

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА

УДК 606:575:57.082.13

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*
НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ГЕНА
БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *rpoB*****А.Б. Шевцов¹, А.Р. Кушугулова², С.С. Кожаметов², С.С. Оралбаева¹,
Л.Г. Стоянова, А.Б. Сейдалиева¹, К.Т. Момыналиев¹***(кафедра микологии; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru)*

В настоящей работе проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *rpoB* гена для оценки возможности его использования в качестве генетического маркера видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* spp., выделенных из кисломолочных продуктов разных районов республики Казахстан. Показано, что дискриминационная характеристика нуклеотидной последовательности *rpoB* гена более достоверна для идентификации близкородственных генов *Lactobacillus* по сравнению с использованием для этих целей только *16S rRNA* гена. Филогения последовательности *rpoB* гена идентична *16S rRNA* гену и может быть использована как дополнительный филогенетический маркер.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, бета-субъединица РНК-полимеразы, идентификация, секвенирование, филогения, *16S rRNA* ген, *rpoB* ген.

Род *Lactobacillus* является самым представительным по числу среди молочнокислых бактерий. Многие виды *Lactobacillus* spp. имеют важное значение для пищевой и медицинской промышленности в качестве заквасочных, стартовых и пробиотических культур [1, 2]. Поэтому для контроля качества и безопасности продуктов питания важной задачей является их правильная таксономическая идентификация. Влияние различных факторов на фенотипические показатели, а также высокий уровень фенотипической изменчивости лактобацилл способствуют широкому применению генетических методов для видовой идентификации [3]. Метод ДНК/ДНК гибридизация является “золотым стандартом” видовой идентификации, но трудоемкость и высокая стоимость не позволяют использовать его как рутинный метод. Альтернативным подходом является анализ последовательности ДНК. На современном этапе секвенирование ДНК — недорогой и быстрый метод, позволяющий создавать общедоступные базы данных нуклеотидных последовательностей. Все эти составляющие способствуют интенсивному развитию данного метода идентификации. Для того чтобы анализ нуклеотидных последовательностей обладал высоким таксономическим разрешением необходимо подобрать генетические маркеры, позволяющие надежно дифференцировать лактобациллы до вида. Широко используемый в таксономии ген *16S rRNA* не позволяет точно дифференцировать новые выделенные в результате скрининга

штаммы бактерий. Необходимы новые генетические маркеры (гены), которые по своей информативности могут быть идентичны или превосходить ДНК/ДНК гибридизацию. Комитет по переоценке бактериальных видов [4] рекомендует проведение анализа пяти генов, что может предоставить достаточную информацию для видовой идентификации микроорганизмов.

Высокую дискриминационную характеристику видов лактобацилл показали фрагменты нуклеотидных последовательностей *tuf* [5], *pheS*, *rpoA* [6] и *hsp60* [7] генов. Кроме того, гены, кодирующие указанные белки, обладают двойным потенциалом: использование нуклеотидной последовательности для дифференциации близкородственных видов, а также использование аминокислотной и нуклеотидной последовательностей для филогении и таксономии отдаленных и близко связанных таксонов. Нуклеотидная последовательность *rpoB* гена кодирует бета-субъединицу РНК-полимеразы и встречается в единичной копии в геноме лактобацилл [8]. Эволюционно древнее происхождение этого гена свидетельствует о его потенциале как бактериального хронометра [9].

Целью данного исследования являлось изучение возможности использования нуклеотидной и аминокислотной последовательности фрагмента *rpoB* гена в качестве альтернативного генетического маркера видовой дифференциации и филогении видов *Lactobacillus* spp.

¹ РГП Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан КН МОН РК, г. Астана.

² ДГП Республиканская коллекция микроорганизмов, Республика Казахстан, г. Астана.

Материалы и методы

В исследовании были использованы образцы ДНК, полученные методом Kate Wilson [10] из 66 культур лактобацилл, выделенных из кисломолочных продуктов разных районов республики Казахстан и выращенных на среде MRS 1 (Hi-Media, India).

Аmplification фрагмента *rpoB* гена была выполнена в объеме 30 мкл ПЦР, смесь содержала 150 нг ДНК, 1 Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 15 пмоль каждого праймера. Нами были подобраны праймеры, содержащие выделенные нуклеотидные позиции на 3' конце For-*rpoB* 5' — TAACCgTggTgCTTggCTDgA-ATWYgAAAC — 3'; Rev-*rpoB* 5' — ATCAAACCAATgTTAggNCSTTCWggDgTTTC — 3'. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95° в течение 7 мин; 30 циклов: 95° — 50 с, 59° — 1 мин, 72° — 1 мин 30 с; заключительная элонгация 7 мин при 72°, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора DNA Engine Tetrad 2 Cyclor PTC-0240 (Bio-Rad).

Определение нуклеотидной последовательности.

При очистке ПЦР продуктов использовали ферментативный метод [11]. Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и подобранных праймеров согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730 × 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности были проанализированы и объединены в общий контиг, используя программное обеспечение SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения Mega 3.1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей делали, используя алгоритм ClustalW, построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ). Идентичность нуклеотидной последовательности рассчитывали с использованием программного обеспечения MegAlign 6.00 DNASTAR Inc. Дополнительно в анализ были включены нуклеотидные последовательности *rpoB* гена 23 видов лактобацилл, а также *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*.

Исследуемые культуры были предварительно идентифицированы методом анализа нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена в GenBank по алгоритму

BLAST, с применением программного обеспечения MicroSeq ID (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Аmplification фрагмента *rpoB* гена размером 1100 п.н. методом ПЦР 66 культур представлена на рис. 1.

Для анализа использовали фрагмент нуклеотидной последовательности *rpoB* гена длиной 769 п.н. (исключая последовательность праймеров и неперекрывающихся областей).

Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 66 анализируемых микроорганизмов отображены на дендрограмме (рис. 2). Нуклеотидные последовательности *rpoB* гена 35 идентифицируемых культур (К-0015, К-0023, К-0024, К-0025, К-0041, К-0043, К-0103, К-0104, К-0105, К-0106, К-0108, К-0149, К-0153, К-0154, К-0155, К-0201, К-0208, Р-001, Р-003, Р-006, Р-010, Р-012, Р-019, Р-020, Р-021, Р-025, Р-027, Р-028, Р-159, Р-034, Р-96, Р-039, Р-41, Р-043, Р-51) расположены на одной филогенетической ветви с *L. paracasei* ssp. *paracasei* 8700:2, *L. paracasei* ssp. *paracasei* ATCC 25302 и референтными штаммами *L. casei* ATCC334, *L. casei* BL23. При идентификации данных культур по *16S rRNA* максимальная идентичность была получена с *L. paracasei*. Внутривидовой полиморфизм *rpoB* гена *L. paracasei* не превысил 0,8%.

Нуклеотидные последовательности *rpoB* гена идентифицируемых культур Р-86, Р-67, Р-73, Р-85, Р-78, Р-79, Р-98, Р-66 при анализе сформировали отдельную филогенетическую ветвь с *L. rhamnosus* GG и *L. rhamnosus* Lc 705. Данные культуры по гену *16S rRNA* были идентифицированы как *L. rhamnosus*. Варибельность нуклеотидных последовательностей *rpoB* гена среди *L. rhamnosus* не превышала 1,7%, однако была значительно выше, чем в *L. casei*. Важно отметить, что нуклеотидная идентичность между филогенетически близкородственными бактериями группы *L. casei*, такими как *L. rhamnosus* GG и *L. paracasei*, составила от 85,6 до 86,1%, тогда как межвидовая идентичность *16S rRNA* гена составила более 98%, что не позволяет однозначно диф-

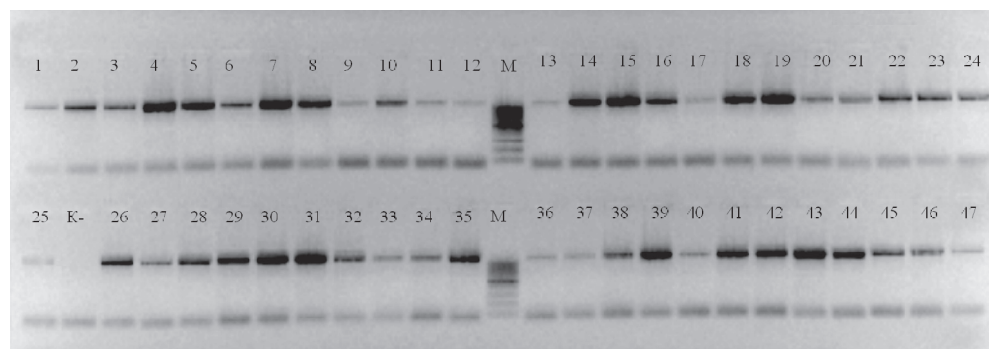


Рис. 1. Электрофоретическая ПЦР продуктов амплификации фрагмента *rpoB* гена. 1—47 образцы, М — маркер 100—1000 п.н. шаг 100 п.н., Fermentas, “К—” — отрицательный контроль постановки ПЦР

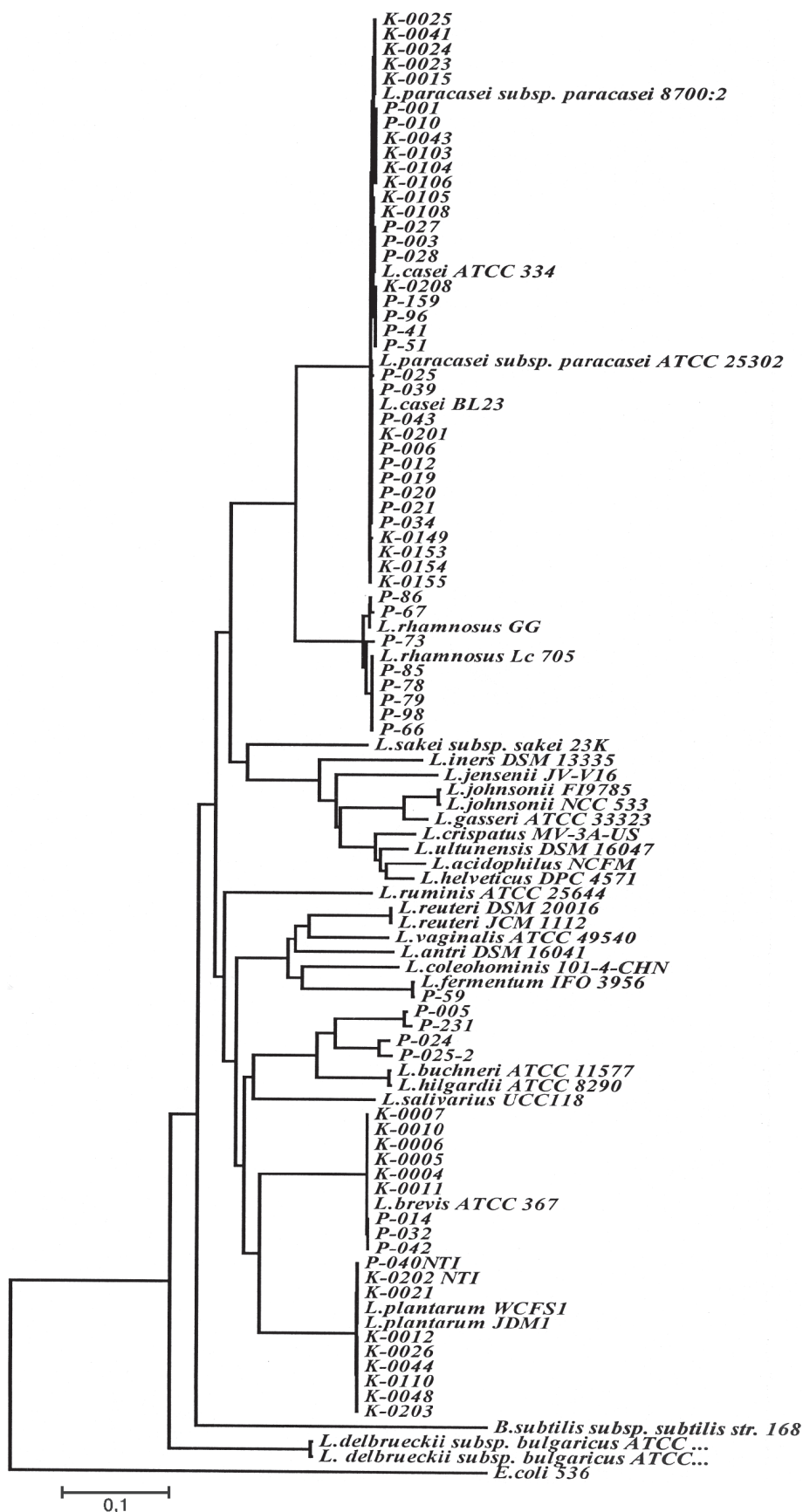


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидной последовательности *rpoB* гена

ференцировать указанные виды. Нуклеотидная идентичность *rpoB* гена *L. paracasei* и *L. rhamnosus* к *L. sakei* не превысила 77%, тогда как по *16S rRNA* гену процент составил 90,1 и 90,7% соответственно.

Уровень генетического родства *rpoB* гена исследуемой культуры P-59 по отношению к *L. fermentum* IFO3956 составила 99,9%, а к наиболее близкородственному виду *L. reuteri* — 91,0% по *16S rRNA* и 76,8% по *rpoB* гену.

Нуклеотидная последовательность *rpoB* гена культур P-005, P-231 и P-024, P-025-2, идентифицированных как *L. parabuchneri* и *L. buchneri*, сформировала две филогенетические ветви, отдаленно расположенные от референтного штамма *L. buchneri* ATCC11577. Последний в свою очередь расположен на одной филогенетической ветви с *L. hilgardii* ATCC8290, являющимся неотипом для данного вида. Идентичность нуклеотидной последовательности *rpoB* гена между ними составила 99,6%, а родство *L. buchneri* ATCC 11577 с P-005, P-231 и P-024, P-025-2 составила 84,3%, 83,9% и 87,3%, 86,6%, соответственно. Важно отметить, что различие в уровнях генетического родства *rpoB* гена P-005, P-231 (*L. parabuchneri*) и P-024, P-025-2 (*L. buchneri*) превысило 12,0%, а *16S rRNA* — всего 2,0–2,5%.

Как видно на рис. 2, идентифицируемые культуры K-0007, K-0010, K-0006, K-0005, K-0004, K-0011, P-014, P-032 и P-042 филогенетически связаны с *L. brevis* ATCC 367, процент идентичности *rpoB* гена между ними составил 99,9–100%.

Нуклеотидные последовательности *rpoB* гена выделенных культур P-040, K-0202, K-0021, K-0012, K-0026, K-0044, K-0110, K-0048 и K-0203 анализировали по отношению к последовательности *rpoB* гена референтным штаммам *L. plantarum* WCFS1 и *L. plantarum* JDM1. Уровень генетического родства внутри данной группы составил 99,9–100%. В нашей выборке отсутствуют близкородственные виды

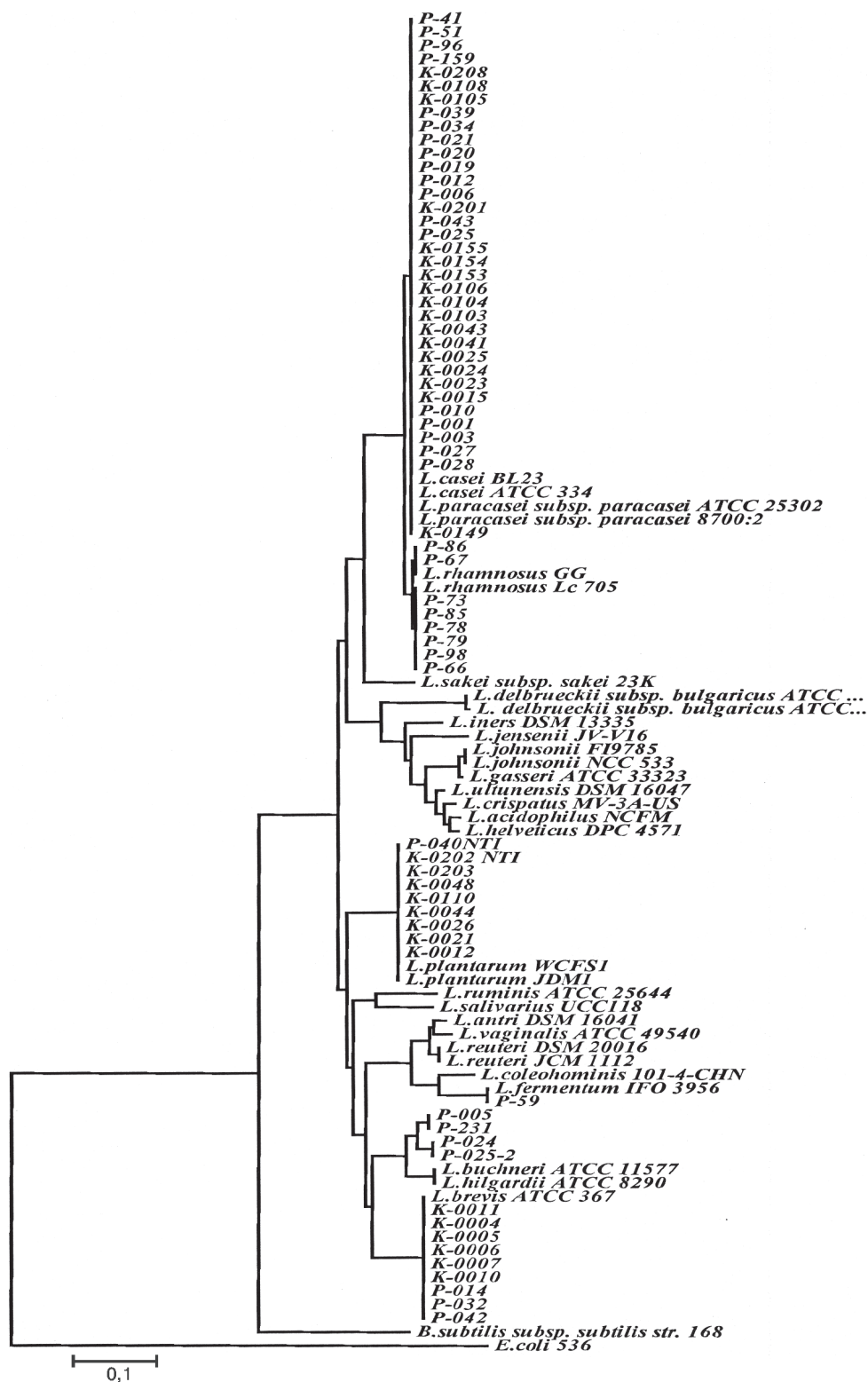


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по аминокислотной последовательности бета-субъединицы РНК-полимеразы и традиционной филогении по 16S rRNA гену

группы *L. plantarum* (*L. paraplantarum* и *L. pentosus*), что не позволило нам оценить дискриминационную характеристику *rpoB* гена для видов данной группы. Но в целом отмечена общая тенденция уменьшения процента родства *L. plantarum* к другим видам. Так, например, идентичность фрагмента нуклеотидной последовательности 16S rRNA гена *L. brevis*

с *L. plantarum* составила около 92,0%, а идентичность фрагмента *rpoB* гена не превысила 82,0%.

Отмечено, что топология дерева, построенного на нуклеотидной последовательности *rpoB* гена, значительно отличается от традиционной филогении, построенной на анализе 16S rRNA гена (рис. 3). Согласно филогенетической структуре рода *Lactobacillus*, построенной на основании нуклеотидных последовательностей гена 16SrRNA, *L. delbrueckii* входит в группу *L. acidophilus* [10], тогда как при анализе нуклеотидной последовательности *rpoB* гена *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* сформировали отдельную филогенетическую ветвь, а *L. sakei*, традиционно входящий в группы *L. casei* по нуклеотидной последовательности *rpoB* гена, стал ближе к группе *L. acidophilus*. Кроме того, анализ гена *rpoB* показал, что *L. brevis* филогенетически ближе к *L. plantarum*, тогда как по 16S rRNA он входит в группу *L. buchneri*. Также *L. ruminis* ATCC 25644 вместе с *L. salivarius* UCC118, традиционно входящие в одну филогенетическую группу *L. salivarius*, расположены на разных ветвях.

Заключение

Ген *rpoB* уже был использован в качестве генетического маркера при идентификации бактерий, отнесенных к типу *Firmicutes*. Например, анализ 318 п.н. позволил дифференцировать бациллы *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis* [11], а также от молочнокислых бактерий методом PCR-DGGE [12]. Аминокислотная последовательность бета-

субъединицы РНК-полимеразы была использована при изучении филогении грамположительных, грамотрицательных бактерий и представителей *Archaea* [13–16]. Однако идентификационная и филогенетическая способность нуклеотидной и аминокислотной последовательностей *rpoB* гена не была изучена для рода *Lactobacillus* spp. В нашем исследовании

довании были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать фрагменты *rpoB* гена лактобацилл, входящие в различные филогенетические группы (*L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. buchneri*). В целом анализ нуклеотидной последовательности *rpoB* гена показал высокую идентификационную способность генетически и фенотипически близкородственных бактерий рода *Lactobacillus* по сравнению

с дискриминационным свойством *16S rRNA* гена. Топология дерева на основе анализа аминокислотной последовательности только по *16S rRNA* гену является недостаточной для идентификации генов близкородственных видов *Lactobacillus*. Анализ нуклеотидной последовательности *rpoB* гена может быть использована как филогенетический маркер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W. The genus *Lactobacillus* — a genomic basis for understanding its diversity // FEMS Microbiol. Lett. 2007. Vol. 269. Is. 1. P. 22–28.
2. Makarova K.S., Koonin E.V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189. P. 1199–1208.
3. Kao Y.T., Liu Y.S., Shyu Y.T. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis // Food Research Int. 2007. Vol. 40. Is. 1. P. 71–79.
4. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. 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. Chavagnat F., Haueter M., Jimeno J., Casey M.G. Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli // FEMS Microbiology Letters. 2002. Vol. 217. P. 177–183.
6. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroeck K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57. P. 2777–2789.
7. Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. *Lactobacillus* strain diversity based on partial *hsp60* gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation // Appl. Environ. Microbiol. 2008. Vol. 74. P. 208–215.
8. Morse R., Collins M.D., O'Hanlon K., Wallbanks S., Richardson P.T. Analysis of the beta' subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. Vol. 46. Is. 4. P. 1004–1009.
9. Adekambi T., Drancourt M., Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists // Trends in Microbiology. 2009. Vol. 17. N 1.
10. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria, in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et al.). Wiley; New York, 1987. P. 241–245.
11. Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4354–4355.
12. Ko K.S., Kim J.M., Kim J.W., Jung B.Y., Kim W., Kim I.J., Kook Y.-H. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41. Is. 7. P. 2908–2914.
13. Rantsiou K., Comi G., Coccolin L. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations // Food Microbiol. 2004. Vol. 21. P. 481–487.
14. Morse R., O'Hanlon K., Collins M.D. Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of Gram-positive and Gram-negative bacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52. P. 1477–1484.
15. Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and metabolism of lactobacilli. *Lactobacillus* molecular biology from genomics to probiotics. L.: Caister Academic Press, 2009. P. 26–27.
16. Matte-Tailliez O., Brochier C., Forterre P., Philipe H. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins // Mol. Biol. Evol. 2002. Vol. 19. P. 631–639.

Поступила в редакцию
29.05.10

THE IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS* spp. ON THE BASE OF ANALYSIS OF GENE FRAGMENT BETA- SUBUNIT RNA -POLYMERASE (*rpoB*)

A.B. Shevtsov, A.R. Kushugulova, S.S. Kojakhmetov, S.S. Oralbaeva,
L.G. Stoyanova, A.B. Seidalina, K.T. Mominaliev

It was carry out a comparative analysis of the nucleotide sequences of the *rpoB* gene to assess its use as a genetic marker for identification genus *Lactobacillus* spp., obtained from acid milk product of different regions of Kazakhstan. Discriminatory ability of the nucleotide sequence analyze of *rpoB* gene is higher than the *16S rRNA* gene for closely related species of the *Lactobacillus* genus. Phylogeny of nucleotide sequence of *rpoB* gene is identical to *16S rRNA* gene and can be used as its additional phylogenetic marker.

Key words: *Lactobacillus*, beta-subunit of RNA- polymerase, identification, sequencing, phylogeny, *16S rRNA* gene, *rpoB* gene.

Сведения об авторах

Шевцов Александр Борисович — науч. сотр. Национальной научной лаборатории коллективного пользования РГП Национальный центр биотехнологии РК КН МОН РК. Тел. 87172200793; e-mail: nmcrshevtsov@mail.ru

Кушугулова Алмагуль Рахимберлиевна — канд. мед. наук, зав. лабораторией коллекции микроорганизмов, ДГП Республиканская коллекция микроорганизмов РГП “НЦБ РК” КН МОН РК. Тел. 87172200793; факс: 87172200927, e-mail: Lgene@biocenter.kz

Кожаметов Самат Серикович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов, ДГП Республиканская коллекция микроорганизмов РГП “НЦБ РК” КН МОН РК. Тел. 87172200793; факс: 87172200927, e-mail: Lgene@biocenter.kz

Оралбаева Сания Саттыбаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Национальной научной лаборатории коллективного пользования РГП Национальный центр биотехнологии РК КН МОН РК. Тел. 87172200793; e-mail: soralbaeva@mail.ru

Стоянова Лидия Григорьевна — докт. биол. наук кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 939-27-63; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Сейдалина Айгерим Бекболатовна — мл. науч. сотр. Национальной научной лаборатории коллективного пользования РГП Национальный центр биотехнологии РК КН МОН РК. Тел. 87172200793.

Момыналиев Куват Темиргалиевич — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. Национальной научной лаборатории коллективного пользования РГП Национальный центр биотехнологии РК КН МОН РК. Тел. 87172200793.