

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Климина Ксения Михайловна**

**Генетический анализ систем токсин-антитоксин  
суперсемейства RelBE у лактобацилл**

03.02.07 - генетика.

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
В.Н. Даниленко**

Москва  
2015 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Общее представление о бактериях рода <i>Lactobacillus</i> .....	7
1.2 ТА системы: общая характеристика и классификация .....	15
1.3 Механизм действия и биомиссии токсинов ТА систем .....	23
1.4 Функции ТА систем .....	26
1.5 Области применения ТА систем.....	29
1.6 Разнообразие ТА систем II типа .....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Штаммы и условия культивирования.....	37
2.2 Выделение ДНК .....	43
2.3 Конструирование праймеров и проведение ПЦР.....	44
2.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле и выделение ДНК из геля.....	55
2.5 Секвенирование ДНК .....	55
2.6 Биоинформатический анализ .....	55
2.7 Клонирование генов ТА систем в экспрессионные векторы.....	56
2.8 Определение активности ТА систем в клетках <i>E.coli</i> . .....	58
2.9 Выделение РНК.....	58
2.10 Обратная транскрипция .....	59
2.11 Количественная ПЦР в режиме реального времени .....	59
2.12 Удлинение праймера (Primer extention) .....	60
2.13 Определение точки начала транскрипции при помощи специфической амплификации концевых фрагментов кДНК (RLM-RACE) .....	60
2.14 Создание <i>lacZ</i> -транскрипционных конструкций (fusions) и определение функционирования промоторов по активности $\beta$ -галактозидазы в клетках <i>B.subtilis</i> .....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	62
3.1 Видовая идентификация штаммов лактобацилл из лабораторной коллекции.....	62
3.2 Биоинформатический поиск и структура модулей ТА систем суперсемейства RelBE типа в секвенированных геномах лактобацилл.....	70
3.3 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE .....	73
3.3.1 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE в штаммах <i>L.rhamnosus</i> .....	73

3.3.2 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE в штаммах <i>L.casei</i> .....	77
3.3.3 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE в штаммах <i>L.helveticus</i> .....	78
<b>3.4 Изучение функционирования ТА систем лактобацилл в клетках <i>E.coli</i> .....</b>	<b>88</b>
3.4.1 Клонирование и экспрессия в клетках <i>E.coli</i> ТА генов <i>L.rhamnosus</i> .....	88
3.4.2 Клонирование и экспрессия в клетках <i>E.coli</i> ТА генов <i>L.helveticus</i> .....	90
3.4.3 Клонирование и экспрессия в клетках <i>E.coli</i> гена токсина <i>L.casei</i> .....	94
<b>3.5 Изучение регуляции экспрессии ТА системы YefM-YoeB у штаммов <i>L.rhamnosus</i>.....</b>	<b>95</b>
3.5.1 Особенности проксимального и дистального районов ТА системы YefM-YoeBLrh ....	95
3.5.2 Идентификация сайтов инициации транскрипции в ТА системе YefM-YoeBLrh ...	97
3.5.3 Исследование активности предполагаемых промоторов.....	99
3.5.4 Изучение транскрипционной активности генов <i>yefM-yoeB<sub>Lrh</sub></i> в стрессовых условиях методом RTq PCR.....	100
<b>3.6 Поиск и характеристика новых ТА систем у <i>L.helveticus</i> .....</b>	<b>105</b>
3.6.1 Поиск новых ТА систем в секвенированных геномах <i>L.helveticus</i> .....	105
3.6.2 Идентификация и полиморфизм новых ТА систем в штаммах <i>L.helveticus</i> из лабораторной коллекции.....	106
3.6.3 Клонирование и экспрессия в клетках <i>E.coli</i> генов новых ТА систем <i>L.helveticus</i> .....	109
<b>3.7 Системы ТА суперсемейства RelBE как биомаркеры для идентификации штаммов лактобацилл.....</b>	<b>113</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>116</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>117</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ.....</b>	<b>118</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>119</b>
<b>Приложение А .....</b>	<b>133</b>
<b>Приложение Б.....</b>	<b>149</b>
<b>Приложение В.....</b>	<b>150</b>
<b>Приложение Г.....</b>	<b>167</b>
<b>Приложение Д.....</b>	<b>171</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>190</b>

## ВЕДЕНИЕ

Исследование микробиоты человека является одним из быстро развивающихся направлений системной биомедицины [Nicholson J.K. et al., 2012; Kelsen J.R. et al., 2012]. Микробиота кишечника трактуется в настоящее время как сателлитный орган, играющий важную роль в становлении и поддержании иммунитета и общего гомеостаза человека, в том числе его нервно-психических и поведенческих особенностей [Flint H.J. et al., 2012; Foster J.A. et al., 2013]. Композиция пробиотической составляющей кишечной микробиоты (бифидобактерии и лактобациллы) является важнейшим показателем состояния постулируемого органа [Turroni F. et al., 2014]. Длительное нарушение микробного баланса кишечника в сторону снижения количества бифидобактерий и лактобацилл играет значительную роль в развитии ослабленного иммунитета, аллергии и метаболического синдрома, отягощая их течение, и коррелирует с проявлением различных заболеваний: гастроэнтерологических, иммунных, кардиологических, онкологических, нейродегенеративных [Young V.B. et al., 2012, Moloney R.D. et al., 2014]. Видовое и штаммовое разнообразие пробиотических бактерий здоровых людей носит индивидуальный (возраст, образ жизни), этно-социальный (традиции питания) и региональный (популяция) характер. Таким образом, для исследования и мониторинга состояния «сателлитного органа» требуется разработка новых подходов и технологий. В последние годы для этих целей применяют методы метагеномного анализа с использованием секвенаторов нового поколения. Вместе с тем, серьезной проблемой при изучении микробиома человека является отсутствие эффективных генов-биомаркеров для видовой и штаммовой идентификации бактериальных компонентов. Разработка таких маркеров и технологий для диагностики состава микробиоты человека является актуальным вопросом для прикладных (диагностических) исследований общей и персонализированной медицины.

Мы предлагаем использовать для видовой и штаммовой идентификации лактобацилл новый генетический маркер – гены систем токсин-антитоксин (ТА) II типа. Подавляющее большинство генов ТА систем видоспецифичны. Предложенный нами метод видовой и штаммовой идентификации может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например в микробиоте человека.

ТА системы – это генетические элементы, состоящие из 2-х, реже 3-х генов. Продукты генов токсинов всех известных ТА систем – это белки, в то время как антитоксины – это либо белки, либо некодирующие РНК. ТА системы и их компоненты

являются удобным инструментом для решения различных задач в области теоретических исследований и биотехнологии. ТА модули рассматриваются как перспективные "мишени" для разработки антибактериальных препаратов, их потенциал предполагается использовать и для борьбы с вирусными инфекциями. Все это может способствовать борьбе с инфекционными заболеваниями [Demidenok O.I. et al., 2013]. ТА системы представляют собой удобные модули для решения различных научных вопросов, таких как реакция на стресс, персистирующее состояние клеток, апоптоз [Prozorov A.A. et al., 2010; Goeders N. et al., 2014], регуляция активности генов, включая роль малых РНК и коротких пептидов, процессов трансляции и транскрипции [Shi W. et al., 2011]. Работ, посвященных ТА системам лактобацилл, нет.

### **Цель работы**

Структурно-функциональная характеристика генов ТА систем II типа суперсемейства RelBE у штаммов *Lactobacillus* для их дальнейшего использования в качестве биомаркеров при исследовании микробиоты человека.

### **Задачи**

1. Создание и характеристика коллекции лактобацилл, выделенных из микробиоты здоровых людей центральных областей России.
2. Анализ *in silico* ТА систем суперсемейства RelBE в секвенированных геномах лактобацилл и изучение полиморфизма и функционирования в клетках *E.coli* ТА систем из штаммов лабораторной коллекции.
3. Изучение регуляции экспрессии ТА системы Yef-YoeB у штаммов *L.rhamnosus*.
4. Поиск и характеристика новых ТА систем у *L.helveticus*.
5. Использование ТА систем в качестве биомаркеров для изучения штаммового разнообразия лактобацилл.

### **Научная новизна работы**

Впервые исследовано наличие, разнообразие и полиморфизм ТА систем суперсемейства RelBE у штаммов *L.rhamnosus*, *L.casei*, *L.helveticus*. Показана активность ряда систем в клетках *E.coli*. Впервые показана сложная организация оперона ТА системы Yef-YoeB<sub>Lrh</sub> у *L.rhamnosus*, включающая 4 сайта инициации транскрипции. Впервые найдены и исследованы новые ТА системы в штаммах *L.helveticus*. Впервые показано, что ТА системы могут быть использованы в качестве биологических маркеров для характеристики штаммового разнообразия микробиоты человека.

### **Практическая значимость**

Практическая значимость настоящей работы – создание метода универсальной, дешевой и быстрой молекулярно-генетической идентификации видов и штаммов лактобацилл, основанной на применении ТА систем. Предложенный нами метод видовой и штаммовой идентификации может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например в микробиоте человека.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общее представление о бактериях рода *Lactobacillus*

#### Классификация лактобацилл

По современной систематике род *Lactobacillus* входит в семейство *Lactobacillaceae*, порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, царство Бактерии. Род *Lactobacillus* состоит из грамположительных, неспорообразующих, каталазо-отрицательных, микроаэрофильных, чаще всего неподвижных палочковидных бактерий со смешанными потребностями в питании. Длина и форма клеток может существенно различаться в зависимости от вида и штамма — от длинных тонких палочек до коротких клеток в форме коккобацилл. Палочки могут быть прямыми или искривленными, обычно они образуют цепочки. Лактобациллы, как правило, являются ацидофильными бактериями, оптимальное для их роста значение pH обычно находится в диапазоне от 5,5 до 6,2. Лактобациллы также относят к группе молочнокислых бактерий, благодаря их способности перерабатывать лактозу и прочие углеводы в молочную кислоту. В процессе своего метаболизма они способны выделять лизоцим, перекись водорода и другие продукты обмена, обладающие антибактериальной активностью. Основное их свойство — образование молочной кислоты, которая препятствует развитию и размножению патогенных бактерий и грибов.

Лактобациллы представляют разнородную филогенетически группу, включающую большое количество видов и штаммов (рисунок 1). Первый филогенетический анализ лактобацилл был проведен в 1991 году Коллинсом на небольшом количестве известных на то время видов [Collins M.D. et al., 1990]. На сегодняшний день комбинация различных методов исследований помогли получить более полное представление о количестве филогенетических групп [Giovanna E.F. et al., 2007]. К настоящему времени большое количество геномов уже секвенировано и аннотировано: *L.rhamnosus* — 30 геномов, *L.plantarum* — 30, *L.fermentum* — 11, *L.casei* — 29, *L.brevis* — 13 и *L.helveticus* — 15 (данные на апрель 2015г) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>].

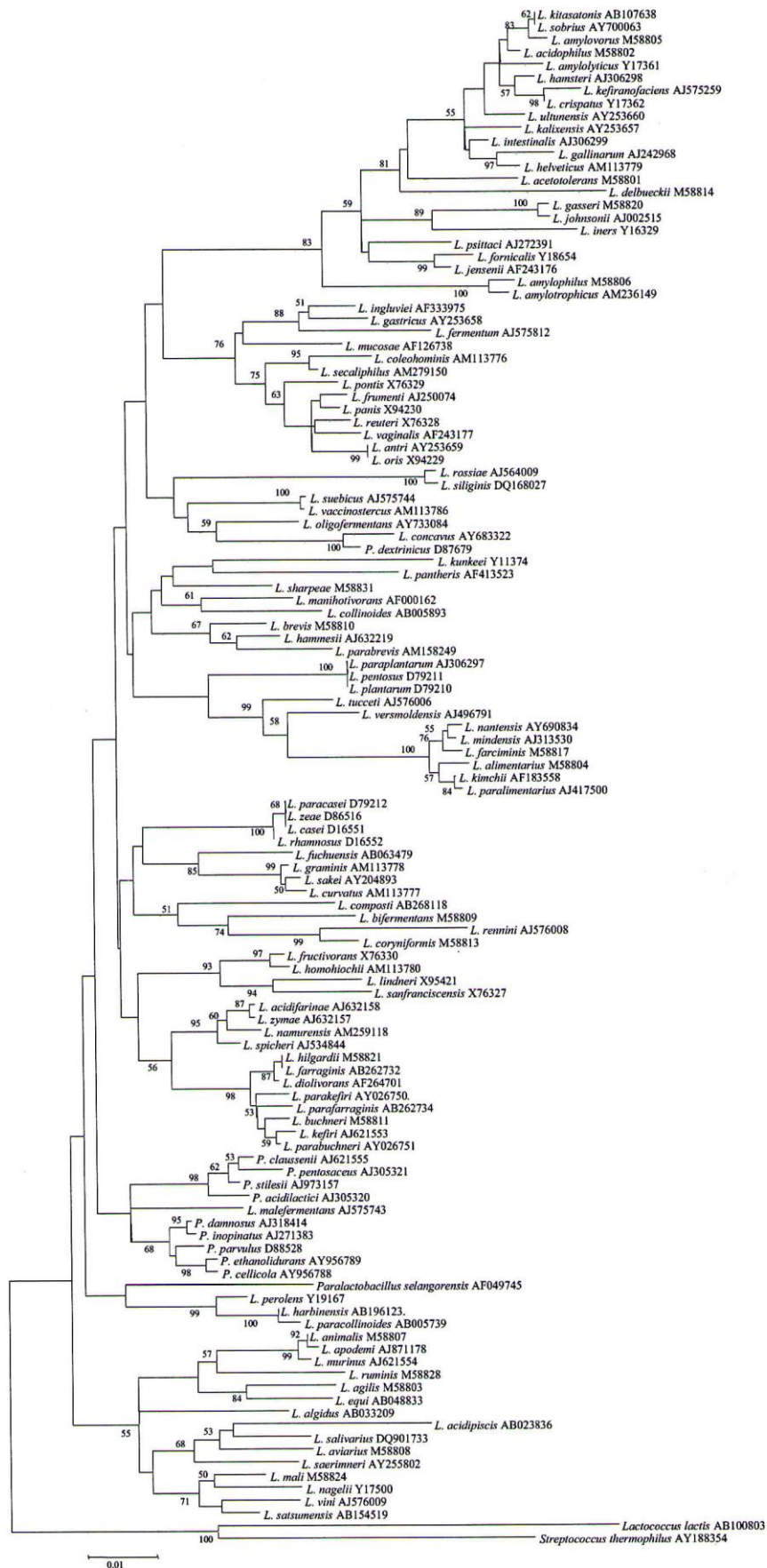


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево бактерий рода *Lactobacillus* [Giovanna E.F. et al., 2007].



## Проблемы идентификации лактобацилл

Существует около 140 видов лактобацилл и они имеют сходные фенотипические и физиологические характеристики. Их геномы сильно различаются по GC-составу, что усложняет идентификацию данного рода.

На данный момент наиболее распространённым методом для идентификации видов бактерий является определение последовательности гена 16S рРНК. На этой основе разработаны родо-, группо- и видоспецифичные праймеры, амплификация с которыми в ряде случаев может проводиться одновременно в общей реакционной смеси (так называемая мультиплексная ПЦР). Данный метод в основном применим для типирования групп и отдельных видов лактобацилл, но неприменим для идентификации близкородственных видов и штаммов. Известные методы идентификации не являются универсальными и простыми в использовании и не позволяют проводить штамм-специфическую идентификацию, поскольку нуклеотидные последовательности генов, обычно используемых для групповой и видовой идентификации, полностью идентичны для разных штаммов одного вида [Song, Y. et al., 2000; Lee J. et al., 2004].

Одной из задач является создание метода универсальной и быстрой молекулярно-генетической идентификации филогенетических групп, видов и штаммов лактобацилл в микробиоте человека (гастроэнтерологический тракт, вагинальная полость и др.), а также в пищевой цепочке кисломолочных продуктов. Установлено, что пробиотические свойства лактобацилл являются штаммоспецифическими.

Проблема быстрой и однозначной видовой и штаммовой идентификации лактобацилл встает при изучении состава микробиоты человека, при поиске и длительном сохранении пробиотически ценных штаммов, при сравнении видов и штаммов, полученных в разных лабораториях. Для начальной идентификации рода, филогенетической группы и вида *Lactobacillus* используют микробиологические и биохимические методы, однако они дают только предварительные сведения о систематическом положении данного микроорганизма и часто не позволяют отнести его к определенному виду. Для более точной идентификации микроорганизмов используют разнообразные молекулярно-генетические методы [Singh S. et al., 2009]. Эти методы можно подразделить на несколько групп.

1. Методы, не связанные с ПЦР: анализ рестрикционных фрагментов хромосомной ДНК (RLFP); разделение суммарного белка клеток в SDS-PAGE электрофорезе; ДНК-ДНК гибридизация, в том числе с использованием чипов (comparative genomic hybridization, CGH) [Markiewicz L.H. et al., 2010].

2. Методы, основанные на реакции ПЦР [Saito S. et al., 2011]. Используются как случайные праймеры (RAPD), так и праймеры для повторяющихся последовательностей ДНК (REP-PCR, ERIC-PCR) и праймеры для определенных генов. В качестве таких генов чаще других используются гены 16S и 23S рибосомальных РНК и спейсерные районы между ними. Используются также некоторые белок-кодирующие гены: *tuf* (ген фактора элонгации Tu), *recA*, *hsp60* (ген белка теплового шока), *rpoA* (ген  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы), *dnaK* (ген белка теплового шока 70 kDa) [Huang C.H. et al., 2011],  $\beta$ -субъединицы F1F0-АТФ синтазы [Sievers M. et al., 2003]. Широко распространен метод, объединяющий анализ рестрикционных фрагментов и ПЦР – т.н. AFLP.

3. Методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности (НП) ДНК: определение НП отдельных генов (или их фрагментов) рибосомальной РНК и белок-кодирующих генов, перечисленных в п.2; определение одиночных нуклеотидных замен в таких генах (SNP) [Huang C.H. et al., 2011]; одновременное определение НП фрагментов нескольких белок-кодирующих генов (MLST) [Raftis E. et al., 2011].

Для идентификации вида чаще используется ПЦР с родо- и видоспецифичными праймерами, созданными по генам и межгенным спейсерам рибосомальных и белок-кодирующих генов, с последующим анализом продуктов реакции в электрофорезе и определением их НП. Для идентификации штаммовой принадлежности лактобацилл чаще используются рестрикционный анализ ДНК, ПЦР с неспецифическими праймерами (RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR), определение НП ряда генов (MLST), гибридизация с чипами (CGH).

Однако ни один из перечисленных методов не является универсальным, каждый имеет свои достоинства, недостатки, область применения и используется для анализа конкретных видов или групп видов и для решения конкретных задач. Считается, что для корректной идентификации вида и штамма следует использовать несколько молекулярных методов или несколько генов [Singh S. et al., 2009]. Поэтому важно включение в молекулярно-генетическую идентификацию лактобацилл новых генов.

### Среда обитания лактобацилл

Лактобациллы могут быть обнаружены в растениях, субстратах растительного происхождения (силос) и ферментированной пищевой продукции (йогурт, сыр, маслины, маринады, салями). На сегодняшний день основное внимание исследователей привлекают лактобациллы как составная часть микробиоты человека [Hammes W.P. et al., 1995]. Они составляют незначительную часть нормальной микробиоты кишечника взрослого человека, приблизительно 0,01–0,6% от всех обитателей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), однако активно осуществляют регуляторные функции внутри популяции кишечных бактерий [Delphine S. et al., 2009].

Лактобациллы распространены по всему пищеварительному тракту: от ротовой полости, слизистой оболочке глотки, пищевода, желудка и до кишечника [Tannock G.W. 1995]. Местом их наибольшего скопления является конечный отдел пищеварительного тракта. Взаимодействуя с клетками эпителия кишечника они обеспечивает процессы репарации слизистой оболочки, индуцируют образование лизоцима и активируют иммунный ответ. Бактериям представителям рода *Lactobacillus* также принадлежит доминирующее положение во влагалище у здоровых женщин репродуктивного возраста. Присутствие лактобацилл на наружных половых органах у женщин необходимо для защиты слизистой оболочки от патогенных факторов и обеспечения препятствия для попадания инфекций внутрь. Удельный вес лактобацилл в вагинальной полости составляет около  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/мл [Tannock G.W. 1995]. Содержание лактобацилл в желудочном соке составляет  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/мл. В толстой кишке содержит  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл, они представлены видами: *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.bulgaricus*, *L.plantarum*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus* и другими видами.

Определение точного видового и штаммового состава отдельных видов *Lactobacillus* в ЖКТ человека остается до сих пор большой проблемой. Большинство из обитающих в ЖКТ бактерий попадают туда из полости рта или из пищи [Berg R.D. 1996]. Были выделены основные виды лактобацилл, которые являются обитателями как ротовой полости, так и фекалий (таблица 1).

**Таблица 1.** Виды лактобацилл, которые были обнаружены в фекалиях, ротовой полости и продуктах питания.

<b>Виды лактобацилл</b>	<b>Фекалии</b>	<b>Ротовая полость</b>	<b>Продукты питания</b>
<i>L. acidophilus</i>	+	+	
<i>L. crispatus</i>	+	+	
<i>L. gasseri</i>	+	+	
<i>L. johnsonii</i>	+		+
<i>L. salivarius</i>	+	+	
<i>L. ruminis</i>	+		
<i>L. casei</i>	+	+	+
<i>L. paracasei</i>	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i>	+	+	+
<i>L. plantarum</i>	+	+	+
<i>L. reuteri</i>	+		+
<i>L. fermentum</i>	+	+	+
<i>L. brevis</i>	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i>	+		+
<i>L. sakei</i>	+		+
<i>L. vaginalis</i>	+	+	
<i>L. curvatus</i>	+		+

В коллекции лактобацилл выделенных из ЖКТ, вагины и ротовой полости обнаружены такие виды лактобацилл, как *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.brevis* и *L.helveticus*.

### **Практическое применение**

Видам *Lactobacillus*, обитающим в ЖКТ, уделяется большое внимание благодаря их свойствам, положительно влияющим на здоровье. Существуют общие критерии для отбора штаммов с пробиотическим потенциалом, такие как способность выживать в среде желудка и кишечника и удерживаться на клетках эпителия кишечника, а также антагонистическая активность в отношении патогенных микроорганизмов [Monteagudo-Mera A. et al., 2012; Bautista-Gallego J. et al., 2012; Wang C.Y. et al., 2010]. Чтобы сохранить жизнеспособность после прохождения через ЖКТ, пробиотические бактерии должны быть устойчивы в желудке к низким рН (рН 2.5 – 3.5) и пепсину, желчным солям и панкреатину в верхней части кишечника [Holzapfel W.H. et al., 1998].

Другим наиболее важным свойством пробиотических бактерий является обеспечение колонизационной резистентности, т.е. способности защиты кишечной стенки от проникновения во внутреннюю среду организма патогенных бактерий. Благодаря этим свойствам лактобациллы подавляют рост и размножение поступающих извне представителей посторонней микрофлоры, предотвращают приживание последних,

блокируя рецепторы клеток слизистых оболочек от адгезинов потенциально патогенных бактерий. За последние несколько лет обнаружена корреляция между состоянием пробиотического компонента микрофлоры человека и некоторыми заболеваниями, в том числе болезнью Крона и онкозаболеваниями [Cain A.M. et al., 2011]. Поэтому в последние годы большой интерес к лактобациллам проявляют именно как к компонентам лекарственных препаратов (пробиотиков) для профилактики болезней человека и животных.

Одни штаммы лактобацилл имеют промышленное значение и применяются при различных процессах ферментации, в то время как другие штаммы, обладающие пробиотическими свойствами и приносящие пользу здоровью человека, используются в коммерческих целях в качестве пробиотиков и лекарственных препаратов [Sanders M. et al., 2005] для лечения дисбактериозов разной этиологии, заболеваний полости рта, урогенитальной сферы, желудочно-кишечных расстройств, а также в составе БАДов. Ниже приведены некоторые примеры использования отечественных штаммов лактобацилл в качестве лекарств и БАДов:

- *L.helveticus* (НК1, 100аш) и *L.casei* К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> — лекарственный препарат Ацилакт;
- *L.helveticus* (НК<sub>1</sub>, НК<sub>2</sub>, НК<sub>5</sub> и НК<sub>12</sub>) — лекарственный препарат Аципол;
- *L.casei* КНМ-12, *L.helveticus* НК<sub>1</sub>, *L.plantarum* 8Р-А3 — БАД Нормоспектрум;
- *L.plantarum* 90Т-С4 — лекарственный препарат Лактобактерин и БАД Гиалакт;
- *L.plantarum* 8Р-А3 — лекарственный препарат Лактобактерин.

Показано влияние кишечной микробиоты на эмоциональное поведение, восприятие боли, сигнальные механизмы, реакцию на стресс у животных, преимущественно грызунов. Так, например, штамм *L. brevis* FPA3709, синтезирующий ГАМК, после введения его крысам оказывал антидепрессивный эффект, схожий с действием антидепрессанта флуоксетина, при этом без побочных проявлений в виде потери аппетита и снижения веса [Ko C.Y. et al., 2013]. Введение мышам линии BALBc штамма *L.rhamnosus* JB-1 изменяло экспрессию мРНК ГАМКергических рецепторов в различных отделах мозга, а также снижало повышенный в результате стресса уровень кортикостерона в крови и уменьшало тревожное состояние животных [Bravo J.A. et al., 2011]. Введение *L. acidophilus* крысам линии Вистар приводило к снижению стрессового состояния животных в тесте принудительного плавания [Singh P.K. et al., 2012].

Эти данные позволили предположить, что аналогичный эффект кишечная микробиота может проявлять в организме человека, влияя на его эмоциональное состояние и течение психических заболеваний, что и было показано в исследованиях,

проведенных на людях-добровольцах. У людей, получавших в течение месяца пробиотическую смесь из лактобацилл *L. helveticus* R0052 и бифидобактерии *Bifidobacterium longum* R0175, заметно снизились показатели тревожности и стресса — по сравнению с теми, кто получал плацебо [Messaoudi M. et al., 2011]. У пациентов, получавших в течение 2-х месяцев пробиотик *L. casei* Shirota достоверно снизился уровень тревожности [Rao A.V. et al., 2009]. Всё это, предположительно, происходит благодаря влиянию бактерий на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую эндокринную ось, чрезмерная активность которой может быть причиной хронического стресса, утомления и т. п.

## 1.2 ТА системы: общая характеристика и классификация

Системы токсин-антитоксин (ТА системы) – это генетические элементы, состоящие из 2-х, реже 3-х генов. Продукты генов токсинов всех известных ТА систем – это белки, в то время как антитоксины – это либо белки, либо некодирующие РНК.

ТА системы и их компоненты используются для решения различных задач в области научных исследований и биотехнологии. ТА модули рассматриваются как перспективные "мишени" для разработки антибактериальных препаратов, их потенциал предполагается использовать и для борьбы с вирусными инфекциями. Все это может способствовать борьбе с инфекционными заболеваниями [Kolodkin-Gal I. et al., 2007]. ТА системы представляют собой удобные модули для решения таких вопросов, как регуляция активности генов, реакция на стресс, персистирующее состояние клеток, апоптоз [Prozorov A.A. et al., 2010].

Первые ТА системы были охарактеризованы еще в 1980 году как молекулярные системы, которые кодируются плазмидой и обеспечивают её стабильность в ходе репликации [Gerdes K. et al., 1986]. Первой обнаруженной такой ТА системой являлась система **контроля клеточной смерти (ccd)**, расположенная на F плазмиде *E. coli* [Ogura T. et al., 1983]. Данная система обеспечивала стабилизацию F плазмиды, приводя к гибели потомство клеток, не содержащих данную плазмиду [Jaffe A. et al., 1985]. Эта система состоит из двух генов, *ccdA* и *ccdB*, организованных в оперон. Белок CcdB – токсин, который ингибирует ДНК гиразу, а белок CcdA – антитоксин, предотвращающий летальное действие CcdB, непосредственно связываясь с ним [Tam J.E. et al., 1989; Bernard P. et al., 1993]. Если при делении клетки плаزمиды не наследовалась, то короткоживущий антитоксин CcdA не пополнялся синтезом *de novo*, поэтому более стабильный токсин CcdB оставался один в цитоплазме, и в результате комплекс ДНК-гиразы захватывался токсином CcdB, что приводило к гибели клетки [Bernard P. et al., 1992].

Впоследствии гомологи ТА систем плазмидного происхождения были обнаружены на бактериальных хромосомах. Обнаружены также и ТА системы, имеющие только хромосомную локализацию. Число ТА систем в бактериальном геноме может исчисляться десятками [Ramage H.R. et al., 2009]. По нуклеотидной последовательности генома можно предположить наличие около 80 ТА систем у *Mycobacterium tuberculosis*, более 70 у некоторых сине-зеленых водорослей. У некоторых протеобактерий до 2,5% ORFs могут быть ТА системами [Ramage H.R. et al., 2009; Leplae R. et al., 2011].

В то время как функции ТА систем на плаزمиде были очевидны, биологическое значение хромосомных систем оставалось долгое время загадкой, и только сейчас

некоторые из предложенных ранее функций были подтверждены экспериментальными данными [Ramage H.R et al., 2009; Gupta A. et al., 2009]. Всесторонний поиск по гомологии последовательностей в базе данных и новые биоинформатические подходы позволили выявить большое количество и разнообразие ТА систем. На сегодняшний день известны более 10000 предполагаемых ТА модулей [Pandey D.P. et al., 2005; Leplae R. et al., 2011; Fozo E.M. et al., 2010; Sberro H. et al., 2013]. Значительно возрос интерес к ним. Число статей по ТА системам составляет сотни за год.

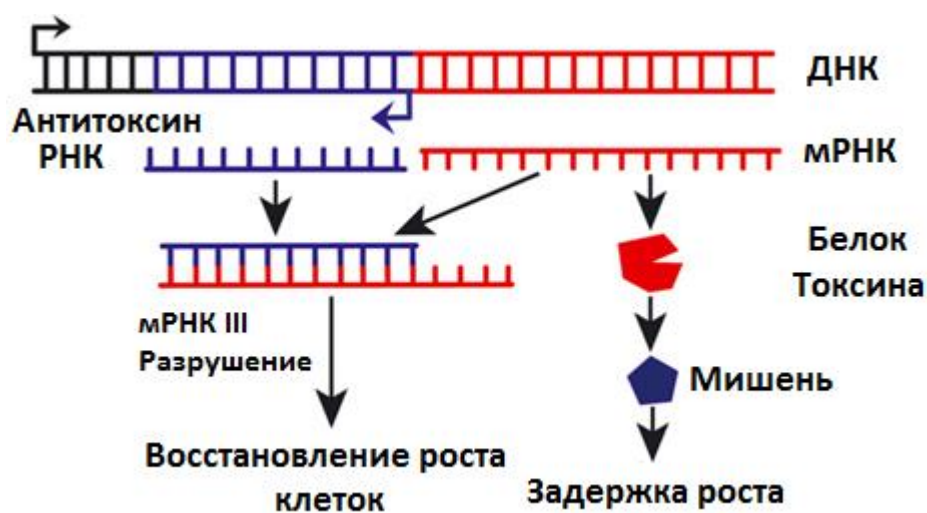
Классификация ТА систем основана как на механизме ингибирования токсина антитоксином, так и природе антитоксина. С недавнего времени, основываясь на молекулярной природе антитоксина и характере его взаимодействия с токсином, ТА модули группируют в пять классов [Goeders N. et al., 2014]. В типе I и III ТА модулей антитоксин – это малая некодирующая РНК, в то время как антитоксины оставшихся классов – небольшие белки.

### **1.2.1 Системы токсин-антитоксин I типа**

Тип I представляет систему, в которой токсин – это гидрофобный белок, состоящий из 19 – 38 остатков аминокислот [Fozo E.M. et al., 2008]; белок проявляет свою токсичность, образуя поры в мембранах клетки [Van Mederen 2009]; исключением является SymE токсин, который является РНКазой. Антитоксин в данной системе – это маленькая (50-200 нуклеотидов) нетранслируемая РНК (sРНК), которая подавляет экспрессию токсина [Gerdes K. et al., 1986].

В ТА системах I типа взаимодействие токсина и антитоксина осуществляется при комплементарном спаривании оснований между мРНК токсина и РНК антитоксина, за счет чего происходит формирование молекулы РНК, состоящей из двух комплементарных цепей. В конечном счете этот комплекс становится мишенью для разрушения РНКазами клетки (рисунок 2) [Gerdes K. et al., 2007]. В некоторых ТА системах I типа (например, SymR/SymE) образование 2-х цепочечной РНК происходит в проксимальной части мРНК, включающей SD последовательность, что препятствует инициации трансляции. В других системах (например, TxpA/RatA *Bacillus subtilis*) гены токсина и антитоксина ориентированы в противоположные стороны и 2-х цепочечная РНК образуется в проксимальной части мРНК, что препятствует экспрессии токсина.





**Рисунок 2** – Структурная организация ТА систем I типа [Wen Y. et al., 2014].

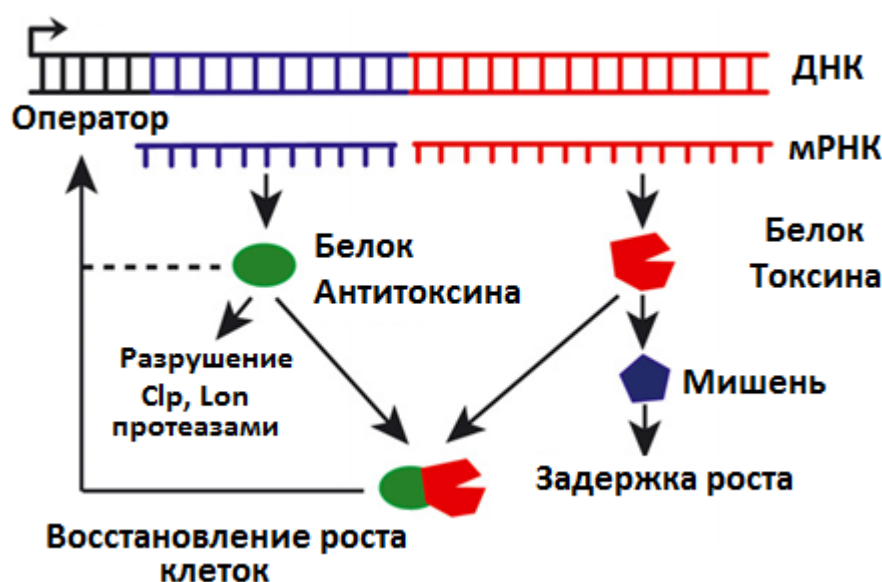
Система типа I иногда включает третий компонент. В хорошо охарактеризованной *Hok-Sok* системе, вдобавок к *hok* – токсину и *sok* – анти毒素у, существует третий ген, названный *tok*. Открытая рамка считывания третьего компонента ТА системы совпадает с открытой рамкой считывания токсина и трансляция токсина зависит от трансляции третьего компонента [Faridani O.R. et al., 2006]. *Sok* антитоксин регулирует трансляцию *Hok* токсина не прямо, а посредством подавления трансляции *Mok* белка [Fozo E.M. et al., 2008].

Системы данного типа широко распространены на плаزمидах и хромосомах бактерий. Стоит отметить, что большинство охарактеризованных анти毒素ов (sРНК), кодируемых плазмидами, обладают высокой комплементарностью к соответствующим мРНК токсинов, в то время как хромосомно-кодируемые sРНК имеют ограниченную комплементарность. Многие ТА системы I типа многократно повторены на хромосомах бактерий: так, *hok* ген повторен на хромосоме *E.coli* от 4 до 15 раз. Вероятно, эволюция систем I типа происходила преимущественно путем дупликаций, а не горизонтального переноса [Fozo E.M. et al., 2008].

### 1.2.2 Системы токсин-анти毒素 II типа

ТА система типа II является наиболее изученной с биологической точки зрения и наиболее многочисленной. К ТА системам II типа относятся *MazE/MazF*, *RelB/RelE*, *HipA/HipB*, *VarB/VarC* и другие. Токсин и анти毒素 являются белками. Гены токсина и анти毒素а объединены в оперон. Общие черты оперона II типа – это небольшой размер обоих генов (80-630 пар нуклеотидов) и небольшой регион, который либо разделяет эти два гена между собой, либо создаёт участок, на котором эти гены могут перекрываться (от

-20 до +30 нуклеотидов) [Pandey D.P. et al., 2005]. Оперон ТА модулей II типа обычно включает две открытые рамки считывания, где первый ген кодирует антитоксин. Однако, известны исключения из стандартной организации оперона. К примеру, ТА модуль HigB/HigA, где ген токсина *higB* расположен перед геном антитоксина *higA* [Tian Q.B. et al., 2001]. Транскрипция оперона саморегулируется путем связывания антитоксина или комплекса токсин-антитоксин с промотором [Bukowski M. et al., 2011]. При взаимодействии токсина и антитоксина формируется неактивный комплекс токсин-антитоксин (белок-белок), при этом белок антитоксина принимает компактную структуру [Makarova K.S. et al., 2009] (рисунок 3). Комплекс токсин-антитоксин, в котором токсин не активен, ответственен за негативную саморегуляцию оперона.



**Рисунок 3** – Структурная организация ТА систем II типа [Wen Y. et al., 2014].

В стрессовых ситуациях антитоксин разрушается клеточными протеазами (Lon и Clp) [Tsuchimoto S. et al., 1992; Van Melderen L. et al., 1994; Lehnherg H. et al., 1995], токсин освобождается из токсин-антитоксин комплекса в клетке и, в конечном счете, происходит ингибирование роста или гибель клетки. По своему механизму действия токсины II типа разнообразны, они подавляют различные стадии трансляции, репликацию, синтез пептидогликанов [Aizenman E. et al., 1996; Christensen S.K. et al., 2004].

Антитоксины II типа – маленькие нестабильные белки, состоящие из 2-х доменов: ДНК-связывающего N-концевого и домена связывания с токсином, С-концевого [Santos-Sierra S. et al., 2002; Smith J.A. et al., 2004; Bernard P. et al., 1991]. У антитоксина MqsA, наоборот, ДНК-связывающий домен расположен в С-концевой части, а токсин-связывающий – в N-части белка [Brown B.L. et al., 2009]. Антитоксины *E.coli* O157:H7 РааА и эpsilon-антитоксин плазмиды *Streptococcus pyogenes* pSM19035 не имеют ДНК-

связывающего домена; в этих ТА системах, помимо токсина и антитоксина, есть третий компонент, являющийся транскрипционным регулятором. ТА модуль pSM19035 состоит из трех компонентов,  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$ . В отличие от других ТА систем II типа, ни токсин  $\zeta$ , ни антитоксин  $\epsilon$ , ни комплекс  $\zeta_2\epsilon_2$  не регулируют экспрессию оперона. Активность промотора оперона P $\omega$  регулируется димером  $\omega_2$ , глобальным регулятором транскрипции [Camacho A.G. et al., 2002]. У *E. coli* O157:H7 первый ген оперона *paarR-paaA-parE* необходим для контроля транскрипции ТА модуля. Однако, в противоположность  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$ , комплекс ТА ParE-PaaA также вовлечен в регуляцию собственной транскрипции, хотя действует значительно слабее ParR. В системе PasA/PasB/PasC плазмиды pTF-FC2 *Thiobacillus ferrooxidans* третий компонент, PasC, не участвует в регуляции экспрессии оперона, но способствует образованию комплекса токсин-антитоксин [Smith A.S. et al., 1997].

Обычно взаимодействие токсина и антитоксина чрезвычайно специфично: токсин взаимодействует только со своим родственным антитоксином. Эта специфичность взаимодействия может быть нарушена одиночной мутацией: одна аминокислотная замена в белке Txe токсина *Enterococcus faecium* делает возможным его взаимодействие с неродственным антитоксином YefM [Polom et al., 2013; Goeders N. et al., 2014]. Как исключение, перекрестное взаимодействие между компонентами различных ТА систем MazE-VarC и MazEF описано у *M. tuberculosis* [Zhu L. et al., 2010].

Первоначально II тип ТА систем был сгруппирован в 8-14 семейств, основываясь на сходстве аминокислотной последовательности белков токсинов и антитоксинов [Pandey D.P. et al., 2005; Park S.J. et al., 2013]. Предполагалось, что в каждом семействе токсин связан с конкретным антитоксином. Однако, на данный момент есть много данных о существовании гибридных систем, где ТА локус содержит токсин из одного семейства, а антитоксин из другого. Функциональность некоторых таких гибридных систем была доказана [Grady R. et al., 2003; Schmidt O. et al., 2007; Unterholzner S.J. et al., 2005]. Поэтому было предложено классифицировать семейства токсинов и антитоксинов независимо друг от друга в 13 суперсемейств токсинов и в 20 суперсемейств антитоксинов по АК последовательности и сходству третичной структуры белков [LepLae R. et al., 2011; Guglielmini J. et al., 2011]. Также было идентифицировано 4 суперсемейства одиночных токсинов, которые при экспрессии ингибировали рост клеток *E. coli*, но экспериментально обнаружить антитоксины, блокирующие действие этих токсинов, не удалось [LepLae R. et al., 2011].

Интересно отметить, что перетасовки токсина/антитоксина могут возникать и между различными типами ТА систем. К примеру, токсин ToxN III типа ТА системы ToxI/ToxN имеет сходную 3D структуру с токсином II типа семейства MazF [Blower T.R. et al., 1981].

Существует база данных по системам II типа, основанная на экспериментальных и биоинформатических данных – TADB [<http://202.120.12.135/TADB2/index.php>; Shao et al., 2011]. Предполагается, что эволюция систем II типа осуществлялась преимущественно путем горизонтального переноса [Lerplae R. et al., 2011].

### 1.2.3 Системы токсин-антитоксин III типа

Первая ТА система III типа **ToxI-ToxN** обнаружена на плазмиде pECA1039 патогена растений *Pectobacterium atrosepticum* [Blower T.R. et al., 1981]. Изначально она была описана как система защиты бактерий от бактериофаговой инфекции [Fineran P.C. et al., 2009]. Антитоксин III типа, подобно таковому I типа, также является sРНК, но при этом модель взаимодействия токсина и антитоксина иная. Данный локус кодирует белок токсина ToxN (19,7 кДа), перед токсином имеются короткий палиндром и повторяющийся мотив, состоящий из 5,5 прямых тандемных повторов по 36 нк. Эта последовательность и является геном антитоксина *toxI*. Инвертированный повтор является транскрипционным терминатором и регулирует относительное количество транскриптов sРНК антитоксина и мРНК токсина. ToxN имеет РНКазную активность и разрезает транскрипт *toxI/toxN* по прямым повторам, позволяя при этом освободиться 36-нуклеотидному РНК- антитоксину [Blower T.R. et al., 1981]. В противоположность ТА системам I типа, РНК антитоксина нейтрализует белок токсина непосредственно связываясь с ним, формируя комплекс РНК-белок. Исследование кристаллической структуры ToxIN комплекса обнаружило гетерогексамерное образование из трех молекул белка ToxN и трех молекул РНК ToxI (рисунок 4) [Blower T.R. et al., 1981].

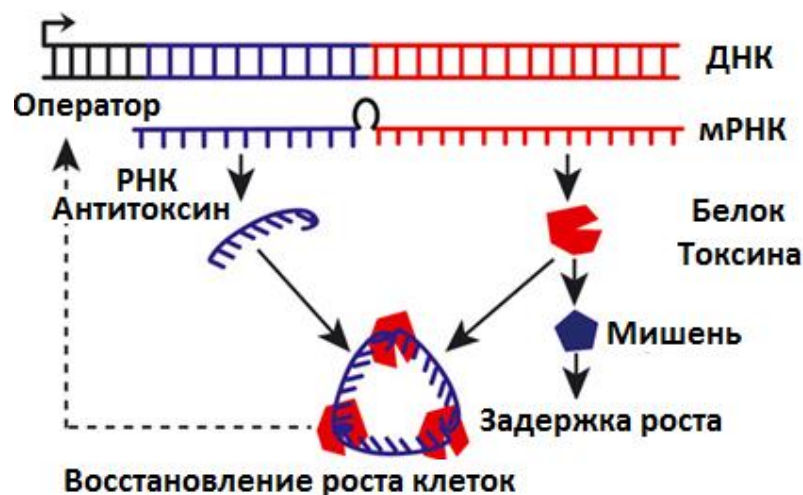


Рисунок 4 – Структурная организация ТА систем III типа [Wen Y. et al., 2014].

При филогенетическом изучении в общей сложности 125-ти предполагаемых систем III типа было идентифицировано 3 независимых семейства *toxIN*, *cptIN*, и *tenpIN* [Blower T.R. et al., 1981]. Первое семейство содержит ToxIN из *P.atrosepticum*, *B. thuringiensis* и их гомологи. Когда давали название семейству, было решено сохранить «IN» в номенклатуре, где каждый антитоксин имеет в названии «I», как ингибитор, а каждый токсин обозначается «N». Если использовать эту универсальную стандартизацию обозначения, то при открытии новых ТА систем III типа будет ясно, какой из генов относится к токсину, а какой - к антитоксину. Второе семейство содержит локус из *Coprococcus catus* GD/7, поэтому данное семейство названо CptIN (*CoPrococcus* тип III Inhibitor/toxiN; произносится как 'сар-тин'). Третье семейство содержит локус из *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01, поэтому это семейство было названо TenpIN (тип III ENdogenous to *Photorhabdus* Inhibitor/toxiN).

Большинство систем III типа кодируется хромосомами, и только приблизительно 15% ToxIN и TenpIN систем кодируются плазмидами; одна система ToxIN обнаружена в геноме профага. Функциональность некоторых систем была проверена на *E. coli* путем оценки токсичности предполагаемого белка токсина и способности родственных повторов антитоксина ингибировать летальный эффект. Эволюция и распространение данной системы связаны с горизонтальным переносом [Blower T.R. et al., 2001; Blower et al., 2012].

#### **1.2.4 Системы токсин-антитоксин IV типа**

Этот тип ТА систем крайне малочисленный. К ТА системам типа IV был отнесен модуль *E.coli yeeU/yeeV* (также названной *ctbA/ctbB*) [Masuda H. et al., 2012]. Функциональный анализ этого модуля показал, что токсин YeeV взаимодействует с белками клетки MreB и FtsZ и тем самым препятствует их полимеризации и сборке цитоскелета. Антитоксин YeeU противодействует YeeV, стабилизируя полимеры MreB и FtsZ [Masuda H. et al., 2012]. Похожая модель действия была показана для *ctbA/ctbB* (*ygfX/ygfY*), другого ТА модуля у *E.coli* [Masuda H. et al., 2012]. В то время как в других типах ТА систем токсин и антитоксин взаимодействуют либо на уровне РНК, либо на белковом уровне, у токсина и антитоксина IV типа нет прямого взаимодействия (рисунок 5).

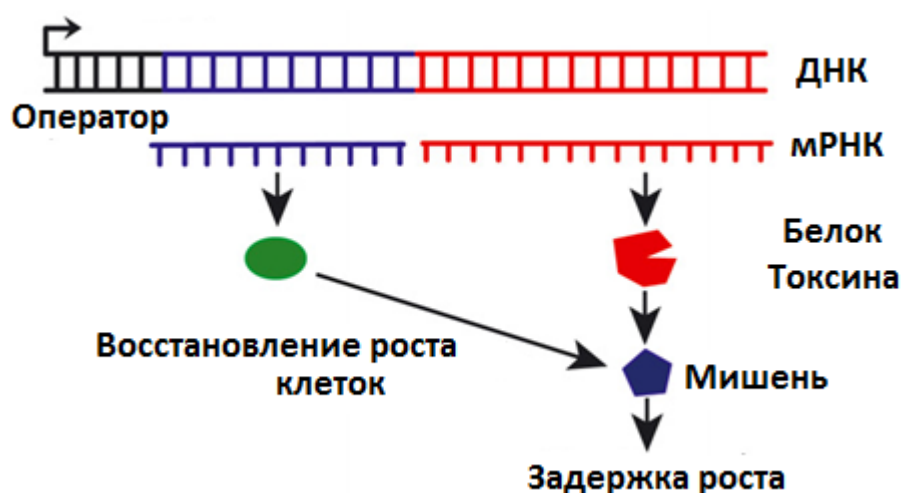


Рисунок 5 – Структурная организация ТА систем IV типа [Wen Y. et al., 2014].

### 1.2.5 Системы токсин-антитоксин V типа

К ТА системам V типа относится только одна система, GhoS/GhoT обнаруженная в *E. coli*. Белок антитоксина GhoS обладает специфической эндорибонуклеазной активностью для расщепления мРНК токсина GhoT, это и предотвращает трансляцию токсина (рисунок 6) [Wang X. et al., 2012].

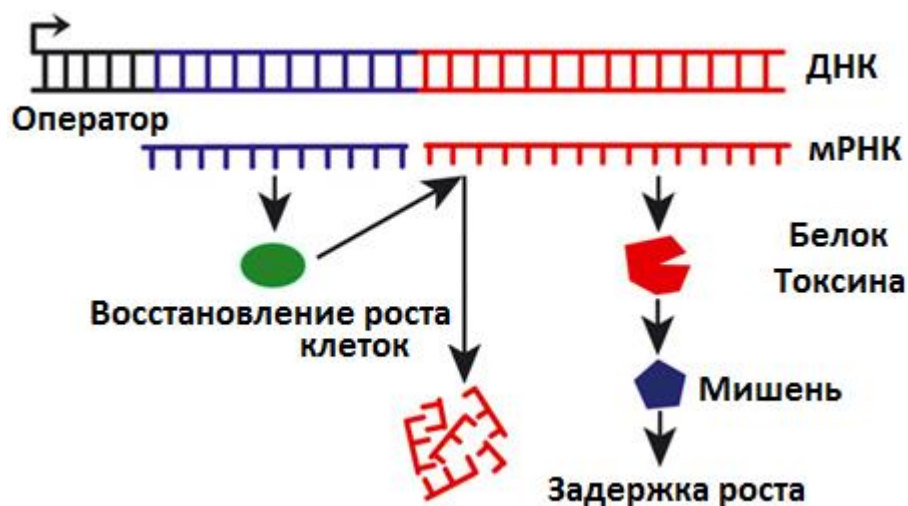


Рисунок 6 – Структурная организация ТА систем V типа [Wen Y. et al., 2014]

### 1.3 Механизм действия и биомишени токсинов ТА систем

Описание мишеней клетки, на которые действуют токсины, имеет фундаментальное значение для понимания роли ТА систем в жизнедеятельности бактерий. Все токсины I типа (за исключением одного токсина, SymE) образуют поры в мембранах клеток и ингибируют синтез АТФ. Мишени токсинов II типа более разнообразны (таблица 2).

**Таблица 2.** Механизм действия и биомишени некоторых токсинов ТА систем [Unterholzner S.J. et al., 2013].

Токсин	Антитоксин/ вид	Тип	Механизм действия	Процесс в клетке
Hok	Sok/RNA	I	Интеграция во внутреннюю клеточную мембрану	синтез АТФ
TisB	IstR-1/RNA	I	Интеграция во внутреннюю клеточную мембрану	синтез АТФ
SymE	SymR/RNA	I	Расщепление мРНК	трансляция
CcdB	CcdA / Protein	II	Интеграция ДНК-гиразы	репликация
ParE	ParD / Protein	II	Интеграция ДНК-гиразы	репликация
MazF	MazE /Protein	II	Расщепление рибосомо-независимой мРНК и гена 16S рРНК	трансляция
MazF-mt6	MazE-mt6 / Protein	II	Расщепление рибосомо-независимой мРНК и гена 23S рРНК	трансляция
Kid	Kis / Protein	II	Расщепление рибосомо-независимой мРНК	трансляция
HicA	HicB / Protein	II	Расщепление рибосомо-независимой мРНК	трансляция
RelE	RelB / Protein	II	Расщепление рибосомо-связанной мРНК	трансляция
VapC	vapB / Protein	II	Расщепление тРНК	трансляция
Doc	Phd / Protein	II	Связывание с 30s рибосомальной субъединицей	трансляция
RatA	RatB / Protein	II	Связывание с 50s рибосомальной субъединицей	трансляция
HipA	HipB /Protein	II	Фосфорелирование of eF-Tu	трансляция
ζ	ε / Protein	II	Фосфорелитрование of UDP-N-acetylglucosamine	синтез пептидогликана
ToxN	Toxi / RNA	III	Расщепление РНК	трансляция
Yeev	YeeU / Protein	IV	Ингибирование полимеризации FtsZ и MreB	действие на цитоскелет
CptA	CptB / Protein	IV	Ингибирование полимеризации FtsZ и MreB	действие на цитоскелет
GhoT	GhoS /Protein	V	Интеграция во внутреннюю клеточную мембрану	синтез АТФ

Большая часть токсинов функционирует как мРНК интерферазы, либо рибосомозависимые, либо независимые. Типичные примеры токсинов, которые расщепляют свободную мРНК: MazF [Zhang Y. et al., 2003], Kid [Muñoz-Gomez A.J. et al., 2005], ChpBK [Zhang Y. et al., 2005], MqsR [Yamaguchi Y. et al., 2009] and HicA [Jorgensen M.G. et al., 2009]. Многие токсины имеют определенные сайты расщепления. К примеру, у HicA нет конкретных консенсусных узнаваемых мотивов, Kid показывает преимущество для сайта UA(A/C), ChpBK, MqsR и MazF специфично расщепляют в сайтах UAC, GCU и ACA соответственно. Для различных MazF токсинов существуют различные узнаваемые мотивы, которые состоят из 3, 5 или 7 нуклеотидов [Yamaguchi Y. et al., 2012]. VarC токсины (II тип) *Shigella flexneri* и *Salmonella enterica* проявляют эндорибонуклеазную активность на тРНК [Winther K.S. et al., 2011]. MazF также может действовать на 3' конец 16S рРНК внутри 30S рибосомальной субъединицы, удаляя 43 нуклеотида, содержащих anti-Shine-Dalgarno последовательность, необходимую для инициации трансляции [Moll I. et al., 2012]

Токсин RelE – наиболее хорошо охарактеризованный пример РНК интерферазы, расщепляющей мРНК рибосомозависимым способом. RelE расщепляет мРНК в сайте А рибосомы [Christensen S.K. et al., 2003]. Существует еще и другой механизм, по которому ТА системы могут вмешиваться в синтез мРНК, изменяя рибосомальную активность через непосредственное взаимодействие с субъединицами рибосомы. Непосредственная связь токсина Doc с 30S рибосомальной субъединицей останавливает элонгацию трансляции [Liu M. et al., 2008]. Схожее действие было показано для токсина II типа RatA ТА системы RatA/RatB. Он связывается с 50S рибосомальной субъединицей, что мешает ее объединению с 30S рибосомальной субъединицей и формированию комплекса 70S рибосомы [Zhang Y. et al., 2011]. В отличие от перечисленных токсинов, токсин HipA является протеинкиназой и непосредственно ингибирует трансляцию, фосфорилируя глутамил-тРНК-синтетазу и тем самым инактивируя ее [Germain E. et al., 2013]. Киназой является и Doc токсин фага P1, фосфорилирующий фактор элонгации EF-Tu, предотвращая его взаимодействие с тРНК [Castro-Roa D. et al., 2013].

Токсин II типа  $\zeta$  ТА системы  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  демонстрирует киназную активность, но его клеточная мишень отличается от HipA и Doc:  $\zeta$  фосфорилирует пептидогликан, предшественник UDP-N-ацетилглюкозамина (UNAG), который ингибирует MurA, фермент, катализирующий инициацию синтеза пептидогликана, и соответственно подавляет формирование клеточной стенки бактерии [Schumacher M.A. et al., 2009].



Внутренняя мембрана клеточной стенки может также служить мишенью для токсинов ТА систем. Большинство систем I типа кодируют маленький, гидрофобный белок, который функционирует подобно фагу, образуя поры в мембране клетки [Brantl S. et al., 2012], что приводит к потере потенциала мембраны и соответственно ухудшает синтез АТФ. Схожий механизм также наблюдается у GhoT, токсина V типа ТА системы *ghoS/ghoT*. GhoT – маленький высоко гидрофобный белок с двумя предсказанными трансмембранными доменами, его введение в клетку вызывает повреждение мембраны и лизис клетки [Wang X. et al., 2012].

Цитоскелет является мишенью для токсина IV типа YeeV, который взаимодействует с белком FtsZ и ингибирует его полимеризацию и ГТФ-азную активность. Для YeeV также показано, что он разрушает полимеры MreB, наиболее важные для деления и поддержания формы клетки [Tan Q. et al., 2011]. Схожие результаты были показаны для токсина CptA [Masuda H. et al., 2012].

Токсины ТА систем также могут ингибировать репликацию ДНК. Для токсинов II типа ParE и CcdB было показано, что они ингибируют GyrA, субъединицу топоизомеразы II типа. Ингибирование гиразы вызывает разрыв двунитевой ДНК, активирует SOS-ответ и приводит к запрограммированной гибели клетки. Механизмы действия этих двух токсинов различны: для действия ParE2 *Vibrio cholerae* необходима АТФ [Yuan J. et al., 2010; Bernard P. et al., 1992]. Необходимо подчеркнуть, что большинство токсинов, включая HipA, StbE, и RelE не вызывают гибель клетки, но приводят к статическому состоянию, в котором клетки все еще живы, но не в состоянии размножаться, т.е. переводят ее в персистирующее состояние.

Представление о мишенях действия можно отнести и к некоторым антитоксинам, способным регулировать экспрессию генов других оперонов. Антитоксин *E.coli* MqsA негативно регулирует экспрессию гена *rpoS*, сигма-фактора стрессового ответа, а также ряда других генов, в том числе связанных с образованием биопленок [Soo V.W. et al., 2010]. Регулировать активность гена *rpoS* может также антитоксин II типа DinJ [Hu Y. et al., 2010]. Биоинформатический поиск палиндромов, с которыми связывается HipB антитоксин, позволяет предполагать, что он регулирует транскрипцию не менее 33 генов, имеющих самые разные функции [Lin C.Y. et al., 2013].

## 1.4 Функции ТА систем

На данный момент функции ТА систем, находящихся на плаزمиде, более-менее ясны, в то время как роль широко распространенных хромосомных ТА систем в жизнедеятельности бактериальной клетки во многом остаётся непонятной [Brantl S. et al., 2012].

Первоначально ТА система была охарактеризована в 1980 году как молекулярная система, которая находится на плазмиде, обеспечивая ее устойчивость [Gerdes K. et al., 1986; Ogura T. et al., 1983]. Если в дочерних клетках происходит потеря плазмиды, то нестабильный антитоксин разрушается, стабильный белок токсина начинает свое действие, подавляя рост клеток, не содержащих данную плазмиду. Это явление носит название “post-segregational killing” (PSK) [Faridani O.R. et al., 2006; Gerdes K. et al., 2000].

Некоторые ТА системы на хромосоме могут выполнять аналогичную функцию и обеспечивать устойчивость суперинтегронов. Так, введение в хромосому *E. coli* модулей RelBE и ParDE из *Vibrio vulnificus* приводило к стабилизации крупных участков ДНК [Szekeres S. et al., 2007]. ТА система MosAT стабилизировала в хромосоме *Vibrio cholerae* интегративный конъюгативный элемент [Wozniak R.A. & Waldor M.K. 2009]. Подобные функции, выполняемые ТА системами в клетках патогенных микроорганизмов, могут стабилизировать островки патогенности и обуславливать вирулентность микроорганизмов (см. ниже).

Хромосомные ТА модули также могут предотвращать вторжение в клетку фагов, как, например, система *E. coli* RnlAB [Koga M. et al., 2011].

Для многих ТА системы показано их участие в формировании состояния персистентности, т.е. способности части клеток генетически гомогенной популяции входить, в стрессовых ситуациях, в метаболически неактивное состояние, позволяющее им выжить в данных условиях; этим свойством обладает не отдельная клетка, а популяция клеток, разделяющаяся в стрессовых условиях на две части (бимодальное развитие): часть клеток гибнет, другая часть впадает в персистирующее состояние и выживает – в том числе, при действии антибиотиков. Суперэкспрессия токсина HipA *E. coli* увеличивала число персистирующих клеток, тогда как делеция оперона *hipAB* резко уменьшала [Keren I. et al., 2004]. Число персистирующих клеток уменьшалось также при делеции генов токсинов *tisB* и *mqsR* [Dorr T. et al., 2010; Keren I. et al., 2004].

В ряде работ израильских ученых было показано, что ТА система MazEF *E. coli* вызывает программированную гибель клеток. При кратковременном воздействии на густую культуру клеток ( $\geq 10^8$  КОЕ) стрессовых факторов в сублетальных дозах –

тиминового голодания [Engelberg-Kulka H. et al., 2005], фаговой инфекции [Hazan R. et al., 2004], обработки антибиотиками [Sat B. et al., 2001] – происходит гибель до 90% клеток; у штаммов с делецией *mazEF* оперона гибели клеток нет. Гибель клеток усиливают quorum-sensing пептиды (QS), иначе названные extracellular death factor (EDF) – небольшие пептиды (5-16 аминокислотных остатков), усиливающие эндорибонуклеазную активность MazF токсина [Kumar S. et al., 2013]. Эти работы не были подтверждены в других лабораториях и выводы авторов подвергаются сомнению, т.к. многие исследования свидетельствуют о бактериостатическом, а не бактерицидном действии MazEF системы [Maisonneuve E. et al., 2011].

Показана связь ТА систем с процессом образования биопленок [Wang X. et al., 2011], однако механизмы, лежащие в основе этой связи, не ясны. Биопленки – сообщества бактерий одного или нескольких видов, погруженные во внеклеточный матрикс и прикрепленные к биотической или абиотической поверхности. Биопленки – альтернатива планктонному состоянию популяции бактерий. Бактериальные клетки в составе биопленки чрезвычайно устойчивы к действию различных бактерицидных факторов, в том числе к действию антибиотиков. Многие хронические инфекции связаны со способностью патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *M. tuberculosis*) образовывать в организме человека биопленки. ТА система *E.coli* b3022 MqsR/MqsA подавляет формирование биопленок. При деградации MqsA антитоксина способность бактерий образовывать биопленки резко возрастает; вероятно, это является следствием того, что MqsA белок репрессирует активность многих генов стрессового ответа [Wang X. et al., 2013]. Образование биопленок уменьшалось у *Shewanella oneidensis* и *E.coli* при инактивации гена токсина *hipA*; в данном случае это было результатом уменьшения выделения внеклеточной ДНК, являющейся адгезивной основой при образовании биопленок [Theunissen S. et al., 2010].

Неоднократно отмечалась связь между наличием ТА систем у патогенных бактерий и их вирулентностью. Отмечена корреляция между числом ТА модулей и вирулентностью бактерий [Georgiades K. & Raoult D. 2011]. В частности, ТА система MazEF широко распространена на плазмидах ванкомицин-устойчивых энтерококков [Moritz E.M. & Hergenrother P.J. 2007; Sadeghifard N. et al., 2014]. Делеция *VapBC* модуля у *Haemophilus influenza* ведет к резкому уменьшению вирулентности в опытах на культурах клеток и на животных [Ren D. et al., 2012]. В ряде случаев установлено, что ТА модули стабилизируют плазмиды, обеспечивающие вирулентность штаммов. Это показано для MvpAT системы на плазмиде *Shigella flexneri* Pmysh6000 [Saeed S. et al., 2000]; HigBA системы на плазмиде

*Proteus vulgaris* Rts1 [Hurley J.M. & Woychik N., 2009];  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  системы на плазмиде pSM19035 *Streptococcus pyogenes* [Mutschler H. & Meinhart A., 2011]. У *Staphylococcus aureus* механизм участия ТА системы MazEF в патогенезе более сложен. Токсин MazF узнает специфическую последовательность РНК, преимущественно свойственную мРНК белков вирулентности, в том числе белка SraP; кроме того, экспрессия этого белка находится под контролем MazE антитоксина [Zhu L. et al., 2009]. Выше было сказано о связи ТА систем с персистирующим состоянием бактерий. Именно пресистирующее состояние латентных инфекций, нечувствительное ко многим антибиотикам, затрудняет их лечение. Показана связь между наличием ТА систем и способностью к переходу в персистирующее состояние у возбудителей туберкулеза - микобактерий [Demidenok O.I. et al., 2014]

Как было сказано в предыдущем разделе, изменение транскрипции и/или трансляции антитоксина, приводящее к разрушению комплекса токсин-антитоксин и активации токсина, является следствием реакции бактериальной клетки на стресс. Реакция на стресс, переход в персистирующее состояние и состояние биопленок - это тесно связанные между собой процессы, затрагивающие общую регуляторную систему бактерий. Именно с общей регуляторной сетью, вероятно, связана основная биологическая роль ТА систем, однако закономерности этих процессов до конца не изучены. Хотя ряд вопросов относительно функций хромосомных ТА систем остаётся нерешенным, их роль в клетке не столь загадочна, как это было много лет назад.

## 1.5 Области применения ТА систем

Поскольку ТА системы повсеместно присутствуют в бактериальных геномах и имеют значительный потенциал для подавления роста или даже убивают клетку, то данные системы были предложены в качестве потенциальных мишеней и активных компонентов при разработке антибактериальных препаратов [Williams J.J. et al., 2012]. Из-за белковой природы антитоксинов систем II типа они, по-видимому, являются наиболее реальными потенциальными соединениями для активации соответствующих токсинов. Наиболее прямолинейный подход для активации токсина будет у препарата, который разрушает ТА комплекс или предотвращает его образование и непосредственно активирует токсин. Кроме того, активация клеточных протеаз приводит к повышенной деградации антитоксина и тем самым активирует токсин. В подобных работах для обеспечения эффективности должна быть использована ТА система, которая широко распространена в штаммах патогенных бактерий. Описаны пептиды, препятствующие *in vitro* образованию ТА комплекса между компонентами ТА системы PemIK *B.anthraxis* [Agarwal S. et al., 2010]. В другой работе были синтезированы пептиды – аналоги CcdB токсина *E.coli*, - которые *in vitro* подавляли активность ДНК-гиразы и топоизомеразы IV [Trovatti E. et al., 2008] Токсин ζ (дзета) из системы ω-ε-ζ плазмиды pSM19035 фосфорилирует предшественник пептидогликана UNAG, что ведет к ингибированию белка MurA и синтеза пептидогликана. Было предложено использовать фосфорилированный UNAG-3P в качестве антибиотика [Mutschler H. et al., 2011].

ТА системы могут быть также применены в генной терапии вирусных инфекций. Некоторые токсины с эндонуклеазной активностью, например, MazF, вызывают гибель эукариотических клеток. Недавно был разработан ретровирусный вектор, содержащий *mazF* ген *E.coli* под контролем TAR промотора из ВИЧ-1. Инфекционный цикл ВИЧ начинается с экспрессии вирулентного Tat-белка, который связывается с TAR последовательностью для того, чтобы вызвать транскрипцию всего генома ВИЧ-1. Клетки, содержащие TAR-*mazF*, в присутствии ВИЧ-1 экспрессируют MazF, который, в свою очередь, эффективно расщепляет мРНК вируса и тем самым предотвращает репликацию ВИЧ-1 *in vivo* в этих клетках [Chono H. et al., 2011]. Токсин MazF был также использован для борьбы с вирусом гепатита С в составе т.н. зимоксина (zymoxin). Зимоксин состоял из соединенных белков токсина и соответствующего антитоксина и содержал сайт узнавания вирусной сериновой протеазы NS3. При попадании в клетку, зараженную вирусом, зимоксин подвергался специфическому действию протеазы, происходило высвобождение MazF токсина и гибель клетки [Shapira A. et al., 2012].

## 1.6 Разнообразие ТА систем II типа

На сегодняшний день для ТА систем II типа описано 13 суперсемейств генов токсинов и 20 суперсемейств генов антитоксинов (таблица 3) [Pandey D.P. et al., 2005; Jorgensen M.G. et al., 2009]. Для трех семейств II типа, RelBE, ParDE и HigBA, было предположено их филогенетическое сходство на основе гомологии их нуклеотидных последовательностей [Tsilibaris V. et al., 2007]. Между другими системами II типа - CcdAB и ParDE - не предполагается никакого эволюционного родства, хотя токсины данных систем имеют одинаковую мишень, а именно ДНК-гиразу. Также выяснилось, что имеется очень большое структурное сходство между токсинами систем CcdAB и Kis/Kid (ParD), хотя первый ингибирует активность ДНК-гиразы, в то время как второй является иРНК интерферазой. Подобное сходство возникает из-за присутствия в структуре молекул ядра из бета-слоя. Однако, наличие бета-слоя в данном случае скорее связано со способностью формировать димеры [Miller S. et al., 1989], нежели с эволюционными или функциональными взаимоотношениями. Так же установлено, что помимо семейств существуют еще и одиночные гены токсинов.

**Таблица 3.** Семейства типа II ТА систем.

Семейство	Оперон	Токсин	Анти-токсин	Активность	Механизм токсичности
ccdAB	ccdAB	CcdB	CcdA	Ингибитор ДНК гиразы	Подавление транскрипции
parDE	parDE	ParE	ParD	Ингибитор ДНК гиразы	Подавление транскрипции
phd/ doc	phd/doc	Phd	Doc	Связывается с 30S рибосомной субъединицей	Ингибитор трансляции
yafNO	yafNO	YafO	YafN	Связывается с 30S рибосомной субъединицей	Ингибитор трансляции
mazEF	mazEF (chpAK)	MazF (ChpK)	MazE (ChpA)	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции
	kis/kid (parD)	Kid	Kis	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции
	pemIK	PemK	PemI	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции
	chpBIK	ChpBK	ChpBI	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции
	mazEF-mt1 – mazEF-mt7	MazF-mt1 – MazF - mt7	MazE-mt1 – MazE-mt7	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции

	mazEFSa	MazFSa	MazESa	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции
	pemIKSa	PemKSa	PemISa	Эндорибонуклеаза	Неизвестно
		YdcE			
relBE	relBE	RelE	RelB	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	Ингибитор трансляции
	yefM-yoeB	YoeB	YefM	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	Ингибитор трансляции
	ygjNM	YgjN	YgjM	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	Ингибитор трансляции
	ygiUT (mqsRA)	YgiU (MqsR)	YgiT (MqsA)	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	Ингибитор трансляции
	dinJ-yafQ	YafQ	DinJ	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	Ингибитор трансляции
	pasB	PasB	PasA	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	
		StbE	StbD	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	
		Txe	Axe	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	
		YahV		Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	
	mqsAR	MqsR	MqsA	Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК в А сайте рибосомы	
higBA	higBA	HigB	HigA	Эндорибонуклеаза, связывание с рибосомой	Ингибитор трансляции
		RnlA		Эндорибонуклеаза, расщепление иРНК	Ингибитор трансляции
vapBC	vapBC	VapC	VapB	Эндорибонуклеаза, тасщепление тРНК	Ингибитор трансляции
ζε	ζε	ζ	ε	Фосфотрансфераза, Фосфорилирует UDP-Glc-Nac	Ингибирует пептидогликановый синтез
hipBA	hipBA	HipA	HipB	Фосфорилирует фактор элонгации EF-Tu	Ингибитор трансляции
hicAB	hicAB (yncN/ydcQ)	HicA (YncN)	HicB (YdcQ)	Эндорибонуклеаза	Ингибитор трансляции

Ранее были описаны основные механизмы регуляции ТА комплекса. Существуют и другие более интересные способы регуляции активности ТА систем:

- взаимодействие между системой MazEF и локусом RelA, который кодирует ppGpp – сигнал аминокислотного голодания. Локус MazEF в данном случае расположен после локуса RelA и транскрибируется совместно с ним, когда экспрессия последнего активируется [Aizenman E. et al., 1996; Christensen S.K. et al., 2003];
- SOS-индуцированные ТА система YafNO;
- активация ТА систем может происходить и с помощью quorum sensing; подобный механизм был показан для MazEF систем в *E.coli*;
- каскадная активация ТА систем;
- на примере системы MqsRA было показано, что её ТА комплекс является необходимым активатором гена токсина CspD;
- был обнаружен случай перекрестной регуляции гомологичных систем, когда ТА комплекс одной системы связывался с регуляторной последовательностью другой;
- токсины и антитоксины из разных семейств могут взаимодействовать, между собой. Например гены из RelE/ParE суперсемейств связаны с генами антитоксинов RelB, Phd, HigA, PasA [Yang M. et al., 2010].

ТА системы хорошо изучены на грамотрицательных бактериях, прежде всего у *E.coli*. На грамположительных бактериях ТА системы II типа обнаружены и в основном изучаются на представителях родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, а также у слабо грам-положительного рода *Mycobacterium*.

Верхние дыхательные пути человека являются естественной средой обитания для патогенного вида *S. pneumoniae*, отсюда эти бактерии распространяются в другие части тела хозяина. Увеличение вирулентности и устойчивости пневмококков к антибиотикам может влиять на эпидемиологию вида [Kadioglu A. et al., 2008]. Устойчивость и персистирующее состояние бактерий часто связаны с наличием ТА систем II типа. В трех первых секвенированных штаммах *S. pneumoniae* (D39, TIGR4 и R6) был обнаружен и подробно исследован оперон *relBE*. Всего в геномах *S. pneumoniae in silico* обнаружено восемь предполагаемых ТА систем: RelBE1Spn, RelBE2Spn, YefMYoeBSpn, HigAB, Phd/Doc, PezAT, TasAB и HicAB [Pandey D.P. et al., 2005; Jorgensen M.G. et al., 2009, Fico S. et al., 2003]. Было показано, что только три из них, а именно, RelBE2Spn [Nieto C. et al., 2006], YefM-YoeBSpn [Nieto C. et al., 2007] и PezAT [Khoo S.K. et al., 2007] были функционально активны, в то время RelBE1Spn была не активна [Nieto C. et al., 2006]. ТА



система *PezAT* гомологична ТА системе  $\omega$ - $\varepsilon$ - $\zeta$ , впервые идентифицированной на плазмиде pSM19035 *S. pyogenes*, однако, в отличие от нее, является двухкомпонентной [Khoo S.K. et al., 2007]. ТА системы *S. pneumoniae* имеют разную частоту встречаемости. Оперон *relBE2Spn* не является необходимым для существования *S. pneumoniae* (хотя и важен, т.к. обеспечивает механизм персистенции, который помогает справиться с неблагоприятными условиями, что позволяет бактериям выжить и эффективно населять человеческий организм [Nieto C. et al., 2010]. Однако, он был обнаружен во всех 100 проанализированных штаммах этой бактерии [Nieto C. et al., 2006]. Оперон *pezAT* отсутствовал только в нескольких геномах [Khoo S.K. et al., 2007], а поиск оперона *yoeB-yefMSpn* у 31 пневмококкового штамма показал, что более чем у 40% штаммов данная система отсутствует [Nieto C. et al., 2007].

У *S. aureus*, также патогенной бактерии, идентифицировано 3 ТА системы: MazEF и две системы YefM-YoeB, прежде называвшиеся Axe-Txe [Yoshimura S. et al., 2009]. Система MazEF была обнаружена у всех 78 исследованных штаммов *S. aureus*, устойчивых к метициллину [Williams J.J. et al., 2011]. Токсин MazEFSa является эндорибонуклеазой, специфически разрезающей мРНК по сайту U $\downarrow$ ACAU [Williams J.J., Hergenrother J.P., 2013]. В геноме непатогенного штамма *S. equorum* также были обнаружены те же 3 ТА системы, так что связь ТА систем с патогенностью стафилококка требует дальнейших исследований [Schuster F.S. et al., 2013]. Еще одна ТА система, где токсин принадлежит к суперсемейству MazF, была обнаружена на плазмиде *S. aureus* pCH91 – PemIKSa. Система обеспечивает стабильность плазмиды и, вероятно, вирулентность штамма, *in silico* она обнаружена во многих штаммах *S. aureus*, преимущественно на хромосомах. Токсин PemI имеет эндорибонуклеазную активность и специфически узнает последовательность U $\downarrow$ AUU [Bukowski M. et al., 2013].

У *B. subtilis* также была обнаружена ТА система MazEF (YdcED) [Pellegrini et al., 2005]. Токсин MazE, эндорибонуклеаза, узнает, как и подобный токсин *S. aureus*, последовательность UACAU [Park J. et al., 2014]. Система MazEF обнаружена и у *B. anthracis* [Agarwal S. et al., 2010]. Кроме того, у *B. subtilis* обнаружено несколько ТА систем нового типа, где белок принадлежит семейству Pfam PF04740 – YobLK, YxiD-YxxD, YgcGF, YokIJ. Эти токсины имеют эндорибонуклеазную активность. Их особенностью является то, что они, вероятно, способны выделяться в среду или как-то проникать в соседние клетки [Holberg et al., 2012]. ТА системы TasAB (токсин суперсемейства MazE) обнаружены на плаزمиде *B. thuringiensis* [Fico S. et al., 2012; Liu M. et al., 2008].

У энтерококков ТА система Ахе-Тхе была впервые обнаружена на плазмиде pRIM *E.faecium* [Grady R. et al., 2003], а затем – на многих плаزمидах этого вида, она также была обнаружена на плазмидах *Bacillus* sp и *E.coli*. Особенно часто система обнаруживается у ванкомицин-устойчивых энтерококков [Moritz E.M. & Hergenrother P.J. 2007; Sadeghifard N. et al., 2014]. Система гомологична YefM-YoeB *E.coli*. Тхе эндорибонуклеаза разрезает мРНК за стартовым кодоном AUG [Halvorson et al., 2011].

Вид *M. tuberculosis* имеет огромное число ТА систем, преимущественно II типа. У штамма H37RV идентифицировано 79 систем: VarBC (50), MazEF (10), YefM-YoeB (1), RelBE (2), HigBA (2), ParDE (2) и несколько неохарактеризованных систем. Для 37 систем была показана их активность. Активация многих ТА систем *M. tuberculosis* способствует персистенции и, следовательно, патогенности микобактерий [Sala A. et al., 2014].

Среди охарактеризованных ТА систем II типа, система YoeB-YefM является одной из широко распространенных в плазмидах и в геномах бактерий. Изначально эта система была охарактеризована как Ахе-Тхе в штамме с множественной лекарственной устойчивостью *E. faecium* [Grady R. et al., 2003]. С тех пор система YoeB-YefM была обнаружена во многих геномах патогенных бактерий, в том числе, таких как *S. aureus*, *S.pneumoniae*, *M. tuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* [Cherny I. et al., 2004]. Система YoeB-YefM была идентифицирована как первая функциональная ТА система у *Streptomyces* [Sevillano L. et al., 20012].

Антитоксин YefM принадлежит Phd суперсемейству, а токсин YoeB принадлежит к суперсемейству ParE/RelE. Как и RelE, YoeB проявляет эндорибонуклеазную активность на мРНК, ассоциированной с рибосомой. Белок YoeB связывается с обеими субъединицами 70S рибосомы, 30S и 50S; он разрезает мРНК через один кодон после иницирующего. Комплекс YoeB-YefM образует гетеротример из двух молекул антитоксина и одной – токсина. Несмотря на сходство с белком RelE, YoeB имеет ряд отличий. Идентичность аминокислотной последовательности белков составляет 15%. В отличие от RelE, YoeB проявляет частичную активность в некоторых биохимических тестах [Kamada K. et al., 2005]. Кроме того, системы взаимодействуют с рибосомой отличным друг от друга способом. YoeB после диссоциации рибосомы связывается с субъединицей 50S [Zhang Y. et al., 2009], а RelE взаимодействует только с 16S рРНК [Neubauer C. et al., 2009]. YoeB и RelE ингибируют трансляцию, влияя либо на инициацию, либо на элонгацию соответственно.

Определена кристаллическая структура YoeB, находящегося в связи с рибосомой в состоянии перед расщеплением мРНК, что позволило охарактеризовать общие и

специфические черты рибосомо-зависимых нуклеаз [Kamada K. et al., 2005; Feng S. et al., 2013]. Экспрессия токсина YoeB из *S. pneumoniae* была летальна в клетках *Arabidopsis thaliana*. Это был первый пример действия бактериальных ТА систем на растения [Abu Bakar F. et al., 2015].

ТА системы присутствуют у разных видов бактерий микробиома человека, в частности система RelBE, была обнаружена у некоторых представителей микробиоты человека (таблица 4).

**Таблица 4.** ТА системы у бактерий микробиомы человека.

<b>Семейство</b>	<b>Вид</b>	<b>Количество ТА систем суперсемейства RelBE*</b>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i>	от 1 до 6
	<i>Corinebacterium</i>	-
	<i>Propionibacterium</i>	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	от 1 до 4
	<i>Parabacteroides</i>	1
	<i>Prevotella</i>	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	от 1 до 5
	<i>Clostridium</i>	от 1 до 3
	<i>Enterococcus</i>	2
	<i>Eubacterium</i>	от 1 до 2
	<i>Lactobacillus</i>	от 1 до 4
	<i>Listeria</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	от 1 до 4
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacterium</i>	4
<i>Proteobacteria</i>	<i>Citobacter</i>	от 1 до 5
	<i>Escherichia</i>	от 1 до 9
	<i>Enterobacter</i>	от 3-х до 7
	<i>Helicobacter</i>	от 1 до 2
	<i>Klebsiella</i>	от 1 до 3
	<i>Pseudomonas</i>	от 1 до 11

- данные по базе данных TADB [<http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/>]

Из изложенного в литературном обзоре можно заключить, что существует большое количество видов лактобацилл и они имеют сходные фенотипические и физиологические характеристики. Установлено, что пробиотические свойства лактобацилл являются штаммоспецифическими. Видам *Lactobacillus*, обитающим в ЖКТ, уделяется большое внимание благодаря их свойствам, положительно влияющим на организм хозяина, что позволяет использовать их в составе лекарственных препаратов для профилактики болезней человека и животных. Актуальной задачей является идентификация штаммов лактобацилл в качестве биомаркеров для тестирования ранних стадий различных заболеваний человека.

ТА системы – это генетические элементы бактерий и архей, состоящие из 2-х, реже 3-х генов. В стрессовых условиях происходит изменение транскрипции и/или трансляции антитоксина, приводящее к разрушению комплекса токсин-антитоксин и активации токсина. ТА системы II типа являются наиболее изученными с биологической точки зрения и наиболее многочисленными. По своему механизму действия токсины II типа разнообразны, они подавляют различные стадии трансляции, репликацию, синтез пептидогликанов. Существуют различные механизмы действия ТА систем и различные биомишени токсинов: это подавление синтеза АТФ, трансляции, репликации, действие на цитоскелет. Токсин RelE, изучаемой в данной работе ТА системы RelBE – наиболее хорошо охарактеризованный пример РНК интерферазы, расщепляющей мРНК рибосомозависимым способом. RelE расщепляет мРНК в сайте А рибосомы. Функции ТА систем в бактериальной клетке разнообразны, это участие в формировании состояния персистентности, в программированной гибели клеток, образовании биопленок, в общей регуляторной системе клетки. Неоднократно отмечалась связь между наличием ТА систем у патогенных бактерий и их вирулентностью. ТА модули рассматриваются как перспективные "мишени" для разработки антибактериальных препаратов, их потенциал предполагается использовать и для борьбы с вирусными инфекциями.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Штаммы и условия культивирования

Штаммы бактерий рода *Lactobacillus* были выделены из фекалий, слюны и содержимого влагалища здоровых людей – жителей центральных областей Российской Федерации. Список всех штаммов, а также источник их выделения, приведены в таблице 5. Видовая идентификация штаммов лактобацилл была проведена нами по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (праймеры 27f и 1492r, таблица 7) [Lane D.J. 1991].

**Таблица 5.** Список штаммов лактобацилл, использованных в работе.

№ п/п	Вид лактобацилл	Название штамма	Источник выделения	Источник получения
1.	<i>L. plantarum</i>	CS 396	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия
2.	<i>L. plantarum</i>	8-РА-3	вагинальная полость	ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Тартуский ун-т. г. Тарту, Эстония
3.	<i>L. plantarum</i>	90-ТС-4	Растительное происхождение	ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Тартуский ун-т. г. Тарту, Эстония
4.	<i>L. plantarum</i>	гКНМ 101	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия
5.	<i>L. plantarum</i>	К9L	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
6.	<i>L. plantarum</i>	46к	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
7.	<i>L. plantarum</i>	36ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
8.	<i>L. plantarum</i>	106зв	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
9.	<i>L. plantarum</i>	29ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
10.	<i>L. plantarum</i>	90ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
11.	<i>L. plantarum</i>	191г	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
12.	<i>L. plantarum</i>	29ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
13.	<i>L. plantarum</i>	32ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
14.	<i>L. plantarum</i>	46ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
15.	<i>L. plantarum</i>	75ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
16.	<i>L. plantarum</i>	90ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
17.	<i>L. rhamnosus</i>	421-2	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия
18.	<i>L. rhamnosus</i>	7дст	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА

				Минздрава России г. Тверь, Россия
19.	<i>L. rhamnosus</i>	24дст	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
20.	<i>L. rhamnosus</i>	32к	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
21.	<i>L. rhamnosus</i>	38к	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
22.	<i>L. rhamnosus</i>	50зв	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
23.	<i>L. rhamnosus</i>	72зв	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
24.	<i>L. rhamnosus</i>	40ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
25.	<i>L. rhamnosus</i>	80ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
26.	<i>L. rhamnosus</i>	22гн	вагинальная полость	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
27.	<i>L. rhamnosus</i>	2гн	вагинальная полость	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
28.	<i>L. rhamnosus</i>	51 гн	вагинальная полость	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
29.	<i>L. rhamnosus</i>	45д	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
30.	<i>L. rhamnosus</i>	50ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
31.	<i>L. rhamnosus</i>	26ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
32.	<i>L. rhamnosus</i>	61ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
33.	<b><i>L. fermentum</i></b>	гКНМ 526	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия
34.	<i>L. fermentum</i>	2пр	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
35.	<i>L. fermentum</i>	11зв	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
36.	<i>L. fermentum</i>	11дст	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
37.	<i>L. fermentum</i>	291Г	слюна	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
38.	<i>L. fermentum</i>	57ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
39.	<i>L. fermentum</i>	59ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
40.	<i>L. fermentum</i>	60ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
41.	<i>L. fermentum</i>	102ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
42.	<i>L. fermentum</i>	103ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
43.	<b><i>L. casei/paracasei</i></b>	гКНМ 23	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия

44.	<i>L. casei/paracasei</i>	гКНМ 577	фекалии	ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского г. Москва, Россия
45.	<i>L. casei/paracasei</i>	К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	фекалии	ВНИИ Молочной промышленности г. Москва, Россия
46.	<i>L. casei/paracasei</i>	20011	фекалии	DSM типовой
47.	<i>L. casei/paracasei</i>	17к	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
48.	<i>L. casei/paracasei</i>	42ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
49.	<i>L. casei/paracasei</i>	48ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
50.	<i>L. casei/paracasei</i>	51ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
51.	<i>L. helveticus</i>	Er 315/ 402	фекалии	Армения
52.	<i>L. helveticus</i>	100 аш	фекалии	ВНИИ Молочной промышленности г. Москва, Россия
53.	<i>L. helveticus</i>	НК-1	фекалии	ВНИИ Молочной промышленности г. Москва, Россия
54.	<i>L. helveticus</i>	NNIE	фекалии	ВНИИ Молочной промышленности г. Москва, Россия
55.	<i>L. brevis</i>	15f	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
56.	<i>L. brevis</i>	47ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
57.	<i>L. brevis</i>	52ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
58.	<i>L. mucosa</i>	46ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
59.	<i>L. salivarius</i>	44ст	фекалии	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
60.	<i>L. salivarius</i>	64ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
61.	<i>L. salivarius</i>	78ск	кишечная биопсия	ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России г. Тверь, Россия
62.	<i>L. johnsonii</i>	К21	фекалии	ГНЦ РФ ИМБП РАН г. Москва, Россия

**Штаммы *Esherichia coli***, используемые в данной работе:

➤ для клонирования и выделения плазмид:

**TG1:** F<sup>-</sup> [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5,  
(rK-mK-);

**DH5α:** F<sup>-</sup> gyrA96(NalR) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17(rk-mk+ ) glnV44 deoR  
delta(lacZYA-argF)U169 [phi80delta(lacZ)M15];

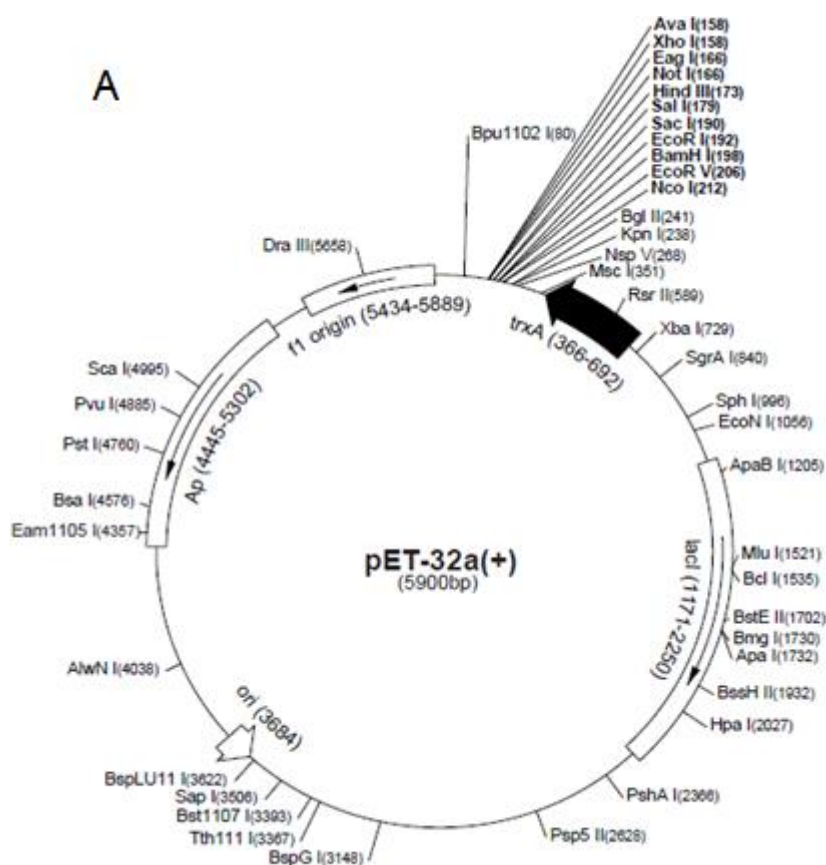
➤ для экспрессии генов:

**BL21 (DE3):** F<sup>-</sup> ompT gal [E. coli B is naturally dcm and lon] hsdSB with DE3, a λ  
prophage carrying the T7 RNA polymerase gene and lacIQ.

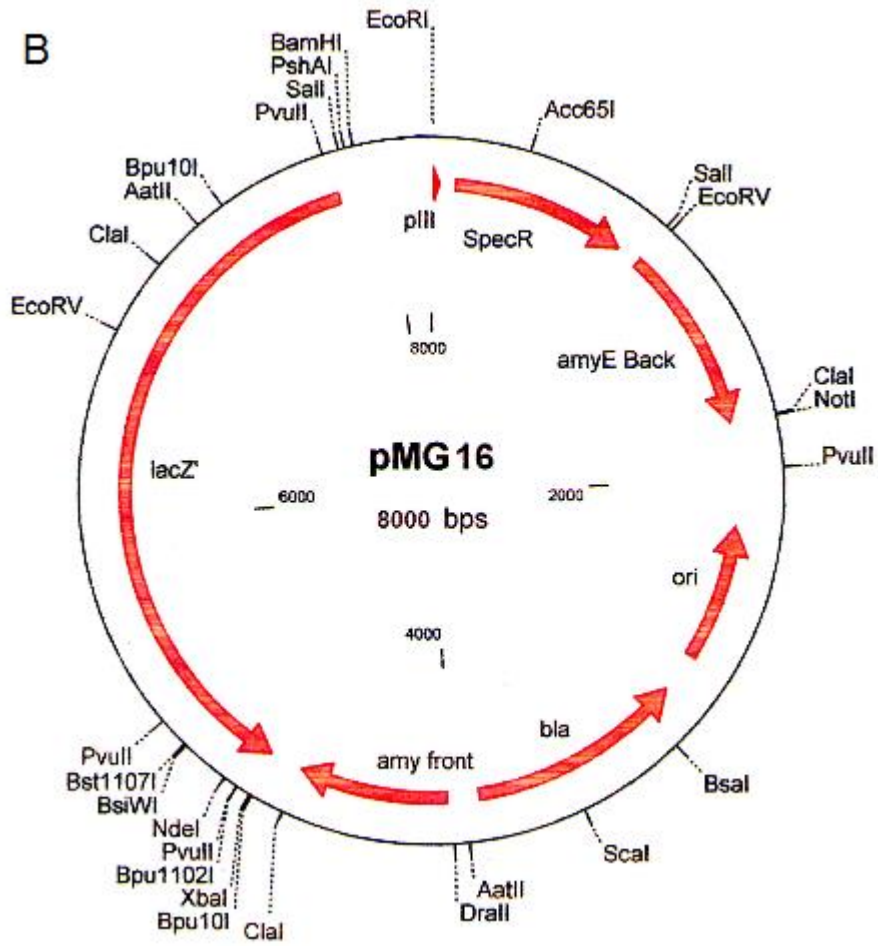
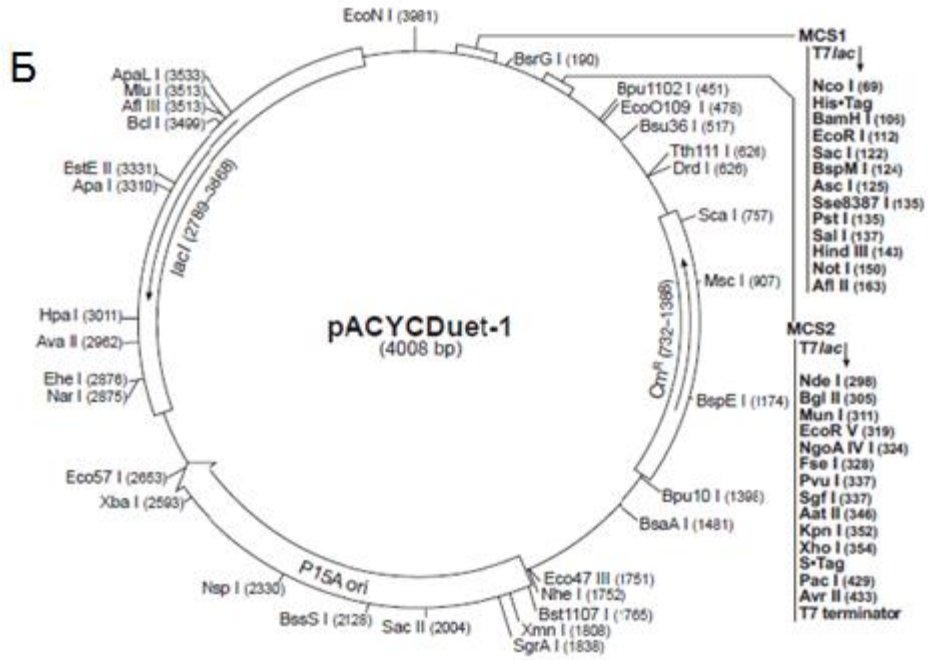
Штамм *Bacillus subtilis* DB104 использовался для получения в хромосоме конструкций с геном-репортером  $\beta$ -галактозидазы и клонированными промоторами.

### Плазмиды и векторы

В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и экспрессии генов использовали векторы pET-32a, pACYCDuet-1. Для клонирования промоторов использовали плазмиду pMG16 (рисунок 7). Характеристика векторов и сконструированных в данной работе плазмид приведена в таблице 6.







**Рисунок 7** – Схемы экспрессионных векторов.  
А – pET-32a; Б – pACYCDuet-1; В – pMG16

Таблица 6. Плазмиды, использованные в работе.

Плазмида	Характеристика	Источни к
pET32a	Экспрессионный вектор <i>E.coli</i> . Содержит IPTG-индуцируемый промотор T7 фага/ <i>lac</i> оператор, rbs, His-Tag, S-Tag и Trx-Tag, pBR322 origin; Ap <sup>R</sup>	Novagen
pACYCDuet-1	Экспрессионный вектор <i>E.coli</i> . Содержит IPTG-индуцируемый промотор T7 фага/ <i>lac</i> оператор, rbs, His-Tag, P15A origin; Cm <sup>R</sup>	Novagen
p32relE1_2	Ген токсина <i>relE1</i> штамма <i>L.r.2гн</i> амплифицирован с помощью праймеров FGG00493 <i>EcoR</i> /RGG00493 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pET-32a	Данная работа
p32yoeB_24	Ген токсина <i>yoeB</i> штамма <i>L.r.24дс</i> амплифицирован с помощью праймеров Flc_02727 <i>EcoR</i> /Rlc_02727 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pET-32a	Данная работа
p32yefM_24	Ген антитоксина <i>yefM</i> штамма <i>L.r.24дс</i> амплифицирован с помощью праймеров Flc_02726 <i>EcoR</i> /Rlc_02726 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pET-32a	Данная работа
p32yoeB_40	Ген токсина <i>yoeB</i> штамма <i>L.r.40ст</i> амплифицирован с помощью праймеров Flc_02727 <i>EcoR</i> /Rlc_02727 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pET-32a	Данная работа
p32relB3_45	Ген антитоксина <i>relB3</i> штамма <i>L.r.45д</i> амплифицирован с помощью праймеров FH_00056 <i>EcoR</i> /RH_00056 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pET-32a	Данная работа
pACYyoeB_24	Ген токсина <i>yoeB</i> штамма <i>L.r.24дст</i> амплифицирован с помощью праймеров Flc_02727 <i>EcoR</i> /Rlc_02727 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE1 <sub>Lhv</sub> _NK	Ген токсина <i>relE1</i> штамма <i>L.h.NK1</i> амплифицирован с помощью праймеров Fhv2502 <i>EcoR</i> /Rhv2502 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE1 <sub>Lhv</sub> _NN	Ген токсина <i>relE1</i> штамма <i>L.h.NNIE</i> амплифицирован с помощью праймеров Fhv2502 <i>EcoR</i> /Rhv2502 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE2 <sub>Lhv</sub> _NK	Ген токсина <i>relE2</i> штамма <i>L.h.NK</i> амплифицирован с помощью праймеров Fhv2503 <i>BamH</i> /Rhv2503 <i>XhoI</i> , рестрицирован <i>BamH/XhoI</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE2 <sub>Lhv</sub> _NN	Ген токсина <i>relE2</i> штамма <i>L.h.NNIE</i> амплифицирован с помощью праймеров Fhv2503 <i>BamH</i> /Rhv2503 <i>XhoI</i> , рестрицирован <i>BamH/XhoI</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE3 <sub>Lhv</sub> _NN	Ген токсина <i>relE3</i> штамма <i>L.h.NNIE</i> амплифицирован с помощью праймеров FH2056 <i>EcoR</i> /RH2056 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
pACrelE5 <sub>Lhv</sub> _NN	Ген токсина <i>relE3</i> штамма <i>L.h.NNIE</i> амплифицирован с помощью праймеров Fhv1630 <i>EcoR</i> /Rhv1630 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в pACYCDuet-1	Данная работа
p32relE1 <sub>Lcs</sub>	Ген токсина <i>relE1</i> штамма <i>L.c.</i> амплифицирован с помощью праймеров Flcs14530 <i>EcoR</i> /Rlcs14520 <i>Hind</i> , рестрицирован <i>EcoRI/HindIII</i> и клонирован в в pET-32a	Данная работа
pMG16	Ap <sup>R</sup> Sp <sup>R</sup> ( <i>E.coli</i> ), Sp <sup>R</sup> ( <i>B.subtilis</i> ) Плазмида для клонирования промоторов. Репортерный ген	

	β-галактозидазы расположен между фрагментами гена амилазы ( <i>amyE</i> ) <i>B.subtilis</i> . Реплицируется в <i>E.coli</i> (pUC19 репликон)	
--	--	--

## Среды

Для культивирования лактобацилл использовали среду Lactobacterium MRS (производства HiMedia). Для выращивания *E.coli* и *B.subtilis* использовали среду Лурия – Бертани (LB). Для обеспечения селективного роста плазмидсодержащих клеток добавляли ампицилин (100мкг/мл), хлорамфеникол (5мг/мл) (для *E.coli*) и спектиномицин (100мг/мл) (для *B.subtilis*). Для отбора клонов после трансформации *B.subtilis* DB104 к LB – агару добавляли крахмал в концентрации 0,5%. В качестве индуктора промотора в плаزمидах pET-32a, pACYCDuet-1 использовали IPTG в концентрации 0,5мМ.

В качестве минимальных сред для *B.subtilis* использовали среды Спицайзена. Основная среда Спицайзена имела следующий состав: (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> - 2 г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 6 г; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 14 г; цитрат натрия - 1 г; MgSO<sub>4</sub> - 0,1 г; глюкоза - 5 г; дистиллированная вода - до 1 л; pH=7,4. Среда Спицайзена I, кроме того, содержала 0,2% дрожжевого гидролизата; 0,01% гидролизата казеина и необходимые аминокислоты и азотистые основания в концентрации 50 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно. Среда Спицайзена II состояла из основной среды Спицайзена с добавлением 0,01% дрожжевого гидролизата.

## Условия выращивания

Культуры всех штаммов лактобацилл выращивали в жидкой и на агаризованной среде MRS в термостате при 37±0,5°C в течение 24-48 часов. При выращивании бактерий на плотных питательных средах применяли анаэроостаты и газпакеты (BD GasPak™ EZ Anaerobe Container System), обеспечивающие атмосферу, содержащую 10% CO<sub>2</sub>. Клетки *E.coli* и *B.subtilis* выращивались на твердой питательной LB среде при 37°C в течение 24 ч и в жидкой среде при 37°C с аэрацией (250об/мин) 24 ч.

## 2.2 Выделение ДНК

### 2.2.1 Выделение хромосомной ДНК лактобацилл

Клетки из 14 мл культуры осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течении 12 мин и ресуспендировали в 7 мл буфера 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>, pH 8,0. Суспензию клеток центрифугировали в тех же условиях и осадок ресуспендировали в 500 мкл указанного выше буфера; суспензию переносили в 2-мл центрифужную пробирку и добавляли 50 мкл хлороформа. Смесь энергично встряхивали с помощью вортекса (5 раз

по 10 сек), вносили 100 мкл лизоцима (120 мг/мл) и инкубировали 30 минут при 37°C; затем добавляли 6 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали еще 30 минут при 37°C. Для лизиса клеток суспензию мягко смешивали с 200 мкл 10% SDS и 200 мкл 5 М NaCl; смесь инкубировали 16 ч при 65°C.

Полученный грубый лизат клеток остужали до комнатной температуры, добавляли 1 мл смеси фенол/хлороформ (1:1) и тщательно смешивали в течение 5 мин до состояния гомогенной эмульсии; смесь центрифугировали при 12000g 15 мин. Водную фазу, содержащую ДНК, отбирали в новую 1,5-мл пробирку и смешивали с 600 мкл изопропанола. Смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 12000g 20 минут. Осадок ДНК трижды промывали порциями по 0,5 мл 75% этанола (центрифугирование по 5 мин при 12000g) и растворяли в 100 мкл деионизированной воды. ДНК хранили при -20°C.

### **2.2.2 Выделение плазмидной ДНК *E.coli* с использованием набора GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США)**

Бактерии выращивали в LB среде с антибиотиком (37°C, 18 часов, 250 об/мин, 10 мл). Биомассу отбирали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин. Клетки суспендировали в 250 мкл Resuspension solution + RNase A. Затем добавляли 250 мкл Lysis solution и тщательно перемешивали в течение 4-6 мин. Добавляли 350 мкл Neutralization solution и повторно перемешивали 4-6 мин. Затем центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин. Супернатант переносили на колонку и центрифугировали в течение 1 мин при 12 000 об/мин. Колонки промывали 0,5 мл Wash solution с последующим центрифугированием в течение 1 мин (2 раза). Остаток Wash solution в колонке удаляли повторным центрифугированием в течение 1 мин. Затем колонки переносили в эппендорфы на 1,5 мл и элюировали ДНК добавлением 50 мкл H<sub>2</sub>O с центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин.

## **2.3 Конструирование праймеров и проведение ПЦР**

Примеры были сконструированы с помощью программы NCBI/Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). Праймеры для обнаружения ТА систем конструировались по консервативным участкам ТА систем аннотированных штаммов *L.rhamnosus*, *L.helveticus* и *L.casei* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). У ТА системы RelBE3<sub>Lrh</sub> проксимальные районы были резко отличны у разных штаммов, поэтому были использованы 3 различных F-праймера (для одного R-праймера). Праймеры для определения нуклеотидной последовательности ТА систем были сконструированы по соседним с ТА систем генам (ТА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, RelBE1<sub>Lhv</sub>, RelBE3<sub>Lhv</sub>, RelBE1<sub>Lcs</sub>)

или по флангам генов (ТА системы RelB3-RelE3<sub>Lrh</sub>, relE1<sub>Lrh</sub> relE2<sub>Lhv</sub> RelBE5<sub>Lhv</sub>) – в зависимости от консервативности нуклеотидных последовательностей, окружающих тот или иной ТА локус. Праймеры для клонирования генов были созданы по фланговым районам генов. При необходимости к 5'-концам праймеров добавляли сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции. Праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия) и представлены в таблице 7.

ПЦР проводили со смесью высокоточных ДНК-полимераз из набора Tersus PCR kit (Eurogen, Russia) на приборе «Терцик» («ДНК Технология», Россия). Температурный режим подбирали с учетом длины и состава праймеров. При скрининге гибридных колоний использовали Taq-полимиразу и набор «PCR core kit» фирмы «Диалат ЛТД», Россия.

Состав смеси для ПЦР: 10×ПЦР буфер; 2,5mM  $\Sigma$ dNTPs; DMSO; 50mM MgCl<sub>2</sub>, плазмидная ДНК; олигонуклеотидные праймеры добавляли в количестве 20 пмоль на 100 мкл смеси; 5u/μl Taq –полимераза.

Таблица 7. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

№ п/п	Название	Последовательность 5' - 3'	Для чего использовался
<b>Для гена 16S рРНК</b>			
1.	27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности гена 16S РНК, [Lane D.J. 1991]
2.	1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности гена 16S РНК, [Lane D.J. 1991]
<b>Для ТА систем в штаммах <i>L. rhamnosus</i></b>			
3.	FGG00493EcoR	TTTTGAATTCATGCCACCTCCCTGCCCT	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности гена токсина LGG_00493 и для клонирования этого гена в плазмиду рЕТ32а.
4.	RGG00493Hind	TTTTAAGCTTTTAAATCTCGCCATGGCGGCC	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности гена токсина LGG_00493 и для клонирования этого гена в плазмиду рЕТ32а.
5.	Flc_02726EcoR	TTTTGAATTCATGGAAGCAACGAATTATAGTGAT	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы Lc705_002726-02727 и для клонирования гена антитоксина Lc705_02726 в рЕТ32а.
6.	Rlc_02726Hind	TTTTAAGCTTTTAATCATGATCGAAGTCCGTAA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина Lc705_02726 в плазмиду рЕТ32а.
7.	Flc_02727EcoR	TTTTGAATTCATGATTAAACCTGGACCGATGA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина Lc705_02727 в плазмиды рЕТ32а и рACYCDuet-1.
8.	Rlc_02727Hind	TTTTAAGCTTTTAACTGTAGTGAGTGCGGCA	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы Lc705_002726-02727 и для клонирования гена токсина Lc705_02727 в рЕТ32а и рACYCDuet-1.
9.	RelBE_R11F	TTTGGATCCATGATCTCGATGGAAACAAAAT	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы НMPREF0541_00056–00057 и для клонирования гена токсина

			HMPREF0541_00056 в плазмиды pET32a и pACYCDuet-1.
10.	RelBE_GG	TTT <u>GGATCC</u> ATGGCAAAGAATCCCGTATC	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности гена антитоксина LGG_00519.
11.	RelBE_Lc	TTT <u>GGATCC</u> TTGATGAACATGACCAAAAATC	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы Lc705_00508–00509.
12.	RelBE_R EcoR	TTT <u>GAATTC</u> TTACTCAATGTTCAATGTATCG	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА систем HMPREF0541_00056–00057, Lc705_00508–00509 и LGG_00519.
13.	FH_00056EcoR	TTTT <u>GAATTC</u> ATGATGTTGACGATTAATCGCA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина HMPREF0541_00056 в плазмиду pACYCDuet-1.
14.	RH_00056Hind	TTTT <u>AAGCTT</u> TTACTCAATGTTCAATGTATCG	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина HMPREF0541_00056 в плазмиду pACYCDuet-1.
15.	FH_00057EcoR	TTTT <u>GAATTC</u> ATGATCTCGATGGAAACAAAAT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина HMPREF0541_00057 в плазмиду pET32a.
16.	RH_00057Hind	TTTT <u>AAGCTT</u> TTAATCGTCAACATCATTGTATAA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина HMPREF0541_00057 в плазмиду pET32a.
<b>Для ТА систем в штаммах <i>L. helveticus</i></b>			
17.	Fhv1127EcoR	TTTT <u>GAATTC</u> ATGACAGTAGCATTAACSTCAAAG	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы Lhv_1127-2502.
18.	Rhv1127Hind	TTTT <u>AAGCTT</u> TTATTTAAATTTCTCCCAATAATCAT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина Lhv_1127 в плазмиду pET-32a.
19.	Fhv2502EcoR	TTTT <u>GAATTC</u> ATGTCAAAATTAGTATTTAGACCAC	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина Lhv_2502 в плазмиду pACYCDuet-1.
20.	Rhv2502Hind	TTTT <u>AAGCTT</u> CTATTTACGAAACTTTCTAGACTT	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы Lhv_1127-2502 и для клонирования гена токсина Lhv_2502 в pACYCDuet-1.
21.	FH1992BamH	TTTT <u>GAATTC</u> ATGCTACAAACACCAAAATAATATTA A	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы LBHH_1992-2056.
22.	RH1992XhoI	TTTT <u>CTCGAG</u> TAAAGCTTCGTCATCTTTAGTTAG	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина LBHH_1992 в плазмиду pET-32a.
23.	FH2056EcoR	TTTT <u>GAATTC</u> ATGACGAAGCTTAACGTAATTTTA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина LBHH_2056 в плазмиду pACYCDuet-1.
24.	RH2056Hind	TTTT <u>GGATCC</u> ATGCTACAAACACCAAAATAATATTA A	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы LBHH_1992-2056 и для

			клонирования гена токсина LBHН_2056 в рACYCDuet-1.
25.	<b>Fhv2503BamH</b>	TTTTGGATCCATGTTTAAACGTTAAGGAAAGAC	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности гена токсина lhv2503 и для клонирования данного гена в плазмиду рACYCDuet-1.
26.	<b>Rhv2503XhoI</b>	TTTTCTCGAGTAAATTTTGTTATGAATCAAGCT	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности гена токсина lhv2503 и для клонирования данного гена в плазмиду рACYCDuet-1.
27.	<b>F05680_EcoR</b>	TTT TGA ATT CAT_GAA GAA GAA TGA TAA AAA G	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_05680 в плазмиду рЕТ-32а.
28.	<b>R05680_BamH</b>	TTT TGG ATC CTT AAT TCT TAT GAT AAT TAA CC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_05680 в плазмиду рЕТ-32а.
29.	<b>F05855_EcoR</b>	TTT TGA ATT CTT GAG CCA ATT AAT ACT GCA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_05855 в плазмиду рЕТ-32а.
30.	<b>R05855_BamH</b>	TTT TGG ATC CTT AAA GCC GCT TTT TTG TAC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_05855 в плазмиду рЕТ-32а.
31.	<b>F06470_EcoR</b>	TTT TGA ATT CAT GCA AGA TTA TAA ATT AGA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_06470 в плазмиду рЕТ-32а.
32.	<b>R06470_BamH</b>	TTT TGG ATC CTT AAA ATG CAT CAT TAA TT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_06470 в плазмиду рЕТ-32а.
33.	<b>F06590_EcoR</b>	TTT TGA ATT CAT GAA AAT TAG TAA TTA TAT TA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_06590 в плазмиду рЕТ-32а.
34.	<b>R06590_BamH</b>	TTT TGG ATC CTT AAT CTT CCT TTC TAA GCA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_06590 в плазмиду рЕТ-32а.
35.	<b>F07345_Xho</b>	TTT TCT CGA GAT GCA CGT TAC AAC GTA T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_07345 в плазмиду рЕТ-32а.
36.	<b>R07345_Hind</b>	TTT TAA GCT TTT ATA TTG CTT TAA TAA ACT T	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_07345 в плазмиду рЕТ-32а.
37.	<b>F08040_EcoR</b>	TTT TGA ATT CAT GGA AAA GTT ACT GAA ATT A	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_08040 в плазмиду рЕТ-32а.
38.	<b>R08040_BamH</b>	TTT TGG ATC CTC ATT TTG CCA TTC GTC C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина R0052_08040 в плазмиду рЕТ-32а.
39.	<b>F09820_EcoR</b>	TTT TGA ATT CAT GAA AAT GCT ACA TTA TAA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина



		AG	<i>R0052_09820</i> в плазмиду pET-32a.
40.	<b>R09820_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ACC TCA ATA CTA ATC TTT C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_09820</i> в плазмиду pET-32a.
41.	<b>F10550_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAT GAT GTA CTT ACT GT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10550</i> в плазмиду pET-32a.
42.	<b>R10550_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAT TGA AAA TAT CTG ACA T	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10550</i> в плазмиду pET-32a.
43.	<b>F10565_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAT TGA AGT AAC CGT TGA TT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10565</i> в плазмиду pET-32a.
44.	<b>R10565_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ATT TTT CAT CTT TTT TGC CTT C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10565</i> в плазмиду pET-32a.
45.	<b>F11135_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GCT TCA AGT TCT GCT GC	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_11135</i> в плазмиду pET-32a.
46.	<b>R11135_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAT TGG TAC TTA CCG AAG T	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_11135</i> в плазмиду pET-32a.
47.	<b>F11615_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAT TGA TTG GGT AAT GAT TG	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_11615</i> в плазмиду pET-32a.
48.	<b>R11615_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTC</u> ACT TAA AAA AGT TCA GAA ATC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_11615</i> в плазмиду pET-32a.
49.	<b>F00225_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAG AAG ACA AGA AAG	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_00225</i> в плазмиду pET-32a.
50.	<b>R00225_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> AAA CTT GAA GTG AC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_00225</i> в плазмиду pET-32a.
51.	<b>F02305_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CTT</u> GCT TTC GCT TGA TAA ATT C	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_02305</i> в плазмиду pET-32a.
52.	<b>R02305_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> ACC TAA AGG CTG TAG CA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_02305</i> в плазмиду pET-32a.
53.	<b>F02870_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GGA TCT GTG GGC AAA GA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_02870</i> в плазмиду pET-32a.
54.	<b>R02870_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTC</u> ACT CCG TAC TTC TAA TGT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_02870</i> в плазмиду pET-32a.

55.	<b>F03020_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GTA TCA AAT TAA ATA TAG TG	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03020</i> в плазмиду pET-32a.
56.	<b>R03020_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ATT TTA CGG TCT CTA CAT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03020</i> в плазмиду pET-32a.
57.	<b>F03080_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAA TAA AAA CGA TCA AAA TGA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03080</i> в плазмиду pET-32a.
58.	<b>R03080_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTC</u> AAC ATA AAC AAA ACC ATA GC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03080</i> в плазмиду pET-32a.
59.	<b>F03145_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GCT TCA TCG CGA AAA TAA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03145</i> в плазмиду pET-32a.
60.	<b>R03145_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> ATG CAC TTA CCC AAT CA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03145</i> в плазмиду pET-32a.
61.	<b>F03820_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CTT</u> GAA TAA CCA AGA CTT TGA TT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03820</i> в плазмиду pET-32a.
62.	<b>R03820_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> ACA TTG AAG TAA AAC TGT C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_03820</i> в плазмиду pET-32a.
63.	<b>F04210_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GCC TAA TTT GTT TTC AGT T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_04210</i> в плазмиду pET-32a.
64.	<b>R04210_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAC TTC CAT TAG TAG CCA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_04210</i> в плазмиду pET-32a.
65.	<b>F05470_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAC TAA TAA AGC TGC A	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_05470</i> в плазмиду pET-32a.
66.	<b>R05470_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> AAT TTT TTA TCT TCA TAT T	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_05470</i> в плазмиду pET-32a.
67.	<b>F0454_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAC AAT CTC TTA TGG TGC TTT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_0454</i> в плазмиду pET-32a.
68.	<b>R0454_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAT TTT CAC CTC TAC GGC GT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_0454</i> в плазмиду pET-32a.
69.	<b>F0783_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GTT AAC AGA AGT CAT CTT TTC T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_0783</i> в плазмиду pET-32a.
70.	<b>R0783_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> AAG CAG CGC GCT TCC CT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина

			<i>Lhv_0783</i> в плазмиду pET-32a.
71.	<b>F0860_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TAT</u> GGC TTT TGA TAA ATT AGG TAG A	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_0860</i> в плазмиду pET-32a.
72.	<b>R0860_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAC TTA AAT TAT CTT TCT TAT CTA C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_0860</i> в плазмиду pET-32a.
73.	<b>F2095_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TAT</u> GAC TAT AGC TCA AAT TAT CAC G	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2095</i> в плазмиду pET-32a.
74.	<b>R2095_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ATT TAA CAA CAA CCT TTC CAT GA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2095</i> в плазмиду pET-32a.
75.	<b>F1977_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TAT</u> GAT TGA TTG GGT AAT GAT TGG	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>LBHH_1977</i> в плазмиду pET-32a.
76.	<b>R1977_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTC</u> ACT TAA AAA AGT TCA GAA ATC C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>LBHH_1977</i> в плазмиду pET-32a.
77.	<b>F0843_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAA AAA ATT GAG AAT AGC ATA C T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>LBHH_0843</i> в плазмиду pET-32a.
78.	<b>R0843_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> AAT ATA CTT TTT TAG CTA ACA AAA T	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>LBHH_0843</i> в плазмиду pET-32a.
79.	<b>F2403_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TTT</u> GCG GAA GAT TTT GAT TTT TAT C	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2403</i> в плазмиду pET-32a.
80.	<b>R2403_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CCT</u> ACT TGC TAT CCG AGT GAA AC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2403</i> в плазмиду pET-32a.
81.	<b>F06470_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GCA AGA TTA TAA ATT AGA	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_06470</i> в плазмиду pACYCDuet-1.
82.	<b>R06470_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TTT</u> AAA ATG CAT CAT TAA TT	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_06470</i> в плазмиду pACYCDuet-1.
83.	<b>F06465_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GGC AGA AGA TTG GAT T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>R0052_06465</i> в плазмиду pET-32a.
84.	<b>R06465_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ACT TTA ATA GCA ATA ATT C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>R0052_06465</i> в плазмиду pET-32a.
85.	<b>F10560_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAA AAA TAA AAA TGA ATT T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10560</i> в плазмиду pACYCDuet-1.

86.	<b>R10560_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ACT TGT CAT GCC TC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>R0052_10560</i> в плазмиду pACYCDuet-1.
87.	<b>F10565_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GAT TGA AGT AAC CGT TGA TT	Forward олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>R0052_10565</i> в плазмиду pET-32a.
88.	<b>R10565_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TTT</u> ATT TTT CAT CTT TTT TGC CTT C	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>R0052_10565</i> в плазмиду pET-32a.
89.	<b>F2403_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CTT</u> GCG GAA GAT TTT GAT TTT TAT C	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2403</i> в плазмиду pACYCDuet-1.
90.	<b>R2403_Hind</b>	TTT <u>TAA GCT TCT</u> ACT TGC TAT CCG AGT GAA AC	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена токсина <i>Lhv_2403</i> в плазмиду pACYCDuet-1.
91.	<b>F0815_EcoR</b>	TTT <u>TGA ATT CAT</u> GTC TAA AAA GTT AGA AAA T	Forward олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>Lhv_0815</i> в плазмиду pET-32a.
92.	<b>R0815_BamH</b>	TTT <u>TGG ATC CTT</u> ATT TTT CAT GCA ATG TA	Reverse олигонуклеотид для клонирования гена антитоксина <i>Lhv_0815</i> в плазмиду pET-32a.
<b>Для ТА систем в штаммах <i>L. casei</i></b>			
93.	<b>FC14520EcoR</b>	TTTT <u>GAATTC</u> ATGGCAGCCACAAAGAAAGAAAC	Forward олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы LCABL_14520-14530.
94.	<b>FC14530EcoR</b>	TTTT <u>GAATTC</u> ATGGACGAACATAAAGACGGCTG	Forward олигонуклеотид для клонирования гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.
95.	<b>RC14530Hind</b>	TTTT <u>AAGCTT</u> CTATTTACCCAAAAGGTTATGATGA	Reverse олигонуклеотид для определения НК последовательности ТА системы LCABL_14520-14530 и для клонирования гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.
96.	<b>F577-30EcoR</b>	TTTT <u>GAATTC</u> ATGAACGAACATAAAGACGGCTGT	Forward олигонуклеотид для клонирования у штамма 577 гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.
97.	<b>R577-30Hind</b>	TTTT <u>AAGCTT</u> CTATTTACCCAGAAGGTTATGATG	Reverse олигонуклеотид для клонирования у штамма 577 гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.
98.	<b>F23-20EcoR</b>	TTTT <u>GAATTC</u> ATGGCAGCCACAAAGAAGGAAAC	Forward олигонуклеотид для клонирования у штамма 23 гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.
99.	<b>R23-30Hind</b>	TTTT <u>AAGCTT</u> CTATTTAACCCAGAAGGTTATGATGA	Reverse олигонуклеотид для клонирования у штамма 23 гена токсина LCABL_14530 в плазмиду pET32a.

<b>Для определения отдельных видов лактобацилл</b>			
100.	<b>paraF</b>	GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC	Forward олигонуклеотид, специфичен к <i>recA</i> гену у <i>L.paraplantarum</i>
101.	<b>pentF</b>	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	Forward олигонуклеотид, специфичен к <i>recA</i> гену у <i>L.pentosus</i>
102.	<b>planF</b>	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA	Forward олигонуклеотид, специфичен к <i>recA</i> гену у <i>L.plantarum</i>
103.	<b>pREV</b>	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	Reverse олигонуклеотид, специфичен к <i>recA</i> гену у <i>L.plantarum</i> , <i>L.paraplantarum</i> , <i>L.pentosus</i>
104.	<b>EP-F</b>	TTG GCA GTT TTA GTA GCA GCT	Forward олигонуклеотид межгенного района, проксимального оперону F0F1 АТФ-синтазы у <i>L.helveticus</i>
105.	<b>EP-R</b>	GCA AGC CAA AGG CAG ATA AGA	Reverse олигонуклеотид межгенного района, проксимального оперону F0F1 АТФ-синтазы у <i>L.helveticus</i>
<b>Для скрининга гибридных плазмид</b>			
106.	<b>ACYCDuetUP1</b>	GGA TCT CGA CGC TCT CCC T	Forward олигонуклеотид для отбора клонов для плазмиды pACYCDuet-1.
107.	<b>DuetDOWN1</b>	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA	Reverse олигонуклеотид для отбора клонов для плазмиды pACYCDuet-1.
108.	<b>T7prom</b>	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	Forward олигонуклеотид для отбора клонов для плазмиды pET32a.
109.	<b>T7term</b>	CTA GTT ATT GCT CAG CGG	Reverse олигонуклеотид для отбора клонов для плазмиды pET32a.
<b>Для оценки экспрессии оперона YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> методом ПЦР в режиме реального времени.</b>			
110.	<b>LGG_01291_F</b>	AAG TCG ATG AAT GGC TTC CG	Forward олигонуклеотид на участок контрольного гена <i>ileS</i> .
111.	<b>LGG_01291_R</b>	GCG TTT AAC GCC TTG TTT GG	Reverse олигонуклеотид на участок контрольного гена <i>ileS</i> .
112.	<b>Lc705_02727_100 F</b>	CGA GTT GTT AAC GGA CTT CG	Forward олигонуклеотид на участок перекрытия генов антитоксина и токсина Lc705_02726 – Lc705_02727
113.	<b>Lc705_02727_100 R</b>	GTT TGA TTG TCC GCT TGT CG	Reverse олигонуклеотид на участок перекрытия генов антитоксина и токсина Lc705_02726 – Lc705_02727

Для поиска и изучения активности промоторов			
114.	yoeB_lr_IRD_3	CAAGCATCATCGGTCCAGGT	IRD800-меченный праймер для Primer extention
115.	yoeB_lr_PCR_F	CTCGGCTAGGCTTAATCCAGT	Forward олигонуклеотид для получения фрагмента в Primer extention
116.	yoeB_lr_PCR_R	TGTAGTCCGCCCAAGCATCA	Reverse олигонуклеотид для получения фрагмента в Primer extention
117.	SB2268	AGTGGTGAAATTGGTCTT	Forward олигонуклеотид на участок BOX+ YefM-YoeB
118.	SB2269	AGTGCACATCCTGATGCG	Reverse олигонуклеотид на участок BOX+ YefM-YoeB
119.	SB2271	GTAGAATTCACCTTGAAACCAACACCAG	Forward олигонуклеотид на участок BOX+ PAT
120.	SB2272	GTAGAATTCGCCGCGTCCCAATCGTTG	Forward олигонуклеотид на участок BOX
121.	SB2273	GTAGGATCCCGGCGGAAATCACTATAA	Reverse олигонуклеотид на участок промотора PAT
122.	SB2274	GTAGAATTCGAAAGGTAAGGTGCCGTT	Forward олигонуклеотид на участок промотора P1/2
123.	SB2275	GTAGGATCCGGTTTCTTCGATGGCGTC	Reverse олигонуклеотид на участок промотора P1/2
124.	SB2276	GTAGAATTCACAATGTGGTGGTTATGA	Forward олигонуклеотид на участок промотора P3/4
125.	SB2277	GTAGGATCCTCGGTCCAGGTTTAAATC	Reverse олигонуклеотид на участок промотора P3/4
126.	SB2278	GTAGAATTCTTGACGCATCAGGATGTG	Forward олигонуклеотид на участок промотора PsRNA
127.	F0F1prF	TTT TGA ATT CCA TGT GGC CGT ACA CAT GC	Forward олигонуклеотид на участок промотора оперона F0F1 в качестве положительного контроля
128.	F0F1prR2	TTT TGG ATC CCTTAC TGA AGC GGC GTC ATA	Reverse олигонуклеотид на участок промотора оперона F0F1 в качестве положительного контроля

## 2.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле и выделение ДНК из геля

Гель-электрофорез ДНК проводили в горизонтальном 1% – 1,5% агарозном геле (в зависимости от длины амплифицированного ПЦР фрагмента) в трис-боратном буфере (состав 10xТБЕ: 0,89М основной трис, 0,89М борная кислота, 20mM ЭДТА, рН 8.0, вода), содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия при напряженности электрического поля 5В/см. Для определения размеров фрагментов ДНК в качестве стандартов использовали ДНК-маркеры фирмы Thermo Scientific, США. Выделение фрагментов ДНК из геля проводилось набором Thermo Fisher Scientific K0691.

## 2.5 Секвенирование ДНК

Секвенирование фрагментов ДНК по методу Сенгера проводили в Научно-исследовательском институте физико-химической медицины ФМБА России (Москва) с помощью набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

## 2.6 Биоинформатический анализ

### 2.6.1 Поиск известных ТА систем в секвенированных геномах лактобацилл

Для поиска использовались нуклеотидные и аминокислотные последовательности генов и белков RelBE систем различных бактерий. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Идентичность последовательностей устанавливали на основе статистической значимости совпадений последовательностей. Дополнительный анализ последовательностей проводили с помощью их выравнивания с использованием программы Clustal X (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

### 2.6.2 Создание базы данных ТА систем RelBE типа у лактобацилл

Для расширенной аннотации генов токсинов и антитоксинов использовались штаммы *Lactobacillus*, имеющих полногеномный сиквенс и были выполнены следующие шаги:

поиск гомологов генов в секвенированных геномах *Lactobacillus* → предсказание открытых рамок чтения → проверка белков соответствующих аннотированных генов с помощью InterPro [Jones P. et al., 2014] [<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>]

Гомологичные последовательности были идентифицированы с помощью tBlastX aligner с пороговым значением e-value  $\leq 10^{-20}$ . Рамки считывания генов были предсказаны при помощи алгоритма GeneMarkS [Besemer J. et al., 2001] [<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>]. В том случае,

если гомологичные последовательности и ген, предсказанный GeneMakrS, перекрывались более чем на 80%, то данный ген рассматривали как возможного кандидата. Белки, соответствующие проаннотированным генам, были проверены при помощи алгоритма InterPro и были сгруппированы по сходству последовательностей (гены, принадлежащие одной группе, схожи более чем на 80%). Использовались следующие обозначения для генов:

[имя группы]\_[номер группы]\_[номер подгруппы].

Например: *L.rhamnosus\_Lc\_705\_RelE\_2\_1*; *L.rhamnosus\_GG\_RelE\_2\_2*.

Данная запись обозначает, что ген относится к группе RelE\_2 к подгруппе 1 или 2. Подгруппы между собой отличаются отдельными нуклеотидными заменами и сходны более чем на 98%.

### 2.6.3 Определение филогенетического родства и построение деревьев

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводилось с помощью программы MUSCLE [Edgar R.C. et al., 2004], входящей в пакет программ MEGA 5.2 [Tamura K. et al., 2011]. Филогенетическое дерево на основе выровненных последовательностей строили с помощью программы MEGA 5.2 методом «ближайших соседей» (Neighbor-joining, NJ). Для оценки достоверности применяли бутстреп-тест (1000 реплик). Для укоренения дерева использовали нуклеотидную последовательность гена *B. subtilis*.

### 2.6.4 Поиск новых ТА систем

Для поиска новых ТА систем в штаммах *L.helveticus* нами был написан скрипт по следующим параметрам: гены токсина и антитоксина расположены либо на близком расстоянии друг от друга (до 70 пн), либо перекрываются (на 30 пн); ген антитоксина предшествует гену токсина и его длина, обычно, меньше [Sevin E.W. et al., 2007], оперон имеет величину примерно 800 пн. После применения данного скрипта к анотированным геномам *L.helveticus* (H10, R0052, DCP5471) анализировались полученные данные и были удалены гены-кандидаты с уже известной функцией.

## 2.7 Клонирование генов ТА систем в экспрессионные векторы

### Рестрикция

Использовали эндонуклеазы рестрикции для быстрого гидролиза Fast Digest (Thermo Fisher Scientific). Рестрицирующие эндонуклеазы добавляли из расчета 10 ед фермента на 1 мкг ДНК. Рестрикцию проводили в течение 30 минут при температуре 37°C, после чего проводили электрофорез в агарозном геле.

### Лигирование



Лигирование вектора и клонируемого фрагмента ДНК проводили, используя фермент Т4 ДНК-лигазу (Thermo Fisher Scientific). Соотношение вектора и клонируемого фрагмента в реакционной смеси составляло 1:2 по количеству молекул. Реакционная смесь для лигирования имела следующий состав: плазмидный вектор (0,2-0,4 мкг), фрагмент (0,4-0,8 мкг), лигазный буфер (1/10 объема), Т4 ДНК лигаза (30 ед). Реакцию проводили при температуре 21°C в течение 40 минут.

#### **Получение компетентных клеток *E.coli* для кальциевой трансформации**

10 мл среды LB засеивали штаммом *E.coli* и инкубировали в термостатированном шейкере в течение 18 часов при 37°C при 250 об/мин. 200 мкл ночной культуры засеивали в 10 мл среды LB и инкубировали в тех же условиях до достижения оптической плотности  $OD_{600}=0,6-0,8$ . Клетки собирали центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 15 мин при +4°C. Осадок ресуспендировали в 5 мл холодного свежеприготовленного 0,1М раствора  $CaCl_2$  и инкубировали в ледяной бане в течение 40 мин. Затем клетки осаждали центрифугированием при +4°C в течение 15 мин при 4 000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 1 мл 0,1М раствора  $CaCl_2$  и инкубировали в ледяной бане в течение 1 часа. Аликвоты полученных клеток по 200 мкл использовали сразу или хранили при -80°C с добавлением 20-50% глицерина (в течении 1-2 месяцев) [Sambrook J. et al., 1989].

#### **Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК или лигазной смесью**

К компетентным клеткам свежим или размороженным в ледяной бане добавляли лигазную смесь или плазмидную ДНК в концентрации 0,2 – 0,3 мкг и инкубировали во льду в течение 40 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 2 - 3 мин. Далее снова охлаждали в ледяной бане в течение 5 мин, затем к клеточной суспензии добавляли по 1 мл среды LB. Клетки инкубировали в течение 40-60 мин в термостате при 37°C (1-2 генерации). Затем суспензию высевали на чашки с твердой средой, содержащей нужные антибиотики.

#### **Трансформация клеток *B.subtilis***

Бактериальная культура выращивается ночь в полноценной питательной среде LB на качалке при температуре 32-37°C. Утром культура разводится в 20 раз теплой средой Спицайзена I и выращивается 4,5 час с аэрацией при 37°C, до начала log-фазы роста. Культура разводится теплой средой Спицайзена II в 10 раз. При трансформации плазмидной ДНК ко II среде добавляли  $CaCl_2$  до 0,5mM и  $MgCl_2$  до 2,5mM (по 5 мкл на 1 мл из растворов 0,1М и 0,5М). Во II среде культура растет 1,5 час. 0,5мл компетентной культуры смешивается с ДНК и инкубируется со слабым качанием 60 минут. После высева на селективную среду с антибиотиком трансформанты растут 1-2 суток.

#### **Анализ рЕТ- и рАС-рекомбинантов методом ПЦР-скрининга колоний**

Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием стандартных праймеров T7prom и T7term (для гибридных плазмид на основе pET32a) и pACYCDuet\_Up1 и pDuet\_Down1 (для гибридных плазмид на основе pACYCDuet-1). Колонии после трансформации скалывали и ресуспендировали в 10 мкл стерильной воды. 3 мкл суспензии клеток использовали для реакции ПЦР. Результаты амплификации учитывали путем анализа исследуемых образцов с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и проводили секвенирование НП для доказательства наличия вставки и идентичности полученной НП искомой.

## 2.8 Определение активности ТА систем в клетках *E.coli*.

Активность белков токсинов в клетках *E.coli* BL21 (DE3) определяли по характеру роста культур на твердой и в жидкой средах в присутствии индуктора IPTG (0,5 mM) и без него. В первом случае ночные культуры клеток *E.coli*, содержащие гибридные плазмиды с клонированными генами токсинов, разводили в 100 раз, выращивали до  $OD_{600}=0,2$ , и высевали или раскапывали в разведениях на чашки LB-агара; рост культур фиксировали через 18 часов при 37°C. Для определения активности клонированных токсинов по характеру роста штаммов *E.coli* в жидкой среде дневные культуры, выращенные до  $OD_{600}=0,2$ , были разделены на две части. Одна часть продолжала расти при тех же условиях, а ко второй части добавляли IPTG. За ростом культур следили, измеряя  $OD_{600}$  на спектрофотометре PD-303 (APEL, Japan). Для определения активности антитоксинов совмещали в клетках *E.coli* BL21 (DE3) ген токсина, клонированный на плазмиде pACYCDuet-1, и соответствующий ему ген антитоксина, клонированный на плазмиде pET32a, далее определяли характер роста штамма в присутствии IPTG и без него.

## 2.9 Выделение РНК

РНК получали из стационарных культур (18 часов) и культур логарифмической стадии роста (8 часов). Использовали набор RNeasy Mini Kit («Qiagen»). 7 мл культуры откручивали в течение 10 мин при 7000 об/мин, удаляли супернатант, осадок промывали TE буфером (10мM TrisHCl, 1мM EDTA, pH 8.0) и ресуспендировали в 500 мкл буфера. Суспензию переносили в 2-мл центрифужную пробирку и вносили 100 мкл лизоцима (90 мг/мл) и инкубировали 60 минут при 37°C. После инкубации переносили все содержимое в лизисные пробирки на 2 мл (innuSPEED Lysis Tube B) и гомогенизировали суспензию 3 раза по 20сек на приборе SpeedMill Plus (Analytik Jena AG-Bio), затем охлаждали пробирки на льду. Осаждали 3 мин на холоде при 5000 об/мин и переносили 300 мкл в новую пробирку для выделения РНК набором RNeasy Mini Kit («Qiagen») в соответствии с протоколом. Концентрацию и качество РНК и ДНК определяли на биоанализаторе Bioanalyzer 2100 («Agilent»).

## 2.10 Обратная транскрипция

Для получения кДНК по матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции. Суммарную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific, США) в соответствующем буфере 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 25 мМ ЭДТА (Thermo Scientific, США) и инкубировали 10 мин. при 65°C. Добавляли 100 нг случайных гексануклеотидных праймеров, смесь прогревали до 70°C в течение 5 мин. и помещали на лед на 2 мин. Затем в реакцию добавляли 1 мМ смеси нуклеотидов; 5-кратный реакционный буфер, содержащий 250 мМ Tris-HCl (pH 8.3, 25°C), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мМ DTT (Thermo Scientific, США); 200 единиц обратной транскриптазы M-MuLV (Thermo Scientific, США). Реакцию проводили в объеме 20 мкл при следующем температурном режиме: 25°C - 10 мин., 42°C - 60 мин., 50°C - 10 мин., 70°C - 10 мин. Препараты кДНК хранили при температуре -80°C.

## 2.11 Количественная ПЦР в режиме реального времени

Для оценки уровня мРНК генов использовали праймеры представленные в таблице 7. Для проведения ПЦР-РВ использовали ПЦР-смесь 2FRT, содержащую ионы Mg<sup>2+</sup> (Amplisens, Москва); термостабильную ДНК-полимеразу TaqF (Amplisens, Москва); 25-кратную смесь нуклеотидов (Thermo Scientific, США); 20-кратный интеркалирующий краситель EVA Green (Biotium, США); референсный краситель ROX (Синтол, Россия); синтезированные праймеры для целевых и контрольных генов (Синтол, Россия) (таблица 7). Приготовленные реакционные смеси по 8 мкл вносили в 96-луночный планшет, после чего добавляли в каждую лунку по 2 мкл (~10 нг) матрицы (кДНК) и плотно закрывали планшет пленкой. Каждая проба имела три повторности. ПЦР-РВ проводили на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, США) с использованием программного обеспечения RQ (Relative Quantitation software, Life Technologies, США). Использовали следующий температурный режим: предварительная денатурация и активация фермента при 95°C в течение 15 мин. (по протоколу для TaqF ДНК-полимеразы); 50 циклов: денатурация - 15 сек. при 95°C, отжиг праймеров и зонда, элонгация - 1 мин. при 60°C.

Полученные данные анализировали с использованием контрольных генов и относительного количественного или  $\Delta\Delta C_t$ -метода. Относительный уровень мРНК ( $R$ ) рассчитывался по формуле:

$$R = \frac{(2^{\log_2(1+E_{\text{цель}}) \times C_t^{\text{цель}} - \log_2(1+E_{\text{контроль}}) \times C_t^{\text{контроль}}})_{\text{контрольный образец}}}{(2^{\log_2(1+E_{\text{цель}}) \times C_t^{\text{цель}} - \log_2(1+E_{\text{контроль}}) \times C_t^{\text{контроль}}})_{\text{опытный образец}}}$$

где  $E$  – эффективность реакции (доля амплифицированных фрагментов),  $C_t$  – пороговый цикл (усредненный по 3-м повторностям), контроль – контрольный ген, цель – целевой ген.

Эффективности всех реакций были более 90% ( $E > 0.9$ ). Все вычисления выполнены с использованием разработанного приложения АТГ (Анализ Транскрипции Генов, Свидетельство №2008612585, 2008, Роспатент, РФ) совместимого с программным обеспечением амплификаторов Applied Biosystems серий 7000/7500 [Krasnov G.S., et al. 2011; Senchenko V.N., et al., 2011]. Программа разработана для оценки относительного уровня мРНК в парных образцах с использованием нескольких контрольных генов, позволяет определять эффективность ПЦР тремя различными методами, оценивать вариабельность контрольных генов и «условных норм». С учетом вариабельности контрольных генов значимыми считали изменения экспрессии в 2.0 и более раз.

## 2.12 Удлинение праймера (Primer extention)

Primer extention анализ с IRD800-меченный праймером *yoeB\_lr\_IRD\_3* выполняли следующим образом: 5 мкг РНК растворяли в 13 мкл DEPC-Н<sub>2</sub>O, добавив 1 мкл dNTPs (10мМ), 2 пмоль IRD800-меченного праймера, смесь денатурировали при 65°C в течение 5 мин. Далее на льду добавив 4 мкл 5x first-strand буфера, 1 мкл 0,1М ДТТ, 1 мкл RiboLock™ ингибитора РНКазы (40 ед/мкл) и 1 мкл SuperScript™III (200 ед/мкл). Смесь инкубировали при 55°C в течение 60 мин с последующей инактивацией при 70°C в течение 10 мин. Затем, проводили гидролиз РНК 10 мкл 1М NaOH при 70 °C в течение 10 мин и нейтрализовали с 25 мкл 1М HEPES (рН 7,0). Референсный ПЦР-фрагмент, полученный с праймерами *yoeB\_lr\_PCR F* и *yoeB\_lr\_PCR R*, был секвенирован по Сенгеру с помощью праймера *yoeB\_lr\_IRD\_3*.

## 2.13 Определение точки начала транскрипции при помощи специфической амплификации концевых фрагментов кДНК (RLM-RACE)

Работу проводили по протоколу набора FirstChoice<sup>R</sup> RLM-RACE (Life Technologies). Тотальная РНК из штамма *L.rhamnosus* 24 дст была обработана щелочной фосфатазой из кишечника теленка, чтобы удалить свободный 5' фосфат с деградированной мРНК, рРНК, тРНК и возможной примесной ДНК (5'трифосфаты остались интактными). Далее РНК обрабатывалась щелочной фосфатазой из растений табака для удаления пирофосфатов с интактной мРНК с образованием ортофосфатных остатков. После этой обработки РНК лигировали с 5'RACE адаптером и проводили обратную транскрипцию, используя специфический праймер для гена *yoeB\_lr\_IRD\_down*. Полученную кДНК амплифицировали с 5'RACE внешним праймером и праймером, специфическим для гена *yoeB\_lr\_IRD\_up*. После очистки полученный ПЦР-фрагмент лигировали в векторе pCRII-ТОРО. После трансформации *E. coli* DH5α плазмиды из отобранных трансформантов были секвенированы с использованием праймера T7.

## 2.14 Создание lacZ-транскрипционных конструкций (fusions) и определение функционирования промоторов по активности $\beta$ -галактозидазы в клетках *B.subtilis*

Для измерения активности промоторов использовалась плазмида pMG16 и штамм *B.subtilis* DB104. Предполагаемые промоторные области синтезировали в реакции ПЦР на матрице хромосомной ДНК штамма *L.rhamnosus* 24дст, с праймерами, представленными в таблице 6. Предполагаемые промоторные районы сначала клонировали на плазмиде pET32a и в клетках *E.coli* TG1, далее переклонировали в плазмиду pMG16 и штамм *E.coli* TG1. Трансформанты отбирали по маркеру устойчивости к спектиномицину. Идентичность нуклеотидной последовательности клонируемых участков определяли секвенированием фрагментов гибридных плазмид. Далее плазмиды с нужной вставкой переносили с помощью генетической трансформации в клетки *B.subtilis* DB104, предварительно обработав клоны рестриктазой ScaI для линейаризации плазмид. Гибридные плазмиды не могли реплицироваться в клетках *B.subtilis*, но могли встраивать клонируемый фрагмент с маркером Sp<sup>R</sup> в ген  $\alpha$ -амилазы, делая ген неактивным. Выросшие клоны пересеивали на чашки с крахмалом и спектиномицином и инкубировали ночь. Затем добавляли в чашки раствор йода и отбирали Amy-Sp<sup>R</sup> клоны для измерения  $\beta$ -галактозидазной активности. Полученные клетки *B.subtilis* DB104 инкубировали 18 ч, измеряли OD<sub>600</sub>, разводили культуру до OD = 0,1 и инкубировали 2, 4 и 6 часов. После каждой инкубации измеряли оптическую плотность и пересчитывали необходимое для стандартного опыта количество культуры по формуле:

$$X(\text{мл}) = 625 \text{ мл/OD}$$

Для измерения  $\beta$ -галактозидазной активности предполагаемых промоторов к каждой отобранной пробе добавляли 240 мкл Z-буфера (состав г/л: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – 25,32; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 6,24; KCl – 0,75; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,75),  $\beta$ -меткаптоэтанолом, и 5 мкл (60 мг/мл) лизоцима. Инкубировали 10 мин при 37<sup>0</sup>С, затем центрифугировали 2 минуты. Отбирали 200 мкл супернатанта и переносили в пробирку, содержащую 600 мкл Z-буфера и 4 мг/мл ОНФГ (орто-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозидом). Инкубировали при 28<sup>0</sup>С от 1 мин до 45 мин, в зависимости от того, как будет меняться окраска. Останавливали реакцию 0,5М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Затем определяли OD<sub>420</sub> и OD<sub>550</sub>. Активность  $\beta$ -галактозидазы рассчитывали по формуле Миллера [Миллер Дж., 1976]:  $((\text{OD}_{420} - 1,75 \text{ OD}_{550}) / (\text{T}_{\text{мин}} * \text{V}_{\text{мл}} * \text{OD}_{600})) * 1000$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Видовая идентификация штаммов лактобацилл из лабораторной коллекции

Первым этапом работы было формирование и характеристика коллекции штаммов лактобацилл в соответствии с существующей системой классификации бактерий рода *Lactobacillus* [Pot V. et al., 2014]. Базой для классификации служила база данных по гену 16S РНК (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Коллекция создавалась из:

- штаммов, выделенных из организма людей – жителей центральной области России – в Тверской Государственной Медицинской Академии (кафедра микробиологии и иммунологии). Штаммы выделялись из слюны, фекалий, содержимого влагалища;
- штаммов, полученных из ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, ВНИИ Молочной промышленности, ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Эти штаммы имеют промышленное значение и используются в производстве молочнокислых продуктов и БАДов.

Всего в коллекции насчитывалось 62 различных штамма лактобацилл. Все штаммы были идентифицированы при их выделении до рода и вида на основании морфологических и биохимических свойств. В настоящей работе, совместно с Д.Х. Кясовой, была проведена окончательная идентификация штаммов молекулярно-генетическими методами по нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомальной РНК. Часть нуклеотидных последовательностей была депонирована в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Результаты идентификации лактобацилл представлены в таблице 8, нуклеотидные последовательности гена 16S РНК представлены в Приложении А. Точная видовая характеристика штаммов была особенно важна в данной работе, потому что изученные ТА системы в подавляющем большинстве являются видоспецифичными.

Таблица 8. Видовая идентификация штаммов лактобацилл на основе гена 16S рРНК.

№ п/п	Вид лактобацилл	Штамм	Ближайший гомолог по данным BLASTN			Ближайший гомолог другого вида по данным BLASTN		
			Вид, штамм	Идентификатор в GenBank	% идентичных нуклеотидов	Вид, штамм	Идентификатор в GenBank	% идентичных нуклеотидов
1.	<i>L. plantarum</i>	CS 396	<i>L. plantarum</i> JCM 1149 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_115605 NR_025447	853/856=99% 663/674=98%	<i>L. fabifermentans</i> DSM 21115	NR_113339	657/674=97%
2.	<i>L. plantarum</i>	8-PA-3	<i>L. plantarum</i> JCM 1149 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_115605 NR_025447	752/754=99% 748/754=99%	<i>L. fabifermentans</i> DSM 21115	NR_113339	742/754=98%
3.	<i>L. plantarum</i>	90-TC-4	<i>L. plantarum</i> JCM 1149 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_115605 NR_025447	667/674=99% 663/674=98%	<i>L. fabifermentans</i> DSM 21115	NR_113339	657/674=97%
4.	<i>L. plantarum</i>	гКНМ 101	<i>L. plantarum</i> JCM 1149 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_115605 NR_025447	804/826=97% 800/826=97%	<i>L. fabifermentans</i> DSM 21115	NR_113339	794/826=96%
5.	<i>L. plantarum</i>	K9L	<i>L. plantarum</i> ST-III <i>L. pentosus</i> 124-2	NC_014554 NR_029133	780/780=100% 780/780=100%	<i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_025447	777/780=99%
6.	<i>L. plantarum</i>	46к	<i>L. plantarum</i> WCFS1	NC_004567	780/780=100%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	731/789=93%
7.	<i>L. plantarum</i>	36ст	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	780/780=100%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	732/789=93%
8.	<i>L. plantarum</i>	10бзв	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	779/780=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	733/789=93%
9.	<i>L. plantarum</i>	29ст	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	649/650=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	605/659=92%
10.	<i>L. plantarum</i>	90ст	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	800/800=100%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	750/809=93%
11.	<i>L. plantarum</i>	191г	<i>L. plantarum</i> WCFS1	NR_075041	649/654=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_014554	751/809=93%
12.	<i>L. plantarum</i>	29ск	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	1440/1441=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	1354/1448=94%
13.	<i>L. plantarum</i>	32ск	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	1435/1436=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	1339/1420= 94%
14.	<i>L. plantarum</i>	46ск	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	1448/1448=100%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	1371/1460= 94%
15.	<i>L. plantarum</i>	75ск	<i>L. plantarum</i> WCFS1 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	NR_075041 NR_025447	1467/1471=99% 1464/1471=99%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NR_075024	1376/1467=94%
16.	<i>L. plantarum</i>	90ск	<i>L. plantarum</i> WCFS1	NR_075041	1450/1450=100%	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NR_075024	1372/1462= 94%

17.	<i>L. rhamnosus</i>	421-2	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	802/804=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	787/806=98%
18.	<i>L. rhamnosus</i>	7дст	<i>L. rhamnosus</i> GG	NC_013198	780/780=100%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	762/780 =98%
19.	<i>L. rhamnosus</i>	24дст	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	599/599=100%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	584/600=97%
20.	<i>L. rhamnosus</i>	К32	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	780/780=100%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	764/781=98%
21.	<i>L. rhamnosus</i>	38к	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	780/780=100%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	764/781=98%
22.	<i>L. rhamnosus</i>	50зв	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	734/735=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	717/735=98%
23.	<i>L. rhamnosus</i>	72зв	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	779/780=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	762/780=98%
24.	<i>L. rhamnosus</i>	40ст	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	749/750=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	733/750=98%
25.	<i>L. rhamnosus</i>	80ст	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	600/600=100%	<i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_113337.1	575/587=98%
26.	<i>L. rhamnosus</i>	22гн	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	562/564=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	546/564=97%
27.	<i>L. rhamnosus</i>	2гн	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	741/741=100%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	725/742=98%
28.	<i>L. rhamnosus</i>	51 гн	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	673/673=100%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	657/674=97%
29.	<i>L. rhamnosus</i>	45д	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	731/732=99%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	715/733=98%
30.	<i>L. rhamnosus</i>	50ст	<i>L. rhamnosus</i> GG	NR_102778.1	630/632=99%	<i>L. casei</i> NBRC 15883	NR_113333	613/633=97%
31.	<i>L. rhamnosus</i>	26ск	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	1439/1442=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	1422/1442=99%
32.	<i>L. rhamnosus</i>	61ск	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	1413/1416=99%	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	1396/1416=99%
33.	<i>L. fermentum</i>	гКНМ 526	<i>L. fermentum</i> CIP 102980	NR_104927	834/838=99%	<i>L. ingluviei</i> KR3	NR_028810	790/841=94%
34.	<i>L. fermentum</i>	2пр	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	779/780=99%	<i>L. reuteri</i> JCM 1112	NC_010609	718/786=91%



35.	<i>L. fermentum</i>	113В	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	780/780=100%	<i>L. reuteri</i> DSM 20016	NC_009513	718/785=92%
36.	<i>L. fermentum</i>	11ДСТ	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	780/780=100%	<i>L. reuteri</i> JCM 1112	NC_010609	719/786=92%
37.	<i>L. fermentum</i>	291Г	<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	NZ_GG6699 09	800/800=100%	<i>L. reuteri</i> DSM 20016	NC_009513	739/805=92%
38.	<i>L. fermentum</i>	57СК	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	1279/1280= 99%	<i>L. reuteri</i> SD2112	NC_015697	1218/1286= 95%
39.	<i>L. fermentum</i>	59СК	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	1463/1467=99%	<i>L. reuteri</i> MM2-3	NZ_GG70471 1.1	1383/1474=94%
40.	<i>L. fermentum</i>	60СК	<i>L. fermentum</i> IFO 3956	NC_010610	1460/1460=100 %	<i>L. reuteri</i> MM2-3	NZ_GG69376 4	1375/1462=94%
41.	<i>L. fermentum</i>	102СК	<i>L. fermentum</i> CECT 5716	NC_017465	1452/1454= 99%	<i>L. reuteri</i> MM2-3	NZ_GG69376 4	1367/1456=94%
42.	<i>L. fermentum</i>	103СК	<i>L. fermentum</i> CECT 5716	NC_017465	1434/1436= 99%	<i>L. reuteri</i> MM2-3	NZ_GG69376 4	1358/1442=94%
43.	<b><i>L. casei/</i></b> <b><i>paracasei</i></b>	гKHM 23	<i>L. casei</i> ATCC 334 <i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_075032 NR_113337	566/568=99% 565/568=99%	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	550/568=97%
44.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	гKHM 577	<i>L. casei</i> ATCC 334 <i>L. paracasei</i> R094	NR_075032 NR_025880	795/800=99% 795/800=99%	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	778/800=97%
45.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	K <sub>3</sub> III <sub>24</sub>	<i>L. casei</i> ATCC 334 <i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_075032 NR_113337	499/500=99% 498/500=99%	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	485/488=99%
46.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	20011	<i>L. casei</i> ATCC 393 <i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_041893 NR_113337	1427/1431=99% 1414/1430=99%	<i>L. rhamnosus</i> NBRC 3425	NR_113332	1411/1431=99%
47.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	17К	<i>L. casei</i> Zhang <i>L. paracasei</i> R094	NC_014334 NR_025880	780/780=100%	<i>L. rhamnosus</i> Lc 705	NC_013199	765/782=98%
48.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	42СТ	<i>L. casei</i> ATCC 334 <i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_075032 NR_113337	587/591=99% 586/591=99%	<i>L. rhamnosus</i> GG	NR_102778	570/591=96%
49.	<i>L. casei/</i> <i>paracasei</i>	48СТ	<i>L. casei</i> ATCC 334 <i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_075032 NR_113337	606/606=100% 605/606=99%	<i>L. rhamnosus</i> GG	NR_102778	588/606=97%
50.	<i>L. casei/</i>	51СТ	<i>L. casei</i> ATCC 334	NR_075032	564/570=99%	<i>L. rhamnosus</i> GG	NR_102778	547/570=96%

	<i>paracasei</i>		<i>L. paracasei</i> NBRC 15889	NR_113337	563/570=99%			
51.	<b><i>L. helveticus</i></b>	Er 315/ 402	<i>L. helveticus</i> NBRC 15019	NR_113719	450/450=100%	<i>L. acidophilus</i> NCFM	NR_075045	443/450=98%
52.	<i>L. helveticus</i>	100 aIII	<i>L. helveticus</i> NBRC 15019	NR_113719	509/509=100%	<i>L. acidophilus</i> NCFM	NR_075045	506/509=99%
53.	<i>L. helveticus</i>	NK-1	<i>L. helveticus</i> DPC 4571	NR_075047	748/750=99%	<i>L. acidophilus</i> NCFM	NR_075045	739/750=99%
54.	<i>L. helveticus</i>	NNIE	<i>L. helveticus</i> NBRC 15019	NR_113719	404/405=99%	<i>L. acidophilus</i> NCFM	NR_075045	401/405=99%
55.	<b><i>L. brevis</i></b>	15f	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497	499/500=99%	<i>L. plantarum</i> ST-III	NC_014554	460/509=90%
56.	<i>L. brevis</i>	47CT	<i>L. brevis</i> ATCC 376	NC_008497	500/500=100%	<i>L. spicheri</i> LTH 5753	NR_025579	528/554=95%
57.	<i>L. brevis</i>	52CT	<i>L. brevis</i> ATCC 376	NC_008497	599/600=99%	<i>L. spicheri</i> LTH 5753	NR_025579	578/603= 96%
58.	<b><i>L. salivarius</i></b>	44CT	<i>L. salivarius</i> UCC118	NC_007929	737/738(99%)	<i>L. ruminis</i> ATCC 25644	NZ_GL8331 09	754/806=94%
59.	<i>L. salivarius</i>	64CK	<i>L. salivarius</i> UCC118	NC_007929	1449/1454=99%	<i>L. animalis</i> KCTC 3501	NZ_GL5731 55.1	1380/1469=94%
60.	<i>L. salivarius</i>	78CK	<i>L. salivarius</i> UCC118	NC_007929	1453/1457=99%	<i>L. animalis</i> KCTC 3501	NZ_GL5731 55.1	1385/1472=94%
61.	<b><i>L. mucosa</i></b>	46CT	<i>L. mucosae</i> str. CCUG 43179	NR_024994	590/590=100%	<i>L. gastricus</i> Kx156A7	NR_029084	560/597=94%
62.	<b><i>L. johnsonii/gasseri</i></b>	K21	<i>L. johnsonii</i> FI9785 <i>L. gasseri</i> JV-V03	NC_013504 NZ_GL3795	900/900=100% 895/900 =99%	<i>L. iners</i> DSM 13335	NR_036982	856/903=95%

С помощью определения нуклеотидной последовательности гена 16S РНК однозначно удалось идентифицировать родовую принадлежность всех штаммов, а также видовую принадлежность штаммов видов *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. salivarius* и *L. mucosa*. Штаммы групп *L. helveticus* – *L. acidophilus*; *L. plantarum* – *L. paraplantarum* – *L. pentosus*; *L. casei* – *L. paracasei*, *L. johnsonii* – *L. gasseri* не могли быть однозначно разделены данным методом: нуклеотидные последовательности исследуемого фрагмента 16S РНК имели у данных групп штаммов 99-100% идентичности.

Для разделения штаммов внутри группы *L. helveticus* – *L. acidophilus* мы использовали метод, разработанный в лаборатории и запатентованный [Международная заявка на патент №2012103277] – определение нуклеотидной последовательности межгенного района, предшествующего оперону F0F1 АТФ-синтазы [Полуэктова Е.У. и др., 2013]. Нуклеотидные последовательности данного района для штаммов NK-1, NNIE, 100 аш, Er315/402 представлены в приложении Б, сравнение последовательностей межгенного района между штаммами 100аш, Er315/402, NK1, NNIE и штаммами лактобацилл из GenBank представлен в таблице 9. На основании полученных данных все 4 штамма были отнесены к виду *L. helveticus*.

**Таблица 9.** Процент идентичности НП межгенного района, проксимального оперону F0F1 АТФ-синтазы, между штаммами 100аш, Er315/402, NK1, NNIE и штаммами лактобацилл из GenBank.

	<b>Вид <i>L. helveticus</i></b>	<b>Вид <i>L. acidophilus</i></b>
<b>Штаммы</b>	DCP 4571, H10, MTCC 5463, DSM 20075	NCFM, DSM 20079, CFH, DSM 9126, CIRM-BIA 445, CIP 76.13, ATCC 4356, DSM 20242, CIRM-BIA 442, La-14, ATCC 4796, 30SC
<b>Процент идентичности</b>	100-99%	≤ 87%

Для разделения штаммов группы *L. plantarum* – *L. paraplantarum* – *L. pentosus* мы использовали ПЦР с праймерами, специфичными к *recA* гену [Torriani S. et al., 2001]. Каждый из трех близких видов дает ПЦР-продукт только со своим специфическим F-праймером (при общем R праймере). По этому тесту все проверенные штаммы коллекции принадлежат к виду *L. plantarum*.

В двух случаях – для близкородственных штаммов групп *L. casei* – *L. paracasei* и *L. johnsonii* – *L. gasseri* точная видовая принадлежность штаммов не была определена.

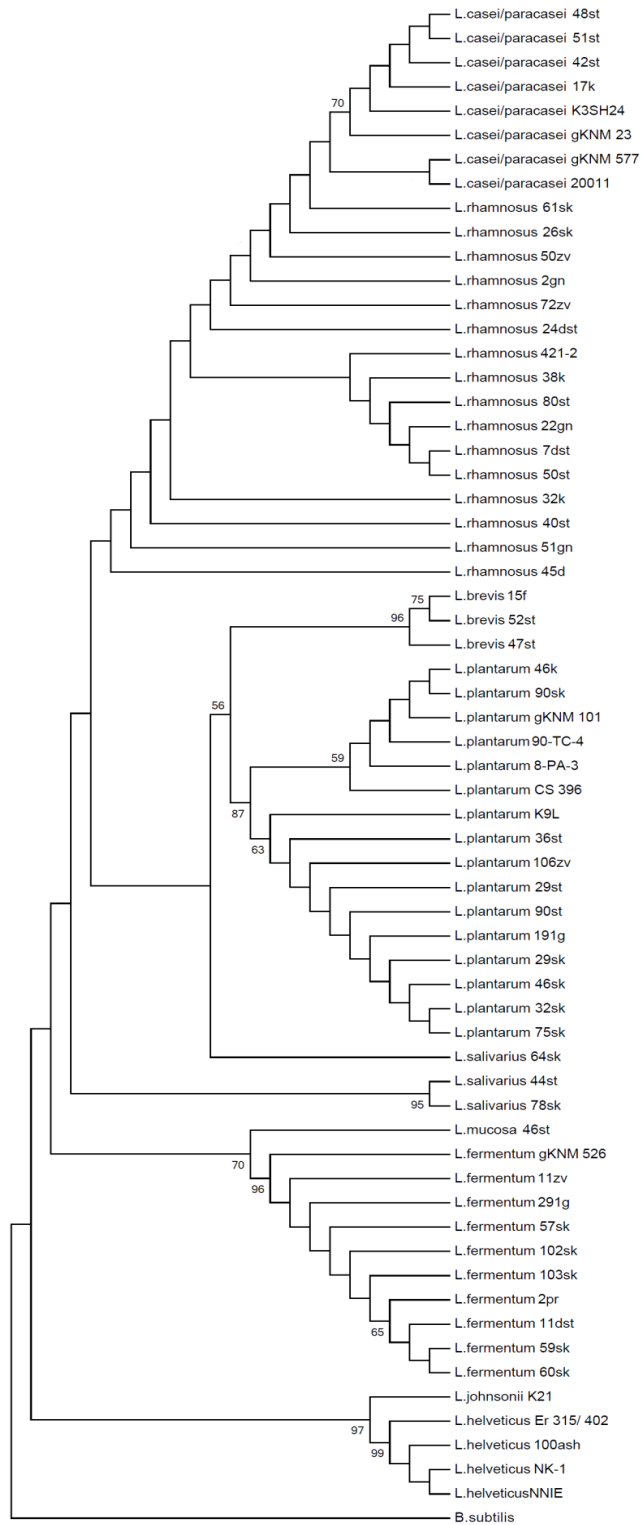
Определенная нами видовая принадлежность штаммов не всегда соответствовала установленной ранее. Это было особенно важно для производственных штаммов (таблица 10).

**Таблица 10.** Производственные штаммы лактобацилл, для которых была изменена видовая принадлежность.

№ п/п	Штамм	Родовая и видовая принадлежность (по паспортным данным)	Родовая и видовая принадлежность (по данным молекулярно-генетическому анализу)
1.	90-ТС-4	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>
2.	гКНМ 101	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>
3.	Er315/402	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
4.	100 аш	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
5.	НК-1	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
6.	NNIE	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. helveticus</i>
7.	гКНМ 23 л1	<i>L. brevis</i>	<i>L. casei/paracasei</i>
8.	гКНМ 577	<i>L. casei</i>	<i>L. casei/paracasei</i>
9.	К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
10.	421-2	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
11.	гКНМ 526	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>

В коллекции культур лактобацилл, выделенных из микробиоты здоровых людей центрального региона России, было идентифицировано 9 видов лактобацилл: *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. casei/paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. mucosa*, *L. johnsonii/gasseri*. Для установления родственных взаимоотношений между разными видами рода *Lactobacillus* было построено филогенетическое дерево исследованных штаммов лактобацилл по нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рибосомальной РНК, которое представлено на рисунке 8.

При филогенетическом анализе получили дерево с ветвями, делящимися на 6 кластеров, которые соответствуют 9-ти видам бактерий. Анализ кластеров показал, что в эволюционном плане наиболее близкими оказались виды *L.casei/paracasei* – *L. rhamnosus*, *L. fermentum* – *L.mucosa*, *L.helveticus* – *L.johnsonii*.



**Рисунок 8** – Филогенетическое дерево на основе последовательности фрагмента гена 16S РНК всех видов и штаммов *Lactobacillus*, использованных в данной работе.

Таким образом, на первом этапе работы была впервые определена молекулярно-генетическим методом видовая принадлежность 62 штаммов лактобацилл, для 53 штаммов – до вида, для 9 – для группы видов. Для 11 производственных штаммов это позволило изменить их видовую принадлежность, установленную ранее по фенотипическим признакам.

### 3.2 Биоинформатический поиск и структура модулей TA систем суперсемейства RelBE типа в секвенированных геномах лактобацилл

Следующим этапом работы был поиск TA систем в геномах тех видов бактерий, которые наиболее часто встречаются в микробиоте здоровых людей центральной области России: *L.casei*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* и *L.helveticus*. Для биоинформатического анализа были взяты геномы штаммов данных видов, для которых, по данным GenBank на 2011 год, была известна нуклеотидная последовательность генома (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/913>).

Использовали базы данных по генным системам токсин-антитоксин RASTA (<http://genoweb.univ-rennes1.fr/duals/RASTA-Bacteria/>) [Sevin E.W. et al., 2007] и TADB (<http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB/>) [Shao Y. et al., 2011], а также осуществляли поиск гомологов известных TA белков грам-положительных микроорганизмов среди белков, синтезируемых штаммами *L.rhamnosus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* и *L.helveticus*, используя алгоритм psi-blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>). Руководствовались тем, что в подавляющем большинстве случаев гены TA систем II типа организованы стандартно: гены токсина и антитоксина имеют величину до 630 пн; расположены на одной цепи ДНК на близком расстоянии друг от друга (до 70 пн) или перекрываются; ген антитоксина предшествует гену токсина [Sevin E.W. et al., 2007].

В ходе биоинформатического анализа было идентифицировано три различные TA системы в штаммах *L.rhamnosus* (RelBE3<sub>Lrh</sub>, YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> и один токсин relE1<sub>Lrh</sub> соло) (таблица 12); одна TA система в штаммах *L.casei* (RelBE1<sub>Lcs</sub>) и пять TA систем в штаммах *L.helveticus* (RelBE1<sub>Lhv</sub>, RelE2<sub>Lhv</sub> – соло, RelBE3<sub>Lhv</sub>, RelBB4<sub>Lhv</sub>, RelBE5<sub>Lhv</sub>) (таблица 13). В таблице 11 представлено распространение TA систем II типа суперсемейства RelBE в лактобациллах. Как видно из таблицы 11, было обнаружено шесть TA систем RelBE типа, два токсина RelE-соло и одна система, состоящая из 2х антитоксинов. В штаммах *L.fermentum* и *L.plantarum* TA систем RelBE типа обнаружено не было. Во всех описанных TA системах токсин принадлежал к различным семействам суперсемейства RelE.

**Таблица 11.** Распространение TA систем II типа суперсемейства RelBE в лактобациллах.

<i>Тип TA системы</i> <i>Вид</i> <i>лактобацилл</i>	Токсин+ антитоксин <i>RelBE</i>	Токсин <i>RelE</i>	Антитоксин + антитоксин <i>RelB</i>
<i>L.helveticus</i>	3	1	1
<i>L.rhamnosus</i>	2	1	-
<i>L.casei</i>	1	-	-
<b>Итого</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

Для каждой ТА системы разнообразие (полиморфизм) между штаммами проявляется в нуклеотидных и аминокислотных заменах. Идентичность нуклеотидных последовательностей внутри каждой ТА системы была больше 99%, между системами – меньше 80% (см. раздел 3.3).

**Таблица 12.** Системы RelBE в штаммах *L.rhamnosus*.

Штамм	RelE1 <sub>Lrh</sub>	YefM-YoeB <sub>Lrh</sub>	RelBE3 <sub>Lrh</sub>
GG	LGG_00493*	-	LGG_00519
GG	LRHM_0477	-	LRHM_0502
LC705	Lc705_00482	Lc705_02727 Lc705_02726	Lc705_00508 Lc705_00509
HN001	LRH_10927	LRH_08783 LRH_08778	LRH_02752
LMS2-1	HMPREF0539_2788	HMPREF0539_0586 HMPREF0539_0587	HMPREF0539_2816 HMPREF0539_2817
ATCC 8530	LRHK_496	LRHK_2836 LRHK_2837	LRHK_524 LRHK_525
ATCC 21052	HMPREF0541_00597	-	HMPREF0541_00056 HMPREF0541_00057
R0011	R0011_08783	-	R0011_08888 R0011_08893
CASL	+	+	+
LRHMDP2	LRHMDP2_168	-	LRHMDP2_197 LRHMDP2_196
LRHMDP3	LRHMDP3_1769	-	LRHMDP3_1054 LRHMDP3_1055

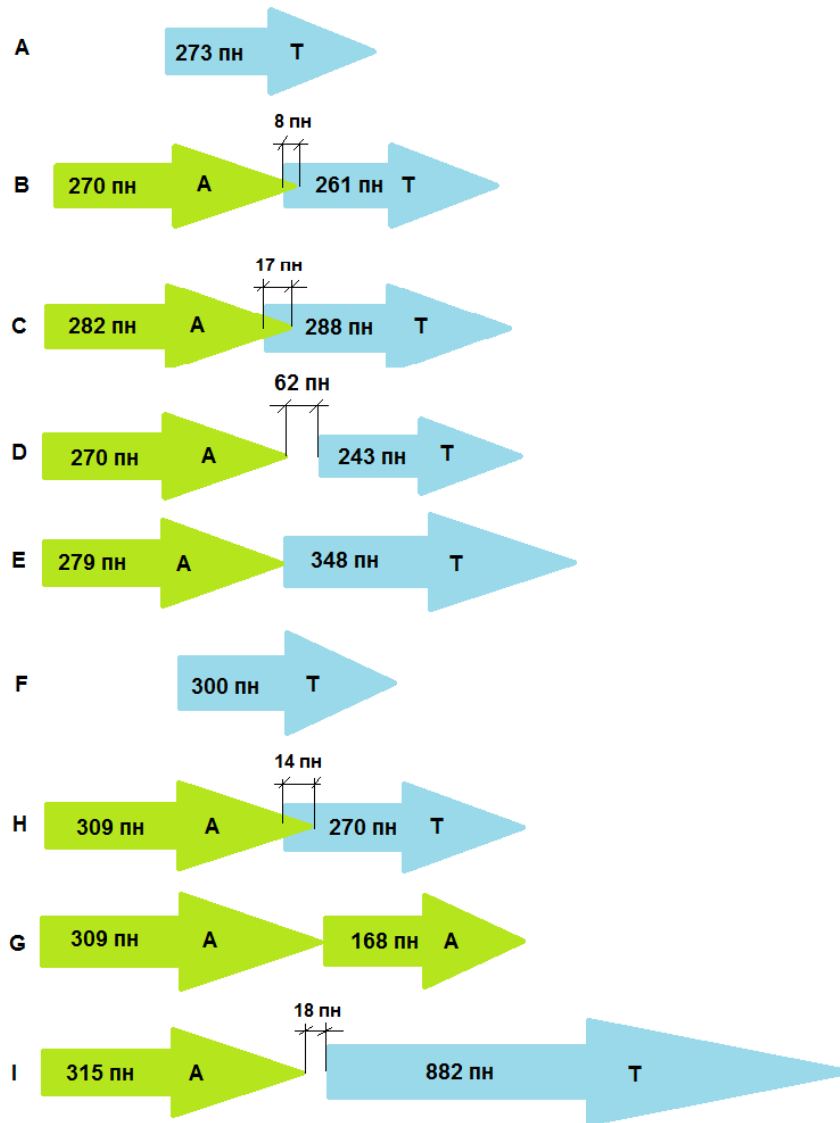
\* указано название локус-тага генов ТА систем.

**Таблица 13.** Системы RelBE в штаммах *L.helveticus*.

Штамм	RelBE1 <sub>Lhv</sub>	RelE2 <sub>Lhv</sub>	RelBE3 <sub>Lhv</sub>	RelBB4 <sub>Lhv</sub>	RelBE5 <sub>Lhv</sub>
<b>H10</b>	LBHH_1066* LBHH_1065	LBHH_1052	LBHH_1992 LBHH_2056	LBHH_1826 LBHH_1827	LBHH_0530 LBHH_0531
<b>DCP4571</b>	lhv_1127 lhv_2502	lhv_2503	локус не выделен lhv_2907	lhv_1847 локус не выделен	lhv_1631 lhv_1630
<b>R0052</b>	R0052_06280 R0052_06275	R0052_06265	R0052_11690 R0052_11695	- R0052_10515	R0052_03220 R0052_03225
<b>MTCC5463</b>	AAULH_06406 AAULH_06411	AAULH_06421	AAULH_11536 AAULH_11541	AAULH_10512 AAULH_10507	AAULH_09378 AAULH_09373

\* указано название локус-тага генов ТА систем.

На рисунке 9 представлена структура модулей идентифицированных ТА систем II типа суперсемейства RelBE в лактобациллах.



**Рисунок 9** – Структура модулей идентифицированных ТА систем

- A) RelE1<sub>Lrh</sub>** – представлен соло, т.е. не имеет антитоксина. Белок принадлежит к RelE-суперсемейству.
- B) YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>** – белок токсина принадлежит к Txe-YoeB семейству, белок антитоксина – к суперсемейству Phd-YefM. Гены антитоксина и токсина перекрываются на 8 пн.
- C) RelBE3<sub>Lrh</sub>** – токсин относится к семейству RelE, антитоксин – к семейству RelB. Гены антитоксина и токсина перекрываются на 17 пн.
- D) RelBE1<sub>Lcs</sub>** – токсин относится к семейству RelE/StbE, антитоксин – к суперсемейству RelB. Гены антитоксина и токсина не перекрываются, а находятся на расстоянии 62 нк друг от друга.
- E) RelBE1<sub>Lhv</sub>** – в данной системе ген токсина относится к семейству YafQ-RelE/StbE, а ген антитоксина к семейству Phd\_YefM. Гены следуют друг за другом.
- F) RelE2<sub>Lhv</sub>** – представлен соло, т.е. не имеет антитоксина. Данный ген относится к семейству Txe\_YoeB.
- G) RelBE3<sub>Lhv</sub>** – в данной системе ген токсина относится к семейству Txe\_YoeB, а ген антитоксина к семейству Phd\_YefM. Гены антитоксина и токсина перекрываются на 14 пн.
- H) RelBB4<sub>Lhv</sub>** – данная система уникальна, так как она состоит из двух генов антитоксина, которые относятся к суперсемейству RelB. Гены следуют друг за другом.
- I) RelBE5<sub>Lhv</sub>** - в данной системе ген антитоксина к суперсемейству RelB, а ген токсина к семейству XRE family transcriptional regulator. Гены антитоксина и токсина не перекрываются, а находятся на расстоянии 18 пн друг от друга.



### 3.3 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE

В охарактеризованной коллекции штаммов лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН мы определяли наличие и полиморфизм идентифицированных ТА систем в 17 штаммах *L. rhamnosus*, в 8 штаммах *L. casei*, в 4 штаммах *L. helveticus* (см. материалы и методы). Праймеры для обнаружения всех ТА систем, найденных биоинформатическим путем, конструировались по консервативным фланговым районам соответствующих генов (см. материалы и методы таблица 7). С праймерами на соответствующий ген ставилась ПЦР, выделялся и секвенировался ПЦР-продукт. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), с помощью которой определяли количество нуклеотидных и аминокислотных замен (см. материалы и методы). Полиморфизм генов и белков ТА систем был определен также для секвенированных штаммов лактобацилл из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Критерием геномного полиморфизма являлось наличие или отсутствие генов в конкретных геномах, критерием генного полиморфизма – изменения в нуклеотидной последовательности генов.

#### 3.3.1 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE в штаммах *L. rhamnosus*

Все три идентифицированных ТА системы *L. rhamnosus* (**RelE1<sub>Lrh</sub>**, **YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>**, **RelBE3<sub>Lrh</sub>**) были обнаружены в геномах российских штаммов *L. rhamnosus*, однако штаммы демонстрировали значительный генный и геномный полиморфизм.

Ген токсина **relE1<sub>Lrh</sub>** имеется у всех исследованных штаммов *L. rhamnosus* – как из GenBank, так и из лабораторной коллекции. Он представлен соло, т.е. не имеет антитоксина. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представлено в таблице 14.

**Таблица 14.** Сравнение нуклеотидных последовательностей гена и аминокислотных последовательностей белка токсина RelE1<sub>Lrh</sub> с геном и белком штамма *L. rhamnosus* LMS2-1 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штаммы <i>L. rhamnosus</i>	Токсин	
		НК гена (273)	АК белка (90)
1	<b>Lc705, ATCC8530, CASL,</b> 40ст, 45д, 51гн, 2гн, 80ст	0	0
2	<b>R0011, ATCC21052, HN001</b>	10	0
3	<b>GG*</b> , 26ск, 61ск	7	0
4	72зв, 7дст, 50зв	9	0
5	22гн, К32, 38к	14	4 A36T V74I D77G I79V



18 штаммов, не содержащих IS-элемента, имеют одинаковые по величине гены и белки и отличаются друг от друга заменами нуклеотидов в гене, 3 штамма отличаются от других заменами аминокислот в белке. Гомологичные белки (50-79% идентичности) есть у многих лактобацилл (*L.zeae*, *L.casei*, *L.buchneri*, *L.kisonensis*, *L.brevis*, *L.parafarraginis* и др.). Белки с идентичностью меньше 50% есть у микроорганизмов других родов (*Fructobacillus*, *Leptotrichia*, *Selenomonas*, *Haemophilus*, *Helicobacter* и др.).

Система **YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>** обнаружена у части штаммов из GenBank и лабораторной коллекции, всего в 12 штаммах. Система отличается высоким консерватизмом – из 12 штаммов у 11 гены токсина и антитоксина идентичны; у одного штамма есть одна нуклеотидная замена в гене токсина, приводящая к аминокислотной замене (№62: Asp→ Glu). Гомологи белков токсина обнаруживаются преимущественно среди отличных от лактобацилл родов микроорганизмов (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Acetobacterium*, *Bifidobacterium* и др.).

Наличие функционально активной системы **RelB3-RelE3<sub>Lrh</sub>** можно предположить только у двух из 8-ми секвенированных штаммов *L.rhamnosus* из GenBank (R0011 и ATCC21052) и 9 лабораторных штаммов, всего у 11 штаммов. У остальных штаммов (6 из GenBank и 6 из лабораторной коллекции) данная ТА система также имеется, однако в обоих генах есть множественные отличия в нуклеотидной последовательности по сравнению со штаммами R0011 и ATCC21052 (замены нуклеотидов, сдвиги рамки считывания, делеции). Эти 12 штаммов разделяются на две группы; у штаммов одной группы можно предположить наличие гипотетических белков антитоксина и претерпевшего делецию токсина (61AA вместо 95AA); у штаммов другой группы можно предположить наличие только белка антитоксина (таблица 15). Белки, родственные белкам данной ТА системы, обнаруживаются только у одного вида лактобацилл – *L.rhamnosus*. Отдаленные гомологи белков (менее 46% идентичности) есть у различных микроорганизмов других родов (*Streptococcus*, *Gardnerella* и др.).

**Таблица 15.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков ТА системы RelBE3<sub>Lrh</sub> с генами и белками штамма *L. rhamnosus* R0011 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (282)	АК белка (93)	НК гена (288)	АК белка (95)
1-1	<b>ATCC21052*</b> , 40ст, 45д, 72зв	0	0	0	0
1-2	7дст, 24дст	1	1 V80F	0	0
1-3	22гн, К32, 38к	1	0	2	1 R62H
2	<b>Lc705, ATCC8530, CASL, LMS2-1, 2гн, 51гн, 80ст</b>	43	12	4 (из 186)	2 (из 61)
3	<b>GG, HN001</b> , 50зв, 421-2, 26ск, 61ск	47 (из 273)	24 (из 90)	-	-

Суммарное распределение ТА систем у *L. rhamnosus* представлено в таблице 16. Нуклеотидные последовательности идентифицированных ТА систем приведены в приложение В.

**Таблица 16.** Распределение генов ТА систем в штаммах *L.rhamnosus*. Жирным шрифтом выделены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№ группы	Штаммы <i>L.rhamnosus</i>	Гены токсинов	Гены антитоксинов
1	<b>GG</b> , 421-1; 26ск; 61ск	<i>relE1</i>	<i>relB3</i>
2	<b>LMS2-1</b> , 24дст	<i>relE1</i> <i>relE3</i> <i>yoeB</i>	<i>relB3</i> <i>yefM</i>
3	<b>ATCC 21052; R0011;</b> 72зв; 22гн; К32; 38к; 45д	<i>relE1</i> <i>relE3</i>	<i>relB3</i>
4	<b>LC705, ATCC8530, CASL;</b> 40ст; 80ст; 2гн; 51гн	<i>relE1</i> <i>relE3</i> <i>yoeB</i>	<i>relB3</i> <i>yefM</i>
5	<b>HN001;</b> 7дст; 50за	<i>relE1</i>  <i>yoeB</i>	<i>relB3</i> <i>yefM</i>

### 3.3.2 Изучение полиморфизма генов суперсемейства RelBE в штаммах *L.casei*

Для *L.casei* референсным геномом был выбран штамм BL23, с которым сравнивались последовательности ТА систем как из лабораторной коллекции, так и из GenBank.

ТА система RelBE1<sub>Lcs</sub> имеется у всех штаммов *L.casei* как из GenBank (4 штамма) так и в лабораторной коллекции (8 штаммов). У 8 штаммов из 12 гены токсина и антитоксина идентичны, у трех штаммов (гКНМ577, 20011, гКНМ23) ген антитоксин идентичен по аминокислотной последовательности, а в гене токсина имеются замены аминокислот (таблица 17). У штамма К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> есть 1 замена аминокислоты в гене антитоксина и три замены в гене токсина, как и у штаммов 20011, гКНМ23.

**Таблица 17.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков ТА системы RelBE1<sub>Lcs</sub> с генами и белками штамма *L. casei* BL23 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (270)	АК белка (89)	НК гена (234)	АК белка (78)
1	<b>BD-II, LC2W, W56, 17к, 42ст, 48ст, 51ст,</b>	0	0	0	0
2	гКНМ577	1	0	10	2 D2N K57E
3	20011, гКНМ23	3	0	10	3 H42V K57E G77V
4	К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	4	1 E72Q	10	3 H42V K57E G77V

### 3.3.3 Изучение полиморфизма генов суперсемейства *RelBE* в штаммах *L. helveticus*

Пять идентифицированных ТА систем были обнаружены в геномах российских штаммов *L. helveticus* (**RelBE1<sub>Lhv</sub>**, **RelE2<sub>Lhv</sub>**, **RelBE3<sub>Lhv</sub>**, **RelBB4<sub>Lhv</sub>**, **RelBE5<sub>Lhv</sub>**), однако штаммы демонстрировали значительный генный и геномный полиморфизм.

ТА система **RelBE1<sub>Lhv</sub>**. В данной системе белок токсина относится к семейству YafQ-RelE/StbE, а ген антитоксина к семейству Phd\_YefM. Данная система обнаружена у всех штаммов *L. helveticus* – как из лабораторной коллекции, так и из GenBank. Данные о заменах представлены в таблице 18.

**Таблица 18.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков ТА системы **RelBE1<sub>Lhv</sub>** с генами и белками штамма *L. helveticus* DCP4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (279)	АК белка (92)	НК гена (348)	АК белка (115)
1	<b>MTCC5463, NNIE</b>	0	0	1	1 D58G
2	<b>H10</b>	0	0	на 3 нк ген больше 2	На 1 ак белок больше 2 V32A D58G +№103: L
3	<b>R0052</b>	0	0	3	3 V17A D43G G83S
4	100аш, Er315, NK1	1	1 E85D	3	3 V32A D58G P73L

Ген токсина *relE2<sub>Lhv</sub>*. Данный ген относится к семейству Txe\_YoeB. Он имеется у всех исследованных штаммов *L. helveticus* – как из GenBank, так и из лабораторной коллекции и представлен соло, т.е. не имеет антитоксина (таблица 19).

**Таблица 19.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков токсина RelE2<sub>Lhv</sub> с генами и белками штамма *L. helveticus* DCP4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штамм	Токсин	
		НК гена (300)	АК белка (99)
1	NNIE	1	0
2	<b>MTCC5463</b>	2	0
3	<b>H10</b>	2	1 E32K
4	100аш, Er315/402, NK1	2	2 W84C W85G
5	<b>R0052</b>	4	2 P55A W84C

ТА система RelBE3<sub>Lhv</sub>. В данной системе белок токсина относится к семейству Txe\_YoeB, а ген антитоксина к семейству Phd\_YefM. Данная система имеется у всех штаммов *L. helveticus* – как из лабораторной коллекции, так и из GenBank. Аминокислотная последовательность гена антитоксина была не вариабельна. В гене токсина всех штаммов из лабораторной коллекции выявлено две нуклеотидных замены, одна из которых приводит к аминокислотной замене (таблица 20).

**Таблица 20.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков ТА системы RelBE3<sub>Lhv</sub> с генами и белками штамма *L. helveticus* H10 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (309)	АК белка (102)	НК гена (270)	АК белка (89)
1	100аш, Er315/402, NK1, NNIE	0	0	2	1 I69M
2	<b>R0052</b>	1	0	1	1 I69M
3	<b>MTCC5463</b>	2	1 T4P E76K	2	1 I69M

Система **RelBB4<sub>Lhv</sub>**. Данная система отличается тем, что она состоит из двух генов, кодирующих белки, относящиеся к семейству RelB, т.е. антитоксинов. Данная система имеется в четырех штаммах из GenBank (H10, DCP4571, DSM 20075 и МТСС 5463) и во всех штаммах из лабораторной коллекции. В штаммах DPC4571, 100ash, Er315/402, NK1, NNIE в первом гене (токсина ?) было 2 нуклеотидные замены, приводящие к 2-м аминокислотным заменам (№55: Р – S № 71: А – Р). В одном штамме из GenBank присутствовал только один ген – «антитоксина».

ТА система **RelBE5<sub>Lhv</sub>**. Данная предполагаемая ТА система также необычна, так как она состоит из гена антитоксина, белок которого относится к семейству RelB, и расположенного рядом предполагаемого гена токсина, длина которого составляет 882 пн. Данная система имеется у всех штаммов *L. helveticus* – как из лабораторной коллекции, так и из GenBank. Аминокислотная последовательность гена антитоксина у штаммов из коллекции не вариабельна, а в гене токсина выявлена одна нуклеотидная замена, которая приводит к аминокислотной замене (таблица 21).

**Таблица 21.** Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков ТА системы RelBE5<sub>Lhv</sub> с генами и белками штамма *L. helveticus* DPC4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№	Штаммы	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (315)	АК белка (104)	НК гена (882)	АК белка (293)
1	<b>H10, R0052,</b> 100ash, Er315/402, NK1, NNIE	0	0	1	1 D152G
2	<b>МТСС5463</b>	1	1 L87I	3	2 D152G A279T

Суммарное распределение ТА систем у *L. helveticus* представлено в таблице 22. Нуклеотидные последовательности идентифицированных ТА систем приведены в приложение В.



**Таблица 22.** Распределение генов ТА систем в штаммах *L. helveticus*. Жирным шрифтом выделены штаммы из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

№ группы	Штамм	Гены-токсинов	Гены-антитоксинов
1	<b>DPC 4571</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-1</i> <i>relB5</i>
2	<b>H10, MTCC5463, 100ash, NK1, NNIE, Er315/402</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i> <i>relE3</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-1</i> <i>relB4-2</i> <i>relB5</i>
3	<b>R0052</b>	<i>relE1</i> <i>relE2</i> <i>relE3</i>  <i>relE5</i>	<i>relB1</i>  <i>relB3</i> <i>relB4-2</i> <i>relB5</i>

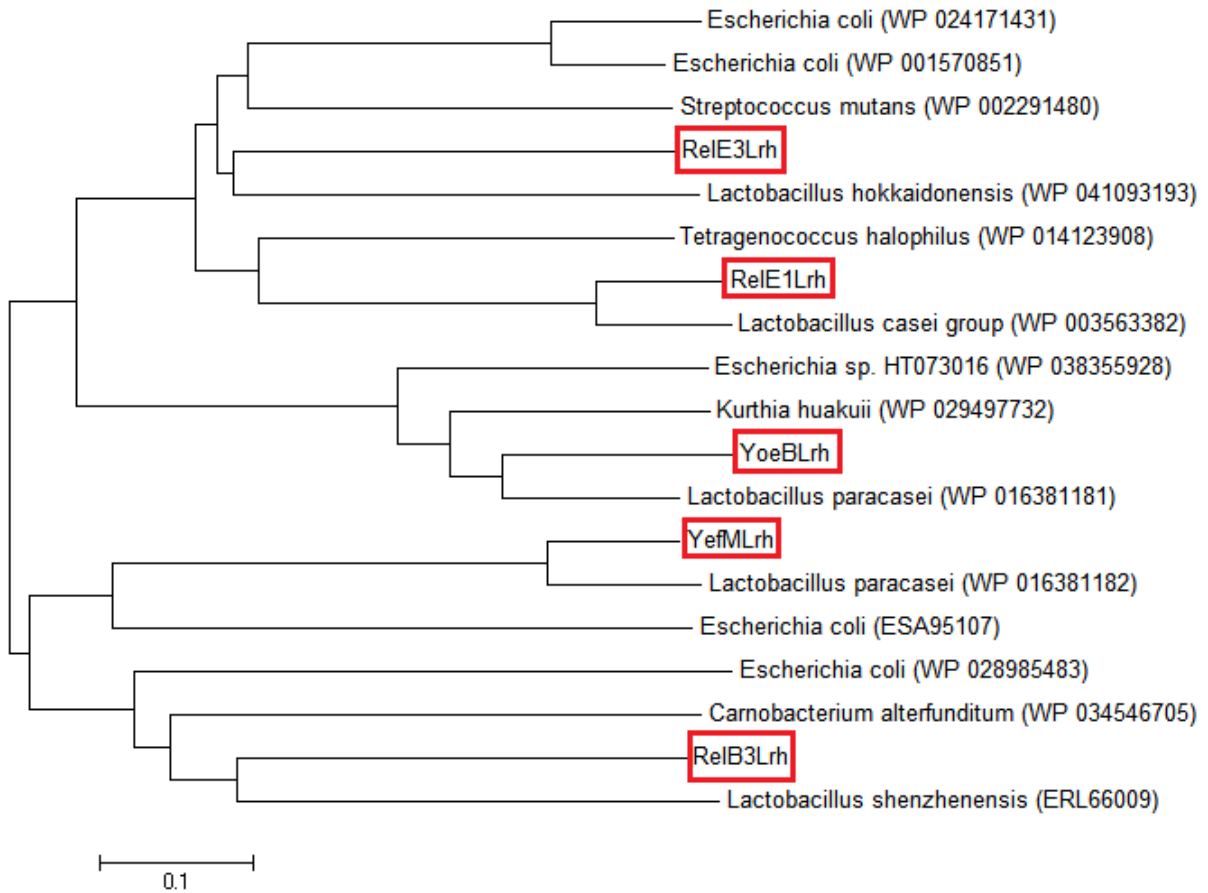
Все идентифицированные нами ТА системы различны. Внутри каждой ТА системы идентичность нуклеотидной последовательности генов составляет более 99% (кроме тех случаев, где наблюдается многочисленные делеции и система «разваливается» - как у RelBE3<sub>L.th</sub>). Идентичность аминокислотной последовательности белков разных ТА систем как внутри одного вида, так и между разными видами, менее 30%.

Как было отмечено ранее, данные ТА системы имеют гомологию с ТА системами других видов. Гомологичные белки внутри рода *Lactobacillus* идентичны на  $\leq 84\%$ , но встречаются и такие белки, которые гомологичны на 95-98% в пределах рода. Гомология с другими видами грам-положительных бактерий составляет  $\leq 75\%$ . При сравнении ТА систем с грам-отрицательными бактериями (на примере *E.coli*), их гомология составила  $\leq 51\%$ . Более подробные результаты по гомологии белков каждой из описанных нами ТА систем с ТА системами других бактерий представлена в таблице 23 и на рисунках 12, 13, 14.

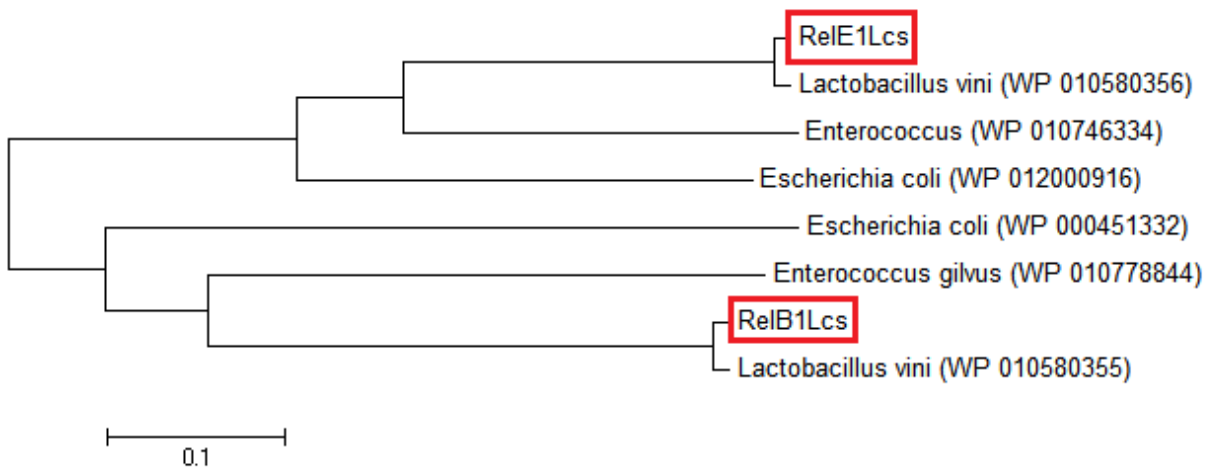
**Таблица 23.** Степень сходства белков идентифицированных нами токсинов и анитоксинов суперсемейства RelBE *L.rhamnosus*, *L.helveticus*, *L.casei* с соответствующими белками представителей других видов лактобацилл, грам-положительных бактерий и *E.coli*.

Белок (токсин /анитоксин)*	Максимальный % идентичности с белками		
	Бактерий других видов лактобацилл	Грам-положительных бактерий, отличных от лактобацилл	<i>E.coli</i>
RelE1 <sub>Lrh</sub>	≤ 79% WP_003563382	≤ 42% WP_014123908	≤ 30% WP_024171431
RelB3 <sub>Lrh</sub>	≤ 43% ERL66009	≤ 41% WP_034546705	≤ 40% WP_028985483
RelE3 <sub>Lrh</sub>	≤ 42% WP_041093193	≤ 42% WP_002291480	≤ 38% WP_001570851
YefM <sub>Lrh</sub>	≤ 84% WP_016381182	≤ 61% WP_012961966	≤ 33% ESA95107
YoeB <sub>Lrh</sub>	≤ 72% WP_016381181	≤ 66% WP_029497732	≤ 49% WP_038355928
RelB1 <sub>Lcs</sub>	≤ 94% WP_010580355	≤ 42% WP_010778844	≤ 37% WP_000451332
RelE1 <sub>Lcs</sub>	≤ 91% (70%) WP_010580356	≤ 55% (45%) WP_010746334	≤ 46% (38%) WP_012000916
RelB1 <sub>Lhv</sub>	≤ 91% WP_035175178	≤ 75% WP_012660356	-
RelE1 <sub>Lhv</sub>	≤ 74% WP_003548064	≤ 60% WP_002827220	≤ 24% WP_000535377
RelE2 <sub>Lhv</sub>	≤ 51% WP_007125692	≤ 37% WP_028790735	-
RelB3 <sub>Lhv</sub>	≤ 95% EEU18998	≤ 42% ESL04426	≤ 27% WP_024176566
RelE3 <sub>Lhv</sub>	≤ 92% WP_025005991	≤ 52% WP_037371013	≤ 51% WP_023157375
RelB1_4 <sub>Lhv</sub>	≤ 41% WP_034991769	≤ 39% WP_042493705	≤ 33% KEL78909
RelB2_4 <sub>Lhv</sub>	≤ 36% WP_003627337	≤ 30% WP_009608577	≤ 28% WP_032170727
RelB5 <sub>Lhv</sub>	≤ 98% WP_005718136	≤ 46% WP_024859130	≤ 30% WP_000451332
RelE5 <sub>Lhv</sub>	≤ 98% WP_005718137	≤ 61% WP_002833662	≤ 28% WP_000904506

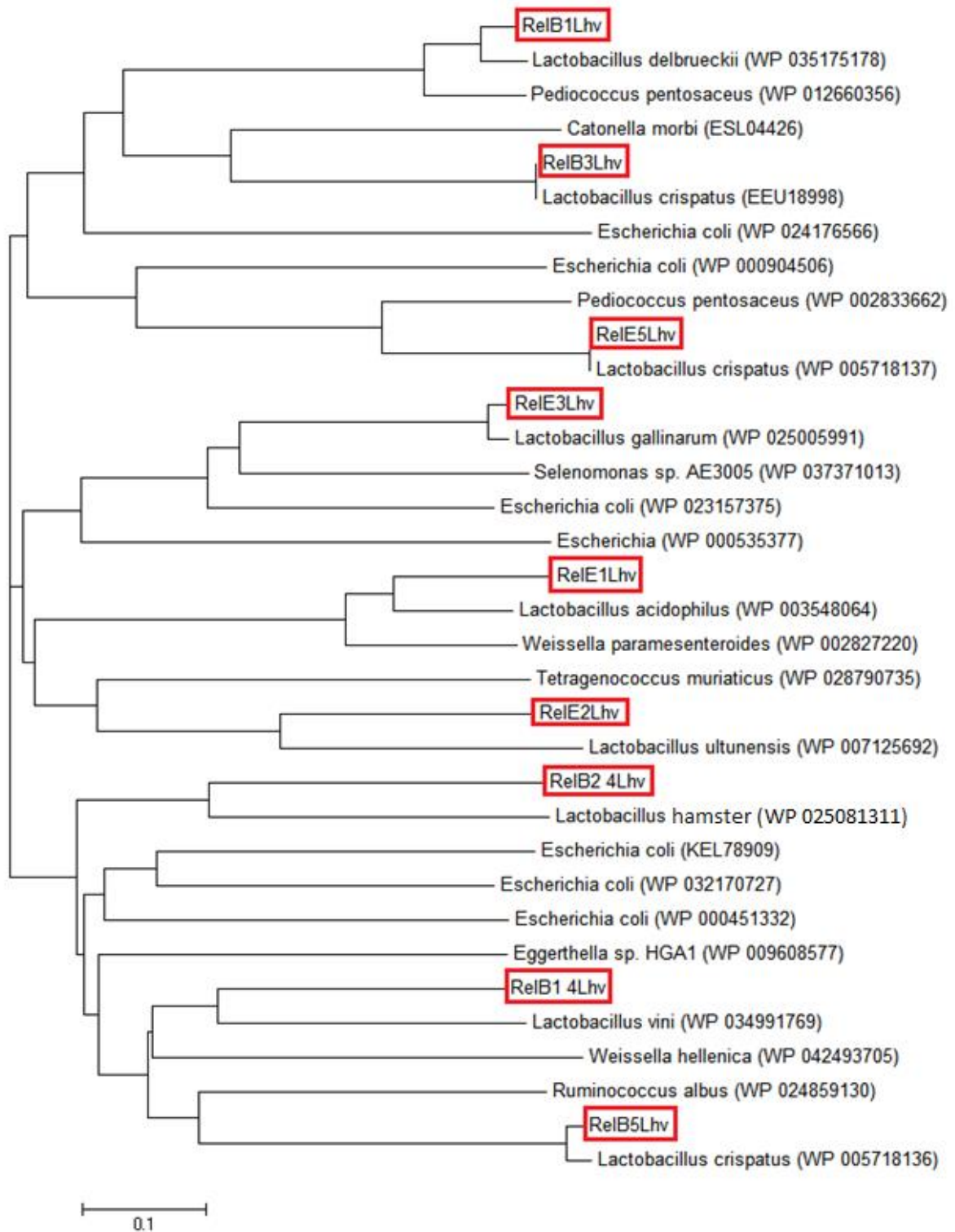
\* Анализируемые в таблице белки описаны в разделе 2, название бактерий представлены на рисунке 12, 13, 14; номера белковых последовательностей предствалены в таблице.



**Рисунок 12** – Гомология белков ТА систем из штаммов *L.rhamnosus* с ТА системами других бактерий. Выбраны гомологи трех групп: бактерии рода *Lactobacillus*, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии (на примере *E.coli*) с максимальным сходством.



**Рисунок 13** – Гомология белков ТА систем из штаммов *L.casei* с ТА системами других бактерий. Выбраны гомологи трех групп: бактерии рода *Lactobacillus*, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии (на примере *E.coli*) с максимальным сходством.



**Рисунок 14** – Гомология белков ТА систем из штаммов *L. helveticus* с ТА системами других бактерий. Выбраны гомологи трех групп: бактерии рода *Lactobacillus*, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии (на примере *E. coli*) с максимальным сходством.

Из представленных рисунков видно, что ТА системы в разной степени гомологичны с ТА системами других видов.

Таким образом, на третьем этапе работы при анализе нуклеотидных последовательностей секвенированных геномов лактобацилл из GenBank мы обнаружили три различные ТА системы суперсемейства RelBE в штаммах *L.rhamnosus*, одну ТА система в штаммах *L.casei* и пять ТА систем в штаммах *L.helveticus*. Все эти ТА системы были обнаружены и в геномах штаммов из лабораторной коллекции. Из 9 обнаруженных ТА систем:

- 6 содержали гены/белки антитоксина и токсина – YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, RelB3-RelE3<sub>Lrh</sub>, RelBE1<sub>Lcs</sub>, RelBE1<sub>Lhv</sub>, RelBE3<sub>Lhv</sub>, RelBE5<sub>Lhv</sub>;
- 2 состояли только из гена/белка токсина «соло» – RelE1<sub>Lrh</sub>, RelE2<sub>Lhv</sub>;
- одна состояла из двух генов/белков, аннотируемых как антитоксины - RelBB4<sub>Lhv</sub>.

Токсины обнаруженных ТА систем (RelE, YoeB) принадлежат к RelE суперсемейству. Антитоксины (RelB, YefM) принадлежат RelB суперсемейству. Один белок – токсин RelBE5 системы – принадлежал к мембранным белкам. Гены токсинов и антитоксинов одной ТА системы у штаммов одного вида отличаются единичными заменами нуклеотидов и имеют более 99% идентичности. Белки токсинов и антитоксинов разных ТА систем – как одного вида лактобацилл, так и разных видов - значительно отличаются друг от друга и имеют 30% идентичности (как исключение, два белка - RelBE1<sub>Lhv</sub> и YoeB<sub>Lrh</sub> – имели 43% идентичности). Сочетание токсинов и антитоксинов не во всех случаях являются «каноническими», это подтверждает вариабельность сочетаний токсинов и антитоксинов различных семейств при образовании ТА систем.

Как видно из таблицы 23, белки токсинов и антитоксинов лактобацилл больше сходны с таковыми других лактобацилл и грам-положительных бактерий, чем с белками *E.coli* и других грам-отрицательных микроорганизмов. Однако некоторые белки (RelB3<sub>Lrh</sub>, RelE3<sub>Lrh</sub>, RelB1<sub>Lhv</sub>, RelB2<sub>Lhv</sub>) имеют одинаковый небольшой процент идентичности с белками всех групп сравнения и свойственны только определенному виду лактобацилл – *L.rhamnosus* или *L.helveticus*.

ТА системы не являются обязательными элементами бактериального генома. При анализе ТА систем в секвенированных геномах бактерий неоднократно встречаются ТА системы с мобильным генетическим элементом либо непосредственно с ним связанные, либо расположены рядом. Ряд авторов относит сами ТА системы к мобильным генетическим элементам [Makarova K. et al., 2009]. Наши данные также подтверждают связь ТА систем с мобильными элементами. Мы обнаружили в гене *relE1*<sub>Lrh</sub> для трех штаммов из лабораторной коллекции мобильный генетический элемент IS3 семейства, который располагается внутри гена.

Как уже отмечалось, ТА системы состоят из гена токсина и антитоксина, которые расположены рядом и образуют оперон. Нами были обнаружены гены токсинов соло (*relE1*<sub>Lrh</sub> и *relE2*<sub>Lhv</sub>), т.е. для данных генов ни в одном из штаммов *L.rhamnosus* и *L.helveticus* не удалось идентифицировать ген, который можно было бы считать геном антитоксина. Обнаруженные нами

единичные гены токсинов присутствовали в геноме всех проверенных штаммов *L.rhamnosus* и *L.helveticus*. Подобные одиночные гены токсинов и антитоксинов отмечены в различных геномах [Makarova K.S. et al., 2009]. Возможно, данные токсины имеют свои специфические антитоксины, однако соответствующие гены расположены в другом месте хромосомы. Возможно, и одиночные гены токсинов могут участвовать, наряду с полноценными ТА системами, в регуляции клеточных процессов. До настоящего времени это было показано для одного уникального токсина *Mucosoccus* [Inouye S. et al., 2008].

Нами была найдена необычная система RelBB4<sub>Lhv</sub>, которая состоит из двух генов, взаимное расположение и величина которых соответствуют таковым ТА систем, однако оба белка аннотируются как антитоксины. Данная ТА система присутствует практически во всех штаммах *L.helveticus*, как из лабораторной коллекции, так и из GenBank. Возможно, один из белков этой системы является токсином с новыми, еще не описанными, механизмом действия и каталитическим доменом. При поиске новых ТА систем в штаммах *L.helveticus* мы также обнаружили систему, оба белка которой аннотировались как антитоксины (R0052\_10560-R0052\_10565); для этой системы была показана активность одного из белков в клетках *E.coli* (см. раздел 3.6).

Обнаруженные нами ТА системы достаточно стабильны, присутствуют практически во всех геномах и отличаются друг от друга только отдельными нуклеотидными или аминокислотными заменами. Только одна из обнаруженных нами ТА систем – RelBIE3<sub>Lrh</sub> – деградирует. Ген антитоксина *relB3<sub>Lrh</sub>* в ряде штаммов *L.rhamnosus* (GG, HN001) представлен соло; в случае данной ТА системы это является результатом потери гена токсина, который в других штаммах *L.rhamnosus* (ATCC21052, R0011, Lc705, ATCC8530, CASL, LMS2-1) обнаруживается.

Штаммы лактобацилл демонстрируют полиморфизм ТА систем, как геномный, так и генный. Генный полиморфизм штаммов может приводить к аминокислотным заменам и, в отдельных случаях, к потере активности белков (как у гена токсина *uoeVL<sub>rh</sub>* из штамма *L.rhamnosus* 40st – см. раздел 3.4.2). Единичные нуклеотидные замены, возможно, могут приводить и к изменению регуляции активности генов и белков, влияя на эффективность транскрипции и трансляции. Штаммы имеют свой специфический набор генов токсинов и антитоксинов, что позволяет использовать полиморфизм ТА систем для характеристики отдельных штаммов (таблица 16 и 22, приложение В). По наличию или отсутствию ТА систем все штаммы *L.rhamnosus* можно разделить на 5 групп, а штаммы *L. helveticus* – на 3 группы, каждая из которых отличается комбинацией систем ТА. Полиморфизм ТА систем использован нами для штаммовой идентификации лактобацилл (см. раздел 3.7). Нами была разработана система

праймеров для видовой и штаммовой идентификацией лактобацилл на основе ТА систем – как RelBE, так и MazEF суперсемейств; получен патент на данное изобретение (патент № 2526576).

Исследованные штаммы лактобацилл выделены из различных отделов микробиоты человека. Число исследованных штаммов невелико для окончательных суждений, однако, данные таблицы 4 позволяют отметить, что группу 1 с минимальным количеством ТА систем составляют только штаммы *L.rhamnosus*, выделенные из ЖКТ; штаммы, выделенные из ротовой полости, составляют две обособленные группы (2 и 5); штаммы вагинального происхождения входят в те же группы, что и штаммы из ЖКТ (3 и 4). Эти данные позволяют предположить некоторую обособленность штаммов, выделенных из желудочно-кишечного тракта и ротовой полости.

Штаммы *L. helveticus* из GenBank (DPC 4571, H10, R0052) выделены из продуктов питания, а штамм MTCC5463 – выделен из вагинальной полости. Штаммы из лабораторной коллекции, выделенные из желудочно-кишечного тракта, сгруппированы в одну группу со штаммом MTCC5463 (таблица 22), что также позволяет предположить некоторую обособленность штаммов, выделенных из организма человека.

### 3.4 Изучение функционирования ТА систем лактобацилл в клетках *E.coli*

Чтобы выяснить, проявляют ли продукты идентифицированных генов токсинов в штаммах *L.rhamnosus*, *L.casei* и *L.helveticus* активность именно как токсины, мы определили влияние экспрессии данных генов на рост клеток на стандартной модели *E.coli*. Гены были клонированы в экспрессионные вектора рЕТ-32а или рACYCDuet-1, содержащих IPTG – индуцируемый промотор (см. материалы и методы, таблица 6). Клонировали гены без собственных регуляторных элементов. Гибридные плазмиды с клонированными генами токсинов переносили трансформацией в клетки *E.coli* BL21(DE3), в которых промотор был активен в присутствии IPTG.

После обнаружения активности генов токсинов необходимо было выяснить, являются ли активными белки антитоксинов у данных ТА систем, то есть способен ли антитоксин подавлять токсин в клетках *E.coli*. Для этого мы клонировали ген токсина на плазмиде рACYCDuet-1, а ген антитоксина - на плазмиде рЕТ-32а, и совмещали их в клетках *E.coli* BL21(DE3).

Характер роста штаммов определяли на твердой и в жидкой средах, используя параллельно среды с IPTG, и без него. На твердой среде раскапывали разведения культур штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с клонированными генами токсинов (*relE1<sub>Lrh</sub>*, *yoeB<sub>Lrh</sub>*, *relE1<sub>Lhv</sub>*, *relE2<sub>Lhv</sub>* и *relE3<sub>Lhv</sub>*). В жидкой среде определяли характер роста штаммов, измеряя оптическую плотность культур OD600 (см. материалы и методы).

#### 3.4.1 Клонирование и экспрессия в клетках *E.coli* ТА генов *L.rhamnosus*

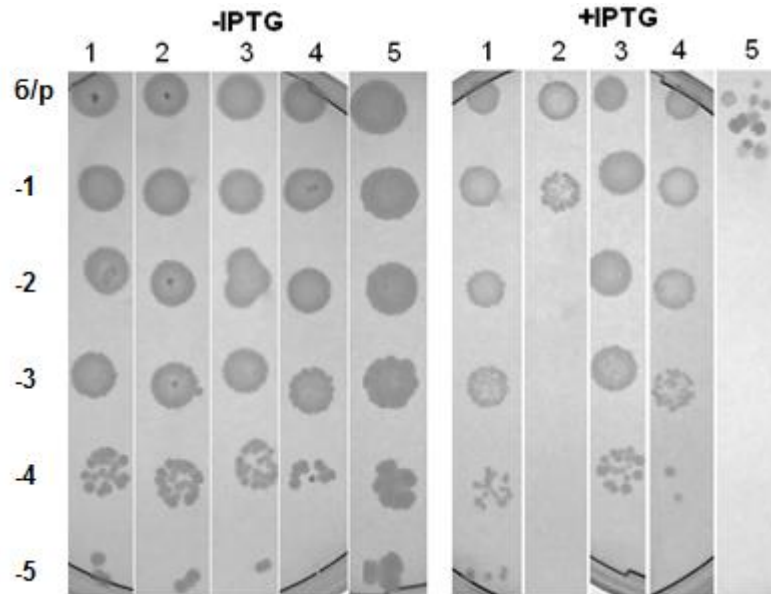
ТА системы в различных штаммах *L.rhamnosus* отличались нуклеотидной последовательностью генов. Для каждой из трех ТА систем был выбран наиболее часто встречающийся вариант гена токсина. Для всех генов токсинов трех ТА систем были получены трансформанты *E.coli* BL21(DE3). Таким образом, были клонированы ген *relE<sub>Lrh</sub>* из штамма 2гн (плазмида р32*relE1<sub>Lrh</sub>*\_2), ген *yoeB<sub>Lrh</sub>* из штамма 24дст и 40 (плазмиды р32*yoeB<sub>Lrh</sub>*\_24 и р32*yoeB<sub>Lrh</sub>*\_40) и ген *relE3<sub>Lrh</sub>* из штамма 45д (плазмида р32*relE3<sub>Lrh</sub>*\_45).

Для штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды р32*yoeB<sub>Lrh</sub>*\_24 и р32*relE3<sub>Lrh</sub>*\_45 с клонированными генами токсинов *yoeB<sub>Lrh</sub>* и *relE3<sub>Lrh</sub>*, эффективность роста на чашках с IPTG была значительно ниже, чем на чашке без индуктора (рисунок 15). Таким образом, индукция данных белков в значительной степени подавляла рост клеток *E.coli*.

Для штамма *E.coli* BL21(DE3) р32*relE1<sub>Lrh</sub>*\_2 с клонированным геном *relE1<sub>Lrh</sub>* эффективность роста на чашках с IPTG была незначительно меньше, чем на чашках без индуктора (рисунок 15). При расеве разведений культуры данного штамма на чашки с IPTG и без него число колоний на чашках было одинаковым, однако величина колоний на чашках с IPTG была значительно меньше (рисунок 16). Вероятно, действие токсина RelE1<sub>Lrh</sub> проявляется таким необычным образом.

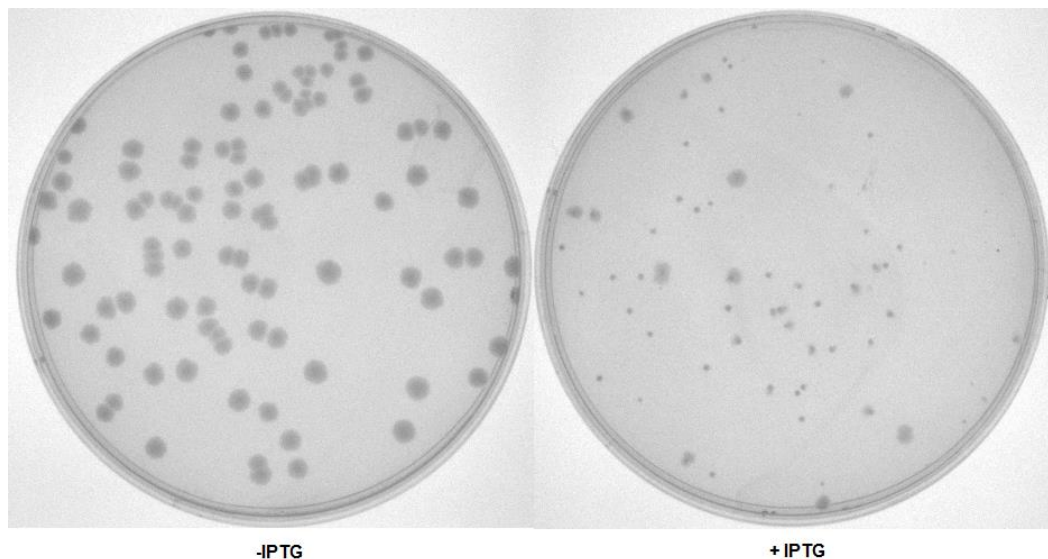


Ген *yoeB* из штамма *L.rhamnosus* 40ст имеет одну нуклеотидную замену, приводящую к аминокислотной замене в белке (Asp62→Glu62), по сравнению с геном из штамма 24дст. Экспрессия белка  $YoeB_{Lrh40}$  не влияла на рост клеток *E.coli* (рисунок 15). Вероятно, белок  $YoeB_{Lrh24}$  является активным токсином, а мутация Asp62→Glu62 подавляет активность белка.



**Рисунок 15** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов *L.rhamnosus* на рост штамма *E.coli* BL21(D3) на твердой среде, содержащей плазмиды:

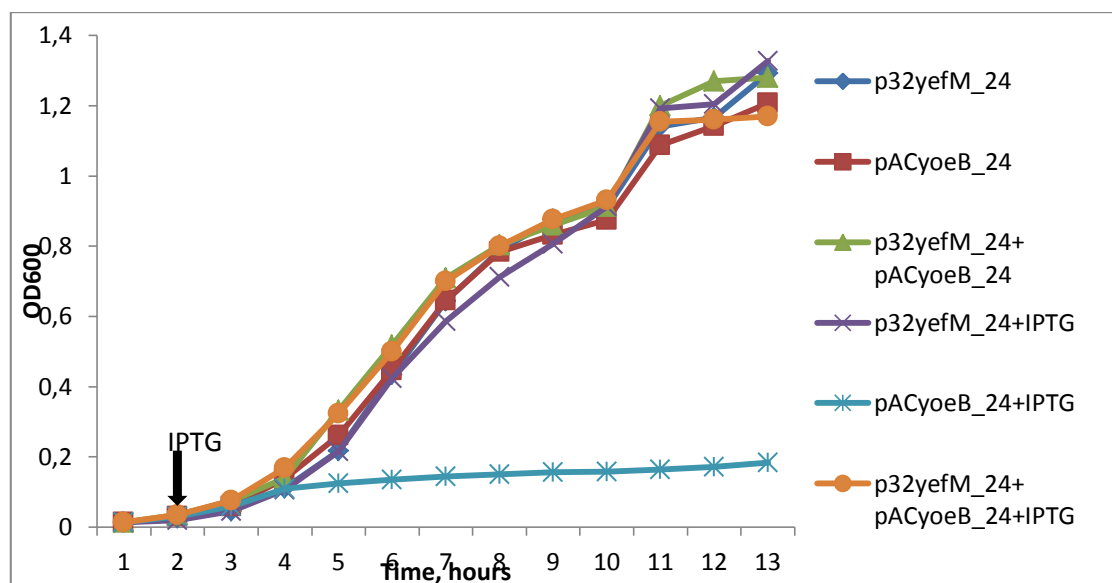
1 – контроль p32a; 2 - p32yoeB<sub>Lrh\_24</sub>; 3 - p32yoeB<sub>Lrh\_40</sub>; 4 - p32relE1<sub>Lrh\_2</sub>; 5 - p32relE3<sub>Lrh\_45</sub>.



**Рисунок 16** – Влияние экспрессии клонированного гена токсина *L.rhamnosus* на рост штамма *E.coli* BL21(D3) при расसेве на твердой среде культуры, содержащей плазмиду p32relE1<sub>Lrh\_2</sub>. Разведение  $10^{-3}$ .

Штаммы *E.coli*, содержащие клонированный ген токсина *yoeB<sub>Lrh</sub>* (как на векторе pET-32a, так и на векторе pACYCDuet-1), резко замедляли рост после добавления индуктора промоторной

активности IPTG. Введение в клетки *E.coli*, несущие плазмиду pACyoeB<sub>Lrh</sub>\_24 с клонированным геном токсина yoeB<sub>Lrh</sub>, плазмиды p32yefM<sub>Lrh</sub>\_24 с геном антитоксина yefM<sub>Lrh</sub> делало характер роста штамма неизменным в присутствии IPTG и без него (рисунок 17). Следовательно, антитоксин YefM<sub>Lrh24</sub> подавляет активность токсина YoeB<sub>Lrh24</sub> в клетках *E.coli*, т.е., также как и токсин, проявляет функциональную активность.

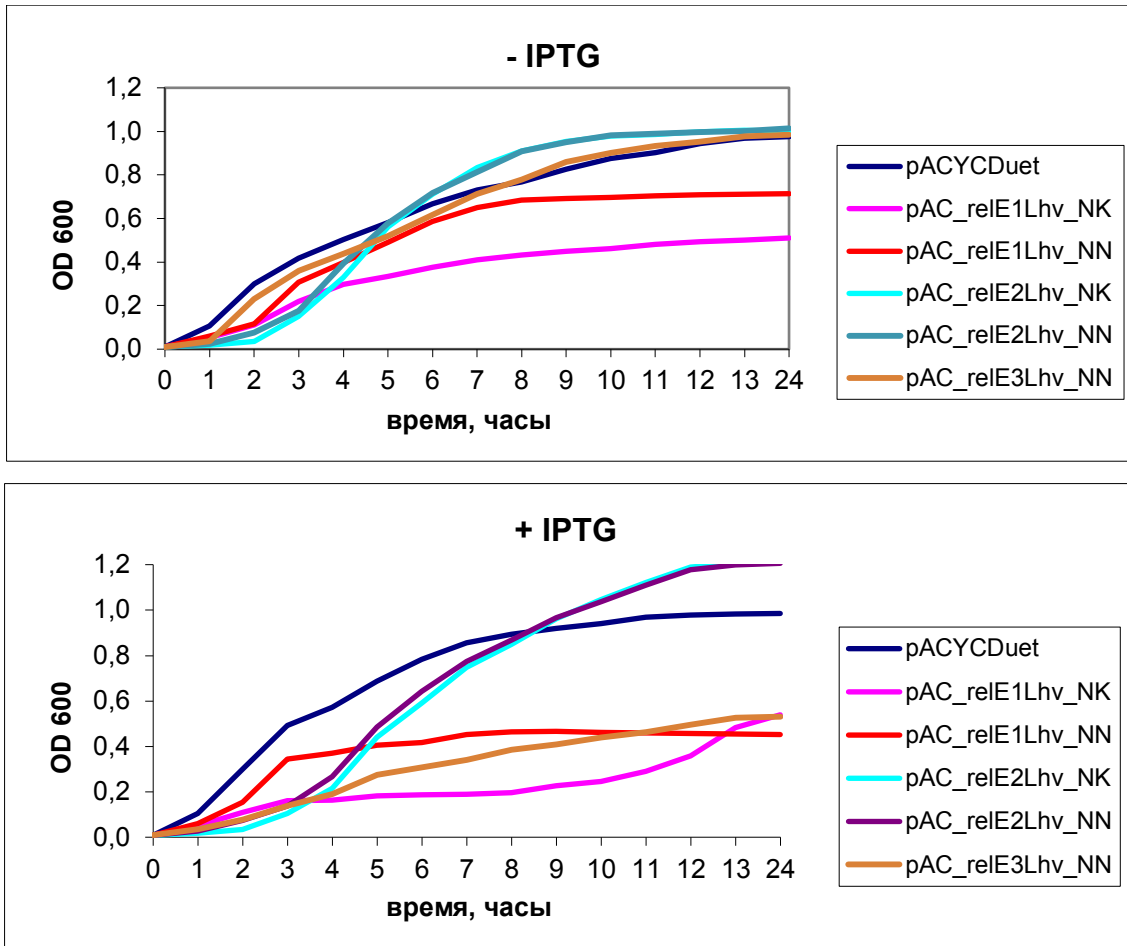


**Рисунок 17** – Характер роста штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с клонированными генами токсина yoeB<sub>Lrh24</sub> и антитоксина yefM<sub>Lrh24</sub>, в жидкой среде LB. К части культур в указанный на рисунке момент времени был добавлен IPTG.

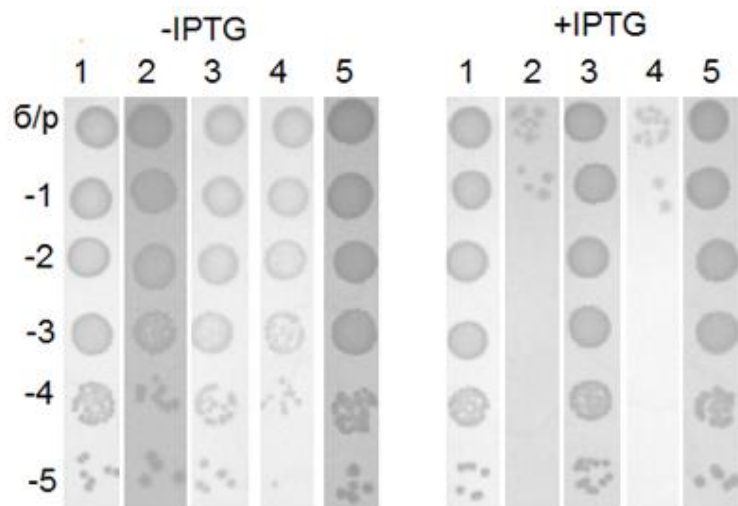
### 3.4.2 Клонирование и экспрессия в клетках *E.coli* TA генов *L. helveticus*

В разделе 3.4.1 было установлено, что даже одна аминокислотная замена в белке токсине может полностью устранять токсический эффект. Поэтому для определения активности генов токсинов *L.helveticus* клонировали несколько вариантов белков токсинов, отличающихся отдельными нуклеотидными заменами. Были клонированы два варианта гена *relE1<sub>Lhv</sub>*: из штамма NNIE (pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NN) и из штамма NKI (pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NK), отличаются тремя нуклеотидными заменами; два варианта гена *relE2<sub>Lhv</sub>*: из штамма NNIE (pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NN) и из штамма NKI (pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NK), отличаются двумя нуклеотидными заменами; ген *relE3<sub>Lhv</sub>* из штамма NNIE (pACrelE3<sub>Lhv</sub>\_NN); ген *relE5<sub>Lhv</sub>* из штамма NNIE (pACrelE5<sub>Lhv</sub>\_NN). Аминокислотные и нуклеотидные замены в белках и генах описаны в разделе 3 и представлены в приложении В.

Нуклеотидные и соответствующие аминокислотные замены в генах *relE1<sub>Lhv</sub>*, *relE2<sub>Lhv</sub>* и *relE3<sub>Lhv</sub>* не приводили к резкому изменению экспрессии гена токсина (рисунок 18), как в случае с геном токсинов yoeB из штамма *L.rhamnosus* 40ст. На рисунке 19 показано влияние экспрессии одного варианта клонированных генов для каждой TA системы на твердой среде.



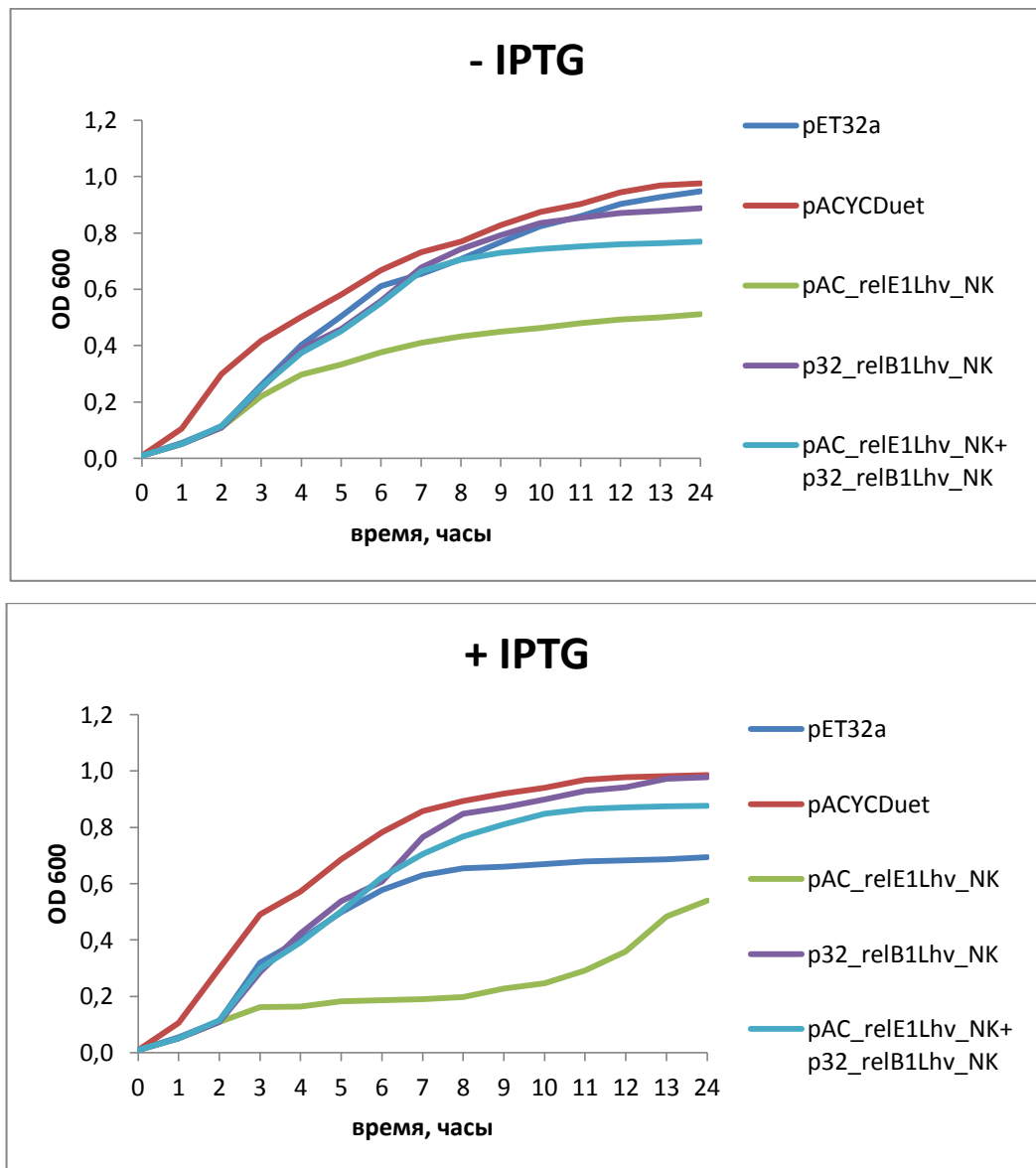
**Рисунок 18** – Характер роста штаммов *E.coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами токсинов и антитоксинов *L.rhamnosus*, в жидкой среде.



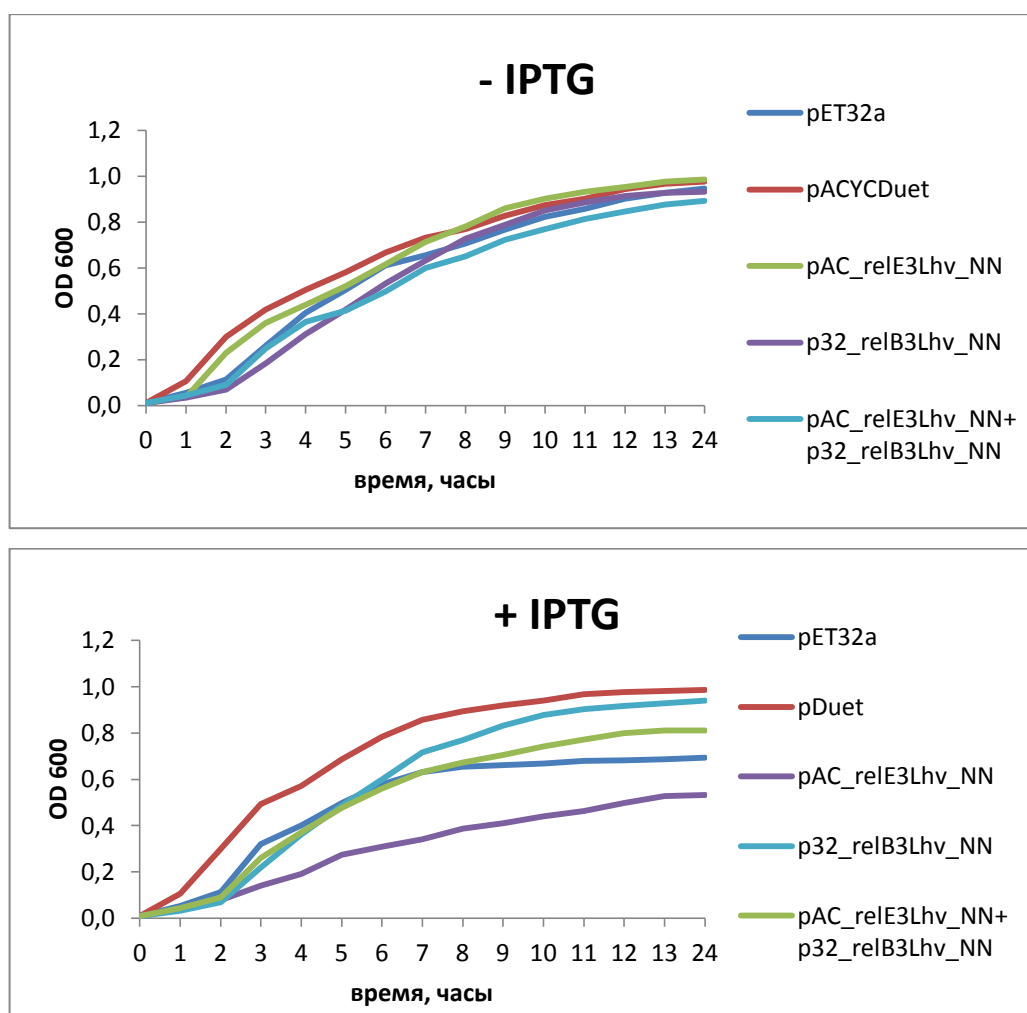
**Рисунок 19** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов *L.helveticus* на рост на твердой среде штамма *E.coli* BL21(D3), содержащего плазмиды:  
 1 – контроль, вектор pACYCDuet-1; 2 – pACrelE1<sub>Lhv</sub>\_NN;  
 3 – pACrelE2<sub>Lhv</sub>\_NN; 4 – pACrelE3<sub>Lhv</sub>\_NN; 5 – pACrelE5<sub>Lhv</sub>\_NN.

Токсины RelE2<sub>Lhv</sub>\_NK и RelE2<sub>Lhv</sub>\_NN не влияют на рост клеток *E.coli*, как с IPTG, так и без IPTG. В то же время токсины RelE3<sub>Lhv</sub>\_NK, RelE3<sub>Lhv</sub>\_NN, RelE1<sub>Lhv</sub>\_NN при добавлении индуктора дают значительное уменьшение скорости роста культуры, что, свидетельствует об активности соответствующих белков как токсинов.

Далее необходимо было выяснить, являются ли активными белки антитоксинов у ТА систем с функционально активными генами токсинов *relE1<sub>Lhv</sub>* и *relE3<sub>Lhv</sub>*, то есть способен ли антитоксин подавлять деятельность токсина в клетках *E.coli*. Результаты представлены на рисунках 20 и 21.



**Рисунок 20** – Характер роста штаммов *E.coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами токсина и антитоксина RelBE1<sub>Lhv</sub> системы, в жидкой среде.



**Рисунок 21** – Характер роста штаммов *E.coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами токсина и антитоксина RelBE3<sub>Lhv</sub> системы, в жидкой среде.

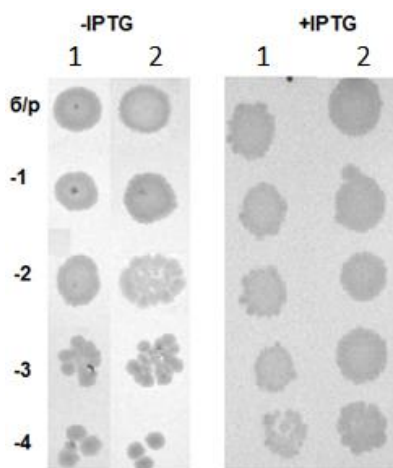
Штаммы *E.coli*, содержащие клонированный ген токсина *relE3<sub>Lhv</sub>*, резко замедляли рост после добавления индуктора. Введение в клетки *E.coli*, несущие плазмиду pAC*relE3<sub>Lhv</sub>*\_NN с клонированным геном токсина *relE3<sub>Lhv</sub>*, плазмиды p32*relB3<sub>Lhv</sub>*\_NN с геном антитоксина *relB3<sub>Lhv</sub>* делало характер роста штамма неизменным в присутствии IPTG и без него (рисунок 21). Аналогичные результаты были получены для системы RelBE1<sub>Lhv</sub> (рисунок 20). Можно сделать вывод, что антитоксины RelB1<sub>Lhv</sub> и RelB3<sub>Lhv</sub> подавляют активность соответствующих токсинов RelE1<sub>Lhv</sub> и RelE3<sub>Lhv</sub> в клетках *E.coli*, т.е., также как и токсины, проявляет функциональную активность.

Стоит отметить, что клонированный ген токсина *relE1<sub>Lhv</sub>*, частично замедляет рост клеток *E.coli* даже без IPTG (рисунок 20 (-IPTG)), т.е. его токсическое действие проявляется сильнее, чем для других клонированных генов токсинов.

Предполагаемый токсин RelE5 не вызывал изменения жизнеспособности клеток *E.coli*.

### 3.4.3 Клонирование и экспрессия в клетках *E.coli* гена токсина *L. casei*

Ген токсина *relE1<sub>Lcs</sub>* был клонирован в клетках *E.coli* DH5 $\alpha$  на экспрессионном векторе pET-32a. Для штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду p32*relE1<sub>Lcs</sub>*, эффективность роста на чашках с IPTG и на чашках без индуктора не отличалась (рисунок 22).



**Рисунок 22** – Влияние экспрессии клонированного гена токсина *relE1<sub>Lcs</sub>* на рост штамма *E.coli* BL21(D3) на твердой среде, содержащей плазмиды:  
1 – контроль p32a; 2 - p32*relE1<sub>Lcs</sub>*.

Таким образом, на четвертом этапе работы было показано, что белки токсинов *YoeB<sub>Lrh</sub>*, *RelE3<sub>Lrh</sub>*, *RelE1<sub>Lhv</sub>* и *RelE3<sub>Lhv</sub>* при экспрессии подавляют рост клеток *E.coli*, т.е. проявляет в них функциональную активность; слабую активность проявляет и токсин *RelE1<sub>Lrh</sub>* (он вызывал только уменьшение размера колоний *E.coli*). Клонированный ген *yoeB<sub>Lrh</sub>* при индукции вызывал гибель бактериальных клеток. Одиночная нуклеотидная замена в гене *yoeB<sub>Lrh</sub>*, приводившая к аминокислотной замене в белке (*Asp62*→*Glu62*), полностью устраняла токсический эффект в клетках *E.coli*. Подобные одиночные замены аминокислот, резко менявшие свойства токсинов, отмечены и для других ТА систем [Khoо S.K. et al., 2007].

Для штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с токсинами *relE2<sub>Lhv</sub>*, *relE5<sub>Lhv</sub>*, и *relE1<sub>Lcs</sub>* эффективность роста на чашках с IPTG и на чашках без индуктора не отличалась, однако это не значит, что данные белки не являются токсинами. Наличие токсинов, не проявляющих активности в *E.coli*, показано для многих токсинов *M.tuberculosis* [Ramage H.R. et al., 2009]. Подобные факты нельзя рассматривать как отсутствие активности токсинов в клетках лактобацилл. Наиболее вероятное объяснение состоит в том, что один из антитоксинов, присутствующих в клетках *E.coli* BL21(D3), способен подавлять активность клонируемых токсинов лактобацилл. Совмещение в клетках *E.coli* генов токсина *yoeB<sub>Lrh</sub>* и антитоксина *yefM<sub>Lrh</sub>*, токсина *relE3<sub>Lhv</sub>* и антитоксина *relB3<sub>Lhv</sub>*, токсина *relE1<sub>Lhv</sub>* и антитоксина *relB1<sub>Lhv</sub>*, устраняло токсический эффект. Таким образом, для данных ТА систем лактобацилл показана функциональная активность обоих белков.

### 3.5 Изучение регуляции экспрессии ТА системы YefM-YoeB у штаммов *L.rhamnosus*

В предыдущем разделе рассмотрены и проанализированы три ТА системы суперсемейства RelBE – relE1<sub>Lrh</sub>, YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, RelB3-RelE3<sub>Lrh</sub> – в различных штаммах *L.rhamnosus*. Для более детальных исследований нами была выбрана ТА система YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, в которой белок токсин YoeB<sub>Lrh</sub> проявляет свою активность и белок анитоксина YefM<sub>Lrh</sub> способен подавлять активность токсина в клетках *E.coli*. Задачей данного раздела работы было изучение структурной организации оперона YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> и его транскрипции.

#### 3.5.1 Особенности проксимального и дистального районов ТА системы YefM-YoeBLrh

У всех штаммов, содержащих ТА систему YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, как из лабораторной коллекции, так и из GenBank, нуклеотидные последовательности проксимального (410 нп) и дистального (213 нп) районов оперона были идентичны (за исключением штамма 40 ст, который имеет одну аминокислотную замену в гене токсине) (рисунок 23).

```

TGTAAGTTTTCTCTCGGAGCATGTGGGTGTCAAACACGAGCACATTAGTTTTACACGATTC 60
CCGTAGCAGTGCAAAGCGGCACSTTGTTCGAATATCAGGATAGAAAGCAAGAGCTGGCCGG 120
AGCGGTGGCGGGCTCAGTGGTGAAATTGGTCTTAAGCGGAGTGGGCTTCTCCGCTTTAGA 180
CCAAGGCCGAGCTTCGAAACCGCGGTCTTTGCGGGTTCGAAGTCGTGCCACCACGTTCC 240
AGCCCAGCCACAGCGGAGCCAGCTCGGAGCATCGGAAATCACTTAATTAGAGTAGAACCG 300
AGAAAAAGTTGACACTTGCCGCCGCTCCCAATCGTTGCTCATACGTACAATATGTTGTA 360
CAATATTTTCGAAGGTAAGGTGCCGTTATGGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCG 420
CAACSTTAAGCATTATATGAGTCAAGTCAACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACC GC 480
TAAAGATGATGATGACAAATGTGGTGGTTATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAAGA 540
AACSTGTATTTACTCAGCAATCCCAAGCTGATGGCCAAAATCAAACGTGGTGTATGCCCA 600
AATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCACGAGTGTAAACGGACTTCGATCATGATTAATAA 660
CSTGGACCGATGATGCTTTGGGCGGACTACATGTATTGGCATGATCAAAACGACAAGCGGA 720
CAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCAAGCCATTGACCGTGACCSTTATAAAGGCATCG 780
GAAAACSTGAGCCASTTAGATATGCGCTAACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGATCAGG 840
AAAATCGCATCATSTACAGCATTGAAAAGAACCACATTAATATTTTCGCTGCCGCACSTC 900
ACTACAGTTAAACAATCAATTATGAAGTTTTCGCGGCTCATTCACAATCTTTGAGTGCCAACCA 960
TCGTTATTTTCGGTCCACCATCCAATATCTCTGATTCTATAGCCAGCAAAAATGGATTAC 1020
CACTTTTAAACGGTTGCGAATCCATTTTTTGTGTGCTTCAGGGTCTACCATCTATATATTT 1080
GGTTATCAGAATAATATAASAAAATTCGCTTACCCAAACACTCACGTTTTTGTGCGCATGG 1140
CTCATCGACTTTGCTCCGCTCCTGACCCTAATACGCATTTGGCCCATGCTTCCGATAATAA 1200
TGTTTATCCAATAAATACTGCCGCAAGTGCACATCCTGATGCCCTCAAAGTCAATGCATGA 1260

```

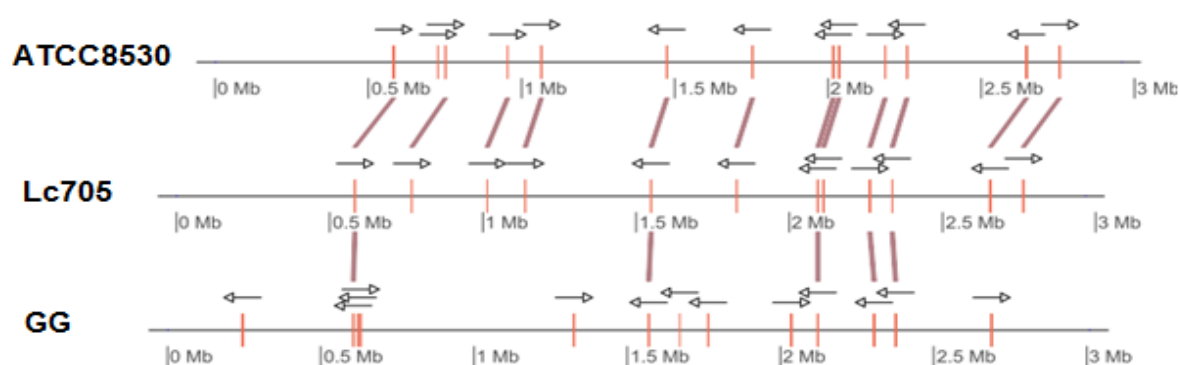
Рисунок 23 – Нуклеотидная последовательность оперона YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>.

Желтым отмечены сайты инициации трансляции;  
 синим – сайты терминации трансляции;  
 серым – участок BOX;  
 зеленым отмечен основной промотор оперона.  
 Красные буквы – сайты инициации транскрипции.

Мы подробно исследовали область, предшествующую оперону, и обнаружили, что она содержит так называемый BOX – элемент длиной около 300 нп с GC-составом 54% (GC-состав геномов *L. rhamnosus* в пределах 43,3-43,6%). Данный участок присутствует во всех

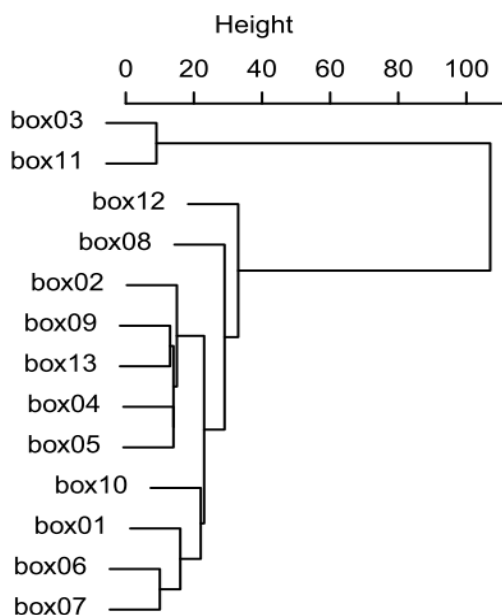


секвенированных геномах *L. rhamnosus* и представлен в 12-13 копиях на геном. На рисунке 24 показано схематическое расположение этого элемента в трех секвенированных геномах *L. rhamnosus*.



**Рисунок 24** – Расположение BOX – элемента в 3-х геномах *L. rhamnosus*

Из рисунка 24 видно, что последовательности близкородственных штаммов ATCC 8530 и Lc705 имеют небольшие отличия в расположении BOX – элемента. Направления данных элементов разные и указаны стрелками. В отличие от них, штамм GG имеет иное расположение BOX-элемента и не содержит последовательностей, гомологичных ТА системе YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>. Все элементы расположены исключительно в некодирующих областях. Они не идентичны, но на основе их нуклеотидных последовательностей они могут быть классифицированы в несколько групп (рисунок 25). Кроме того, в дистальной области оперона мы идентифицировали новую ORF, расположенную за стоп-кодом гена токсина на другой нити ДНК, чем ТА оперон (рисунок 23).

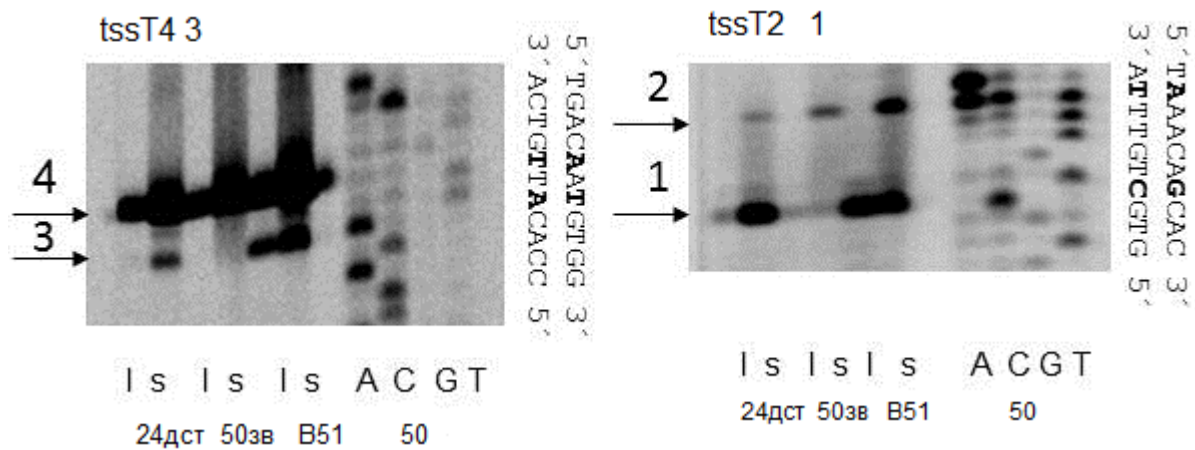


**Рисунок 25** – Филогенетическое дерево, отражающее взаимоотношения между тринадцатью последовательностями BOX из штамма *L. rhamnosus* ATCC 8530



### 3.5.2 Идентификация сайтов инициации транскрипции в ТА системе YefM-YoeBLrh

Попытки несколько раз клонировать оперон *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* целиком были безуспешными. Мы предположили, что внутри данной системы имеется какой-то регуляторный элемент – возможно промотор, который стоит перед геном токсина, и попытались экспериментально подтвердить наше предположение. Для этого провели стандартный эксперимент по поиску промоторов по методу удлинение праймера (см. материалы и методы) с праймерами *yoeB\_lr\_PCR F* и *yoeB\_lr\_PCR R* и ДНК штаммов *L. rhamnosus* 24дст, B51 и 50зв. Мы обнаружили два участка инициации транскрипции перед геном токсина и в пределах последовательности гена антитоксина, каждый участок содержит 2 сайта инициации транскрипции (рисунок 26). Таким методом нам удалось найти два предполагаемых промотора (P<sub>1/2</sub> и P<sub>3/4</sub>), которые находятся внутри ТА системы.



**Рисунок 26** – Определение точек инициации транскрипции методом удлинения праймера для штаммов *L. rhamnosus* 24дст, B51 и 50зв с праймером *yoeB\_lr\_IRD\_3*.

s – стационарная фаза роста культур;

Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, с которых начинается транскрипция.

При анализе района, предшествующего оперону *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*, нам удалось обнаружить, исходя из литературных данных о строении ТА системы и используя поиск промоторов на сайте BПРОМ (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), кроме BOX-элемента, область, которая соответствует промотору (рисунок 27). Наличие такого промотора не удалось показать методом удлинения праймера. Поэтому для поиска основного промотора (P<sub>AT</sub>) перед опероном мы использовали метод определения дефицитных мРНК (RLM-ПЦР, см. материалы и методы). При поиске основного промотора оперона методом RLM-ПЦР последовательность праймера, которая использовалась для выявления основного промотора (P<sub>AT</sub>), оказалась еще и комплементарной к 3'-концу гена *yoeB<sub>Lrh</sub>*. Таким способом, нам удалось найти и основной промотор (P<sub>AT</sub>) и еще один предполагаемый промотор P<sub>X</sub>, который находится за опероном и иницирует транскрипцию в противоположном направлении. Для всех четырех участков инициации транскрипции были

идентифицированы стартовые кодоны, терминирующие кодоны и предполагаемые ORF. ORF, соответствующая часть гена антитоксина *yefM*, была названа  $\Delta yefM$  (рисунок 27). Антитоксины TA систем II типа имеют два активных участка: С-концевой взаимодействует с белком токсина, N-концевой имеет ДНК-связывающий домен, взаимодействует с промоторным участком оперона и подавляет его транскрипцию [Yamaguchi Y. et al., 2011]. Гипотетический  $\Delta YefM$  пептид, образующийся при транскрипции с T4/3, возможно, взаимодействует с белком токсина, но не имеет ДНК-связывающей регуляторной активности.

### 3' end BOX

```

                    -35
5'  CTCGGAGCAT CGGAAATCAC TTAATTAGAG TAGAACCGAG AAAAAGTTGA CACTTGCCGC CGCGTCCCAA TCGTTGCTCA
3'  GAGCCTCGTA GCCTTTAGTG AATTAATCTC ATCTTGGCTC TTTTCAACT GTGAACGGCG GCGCAGGGTT AGCAACGAGT

                    -10      tss AT      RBS      Start yefM      yoeB_lr_IRD_up
81  TACGTACAAT ATGTTGTACA ATATTTTCA AAGGTAAGGT GCCGTTATGG AAGCAACGAA TTATAGTGAT TTCCGCCGCA
81  ATGCATGTTA TACAACATGT TATAAAAGCT TTCCATTCCA CGGCAATACC TTCGTTGCTT AATATCACTA AAGGCGCGCT

                    yoeB_lr_IRD_down                                tss T4/3
161 ACCTTAAGCATTATATGAGT CAAGTCAACG AAGACGCCGA ACCGCTACTG GTTACCCTA AAGATGATGA TGACAATGTG
161 TGGAATTCGT AATATACTCA GTTCAGTTGC TTCTGCGGCT TGGCGATGAC CAATGGCGAT TTCTACTACT ACTGTTACAC

                    Start  $\Delta yefM$ 
241 GTGGTTATGA GCAAGCACGA TTTTGACGCC ATCGAAGAAA CCCTGTATT ACTCAGCAAT CCCAAGCTGA TGGCCAAAAT
241 CACCAATACT CGTTCGTGCT AAAACTGCGG TAGCTTCTTT GGGACATAAA TGAGTCGTTA GGGTTCGACT ACCGGTTTTA

                    tss T2/T1                                Start yoeB Stop yefM
321 CAAACGTGGT GATGCCCAAA TTGCGCTGG AAAGGCTAAA CAGCACGAGT TGTTAACGGA CTTCGATCAT GATTAAAACC
321 GTTTGACCA CTACGGGTTT AACGGCGACC TTTCCGATTT GTCGTGCTCA ACAATTGCCT GAAGCTAGTA CTAATTTTGG

                    yoeB_lr_IRD_3
401 TGGACCGATG ATGCTTGGGG GGACTACATG TATTGGCATG ATCAAAACGA CAAGCGGACA ATCAACGAA TTAATCAACT
401 ACCTGGCTAC TACGAACCGC CCTGATGTAC ATAACCGTAC TAGTTTTGCT GTTCGCCTGT TAGTTTTGCTT AATTAGTTGA

481 CATTCAAGCC ATTGACCGTG ACCCTTATAA AGGCATCGGA AAACCTGAGC CACTTAGATA TGCGCTAACC GGAAAATGGT
481 GTAAGTTCGG TAACTGGCAC TGGGAATATT TCCGTAGCCT TTTGGACTCG GTGAATCTAT ACGCGATTGG CCTTTTACCA

                    yoeB_lr_IRD_down
561 CACGTCGGAT TGATCAGGAA AATCGCATCA TCTACAGCAT TGAAGAAGAAC CACATTAATA TTTTCGCCTG CGGCACTAC
561 GTGCAGCCTA ACTAGTCSTT TTAGCGTAGT AGATGTCGTA ACTTTTCTTG GTGTAATTAT AAAAGCGGAC GCGGTGAGTG

                    Stop yoeB Stop ORF27 yoeB_lr_IRD_up
641 TACAGTTAAC AATCATATTG AAGTTTGCGG CTCATTCACA ATCTTTGAGT GCCAACCATC GTTATTTCGG TCCACCATCC
641 ATGTCAATTG TTAGTATAAC TTCAAACGCC GAGTAAGTGT TAGAAACTCA CGGTTGGTAG CAATAAAGCC AGGTGGTAGG

                    Start ORF27      tss X
721 AATATCTCTG ATTCATAGCC AGCAAAAAT GGATTCACCA CTTTAAACGG TTGCGAATCC ATTTTTTGTG TCGTTCAGGG
721 TTATAGAGAC TAAGTATCGG TCGTTTTTTA CCTAAGTGGT GAAAATTGCC AACGCTTAGG TAAAAACAC AGCAAGTCCC

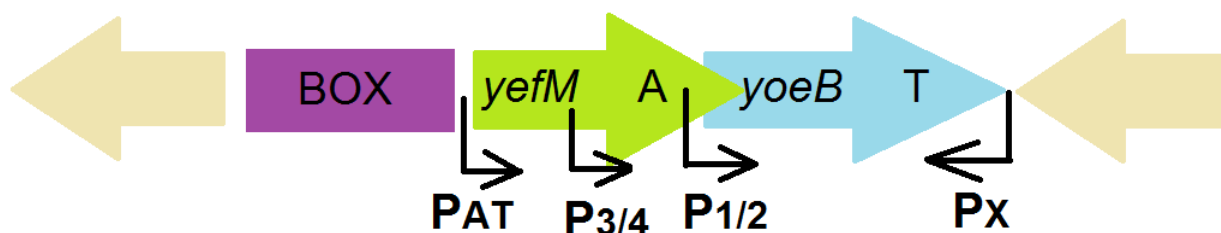
                    Stop rpe
801 TCTACCATCT ATATATTGG TTATCAGAAT AATATAACAA AATGCCTCA CCCAAACACT CA 3'
801 AGATGGTAGA TATATAAAC AATAGTCTTA TTATATTGTT TTAACGGAGT GGGTTTGTG A GT 5'

```

**Рисунок 27** – Структурная организация оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus*.

Конец BOX-элемента отмечен прямой линией. Выделены сайты связывания с сигма-фактором 70 (-10, -35) и рибосомой (RBS) – иницирующие и терминирующие кодоны трансляции, сайты инициации транскрипции и последовательности праймеров, использованных при определении сайтов инициации транскрипции.

Таким образом, нам удалось обнаружить участок BOX, предшествующий гену антитоксину, и 4 предполагаемых промотора в опероне *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*. Схематическое изображение исследуемой системы представлено на рисунке 28. В дальнейшие наши задачи входило выяснить активность предполагаемых промоторов и участка BOX.



**Рисунок 28** – Схема строения оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*.

**BOX** – регуляторный элемент с неизвестной функцией, представлен в геноме *L.rhamnosus*13 копиями;

**Токсин YoeB** – является рибосомно-зависимой РНКазой;

**Антитоксин YefM** – блокирует действие токсина YoeB;

**P<sub>AT</sub>** – главный промотор оперона *yefM-yoeB*, две точки инициации транскрипции;

**P<sub>3/4</sub>** – промотор дистальной части гена антитоксина  $\Delta yefM$ ; две точки инициации транскрипции;

**P<sub>1/2</sub>** – промотор гена токсина *yoeB*, две точки инициации транскрипции;

**P<sub>X</sub>** – промотор гена ORF 27.

### 3.5.3 Исследование активности предполагаемых промоторов

Для определения активности предполагаемых промоторов и района BOX использовали плазмиду рMG16 плазида с геном-репортером  $\beta$ -галактозидазы и клонированным районом предполагаемого промотора встраивалась в геном грам-положительной бактерии *B.subtilis* DB104 (см. материалы и методы).

Для проверки активности промоторов использовали следующие участки:

**BOX+P<sub>AT</sub>**: праймеры SB2271/SB2273

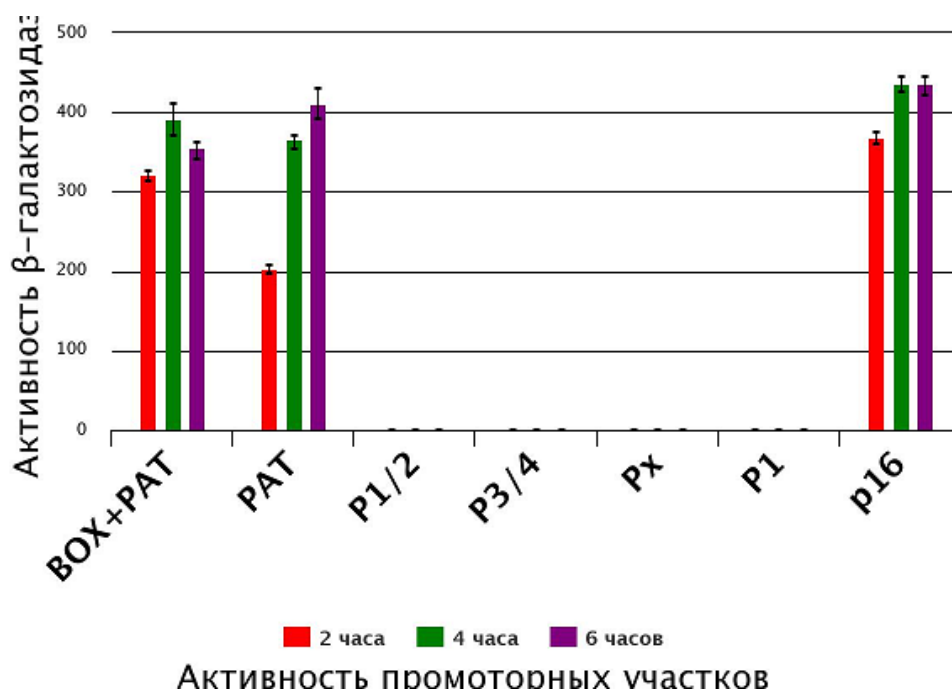
**P<sub>AT</sub>**: праймеры SB2272/SB2273

**P<sub>1/2</sub>**: праймеры SB2274/SB2275

**P<sub>3/4</sub>**: праймеры SB2276/SB2277

**P<sub>X</sub>**: праймеры SB2278/SB2279

При измерении  $\beta$ -галактозидазной активности промоторы P<sub>3/4</sub>, P<sub>1/2</sub>, P<sub>X</sub> не проявили активности, превышающей отрицательный контроль. Активность основного промотора P<sub>AT</sub> была высокой (рисунок 29) как с BOX элементом, так и без него, т.е. BOX-элемент не содержит промотора.

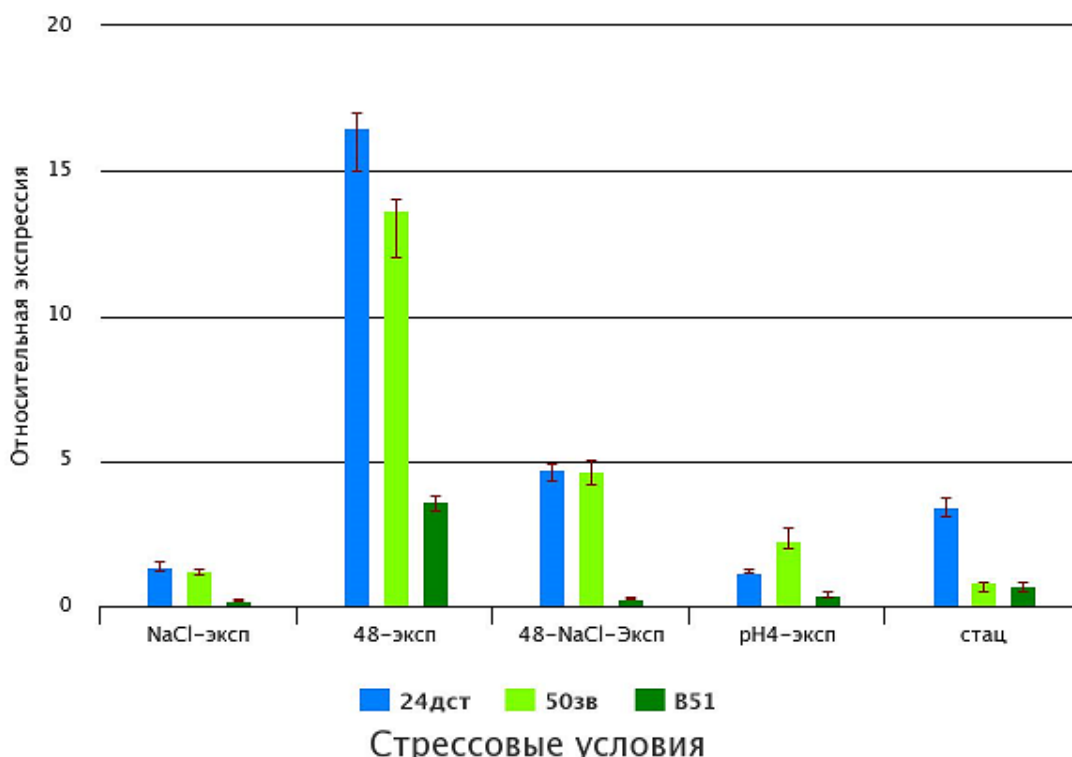


**Рисунок 29** – Измерение активности  $\beta$ -галактозидазы промоторов  $P_{AT}$ ,  $P_{3/4}$ ,  $P_{1/2}$ ,  $P_x$   
 $P_1$  – отрицательный контроль;  
 $P_{16}$  – положительный контроль

На основе проведенных экспериментов по измерению активности промоторов было выявлено, что активен только основной промотор,  $P_{AT}$ . При этом  $VOX$  элемент никак не влиял на активность данного промотора. Таким образом, перед опероном *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* мы обнаружили  $VOX$ -элемент, функции его не известны, идентифицировано 4 промотора. Транскрипционная активность в клетках *B.subtilis* показана только для промотора оперона  $P_{AT}$ .

### 3.5.4 Изучение транскрипционной активности генов *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* в стрессовых условиях методом RTq PCR

Представляло интерес определить экспрессию оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* в различных стрессовых условиях. Для эксперимента были выбраны три штамма *L. rhamnosus* 24дст, 50зв и 51гн, имеющие идентичную нуклеотидную последовательность оперона. Была выполнена серия опытов количественной ПЦР в реальном времени с использованием прямого праймера, расположенного в гене антитоксина *yefM<sub>Lrh</sub>*, и обратного праймера, расположенного в гене токсина *yoeB<sub>Lrh</sub>*. Для всех 4-х исследованных штаммов были получены РНК, что говорит о транскрипции обоих генов в составе одной РНК, т.е. подтверждает оперонное строение ГА системы. Выбраны следующие стрессовые условия для экспоненциально растущей культуры: 48°C; 0,8М NaCl; 48°C + 0,8М NaCl; кислотный стресс (рН 4.0). Определена экспрессия генов в экспоненциальной культуре относительно экспрессии в стационарной культуре. Результаты представлены на рисунке 30. Были выбраны такие значения стрессовых факторов, которые не снижали жизнеспособность культур.

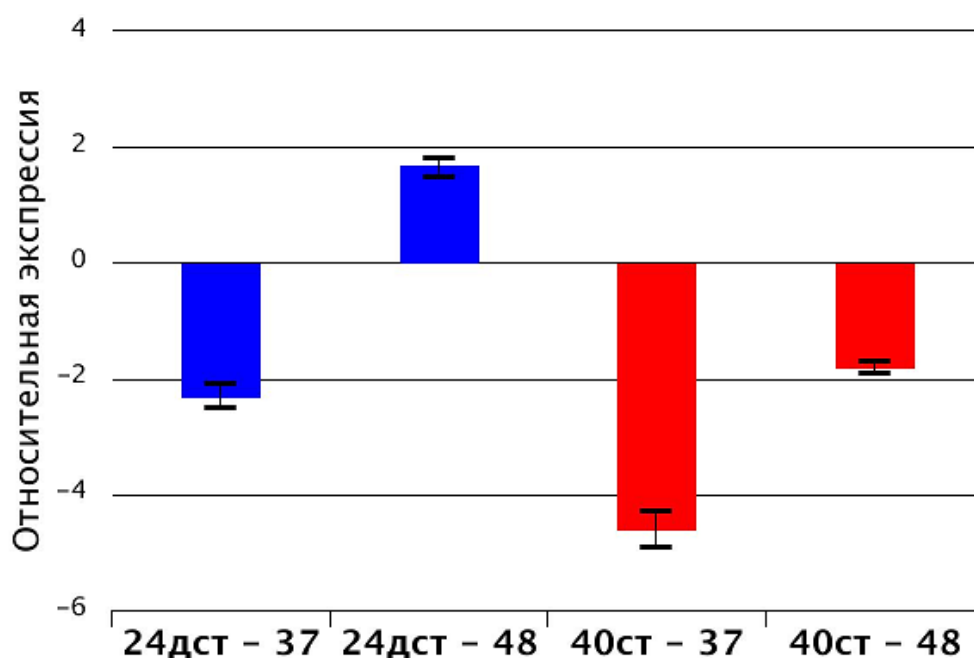


**Рисунок 30** – Экспрессия оперона *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* в различных стрессовых условиях.

Определялась экспрессия оперона в экспоненциальной фазе роста относительно экспрессии в стационарной фазе роста и при разных стрессовых условиях (48°C; 0,8 м NaCl; 48°C + 0,8 м NaCl; кислотный стресс (pH 4.0)). В качестве контроля использован ген *ileS*.

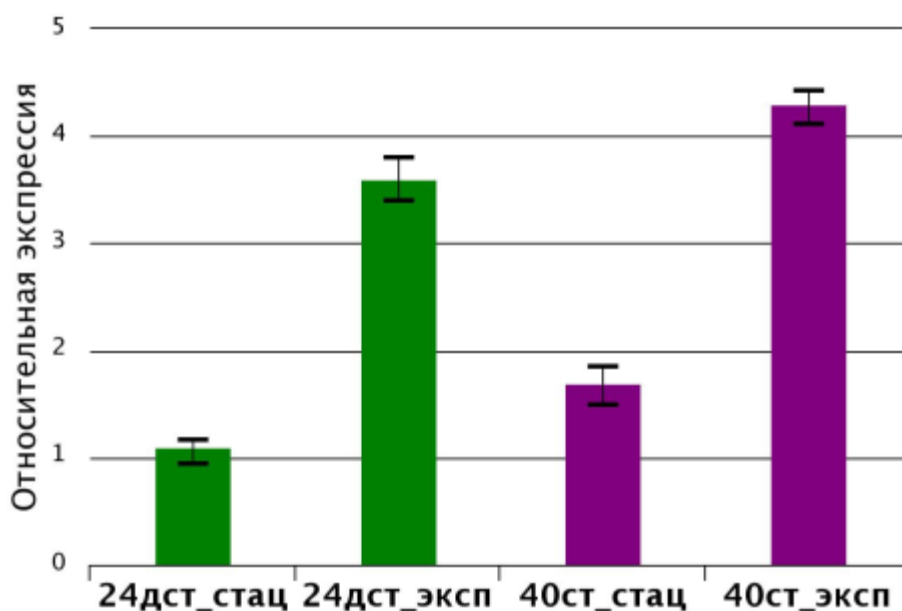
Увеличение экспрессии ТА системы происходило для всех 3-х штаммов при 48°C, хотя и в разной степени. При кислотном и солевом стрессе экспрессия ТА системы не менялась. При сочетании обоих факторов стресса (температура и NaCl), были получены промежуточные значения.

Основываясь на результатах по относительной экспрессии штаммов *L. rhamnosus*, для дальнейших исследований ТА системы *YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>* нами были выбраны условия стресса в виде температурного шока (10 минут – 48°C). Ранее было описано (см. раздел 4), что в гене токсина *yoeB<sub>Lrh</sub>* у штамма 40ст есть одиночная нуклеотидная замена, приводившая к аминокислотной замене в белке (Asp62→Glu62). Эта мутация полностью устраняла токсический эффект белка в клетках *E.coli*. Были проделаны опыты с теми же праймерами, ДНК штаммов *L.rhamnosus* 24дст и 40ст и геном-маркером *ileS*. РНК получали из стационарных культур (18 часов) и культур экспоненциальной стадии роста (8 часов), выращенных при 37°C и 48°C. Мы сравнили экспрессию генов в экспоненциальных и стационарных культурах (рисунок 31).



**Рисунок 31** – Экспрессия генов *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus* для 8-ми часовой культуры по сравнению с 18-часовой. Контроль – ген *ileS*.

Далее мы сравнили экспрессию при стрессовых условиях (48<sup>0</sup>C), относительно нормальных (37<sup>0</sup>C) (рисунок 32).



**Рисунок 32** – Экспрессия генов *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus* в стрессовых условиях при 37<sup>0</sup>C относительно 48<sup>0</sup>C. Контроль – ген *ileS*.

Транскрибировалась и ТА системы в штамме 40ст, несмотря на то, что мутация в гене токсина делала его неактивным. Температурный шок увеличивал транскрипцию только в экспотенциально растущей культуре, но не в стационарной.

Как показали данные RT-PCR, гены *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus* считаются на одной мРНК, т.е. образуют оперон. Перед опероном мы обнаружили некодирующий фрагмент ДНК размером около 300 пн, многократно повторенный в межгенных районах различных штаммов; мы назвали этот фрагмент BOX'ом по аналогии с подобным элементом ДНК, описанным у пневмококков. У пневмококков BOX-элемент влияет на экспрессию соседних генов и регуляцию таких процессов, как смена фаз, вирулентность, компетентность в генетической трансформации и способен к перемещению по геному [Knutsen E. et al., 2006]. BOX, расположенный перед опероном *yefM-yoeB<sub>Spn</sub>* *S.pneumoniae*, содержал промотор и влиял на экспрессию оперона [Chan W. et al., 2011]. В идентифицированном нами BOX-элементе мы не смогли обнаружить промотор – ни при анализе его нуклеотидной последовательности, ни при клонировании в векторе с геном-репортером. Можно только предполагать, что у *L.rhamnosus*, как и у *S.pneumoniae*, BOX участвует в перестановках и транспозициях фрагментов генома.

Мы обнаружили также новую небольшую ORF – ORF 27, расположенную после локуса *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus*. Мы также смогли идентифицировать соответствующую ORF 27 точку инициации транскрипции. ORF 27 не перекрывалась с геном токсина *yoeB<sub>Lrh</sub>*, однако способ определения точки инициации транскрипции несомненно свидетельствует о том, что 3' конец РНК, соответствующей ORF 27, перекрывается с 3' концом гена *yoeB<sub>Lrh</sub>*. Мы не смогли идентифицировать вблизи ORF 27 сайт связывания с рибосомами; возможно, данная РНК транслируется как “leaderless” РНК или является нетранслируемой регуляторной РНК. Данный транскрипт сходен по расположению с антитоксином I типа, характерным для *Bacillus subtilis* (ТА системы TxpA/RatA, BsrG/SR4, YonT/AS-YonT). Эти антитоксины взаимодействуют с 3' концом мРНК токсина и образуют 2-х цепочечную РНК, которая разрушается нуклеазами [Brantl S. et al., 2012].

В самом локусе *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>* *L. rhamnosus* мы идентифицировали три сайта инициации транскрипции, в каждом из сайтов транскрипция начиналась с двух близлежащих нуклеотидов. Один из сайтов располагался перед геном антитоксина, два других – внутри гена антитоксина, в середине его (tss 1/2) и конце (tss 4/3). РНК, синтезируемые с этих tss, соответствовали С-концевой части гена антитоксина и гену токсина. Необычное расположение точек инициации транскрипции внутри функционирующего гена предполагает жесткую стабильность этих сайтов. У ТА систем II типа белок антитоксина обычно имеет два активных домена: С-концевой взаимодействует с белком токсина и нейтрализует его активность, а N-концевой представлен ДНК-связывающим районом, он взаимодействует с промотором оперона и регулирует его транскрипцию (см. раздел 1.2.2). Возможно, гипотетический пептид ΔYoeB, для которого РНК транскрибируется с tss 4/3,

имеет только одну функцию - подавлять активность токсина, но не регулировать транскрипцию оперона.

Сайты связывания с сигмой 70 субъединицей РНК полимеразы и рибосомой мы смогли идентифицировать только для *tssAT*, расположенной перед геном антитоксина. Именно соответствующий участок ДНК показал активность как промотор при клонировании в плазмиде с геном-репортером. Для двух других участков, *tss 1/2* и *tss 4/3*, показать промоторную активность не удалось. Возможно, эти сайты узнаются сигма-факторами, специфичными для лактобацилл или активными в определенных стрессовых условиях. Перед обоими этими сайтами мы обнаружили последовательность TGG.....TGG, сходную с промотором, узнаваемым субъединицей сигма-54 РНК полимеразы [Stevens, M.J. et al., 2010]. Гипотетические РНК, которые образуются с *tss 1/2* и *tss 3/4*, могут быть и регуляторными нетранслируемыми РНК. Возможно, они транслируются по т.н. *leaderless* механизму. Следует отметить, что перед всеми 4-мя *tss* есть инвертированный повтор. Следует отметить, что перед всеми 4-мя *tss* есть инвертированные повторы, а перед *tssAT* и *tss 4/3* – и прямые повторы.

При изучении транскрипции оперона мы показали, что на активность транскрипции влияют температура и стадия роста культуры. Используемые в работе штаммы *L.rhamnosus* имели идентичную нуклеотидную последовательность как оперона, так и окружающих его участков ДНК. Однако изменение активности транскрипции, определяемое RT-PCR (рисунок 29), и активность различных сайтов инициации транскрипции (рисунок 26) у разных штаммов были различны. Вероятно, в регуляции активности ГА системы участвуют различные белки клетки. Возможно, отчасти эти отличия обусловлены различными нишами обитания штаммов. Так, штаммы 24дст и 50зв в разных стрессовых условиях реагировали сходно и отлично от штамма B51; штаммы 24дст и 50зв были выделены из одной ниши тела человека (ротовой полости), а штамм B51 выделен из вагинальной полости.



### 3.6 Поиск и характеристика новых ТА систем у *L.helveticus*

В последние 10 лет происходит интенсивное изучение структуры, функций и распространения хромосомных ТА систем бактерий. Обнаруживаются новые типы и семейства ТА систем. Поиск новых ТА систем у лактобацилл обусловлен тем, что, с одной стороны, это важные элементы регуляторной системы клетки, а с другой – тем, что они могут быть использованы для штаммовой идентификации, в том числе при метагеномном анализе.

#### 3.6.1 Поиск новых ТА систем в секвенированных геномах *L.helveticus*

Из литературных данных известно, что в подавляющем большинстве случаев ТА системы II типа организованы стандартно: гены токсина и антитоксина расположены либо на близком расстоянии друг от друга (до 70 пн), либо перекрываются (на 30 пн); ген антитоксина предшествует гену токсина и его длина, обычно, меньше [Sevin E.W. et al., 2007], оперон имеет величину примерно 800 пн. На основе этих данных с помощью написанного нами скрипта по вышеуказанным параметрам мы попытались найти новые предполагаемые ТА системы в геномах секвенированных и аннотированных штаммов *L.helveticus* из GenBank. Применяв данный скрипт для анализа полностью секвенированных штаммов *L.helveticus* из GenBank (DPC4571, R0052, H10), мы получили список генов-кандидатов, удовлетворяющих заданным параметрам. Для штамма *L.helveticus* DPC4571 было найдено двадцать семь, для штаммов *L.helveticus* H10 – тридцать пять и для *L.helveticus* R0052 – шестьдесят две предполагаемых пары генов, удовлетворяющих заданным параметрам.

Далее были удалены гены-кандидаты с функцией явно не удовлетворяющей свойствам ТА систем, такие как, например, гены 30S или 50S рибосомальных субъединиц. В итоге в списке осталось одиннадцать предполагаемых ТА систем в штамме DPC4571, десять предполагаемых ТА систем в штамме H10 и тридцать две предполагаемые ТА системы в штамме R0052. Перечень предполагаемых ТА систем приведён в приложении В. Далее по гомологии аминокислотных последовательностей с помощью программы blastp определялись ТА системы, сходные у штаммов *L.helveticus* H10, DPC4571 и R0052. В конечном счете, у нас осталось 27 различных ТА систем.

Таким образом, поиск в базе данных и анализ гомологии аминокислотных последовательностей позволил выделить новые предполагаемые ТА системы в уже аннотированных геномах. Продукты большинства генов в предполагаемых ТА системах определялись как «гипотетический белок», однако были и белки, функцию которых можно было предположить по наличию определенных доменов.

### 3.6.2 Идентификация и полиморфизм новых ТА систем в штаммах *L.helveticus* из лабораторной коллекции

На следующем этапе мы определяли наличие генов токсинов обнаруженных новых 27 ТА систем в четырех штаммах *L.helveticus* российского происхождения, выделенных из организма людей: 100аш, NK1, NNIE, Er315. Для этого были созданы праймеры по концам генов предполагаемых токсинов (см. материалы и методы, таблица 7), и проведена ПЦР с хромосомной ДНК исследуемых штаммов. В результате гены восемнадцати (из двадцати семи) идентифицированных ранее токсинов были обнаружены в геномах штаммов *L.helveticus* из лабораторной коллекции (таблица 24).

**Таблица 24.** Предполагаемые ТА системы в штаммах *L.helveticus* и геномный полиморфизм по предполагаемым генам токсинов.

ТА система	Локус Tag	Штаммы из лабораторной коллекции				Штаммы из GenBank		
		100аш	Er315	NK1	NNIE	H10	DCP5471	R0052
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ТА1 <sub>Lhv</sub>	LBHH_0842-0843	+	+	+	-	+	-	+
ТА2 <sub>Lhv</sub>	Lhv_2095-2096	+	+	+	+	-	+	+
ТА3 <sub>Lhv</sub>	LBHH_1976-1977	+	+	+	-	+	+	-
ТА4 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0782-0783	+	+	+	+	+	+	+
ТА5 <sub>Lhv</sub>	R0052_02870-02875	+	+	+	+	+	-	+
ТА6 <sub>Lhv</sub>	R0052_03145-03140	+	+	+	+	+	+	+
ТА7 <sub>Lhv</sub>	R0052_05470-05465	+	+	+	+	+	+	+
ТА8 <sub>Lhv</sub>	R0052_00225-00230	-	-	-	+	+	-	+
ТА9 <sub>Lhv</sub>	R0052_11615-11620	+	-	+	+	+	-	+
ТА10 <sub>Lhv</sub>	R0052_06470-06465	+	+	+	+	-	-	+
ТА11 <sub>Lhv</sub>	R0052_10550-10555	+	+	+	+	+	+	+
ТА12 <sub>Lhv</sub>	R0052_10565-10560	+	+	+	+	+	+	+
ТА13 <sub>Lhv</sub>	R0052_07345-07350	-	-	-	+	+	+	+
ТА14 <sub>Lhv</sub>	Lhv_2403 – 0815	+	+	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9
TA15 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0860-2407	+	+	+	+	+	+	+
TA16 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0454-0455	+	+	+	+	+	+	-
TA17 <sub>Lhv</sub>	R0052_03080-03085	+	+	+	+	+	-	-
TA18 <sub>Lhv</sub>	R0052_08040-08035	+	+	+	+	-	+	-

В результате нами было показано, что по наличию или отсутствию генов предполагаемых токсинов ТА систем лабораторные штаммы отличались друг от друга (таблица 24). Гены предполагаемых токсинов распределяются в штаммах из лабораторной коллекции неодинаково, что позволяет нам говорить о геномном полиморфизме по данным локусам.

Для изучения генного полиморфизма определялась нуклеотидная последовательность продуктов ПЦР и сравнивалась с последовательностями генов предполагаемых токсинов в секвенированных штаммах *L.helveticus* из GenBank. Штаммы демонстрировали значительный генный полиморфизм (таблица 25). При сравнении нуклеотидных последовательностей, за референсную бралась последовательность соответствующего гена в штамме, в котором была обнаружена предполагаемая ТА система.

**Таблица 25.** Полиморфизм предполагаемых новых генов токсинов в штаммах *L.helveticus* из лабораторной коллекции. В столбцах 5 и 6 указаны число и положение нуклеотидных и аминокислотных замен в генах и белках токсинов лабораторных штаммов по сравнению с референсным штаммом.

ТА системы	Локус таг гена токсина	Лабораторные штаммы	Референсный штамм	Нуклеотиды	Аминокислоты
1	2	3	4	5	6
TA1 <sub>Lhv</sub>	LBHH_0843	100аш, Er315, NK1	H10	1 (№561 G→T)	1 (№187 Glu→Asp)
TA2 <sub>Lhv</sub>	Lhv_2095	100аш, Er315, NK1 NNIE	DPC 4571	0 1 (№163 G→A)	0 1 (№54 Ala→Thr)
TA3 <sub>Lhv</sub>	LBHH_1997	100аш, Er315, NK1	H10	3 (№194 C→T) (№222 C→T) (№338 A→G)	2 (№65 Thr→Ile) (№113 Tyr→Cys)
TA4 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0783	100аш, Er315, NK1, NNIE	DPC 4571	3 (№174 T→C) (№238 T→G) (№256 A→G)	2 (№80 Cys→Gly) (№86 Thr→Ala)
TA5 <sub>Lhv</sub>	R0052_02870	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	3 (№106 T→G) (№141 G→A) (№352 A→G)	2 (№36 Ser→Ala) (№118 Arg→Gly)

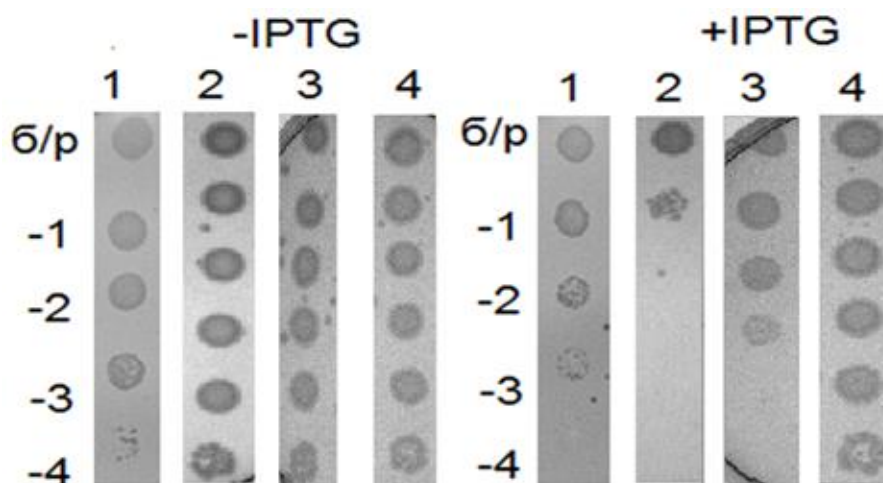
1	2	3	4	5	6
TA6 <sub>Lhv</sub>	R0052_03145	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	3 (№24 A→T) (№239 C→T) (№263 T→C)	1 (№88 Val→Ala)
TA7 <sub>Lhv</sub>	R0052_05470	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	(№13 A→G) (№31 C→T) (№240 A→C) (№556 A→G) (№559 A→G) (№580 insC)	5 (№5 Thr→Ala) (№11 Gln→stp) (№186 Lys→Glu) (№187 Asn→Asp) (№194 frameshift)
TA8 <sub>Lhv</sub>	R0052_00225	NNIE	R0052	1 (№102 C→T)	0
TA9 <sub>Lhv</sub>	R0052_11615	100аш, NK1, NNIE	R0052	1 (№337 A→G)	1 (№113 Tyr→Cys)
TA10 <sub>Lhv</sub>	R0052_06470	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	1 (№119 A→G)	1 (№40 Asp→Gly)
TA11 <sub>Lhv</sub>	R0052_10550	100 аш	R0052	1 (№84 G→A)	0
		Er315, NK1, NNIE		0	0
TA12 <sub>Lhv</sub>	R0052_10565	100аш, Er315, NK1	R0052	3 (№152 G→A) (№158 A→C) (№195 T→G)	2 (№51 Cys→Tyr) (№53 Glu→Ala)
		NNIE		2 (№158 A→C) (№195 T→G)	1 (№53 Glu→Ala)
TA13 <sub>Lhv</sub>	R0052_07345	NNIE	R0052	0	0
TA14 <sub>Lhv</sub>	Lhv_2403	100аш, Er315, NK1, NNIE	DPC 4571	0	0
TA15 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0860	100аш, Er315, NK1, NNIE	DPC 4571	0	0
TA16 <sub>Lhv</sub>	Lhv_0454	Er315, NK1, NNIE	DPC 4571	0	0
TA17 <sub>Lhv</sub>	R0052_03080	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	0	0
TA18 <sub>Lhv</sub>	R0052_08040	100аш, Er315, NK1, NNIE	R0052	0	0

Внутри каждой из выявленных и проанализированных систем нуклеотидные последовательности генов у всех 4-х лабораторных штаммов были идентичны или отличались единичными заменами за исключением одной системы – TA7<sub>Lhv</sub>, в которой была показана значительная деградация гена токсина.

### 3.6.3 Клонирование и экспрессия в клетках *E.coli* генов новых ТА систем *L.helveticus*

Чтобы выяснить, проявляют ли продукты идентифицированных генов токсинов *L.helveticus* ингибирующую активность именно как токсины, мы определили влияние экспрессии данных генов на рост клеток *E.coli*. Гены токсинов были клонированы в клетках *E.coli* на экспрессионном векторе pET-32a. Клонированы гены *Lhv\_2403*, *Lhv\_0860*, *LBHH\_0843*, *Lhv\_2095*, *LBHH\_1997*, *Lhv\_0783*, *Lhv\_0454* из штамма NK1, а также гены *R0052\_02870*, *R0052\_03080*, *R0052\_03145*, *R0052\_05470*, *R0052\_00225*, *R0052\_11615*, *R0052\_06470*, *R0052\_08040*, *R0052\_10550*, *R0052\_10565*, *R0052\_07345* из штамма NNIE. Влияние экспрессии клонированных генов токсинов на рост клеток *E.coli* определяли на твердой и в жидкой средах (см. материалы и методы).

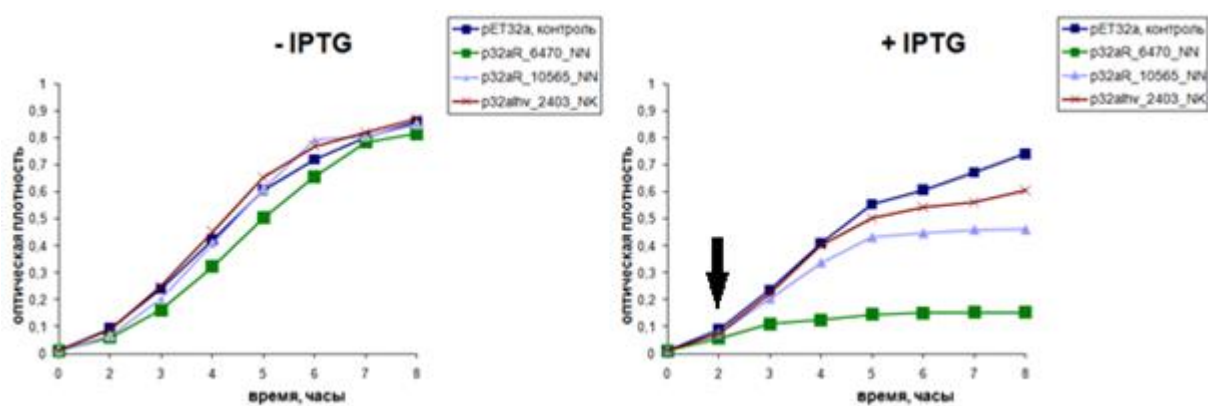
На твердой среде. Для штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды p32a*lhv\_2403\_NK*, p32a*R\_6470\_NN* и p32a*R\_10565\_NN* с клонированными генами токсинов *lhv\_2403*, *R0052\_06470* и *R0052\_10565*, эффективность роста на чашках с IPTG была значительно ниже, чем на чашке без индуктора. Таким образом, индукция данных белков в значительной степени подавляла рост клеток *E.coli*. Для штаммов *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с другими предполагаемыми токсинами, эффективность роста на чашках с IPTG и на чашках без индуктора не отличалась (рисунок 33).



**Рисунок 33** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов *L.helveticus* на рост штамма *E.coli* BL21(D3) на твердой среде, содержащей плазмиды:

1 – p32a*lhv\_2403\_NK*; 2 – p32a*R\_6470\_NN*; 3 – p32a*R\_10565\_NN*; 4 – контроль, вектор pET32a.

В жидкой среде выявляли активность генов, проявивших свою активность в опытах на твердой среде, путем измерения оптической плотности культуры (рисунок 34).



**Рисунок 34** – Характер роста штаммов *E.coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами токсина (стрелкой показано время добавления индуктора).

При росте в жидкой среде индукция клонированных генов токсинов *Lhv\_2403*, *R0052\_06470* и *R0052\_10565* дает значительное уменьшение скорости роста культуры; в наибольшей степени этот эффект проявлялся для гена *R0052\_06470*. Это свидетельствует о проявлении активности данных генов как генов токсинов.

После выявления новых ТА систем, у которых белки токсинов проявляли активность в клетках *E.coli*, мы провели поиск белков, гомологичных токсинам и анитоксинам данных систем, в других организмах с помощью алгоритма blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) (таблица 26).

**Таблица 26** Предполагаемые функции белков новых гипотетических ТА систем *L.helveticus*

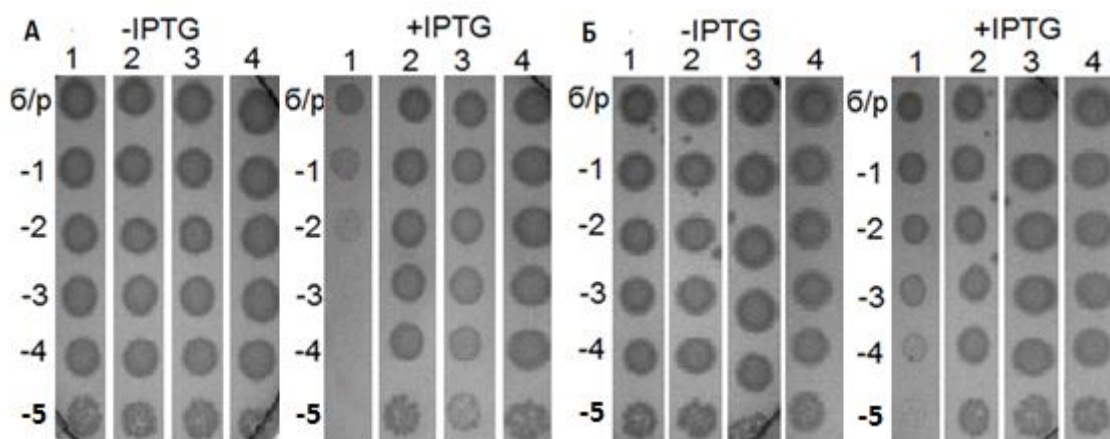
ТА система	Белок		Величина	Предполагаемая функция белка по данным алгоритма BlastP и базы данных NCBI
	Предполагаемый токсин	Предполагаемый анитоксин		
TA14 <sub>Lhv</sub>		Lhv_0815	75aa	Белок неизвестной функции, свойственный лактобациллам
	Lhv_2403		97aa	Мембранный белок; гемолизин
TA10 <sub>Lhv</sub>		R0052_06465	45aa	Белок деления клетки
	R0052_06470		74aa	Гипотетический белок
TA12 <sub>Lhv</sub>		R0052_10560	73aa	Гипотетический белок; транскрипционный регулятор семейства XRE
	R0052_10565		75aa	Транскрипционный регулятор

Из таблицы видно, что ближайшие гомологи обоих генов системы R0052\_10560-10565 относятся к семейству транскрипционных регуляторов. Обычно к данному семейству принадлежат анитоксины. Данная гипотетическая ТА система необычна еще и тем, что гены/белки Т и А

имеют одинаковую величину; обычно Т больше А. Токсическое действие белка R0052\_10565 может быть связано с каким-то новым неизученным его доменом. Возможно и другое объяснение токсического действия белка. Используемый для определения активности клонированного гена Т штамм *E.coli* содержит более 8 ТА систем; белок R0052\_10565 может влиять на экспрессию какой-либо из этих ТА систем и активировать токсин этой системы. Нужно отметить, что негомологичная ТА система *L.helveticus*, состоящая из 2-х генов антитоксинов, была описана нами в разделе 2 и 3 (RelBB4<sub>Lhv</sub>). Для гена предполагаемого токсина R0052\_6470 системы R0052\_6465-6470 не было обнаружено ни для одного гомолога с известной функцией. Все они были аннотированы как гипотетические белки. Гомологи генов системы Lhv\_2403-0815 относились к нескольким различным семействам. Для гомологов гена предполагаемого антитоксина была показана принадлежность к семейству ДНК-связывающих белков, однако процент гомологии при этом довольно низкий (не более 35%). Для гомологов токсина была показана принадлежность к семействам гемолизин и мембранных белков. Судя по данным таблицы 26, все три гипотетических токсина не имеют рибонуклеазной активности, свойственной подавляющему большинству токсинов II типа и являются новыми типами токсинов.

Далее мы изучили в клетках *E.coli* BL21(DE3) способность антитоксинов ингибировать действие токсинов Lhv\_2403, R0052\_06470 и R0052\_10565. Для этого в клетках *E.coli* BL21(DE3) совмещали ген антитоксина - на плазмиде рЕТ-32а, и ген токсина на плазмиде рACYCDuet-1. Характер роста штаммов определяли на твердой среде с добавлением IPTG и без него.

Штаммы *E.coli*, содержащие клонированный ген токсина R0052\_10565, резко замедляли рост после добавления индуктора (рисунок 35А). Введение в клетки *E.coli*, несущие плазмиду рDuetR\_10565\_NN с клонированным геном токсина R0052\_10565, плазмиды р32R\_10560\_NN с геном антитоксина R0052\_10560, изменяло характер роста штамма, делая его практически неизменным в присутствии IPTG и без него (рисунок 35Б). Для систем Lhv\_2403-0815 и R0052\_06470-06465 с клонированными в плазмиду рACYCDuet-1 токсинами подобного эффекта не наблюдалось. Более того, клонированные в рACYCDuet-1 токсины Lhv\_2403 и R0052\_06470 без антитоксина даже на среде с IPTG не изменяли характера своего роста (рисунок 35А). Вероятно, это объясняется тем, что копияность плазмиды рACYCDuet-1 меньше (10-12), чем плазмиды рЕТ32а ( $\approx 40$ ), и количество синтезированного токсина, возникающего в ответ на индукцию при помощи IPTG, не хватает для проявления видимого эффекта.



**Рисунок 35** – Влияние экспрессии клонированных генов токсинов (А), ТА систем (Б) *L.helveticus* на рост штамма *E.coli* BL21(D3) на твердой среде.

Штаммы содержат плазмиды:

1 – pDuetR\_10565\_NN; 2 – pDuetR\_6470\_NN;  
3 – pDuetlhv\_2403\_NK; 4 – контроль, вектор pACYCDuet-1.

Таким образом, на шестом этапе работы в 3-х аннотированных геномах *L.helveticus* из GenBank выявлено *in silico* 27 пар генов, предположительно относящихся к генам ТА систем. В четырех штаммах *L.helveticus* (100аш, NKI, NNIE, Er315/402), выделенных из микробиоты людей центрального региона России, идентифицированы 18 из этих гипотетических ТА систем. Определены нуклеотидные последовательности генов предполагаемых токсинов для этих ТА систем. Показано, что штаммы обладают геномным и практически не обладают генным полиморфизмом по данным локусам. Из 18 клонированных на плазмиде pET32a генов предполагаемых токсинов, только три проявляют активность в клетках *E.coli* BL21 (DE3) как токсины, подавляя рост бактериальных клеток. Для одной из них, R0052\_10565-10560, при совместном клонировании в клетках *E.coli* BL21 (DE3) гена токсина (на плазмиде pACYCDuet-1) и гена антитоксина (на плазмиде pET32a) оба гена проявляли активность. Все это позволяет полагать, что данные три системы могут быть новыми типами ТА систем.



### 3.7 Системы ТА суперсемейства RelBE как биомаркеры для идентификации штаммов лактобацилл

В настоящей работе у *L.rhamnosus*, *L.casei* и *L.helveticus* обнаружено только несколько ТА систем суперсемейства RelBE. По-видимому, общее число ТА систем у данных видов больше, что следует из результатов работы, описанных в предыдущем разделе.

Первоначально мы обнаружили, что исследованным штаммам *L.rhamnosus* (таблица 16, раздел 3), *L.helveticus* (таблица 22, раздел 3), и *L.casei* свойственны различный набор ТА систем RelBE типа. Мы предположили, что генный и геномный полиморфизм ТА систем может быть использован для характеристики отдельных штаммов и других видов лактобацилл.

Основываясь на полученных результатах по распределению ТА систем в штаммах *L.rhamnosus*, мы решили посмотреть, как системы суперсемейства RelBE будут распределены в других видах бактерий рода *Lactobacillus* из GenBank, имеющих полногеномный сиквенс на стадии «complete». За основу были взяты уже проаннотированные гены суперсемейства RelBE в штаммах *L.rhamnosus*, *L.helveticus*, *L.casei* из GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>], которые описаны в разделе 2. Была сконструирована база генов токсинов и антитоксинов, которая использовалась для первичной аннотации генов в штаммах других видов *Lactobacillus*. Для каждого гена мы изучали распределение как на видовом, так и на штаммовом уровне и разнообразие аннотированных генов среди всех штаммов *Lactobacillus*, имеющих полногеномный сиквенс.

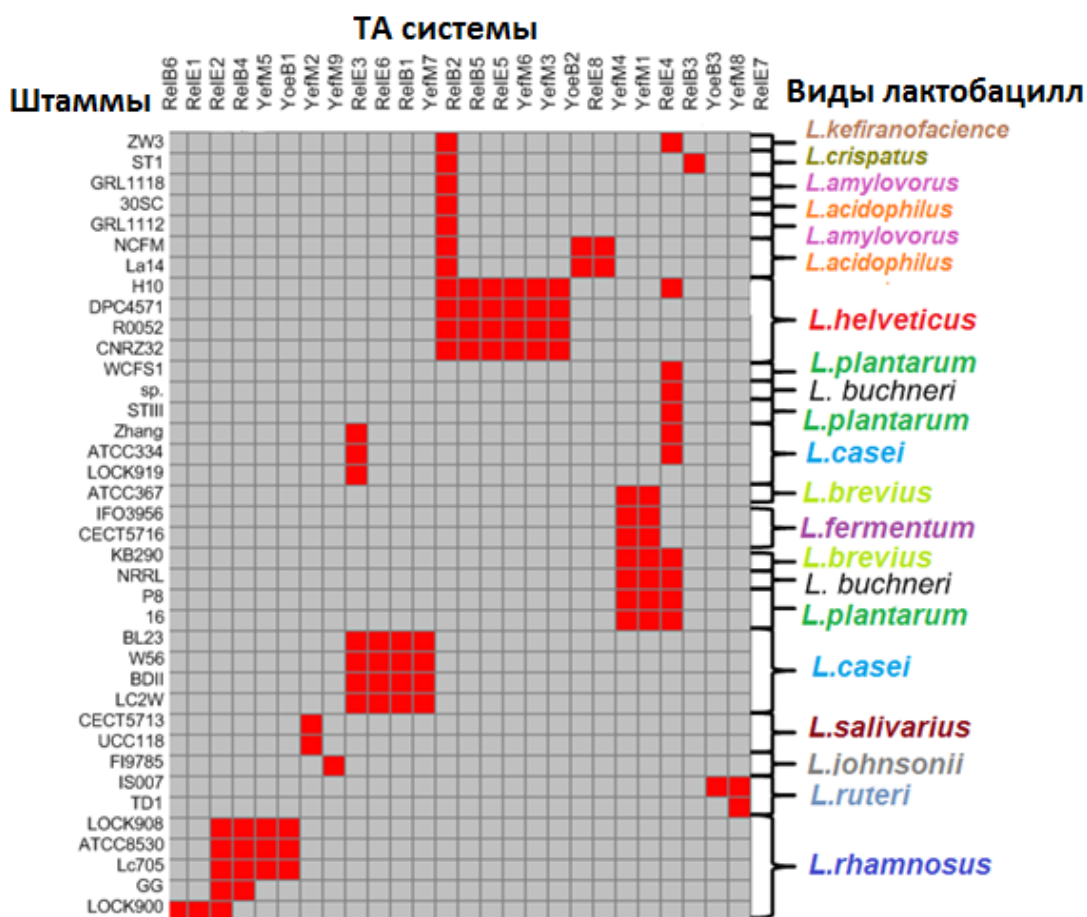
Для распределения генов токсинов и антитоксинов были взяты бактерии рода *Lactobacillus*, имеющие полногеномный сиквенс, а именно: 5 штаммов *L. rhamnosus*; 4 штамма *L. helveticus*; 3 штамма *L. acidophilus*; 7 штаммов *L. casei*; 2 штамма *L. salivarius*; 2 штамма *L. fermentum*; 2 штамма *L. reuteri*; 4 штамма *L. plantarum*; 2 штамма *L. buchneri*; 2 штамма *L. brevis*; 2 штамма *L. amylovorus*; 1 штамм *L. crispatus*; 1 штамм *L. kefiranofaciens*; 1 штамм *L. johnsonii*.

Все нуклеотидные последовательности генов и их выравнивание представлены в приложении Д. В таблице 27 приведено распределение генов суперсемейства RelBE по видам лактобацилл.

Таблица 27. Распределение генов суперсемейства RelBE по видам лактобацилл.

Гены	Вид лактобацилл
<i>relE1</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>relE2</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>relE3</i>	<i>L. casei</i>
<i>relE4</i>	<i>L. brevis, L. fermentum, L. plantarum, L. buchneri</i>
<i>relE5</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>relE6</i>	<i>L. casei</i>
<i>relE7</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>relE8</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>relB1</i>	<i>L. casei</i>
<i>relB2</i>	<i>L. acidophilus, L. amylovorus, L. helveticus, L. crispatus, L. kefiranofaciens</i>
<i>relB3</i>	<i>L. helveticus, L. plantarum, L. kefiranofaciens, L. brevis, L. casei, L. buchneri</i>
<i>relB4</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>relB5</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>relB6</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>yoeB1</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>yoeB2</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>yoeB3</i>	<i>L. crispatus</i>
<i>yefM1</i>	<i>L. plantarum, L. buchneri, L. fermentum, L. brevis</i>
<i>yefM2</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>yefM3</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>yefM4</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>yefM5</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>yefM6</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>yefM7</i>	<i>L. casei</i>
<i>yefM8</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>yefM9</i>	<i>L. johnsonii</i>

После проведенной расширенной аннотации по генам суперсемейства RelBE в бактериях рода *Lactobacillus* была построена диаграмма, показывающая наличие или отсутствие гена токсина или антитоксина в бактериях. На рисунке 36 показано распределение систем токсин-антитоксин в разных видах и штаммах бактерий рода *Lactobacillus*. Красным цветом показывается наличие гена, серым – его отсутствие.



**Рисунок 36** – Распределение ТА систем RelBE в штаммах *Lactobacillus*.

На рисунке 36 видно, что распределение генов токсинов и антитоксинов видо- и штаммоспецифично. Наиболее отдаленные виды не имеют пересекающихся генов Т и А. Штаммы, относящиеся к одному виду бактерий, имеют сходный, но не всегда идентичный набор генов Т и А. Распределение ТА систем среди штаммов *L.rhamnosus* на рисунке 36 совпадает с экспериментально проведенными результатами распределения ТА систем (таблица 16, 22). Штаммы *L.rhamnosus* (LOCK908, ATCC8530, Lc705) составляют одну подгруппу, штамм *L.rhamnosus* GG и штамм *L.rhamnosus* LOCK900 имеют совершенно другую комбинацию ТА систем. Эти данные соответствуют распределению в таблице 16: штаммы *L.rhamnosus* (ATCC8530, Lc705) входят в одну группу, а штамм *L.rhamnosus* GG в другую.

На основе проведенной аннотации по генам Т и А в секвенированных геномах лактобациллах мы показали, что данные гены можно использовать для идентификации видов и штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Предложенный нами метод видовой и штаммовой идентификации может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например, в микробиоте человека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена аннотация лабораторной коллекции лактобацилл – определена видовая принадлежность 62-х штаммов по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Среди штаммов, выделенных из микробиоты здоровых людей центральной области России, чаще других встречаются виды *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* и *L. casei*.

ТА системы присутствуют в геномах подавляющего большинства видов бактерий и архей. Они участвуют в различных регуляторных процессах в клетке, в том числе в ответе клетки на стресс. У лактобацилл данные системы практически не изучены. Мы идентифицировали в геномах аннотированных штаммов лактобацилл из GenBank шесть различных ТА систем II типа суперсемейства RelBE; два гена токсина соло; одну ТА систему, состоящую из двух генов антитоксинов. Методом ПЦР-анализа все эти системы были обнаружены в штаммах лактобацилл из лабораторной коллекции. ТА системы суперсемейства RelBE демонстрируют значительный полиморфизм, как геномный, так и генный. Штаммы лактобацилл имеют свой специфический набор генов токсинов и антитоксинов, что позволяет использовать полиморфизм ТА систем для характеристики видов и отдельных штаммов. Клонированные гены токсинов четырех ТА систем в различной степени подавляли или ограничивали рост модельного объекта для таких исследований *E. coli*, что свидетельствует об их функциональности.

Штаммы отличаются не только наличием и строением ТА систем, но и типом их регуляции. Анализ ТА системы *L. rhamnosus* YefM-YoeB позволил обнаружить участок ВОХ, предшествующий гену антитоксина, и четыре точки инициации транскрипции. Используемые в работе штаммы *L. rhamnosus* имели идентичную нуклеотидную последовательность как ТА генов, так и окружающих их участков ДНК. Однако у разных штаммов изменение уровня транскрипции при изменении условий роста (по данным RT-PCR) и активность различных сайтов инициации транскрипции (по данным primer extension) были различны. Вероятно, по-разному регулируемые ТА системы участвуют в клеточной регуляторной сети и обеспечивают приспособление различных штаммов лактобацилл к изменяющимся условиям жизни и стрессовым факторам окружающей среды.

Постоянно растущее число описанных ТА систем позволяет предположить, что и в клетках лактобацилл нам известны далеко не все. Разработанный нами алгоритм позволил обнаружить в геномах *L. helveticus* новые гипотетические ТА системы II типа. 3 токсина проявили активность в клетках *E. coli*.

Суммируя наши результаты, можно сказать, что мы впервые описали, исследовали строение и регуляцию ТА систем лактобацилл на примере суперсемейства RelBE и показали возможность использования этих систем для характеристики видов и штаммов лактобацилл.

## ВЫВОДЫ

1. В аннотированных геномах *L.rhamnosus*, *L.helveticus* и *L.casei* из GenBank *in silico* идентифицированы 6 ТА систем суперсемейства RelBE, два гена токсина *relE* соло и одна система RelBB, состоящая из 2-х генов антитоксинов.

2. Установлено, что штаммы лактобацилл обладают генным и геномным полиморфизмом по ТА системам суперсемейства RelBE. Распределение ТА систем у лактобацилл видов- и штаммоспецифично и может быть использовано для видовой и штаммовой характеристики.

3. Для ТА систем YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>, RelBE3<sub>Lrh</sub>, RelE1<sub>Lhv</sub>, RelBE3<sub>Lhv</sub> показана активность как токсинов, так и антитоксинов в клетках *E.coli*.

4. Показана сложная структурная организация ТА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>: обнаружен участок ВОХ, предшествующий гену антитоксина и 4 предполагаемых промотора в опероне *yefM-yoeB<sub>Lrh</sub>*.

5. Экспрессия ТА системы YefM-YoeB<sub>Lrh</sub> в штаммах *L.rhamnosus* зависит от стадии роста культуры и температуры. Эта зависимость проявляется по-разному в разных штаммах лактобацилл.

6. В 3-х аннотированных геномах *L.helveticus* из GenBank *in silico* выявлено 27 пар генов, относящихся к генам новых гипотетических ТА систем II типа. 18 из них были обнаружены в штаммах *L.helveticus* из лабораторной коллекции. Три гена предполагаемых токсинов проявили активность в клетках *E.coli*.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ

ТА система – токсин-антитоксин система

Т – токсин

А – антитоксин

16S РНК - один из трёх основных типов рибосомальной РНК, образующих основу рибосом прокариот, находятся в их малой субъединице; константа седиментации равна 16S (единиц Сведберга)

MRS (MPC) – питательная среда Мозера-Рогоза-Шарпа для работы с чистой культурой и для хранения культур лактобацилл

LB – среда Лурия Бертани

НП – нуклеотидные последовательности

пн – пар нуклеотидов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

АТФ - аденозинтрифосфат

ПЦР – полимиразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимиразная цепная реакция в режиме реального времени

НК – нуклеотид

АК – аминокислота

ORF – открытая рамка считывания

IPTG - изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

OD – оптическая плотность

КОЕ – колониобразующие единицы

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abu Bakar F., Yeo C, Harikrishna J. Expression of the *Streptococcus pneumoniae* *yo*eB chromosomal toxin gene causes cell death in the model plant // *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biotechnology*.- 2015.-15:26.
2. Agarwal S, Mishra NK, Bhatnagar S, Bhatnagar R. PemK toxin of *Bacillus anthracis* is a ribonuclease: an insight into its active site, structure, and function // *J Biol Chem*.- 2010.- № 285.- p. 7254–7270.
3. Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine 3\_,5\_-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.- 1996.- №93.- p. 6059–6063.
4. Bautista-Gallego J, Arroyo-López F, Rantsiou K, Jiménez-Díaz R, Garrido-Fernández A, Cocolin L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential // *Food Res Int*.- 2012.- № 50.- p. 135-142.
5. Bernard P. and Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes // *Journal of Molecular Biology*.- 1992.-vol. 226.- №.3.- p. 735–745.
6. Bernard P., Couturier M. The 41 carboxy-terminal residues of the miniF plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein // *Mol. Gen. Genet*.- 1991.- p. 297–304.
7. Bernard, P., Kezdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., et al. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase // *J MolBiol*.- 1993, p. 534–541.
8. Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions // *Nucleic Acids Res*.- 2001.- p. 2607-2618.
9. Blower TR, Pei XY, Short FL, Fineran PC, Humphreys DP, Luisi BF, Salmond GP. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system // *Nat Struct Mol Biol*.-2011.- №. 18.- p. 185–190.
10. Blower TR, Short FL, Rao F, Mizuguchi K, Pei XY, Fineran PC, Luisi BF & Salmond GPC. Identification and classification of bacterial Type III toxin–antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes // *Nucleic Acids Res*.- 2012.- № 40.- p. 6158–6173.
11. Brantl S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems // *RNA Biol*.-2012.- № 9.- p. 1488–1490.
12. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve // *Proc.Natl.Acad.Sci*.- 2011.- № 108.- p.16050-16055.

13. Brown B.L., Grigoriu S., Kim Y., Arruda J.M., Davenport A., Wood T.K., Peti W., Page R. Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: A novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties // *PLoS Pathog.*- 2009.- 5:e1000706.
14. Bukowski M, Rojowska A, Wladyka B. Prokaryotic toxin-antitoxin systems--the role in bacterial physiology and application in molecular biology // *Acta Biochim Pol.*- 2011.- № 58.- p. 1–9.
15. Bukowski M, Lyzen R, Helbin WM, Bonar E, Szalewska-Palasz A, Wegrzyn G, Dubin G, Dubin A, Wladyka B. A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system PemIKSa // *Nat Commun.*- 2013.- № 4.- p. 2012.
16. Cain AM, Karpa KD. Clinical utility of probiotics in inflammatory bowel disease // *Altern Ther Health Med.*- 2011.- №17(1).- p. 72-79
17. Camacho AG, Misselwitz R, Behlke J, Ayora S, Welfle K, Meinhart A, et al. In vitro and in vivo stability of the  $\epsilon 2\zeta 2$  protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system // *Biol Chem.*- 2002.- № 383.- 1709–1173.
18. Castro-Roa D., Garcia-Pino A., de Gieter S., van Nuland N.A., Loris R., Zenkin N. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu // *Nat. Chem. Biol.*- 2013.- № 9.- p. 811–817.
19. Chan, W.T., Nieto, C., Harikrishna, J.A., Khoo, S.K., et al.. Genetic regulation of the yefM-yoeB toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae* // *J. Bacteriol.*-2011.-№193.-p.4612–4625.
20. Cherny I, Gazit E. The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target // *J. Biol. Chem.*-2004.- № 279.- p.8252–8261.
21. Chono H, Matsumoto K, Tsuda H, Saito N, Lee K, Kim S, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Yasutomi Y, et al. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *E. coli* mRNA interferase // *Hum Gene Ther.*- 2011.- № 22.- p. 35–43.
22. Christensen SK, Gerdes K. RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA // *Mol Microbiol.*- 2003.- № 48.- p. 1389–1400.
23. Christensen SK, Maenhaut-Michel G, Mine N, Gottesman S, Gerdes K, Van Melderen L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeBtoxin-antitoxin system // *Mol. Microbiol.*- 2004.- № 51 .- p. 1705–1717.
24. Collins, M.D., Williams, A.M., and Wallbanks, S. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov // *FEMS Microbiol. Lett.*- 1990.- № 58.- p. 255–262.
25. Delphine MA Saulnier, Jennifer K Spinler, Glenn R Gibson and James Versalovic. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods // *Current Opinion in Biotechnology.*- 2009.- № 20.- p. 135–141.



26. Demidenok OI, Kaprelyants AS, Goncharenko AV. Toxin-antitoxin vapBC locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis* // *FEMS Microbiol Lett.*- 2014.- №352(1).- p. 69-77.
27. Demidenok OI, Goncharenko AV. Bacterial toxin-antitoxin systems and perspectives for their application in medicine: a review // *Prikl Biokhim Mikrobiol.*- 2013.- №49(6).- p. 539-546.
28. Dorr T, Vulic M & Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* // *PLoS Biol.*- 2010.- 8: e1000317.
29. Edgar, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research.* - 2004.- № 32(5).- p. 1792-1797.
30. Engelberg-Kulka H, Hazan R, Amitai S. mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria // *J Cell Sci.*-2005.- № 118.- p. 4327–4332.
31. Faridani OR, Nikravesh A, Pandey DP, Gerdes K, Good L. Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.*- 2006.- 34 (20).
32. Feng Shu, Yun Chen, Katsuhiko Kamada, Han Wang, Kai Tang, Meitian Wang and Yong-Gui Gao. YoeB–ribosome structure: a canonical RNase that requires the ribosome for its specific activity // *Nucleic Acids Research.*- 2013.- Vol. 41.- №. 20.
33. Fico S, Mahillon J. TasA-tasB, a new putative toxin-antitoxin (TA) system from *Bacillus thuringiensis* pGI1 plasmid is a widely distributed composite mazE-doc TA system // *BMC Genomics.*- 2006.- №7. p.259
34. Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GP. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair // *Proc Natl Acad Sci.*- 2009.- № 106.- p. 894–899.
35. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*-2012.-Sep 4;9(10).-p.577-89.
36. Foster J.A. and McVey Neufeld K.A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression // *Trends in Neurosciences.*- 2013.- Vol. 36.- № 5.- p. 305-312.
37. Fozo EM, Hemm MR, Storz G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*- 2008.- 72 (4).- p. 579–589.
38. Fozo EM, Makarova KS, Shabalina SA, Yutin N, Koonin EV, Storz G. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families // *Nucleic Acids Res.*- 2010.- № 38.- p. 3743–3759.

39. Georgiades K, Raoult D. Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin–antitoxin modules // *PLoS One*.- 2011.- 6: e17962.
40. Gerdes K, Bech FW, Jorgensen ST, Lobner-Olesen A, Rasmussen PB, Atlung T, Boe L, Karlstrom O, Molin S, von Meyenburg K. Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the *E. coli* relB operon // *Embo J*.-1986.- 5(8).- p. 2023-2029.
41. Gerdes K, Wagner EG. RNA antitoxins // *Curr Opin Microbiol*.- 2007.- №10.- p. 117–124.
42. Gerdes K. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress // *J. Bacteriol*.- 200.- 182 (3).- p. 561–572.
43. Germain E., Castro-Roa D., Zenkin N., Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA // *Mol. Cell*.- 2013.- № 52.- p. 248–254.
44. Giovanna E. Felis and Franco Dellaglio Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria *Curr. Issues Intest // Microbiol*.- 2007.- № 8.- 44-61.
45. Goeders N., Van Melderen L. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems // *Toxins*.- 2014.- № 6.- p. 304-324.
46. Grady R, Hayes F. Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium* // *Mol Microbiol*.- 2003.- № 47.- p. 1419–1432.
47. Guglielmini J, Van Melderen L. Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere // *Mob Genet Elements*.- 2011.- № 1.- p. 283–290.
48. Gupta A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis* // *FEMS Microbiol Lett*.- 2009.- 290(1).- p. 45-53.
49. Halvorsen E.M., Williams J.J., Bhimani A.J., Billings E.A., Hergenrother P.J. Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe–Txe toxin–antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis // *Microbiology*.- 2011.-Feb; 157(Pt 2).-p.387–397.
50. Hammes, W. P., Vogel R. F. The genus *Lactobacillus* // *The genera of lactic acid bacteria*, vol. 2. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.- 1995.- Vol. 2.- p. 19-54
51. Hazan R, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1 // *Mol Genet Genomics*.- 2004.- № 272.- p. 227–234.
52. Holberger L.E., Garza-Sánchez F., Lamoureux J., Low D.A., Hayes C.S. A novel family of toxin/antitoxin proteins in *Bacillus* species // *FEBS Lett*.-2012.-Jan 20; 586(2).-p.32–136.
53. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U. Overview of gut flora and probiotics // *Int J Food Microbiol*.- 1998.- № 41.- p. 85-101.

54. Hu Y., Benedik M.J., Wood T.K. Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE. *Environ // Microbiol.*- 2012.- № 14.- p. 669–679.
55. Huang C.-H., Chang M.-T., Huang M.-C., Lee F.-L. Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* group using the SNaPshort minisequencing // *Systematic and applied microbiology.*- 2011.- № 34.- p. 586-589.
56. Huang C.-H., Lee F.-L. The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group // *Antonie van Leeuwenhoek.*- 2011.- № 99.- p. 319-327.
57. Hurley JM, Woychik N. Bacterial toxin HigB associates with ribosomes and mediates translation-dependent mRNA cleavage at A-rich sites // *J Biol Chem.*/ 2009.- № 284.- p. 18605–18613.
58. Inouye S., Nariya H. Dual regulation with Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp TCS in *Myxococcus xanthus* // *Adv Exp Med Biol.*- 2008.- № 631.- p. 111-121
59. Jaffé, A., Ogura, T. and Hiraga, S. Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth // *J Bacteriol.*- 1985.- № 163.- p. 841–849.
60. Jones P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics.*- 2014.- 30(9) .- p. 1236-1240.
61. Jorgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea // *J Bacteriol.*-2009.- № 191.- p. 1191–1199.
62. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease // *Nat Rev Microbiol.*- 2008.- № 6. – p. 288–301.
63. Kamada K, Hanaoka F. Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin // *Mol. Cell.*- 2005.- № 19.- p. 497–509.
64. Kelsen JR, Wu GD. The gut microbiota, environment and diseases of modern society // *Gut Microbes.*-2012.- №3(4).- p. 374-382.
65. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* // *J Bacteriol.*- 2004.- № 186.- p. 8172–8180.
66. Khoo SK, Loll B, Chan WT, Shoeman RL, Ngoo L, et al. Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal Toxin-Antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* // *J Biol Chem.*- 2007.- № 282.- p. 19606–19618.
67. Knutsen, E., Johnsborg, O., Quentin, Y., Claverys, J.P., et al. BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development // *J. Bacteriol.*-2006. №188.-p.8307–8312.

68. Ko C.Y., Lin H.-T.V., Tsai G.J. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model // *Process Biochem.*- 2013.- № 48(4).- p. 559-568.
69. Koga M., Otsuka Y., Lemire S. and Yonesaki T. *Escherichia coli* rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system // *Genetics.*-2011.-№187.- p. 123-130.
70. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H. A linear penta-peptide is a quorum sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli* // *Science.*- 2007.- № 318.- p. 652–655.
71. Krasnov, G.S., et al. RPN1, a new reference gene for quantitative data normalization in lung and kidney cancer // *Molecular Biology.*- 2011.- №45(2).- p. 211-220.
72. Kumar S., Kolodkin-Gal I., Engelberg-Kulka H. Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death // *mBio.*- 2013.- Vol. 4.- № 3.- e00314-13
73. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* // Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.- 1991.- p. 115–175.
74. Lee J., Jang J., Kim B., Kim J., Jeong G., Han H. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis // *Journal of Microbiological Methods.*- 2004.- № 59.- p. 1–6.
75. Lehnerr, H., and Yarmolinsky, M.B. Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci.*- 1995. - № 92.- p. 3274–3277.
76. Leplae R., Geeraerts D., Hallez R., Guglielmini J., Drèze P., van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families // *Nucleic Acids Res.*- 2011.- № 39.- p. 5513–5525.
77. Lin C.-Y., Awano N., Masuda H., Park J.-H., Inouye M. Transcriptional repressor HipB regulates the multiple promoters in *Escherichia coli* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*- 2013.- № 23.- p. 440–447.
78. Liu M, Zhang Y, Inouye M, Woychik NA. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit // *Proc Natl Acad Sci.*- 2008.- № 105.- p. 5885–5890.
79. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases // *Proc Natl Acad Sci.*- 2011.- № 108.- 13206–13211.
80. Makarova K. S., Wolf Y. I., and Koonin E. V. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxinantitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes // *Biology Direct.*- 2009.- Vol. 4.- article 19.
81. Markiewicz L.H., Biedrzycka E., Wasilewska E., Bielecka M. Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains // *Folia Microbiol.*- 2010.- № 55, p. 481-488.

82. Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu KP, Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli* // *Mol Microbiol.*- 2012.- № 84.- p. 979–989.
83. Masuda H, Tan Q, Awano N, Yamaguchi Y, Inouye M. A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol Lett.*- 2012.- № 328.- 174–181.
84. Messaoudi M., Violle N., Bisson J.-F., Desor D., Javelot H., Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers // *Gut Microbes.*- 2011.- №2(4).- p. 256-261.
85. Miller S The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins // *Protein Eng.*- 1989.- № 3.- p. 77–83.
86. Moll I., Engelberg-Kulka H. Selective translation during stress in *Escherichia coli* // *Trends Biochem Sci.*- 2012.- №37(11).- p. 493-498.
87. Moloney R.D., Desbonnet L., Clarke G., Dinan T.G., Cryan J.F. The microbiome: stress, health and disease // *Mamm Genome.*- 2014.- № 25.- p. 49-74.
88. Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armesto MR, et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin // *J Funct Foods.*- 2012.- № 4.- p. 531-541.
89. Moritz EM & Hergenrother PJ. Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci // *P Natl Acad Sci.*- 2007.- № 104.- p. 311–316.
90. Muñoz-Gómez AJ, Lemonnier M, Santos-Sierra S, Berzal-Herranz A, Díaz-Orejas R. RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin-antitoxin system // *J Bacteriol.*- 2005.- № 187.- p. 3151–3157.
91. Mutschler H & Meinhart A. E/Z Systems: their role in resistance, virulence, and their potential for antibiotic development // *J Mol Med (Berl).*- 2011.- № 89.- p. 1183–1194.
92. Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis // *PLoS Biol.*- 2011; 9:e1001033.
93. Neubauer C, Gao YG, Andersen KR, Dunham CM, Kelley AC, Hentschel J, Gerdes K, Ramakrishnan V, Brodersen DE. The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE // *Cell.*- 2009.- № 139.- p. 1084–1095.
94. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions // *Science.*- 2012.- № 336(6086).- p. 1262-1267.

95. Nieto C, Cherny I, Khoo SK, de Lacoba MG, Chan WT, et al. The yefM-yoeB toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation // *J Bacteriol.*- 2007.- № 189.- p. 1266–1278.
96. Nieto C, Pellicer T, Balsa D, Christensen SK, Gerdes K, et al. The chromosomal relBE2 toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction // *Mol Microbiol.*- 2006.- № 59.- p. 1280–1296.
97. Nieto C, Sadowy E, de la Campa AG, Hryniewicz W, Espinosa M. The relBE2Spn Toxin-Antitoxin System of *Streptococcus pneumoniae*: Role in Antibiotic Tolerance and Functional Conservation in Clinical Isolates // *PLoS ONE.*- 2010.- №5(6): e11289.
98. Ogura T, Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation // *Proc Natl Acad Sci.*- 1983.- 80(15).- p. 4784-4788.
99. Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes // *Nucleic Acids Res.*- 2005.- № 33.- p. 966–976.
100. Park Jung-Ho, Yamaguchi Yoshihiro, Inouye Masayori. *Bacillus subtilis* MazF-bs (EndoA) is a UACAU-specific mRNA interferase // *FEBS Lett.*- 2012.- Vol. 585.- p. 2526-2532.
101. Park SJ, Son WS, Lee BJ. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents // *Biochim Biophys Acta.*- 2013.- № 1834.- p. 1155–1167.
102. Pellegrini O, Mathy N., Gogos G., Shapiro L., Condon C. The *Bacillus subtilis* ydcDE operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor // *Mol Microbiol.* – 2005. – Jun\_56(5) – p.1139-48.
103. Połom D., Boss L., Wezgrzyn G., Hayes F. and Kezdzierska B. Amino acid residues crucial for specificity of toxin–antitoxin interactions in the homologous Axe–Txe and YefM–YoeB complexes // *FEBS Journal.*–2013.–280–p. 5906–5918.
104. Pot B., Felis G., De Bruyne K., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Leisner J. and Vandamme P. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* // Editor(s): Wilhelm H. Holzapfel, Brian J.B. // Wiley-Blackwell. 2014.
105. Prozorov AA, Danilenko VN. Toxineantitoxin systems in bacteria: apoptotic tools or metabolic regulators // *Microbiology.*- 2010.- № 79.- p. 129-140.
106. Raftis E., Salvetti E., Torriani S., Felis G.E., O’Toole P.W. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius* // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2011, vol. 77, № 3, p. 954-965.
107. Ramage H.R., Connolly L.E., Cox J.S. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution // *PLoS Genetics.*- 2009.-5(12):e1000767.

108. Rao A.V., Bested A.C., Beaulne T.M., Katzman M.A., Iorio C., Berardi J.M., Logan A.C. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome // *Gut Pathogens*.- 2009.- №19.-p.1 – 6.
109. Ren D, Walker AN & Daines D. Toxin–antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae* // *BMC Microbiol*.- 2012.- № 12.- p. 263.
110. Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z, Ghafourian S. Is the mazEF toxin-antitoxin system responsible for vancomycin resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*? // *GMS Hyg Infect Control*.- 2014.- 9(1).
111. Saito S., Kobayashi M., Kimoto-Nira H., Aoki R., Mizumachi K., Miyata S., Yamamoto K., Kitagawa Y., Suzuki C. Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR // *FEMS Microbiology Letters*.- 2011.- № 316.- p. 70-76.
112. Sala A., Bordes P., Genevoux P. Multiple Toxin-Antitoxin Systems in *Mycobacterium tuberculosis* // *Toxins*.- 2014.- 6(3).- p. 1002-1020.
113. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* // New York: Cold Spring Harbour.- 1989.- 2 ed.
114. Sanders M, Klaenhammer T. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic // *J Dairy Sci*.- 2001.- № 84.- p. 319-331.
115. Santos-Sierra S., Pardo-Abarrio C., Giraldo R., Díaz-Orejas R. Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the parD killer system of plasmid R1 // *FEMS Microbiol. Lett*.- 2002.- № 206.- p. 115–119.
116. Sat B, Hazan R, Fisher T, Khaner H, Glaser G, Engelberg-Kulka H. Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality// *J Bacteriol*.- 2001.- № 183.- p. 2041–2045.
117. Sayeed S, Reaves L, Radnedge L & Austin S. The stability region of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* encodes an efficient postsegregational killing system // *J Bacteriol*.- 2000.- № 182.- p. 2416–2421.
118. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, Sorek R. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning // *Mol Cell*.- 2013.- № 50.- p. 136–148.
119. Schmidt O, Schuenemann VJ, Hand NJ, Silhavy TJ, Martin J, Lupas AN, Djuranovic S. prIF and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli* // *J Mol Biol*.- 2007.- № 372.- p. 894–905.
120. Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K, Brennan RG. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB // *Science*.- 2009.- № 323.- p. 396–401.

121. Schuster F. Christopher, Jung-Ho Park, Marcel Prax, Alexander Herbig, Kay Nieselt, Ralf Rosenstein, Masayori Inouye, Ralph Bertram. Characterization of a mazEF Toxin-Antitoxin Homologue from *Staphylococcus equorum* // *J Bacteriol.*- 2013.- 195(1).- p. 115–125.
122. Senchenko, V.N., et al., Differential expression of CHL1 gene during development of major human cancers // *PLoS One.*- 2011.- 6(3).- e15612.
123. Sevillano L, Diaz M, Yamaguchi Y, Inouye M, Santamaria RI. Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces* // *PLoS One.*- 2012.- 7.- e32977.
124. Sevin E.W., Barloy-Hubler F. RASTA-bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes // *Genome Biology.*- 2007.- 8(8).- R155.
125. Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou H-Y, Rajakumar K, Deng Z. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin– antitoxin loci in bacteria and archaea // *Nucleic Acids Res.*- 2011.- Vol 39.- p. 606–611.
126. Shapira A, Shapira S, Gal-Tanamy M, Zemel R, Tur-Kaspa R & Benhar I. Removal of hepatitis C virus-infected cells by a zymogenized bacterial toxin // *PLoS One.*- 2012.- № 7.- e32320.
127. Shi Wanliang, Xuelian Zhang, Xin Jiang, Haiming Ruan, Clifton E. Barry, Honghai Wang, Wenhong Zhang, Ying Zhang. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy // *Science.*- 2011.- 333(6049).- p. 1630–1632.
128. Sievers M, Uermösi C, Fehlmann M, Krieger S. Cloning, sequence analysis and expression of the F1F0-ATPase beta-subunit from wine lactic acid bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2003.- vol. 26.- № 3.- p. 350-356.
129. Siguier P, Filée J, Chandler M. Insertion sequences in prokaryotic genomes // *Curr. Opin. Microbiol.*- 2006.- № 9.- p. 526-531.
130. Singh P.K., Chopra K., Kuhad A., Kaur I.P. Role of *Lactobacillus acidophilus* loaded floating beads in chronic fatigue syndrome: behavioral and biochemical evidences // *Neurogastroenterol Motil.*- 2012.- № 24.- p. 366.
131. Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review // *LWT – Food science and technology.*- 2009.- № 42.- p. 448-457.
132. Smith AS, Rawlings DE. The poison-antidote stability system of the broad-host-range *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid pTF-FC2 // *Mol. Microbiol.*- 1997.- № 26.- p. 961–970.
133. Smith J.A., Magnuson R.D. Modular organization of the Phd repressor/antitoxin protein // *J. Bacteriol.*- 2004.- № 186.- p. 2692–2698.



134. Song, Y., Kato, N., Liu, C., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA // *FEMS Microbiology Letters*.- 2000.- № 187.- p. 167–173;
135. Soo V.W., Wood T.K. Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD // *Sci. Rep*.- 2013.- № 3.- p. 3186.
136. Stevens, M.J., Molenaar, D., de Jong, A., De Vos, W.M. Sigma54-Mediated control of the mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus plantarum* impacts on carbohydrate metabolism. *Microbiology*. – 2010.-№156.-p. 695–707
137. Szekeres S, Dauti M, Wilde C, Mazel D, Rowe-Magnus DA. Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection // *Mol Microbiol*.- 2007.- № 63.- p. 1588–1605.
138. Tam, J.E., and Kline, B.C. Control of the *ccd* operon in plasmid F // *J Bacteriol*.- 1989.- № 171.- p. 2353–2360.
139. Tamura K, Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol*.-2011.- 28(10).- p. 2731–2739.
140. Tan Q, Awano N, Inouye M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB// *Mol. Microbiol*.- 2011.- № 79.- p. 109–118.
141. Tannock, G. W. Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body // Chapman and Hall.- 1995.
142. Theunissen S, De Smet L, Dansercoer A, Motte B, Coenye T, Van Beeumen JJ, Devreese B, Savvides SN, Vergauwen B. The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation // *Res Microbiol*.- 2010.- № 161.- p. 144–152.
143. Tian QB, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Terawaki Y, Hayashi T. Specific protein-DNA and protein-protein interaction in the *hig* gene system, a plasmid-borne proteic killer gene system of plasmid Rts1 // *Plasmid*.- 2001.- № 45.- p. 63–74.
144. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L.pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers // *Appl. Env. Microbiol*.- 2001.- Vol. 67.- № 8.- p. 3450–3454.
145. Trovatti E, Cotrim CA, Garrido SS, Barros RS & Marchetto R (2008) Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 6161–6164.

146. Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Mine N, Van Melderen L. What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-anti-toxin systems in its genome? // *J Bacteriol.*- 2007.- № 189.- p. 6101–6108.
147. Tsuchimoto, S., Nishimura, Y., and Ohtsubo, E. The stable maintenance system pem of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth // *J Bacteriol.*- 1992.- № 174.- p. 4205–4211.
148. Turrone F., Ventura M., Buttó L.F., Duranti S., O’Toole P.W., O’Connell Motherway M., Douwe van Sinderen D. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective // *Cell. Mol. Life Sci.*- 2014.- № 71.- p. 183–203.
149. Unterholzner SJ, Hailer B, Poppenberger B, Rozhon W. Characterisation of the stbD/E toxin-antitoxin system of pEP36, a plasmid of the plant pathogen *Erwinia pyrifoliae* // *Plasmid.*- 2013.- № 70.- p. 216–225.
150. Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W. Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application // *Mobile Genetic Elements.*- 2013.- 3:e26219.
151. Van Mederen, de Bast. Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? // *PLoS Genetics.*- 2009.- 5(3).-e1000437.
152. Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria // *MolMicrobiol.*- 1994.- № 11.- p. 1151–1157.
153. Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage // *Anaerobe.*- 2010.- № 16.- p. 578-585.
154. Wang X, Lord DM, Cheng HY et al. A novel type V TA system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS // *Nat Chem Biol.*- 2013.- № 8.- p. 855–861.
155. Wang X, Lord DM, Cheng HY, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, Quiroga C, Zheng K, Herrmann T, Peti W, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS // *Nat Chem. Biol.*- 2012.- № 8.- p.855–861.
156. Wang X, Wood TK. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response // *Appl. Environ Microbiol.*- 2011.- № 77.- p. 5577–5583.
157. Wen Y, Behiels E, Devreese B. Toxin–Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity // *Pathog. Dis.*- 2014.- 70(3).- p. 240-249.
158. Williams J. Julia, Elizabeth M. Halvorsen, Ellen M. Dwyer, Robert M. DiFazio, Paul J. Hergenrother. Toxin-Antitoxin (TA) Systems are Prevalent and Transcribed in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiol Lett.*- 2011.- 322(1).- p. 41–50.

159. Williams JJ, Hergenrother PJ. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy // *Trends Microbiol.*- 2012.- № 20.- p. 291–298.
160. Williams J.J. and Hergenrother P.J. Detection of Endogenous MazF Enzymatic Activity in *Staphylococcus aureus* // *Anal Biochem.*- 2013.- 443(1).-p.81-7
161. Winther KS, Gerdes K. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.*- 2011.- № 108.- p. 7403–7407.
162. Wozniak RA & Waldor MK. A toxin–antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element // *PLoS Genet.*- 2009.- 5.- e1000439
163. Yamaguchi Y, Nariya H, Park JH, Inouye M. Inhibition of specific gene expressions by protein-mediated mRNA interference // *Nat Commun.*- 2012.- № 3.- p. 607.
164. Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli* // *J Biol. Chem.*- 2009.- № 284.- p. 28746–28753.
165. Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archea // *Annu. Rev. Genet.*-2011.-№45.-p.61–79.
166. Yang M, Gao C, Wang Y, Zhang H, He Z-G. Characterization of the Interaction and Cross-Regulation of Three *Mycobacterium tuberculosis* RelBE Modules // *PLoS ONE.*- 2010.- 5(5).-e10672.
167. Yoshizumi S, Zhang Y, Yamaguchi Y, Chen L, Kreiswirth BN, Inouye M. *Staphylococcus aureus* YoeB Homologues Inhibit Translation Initiation // *J Bacteriol.*- 2009.- 191(18).- p. 5868–5872.
168. Young V.B. The intestinal microbiota in health and disease // *Opin. Gastroenterol.*- 2012.- № 28.- p. 63-69.
169. Yuan J., Sterckx Y., Mitchenall L.A., Maxwell A., Loris R., Waldor M.K. *Vibrio cholerae* ParE2 poisons DNA gyrase via a mechanism distinct from other gyrase inhibitors // *J. Biol. Chem.*- 2010.- № 285.- p. 40397–40408.
170. Zhang Y, Inouye M. RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation // *Mol Microbiol.*- 2011.- № 79.- p. 1418–1429.
171. Zhang Y, Inouye M. The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin // *J. Biol. Chem.*- 2009.- № 284.- p. 6627–6638.
172. Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qing G, Inouye M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli* // *Mol Cell.*- 2003.- № 12.- p. 913–923.
173. Zhang Y, Zhu L, Zhang J, Inouye M. Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli* // *J Biol. Chem.*- 2005.- № 280.- 26080–26088.

174. Zhu L, Inoue K, Yoshizumi S, Kobayashi H, Zhang Y, Ouyang M, Kato F, Sugai M, Inouye M. Staphylococcus aureus MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP // J Bacteriol.- 2009.- № 191.- p. 3248–3255.

175. Zhu L., Jared D. Sharp, Hiroshi Kobayashi, Nancy A. Woychik, Masayori Inouye. Noncognate Mycobacterium tuberculosis Toxin-Antitoxins Can Physically and Functionally Interact // J Biol Chem.- 2010.- 285(51).- p. 39732–39738.

176. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. пер. с англ.: Ю. Н. Зограф; под ред. и с предисл. С. И. Алиханян. – М. : Мир, 1976 . – 436 с.

177. Полуэктова Е.У., Даниленко В.Н. Метод видовой и штаммовой идентификации лактобацилл, основанный на использовании проксимального межгенного участка ДНК оперона F1F0 АТФ-синтазы // Международная заявка на патент №2012103277, 2013.

## Последовательность гена 16SRNA штаммов из лабораторной коллекции

№ п/п	Видовая идентификация штамма (16S РНК)	Название штамма	Последовательность гена 16S РНК
1.	<i>L. plantarum</i>	CS 396	ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCC AGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGC TATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG GTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAA CTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTG TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAAT GCTAAGTGTGGAAAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTTCCNCCCTGGGGANTACGG
2.	<i>L. plantarum</i>	8-PA-3	CTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAG CGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCA CTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAT CGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAG CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTG ACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGA GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAANGCGGCTGTCTGG TCTGTAACCTGACGCTGANGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGGTA
3.	<i>L. plantarum</i>	90-TC-4	GCAGGTGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGNATTTACATTTGCAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTTAACACGNT GGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAA AGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG GACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGA GTAACCTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATC GGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
4.	<i>L. plantarum</i>	rKHM 101	ATGCAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGATGG GAAACCTGCCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAG ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTANCC

			GACCTGAGAGGGTAATCNGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGA CGAAAGTCTGATGGANCAACGCCNCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGANAGT AACTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCANCAGCCGCGGTAATACNTANGTGGCAAGCGTT GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAANAAGTGCATCNG AACTGGGAAACTTGAGTGCANAAGAGGACAGTGNAACTCCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGC GAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCNAAGTATNGGTAGCAAACAGGNATTANATACCCTGGTNAGTCCATAACC GTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGNTTCCNCCCTTCA
5.	<i>L. plantarum</i>	K9L	ATACATGCAAGTCAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTG AAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA GAGTAACCTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC TCGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
6.	<i>L. plantarum</i>	46κ	ATACATGCAAGTCAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGCTTG AAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA GAGTAACCTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC TCGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
7.	<i>L. plantarum</i>	36ct	ATACATGCAAGTCAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTG AAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA GAGTAACCTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC TCGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
8.	<i>L. plantarum</i>	1063B	ATACATGCAAGTCAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTG AAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA GAGTAACCTGTTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC TCGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

			TCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG TGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
9.	<i>L. plantarum</i>	29ст	TGCAAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGG GAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAG ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCC GACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGA CGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT AACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA
10.	<i>L. plantarum</i>	90ст	TCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCT GCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTT CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGA GAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT CAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGG GAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCG GCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT
11.	<i>L. plantarum</i>	191г	AAGTCTGACGAACCTGCTGTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGG AAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGA TGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCG ACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTA ACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGA AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
12.	<i>L. plantarum</i>	29ск	ATACATGCAAGTCGAACGAACCTGCTGGGTATTGGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGTGAGGTGAGTGGCGAACTGGTGAGT AACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGA GTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGA TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATA TCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAA GTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAG TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACCTCTGG TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT

			ACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA TGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCCTAA
13.	<i>L. plantarum</i>	32ск	GGCGTGCCTATACATGGAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGGGAGGGGCGAACTGGTG AGTAACACGGGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTC CGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAA TGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAAC ATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAA GAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCTACGCGA AGAACCTTACCAGGCTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTG TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACCTC TGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCG CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA CCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCCTAAGTGACAGATTA
14.	<i>L. plantarum</i>	46ск	GGCGTGGCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGGTGGCGAACTGG TGAGTAACACGTTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGG TCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGC AATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA TCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGA ACATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCG AAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA AGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCTACGC GAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGT TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCAC TCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC TACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACT CGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA CACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCCTAAGGTGAACCAGGAT
15.	<i>L. plantarum</i>	75ск	AGGGCCTTGGGGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGG TGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTT GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGG CTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTT



			<p>GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTT  CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGAT  TAGATACCCTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAG  CATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  CGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGG  TGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  AAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  TACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCCAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGT  AGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  ACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGAACAGAT</p>
16.	<i>L. plantarum</i>	90ск	<p>TGGGCGGGGGGGGGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAG  TGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTT  GGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGG  CTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCA  GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTTCCGGCTCGTAAAACTCTGTT  GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTT  CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGAT  TAGATACCCTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAG  CATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  CGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGG  TGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  AAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC  TACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCCAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGT  AGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  ACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGACCAGGAA</p>
17.	<i>L. rhamnosus</i>	421-2	<p>GCAGTCGAAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  TAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCAGCATGGTTCTTGGCTGAAAGA  TGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAAACGGCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCG  AACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC  GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCCGGTCTGTTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCCGGCAGAGTA  ACTGTTGTGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAAACCGAGGAAGTGCATCGGA  AACTGGNAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG  AAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA  AACGATGAATGCTAGGTGTTGGA</p>
18.	<i>L. rhamnosus</i>	7дст	<p>ATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA  CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAAACCGCATGGTTCTTGGCT</p>

			GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
19.	<i>L. rhamnosus</i>	24дст	ATACATGCAAGTCAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC
20.	<i>L. rhamnosus</i>	K32	ATACATGCAAGTCAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
21.	<i>L. rhamnosus</i>	38к	ATACATGCAAGTCAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
22.	<i>L. rhamnosus</i>	503B	GTGCAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGGTGCCTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA CCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGG CGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCA AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACT GTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC GGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAAC TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAG GCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAG

23.	<i>L. rhamnosus</i>	723B	ATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTGATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTC
24.	<i>L. rhamnosus</i>	40CT	ATGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG GGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAA GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGC CGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG ACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAG TAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT TATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCG GAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGG CGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGC
25.	<i>L. rhamnosus</i>	80CT	CGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC TTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGC TATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAC TGAGAGG TTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCTG GCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAA
26.	<i>L. rhamnosus</i>	22ГН	TCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC TGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAC TG AGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAG TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAAATAACTGT TGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT
27.	<i>L. rhamnosus</i>	2ГН	TGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG GTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAG ATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCC GAAC TGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGA CGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGT AACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT ATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGG AAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGC GAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCA

28.	<i>L. rhamnosus</i>	B51	GTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACGTAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGT TGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG GATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACT GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
29.	<i>L. rhamnosus</i>	45д	GCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG TAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGA TGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCG AACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTA ACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA TCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGA AACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCG AAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT
30.	<i>L. rhamnosus</i>	50сг	CAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAAAATCCAAAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATG CCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAA CTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGC AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAAATGGTCGGCAGAGTAAC TGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC CGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
31.	<i>L. rhamnosus</i>	26ск	TACATGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGGTGCCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACG TAGCCGAACGTAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACCTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC ATCGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACA GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAT GCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACG ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCT TACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAG CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACCTAGTAAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGA TGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCCTACAC GAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTCTCACCATGAG

			AGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCG
32.	<i>L. rhamnosus</i>	61ск	CGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGGTGCCTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC TGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCG TAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACCTG AGAGGTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAG TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACCTGT TGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTG GAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC GGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGA TGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTT GACATCTTTTGGATCACCTGAGAGATCAGGTTTTCCCTTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGT AGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGA CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGA GTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTTCTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACA CCCGAAGCCGGTGGTTCGTAACCCT
33.	<i>L. fermentum</i>	rKHM 526	AGTCNACGCGTTGGCCCATTTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA GGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAACANCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAA GATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCATGATGCATAG CCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG GGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGA GTAACGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG TTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATC GGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTG GCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC CGTAAACGATGAGTGCATAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCANTGCCGGAGCTAACGC
34.	<i>L. fermentum</i>	2пр	ATACATGCAAGTGAACGCGTTGGCCCAATTTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTG AGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAAC AACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTTACCAAGGCG ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAA CACGTATGAGAGTAACGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCCGGCTTAACCGG AGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
35.	<i>L. fermentum</i>	113B	ATACATGCAAGTGAACGCGTTGGCCCAATTTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTG AGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAAC AACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTTACCAAGGCG ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT

			CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAA CACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGG AGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
36.	<i>L. fermentum</i>	11дст	ATACATGCAAGTCAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGATTTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTG AGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAAC AACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAA CACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGG AGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
37.	<i>L. fermentum</i>	291г	TGCAAGTCAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGATTTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA CACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGC TAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGAT GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC ACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGT ATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAG TGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCG
38.	<i>L. fermentum</i>	57ск	TCCGATCGGCCGGGGTGCCTAATACATGCAAGTCAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCCTTGCACCTGATTGAAAAAGGAAGC CAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA ACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGG GGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA GCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTG AAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTG GAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCG AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCATAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAAC GCATTAAGCACCTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG GTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTTCCCTTCGGGAACGCA ATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTACTAGTTG CCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATG ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAATCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTT CGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCCGTCTCTCCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCTAAGGGGAA CACGAAA

39.	<i>L. fermentum</i>	59ск	<p>ATGCAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCCTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA  CACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGC  TAAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGAT  GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  ACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGT  ATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTACGGCTAACACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTAACCGGAGAAG  TGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACA  CCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  CATGCCGTAAACGATGAGTGCCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGT  ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAA  CCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTTCTTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCGT  CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGT  GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT  GGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTG  CACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT  GAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCT</p>
40.	<i>L. fermentum</i>	60ск	<p>ATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCCTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA  ACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACG  CTTAAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGA  TGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTTC  CACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACG  TATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTACGGCTAACACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAA  GTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC  ACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  CCATGCCGTAAACGATGAGTGCCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAG  TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGCTACGCGAAGA  ACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTTCTTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCG  TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAG  TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  TGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCT  GCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA  TGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAAC</p>
41.	<i>L. fermentum</i>	102ск	<p>ATACATGCAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCCTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGA  GTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACA  ACGCTTAAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGA  TGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  TTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAC  ACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAGTACGGCTAACACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  GTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGA</p>

			GAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATGCCGTAACCGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCCA AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCCTAGAGATAGGGCGTTTCCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCC TCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTC TAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCG CCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCA CAATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCTAAG
42.	<i>L. fermentum</i>	103ck	ATGCAGTCGAACGCGTGGCCCAAATTTGATTGATGGTGCCTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACG CTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACCTTCTGGATGGACCTGCCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGA TGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACG TATGAGAGTAACTGTTTACATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAA GTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCATGCCGTAACCGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCCTAGAGATAGGGCGTTTCCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTCG TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAG TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCT GCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAACCA TGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGT
43.	<i>L. casei/ paracasei</i>	rKHM 23	CCTATCATGCAAGTCGAACGAAGTCTCGTTGATGATCGGTGCCTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAAGTGGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTG GCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGAT ACGTAGCCGAACGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTCCGGTTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTC GGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTATCCGGNATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTTT
44.	<i>L. casei/ paracasei</i>	rKHM 577	TAGCATTCATCGTTTTACGGCATGGACTAACAGGGTATNTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTTACAG ACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCA CTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCTCGGTTAAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTAC GCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATAACCG TCACGCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCATTTCTTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCGGCGTT GCTCCATCAGACTTGCGTCCATTTGTGGAAGATTTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGTGGCC GATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAA



			GCGATAGCTTACGCCATCTTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCC ACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAG AACTCGTCGACTGCA
45.	<i>L. casei/ paracasei</i>	K <sub>3</sub> III <sub>24</sub>	GATTACAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGC TAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCCTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAG CTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACAGAGAGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTT CGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
46.	<i>L. casei/ paracasei</i>	20011	GCCTATACATGCAAGTCGTACGAGTTTTGGTCGATGAAGGGTGCCTGCACCTGAGATTCGACTTAAAACGAGTGGCGGACGGGTGAGT AACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCCT GGCTGAAAGATGGCGCAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGA TACGTAGCCGAACAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGT CGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAA GCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT CCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGTTTTCCGCCCTCAGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGGAA ACCTTACCAGGCTTTGACATCTTTTGTATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGATGATGTTGTCG TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGATTGGGCACTCTAG TAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCT ACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCA TGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCC
47.	<i>L. casei/ paracasei</i>	17к	ATACATGCAAGTCGAACGAGTTCCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTC AACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCCTGGCT GAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACG TAGCCGAACAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGC AGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGC ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTGTCGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTC
48.	<i>L. casei/ paracasei</i>	42ct	CATGCAAGTCGAACGAGTTCCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTC AACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT GGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCCTGGCTGAA AGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAG CCGAACAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG GACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGA GTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG

			TTATCCGGATTTATTGGGCGTCCAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCT
49.	<i>L. casei/ paracasei</i>	48ct	CGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAAC
50.	<i>L. casei/ paracasei</i>	51ct	GTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA CCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGG CGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACTCA AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAC TGTGTCGGCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCTTTTCGGGTTTTTTAAGTCTGAT
51.	<i>L. helveticus</i>	Er 315/ 402	AGATTTACTTCCGTAATGACGCTGGGGACGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGGATACCA CTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGC CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGG ACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACGGCCTTTATTTGACGGTAATCAAC CAGAAAGTCACGGCT
52.	<i>L. helveticus</i>	100 am	CACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGGATACCACCTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTT AATAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATG CATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAG AGGTAGTAACGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCT
53.	<i>L. helveticus</i>	NK-1	GTCGAGCGAGCAGAACCAGCAGATTTACTTCCGTAATGACGCTGGGGACGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTG CCCCATAGTCTGGGATACCACCTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAAGGCGGCGTA AGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAG AGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTC TGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACGGCC TTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACGTCATCGGAAACTGTT TTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAANGCGA CTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
54.	<i>L. helveticus</i>	NNIE	ACACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGGATACCACCTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCT TATAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGAT GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCATCAGTAGGGAATCTTCC ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATA GAGGTAGTAACGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC

55.	<i>L. brevis</i>	15f	CAAGTCGAACGAGCTTCCGTGTGAATGACGTGCTTGCAC TGATTTTAAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGA AATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGT GGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGA CCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAA CTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCATCCCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT CTGGATTTATTGGACGTAAAGCGAGAGCA
56.	<i>L. brevis</i>	47ct	AGTCGAACGAGCTTCCGTGTGAATGACGTGCTTGCAC TGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAAT CTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGGC TTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCT GAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAA GTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTG TTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
57.	<i>L. brevis</i>	52ct	AAGTCGAACGAGCTTCCGTGTGAATGACGTGCTTGCAC TGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA TCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGG CTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACC TGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAA AGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACT GTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGCGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAA
58.	<i>L. mucosa</i>	46ct	GCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAACTGATTTGAACGTGCTTGCACGGACTTGACGTTGGTTTACCAGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA CACGTAGGTAACTTGCCCAAAGCGGGGATAAACAATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAATTTGAATCGCATGATTCAAAT TTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTTGTGGTAGGGTAACGGCTACCAAGGCTGTGATG CGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAC TGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCG TGAGAGCAACTGTTACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGATTTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCATGCGGTTTG
59.	<i>L. salivarius</i>	44ct	GCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAGATGCTTGCATTCACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA CCTGCCTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGG TTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGGCGTATTAAC TAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACT GAGAGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTG TTCATTGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG GATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGGCGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGGAGTAGTGATTTGGAAACT GGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAG CGGCTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTG
60.	<i>L. salivarius</i>	64ck	TCCTGTCACCTTAGACGGCTGGCTCCTTGC GGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAAT CCGAAC TGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA GGTCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCACTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCCAGAGTGCCCAACTTAATGC TGGCAACTGACAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGT

			<p>CAC TTTGTCCCCGAAGGGAAAGCCTAATCTCTTAGGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA  AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAT  TGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACCTAGCATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  GTTTGCTACCCACGCTTTCGAACCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCA  TTTCACCGCTACACATGGAGTTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTCCAGTTTCCAATGCACACTCCGGTTAAGCCGAAGGC  TTTCACATCAGACTTAAAAGACCGCCTGCGTTCCCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT  GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTGTGGTTAGATACCGTCATCGAATGAACAGTTACTCTCACTCGTGTCTTCTCTAACAACAG  AGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCCTCCATTTGTGGAAGATCCCTACTGCTGCCT  CCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTGGTAGGCCGTT  ACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAG  ATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCCTCAAC  TTCTTACGGTGAATGCAAGCATCTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTTCGACTGCATGTATAGCACGCCCCCCCCC</p>
61.	<i>L. salivarius</i>	78ск	<p>ACGGGTGTGGGGGCGTGCATATACATGCAAGTGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTACCCGTAAGAAGTTGAGTGGC  GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGAT  CGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCGTCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAC TAGTTGGTGGGGTAACGGCTAC  CAAGGTGATGATACGTAGCCGAAC TGAGAGTTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT  AGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTGTGTAG  AGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTCGATGACGGTATCTAACAGCAAGTACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTGAGTGAAGGCTTCGGCT  TAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGATA  TATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGAT  ACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTTC  CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAG  CAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTG  CATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTGTGTCAGTTGCCAGCATTAAGTT  GGGCACCTCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAC  ACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTGCAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCT  GCAACTCGCCTACATGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC  CCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGACAGGTGTT</p>
62.	<i>L. johnsonii</i>	K21	<p>TCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGTTCGACTAAAAGAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  TAACCTGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTGAAAGA  TGGTTCGTCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGA  GTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG  AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAA  CTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  CCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAAATGCATCAGAA  ACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGA  AGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAA  ACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAA  GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC</p>

**Нуклеотидные последовательности межгенного района,  
предшествующего оперону F0F1 АТФ-синтазы**

<b>Штамм <i>L. helveticus</i></b>	<b>Нуклеотидная последовательность</b>
100 аш	TTCCCTTTTCGTAAAAAATATTCATTAGAATACGCTTACATGTTACA CAAAGGACTTTTTTGGTGTTAAGATGATTTAAGTGTTTCGAGTTTAATT CAACACGAGAAGGGAGGTCACGAAGTA
Er315/402	TTCCCTTTTCGTAAAAAATATTCATTAGAATACGCTTACATGTTACA CAAAGGACTTTTTTGGTGTTAAGATGATTTAAGTGTTTCGAGTTTAATT CAACACGAGAAGGGAGGTCACGAAGTA
NK1	TTCCCTTTTCGTAAAAAATATTCATTAGAATACGCTTACATGTTACA CAAAGGACTTTTTTGGTGTTAAGATGATTTAAGTGTTTCGAGTTTAATT CAACACGAGAAGGGAGGTCACGAAGTA
NNIE	TTCCCTTTTCGTAAAAAATATTCATTAGAATACGCTTACATGTTACA CAAAGGACTTTTTTGGTGTTAAGATAATTTAAGTGTTTCGAGTTTAATT CAACACGAGAAGGGAGGTCACGAAGTA

### Нуклеотидные последовательности ТА систем *Lactobacillus rhamnosus*

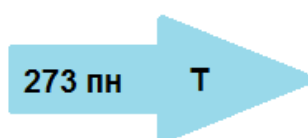
**Xxx** – иницирующие кодоны транскрипции;

**Xxx** – терминирующие кодоны транскрипции;

**Xxx** – перекрывающиеся иницирующие и терминирующие кодоны.

**Xxx** – замены нуклеотидов и аминокислот

#### RelE1



Сравнение нуклеотидных последовательностей гена и аминокислотных последовательностей белка с геном и белком штамма *L. rhamnosus* LMS2-1 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Токсин	
		НК гена (273)	АК белка (90)
1	<b>Lc705, ATCC8530, CASL</b> , 40ст, 45д, 51гн, 2гн, 80ст	0	0
2	<b>R0011, ATCC21052, HN001</b>	10	0
3	<b>GG</b> , 26ск, 61ск	7	0
4	72зв, 7дст, 50зв	9	0
5	22гн, К32, 38к	14	4 A36T V74I D77G I79V

```

1 ATGCCCACSTCCSTGCCSSTCATCGAACAATCCCGSTTCAAAAAACATCTCAAACAACTC 60
2 ATGCCCACSTCCSTGCCSSTCATCGAACAATCCCGSTTCAAAAAACATCTCAAACAACTC 60
3 ATGCCCACSTCCSTGCCSSTTATCGAACAATCCCGSTTCAAAAAACATCTCAAACAACTC 60
4 ATGCCCACSTCCSTGCCSSTCATCGAACAATCCCGSTTCAAAAAACATCTCAAACAACTC 60
5 ATGCCCACSTCCSTGCCSSTCATCGAACAATCCCGSTTCAAAAAACATCTCAAACAACTC 60
*****

```

```

1 STCCAAGCCGGCGSTTCACCAAGGCTGACTTTCAGCAAGTCTTGCTTACTTACAAACC 120
2 STCCAAGCCGGCGSTTCACCAAGGCTGACTTTCAGCAAGTCTTGCTTACTTACAAACC 120
3 STAACAAGCCGGCGSTTCAAGGCTGACTTTCAGCAAGTCTTGCTTACTTACAAACC 120
4 STCCAAGCCGGCGSTTCACCAAGGCTGACTTTCAGCAAGTCTTGCTTACTTACAAACC 120
5 STCCAAGCCGGCGSTTCACCAAGGCTGACTTTCAGCAAGTCTTACTTACTTACAAACC 120
** .*****

```

```

1 AGCACCCCACTGCCGAAAAAGTATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGT 180
2 AGCACACCCTGCCGAAAAAGTATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAGCCAGATCGC 180
3 AGCACCCCACTGCCGAAAAAGTATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGT 180
4 AGCACACCCTGCCGAAAAAGTATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAGCCAGATCGC 180
5 AGCACCCCACTGCCGAAAAATATGACGATCACGTGATCAAAAAACGTAAGCCGATCGT 180
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 GCTTTGTTTCATCAAAGGTAATTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGC 240
2 GCTTTGTTTCATCAAGGGTAATTGGCTGCTCATTTATCGGGTTGAACCAGACGCGATCCGC 240
3 GCTTTGTTTCATCAAGGGTAATTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGC 240
4 GCTTTGTTTCATCAAGGGTAATTGGCTGCTCATTTATCGGGTTGAACCAGACGCGATCCGC 240
5 GCTTTGTTTCATCAAAGGTAATTGGCTGCTCATCTATCGGATTGAACCAGCGCAGTCCGC 240
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

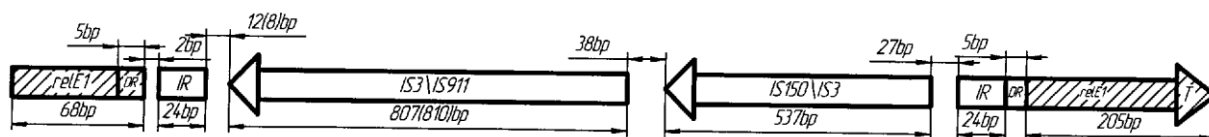
1 TTGATTGATGTTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA 273
2 TTGATTGATGTTGGCCGCCATGGCGAGACTAA 273
3 TTGATTGATGTTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA 273
4 TTGATTGATGTTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA 273
5 TTGATTGATGTTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA 273
*****.*****.*****.*****.*****

```

2 группы штаммов с IS-элементами:

1.24дс, 50зв;

2.421-2;



Xxx – фрагменты RelB1 гена;

Xxx – прямые повторы;

Xxx – инвертированные повторы;

Xxx – ORFs IS-элементов;

Xxx – фрагменты IS-элементов вне ORFs.

```

1 TTCAAAAACACCTCAACAACCTCCTCAAGCTGAAGTGCAACAAAAAAGTTAGACAGTTTG 60
2 -----ACATCTCAACAACCTCCTCAAGCTGAAGTGCAACAAAAAAGTTAGACAGTTTG 53
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 AAATTTAGTTACACAGCGGCTTGATTCCGGTATTCAATCGGGGTCAGGCCATTTTATTG 120
2 AAAATTAG-TACGCAGCGGTCTGATTCCGATATTCAATCGGGGTCAGGCCATTTTATTG 112
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 AGTGAATACGGTCATGATTAACCACGTGACGTAACGATTTACGATTTGCTTCAGTTCC 180
2 AGTGAATACGGTCATGATTAACCACGTGACGTAATGATCTACGATTTGCTTCAGTTCC 172
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 TCAAGATCCTTGATTGGTTGCCGATTGAGCCGTTCTCGTTTGAGTAGGTTGAAGAACTT 240
2 TCAAGATCCTTGATTGGTTGCCGATTGAGCCGTTCTCGTTTGAGTAGGTTGAAGAACTT 232
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 TCCATTGGTGCGTTATCATGGCAATTACCTTACGGGACATGCTGGGAATGATACCCATG 300
2 TCCATTGGTGCGTTATCATGGCAATTACCTTACGAGACATGCTGGGAACGATGCCCATG 292
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 GCGTGCACCCGAGACTGGTATTACCGGGTTTGGTATTGCCATCCTTGGTCAGAATGCACG 360
2 GCGTGCACCCGAGACTGGTATTACCGGGTTTGGTATTGCCACCCTTGGTCAGAGTGCATG 352
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1 ATGGGTGTGACGCCAGTGGGAAGCTTCTTAGCCAAATCGTCAAGCGTCAGGTGGAGTTGC 420
2 ATGGGTGTGACGCCAGCGGGGAGTTTCTTGGCCAAATCGTCAAGCGTTAGGTGGAGTTGT 412
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```



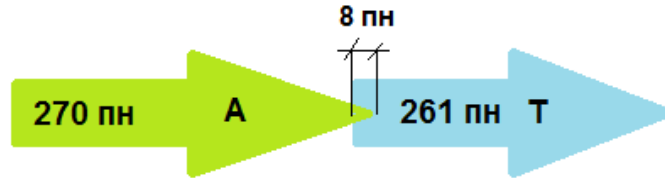


\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

1 TCAAGCCGGGCGCTTCACCAAGGCTGACTTTCAACAAGTCCTTGCTTACTTACAAGCCAG 1560  
2 TCAAGCCGGCCGCTTCACCAAGGCTGACTTTCAACAAGTCTTGCTTACTTACAAACCAG 1552  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

1 CACCCCACTGCCGAAAAATATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAGCCGGATCGTGC 1620  
2 CACCCCACTGCCGAAAAAGTATGACGATCACGTGATCAAAAAACGCAAGCCAGATCGCGC 1612  
\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

1 TTTGTTTCATCAAAGGTAATTGGCTGCTCATT-ACCGAGTGAACCAGACGCG 1670  
2 TTTGTTTCATCAAAGGTAATTGGCTGCTCATTATCGGGTGAACCAGACGCG 1663  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \* \*\*

**YefM-YoeB<sub>Lrh</sub>**

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. rhamnosus* LMS2-1 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (270)	АК белка (89)	НК гена (261)	АК белка (86)
1	<b>Lc705, ATCC8530, HN001, CASL</b> , 2гн, 7дст, 24дст, 30зв, 50зв, 51гн, 80ст	0	0	0	0
2	40ст	0	0	1	1 Asp62Glu

```

1 ATCGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCGCAACCTTAAGCATTATATGAGTCAAGTC 60
2 ATCGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCGCAACCTTAAGCATTATATGAGTCAAGTC 60
*****

1 AACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACCGCTAAAGATGATGATGACAATGTGGTGGTT 120
2 AACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACCGCTAAAGATGATGATGACAATGTGGTGGTT 120
*****

1 ATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAAGAAACCCTGTATTTACTCAGCAATCCCAAG 180
2 ATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAAGAAACCCTGTATTTACTCAGCAATCCCAAG 180
*****

1 CTGATGGCCAAAATCAAACGTGGTGATGCCCAAATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCAC 240
2 CTGATGGCCAAAATCAAACGTGGTGATGCCCAAATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCAC 240
*****

1 GAGTTGTTAACGGACTTCGATCATGATTAAACCTGGACCGATGATGCTTGGGCGGACTA 300
2 GAGTTGTTAACGGACTTCGATCATGATTAAACCTGGACCGATGATGCTTGGGCGGACTA 300
*****

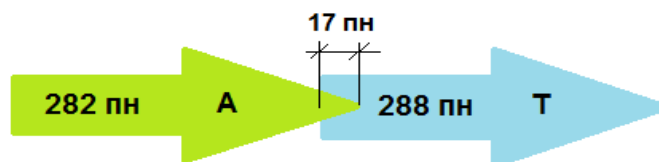
1 CATGTATTGGCATGATCAAAACGACAAGCGGACAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCA 360
2 CATGTATTGGCATGATCAAAACGACAAGCGGACAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCA 360
*****

1 AGCCATTGACCGTGACCCTTATAAAGGCATCGGAAAACCTGAGCCACTTAGATATGCGCT 420
2 AGCCATTGACCGTGACCCTTATAAAGGCATCGGAAAACCTGAGCCACTTAGATATGCGCT 420
*****

1 AACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGATCAGGAAAATCGCATCATCTACAGCATTGAAAA 480
2 AACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGACAGGAAAATCGCATCATCTACAGCATTGAAAA 480
*****

1 GAACCACATTAATATTTTCGCCTGCCGCACTCACTACAGTTAA 523
2 GAACCACATTAATATTTTCGCCTGCCGCACTCACTACAGTTAA 523
*****

```

**RelB3/RelE3<sub>Lrh</sub>**

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. rhamnosus* R0011 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (282)	АК белка (93)	НК гена (288)	АК белка (95)
1-1	<b>ATCC21052</b> , 40ст, 45д, 72зв	0	0	0	0
1-2	7дст, 24дст	1	1 V80F	0	0
1-3	22гн, К32, 38к	1	0	2	1 R62H
2	<b>Lc705</b> , <b>ATCC8530</b> , <b>CASL</b> , <b>LMS2-1</b> , 2гн, 51гн, 80ст	43	12	4 (из 186)	2 (из 61)
3	<b>GG</b> , <b>HN001</b> , 50зв, 421-2, 26ск, 61ск	47 (из 273)	24 (из 90)	-	-

```

1-1      ATGATCTCGATGGA AACAAAATCCCGTATCAGCGTGCGAATTGATACCAA AACCAAAGAA 60
1-2      ATGATCTCGATGGA AACAAAATCCCGTATCAGCGTGCGAATTGATACCAA AACCAAAGAA 60
1-3      ATGATCTCGATGGA AACAAAATCCCGTATCAGCGTGCGAATTGATACCAA AACCAAAGAA 60
2        TTGATGAACATGACCA AAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAA AACCAAAGAA 60
3        -----ATGCAAAAAGCAATCCCGTATCCGCAATTGGATTACCA AATAACCA GAAAA 51
          ****. .*. .***** ***.**.: *.**.* **.*:*** *.**.*

1-1      CGGGCTCTCCATGTCSTCAATAGCATGGGACTAGATATGTCCSTCAGSTATTAACATGTAT 120
1-2      CGGGCTCTCCATGTCSTCAATAGCATGGGACTAGATATGTCCSTCAGSTATTAACATGTAT 120
1-3      CGGGCTCTCCATGTCSTCAATAGCATGGGACTAGATATGTCCSTCAGSTATTAACATGTAT 120
2        CGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTCCSTCGGSTATTAACATGTAC 120
3        CGAGCTCTCCATGTTCTTAATCGTCTGGGACTAGAGAGATTCTCGGSTATTAACATGTAT 111
          **..** ***** ** **.* .***** ***** * * ***.*****

1-1      TTGAAACGCATTTGGTGACACTGGTGAGTTGCCATTTACACCTGAAATGTCGTTTCGCCGAT 180
1-2      TTGAAACGCATTTGGTGACACTGGTGAGTTGCCATTTACACCTGAAATGTCGTTTCGCCGAT 180
1-3      TTGAAACGCATTTGGTGACACTGGTGAGTTGCCATTTACACCTGAAATGTCGTTTCGCCGAT 180
2        CTGAAACGCATTTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACACCTCCAATGTCAATTGTTGAT 180
3        TGGAAACGCATTTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACACCTTGAATGTCAATTGCCCGAT 171
          ***** ***** **.*.***** ***** * .***** **.* **

1-1      CAGCTTCAAGCTGCAGAAGCTGATGTTAAAGCGGGACGAACSTAAGAGCTTCAAGACCGTT 240
1-2      CAGCTTCAAGCTGCAGAAGCTGATGTTAAAGCGGGACGAACSTAAGAGCTTCAAGACCGTT 240
1-3      CAGCTTCAAGCTGCAGAAGCTGATGTTAAAGCGGGACGAACSTAAGAGCTTCAAGACCGTT 240
2        CAGCTTCAAGCTTGCAGAAGCTGATGTTAAAGCGGGCGGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTC 240
3        CAGCTTCAAGTTTGCAGAAGCA GATGTTAAAGCGGGCGGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTT 231
          ***** .* *****:*****.*** :**.****** *

```

```

1-1   GATGCCCTGATGAAGGATTTATACAATGATGTTGACGATTAAATCGCACGCGCACTTTCAA 300
1-2   GATGCCCTGATGAAGGATTTATACAATGATGTTGACGATTAAATCGCACGCGCACTTTCAA 300
1-3   GATGCCCTGATGAAGGATTTATACAATGATGTTGACGATTAAATCGCACGCGCACTTTCAA 300
2     GATGCTTTGATGAAGGATTTATACAGTGTGATGTTGACGATTAATCTGCATGCATATTGACAG 300
3     GGTGCTTTGATGAAGGATTTATACAGTGTGATGTTGACGTTAA----- 273
* .***  *****.*****.***

1-1   ACGACAATTTAAACATCTTCTTAGGCAAGGTAAAGATATGACGAAACTTGCAACTGCAAT 360
1-2   ACGACAATTTAAACATCTTCTTAGGCAAGGTAAAGATATGACGAAACTTGCAACTGCAAT 360
1-3   ACGACAATTTAAACATCTTCTTAGGCAAGGTAAAGATATGACGAAACTTGCAACTGCAAT 360
2     GCAACAA----- 307
3     -----

1-1   TGATACTTTGCAGCGTCAAGATCGTGTAAAAATTAGCTTCTTTACACGACCATGCTTTAAA 420
1-2   TGATACTTTGCAGCGTCAAGATCGTGTAAAAATTAGCTTCTTTACACGACCATGCTTTAAA 420
1-3   TGATACTTTGCAGCGTCAAGATCGTGTAAAAATTAGCTTCTTTACACGACCATGCTTTAAA 420
2     -----CTTTGCAGCGTCAAGGTCATGTAAAAATTAGCTTCTTACATGACCATGCTTTAAA 362
3     -----

1-1   GGGTGCTCACAGCGGCGAACGAGCATTGCGTGTGCTCCTGATTGGCTTCTCGTTTATAA 480
1-2   GGGTGCTCACAGCGGCGAACGAGCATTGCGTGTGCTCCTGATTGGCTTCTCGTTTATAA 480
1-3   GGGTGCTCACAGCGGCGAACGAGCATTGCGTGTGCTCCTGATTGGCTTCTCGTTTATAA 480
2     GGGTGCTCACAGCGGCGAACGAGCATTGCGTGTGCTCCTGATTGGCTTCTCGTTTATAA 422
3     -----

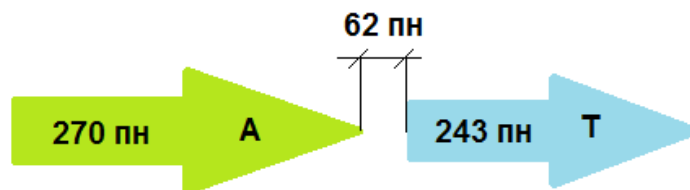
1-1   AGTCGATGCTGAAGCGTTAATTTTAATGCTTCTTGCAACAGGCACACACCGCGATACATT 540
1-2   AGTCGATGCTGAAGCGTTAATTTTAATGCTTCTTGCAACAGGCACACACCGCGATACATT 540
1-3   AGTCGATGCTGAAGCGTTAATTTTAATGCTTCTTGCAACAGGCACACACCGCGATACATT 540
2     AGTCGATGCTGAAGCGTTAATTTTAATGCTTCTTGCAACAGGCACACACCGCGATACATT 482
3     -----

1-1   GAACATTGAGTAA 553
1-2   GAACATTGAGTAA 553
1-3   GAACATTGAGTAA 553
2     GAACATTGAGTAA 495
3     -----

```

## Нуклеотидные последовательности ГА систем *Lactobacillus casei*

### RelBE1<sub>Lcs</sub>



Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. casei* BL23 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (270)	АК белка (89)	НК гена (234)	АК белка (78)
1	<b>BD-II, LC2W, W56</b> , 17к, 42ст, 48ст, 51ст,	0	0	0	0
2	гКНМ577	1	0	10	2 D2N K57E
3	20011, гКНМ23	3	0	10	3 H42V K57E G77V
4	К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	4	1 E72Q	10	3 H42V K57E G77V

### Антитоксин

1	<b>ATC</b> GCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
2	<b>ATC</b> GCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
3	<b>ATC</b> GCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCC <b>T</b> GAATTA AAAAAGT 60
4	<b>ATC</b> GCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCC <b>T</b> GAATTA AAAAAGT 60
	***** . ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
1	GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
2	GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
3	GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTAC <b>G</b> ATGTTC 120
4	GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTAC <b>G</b> ATGTTC 120
	***** *****
1	ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
2	ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
3	ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
4	ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
	*****
1	ACSTTACAGGCGTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCT 240
2	ACSTTACAGGCGTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCT 240
3	ACSTTACAGGCGTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCT 240
4	ACSTTACAGGCGTGAAAGAAGCAAAGCACCC <b>A</b> AGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCT 240
	***** *****

```

1 GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTA 270
2 GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTA 270
3 GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTA 270
4 GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTA 270
*****

```

**Токсин**

```

1 ATGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCTGCTGGTACAAATGCTGAACTATTA 60
2 ATGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCCGCTGGTACAAATGCTGAACTATTA 60
3 ATGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCCGCTGGTACAAATGCTGAACTATTA 60
4 ATGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCCGCTGGTACAAATGCTGAACTATTA 60
*** . ***** . *****

```

```

1 AGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCCTCAAGCAGCGAGTGAAAGGATATCGTGAA 120
2 AGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCCTCAAGCAGCGAGTGAAAGGATATCGTGAA 120
3 AGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCCTCAAGCAGCGAGTGAAAGGATATCGTGAA 120
4 AGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCCTCAAGCAGCGAGTGAAAGGATATCGTGAA 120
*****

```

```

1 CTACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTAAGCAGCAAGAT 180
2 CTACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTGAGCAGCAAGAT 180
3 CTACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTGAGCAGCAAGAT 180
4 CTACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTGAGCAGCAAGAT 180
*** . ***** . *****

```

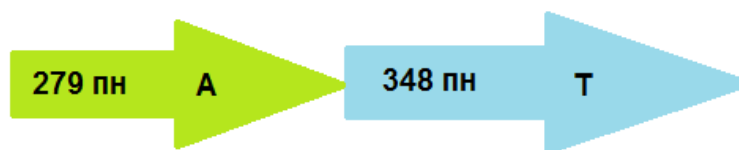
```

1 CTCATTTTGACCCGTGGTTAGAACGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 234
2 CTCATTTTGACCCGTGGTTAGAACGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 234
3 CTCATTTTGACCCGTGGTTAGAACGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 234
4 CTCATTTTGACCCGTGGTTAGAACGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 234
** ***** . ***** . ***** ***** *****

```

## Нуклеотидные последовательности ТА систем *Lactobacillus helveticus*

### RelBE1<sub>Lhv</sub>



Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. helveticus* DCP4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (279)	АК белка (92)	НК гена (348)	АК белка (115)
1	<b>MTCC5463</b> , NNIE	0	0	1	1 D58G
2	<b>H10</b>	0	0	на 3 нк ген больше 2	На 1 ак белок больше 2 V32A D58G +№103: L
3	<b>R0052</b>	0	0	3	3 V17A D43G G83S
4	100ам, Er315/402, NK1	1	1 №85: E→D	3	3 V32A D58G P73L

### АНТИТОКСИН

```

1 ATCACAGTAGCATTAACTCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTAATAAATATTTAGATCAA 60
2 ATCACAGTAGCATTAACTCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTAATAAATATTTAGATCAA 60
3 ATCACAGTAGCATTAACTCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTAATAAATATTTAGATCAA 60
4 ATCACAGTAGCATTAACTCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTAATAAATATTTAGATCAA 60
*****

```

```

1 GTAAACGATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCAGATCAAATAGTCGTAGTGTTCAGTA 120
2 GTAAACGATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCAGATCAAATAGTCGTAGTGTTCAGTA 120
3 GTAAACGATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCAGATCAAATAGTCGTAGTGTTCAGTA 120
4 GTAAACGATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCAGATCAAATAGTCGTAGTGTTCAGTA 120
*****

```

```

1 ATTTCTCAGGAAAAGATGTATTGGATGGAGAAAGCTATACAAGCAAAGAAGATTCATTA 180
2 ATTTCTCAGGAAAAGATGTATTGGATGGAGAAAGCTATACAAGCAAAGAAGATTCATTA 180
3 ATTTCTCAGGAAAAGATGTATTGGATGGAGAAAGCTATACAAGCAAAGAAGATTCATTA 180
4 ATTTCTCAGGAAAAGATGTATTGGATGGAGAAAGCTATACAAGCAAAGAAGATTCATTA 180
*****

```

```

1 GATTACGCTGTTGCTCGTGATCAATTAATTCGTAGAAATGTTTTGCCTGATGACCCAATT 240
2 GATTACGCTGTTGCTCGTGATCAATTAATTCGTAGAAATGTTTTGCCTGATGACCCAATT 240
3 GATTACGCTGTTGCTCGTGATCAATTAATTCGTAGAAATGTTTTGCCTGATGACCCAATT 240
4 GATTACGCTGTTGCTCGTGATCAATTAATTCGTAGAAATGTTTTGCCTGATGACCCAATT 240
*****

```

```

1 GTTGAATCCAATGATGATTATTGGGAGAAATTTAAA 279
2 GTTGAATCCAATGATGATTATTGGGAGAAATTTAAA 279
3 GTTGAATCCAATGATGATTATTGGGAGAAATTTAAA 279
4 GTTGAATCCAATGAGATTATTGGGAGAAATTTAAA 279
*****

```

## Токсин

```

1 ATCTCAAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAGACGTCTTGG 60
2 ATCTCAAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAGACGTCTTGG 60
3 ATCTCAAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAGACGTCTTGG 15
4 ATCTCAAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAGACGTCTTGG 60
*****

```

```

1 AAAC TTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGTAGCTATCGAAGAATTACTCGAAACT 120
2 AAAC TTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGCAGCTATCGAAGAATTACTCGAAACT 120
3 AAAC TTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGCAGCTATCGAAGAATTACTCGAAACT 75
4 AAAC TTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGCAGCTATCGAAGAATTACTCGAAACT 120
*****

```

```

1 GGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCATCCTTTAAAAAGGCGACTAGCTGGTTATCGC 180
2 GGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCATCCTTTAAAAAGGCGACTAGCTGGTTATCGC 180
3 GGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCATCCTTTAAAAAGGCGACTAGCTGGTTATCGC 135
4 GGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCATCCTTTAAAAAGGCGACTAGCTGGTTATCGC 180
*****

```

```

1 GAATTCATGTTAGAGATACCCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTA 240
2 GAATTCATGTTAGAGATACCCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTA 240
3 GAATTCATGTTAGAGATACCCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTA 195
4 GAATTCATGTTAGAGATACCCCTAAAGGTGAGCAGCTAACGATATAAATGATGTATTA 240
*****

```

```

1 GTCATTTGGTATATTGAACACAATAACTTAGTGGTAGTTGGTGTACGAGTAGGCTCTCAC 300
2 GTCATTTGGTATATTGAACACAATAACTTAGTGGTAGTTGGTGTACGAGTAGGCTCTCAC 300
3 GTCATTTGGTATATTGAACACAATAACTTAGTGGTAGTTGGTGTACGAGTAGGCTCTCAC 255
4 GTCATTTGGTATATTGAACACAATAACTTAGTGGTAGTTGGTGTACGAGTAGGCTCTCAC 300
*****

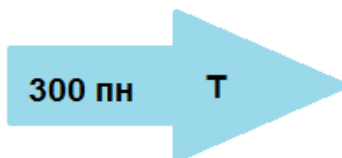
```

```

1 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAAA 348
2 CAACGACTACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAAA 351
3 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAAA 303
4 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAAA 348
*****

```





Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. helveticus* DCP4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Токсин	
		НК гена (300)	АК белка (99)
1	NNIE	1	0
2	<b>MTCC5463</b>	2	0
3	<b>H10</b>	2	1 E32K
4	100аш, Er315/402, NK1	2	2 W84C W85G
5	<b>R0052</b>	4	2 P55A W84C

```

1 ATGTTTAAACGTTAAGGAAAGACGTATTCTAAAAAGCATATTA AAAATCTAAAGTCTGCT 60
2 ATGTTTAAACGTTAAGGAAAGACGTATTCTAAAAAGCATATTA AAAATCTAAAGTCTGCT 60
3 ATGTTTAAACGTTAAGGAAAGACGTATTCTAAAAAGCATATTA AAAATCTAAAGTCTGCT 60
4 ATGTTTAAACGTTAAGGAAAGACGTATTCTGAAAAAGCATATTA AAAATCTAAAGTCTGCT 60
5 ATGTTTAAACGTTAAGGAAAGACGTATTCTAAAAAGCATATTA AAAACCTAAAGTCTGCT 60
*****.*****

```

```

1 AGTTTATATAAAAACCTTATCGCAAAATCCATAATGAATTGGAAACCGATCCTTTAATTAGA 120
2 AGTTTATATAAAAACCTTATCGCAAAATCCATAATGAATTGGAAACCGATCCTTTAATTAGA 120
3 AGTTTATATAAAAACCTTATCGCAAAATCCATAATGAATTGGAAACCGATCCTTTAATTAGA 120
4 AGTTTATATAAAAACCTTATCGCAAAATCCATAATGAATTGGAAACCGATCCTTTAATTAGA 120
5 AGTTTATATAAAAACCTTATCGCAAAATCCATAATGAATTGGAAACCGATCCTTTAATTAGA 120
*****.*****

```

```

1 ACTCATCATTTTGTAGCTCTTAGCCAAAAGAGGCGTTAAGCCACCTGTATATTCAAAAAGG 180
2 ACTCATCATTTTGTAGCTCTTAGCCAAAAGAGGCGTTAAGCCACCTGTATATTCAAAAAGG 180
3 ACTCATCATTTTGTAGCTCTTAGCCAAAAGAGGCGTTAAGCCACCTGTATATTCAAAAAGG 180
4 ACTCATCATTTTGTAGCTCTTAGCCAAAAGAGGCGTTAAGCCACCTGTATATTCAAAAAGG 180
5 ACTCATCATTTTGTAGCTCTTAGCCAAAAGAGGCGTTAAGCCAGCTGTATATTCAAAAAGG 180
*****.*****

```

```

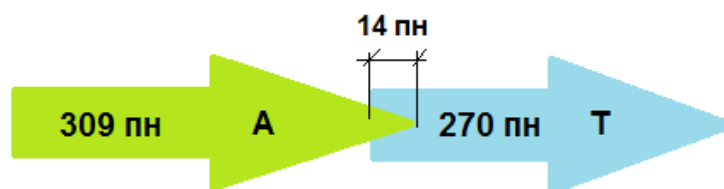
1 ATTAGCCAGGATAATCGAATTGTGTACTCAGTTGATCTAAAAAGCAAAGAGGTAATTATT 240
2 ATTAGCCAGGATAATCGAATTGTGTACTCAGTTGATCTAAAAAGCAAAGAGGTAATTATT 240
3 ATTAGCCAGGATAATCGAATTGTGTACTCAGTTGATCTAAAAAGCAAAGAGGTAATTATT 240
4 ATTAGCCAGGATAATCGAATTGTGTACTCAGTTGATCTAAAAAGCAAAGAGGTAATTATT 240
5 ATTAGCCAGGATAATCGAATTGTGTACTCAGTTGATCTAAAAAGCAAAGAGGTAATTATT 240
*****.*****

```

```

1 TTTAGTGCCTGGTGGCATTATTTCGAGTGGCAATCAAAGCTTGATTCATAACAAAATT 300
2 TTTAGTGCCTGGTGGCATTATTCAAGTGGCAATCAAAGCTTGATTCATAACAAAATT 300
3 TTTAGTGCCTGGTGGCATTATTTCGAGTGGCAATCAAAGCTTGATTCATAACAAAATT 300
4 TTTAGTGCCTGCGGGCATTATTTCGAGTGGCAATCAAAGCTTGATTCATAACAAAATT 300
5 TTTAGTGCCTGCTGGCATTATTTCGAGTGGCAATCAAAGCTTGATTCATAACAAAATT 300
*****.*****

```

**RelBE3<sub>Lhv</sub>**

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. helveticus* Н10 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штамм	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (309)	АК белка (102)	НК гена (270)	АК белка (89)
1	100аш, Er315/402, NK1, NNIE	0	0	2	1 I69M
2	<b>R0052</b>	1	0	1	1 I69M
3	<b>MTCC5463</b>	2	1 Т4Р Е76К	2	1 I69М

**АНТИТОКСИН**

```

1   ATGCTACAААСАССААТААТАТТАААГСАГТТАСТГСТСГТГАССТАСГТААТААСТТТ 60
2   ATGCTACAААСАССТТААТААТАТТАААГСАГТТАСТГСТСГТГАССТАСГТААТААСТТТ 60
3   ATGCTACAААСАССААТААТАТТАААГСАГТТАСТГСТСГТГАССТАСГТААТААСТТТ 60
   ***** .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1   АААААААТТГСТГАТГАСАТТААТГАСТАТГАТАСТАСАГТТАТТГТТГСТСГТСТААА 120
2   АААААААТТГСТГАТГАСАТТААТГАСТАТГАТАСТАСАГТТАТТГТТГСТСГТСТААА 120
3   АААААААТТГСТГАТГАСАТТААТГАСТАТГАТАСТАСАГТТАТТГТТГСТСГТСТААА 120
   *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1   GACAAAААСГТСГТААТТАТТТТСАСААААГААТАТГАТТКАТГГСААГААССТСАТАТ 180
2   GACAAAААСГТСГТААТТАТТТТСАСААААГААТАТГАТТКАТГГСААГААССТСАТАТ 180
3   GACAAAААСГТСГТААТТАТТТТСАСААААГААТАТГАТТКАТГГСААГААССТСАТАТ 180
   *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1   СТТСТАГГГАСТАААГСАААТСГТГАТГАТТАТТАГСАААГСТАААГААТСГТТТГААААТ 240
2   СТТСТАГГГАСТАААГСАААТСГТГАТГАТТАТТАГСАААГСТАААГААТСГТТТГААААТ 240
3   СТТСТАГГГАСТАААГСАААТСГТГАТГАТТАТТАГСАААГСТААААААТСГТТТГААААТ 240
   *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1   АААГАТАСССГАААСАААТСТТААСССГАААГААТТЦГААГГСТСТААСТАААГАТГАС 300
2   АААГАТАСССГАААСАААТСТТААСССГАААГААТТЦГААГГСТСТААСТАААГАТГАС 300
3   АААГАТАСССГАААСАААТСТТААСССГАААГААТТЦГААГГСТСТААСТАААГАТГАС 300
   *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

1   GAAGCT 309
2   GAAGCT 309
3   GAAGCT 309
   *****

```

## Токсин

```

1 ATGACGAAGCTTAAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCTAGAGTGGAAG 60
2 ATGACGAAGCTTAAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCTAGAGTGGAAG 60
3 ATGACGAAGCTTAAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCTAGAGTGGAAG 60
*****

1 AAAGAAGATAAAAAAAGCTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCATTAGAGATTGTCAACGCCAT 120
2 AAAGAAGATAAAAAAAGCTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCATTAGAGATTGTCAACGCCAT 120
3 AAAGAAGATAAAAAAAGCTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCATTAGAGATTGTCAACGCCAT 120
*****

1 CCATTCACCTGGAAAAGGAAAACCTGAGCCTTTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCT 180
2 CCATTCACCTGGAAAAGGAAAACCTGAGCCTTTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCT 180
3 CCATTCACCTGGAAAAGGAAAACCTGAGCCTTTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCT 180
*****

1 CGAAAAATCAATCACAAAGATCGTATGGTTTATTCAGTTACGGCAACAGAACTTCAAATA 240
2 CGAAAAATTAATCACAAAGATCGTATGGTTTATTCAGTTACGGCAACAGAACTTCAAATA 240
3 CGAAAAATCAATCACAAAGATCGTATGGTTTATTCAGTTACGGCAACAGAACTTCAAATA 240
*****

1 TGGCAACTAAAATATCACTATTCTAAA 270
2 TGGCAACTAAAATATCACTATTCTAAA 270
3 TGGCAACTAAAATATCACTATTCTAAA 270
*****

```

**RelBB4<sub>Lhv</sub>**

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. helveticus* H10 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штаммы	Антитоксин_1		Антитоксин_2	
		НК гена (168)	АК белка (55)	НК гена (309)	АК белка (102)
1	<b>MTCC5463, R0052</b>	0	0	0	0
2	<b>DPC4571, 100ash</b> Er315/402, NK1, NNIE	0	0	2	2 P55S A71P

**Антитоксин**

```

1  ATGAAAGAAAGAACGATTAATATTC AATTGGACAAGGACATCGTTAATACGGCAAAAGCA 60
2  ATGAAAGAAAGAACGATTAATATTC AATTGGACAAGGACATCGTTAATACGGCAAAAGCA 60
   *****

1  ATTCTAAAAGAAAATAATTTAGCCATAGATGATGCGGTTAAAATGTTGTATAGCCAATTT 120
2  ATTCTAAAAGAAAATAATTTAGCCATAGATGATGCGGTTAAAATGTTGTATAGCCAATTT 120
   *****

1  GTTTTAACTGGGCAGTTACCGTTTAAAATTGGTAAAGGGAAGAAT 168
2  GTTTTAACTGGGCAGTTACCGTTTAAAATTGGTAAAGGGAAGAAT 168
   *****

```

**Токсин**

```

1  ATGGATTACAAAGATCAAACCTTCGATGCAAAAAACACAACSTAAGCATTTCCGTTGATGAA 60
2  ATGGATTACAAAGATCAAACCTTCGATGCAAAAAACACAACSTAAGCATTTCCGTTGATGAA 60
   *****

1  GATTTAGCTAAGGATGTCCAAGAAAAATTAGAAATGCTAGGATTAGATCAAAGTGATTTT 120
2  GATTTAGCTAAGGATGTCCAAGAAAAATTAGAAATGCTAGGATTAGATCAAAGTGATTTT 120
   *****

1  TTAATAGGCSTTTTGACSTAATATAGCTAATAATAAAAAATTACSTTTTAGCAAGCTTACT 180
2  TTAATAGGCSTTTTGACSTAATATAGCTAATAATAAAAAATTACSTTTTAGCAAGCTTACT 180
   *****

1  AATGAAGAAGAGGAAAAAGCAATATTTGGCTGCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGG 240
2  AATGAAGAAGAGGAAAAAGCAATATTTGGCTCCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGG 240
   *****

1  GGAAATATTCCTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAAGA 300
2  GGAAATATTCCTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAAGA 300
   *****

1  AACGAT 309
2  AACGAT 309
   *****

```

**RelBE5<sub>Lhv</sub>**

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков с генами и белками штамма *L. helveticus* DPC4571 (число замен НК и АК). Жирным шрифтом отмечены штаммы из GenBank.

№	Штаммы	Антитоксин		Токсин	
		НК гена (315)	АК белка (104)	НК гена (882)	АК белка (293)
1	<b>H10, R0052</b> , 100ash, Er315/402, NK1, NNIE	0	0	1	1 D152G
2	<b>MTCC5463</b>	1	1 L87I	3	2 D152G A279T

**АНТИТОКСИН**

```

1 ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAAGGAAAAGGCA 60
2 ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAAGGAAAAGGCA 60
  *****

1 GAAGCTATTCTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGGCAATTAACATGTTCTATGAT 120
2 GAAGCTATTCTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGGCAATTAACATGTTCTATGAT 120
  *****

1 CAGATTATTCTTCATAATGGTATTCCTTTTCAGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAAT 180
2 CAGATTATTCTTCATAATGGTATTCCTTTTCAGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAAT 180
  *****

1 TTGGATCAAATGAATAAGTATGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTG 240
2 TTGGATCAAATGAATAAGTATGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTG 240
  *****

1 AACGGAAGGGAAGATTTACTTGGAGATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGAATGAA 300
2 AACGGAAGGGAAGATTTAAATTGGAGATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGAATGAA 300
  *****

1 AAGAAAGACAАСТАА 315
2 AAGAAAGACAАСТАА 315
  *****

```

## Токсин

1 ATGATGGCAAGAATTATTATTGGCATTATTGTTGTTTTAGTTATTGTGTATGTTTGTGT 60  
 2 ATGATGGCAAGAATTATTATTGGCATTATTGTTGTTTTAGTTATTGTGTATGTTTGTGT 60  
 \*\*\*\*\*

1 GGTTTTAAAATCGTTCACAAAATAATGAAGGTTTGGTTGAAACCTTGGGTAAGTATTCT 120  
 2 GGTTTTAAAATCGTTCACAAAATAATGAAGGTTTGGTTGAAACCTTGGGTAAGTATTCT 120  
 \*\*\*\*\*

1 AAGACAGTAAAAGCTGGATTTATCTTTGTCTGGCCACTTTTCCAAAGAATTCGCAAAGTT 180  
 2 AAGACAGTAAAAGCTGGATTTATCTTTGTCTGGCCACTTTTCCAAAGAATTCGCAAAGTT 180  
 \*\*\*\*\*

1 CCATTAGCACTTCAACCACTTGAATTTCTAAGTACTCAATCATTACCAAAGATAACGCT 240  
 2 CCATTAGCACTTCAACCACTTGAATTTCTAAGTACTCAATCATTACCAAAGATAACGCT 240  
 \*\*\*\*\*

1 GAAATTTCTACTAGTTTAACTTTGAACTACTTGGTCACTGATTCATACCGTTACTTCTAC 300  
 2 GAAATTTCTACTAGTTTAACTTTGAACTACTTGGTCACTGATTCATACCGTTACTTCTAC 300  
 \*\*\*\*\*

1 AACAAACCCGACTCAGTTGAATCAATGGTGCATTAATCCGTGGTCACTTGCCTGACATT 360  
 2 AACAAACCCGACTCAGTTGAATCAATGGTGCATTAATCCGTGGTCACTTGCCTGACATT 360  
 \*\*\*\*\*

1 ATTGGTCGTATGGATTTGAACGCAGCCCTTGGCTCAACTAAGGAAATTAACGATCAACTT 420  
 2 ATTGGTCGTATGGATTTGAACGCAGCCCTTGGCTCAACTAAGGAAATTAACGATCAACTT 420  
 \*\*\*\*\*

1 TTCACTGCAACTGGTGACCTGACTGATATCTACGGTATCAAGGTCGTTTCGTGTCAACGTT 480  
 2 TTCACTGCAACTGGTGACCTGACTGATATCTACGGTATCAAGGTCGTTTCGTGTCAACGTT 480  
 \*\*\*\*\*

1 GATGAACTTTTACCAAGTGTGAAATTCACATGCCATGGACAAAACAACCTACTGCCGAC 540  
 2 GATGAACTTTTACCAAGTGTGAAATTCACATGCCATGGACAAAACAACCTACTGCCGAC 540  
 \*\*\*\*\*

1 CGTGAAAAGACTGCCGCAATTGCTAAGGCCGAAGGTGAAGCTCGTACCATTGGAATGACC 600  
 2 CGTGAAAAGACTGCCGCAATTGCTAAGGCCGAAGGTGAAGCTCGTACCATTGGAATGACC 600  
 \*\*\*\*\*

1 ACTAAGGCTAAGAACGATGCTTTGGTTGCTACTGCTAAGGCCAACCTGAGGCAGTTAAG 660  
 2 ACTAAGGCTAAGAACGATGCTTTGGTTGCTACTGCTAAGGCCAACCTGAGGCAGTTAAG 660  
 \*\*\*\*\*

1 ACGCAAGCTGATGCCGACGCTTACCGTGTACAAAAGATGCAAGAAGCCTTGTCAAAGGCT 720  
 2 ACGCAAGCTGATGCCGACGCTTACCGTGTACAAAAGATGCAAGAAGCCTTGTCAAAGGCT 720  
 \*\*\*\*\*

1 GGCGAAGGTTACTTCAGAAACCAAAGTTTGGACAGCTTTAACCAATTGGCTCAAGGCCCT 780  
 2 GGCGAAGGTTACTTCAGAAACCAAAGTTTGGACAGCTTTAACCAATTGGCTCAAGGCCCT 780  
 \*\*\*\*\*

1 AACAACTTGATCGTGGTTGGCAAGGATGAAATGACCGACTTGGGTAAGGTTCCCTGCTTTG 840  
 2 AACAACTTGATCGTGGTTGGCAAGGATGAAATGACCGACTTGGGTAAGGTTCCCTGCTTTG 840  
 \*\*\*\*\*

1 AGAAAGGTGTGGGATGCCAGCGACGATAAGAAAGATAAATAA 882  
 2 AGAAAGGTGTGGGATGCCAGCGACGATAAGAAAGATAAATAA 882  
 \*\*\*\*\*

## Приложение Г

Предполагаемые ТА системы в штаммах *L. helveticus* DCP4571, H10 и R0052Предполагаемые ТА системы в штамме *L. helveticus* DCP4571

№ п/п	ТА система	Величина белка	Характеристика белка
1.	Lhv_0083	140aa	Profag repressor
	Lhv_0084	117aa	putative transcriptional regulator
2.	Lhv_0439	85aa	hypothetical protein
	Lhv_0440	142aa	putative DNA recombination protein
3.	Lhv_0440	142aa	putative DNA recombination protein
	Lhv_0441	103aa	YrzB family protein
4.	Lhv_0454	141 aa	Methyl-accepting chemotaxis-like protein
	Lhv_0455	123aa	hypothetical protein
5.	Lhv_0782	95aa	hypothetical protein
	Lhv_0783	166aa	hypothetical protein
6.	Lhv_2403	97aa	hypothetical protein
	Lhv_0815	75aa	hypothetical protein
7.	Lhv_0860	145aa	Cell division protein sepF
	Lhv_2407	100aa	cell division membrane protein
8.	Lhv_0915	-	-
	Lhv_0917	171aa	hypothetical protein
9.	Lhv_1127	92aa	PHD family toxin-antitoxin system
	Lhv_2502	115aa	RelE family toxin-antitoxin system
10.	Lhv_1657	122aa	Xre family toxin-antitoxin system
	Lhv_1658	88aa	hypothetical protein
11.	Lhv_2095	125aa	Cupredoxin-like domain protein
	Lhv_2096	95aa	Cupredoxin-like domain protein

**Предполагаемые ТА системы в штамме *L. helveticus* Н10**

<b>№ п/п</b>	<b>ТА система</b>	<b>Величина белка</b>	<b>Характеристика белка</b>
1.	LBHH_0481	172aa	MutT/NUDIX family protein
	LBHH_0482	89aa	hypothetical protein
2.	LBHH_0655	57aa	hypothetical protein
	LBHH_0656	47aa	plasmid replication initiation protein
3.	LBHH_0842	53aa	histidine kinase
	LBHH_0843	201aa	ArsR family transcriptional regulator
4.	LBHH_0952	135aa	MerR family transcriptional regulator
	LBHH_0953	60aa	hypothetical protein
5.	LBHH_1065	95aa	PHD family toxin-antitoxin system
	LBHH_1066	116aa	RelE family toxin-antitoxin system
6.	LBHH_1219	153aa	Toxin-antitoxin system, antitoxin component, HicB family
	LBHH_1220	255aa	Choloylglycine hydrolase
7.	LBHH_1715	61aa	Integral membrane protein
	LBHH_1716	186aa	hypothetical protein
8.	LBHH_1826	46aa	Toxin-antitoxin system
	LBHH_1827	102aa	hypothetical protein
9.	LBHH_1976	85aa	putative membrane protein
	LBHH_1977	129aa	phospholipase D
10.	LBHH_1992	102aa	PHD family toxin-antitoxin system
	LBHH_2056	89aa	RelE family toxin-antitoxin system



Предполагаемые ТА системы в штамме *L. helveticus* R0052

№п/п	ТА система	Величина белка	Характеристика белка
1.	R0052_00225	117aa	membrane protein
	R0052_00230	66aa	DNA-binding protein
2.	R0052_02305	47aa	membrane carboxypeptidase, arginine repressor
	R0052_02310	28aa	antitoxin HicB
3.	R0052_02310	28aa	antitoxin HicB
	R0052_02315	56aa	antitoxin HicB (39%), glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (52%)
4.	R0052_02570	141aa	Methyl-accepting chemotaxis-like protein
	R0052_02575	123aa	hypothetical protein
5.	R0052_02870	142aa	hypothetical protein
	R0052_02875	87aa	hypothetical protein
6.	R0052_03020	60aa	addiction module toxin RelE
	R0052_03025	87aa	AbrB family transcriptional regulator
7.	R0052_03080	42aa	glycolate oxidase
	R0052_03085	37aa	6-phospho-beta-glucosidase
8.	R0052_03140	111aa	Xre family toxin-antitoxin system
	R0052_03145	63aa	hypothetical protein
9.	R0052_03820	158aa	DNA-directed RNA polymerase beta subunit
	R0052_03825	92aa	acetyl-CoA carboxylase
10.	R0052_04205	97aa	hypothetical protein
	R0052_04210	98aa	hypothetical protein
11.	R0052_04940	53aa	histidine kinase
	R0052_04945	203aa	ArsR family transcriptional regulator
12.	R0052_05465	34aa	Sir2 silent information regulator family NAD-dependent deacetylase
	R0052_05470	216aa	Sir2 silent information regulator family NAD-dependent deacetylase
13.	R0052_05680	150aa	hypothetical protein
	R0052_05685	58aa	HTH-type transcriptional regulator
14.	R0052_05850	67aa	Amidase
	R0052_05855	174aa	cell separation protein
15.	R0052_06465	45aa	cell division protein Fic
	R0052_06470	71aa	hypothetical protein
16.	R0052_06585	125aa	camphor resistance protein CrcB
	R0052_06590	127aa	chromosome condensation protein CrcB
17.	R0052_07345	171aa	hypothetical protein
	R0052_07350	89aa	polyferredoxin
18.	R0052_07620	146aa	Cell division protein sepF
	R0052_07625	100aa	cell division membrane protein

19.	R0052_07860	93aa	hypothetical protein
	R0052_07865	75aa	hypothetical protein
20.	R0052_08030	89aa	hypothetical protein
	R0052_08035	195aa	hypothetical protein
21.	R0052_08035	195aa	hypothetical protein
	R0052_08040	143aa	Prepilin-type cleavage/methylation protein
22.	R0052_08615	90aa	hypothetical protein
	R0052_08620	90aa	hypothetical protein
23.	R0052_09820	110aa	HicB protein
	R0052_09825	83aa	hexulose-6-phosphate isomerase
24.	R0052_10095	175aa	glycosyltransferase in exopolysaccharide biosynthesis
	R0052_10100	71aa	CDP-glycerol:poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase
25.	R0052_10550	63aa	hypothetical protein
	R0052_10555	62aa	hypothetical protein
26.	R0052_10560	73aa	hypothetical protein
	R0052_10565	75aa	XRE family transcriptional regulator
27.	R0052_10895	45aa	acetoin(diacetyl)reductase
	R0052_10900	212aa	acetoin(diacetyl)reductase
28.	R0052_11130	40aa	hypothetical protein
	R0052_11135	120aa	hypothetical protein
29.	R0052_11135	120aa	hypothetical protein
	R0052_11140	79aa	transposase
30.	R0052_11615	129aa	phospholipase D
	R0052_11620	68aa	immunity protein PlnI
31.	R0052_11690	102aa	PHD family toxin-antitoxin system
	R0052_11695	89aa	RelE family toxin-antitoxin system
32.	R0052_11890	125aa	Cupredoxin-like domain protein
	R0052_11895	95aa	Cupredoxin-like domain protein

Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB\_1*Ген *RelB\_1*

```

L.casei_BD_II      ATGGCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
L.casei_LC2W      ATGGCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
L.casei_BL23      ATGGCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
L.casei_W56       ATGGCAGCCACAAAGAAAGAAACTCGCTTGAATATTCGTGTTGATCCGGAATTA AAAAAGT 60
*****

L.casei_BD_II      GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
L.casei_LC2W      GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
L.casei_BL23      GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
L.casei_W56       GCTGCTCAAATCGTAGCAAATGATATGGGCATCGACTTGACCGCAGCTGTTACTATGTTC 120
*****

L.casei_BD_II      ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
L.casei_LC2W      ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
L.casei_BL23      ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
L.casei_W56       ATGACGAAAATGGTGAAAGATCACGCCCTCCCGTTTACCCCAACAAGTCTACCAGTTGAA 180
*****

L.casei_BD_II      ACCTTACAGGCGCTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCCT 240
L.casei_LC2W      ACCTTACAGGCGCTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCCT 240
L.casei_BL23      ACCTTACAGGCGCTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCCT 240
L.casei_W56       ACCTTACAGGCGCTGAAAGAAGCAAAGCACCCAGAGCTGCTCAAAAAATACAGCACGCCCT 240
*****

L.casei_BD_II      GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTATAG 270
L.casei_LC2W      GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTATAG 270
L.casei_BL23      GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTATAG 270
L.casei_W56       GATGACATGTGGAGAGACTTGAATGTATAG 270
*****

```

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB\_2*

```

L.acidophilus_NCFM          ATGGCAGAAAAACAACGGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.acidophilus_La_14        ATGGCAGAAAAACAACGGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.helveticus_DPC_4571     ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.amylovorus_GRL_1112     ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.helveticus_R0052        ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.helveticus_H10          ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.helveticus_CNRZ32       ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.acidophilus_30SC        ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.amylovorus_GRL1118      ATGGCAGAAAAACAACAGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.kefiranofaciens_ZW3     ATGGCAGAGAAAGACAACAGGCCTGTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
L.crispatus_ST1           ATGGCTGAGAAAAACAACGGGACTTTATGTCAGAATGAATCCAGAAAAGAA 50
*****:**.*.*.***** **.* ** *****

L.acidophilus_NCFM          GGAAAAGGCGGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGTTTGAATTCGGCTACGG 100
L.acidophilus_La_14        GGAAAAGGCGGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGTTTGAATTCGGCTACGG 100
L.helveticus_DPC_4571     GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.amylovorus_GRL_1112     GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.helveticus_R0052        GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.helveticus_H10          GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.helveticus_CNRZ32       GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.acidophilus_30SC        GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.amylovorus_GRL1118      GGAAAAGGCGAGAAGCTATTTTGAAAAAGCTGGGGTTAAATTCAGCTACGG 100
L.kefiranofaciens_ZW3     GGAAAAGGCGAGAAGCAATTTTGAAGCAATTAGGCTTGAATTCGCGACTG 100
L.crispatus_ST1           AGAAAAGGCGAGAAGCAATTTTAAAGCAATTAGGTTTGAATTCAGCTACTG 100
*****:**.*.*****:*** *.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*

L.acidophilus_NCFM          CAATTAACATGTTTTATGATCAAATTTATTTGCATAATGGTATTCCTTTT 150
L.acidophilus_La_14        CAATTAACATGTTTTATGATCAAATTTATTTGCATAATGGTATTCCTTTT 150
L.helveticus_DPC_4571     CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.amylovorus_GRL_1112     CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.helveticus_R0052        CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.helveticus_H10          CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.helveticus_CNRZ32       CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.acidophilus_30SC        CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.amylovorus_GRL1118      CAATTAACATGTTCTATGATCAGATTATTTCTTCATAATGGTATTCCTTTC 150
L.kefiranofaciens_ZW3     CGATTAACATGTTTTATGATCAAATTTATTTACATAATGGTATTCCTTTT 150
L.crispatus_ST1           CAATTAATATGTTTTATGATCAAATTTATTTACGTAATGGTATTCCTTTT 150
*.*.***** ***** *****.*.***** *.*.*****

L.acidophilus_NCFM          AGAGTTGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.acidophilus_La_14        AGAGTTGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.helveticus_DPC_4571     AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.amylovorus_GRL_1112     AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.helveticus_R0052        AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.helveticus_H10          AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.helveticus_CNRZ32       AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.acidophilus_30SC        AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAATA 200
L.amylovorus_GRL1118      AGAGTAGAGATTCCAAATGCATGGGATAATTTGGATCAAATGAATAAGTA 200
L.kefiranofaciens_ZW3     AGAGTTGAAATTCCAAATGCCTGGGATAATTTGGATCATATGAATAAGTA 200
L.crispatus_ST1           AGAGTTGAGATTCTAATGCTTGGGCCAACTTGGACTACATGAACAAGTA 200
*****:**.*.*****:***** ***** **.*.***** *.*.*****

L.acidophilus_NCFM          TGAATACACCAGGTTGCTTGACGAAACGCTCTTAATACGCTTAGTGGAAGG- 249
L.acidophilus_La_14        TGAATACACCAGGTTGCTTGACGAAACGCTCTTAATACGCTTAGTGGAAGG- 249
L.helveticus_DPC_4571     TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGAACGGAAGG- 249
L.amylovorus_GRL_1112     TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGAACGGAAGG- 249
L.helveticus_R0052        TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGAACGGAAGG- 249
L.helveticus_H10          TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGAACGGAAGG- 249
L.helveticus_CNRZ32       TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGAACGGAAGG- 249
L.acidophilus_30SC        TGAATACGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGACCGGAAGG- 249
L.amylovorus_GRL1118      TGAATATGCCAAACTGCTTGACGAGCGCCTGAACACATTGACCGGAAGG- 249
L.kefiranofaciens_ZW3     TGAATATGCTAAGCTCCTGGATGAACGGCTTAATACGCTCACC GGAAGG- 249
L.crispatus_ST1           TGAGTATGCTCATCTACTTGTATGAAAAGCTTAAC-CGCTTGGCAGAGCAG 249
***.**.*.*..* ** ** **.*..** ** *.*.*.*.*.*.*

L.acidophilus_NCFM          ---GAAGATTTGTTAGGAG-AAATTGCCAAGCAACTTGATGATGACAA-- 293
L.acidophilus_La_14        ---GAAGATTTGTTAGGAG-AAATTGCCAAGCAACTTGATGATGACAA-- 293
L.helveticus_DPC_4571     ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295

```

```

L.amylovorus_GRL_1112    ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.helveticus_R0052      ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.helveticus_H10        ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.helveticus_CNRZ32     ---GAAGATTTAATTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.acidophilus_30SC      ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.amylovorus_GRL1118    ---GAAGATTTACTTGGAG-ATATCGCCAAGAGGCTTGATGCGGAAAAGA 295
L.kefiranofaciens_ZW3   ---GAAGATCTATTGGGGGATGTCGCTAG----- 276
L.crispatus_ST1         ACCGATAGTTCCTAGGTG-AATTAGCCAAGGGAGTCGATCCAAG---- 294
                        **:..* . * * * * *: * * * * .

```

```

L.acidophilus_NCFM      ----AAAGAAAGATGAATAA 309
L.acidophilus_La_14     ----AAAGAAAGATGAATAA 309
L.helveticus_DPC_4571   ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.amylovorus_GRL_1112   ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.helveticus_R0052      ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.helveticus_H10        ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.helveticus_CNRZ32     ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.acidophilus_30SC      ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.amylovorus_GRL1118    ATGAAAAGAAAGACAATAA 315
L.kefiranofaciens_ZW3   -----
L.crispatus_ST1         ----AAGAAGGACGAGTAA 309

```



L.casei_Zhang_RelB_3_2	AGCTACCAAGGGGACACCAGTAACAGAGTTAAAAGACGCTAAAGGAGTCA 250
	. ** *** . * . * . ***** . ** . ** . ** . ***** **** . . *** .
L.kefiranofaciens_ZW3_RelB_3_3	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.plantarum_WCFS1_RelB_3_6	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 231
L.casei_ATCC_334_RelB_3_3	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.plantarum_16RelB_3_8	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.helveticus_H10_RelB_3_5	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.brevis_KB290_RelB_3_9	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.plantarum_P8_RelB_3_10	CTGATTGGCTCAACGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.plantarum_ST_III_RelB_3_7	CTGATTGGCTCAATGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.plantarum_16_RelB_3_1	CTGATTGGCTCAATGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.buchneri_RelB_3_4	CTGATTGGCTCAATGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.buchneri_NRR1_RelB_3_4	CTGATTGGCTCAATGATCCAGATGAGGACTAA 282
L.casei_Zhang_RelB_3_2	GCGATTGGCTCAATGATCCAGATGAGGACTGA 282
	***** ***** . *

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB4*

```

L.rhamnosus_LOCK908      ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
L.rhamnosus_Lc_705       ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
L.rhamnosus_ATCC_8530    ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  ATGGCAAAAGAATCCCGTATCCGCAATTGGATTAACACAATAACCAGAAA 50
                          ***.*.***.***** **.*.***.:*:*:*.* **.*:*:* **.*.*

L.rhamnosus_LOCK908      ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
L.rhamnosus_Lc_705       ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
L.rhamnosus_ATCC_8530    ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  ACGAGCTCTCCATGTTCTTAATCGTCTGGGACTAGAGAGATTCTCGGCTA 100
                          ***** *****.* .***** ***** * :* *****

L.rhamnosus_LOCK908      TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
L.rhamnosus_Lc_705       TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
L.rhamnosus_ATCC_8530    TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  TTAACATGTATTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
                          ***** *****

L.rhamnosus_LOCK908      CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
L.rhamnosus_Lc_705       CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
L.rhamnosus_ATCC_8530    CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  CTTGAAATGTCATTCGCCGATCAGCTTCGATTTGCAGAAGCAGATGTTAA 200
                          * * .***** * *****.* *****.*:*****

L.rhamnosus_LOCK908      AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
L.rhamnosus_Lc_705       AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
L.rhamnosus_ATCC_8530    AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTTGGTGCTTTGATGAAGGATT 250
                          ***** ***** * .***** *****

L.rhamnosus_LOCK908      TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
L.rhamnosus_Lc_705       TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
L.rhamnosus_ATCC_8530    TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
L.rhamnosus_GG_RelB_4_2  TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
                          *****.*.****

L.rhamnosus_ATCC_8530    ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
L.rhamnosus_Lc_705       ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
L.rhamnosus_LOCK908      ATGACCAAAAAATCCCGCATCAGCGTTAGGATTGATACCAAACTAAAGA 50
                          *****

L.rhamnosus_ATCC_8530    ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
L.rhamnosus_Lc_705       ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
L.rhamnosus_LOCK908      ACGAGCGCTCCATGTTCTTAATAGCATGGGATTAGATATTTCTCGGCTA 100
                          *****

L.rhamnosus_ATCC_8530    TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
L.rhamnosus_Lc_705       TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
L.rhamnosus_LOCK908      TTAACATGTACCTGAAACGGATTGGTGACACCGGTGCATTGCCATTTACA 150
                          *****

L.rhamnosus_ATCC_8530    CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
L.rhamnosus_Lc_705       CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
L.rhamnosus_LOCK908      CCTCCAATGTCATTTGTTGATCAGCTTCAAGTTGCAGAAGCTGATGTTAA 200
                          *****

L.rhamnosus_ATCC_8530    AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
L.rhamnosus_Lc_705       AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
L.rhamnosus_LOCK908      AGCGGGGCGAATAAAAAGCTTCAAGACTGTCGATGCTTTGATGAAGGATT 250
                          *****

L.rhamnosus_ATCC_8530    TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
L.rhamnosus_Lc_705       TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
L.rhamnosus_LOCK908      TATACAGTGATGTTGACGATTAA 273
                          *****

```



### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB5*

```

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 -----
L.helveticus_H10_RelB_5_5 ATGGATTACAAAGATCAAACCTTCGATGCAAAAAACACAACCTAAGCATTTTC 50
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 ATGGATTACAAAGATCAAACCTTCGATGCAAAAAACACAACCTAAGCATTTTC 50
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 ATGGATTACAAAGATCAAACCTTCGATGCAAAAAACACAACCTAAGCATTTTC 50

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 -----ATGCTAG 7
L.helveticus_H10_RelB_5_5 CGTTGATGAAGATTTAGCTAAGGATGTCCAAGAAAAATTAGAAATGCTAG 100
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 CGTTGATGAAGATTTAGCTAAGGATGTCCAAGAAAAATTAGAAATGCTAG 100
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 CGTTGATGAAGATTTAGCTAAGGATGTCCAAGAAAAATTAGAAATGCTAG 100
*****

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 GATTAGATCAAAGTGATTTTTTAATAGGCTTTTTGACTAATATAGCTAAT 57
L.helveticus_H10_RelB_5_5 GATTAGATCAAAGTGATTTTTTAATAGGCCTTTTTGACTAATATAGCTAAT 150
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 GATTAGATCAAAGTGATTTTTTAATAGGCCTTTTTGACTAATATAGCTAAT 150
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 GATTAGATCAAAGTGATTTTTTAATAGGCCTTTTTGACTAATATAGCTAAT 150
*****

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 AATAAAAAATTACCTTTTAGCAAGCTTACTAATGAAGAAGAGGAAAAAGC 107
L.helveticus_H10_RelB_5_5 AATAAAAAATTACCTTTTAGCAAGCTTACTAATGAAGAAGAGGAAAAAGC 200
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 AATAAAAAATTACCTTTTAGCAAGCTTACTAATGAAGAAGAGGAAAAAGC 200
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 AATAAAAAATTATCTTTTAGCAAGCTTACTAATGAAGAAGAGGAAAAAGC 200
*****

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 AATATTGGCTGCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGGGGAAATATTC 157
L.helveticus_H10_RelB_5_5 AATATTGGCTGCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGGGGAAATATTC 250
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 AATATTGGCTGCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGGGGAAATATTC 250
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 AATATTGGCTCCTAAATTAAGTGCATTAACAACGAGCTGGGGAAATATTC 250
*****

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 CTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAGA 207
L.helveticus_H10_RelB_5_5 CTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAGA 300
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 CTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAGA 300
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 CTGAGTTAAAGAATTTACAACAGTTGAAAGAGTGGCTGAATGAAGAAAGA 300
*****

L.helveticus_R0052_RelB_5_3 AACGATTAA 216
L.helveticus_H10_RelB_5_5 AACGATTAA 309
L.helveticus_CNRZ32_RelB_5_2 AACGATTAA 309
L.helveticus_DPC_4571_RelB_5_1 AACGATTAA 309
*****

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relB6*

```

>L.rhamnosus_LOCK900
ATGGAAACAAAATCCCGTATCAGCGTGCGAATTGATACCAAACCAAAGAACGGGCTCTCCATGTCCTCAATAGCAT
GGGACTAGATATGTCCTCAGCTATTAACATGTATTTGAAACGCATTTGGTGACACTGGTGAGTTGCCATTTACACCTG
AAATGTCGTTTCGCCGATCAGCTTCAAGCTGCAGAAGCTGATGTTAAAGCGGGACGAACCTAAGAGCTTCAAGACCGTT
GATGCCCTGATGAAGGATTTATACAATGATGTTGACGATTAA

```

RelE1

```

>L.rhamnosus_LOCK900
ATGATGTTGACGATTAATCGCACGCGCACTTTCAAACGACAATTTAAACATCTTCTTAGGCAAGGTAAAGATATGAC
GAAACTTGCAACTGCAATTGATACTTTGCAGCGTCAAGATCGTGTAATAATTAGCTTCTTTACACGACCATGCTTTAA
AGGGTGCTCACAGCGGCGAACGAGCATTTGCGTGTGCTCCTGATTGGCTTCTCGTTTTATAAAGTCGATGCTGAAGCG
TTAATTTTTAATGCTTCTTGCAACAGGCACACACCGGATACATTTGAACATTTGAGTAA

```

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE2*

```

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      ATGCCCACCTCCCTGCCCCCTCATCGAACAATCCCGCTTCAAAAAACATCT  50
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       ATGCCCACCTCCCTGCCCCCTCATCGAACAATCCCGCTTCAAAAAACATCT  50
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       ATGCCCACCTCCCTGCCCCCTCATCGAACAATCCCGCTTCAAAAAACATCT  50
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           ATGCCCACCTCCCTGCCCCCTTATCGAACAATCCCGCTTCAAAAAACATCT  50
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      ATGCCCACCTCCCTGCCCCCTCATCGAACAATCCCGCTTCAAAAAACATCT  50
*****

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      CAAACAACCTCCTCCAAGCCGGGCGCTTCACCAAGGCTGACTTTTCAGCAAG  100
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       CAAACAACCTCCTCCAAGCCGGGCGCTTCACCAAGGCTGACTTTTCAGCAAG  100
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       CAAACAACCTCCTCCAAGCCGGGCGCTTCACCAAGGCTGACTTTTCAGCAAG  100
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           CAAACAACCTCCTACAAGCCGGGCGCTTCACCTAAGGCTGACTTTTCAGCAAG  100
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      CAAACAACCTCCTCCAAGCCGGGCGCTTCACCAAGGCTGACTTTCAACAAG  100
*****

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      TCCTTGCTTACTTACAAACCAGCACCCCACTGCCGAAAAGTATGACGAT  150
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       TCCTTGCTTACTTACAAACCAGCACCCCACTGCCGAAAAGTATGACGAT  150
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       TCCTTGCTTACTTACAAACCAGCACCCCACTGCCGAAAAGTATGACGAT  150
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           TTCTTGCTTACTTACAAACCAGCACCCCACTGCCGAAAAGTATGACGAT  150
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      TTCTTGCTTACTTACAAACCAGCACCCCACTGCCGAAAAGTATGACGAT  150
* *****

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      CACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGTGCTTTGTTTCATCAAAGGTAA  200
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       CACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGTGCTTTGTTTCATCAAAGGTAA  200
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       CACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGTGCTTTGTTTCATCAAAGGTAA  200
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           CACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGTGCTTTGTTTCATCAAAGGTAA  200
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      CACGTGATCAAAAAACGCAAACCAGATCGTGCTTTGTTTCATCAAAGGTAA  200
*****

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      TTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGCTTGATTGATG  250
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       TTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGCTTGATTGATG  250
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       TTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGCTTGATTGATG  250
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           TTGGCTGCTCATTTACCGAGTTGAACCAGACGCGATCCGCTTGATTGATG  250
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      TTGGCTGCTCATTTATCGGGTTGAACCAGACGCGATCCGCTTGATTGATG  250
*****

L.rhamnosus_ATCC_8530_RelE_2_1      TTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA  273
L.rhamnosus_LOCK908_RelE_2_1       TTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA  273
L.rhamnosus_Lc_705_RelE_2_1       TTGGCCGCCATGGCGAGATTTAA  273
L.rhamnosus_GG_RelE_2_2           TCGGCCGCCATGGCGAGATTTAA  273
L_rhamnosus_LOCK900_RelE_2_3      TTGGCCGCCATGGCGAGACTTAA  273
* *****

```

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE3*

```

L.casei_W56_RelE_3_1      ATGCCCAATACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_BL23_RelE_3_1    ATGCCCAATACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_BD_II_RelE_3_1   ATGCCCAATACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_LC2W_RelE_3_1    ATGCCCAATACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_Zhang_RelE_3_2   ATGCCCACTACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 ATGCCCACTACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 ATGCCCACTACCAACTCACACAACAATCAGCTTCAAAAAGCACCTCAA 50
*****.*****

L.casei_W56_RelE_3_1      GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_BL23_RelE_3_1    GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_BD_II_RelE_3_1   GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_LC2W_RelE_3_1    GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_Zhang_RelE_3_2   GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 GCAACTCCTCCAAGCTGGCCGCTTTACTCAGAACGACTTTGAACAAGTCA 100
*****

L.casei_W56_RelE_3_1      CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_BL23_RelE_3_1    CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_BD_II_RelE_3_1   CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_LC2W_RelE_3_1    CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_Zhang_RelE_3_2   CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 CCAACTACTTGAAAACCGGCGACCCGCTGCCGGAAAAATACGACGATCAT 150
*****

L.casei_W56_RelE_3_1      GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_BL23_RelE_3_1    GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_BD_II_RelE_3_1   GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_LC2W_RelE_3_1    GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_Zhang_RelE_3_2   GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 GTCATCAAAAGTCGCAAACCTGATCGCGCTTTGTTTCATTAAGGCAGCTG 200
*****

L.casei_W56_RelE_3_1      GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGAAGGTACGGTTGCTGGACGTGG 250
L.casei_BL23_RelE_3_1    GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGAAGGTACGGTTGCTGGACGTGG 250
L.casei_BD_II_RelE_3_1   GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGAAGGTACGGTTGCTGGACGTGG 250
L.casei_LC2W_RelE_3_1    GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGAAGGTACGGTTGCTGGACGTGG 250
L.casei_Zhang_RelE_3_2   GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGACGGTACGGTTGCTGGATGTGG 250
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGACGGTACGGTTGCTGGATGTGG 250
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 GTTGCTGATCTATCGGGTAGAAGATTTGACGGTACGGTTGCTGGATGTGG 250
*****.*****

L.casei_W56_RelE_3_1      GGCGTCATGGGGACATTTAA 270
L.casei_BL23_RelE_3_1    GGCGTCATGGGGACATTTAA 270
L.casei_BD_II_RelE_3_1   GGCGTCATGGGGACATTTAA 270
L.casei_LC2W_RelE_3_1    GGCGTCATGGGGACATTTAA 270
L.casei_Zhang_RelE_3_2   GGCGTCATGGTGACATTTGA 270
L.casei_ATCC_334_RelE_3_3 GGCGTCATGGTGACATTTGA 270
L.casei_LOCK919_RelE_3_2 GGCGTCATGGTGACATTTGA 270
*****.*****

```



L.brevis\_ATCC\_367\_RelE\_4\_6 CAAATAG 357  
\* . \*\*\*\* .

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE5*

```

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 ATGTCAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAG 50
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 ATGTCAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAG 50
L.helveticus_H10_RelE_5_1 ATGTCAAAATTAGTATTTAGACCACGTGCAACATTTAATGCTGATATGAG 50
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 -----ATGAG 5
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 ACGTCTTGGAAAACCTTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGTAGCTA 100
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 ACGTCTTGGAAAACCTTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGTAGCTA 100
L.helveticus_H10_RelE_5_1 ACGTCTTGGAAAACCTTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGTAGCTA 100
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 ACGTCTTGGAAAACCTTGATCCAACAATAATTGATGACGTCAGAGTAGCTA 55
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 TCGAAGAATTACTCGAAACTGGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCAT 150
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 TCGAAGAATTACTCGAAACTGGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCAT 150
L.helveticus_H10_RelE_5_1 TCGAAGAATTACTCGAAACTGGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCAT 150
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 TCGAAGAATTACTCGAAACTGGTACGTTATCTGAAGAATATCGTGACCAT 105
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 CCTTTAAAAAGCGGACTAGCTGATTATCGCGAATTTTCATGTTAGAGATAC 200
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 CCTTTAAAAAGCGGACTAGCTGGTTATCGCGAATTTTCATGTTAGAGATAC 200
L.helveticus_H10_RelE_5_1 CCTTTAAAAAGCGGACTAGCTGGTTATCGCGAATTTTCATGTTAGAGATAC 200
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 CCTTTAAAAAGCGGACTAGCTGGTTATCGCGAATTTTCATGTTAGAGATAC 155
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 CCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTAGTCATTTGGT 250
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 CCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTAGTCATTTGGT 250
L.helveticus_H10_RelE_5_1 CCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTAGTCATTTGGT 250
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 CCCTAAAGGTGAGCAGCCTAACGATATAAATGATGTATTAGTCATTTGGT 205
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 ATATTGAACACAATAAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 347
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 ATATTGAACACAATAAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 347
L.helveticus_H10_RelE_5_1 ATATTGAACACAATAAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 350
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 ATATTGAACACAATAAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 302
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 347
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 347
L.helveticus_H10_RelE_5_1 CAACGACTACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 350
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 CAACG---ACTGTTTCCAGGTTTAAATAAGTCTAGAAAGTTTCGTAATA 302
                                         *****

L.helveticus_DPC_4571_RelE_5_3 G 348
L.helveticus_CNRZ32_RelE_5_4 G 348
L.helveticus_H10_RelE_5_1 G 351
L.helveticus_R0052_RelE_5_2 G 303
                                         *

```

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE6*

```

L.casei_LC2W      ATGTATAGTCTGGTTCGACGCCTACATTTAAGCGCGATCTAAAACGACTCTCCAAGAAG 60
L.casei_BD_II     ATGTATAGTCTGGTTCGACGCCTACATTTAAGCGCGATCTAAAACGACTCTCCAAGAAG 60
L.casei_BL23      ATGTATAGTCTGGTTCGACGCCTACATTTAAGCGCGATCTAAAACGACTCTCCAAGAAG 60
L.casei_W56       ATGTATAGTCTGGTTCGACGCCTACATTTAAGCGCGATCTAAAACGACTCTCCAAGAAG 60
*****

L.casei_LC2W      CATTGGCCGATGGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCTGCTGGTACAAATGCT 120
L.casei_BD_II     CATTGGCCGATGGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCTGCTGGTACAAATGCT 120
L.casei_BL23      CATTGGCCGATGGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCTGCTGGTACAAATGCT 120
L.casei_W56       CATTGGCCGATGGACGAACTAAAGACGGCTGTTAATCTCCTAGCTGCTGGTACAAATGCT 120
*****

L.casei_LC2W      GAACTATTAAGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCTTCAAGCAGCGAGTGGAAAGGA 180
L.casei_BD_II     GAACTATTAAGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCTTCAAGCAGCGAGTGGAAAGGA 180
L.casei_BL23      GAACTATTAAGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCTTCAAGCAGCGAGTGGAAAGGA 180
L.casei_W56       GAACTATTAAGCAAAAAGTATGCAGATCATGCCTTGTCTTCAAGCAGCGAGTGGAAAGGA 180
*****

L.casei_LC2W      TATCGTGAAC TACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTAAG 240
L.casei_BD_II     TATCGTGAAC TACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTAAG 240
L.casei_BL23      TATCGTGAAC TACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTAAG 240
L.casei_W56       TATCGTGAAC TACATGTTGACGGCCCTCGTGGCGACTGGTTGCTAATCTATAAAAATTAAG 240
*****

L.casei_LC2W      CAGCAAGATCTCATTTTGACCCTGGTTAGA ACTGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 300
L.casei_BD_II     CAGCAAGATCTCATTTTGACCCTGGTTAGA ACTGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 300
L.casei_BL23      CAGCAAGATCTCATTTTGACCCTGGTTAGA ACTGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 300
L.casei_W56       CAGCAAGATCTCATTTTGACCCTGGTTAGA ACTGGATCTCATCATAACCTTTTGGGTAAA 300
*****

L.casei_LC2W      TAG 303
L.casei_BD_II     TAG 303
L.casei_BL23      TAG 303
L.casei_W56       TAG 303
***

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE7*

```

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      ATGTCTTATTACTCTTTTCGGCCACGCAAAACATTTAATGCTGATTTAGC 50
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       ATGTCTTATTACTCTTTTCGGCCACGCAAAACATTTAATGCTGATTTAGC 50
*****

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      ACGTCTTGGTAAATTAGACCCATCAATTATCGATGACATTCATGAGGCCA 100
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       ACGTCTTGGTAAATTAGCCCCATCAATTATCGATGACATTCACGAGGCCA 100
*****

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      TTGATATTTTGCTCAATGGCGATGTTCTCCCAAAGAATATAGGGATCAT 150
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       TTGATATTTTGCTCAATGGCGATGCCCTCCCTAAAGAATATAGAGATCAT 150
*****

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      AACTTACAAAGAAAATATGCCGGTTACAGAGAATTTTCATGTCAGGGATAC 200
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       AACTTGCAAAGAAAATATGCCGGTTACAGAGAATTTTCATGTTAGAGATAC 200
*****

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      TCCCAAAGGTGCAAAACCTACGAAGACCAATGATGTGCTAGTAATCTATA 250
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       TCCTAAGGGCGTAAAACCTACGAAAACCAACGATGTGCTAATAATCTATA 250
*** * * * *

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      AGATTGACCATCAAGATCTTGTATTAGTTGCTGTACGAGCAGGTTCTCAC 300
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       AGATTGACCATCAAGATCTTGTATTAGTTGCTGTACGAGCAGGTTCTCAC 300
*****

L.reuteri_I5007_RelE_7_2      AATATCTTTTTAATAAGGGTTATCGAAAAACAAATAA 339
L.reuteri_TD1_RelE_7_1       AATAATCTTTTTAATAGGTCATATCGAAAAACAAATAA 339
****:*****.* :*****

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *relE8*

```

L.acidophilus_La_14          ATGGCAAGATTACAATTTAGGCCACGTGCTACTTTCAACGCTGATTTAAAACGCTTAGGA 60
L.acidophilus_NCFM          ATGGCAAGATTACAATTTAGGCCACGTGCTACTTTCAACGCTGATTTAAAACGCTTAGGA 60
*****

L.acidophilus_La_14          CGTCTTGATCCAACSTATTATTGATGATGTACGAGCAGCGATTGATGAATTATTAGAAAAT 120
L.acidophilus_NCFM          CGTCTTGATCCAACSTATTATTGATGATGTACGAGCAGCGATTGATGAATTATTAGAAAAT 120
*****

L.acidophilus_La_14          GGCGTATTACCTGATGAGTATGACGATCATCCACTTAAGCGACGGCTAGCTGGATATCGA 180
L.acidophilus_NCFM          GGCGTATTACCTGATGAGTATGACGATCATCCACTTAAGCGACGGCTAGCTGGATATCGA 180
*****

L.acidophilus_La_14          GAATTTTCATGTTTCGTGATACCCCTCACGAAAGCACCCAAACGATATTAATGATGTATTA 240
L.acidophilus_NCFM          GAATTTTCATGTTTCGTGATACCCCTCACGAAAGCACCCAAACGATATTAATGATGTATTA 240
*****

L.acidophilus_La_14          GTGATTTGGTACGTAGAACGTAATGAATTAATGCAGTTGGTGTGCGAGTCGGCTCACAT 300
L.acidophilus_NCFM          GTGATTTGGTACGTAGAACGTAATGAATTAATGCAGTTGGTGTGCGAGTCGGCTCACAT 300
*****

L.acidophilus_La_14          GATCGATTGTTTCCAAATCAAAATAGTTTAAAGAAATATCATAAATAG 348
L.acidophilus_NCFM          GATCGATTGTTTCCAAATCAAAATAGTTTAAAGAAATATCATAAATAG 348
*****

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yoeB1*

```

L.rhamnosus_ATCC_8530      ATGATTAAAACCTGGACCGATGATGCTTGGGCGGACTACATGTATTGGCA 50
L.rhamnosus_LOCK908      ATGATTAAAACCTGGACCGATGATGCTTGGGCGGACTACATGTATTGGCA 50
L.rhamnosus_Lc_705       ATGATTAAAACCTGGACCGATGATGCTTGGGCGGACTACATGTATTGGCA 50
                          *****
L.rhamnosus_ATCC_8530      TGATCAAAACGACAAGCGGACAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCAAG 100
L.rhamnosus_LOCK908      TGATCAAAACGACAAGCGGACAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCAAG 100
L.rhamnosus_Lc_705       TGATCAAAACGACAAGCGGACAATCAAACGAATTAATCAACTCATTCAAG 100
                          *****
L.rhamnosus_ATCC_8530      CCATTGACCGTGACCCTTATAAAGGCATCGGAAAACCTGAGCCACTTAGA 150
L.rhamnosus_LOCK908      CCATTGACCGTGACCCTTATAAAGGCATCGGAAAACCTGAGCCACTTAGA 150
L.rhamnosus_Lc_705       CCATTGACCGTGACCCTTATAAAGGCATCGGAAAACCTGAGCCACTTAGA 150
                          *****
L.rhamnosus_ATCC_8530      TATGCGCTAACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGATCAGGAAAATCGCAT 200
L.rhamnosus_LOCK908      TATGCGCTAACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGATCAGGAAAATCGCAT 200
L.rhamnosus_Lc_705       TATGCGCTAACCGGAAAATGGTCACGTCGGATTGATCAGGAAAATCGCAT 200
                          *****
L.rhamnosus_ATCC_8530      CATCTACAGCATTGAAAAGAACCACATTAATATTTTCGCCTGCCGCACTC 250
L.rhamnosus_LOCK908      CATCTACAGCATTGAAAAGAACCACATTAATATTTTCGCCTGCCGCACTC 250
L.rhamnosus_Lc_705       CATCTACAGCATTGAAAAGAACCACATTAATATTTTCGCCTGCCGCACTC 250
                          *****
L.rhamnosus_ATCC_8530      АСТАСAGTTAA 261
L.rhamnosus_LOCK908      АСТАСAGTTAA 261
L.rhamnosus_Lc_705       АСТАСAGTTAA 261
                          *****

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yoeB2*

```

L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      ATGACGAAGCTTAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCT 50
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       ATGACGAAGCTTAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCT 50
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  ATGACGAAGCTTAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCT 50
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    ATGACGAAGCTTAACGTAAATTTTAACTATAATGCCTGGGATGAATATCT 50
                          *****
L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      AGAGTGGAAGAAAGAAGATAAAAAAACTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCA 100
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       AGAGTGGAAGAAAGAAGATAAAAAAACTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCA 100
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  AGAGTGGAAGAAAGAAGATAAAAAAACTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCA 100
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    AGAGTGGAAGAAAGAAGATAAAAAAACTTCAAAGAAAATCGATGGTCTCA 100
                          *****
L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      TTAGAGATTGTCAACGCCATCCATTCCTGAAAAGGAAAACCTGAGCCT 150
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       TTAGAGATTGTCAACGCCATCCATTCCTGAAAAGGAAAACCTGAGCCT 150
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  TTAGAGATTGTCAACGCCATCCATTCCTGAAAAGGAAAACCTGAGCCT 150
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    TTAGAGATTGTCAACGCCATCCATTCCTGAAAAGGAAAACCTGAGCCT 150
                          *****
L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      TTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCTCGAAAAATTAATCACAAGA 200
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       TTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCTCGAAAAATTAATCACAAGA 200
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  TTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCTCGAAAAATTAATCACAAGA 200
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    TTAAAGGCAAATTTAAGCGGTACATGGTCTCGAAAAATTAATCACAAGA 200
                          *****
L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      TCGTATGGTTTATTTCAGTTACGGCAACAGAАCTTCAAATATGGCAACTAA 250
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       TCGTATAGTTTATTTCAGTTACGGCAACAGAАCTTCAAATATGGCAACTAA 250
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  TCGTATGGTTTATTTCAGTTACGGCAACAGAАCTTCAAATATGGCAACTAA 250
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    TCGTATGGCTTATTTCAGTTACGGCAACAGAАCTTCAAATATGGCAACTAA 250
                          *****
L.helveticus_R0052_YoeB_2_2      AATATCACTATTCTAAATAG 270
L.helveticus_H10_YoeB_2_3       AATATCACTATTCTAAATAG 270
L.helveticus_DPC_4571_YoeB_2_1  AATATCACTATTCTAAATAG 270
L.helveticus_CNRZ32_YoeB_2_4    AATATCACTATTCTAAATAG 270
                          *****

```



## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yoeB3*

>L.crispatus\_ST1

ATGATCGTAGCATGGACGGATGATGGTTGGAACGACTATGTGTATTGGTATGACGATGGTGATTATAAAAAGGTATCAAGAATAAACGATCTTG  
TGAAAGATATGAAAAGACATCCATTTACAGGTATTGGTAAGCCTGAGCCCTTAAAGAGAAATCTATCAGGGTTATGGTCAAGACGAATCGATTC  
GAAAAATCGGATCGTCTATGATTGTCATAAATCAATGATAACTATATATTCATGTAAGGATCACTATTGA

## Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM1*

L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	ATGACATTAGCACTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.plantarum_P8_YefM_1_4	ATGACATTAGCACTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.plantarum_16_YefM_1_2	ATGACATTAGCACTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.brevis_KB290_YefM_1_3	ATGACATTAGCATTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	ATGACATTAGCATTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	ATGACATTAGCACTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	ATGACATTAGCACTAACACAGAGCGATTTTCGCGCTAACCTAAAAAATA	50
	*****	
L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACCGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.plantarum_P8_YefM_1_4	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACCGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.plantarum_16_YefM_1_2	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACCGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.brevis_KB290_YefM_1_3	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACCGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACCGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACAGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	TTTAGATCAAGTTAATGACGAAGACGAAACAGTTTATATTGCTCGTTCAA	100
	***.*****.*****.	
L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	ATAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
L.plantarum_P8_YefM_1_4	ATAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
L.plantarum_16_YefM_1_2	ATAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
L.brevis_KB290_YefM_1_3	ATAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	ATAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGTTAGAA	150
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	ACAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	ACAGTCGCGCAGTAGCCATCGTTTCACAAGAAAAATGGACTGGCTAGAA	150
	* *****.*****.*****.*****	
L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGTTTCGTTAGAATATGCAATTGCACGTGA	200
L.plantarum_P8_YefM_1_4	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGTTTCGTTAGAATATGCAATTGCACGTGA	200
L.plantarum_16_YefM_1_2	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGTTTCGTTAGAATATGCAATTGCACGTGA	200
L.brevis_KB290_YefM_1_3	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGTTTCGTTAGAATATGCAATTGCACGTGA	200
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGTTTCGTTAGACTATGCAATTGCGCGTGA	200
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGCTCGTTAGAATATGCCATTGCGCGTGA	200
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	AGAGCATTAAAAGCTAAAGAAGGCTCGTTAGAATATGCCATTGCGCGTGA	200
	***** *****.*****.*****.*****	
L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAG	250
L.plantarum_P8_YefM_1_4	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAG	250
L.plantarum_16_YefM_1_2	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAG	250
L.brevis_KB290_YefM_1_3	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAG	250
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGATGATGAAATTGTTGAATCAA	250
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAA	250
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	TCAGTTAATTAACGCCATGTTTTACCTGACGATGAAATTGTTGAATCAA	250
	*****.*****.*****.	
L.buchneri_NRR1_B_30929_YefM_1	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAATAA--- 279	
L.plantarum_P8_YefM_1_4	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAATAA--- 279	
L.plantarum_16_YefM_1_2	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAATAA--- 279	
L.brevis_KB290_YefM_1_3	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAATAA--- 279	
L.brevis_ATCC_367_YefM_1_5	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAACAATGA 282	
L.fermentum_IFO_3956_YefM_1_1	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAACAATGA 282	
L.fermentum_CECT_5716_YefM_1_1	ATGATGATTATTGGGGTCAGTTTAAACAATGA 282	
	***** **	

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM2*

L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	ATGCCAATTGCTTCTACTCAAAGTGATTTCCGTAATCATATTTAAAGACTA	50
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	ATGCCAATTGCTTCTACTCAAAGTGATTTCCGTAATCATATTTAAAGACTA	50
	*****.*****	
L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	CTTAGATAAAGTTAATGATGAAAATCAAACAGTACTAATTGCACGTTCTA	100
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	CTTAGATAAAGTTAATGATGAAAATCAAACAGTACTAATTGCACGTTCTA	100
	*****	
L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	ATCAACGAGCAGCAGCTGTTATCTCACAAGAACAACCTCAATACCCCTTCTT	150
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	ATCAACGAGCAGCAGCTGTTATCTCACAAGAACAACCTCAATACCCCTTCTT	150
	*****	
L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	GAGGCTGTTAATGCTAAAGAAGATTCCTAGATTATGCTATTACTAGAGA	200
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	GAGGCTGTTAATGCTAAAGAAGATTCCTAGATTATGCTATTACTAGAGA	200
	*****.*****	
L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	TAAGTTAATCGAAATGCATATCTTACCTGATGATCCTATCGTTGAACCAA	250
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	TAAGTTAATCGAAATGCATATCTTACCTGATGATCCTATCGTTGAACCAA	250
	*****	
L.salivarius_UCC118_YefM_2_1	CTGACGATTATTGGAATAGTTTTAAGCCAAAGGATAACAGTAACCAATGA	300
L.salivarius_CECT_5713_YefM_2_	CTGACGATTATTGGAATAGTTTTAAGCCAAAGGATAACAGTAACCAATGA	300
	*****	

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM3*

L.helveticus_H10_YefM_3_2	ATGCTACAAACACCAAATAATATTAAGCAGTACTGCTCGTGACCTACG	50
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	ATGCTACAAACACCAAATAATATTAAGCAGTACTGCTCGTGACCTACG	50
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	ATGCTACAAACACCAAATAATATTAAGCAGTACTGCTCGTGACCTACG	50
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	ATGCTACAAACACCAAATAATATTAAGCAGTACTGCTCGTGACCTACG	50
	*****.***.*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	TAATAACTTTAAAAAATTGCTGATGACATTAATGACTATGATACTACAG	100
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	TAATAACTTTAAAAAATTGCTGATGACATTAATGACTATGATACTACAG	100
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	TAATAACTTTAAAAAATTGCTGATGACATTAATGACTATGATACTACAG	100
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	TAATAACTTTAAAAAATTGCTGATGACATTAATGACTATGATACTACAG	100
	*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	TTATTGTTGCTCGTCTCTAAAGACAAAAACGTCGTAATTATTTACAAAAA	150
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	TTATTGTTGCTCGTCTCTAAAGACAAAAACGTCGTAATTATTTACAAAAA	150
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	TTATTGTTGCTCGTCTCTAAAGACAAAAACGTCGTAATTATTTACAAAAA	150
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	TTATTGTTGCTCGTCTCTAAAGACAAAAACGTCGTAATTATTTACAAAAA	150
	*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	GAATATGATTTCATGGCAAGAGACCTCATATCTTCTAGGGACTAAGGCAAA	200
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	GAATATGATTTCATGGCAAGAGACCTCATATCTTCTAGGGACTAAGGCAAA	200
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	GAATATGATTTCATGGCAAGAGACCTCATATCTTCTAGGGACTAAGGCAAA	200
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	GAATATGATTTCATGGCAAGAGACCTCATATCTTCTAGGGACTAAGGCAAA	200
	*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	TCGTGATGCATTAGCAGAAGCTAAAGAATCGTTTGAAAATAAAGATACCC	250
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	TCGTGATGCATTAGCAGAAGCTAAAGAATCGTTTGAAAATAAAGATACCC	250
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	TCGTGATGCATTAGCAGAAGCTAAAGAATCGTTTGAAAATAAAGATACCC	250
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	TCGTGATGCATTAGCAGAAGCTAAAGAATCGTTTGAAAATAAAGATACCC	250
	*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	GAAACAAAATCTTAACCCAGAGAATTCGAGGCTCTAACTAAAGATGAC	300
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	GAAACAAAATCTTAACCCAGAGAATTCGAGGCTCTAACTAAAGATGAC	300
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	GAAACAAAATCTTAACCCAGAGAATTCGAGGCTCTAACTAAAGATGAC	300
L.helveticus_R0052_YefM_3_3	GAAACAAAATCTTAACCCAGAGAATTCGAGGCTCTAACTAAAGATGAC	300
	*****	
L.helveticus_H10_YefM_3_2	GAAGCTTAA	309
L.helveticus_DPC_4571_YefM_3_1	GAAGCTTAA	309
L.helveticus_CNRZ32_YefM_3_2	GAAGCTTAA	309

L.helveticus\_R0052\_YefM\_3\_3 GAAGCTTAA 309  
\*\*\*\*\*

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM4*

L.acidophilus_La_14	ATGACCTTAGCATTAACACAAAGTGATTTTAGAGCTCACATAAAAAAATATTTAGATCAA	60
L.acidophilus_NCFM	ATGACCTTAGCATTAACACAAAGTGATTTTAGAGCTCACATAAAAAAATATTTAGATCAA	60
	*****	
L.acidophilus_La_14	GTAATGACGATGATGAAGTAGTATATGTTGCTAGATCTAATAGCCGCTCAGTTGCTGTC	120
L.acidophilus_NCFM	GTAATGACGATGATGAAGTAGTATATGTTGCTAGATCTAATAGCCGCTCAGTTGCTGTC	120
	*****	
L.acidophilus_La_14	CTTCTCAGGAAAAATTATATTGGATGGAAAAAGCGTTGCAAGCTAAGGAGGATCTTTA	180
L.acidophilus_NCFM	CTTCTCAGGAAAAATTATATTGGATGGAAAAAGCGTTGCAAGCTAAGGAGGATCTTTA	180
	*****	
L.acidophilus_La_14	GATTATGCTATTGCTCGTGATCAATTAATTCAACGTCATGTATTACCAGATGATCTGTT	240
L.acidophilus_NCFM	GATTATGCTATTGCTCGTGATCAATTAATTCAACGTCATGTATTACCAGATGATCTGTT	240
	*****	
L.acidophilus_La_14	GTAATCGAATGATGATTATTGGGAGCAGTTTAAATAA	279
L.acidophilus_NCFM	GTAATCGAATGATGATTATTGGGAGCAGTTTAAATAA	279
	*****	

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM5*

L.rhamnosus_Lc_705	ATGGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCCAACCTTAAGCATTATAT	50
L.rhamnosus_LOCK908	ATGGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCCAACCTTAAGCATTATAT	50
L.rhamnosus_ATCC_8530	ATGGAAGCAACGAATTATAGTGATTTCCGCCCAACCTTAAGCATTATAT	50
	*****	
L.rhamnosus_Lc_705	GAGTCAAGTCAACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACCGCTAAAGATG	100
L.rhamnosus_LOCK908	GAGTCAAGTCAACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACCGCTAAAGATG	100
L.rhamnosus_ATCC_8530	GAGTCAAGTCAACGAAGACGCCGAACCGCTACTGGTTACCGCTAAAGATG	100
	*****	
L.rhamnosus_Lc_705	ATGATGACAATGTGGTGGTTATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAA	150
L.rhamnosus_LOCK908	ATGATGACAATGTGGTGGTTATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAA	150
L.rhamnosus_ATCC_8530	ATGATGACAATGTGGTGGTTATGAGCAAGCACGATTTTGACGCCATCGAA	150
	*****	
L.rhamnosus_Lc_705	GAAACCCGTATTTACTCAGCAATCCCAAGCTGATGGCCAAAATCAAACG	200
L.rhamnosus_LOCK908	GAAACCCGTATTTACTCAGCAATCCCAAGCTGATGGCCAAAATCAAACG	200
L.rhamnosus_ATCC_8530	GAAACCCGTATTTACTCAGCAATCCCAAGCTGATGGCCAAAATCAAACG	200
	*****	
L.rhamnosus_Lc_705	TGGTGATGCCAAAATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCACGAGTTGTAA	250
L.rhamnosus_LOCK908	TGGTGATGCCAAAATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCACGAGTTGTAA	250
L.rhamnosus_ATCC_8530	TGGTGATGCCAAAATTGCCGCTGGAAAGGCTAAACAGCACGAGTTGTAA	250
	*****	
L.rhamnosus_Lc_705	CGGACTTCGATCATGATTAA	270
L.rhamnosus_LOCK908	CGGACTTCGATCATGATTAA	270
L.rhamnosus_ATCC_8530	CGGACTTCGATCATGATTAA	270
	*****	

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM6*

```

L.helveticus_DPC_4571      ATGACAGTAGCATTAAC TCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTA AAAAAATA 50
L.helveticus_CNRZ32      ATGACAGTAGCATTAAC TCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTA AAAAAATA 50
L.helveticus_H10         ATGACAGTAGCATTAAC TCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTA AAAAAATA 50
L.helveticus_R0052      ATGACAGTAGCATTAAC TCAAAGCGACTTTAGAGCGCACATTA AAAAAATA 50
*****

L.helveticus_DPC_4571      TTTAGATCAAGTAAACG ATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCA GATCAA 100
L.helveticus_CNRZ32      TTTAGATCAAGTAAACG ATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCA GATCAA 100
L.helveticus_H10         TTTAGATCAAGTAAACG ATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCA GATCAA 100
L.helveticus_R0052      TTTAGATCAAGTAAACG ATGATGATGAGACAGTTTATGTTGCCA GATCAA 100
*****

L.helveticus_DPC_4571      ATAGTCGTAGTGTTGCA GTAAATTTCTCAGGAAAAGATGTATTG GATGGAG 150
L.helveticus_CNRZ32      ATAGTCGTAGTGTTGCA GTAAATTTCTCAGGAAAAGATGTATTG GATGGAG 150
L.helveticus_H10         ATAGTCGTAGTGTTGCA GTAAATTTCTCAGGAAAAGATGTATTG GATGGAG 150
L.helveticus_R0052      ATAGTCGTAGTGTTGCA GTAAATTTCTCAGGAAAAGATGTATTG GATGGAG 150
*****

L.helveticus_DPC_4571      AAAGCTATACAAGCAA AAGAAGATTCATTAGATTACGCTGTTG CTCTGTA 200
L.helveticus_CNRZ32      AAAGCTATACAAGCAA AAGAAGATTCATTAGATTACGCTGTTG CTCTGTA 200
L.helveticus_H10         AAAGCTATACAAGCAA AAGAAGATTCATTAGATTACGCTGTTG CTCTGTA 200
L.helveticus_R0052      AAAGCTATACAAGCAA AAGAAGATTCATTAGATTACGCTGTTG CTCTGTA 200
*****

L.helveticus_DPC_4571      TCAATTAATTCGTAGA AATGTTTTGCCTGATGACCCAATTGTTG AATCCA 250
L.helveticus_CNRZ32      TCAATTAATTCGTAGA AATGTTTTGCCTGATGACCCAATTGTTG AATCCA 250
L.helveticus_H10         TCAATTAATTCGTAGA AATGTTTTGCCTGATGACCCAATTGTTG AATCCA 250
L.helveticus_R0052      TCAATTAATTCGTAGA AATGTTTTGCCTGATGACCCAATTGTTG AATCCA 250
*****

L.helveticus_DPC_4571      ATGATGATTATTGGGAG AAAATTTAAATAA 279
L.helveticus_CNRZ32      ATGATGATTATTGGGAG AAAATTTAAATAA 279
L.helveticus_H10         ATGATGATTATTGGGAG AAAATTTAAATAA 279
L.helveticus_R0052      ATGATGATTATTGGGAG AAAATTTAAATAA 279
*****

```

### Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM7*

```

L.casei_LC2W              ATGGATGCAATGAGCTA CCATCATTTCAAGCAGCATCTTAAAGAC CACCTGAAACAAGTC 60
L.casei_BL23              ATGGATGCAATGAGCTA CCATCATTTCAAGCAGCATCTTAAAGAC CACCTGAAACAAGTC 60
L.casei_W56               ATGGATGCAATGAGCTA CCATCATTTCAAGCAGCATCTTAAAGAC CACCTGAAACAAGTC 60
L.casei_BD_II             ATGGATGCAATGAGCTA CCATCATTTCAAGCAGCATCTTAAAGAC CACCTGAAACAAGTC 60
*****

L.casei_LC2W              AATGAAGATGCCATCCC ATTAGTCGTCACTTTCAAGAATCCAGAC GACAATGTTGTGGTG 120
L.casei_BL23              AATGAAGATGCCATCCC ATTAGTCGTCACTTTCAAGAATCCAGAC GACAATGTTGTGGTG 120
L.casei_W56               AATGAAGATGCCATCCC ATTAGTCGTCACTTTCAAGAATCCAGAC GACAATGTTGTGGTG 120
L.casei_BD_II             AATGAAGATGCCATCCC ATTAGTCGTCACTTTCAAGAATCCAGAC GACAATGTTGTGGTG 120
*****

L.casei_LC2W              ATGAGCAAACGCGATTT TGACGCTACCGAAGAAACCATGTATTTG CTTAGTAACCCGGAA 180
L.casei_BL23              ATGAGCAAACGCGATTT TGACGCTACCGAAGAAACCATGTATTTG CTTAGTAACCCGGAA 180
L.casei_W56               ATGAGCAAACGCGATTT TGACGCTACCGAAGAAACCATGTATTTG CTTAGTAACCCGGAA 180
L.casei_BD_II             ATGAGCAAACGCGATTT TGACGCTACCGAAGAAACCATGTATTTG CTTAGTAACCCGGAA 180
*****

L.casei_LC2W              CTGATGGCCCGAATTCG CCGTGGGGACGCGCAAATACGGCTGGTA AAGCCAAGCGCCAC 240
L.casei_BL23              CTGATGGCCCGAATTCG CCGTGGGGACGCGCAAATACGGCTGGTA AAGCCAAGCGCCAC 240
L.casei_W56               CTGATGGCCCGAATTCG CCGTGGGGACGCGCAAATACGGCTGGTA AAGCCAAGCGCCAC 240
L.casei_BD_II             CTGATGGCCCGAATTCG CCGTGGGGACGCGCAAATACGGCTGGTA AAGCCAAGCGCCAC 240
*****

L.casei_LC2W              GATCTACCAAACGTATA A 258
L.casei_BL23              GATCTACCAAACGTATA A 258
L.casei_W56               GATCTACCAAACGTATA A 258
L.casei_BD_II             GATCTACCAAACGTATA A 258
*****

```

**Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM8***

>L.reuteri\_I5007

```
ATGCCAATTGCTACTACTCAAAGTGACTTCAGAAAAATATCAAGGATTACCTTGATCGAGTTAATGAAGACGAGCAAACGTCTTAGTTGCC  
GTTCAAATCAACGAACAGCTGCCATCATCTCCCAAATCAATTGAATGCATTGCTTGATGCTGTAATGCTAAGGAAGATTCATTAGATTATGC  
TATTGCAAGAGATAAATTAATGACATGCATGTTATCCAGATGATCCTATTATGAATCCAATGACAATTACTGGAATCAATTCAGAATAGT  
GAGGAAAAGTAA
```

**Выравнивание нуклеотидной последовательности генов группы *yefM9***

>L.johnsonii\_FI9785

```
ATGGAGAAAGCTATCCAATCAAAAGAAGATTCTTTAGAGTACGCGATCGCTCGTGATCAACTAATTCAAAGACATGAGTTATCGGAAGATCCAA  
TTGTAGAATCAACTGATGATTATTGGAATCAATTTAAGTAA
```

**БЛАГОДАРНОСТИ**

**д.б.н. Ботиной Светлане Геннадиевне**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей  
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук**

*Лаборатория генетики микроорганизмов*

**д.б.н. Даниленко Валерий Николаевич**

**д.б.н. Полуэктова Елена Ульриховна**

**Захаревич Наталья Владимировна**

*Студенты лаборатории генетики микроорганизмов*

**Гладышев Сергей Александрович (МФТИ, кафедра биоинформатики)**

**Емельянов Кирилл Викторович (МФТИ, кафедра биоинформатики)**

**Алиев Владислав Олегович (МГУ, кафедра генетики)**

*Лаборатория системной биологии и вычислительной генетики*

**д.б.н. Макеев Всеволод Юрьевич**

**к.б.н. Касьянов Артем Сергеевич**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук**

*Лаборатория постгеномных исследований*

**к.б.н. Кудрявцева Анна Викторовна**

**к.б.н. Снежкина Анастасия Владимировна**

**Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-Knöll-  
Institute, Beutenbergstr, Jena, Germany**

Hans Krügel

**Friedrich-Schiller-University Jena, Germany**

Sabine Brantl

Natalie Jahn