

ИЗУЧЕНИЕ ЛАКТОКОККОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD-АНАЛИЗА

Шпаникова Е. В., Борунова С. Б. Василенко С. Л.,
Жабанос Н. К., Фурик Н. Н.

Институт мясо-молочной промышленности НАН Беларуси
г. Минск, Республика Беларусь

Фаголизис на молочных комбинатах остается одной из основных проблем при производстве широкого спектра ферментированных продуктов. Одной из действенных профилактических мер, призванных ограничить экономические потери от фаголизиса при производстве кисломолочных продуктов, является непрерывный фаговый мониторинг, а его результативность зависит от эффективности используемых методов обнаружения фагов и их идентификации и дифференциации [1]. На территории Республики Беларусь распространены фаги видов С2 и 936, а также вида P034 семейства *Podoviridae* [2, 3]. Наиболее распространенным является вид С2, который и представляет особый интерес. Широкомасштабное изучение особенностей организации и свойств фагов молочнокислых бактерий призвано помочь найти способы борьбы с распространением лактофагов для предотвращения фаголизиса.

Настоящее исследование проводилось с целью дифференцирования коллекционных фагов лактококков с использованием RAPD-анализа.

В работе использовали 125 вирусов из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Проведено получение лизатов коллекционных бактериофагов на среде MRS. Во всех лизатах определено количество вирусных частиц, которое составило от $1,1 \times 10^8$ БОЕ/мл до $4,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. При этом для большего количества фагов (52,8% от исследованных) получены лизаты с титром от $1,0 \times 10^9$ до $9,9 \times 10^9$ БОЕ/мл. Использование среды MRS позволило для 28,7% исследованных вирусов получить лизаты, количество вирусных частиц в которых превышало $1,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Для 18,5% фагов полученные лизаты содержали от $1,1 \times 10^8$ БОЕ/мл до $9,9 \times 10^8$ БОЕ/мл. Полученные лизаты использованы для выделения вирусной ДНК согласно [4]. Установлено, что концентрация выделенной ДНК зависит от количества вирусных частиц в лизате.

При проведении RAPD-ПЦР использовали праймеры P1 (5'-CCGCAGCCAA-3') и B (5'-CCGAGTCCA-3') производства Праймтех, Беларусь. Реакционная смесь содержала 1 Ед. полимеразы, 200 мкМ праймера, 200 мкМ дНТФ, 2 мкл 10X реакционного буфера, деионизированную воду, в качестве матрицы использовали 0,5 мкл разведенной в деионизированной воде (в соотношении 1:10) выделенной вирусной ДНК.

Результаты фиксировали путем проведения электрофореза в 1%-м агарозном геле и SB-буфере при 60-70 В. Для визуализации фрагментов ДНК использовали бромистый этидий (0,5 мкг/мл).

Установлено, что фаги, дающие практически идентичную картину в RAPD-ПЦР с праймером B, при анализе с праймером P1 показывают значительно различающиеся между собой RAPD-ПЦР профили.

При проведении RAPD-ПЦР с праймером P1 визуализировали продукты различного размера от 100 до 1500 п.н. В ходе анализа были выявлены различные группы сходных вирусов: наиболее обширная включала в себя 23 фага, остальные группы включали от 2 до 10 фагов.

При проведении RAPD-ПЦР с праймером B регистрировали 15 продуктов различного размера от 150 до 1500 п.н. Выявлена 21 группа сходных вирусов. Самая многочисленная группа включала в себя 6 фагов, остальные группы включали от 2 до 5 фагов.

Таким образом, выделена вирусная ДНК, с использованием которой проведен RAPD-ПЦР анализ бактериофагов лактококков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Выявлены фаги, которые проявляют значительное сходство между собой: при использовании каждого из праймеров выявлено по 21 группе вирусов, имеющих сходный RAPD-ПЦР профиль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szczepanska A.K., Hejnowicz M.S. et al. // J. Acta Biochim. Pol. 2007. С. 151-158.
2. 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.
3. Райский, А. П. Фенотипическая характеристика лактофагов молочнокислых продуктов / А. П. Райский, А. Батаев, Г. И. Новик, Н. А. Белясова // Наука и инновации. – 2008. – Т 62, № 4. – С. 36-40
3. Райский А. П., Белясова Н. А. и соавт. // Вестник БГУ. Сер. 2. 2009. № 1. – С. 70-73.