

Е.Н. Бирюк¹, Е.Н. Сысолятин², К.К. Яцевич², Д.В. Галиновский²,
Н.Н. Фурик¹

¹Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Беларусь

²Институт 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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.

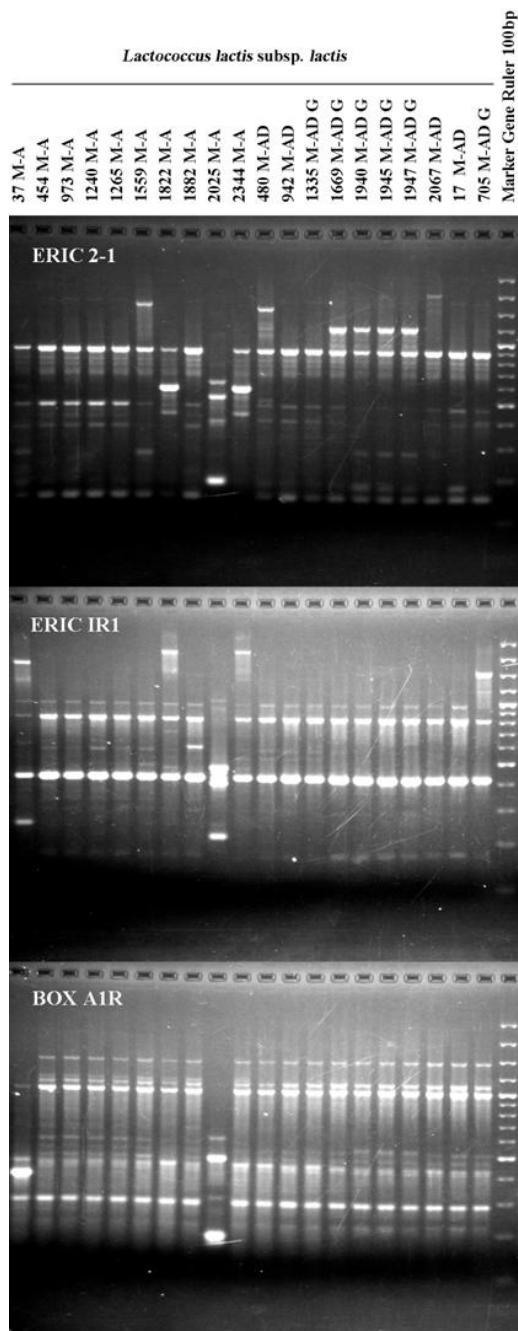


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов Rep-ПЦР, полученных при типировании культур *L. lactis* subsp. *lactis*.

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.

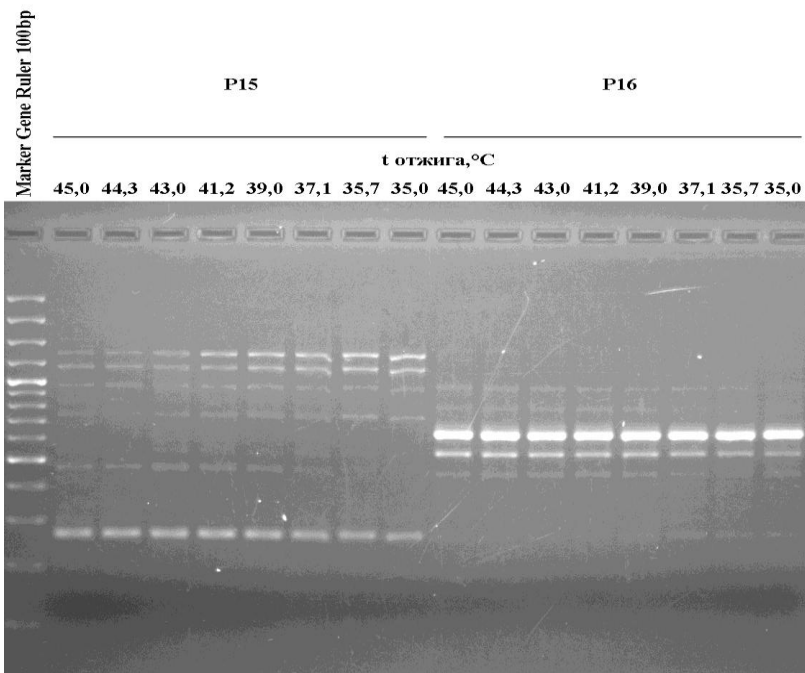


Рисунок 2 – Градиентная RAPD-ПЦР со штаммом *L. Lactis subsp. lactis* 1945 M-ADG и праймерами P15 и P16

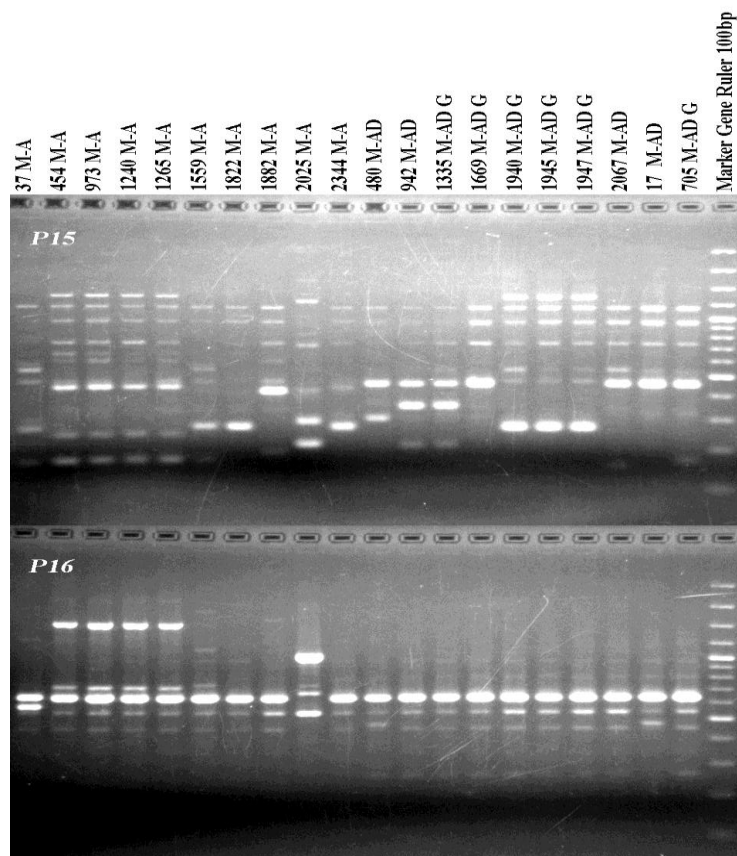


Рисунок 3 – RAPD-ПЦР профили, полученные при типировании культур *L. lactis subsp. lactis* с помощью праймеров P15, P16

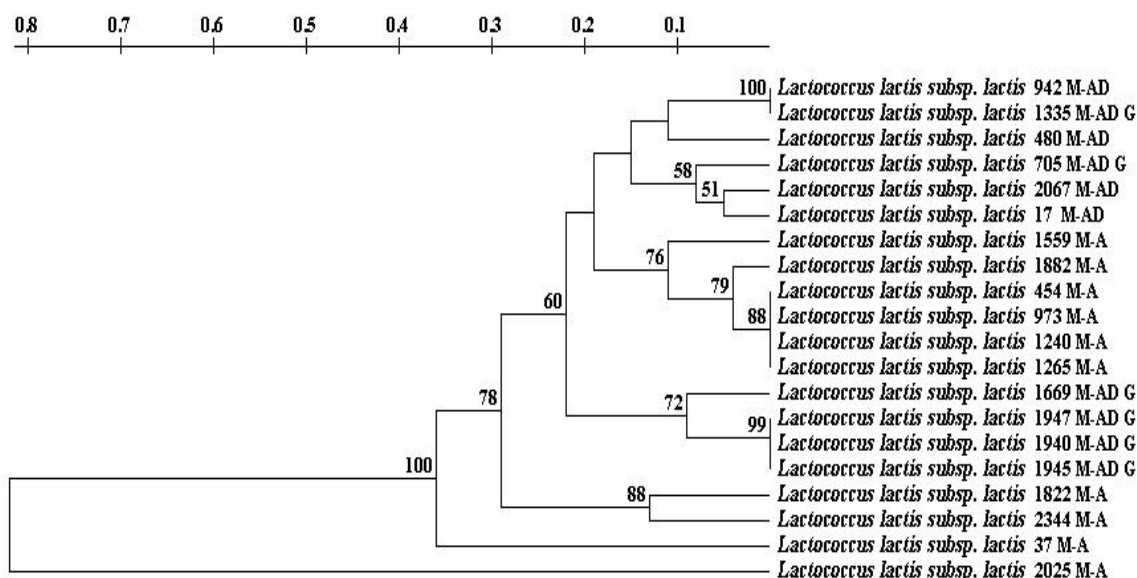


Рисунок 4 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью Rep-ПЦР (праймеры ERIC IR-1, ERIC 2-1, BOX A1R). Указано значение бутстрапа больше 50

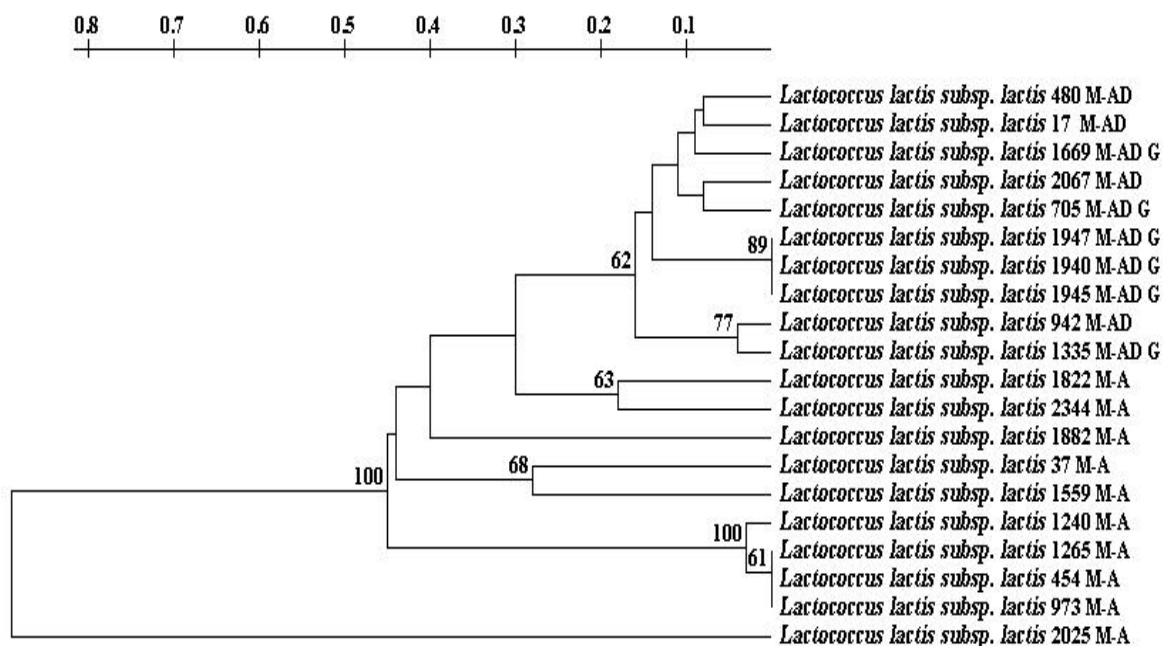


Рисунок 5 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью RAPD-ПЦР (праймеры P15, P16). Указано значение бутстрапа больше 50

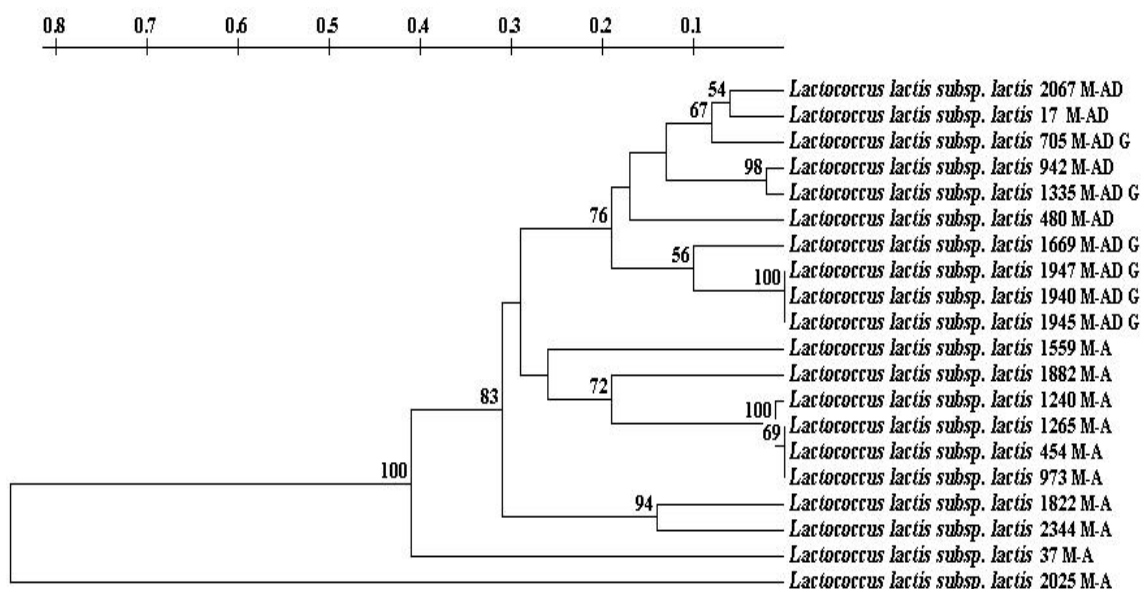


Рисунок 6 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР. Указано значение бутстрапа больше 50

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.