

УДК 577.29; 579.672; 579.8.06; 579.252.2

С.М. Шайхин¹, К.Г. Ли¹, А.К. Молдагулова¹, Э.Е. Бекенова¹, А.К. Кажыбаев¹, М.Ж. Каирова²,
М.С. Уразова¹, К.Х. Алмагамбетов¹

¹РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан

²РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан

*e-mail: s.shaikhin@rcm.kz

Применение молекулярных методов для идентификации молочнокислых бактерий

ДНК-полиморфизмы изолятов молочнокислых бактерий (МКБ) анализировали методом RAPD – ПЦР. В качестве одиночных праймеров использовали произвольный праймер, полученный из межгенных спейсерных регионов (ТЗВ) и микросателлитный праймер (GTG)₅. Закономерности формирования характерных полос в агарозном геле после электрофореза (фингерпринты) дают основания для их использования в идентификации МКБ. Сравнение видоспецифических RAPD-ПЦР фингерпринтов, принадлежащих изолятам МКБ из продуктов питания, с фингерпринтами эталонных штаммов позволит идентифицировать микроорганизмы на уровне видов, даже если они не выявлены стандартными биохимическими методами. Анализ RAPD-ПЦР полезен для молекулярного типирования МКБ в лабораториях с относительно ограниченной технической оснащённостью.

Ключевые слова: RAPD-ПЦР анализ, праймеры, молочнокислые бактерии, фингерпринты.

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

Сүтқышқылды бактерияларды молекулярлы әдісті қолдана отырып идентификациялау

Оқшауланған СҚБ ДНК-полиморфизмін RAPD-ПЦР әдісі бойынша зерттеген. Жеке праймер ретінде генаралық спейсерлі аймақтардан (ТЗВ) және микросателлитті праймер (GTG)₅ еркін праймерлер қолданған. Электрофорез өткізгеннен кейін (фингерпринттер) агарозды гелде жолақтардың пайда болу заңдылығына байланысты оларды СҚБ идентификациялауда қолданады. Тамақ өнімдеріндегі СҚБ алынған RAPD-ПЦР фингерпринттердің түр ерекшеліктерін эталонды штаммдардың фингерпринттерімен салыстыру – түр деңгейінде микроорганизмдерді идентификациялауға мүмкіндік береді. RAPD-ПЦР анализ СҚБ молекулярлы түрін анықтауға, зертханалық база салыстырмалы түрде шектеулі болғанда өте қолайлы.

Түйін сөздер: RAPD-ПЦР анализ, праймерлер, сүтқышқылды бактериялар, фингерпринттер.

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

Application of molecular methods to identify lactic acid bacteria

DNA polymorphisms of isolates of lactic acid bacteria (LAB) were analyzed by RAPD - PCR. Primer derived from the intergenic spacer region (TЗВ) and microsatellite primer (GTG)₅ were used as a single arbitrary primer. Laws of formation of characteristic bands in agarose gel after electrophoresis (fingerprints) give reasons for their use in the identification of the LAB. Comparison of species specific RAPD-PCR fingerprints belonging to the LAB isolates from food, with fingerprints of reference strains will allow for identification of the microorganisms at species level, even if they are not revealed by standard biochemical methods. RAPD-PCR analysis is good for molecular typing of LAB in the laboratories with relatively limited technical equipment.

Keywords: RAPD-PCR analysis, primers, lactic acid bacteria, fingerprints.

Достижения последних лет в молекулярной биологии дали возможность изучения генетического разнообразия бактериальных штаммов [1].

При отборе штаммов для создания бактериальных заквасок еще недавно использовали только стандартные оценки стартерных культур на основе изучения морфологии и физиолого-биохимических

свойств. Традиционные технологии не всегда позволяли отбирать штаммы МКБ для производства кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов. Многими исследователями отмечалось, что у биотехнологов возникают трудности при идентификации различных родов и видов факультативных анаэробов. В этой связи особую актуальность приобретают задачи

использования современных фундаментальных научных достижений изучения бактериального генетического разнообразия в прикладных областях науки [1]. Целью работы было проведение RAPD-ПЦР анализа и изучение закономерности формирования фингерпринтов. На основании полученных результатов было сделано заключение о перспективности RAPD-ПЦР анализа для быстрой идентификации состава микробов в мясных продуктах.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали 4 изолята, выделенных из местных мясных продуктов и идентифицированных по морфолого-биохимическим и генетическим признакам с помощью общепринятых методик [2]. Выделение геномной ДНК описано ранее [2]. Секвенирование фрагментов генов 16S рРНК проводили на автоматическом анализаторе ДНК ABI PRISM 3730xl фирмы “Applied Biosystems”, с набором реактивов “ABI Prism

BygDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” фирмы “Applied Biosystems” согласно рекомендациям производителя. Изображение гелей получали на геледокументирующем устройстве GelDoc, BioRad (США).

Получение RAPD-профилей с использованием неспецифических праймеров.

Нуклеотидные последовательности праймеров были взяты из опубликованной работы [3], и синтезированы в Лаборатории органического синтеза НЦБ РК. Начальные условия проведения реакций (объем реакционной смеси, концентрации матрицы, праймеров, MgCl₂, температура отжига, количество и продолжительность циклов амплификации) подбирали индивидуально, в зависимости от конкретного объекта исследования. Последовательности праймеров и их характеристики приведены в Таблице 1.

Таблица 1 - Температурные условия анализа RAPD-ПЦР

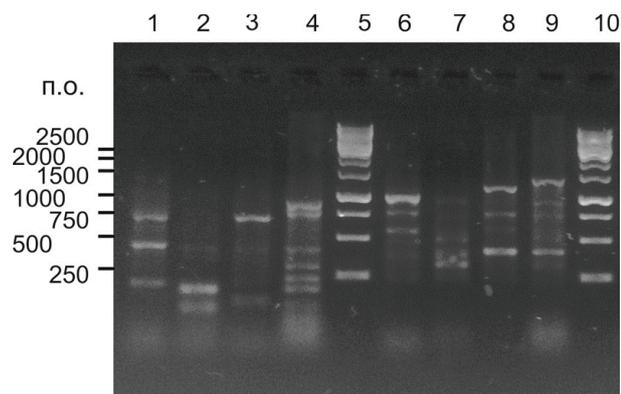
Праймеры	Последовательность (5'-3')	Температура отжига праймера	
		по литературной ссылке [3]	настоящая работа
ТЗВ	AGGTCGCGGGTTTCGAATCC	52°C	62°C
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	50°C	59°C

Результаты и их обсуждение

В нашей лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов выделены различные виды молочнокислых бактерий из мяса, колбас и домашней сметаны [2]. Анализ культурально-морфологических свойств бактерий и нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК позволил нам идентифицировать изоляты *Weissella spp.* 5А, *Pediococcus spp* 8а, *Lactococcus Lactis* 17А, *Lactococcus garvieae* 10А в двух типах конины и трех типах колбас. Целью данной работы было проведение RAPD-ПЦР анализа этих изолятов и выяснение применимости такого подхода для родо- и видоспецифической идентификации МКБ. На рис.1 представлен результат одного из 3 проведенных RAPD-ПЦР анализов. Надо подчеркнуть, что получение воспроизводимых результатов мы объясняем модификацией условий RAPD-ПЦР анализа, которая заключалась в повышении температуры отжига праймеров на 10 °С и 9 °С, как показано в

таблице 1. Повышение температуры отжига праймеров на ДНК матрице по сравнению с расчетными температурами представляет особый интерес. В литературе такой анализ обозначают аббревиатурой «НАТ-RAPD» (High Annealing Temperature – RAPD) и в ряде работ было показано, что в жестких условиях высоких температур отжига праймера, метод приводит к полиморфизму с более высокой воспроизводимостью и высоким разрешением [4-7]. Воспроизводимость результатов RAPD-ПЦР в настоящей работе, хорошо согласуется с выводами цитируемых работ [4-7].

Данные анализа RAPD-ПЦР на рисунке 1 свидетельствуют о том, что каждый праймер дает свою специфическую картину (паттерн) для отдельно взятого изолята (сравните дорожки 1-6, 2-7, 3-8 и 4-9), что наглядно отражает полиморфизм расположения и гомологию геномных участков, комплементарных праймеру.



1, 2, 3, и 4 – ампликоны праймера ТЗВ изолятов *Weissella spp-5A*, *Pediococcus spp 8a*, *Lactococcus lactis-17A* и *Lactococcus garvieae-10A* соответственно. 6, 7, 8, и 9 – ампликоны праймера (GTG)₅ изолятов *Weissella spp-5A*, *Pediococcus spp 8a*, *Lactococcus lactis-17A* и *Lactococcus garvieae-10A* соответственно. 5 и 10 – маркеры размера ДНК

Рисунок 1 – Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов RAPD-ПЦР анализа геномной ДНК изолятов молочнокислых бактерий, выделенных из мясных продуктов

Фингерпринты *Lactococcus lactis-17A* и *Lactococcus garvieae-10A*, полученные с использованием обоих праймеров показывают, наряду с отличиями (дорожки 3-4), наличие общих ампликонов (дорожки 8-9), которые вполне могут быть родо- и видоспецифичными. В то же время каждый профиль вполне специфичен и четко отличим от других. В

литературных источниках было высказано предположение, что результаты RAPD-ПЦР анализа могли бы быть точными показателями генетических расстояний, поскольку в нем случайно выбираются полиморфизмы в последовательностях, распределенных по геному [8].

Таким образом, на примере МКБ показана перспективность RAPD-ПЦР анализа для быстрой идентификации состава микробов в мясных продуктах. Закономерности формирования характерных фингерпринтов обосновывают их использование для идентификации МКБ и, в перспективе, при условии накопления достаточной базы данных, применение одиночных праймеров позволит дискриминировать межвидовые и внутривидовые различия в ДНК-профилях МКБ. Сравнение видоспецифических RAPD-ПЦР фингерпринтов, принадлежащих изолятам МКБ из продуктов питания, с фингерпринтами эталонных штаммов позволит идентифицировать микроорганизмы на уровне видов, даже если они не выявлены стандартными биохимическими методами. RAPD-ПЦР анализ будет полезен для молекулярного типирования МКБ в условиях, когда лабораторная база относительно ограничена.

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. - Vol.42. - P. 448– 457.
- 2 Kairova M., Moldagulova A. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria from horsemeat and homemade sour cream // J. World academy of Science, Engineering and Technology. Dubai. - 2013. – Vol.73. - P. 1220-1225.
- 3 Thanos M., G. Schonian, W. Meyer C., Schweinoch, Y. Graser, T. G. Mitchell, W. Presber, H.-J. Tietz. Rapid identification of Candida species by DNA fingerprinting with PCR // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34. – №3. – P. 615–621.
- 4 Wongsawad C., Wongsawad P., Chai J.Y., Anuntalabhochai S. Haplorchis taichui, Witenberg, 1930: Development of a HAT-RAPD marker for the detection of minute intestinal fluke infection // Experimental Parasitology. – 2009. - Vol. 123(2). – P. 158-161.
- 5 Wongsawad P. and Wongsawad C. DNA Fingerprints Of Some Heterophyid Trematodes From Adult and Metacercarial Stages In Thailand // Southeast Asian J Trop Med Public Health. - 2007. – Vol. 38. – P. 110–114.
- 6 Guang-Hui Du, Zhi-Qiang Zhang, Qing-Jun Li. Morphological And Molecular Evidence for Natural Hybridization In Sympatric Population Of Roscoea Humeana and R. Cautleoides (Zingiberaceae) // J Plant Res. – 2012. – Vol.125. – P. 595-603.
- 7 Wongsawad C. Detection of S. Falcatus Using Hat-RAPD PCR // Southeast Asian J Trop Med Public Health. – 2011. – Vol. 42. – P. 46-52.
- 8 Welsh J., Pretzman C., Postic D., Saint Girons I., Baranton G., McClelland M. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves Borrelia burgdorferi into three distinct phyletic groups // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1992. – Vol. 42. – P. 370–377.