

УДК 602.3:579.6

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТЕОМА БАКТЕРИОФАГА *BACILLUS CEREUS*

Кондрашин И.А., магистрант. Феоктистова Н.А., доцент, Мерчина С.В., доцент, Евина Д.А., студент, Сулейманова М.И., студент, тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru
Научный руководитель - проф. Васильев Д.А.
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, бактериофаг, протеом, молекулярная масса, белок, изоэлектрическая точка.

В работе представлены результаты исследований протеома бактериофага Fbc-28 УГСХА. При секвенировании его нуклеиновой кислоты было выявлено 60 белков с молекулярными массами от 5,7 до 132,3 кДа. Гистограмма распределения белкового состава *Bacillus cereus* phage Fbc-28 УГСХА по изоэлектрической точке (pI) фиксирует значения в широком диапазоне, равном 4,2 - 12,1.

**Исследования проводятся в соответствии с тематическим
планом научно-исследовательских работ, выполняемых
по заданию МСХ РФ в 2018 году.**

Введение. Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для де-контаминации пищевого сырья или готовых к употреблению продуктов питания подразумевает изучение их основных биологических свойств (литической активности, специфичности, устойчивости к физическим и химическим факторам, сохранении титра при хранении и т.п.), к которым также относятся и молекулярно-генетические характеристики, включая анализ протеома [1-3].

Цель работы – изучение протеома бактериофага *Bacillus cereus* Fbc – 28УГСХА (определение количества, молекулярного веса и изоэлектрической точки белков).

Материалы и методика исследований. Объект исследования - бактериофаг Fbc – 28УГСХА, выделенный в 2008 г. из пробы почвы (г. Сызрань, Самарская область). Бактериофаг концентрировали методом ультрафильтрации с применением одноразовых ультрафильтров с пределом исключения 10 кДа, Merck (Millipore) [4].

Нуклеотидные последовательности исследуемых бактериофагов изучали методом полупроводникового секвенирования на платформе IonTorrent (Thermo Fisher Scientific, США) при помощи набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 на чипе Ion PI ChipKit v2 секвенатором IonProton (ThermoFisherScientific, США) согласно протоколу производителя.

Оценку распределения длин фрагментов библиотек и их концентрацию проводили с использованием прибора Bioanalyzer 2100 и набора реагентов

Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США) согласно протоколу производителя. Клональную амплификацию библиотек, которые были предварительно эквимольно пулированы, проводили с использованием набора Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Для сборки фаговых геномов *de novo* использовали риды с качеством прочтения нуклеотидов не ниже Q20 и длиной не менее 50 оснований.

Сборку геномов осуществляли с использованием программного обеспечения Newbler (Roche/454 GS-FLX). Сравнение собранных бактериофагов с геномами известных аннотированных бактериофагов проводили при помощи алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных нуклеотидных последовательностей NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США). Визуализацию выравнивания собранных нами геномов с известными мы проводили с использованием программного обеспечения BLAST Ring Image Generator (BRIG). Поиск открытых рамок считывания проводили при помощи программного обеспечения UGENE (Унипро, Россия). Для проведения анализа протеома бактериофага *FBc* – 28 УГСХА применяли ресурсы систем SnapGeneViewerv.4.1.7 и ExPasy (<https://web.expasy.org>).

Результаты исследований и их обсуждение. Данные сиквенса бактериофага *Bacillus cereus FBc* – 28 УГСХА были внесены в систему SnapGeneViewerv.4.1.7 и получена карта протеома [5-6]. Затем нуклеотидный сиквенс каждого из локусов был ретранслирован в протеомный сиквенс и определен аминокислотный состав, который был перенесен в систему ExPasy и получены данные о молекулярной массе и точке изоэлектрического фокусирования. Этот алгоритм применяли для каждого генетического локуса. Полученные нами данные анализа протеома бактериофага *FBc* – 28УГСХА были сопоставлены на основании данных проведенного сиквенса.

Установлено, что анализ протеома бактериофага *Bacillus cereus FBc* – 28 УГСХА соответственно данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 60 белков с молекулярными массами от 5,7 до 132,3 кДа.

На основании данных системы ExPasy были построены гистограммы распределения фрагментов протеома бактериофага *Bacillus cereus FBc* – 28 УГСХА в зависимости от молекулярной массы и точке изоэлектрического фокусирования. Установлено, что 57% выявленных белков имеет молекулярную массу 10-20 кДа, 15% - 20-40 кДа, 10% - 40-60 кДа, 5% - более 80 кДа, 13% - менее 10 кДа. Анализ белков бактериофага *Bacillus cereus FBc* – 28УГСХА по изоэлектрической точке (pI) - величине рН, при которой белки переходят в изоэлектрическое состояние, показал, что она располагается в диапазоне от 4,2 до 12,1.

Закключение. Исследование биологических свойств бактериофагов, которые будут входить в состав биопрепарата для деконтаминации продуктов пита-

ния, невозможно без изучения их белков. При анализе протеома бактериофага *Fbc* – 28 УГСХА - данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 60 белков, у которых определен размер. Молекулярная масса установленных белков колеблется в диапазоне от 5,7 до 132,3 кДа, причем 57% из них имеет молекулярную массу 10-20 кДа, 15% - 20-40 кДа, 10% - 40-60 кДа, 5% - более 80 кДа, 13% - менее 10 кДа. Гистограмма распределения белкового состава *Bacillus cereus phage Fbc* – 28 УГСХА по изоэлектрической точке (pI) дает информацию о кислотности среды (рН), при которой белок не несёт электрического заряда, и фиксирует значения в широком диапазоне, равном 4,2 - 12,1. Полученные данные количественного анализа белков бактериофага *Bacillus cereus Fbc* – 28 УГСХА позволяют в перспективе получить информацию о качественном его составе. Полученные данные о протеоме бактериофага *Fbc*–28 УГСХА, специфичного в отношении *Bacillus cereus*, приближает нас к созданию фаговых препаратов нового поколения, предназначенных для деконтаминации пищевого сырья, имеющих высокую специфичность и широкий спектр литического действия в пределах бактериального вида, и соответствующих стандартам биобезопасности.

Библиографический список:

1. Суярова Е.А., Тарасова Г.Н. Диагностические возможности протеомного профилирования в гастроэнтерологии // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1-9. – С. 1921-1925; URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=38454> (дата обращения: 15.10.2018).
2. Мирошников, К.А. Молекулярно-биологические и генетические принципы селекции терапевтических бактериофагов бактерий родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* / К.А. Мирошников, Е.Е. Куликов, О.С. Дарбеева, К.А. Лыско, Г.М. Игнатьев // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2014. - Т. 50. - № 3. - С. 338.
3. Conrotto, P. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications / P. Conrotto, S. Souchelnytskyi // *Exp. Oncol.* - 2008. - V. 30. - № 3. - P. 171–180.
4. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А.В. Летаров; [пер. с англ. Е. Е. Куликов и др.]. - Москва: Научный мир, 2012. - 636 с.
5. Феоктистова, Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Bacillus cereus Fbc*-28 УГСХА / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. - 2018. - № 2 (42). - С. 216-222.
6. Feoktistova, N.A. Molecular-genetic Characteristics of Bacteriophage *Bacillus cereus Fbc* – 28 UGSHA / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V.

Suldina, S.N. Zolotukhin // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – V. 9. - № 4. – P. 345-354.

RESULTS OF STUDYING OF PROTEOM OF THE BAKTERIFAG OF *BACILLUS CEREUS*

Kondrashin I.A., Feoktistova N.A., Merchina S.V., Evina D.A., Suleymanova M.I.

Keywords: *Bacillus cereus*, bacteriophage, protey, molecular weight, protein, isoelectric point.

In work results of researches of a proteom of a bacteriophage of FBC-28 UGSHA are presented. When sequencing his nucleinic acid 60 proteins with a molecular masses from 5,7 to 132,3 kd have been revealed. The histogram of distribution of proteinaceous structure of Bacillus cereus phage FBC-28 UGSHA on an isoelectric point (pI) fixes values in the wide range equal 4,2 - 12,1.