

Е.Н. Бирюк<sup>1</sup>, Е.Н. Сысолятин<sup>2</sup>, К.К. Яцевич<sup>2</sup>, Д.В. Галиновский<sup>2</sup>,  
Н.Н. Фурик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOCOCCUS*

**Реферат.** В работе проведена оценка методов внутривидовой генотипической дифференциации бактерий вида *Lactococcus lactis*. Установлено, что наиболее эффективны методы Rep- и RAPD-ПЦР. Метод риботипирования (ITS-RFLP) оказался непригодным для внутривидовой дифференциации бактерий данного вида. В результате генотипирования коллекционные штаммы бактерий (20 штаммов) были разделены на четыре генетически гетерогенные группы.

**Введение.** До недавнего времени при составлении консорциумов из штаммов молочнокислых бактерий для создания бактериальных заквасок и концентратов использовались только биохимические, микробиологические и органолептические методы оценки. Побочным результатом такого подхода становится высокая генетическая однородность культур в заквасочном консорциуме. Это может быть причиной периодически возникающих технологических проблем, связанных, прежде всего, с нарушением ферментации из-за поражения бактерий высоковирулентными формами бактериофагов. В связи с этим, при составлении новых заквасочных консорциумов, устойчивых к фагам, целесообразно использовать генетически гетерогенные культуры лактококков. Молекулярное типирование позволяет дифференцировать штаммы по генотипу и составлять перспективные заквасочные консорциумы. Использование культур в составе консорциумов, которые имеют низкий уровень внутривидового генетического родства, стабилизирует их производственно-ценные свойства (газо-, ароматообразование, кислотообразование, фагоустойчивость и т.д.), что в свою очередь, обеспечит гарантированное получение ферментированных продуктов высокого качества.

В настоящее время разработаны различные методики ДНК-типирования, основанные на полимеразной цепной реакции: specific PCR, RAPD-PCR, PCR-DGGE, RFLP, AFLP, species-specific PCR и др. [1-

7]. Данные методы успешно применяются для типирования различных групп бактерий, в том числе и молочнокислых. Цель данной работы – подбор метода генетической дифференциации бактерий *Lactococcus lactis* и типирование коллекционных культур лактококков данным методом.

#### **Материалы и методы исследования.**

В экспериментах использовали 20 коллекционных культур лактококков, краткое описание которых приведено в таблице 1.

##### *Выделение общей ДНК.*

Выделение ДНК проводили методом лизиса в присутствии Chelex 100 (хелатирующий агент, который связывает двухвалентные катионы и таким образом инактивирует нуклеазы). С этой целью клетки исследуемого штамма ресуспендировали в суспензии 5 % Chelex® 100 (1 колония на 50 мкл). Затем образцы выдерживали на кипящей водяной бане в течение 5 минут, после чего сразу же охлаждали в тающем льду в течение 5 мин. Для обеспечения надежного лизиса процедуру кипячения-охлаждения повторяли. Смолу Chelex® 100 осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 4 мин. Надосадочную жидкость переносили в новые пробирки и хранили при температуре не выше минус 18 °С до использования в ПЦР реакции. В ПЦР использовали 0,5 мкл супернатанта.

##### *Проведение риботипирования (ITS-RFLP).*

Для амплификации 16S-23S спейсера использовали пару праймеров sp1 и sp2 (по 30 пмолей), гомологичных консервативным последовательностям генов 16S и 23S рРНК соответственно.

Реакцию начинали денатурацией при 95 °С в течение 4 мин, затем следовало 30 циклов, состоящих из инкубаций: 94 °С – 1 мин, 55 °С – 3 мин, 72 °С – 2 мин и завершающая элонгация при 72 °С в течение 5 мин. Продукты амплификации анализировали с помощью гель-электрофореза как непосредственно, так и после обработки рестриктазами *AluI*, *TaqI*, либо «смесью» рестриктаз *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NotI*, *PstI* (“Fermentas”, Литва).

Таблица 1 – Коллекционные культуры, использованные в работе

Паспортный номер	Видовая принадлежность штамма	Источник выделения
1	2	3
37 М-А	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Молоко сырое, г. Сморгонь, Гродненская. обл.

1	2	3
454 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Хвоя, г. Волковыск, Волковысский р-н, Гродненская. обл.
973 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Хвоя, г. Шклов, Могилевская. обл.
1240 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Творог домашний, г. Кричев
1265 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Творог домашний, г. Столбцы, Минская обл.
1559 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Ромашка, г. Клецк, Мин. обл.
1822 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Сирень (побег), г. Минск
1882 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Василек, г. Кричев, Могилевская обл.
2025 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Яблоко, г. Брест
2344 M-A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Ель (хвоя), д. Василевщина, Березинский р-н, Минская обл.
480 M-AD	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Сыр домашний, г. Смоленск
942 M-AD	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Яблоко, г. Клецк, Минская. обл.
1335 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Хвоя, г. Лепель, Витебская обл.
1669 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Творог домашний, г. Орша, Витебская обл.
1940 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Черноплодная рябина (цв.), г. Кричев, Могилевская обл.
1945 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Сирень (побеги), г. Кричев, Могилевская обл.
1947 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Волчьи ягоды, г. Кричев, Могилевская обл.
2067 M-AD	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Яблоко, г. Ошмяны, Гродненская обл.
17 M-AD	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Яблоко, г. Фаниполь, Минская обл.
705 M-ADG	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	Творог дом., г. Пружаны, Брестская обл.

#### Проведение Rep-ПЦР.

ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X ПЦР буфера, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP; 60 пкмоль праймера, 1 U Taq-полимеразы (Диалат, Москва) и 0,5 мкл клеточного лизата в качестве матрицы. В исследовании использовали праймеры ERIC 1R-1, ERIC 2-1, BOX A1R.

Аmplификацию осуществляли поэтапно. В случае с праймерами ERIC 1R-1 и ERIC 2-1, начинали реакцию плавлением ДНК при 95 °С в течение 5 мин., первый этап включал в себя 4 цикла: 95 °С – 1 мин, 40 °С – 5 мин, 68 °С – 8 мин; а второй этап – 30 циклов: 94 °С – 30 сек, 51 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин. Реакцию с праймером BOXA1R также начинали плавлением ДНК при 95 °С в течение 5 мин., первый этап включал в себя

4 цикла: 95 °С – 1 мин, 40 °С – 5 мин, 68 °С – 8 мин; а второй этап включал 30 циклов: 94 °С – 1 мин, 65 °С – 2 мин, 72 °С – 2 мин. В обоих случаях реакции завершали элонгацией при 72 °С в течение 5 мин.

#### *Проведение RAPD-ПЦР*

При проведении RAPD-ПЦР использовали праймеры P15 и P16. Реакцию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X ПЦР буфера, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, 20 пкмоль праймера, 1,5U *Taq*-полимеразы (Диалат, Москва) и 0,5 мкл клеточного лизата в качестве матрицы. Реакцию начинали плавлением ДНК при 95 °С в течение 5 мин., затем следовало 40 циклов: 94 °С – 30 сек, 40 °С – 30 сек, 72 °С – 1 мин. Завершали реакцию элонгацией при 72 °С в течение 7 мин.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле в 1X TBE буфере. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

*Кластерный анализ* полученных ПЦР-профилей осуществляли с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b) [6]. Бинарные матрицы исходных данных получали вручную после визуализации гелей, обозначая присутствие фрагмента как 1, а его отсутствие – 0. Анализ осуществляли методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Бутстрап вычисляли по выборке из 100 деревьев. Критерием устойчивости кластера считали значение бутстрапа выше 50.

**Результаты исследования.** Для выявления внутривидовой генетической гетерогенности при необходимости анализа большого количества штаммов наиболее часто применяют амплификацию со случайными праймерами (RAPD) [8,9], амплификацию консервативных повторяющихся последовательностей (Rep-ПЦР) [10-14] и риботипирование (ITS-ПЦР) [15,16].

а) Риботипирование основано на исследовании спейсера, расположенного между генами 16S и 23S рибосомных РНК. Этот спейсер является высоко полиморфным, обладает повышенной способностью к изменчивости. Его полиморфизм хорошо воспроизводим и служит стабильным маркером, с помощью которого можно дифференцировать неродственные изоляты или обнаружить высокую степень идентичности независимо изолированных штаммов внутри различных видов. В то же время гены 16S и 23S рибосомных РНК высококонсервативны. Это позволяет использовать одну и ту же пару праймеров sp1 (5' TTGTACACACCGCCCGTCA 3') и sp2 (5' GGTACCTTAGATGTTCAGTTC 3'), комплементарных 16S и 23S генам,

для амплификации этого спейсера у представителей разных таксономических групп бактерий. С целью более глубокой дифференциации штаммов продукт, полученный при ITS-ПЦР, подвергают расщеплению дифференцирующими рестриктазами (например, *AluI* или *TaqI*), а затем анализируют с помощью гелелектрофореза (ITS-RFLP). На основании сравнения получаемых ДНК-профилей при электрофоретическом разделении ДНК возможно проведение внутри- и межвидовой дифференциации исследуемых бактерий.

б) Rep – ПЦР (амплификация консервативных повторяющихся последовательностей) характеризуется универсальностью и может быть применена для типирования любых бактерий. Повторяющиеся последовательности встречаются в геномах различных микроорганизмов. Количество и/или расположение Rep-элементов уникально для конкретной бактерии. Соответственно, использование праймеров гомологичных Rep-элементам приводит к получению уникального набора продуктов амплификации (“фингерпринт”). Частным случаем Rep - ПЦР являются ERIC- и BOX – ПЦР, где в качестве праймеров используют последовательности гомологичные ERIC – элементам энтеробактерий (ERIC IR-1 (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAC3'), ERIC 2-1 (5'AAGTAAGTGAAGTGGGGGTGAGCG3')) и BOX-элементам грамположительных *Streptococcus pneumoniae* (BOX A1R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3')), соответственно. На основании сравнения получаемых “фингерпринтов” при электрофоретическом разделении ДНК возможно проведение внутри- и межвидовой дифференциации исследуемых бактерий.

в) RAPD типирование сводится к случайной амплификации полиморфной ДНК. В этой методике обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых бактерий. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиваться удовлетворительного отличия картины ПЦР для разных изолятов, даже близкородственных. Из литературных источников для отработки метода RAPD типирования штаммов лактококков нами выбраны праймеры P15 (5'CTGGGCACGA 3') и P16 (5'TCGCCAGCCA 3'), а для дифференциации изолятов термофильного стрептококка – праймеры XD8 (5'CAAGGCATCC 3') и XD9 (5'GAAGTCGTCC 3').

Методики внутривидовой генотипической идентификации включают несколько этапов, которые выполняются в следующей последовательности:

1) Подготовка лизатов культур, пригодных для использования в ПЦР.

2) Проведение ITS амплификации, или Rep амплификации, либо RAPD амплификации.

3) После проведения ITS амплификации проводится дополнительная рестрикция синтезированных ампликонов рестриктазами *AluI* или *TaqI*.

4) Определение длины фрагментов рестрикции (в случае ITS-RFLP) либо длины синтезированных ампликонов (в случае RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР) методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле.

5) Составление ДНК профилей для каждого из исследуемых изолятов, определение типа ДНК-профиля и отнесение штамма к конкретной внутривидовой группе.

На первом этапе работы проводили проверку пригодности методов риботипирования (ITS-RFLP), Rep-ПЦР типирования и RAPD типирования для внутривидовой генотипической дифференциации исследуемых культур.

Риботипирование (ITS-RFLP). Из 20 культур были приготовлены препараты общей ДНК, которые в дальнейшем были использованы в качестве матриц для риботипирования.

При амплификации межгенного 16S–23S спейсера у каждого из исследуемых штаммов *Lactococcus lactis* обнаруживался единичный фрагмент размером около 650 п.о.

Обработка продуктов амплификации межгенных 16S-23S участков смесью рестриктаз не привела к уменьшению размера амплифицированных фрагментов, что свидетельствует об отсутствии в 16S-23S спейсере исследуемых бактерий сайтов узнавания для выбранных рестриктаз. Обработка продуктов амплификации межгенных 16S–23S спейсеров рестриктазой *TaqI* либо *AluI* приводила к обнаружению четких рестрикционных профилей у каждого из исследуемых штаммов. При этом рестрикционные профили оказались уникальными, но однотипными для каждого штамма. Отсутствие внутривидовой вариабельности при риботипировании свидетельствует о непригодности метода ITS-RFLP для внутривидовой генотипической дифференциации лактококков.

Rep-ПЦР типирование. На первом этапе работы из 20 культур были приготовлены препараты общей ДНК, которые в дальнейшем были использованы в качестве матриц для Rep-ПЦР.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле. При визуальном анализе полученных в ходе типирования профилей, было выявлено 14-25 типов фрагментов (табл. 2). Наибольшее разнообразие фрагментов образовывалось в реакциях с праймером ERIC2-1.

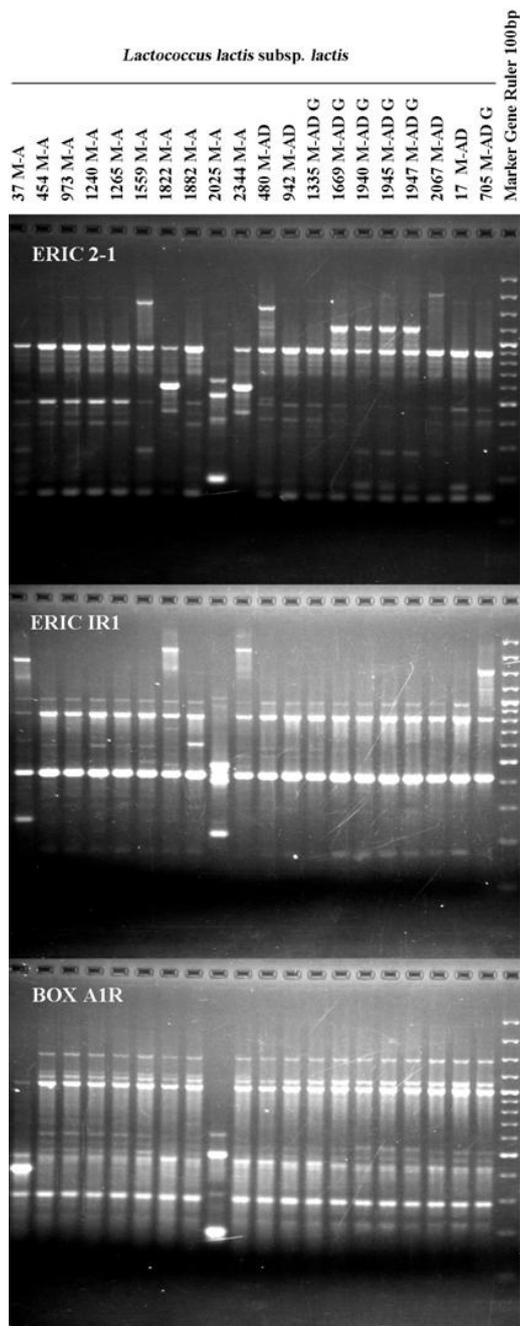


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов Rep-ПЦР, полученных при типировании культур *L. lactis* subsp. *lactis*.

Таблица 2 – Количество фрагментов, полученных при типировании с помощью Rep-ПЦР

Источник ДНК	Количество типов фрагментов		
	ERIC2-1	ERIC IR1	BOXA1R
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	25	21	14

RAPD-ПЦР типирование. Схема генотипической дифференциации исследуемых бактерий с помощью RAPD-ПЦР включала в себя этапы оптимизации режима проведения RAPD-ПЦР, амплификацию с помощью случайных праймеров, электрофоретическое разделение синтезированных продуктов и кластерный анализ получившихся «фингерпринтов».

Оптимизация режима проведения RAPD-ПЦР заключалась в подборе оптимальной температуры отжига праймеров. В качестве матрицы для RAPD-ПЦР при оптимизации температурных условий реакции использовали штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1945 M-ADG (праймеры P15, P16) Результаты градиентной RAPD-ПЦР представлены на рисунке 2.

По результатам градиентной RAPD-ПЦР было принято решение проводить отжиг праймеров при 40 °С. Полученные RAPD-профили представлены на рисунке 3.

При визуальном анализе полученных в ходе типирования RAPD-профилей, было выявлено 18 (праймер P16) и 23 (праймер P15) типов фрагментов.

Кластерный анализ полученных ПЦР-профилей. Для объективной оценки генетического родства исследуемых культур проводили кластерный анализ результатов генотипирования с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b). Результаты анализа представлены на рисунках 4-6 в виде филогенетических деревьев.

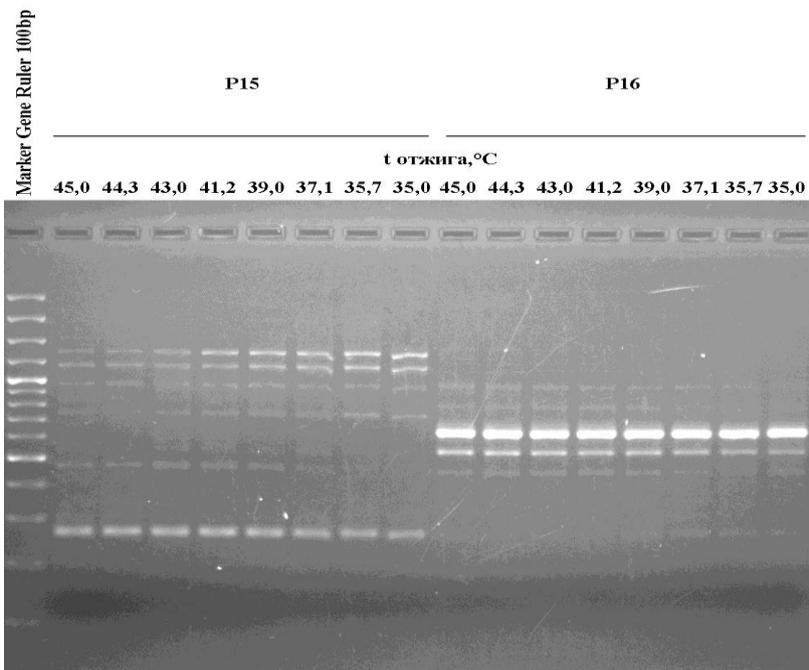


Рисунок 2 – Градиентная RAPD-ПЦР со штаммом *L. Lactis subsp. lactis* 1945 M-ADG и праймерами P15 и P16

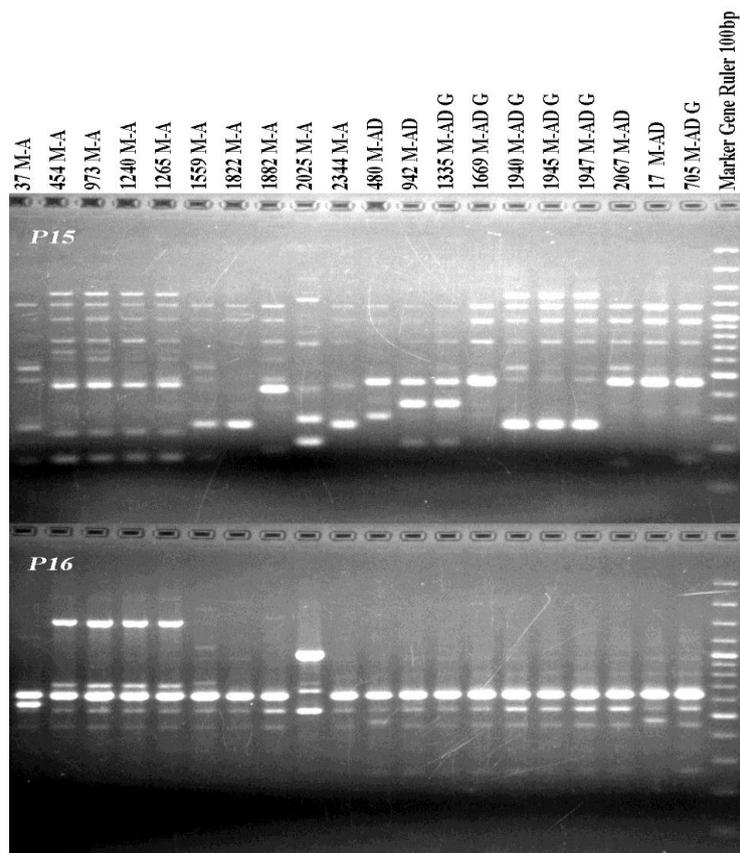


Рисунок 3 – RAPD-ПЦР профили, полученные при типировании культур *L. lactis subsp. lactis* с помощью праймеров P15, P16

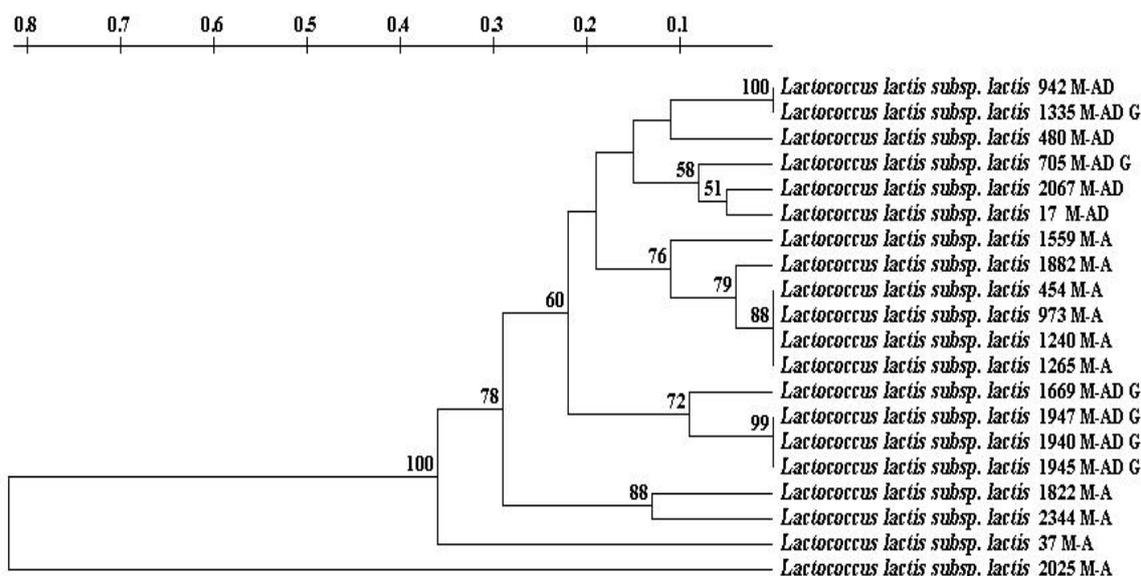


Рисунок 4 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью Rep-ПЦР (праймеры ERIC IR-1, ERIC 2-1, BOX A1R).  
Указано значение бутстрапа больше 50

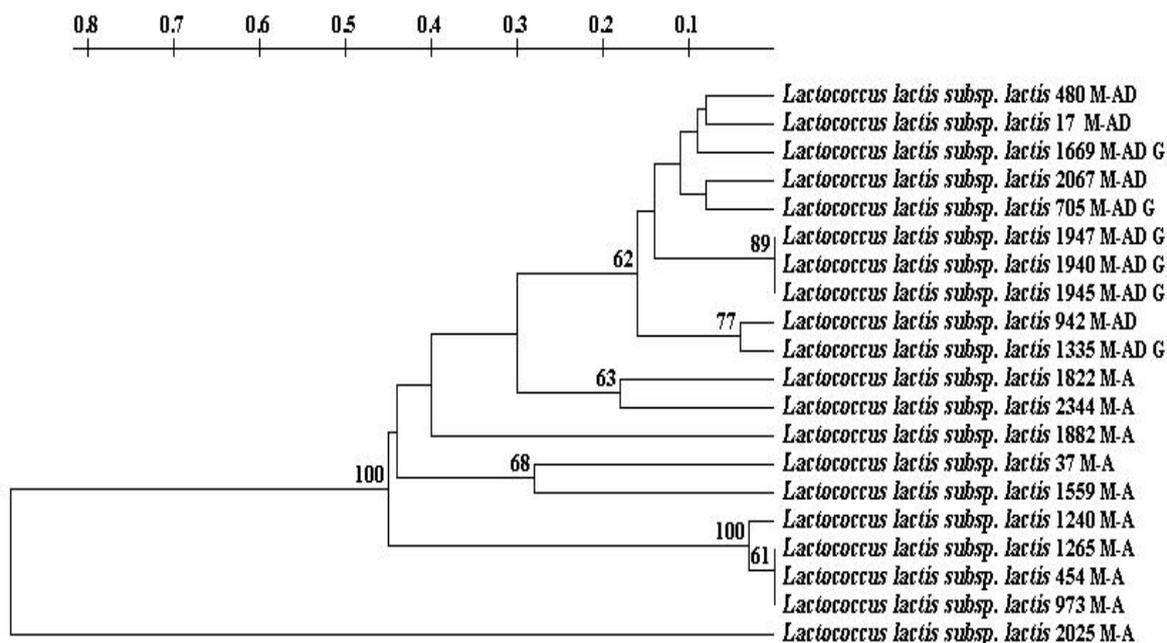


Рисунок 5 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью RAPD-ПЦР (праймеры P15, P16).  
Указано значение бутстрапа больше 50

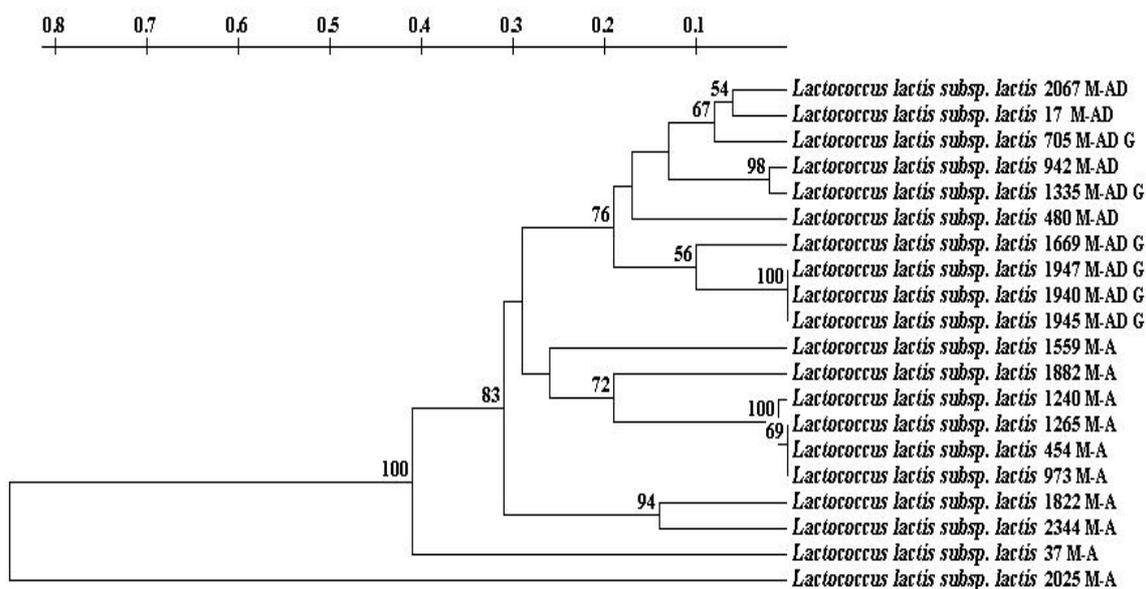


Рисунок 6 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР. Указано значение бутстрапа больше 50

Анализ полученных профилей позволил выделить 4 близкородственные группы штаммов лактококков: 2067 M-AD, 17 M-AD, 705 M-AD G (группа A), 942 M A-D, 1335 M-AD G (группа B), 1940 M AD-G, 1945 M AD-G, 1947 M AD-G (группа C), 1265 M-A, 454 M-A, 973 M-A, 1240 M-A (группа D). При создании заквасочного консорциума не рекомендуется использовать штаммы из одной близкородственной группы.

**Заключение.** Таким образом, для внутривидовой генотипической дифференциации бактерий вида *Lactococcus lactis* наибольшую эффективность показали методы Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР. Метод риботипирования (ITS-RFLP) оказался непригодным для внутривидовой дифференциации бактерий данного вида.

В результате генетического анализа коллекционные штаммы бактерий были разделены на четыре генетически гетерогенные группы. Для создания заквасочного консорциума рекомендуется использовать бактерии из разных групп.

## Литература

1. Ruiz, P. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns // Patricia Ruiz, Pedro Miguel Izquierdo,

Susana Sesen, M. Llanos Palop / Food Microbiology. – 25 (2008). – P. 942–948.

2. Yavuz, E. RFLP of 16S-ITS rDNA region to differentiate Lactobacilli at species level / Elif Yavuz, Hatice Gunes, Cisem Bulut, Sebnem Harsa and A. Fazil Yenidunya // World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 535–537, 2004.

3. Patzak, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Patzak // Euphytica 121: 9–18, 2001.

4. Giraffa, G. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR / Giorgio Giraffa, Lia Rossetti // Ital.J.Food Sc. – 2000. - V.12, N 4. - P. 403-423.

5. Dansakull, S. Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker for Typing of *Saccharomycopsis fibuligera* Isolated from Loog-pang, Kao-mag and Satho / Saowalak Dansakull, Vichein Leelawatcharamas1, Charoen Charoenchai and Hathairat Urairong // Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43 : 339 - 347 (2009).

6. Liu, S. Optimising RAPD-PCR for Screening the Link of RAPD Markers to an Acid-resistant Gene in *Oenococcus oeni* / S. Liu, L. He, X. Li, X. Li // S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 32, No. 2, 2011. – P. 296-299.

7. Hamza, A. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab)/ A. Hamza, Eisa I. El Gaali, Ahmed A. Mahdi // African J. Biotechnology, 2009. – V. 8 (15). – P. 3399-3404.

8. Samarzija, D Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures/ D. Samarzija, S. Sikora, S. Redzepović, N. Antunac, J. Havranek – Microbiol Res. 2002. V.157. P.13-17

9. Moschetti, G. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains/ G. Moschetti, G. Blaiotta, M. Aponte, P. Catzeddu, F. Villani, P. Deiana, S. Coppola – J Appl Microbiol, 1998. V.85, P. 25-36.

10. Stern, M.J. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome / M.J. Stern, G.F. Ames, N.H. Smith, E.C. Robinson, C.F. Higgins – Cell. 1984. V.37 – P.1015 – 1026.

11. Versalovic, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes/ J.

Versalovic, T. Koeuth, J.R. Lupski– Nucleic Acids Res. 1991. V.19 – P. 6823-6831.

12. Koeuth, T. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria/ T. Koeuth, J. Versalovic, J.R. Lupski– Genome Res. 1995. V.5. – P.408-418.

13. Rajashekara, G. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element / G. Rajashekara, T. Koeuth, S. Nevile, A. Back, K.V. Nagaraja, J.R. Lupski, V. Kapur – J. Med. Microbiol. 1998. V.47. P. 489-497.

14. Van Belkum, A. Hermans P.W.M. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains / A. Van Belkum, M. Sluijter, R. de Groot, H. Verbrugh – J. Clin. Microbiol. 1996. V.34. P.1176-1179.

15. Olive, D.M. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. / D.M. Olive, P. Bean – J. Clin. Microbiol. 1999. V.37. P.1661-1669.

16. Williams, J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey – Nucleic Acids Res. 1990. V.18. – P. 6531-6535.

*A.N. Biruk, E.N. Sysaliatsin, K.K. Yatsevich, D.V. Galinovsky, N.N. Furik*

## **MOLECULAR-GENETIC DIFFERENTIATION OF *LACTOCOCCUS***

### **Summary**

*Lactococcus lactis* subspecies differentiations methods were examined. It was received that the most effective differential methods are Rep- and RAPD-PCR. The ribotyping method is not suitable to distinguish the subspecies of *Lactococcus lactis*. According the genotyping analysis twenty collection bacteria strains were divided into four groups which were genetic heterogeneous.