

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ HBL ENTEROTOXIN В ГЕНОМЕ БАКТЕРИОФАГОВ *VACILLUS PUMILIS*

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: бактериофаг, *Vacillus pumilis*, HBL enterotoxin, система праймеров, геном

В статье представлена молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Vacillus pumilis* FBm-8 УГСХА, подтверждена его оригинальность и вирулентная природа, что позволяет его использовать в составе биопрепарата для деконтаминации плодоовощной продукции и результаты разработки системы детекции HBL enterotoxin в геноме бактериофагов, специфичных для *Vacillus pumilis*. Для бактериофага FBm-8 УГСХА, трижды секвенированного, была составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. Проведено картирование генов, для которых были и не были определены гомологии. Установлено, что качественный состав протеинов изучаемого бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов и имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. Определено, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной ДНК FBm-8 УГСХА. На основании консервативных участков гена были подобраны праймеры для детекции гена HBL enterotoxin методом ПЦР, так как с позиции горизонтального переноса факторов патогенности у бактерий рода *Vacillus* одним из важных является данный энтеротоксин. Характеристика праймеров: прямой праймер (f) 5'-3' – GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG; обратный праймер (r) 5'-3' – TGCGATTCTAGCGGAGTTC; расчетная температура плавления прямого праймера – 60,0 °C; расчетная температура плавления обратного праймера – 59,9 °C; теоретическая специфичность – *Vacillus pumilis*; длина амплифицируемого участка (п.о.) – 366. В результате исследований была разработана ПЦР-система для индикации наличия фрагмента гена HBL enterotoxin, которая позволила определить отсутствие фрагментов вирулентного гена HBL enterotoxin бактерий *Vacillus* в геноме бактериофага *Vacillus pumilis* FBm-8 УГСХА, что свидетельствует о возможном его использовании в составе биопрепарата для обработки плодоовощной продукции.

Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2019 году.

Введение

Известно, что *Vacillus spp.* входят в группу почвенных сапрофитов и, таким образом, являются источником контаминации продуктов питания, включая овощи, специи и злаки [1-3]. *Vacillus cereus* является достаточно изученным бактериальным агентом, вызывающим пищевые отравления, вырабатывающим термостойкий рвотный токсин (cereulide), термочувствительные диарейные энтеротоксины (HBL, NHE и VcET) [4-6]. По литературным данным, продукция токсинов, аналогичных вышеназванным, была зафиксирована у других представителей рода *Vacillus*: *V. mycoides*, *V. subtilis*, *V. pumilis*, *V. thuringiensis*, *V. licheniformis*, *V. circulans*, *V. lentus*, которые относительно редко идентифицируются при пищевых отравлениях [7-8].

Vacillus pumilis - фитопатогенные бактерии, поражающие сельскохозяйственные культуры, такие как кукуруза, столовая свекла, плоды апельсина и абрикоса, цукини, тыква, клубни картофеля, семенники белокочанной капусты, технические культуры: хлопчатник и лен, что наносит экономи-

ческий ущерб сельскохозяйственным и перерабатывающим предприятиям [9]. Вышеназванные бактерии в ассоциации с *Vacillus subtilis* являются возбудителями «картофельной болезни хлеба», которая связана с разрушением структуры хлеба, изготовленного из пшеничной муки под действием протеолитических и амилолитических ферментов. Определенная роль отводится термофильным формам *Vacillus pumilis* при самосогревании зерна [10]. На основании проведенных филогенетических исследований, основанных на изучении последовательности 16S рРНК, *Vacillus pumilis* входит в «*Vacillus subtilis* group» [11]. Исследователи отмечают, что высокая генетическая гетерогенность характерна для многих представителей «*Vacillus subtilis* group», выделенных из одного источника [12].

В настоящее время метод обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующий увеличению сроков хранения (биопроцессинг), позволяет эффективно элиминировать микрофлору, контаминирующую пищевое сырье и продукты питания [13]. Установлено, что

бактериофаги являются агентами горизонтального переноса генов от бактерии к бактерии [14], поэтому есть необходимость изучения кандидатных бактериофагов, предназначенных для деконтаминации продуктов питания растительного происхождения, молекулярно-генетическими методами для определения их потенциальной способности к переносу генов бактерий.

Цель исследований – дать молекулярно-генетическую характеристику бактериофагу *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА для подтверждения его оригинальности и вирулентной природы, что позволит его использовать в составе биопрепарата для обработки плодоовощной продукции и разработать систему детекции HBL enterotoxin в геноме бактериофагов, специфичных для *Bacillus pumilis*.

Объекты и методы исследований

Бактериофаг *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА был выделен из пробы почвы и характеризовался следующими показателями: литическая активность - $4,0 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грацио, диапазон литического действия - специфичен для 77,3% бактериальных культур *Bacillus pumilis* из 22 музейных штаммов НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, не лизирует культуры гомологичного рода.

Методы выделения и изучения биологических свойств бактериофагов многократно были апробированы автором [15-17].

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома FBm-8 УГСХА применяли метод полногеномного секвенирования ДНК бактериофагов второго поколения (IonTorrent, ThermoFisherScientific, США).

Бактериофаг FBm-8 УГСХА был секвенирован трижды. Полученные результаты были подвергнуты биоинформационному анализу. Высокая достоверность при сборе генома бактериофага обеспечивалась фильтрацией качества прочтений (ридов). В экспериментах использовалась информация, полученная из международных баз данных GeneBank, DDBJ, EMBL. Сборка генома осуществлялась программным обеспечением Newbler (Roche/454 GS-FLX)

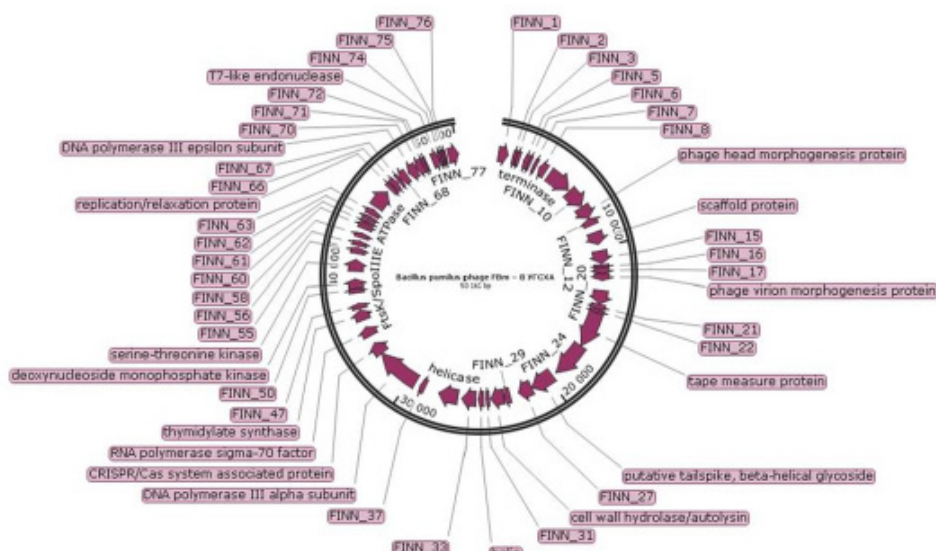


Рис. 1 - Карта линейной ДНК бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА, где проведено дешифрование кодирующих областей генома

В исследованиях использовали спектрофотометр Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher), амплификатор («MaxyGene», AXYGEN Scientific, США). С целью оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях с *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА применяли методику электрофореза в агарозном геле.

Результаты исследований

Нами был проведен спектр исследований, направленных на изучение молекулярно-генетической характеристики бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА: определялся размер фагового генома, рассматривался процент идентичности с максимально близкими с точки зрения таксономии бактериофагами, осуществлялось определение наличия в составе ДНК FBm-8 УГСХА гена, кодирующего HBL enterotoxin.

На рис. 1 собранный геном бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА сравнивали с ДНК бактериофагов, которые были депонированы в GenBank NCBI.

Далее были составлены карты линейных ДНК выделенного и селекционированного нами бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА. С учетом известных аналогов определялись продукты экспрессии его генов (рис. 2).

Установлено, что качественный состав белков бактериофага FBm-8 УГСХА аналогичен с аннотированными аналогами, имеет четкие гомологии аминокислотного и нуклеотидного наборов.

В структуре протеинов фага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА выявлена закономерность, которая присуща бактериофагам – это присутствие структурных и неструктурных компонентов. Установлены продукты генов, которые не имеют четко определенных функциональных характеристик.

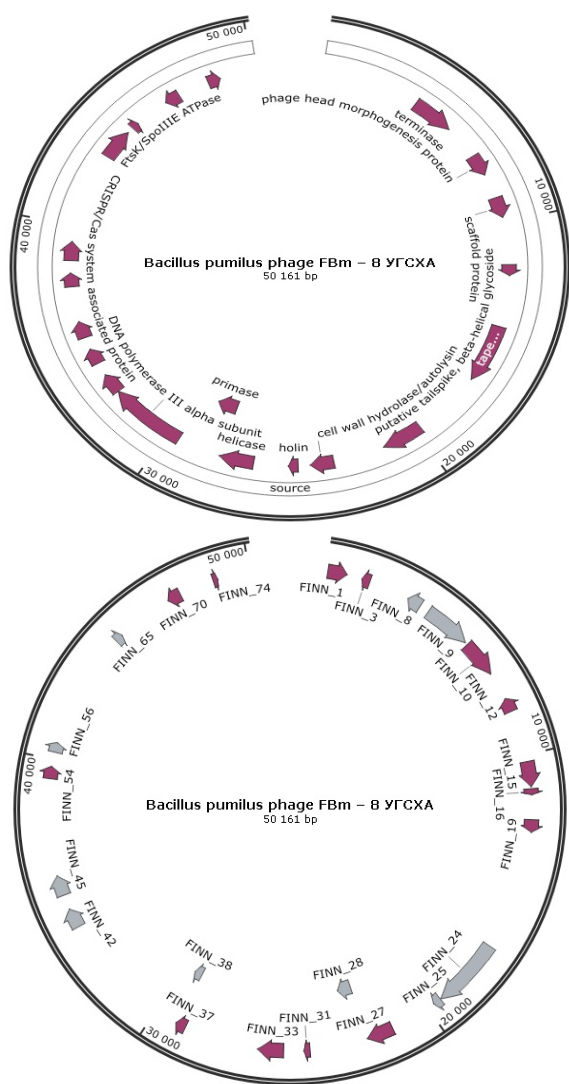


Рис. 2 - Карта линейной ДНК фага *Bacillus pumilus* FBm-8 УГСХА (картирование генов, для которых: А) определены гомологии, Б) не определены гомологии)

Это так называемые «гипотетические белки», имеющие аналоги в аннотированных базах данных (GeneBank, EMBL, DDBJ) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Bacillus pumilus*.

Одним из основных критериев при отборе кандидатного бактериофага для целей био-процессинга является определение отсутствия в структуре его генома «островков патогенности». Если рассматривать горизонтальный перенос генов, кодирующих факторы патогенности, то у бактерий рода *Bacillus* одним из важных вирулентных факторов является энтеротоксин, входящий в HBL-комплекс, структура которого закодирована в гене HBL enterotoxin.

Первоначально был проанализирован нуклеотидный состав и проведено выравнивание гена энтеротоксина с целью определения кон-

сервативных участков. Фрагменты исследований представлены на рис. 3.

С учетом полученной выше информации были подобраны праймеры для детекции гена HBL enterotoxin методом ПЦР. Его отсутствие будет свидетельствовать о перспективности применения изучаемого бактериофага *Bacillus pumilus* FBm-8 УГСХА при обработке плодоовощной продукции. Данные подбора представлены на рис. 4-5.

Для экстракции нуклеиновых кислот были использовано несколько различных технологий их очистки от протеинов и ферментов, которые усложняют постановку реакции, иногда ингибируют действие ДНК-полимеразы [18].

После экстрагирования ДНК мы осуществляли измерение оптической плотности при 260 нм, 280 нм и 230 нм. Использовали расчеты A_{260}/A_{230} , позволяющие вычистить примеси, которые не относятся к поглощению светового потока ДНК. Для определения чистоты нуклеиновых кислот применяли расчеты A_{260}/A_{280} (чистой для использования в ПЦР, считалась ДНК при коэффициенте не менее 1,8).

При определении коэффициента чистоты ДНК установлено, что фенольно-хлороформная экстракция является эффективным методом для выделения и ее очистки.

Далее мы определили пару праймеров, которая отвечает следующим условиям: GC должно быть не более 60%, температура плавления составляет $\approx 60^\circ\text{C}$, длина ампликона находится в диапазоне от 200 до 400 п.н., длина праймеров составляет от 18 до 24 п.н. (табл. 1).

После подбора праймерных систем к участку гена HBL enterotoxin - GAGATGCAAAAATTAATGCGGCGG и TGCGATTCTAGCGGAGTTC - определялась их работоспособность и специфичность, а также оптимизировались режимы постановки полимеразно-цепной реакции на пробах, содержащих экстрагированную ДНК музейных и полевых штаммов *Bacillus pumilus*. Для этого был проведен цикл исследований по постановке ПЦР с детекцией методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Температура отжига праймеров выбиралась эмпирически с учетом их расчетных температур плавления и необходимости создания универсального протокола ПЦР для индикации искомого ДНК.

Диапазон температур, с которым нам пришлось работать, был достаточно велик - $50-75^\circ\text{C}$. Определено, что температура отжига $+60^\circ\text{C}$ является оптимальной для системы праймеров, применяемой для выявления гена, кодирующего HBL enterotoxin. В процессе исследований была определена оптимальная программа амплификации

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 5_Bacillus_cereus_14579 | GAAGAC TTGAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC TT CGGAT AC GC AAAAC TTC AAGGGTGAT |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | GAAGAC TTAAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC GT CGGAT AC TC AAAAT TTC AAGGGAGAT |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | GAAGAC TTAAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC GT CGGAT AC TC AAAAT TTC AAGGGAGAT |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | GAAGAC TTGAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC GT CGGAT AC GC AAAAC TTC AAGGGTGAT |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | GAAGAC TTGAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC TT CGGAT AC GC AAAAC TTC AAGGGTGAT |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | GAAGAC TTGAAGAAATTC CGAAAT AAAAT GAC TT CGGAT AC GC AAAAC TTC AAGGGTGAT |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | GCAAA TCAAA TACA TC TAT AT TAG CT AG T CAAG AT GCAGG AAT TC CGC TT CT GCA AAA T |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | GCAAA TCAAA TACA TC TAT CT TGG CT AG T CAAG AT GCT GGA AT CC CGC TT CT GCA AAA T |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | GCAAA TCAAA TACA TC TAT CT TGG CT AG T CAAG AT GCT GGA AT CC CGC TT CT GCA AAA T |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | GCAAA TCAAA TACA TC TAT TT TAG CT AG T CAAG AC GCT GGA AT CC CGC TT CT GCA AAA T |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | GCAAA TCAAA TACA TC TAT AT TAG CT AG T CAAG AT GCAGG AAT TC CGC TT CT GCA AAA T |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | GCAAA TCAAA TACA TC TAT AT TAG CT AG T CAAG AT GCAGG AAT TC CGC TT CT GCA AAA T |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | CAAAT TACA AC GT ACA AT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CT |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | CAAAT TACA AC GT AT AAT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CT |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | CAAAT TACA AC GT AT AAT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CT |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | CAAAT TACA AC GT ACA AT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CA |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | CAAAT TACA AC GT ACA AT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CT |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | CAAAT TACA AC GT ACA AT GAAG CAA TT AG T AAAT AT AAT GCAA T TAT TAT C GGT CAT CT |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | GTT GC GAC AGC TC TAGG ACC AA TT GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC GGG GC |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | GTT GC GAC AGC TT TAGG C CCA AT T GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC GGG GA |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | GTT GC GAC AGC TT TAGG C CCA AT T GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC GGG GA |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | GTT GC GAC AGC TC TAGG G CCA AT T GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC AG GT |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | GTT GC GAC AGC TC TAGG ACC AA TT GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC GGG GC |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | GTT GC GAC AGC TC TAGG ACC AA TT GCA AT TAT CGGT GGT GC AG T AG TT ATT GC TAC GGG GC |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | GCAGGA ACAC C GC TAGG AG T AG CAT TAAT T GC AG GT GGT GC AG C AG CT G TAGG CGG TGG T |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | GCAGGA AC TCC GC TAGG AAT CG CAT TAAT T GC AG GT GGA AC AG C AG TAGG TGG TGG G |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | GCAGGA AC TCC GC TAGG AAT CG CAT TAAT T GC AG GT GGA AC AG C AG TAGG TGG TGG G |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | GCAGGA AC GC C AC TAGG AG T CG CAT TAAT T GC AG GA GGC GC AG C GGT G TAGG CGG TGG G |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | GCAGGA ACAC C GC TAGG AG T AG CAT TAAT T GC AG GT GGT GC AG C AG CT G TAGG CGG TGG G |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | GCAGGA ACAC C GC TAGG AG T AG CAT TAAT T GC AG GT GGT GC AG C AG CT G TAGG CGG TGG G |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | GGT ATT GGT TT AGGA AC AG C GGT GT CAC AG CAT CT AAG C ATA TGG AC TC CT ATA AT |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | -----AACAGCTGGAATCGAT TAGCGAAGAA--AGAGCTTGAATAAT |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | -----AACAGCTGGAATCGAT TAGCGAAGAA--AGAGCTTGAATAAT |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | -----TACAGCTGGAATCGAT TAGCGAAGAA--AGAGCTTGAATAAT |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | -----TACAGCTGGAATCGAT TAGCGAAGAA--AGAGCTTGAATAAT |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | -----TACAGCTGGAATCGAT TAGCGAAGAA--AGAGCTTGAATAAT |
| ***** | |
| 5_Bacillus_cereus_14579 | -----GAAATTTCTAACAAAA TC GGA----- |
| 1_Bacillus_mycooides_ATCC_6462, | GCA CAAGCAGAAATTC AAAAAA TAA CAGGACT GCAGAAC GAGAAAT AGC CAGTTT AAA GA |
| 2_Bacillus_mycooides_Gnyt1 | GCA CAAGCAGAAATTC AAAAAA TAA CAGGAC----- |
| 6_Bacillus_anthraxis_SPV_842_15 | GCA CAAGC TGAAATTC AAAAAA TAA CTGGAC----- |
| 3_Bacillus_cereus_FORC_047 | GCA CAAGCAGAAATTC AAAAAA TAA CAGGAC----- |
| 4_Bacillus_thuringiensis_Bt_1824 | GCA CAAGCAGAAATTC AAAAAA TAA CAGGAC----- |
| ***** | |

Рис. 3 – Фрагмент выравнивание гена HBL enterotoxin



Рис. 4 – Подбор системы праймеров к участку гена HBL enterotoxin

| Primer pair 1 | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-----------------|--------|-------|------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG | Plus | 23 | 369 | 391 | 60.06 | 43.48 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | TGCGATTCTAGCGGAGTTC | Minus | 20 | 734 | 715 | 59.90 | 55.00 | 4.00 | 2.00 |
| Product length | 366 | | | | | | | | |
| Primer pair 2 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | ATGCAAAATTAATGCGCGGTA | Plus | 22 | 372 | 393 | 58.22 | 38.36 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | CTGTGCGCACAGATGAACCG | Minus | 20 | 660 | 641 | 59.56 | 55.00 | 8.00 | 2.00 |
| Product length | 289 | | | | | | | | |
| Primer pair 3 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | AGATGCAAAAATTAATGCGCGTA | Plus | 24 | 370 | 393 | 60.44 | 37.50 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | ATGCGATTCTAGCGGAGTTC | Minus | 20 | 735 | 716 | 59.25 | 50.00 | 4.00 | 0.00 |
| Product length | 366 | | | | | | | | |
| Primer pair 4 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | GCAAAAATTAATGCGCGGTATTGG | Plus | 24 | 374 | 397 | 60.55 | 41.67 | 7.00 | 3.00 |
| Reverse primer | AATGCGATTCTAGCGGAGTTC | Minus | 20 | 736 | 717 | 59.25 | 50.00 | 4.00 | 2.00 |
| Product length | 363 | | | | | | | | |
| Primer pair 5 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | CAAAATTAATGCGCGGTATTGG | Plus | 23 | 375 | 397 | 57.94 | 39.13 | 7.00 | 3.00 |
| Reverse primer | CGATTCTAGCGGAGTTCCT | Minus | 20 | 732 | 713 | 58.97 | 55.00 | 4.00 | 2.00 |
| Product length | 358 | | | | | | | | |
| Primer pair 6 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | AGAGATGCAAAAATTAATGCGGCG | Plus | 24 | 368 | 391 | 61.26 | 41.67 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | ATTGGCGCTAAAGCTGTGCG | Minus | 20 | 673 | 654 | 61.03 | 55.00 | 6.00 | 2.00 |
| Product length | 306 | | | | | | | | |
| Primer pair 7 | | | | | | | | | |
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | TTAATGCGCGGTATTGGTTAAAT | Plus | 23 | 381 | 403 | 57.50 | 34.78 | 7.00 | 2.00 |
| Reverse primer | GCAATTGGCGCTAAAGCTGTC | Minus | 21 | 676 | 656 | 60.13 | 52.38 | 6.00 | 2.00 |
| Product length | 286 | | | | | | | | |

Рис. 5 - Подбор системы праймеров к участку гена HBL enterotoxin

Таблица 1
Характеристика системы праймеров к участку гена, кодирующего HBL enterotoxin

| Параметр | Характеристика |
|----------------------------------------------------|-------------------------|
| участок гена HBL enterotoxin | |
| Праймер 1 (f) 5'-3' | GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG |
| Праймер 2 (r) 5'-3' | TGCGATTCTAGCGGAGTTC |
| Расчетная температура плавления прямого праймера | 60,0°C |
| Расчетная температура плавления обратного праймера | 59,9°C |
| Размер ампликона, п.н. | 366 |

Таблица 2
Разработанный алгоритм амплификации ДНК

| Для амплификаторов с активным регулированием (по раствору в пробирке): «Терцик» (НПО «ДНК-Технология», Россия) | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------|--------------|---------------------|
| № цикла | Шаг | Температура | Длительность | Количество повторов |
| 1 | 1 | 95°C | 1 мин | 1 |
| 2 | 1 | 95°C | 10 сек | 30 |
| | 2 | 60°C | 10 сек | |
| | 3 | 72°C | 20 сек | |
| 3 | 1 | 72°C | 2 мин | 1 |

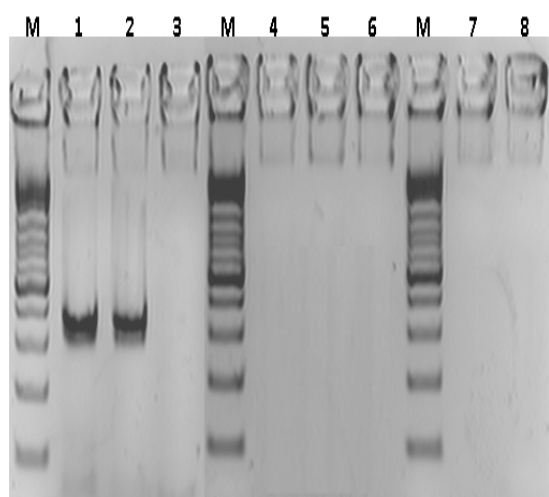


Рис. 6 - Результаты амплификации фрагмента гена HBL enterotoxin электрофоретическим методом: М – маркер молекулярного веса; 1,2 – положительный контроль; 3 – бактериофаг FBm – 8 УГСХА - *Bacillus pumilis*; 4 – отрицательный контроль

(табл. 2), которая позволила добиться определенной специфичности для подобранной системы праймеров, позволяющей осуществлять идентификацию гена, кодирующего HBL enterotoxin в ДНК штаммов *Bacillus pumilis*.

Методом подбора была установлена концентрация для каждого из праймеров, которая составила 10 pmol на реакцию в объеме 25 мкл.

Для визуализации результатов полимеразно-цепной реакции применяли метод электрофореза (рис. 6).

В результате исследований нами была разработана ПЦР-система для индикации наличия фрагмента гена HBL enterotoxin. Ее применение позволило определить, что фрагментов вышеназванного гена в геноме бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА обнаружено не было, что свидетельствует о возможности его использования в составе биопрепарата, разрабатываемого для деконтаминации плодоовощной продукции.

Выводы

Результаты секвенирования генома бакте-

риофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА, подвергнутые биоинформационному анализу, позволили установить, что качественный состав белков фага аналогичен с аннотированными аналогами и имеет четкие гомологии аминокислотного и нуклеотидного наборов. В структуре протеинов FBm-8 УГСХА выявлена закономерность, которая присуща бактериофагам – это присутствие структурных и неструктурных компонентов. Установлены продукты генов, которые не имеют четко определенных функциональных характеристик. Это так называемые «гипотетические белки», имеющие аналоги в аннотированных в базах данных (GeneBank, EMBL, DDBJ) в геномах бактериофагов, специфичных для *Bacillus pumilis*.

Определено, что фенольно-хлороформная экстракция является эффективным методом для очистки ДНК бактериофага FBm-8 УГСХА.

Разработана система молекулярно-генетической детекции (постановка ПЦР) фрагмента гена HBL enterotoxin в геноме фагов, специфичных для *Bacillus pumilis*, которые являются кандидатами для средства деконтаминации плодоовощной продукции. Система праймеров для индикации участков гена HBL enterotoxin в геноме фагов *Bacillus pumilis* включает прямой праймер (f) 5'-3' – GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG и обратный праймер (r) 5'-3' – TGCGATTCTAGCGGAGTTC, имеет расчетную температуру плавления прямого праймера – +60,0 °С и обратного праймера – +59,9 °С, длина амплифицируемого участка составляет 366 п.о. Специфического фрагмента гена HBL enterotoxin в геноме бактериофага *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА, поиск которого проводили с применением разработанной системы молекулярно-генетической детекции, выявлено не было.

Полученные в результате экспериментов данные позволяют рекомендовать бактериофаг *Bacillus pumilis* FBm-8 УГСХА для конструирования нового высокоэффективного фагового биопрепарата.

Библиографический список

1. Griffiths, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk / M.W. Griffiths // *Journal of Food Protection*. – 1990. - № 53. – P. 790–792.

2. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in The Netherlands / M.C. Te Giffel, R.R. Beumer, S. Leijendekkers, F.M. Rombouts // *Food Microbiol.* - 1996. – Vol. 13. – P. 53-58.

3. Beattie, S.H. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay / S.H. Beattie, A.G. Williams // *Lett.*

Appl. Microbiol. - 1999. – Vol. 28. – P. 221-225.

4. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation / S.G. Jackson, R.B. Goodbrand, R. Ahemd, S. Kasatiya // *Lett. Appl. Microbiol.* - 1995. – Vol. 21. – P. 103–105.

5. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning / M.S. Salkinoja-Salonen, R. Vuorio, M.A. Andersson, P. Ka`mpfer, M.C. Andersson, T. Honkanen-Buzalski, A.C. Scoging // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. – Vol. 65. – P. 4637–4645.

6. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections / N.J. Rowan, G. Caldow, C.G. Gemmell, I.S. Hunter // *Applied and environmental microbiology*. – 2003. - Vol. 69, № 4. - P. 2372–2376.

7. McKillip, J. L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review / J.L. McKillip // *Antonie Leeuwenhoek*. - 2000. – Vol. 77. – P. 393–399.

8. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae / N.J. Rowan, K. Deans, J.G. Anderson, C.G. Gemmell, I.S. Hunter, T. Chaithong // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. - № 9. – P. 3873-3881.

9. Асколонов, С.П. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / С.П. Асколонов, А.И. Ильченко // *Вопросы питания*. – Киев: Госмедиздат УССР, 1962. – С.226–229.

10. Гигиеническая оценка контаминации муки возбудителями картофельной болезни / О.В. Пельц, Е.Я. Долгушина, Н.Н. Аксенова, [и др.] // *Медицина в Кузбассе: спецвыпуск*. – 2003. - № 5. - С. 74–75.

11. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance / K. Jeyaram, W. Romi, T.A. Sing, G.A. Adewumi, K. Basanti, F.A. Oguntoyinbo // *Journal of Microbiological Methods*. – 2011. - Vol. 87. – P. 161-164.

12. Siciua, O.A. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection / O.A. Siciua, F. Constantinscu, C.C. Petruța // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2015. - Vol. 20, № 5. – P. 10737- 10750.

13. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации / А.В. Алешкин, Э.А.Светоч, Н.В. Воложанцев, И.А.Киселева, Е.О. Рубальский, О.Н. Ершова, Л.И. Новикова // *Бактериология*. – 2016. – Том 1, № 1. – С. 22-32.

14. Крылов, В.М. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий / В.М. Крылов // Генетика. - 2003. - Том 39, № 5. - С. 595–620.

15. Методы выделения бактериофагов бактерий *Bacillus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев [и др.] // Вестник Ветеринарии. – 2011.– № 4. – С.88–89.

16. Белова, К.В. Бактериофаги *Bacillus coagulans*: способ выделения и параметры культивирования / К.В. Белова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной

сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 2 (34). - С. 80-86.

17. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин, К.В. Белова // Биокиров – 2015. Материалы III Международного форума. – Киров, 2015 – С. 10-12.

18. Аукунов, Н.Е. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе / Н.Е. Аукунов, М.Р. Масабаева, У.У. Хасанова // Наука и здравоохранение. – 2014. - № 1. – С.51-53.

CHARACTERISTICS OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF FBM-8 UGSKHA BACTERIOPHAGE

Feoktistova N.A.

FSBEI HE Ulyanovsk State Agricultural Academy
432017, Ulyanovsk, Novy Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: bacteriophage, *Bacillus pumilis*, HBL enterotoxin, primer system, genome

The article presents results of studies on the molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilis* FBM-8 UGSKHA bacteriophage in order to confirm its originality, virulent nature to determine the appropriateness of its use as part of a biological product that will potentially be used in treatment of fruit and vegetable products and to develop a HBL enterotoxin detection system in the genome of bacteriophages specific for *Bacillus pumilis*. A linear DNA map was compiled for a three times sequenced bacteriophage, with a decoding of the coding regions of the genome. Mapping was performed for genes for which homology was determined and not defined. It was established that the qualitative composition of the proteins of the studied bacteriophage corresponds to those of annotated analogues and has clear homology of the nucleotide and amino acid sets. It was determined that the use of phenol-chloroform extraction leads to the best yield of template DNA. Based on the conserved regions of the gene, primers were selected for detection of the HBL enterotoxin gene by PCR, since the position of horizontal transfer of pathogenicity factors in bacteria of *Bacillus* genus is one of the most important enterotoxin. Primer characteristics: direct primer (f) 5'-3' - GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG; reverse primer (r) 5'-3' - TGCGATTCTAGCGGAGTTC; the calculated melting temperature of the direct primer is 60.0 °C; the estimated melting temperature of the reverse primer is 59.9 °C; theoretical specificity - *Bacillus pumilis*; the length of the amplified part (bp) is 366. As a result of the studies, we developed a PCR system to indicate the presence of the HBL gene fragment enterotoxin, which allowed us to determine that the fragments of the virulent HBL gene enterotoxin of *Bacillus* bacteria in the genome of *Bacillus pumilis* FBM-8 UGSKHA bacteriophage was not found, which indicates its possible use as part of a biological product developed for treatment of fruits and vegetables.

Bibliography

1. Griffiths, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk / M.W. Griffiths // *Journal of Food Protection*. – 1990. - № 53. – pp. 790–792.
2. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in The Netherlands / M.C. Te Giffel, R. R. Beumer, S. Leijendekkers, F. M. Rombouts // *Food Microbiol.* - 1996. – Vol. 13. – pp. 53-58.
3. Beattie, S.H. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay / S.H. Beattie, A.G. Williams // *Lett. Appl. Microbiol.* - 1999. – Vol. 28. – pp. 221-225.
4. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation / S.G. Jackson, R.B. Goodbrand, R. Ahemd, S. Kasatiya // *Lett. Appl. Microbiol.* - 1995. – Vol. 21. – pp. 103–105.
5. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning / M.S. Salkinoja-Salonen, R. Vuorio, M.A. Andersson, P.Ka'mppfer, M.C. Andersson, T. Honkanen-Buzalski, A. C. Scoging // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. – Vol. 65. – pp. 4637–4645.
6. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections / N.J. Rowan, G. Caldwell, C.G. Gemmell, I.S. Hunter // *Applied and environmental microbiology*. – 2003. - Vol. 69, № 4. - pp. 2372–2376.
7. McKillip, J. L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review / J.L. McKillip // *Antonie Leeuwenhoek*. - 2000. – Vol. 77. – pp. 393–399.
8. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae / N.J. Rowan, K. Deans, J.G. Anderson, C.G. Gemmell, I.S. Hunter, T. Chaitong // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. - № 9. – pp. 3873-3881.
9. Askolonov, S.P. Nutritive diseases caused by spore-forming *Bacillus subtilis* and *Bacillus mesentericus* bacteria / S.P. Askolonov, A.I. Ilchenko // *Nutrition issues*. - Kiev: State Medical Publishing House of the Ukrainian SSR, 1962 - P.226–229.
10. Peltz, O.V. Hygienic evaluation of flour contamination with pathogens of potato disease / O.V. Peltz, E.Ya. Dolgushina, N.N. Aksenova, [et al.] // *Medicine in Kuzbass, special issue*. 2003, No. 5. P.74–75.
11. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance / K. Jeyaram, W. Romi, T.A. Sing, G.A. Adewumi, K. Basanti, F.A. Oguntoyinbo // *Journal of Microbiological Methods*. – 2011. - Vol. 87. – pp.161-164.
12. Siciua, O.A. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection / O.A. Siciua, F. Constantinescu, C.C. Petruța // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2015. - Vol. 20. - № 5. – pp. 10737- 10750.
13. Aleshkin, A.V. Innovative directions for of bacteriophage usage in the field of sanitary and epidemiological welfare of the population of the Russian Federation / A.V. Aleshkin, E.A. Svetoch, N.V. Volozhantsev, I.A. Kiseleva, E.O. Rubalskiy, O.N. Ershova, L.I. Novikova // *Bacteriology*. - 2016. - V. 1. - No. 1. - P. 22-32.
14. Krylov, V.M. The role of horizontal gene transfer by bacteriophages in case of occurrence of pathogenic bacteria / V.M. Krylov // *Genetics*. - 2003. - V. 39. - No. 5. - P. 595–620.
15. Methods for isolation of *Bacillus* bacteria bacteriophages / M.A. Yudina, N.A. Feoktistova, V.A. Makeev [et al.] // *Vestnik of Veterinary Medicine*. - 2011.– No. 4. - P.88–89.
16. Belova, K.V. Bacteriophages of *Bacillus coagulans*: isolation method and cultivation parameters / K.V. Belova, N.A. Feoktistova D.A. Vasiliev // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2016. - No. 2 (34). - P. 80-86.
17. Isolation of bacteriophages specific for *Bacillus anthracis* // E.I. Klimushkin, N.A. Feoktistova D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, A.V. Aleshkin, K.V. Belova // *Biokirov - 2015: proceedings of the III International Forum*. - 2015 - P. 10-12.
18. Aukenov, N.E. Isolation and purification of nucleic acids. The state of the problem at the present stage / N.E. Aukenov, M.R. Masabaeva, Yu. Yu. Khasanova // *Science and Health*. - 2014. - No. 1. - P.51-53.