

УДК 577.2

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР

Джобулаева А.К., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М., Жаниязов Ж.А., Алимбетова А.В.
РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, e-mail: lazzat8523ru09@mail.ru

Проведен молекулярно-генетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA 3 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта здоровых людей. Идентифицировано до вида три культуры бактерии рода *Lactobacillus*, которые являются антагонистами по отношению к патогенным и условно патогенным бактериям. По результатам анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA штаммы отнесены к роду *Lactobacillus*. Филогенетический анализ фрагмента гена 16S rRNA показал, что штаммы № 139, № 2 и № 53H образуют один кластер со штаммами *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* и *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei* и принадлежат к филогенетической группе *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei/paracasei*.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, генетическая идентификация, 16S rRNA ген, праймеры, секвенирование

THE USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION TO IDENTIFY COLLECTION CULTURES

Dhobulayeva A.K., Jakibaeva G.T., Kebekbayeva K.M., Zhanijazov Z.A., Alimbetova A.V.
RSE «Institute of Microbiology and Virology» SK MES RK, Almaty, e-mail: lazzat8523ru09@mail.ru

Molecular genetic analysis of nucleotide sequence of 16S rRNA of 3 strains of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of healthy people was conducted. Identified to the species level three cultures of bacteria of the genus *Lactobacillus*, which is antagonists against pathogenic and conditionally pathogenic bacteria. According to the analysis of the nucleotide sequence of a fragment of 16S rRNA three strains assigned to the genus *Lactobacillus*. Phylogenetic analysis of a fragment of 16S rRNA showed that the strains No. 139, No. 2 and No. 53H form one cluster with strains of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*, and belong to the phylogenetic group of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei/paracasei*.

Keywords: *Lactobacillus*, genetic identification, 16S rRNA gene, primers, sequencing

Лактобактерии являются представителями естественной микрофлоры организма человека и животных и играют важную роль в поддержании колонизационной резистентности [1–2]. Они подавляют рост и размножение поступающих извне представителей посторонней микрофлоры, предотвращают их приживание. В организме человека лактобациллы появляются в первые дни после рождения и в течение всей его жизни присутствуют в кишечнике, препятствуя развитию гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Развитие дисбактериоза в большинстве случаев связано с нарушением естественного состава микрофлоры кишечника. Представители рода *Lactobacillus* нашли свое применение в составе многочисленных лечебно-диетических кисломолочных продуктов и фармакопейных биопрепаратов [3–4].

Лактобактерии и продукты метаболизма широко используются для профилактики и лечения различных острых и хронических заболеваний пищеварительного тракта, способствуя восстановлению нормальной микрофлоры. Лактобактерии широко используются в пищевой промышленности в составе заквасок для приготовления кисломолочных продуктов (сыры, масла, йогурты), для хле-

бопечения (ржаной хлеб), для квашения овощей и засолки рыбы, для приготовления сухих и варено-копченых колбас [5].

Прежде чем использовать штаммы микроорганизмов для промышленного производства необходимо определить их разнообразные характеристики, в том числе и генетические, которые в отличие от культурально-морфологических более стабильны. Классическими методами внутривидового типирования микроорганизмов являются изучение морфологии, биохимические тесты и серологические реакции. Но вышеуказанные методы обладают существенными недостатками: они опираются на выявление переменных фенотипических признаков, относительная однородность которых определяет трудности во внутривидовой дифференциации микроорганизмов и не позволяет выявить различия между штаммами одного вида. Для повышения достоверности результатов при типировании штаммов лактобацилл целесообразно наряду с классическими использовать молекулярно-генетические методы исследования [6–8].

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют не только провести внутривидовую дифференциацию лактобацилл на основании особенностей их гено-

мов, но и дают возможность получить индивидуальными генотипические характеристики каждого штамма. Наиболее перспективными методами типирования штаммов лактобацилл, по нашему мнению, являются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одновременное применение нескольких методов ПЦР обеспечивает возможность генотипирования лактобацилл и позволяет решать задачи дифференциации видов и штаммов, входящих в состав пробиотических и производственных заквасок [9–10].

Материалы и методы исследования

Штаммы. В работе были использованы 3 штамма бактерий рода *Lactobacillus*, зарегистрированные в коллекции промышленных микроорганизмов РГП «Института микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, по паспортным данным принадлежащих к *Lactobacillus casei* № 139, *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H и 15 нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA* молочнокислых бактерий, депонированные в базу данных NCBI.

Определение и анализ нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA*. Геномную ДНК выделяли методом Kate Wilson [11]. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Nano Drop 1000 при длине волны 260 нм, а также проводили качественную оценку ДНК электрофоретическим методом. Матрицы для секвенирования синтезировали с помощью ПЦР, используя универсальные праймеры 8f-5'-AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R-5'-ggACTACCAgggTATCTAAT-3 [12], что позволяло амплифицировать ген *16S rRNA* почти полностью. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 3 мкл 10х реакционного буфера (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ), по 10 пмоль каждого из праймеров, 1 единицу Taq – полимеразы Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas) и 150 нг геномной ДНК в качестве матрицы. ПЦР проводили в термоциклере Mastercycler pro S (Eppendorf). Реакцию начинали инкубированием смеси при 95 °С в течение 7 минут, затем следовало 30 циклов, состоящих из инкубаций: 95 °С – 30 секунд, 55 °С – 40 секунд, 72 °С – 1 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72 °С в течение 10 минут. Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле. Гели окрашивали этидиум бромидом. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза Bio-RAD Basic и источником тока «Consort EV-243». В качестве электродного буфера использовали 1хTAE-буфер. Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Gel Doc. Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder производства (Fermentas). ПЦР продукты очищали от остатков олигонуклеотидов методом дефосфолирования с помощью щелочной фосфатазы (SAP-shimp alkaline phosphatase) и эндонуклеазы I [13]. Секвенирование фрагментов гена *16S rRNA* идентифицируемых бактерий проводили

на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), придерживаясь рекомендаций производителя. Результаты секвенирования обрабатывали в программе SeqMan (Applied Biosystems). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA* осуществляли с помощью программы BLAST в базе данных Gene Bank Национального центра биотехнологической информации США. Идентификация была осуществлена относительно инвентарных номеров *Gene Bank* первых трех нуклеотидных последовательностей, имеющих максимальное совпадение. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения *MEGA4* [14]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм ClustalW [15]. Для построения филогенетических деревьев использовали метод «объединения соседей» Neighbor-Joining (NJ) [16].

Результаты исследования и их обсуждение

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA* у рода *Lactobacillus*. В нашем исследовании генетическая идентификация 3 штаммов была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank, а также построением филогенетических деревьев с нуклеотидными последовательностями референтных штаммов.

В результате выделения ДНК были получены образцы с высокой концентрацией ДНК от 80 до 150 нг/мкл, соотношение длин волн 260/280 в среднем составило 1,99. Методом ПЦР был амплифицирован фрагмент *16S rRNA* гена, молекулярной массой размером около 800 п.н. Результаты амплификации образцов с отрицательным контролем отображены на рис. 1.

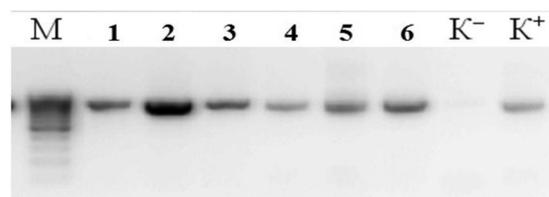


Рис. 1. Электрофорерограмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента *16S rRNA* гена ДНК: 1) – № 139, 2) – № 2, 3) – № 53H; (M) – маркер молекулярной массы O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) (100 – 1000 п.н. от 100 – 1000 шаг 100 п.н.), (K-) – отрицательный контрольный образец; (K+) – положительный контрольный образец

Продукты ПЦР амплификации были использованы для определения нуклеотидной последовательности. Для исключения методической погрешности анализа *16S rRNA* гена, дополнительно было проведено построение филогенетических деревьев (рис. 2, 3–4). После удаления последовательности праймеров в неперекрывающихся областях были получены нуклеотидные последовательности размером 650 п.н. При выравнивании было выявлено, что нуклеотидные последовательности фрагмента *16S rRNA* гена референтных штаммов *Lactobacillus casei* (KJ739522.1), *Lactobacillus plantarum* (KM200717.1) и *Lactobacillus pentosus* (KF317899.1), а также *Lactobacillus paracasei* (KJ958418.1) и *Lactobacillus casei* (HG931728.1), *Lactobacillus paracasei* (KM009083.1) и *Lactobacillus casei* (KJ806307.1) имели размер 560 и 550 п.н. соответственно. В связи с этим для формирования однородной выборки размером 550 п.н. была удалена часть нуклеотидных последовательностей у исследуемых штаммов. Процент идентичности фрагментов нуклеотидных последовательностей *16S rRNA* гена между *Lactobacillus casei* № 139 и *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* составил 100%. У штаммов *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H и *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei* также составил 100%.

Результаты филогенетического анализа последовательностей гена *16S rRNA* у изу-

чаемых штаммов представлены на филогенетическом дереве (рис. 2, 3–4), построенном в программе *MEGA4*, с использованием *Neighbor-Joining* кластерного метода расчета генетических расстояний и *bootstrap* анализа, отражающего достоверность кластеризации.

Из представленных данных, по характеру последовательностей штаммы можно распределить в 2 кластера, один из которых составляет культуры *Lactobacillus casei* (KJ739522.1), *Lactobacillus plantarum* (KM200717.1) и *Lactobacillus pentosus* (KF317899.1), полные нуклеотидные последовательности которых характеризуются 100%-м сходством. Второй кластер включает штамм *Lactobacillus paraplantarum*, сходство последовательностей гена *16S rRNA* у которого составило 99–98% (рис. 2). Как видно на рис. 2, при филогенетическом анализе фрагмента *16S rRNA* гена штамм *Lactobacillus casei* № 139 был объединен в один кластер с *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus pentosus*. При идентификации в Gene Bank штамм *Lactobacillus casei* № 139 находится на одной филогенетической ветви образуемой бактериями *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* что указывало на его принадлежность к одному из этих видов и исключало возможность отнесения к *Lactobacillus casei*. Разграничение видов *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* на основании результатов проведенного филогенетического анализа оказалось невозможным.

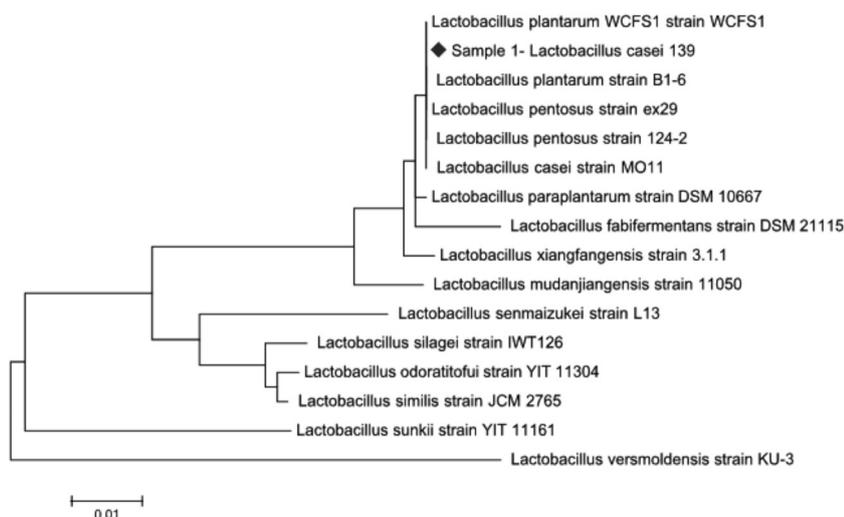


Рис. 2. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов гена *16S rRNA*, отражающее родственные связи штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*

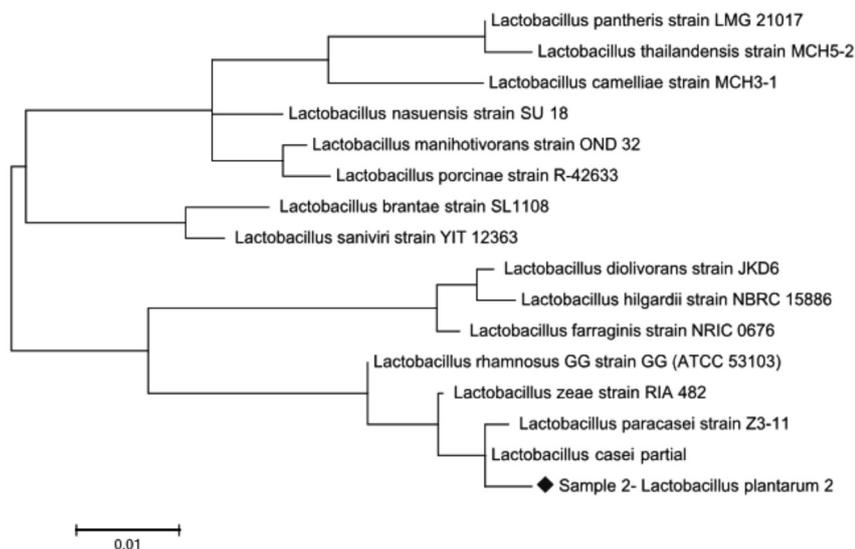


Рис. 3. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов гена 16S rRNA, отражающее родственные связи штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*

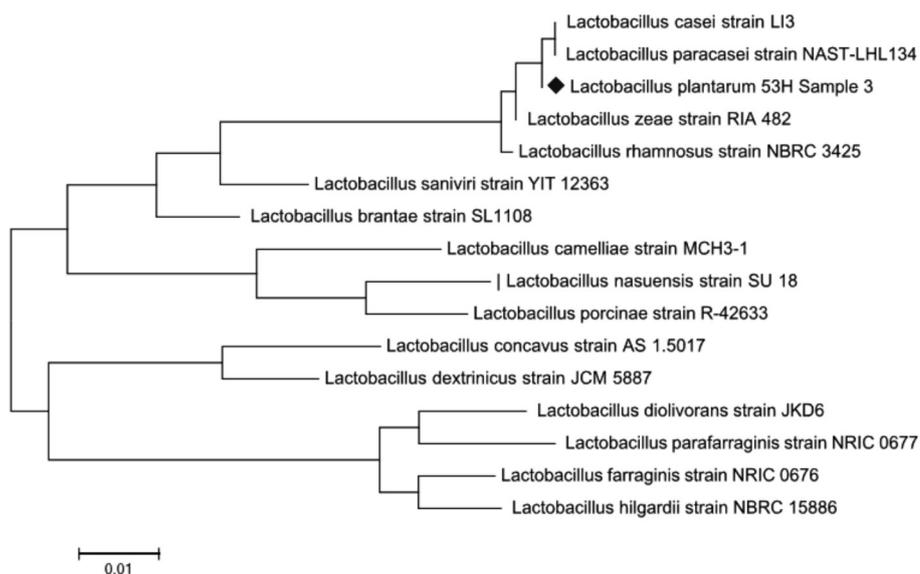


Рис. 4. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов гена 16S rRNA, отражающее родственные связи штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*

Из представленных данных, по характеру последовательностей штаммы можно распределить в 2 кластера, один из которых составляет культуры *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei*, нуклеотидные последовательности которых характеризуются 100%-м сходством. Второй кластер включает штамм *Lactobacillus zeae*, сходство последовательностей гена 16S rRNA у которого составило 99–98% (рис. 3–4). Как

видно на рис. 3–4, при филогенетическом анализе фрагмента 16S rRNA гена штаммы *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H были объединены в один кластер с *Lactobacillus casei-paracasei*. При идентификации в *Gene Bank* штаммы *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H находятся на одной филогенетической ветви, образуемой бактериями *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei*,

что указывает на их принадлежность к одному из этих видов и исключает возможность отнесения к *Lactobacillus plantarum*. Разграничение видов *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei* на основании результатов проведенного филогенетического анализа оказалось невозможным.

Причиной этого можно считать низкую вариабельность нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA*. Коллекционные штаммы лактобацилл по результатам нашего анализа последовательностей их генов *16S rRNA* были разделены на 2 группы. В первую группу *Lactobacillus plantarum* вошел штамм *Lactobacillus casei* № 139, видовой принадлежность которого не соответствует их исходным паспортным данным, составленным на основании традиционных микробиологических методов исследования. Ко второй группе *Lactobacillus casei-paracasei* отнесены штаммы *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H, у которых последовательность гена *16S rRNA* также не соответствует видовому положению, указанному в паспортных данных.

В данном исследовании представлены результаты молекулярно-генетической идентификации трех штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей *16S rRNA* гена, выделенных из желудочно-кишечного тракта здоровых людей. Штаммы молочнокислых бактерий были просеквенированы и проанализированы.

Сравнение нуклеотидной последовательности генов *16SrRNA* коллекционных штаммов с таковой международных баз данных позволило установить, что штаммы № 139, № 2 и № 53H, идентифицированные ранее, как штаммы *Lactobacillus casei* № 139, *Lactobacillus plantarum* № 2 и *Lactobacillus plantarum* № 53H, на самом деле относятся к *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* к группе *Lactobacillus plantarum*, а штаммы *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei* – к группе *Lactobacillus casei/paracasei*.

Секвенирование гена *16S rRNA* выявило высокий уровень гомологии с представителями рода *Lactobacillus*: штамм *Lactobacillus casei* № 139 – 100% с *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus*; а штамм *Lactobacillus plantarum* № 2 – 100% с *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei*. А также штамм, *Lactobacillus plantarum* № 53H – 100% с *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus casei*.

Следовательно, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей трех штаммов молочнокислых бактерий показал их высокую идентичность.

Список литературы

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50–58.
2. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. – М.: Грантъ, 2001. – 288 С.
3. Янковский Д.С. Бифидобактерии и лактобациллы как оптимальная основа современных пробиотиков / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент // Современная педиатрия. – 2006. – Т. 3, № 12. – С. 1–10.
4. Giraffa G. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology / G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti // Research in Microbiology. – 2010. – Vol. 161. – P. 480–487.
5. Rantsiou K. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy / K. Rantsiou, E.H. Drosinos, M. Gialitaki [et al.]. // Food Microbiology. – 2005. – Vol. 22. – P. 19–28.
6. Spano G. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR / G. Spano, L. Beneduce, D. Tarantino [et al.]. // Letters in Applied Microbiology. – 2002. – Vol. 35. – P. 370–374.
7. Han K. Rapid identification of *Lactobacillus acidophilus* by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and flanking 23S rRNA gene / K. Han, Y. Kim, S. Choi [et al.]. // Biotechnology Letters. – 2005. – Vol. 27. – P. 1183–1188.
8. Mohania D. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria / D. Mohania, R. Nagpal, M. Kumar [et al.]. // Journal of Digestive Diseases. – 2008. – Vol. 9. – P. 190–198.
9. Settanni L. Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough *Lactobacillus* species by multiplex PCR / L. Settanni, D. Sinderen, J. Rossi [et al.]. // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 6. – P. 3049–3059.
10. Blaiotta G. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation / G. Blaiotta, V. Fusco, D. Ercolini [et al.]. // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 71, № 1. – P. 208–215.
11. Giraffa G. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology / G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti // Research in Microbiology. – 2010. – Vol. 161. – P. 480–487.
12. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria in Current Protocols in Molecular Biology // Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., et al. New York: Wiley. – 1987. – P. 241–245.
13. Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // Infection Control and Hospital Epidemiology. – 2006. – Vol. 27. – P. 397–404.
14. Werle E., Schneider C., Rrenner M., Volker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. – 1994. – V. 22. – P. 4354–4355.
15. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evolut. – 2007. – V. 24. – P. 1596–1599.
16. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., Clustal W. In proving the sensitivity multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap Nucleic Acids Res. – 1994. – V. 22. – P. 4673–468.
17. Clarridge III J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 17. – P. 840–862.