

Nowa metoda identyfikacji *Prototheca* sp. wykorzystująca analizę PCR-RFLP genu 18S rDNA

Sylwia Gregorcuk¹, Zofia Bakuła¹, Henryk Krukowski², Mariola Bochniarz³, Tomasz Jagielski^{1*}

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

²Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

³Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

*Autor korespondencyjny, tel. 22 55 41 312, e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

Badanie zostało sfinansowane ze środków przyznanych grantem N.C.N. „SONATA” (2014/15/D/NZ7/01797) i grantem Wydziału Biologii „DSM” (501/86-110103).



Wstęp

Algi z rodzaju *Prototheca* są jednokomórkowymi, bezbarwnymi, drożdżakopodobnymi drobnoustrojami, szeroko rozpowszechnionymi w środowisku [1,2]. Izolowane są, jako flora saprofityczna, z gleby, wód powierzchniowych, roślin i zwierząt [3]. Glony *Prototheca* mogą wywoływać oportunistyczne zakażenia u ludzi. Spośród 8 rozpoznanych dotąd gatunków/genotypów, 5 (*P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. wickerhamii*, *P. cutis*, *P. miyajii*) uznaje się za patogenne [4]. Chociaż prototekozą jest rzadką chorobą, z każdym rokiem rozpoznaje się coraz więcej jej przypadków wśród ludzi i zwierząt.

Cel

Celem pracy było zaproponowanie nowej metody identyfikacji glonów *Prototheca*, umożliwiającej rozróżnienie wszystkich 8 gatunków/genotypów, w oparciu o analizę sekwencyjną genu 18S rRNA.

Materiały i metody

Do badań użyto 8 szczepów referencyjnych reprezentujących 8 gatunków/genotypów *Prototheca*: RZ1-3 *P. zopfii* genotyp I, LZ-5 *P. zopfii* genotyp II, RZIII-3 *P. blaschkeae*, ATCC PRA-338 *P. cutis*, ATCC 16528 *P. stagnora*, ATCC 50112 *P. ulmea*, DBVPG 9298 *P. wickerhamii*, IFM 53848 *P. miyajii*. Izolację DNA przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA Purification Kit (EURx). Dla każdego ze szczepów amplifikowano, metodą PCR, fragment genu kodującego 18S rRNA, przy użyciu zdegenerowanych starterów Eukar18F i Eukar18R [5]. Produkt PCR sekwencjonowano w obu kierunkach, stosując startery jw. Sekwencje konsensusowe analizowano w programie Clone Manager ver. 8 (Scientific & Educational Software), poszukując miejsc restrykcyjnych umożliwiających, w wyniku trawienia odpowiednią endonukleazą, identyfikację gatunku/genotypu. Do walidacji metody użyto 22 szczepy *Prototheca*, przypisanych do gatunku/genotypu na podstawie testów biochemicznych i analizy sekwencyjnej fragmentu 18S rDNA.

Wyniki

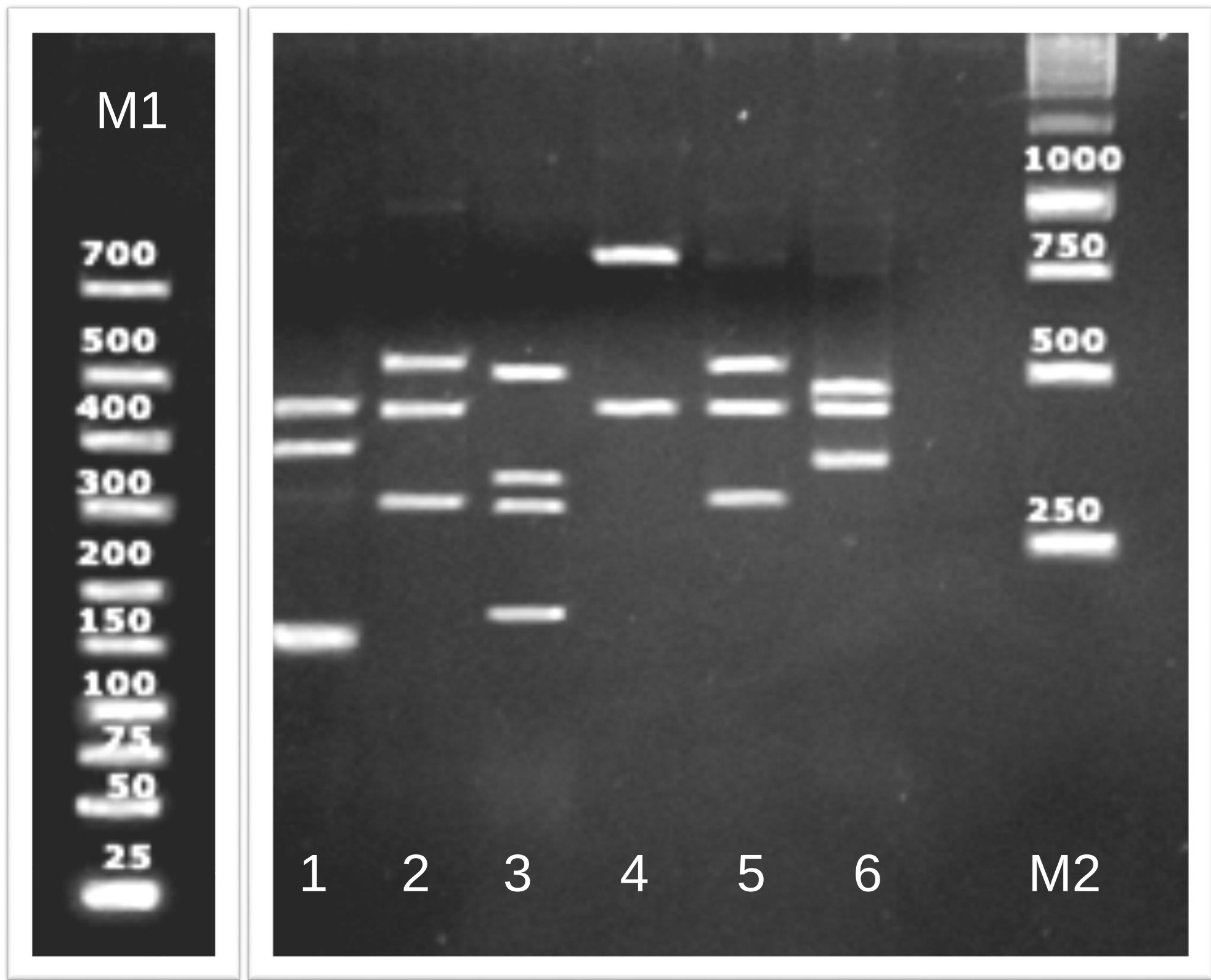
Dla 6 z 8 wzorcowych szczepów (*P. zopfii* gen. I, *P. zopfii* gen. II, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. ulmea*, *P. stagnora*) uzyskano produkt PCR o wielkości ok. 1200 pz, który następnie z powodzeniem sekwencjonowano. Na podstawie analizy *in silico* otrzymanych sekwencji wybrano dwa enzymy, tj. MvaI i SmaI (Thermo Scientific), generujące gatunkowo-specyficzne wzory restrykcyjne (Tab. 1.). Wzory te zostały potwierdzone eksperymentalnie i zwizualizowane w 2% żelu agarozowym (Ryc. 1.). Wyniki identyfikacji gatunkowej nową metodą dla 22 szczepów *Prototheca*, użytych na etapie walidacji, były zgodne z oznaczeniami na podstawie testów biochemicznych i analizy sekwencyjnej fragmentu 18S rDNA.

Tab. 1. Wielkość fragmentów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu produktów amplifikacji enzymami MvaI i SmaI.

Gatunki/genotypy	Wielkość fragmentów restrykcyjnych [pz]
<i>P. cutis</i>	8, 48, 122, 147, 147, 364, 439
<i>P. stagnora</i>	48, 263, 409, 508
<i>P. ulmea</i>	48, 159, 260, 291, 482
<i>P. zopfii</i> genotyp I	48, 407, 762
<i>P. zopfii</i> genotyp II	48, 265, 414, 502
<i>P. blaschkeae</i>	48, 321, 411, 450

Wnioski

- ☐ Zaprojektowana metoda pozwala na identyfikację 4 z 8 gatunków (genotypów) *Prototheca*: *P. zopfii* gen. I, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. ulmea*.
- ☐ Dla gatunków *P. wickerhamii* i *P. miyajii* nie otrzymano produktu PCR.
- ☐ Gatunki *P. stagnora* i *P. zopfii* gen. II posiadają taki sam wzór restrykcyjny.



Ryc. 1. Wyniki PCR-RFLP dla poszczególnych szczepów wzorcowych. M1 - marker [Low Range DNA Ladder], 1 - *P. cutis*; 2 - *P. stagnora*; 3 - *P. ulmea*; 4 - *P. zopfii* genotyp I; 5 - *P. zopfii* genotyp II; 6 - *P. blaschkeae*; M2 - marker [Gene Ruler 1kb].

Literatura:

- Jagielski, T., et al., *J. Med. Mycol.*, 2007, (17)(4):261-70.
- Shahid, M., et. al., *Mycopathologia*, 2015, (181)(3):185-95.
- Marques, S., et al., *Res. Vet. Sci.*, 2010, (89)(1):5-9.
- Masuda, M., et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, (66)(3):1510-1520.
- Zhang, Q., et al., *Int. J. Infect.Dis.*, 2010, (14)(3):32-5.