

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БАКТЕРИЙ

Г. В. МАРТИРОСЯН

Кандидат биологических наук, лектор ГГУ

М. Е. К. ФЛОРЕС

*Доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной
биологии и биотехнологии Института биомедицинских
исследований национального автономного университета Мексики*

С развитием генетики и молекулярной биологии, наряду с классическими методами, для более точной идентификации микроорганизмов все большее распространение получают молекулярно-генетические методы. В предыдущих работах [1, 2] были показаны 5 штаммов бактерий, обладающих экзоинулиназной активностью, которые были определены с помощью исследований диагностически важных морфо-культуральных, физиологических и биохимических признаков по Берги [3]. В результате исследования выяснилось, что они принадлежали к следующим видам: штамм М 11 имел наибольшее сходство с *Bacillus subtilis*, М 14 - с *Bacillus megaterium*, Т 9-1 — с *Bacillus stearothermophilus*, Т 115-6 — с *Bacillus circulans*, а Г 50 был идентифицирован до семейства Halobacteriaceae.

Для определения точности идентификации по классическим методам, совместно с сотрудниками Института биомедицинских исследований Национального автономного университета Мексики был проведен анализ нуклеотидных последовательностей 16S рДНК пяти отобранных штаммов и проведена идентификация данных штаммов путем исследования последовательностей 16S рДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК из выращенных культур проводили согласно Гловеру [4].

1. Амплификацию генов 16S рДНК с помощью ПЦР проводили, используя нижеприведенный протокол:

Реакционная смесь (platinum Pfx DNA polymerase, Invitrogen, США):

10 x Pfx буфер — 5 мкл;

10 mM смесь dNTP — 1,5 мкл;

50 mM MgSO₄ - 1 мкл;

праймер 1 (P27F) — 0,3 мкМ;

праймер 2 (RIB RE) - 0,3 мкМ;

ДНК — 200-500 нг; ДНК-полимераза Platinum Pfx - 10 μл (2,5 ед.);

10 x PCRx Enhancer Solution - 5 мкл;

H₂O — до 50 мкл.

Режим амплификации:

- 95 °C — 5 мин.
- 95 °C — 1,5 мин.
- 57 °C — 1,5 мин.
- 68 °C — 2 мин. 15 с.
- 68 °C — 10 мин.

Этапы 2 — 4 повторяются 25 раз.

Праймеры, использованные для амплификации генов 16S рРНК:

P27F (от 5' к 3'): agagtttgatcctggctcag,

RIB RE (от 5' к 3'): gggtacctgttacgactt [5].

2. Выделение амплифицированной ДНК (соответствующей генам 16S рДНК)

После ПЦР продукты реакции разделяются электрофорезом в агарозе (0,8 %) в 1 х ТАЕ в присутствии этидиумбромиде [6]. После визуализации УФ-лучами полосу геля, соответствующую ампликону, размером чуть меньше 1,5 kb ($\approx$ 1,4 kb), вырезали скальпелем и выделяли соответствующую 16S рДНК с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Швейцария).

3. Секвенирование выделенных 16S рДНК.

Секвенирование проводили с помощью BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit версии 2,0 и 3,1 фирмы Applied Biosystems (США), согласно протоколу фирмы:

ДНК — 500-800 нг, праймер — 4,0 нмоль, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix — 8 мкл в объеме 20 мкл; режим проведения процесса:

1. 96 °C — 7 мин.
2. 96 °C — 0,5 мин.
3. 57 °C — 0,25 мин.
4. 60 °C — 4 мин.

Этапы 2-4 повторяются 25 раз.

После осаждения продуктов секвенной реакции спиртом и высушивания последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

В реакциях секвенирования, кроме праймеров P27F и RIB RE, использовали также:

P346F (от 5' к 3'): acggcccagactcctacg

P692F (от 5' к 3'): aattcctggtgtagcggt [7].

По результатам секвенирования с праймерами P27F, RIB RE, P346F и P692F компонуется последовательность каждой 16S рДНК.

2.6.5. Анализ последовательностей 16S рДНК штаммов.

Последовательность 16S рДНК штаммов сравнивалась с известными последовательностями 16S рДНК из баз данных GenBank, EMBC и т.д. с помощью программы BLASTN 2.2.9 [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очищенные 16S рДНК исследованных штаммов показаны на рисунке 5.

После секвенирования полученных 16S рДНК по методике 1, получили последовательности нуклеотидов, при сравнении которых с известными последовательностями из баз данных GenBank, EMBL, DDBJ, PDB по программе BLASTN 2.2.9 [8], получили список последовательностей, наиболее схожих с полученными нами в результате опытов для каждого штамма. Ниже приведены данные наибольших совпадений для каждого штамма.

Штамм М 11

gi|47834648|gb|AY553094.1| *Bacillus subtilis* strain MO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1495

Score = 2868 bits (1447), Expect = 0.0

Identities = 1452/1454 (99%)

Strand = Plus / Plus

Штамм М 14

gi|47834672|gb|AY553118.1| *Bacillus megaterium* strain MO31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1504

Score = 2775 bits (1400), Expect = 0.0

Identities = 1400/1400 (100%)

Strand = Plus / Plus

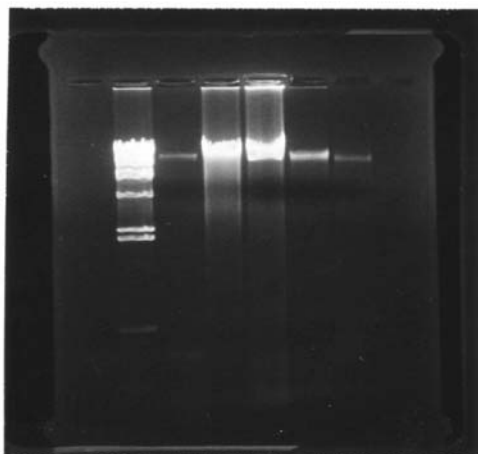


Рис. 1. Хромосомные ДНК (слева-направо): (Маркер Λ / *Hind* III), шт. Г 50, шт. Т 115-6, шт. Т 9-1, шт. М 14, шт. М 11

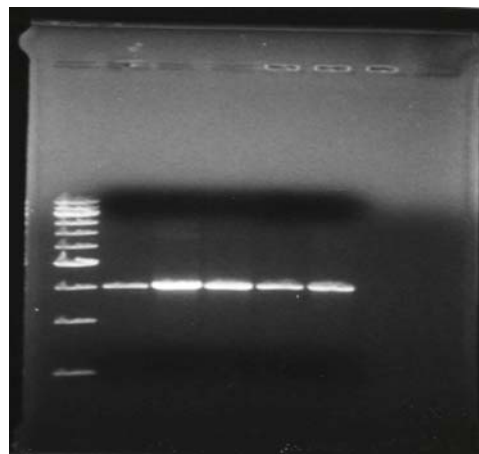


Рис. 2. Амплифицированные с помощью ПЦР и очищенные 16S рДНК (слева-направо): (Маркер 500bp DNA ladder – Roche XVII), шт. Г 50, шт. Т 115-6, шт. Т 9-1, шт. М 14, шт. М 11

Штамм Т 9-1

gi|49482196|gb|AY608951.1| *Geobacillus caldoxylosilyticus* strain BGSC W9A36 16S ribosomal RNA gene, complete sequence

Length = 1560

Score = 2801 bits (1413), Expect = 0.0

Identities = 1416/1417 (99%)

Strand = Plus / Plus

Штамм Т 115-6

gi|49482233|gb|AY608988.1| *Geobacillus thermoglucosidasius* strain BGSC W9A30 16S ribosomal RNA gene, complete sequence

Length = 1562

Score = 2803 bits (1414), Expect = 0.0

Identities = 1414/1414 (100%)

Strand = Plus / Plus

Штамм Г 50

gi|1699010|gb|U78719.1|CMU78719 *Chromohalobacter marismortui* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1458

Score = 2759 bits (1392), Expect = 0.0

Identities = 1395/1396 (99%)

Strand = Plus / Plus

Таким образом, сравнением последовательностей 16S рДНК с известными источниками, выделенные мезофильные культуры, условно обозначенные нами как М 11 и М 14, были идентифицированы как *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* соответственно, термофильные культуры Т 9-1 и Т 115-6 - как *Geobacillus caldoxylosilyticus* и *Geobacillus thermoglucosidasius*, а галофильная культура Г 50 — как *Chromohalobacter marismortui*.

Следовательно, результаты идентификации шт. М 11, М 14, полученные традиционными классическими методами, подтвердились результатами генетического анализа — это *B. subtilis* и *B. megaterium*. Штамм Г 50, предварительно определенный как вид, относящийся к семейству Halobacteriaceae, действительно оказался, по результатам генетического анализа галобактерией *Chromohalobacter marismortui*. Штаммы термофилов по результатам генетического анализа идентифицированы как *Geobacillus caldoxylosilyticus* и *Geobacillus thermoglucosidasius*, которые недавно выделены как самостоятельные виды.

B. subtilis М 11 и *B. megaterium* М 14 - мезофильные бациллы, которые имеют температурные пределы роста 15 - 50 °С, устойчивы к 7 % NaCl, из исследованных штаммов имеют наибольшую инулиназную активность.

Термофильные штаммы *Geob. caldoxylosilyticus* Т 9-1 и *Geob. thermoglucosidasius* Т 115-6, хотя и обладают более низкой инулиназой

активностью, но их температурные пределы 48-50 — 85-90 °C, с оптимумом 56 — 60 °C, что дает несомненные преимущества при их дальнейшей эксплуатации.

Штамм *Chromohalobacter marismortui* Г 50 является умеренным галофилом и растет при 5 - 25 % NaCl, при сравнительно высоких температурах (до 56 °C). Инулиназная активность у него проявляется также при отсутствии NaCl в реакционной среде, несмотря на то, что без добавления соли в питательную среду этот штамм не растет.

Штаммы М 11, М 14, Т 9-1, Т 115-6 и Г 50 депонированы в Коллекции Культур UNAM-48/WFCC под следующими номерами:

М 11 — BM-B-401, М 14 — BM-B-402, Т 115-6 — B-MB-403, Т 9-1 — B-MB-404, Г 50 — B-MB-405.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Martirosyan G. V., Balayan A. M., Manoukyan L. S., Abelyan V. A.** New cultures-producers of inulinases: Lactosucrose reception reception // Archive of Clinical and Experimental Medicine, Donetsk, UA, 2003, Vol. 12, N 1, p. 41.
2. **Martirosyan G. V.** Isolation and characterization of strains of genus *Bacillus* with inulinase activity // Biological Journal of Armenia; 2003, Vol. 12, N 55, p. 310-315.
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Sneath P.H.A., Editor; Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., associate editors. - 2. Edition. - Baltimore-Hong-Kong-London-Sydney: The Williams and Wilkins Co. 1986, Vol. 2, p. 1104-1139.
4. **Glover D. M.** Gene cloning in *Streptomyces* // DNA Cloning 2: A Practical Approach - Expression Systems Second Edition. 1995, Vol. 2, p. 19-44.
5. **Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., and Lane D. J.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991, Vol. 173, p. 697-703.
6. **Маниатис Т, Сэмбрук Дж., Фритч Е.** Молекулярное клонирование. Москва, Мир, 1984.
7. **Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., and Lane D. J.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991, Vol. 173, p. 697-703.
8. **Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997, Vol. 25, p. 3389-3402.

ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ՊԱՏԿԱՆԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՄԱՆ ՀԱՄԱՐ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՄԱՆ ՀԵՌԱՆԿԱՐՆԵՐԸ

**Գ. Վ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ
Ս. Ե. Վ. ՖԼՈՐԵՆՍ**

Գենետիկայի և մոլեկուլային կենսաբանության զարգացման, ինչպես նաև դասական մեթոդների հետ մեկտեղ, միկրոօրգանիզմների առավել ճշգրիտ նույնականացման համար մեծ տարածում են ստանում մոլեկուլագենետիկական մեթոդները: Նախորդ աշխատանքներում [1, 2] ներկայացվել են բակտերիաների 5 շտամեր, որոնք օժտված են էկզոհիմազային ակտիվությամբ և որոշվել էին Բերգիի [3] մորֆո-կոլտուրալ, ֆիզիոլոգիական և բիոքիմիական

ցուցանիշների օգնությամբ: Արդյունքում այդ շտամների պատկանելիությունը հետևյալն էր՝ M 11-ը ուներ նմանություն *Bacillus subtilis*-ի հետ, M 14-ը *Bacillus megaterium*-ի հետ, T 9-1 – *Bacillus stearothermophilus*-ի հետ, T 115-6 – *Bacillus circulans* – ի հետ, իսկ T 50-ը նույնականացվել էր որպես *Halobacteriaceae* ընտանիքի ներկայացուցիչ: Դասական մեթոդներով նույնականացման ճշգրտությունը որոշելու նպատակով, Մեքսիկայի Ազգային ինքնավար համալսարանի Բիոբժշկական հետազոտությունների ինստիտուտի աշխատակիցների հետ համատեղ կատարվել է հինգ ընտրված շտամների 16S P ՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծություն և անց է կացվել նշված շտամների նույնականացումը:

M 11 և M 14 շտամների նույնականացման արդյունքները, որոնք ստացվել էին դասական մեթոդներով, հաստատվեցին գենետիկական վերլուծության արդյունքներով, համապատասխանաբար որպես *Bacillus subtilis* և *Bacillus megaterium*: T 50, որը նախապես նույնականացվել էր որպես *Halobacteriaceae* ընտանիքի ներկայացուցիչ, գենետիկական վերլուծության արդյունքում նույնականացվեց որպես *Chromohalobacter marismortui*: Թերմոֆիլների շտամները, որոնք դասական եղանակներով նույնականացվել էին որպես *Bacillus stearothermophilus* և *Bacillus circulans*, գենետիկական վերլուծության արդյունքներում նույնականացվեցին որպես *Geob. caldxylosilyticus* և *Geob. thermoglucosidasius* համապատասխանաբար:

PERSPECTIVES OF USING GENETIC METHODS IN IDENTIFICATION OF BACTERIAL SPECIES

**G. V. MARTIROSYAN
M. E. K. FLORES**

For the development of genetics and molecular biology as well as for more accurate identification of microorganisms, molecular and genetic methods are widely used together with classical methods. In this work we have shown comparative differences in identifications of the following five strains: M11, M14, T 9-1, T 115-6, × 50 [1, 2]. By Berge [3] they have belonged to the following five species: M 11 was more similar to *Bacillus subtilis*, M 14 to *Bacillus megaterium*, T 9-1 to *Bacillus stearothermophilus*, T 115-6 to *Bacillus circulans*, and × 50 identified as species of *Halobacteriaceae* family.

With our colleagues from Institute of Biomedical Investigations at National Autonomous University of Mexico we have analyzed the sequences of nucleotides of 16S rDNA of those strains for precise identification. For strains M11 and M 14 results have been the same as in result of using classical methods. Strain G 50, preciously described as species belonged to *Halobacteriaceae* family, in result of genetic analysis turned out as *Chromohalobacter marismortui* bacteria. Strains of thermofils in result of genetic analysis have identified as *Geob. caldxylosilyticus* *Geob. thermoglucosidasius*.