

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛАКТОФАГОВ СЕМЕЙСТВА *PODOVIRIDAE*

А.П. Райский¹, А.Л. Лагоненко², Т. С. Ровская¹, Н.А. Белясова¹, А.Н. Евтушенков²

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Интерес к фагам бактерий вида *Lactococcus lactis* обусловлен тем, что фаголизис на молочных комбинатах остается одной из основных проблем при производстве широкого спектра ферментированных продуктов. Широкомасштабное изучение особенностей организации и свойств фагов молочнокислых бактерий призвано помочь найти способы борьбы с распространением лактофагов для предотвращения фаголизиса. На данный момент фаги бактерий *Lactococcus lactis* дифференцируют на 10 групп, три из которых (с2, P335 и 936) распространены повсеместно и наиболее часто упоминаются в литературе как возбудители фаголизиса на молочных комбинатах России, Европы, Америки и других регионов [1]. Лактофаги перечисленных групп являются представителями семейства *Siphoviridae* и отличаются морфологией вирионов, которые содержат длинный (90-130 нм) несократимый отросток. В то же время, фаги бактерий *Lactococcus lactis* из семейства *Podoviridae*, вирионы которых имеют очень короткий несократимый отросток, гораздо реже встречаются в составе образцов кисломолочных продуктов и менее распространены на молочных комбинатах [2]. В результате эти фаги остаются практически не изученными.

В данном исследовании приведены результаты изучения молекулярно-генетических свойств распространенных на территории Беларуси лактофагов семейства *Podoviridae* и показана возможность использования метода ПЦР для их детекции в молоке и других объектах.

Объекты и методы исследования

В работе использованы вирулентные лактофаги из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии. Все фаги выделены из кисломолочных продуктов производства различных предприятий Республики Беларусь в период с 2006 до 2007 гг. [3]. Фаги титровали на чувствительных (индикаторных) тест-культурах *Lactococcus lactis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ.

Получение фаголизатов с высоким титром осуществляли в жидкой среде M17 в присутствии 0,5% глюкозы и 5 мМ CaCl₂. Фаговые частицы концентрировали центрифугированием при 36600 g в течение 40 мин при 4°C.

Для подготовки к электронной микроскопии фаги отмывали в 1 мл 0,1M раствора ацетата аммония. Повторно центрифугировали и ресуспендировали в 15 мкл ацетата аммония. На пленки-подложки наносили по 10 мкл суспензии фагов. Через 1 мин наносили раствор 2%-ной фосфорно-вольфрамовой кислоты.

ПЦР-анализ фаговых лизатов осуществляли в объеме 50 мкл, содержащем 1 моль/л каждого из трех пар праймеров, специфичных по отношению к фагам групп с2, 936 и P335; 1,25 U *Taq*-полимеразы ДНК («Fermentas», Литва), *Taq*-буфер1x и 1 мкл лизата ($T = 10^8$ БОЕ/мл). В качестве контроля вместо лизата в рабочую смесь вносили 1 мкл стерильной среды M17. Амплификацию осуществляли в термоциклере «Терцик» при следующих режимах: 3 мин при 94°C, 35 циклов по 30 с при 94°C, 1 мин при 50°C и 1 мин при 72°C, последний шаг – 7 мин при 72°C.

ПЦР-продукты разделяли с использованием 1,5% агарозного геля в ТАЕ буфере, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ ($\lambda = 280$ нм).

Для выделения ДНК осажденные фаговые частицы ресуспендировали в 100 мкл ТЕ-буфера, добавляли 5 мкл 10% SDS и выдерживали в течение 5 мин при 70°C. Затем добавляли 20 мкл 5М ацетата калия и помещали на лед на 30 мин. Центрифугировали при 15500 g 15 минут при 4°C. Отбирали супернатант и добавляли 250 мкл этанола. Центрифугировали при 15500 g в течение 5 минут при 4°C. Этанол тщательно удаляли, ДНК ресуспендировали в ТЕ-буфере. Рестрикционный анализ осуществляли в условиях, оговоренных фирмой-производителем ферментов («Fermentas», Литва). Разделяли фрагменты рестрикции в 0,7% агарозном геле в ТАЕ буфере при 100 В. Лигирование и трансформирование осуществляли стандартными методами [4]. Секвенирование ДНК осуществляли с использованием набора CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit («Fermentas», Литва) в ДНК анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Анализ результатов сиквенса проводили с помощью программного пакета ALFwin Software, поисковой системы BLAST 2.2.18+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast).

Результаты и их обсуждение

Широкомасштабный фаговый мониторинг, проведенный на территории Республики Беларусь, позволил выявить необычно высокую пропорцию (до 17%) бактериофагов с коротким (18–20 нм) хвостовым отростком [5], которые, согласно морфологическим критериям [6], должны принадлежать группе P034 семейства *Podoviridae* (рис.1).

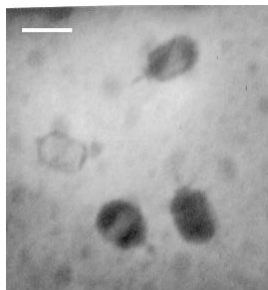


Рисунок 1 – Электронная микрофотография лактофага семейства *Podoviridae*

Чтобы получить уверенность в том, что фаги E04, БИМ BV-32, БИМ BV-37 и БИМ BV-41 являются представителями группы P034 семейства *Podoviridae* проведен ПЦР-анализ их ДНК. В литературе опубликована структура олигонуклеотидных праймеров для амплификации характерных последовательностей ДНК только широко распространенных фагов – представителей групп c2, P335 и 936. Поскольку геном фагов группы P034 пока не секвенирован, в литературе отсутствуют сведения о структуре праймеров для их ПЦР-детекции [6].

В анализе участвовали в качестве контрольных изолятов фаги БИМ BV-28, БИМ BV-33 (группа c2), БИМ BV-27, БИМ BV-30 (группа 936) и x411, x415 (группа P335), а также 4 фага с короткими хвостовыми отростками: E04, БИМ BV-32, БИМ BV-37 и БИМ BV-41.

В мультиплексной ПЦР использовались праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для ПЦР-детекции лактофагов и ожидаемые продукты амплификации

Группа	Фаг	Структура праймеров	Ожидаемая величина ампликонов, bp
c2	БИМ BV-28, БИМ BV-33	5' СААТСГААГСАГГТГТААААГТТСГАГААС 3', 5' GCTTTATCCATTTGTAGGTATGCTTCTGC 3'	444
936	БИМ BV-27, БИМ BV-30	5' АТСАГТТГГСТСААТГГААГАССААГСГГ 3', 5' GTTGCTTCTGCTGTTGGTGTCAAATGAGGA 3'	318
P335	x411, x415	5' GAAGСТАГГСГААТСАГТАААСТТГСТАГ 3', 5' СGGСТАТСТСГТСААТТГТТССGGТТGC 3'.	196

На рисунке 2 приведены результаты мультиплексной ПЦР, проведенной с перечисленными в таблице 1 праймерами. Можно видеть, что для каждого из контрольных лактофагов, представителей групп c2, 936 и P335, получены ожидаемые по величине ампликоны, в то время, как ДНК фагов E04, БИМ BV-32, БИМ BV-37 и БИМ BV-41 не обеспечивала амплификацию фрагментов при использовании данных олигонуклеотидных последовательностей.

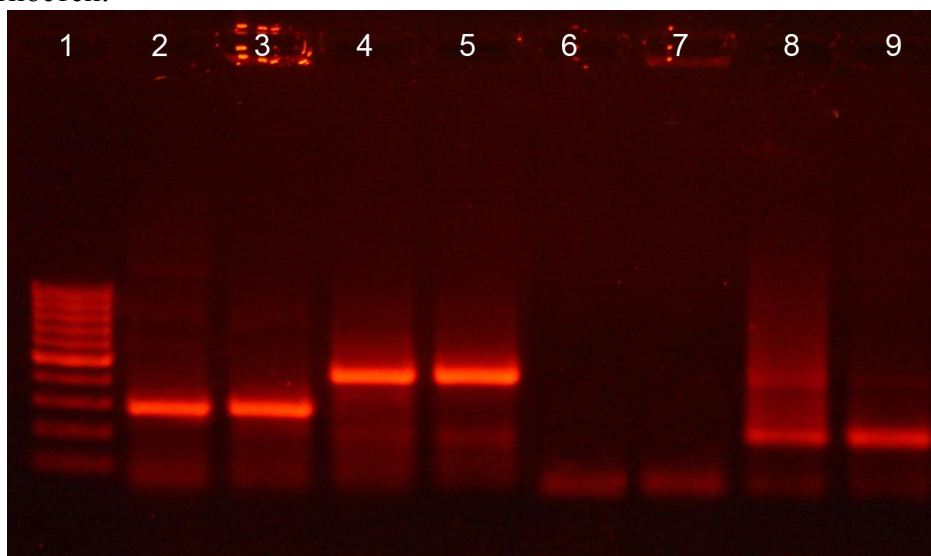


Рисунок 2 – Мультиплексная ПЦР фагов лактококков.

1 – 100 bp маркер; 2 – БИМ BV-27; 3 – БИМ BV-30; 4 – БИМ BV-28; 5 – БИМ BV-33; 6 – E04;
7 – БИМ BV-37; 8 – x411; 9 – x415

В ДНК фагов E04, БИМ BV-32, БИМ BV-37 и БИМ BV-41 отсутствуют уникальные для представителей групп с2, P034 и 936 последовательности, эти изоляты нельзя причислить ни к одной из названных групп.

Один из фагов данной группы (БИМ BV-37, рис.1) отличался от всех остальных изолятов спектром продуктов рестрикции генома эндонуклеазой *Hind*III (рис.3), а также степенью устойчивости к разным инактивирующим агентам.



Рисунок 3 – Продукты расщепления ДНК эндонуклеазой *Hind*III: а – фага λ (маркер), б – БИМ BV-37

Однако, данный изолят можно было причислить к числу фагов *L. lactis*, поскольку в коллекции бактерий *Lactococcus lactis* найдено 3 разных штамма *L. lactis* ssp. *lactis*, клетки которых обеспечивали его репродукцию.

Представлялось интересным секвенировать ДНК этого нового, не описанного в литературе лактофага. Четыре фрагмента ДНК фага БИМ BV-37 клонированы в составе плазмидного вектора pUC18 (рис.4) и секвенированы (табл.2).

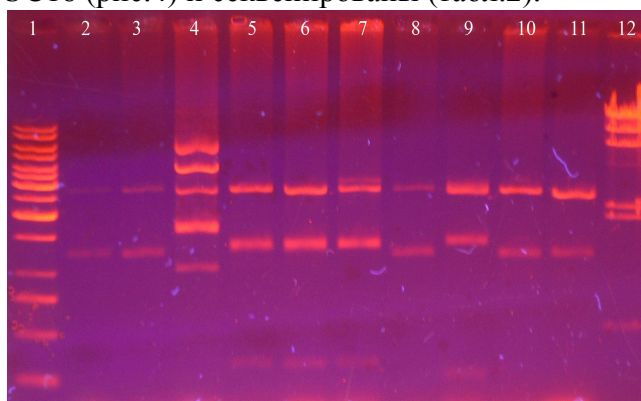


Рисунок 4 – 1 – ДНК маркер, 2, 3 – контроль pUC18, 4 – pUC18/f3, 5 – pUC18/f4, 6 – pUC18/f5, 7 – pUC18/f7, 8 – pUC18/f10, 9 – pUC18/f11, 10 – pUC18/f12, 11 – pUC18/f16, 12 – ДНК маркер λ/*Hind*III

Таблица 2 – Последовательности нуклеотидов в секвенированных фрагментах

Фрагмент генома БИМ BV-37	Последовательность нуклеотидов
pUC18/f7	1 GCTCCACTG TACAACGTAT GAGTGGTATG TTAGCTATTG GТАCTGGTGT 51 AGGAATAGGT GCTATTGGTG TTGGTATTGC AGGTCAGGTT AAAGGTGCAT 101 TTCAGTATGC TCAAGAAGTT GATAAAGCAA GACAACAАСТ TAAAGCTCAA 151 GGTGTTGAAG GTAAAAGACT AGAAAATGTT TATCAGGATA TCGTAAAATA 201 TGCCAATGTA TCTCCATTTG ATGTTGGTAA CATGACTCAA GCGGTATCTC 251 AGATGAATTC STTТАCTGGT GACATTGATA AATCCATGAG AGCTACAAAA 301 GCT

pUC18/f4	1 AGCTCTCATG GATTTATCAA TGTCACCAGT AAAGGAATTC ATCTGAGATA 51 CCGCTTGAGT CATGTTACCA ACATCAAATG GAGATACATT GGCATATTTT 101 ACGATATCCT GATAAACATT TTCTAGTTT TTACCTCAA CACCTTGAGC 151 TTAAAGTTGT TGTCTTGCTT TATCAACTTC TTGAGCATAC TGAAATGCAC 201 CTTAAACCTG ACCTGCAATA CCAACACCAA TAGCACCTAT TCCTACACCA 251 GTACCAATAG CTAACATACC ACTCATACTG TGTACAGTGG AAGCCGCAGA 301 AGCAAAGTGG TTAAGTGAAT GATTCATTC
pUC18/f3for	1 GCTGCTCTA CATGCTTAGT TAAACACCAC TTCTTTTCAT TACCTTTACC 51 ACCTGCAATA TCAAAGATAA GTTATAGTAGT AGTACGACGA AGTGCTGTTA 101 CTTGTTCAAG ATTAGCAATA TAATCTGGTT CAAGTTCATC AAACCTTTGT 151 AAGTTAATTT CACCCAGTTC AAGGTCTGCA TTAAACGTT CAATATTAGT 201 TTTCTCATGT AGTTCAGCAC ATGTTAATTG AACCATTTGA CGCATTAAT 251 CTTCCAATAA ACCTTCACTG GATAACTTGT TTTCCGCCAT TTGTAATTC 301 CTCCATTTGT TCTATTTGTT GCTTCTCAGT TTCAATCTCA GCTAATCTAG 351 TATTAATGGT AGCTGCTTCG ATAACTGAC TAGCTCTCGA ACCAGATAGA 401 TTATCTAGTT GTTGTCTAA TGATTGTTTC TCCGAATGTA AATCTGATTT 451 TAATGCCATT GTTTGAAAG TGGGTGTCTA AAGTCTTCCA ATTGACTCCA 501 CCAACAAGT GACTGGG
pUC18/f3rev	1 GTATGCTGTT GATACACGCT CTAAGCTCAA TACAACGACA ACACAGCGTC 51 GTAACGCTAT CTATAATAGT TTTGGTCAAG AGAGGTCTAT AACGCTACA 101 CCGAACGTTT CTGGGGTTCT GTACCTACCT ATTACAACGG ATATATCTAA 151 TTTCATTAGA TGGAACTTTA AACTAGTAAT TCGTCCAATT GCAGGTGTTA 201 CTGTAACCC AAAATTTACT AAGTTCATAA TCATATTTGA TGGTCTTGAT 251 GTTACAAAAT TGTTTAATGC TCAATGGGAT TTACSTAAAA CCACAGGTAT 301 CTAATCCTAAT AAATCCATGG GAGACTTTTA TGATATAATT AAGATATGTA 351 ATATGTTGTC TGATTTAGAT AGAGATACTA TGTTAAATGG TGGTATGCAC 401 ACG

При сопоставлении полученных последовательностей нуклеотидов с информацией в базе данных BLAST 2.2.18+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), оказалось, что в составе известных фаговых геномов отсутствуют области, гомологичные секвенированным последовательностям фага БИМ ВУ-37.

Чтобы определить, насколько широко фаги, родственные БИМ ВУ-37 распространены в кисломолочных продуктах производства Республики Беларусь, в ходе анализа полученных сиквенсов подобрали 2 олигонуклеотидных праймера следующей структуры:

P034A – 5' TCAAACCTCTTGTAAGTTAATTTACCCC 3',

P034B – 5' GTCCAGTTGTTGGTGGAGTCA3'

С их помощью осуществили ПЦР-анализ ДНК фага БИМ ВУ-37, а также образцов кисломолочных продуктов (всего 34 образца). На рисунке 5 показаны результаты электрофоретического разделения полученных ампликонов. Несмотря на то, что из 34-х исследованных образцов продуктов искомым ампликон выявлен лишь для одного, полученные результаты подтверждают возможность использования предложенных олигонуклеотидных праймеров для детекции и идентификации редких фагов группы P034 семейства *Podoviridae*.

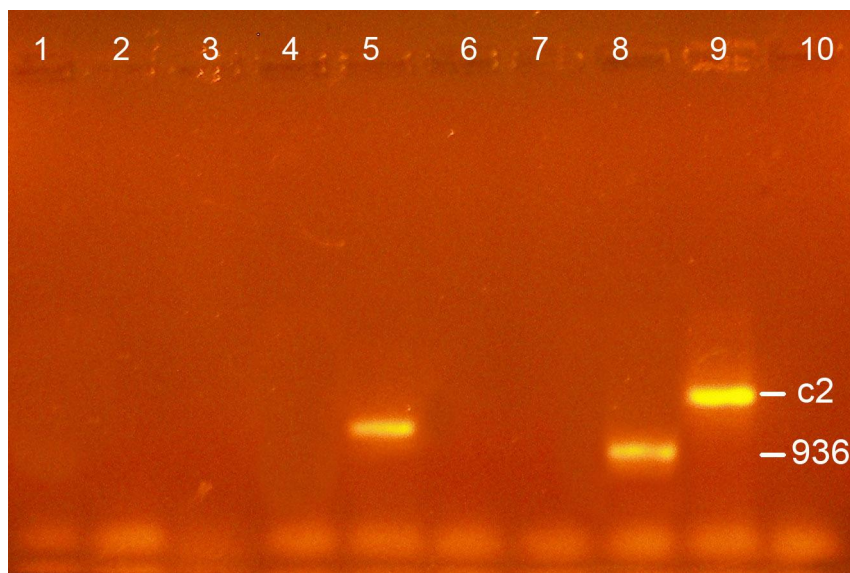


Рисунок 5 – Продукты амплификации ДНК лактофагов

1 – БИМ BV-27, 2 – БИМ BV-28, 3 – E04; 4 – БИМ BV-32; 5 – БИМ BV-37, 6 – БИМ BV-41; 7 – x411, 8 – БИМ BV-27 с праймерами для группы 936, 9 – БИМ BV-28 с праймерами для группы c2

То обстоятельство, что ДНК остальных лактофагов, чьи вирионы имеют короткие хвостовые отростки (E04, БИМ BV-32 и БИМ BV-41), не содержат последовательностей, амплификация которых возможна с использованием указанных праймеров, свидетельствует, скорее всего, о том, что при определении структуры праймеров за основу был взят один из секвенированных фрагментов ДНК БИМ BV-37, который уникален для данного изолята, но не для других представителей группы P034.

Заключение

В ходе исследования впервые получены молекулярно-генетические характеристики одного из лактофагов группы P034 семейства *Podoviridae* БИМ BV-37, который является новым, не описанным в литературе вариантом, насколько можно судить по результатам сопоставления секвенированных последовательностей его генома с имеющимися в базах данных последовательностями. Подобраны праймеры для детекции и идентификации в ходе мультиплекс ПЦР редких фагов, родственных изоляту БИМ BV-37.

Работа выполнена в рамках финансируемого задания 1.07 ГППИ (2006-2010 гг.) «Новые биотехнологии» № ГР 20062705.

Литература

1. Biodiversity and classification of lactococcal phages / H. Deveau [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72. – P. 4338–4346
2. Boucher I., S. Moineau. Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium. // Recent Res. Devel. Virol. – 2001. Vol. 3. – P. 243–256.

3. Райский А.П., Беясова Н.А., Малечко Е.П. Распространение бактериофагов лактококков в молочных продуктах, произведенных в Республике Беларусь // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология органических веществ. – 2006. – Вып. XIV. – С. 144–146.
4. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
5. Фенотипическая характеристика лактофагов молочных продуктов / Райский А.П. и др. // Наука и инновации – 2008 – № 4(62) – С.36-40
6. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A. W Jarvis [et al.] // Intervirology – 1991. – Vol. 32. – P. 2–9.
7. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk / del Rio [et al.] // Food Microbiology. – 2007. –Vol. 24. – P. 75–81.

**MOLECULAR-GENETIC ANALYSES OF LACTOCOCCAL BACTERIOPHAGES
PODOVIRIDAE FAMILY**

A.P. Raiski¹, A.L. Lagonenko², T.S. Rovskaya¹, N.A. Belyasova¹, A.N. Evtushenkov²

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Molecular-genetic characteristics of BIM BV-37 lactococcal phage are studied. This phage is a member of rare P034-species from *Podoviridae* family Based on genome fragment nucleotide sequences in comparison with database BLAST sequences, this isolate was found to be new lactococcal bacteriophage, undescribed previously. Primers for detection and identification in multiplex PCR of BIM BV-37 similar phages were designed. Thus lactic phages variety to be detected in milk products was increased.