

УДК 602.3:579.6

ДАННЫЕ АНАЛИЗА ПРОТЕОМА *PROTEUSPHAGE PR – 6* УГСХА *

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,

Тел.8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Е.В. Сульдина, ассистент, Тел.8(8422) 55-95-47,

ekaterina-suldina@rambler.ru

А.В. Мاستиленко, кандидат биологических наук, доцент,

Тел.8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,

Тел.8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Proteus*, бактериофаг, протеомный анализ, сиквенс, белок, молекулярная масса.

В статье представлены результаты изучения протеома протейного фага. При анализе протеома бактериофага *Pr – 6* УГСХА и, соответственно, данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 50 белков с молекулярными массами от 5,5 до 140 кДа. При разделении выделенных и сконцентрированных белков фага в ПААГ методом вертикального электрофореза для *Proteusphage Pr – 6* УГСХА было выявлено 3 белка (67 кДа, 77 кДа и 94 кДа).

***Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.**

Опираясь на литературные данные можно утверждать, что в тонком кишечнике молодняка сельскохозяйственных животных и птицы в хозяйствах, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, бактерий рода *Proteus* регистрируются примерно 20-50 % случаев [1-2].

Разработка экологически чистых и эффективных терапевтических средств для диагностики, лечения и профилактики бактериальных инфекций, вызываемых бактериями рода *Proteus*, включает поиск и селекцию специфических бактериофагов, на основе которых и может быть сконструирован новый биопрепарат. Для максимально эффективного и научно обоснованного применения бактериофагов в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и аквакультурах требуется глубокое их

изучение и систематизация на генном уровне, а также высокая степень очистки применяемых фаговых препаратов. Аналогичные исследования в области изучения протеома бактерий и специфичных им бактериофагов представлены в ряде публикаций зарубежных ученых и отечественных ученых [3-10].

Цель работы – проведение протеомного анализа бактериофага протейного *Pr – 6* УГСХА (изучение аминокислотной последовательности протеинов, их качественного и количественного составов, изоэлектрической точки белков, молекулярного веса).

Объекты и методы исследований. Объект исследования – бактериофаг *Pr – 6* УГСХА, выделенный в 2017 году коллективом авторов из объектов внешней среды, имеющий следующие характеристики – диаметр бляшкообразующих единиц - $0,5 \pm 0,1$ мм, титр по Грация - $1,3 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, титр по Аппельману – 10^{-8} , устойчив у воздействию трихлорметана в течение 15 минут и специфичен для культур *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, выделенных из патологического материала и объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям в 2016-2017 гг. [11-13].

Для протеомного анализа нами были использованы ресурсы систем SnapGene Viewer v.4.1.7 и ExPasy (<https://web.expasy.org>) и был проведен анализ бактериофага *Pr – 6* УГСХА, активного в отношении бактерий *Proteus* и даны физико-химические характеристики каждого из белков в их составе.

Для анализа белковых профилограмм выделенного бактериофага *Pr – 6* УГСХА нами был использован метод вертикального электрофореза в ПААГ. Анализ профилограмм был проведен с использованием программного обеспечения GelAnalyzer 2010.

Для начала необходимо было получить максимально возможную бактериофаговую массу для достаточной визуальной детекции после электрофореза. Бактериальную массу культивировали в течение 24 часов на жидких питательных средах. Затем были внесены выделенные бактериофаги в титре 10^9 БОЕ/мл количестве 1,0 мл на 10 мл бактериальной культуры соответственно изучаемому виду. Культивировали в течение 48 часов при 37 °C в аэробных условиях и достаточной влажности. Затем часть аликвоты культуры *Pr. vulgaris* 28 [13] с бактериофагом *Pr – 6* УГСХА были исследованы методом агаровых слоев по Грация для подтверждения титра фагов, а часть – использована для получения белков бактериофагов.

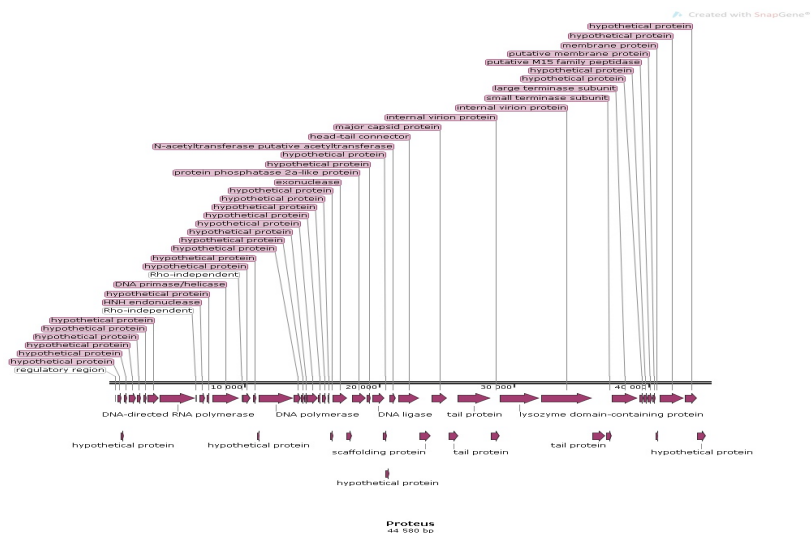


Рисунок 1 - Карта линейной ДНК бактериофага Proteusphage Pr-6 УГСА с расшифровкой кодирующих областей генома

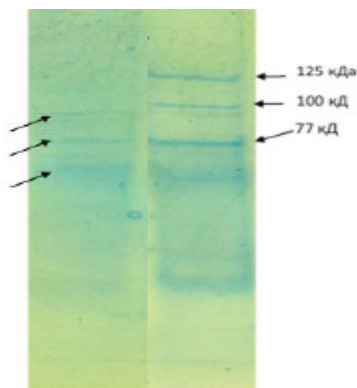


Рисунок 2 - Профилограмма протеома бактериофага *Proteusphage Pr* – 6 УГСХА и ее сравнение с маркером

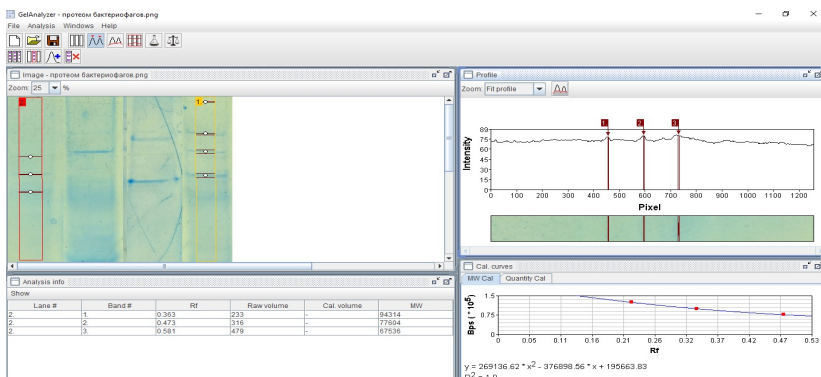


Рисунок 3 - Анализ протеома бактериофага *Proteusphage Pr* – 6 УГСХА

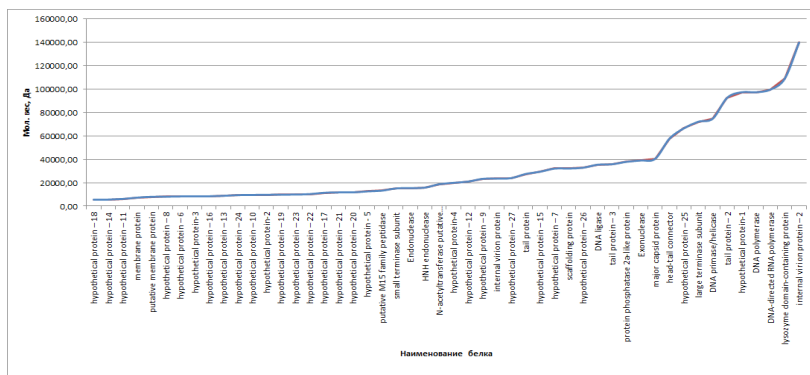


Рисунок 4 - График распределения белкового состава *Proteusphage Pr* – 6 УГСХА по молекулярной массе

Для выделения и концентрирования белков бактериофага *Pr* – 6 УГСХА культуральную жидкость центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин (Centrifuge type MPW-310, Польша). Надосадочную жидкость, содержащую бактериофаги, переносили в чистую пробирку в количестве 5,0 мл и подвергали ультразвуковой дезинтеграции при режиме 10 микрон с трехкратным подходом по 60 секунд. Затем в смесь вносили 5,0 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Все манипуляции проводили на холоде. Смесь инкубировали в течение 1 часа при 4-8 °С, а затем белки осаждали при 10000 об/мин в течение 30 минут

(Centrifuge type MPW-310, Польша). Надосадочную жидкость удаляли под визуальным контролем наличия осадка. Осадок растворяли в 100 мкл буфера для электрофореза. Крупные конгломераты нерастворимых фракций белков и детрита осаждали при 3000 об/мин в течение 1 минуты (Centrifuge type MPW-310, Польша).

Выделенные и сконцентрированные таким образом белки были использованы для проведения вертикального электрофореза в ПААГ.

Режим электрофореза и концентрация ПААГ: 200 В, 60 мА, 30 минут, 4-20% ПААГ, трис-глициновый буфер с pH-8,6.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований нами были сопоставлены данные протеомного анализа на основании проведенного сиквенса и электрофореза в ПААГ. На рис. 1 представлена профилограмма протеомов выделенного протейного бактериофага при разделении их в ПААГ. Для *Proteusphage* было выявлено 3 белка (67 кДа, 77 кДа и 94 кДа) (рис. 2-3).

При анализе протеома бактериофага *Proteus* соответственно данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 50 белков с молекулярными массами от 5,5 до 140 кДа. Качественный протеомный состав *Proteusphage* представлен в таблицах 1-2 и рисунках 4-6.

Закключение. В результате проведенных исследований были получены сиквенсовые данные генома бактериофага *Pr – 6* УГСХА, выделенного из объектов внешней среды и селекционированного (по определенным биологическим свойствам: литической активности, специфичности и спектру литического действия), и была составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома.

Данные нуклеотидных последовательностей протейного бактериофага, полученные при его секвенировании, позволили нам провести сравнительный анализ их геномов (таблица 1). Установлено, что качественный состав протеинов бактериофага *Pr – 6* УГСХА соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов выявлена закономерность, присущая бактериофагам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Определены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик - гипотетические белки, которые имеют аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Proteus*. Однако исследование биологических свойств бактериофагов включает в себя также их протеомный анализ. При анализе протеома бактериофага *Pr – 6* УГСХА - данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 50

Таблица 1 - Локализация белков в геноме Proteusphage

sequence: Proteus.gb (Linear / 44 580 bp)						
features: 54 total						
Feature	Location	Size				Type
source	1 .. 44 580	44 580 bp				source
✓ regulatory region	403 .. 422	20 bp				regulatory
✓ hypothetical protein	607 .. 882	276 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	845 .. 1096	252 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	1096 .. 1305	210 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	1463 .. 1963	501 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	2028 .. 2357	330 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	2536 .. 2754	219 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	2825 .. 3670	846 bp			CDS	hypothetical protein
✓ DNA-directed RNA polymerase	3744 .. 6371	2628 bp			CDS	
✓ Rho-independent	6383 .. 6424	42 bp			regulatory	
✓ HNH endonuclease	6674 .. 7087	414 bp			CDS	HNH endonuclease
✓ hypothetical protein	7219 .. 7437	219 bp			CDS	hypothetical protein
✓ DNA primase/helicase	7647 .. 9635	1989 bp			CDS	
✓ Rho-independent	9815 .. 9858	44 bp			regulatory	
✓ hypothetical protein	9883 .. 10 494	612 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	10 636 .. 10 887	252 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	10 951 .. 11 115	165 bp			CDS	hypothetical protein
✓ DNA polymerase	11 099 .. 13 651	2553 bp			CDS	DNA polymerase
✓ hypothetical protein	13 690 .. 14 235	546 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	14 238 .. 14 468	231 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	14 487 .. 14 642	156 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	14 655 .. 15 461	807 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	15 465 .. 15 689	225 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	15 792 .. 16 115	324 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	16 187 .. 16 339	153 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	16 406 .. 16 651	246 bp			CDS	hypothetical protein
✓ exonuclease	16 597 .. 17 631	1035 bp			CDS	exonuclease
✓ endonuclease	17 616 .. 18 026	411 bp			CDS	endonuclease
✓ protein phosphatase 2a-like p...	18 019 .. 19 026	1008 bp			CDS	
✓ hypothetical protein	19 097 .. 19 402	306 bp			CDS	hypothetical protein
✓ DNA ligase	19 497 .. 20 438	942 bp			CDS	DNA ligase
✓ hypothetical protein	20 314 .. 20 625	312 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	20 498 .. 20 761	264 bp			CDS	hypothetical protein
✓ N-acetyltransferase putative...	20 761 .. 21 255	495 bp			CDS	
✓ head-tail connector	21 436 .. 22 986	1551 bp			CDS	head-tail connector
✓ scaffolding protein	22 986 .. 23 867	882 bp			CDS	scaffolding protein
✓ major capsid protein	23 941 .. 25 053	1113 bp			CDS	
✓ tail protein	25 182 .. 25 910	729 bp			CDS	tail protein
✓ tail protein	25 852 .. 28 317	2466 bp			CDS	tail protein
✓ internal virion protein	28 317 .. 28 994	678 bp			CDS	
✓ lysozyme domain-containing p...	29 003 .. 31 954	2952 bp			CDS	
✓ internal virion protein	32 022 .. 35 843	3822 bp			CDS	
✓ tail protein	35 843 .. 36 802	960 bp			CDS	tail protein
✓ small terminase subunit	36 870 .. 37 292	423 bp			CDS	
✓ large terminase subunit	37 292 .. 39 190	1899 bp			CDS	
✓ hypothetical protein	39 357 .. 39 632	276 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	39 644 .. 39 913	270 bp			CDS	hypothetical protein
✓ putative M15 family peptidase	39 923 .. 40 276	354 bp			CDS	
✓ putative membrane protein	40 303 .. 40 527	225 bp			CDS	
✓ membrane protein	40 520 .. 40 717	198 bp			CDS	membrane protein
✓ hypothetical protein	40 831 .. 42 675	1845 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	42 734 .. 43 606	873 bp			CDS	hypothetical protein
✓ hypothetical protein	43 606 .. 44 250	645 bp			CDS	hypothetical protein

Таблица 2 - Протеомный состав бактериофага Pr – 6 УГСХА

Наименование	Мол. Масса, Да	pI
DNA ligase	35410	6,57
DNA polymerase	97367	6,09
DNA primase/helicase	74770	5,92
DNA-directed RNA polymerase	99625	6,38
Endonuclease	15439	9,82
Exonuclease	39003	6,27
head-tail connector	57724	5,48
HNH endonuclease	15818	9,74
hypothetical protein – 1	97367	6,09
hypothetical protein – 10	9551	10,06
hypothetical protein – 11	6135	4,04
hypothetical protein – 12	20960	5,49
hypothetical protein – 13	8786	8,54
hypothetical protein – 14	5587	5,11
hypothetical protein – 15	29386	4,79
hypothetical protein – 16	8410	6,16
hypothetical protein – 17	11408	4,57
hypothetical protein – 18	5538	4,12
hypothetical protein – 19	9808	6,27
hypothetical protein – 2	9677	5,81
hypothetical protein – 20	11778	7,74
hypothetical protein – 21	11748	4,94
hypothetical protein – 22	10275	9,15
hypothetical protein – 23	9892	9,74
hypothetical protein – 24	9419	4,61
hypothetical protein – 25	66538	7,51
hypothetical protein – 26	32842	5,60
hypothetical protein – 27	23953	6,28
hypothetical protein – 3	8340	4,28
hypothetical protein – 4	19922	4,32
hypothetical protein – 5	12585	3,59
hypothetical protein – 6	8298	5,09
hypothetical protein – 7	32074	5,12
hypothetical protein – 8	8060	9,27
hypothetical protein – 9	23289	9,65
internal virion protein	23624	7,97
internal virion protein – 2	139867	6,49
large terminase subunit	72173	6,50
lysozyme domain-containing protein	108926	5,52
major capsid protein	40443	5,18
membrane protein	7245	5,11
N-acetyltransferase putative acetyltransferase	18741	6,20
protein phosphatase 2a-like protein	37886	7,04
putative M15 family peptidase	13215	9,39
putative membrane protein	7982	9,86
scaffolding protein	32160	4,17
small terminase subunit	15141	6,72
tail protein	27466	5,94
tail protein – 2	92577	5,48
tail protein – 3	35803	4,87

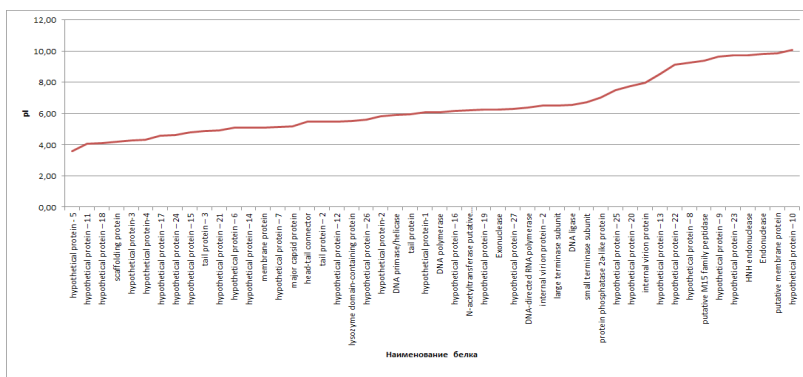


Рисунок 5 - График распределения белкового состава Proteusphage Pr – 6 УГСХА по изоэлектрической точке (pI)

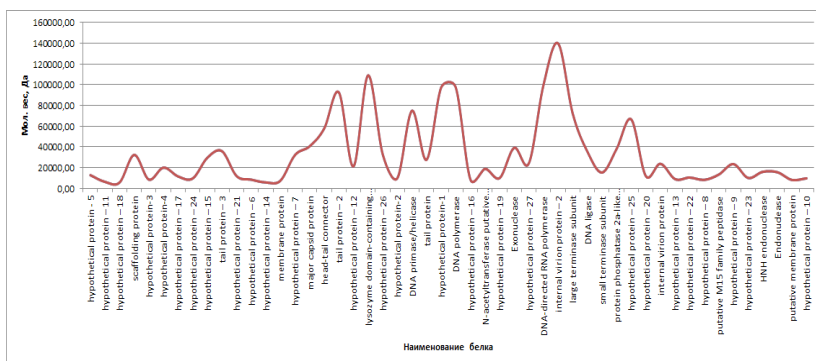


Рисунок 6 - График распределения белкового состава Proteusphage Pr – 6 УГСХА по молекулярной массе в зависимости от pI

белков с молекулярными массами от 5,5 до 140 кДа (рисунок 4-6). При разделении выделенных и сконцентрированных белков фага в ПААГ методом вертикального электрофореза для Proteusphage было выявлено 3 белка (67 кДа, 77 кДа и 94 кДа) (рисунок 2-3).

Полученные данные о геноме бактериофага Pr – 6 УГСХА, специфичного для бактерий рода *Proteus*, вызывающих зоонозные инфекции, приближает нас к созданию фаговых терапевтических препаратов нового поколения, приспособленных для парентерального введения,

обладающих заданными параметрами фармакокинетики и соответствующих современным стандартам биобезопасности

Библиографический список

1. Хапцева, О.Ж. О действии подкислителей на микрофлору желудочно-кишечного тракта телят / О.Ж. Хапцева, З.Ю. Хапцев, Е.А. Фауст, О.С. Ларионова, А.А. Щербаков // Научная жизнь. - 2015. - № 2. - С. 103-109.
2. Нифонтова, В.В. Получение бактериофагов и их применение в ветеринарии // В.В. Нифонтова, О.Е. Чугунова // Вестник Пермского научного центра. - № 2. - 2015. - С. 54-59.
3. Чугунова, О.Е. Изучение свойств протейных фагов / О.Е. Чугунова, Н.А. Татарникова // Пермский аграрный вестник. - № 3(15). - 2016. - С. 108-122.
4. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. - Ульяновск: Копиринг, 2004. - С.29-37 (130с).
5. Сбойчаков, В.Б. Эпидемиология, клиника и лабораторная диагностика бактериальных и вирусных диарей / В.Б. Сбойчаков, С.М. Захаренко, Ю.П. Финогеев, В.Ф. Крумгольц // Лечение и профилактика. - 2012. - № 3. - С. 77-81.
6. Мирошников, К.А. Геномика и протеомика литических бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. дис. ...докт. хим. наук: 03.01.04, 03.01.06 / Мирошников Константин Анатольевич. - Москва, 2013. - С.5 (169с).
7. Нестабильность генома фагов вида *EL Pseudomonas aeruginosa*: исследование мутантов, проявляющих вирулентность / С.В. Крылов, Е.А. Плетенева, М.В. Буркальцева, О.В. Шабурова, К.А. Мирошников, Р. Лавинь, А. Корнелиссен, В.Н. Крылов // Генетика. - 2011. - Т. 47. - № 2. - С. 183-189.
8. Crystal structure and location of gpl31 in the bacteriophage phiK2 virion / L.V. Sycheva, M.M. Shneider, N.N. Sykilinda, M.A. Ivanova, K.A. Miroshnikov, P.G. Leiman // Virology. - 2012. - Vol. 434. - P.257-265.
9. Jungblut, P. R. Proteomics of microbial pathogens / P. R. Jungblut, M. Hecker // Proteomics. - 2004. - Vol. 4. - № 10. - P.2829-2830.
10. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3 / P. Vandamme, M. Vancanneyt, A. van Belkum et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1996. - Vol. 46. - № 3. - P. 782-791.
11. Феоктистова, Н.А. Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017 - № 4(40). - С. 75-80.
12. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Улья-

новской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 3(39). – С. 99-105.

13. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 70-76.

DATA ANALYSIS PROTEOME PROTEUSPHAGE PR – 6 UGSHA

Feoktistova N.A., Suldina E. V., Mastilenko A.V., Vasilyev D. A.

Keywords: *Proteus, bacteriophage, proteomic analysis, sequence, protein, molecular weight.*

The article presents the results of studying proteome of proteinaceous phage. When analyzing the bacteriophage proteome Pr-6 UGSKHA and, accordingly, the data of its nucleic acid sequencing, 50 proteins with molecular masses from 5.5 to 140 kDa were revealed. 3 proteins (67 kDa, 77 kDa and 94 kDa) were detected by vertical electrophoresis method for Proteusphage Pr – 6 UGSKHA when separated and concentrated faga proteins in PAAG.