

## Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолабильной щелочной фосфатазы

Категория: [Исследования геномной ДНК](#)

Просмотров: 6463

Ю.П. Зернов, М.А. Абдурашитов, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2005, №6, с 3-11

*Предложен метод идентификации микроорганизмов, основанный на анализе полиморфизма длин фрагментов рестрикции (ПДФР) ПЦР-продукта гена 16S РНК длиной 1500 нуклеотидов. Подобран набор из 6 эндонуклеаз рестрикции (Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI и RsaI), позволяющий с помощью ПДФР проводить идентификацию широкого спектра микроорганизмов.*

*Из природных изолятов морской воды выделены четыре штамма-продуцента термолабильной щелочной фосфатазы. Проведенный анализ ПДФР для данных штаммов в сравнении с расчетными результатами, полученными для генов 16S РНК различных микроорганизмов, позволил установить, что выявленные продуценты относятся к роду *Alteromonas*.*

Наряду с традиционными методами идентификации микроорганизмов с использованием культуральных и морфологических характеристик, а так же химических и биохимических реакций [1], в последнее время все более широкое применение находят методы определения микроорганизмов, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей различных генов микроорганизмов [2-4] и анализе полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК, полученных в результате амплификации отдельных генов бактерий [5,6]. Наиболее подходящими для идентификации являются гены, кодирующие 16S и 23S рибосомальные РНК, поскольку они присутствуют во всех бактериальных клетках и являются родоспецифичными для большинства микроорганизмов [7-9]. Использование для идентификации фрагмента ДНК, содержащего как гены 16S и 23S РНК, так и спейсер, находящийся между ними и являющийся более переменчивым, позволяет различать близко родственные виды и подвиды микроорганизмов [10].

В данной работе представлены результаты анализа ПДФР ПЦР-продукта длиной 1500 нуклеотидов для различных микроорганизмов и показано, что использование 6 эндонуклеаз рестрикции Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI и RsaI позволяет достоверно идентифицировать

большинство микроорганизмов. В работе выявлено 4 новых продуцента термолabileйной щелочной фосфатазы и с помощью предложенного метода проведен сравнительный анализ ПДФР для идентификация этих микроорганизмов. На основании сравнения сделан вывод, что найденные продуценты относятся к роду *Alteromonas*.

## **УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Для выявления продуцентов термолabileйной щелочной фосфатазы 50 мкл морской воды растирали по поверхности питательного агара и анализировали как описано в работе [11]. Получение биомассы микроорганизмов проводили выращиванием продуцентов при 20° С в бульоне, содержащем 1% триптона (AGS GmbH, Германия), 0,5% дрожжевого экстракта (той же фирмы) и соли морской воды (NaCl - 27,5, MgCl<sub>2</sub> - 5, MgSO<sub>4</sub> - 2, CaCl<sub>2</sub> - 0,5, KCl - 1, FeSO<sub>4</sub> - 0,001г/л [12]), pH 7,2 - 7,7. Засеянный бульон распределяли по 200 мл в качалочные колбы объёмом по 700 мл и встряхивали при 150 об/мин в течение 16ч.

Выделение хромосомальной ДНК проводили по методу [13].

Аmplификацию гена 16S рибосомальной РНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции как описано в работе [14].

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 4 ч. при 37° С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2ед. акт. рестриктазы Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI или RsaI производства НПО "СибЭнзим", в соответствующем буфере. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл стоп раствора, содержащего 0,1 М ЭДТА, 0,05% бромфенолового синего и 40% сахарозы.

Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции амплифицированной ДНК проводили в 2% агарозе (Sigma) в трис-ацетатном буфере с этидий бромидом (0,5мг/л) при 120 V в течение 4 ч.

Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярного веса ДНК (100bp +1.5 Kb ДНК маркеры, НПО "СибЭнзим"). Определение длин полученных рестриктос осуществляли с помощью компьютерной программы Gel Pro Analyzer, версия 4.0.00.001. Процент идентичности длин фрагментов рассчитывали для каждой пары микроорганизмов, сравнивая картины рестрикции отдельно по каждой рестриктазе. При сравнении длин рестриктос идентичными считали фрагменты ДНК, длина которых различалась не более чем на 5%.

Для сравнения экспериментальных данных с опубликованными последовательностями генов 16S РНК использовали генетический банк данных секвенированных последовательностей.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Из природных изолятов морской воды нами были выделены четыре штамма-продуцента термолabileйной фосфатазы, обозначенные как 20, 27, 48 и штамм, охарактеризованный ранее [11] с использованием традиционных методов как *Alteromonas undina*. Для идентификации полученных штаммов из биомассы микроорганизмов, выращенных в жидкой питательной среде с

добавлением морских солей, выделили хромосомальную ДНК.

Далее хромосомальную ДНК использовали в полимеразной цепной реакции для амплификации гена 16S рибосомальной РНК. Продукт амплификации независимо обрабатывали 6-ю различными эндонуклеазами рестрикции. Все использованные нами рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 8 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 1500 пар нуклеотидов. Использованные рестриктазы Sse9I и Tru9I имеют соответственно сайты узнавания AATT и TTAA, тогда как рестриктазы BsuRI и MspI режут по сайтам GGCC и CCGG. Сайты узнавания рестриктаз BstMBI и RsaI, соответственно GATC и GTAC, содержат в своем составе все четыре нуклеотида. Такой подбор эндонуклеаз рестрикции должен, на наш взгляд, обеспечить универсальность при идентификации микроорганизмов, имеющих как AT- богатые, так и GC- богатые геномы. В количественном отношении использование именно 6 различных рестриктаз мы считаем оптимальным, поскольку использование 1 или 3 рестриктаз, как предлагалось в ряде работ [10,15], может не выявлять полиморфизма при идентификации близко родственных микроорганизмов или, наоборот, приводить к слишком большим различиям из-за одной или нескольких случайных мутаций. Вместе с тем, использование 10 различных эндонуклеаз рестрикции не приводит к дополнительному выявлению полиморфизма длины фрагментов рестрикции ДНК и является явно избыточным [9].

На рис.1 представлены симулированные с помощью компьютера картины рестрикции генов 16S РНК, предложенным нами набором из шести рестриктаз (Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI и RsaI). Гены 16S РНК взяты в генетическом банке секвенированных последовательностей. Выбор микроорганизмов был достаточно случайным. Все бактерии относятся к различным родам и представляют как грамотрицательные, так и грамположительные микроорганизмы. Видно, что для всех микроорганизмов наблюдается своя уникальная картина набора рестриктов. Количество фрагментов ДНК колеблется от 23 до 30 (в учет не берутся фрагменты длина которых меньше 100 пар нуклеотидов). Результаты расчета процента идентичности длин фрагментов ДНК (идентичными считали рестрикты длина которых отличалась не более, чем на 5%) для различных пар микроорганизмов представлены в Таблице 1. В данной таблице представлена только часть возможных пар микроорганизмов, приведенных на рис. 1. Но представленные результаты сравнения являются достаточно характерными и позволяют видеть, что процент идентичности длин фрагментов ДНК обычно колеблется в пределах 12-28% для представителей различных родов микроорганизмов. Таким образом, приведенные данные показывают, что картины рестрикции генов 16S РНК предлагаемым нами набором рестриктаз могут служить основой для идентификации родовой принадлежности бактериальных клеток.

**Рис. 1.** Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S РНК, после обработки рестриктазами Sse9I (1), Tru9I (2), BsuRI (3), MspI (4), BstMBI (5) и RsaI (6). Дорожки М - маркер молекулярного веса

|                                | <b>Streptomyces albus</b>    | <b>Micrococcus luteus</b> | <b>Bacillus subtilis</b>      | <b>Staphylococcus aureus</b>   |
|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b>Escherichia coli</b>        | 22                           | 20                        | 27                            | 24                             |
| <b>Streptomyces albus</b>      | —                            | 37                        | 28                            | 20                             |
| <b>Hemophilus influenzae</b>   | 20                           | 20                        | 24                            | 16                             |
| <b>Neisseria denitrificans</b> | 22                           | 26                        | 22                            | 22                             |
|                                | <b>Hemophilus influenzae</b> | <b>Escherichia coli</b>   | <b>Pseudomonas aeruginosa</b> | <b>Neisseria denitrificans</b> |
| <b>Escherichia coli</b>        | 25                           | —                         | 27                            | 20                             |
| <b>Streptomyces albus</b>      | 12                           | 22                        | 16                            | 12                             |
| <b>Hemophilus influenzae</b>   | —                            | 24                        | 24                            | 20                             |
| <b>Neisseria denitrificans</b> | 18                           | 22                        | 26                            | —                              |

**Таблица 1.** Процент идентичности длин фрагментов ДНК генов 16S РНК представителей различных родов микроорганизмов

На рис. 2 представлены результаты гидролиза амплифицированных генов 16S РНК выявленных нами продуцентов термолабильных фосфатаз. Простое визуальное сравнение картин рестрикции показывает, что 20 и 48 продуценты дают идентичные по длине наборы фрагментов ДНК при обработке всеми 6-ю эндонуклеазами рестрикции. Это свидетельствует о том, что 20 и 48 продуценты являются либо идентичными, либо близкородственными. Следует отметить, что наличие на электрофореграммах слабых минорных полос может быть обусловлено как частичным недогидролизом исходной амплифицированной ДНК, так и тем, что в геноме микроорганизмов обычно присутствует несколько копий гена 16S РНК, и некоторые из них могут содержать вариации в своей последовательности [10]. Вместе с тем это не оказывает существенного влияния на дальнейшую обработку экспериментальных результатов, поскольку

при компьютерной обработке минорные полосы отсеиваются и не учитываются при определении длин рестриктов.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

**Рис. 2.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена 16S PHK продуцентов щелочной фосфатазы после обработки рестриктазами Sse9I(2), Tru9I(3), BsuRI(4), MspI(5), BstMBI(6) и RsaI(7). Дорожка 1 - маркер молекулярного веса

Как видно из результатов, представленных в таблице 2, при обработке каждой рестриктазой, амплифицированных генов продуцентов 27, 48, 20 и *Alteromonas undina* наблюдается высокий процент равных по длине рестриктов. Равными по длине (как и при сравнении симулированных компьютером картин рестрикции) считали рестрикты длина которых отличалась не более чем на 5%, что соответствует экспериментальной ошибке определения их длины.

| Sse9I |     |     |       | Tru9I  |     |     |       | BsuRI |     |     |       |
|-------|-----|-----|-------|--------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-------|
| 27    | 48  | 20  | A.und | 27     | 48  | 20  | A.und | 27    | 48  | 20  | A.und |
| 537   | 548 | 550 | 548   |        | 469 | 471 |       | 470   |     |     | 478   |
| 470   |     |     |       |        |     |     | 409   |       | 313 | 319 | 330   |
|       | 439 | 442 |       | 349    | 356 | 360 | 357   | 281   | 283 | 285 | 287   |
| 385   |     |     |       |        |     |     |       | 262   |     |     |       |
| 249   | 245 | 250 | 252   | 310    |     |     | 314   |       | 205 | 207 |       |
| 168   |     |     |       | 269    | 279 | 282 |       | 187   | 184 | 188 | 185   |
| 128   | 129 | 134 |       | 143    | 146 | 145 | 140   | 140   | 136 | 141 | 137   |
|       | 121 | 125 | 123   | 129    |     |     |       | 109   | 110 | 114 |       |
| 96    |     |     |       |        |     |     |       |       | 90  | 95  |       |
|       |     |     |       | 100    | 96  | 95  | 97    |       |     |     | 83    |
| MspI  |     |     |       | BstMBI |     |     |       | RsaI  |     |     |       |
| 27    | 48  | 20  | A.und | 27     | 48  | 20  | A.und | 27    | 48  | 20  | A.und |
|       | 552 | 550 | 539   | 665    | 659 | 641 |       | 900   |     |     | 886   |
| 524   | 504 | 508 |       |        |     |     | 539   |       | 485 | 500 |       |
|       |     |     | 488   |        |     |     | 500   |       | 445 | 442 |       |
| 310   |     |     |       |        | 403 | 400 |       | 360   |     |     | 359   |
| 246   |     |     |       | 321    |     |     |       |       | 241 | 243 |       |
| 176   |     |     |       | 276    | 286 | 287 | 277   |       | 231 | 232 |       |
| 143   | 140 | 146 | 140   | 169    | 170 | 171 | 172   | 155   |     |     | 155   |
| 122   | 117 | 120 | 116   | 102    |     |     |       | 136   | 134 | 136 | 133   |
|       | 79  | 83  | 79    |        |     |     |       |       |     |     |       |

**Таблица 2.** Длина рестриктов, полученных при обработке каждой рестриктазой амплифицированных генов продуцентов 27, 48, 20 и A.undina

Из результатов, представленных на рис. 3, видно, что процент идентичности длин фрагментов ДНК, при сравнении этих продуцентов между собой, превышает 50%. Последнее указывает на то, что эти микроорганизмы являются родственными. Сравнение длин рестриктов продуцента *Alteromonas undina* с аналогичными картинками рестрикции, полученными при гидролизе амплифицированных генов 16S РНК микроорганизмов *Streptomyces albus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Neisseria denitrificans*, взятых в качестве контроля (Таблица 3), показало, что процент совпадения длин рестриктов во всех случаях составляет 11 -22%. Такой процент совпадений, видимо, можно считать случайным и использовать в качестве контроля для

подтверждения того, что данные микроорганизмы не являются родственными и относятся к различным родам.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

**Рис. 3.** Сравнение процента идентичности длин фрагментов ДНК генов 16S РНК различных продуцентов

|                               | <b>Streptomyces<br/>albus</b>    | <b>Micrococcus<br/>luteus</b> | <b>Bacillus subtilis</b>          | <b>Staphylococcus<br/>aureus</b>   |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>Alteromonas<br/>undina</b> | 11                               | 22                            | 18                                | 11                                 |
|                               | <b>Hemophilus<br/>influenzae</b> | <b>Escherichia coli</b>       | <b>Pseudomonas<br/>aeruginosa</b> | <b>Neisseria<br/>denitrificans</b> |
| <b>Alteromonas<br/>undina</b> | 22                               | 15                            | 22                                | 18                                 |

**Таблица 3.** Сравнение процента идентичности длин фрагментов ДНК генов 16S РНК *Alteromonas undina* и представителей различных родов микроорганизмов

Вместе с тем 50% совпадение длин рестриктов для выявленных нами продуцентов само по себе еще недостаточно, для того чтобы считать их представителями одного рода. Для подтверждения этого предположения нами были проанализированы симулированные с помощью компьютера картины рестрикции генов 16S РНК ряда представителей рода *Alteromonas* теми же рестриктазами, которые мы использовали для гидролиза генов 16S РНК исследуемых нами микроорганизмов (Рис. 4). В генетическом банке секвенированных последовательностей нами были обнаружены последовательности генов 16S РНК *A(P). atlantica*, *A. litorea*, *A. marina* SW47, *A. marina* SW49 и *A. stellaepolaris*. Как видно из рис. 4, гены 16S РНК *A. marina* SW47 и *A. marina* SW49 дают идентичные картины рестрикции для всех 6-ти рестриктаз, поэтому в дальнейшем для сравнения использовался только один из них. Сравнение картин рестрикции продуцента 27 с аналогичными картинками, полученными для альтеромонасов из генетической базы данных и *A. undina* показало, что идентичность длин рестриктов (как представлено на рис. 3) колеблется от 45 до 58% и составляет (49 + 4)%. Для продуцентов 20 и 48 колебание идентичности длин рестриктов составляет от 53 до 63%, а среднее значение - (58 + 3)%. Для *Alteromonas undina* эти

цифры варьируют от 49 до 57% при среднем значении (54 + 3)%. Таким образом, наблюдаются статистически достоверные различия при сравнении длин рестриктов ДНК генов 16S РНК найденных нами продуцентов с представителями рода *Alteromonas* с одной стороны (50 и более %) и представителями других родов (11-22% идентичности длин рестриктов). Варьирование идентичности длин рестриктов внутри рассмотренных нами представителей рода *Alteromonas* колеблется от 62 до 87%. Здесь следует отметить, что предложенное авторами работы [8] разделение рода *Alteromonas* на два рода *Alteromonas* и *Pseudoalteromonas*, на наш взгляд, является выделением внутри рода *Alteromonas* группы более близкородственных микроорганизмов. Подтверждением сказанного может служить сравнение процента идентичности длин рестриктов ДНК генов 16S РНК, *A(P). atlantica* и *Alteromonas undina*, которые по новой классификации относятся к роду *Pseudoalteromonas*. Степень идентичности длин рестриктов ДНК между ними составляет 53%. Аналогично, степень идентичности длин рестриктов ДНК генов 16S РНК этих микроорганизмов по отношению к *A. litorea*, *A. marina* SW47, *A. marina* SW49 и *A. stellaepolaris*, которые по новой классификации образуют род *Alteromonas*, колеблется от 49 до 65%. Вместе с тем степень идентичности между *A. litorea*, *A. marina* SW47, и *A. stellaepolaris* колеблется от 77 до 87%, что, видимо, указывает на их более близкое родство.

**Рис. 4.** Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S РНК рода *Alteromonas*, после обработки рестриктазами *Sse9I* (1), *Tru9I* (2), *BsuRI* (3), *MspI* (4), *BstMBI* (5) и *RsaI* (6). Дорожки М - маркер молекулярного веса

Таким образом, можно сделать следующий вывод. Совпадение длин рестриктов, полученных в результате гидролиза генов 16S РНК различных микроорганизмов 6-ю рестриктазами (*Sse9I*, *Tru9I*, *BsuRI*, *MspI*, *BstMBI* и *RsaI*) примерно на 50% или более указывает на то, что данные микроорганизмы относятся к одному роду. Следовательно, продуценты термолабильной фосфатазы 20, 27 и 48 относятся к роду *Alteromonas* и могут быть обозначены соответственно *A. species* 20, *A. species* 27, *A. species* 48.

Полученные результаты показывают, что предложенная комбинация эндонуклеаз рестрикции для расщепления продукта гена 16S РНК в совокупности с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей может служить достаточно простым и универсальным способом идентификации микроорганизмов. Кроме того, метод рестрикционного



анализа гораздо менее чувствителен к наличию примесей в ДНК по сравнению с полимеразной цепной реакцией, используемой для определения последовательности продукта гена 16S РНК.

Выражаем благодарность Н. Санамян за техническое содействие в отборе глубинных проб микроорганизмов.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Хоупта Дж. и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина, - М., 1997.
2. Bentley, R.W., Leigh, J.A., Collins, M.D. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1991. - V. 41. - P. 487-494.
3. Poyard, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., Trieu-Cuot, P. // J. Clin. Microbiol. - 1998. - V. 36. - P. 41-47.
4. Garnier, F., Gerbaud, G., Courvalin, P., Galimand, M. // J. Clin. Microbiol. - 1997. - V. 35. - P. 2337-2341.
5. Jayarao, B.M., Dore, J.J.E., Oliver, S.P. // J. Clin. Microbiol. - 1992. - V. 30. - P. 2235-2240.
6. Vaneechoutte, M., Beenhouwer, H., Claeys, G., Verchraegen, G., Rouck, A., Paepe, N., Elaichouni, A., Portaels, F. // J. Clin. Microbiol. - 1993. - V. 31. - P. 2061-2065.
7. Grimont, F., Grimont, P. A.D. // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. - 1986. - 137. P. 165-175.
8. Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1995. - V. 45. - P. 755-761.
9. Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., DeVos, P., Claeys, G., Verchraegen, G. // J. Clin. Microbiol. - 1995. - V. 33. - P. 11-15.
10. Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A.D., Bouvet, A. // J. Clin. Microbiol. - 2003. - V. 41. - P. 657-666.
11. Зернов Ю.П., Дедков В.С., Антонова Ю.А., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. // Биотехнология, 2005, № 2, с. 38-43. ([интернет-версия](#))
12. Методы общей бактериологии. / Под. ред. Ф. Герхардта и др.: В 3 томах: Пер. с англ. под ред. чл. корр. АН СССР Е. Н. Кондратьевой и проф. Л. В. Калакуцкого, - М., 1984.
13. New England Biolabs protocols of DNA purification, 1990.
14. Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M., Kaneko, M. // J. Clin. Microbiol. - 1997. - V. 35. - P. 2458-2463.
15. Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., Sjostedt, S. // J. Clin. Microbiol. - 1996. - V. 34. - P. 2894-2896.