

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА АНАЛИЗА ПЛАВЛЕНИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ (HRM) ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *L. sakei* И *L. curvatus*

Курбаков К.А.; Минаев М.Ю., канд. техн. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова», г. Москва

Аннотация. В данной работе была рассмотрена возможность идентификации и дифференциации двух близкородственных видов микроорганизмов *L. sakei* и *L. curvatus* методом ПЦР с последующим HRM анализом. В эксперименте с разработанной парой праймеров ДНК, выделенные из музейных штаммов *L. sakei* 12.1 и *L. curvatus* 11.1, достоверно дифференцировались методом HRM анализа.

Введение. В целях контроля видового состава стартовых культур возникает необходимость обнаружения широкого спектра видов микроорганизмов: так, в России в мясной промышленности при производстве бактериальных препаратов могут использоваться порядка 10ти видов микроорганизмов. Метод ПЦР является наиболее перспективным для этих целей, так как обладает высокой специфичностью и при этом не требует выделения чистых культур микроорганизмов, однако, при таком количестве целевых объектов, он всё равно является затратным как финансово, так и по времени. Таким образом, необходим специальный подход, позволяющий оптимизировать исследование микробиологического состава стартовых культур. Ранее нами рассматривался поэтапный подход, когда на первом этапе мы определяли филогенетические группы микроорганизмов препарата, после чего проводилась ПЦР с праймерами, видоспецифическими к входящим в данные группы микроорганизмам.

Тем не менее, некоторые целевые микроорганизмы, такие как *L. sakei* и *L. curvatus*, находятся в крайне близком филогенетическом родстве [1], из-за чего мы сделали предположение, что возможно подобрать такую пару праймеров, которая была бы специфична только этим двум видам, но при этом на участке ДНК, ограничиваемом данной парой, находилась бы однонуклеотидная замена, достоверно отличающая эти виды. Наиболее простым методом, выявляющим однонуклеотидные замены на целевом участке ДНК, является HRM-анализ, который был предложен Wittwer в 1997 году [2]. Однако, как правило, исследования данным методом проводятся для объектов, принадлежащих к одному виду.

Нами было изучены по базе данных NCBI четыре геномных прочтения достаточной длины четырёх штаммов *L. sakei* и двух – *L. curvatus*. Не смотря на ограниченную выборку, данные изоляты были получены из различных географических регионов и источников выделения [1,3–7], что позволяет предположить, что последовательность нуклеотидов на выбранных нами участках геномов будет стабильна.

В данной работе мы рассмотрели возможность идентификации и дифференциации видов *L. sakei* и *L. curvatus* при помощи ПЦР в реальном времени с последующим HRM анализом.

Объекты и методы. Объектами исследования данной работы являлись лабораторные музейные штаммы *L. sakei* 12.1 и *L. curvatus* 11.1.

Выделение ДНК

Перед выделением ДНК культуры штаммов разводили в физиологическом растворе в концентрации 5McF. Для выделения ДНК отбирали 200мкл полученных растворов.

Выделение ДНК из препаратов и изолированных колоний проводили с использованием магнитных частиц на станции выделения ДНК MagNA Pure LC 2.0 Instrument (Roche, Germany), при помощи набора MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) (Roche, Germany) с предварительным лизисом и отмывкой на хлороформе при помощи реактивов набора Сорб-ГМО-Б (Синтол, Россия) согласно инструкциям.

Секвенирование участка гена RNAP A выделенных изолятов.

Для разработки пары праймеров для идентификации и дифференциации *L. sakei* и *L. curvatus* по результатам анализа базы данных NCBI нами был выбран ген субединицы α ДНК-зависимой РНК полимеразы (RNAP A). Чтобы подтвердить целесообразность его применения, было проведено секвенирование целевого участка данного гена музейных штаммы *L. sakei* 12.1 и *L. curvatus* 11.1.

Для получения ампликонов для дальнейшего секвенирования использовали разработанную нами пару праймеров с длиной получаемого ампликона – 291 bp.

Определение нуклеотидной последовательности полученных ампликонов проводилось ООО «Евроген» (Россия). Полученная нуклеотидная последовательность была выравнена при помощи базы данных NCBI с соответствующим участком генома *Lactobacillus sakei* strain 23K (GenBank: CR936503.1 locus_tag="LCA_RS08655") и *Lactobacillus curvatus* strain NRIC0822 (GenBank: JTJV01000011.1 locus_tag="OA78_0535").

Подбор праймеров для ПЦР с последующим HRM анализом

При помощи программ Primer-BLAST и OligoAnalyzer 3.1 была подобрана специфическая к микроорганизмам видов *L. sakei* и *L. curvatus* пара праймеров, длина получаемого ампликона – 96 bp, что оптимально для проведения HRM анализа[8].

Расчёт температур плавления получаемых ампликонов *in silico* проводили при помощи программы uMeltSM <https://dna.utah.edu/umelt/um.php> с применением термодинамической модели Blake & Delcourt.

Условия проведения ПЦР в реальном времени с последующим анализом кривых плавления высокого разрешения (HRM анализ).

ПЦР в реальном времени и HRM анализ проводили на амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Germany) с использованием набора LightCycler 480 HRM Master. Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала 10,0 мкл Master Mix, 2х концентрации с красителем ResoLight, MgCl₂ концентрацией 2,5 mM, праймеры

в концентрации 0,3 мМ и 1,5 мкл ДНК. Реакция проходила на амплификаторе LightCycler 96 (Roche, США). Условия ПЦР включали предварительную денатурацию при 95°C – 420 сек. и 45 циклов амплификации (60°C – 15 сек., 72°C – 15 сек., 95°C – 15 сек.).

Режим HRM – 20 чтений на 1°C. Анализ кривых плавления проводили при помощи программы LightCycler® 96 Instrument Software, Version 1.1.1.

Результаты исследований

Секвенирование гена RNAP A музейных штаммов

Была проведена ПЦР с ДНК музейных штаммов разработанной нами парой праймеров для секвенирования целевого участка гена RNAP A *L. sakei* 12.1 и *L. curvatus* 11.1. В дальнейшем было проведено секвенирование полученных ампликонов.

Полученные последовательности при помощи программы Clustal Omega <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-I20160218-143428-0398-24015396-pg> выровняли с соответствующими участками геномов *L. sakei* strain 23K и *L. curvatus* strain NRIC0822. Результаты выравнивания представлены на рисунке 1.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

gi|81427616:1724342-1724557      ACATCAAGTGTTAACTTGTGCGAAATCGTTACGACGACCAACACGTGACTTTCTACTTGA  1
L_sakei_12.1                    ACATCAAGTGTTAACTTGTGCGAAATCGTTACGACGACCAACACGTGACTTTCTACTTGA  2
L_curvatus_11.1                 ACATCAAGTGTTAACTTGTGCGAAATCGTTACGACGACCAACACGTGACTTTCTACTTGA  3
gb|JTV01000011.1|:35937-36152  ACATCAAGTGTTAACTTGTGCGAAATCGTTACGACGACCAACACGTGACTTTCTACTTGA  4
*****

gi|81427616:1724342-1724557      TAGTTGACACGACTGATTGGGGTATAAATTGAGTCGATTGGTAAAACACCAATTGGCATA  1
L_sakei_12.1                    TAGTTGACACGACTGATTGGGGTATAAATTGAGTCGATTGGTAAAACACCAATTGGCATA  2
L_curvatus_11.1                 TAGTTGACACGACTGATTGGGGTATAAATTGAGTCGATTGGTAAAACACCAATTGGCATA  3
gb|JTV01000011.1|:35937-36152  TAGTTGACACGACTGATTGGGGTATAAATTGAGTCGATTGGTAAAACACCAATTGGCATA  4
*****

gi|81427616:1724342-1724557      TCGTCTGACTTGTTTGAACAGCAGCAACATAACCACGGCCTTTTTAACTGTCATTGCG  1
L_sakei_12.1                    TCGTCTGACTTGTTTGAACAGCAGCAACATAACCACGGCCTTTTTAACTGTCATTGCG  2
L_curvatus_11.1                 TCGTCTGACTTGTTTGAACAGCAGCAACATAACCACGGCCTTTTTAACTGTCATTGCG  3
gb|JTV01000011.1|:35937-36152  TCGTCTGACTTGTTTGAACAGCAGCAACATAACCACGGCCTTTTTAACTGTCATTGCG  4
*****

gi|81427616:1724342-1724557      ACGTGGAAATTGCCGCCTTC  1
L_sakei_12.1            ACGTGGAAATTGCCGCCTTC  2
L_curvatus_11.1        ACGTGGAAATTGCCGCCTTC  3
gb|JTV01000011.1|:35937-36152  ACGTGGAAATTGCCGCCTTC  4
*****

```

Рис.1. Результат выравнивания прочтений полученных ампликонов с соответствующими участками гена RNAP A штаммов, представленных в базе данных NCBI, красным цветом выделены однонуклеотидные замены:

1 – *Lactobacillus sakei* strain 23K (GenBank: CR936503.1 locus_tag="LCA_RS08655"); 2 – музейный штамм *L. sakei* 12.1; 3 – музейный штамм *L. curvatus* 11.1; 4 – *Lactobacillus curvatus* strain NRIC0822 (GenBank: JTV01000011.1 locus_tag="OA78_0535")

Последовательности, полученные при секвенировании данного участка геномов музейных штаммов, полностью совпали с аналогичными у штаммов, последовательности которых были представлены в NCBI.

Проведение ПЦР с последующим HRM анализом

Нами была подобрана пара праймеров с необходимой разрешающей способностью и специфичностью, длина ампликона была оптимальна для проведения HRM анализа, которая в нашем случае составила 96bp [8].

На участке ДНК, амплифицируемом полученными праймерами, располагались две видоспецифичные замены – Т и А у *L. sakei* на А и G у *L. curvatus* соответственно, расчёт с использованием программы uMelt показал разницу температур плавления ампликонов $\Delta T_m = 0,5$ °С.

Для постановки ПЦР-реакции с последующем HRM анализом были взяты в трёх повторностях ДНК музейных штаммов. Результаты HRM анализа представлены на рисунках 2 а,б.

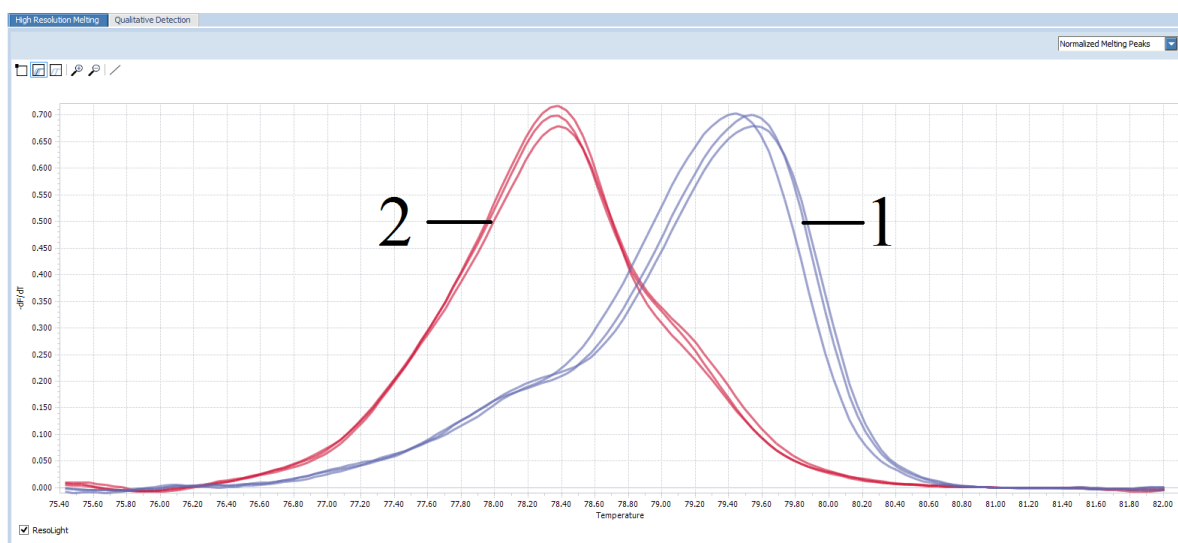


Рис. 2а. Производные кривых плавления ампликонов, полученных в ходе ПЦР с ДНК музейных штаммов

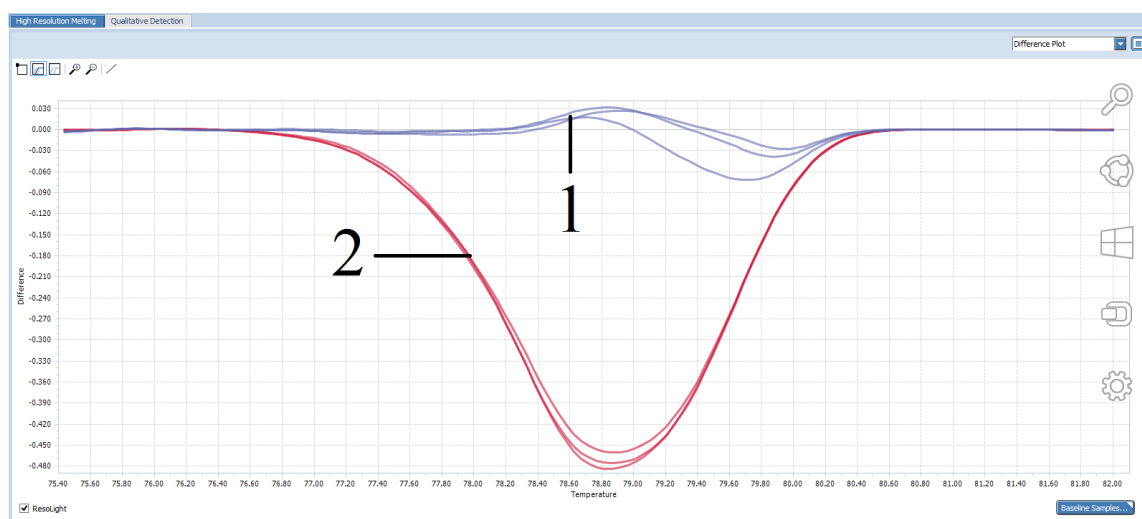


Рис. 2б. Разница температур кривых плавления ампликонов, полученных в ходе ПЦР с ДНК музейных штаммов: 1 – *L. curvatus* 11.1, 2 – *L. sakei* 12.1

Как видно на рис. 2а, производные кривых плавления продуктов амплификации ДНК чётко делятся на два кластера: в первом кластере находятся кри-

вые плавления, характерные для *L. curvatus*, во втором – *L. sakei*. Визуализация разницы температур плавления ΔT_m хорошо видна на рисунке 1b, ΔT_m составила $4,5^\circ\text{C}$, что согласуется с предварительными расчётами. Данное значение хорошо детектируется современными амплификаторами с функцией HRM анализа.

Выводы.

В данной работе мы рассмотрели метод HRM анализа в целях разработки мультиплексной реакции для обнаружения и дифференциации двух родственных видов микроорганизмов на примере *L. sakei* и *L. curvatus* исходя из предположения, что различные участки геномов целевых микроорганизмов могут отличаться по однонуклеотидным заменам, стабильным для каждого вида. Данное предположение мы сделали исходя из анализа последовательности базы данных NCBI и прочтения целевых участков геномов лабораторных музейных штаммов. Это было экспериментально подтверждено проведением успешной ПЦР с последующим HRM анализом с разработанной нами парой праймеров. Следует отметить, что данным методом мы подтвердили не только целевые виды изолированных культур, но и смогли обнаружить их в составах комплексных бактериальных препаратов.

Литература

1. Cousin F.J. и др. Detection and Genomic Characterization of Motility in *Lactobacillus curvatus*: Confirmation of Motility in a Species outside the *Lactobacillus salivarius* Clade // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Т. 81, № 4. С. 1297–1308.
2. Wittwer C.T. и др. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification // *Biotechniques.* 1997. Т. 22, № 1. С. 130–138.
3. Chaillou S. и др. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. // *Nat. Biotechnol.* 2005. Т. 23, № 12. С. 1527–1533.
4. Mcleod A., Brede A., Rud I. Genome sequence of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* LS25, a commercial starter culture strain for fermented sausage // *Genome Announc.* 2013. Т. 1, № 4. С. 2006–2007.
5. http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=1096 [Электронный ресурс]. URL: http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=1096.
6. Lim H.I. и др. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus sakei* Strain wikim 22, Isolated from Kimchi in Chungcheong Province, South Korea. 2014. Т. 2, № 6. С. 195–196.
7. Hebert E.M. и др. Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. // *J. Bacteriol.* 2012. Т. 194, № 2. С. 538–539.
8. Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations // *Human Mutation.* 2009. Т. 30, № 6. С. 857–859.