

Оптимальные параметры ПЦР-анализа возбудителей диплостомоза Зятков С. А.¹, Курак Е. М.², Гончаренко Г. Г.³

¹Зятков Сергей Александрович / Zyatkov Sergej Aleksandrovich – ассистент;

²Курак Екатерина Михайловна / Kurak Ekaterina Mihailovna – ассистент;

³Гончаренко Григорий Григорьевич / Goncharenko Grigori Grigorevich – доктор биологических наук, профессор, кафедра зоологии, физиологии и генетики, биологический факультет,

Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, г. Гомель, Республика Беларусь

Аннотация: разработаны оптимальные параметры для ПЦР-анализа зараженности диплостомидами вторых промежуточных хозяев – рыб семейства Карповые (Cyprinidae).

Ключевые слова: ПЦР-анализ, температура отжига, *Diplostomum*, ITS1-5,8S-ITS2, Cyprinidae.

В последнее время большое внимание ученых стало уделяться опасному паразитарному заболеванию рыб и рыбадных птиц – диплостомозу, которое широко распространено среди пресноводных рыб семейства Карповые (Cyprinidae) и вызывается метацеркариями трематод рода *Diplostomum* (сем. Diplostomidae, отр. Strigeidida) [1-3]. Жизненный цикл трематод рода *Diplostomum* сложный, протекающий с участием трех хозяев: промежуточных – моллюски семейства Прудовиков (Lymnaeidae), дополнительных или вторых промежуточных – рыбы семейства Карповые и окончательных – рыбадные птицы, преимущественно чайковых (сем. Laridae) [4].

Необходимо подчеркнуть, что идентификация видов *Diplostomum spp.* весьма затруднена на всех стадиях жизненного цикла паразита вследствие их фенотипической пластичности, недостаточной изученности морфологических особенностей разных стадий развития. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка методов ДНК-идентификации паразитов-диплостомид на любой стадии их жизненного цикла, в том числе с использованием ПЦР-анализа. Данные молекулярно-генетические методы успешно показали себя весьма эффективным инструментом в идентификации многих гельминтов [3, 5].

Целью работы было разработать наиболее оптимальные параметры для ПЦР-анализа зараженности диплостомидами вторых промежуточных хозяев – рыб семейства Карповые (Cyprinidae).

На первом этапе проводился отлов рыб и выделение метацеркарий из хрусталика глаз зараженных особей. Затем проводили выделение ДНК с использованием ионно-обменной смолы Chelex 100 [5].

Выделенную суммарную ДНК подвергали полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами следующего состава: D1 (5'-AGG AAT TCC TGG TAA GTG CAA G-3'), D2 (5'-CGT TAC TGA GGG AAT CCT GGT-3'), позволяющих амплифицировать фрагмент ДНК *Diplostomum spp.* размером около 1100 н.п., включающий ITS1-5,8S-ITS2 участки [3].

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. В реакционные ПЦР-пробирки, объемом 0,6 мл вносили смесь, содержащую: 0,5 мкл dNTP; по 1 мкл каждого праймера; 2,5 мкл 10x Taq Buffer; 0,2 мкл Taq-polymerase; 1,3 мкл MgCl₂; 13,5 мкл Milli-Q воды, 5 мкл исследуемой ДНК. Затем сверху наслаивали 25 мкл минерального масла для ПЦР. После чего пробирки помещали в амплификатор Терцик.

В серии проведенных экспериментов были апробированы различные температуры отжига (54, 56, 58, 60 °C) и подобраны подходящие термопрофили, позволяющие амплифицировать фрагмент ДНК *Diplostomum spp.*, содержащий ITS1-5,8S-ITS2 участок и прилегающие к нему консервативные области 18S и 28S рибосомальных генов. Температура отжига является одним из ключевых параметров при проведении ПЦР-анализа, так как определяет условия для посадки праймеров на амплифицируемый участок.

Параметры использованных термопрофилей приведены ниже:

1 цикл	94°C2 мин
30 циклов	94°C1 мин 54, 56, 58, 60°C.....1 мин 72°C2 мин
1 цикл	72°C.....5 мин
Хранение	4°C∞

Идентификацию ампликонов проводили с помощью гель-электрофореза в горизонтальной камере SE-1 Helicon. Электрофоретическое фракционирование проводилось с использованием трис-борат-ЭДТА (TBE) буфера в 1,5 % агарозном геле (60 мин. при напряженности электрического поля 85 В) с последующей окраской бромистым этидием.

Визуализацию ампликонов после электрофореза проводили на трансиллюминаторе (длина волна 360 нм). Полученный электрофоретический спектр приведен на рисунке 1.

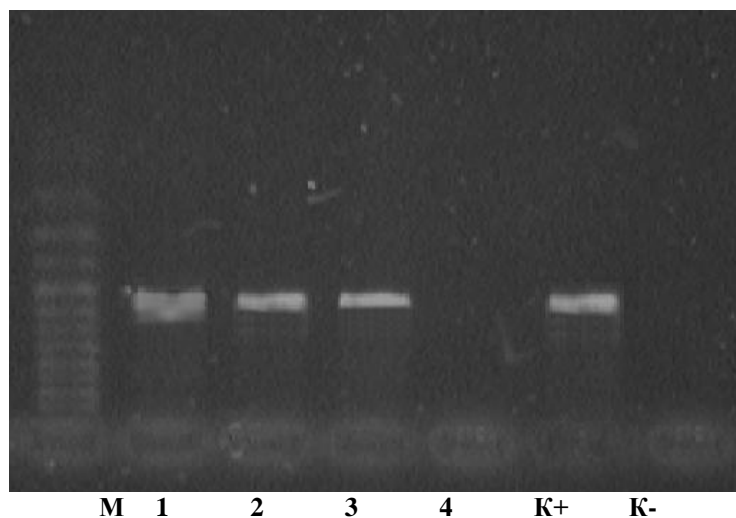


Рис. 1. Электрофоретические спектры ITS1-5,8S-ITS2 *Diplostomum* spp.

М – маркеры молекулярных масс; 1, 2, 3, 4 – образцы с 54, 56, 58, 60°C температурой отжига; K+ - положительный контроль; K- – отрицательный контроль.

Как видно из рисунка, наиболее идентифицируемой и четкой является фракция 2 ($t_{\text{отжига}}$ 56 °С), фракция 4 ($t_{\text{отжига}}$ 60 °С) не содержит достаточного количества ампликона для визуализации. Результаты электрофореза фрагмента ДНК *Diplostomum* spp. показали, что наиболее оптимальными для ПЦР-анализа зараженности диплостомидами вторых промежуточных хозяев – рыб семейства Сурпинidae оказались следующие термопрофили: 94°C – 1 мин.; 56°C – 1 мин; 72°C – 2 мин.

Работа проводилась в рамках темы ГБЦМ 14-32 «Разработка видоспецифичных ПЦР-диагностических систем для выявления возбудителей диплостомоза и описторхоза в промежуточных и дефинитивных хозяевах», выполняемой в рамках ГП «Фундаментальные основы биотехнологий».

Литература

1. Шигин А. А. Трематоды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии. М.: Наука, 1986. Т. XIV. 254 с.
2. Шигин А. А. Трематоды фауны России и сопредельных регионов. Род *Diplostomum*. Мариты. М.: Наука, 1993. 208 с.
3. Galazzo D. E., Dayanandan S., Marcogliese D. J., McLaughlin J. D. Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners // Canadian Journal of Zoology, 2002. Vol. 80 (12). P. 2207-2217.
4. Гончаренко Г. Г., Кураченко И. В., Зятков С. А. Жизненный цикл возбудителей диплостомоза // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, 2014. № 6 (87). С. 21-22.
5. Blasco-Costa I., Faltrynkova A., Georgieva S., Skirnisson K., Scholz T., Kostadinova A. Fish pathogens near the Arctic Circle: molecular, morphological and ecological evidence for unexpected diversity of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) in Iceland // Int. J. Parasitol., 2014. Vol. 44. P. 703-715.