

УДК 602.3:579.6

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА Pr-4 УГСХА

*Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru;*
И.А. Кондрашин, магистрант, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru;
*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru*
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Proteus, бактериофаг, анализ, протеом, ген, белок, деконтаминация.*

В статье описана молекулярно-генетическая характеристика протейного бактериофага Pr-4 УГСХА. Данные протеомного анализа на основании проведенного сиквенса и электрофореза в ПААГ позволили выявить 3 белка (67 кДа, 77 кДа и 94 кДа); при анализе протеома в приложении SnapGene Viewer 4.1.9 было выявлено 50 белков с молекулярными массами от 5,5 до 140 кДа; в приложении BASys (Bacterial Annotation System) выявлено 55 белков с молекулярными массами от 3,4 до 140 кДа.

Введение. Проблема изучения основных биологических свойств вирулентных и умеренных бактериофагов рода *Proteus*, включающих морфологию бляшкообразующих единиц, литическую активность, спектр литического действия, специфичность, характеристику генома и анализ протеома) в настоящее время в литературе описана недостаточно [1-4]. Однако, молекулярно-генетическая характеристика и анализ протема в частности, позволят в перспективе контролировать свойства бактериофагов-кандидатов для создания фаговых биопрепаратов для деконтаминации пищевого сырья и продовольственных товаров.

Цель работы - изучение молекулярно-генетических характеристики бактериофага Pr-4 УГСХА, кандидатного для создания биопрепарата для деконтаминации продуктов питания.

Задачи исследований:

- провести селекцию методов экстракции фаговых геномов. Определить оптимальную методику выделения фаговых геномов, исходя из критериев трудоемкости, эффективности и отсутствия деградации при исследовании и хранении нуклеиновых кислот.

- определить размеры и общие характеристики нуклеиновых кислот бактериофага Pr-4 УГСХА.

- провести анализ протеома бактериофага Pr-4 УГСХА: при разделении выделенных и сконцентрированных белков бактериофага в ПААГ методом вертикального электрофореза; в приложении SnapGene Viewer 4.1.9; в приложении BASys (Bacterial Annotation System).

Материалы и методы. Объектом исследований был бактериофаг Pr – 4 УГСХА, выделенный в 2017 году из объектов внешней среды, специфичный только для бактерий рода *Proteus* [5-7].

Для протеомного анализа нами были использованы ресурсы систем SnapGene Viewer v.4.1.7 и ExPasy (<https://web.expasy.org>) [8]. Для анализа белковых профилограмм выделенных бактериофагов нами был использован метод вертикального электрофореза в ПААГ. Анализ профилограмм был проведен с использованием программного обеспечения GelAnalyzer 2010.

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

Результаты исследований и их обсуждение. Одним из важных этапов в практике является подготовка ДНК. Для этого были использованы несколько различных технологий очистки нуклеиновых кислот от ферментов, белков, ионов, которые могут существенно усложнить протекание реакции, а в некоторых случаях и вовсе ингибировать действие ДНК-полимеразы. В данной работе нами были использованы методы экстракции с использованием сорбента и фенольно-хлороформная экстракция ДНК.

В результате проведенных исследований и расчетов коэффициента чистоты НК в растворе трис-ЭДТА было сделано заключение, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной НК, а это отвечает целям эксперимента.

Следующим этапом работы с бактериофагом Pr 4- УГСХА было изучение его молекулярно-генетической характеристики, включающей в себя определение размера фагового генома, проверку наличия или отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и других нежелательных локусов. Изучение данных характеристик позволяет подтвердить оригинальность и вирулентную природу бактериофага.

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Штамм бактериофага был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы

методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. Собранные геномы сравнивали с известными ДНК бактериофагов, депонированных в GenBank NCBI для определения кодирующих областей геномов.

В результате проведенных исследований была составлена карта линейной ДНК бактериофага *Pr 4- УГСХА*. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов.

Качественный состав протеинов бактериофага соответствует такому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемых видов бактерий.

Нами были получены биоинформационные данные сиквенса *Proteus phage (Pr 4- УГСХА)*: длина цепи - 44 580 п.н., G/C-состав – 39,21%, молекулярный вес – 13712 кДа, молярный коэффициент – 484 409 600 l/mol, температура плавления – 80,96 °C, $\mu\text{g}/\text{OD}_{260}$ – 28,31, A – 29,2%, C – 22,6%, G – 16,6%, T – 31,6%.

В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии его генов. Качественный состав протеинов изучаемых бактериофагов соответствует такому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – это наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемых видов бактерий.

В результате проведенных исследований нами были сопоставлены данные протеомного анализа на основании проведенного сиквенса и электрофореза в ПААГ. Для *Proteus phage (Pr 4 – УГСХА)* было выявлено 3 белка (67 кДа, 77 кДа и 94 кДа). При анализе протеома бактериофага *Proteus* в приложении SnapGene Viewer 4.1.9 соответственно данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 50 белков с молекулярными массами от 5,5 до 140 кДа. При анализе про-

теома бактериофага *Proteus* (Pr 4 - УГСХА) в приложении BASys (Bacterial Annotation System) соответственно данных секвенирования его нуклеиновой кислоты было выявлено 55 белков с молекулярными массами от 3,4 до 140 кДа. При анализе соответствия протеомного состава, количества белков и распределения их по молекулярным массам в биоинформационных приложениях SnapGene Viewer 4.1.9 и BASys version 1.0 выявлена их идентичность.

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

Библиографический список:

1. Чугунова, О.Е. Изучение свойств протейных фагов / О.Е. Чугунова, Н.А. Татарникова // Пермский аграрный вестник. - № 3(15). – 2016. – С. 108-122.
2. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
3. Сятчихина, Е.Н. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* / Е.Н. Сятчихина, П.А. Набатников, С.А. Коровкин, А.В. Катлинский, Г.М. Игнатъев // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2016. – Т. 16. - № 2 (58). – С.90-95.
4. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
5. 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.
6. 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.
7. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 3(39). – С. 99-105.
8. Феоктистова, Н.А. Анализ протеома протейного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина, // Вестник Ульянов-

ской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. - № 2 (42).
– С. 223-229.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF THE BACTERIOPHAGE PR-4 УГСА

Feoktistova N.A., Kondrashin I. A., Vasilyev D.A.

Key words: *Proteus, bacteriophage, analysis, protein, gene, protein, decontamination.*

The article describes the molecular genetic characteristics of the proteinaceous bacteriophage Pr-4 УГСА. Data proteomic analysis based on the sequence and electrophoresis in PAAG revealed 3 proteins (67 kDa, 77 kDa and 94 kDa); in the analysis of the proteome in the application SnapGene Viewer 4.1.9 revealed 50 proteins with molecular weights from 5.5 to 140 kDa; in the Annex Bases (Bacterial Annotation System) revealed 55 proteins with molecular weights from 3.4 to 140 kDa.