

А. П. Райский, аспирант; А. В. Купрейчик, студентка; Н. А. Белясова, доцент

## ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ЛАКТОФАГОВ НА ОСНОВЕ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА ИХ ДНК

This is the first study by restriction analysis on lactic acid bacteria bacteriophages isolated from dairy plants in the Republic of Belarus. Over a period of one year, twenty three lactococcal phages were isolated from samples taken from different dairy plants. Some parameters of lactophage DNA restriction digestion were optimized and it was shown, that restriction analysis method has high reproducibility of results. Phages were characterized by genome size and restriction patterns with EcoRI and HindIII. The genome sizes of phages were estimated between 16,1 and 38,4 kb. Twenty three lactococcal bacteriophages were classified into four groups based on their genome sizes, same restriction endonuclease recognition and restriction sites in the lactococcal bacteriophage genomes. In each group one typical phage was revealed.

**Введение.** Потери сырья, а также пониженные качества кисломолочных продуктов обусловлены снижением активности ферментационных процессов в результате поражения заквасочной микробиоты бактериофагами [1].

Борьба с фаголизисом требует постоянного фагового мониторинга на предприятиях. Необходима регулярная работа по выделению новых штаммов бактериофагов, чья изменчивость характеризуется высокой скоростью [2], а также по их дифференцированию и выявлению типовых представителей.

В настоящее время считается, что критическими признаками для дифференцирования бактериофагов являются наличие специфической морфологии вирусных частиц, которую можно изучить с помощью электронной микроскопии, а также особое расположение сайтов рестрикции в геноме [3]. В нашей стране вплоть до последнего времени исследования фагов лактококков с использованием этих критериев для классификации не проводили, что не позволяло организовать как фаговый мониторинг, так и целенаправленную работу по получению фагоустойчивых вариантов лактококков.

В задачи данного исследования входило изучение нуклеиновых кислот лактофагов, циркулирующих на молочных комбинатах Республики Беларусь, с целью адаптации метода рестрикционного картирования для их дифференцирования.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования являлись вирулентные по отношению к бактериям *Lactococcus lactis* фаги, выделенные в период с октября 2005 г. по ноябрь 2006 г. из различных кисломолочных продуктов производства Республики Беларусь. Источники и способы выделения фагов описаны ранее [4]. Тест-культурами бактерий, в клетках которых происходила репродукция лактофагов, служили штаммы *Lactococcus lactis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии, а также сквашивающие молоко бактерии, выделенные из тех же источников, что и фаги.

Получение фаголизатов с высоким титром осуществляли в жидкой среде M17 в присутствии 0,5% глюкозы и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Извлечение и очистку фаговой ДНК проводили по общепринятым методикам [5], рестрикционный анализ – в условиях, оговоренных фирмой-производителем ферментов («Fermentas», Литва). Разделение фрагментов рестрикции осуществляли в 0,7% агарозном геле в TAE буфере при 150 В.

**Результаты.** На начальном этапе производили подбор условий для извлечения из вирионов нативной ДНК, ее очистки, рестрикционного расщепления и визуализации полученных фрагментов. Решающее значение имели следующие факторы:

- титр фаголизатов (не менее 10<sup>10</sup> БОЕ/мл);
- степень очистки препаратов выделенной фаговой ДНК;
- напряжение при электрофоретическом разделении рестрикционных фрагментов ДНК. Оптимизированные условия позволили получить удовлетворительные результаты по изучению фрагментов рестрикции ДНК лактофагов (рис. 1).



Рис. 1. Продукты полного гидролиза ДНК фага E7:  
1, 2 – E7/EcoRI;  
3 – ДНК фага λ/HindIII;  
4, 5 – E7/HindIII

Как видно из приведенных данных, в двух экспериментах для независимо выделенных, очищенных и расщепленных с помощью ферментов EcoRI и HindIII проб ДНК фага E7 имеет место хорошая воспроизводимость: количество фрагментов рестрикции и их подвижность

остаются одинаковыми. Это обстоятельство выгодно отличает анализируемый признак (расположение сайтов рестрикции в геноме) от фенотипических характеристик лактофагов, таких, например, как морфология негативных колоний и спектр литического действия.

С использованием двух рестрикционных ферментов осуществлено рестрикционное картирование 23 коллекционных лактофагов. В табл. 1 приведена величина полученных фрагментов, а также размер целых фаговых геномов, который вычисляли по сумме размеров фрагментов, образованных в результате полной рестрикции ДНК каждым из ферментов.

Анализ систематизированных в табл. 1 данных, позволяет выявить определенные закономерности:

1) геномы большинства лактофагов (за исключением E12, E16 и E21) содержат по несколько сайтов рестрикции только для одного из двух выбранных ферментов – либо для EcoRI, либо для HindIII;

2) для некоторых фагов из числа проанализированных количество и размер рестрикционных фрагментов полностью совпадают, как, например, для E8, E14 и E18;

3) ДНК некоторых фагов характеризуется сходной величиной, но несколько различающимися спектрами продуктов рестрикции (например, E1 и E6; E1 и E20).

**Обсуждение результатов.** Принцип методологии рестрикционного картирования заключается в выявлении в геномах исследуемых микроорганизмов сайтов рестрикции для различных рестрикционных ферментов. Общность в наличии и расположении этих сайтов в геномах свидетельствует об общности происхождения и высокой степени генетического родства. Кроме того, как показано (рис. 1, табл. 1), результаты рестрикционного картирования таких небольших геномов, как фаговые, позволяют с высокой степенью воспроизводимости получать легко анализируемые количественные характеристики. Эти важные отличительные особенности делают названный метод незаменимым при дифференцировании фагов, выделенных из сходных экологических ниш и специфичных по отношению к близкородственным бактериям. Такие фаги обычно имеют похожие фенотипические признаки (морфологию, круг бактерий-хозяев, отношение к инактивирующим агентам и др.), так что найти достоверные различия между ними оказывается нелегко. Ситуация осложняется еще и тем, что у этих чрезвычайно просто организованных форм жизни происходит быстрое закрепление в популяциях и накопление адаптационных мутаций. В результате с высокой скоростью возникают варианты фагов с обновленным спектром литического действия и другими измененными характеристиками.

Таблица 1

Размеры геномов и фрагментов рестрикции ДНК лактофагов

| Группа | Фаг          | Количество фрагментов при рестрикции ферментом |         | Размер генома, kbp | Величина фрагментов, kbp |   |
|--------|--------------|--|---------|--------------------|--------------------------|---|
|        |              | EcoRI  | HindIII |                    | EcoRI                    | HindIII   |
| X1     | E1           | 4  | –       | 22,3               | 8,2; 6,3; 5,2; 2,7       | –   |
|        | E2           | 2  | –       | 22,9               | 17,4; 5,5                | –   |
|        | E8, E14, E18 | 4  | –       | 27,2               | 13,2; 7,3; 4,5; 2,2      | –   |
|        | E6           | 3  | –       | 27,4               | 15,6; 7,3; 4,5           | –   |
|        | E13          | 3  | –       | 16,1               | 7,6; 6,1; 2,4            | –   |
|        | E20          | 4  | –       | 24,8               | 11,2; 8,4; 3,2; 2,0      | –   |
|        | E22          | 2  | –       | 28,0               | 13,5; 4,5                | –   |
|        | E17          | 2  | –       | 19,1               | 11,3; 8,8                | –   |
| X2     | E10          | 4  | –       | 26,3               | 15,2; 5,0; 4,8; 1,3      | –   |
|        | E3, E11, E15 | –  | 13      | 36,7               | –                        | 9,1; 4,7; 4,1; 3,2; 2,8; 2,3; 2,0; 1,8; 1,5; 1,4; 1,1; 1,0; 0,8           |
|        | E7           | –  | 15      | 36,1               | –                        | 6,2; 5,7; 5,0; 3,9; 3,0; 2,7; 2,0; 1,7; 1,4; 1,3; 0,9; 0,8; 0,6; 0,5; 0,4 |
| X3     | E21          | 2  | 13      | 38,4               | 20,4; 18,0               | 10,2; 4,2; 3,8; 3,2; 2,8; 2,5; 2,3; 1,2; 1,8; 1,6; 1,5; 1,2; 1,1          |
|        | E23          | 3  | –       | 37,2               | 18,2; 10,3; 8,3          | –   |
|        | E9           | 3  | –       | 36,0               | 18,2; 10,3; 7,5          | –   |
| X4     | E5, E12      | 4  | 2       | 36,1               | 17,1; 8,2; 7,5; 3,3      | 32,1; 4,0   |
|        | E19          | –  | 7       | 34,7               | –                        | 15,9; 7,1; 4,0; 4,1; 1,8; 1,1; 0,7  |
|        | E4           | 4  | 7       | 28,7               | 18,9; 4,4; 4,1; 2,3      | 6,1; 5,2; 4,9; 4,1; 3,5; 2,7; 2,2   |
|        | E16          | 4  | 8       | 28,9               | 18,9; 4,6; 4,1; 2,3      | 6,3; 5,1; 4,9; 4,2; 3,5; 2,7; 2,2; 1,3                                    |

Фенотипические свойства лактофагов E8, E14, E18

| Свойства                         |               | E8                         | E14                    | E18                        |
|----------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| Морфология негативных колоний    |               | Прозрачные, диаметр 3,0 мм | Мутные, диаметр 3,5 мм | Прозрачные, диаметр 2,8 мм |
| Спектр литического действия      |               | 407/1, 502, 503            | 407/1, 411, 502, 503   | 502, 503, 407/1            |
| Выживаемость, %, при воздействии | ультрафиолета | 1,1                        | 1,2                    | 1,0                        |
|                                  | цитрата       | 16,0                       | 14,6                   | 15,0                       |

Результаты рестрикционного анализа геномов 23 лактофагов, полученные с использованием всего двух ферментов, дают возможность распределить выделенные фаги в четыре достаточно обособленные группы (табл. 1) и, таким образом, осуществить их дифференцирование на основании объективного генетического критерия. В каждой из сформированных групп находятся представители с похожими, но не абсолютно одинаковыми фенотипическими признаками. Это подтверждают, например, данные табл. 2, где для трех лактофагов, идентичных по составу рестрикционных фрагментов, приведены другие свойства. Рестрикционное картирование лактофагов, выделенных из произведенных в Республике Беларусь кисломолочных продуктов, позволило выявить несколько типичных представителей, различающихся комплексом свойств и преобладающих в составе проанализированных проб. Фрагменты рестрикции этих фагов представлены на рис. 2.

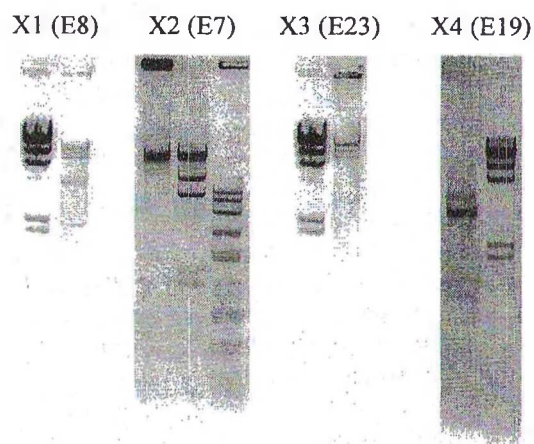


Рис. 2. Фрагменты рестрикции типичных представителей групп

**Заключение.** Выявление типовых лактофагов в результате дифференцирования обширной коллекции этих организмов с привлечением генетических признаков открывает возможности для более оперативного и адекватного скрининга фагоустойчивых вариантов заквасочных бактерий, что должно способствовать сокращению распространения явления фаголизиса при производстве ферментированных молочных продуктов. С другой стороны, сокращение числа изучаемых фагов за счет выявления типовых форм облегчает и делает направленной работу по анализу последовательности нуклеотидов в их ДНК, что является необходимым этапом в процессе воздания ДНК-зондов для обнаружения этих опасных агентов в сырье и продуктах.

#### Литература

1. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants / S. Moineau [et. al.] // *Can. J. Microbiol.*, 1992. – 38:875-882.
2. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A. W. Jarvis [et. al.] // *Intervirology*, 1991. – 32, 2-9.
3. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States / S. Moineau [et. al.] // *J. Dairy Sci.* 1996. – 79:2104-2111.
4. Райский, А. П. Распространение бактериофагов лактококков в молочных продуктах, произведенных в Республике Беларусь / А. П. Райский, Н. А. Белясова, Е. П. Малечко // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в.* – 2006. – Вып. XIV. – С. 144-146.
5. Девис, Р. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий / Р. Девис, Д. Ботстайн, Дж. Рот. – М.: Мир, 1984. – 176 с