

8 Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.-E., Lindba T., Andersson M., Schulz A., Fricker M. et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains // *Microbiol.*, 2005. 151: 183-197.

9 Ботина С.Г., Пиксасова О.В., Цыганков Ю.Д., Суходолец В.В. Генетическое разнообразие природных штаммов бактерий вида *Streptococcus thermophilus*. *Генетика*, 2007. 5: 601-608.

Тұжырым

Bacillus штамдарының ДНҚсы RAPD әдісімен зерттелді. Зерттеу нәтижесінде аталмыш штамдардың туыстық қатынасын анықтайтын мәліметтер алынды.

Summary

Testing of DNA of *Bacillus* strains – destructors of petroleum was performed by RAPD method, and the data was obtained regarding their genetic relationship.

УДК 579.06: 577.21

Аширбеков¹ Е.Е., Аbugалиева¹ Г.К., Балмуханов¹ Т.С., Айтхожина¹ Н.А.,

Цзю² В.Л., Игнатова² Л.В., Мукашева² Т.Д.

RAPD-АНАЛИЗ ДНК ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КАЗАХСКИХ НАЦИОНАЛЬНЫХ КИСЛОМОЛОЧНЫХ НАПИТКОВ

(¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,

² Казахский государственный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

Проведение RAPD-анализа ДНК микроорганизмов продуцентов казахских национальных молочных напитков - кумыса и шубата, позволило уточнить систематическое положение некоторых лабораторных культур дрожжей.

Дрожжи, принадлежащие к родам *Kluyveromyces* и *Saccharomyces*, являются продуцентами биологически активных веществ, используются в биотехнологии и в производстве казахских национальных кисломолочных продуктов. Многообразие существующих дрожжей, фенотипические различия жизненных форм, делают, в некоторых случаях, сложным точное определение их систематического положения, в связи с чем таксономический статус определенных представителей данных родов подвергался пересмотру. В настоящее время возможности традиционной классификации, основанные на фенотипических и биохимических различиях, обогатились молекулярно-генетическими методами, главными из которых является сиквенирование генома и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Анализ молекулярно-генетических маркеров при помощи различных модификаций метода ПЦР позволяет достоверно описывать не только межвидовые и внутривидовые различия, но и дифференцировать между собой природные изоляты, детально описывать промышленные штаммы (связывая генетические маркеры с хозяйственно-ценными признаками), а также создавать генетические паспорта. В предлагаемой работе использован один из вариантов ПЦР - метод определения полиморфизма амплифицированных фрагментов (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) для изучения генетических связей штаммов, выделенных из казахских национальных напитков – кумыса и шубата. Систематическое положение отдельных представителей дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Saccharomyces* до настоящего времени продолжает оставаться предметом обсуждения. Детальная идентификация микроорганизмов на основе объединения фенотипических, биохимических и молекулярно-генетических маркеров важна как для уточнения их систематического положения, так и для рационального использования ценных свойств данных микроорганизмов в биотехнологических процессах.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использованы 10 штаммов молочнокислых дрожжей из коллекции культур микроорганизмов КазНУ, выделенных из кумыса и шубата: *Kluyveromyces sphaerica* 3M, *K. sphaerica* KM95, *K. sp.* R59, *Saccharomyces sp.* 42K(P), *S. sp.* 71D, *S. sp.* 44KP, *S. sp.* 14K, *S. sp.* 5K, *S. sp.* 35U и *Candida kefyr var. kumis* 17. Образцы 3M, R59, 42K(P), 71D, 44KP выделены из шубата в Алматинской, Джамбульской и Кызылординской областях в 2001 и 2002 годах. Штаммы KM95 и *C. kefyr var. kumis* 17 выделены из кумыса в Алматинской области в 1995 и 1983 годах, соответственно.

Выделение и очистка ДНК выполнены с использованием набора «AxyPrepGenomic DNA Miniprep Kit» фирмы «Ахуген» согласно протоколу фирмы-производителя.

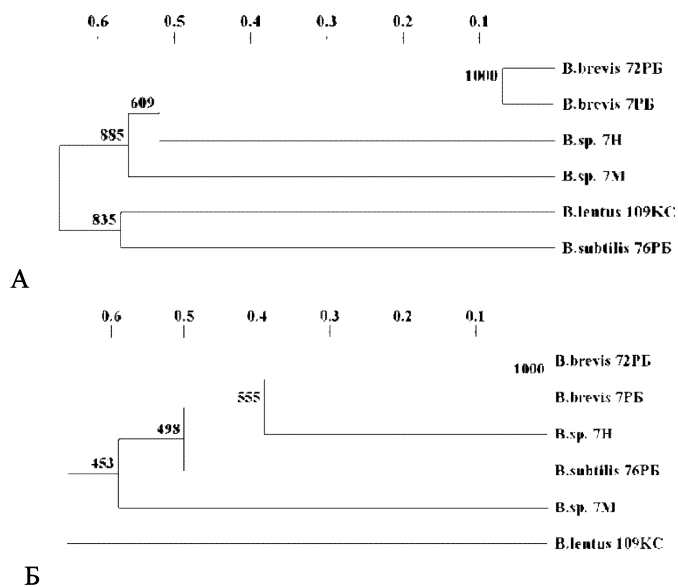
Метод RAPD основан на определении различий длин фрагментов ДНК, синтезированных в результате ПЦР с использованием произвольно отобранных олигонуклеотидных праймеров [1, 2]. Использованы 13 праймеров, нуклеотидные последовательности которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – RAPD-праймеры, использованные в работе

Номер праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
1	ACCCGGTCAC
2	GATGACCGCC
3	TGGACCGGTG
4	TGCCGAGCTG

Высокий уровень полиморфизма, полученный в результате исследования, отражен в дендрограмме родственных взаимоотношений, построенных на основе статистического анализа RAPD-данных (рис. 2, А).

Исследованные штаммы разделились на два кластера: в первый кластер вошли четыре штамма *B. brevis* 72РБ, *B. brevis* 7РБ, *B. sp.* 7М, *B. sp.* 7Н; второй кластер образовали два штамма *B. lentus* 109КС, *B. subtilis* 76РБ. Представители первого кластера оказались сгруппированы с довольно высоким значением индекса бутстрепа (88,5 %). Два штамма *B. brevis*, как и ожидалось, показали высокий уровень генетического сходства по сравнению с другими штаммами и образовали отдельный субкластер внутри первого кластера. Штаммы 7Н и 7М, которые до настоящего времени не получили видовой характеристики, не обнаружили генетической близости не с одним из трех исследованных в работе видов рода *Bacillus*.



А – общая дендрограмма для всех праймеров; Б – для праймера М13. Вверху расположена шкала генетических дистанций. В узлах дендрограммы приведены значения бутстрепа.

Рисунок 2 - Дендрограммы родственных взаимоотношений изученных штаммов рода *Bacillus*, построенные методом UPGMA на основе данных RAPD-анализа

Для приведения получаемых результатов к одному стандарту все чаще в качестве праймерной последовательности выбирается тандемные повторы фага М13, которые, как было показано ранее, встречаются в геноме различных бактерий, в частности у *Bacillus subtilis* [7-9]. Этот праймер, обозначаемый в литературе как М13 использован и данной работе под номером 13. Результаты анализа ПЦР-фингерпринтов с использованием праймера М13 продемонстрированы на рисунке рисунке 2, Б.

Методом RAPD проведено ДНК-типирование шести штаммов рода *Bacillus*, выделенных из нефтезагрязненных почв РК. Тестирование 13 вариантов RAPD-праймеров показало пригодность для анализа 11 из них. На полученной дендрограмме штаммы разделились на два кластера: в первый кластер вошли четыре штамма *B. brevis* 72РБ, *B. brevis* 7РБ, *B. sp.* 7М, *B. sp.* 7Н; второй кластер образовали два штамма *B. lentus* 109КС, *B. subtilis* 76РБ. Штаммы 7Н и 7М, которые до настоящего времени не получили видовой характеристики, не обнаружили генетической близости не с одним из трех исследованных в работе видов рода *Bacillus*.

Литература

- 1 Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski A., Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Research*, 1990. 22: 6531-6535.
- 2 Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Research*, 1990. 24: 7213-7218.
- 3 Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R., Sorlini C. A Randomly Amplified Polymorphic DNA Marker Specific for the *Bacillus cereus* Group Is Diagnostic for *Bacillus anthracis* // *Appl. and Environment. Microbiol.*, 1999. 3: 1298-1303.
- 4 <http://bioc-www.uia.ac.be/uydp/treeconw.html>.
- 5 Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979. 76: 5269-5273.
- 6 <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- 7 Huey B., Hall J. Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13 // *J. Bacteriol.*, 1989. 5: 2528-2532.

обработка и сравнительный анализ полученных паттернов, а также определение длин фрагментов проводилось с использованием программного обеспечения Quantity One - 4.4.0.

Для оценки степени полиморфизма и уровня дивергенции между изученными штаммами полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние «1» или «0». При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. Полиморфизм по интенсивности не брали в расчет. По матрице бинарных признаков были рассчитаны матрицы различий и построены дендрограммы сходства невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA) с оценкой статистической поддержки узлов методом бутстрепа с помощью компьютерной программы Treecon 3.1 [4]. Расчет генетической дистанции проводили по формуле:

$$GD_{xy} = 1 - \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y},$$

где GD_{xy} – генетическое расстояние по Nei и Li (1979) [5], N_x – число фрагментов в спектре X, N_y – число фрагментов в спектре Y, N_{xy} – число общих фрагментов.

Определение частот встречаемости локусов и расчет внутривидового и внутривидового полиморфизма был выполнен с применением программы Popgen 1.32 [6].

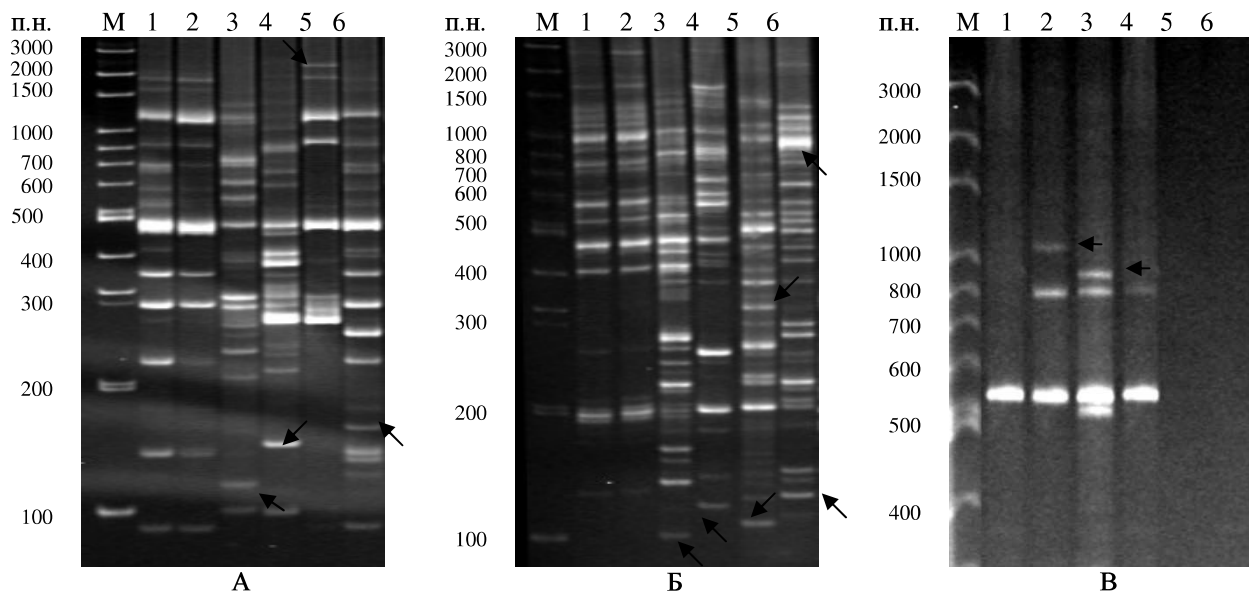
Результаты и их обсуждение

В настоящей работе мы использовали метод произвольно амплифицированной полиморфной ДНК для характеристики шести штаммов рода *Bacillus*. Было протестировано 13 случайных праймеров на способность дифференциации исследованных штаммов. Из числа протестированных праймеров праймеры №6 и 10 при амплификации не давали какие-либо фрагменты для всех изученных штаммов. Несмотря на то, что два праймера были неактивными, многие праймеры оказались пригодными для дифференциации изучаемых штаммов. Большинство праймеров давали множество уникальных фрагментов различной интенсивности, среди которых можно было найти RAPD-маркеры для идентификации определенного штамма (рис. 1).

Праймер №7 был неактивен в отношении штаммов *B. lentus* 109КС и *B. subtilis* 76РБ, в то время как праймер №8 был активен лишь со штаммами *B. brevis* 7РБ и *B. sp.* 7Н. Несмотря на это, праймеры №7 и 8 могут быть полезными при идентификации, так как для штаммов, в отношении которых эти праймеры были активными, они давали характерные паттерны.

Результаты исследования показали, что два штамма *B. brevis*, как правило, имели идентичные ПЦР-фингерпринты. Среди 13 полиморфных локусов *B. brevis* большинство фрагментов встречались в паттернах других изученных штаммов рода *Bacillus*. Однако, праймер №7, кроме того, что позволял различать два штамма, давал уникальный фрагмент размером 1100 п.н. для штамма 7РБ (рис. 1, В).

На основе сравнения RAPD-паттернов было определено 305 локусов (в среднем 27,7 локусов на праймер). Из них всего лишь 17 локусов присутствовали в спектрах всех изученных штаммов, остальные 288 локусов явились полиморфными. Уровень полиморфизма среди всех изученных штаммов составил 94,4%, между двумя родственными штаммами *B. brevis* доля полиморфных локусов составила 13,5%.



М – маркер молекулярной массы, 1 – *B. brevis* 72РБ, 2 – *B. brevis* 7РБ, 3 – *B. sp.* 7М, 4 – *B. sp.* 7Н, 5 – *B. lentus* 109КС, 6 – *B. subtilis* 76РБ. Стрелками показаны уникальные RAPD-фрагменты, которые могут служить как идентификационные маркеры

Рисунок 1 – RAPD-спектры штаммов рода *Bacillus* с праймером 1 (А), с праймером 4 (Б) и с праймером 7(В)

Было проведено исследование ДНК штаммов *Bacillus* – деструкторов нефти при помощи метода RAPD с целью уточнения генетических взаимоотношений и поиска идентификационных маркеров.

Республика Казахстан, на территории которой сосредоточены значительные запасы нефти, сталкивается с необходимостью ликвидации последствий аварий, происходящих в результате её добычи и транспортировки. Наряду с использованием технологических средств, перспективным является создание высоко устойчивых биологических систем, способных эффективно производить самоочищение прилегающих к месторождениям территорий. К одному из биологических методов относится создание заградительных зон-биофильтров, в которых присутствуют микроорганизмы, способные утилизировать вещества-загрязнители.

Коллекция микроорганизмов, созданная на кафедре микробиологии биологического факультета КазНУ им. аль-Фараби, содержит значительное количество образцов, способных к деструкции нефтепродуктов. Методы традиционной классификации микроорганизмов, основанные на морфологических и биохимических признаках, обогатились молекулярно-генетическими методами с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время существует возможность достоверной идентификации наиболее перспективных генетически гомогенных штаммов путем использования различных вариантов ПЦР. Одним из таких методов является метод определения полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК - RAPD (randomly amplified polymorphism DNA). Данный метод основан на использовании ПЦР с одиночными десятичленными праймерами с преобладающим составом GC пар нуклеотидов и низкими температурами отжига. Число и расположение сайтов связывания таких неспецифических праймеров могут различаться среди бактерий разных штаммов, и при разделении RAPD-фрагментов на электрофореze получают паттерны, которые служат «дактилоскопическими» характеристиками данных штаммов. Метод RAPD широко используется для дифференциации генетически не маркированных штаммов различных бактерий [1-3]. Преимуществами метода являются техническая простота, достаточно высокая разрешающая способность и относительно небольшое время осуществления эксперимента.

Представленная работа описывает использование метода RAPD для выявления специфических молекулярно-генетических маркеров представителей рода *Bacillus*, отобранных на кафедре микробиологии КазНУ в качестве перспективных деструкторов нефтепродуктов.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы шесть штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции культур микроорганизмов КазНУ - *Bacillus brevis* 72РБ, *B. brevis* 7РБ, *B. sp.* 7М, *B. sp.* 7Н, *B. lentus* 109КС, *B. subtilis* 76РБ.

Выделение и очистка ДНК были выполнены с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA MiniPrep Kit фирмы «Axygen», согласно протоколу изготовителя.

RAPD-ПЦР проводили с использованием 13 праймеров (таб. 1). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 нг ДНК, 10 пМ праймера, смесь dNTP по 200мкМ каждого, 2,5 мМ MgCl₂, 1,5 ед. Taq-полимеразы (Сибэнзим, Новосибирск) в рекомендованном производителем буфере. Амплификацию ДНК проводили в следующем режиме: первая денатурация 95° в течение 3 мин с последующими 40 циклами амплификации - 94° 1 мин, 37° (для праймера 13 - 55°) 30 с, 72° 40 с. Для проверки достоверности полученных RAPD-спектров опыт повторяли не менее двух раз.

Таблица 1 – Характеристика праймеров, использованных для RAPD-анализа

Номер праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Число фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Полиморфизм, %
1	ACCCGGTCAC	41	40	97,6
2	GATGACCGCC	14	14	100
3	TGGACCGGTG	47	47	100
4	TGCCGAGCTG	45	45	100
5	TGCAGCGTGG	33	31	93,9
6	TGATCCCTGG	0	0	0
7	CTGCTGGGAC	4	4	100
8	GTAGACCGT	3	3	100
9	CCTTGACGCA	10	10	100
10	TTCCCCCGCT	0	0	0
11	AGGGAACGAG	36	28	77,8
12	GGACCCTTAC	35	32	91,4
13	GAGGGTGGCGGTTCT	37	34	91,9
	Всего	305	288	94,4

Продукты RAPD-ПЦР анализировали электрофорезом в 8 % акриламидном геле. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали водой, просматривали в ультрафиолетовом свете и фиксировали в цифровом формате с помощью гель-документирующей системы фирмы BioRad. Для определения длин фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100 bp ladder DNA marker (100-3000 пн.) фирмы Axygen. Первичная

- phytoextraction systems: Approaches and Progress. – New York, 1998. – 37 p.
- 2 Brooks R.R. Plants that hyperaccumulate heavy metals // Wallingford, UK: CAB International, 1998. – 53 p.
- 3 Li Y.M., Chaney R., Brewer E., Roserberg R., Angle J.S., Baker A., Reeves R., Nelkin J. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel - economic and technical considerations // Plant and Soil. - 2003. - Vol. 249. - P. 107-115.
- 4 Grill E., Luffler S., Winnacker E-L. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthetase) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 6838-6842.
- 5 Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J. Plant metallo-thioneins // Biochem. J. Environ. Qual. – 1994. – N 23. – P. 1151-1157.
- 6 Rauser W.E. Phytochelatin and related peptides // Plant physiol. – 1995. – Vol. 109. – P. 1141-1149.
- 7 Harmens H., Den Hartog P.R., Verkleij J.A. Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatin // New Phytol. – 1993. – N103. – P.1305-1309.
- 8 Howden R., Andersen C.R., Gobbett C.S. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* // Plant Phys. – 1995. – Vol. 107. – P. 1067-1073.
- 9 Howden R., Goldbrough P.B., Andersen C.R., Gobbet C.S. Cadmium sensitive *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin-deficient // Plant Phys. – 1995. – Vol. 107. – P. 1059-1066.
- 10 Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P., Young S.D. Physiological evidence for high-affinity transporter highly expressed in *Thlaspi caerulescens* ecotype // New Phytol. – 2001. – N149. – P. 53-60.
- 11 Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 119. – P. 73-80.
- 12 Foyer C.H., Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism // Planta. - 1976. – Vol. 133. – P. 21-25.
- 13 Marrs K. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – Vol. 47. – P.127-158.
- 14 Zenk M.H. Heavy metal detoxification in higher plants: a review // Gene. – 1996. – Vol. 179. – P. 21-30.
- 15 Chen J., Zhou J., Goldbrough P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 101. – P. 165-172.
- 16 Steffens J.C. The heavy metal-binding peptides of plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1990. – Vol. 41. – P. 553-575.
- 17 Foyer C.H., Souriau N., Perret S., Lelandais M., Kunert K.J., Pruvost C., Jouanin L. Over-expression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 109. – P. 1047-1057.
- 18 Schneider S., Bergmann L. Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco // Bot Acta. – 1995. – Vol. 108. – P. 34-40.
- 19 Rauser W.E., Schupp R., Rennenberg H. Cysteine, γ -glutamylcysteine and glutathione levels in maize seedlings. Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants // Plant Physiol. – 1991. – Vol. 97. – P. 128-138.
- 20 Goldbrough P.B. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins // Phytoremediation of Trace elements (Eds N.Terry, G.S.Banuelos). – Ann. Arbor. Press., Ann. Arbor, MI, 1998 – 386 p.
- 21 Cheung W.Y. Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity // Fed. Proc. - 1984. – Vol. 43. – P. 2995-2999.
- 22 Marchiol L., Leita L., Martin M., Peressotti A., Zerbi G. Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium // J. Environ. Qual. – 1996. – Vol. 25. – P. 562-566.
- 23 Petit C.M., van de Geijn S.C. In vivo measurements of cadmium (115 mM Cd) transport and accumulation in steams of intact tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill). I. Long distance transport and local accumulation // Planta. – 1978. – Vol. 138. – P. 137-143.

Тұжырым

Өсімдіктердің гипертөзімділігінің және ауыр металдардың өсімдіктердегі гипераккумуляция механизмдері туралы соңғы кездегі әдебиетке шолу берілген

Summary

The review of modern literature data about mechanisms of plant hypertolerance and hyperaccumulation of heavy metals by plants it was presented

УДК 579.06: 577.21

Аширбеков¹ Е.Е., Абугалиева¹ Г.К., Балмуханов¹ Т.С., Айтхожина¹ Н.А.,
Цзю² В.Л., Игнатова² Л.В., Мукашева² Т.Д.

ДНК-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ РОДА *Vacillus* МЕТОДОМ RAPD

(¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,

²Казахский государственный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)