

УДК 637.12.04/.07:663.1

К.В. Беспоместных, О.О. Бабич, А.Ю. Просеков, Е.В. Короткая

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ И ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ
ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ЛАКТОВАЦИЛЛУС ВУЛГАРИКУС***

Проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей бактерий рода *Lactobacillus*, депонированных в базу данных NCBI. Синтезированы родоспецифичные и видоспецифичные праймеры для индикации и идентификации *L. bulgaricus* и *L. acidophilus*. Разработанные родоспецифичные и видоспецифичные праймеры обладают низкой степенью гомологии относительно соответствующих регионов ДНК других бактерий молочнокислого брожения, что обеспечивает их специфичность.

Разработанная методика индикации молочнокислых бактерий и комплексная схема их родовой и видовой идентификации могут использоваться для характеристики изолируемых штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и представлять практический интерес для использования в системе контроля качества продуктов питания, обогащенных лактобациллами.

Бактерии, род, *Lactobacillus*, штамм, филогенетический анализ, праймеры, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Гос. контракт П-423.

Штаммы рода *Lactobacillus* относятся к промышленно-значимым молочнокислым бактериям, которые участвуют в производстве многих ферментированных пищевых продуктов как растительного, так и животного происхождения. Исходя из различий в экологических нишах и способности к брожению род *Lactobacillus* разделен на три подвида: *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, который обычно обнаруживается в ферментированных овощах; *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *L. delbrueckii subsp. lactis*, которые присутствуют в молочных продуктах (последний использует более широкий спектр углеводов). Из-за их своеобразных метаболических и технологических свойств природные или выделенные культуры штаммов подвидов широко используются в ассоциации с другими микроорганизмами для производства йогуртов, кисломолочных продуктов и сыров [1, 3].

Быстрая и надежная идентификация *L. delbrueckii* на подвидовом и штаммовом уровнях имеет большой интерес для базовых знаний, а также для промышленных целей. Например, в соответствии содержания информации на этикетке должны быть указаны те микроорганизмы, которые используются для производства кисломолочных продуктов и сыров.

За последние несколько лет созданы молекулярные методы таксономической идентификации *L. delbrueckii* для устранения недостатков фенотипических классических методов. Эти современные подходы включают в себя фенотипические и генетические методы, такие как использование штамм-специфических олигонуклеотидных зондов для блот-гибридизации, ДНК-дактилоскопии и рестрикции рибосомной ДНК. Развитие методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) открыло новые возможности для четкой и быстрой идентификации молочнокислых бактерий [2, 3].

Быстрые в исполнении методики на основе ПЦР являются альтернативой классическим микробиологическим методам и предпочтительны в случае необходимости немедленного получения результата. Метод позволяет решать задачи индикации, относящиеся к указанному роду, и точной видовой идентификации.

Для дизайна родоспецифичных и видоспецифичных праймеров чаще всего используют генетические детерминанты 16S и 23S рРНК и гипервариабельный интерспейсерный регион (ITS), разделяющий вышеназванные локусы [4]. Реже матрицей для праймеров являются ген трансальдолазы, ген *gcsA*-малого протеина, принимающего участие в рекомбинации гомологичной ДНК, *tuf*-ген, кодирующий фактор элонгации Tu [5, 6].

Генетическая детерминанта 16S рРНК у различных видов рода *Lactobacillus* имеет размер около 1500 п.н. и несколько раз дублируется в геноме бактерий. Копии этих генов разделены спейсерными областями различного размера. Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* имеют две

отличающиеся по размеру спейсерные области между генами 16 и 23S рРНК, фланкированные полностью гомологичными участками. Ген 16S рРНК несет как консервативные, так и вариабельные участки нуклеотидной последовательности, что позволяет использовать ее для определения родового и видового типирования.

Целью данной работы являлось конструирование родоспецифичных и видоспецифичных праймеров для индикации и идентификации промышленно-значимых штаммов бактерий рода *Lactobacillus*.

Методика

Штаммы. В работе были использованы 10 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ) ФГУП ГосНИИгенетика, 5 из которых по паспортным данным принадлежали к *L. acidophilus*, а другие 5 – к *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (табл. 1), и 12 нуклеотидных последовательностей генов 16S рибосомной РНК молочнокислых бактерий, депонированные в базу данных NCBI (табл. 2).

Таблица 1

Штаммы микроорганизмов из ВКПИМ (ГосНИИгенетика)

№ п/п	№ в коллекции ВКПИМ	Название штамма	Источник
1	В-6551	L.a. T-3	Фесцес новорожденного ребенка
2	В-8153	L.a. AE-5	Получен из штамма L.a. AT-44
3	В-194	L.a.1k	Выделен из курицы
4	В-8634	L.a. 3	Самоквасная простокваша
5	В-5863	L.a. 57S	Самоквасное молоко
6	В-6516	L.d. b. 21	Выделен из молока
7	В-3964	L.d. b.	Сырое молоко
8	В-3141	L.d. b. Л20/2	Мацони
9	В-6543	L.d. b. Б-259	Самоквасный молочный продукт
10	В-6515	L.d. b. 19	Выделен из молока

Выделение ДНК. ДНК из высушенной культуры бактерий выделяли с помощью «Набора для выделения геномной ДНК из бактерий» компании «Синтол» (Москва). Для экстракции бактериальной ДНК брали 1 мл жидкой культуры и осаждали клетки центрифугированием 10 000 об/мин – 3 мин, отбирали супернатант. Далее ресуспендировали клетки в 300 мкл буфера (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 50 mM глюкоза, 10 mM ЭДТА), к суспензии добавляли 3 мкл лизоцима (концентрацией 10 мг/мл). Лизировали клеточную стенку при 37 °С 60 мин, периодически перемешивая содержимое пробирки переворачиванием, центрифугировали при 13 000 об/мин 1 мин. Далее полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл лизирующего буфера

(20 mM Tris HCl, pH 8,0; 75 mM NaCl; 1 % SDS; 10 mM ЭДТА), в полученную суспензию добавляли 3 мкл РНКазы А (концентрацией 10 мг/мл). Проводили инкубацию при 37 °С 30 мин, охлаждали во льду 1 мин. Добавляли 100 мкл раствора для осаждения белков (7,5М ацетат NH₄) и перемешивали на вортексе в течение 20 с, затем центрифугировали при 13 000 об/мин 5 мин. Затем переносили супернатант в чистые 1,5 мл пробирки и добавляли 300 мкл изопропанола, перемешивали переворачиванием в течение 1 мин, помещали на -20 °С на 30 мин. Затем центрифугировали при 13 000 об/мин 5 мин, аккуратно сливали супернатант и помещали пробирки перевернутыми на чистую фильтровальную бумагу. После чего добавляли в пробирки по 400 мкл 70 % спирта и перемешивали переворачиванием несколько раз, чтобы промыть осадок ДНК. Несколько раз повторяли то же самое. Окончательно промытый осадок подсушивали при 37 °С 15 мин до полного исчезновения капель спирта. Высушенный осадок растворяли в 30 мкл ТЕ буфера.

Таблица 2

Номера последовательностей гена 16S рРНК представителей рода *Lactobacillus*, депонированных в NCBI

Номер последовательности и гена 16S рРНК в NCBI	Название штамма
CP000033.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM
FJ556999.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain СЕСТ 4529
FJ749655.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain IMAU30067
EU878007.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain NX2-6
AY763429.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain LH4
FJ861093.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain KLDS 1.0625
EU483107.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain LC
CP000412.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365
EU642554.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU40169
FJ915706.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain IMAU40169
EU547306.1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain BCS113
AF429503	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842

Филогенетический анализ. Для конструирования видоспецифичных и родоспецифичных праймеров использовано 12 нуклеотидных последовательностей генов 16S рибосомной РНК молочнокислых бактерий, депонированные в базу данных NCBI: *Lactobacillus acidophilus* – CP000033.3, FJ556999.1, FJ749655.1, EU878007.1, AY763429.1; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – FJ861093.1, EU483107.1, CP000412.1, EU642554.1, FJ915706.1, EU547306.1 (для видоспецифичных); *Lactobacillus delbrueckii*

ssp. *bulgaricus* AF429503, *Lactobacillus acidophilus* AY763429 (для родоспецифичных).

Анализ последовательности ДНК, кодирующей синтез 16S рРНК, является основой филогенетического анализа бактерий. Для установления различий в последовательностях был проведен сравнительный анализ и построено филогенетическое дерево в программе ClustalW.

Синтез олигонуклеотидов. Синтез олигонуклеотидов производился на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе ASM1000 («Биоссет», Новосибирск). Очистка производилась в полиакриламидном геле (ПААГ).

Аmplификация гена 16S рРНК. Амплификацию проводили на приборе типа «Терцик» (Москва) с применением термостабильной Taq-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск) согласно рекомендациям фирмы-производителя полимеразы. Для амплификации использовали синтезированные праймеры.

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: 95 °С – 200 с – 1 цикл, 62 °С – 50 с, 95 °С – 20 с – 25 циклов, 72 °С – 120 с – 1 цикл. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, содержащем бромид этидия. Документирование результатов осуществляли на видеосистеме Vitran «Биоком». Использовали маркер длин фрагментов ДНК.

Результаты и их обсуждение

Для конструирования универсальных родоспецифичных праймеров был проведен сравнительный анализ двух выровненных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения. По результатам анализа сконструированы универсальные праймеры для индикации бактерий рода *Lactobacillus* также на основе гена 16S рРНК:

16S for: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A
16S rev: 5'- ACG CTT GCC ACC TAC GTA TTA C

для амплификации последовательностей 16S рРНК длиной 566 н.п.

Теоретическая специфичность родоспецифичных праймеров была подтверждена экспериментально на 10 штаммах, из них 5 штаммов относятся к виду *L. acidophilus*, а другие 5 – к *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Синтезированные праймеры были использованы в амплификации фрагмента гена 16S рРНК исследуемых штаммов (рис. 1).

Представленные олигонуклеотиды могут составлять основу для разработки тест-систем, позволяющих проводить индикацию бактерий рода *Lactobacillus*.

Синтезирование праймеров для амплификации фрагмента 16S лактобацилл позволило наработать фрагмент, размер которого достаточен для получения геномных характеристик.

С целью конструирования видоспецифичных праймеров был проведен сравнительный анализ 11 полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения с помощью программы ClustalW.

Для этого нами был проведен поиск по базе данных полных нуклеотидных последовательностей, соответствующих генам 16S рРНК типовых представителей бактерий рода *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus*, депонированные в NCBI под номерами CP000033.3, FJ556999.1, FJ749655.1, EU878007.1, AY763429.1; *Lactobacillus delbruesckii ssp. bulgaricus* – FJ861093.1, EU483107.1, CP000412.1, EU642554.1, FJ915706.1, EU547306.1.

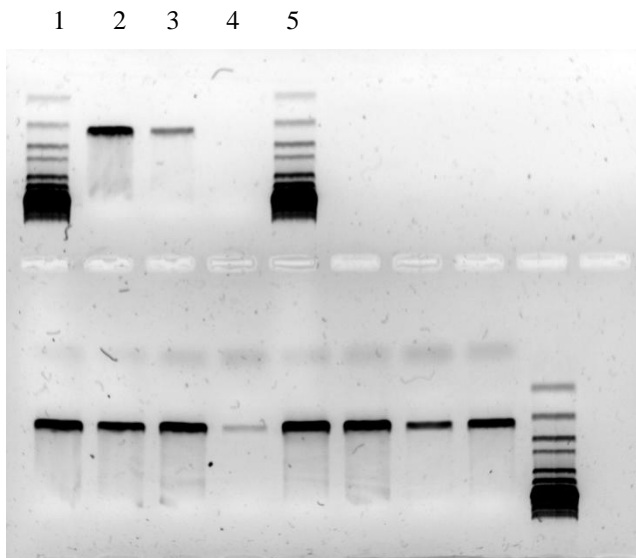


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения с использованием синтезированных праймеров: А – гель 1: 1 – маркер мол. веса «Медиген» 400–2500 п.н.; 2 – № 9; 3 – № 10; 4 – отрицат. контроль/H₂O; 5 – маркер; Б – гель 2: 1 – № 1; 2 – № 2; 3 – № 3; 4 – № 4; 5 – № 5; 6 – № 6; 7 – № 7; 8 – № 8; 9 – маркер

Выбранные нами нуклеотидные последовательности использованы для сравнительного филогенетического анализа, результаты которого отражены на рис. 2.

Одиннадцать использованных нами последовательностей гена 16S рРНК разных видов лактобацилл распределились в четыре кластера: в первый кластер вошли типовые штаммы видов *L. acidophilus* (CP000033.3, FJ556999.1, FJ749655.1, EU878007.1, AY763429.1); во второй и третий кластеры соответственно штаммы вида *L. bulgaricus* (EU547306.1, FJ915706.1); в четвертый кластер вошли типовые штаммы вида *Lactobacillus delbruesckii ssp. bulgaricus* (FJ861093.1, EU483107.1, CP000412.1, EU642554.1). Данное филогенетическое дерево (см. рис. 2) построено в программе ClustalW. Как видно из данных, представленных на рис. 2, в первом и четвертом кластерах соответственно объединяются два близких вида: *L. acidophilus* и *Lactobacillus delbruesckii ssp. bulgaricus*. Согласно данным, полученным нами, при анализе полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК гомология строения гена видов разных представителей рода *Lactobacillus* по отношению к гену 16S рРНК *Lactobacillus delbruesckii ssp. bulgaricus* составляет 87–93 % для штаммов вида *L. acidophilus* и 92–99 % для штаммов *L. bulgaricus*.

Сравнительный анализ показал, что наиболее значительные различия в последовательностях, кодирующих 16S рРНК, наблюдаются в первой трети последовательности. Ранее зарубежными авторами была проделана работа по систематизации видов рода *Lactobacillus* по 16S рРНК и другим маркерным последовательностям. Нами были оптимизированы ранее предложенные последовательности праймеров с целью повышения температуры отжига и увеличения специфичности получаемого ПЦР-продукта. По результатам анализа были синтезированы видоспецифичные праймеры:

16SbulF: 5'- CAA CAG AAT CGC ATG ATT CAA GTT TG (26)
 16SbulR: 5'- ACC GGA AAG TCC CCA ACA CCT A (22)
 для амплификации последовательностей 16S рРНК длиной 675 н.п.

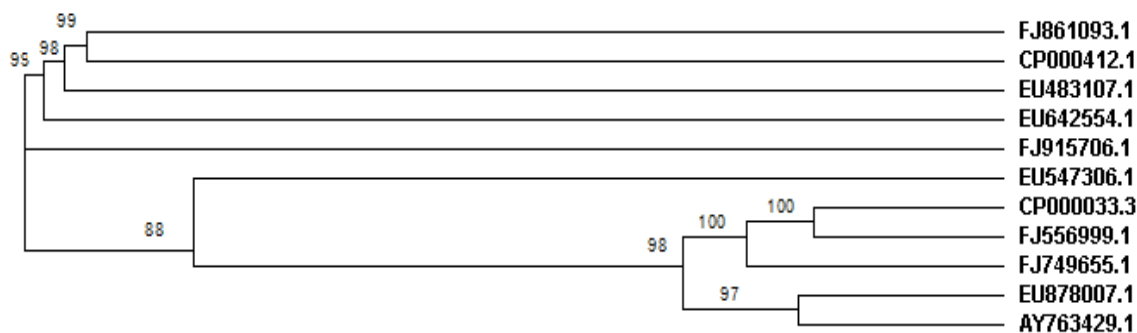


Рис. 2. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов гена 16S рРНК, отражающее родственные связи исследуемых штаммов молочнокислых бактерий *L. bulgaricus* и *L. acidophilus*

Вновь разработанный праймер обладает низкой степенью гомологии относительно соответствующих регионов ДНК других бактерий молочнокислого брожения, что обеспечивает его специфичность. Теоретическая специфичность праймеров была подтверждена экспериментально на пробиотических продуктах (рис. 3).

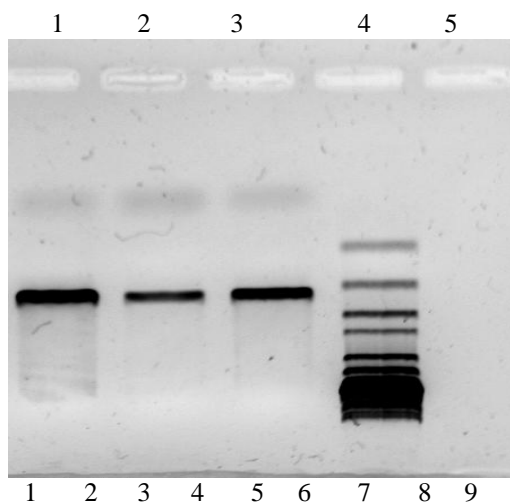


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК генома представителей рода *Lactobacillus*, содержащихся в различных субстратах: 1 – йогурт; 2 – бифилайф; 3 – положительный контроль; 4 – маркер; 5 – отрицательный контроль

В рамках разработанной темы этап видовой идентификации проводится на фрагменте обнаружения, что позволяет в короткий срок выявить в пробе бактерии рода *Lactobacillus* и идентифицировать виды *L. acidophilus* и *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Указанные виды лактобацилл являются промышленно-значимыми, входят в состав пробиотиков и лечебных продуктов питания. Разработанная методика индикации молочнокислых бактерий и комплексная схема их видовой идентификации могут использоваться для характеристики изолируемых штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и представлять практический интерес для использования в системе контроля качества продуктов питания, обогащенных лактобациллами.

Список литературы

1. Точилина, А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 2008. – № 3. – С. 69–73.
2. Ботина, С.Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 12. – С. 1621–1635.
3. Torriani, S. Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* / S. Torriani, G Zapparoli, F.

Dellaglio // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – № 10. – P. 4351–4356.

4. Hans G. H. J. Heilig. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA / Heilig et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – № 1. – P. 114–123.

5. Torriani, S. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers / S. Torriani, Giovanna E. Felis, F. Dellaglio // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 8. – P. 3450–3454.

6. Ventura, M. Analysis, Characterization, and Loci of the *tuf* Genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species and Their Direct Application for Species Identification / M. Ventura, C. Canchaya, V. Meylan et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – № 11. – P. 6908–6922.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей,
47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40

SUMMARY

**K.V. Bospomestnykh, O.O. Babich, A.J. Prosekov,
E.V. Korotkaya**

DESIGN OF GENUS-SPECIFIC AND SPECIES-SPECIFIC PRIMERS FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS BULGARICUS*

A comparative analysis of the nucleotide sequences of *Lactobacillus* deposited into the NCBI database has been carried out. Genus-specific and species-specific primers for indication and identification of *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* have been synthesized. Genus-specific and species-specific primers designed have a low degree of homology regarding DNA regions of other bacteria of lactic fermentation that ensures their specificity.

The developed method of indication of lactic acid bacteria and a complex scheme of their general and specific identification can be used to characterize the isolated strains of *Lactobacillus*. It can be of practical interest for use in a system of quality control of foodstuffs enriched with *Lactobacillus*.

Bacteria, genus, *Lactobacillus*, strain, phylogenetic analysis, primers, polymerase chain reaction (PCR).

