

# **СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ КАМЧАТКИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ МОРЕЙ**

Материалы V научной конференции.  
Петропавловск-Камчатский, 22-24 ноября 2004 г.

---

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА АМПЛИФИЦИРОВАННОГО ГЕНА 16S РНК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МОРСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРМОЛАБИЛЬНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ**

*Identification of sea producers of heat-labile alkaline phosphatase using restriction analysis of genes coding 16S RNA as a method for investigation of biodiversity*

**Ю.П.Зернов, М.А.Абдурашитов, С.Х.Дегтярев**  
**Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН,**  
**Новосибирск**

Наряду с традиционными методами идентификации микроорганизмов с использованием культуральных и морфологических характеристик, а так же химических и биохимических реакций, в последнее время все более широкое применение находят методы сравнения нуклеотидных последовательностей различных генов микроорганизмов и анализ полиморфизма длинны фрагментов рестрикции ДНК, полученной в результате амплификации отдельных генов бактерий. Наиболее универсальными для идентификации являются гены, кодирующие 16S и 23S РНК, поскольку присутствуют во всех бактериальных клетках и являются достаточно консервативными.

Из природных изолятов морской воды, взятых в районе островов Старичков, Топорков и Крашенинникова, а также в бухте Бечевинская, нами были выделены четыре штамма-продуцента термолабильной фосфатазы. 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 АТ- 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, 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.

Электрофоретическое разделение продуктов рестриктолиза проводили в 2% агарозе, а для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярного веса ДНК.

Было проведено сравнение полученных картин рестрикции с аналогичными картинками рестрикции генов 16S РНК ряда представителей рода *Alteromonas*, находящихся в генетическом банке секвенированных последовательностей ДНК. На основании сравнения сделан вывод, что найденные продуценты относятся к роду *Alteromonas*.

Таким образом, предложенная комбинация эндонуклеаз рестрикции для расщепления продукта гена 16S РНК в совокупности с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей может оказаться достаточно простым и универсальным способом идентификации микроорганизмов. Кроме того, метод рестрикционного анализа гораздо менее чувствителен к наличию примесей по сравнению с полимеразной цепной реакцией, используемой для определения последовательности продукта гена 16S РНК. Относительная простота и дешевизна метода, как нам представляется, является существенным для организации мониторинга биоразнообразия микрофлоры района и изучения устойчивости данного микробного сообщества.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Grimont, F., Grimont, P. A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 137. P.165-175.

Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations // Int. J. Syst. Bacteriol. Vol.45. P.755-761.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., DeVos, P., Claeys, G., Verchraegen, G. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis // J. Clin. Microbiol. Vol.33. P.11-15.

Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A.D., Bouvet, A. 2003. Identification of major *Streptococcal* species by *rrn*-amplified ribosomal DNA restriction analysis // J. Clin. Microbiol. Vol.41. P.657-666.

Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., Sjostedt, S. 1996. Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria // J. Clin. Microbiol. Vol.34. P.2894-2896.