

что 4 растительных экстракта проявили высокую антиоксидантную активность: *Rhodiola quadrifida* (все растение, растворитель дихлорметан), *Epilobium hirsutum* (надземная часть, растворитель дихлорметан), *Rumex confertus* (корни, растворитель дихлорметан), *Atraphaxis replicate Lam.* (надземная часть, растворитель спирт). Наибольшей антиоксидантной активностью среди проверенных растительных экстрактов обладали экстракты *Rumex confertus* (корни, растворитель дихлорметан) и *Atraphaxis replicate Lam.* (надземная часть, растворитель спирт), IC_{50} которых составила 3,8 мкг/мл. 3 экстракта с антимикробной активностью антиоксидантной активностью не обладали.

Таким образом, проведенный скрининг позволил выявить наиболее перспективные растительные экстракты с высокой антиоксидантной и антимикробной активностями. К ним относятся дихлорметановые экстракты *Rhodiola quadrifida* (все растение), *Epilobium hirsutum* (надземная часть) и *Rumex confertus* (корни), этанольный экстракт *Atraphaxis replicate Lam.* (надземная часть). Они могут быть рекомендованы в качестве основы для создания препаратов профилактического и лечебного характера.

Литература

- 1 Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber S.L., Duke J.A., Brielmann H.L. Natural products from plants. - Boca Raton, London: New York, 2006. – 611 p.
- 2 Биологически активные вещества растительного происхождения. – Москва: Наука, 2001, 2002. - т. 1-3.
- 3 Dillard C.J., German J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2000. – P. –V. 80. – P. 1744-1756.
- 4 Флора Казахстана. - Алма-Ата, 1956, 1966. - Т. I-IX.
- 5 Иллюстрированный определитель растений Казахстана. -Алма-Ата, 1969. -Т.1. - С. 243.
- 6 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Wayne, Pa.): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Second Edition. Document M27-A2, 2002. – 22 p.
- 7 NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, approved Standard – Seventh edition. Document M7-A7. – 2006. – 26 p.
- 8 Re R., Pellegrini N., Proteggente A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26. - N9/10. – P. 1231–1237.

УДК 577.29; 579.672; 579.8.06; 579.252.2

К.Г. Ли*, А.К. Молдагулова, Э.Е. Бекенова, А.К. Кажыбаев, М.Ж. Каирова, М.С. Уразова,
С.М. Шайхин, К.Х. Алмагамбетов

Республиканская коллекция микроорганизмов, г. Астана, Казахстан

*e-mail: lee11@mail.ru

Быстрый метод обнаружения *L. casei* и *L. rhamnosus* в продуктах молочнокислого брожения

Разработан метод дифференцированного обнаружения двух видов молочнокислых бактерий - *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus rhamnosus* в продуктах питания. Метод основан на амплификации специализированных генов, кодирующих пептидогликангидролазы - p40 и p75. Результаты модельных экспериментов по прямому выделению ДНК из молочнокислых продуктов с последующей амплификацией специфических последовательностей посредством дизайнированных праймеров могут служить основой создания тест-системы для экспресс-анализа молочнокислой продукции пищевых производств.

Ключевые слова: Лактобациллы, ПЦР, праймеры, тест-система.

K.G. Lee, A.K. Moldagulova E.E.Bekenova, A.K. Kazhybaev, M.J. Kairova, M.S. Urazova,
S.M. Shaikhin, K.Kh. Almagambetov

Rapid method of *L. casei* and *L. rhamnosus* detection in lactic fermentation products

A method for differential detection of two types of lactic acid bacteria - *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in food was developed. The method is based on amplification of specific genes encoding peptidoglycan hydrolases - p40 and p75. The results of model experiments on the direct isolation of DNA from milk products, followed by amplification of specific sequences by designed primers can serve as the basis for creating a test system for rapid analysis of fermented milk products of food production.

Keywords: *Lactobacillus*, PCR, primers, test-system.

К.Г. Ли, А.К. Молдагулова, Э.Е. Бекенова, А.К. Кажыбаев, М.Ж. Каирова, М.С. Уразова,
С.М. Шайхин, К.Х. Алмағамбетов

***L. casei* және *L. rhamnosus* бактерияларын сүт қышқылды ашытудың өнімдерінен тез айқындау әдісі**

Тамақ өнімдерінен *Lactobacillus casei* және *Lactobacillus rhamnosus* екі түрлі сүт қышқылды бактерияларын айқындаудың дифференцирленген әдісі жетілдірілді. Бұл әдіс p40 и p75 пептидогликангидролазаны кодтайтын арнайы гендердің амплификациясына негізделген. Сүт қышқылды өнімдерден ДНҚ-ны тікелей алу моделді тәжірибелердің нәтижесі, яғни дизайнерленген праимерлер гендердің ерекше реттіліктің амплификациясын тудыртуы, сүт қышқылды тағам өнімдердің экспресс-анализіне арналған тест-жүйенің негізі бола алады.

Түйінк сөздер: Лактобациллалар, ПЦР, праимерлер, тест-жүйе. Лактобациллы являются биотехнологическим объектом, который применяют в качестве заквасок при производстве продуктов молочнокислого брожения, а также используются в составе лекарственных препаратов, БАД, продуктов функционального питания для человека и кормовых добавок для животных. Отбор штаммов молочнокислых бактерий для создания бактериальных заквасок в настоящее время пополнился современными молекулярно-биологическими подходами для таксономической идентификации, молекулярно-генетической паспортизации и генотипирования бактерий [1]. Метод сравнения последовательностей генов 16S рРНК часто используется для определения видовой принадлежности микрофлоры, присутствующей в молочных продуктах [2]. Однако в случае штаммов, относящихся к группе *L. casei* данные литературы свидетельствуют о невозможности установить видовую принадлежность на основе сравнения 16S РНК из-за её 100%-го сходства у представителей этой группы [3]. Для преодоления этих проблем стали все чаще привлекать в качестве альтернативы гены домашнего хозяйства с более высоким разрешением [4] и анализ профилей MALDI-TOF MS рибосомных белков [5].

В нашей работе использованы гены пептидогликангидролаз p40 и p75, обнаруживаемые только в штаммах группы *L. casei*, в качестве альтернативных генетических маркеров. Известный из литературы факт уникальности этих генов для штаммов группы *L. casei* [6,7] позволяет дискриминировать эту группу видов от других видов лактобацилл, не входящих в эту группу. Наличие 2 разных по величине и первичной структуре генов пептидогликангидролаз позволяет дискриминировать вид *L. casei* от вида *L. rhamnosus* уже внутри исследуемой группы штаммов.

Материалы и методы

Объекты исследования - Штаммы *L. rhamnosus* BSR, выделенный из коммерческого продукта молочнокислого брожения «Простокваша FOOD MASTER, Био-с иммун +» Компании ФудМастер и *L. casei* B005, выделенный из молочнокислого продукта кумыс домашнего производства.

ДНК выделяли из смеси продукта «Ряженка» (Фудмастер) с ночными культурами штаммов *L. rhamnosus* BSR (КОЕ 10⁸) и *L. casei* B005 в соотношении 10:1:1 сразу же после перемешивания с помощью комплекта реагентов для экстракции ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», следуя рекомендациям производителя [8]. Концентрацию ДНК в препаратах измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000 (ThermoScientific, USA) с использованием отношения оптических поглощений 260/280.

Дизайн праимеров проводили с применением компьютерных программ NCBI Blast 2 – определение гомологии при изучении последовательностей соответствующих праимеров и OligoCalc – определение температуры отжига праимеров и % GC состава [9].

Полимеразная цепная реакция. Для постановки ПЦР использовали реактивы фирмы “Fermentas”. Праимеры были синтезированы в Лаборатории органического синтеза НЦБ РК. Реакции проводили на амплификаторе i-Cycler iQ5 (“BioRad” США).

Изображение гелей получали на гель-документирующем устройстве GelDoc, BioRad (США).

Результаты и их обсуждение

Подбор праимеров для специфической амплификации генов пептидогликангидролаз p40 и p75.

Для специфической амплификации генов пептидогликангидролаз p40 и p75 бактерий группы *Lactobacillus casei* использованы нуклеотидные последовательности из 5'- и 3'- областей генов p40 и p75. Размеры соответствующих генов составляют приблизительно 1250 и 1500 п.н. Для дизайна праимеров были выбраны гены p40 и p75 (LGp40: 5'-ACCGGTTTTGAATTCCAC-3'/5'-TAAGGGTGGGTAACCTCGA-3' и BL23p75: 5'-GTAGATCTTCAACGGGG-3'/5'-

TAGGGTACCTTATAGTGA-3', соответственно). Свойства подобранных пар праймеров оптимизировали с помощью онлайн-программы Oligocalc [9]. Для проверки эффективности праймеров были проведены ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из полученных нами штаммов *L. casei* B005 (из продукта кумыс) и *L. rhamnosus* BSR (из продукта простокваша БиоС). Реакции проводили отдельно для каждой пары праймеров с целью сравнения расчетных параметров с реальными свойствами праймеров в эксперименте.

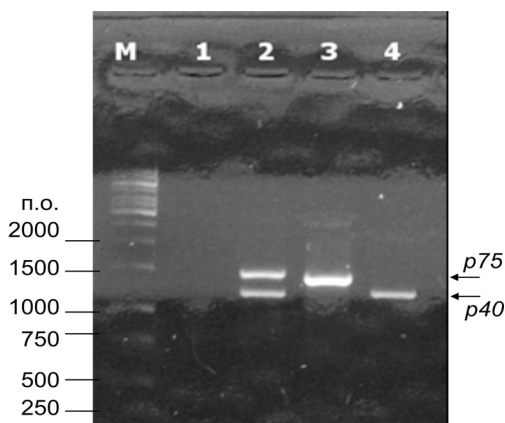
Подбор и оптимизация условий проведения дуплексной ПЦР для индикации и идентификации штаммов группы *L. casei* в продуктах молочнокислого брожения. ДНК-матрица для дуплексной ПЦР была приготовлена в виде препаратов, выделенных из смесей "Ряженки" (Фудмастер) с ночными культурами штаммов *L. casei* B005 (из продукта кумыс) и *L. rhamnosus* BSR (из продукта простокваша БиоС). Оптимизация ПЦР заключалась в конкретизации параметров постановки реакций (температура отжига праймеров, количество циклов амплификации, концентрация ионов магния, праймеров и ДНК-матрицы).

Были проведены серийные эксперименты, в каждой из которых варьировал один из параметров. Серии проводили последовательно, фиксируя в каждом случае оптимальное значение исследуемого фактора. В конечном итоге были подобраны условия, обеспечивающие максимальный выход продукта амплификации: температура отжига 54,5°C, 35 циклов, концентрации MgCl₂ и праймеров были 4 mM и 10 pmol/25µl соответственно.

В дуплексной ПЦР реакции были одновременно использованы 2 пары праймеров, представленные выше. Концентрации ДНК-матриц варьировали в пределах 10-30 нг/мкл. Результаты дуплексной реакции представлены на рисунке 1.

Полностью подтверждены расчетные параметры всех четырех использованных в реакции праймеров, касающиеся специфичности и отсутствия взаимной и внутренней комплементарности. Об этом свидетельствует отсутствие продуктов неспецифического синтеза и соответствие размеров ампликонов ожидаемым значениям 1,2 и 1,4 тыс. пар оснований.

Таким образом, на модельном продукте отработаны условия индикации и идентификации лактобацилл группы *Lactobacillus casei*, а также проведена дискриминация видов *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus casei* в модельной тест-системе дуплексной ПЦР.



М – маркеры размера молекул ДНК; 1 – отрицательный контроль (нет ДНК-матрицы); 2 – двойная матрица (ДНК *L. casei* B005 и *L. rhamnosus* BSR в соотношении 1:1); 3 – ДНК-матрица *L. casei* B005; 4 – ДНК-матрица *L. rhamnosus* BSR); Цифры слева – маркеры размера ДНК в парах оснований (п.о.)

Рисунок 1 – Электрофорез продуктов дуплексной ПЦР

Данные, полученные в результате проведенной работы, имеют практическую ценность и могут быть применены для изучения природных биотопов обитания и характера распространения бактерий группы *Lactobacillus casei* и представляет практический интерес для использования в системе контроля качества продуктов питания, обогащенных лактобациллами.

Литература

1. Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. // *LWT – Food Sci. Technol.* – 2009. - 42, 448–457.
2. Tannock G.W. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. // *Curr. Issues Molec. Biol.* – 1999. - 1(1): 53-64.
3. Coudeyras S., Marchandin H., Fajon C., and Forestier Ch. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* Group // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2008. - Vol. 74(9). - p. 2679–2689
4. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology// *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* - 2002. - Vol.52. - p.1043–1047
5. Satoa H., Torimura M., Kitahara M., Ohkuma M., Hottac Y., Tamura H. Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS. // *System. Appl. Microbiol.* - 2012. - Vol. 35. - p. 447–454
6. Claes I.J.J., Schoofs G., Regulski K., Courtin P., Chapot-Chartier M., Rolain T., Hols P., von Ossowski I., Reunanen J., de Vos W.M., Palva A., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J., Lebeer S. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – Issue 2. – e31588.
7. Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D.B., Monedero V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. // *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V.19. – P.231–241.
8. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» <http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/466/AmpliPrime-DNA-sorb-AM.MANUAL.27122012.pdf>
9. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator // *Nucl. Acids Res.* – 2007. – Vol. 35 (webserver issue): May 25.

УДК 577.218

Э.Р. Мальцева*¹, А.Ж. Исмагул², Г. Исакова², С. Лопато², С. Елибай², Н.А. Айтхожина¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

²Австралийский центр функциональной геномики растений (АЦФГР), Австралия, г. Аделаида

*e-mail: elina_m@inbox.ru

Генетическая трансформация пшеницы транскрипционным фактором DREB3

Проведена биобаллистическая трансформация незрелых зародышей мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Получено 40 трансгенных растений- регенерантов поколения T₀, несущих ген пшеничного транскрипционного фактора DREB3. Наличие целевого гена подтверждено методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Ключевые слова: абиотические стрессы, транскрипционные факторы, DREB3, пшеница, генетическая трансформация.

E. Maltseva, A.Zh. Ismagul, G. Iskakova, S. Lopato, S. Eliby, N.A. Aitkhodzina

Wheat genetic transformation with DREB3 transcription factor

Biolistic transformation was carried out for immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Saratovskaya 29. Forty transgenic plants – regenerants of T₀ generation with wheat DREB3 transcription factor gene were obtained. Presence of the target gene was proved by the method of polymerase chain reaction with specific primers.

Keywords: abiotic stress, transcription factors, DREB3, wheat, genetic transformation.

Э. Мальцева, А.Ж. Исмагул, Г. Исакова, С. Лопато, С. Елибай, Н.А. Айтхожина

DREB 3 транскрипциялық факторы арқылы бидайдың генетикалық трансформациясы

Жұмсақ бидайдың (*Triticum aestivum* L.) Саратовская-29 сортының толық дамымаған ұрықтарының биобаллистикалық трансформациясы жүргізілді. Бидайдың DREB3 транскрипциялық факторының генін тасымалдайтын T₀ ұрпағының 40 трансгенді регенерант өсімдіктері алынды. Мақсатты геннің бар екендігі спецификалық праймерлі полимеразалық тізбекті реакция әдісімен расталды.

Түйін сөздер: абиотикалық стресс, транскрипциялық факторлар, DREB3, жұмсақ бидай, генетикалық трансформация.