неможливо ідентифікувати за допомогою культуральних методів, часто залишаються невиявленими, тому застосування ПЛР - це єдина альтернатива, щоб продемонструвати їх присутність в патологічному матеріалі [9].

Ендонуклеази рестрикції розпізнають специфічні (паліндромні) короткі послідовності ДНК та розрізають її в цьому місці (сайт рестрикції). Одна нуклеотидна заміна може призводити до надбання або втрати сайту рестрикції, результатом чого є поліморфізм фрагментів ДНК одного гену. На відміну від рестрикційного аналізу загальної ДНК, аналіз малих фрагментів або ПЛР продуктів є більш інформативним і може бути використаний в діагностиці [10]. За допомогою методу ПЛР-ПДРФ можна провести ідентифікацію близькоспоріднених організмів, наприклад, штамів бактерій одного виду [11].

Результати проведених досліджень показали, що універсальні олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену 16S рРНК ( $\Gamma$ ) бактерій, ампліфікують фрагмент ДНК. Використовуючи цей фрагмент гену 16S рРНК, за допомогою ендонуклеаз рестрикції *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* та *SmaI* можна ідентифікувати ( $\Gamma$ ) бактерії до роду або навіть виду. У подальших дослідженнях планується здійснювати секвенс ампліфікованих фрагментів гену 16S рРНК з метою переконання достовірності одержаних результатів та проведення філогенетичного аналізу українських штамів досліджуваних бактерій. Також перспективним в діагностиці може бути дослідження повнорозмірних послідовностей ДНК гену 16S рРНК бактерій, оскільки це розширить видовий діапазон Грам-негативних та дозволить проводити ідентифікацію Грам-позитивних бактерій.

## ВИСНОВКИ

Розроблено та апробовано комплексний метод ПЛР-ПДРФ гену 16S рРНК для ідентифікації найпоширеніших грамнегативних бактерій – збудників інфекційних захворювань риб.

У хворих цьоголіток райдужної форелі *O. mykiss* ідентифіковано групу бактерій з родини *Enterobacteriaceae*, бактерію *Yersinia sp.*, збудника псевдомонозу – бактерію *P. fluorescens*, аеромонади *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.* та *Shewanella sp.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Woo P.T.K., Bruno D.W. 2011. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI, 944 pp.
2. Cerro A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by Multiplex PCR / A. Cerro, I. Marquez, J. A. Guijarro // Appl. Environ. Microbiol. 2002. – Vol. 68, № 10. – P. 5177–5180.
3. Wagner C. Molecular diagnostics // J. Mol. Med. – 1997. – Vol. 75. – P. 728-744.



4. *Cunningam C.O.* Molecular diagnosis of fish and shellfish disease: present status and potential use in disease control // *Aquaculture*. – 2002. – Vol. 206. – P. 19-55.
5. *Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др.* // Лабораторный практикум по болезням рыб. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. – 296 с.
6. *Sambrook J.* Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed / J. Sambrook, D.W. Russell. – New York: Cold Spring Harbour, 2001.
7. *McPherson M.J.* PCR. The basics: from background to bench / M.J. McPherson, S.G. Moller. – New York: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000. – p. 276.
8. *Altinok I.* Molecular diagnosis of fish diseases: a review / I. Altinok, I. Kurt // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2003. – Vol. 3. – P. 131-138.
9. *Brasher C.W.* Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR / C.W. Brasher, A. DePaola, D.D. Jones, A.K. Bej // *Curr. Microbiol.* - 1998. – Vol. 37. – P. 101–107.
10. *Chakroun C.* Random amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophila* and *Flavobacterium* species / C. Chakroun, M.C. Urdaci, D. Faure et al. // *Dis. Aquat. Org.* – 1997. – Vol. 31. – P. 167-177.
11. *Hanninen M.L.* Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis / M.L. Hanninen, V. Hirvella-Koski // *Epidemiol. Infect.* – 1999. – Vol. 123. – P. 299-307.

#### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ У РЫБ МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ ГЕНА 16S рРНК

Ю.П. Рудь

Разработан комплексный метод полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) гена 16S рРНК для идентификации самых распространенных грамотрицательных (Г-) бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний рыб. Показаны специфичность и эффективность универсальных олигонуклеотидных праймеров для гена 16S рРНК (Г-) бактерий, а также возможность дифференциации этих бактерий с помощью набора эндонуклеаз рестрикции.

**Ключевые слова:** ПЦР-ПДРФ, 16S рРНК, грамотрицательные (Г) бактерии.

#### IDENTIFICATION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA OF FISH BY THE METHOD OF PCR-RFLP OF 16S rDNA GENE

Yu. Rud

The complex method of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) targeting to the 16S rDNA gene was developed for identification of the most widespread gram-negative bacteria of fish. The specificity and efficiency of flexible oligonucleotide primers for 16S rDNA gene of gram-negative bacteria and also possibility of differentiation of these bacteria by use of the restriction endonuclease sets were shown.

**Key words:** PCR-RFLP, 16s rRNA, gram-negative (G<sup>-</sup>) bacteria

