

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ ГРУППЫ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Тарашкевич Ю.С.

РУП «Институт мясомолочной промышленности», Минск,
julia10095@mail.ru

В настоящее время исследователи уделяют большое внимание молочнокислым бактериям за их способность образовывать антибиотические вещества и за счёт этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на вредную микрофлору. Наличие этих свойств объясняет использование бактерий рода *Lactobacillus* в различных пищевых производствах: в сыроделии, при производстве пробиотических кисломолочных продуктов, в хлебопечении, консервировании овощей, растительных соков, в виноделии и силосовании кормов [1].

Однако на сегодняшний день, несмотря на интенсивное изучение и активное применение представителей рода *Lactobacillus*, вопросы, касающиеся их таксономии и номенклатуры, все еще окончательно не решены. Их классификацию и видовую идентификацию значительно усложняет большое количество морфологических и физиолого-биохимических признаков, которые очень вариабельны даже в пределах одного вида и во многом зависят от состава среды и условий культивирования. Поэтому для установления точного таксономического положения бактерий становится обязательным применение молекулярно-генетических методов [2]. Развитие методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) открыло новые возможности для четкой и быстрой идентификации бактерий [3].

В связи с этим целью данной работы явилась разработка метода мультиплексной ПЦР для бактерий видов группы *Lactobacillus plantarum*.

Для исследований отобрали 5 бактериальных культур рода *Lactobacillus* из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (1157 ML-AF, 2640 ML-O, 1180 ML-OF, 2645 ML-O, 2786 ML-O) и 2 изолята лактобацилл, выделенные из природных источников (p1468/3-4-1, p1431/3-2-1).

Было проведено секвенирование исследуемых культур и определены нуклеотидные последовательности гена 16S rRNA длиной около 1500 п.н. При проведении филогенетического анализа исследуемых культур в качестве сравнения использовали нуклеотидные последовательности генов 16S rRNA референтных штаммов основных видов рода *Lactobacillus*, полученных из базы данных GenBank.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA-X [4] с последующей ручной корректировкой. Филогенетическое дерево построено с использованием Neighbor-Joining

кластерного метода расчета генетических расстояний и bootstrap анализа, отражающего достоверность кластеризации (рис. 1). Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 500 деревьев.

Филогенетический анализ показал, что все исследуемые культуры располагались в одном кластере с референтными штаммами, относящимися к группе видов близких к *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* и *Lb. pentosus*) (рис. 1).

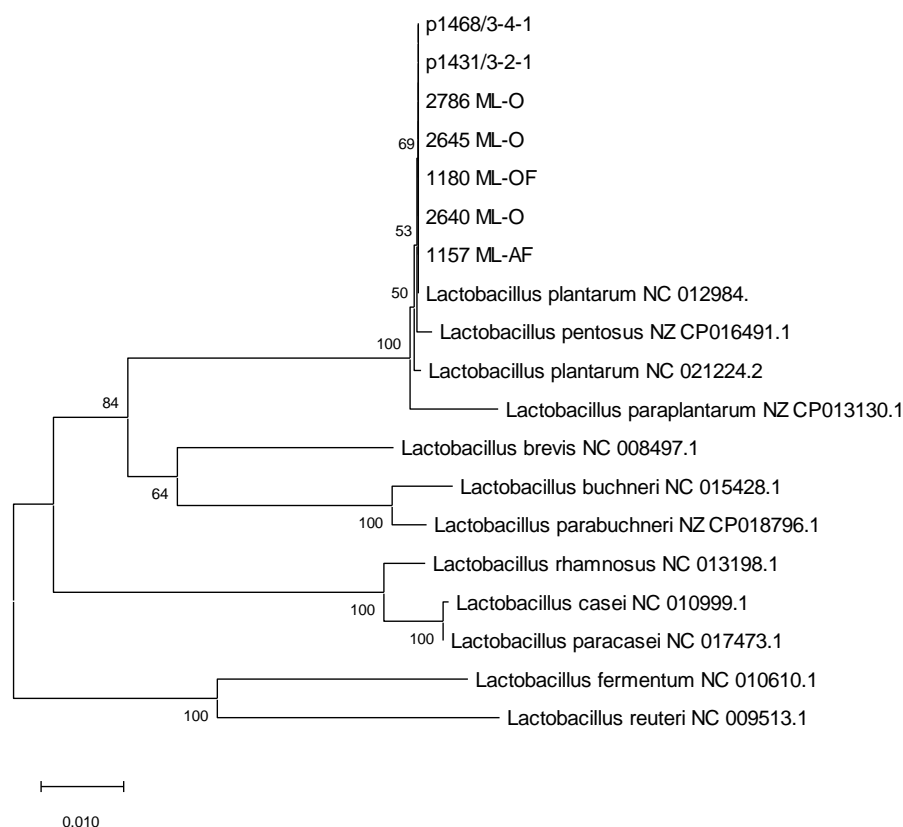


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа гена 16S rRNA, отражающее родственные связи штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Согласно литературным источникам и нашим данным, полученным при секвенировании, различие в нуклеотидных последовательностях гена 16S rRNA данных видов составляет менее 1% [5], что не позволяет проводить окончательную надежную видовую идентификацию по данному молекулярному признаку. В связи с этим нами был проведен молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 23S rRNA и *gcsA*, которые часто используются в качестве маркеров для идентификации бактерий.

Идентификация видов *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* с использованием последовательности гена 23S rRNA оказалась невозможна в связи с её высокой идентичностью у всех трех культур.

В ходе филогенетического анализа гена *recA* было выявлено, что исследуемые виды находятся на разных филогенетических ветвях с высоким уровнем бутстрапа, что позволяет достоверно идентифицировать данные культуры (рис. 2).

Для конструирования специфичных праймеров были отобраны четыре участка в последовательности гена *recA*. Для проведения мультиплексной ПЦР (мПЦР) в качестве общего выступал реверс праймер Uni2-R, а форвард праймеры *paraF*, *pent-F*, *plan-F* использовали для идентификации *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* соответственно.

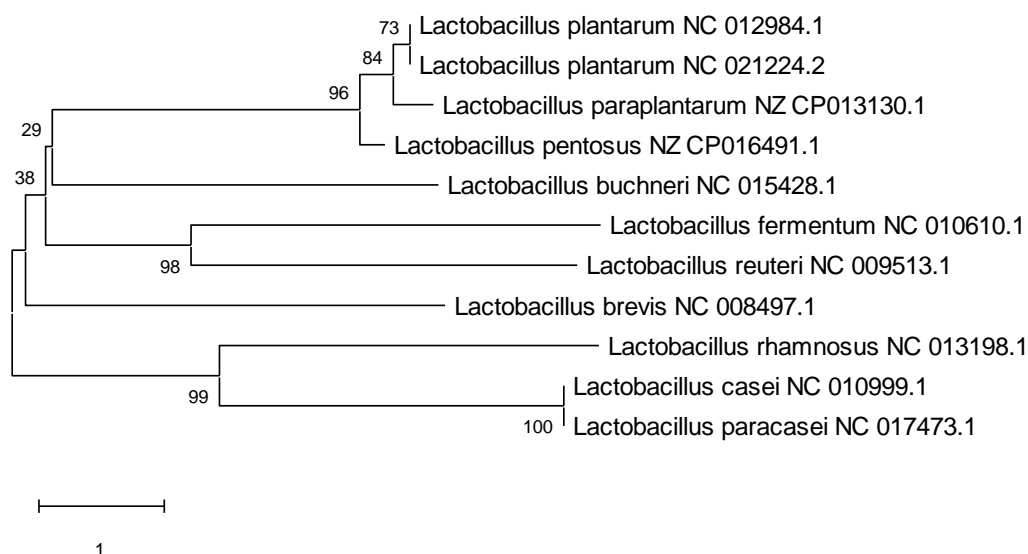


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа гена *recA*, отражающее родственные связи штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Сконструированные праймеры представлены в таблице 1. Для определения расчетной температуры отжига использовали функции анализа олигонуклеотидов и дизайна праймеров на сайте <https://eu.idtdna.com>.

Таблица 1 – Дизайн специфичных праймеров

Праймер	Последовательность 5'→3'	T, °C	Размер продукта, п.н.
Uni2-R	TCGGGATTACCAACATCAC	52,5	–
<i>paraF</i>	GTCACAGGCATTACGAAAAC	52,0	107
<i>pent-F</i>	CAGTGGCGCGGTTGATATC	56,0	218
<i>plan-F</i>	CCGTTTATGCGGAACACCTA	55,0	318

Во избежание неспецифического отжига проводили оптимизацию с учетом температуры и времени отжига праймеров, а также оптимизацию концентраций праймеров. Таким образом, смесь ПЦР состояла из 2 мМ MgCl₂, праймеров *paraF*, *pentF* и Uni2-R (0,25 мкМ каждый), 0,12 мкМ праймера *planF*, 12 мкМ дНТФ (3 мкМ каждый), 1000 Ед. *Taq*-полимеразы (ОДО «Праймтех»), 1× буфер для ПЦР (ОДО «Праймтех») и 0,5 мкл ДНК. ПЦР проводили в

термоциклере MJ Mini™ (Bio-Rad) с начальной денатурацией при 94°C в течение 3 минут, 30 циклами денатурации при 94 °C (30 сек), отжигом при 56°C (20 сек) и элонгации при 72°C (30 сек) и окончательное удлинение при 72°C в течение 5 мин. Продукты амплификации разделяли по стандартной методике в 1,5%-ном агарозном геле, окрашивали красителем UView 6x Loading Dye и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы GelDoc XR+ (Bio-Rad). Результаты мПЦР представлены на рисунке 3. Как видно из представленных результатов, при проведении мПЦР с рассчитанной концентрацией и температурой отжига, стабильно детектируется фрагмент гена *recA* размером ≈ 107 п.н. в тех образцах, где содержится ДНК *Lb. paraplantarum*, а фрагмент размером ≈ 318 п.н. в образцах где матрицей ДНК выступает геномная ДНК *Lb. plantarum*.

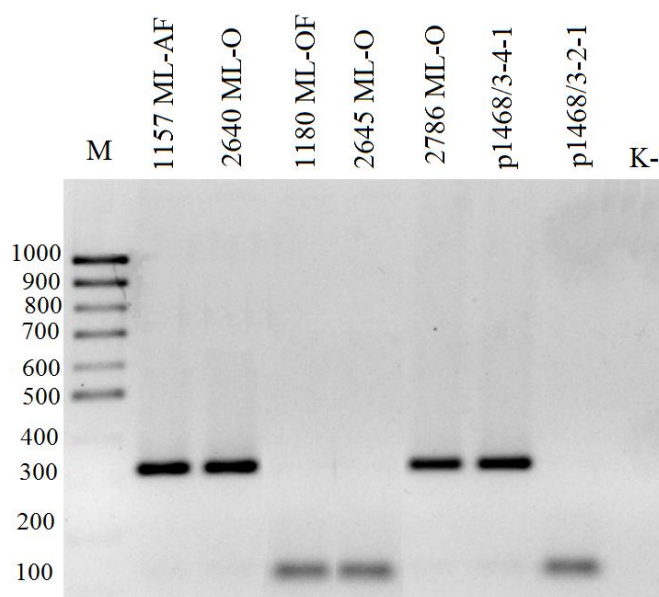


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов мПЦР

Примечание: М – маркер молекулярного веса М100bp (ОДО «Праймтех»),
К- – отрицательный контроль.

Ни в одной дорожке агарозного геля не был зафиксирован фрагмент размером ≈ 218 п.н., что говорит о том, что ни одна из исследуемых культур не принадлежит к виду *Lb. pentosus*. Полученные результаты указывают на высокую специфичность разработанных праймеров и возможность использования гена *recA* в качестве филогенетически-таксономического маркера для близкородственных видов группы *Lactobacillus plantarum*.

Литература

1. Квасников, Е.И., Нестеренко, О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. Москва: Наука, 1975. – 384 р.

2. Соловьева, И.В. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы / И.В. Соловьева и др. // МедиАль. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 29–44.

3. Settanni, L. Rapid Differentiation and In Situ Detection of 16 Sourdough *Lactobacillus* Species by Multiplex PCR / L. Settanni et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 6. – P. 3049–3059.

4. Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. / S. Kumar et al. // – 2018. – № 35. – P. 1547–1549.

5. Naser, S.M. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses / S.M. Naser et al. // IJSB. – 2007. – Vol. 57, № 12. – P. 2777–2789.