

DISEÑO DE UN ENSAYO POR PCR PARA LA DETECCIÓN DE PROFAGOS EN LACTOBACILOS PROBIÓTICOS

Delfina Zaburlin

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Palabras claves: fagos, lactobacilos, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan bacterias, y en el caso de las bacterias lácticas (BAL) pueden afectar notoriamente la capacidad acidificante de los cultivos iniciadores, con graves consecuencias en la elaboración de productos lácteos fermentados (queso, yogur, etc.). El problema se agrava al utilizar cepas probióticas ya que, por su naturaleza, su reemplazo resulta difícil y costoso. La incidencia de la lisogenia (presencia de profagos en genomas bacterianos) es elevada en *Lactobacillus* del grupo *casei* (*L. paracasei*, *L. casei* y *L. rhamnosus*), especies muy usadas como probióticos en alimentos, e incluye a la mayoría de las cepas comerciales analizadas.

La cepa probiótica comercial *L. paracasei* A (LcA) fue recientemente secuenciada y se suma a una lista creciente de secuencias genómicas bacterianas publicadas. Contiene un profago (iA2) inducible con mitomicina C (MMC) y sin cepa indicadora conocida. Por otro lado, los fagos C_{L1} y C_{L2} se indujeron espontáneamente a partir de cultivos de la cepa LcA y fueron capaces de lisar tanto dicha cepa como otras relacionadas. El tratamiento con MMC de otras cepas (comerciales, de colección y salvajes) demostró que la mayoría eran lisógenas, y en 2 casos se obtuvieron nuevos fagos temperados (iLp84 e iLp1308) capaces de propagarse lisando cultivos de cepas relacionadas.

Los fagos C_{L1}, C_{L2}, iLp84, iLp1308 y el profago iA2 fueron recientemente secuenciados. Profagos similares al iA2 se encontraron en numerosas cepas secuenciadas del grupo *casei*. Los fagos C_{L1}, C_{L2}, iLp84 e iLp1308 están relacionados entre sí (grupo V1), y fragmentos grandes de sus genomas están presentes en dichas cepas. Fragmentos genómicos de otros fagos y profagos del grupo *casei* (grupo V2: A2, phiAT3, PL-1, J-1, Lca1, Lrm1, Lc-Nu; menor homología con fagos del grupo V1), también se encontraron en genomas bacterianos, si bien de modo más fragmentado. La amplia distribución de profagos (completos o remanentes) en el grupo *casei* constituye una reserva de genes para generar nuevos fagos mediante recombinación.

OBJETIVOS

Diseñar un ensayo rápido de monitoreo por PCR que permita detectar profagos en cepas de lactobacilos del grupo *casei*. Como objetivos particulares, se plantearon:

- ✓ Diseñar cebadores sobre regiones conservadas en el profago iA2 y similares (grupo P), presentes en *Lactobacillus* del grupo *casei* de secuencia conocida.
- ✓ Diseñar oligonucleótidos sobre regiones conservadas entre los genomas de diferentes fagos líticos de *Lactobacillus* del grupo *casei* (grupos V1 y V2), presentes en genomas bacterianos (origen temperado) de secuencia conocida.
- ✓ Aplicar el ensayo por PCR a lactobacilos del grupo *casei* de la colección del INLAIN, donde se desconoce la presencia de profagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Tesina para optar por el Título de Licenciada en Biotecnología.

Director: Dr. Diego Mercanti

Co-directora: Dra. Andrea Quiberoni

Se utilizaron 3 grupos de cepas (A, B, C). Los grupos A y B comprenden 29 y 20 cepas de *Lactobacillus del* grupo *casei*, respectivamente, cuya presencia de profagos inducibles con MMC se conoce (grupo A, incluyendo la cepa LcA) o no (grupo B). El grupo C comprende bacterias no pertenecientes al grupo *casei*, que fueron empleadas como controles negativos en los ensayos por PCR.

Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias genómicas utilizadas para el diseño de oligonucleótidos se obtuvieron de GenBank y se detallan en la Tablas 1 y 2. La herramienta PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) permitió extraer secuencias de profagos a partir de los genomas completos de bacterias lisógenas. Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias (Clustal Omega; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), y se identificaron las secuencias fágicas consenso presentes en la cepa LcA, utilizando BioEdit v7.2.5 (Hall, T. A., 1999). Para el diseño de los cebadores se utilizaron las herramientas GEMI (Sobhy, H. and Colson, P., 2012) y Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La herramienta OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com>) permitió descartar la formación de estructuras secundarias y homo o heterodímeros en los cebadores seleccionados.

Tabla 1 y 2. Secuencias genómicas de cepas y fagos utilizadas para el diseño de oligonucleótidos, respectivamente.

Cepas del grupo <i>casei</i>	Secuencia (AN)	Profagos y fagos del grupo <i>casei</i>	Secuencia (AN)
<i>Lb. casei</i> LcA	CM001861	iA2	KR905068.1
<i>Lb. casei</i> BD-II	NC_017474.1	profagos (P1 y P2) cepa BD-II	(*)
<i>Lb. casei</i> BL23	NC_010999.1	profagos (P1 y P2) cepa BL23	(*)
<i>Lb. casei</i> LC2W	NC_017473.1	profagos (P1 y P2) cepa LC2W	(*)
<i>Lb. casei</i> LcY	NZ_CM001848.2	profago cepa LOCK919	(*)
<i>Lb. casei</i> LOCK919	NC_021721.1	profagos (P1 y P2) cepa W56	(*)
<i>Lb. casei</i> Zhang	NC_014334.2	profago cepa 8700:2	(*)
<i>Lb. casei</i> W56	NC_018641.1	profago cepa N1115	(*)
<i>Lb. paracasei</i> 8700:2	NC_022112.1	C _L 1	KR905066
<i>Lb. paracasei</i> N1115	CP007122	C _L 2	KR905067
<i>Lb. rhamnosus</i> LOCK900	NC_021723.1	iLp84	KR905069
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	NC_013198.1	iLp1308	KR905070
		Lrm1	EU246945
		J-1	KC171646
		PL-1	KC171647
		A2	AJ251789
		phi-AT3	AY605066
		Lc-Nu	AY131267

(*): profagos extraídos con PHAST a partir de secuencias genómicas bacterianas.

Extracción de ADN bacteriano

El ADN bacteriano se extrajo con el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich). El ADN extraído se cuantificó en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) en buffer TBE 1X y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Ensayos de amplificación por PCR

Se empleó un termociclador Veriti® 96-Wells ThermalCycler (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción (20 µl finales) contenía 2 µl de buffer Taq 10X (Sigma-Aldrich), dATP, dCTP, dGTP y dTTP (200 µM c/u), cebadores directo y reverso (0,5 µM c/u), 0,5 U de Taq Polimerasa (Sigma-Aldrich) y 1 µl de una dilución de ADN bacteriano. Los ciclos empleados fueron: 3 min / 94 °C (1 ciclo), 1 min / 94 °C, 2 min / 60, 55 o 50 °C (temperatura de hibridación –Th– variable, según los cebadores usados) y 2 min / 72 °C (35 ciclos), y 7 min / 72 °C (1 ciclo). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,8 % (p/v) en buffer TBE 1X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de oligonucleótidos para la detección de profagos

Dada la baja homología de secuencias entre profagos del tipo iA2 y otros fagos líticos y profagos, el diseño se encaró de manera independiente para ambos. Para el primer grupo mencionado, se trabajó sobre 2 subgrupos principales que engloban profagos muy similares entre sí (P1 y P2). El profago iA2, secuenciado a partir de virus inducidos en un cultivo de la cepa LcA, pertenece al subgrupo P1, que contiene profagos muy similares presentes en las cepas *L. paracasei* BL23, LC2W, BDII y W56 (ver Tabla 1). Estas cepas, LcA inclusive, contienen otro profago muy conservado (subgrupo P2) pero distinto del iA2. Las cepas *L. paracasei* LOCK919, N1115 y 8700:2 fueron incluidas en el diseño de cebadores, ya que también contienen profagos, no pertenecientes a los subgrupos anteriores pero más emparentados con los del subgrupo P1. Empleando la herramienta Primer BLAST se obtuvieron 10 pares de cebadores, de los cuales 4 fueron seleccionados para ser utilizados en los ensayos de PCR. El par #1 permite detectar todos los profagos del tipo iA2, y fue diseñado sobre ORFs que codifican para una endonucleasa HNH (ORF50) y la subunidad mayor de la terminasa (ORF2), los cuales presentaban gran similitud en todos los genomas. Los pares #2 y #3, diseñados también sobre el ORF2, permiten detectar profagos del subgrupo P1 y los 3 profagos que no pertenecen a ningún subgrupo. El par #4 sólo detecta profagos del subgrupo P2. Si bien el cebador directo del par #4 fue diseñado sobre una helicasa (ORF19), el reverso corresponde a una región no codificante, que de todos modos se encuentra conservada entre los profagos P2.

Diseño de oligonucleótidos para la detección de fagos virulentos

El diseño de cebadores para detectar fagos virulentos de origen temperado se realizó previa clasificación de los mismos en dos grupos, en función de la homología de sus secuencias. El primer grupo (V1) comprende los fagos recientemente secuenciados C_L1, C_L2, iLp84 e iLp1308. El segundo grupo (V2) comprende los fagos A2, PL-1, J-1, Lrm1, phiAT3 y Lc-Nu. Para la detección de fagos del grupo V1, se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos utilizando GEMI y Primer BLAST. El par #5 se diseñó sobre la subunidad grande de la terminasa y el par #6 sobre la proteína portal. Estas proteínas están codificadas, respectivamente, por el ORF2 (todos los fagos del grupo V1), y por los ORF3 (C_L1, iLp1308 e iLp84) y ORF4 (C_L2).

Para el diseño de cebadores que permitan la detección de los fagos del grupo V2, el procedimiento fue diferente. Dada la baja homología entre sus genomas, el diseño de cebadores se hizo sobre ORFs de función desconocida y regiones no codificantes. Se realizaron alineamientos múltiples, y sobre la secuencia CLUSTAL consenso se diseñaron 9 cebadores directos y 8 reversos utilizando GEMI. Debido a una serie de restricciones en su posterior aplicación, sólo fue posible la selección de 2 cebadores directos y 2 reversos, cuyas combinaciones dieron origen a 4 pares (#7, #8, #9 y #10).

Ensayos de amplificación por PCR

Los 10 pares de cebadores diseñados fueron probados en reacciones de PCR sobre ADN de la cepa LcA, de modo de verificar su correcto funcionamiento. El par #2 fue descartado por presentar reiteradamente amplificaciones en el control negativo. Con los 9 pares restantes, se llevaron a cabo ensayos de PCR sobre las 49 cepas de los grupos A y B (lactobacilos del grupo *casei*) (*Materiales y métodos*), y las 7 del grupo C, pertenecientes a otros géneros y especies, empleadas como control negativo.

Las amplificaciones utilizando los cebadores diseñados en este trabajo resultaron variables según la temperatura de hibridación utilizada (50, 55 y 60 °C) y, si bien todos los oligonucleótidos cebadores dieron resultados positivos para un gran número de cepas, los mejores resultados se obtuvieron con los pares #3 (detección de profagos P1, Th=60 °C), #5 y #7 (detección de fagos V1 y V2, respectivamente, Th=55 °C). La tabla 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos en las reacciones de PCR utilizando los pares #3, #5 y #7, sobre los tres grupos de cepas (A, B y C).

Tabla 3. Resultados obtenidos en los ensayos por PCR para la detección de profagos y remanentes de fagos virulentos.

Nº	Cepa	Par 3 (I)			Nº	Cepa	Par 3 (I)			
		60°C	55°C	55°C			60°C	55°C	55°C	
Cepas grupo A				Cepas grupo B						
1	<i>Lb. paracasei</i> A	+	+	+	30	<i>Lb. casei</i> FSM 320n	+	-	+	
2	<i>Lb. paracasei</i> Dn	+	+	+	31	<i>Lb. casei</i> FSM 323	+	-	+	
3	<i>Lb. paracasei</i> Hn	+	+	+	32	<i>Lb. casei</i> FSL 343	-	+	+	
4	<i>Lb. paracasei</i> Yk	+	-	+	33	<i>Lb. casei</i> FSL 346	-	-	+	
5	<i>Lb. paracasei</i> A13	+	+	+	34	<i>Lb. casei</i> FSL 347	-	-	+	
6	<i>Lb. paracasei</i> A14	+	+	+	35	<i>Lb. casei</i> FSL 436	-	+	+	
7	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092	+	+	+	36	<i>Lb. casei</i> FSL 541	+	+	+	
8	<i>Lb. paracasei</i> Bio	-	+	+	37	<i>Lb. casei</i> FSL 564	-	+	+	
9	<i>Lb. paracasei</i> L26	+	+	+	38	<i>Lb. casei</i> FSL 574	+	+	+	
10	<i>Lb. paracasei</i> SA	-	-	+	39	<i>Lb. casei</i> FSL 576	-	+	+	
11	<i>Lb. rhamnosus</i> CNRZ 1224	-	-	-	40	<i>Lb. casei</i> FSM 317n	-	+	+	
12	<i>Lb. paracasei</i> CNRZ 1308	-	-	+	41	<i>Lb. casei</i> FSL 579n	-	+	+	
13	<i>Lb. paracasei</i> CNRZ 318	-	+	+	42	<i>Lb. casei</i> YOL-G	-	-	+	
14	<i>Lb. rhamnosus</i> CNRZ 1976	-	+	+	43	<i>Lb. casei</i> YOL-CH	-	-	+	
15	<i>Lb. paracasei</i> Jp-1	-	+	+	44	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 25302	-	-	+	
16	<i>Lb. rhamnosus</i> Principia	-	-	+	45	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-	-	
17	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27139	+	+	+	46	<i>Lb. casei</i> GG	-	-	-	
18	<i>Lb. paracasei</i> INL3	+	+	+	47	<i>Lb. paracasei</i> 906 (ILC 2234)	+	-	+	
19	<i>Lb. casei</i> CNRZ 1874	-	-	+	48	<i>Lb. casei</i> 17051	-	-	-	
20	<i>Lb. paracasei</i> 72	-	-	+	49	<i>Lb. casei</i> 17052	+	+	+	
21	<i>Lb. paracasei</i> 81	-	+	+	50	<i>Lb. plantarum</i> 8014	-	-	-	
22	<i>Lb. paracasei</i> 84	-	+	+	51	<i>Ln. mesenteroides</i> R707	-	-	-	
23	<i>Lb. paracasei</i> 85	-	+	+	52	<i>Lc. lactis</i> Mo9	-	-	-	
24	<i>Lb. paracasei</i> 86	-	+	+	53	<i>S. thermophilus</i> Ab1	-	-	-	
25	<i>Lb. paracasei</i> 88	-	+	+	54	<i>E. coli</i> Dh5α	-	-	-	
26	<i>Lb. rhamnosus</i> 90	-	-	-	55	<i>Ln. mesenteroides</i> mb1	-	-	-	
27	<i>Lb. rhamnosus</i> INL1	-	-	+	56	<i>Ln. mesenteroides</i> D11	-	-	-	
28	<i>Lb. rhamnosus</i> INL2	-	-	+	control negativo			ok	ok	ok
29	<i>Lb. casei</i> Sacco	-	-	+						
control negativo				ok	ok	ok				

CONCLUSIONES

Se diseñó un ensayo por PCR que permite detectar profagos y remanentes de fagos virulentos en lactobacilos del grupo *casei*. La mayoría de los cebadores diseñados amplificó correctamente un fragmento sobre la cepa LcA, y al menos 2 cebadores de cada tipo (P, V1, V2) amplificaron en la mayoría de un grupo de cepas que se sabía que contenían profagos inducibles con mitomicina C. A su vez, la aplicación del ensayo sobre cepas cuya presencia de profagos se desconocía permitió simular la aplicación del ensayo por PCR a nuevos aislamientos. Este ensayo por PCR resultaría promisorio para caracterizar nuevos aislamientos de cepas potencialmente probióticas, en lo referente a lisogenia y riesgo de generación de nuevos fagos líticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Hall, T.A., 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser., p. 95-98.
- Sobhy, H. and Colson, P., 2012. Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments. CompFunct Genomics, Article ID: 783138.