

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* И *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII*

М.Ю. Сыромятников

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

За последние двадцать лет выявлена значительная роль анаэробной бактерии *Akkermansia muciniphila* в поддержании здорового микробиома кишечника человека [1,2]. Эта бактерия в настоящее время рассматривается как пробиотик нового поколения [3]. Анаэробная бактерия *Faecalibacterium prausnitzii* также обладает свойствами нового пробиотического агента [4]. Для разработки пробиотиков на основе этих бактерий необходим метод их быстрой идентификации на основе ПЦР ввиду того, что микробиологически идентифицировать данные бактерии крайне сложно. Был разработан TaqMan ПЦР метод быстрой идентификации *A. muciniphila* и *F. prausnitzii*.

Первоначально был проведен бионформатический анализ ДНК *F. prausnitzii* и *A. muciniphila* для идентификации областей генома бактерий, которые консервативны и характерны для этих видов бактерий. Далее были разработаны зонд и праймеры, которые были высокоспецифичны к ДНК *A. muciniphila*: прямой праймер - AkMuNF; обратный праймер - AkMuNR; TaqMan-зонд - AkMuNP. Также были разработаны праймеры и зонд, которые были специфичны к ДНК *F. prausnitzii*: прямой праймер FaPrN-f; обратный праймер 1 FaPrN-r1; обратный праймер 2 FaPrN-r2; TaqMan-зонд FaPrM-p. Был оптимизирован температурный цикл реакций ПЦР. Наиболее оптимальной температурой плавления для реакции амплификации с ДНК *A. muciniphila* была температура 57 °С. Такая же температура была наиболее подходящей при амплификации ДНК *F. prausnitzii*. Кроме того, был оптимизирован состав реакционной смеси. Установлено, что концентрация зонда 200 нМ была оптимальна для идентификации ДНК *A. muciniphila*, а 400 нМ для идентификации *F. prausnitzii*.

На следующем этапе была оценена чувствительность TaqMan ПЦР методов идентификации новых пробиотических агентов *F. prausnitzii* и *A. muciniphila*. Было выявлено, что чувствительность метода для *A. muciniphila* составляет 10 фг ДНК. Чувствительность разработанного TaqMan ПЦР метода для *F. prausnitzii* составлял 100 фг ДНК. Специфичность разработанных методов TaqMan ПЦР была оценена с помощью ПЦР с ДНК микроорганизмов из различных таксономических групп, животных, растений, а также человека (*Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Homo sapiens*, *Bacteroides sp.*, *Solanum lycopersicum*, *Sus scrofa*, *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*). Положительная реакция TaqMan ПЦР наблюдалась только с ДНК *A. muciniphila* и *F. prausnitzii*.

Учитывая то, что *A. muciniphila* и *F. prausnitzii* являются анаэробными бактериями, молекулярно-генетические методы их идентификации будут существенно облегчать верификацию состава пробиотиков, содержащих эти бактерии. Разработанные методы позволят проводить идентификацию бактерий в микробиоте кишечника, что в свою очередь позволит проводить оценку эффективности пробиотиков нового поколения. Кроме того, разработанные TaqMan ПЦР методы позволят осуществлять скрининг выросших колоний бактерий без проведения идентификации бактерий на основании морфологических и биохимических данных, а также секвенирования при разработке новых пробиотиков.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20036, <https://rscf.ru/project/24-24-20036>.

Литература

1. Aja E., Zeng A., Gray W. et al. Health effects and therapeutic potential of the gut microbe *Akkermansia muciniphila* // *Nutrients*. 2025. Vol. 17. № 3. 562.
2. Pellegrino A., Coppola G., Santopaolo F. et al. Role of *Akkermansia* in human diseases: from causation to therapeutic properties // *Nutrients*. 2023. Vol. 15. № 8. 1815.
3. Zhai Q., Feng S., Arjan N., Chen W. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila* // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59. № 19. P. 3227–3236.
4. Martín R., Rios-Covian D., Huillet E. et al. *Faecalibacterium*: a bacterial genus with promising human health applications // *FEMS Microbiology Reviews*. 2023. Vol. 47. № 4. fuad039.