

УДК: 576.8.095

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БАКТЕРІЙ РОДІВ *BACILLUS* І *KLEBSIELLA*

Коваль Г.М., Бойко Н.В.

Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра мікробіології, вірусології, імунології з курсом інфекційних хвороб, м. Ужгород

РЕЗЮМЕ: нами за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції проведено контрольну ідентифікацію штамів *Bacillus subtilis*: 090, 091, 092 (перспективні для розробки на їх основі біопрепаратів вибіркової дії); 1106, 1109, 1110 (музейні культури); Кр60₁, Мр 92, 81 (ізолювані з ґрунту); 572, 94, 5₁₂90, 5₃102 (виділені із проб стічних вод і повітря агроєкосистем Закарпатської області); 1_{TC}L₃ (ізолюваний із умісту кишечника курчати) та клінічних і музейних культур *Klebsiella rhinoscleromatis* 230, 30; *K. pneumoniae* 3785, 5054, *K. planticola* 33558, 33531; *K. terrigena* 80-07 – всього 13 штамів. REP-ПЛР аналіз дозволив виявити генеральну родову і видову спорідненість більшості досліджуваних культур бацил, що підтвердилось і при використанні методу риботипування для ідентифікації досліджуваних штамів. При використанні REP-ПЛР-опосередкованого ДНК-фінгерпринтного аналізу для біотипування клебсієл спостерігали суттєву варіабельність у складі ПЛР-продуктів. Поки що залишається нез'ясованим, наскільки закономірними є виявлені нами збіг чи розбіжність у REP-ПЛР-профілях досліджуваних культур клебсієл.

Ключові слова: ПЛР, ідентифікація, праймери, *Bacillus*, *Klebsiella*

Вступ. Розвиток методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) суттєво розширив межі його застосування в фундаментальних та прикладних дослідженнях [3, 4]. Безсумнівний інтерес викликає можливість швидкої і точної видової ідентифікації мікроорганізмів за допомогою ПЛР на якісно новому рівні [11, 12]. Особливо актуальним є застосування даного методу з метою встановлення спорідненості виділених бактеріальних культур із різних еконіш для їхнього контрольного типування [6].

Метою даної роботи було встановлення принципової можливості застосування методу ПЛР для видової ідентифікації ізолюваних нами із різних джерел штамів клебсієл і бацил.

Матеріали і методи досліджень. Для ідентифікації клебсієл були використані дезоксиолігонуклеотидні праймери, синтезовані на ДНК-синтезаторі «Вікторія» (м. Новосибірськ) І.Я. Дубеєм (НДІ біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, м. Київ). Це специфічні для повторюваних послідовностей геномів ентеробактерій REP (*repetitive extragenic palindrome*) [9] праймери REP1 – 5' III IGG IGG ICA TCI GGC – 3'; REP2 – 5' IGG IGG ICA TCI GGC – 3'; 5' IGG ICT TAT CIG GCC TAC – 3', де I – інозин. Головною перевагою таких праймерів є те, що вони дозволяють працювати з геномами, інформація про нуклеотидну послідовність яких відсутня. Показано, що ці праймери можуть бути використані для ДНК-фінгерпринтного аналізу різних бактерій [7].

Використані праймери 27F 5' – GAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3' і 1525R 5' – AGAAAGGAGGTGATCCAGCC – 3' для риботипування методом 16S RNA (ARDRA) з метою контрольної ідентифікації штамів бацил були надані нам для досліджень проф. К. Маріалігеті (Eotvos

Lorand University, Будапешт). Хромосомну ДНК виділяли із нічних культур бактерій протеїнажною обробкою з наступною екстракцією фенолом і хлороформом, після чого очищали за допомогою Prep-A-Gene DNA Purification kit (Bio-Rad), осаджували етанолом і розчиняли в воді [2]. ПЛР проводили в об'ємі 25 мкл (клебсієли) та 50 мкл (бацили). Реакційна суміш містила 25 mM трис HCl pH 8,8 (20 °C); 15 mM (NH₄)₂SO₄; 3,5 mM MgCl₂; 0,5 mM дитіотреїтолу; 0,2 mM кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів (дАТФ; дАТФ; дЦТФ, дТТФ), 25 нг ДНК-матриці, по 12 pM кожного праймеру REP1 та REP2, 2 е.а. Taq-полімерази («Биомастер», Москва). Після прогрівання реакційної суміші впродовж 3 хв. при 93 °C здійснювали 35 циклів ПЛР: 93 °C, 40 сек.; 35 °C, 60 сек.; 70 °C, 90 сек. – для клебсієл та 28 циклів за схемою: ініціальна денатурація 98 °C – 3 хв., + TAG 0,5 мкл, далі: 52 °C – 30 сек., 72 °C – 1 хв., 93 °C – 30 сек., 72 °C – 7 хв., охолодження до 4 °C – для бацил. ПЛР досліджуваних культур клебсієл і бацил проводили на ампліфікаторі виробництва НПО «Біолюкс» (м. Пушино, Росія) та на ампліфікаторі (UK, Gene Amplifier PCR System 2400 “Perkins Elmer”, Будапешт) – тільки штамів бацил. Загальний час реакції становив близько 4 годин. Продукти реакції аналізували електрофорезом у 1,5 % гелі агарози в буфері TBE на електролізері Gel Casting System 11 –14, GIBCO BRL.

Результати досліджень і їх обговорення. Хоч послідовності REP, що повторюються, були спочатку виявлені в геномах *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium*, зараз загальновідомою є можливість використання REP-праймерів для біотипування широкого спектра мікроорганізмів [7, 10]. Як видно із рис.1, ПЛР-опосередкований ДНК-фінгерпринтний аналіз бацил із використанням

REP-праймерів є досить інформативним. Так, дев'ять із чотирнадцяти досліджених штамів *Bacillus subtilis* мали абсолютно ідентичні набори з трьох фрагментів із розмірами 450, 500 і 700 н.п., два штами, ізольовані з ґрунту (81 і Мр92), мали один фрагмент розміром близько 500 н.п. (нечіткий на фотографії), а штам 94 – фрагмент розміром 400 н.п. Штам 1_{ТСL3}, ізольований із умісту

кишечника курчати характеризувався наявністю двох фрагментів довжиною 800 і 250 н.п., тоді як штам 572 – фрагментом 1100 н.п. і набором низькомолекулярних продуктів. Найбільшу подібність виявляли між собою штами *Bacillus subtilis* 090, 091, 092, 1110 і Кр60₁. Генетичною гетерогенністю за кількістю нуклеотидних пар характеризувалися дві із досліджуваних культур бацил – 572 і 94.

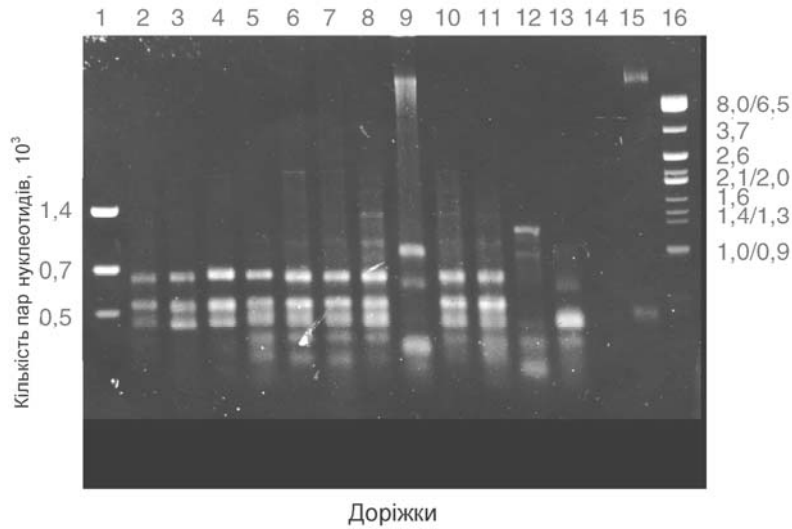


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз REP-ПЛР- продуктів штамів *Bacillus subtilis*. Доріжки 2 – 15 – штами *B. subtilis* 092, 1_{ТСL3}, Мр 92, 090, Кр60₁, 81, 1109, 1106, 1110, 091, 572, 94, 5₁₂90, 5₃102; доріжка 1 – маркер молекулярної маси, рUC, рестрикційна Таq 1, доріжка 16 – маркер молекулярної маси, фаг лямбда, рестрикований Аva II.

Аналогічний результат було одержано і у випадку використання для ідентифікації досліджуваних штамів бацил праймерів, специфічних до бактеріальної ДНК (рис. 2).

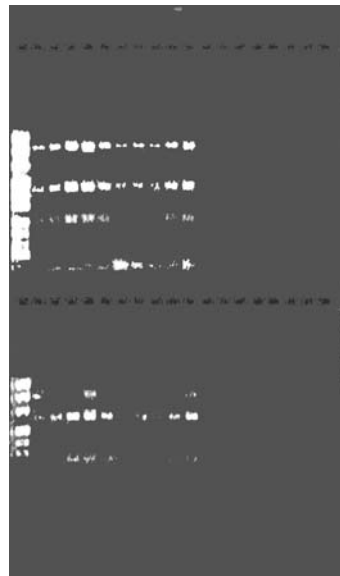


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз штамів *Bacillus subtilis* методом ПЛР-риботипування. Доріжка 1 – маркер молекулярної маси лямбда ДНК із Eco RI й Hind III рестрикційними ендонуклеазами; доріжки 2-11 – штами *B. subtilis* 091, Мр 92, 572, Кр60₁, 81, 1_{ТСL3}, 5₃102, 94, 092, 090. Рестрикційний аналіз ПЛР-продуктів здійснено з використанням ензимів Thru 91 й Hin P1 I.

У всіх культур відзначали наявність трьох очікуваних ПЛР-продуктів з незначними кількісними відхиленнями між збірками. Одержані дані є свідченням досить низької чутливості методу риботипування для ідентифікації штамів деяких бактеріальних культур [5, 8].

Таким чином, за допомогою REP-ПЛР аналізу вдалось виявити генеральну родову і видову спорідненість більшості досліджуваних культур

бацил (як музейних, так і ізолюваних нами культур) та деяку незначну генетичну гетерогенність (для штамів *B. subtilis* 572 і 94, що підтвердили результати риботипування (ARDRA).

При використанні REP-ПЛР-опосередкованого ДНК-фінгерпринтного аналізу для біотипування клебсієл було виявлено суттєву варіабельність у складі їхніх ПЛР-продуктів (рис. 3).

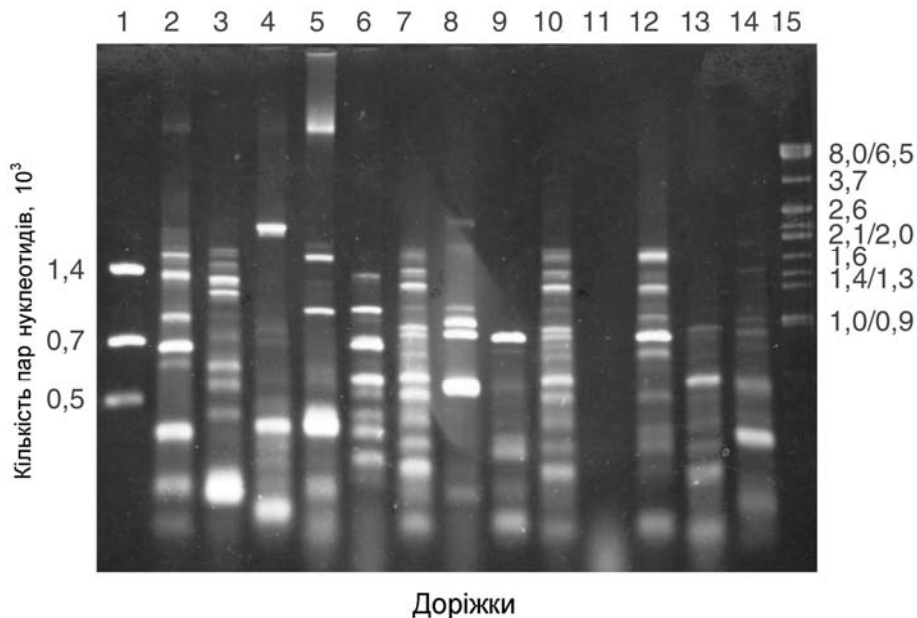


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз REP-ПЛР- продуктів штамів клебсієл: доріжки: 2-7 – штами *K. pneumoniae* 4622на, 3785, 4622з, 4631нпл, 5054, 285; 8,9 – *K. rhinoscleromatis* 230, 1250н; 10,11 – *K. ozaenae* NN 5051, 5052; 12,13 – *K. planticola* 33531, 33558; 14 – *K. oxytoca* 13183. Доріжки 1 і 15 – маркери молекулярної маси, як на рис. 1.

Абсолютна ідентичність мала місце лише для двох культур: *K. pneumoniae* 285 і типового штаму *K. ozaenae* 5051 (рис. 3, доріжки 7 и 10). На жаль, другий типовий штам *K. ozaenae* 5052, одержаний нами із Колекції промислових культур (ГИСК, Москва), не типувався як *K. ozaenae* традиційними мікробіологічними методами (комп'ютерна ідентифікація штамів клебсієл за їхніми біохімічними властивостями) [1] і не виявляв типових для виду клебсієл REP-ПЛР-продуктів (рис. 3, доріжка 11).

Поки що залишається нез'ясованим, наскільки закономірним є виявлений нами збіг у REP-ПЛР-профілях *K. pneumoniae* 285 і *K. ozaenae* 5051. Характерно, що за загальним "мотивом" складу фрагментів до близькоспоріднених до вищезгаданих двох штамів можна віднести також і *K. pneumoniae* 3785 (рис. 3, доріжка 3). Ще два штами, *K. pneumoniae* 4622на і *K. planticola* 33531, мали певну подібність у загальному "мотиві" ПЛР-продуктів: мажорний фрагмент 700 н.п., три мінорні фрагменти з розмірами близько 1000, 1400 і 1600 н.п. при незначній гетерогенності області ПЛР-продуктів із розміром менше 500 н.п. (рис. 3, доріжки 2 і 12). Інші штами клебсієл, як

відзначалося, характеризувались значною варіабельністю складу ПЛР-продуктів, що свідчила про між- і внутрішньовидову гетерогенність їх геномів. Штам *K. oxytoca* 13183, що займає відособлене положення в таксономії клебсієл, за результатами REP-ПЛР аналізу теж виявляв свою неподібність, відрізняючись від інших культур наявністю незначної кількості фрагментів малих розмірів і слабкої інтенсивності (рис.3, доріжка 14).

Таким чином, одержані результати по ідентифікації клебсієл показали, що, з одного боку, REP-ПЛР аналіз різних штамів характеризувався деяким загальним набором продуктів ("мотивом"), що свідчив про їх безперечну родову близькість (особливо для штамів *K. rhinoscleromatis*), а, з другого боку, певною варіабельністю, що відповідала їх генетичній гетерогенності.

Отже, даний метод, очевидно, не може бути застосований для остаточної ідентифікації штамів бактерій різних видів клебсієл і повинен бути доповнений даними блот-гібридації.

Висновки. 1. ПЛР-опосередкований ДНК-фінгерпринтний аналіз бацил із використанням REP-праймерів є досить інформативним.

2. REP-ПЛР аналіз дозволив виявити генеральну родову і видову спорідненість більшості досліджуваних культур бацил, що підтвердилось і при використанні методу риботипування для ідентифікації досліджуваних штамів.

3. При використанні REP-ПЛР-опосередкова-

ного ДНК-фінгерпринтного аналізу для біотипування клібсіел спостерігали суттєву варіабельність у складі ПЛР-продуктів.

Поки що залишається нез'ясованим, наскільки закономірними є виявлені нами збіг чи розбіжність у REP-ПЛР-профілях досліджуваних культур клібсіел.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бойко Н. В. Комп'ютерна ідентифікація деяких штамів музею мікробних культур наукової мікробіологічної лабораторії УжДУ / Н. В. Бойко, М. В. Лисецька // Науковий вісник УжДУ, серія Біологія. – 1998. – №5. – С. 75–77.
2. Коваленко Н. К. Применение метода полимеразной цепной реакции для идентификации представителей рода *Enterococcus* / Н. К. Коваленко, Л. Н. Бурьяновский, В. С. Подгорский // Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58, № 5. – С. 96–100.
3. Козыровская Н. А. Молекулярно-биологические методы детекции и идентификации микроорганизмов в окружающей среде / Н. А. Козыровская, Г. Л. Ковтунович // Биополимеры и клетка. – 1994. – Т. 10. – № 34. – С.15–19.
4. Орешкова С. Ф. Идентификация и паспортизация штаммов микроорганизмов методом геномной дактилоскопии с использованием биотинилированной ДНК фага M 13 / С. Ф. Орешкова, О. В. Манохина, Л. И. Пучкова, В. Е. Репин, А. А. Ильичов // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 740–743.
5. Boye K. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers / K. Boye, E. Hogdall, M. Borre // Microbiological Research. – 1999. – № 154. – P. 23–26.
6. Brim H. Characterization of the bacterial community of a zink-polluted soil / H. Brim, H. Heuer, E. Krogerrecklenfort, M. Mergeay, K. Smalla // Can. J. Microbiol. – 1999. – № 45. – P. 326–338.
7. Bruijn F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melioli* isolates and other soil bacteria / F. J. Bruijn // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – Vol. 58, № 7. – P. 2180–2187.
8. Kuhn I. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of *Enterococci* / I. Kuhn, L. G. Burman, S. Haegman // Journal of Clinical Microbiology. – 1995. – Vol. 33. – P. 2812–2817.
9. Lupski J. R. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes / J. R. Lupski, G. M. Weinstock // Journal of Bacteriology. – 1992. – Vol. 174, № 14. – P. 4525–4529.
10. Matheson V. G. A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment / V. G. Matheson, J. Munakata-Marr, G. D. Hopkins // Ibid. – 1997. – Vol. 63, № 7. – P. 2863–2869.
11. Neuberger A. Clinical Impact of a PCR Assay for Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae* in Blood Cultures / A. Neuberger, I. Oren, H. Sprecher // J. Clin. Microbiol. – 2008. – № 46(1). – P. 377–379.
12. Otman J. Atypical phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from an outbreak in a neonatal intensive care unit in Brazil / J. Otman, M. E. Perugini, M. C. Tognim, M. C. Vidotto // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. – № (38). – P. 273–277.

SUMMARY

USAGE OF POLYMERASE CHAIN REACTION TO IDENTIFY SOME REPRESENTATIVES OF *BACILLUS* AND *KLEBSIELLA* GENERA

Koval H., Boyko N.

Usage of polymerase chain reaction method, we have conducted control identification of the following strains: *Bacillus subtilis*: 090, 091, 092 (promising as the base for biopreparations of selective action); 1106, 1109, 1110 (museum cultures); Kp60₁, Mp 92, 81 (isolated from the soil); 572, 94, 5₁290, 5₃102 (isolated from wastewater and air samples taken from Zakarpatska Oblast agroecosystems); 1_{TC}L₃ (isolated from the contents of a chicken's intestine) and clinical and museum cultures *Klebsiella rhinoscleromatis* 230, 30; *K. pneumoniae* 3785, 5054, *K. planticola* 33558, 33531; *K. terrigena* 80-07 – totally, 13 strains. REP-PCR analysis has enabled us to detect general generic and specific relationship between most of the studied bacilli cultures, that proved true when using ribotyping method to identify the studied strains. When using the REP-PCR-mediated DNA-fingerprint analysis for *Klebsiella* biotyping, the composition of PCR-products was observed to be significantly variable. So far, it remains uncertain to what extent the detected coincidence in the REP-PCR-profiles of the studied *Klebsiellae* cultures was regular.

Key words: PCR, identification, primers, *Bacillus*, *Klebsiella*