

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ШТАММОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ AFLP-ФИНГЕРПРИНТИНГА*

В.И. САФРОНОВА, Е.П. ЧИЖЕВСКАЯ, Е.Е. АНДРОНОВ

Объектом исследования были 16 штаммов из Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (ВКСМ), относящиеся к родам *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Целью работы была разработка методики генотипической паспортизации штаммов с помощью AFLP-фингерпринтинга, обеспечивающего детекцию нуклеотидного полиморфизма и мелких геномных перестроек. В результате исследований разработан протокол проведения AFLP-фингерпринтинга, начиная от выделения ДНК из клеток микроорганизмов и заканчивая компьютерной обработкой данных. Показано, что метод AFLP-фингерпринтинга обладает высокой штаммовой специфичностью, разрешающей способностью и воспроизводимостью результатов. Метод может быть использован для получения индивидуальных генетических паспортов микроорганизмов, депонируемых в ВКСМ, в целях защиты авторских прав на коммерческие штаммы.

Ключевые слова: микробиологическая коллекция, генетическая паспортизация коммерческих штаммов микроорганизмов, AFLP-фингерпринтинг.

Keywords: microbial collections, genotypic certification of microorganisms, AFLP-fingerprinting.

К важным задачам коллекционной работы относится идентификация и паспортизация культур микроорганизмов, которые необходимы для безопасного использования микробиологических ресурсов в биотехнологической отрасли (включая растениеводство, животноводство и пищевую промышленность), а также защиты авторских прав на коммерческие штаммы. Для этих целей в настоящее время привлекаются как методы, основанные на изучении физиолого-биохимических свойств штаммов, так и современные молекулярно-генетические методы, например BOX, ERIC, REP-PCR и AFLP-фингерпринтинг (1, 2). Различные варианты фингерпринтинга основаны на изучении геномной ДНК микроорганизмов для выявления индивидуальных особенностей штаммов, которые могут быть использованы при создании штамм-специфичных паспортов. AFLP-фингерпринтинг (amplified fragment length polymorphism) — один из наиболее перспективных приемов молекулярно-генетической паспортизации микроорганизмов. Метод заключается в анализе полиморфизма длин рестрицированных и амплифицированных фрагментов ДНК (3, 4). Его преимущество — очень высокая чувствительность, которая позволяет генерировать индивидуальные профили штаммов и различать их в пределах одного вида. Ранее с помощью AFLP-фингерпринтинга были успешно проведены исследования генетических различий между близкородственными штаммами клубеньковых бактерий, относящихся к разным родам (5-7).

В связи с этим наша цель заключалась в разработке методики генетической паспортизации штаммов, депонированных в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии, с помощью AFLP-фингерпринтинга.

Методика. Объектами исследования были 16 практически ценных штаммов из коллекции ВКСМ: *Rhizobium leguminosarum* (348, 700, 261 и

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» (Государственный контракт № 16.518.11.7095).

712), *Rhizobium galegae* 912, *Bradyrhizobium japonicum* 630, *Bradyrhizobium* sp. 820, *Bacillus thuringiensis* (626, 634, 603, 640 и 642), а также штаммы *Lactobacillus plantarum* (616, 621, 631 и 613). Штаммы клубеньковых бактерий культивировались при 28 °С на маннитно-дрожжевом агаре (УМА), *Bacillus thuringiensis* — на мясопептонном агаре (МПА), молочнокислые бактерии — на жидком сусле (8).

Общую ДНК клубеньковых бактерий выделяли по следующей методике: 1,5 мл ночной культуры клеток ризобий центрифугировали при 14000 об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера ТЕ (Трис-НСI — 10 ммоль/л, EDTA — 5 ммоль/л, рН 8,0). К суспензии добавляли лизоцим (1 мг/мл), инкубировали 5 мин при комнатной температуре, затем вносили SDS до концентрации 0,5 % и протеиназу К до концентрации 0,05 мг/мл и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Экстракцию проводили смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (24:24:1). ДНК осаждали двумя объемами этанола 5 мин при комнатной температуре. Раствор центрифугировали 2 мин при 14 000 об/мин и растворяли осадок в 100 мкл дистиллированной воды. В случае выделения ДНК из бактерий рода *Bacillus* и *Lactobacillus* вводили стадию предварительной обработки протеиназой К в концентрации 0,05 мг/мл при 60 °С в течение 1 ч, при необходимости для разрушения клеток суспензию встряхивали со стеклянными шариками в гомогенизаторе FastPrep24 («MP Biomedicals», США) при максимальной мощности в течение 1 мин. Окончательную очистку проводили, как описано выше.

Полученную геномную ДНК (50 нг) использовали для одновременной реакции рестрикции и лигирования. В состав реакционной смеси входили по 2,5 ед. рестриктаз MseI и EcoRI («МБИ Fermentas», Литва), 1 ед. лигазы фага T4 («МБИ Fermentas», Литва), два олигонуклеотидных адаптера — для сайта EcoRI (adEco1 CTCGTAGACTGCGTACC и adEco2 AAT-TGGTACGCAGTCTAC) и для сайта MseI (adMse1 GACGAGAGTCCTG-AG и adMse2 TACTCAGGACTCAT) в количестве 5 пмоль каждого. Реакцию проводили в буфере для лигазы («МБИ Fermentas», Литва) при 37 °С в течение 16 ч.

В финальной амплификации, результатом которой были геномные фингерпринты, в качестве матрицы использовали 1 мкл реакционной смеси, полученной на предыдущей стадии, и селективные праймеры (по одному для каждого адаптера, флуоресцентно меченного красителем FAM): Mse_a GA-TGAGTCCTGAGTAAA, Mse_cg GATGAGTCCTGAGTAACG или Mse_ca GATGAGTCCTGAGTAACA — для сайта MseI; Eco_0 GACTGC-GTACCAATT или Eco_a GACTGCGTACCAATTCA — для сайта EcoRI (по 10 пмоль каждого). Для поиска оптимального сочетания испытывали все возможные комбинации MseI/EcoRI селективных праймеров. Предварительную оценку результата проводили в агарозном 3 % геле, финальную — в условиях автоматического капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3500xl («Applied Biosystems», США). В смесь для электрофоретического разделения добавляли также интернальный маркер молекулярной массы GeneScan-600 LIZ Size Standard («Applied Biosystems», США).

При сопоставлении фингерпринтов использовали программу FPQuest («Bio Rad», США). Исходным материалом для анализа служили файлы, полученные после электрофоретического разделения фрагментов и содержащие кривые, которые соответствовали фрагментам AFLP (FAM) и стандарту молекулярной массы (LIZ). Файлы предварительно экспортировали в TIFF-формат.

Степень сходства между фингерпринтами оценивали по корреля-

ции Пирсона, ориентированной скорее на поиск общего сходства между кривыми, чем на поиск фрагментов одинакового размера.

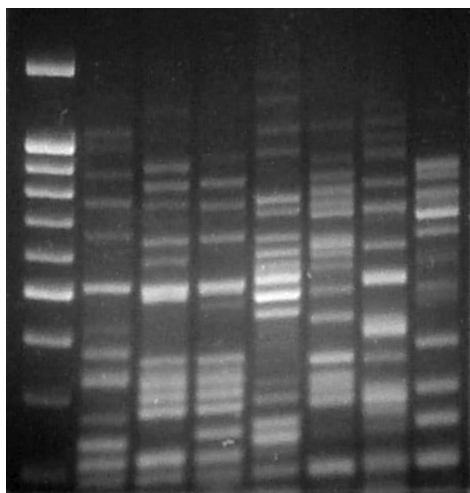


Рис. 1. Предварительный электрофорез в 3 % агарозном геле AFLP-фрагментов ДНК ризобий, полученных с использованием селективных праймеров Mse_{ca}/Eco_a.

Результаты. Из всех проанализированных штаммов мы выделили геномную ДНК, концентрация и степень очистки которой были достаточными для проведения AFLP. Реакции рестрикции и лигирования с адаптерами дали отличный результат, так как при использовании рестриционно-лигазной смеси в качестве матрицы на завершающем этапе AFLP-ПЦР для всех проанализированных микроорганизмов получили высокоспецифичные профили. В результате изучения разных комбинаций селективных праймеров была отобрана пара Mse_{ca}/Eco_a как дающая оптимальное соотношение количества и специфичности фрагментов (рис. 1).

Обработка полученных данных в программе FPQuest позволила эффективно выравнивать фингерпринты, вычислить степень их родства и провести кластерный анализ, включающий статистическую поддержку кластеризации. На первом этапе была построена дендрограмма родства, объединяющая все полученные данные, включая различные штаммы и разные объемы смеси фрагментов, использованные при электрофорезе (1; 0,5; 0,25 или 0,1 мкл) с целью подбора оптимального соотношения для обеспечения эффективного разделения и элиминации эффектов, связанных с перегрузкой или недостаточным количеством внесенного материала (рис. 2).

Анализ полученных данных показал, что за исключением штаммов, имеющих высокий уровень сходства (штаммы 621, 616, 631 и 613 *Lactobacillus*; 626/634 и 640/642 *Bacillus thuringiensis*), фингерпринты группируются строго по штаммам, демонстрируя очень высокое сходство между профилями, соответствующими разным количествам AFLP-смеси и принадлежащим одному и тому же штамму. На основании сопоставления результатов было продемонстрировано, что в проводимом эксперименте оптимальное для нанесения в генетический анализатор количество соответствует 0,1 мкл смеси AFLP. Поэтому для финального сравнения выбрали именно эти образцы с наименьшей концентрацией (рис. 3). Их анализ выявил очевидные различия в наборах фрагментов ДНК, что свидетельствует об очень высокой чувствительности метода, который позволяет получать уникальные профили для каждого штамма и дискриминировать их в пределах одного вида. Тем не менее, несмотря на очень высокую специфичность метода, кластерный анализ AFLP-профилей позволяет достаточно четко группировать штаммы в соответствии с их филогенетическим родством. На дендрограмме (см. рис. 3) штаммы ризобий (348, 912, 630, 820, 700, 261 и 712), штаммы *Bacillus* (626, 634, 603, 640 и 642), а также штаммы *Lactobacillus* (616, 621, 631 и 613) образуют обособленные группы. Среди проанализированных клубеньковых бактерий пять штаммов — 348 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), 912 (*Rhizobium galegae*), 630 (*Bradyrhizobium japonicum*), 820 (*Bradyrhizobium* sp.), 700 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) оказались вне кластеров (уровни сходства менее 30 %). Другие два штамма

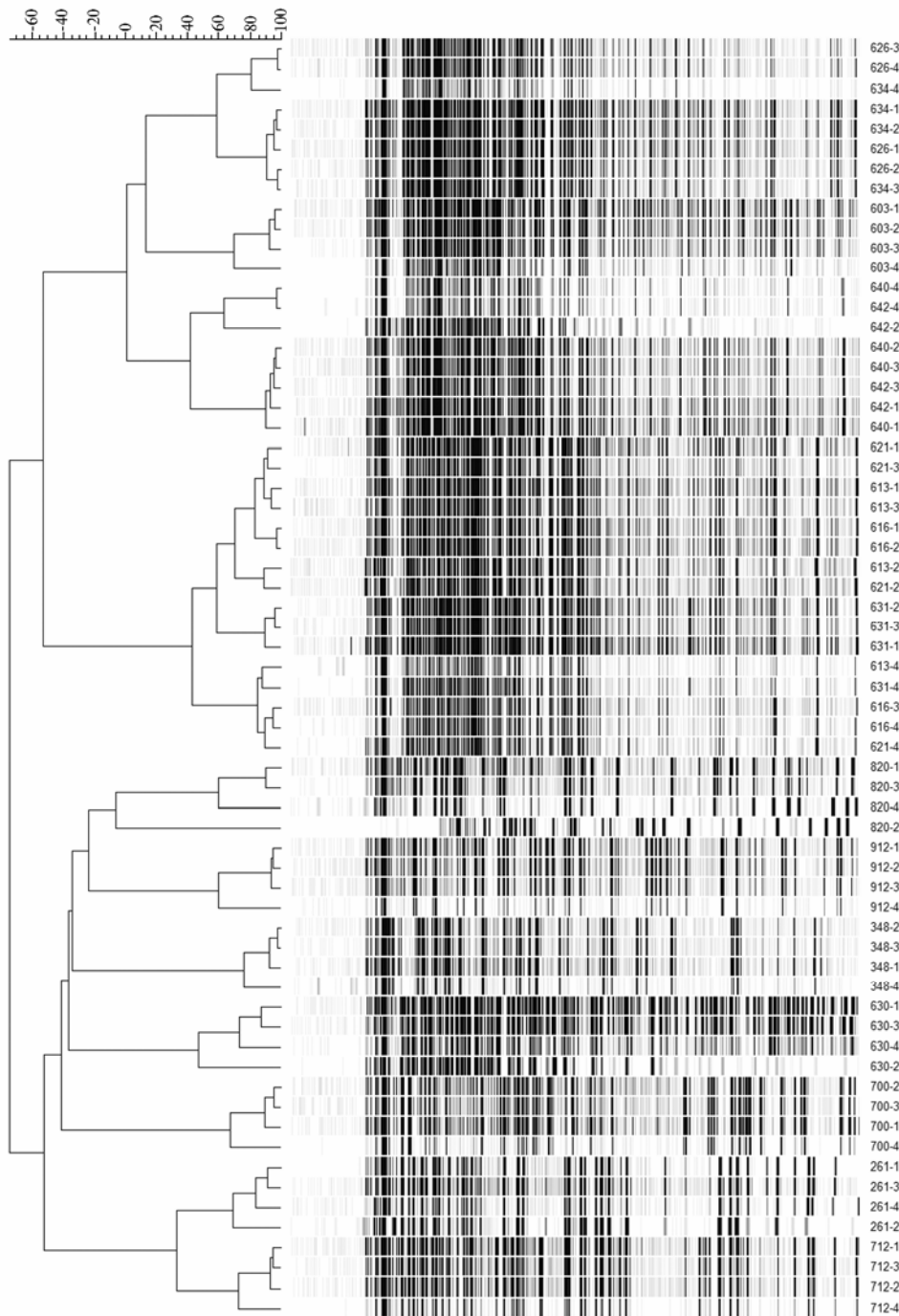


Рис. 2. Сопоставление всех данных (все штаммы микроорганизмов и все количества), полученных при разделении AFLP-фрагментов на генетическом анализаторе (ABI 3500xl, «Applied Biosystems», США): 1 — 1 мкл, 2 — 0,5 мкл, 3 — 0,25 мкл, 4 — 0,1 мкл.

ризобий (261 и 712 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*), как и штаммы *Bacillus* и *Lactobacillus*, могут быть отнесены к отдельным группам, поскольку степень сходства более 50 % достаточна для статистически достоверного

разделения кластеров (9, 10).

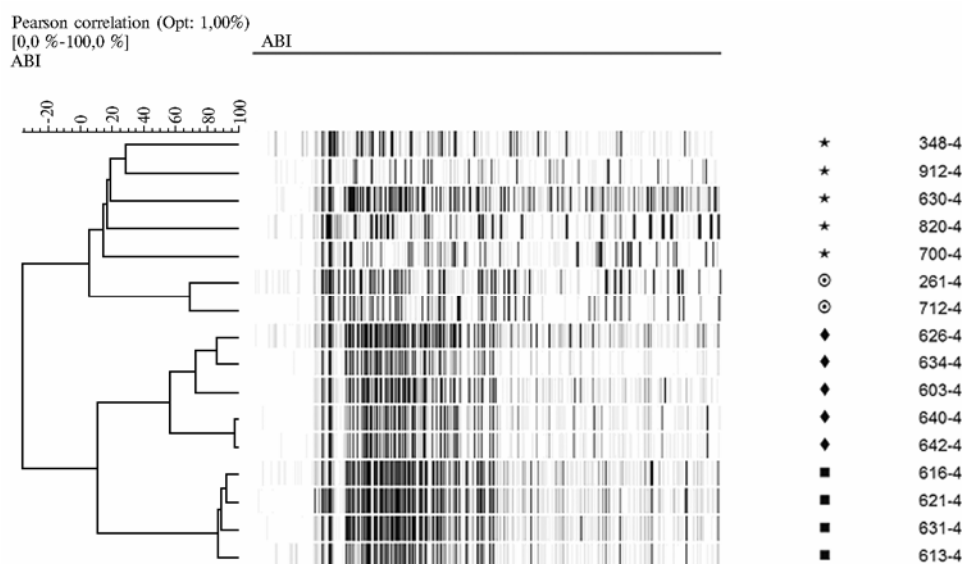


Рис. 3. Сопоставление данных AFLP-фингерпринтинга, соответствующих внесению 0,1 мкл смеси, для всех проанализированных штаммов.

Таким образом, метод AFLP-фингерпринтинга продемонстрировал высокую разрешающую способность при проведении как внутривидовой, так и межвидовой дифференциации генотипов. Метод характеризуется высокой воспроизводимостью, наличием ряда эффективных подходов к анализу полученных данных и может с успехом применяться в растениеводстве, ветеринарии и в пищевой промышленности для молекулярно-генетической характеристики практически ценных штаммов микроорганизмов. Результаты исследования будут использованы для стандартизации процедуры проведения комплексной доказательной паспортизации штаммов сельскохозяйственных микроорганизмов, депонированных в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (ВКСМ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Vinuesa P., Rademaker J.L.W., De Bruijn F.J., Werner D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2096-2104.
2. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 1995, 23: 4407-4414.
3. Willems A., Doignon-Bourcier F., Coopman R., Hoste B., De Lajudie P., Gillis M. AFLP fingerprint Analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *System. Appl. Microbiol.*, 2000, 23: 137-147.
4. Paun O., Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 862: 75-87.
5. Wdowiak-Wróbel S., Małek W. Genomic diversity of *Astragalus cicer* microsymbionts revealed by AFLP fingerprinting. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2005, 51: 369-378.
6. Safronova V., Chizhevskaya E., Bullitta S., Andronov E., Belimov A., Charles T.C., Lindström K. Presence of a novel 16S-23S rRNA gene intergenic spacer insert in *Bradyrhizobium canariense* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, 269: 207-212.
7. Aserse A.A., Räsänen L.A., Assefa F., Hailemariam A., Lindström K. Phy-

logeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. Syst. Appl. Microbiol., 2012, 35: 120-131.

8. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов: Метод. реком. СПб, 2007.
9. Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 1996, 142: 1881-1893.
10. Willems A., Doignon-Bourcier F., Coopman R., Hoste B., De Lajudie P., Gillis M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. System. Appl. Microbiol., 2000, 23: 137-147.

ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
196608 г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: v.safronova@rambler.ru

Поступила в редакцию
25 мая 2012 года

OPTIMIZATION OF THE AFLP-FINGERPRINTING METHOD FOR A MOLECULAR-GENETIC CERTIFICATION OF AGRICULTURAL MICROORGANISMS

V.I. Safronova, E.P. Chizhevskaya, E.E. Andronov

Summary

The study involved 16 strains of the Russian collection of agricultural microorganisms (RCAM) related to the genera *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhizobium*, and *Bradyrhizobium*. The aim of the work was to develop a procedure of the genotypic certification of strains with AFLP-fingerprinting (amplified fragment length polymorphism), providing detection of nucleotide polymorphisms and small rearrangements. As a result the protocol of AFLP-fingerprinting, ranging from the isolation of DNA from microbial cells and ending with computer data processing is developed. It is shown that the method of AFLP-fingerprinting has a high specificity, resolution and reproducibility of results. This method can be used to obtain individual genetic passports of microorganisms deposited in the RCAM, in order to protect the copyright of the commercial strains.

**Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология»
выполняет рассылку электронных отписок опубликованных статей**

Для получения электронного отписка Вам необходимо:

- ❖ отослать точное описание заказа (авторы и название статьи, год, номер журнала, страницы) по адресу agrobiol@mail.ru, указав Ваши фамилию, имя, отчество (полностью), город, где проживаете, контактные e-mail и телефон;
- ❖ получить из редакции по своему контактному e-mail подтверждение заказа (с присвоенным ему номером);
- ❖ оплатить услугу, указав в платежном документе в графе «Назначение платежа» присвоенный заказу номер и Ваши фамилию, имя, отчество.

Отписки высылаются на Ваш контактный e-mail после зачисления оплаты на счет редакции.

Банковские реквизиты редакции:

Получатель:

ИНН 7708051012 Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология», Марьиноорошинское ОСБ 7981, г. Москва, р/с 40703810638050100603

Банк получателя:

Сбербанк России ОАО г. Москва, БИК 044525225, к/с 30101810400000000225

В назначении платежа укажите номер заказа, Ваши фамилию, имя, отчество.

Стоимость услуги:

- ❖ один отиск — 120 руб.,
- ❖ не более шести отписок (абонемент) — 360 руб.,
- ❖ не более двенадцати отписок (абонемент) — 700 руб.

Цены приведены с учетом НДС 10 %. Абонементное обслуживание предполагает предоставление указанного числа отписок за период не более каждого текущего года по предоплате.

E-mail для заказа электронных отписок — agrobiol@mail.ru

© Электронные отписки являются интеллектуальной собственностью редакции журнала «Сельскохозяйственная биология». Внесение в них каких бы то ни было изменений и дополнений не допускается. Перепечатка, тиражирование, размещение в средствах информации, в том числе электронных и сети Интернет, а также коммерческое распространение возможны только с разрешения редакции.