



TYPOWANIE GLONÓW *PROTOTHECA* SPP. TECHNIKĄ HIGH RESOLUTION MELTING *REAL-TIME* PCR

Katarzyna Roeske, Elżbieta Dulko, Tomasz Jagielski

¹ Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

WPROWADZENIE

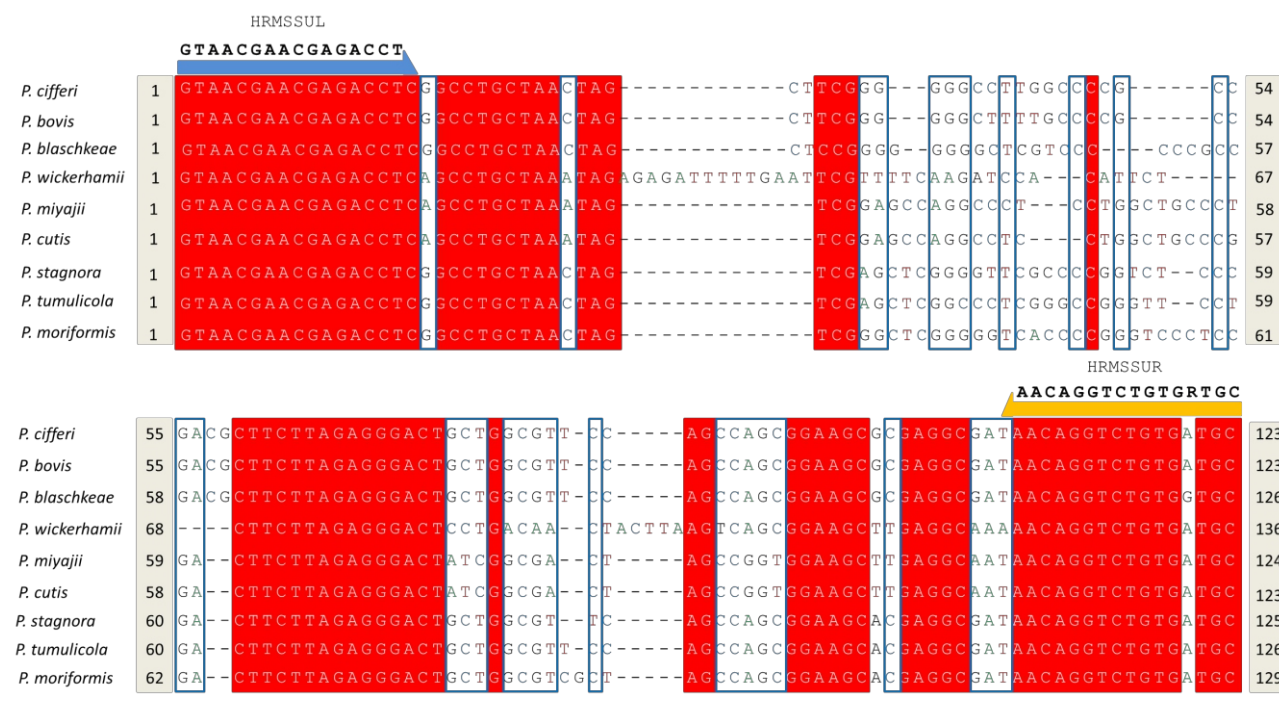
Rodzaj *Prototheca* obejmuje jednokomórkowe, pozbawione chlorofilu glony powszechnie występujące w przyrodzie. Sześć z 14 opisanych gatunków: *P. ciferrii* (wcześniej *P. zopfii* genotyp 1), *P. bovis* (*P. zopfii* genotyp 2), *P. blaschkeae*, *P. wickerhamii*, *P. cutis*, oraz *P. miyajii*, uznaje się za oportunistyczne patogeny ludzi i zwierząt, wywołujące zakażenia zwane prototekozami. Glony *Prototheca* spp., obok przedstawicieli rodzaju *Chlorella*, są jedynymi znanymi dotąd roślinami zdolnymi do infekcji kręgowców, w tym ludzi. Dominującą formą zwierzęcej prototekozy jest zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) krów. Coraz częściej notowane przypadki *mastitis prototheca* stanowią poważne zagrożenie epidemiologiczne i ekonomiczne dla sektora mleczarskiego. Choroba u ludzi dotyka głównie osoby ze znacznym upośledzeniem układu immunologicznego.

CEL BADANIA

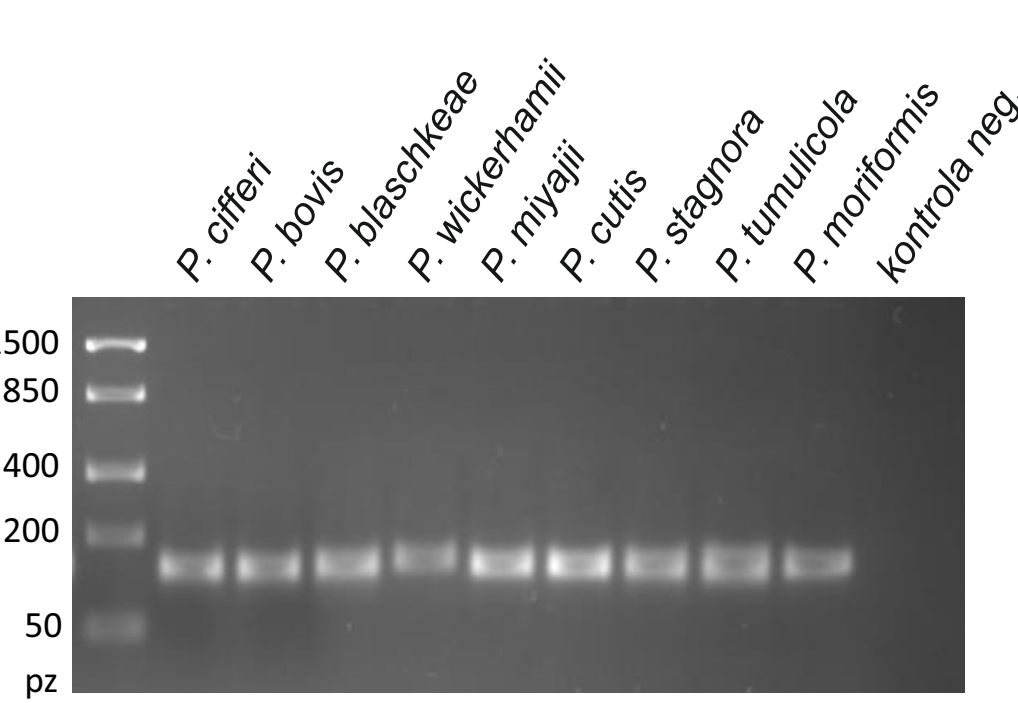
Celem prezentowanej pracy było opracowanie prostej i szybkiej metody identyfikacji glonów należących do rodzaju *Prototheca* wykorzystującej technologię PCR z wysokorozdzielczą analizą temperatur topnienia produktu (PCR-HRM – High Resolution Melting *Real-Time* PCR).

WYNIKI

Szczepy typowe wszystkich 9 analizowanych gatunków *Prototheca* wykazały odrębne profile PCR-HRM, umożliwiając łatwą identyfikację gatunkową (**Rys. 3**). Zgodnie z analizą *in silico*, krzywe o najwyższych temperaturach topnienia (T_m) obserwowano dla *P. blaschkeae*, a niższe dla kolejno: *P. ciferrii*, *P. bovis*, *P. moriformis*, *P. tumulicola*, *P. stagnora*, *P. cutis*, *P. miyajii* i *P. wickerhamii*. W wypadku innych gatunków glonów i grzybów nie obserwowano amplifikacji, względnie obserwowano inne T_m i przebieg krzywych topnienia niż te dla *Prototheca* spp. Powtarzalność metody zweryfikowano w czterech niezależnych eksperymentach. Minimalne i maksymalne T_m , średnie T_m wraz z odchyleniami standardowymi (SD) i wartości odcięcia zebrano w **Tab. 1**. Minimalna różnica między grupami szczepów wynosiła więcej niż czterokrotność SD. Metoda pozwoliła na prawidłowe w 100% przyporządkowanie gatunkowe 50 szczepów *Prototheca* spp.



Rys. 1. Porównanie sekwencji produktów PCR genu SSU używanego na matrycy DNA chromosomowego szczepów wzorcowych *Prototheca* spp. wykonane w programie AliView (Larsson, 2014) przy wykorzystaniu algorytmu MUSCLE (Edgar, 2004). Nukleotydy identyczne dla wszystkich gatunków zakresłono na czerwono, nukleotydy obecne w przynajmniej sześciu sekwencjach ujęto w niebieskie ramki. Myślniki wyznaczają przerwy wewnątrz sekwencji. Niebieskie i czerwone strzałki wyznaczają miejsca przyłączania starterów. Nazwy starterów umieszczono nad strzałkami.



Rys. 2. Produkty PCR genu SSU używanego na matrycy DNA chromosomowego szczepów wzorcowych *Prototheca* spp. M – wzorec masowy FastRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

	Średnia	SD	Cut off (średnia $\pm$ 4SD*)		Temp. $\pm$ SD	
			Min. (°C)	Max. (°C)	Min. (°C)	Max. (°C)
<i>P. blaschkeae</i>	91.79	0.06	91.55	92.03	91.73	91.85
<i>P. cifferi</i>	91.29	0.02	91.21	91.37	91.27	91.31
<i>P. bovis</i>	90.82	0.04	90.66	90.98	90.78	90.86
<i>P. moriformis</i>	90.50	0.01	90.46	90.54	90.49	90.51
<i>P. tumulicola</i>	90.40	0.02	90.32	90.48	90.38	90.42
<i>P. stagnora</i>	90.09	0.01	90.05	90.13	90.08	90.10
<i>P. cutis</i>	88.41	0.24	87.44	89.38	88.17	88.66
<i>P. miyajii</i>	87.91	0.11	87.45	88.37	87.79	88.02
<i>P. wickerhamii</i>	82.94	0.28	81.83	84.06	82.66	83.22

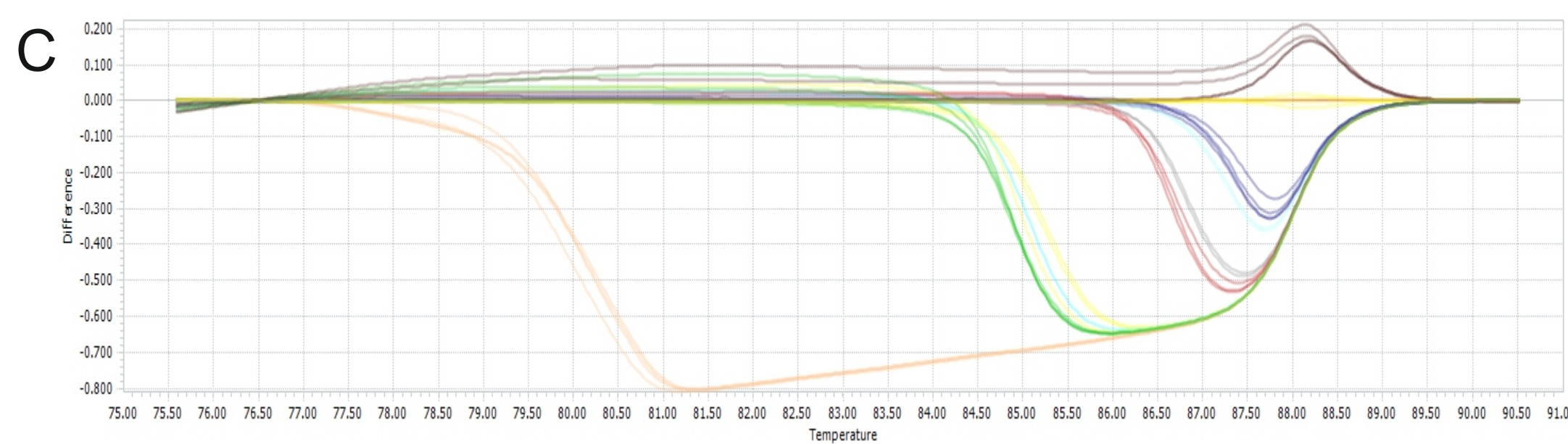
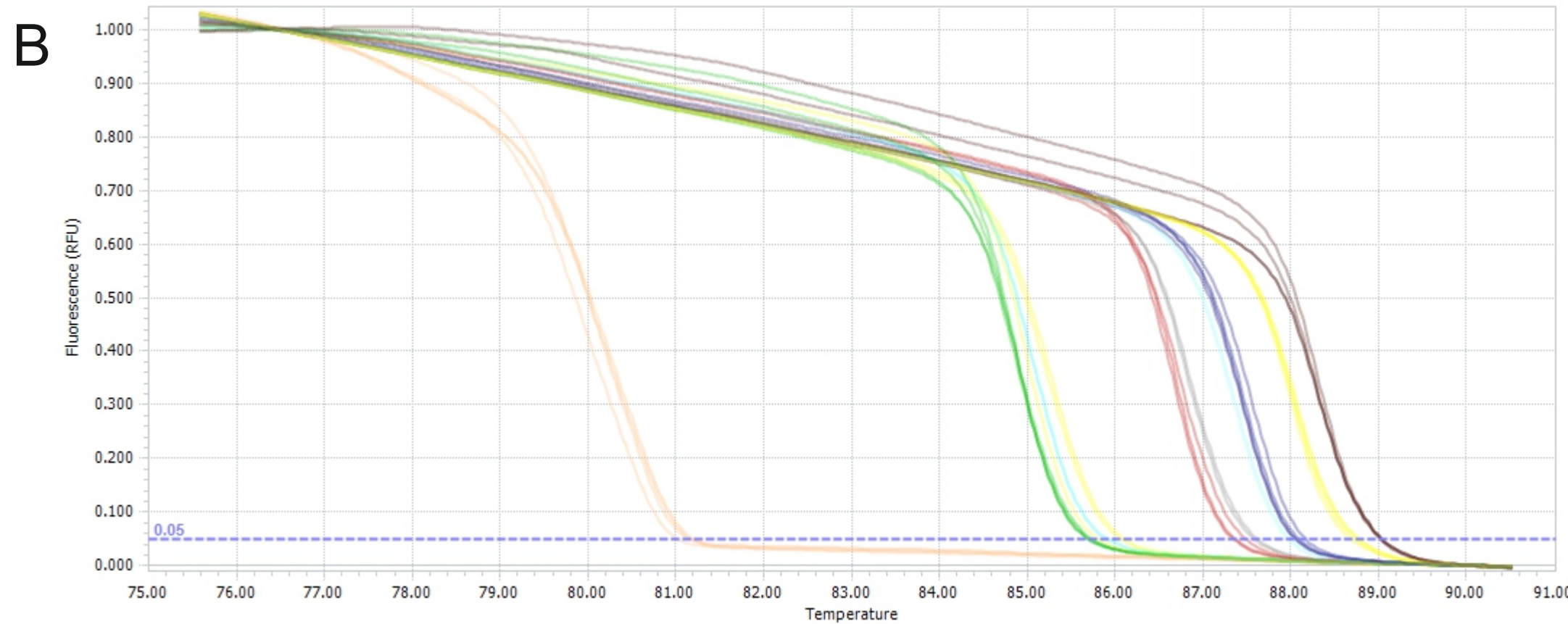
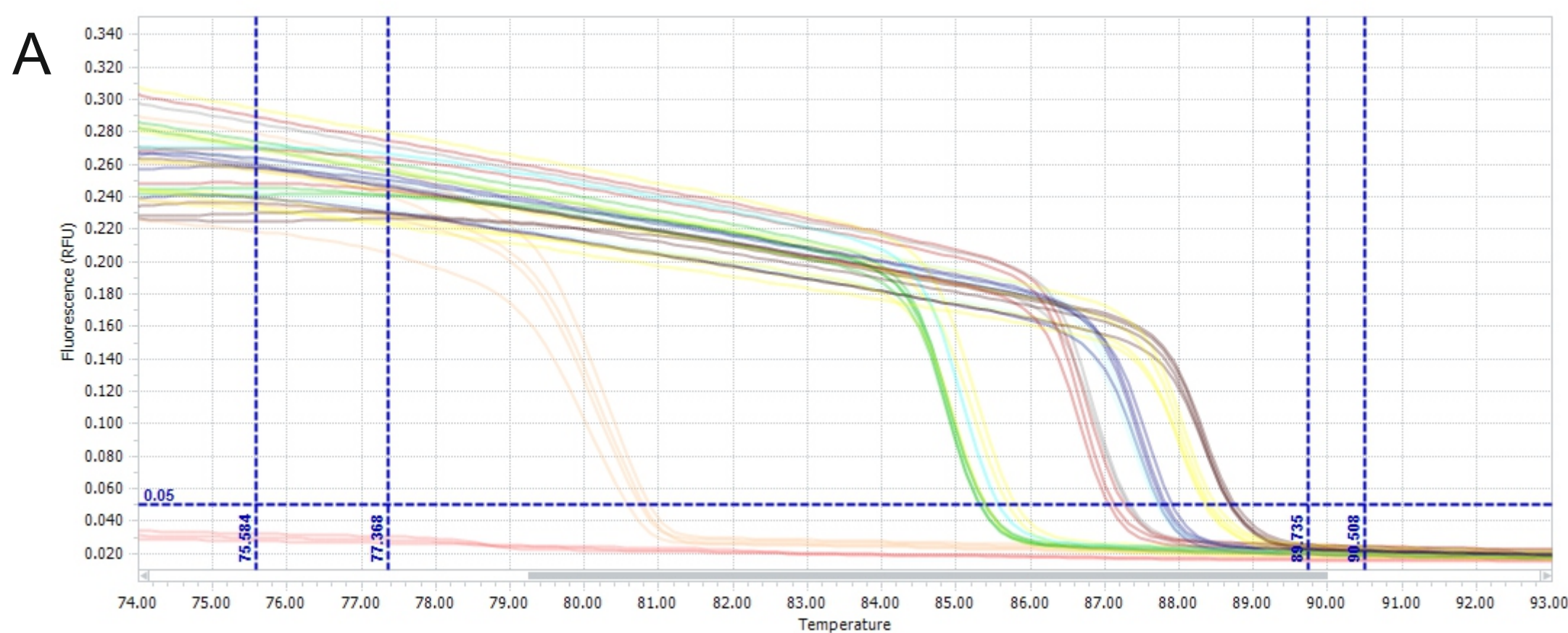
Tab. 1. Wartości temperatur topnienia (T_m) z czterech niezależnych eksperymetów.

* Zakresy wartości cut off wyznaczono według publikacji Odell *et al.* (2005) i Slinger *et al.* (2007).

MATERIAŁY I METODY

Prezentowana metoda, wykorzystująca PCR w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR) została opracowana przy użyciu szczepów typowych 6 gatunków chorobotwórczych (*P. ciferrii*, *P. bovis*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis* i *P. miyajii*) i 3 saprofitycznych (*P. moriformis*, *P. tumulicola* i *P. stagnora*). Startery do reakcji PCR zaprojektowano na podstawie sekwencji 18S rDNA w oprogramowaniu Design Signature (Decipher) (**Rys. 1**).

Do przywydywania przebiegu krzywych topnienia produktów PCR użyto oprogramowania uMelt (www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html). Warunki PCR optymalizowano przy użyciu polimerazy Color OptiTaq (EURx) i genomowego DNA *Prototheca* spp. lub wody (kontrola negatywna) (**Rys. 2**). Reakcje PCR-HRM prowadzono w termocyklerze Light Cycler® 96 (Roche) z wykorzystaniem zestawu Eva Green Typelt® HRM-PCR (Qiagen). Krzywe topnienia analizowano w programie QuantStudio™ Design & Analysis Software (Roche). Powtarzalność metody weryfikowano w 4 niezależnych eksperymentach, dla każdego wariantu w 4 powtórzeniach. Specyficzność techniki oceniano stosując jako matrycę DNA grzybów (*Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*) i glonów (*Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris*, *Helicospodium* sp.). Technikę zwalidowano na kolekcji 50 szczepów *Prototheca* spp., wcześniej identyfikowanych metodą PCR-sequencing.



Rys. 3. Krzywe topnienia fragmentu genu SSU *Prototheca* spp. *P. cifferi* (dawniej *P. zopfii* genotyp 1) oznaczono kolorem żółtym, *P. bovis* (dawniej *P. zopfii* genotyp 2) – niebieskim, *P. blaschkeae* – brązowym, *P. wickerhamii* - pomarańczowym, *P. miyajii* - zielonym, *P. cutis* - turkusowym, *P. stagnora* - czerwonym, *P. tumulicola* - szarym, *P. moriformis* (dawniej *P. ulmea*) – fioletowym. **A** - Krzywe topnienia, **B** - normalizowane krzywe topnienia, **C** - wykres różnicujący (ang. *difference plot*).

WNIOSKI

Opracowano metodę identyfikacji glonów *Prototheca* spp. opartą na amplifikacji PCR-HRM regionu 18S rDNA. Potwierdzono specyficzność gatunkową generowanych w metodzie profilów PCR-HRM. Możliwość stosowania metody jako standardowego narzędzia w identyfikacji glonów *Prototheca* spp. wymaga dalszych badań walidacyjnych. Konieczna jest też weryfikacja metody dla pozostałych 5 gatunków z rodzaju *Prototheca* (*P. zopfii*, *P. cerasi*, *P. cookei*, *P. pringsheimii*, *P. xanthoriae*).

Odell, I.D., Cloud, J.L., Seipp, M. and Wittwer, C.T. (2005) Rapid species identification within the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group by high-resolution melting analysis of hsp65 PCR products. *Am J Clin Pathol* 123, 96–101.

Slinger, R., Bellfof, D., Desjardins, M. and Chan, F. (2007) High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57, 455–458.

Dane kontaktowe:
dr Katarzyna Roeske
Uniwersytet Warszawski
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii Stosowanej
ul. I. Miecznikowa 1, Warszawa
tel. (22) 55 41 311
e-mail: kroeske@biol.uw.edu.pl

Projekt sfinansowano z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na badania naukowe służące rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowane w wewnętrznym trybie konkursowym dla Wydziału Biologii UW, DSM nr 31/2018.