

Propozycja nowej metody identyfikacji *Prototheca* sp. na podstawie PCR-RFLP analizy genu 18s rDNA

Autorzy: Sylwia Gregorcuk¹, Zofia Bakula¹, Henryk Krukowski², Mariola Bochniarz³, Tomasz Jagielski¹

¹Zakład 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

Wstęp:

Algi z rodzaju *Prototheca* są jednokomórkowymi, bezbarwnymi, drożdżakopodobnymi drobnoustrojami, szeroko rozpowszechnionymi w środowisku. Izolowane są, jako flora saprofityczna, z gleby, wód powierzchniowych, roślin i zwierząt. Glony *Prototheca* mogą wywoływać oportunistyczne zakażenia u ludzi. Spośród 8 rozpoznanych dotąd gatunków/genotypów, 5 (*P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. wickerhamii*, *P. cutis*, *miyajii*) uznaje się za patogenne. Chociaż prototekoza 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 operonu rDNA.

Materiał i metody:

Do badań użyto 8 szczepów referencyjnych reprezentujących 8 gatunków/genotypów *Prototheca*: RZI-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*, DVBG 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 EukarF i EukarR. 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 szczepów *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 (MvaI i SmaI), generujące gatunkowo-specyficzne wzory restrykcyjne. Wzory te zostały potwierdzone eksperymentalnie i zwizualizowane w żelu agarozowym. Wyniki identyfikacji gatunkowej nową metodą dla 22 szczepów *Prototheca* były zgodne z oznaczeniami na podstawie testów biochemicznych i analizy sekwencyjnej fragmentu 18S rDNA.

Wnioski:

1. Zaprojektowana metoda umożliwia identyfikację 4 z 8 gatunków *Prototheca*: *P. zopfii* gen. I, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. ulmea*.
2. Dla gatunków *P. wickerhamii* i *P. miyajii* nie otrzymano produktu PCR.
3. Gatunki *P. stagnora* i *P. zopfii* gen. II posiadają taki sam wzór restrykcyjny.