

УДК 578.81

А. П. Райский, ассистент (БГТУ); О. В. Дмитриева, инженер (БГТУ);
А. А. Почтенная, студентка (БГТУ); Н. А. Белясова, доцент (БГТУ)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗРАБОТАННЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФАГОВ ГРУППЫ P034

В работе представлены результаты подбора праймеров для бактериофагов лактококков группы P034. На основании анализа секвенированных последовательностей генома фага BIM BV-37 подобрана структура четырех наборов олигонуклеотидных праймеров, обеспечивающих амплификацию характерных для ДНК фагов группы P034 фрагментов. ПЦР-анализ коллекционных фагов группы P034 с разработанными наборами праймеров показал пригодность одной из пар, которая обеспечивает получение ампликонов размером 392 пар нуклеотидов. Продукты амплификации уникальных последовательностей фага BIM BV-37 и родственных ему изолятов отличаются размерами от аналогичных продуктов, образующихся при ПЦР-детекции представителей групп с2, 936 и P335. Праймеры были использованы для обнаружения фагов в составе сырого молока и молочных продуктах.

We present here the results of the primers selection for lactococcal bacteriophage group P034. Based on analysis of the sequenced genome of phage BIM BV-37 structure were designed four sets of oligonucleotide primers to ensure amplification characteristic of P034 phage DNA fragments. PCR analysis of the collections of phage group with P034-developed set of primers showed the suitability of one of the pairs, which ensures obtaining amplicons size 392 base pairs. PCR products were unique sequences of phage BIM BV-37 and kindred isolates vary in size from similar products produced in the PCR detection of representatives of groups с2, 936 and P335. PCR primers for timely detection of lactophages species P034 in milk raw materials and other objects with their DNA were used.

Введение. В настоящее время в учреждениях Республики Беларусь, призванных осуществлять контроль за распространением лактофагов, а также составлять ассоциации заквасочных культур для выявления вирулентных лактофагов и лизогенных бактерий используют методы титрования проб на потенциально чувствительных бактериях. Этот малоэффективный подход опасен тем, что заранее невозможно предсказать – будут ли подобранные наугад бактерии поддерживать репродукцию фагов, содержащихся в пробе [1, 2]. Гораздо более надежным и оперативным является другой метод детекции фагов – основанный на ПЦР-анализе. Этот метод нашел довольно широкое распространение в странах Европы, в Америке, Австралии, где используется для выявления в сырье, воде, полуфабрикатах, заквасках, а также в готовых продуктах лактофагов доминирующих в этих странах групп – с2, 936 и P335 [3, 4, 5]. Для ПЦР-детекции фагов названных групп сконструированы олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов генов, уникальных для каждой группы. Однако для лактофагов группы P034 таких праймеров не создано, поскольку эти фаги встречаются крайне редко в странах, где эффективно борются с фаголизисом, и P034-фаги остаются малоизученными. В то же время, как показано ранее [6], фаги группы P034 составляют более 17% изолятов доминирующих в Беларуси лактофагов, что предопределяет необходимость разработки

способа их ПЦР-детекции. Для успешной борьбы с фаговой инфекцией и предотвращения развития фаголиза необходимо иметь возможность вовремя выявлять фаги всех групп.

В данной работе представлены результаты подбора праймеров для создания способа детекции фагов группы P034.

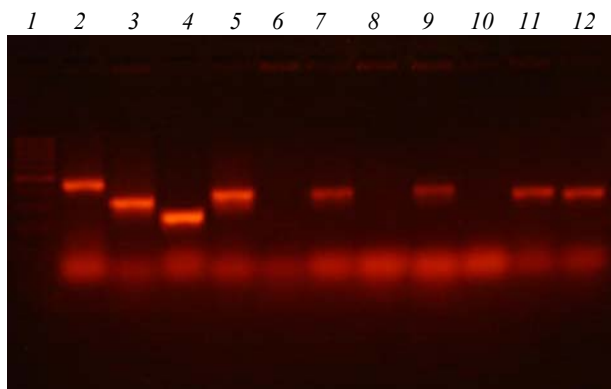
Объекты и методы исследования. В работе использовали вирулентные лактофаги, выделенные из кисломолочных продуктов производства различных предприятий Республики Беларусь [7]. Фаги титровали на чувствительных тест-культурах *Lactococcus lactis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии.

Получение фаголизатов с высоким титром осуществляли в жидкой среде M17 в присутствии 0,5% глюкозы и 5 мМ CaCl₂.

Для выделения ДНК осажденные центрифугированием при 36 600 g в течение 40 мин 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 15 500 g 15 мин при 4°C. Отбирали супернатант и добавляли 250 мкл этанола. Центрифугировали при 15 500 g в течение 5 мин при 4°C. Этанол тщательно удаляли, ДНК ресуспендировали в ТЕ-буфере.

ПЦР-анализ осуществляли в объеме 50 мл, содержащем 1 моль/л каждого из трех пар

менно отличать фаги данной группы от представителей групп P335, 936 и с2, амплификация ДНК которых приводит к образованию ПЦР-продуктов размером 196, 318 и 444 п. н. соответственно.



1 – 100 bp маркер; 2 – ВІМ BV-28 (с2А,В);
3 – ВІМ BV-27 (936А,В); 4 – x411-f (P335А,В);
5 – ВІМ BV-37 (P034А,В); 6 – ВІМ BV-41 (P034А,В);
7 – ВІМ BV-37 (P4А,В); 8 – ВІМ BV-41 (P4А,В);
9 – ВІМ BV-37 (P5А,В); 10 – ВІМ BV-41 (P5А,В);
11 – ВІМ BV-37 (P1А,В); 12 – ВІМ BV-41 (P1А,В)

Продукты амплификации ДНК лактофагов в мультиплексной ПЦР

Для изучения чувствительности метода ПЦР и определения порога чувствительности провели амплификацию лизатов фагов ВІМ BV-37 и ВІМ BV-41, представителей группы P034 в серии последовательных разведений. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты ПЦР-детекции лактофагов в образцах продуктов

Титр лизата, БОЕ/мл	Регистрация ампликонов для лизатов фагов	
	ВІМ BV-37	ВІМ BV-41
10 ⁹	+	+
10 ⁸	+	+
10 ⁷	+	+
10 ⁶	+	+
10 ⁵	+	+
10 ⁴	+	–
10 ³	–	–

Таким образом, условия проведения ПЦР и разработанные праймеры позволяют выявлять фаги группы P034 в достаточно низкой концентрации 10⁴–10⁵ БОЕ/мл. Кроме того, детекция фагов методом ПЦР не требует наличия чувствительных к ним тест-культур, что значительно

повышает вероятность своевременного обнаружения бактериофагов.

Разработанный способ ПЦР-детекции фагов группы P034 в мультиплексной ПЦР опробован при выявлении лактофагов в образцах кисломолочных продуктов (34 образца). Результаты анализа приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты ПЦР-детекции лактофагов в образцах продуктов

Продукт (предприятие-изготовитель)	Размер ампликона, bp
Сырок творожный (ГМЗ г. Новогрудок)	444
Сыр «Голландский» (ГМЗ г. Щучин)	
Сметана (ГМЗ г. Щучин)	
Масса творожная (ГМЗ г. Могилев)	196
Творог «Нежирный» (ГМЗ г. Новогрудок)	
Творог 9% (ГМЗ г. Щучин)	392
Сметана 10% (ГМЗ г. Барановичи)	
Творог 5% (Глубокский МКК)	318
Сыр «Российский» (ГМЗ г. Ружаны)	
25 проб молока и продуктов	Не выявлено

Полученные результаты подтверждают возможность использования разработанных олигонуклеотидных праймеров для детекции и идентификации редких фагов группы P034 семейства *Podoviridae*.

Дальнейшие исследования возможности обнаружения фагов методом мультиплексной ПЦР и использование праймеров для фагов других представителей заквасочной микрофлоры, как, например, *Lactobacillus* [8], позволит в одной реакции обнаруживать фаги нескольких родов молочнокислых бактерий.

Закключение. Разработаны олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-детекции редких фагов группы P034. С помощью разработанных праймеров, совместно с уже известными последовательностями, специфичными к геномам фагов групп с2, 936 и P335, в ходе мультиплексной ПЦР выявлены лактофаги четырех групп в молоке и молочных продуктах.

Работа выполнена в рамках финансируемого задания ГППИ (2006–2010 гг.) «Новые биотехнологии».

Литература

1. Boucher, I. Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium / I. Boucher,

S. Moineau // *Recent Res. Devel. Virol.* – 2001. – Vol. 3. – P. 243–256.

2. Characterization and classification of virulent bacteriophages isolated from a cheddar cheese plant // C. N. Casey [et al.] // *J. Appl. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 74. – P. 268–275.

3. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A. W. Jarvis [et al.] // *Intervirology.* – 1991. – Vol. 32. – P. 2–9.

4. Labrie, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages / S. Labrie, S. Moineau // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2000. – Vol. 66, № 3. – P. 987–994.

5. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk // B. del

Rio [et al.] // *Food Microbiology.* – 2007. – Vol. 24. – P. 75–81.

6. Raiski, A. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus / A. Raiski, N. Belyasova // *Int. J. Food Microbiol.* – 2009. – Vol. 130. – P. 1–5.

7. Фенотипическая характеристика лактофагов молочных продуктов / А. П. Райский [и др.] // *Наука и инновации.* – 2008. – № 4. – С. 36–40.

8. Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR / M. Zago [et al.] // *J. Dairy Res.* – 2008. – Vol. 75. – P. 196–201.

Поступила 26.03.2010