

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАГОВОЙ ИНФЕКЦИИ

*Дубровин Е.В., кандидат физико-математических наук
ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»*

тел. 8(495) 926-37-43, dubrovin@physics.msu.ru

Попова А.В., кандидат биологических наук

*ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
8(4967) 36-01-47, popova_nastya86@mail.ru*

Краевский С.В., кандидат физико-математических наук

*ГНЦ Институт теоретической и экспериментальной физики
имени А.И. Алиханова*

Игнатов С.Г., доктор биологических наук

*ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора,
ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»*

Яминский И.В., доктор физико-математических наук

*ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»*

Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук

*ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
8(4967) 36-01-47, nikvol@obolensk.org*

Ключевые слова: *Атомно-силовая микроскопия, бактериофаги, Acinetobacter baumannii.*

Работа посвящена развитию атомно-силовой микроскопии для исследования бактериофагов на примере фага AP22, специфически инфицирующего A. baumannii.

Введение. В связи с возрастающим интересом к использованию бактериофагов в медицине, в частности, для фаговой терапии, большое значение приобретают прямые и быстрые методы исследования взаимодействия бактериофагов с бактериальными клетками. Одним из таких наиболее перспективных методов является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Если по латеральному пространственному разрешению АСМ сопоставима со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), традиционно применяющейся для анализа бактериофагов (см., например, [1-2]), то по ряду признаков значительно превосходит или дополняет её. Среди таких признаков можно назвать следующие: высокое (не менее десятых долей нанометра) разрешение по высоте, относительно быстрая и простая пробоподготовка (не требуется контрастирование атомами тяжёлых металлов, замораживание-скалывание), возможность проводить исследования на воздухе и в жидкости, а также изучать динамику процессов. Кроме того, АСМ позволяет напрямую изучать механические, адсорбционные, адгезивные, электрические и прочие свойства микробиологических поверхностей [3]. Перечисленные достоинства АСМ позволяют использовать её для исследования особенностей взаимодействия бактериофагов с бактериальными клетками с высоким пространственным разрешением, в частности, фаговой адсорбции, детального изучения различных стадий инфекционного процесса, морфологии поверхности клетки и фагов, изменения механической жёсткости заражённой клетки. Данная

работа посвящена развитию метода АСМ для исследования бактериофагов и их литического цикла. В качестве объекта в данной работе использовали литический бактериофаг AP22, инфицирующий *A. baumannii*.

Материалы и методы исследований. В работе использовали недавно описанный литический бактериофаг AP22, специфически инфицирующий *A. baumannii* [4]. Для получения фаголизата культуру штамма-хозяина *A. baumannii* 1053 (“ГКПМ-Оболенск” № В7129) выращивали при температуре 37 °С с аэрацией до значения оптической плотности $OD_{600}=0,3-0,4$, заражали бактериофагом таким образом, чтобы множественность инфицирования составляла один бактериофаг на 10 бактериальных клеток ($MOI=0,1$), и инкубировали до заметного лизиса жидкой культуры.

Для АСМ-экспериментов использовали фаговый препарат с титром 10^9 БОЕ/мл. Суточную бактериальную культуру штамма *A. baumannii* 1053, выращенную в LB-бульоне при температуре 37 °С в стационарных условиях, разбавляли свежим LB-бульоном и выращивали в течение 1,5-2 ч в тех же условиях. Затем бактериальную культуру разделяли на две части: экспериментальную и контрольную. К экспериментальной части добавляли бактериофаг, таким образом, чтобы множественность инфицирования составляла 50. Экспериментальный и контрольные (содержащий только бактериальные клетки или только фаги) образцы инкубировали при 37 °С. Через разные промежутки времени (от 1 до 60 мин) отбирали аликвоты образцов бактерий *A. baumannii*, фагов и бактериальных клеток, инкубированных с фагом, и анализировали с помощью АСМ.

В качестве подложек использовали пластины из слюды и высокоориентированного графита (ВОПГ) квадратной формы (приблизительно 7×7 мм). Клетки *A. baumannii* или их смесь с фагом (образец) разбавляли в 11 раз, смешивая на свежесколотой поверхности подложки 1 мкл образца с каплей деионизованной воды объёмом 10 мкл. После этого образец оставляли на 1 минуту для адсорбции, аккуратно промывали из микропипетки 20 микролитрами деионизованной воды и высушивали в ламинарном шкафу. Для АСМ-исследований использовали мультимодовый атомно-силовой микроскоп 3a (Digital Instruments, США), оснащённый сканером 150 мкм. Сканирование проводили под углом 90°, со скоростью 2 Гц, в контактном режиме на воздухе с использованием коммерческих кантилеверов CSC11 из кремния (Микро-Маш) с константой упругости 0,35 Н/м. Для анализа и обработки изображений использовали программу Фемтоскан (Центр перспективных технологий, Россия).

Результаты исследований и их обсуждение. Прежде всего, нами были изучены особенности адсорбции бактериофага AP22 на различные поверхности – слюду и ВОПГ. На АСМ-изображениях частиц бактериофага, адсорбированных на слюду (рис. 1а), чётко различаются головка и хвостовой отросток бактериофага, при этом встречаются две разных высоты головки, средние значения которых составляют 42 и 62 нм. Высота в 62 нм согласуется с экспериментами по электронной микроскопии [4] и соответствует интактному бактериофагу, тогда как заниженное значение высоты головки (42 нм) соответствует бактериофагу, частично либо полностью лишённому своей ДНК. Это подтверждается также наличием в ряде случаев небольшого отверстия на головке бактериофага, свидетельствующего о возникновении в ней полости. Бактериофаги, адсорбированные на поверхность ВОПГ (рис. 1б) также имеют бимодальное распределение высот, однако, в отличие от слюды, сами высоты ещё ниже и их средние значения составляют 18 и 38 нм. Вероятно, это связано с частичным разрушением капсида бактериофага из-за гидрофобного взаимодействия с поверхностью ВОПГ. Влияние поверхности графита на целостность адсорбированных на неё вирусных частиц также было описано на примере вируса табачной мозаики [5]. При адсорбции бактериофагов как на слюду, так и на графит часть из них утрачивает свою целостность, что можно наблюдать по наличию отдельно

лежащих на поверхности головок и хвостовых отростков фага. Данный эффект особенно ярко выражен для ВОПГ. Таким образом, можно сделать вывод, что подложка, с которой контактирует бактериофаг, может сильно влиять не только на процесс его адсорбции, но также и на целостность фаговой частицы. Большую роль при этом играет гидрофобное взаимодействие белковой оболочки капсида с поверхностью.

Для изучения различных стадий литического цикла бактериофага AP22 отбирали пробы бактериальных клеток *A. baumannii*, инкубированных с фагом AP22 при температуре 37 °С, через разные промежутки времени (от 1 до 60 мин) от начала фаговой инфекции.

Адсорбция фагов на клетки наблюдалась уже с первой минуты (рис. 2а), причём количество адсорбированных фагов значительно увеличивалась в последующие несколько минут взаимодействия (рис. 2б-2г). На рисунке 3 приведены увеличенные фрагменты АСМ-изображений поверхностей инфицированной и неинфицированной клетки. В отличие от фагов, адсорбированных на подложку, у связавшихся с поверхностью клетки бактериофагов почти все головки имеют отверстия, свидетельствующие о вышедшей из них ДНК (рис. 3б). Наблюдение за морфологией инфицированных клеток показало, что их целостность начинает значительно нарушаться после 30 минут взаимодействия с бактериофагами. Это выражается в значительном уменьшении высоты адсорбированной клетки с 300-400 нм до 200 нм и менее, увеличении шероховатости поверхности, а также в изменении начальной формы клетки (рис. 2д-2е). Полный лизис клетки наблюдается на временах инкубации порядка 60 минут. При этом АСМ-изображения лизированных клеток сопровождаются наличием большого количества новых фагов, высвободившихся из неё (рис. 2д-2е).

Интересно, что данные, полученные с помощью АСМ, позволяют также предположить наличие у фага AP22 деполимеразной активности в отношении к экзополисахаридам, секретлируемым бактериальными клетками *A. baumannii*. Действительно, уже с первой минуты совместной инкубации *A. baumannii* с бактериофагами практически все бактериальные клетки адсорбируются на поверхность подложки поодиночке, по сравнению с контрольным образцом клеток *A. baumannii*, где они располагаются в виде агрегатов, окруженных слоем внеклеточного матрикса.

Заключение. Применение АСМ к изучению бактериофагов и их взаимодействия с бактериальными клетками позволяет не только получить качественную информацию о специфичности данного фага, но и количественно охарактеризовать такое взаимодействие, например, измерить морфологические параметры фага и клетки, поверхностную плотность адсорбции бактериофага, оценить продолжительность разных стадий литического цикла. Высокое пространственное разрешение АСМ наряду с возможностью проведения относительно быстрого анализа бактериофага делает её перспективной для широкого применения в исследованиях бактериофагов.

Работа поддержана программой грантов Президента РФ для молодых учёных (МК-312.2013.2).

Библиографический список

1. Bes, M. Morphology of *Staphylococcus saprophyticus* bacteriophages / M. Bes, H.-W. Ackermann, Y. Brun, J. Fleurette. // Research in Virology. – 1990. – V. 141. – P. 625–635.
2. Yele, A.B. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm / A.B. Yele, N.D. Thawal, P.K. Sahu, B.A. Chopade. // Archives of Virology. – 2012. – V. 157. – P. 1441–1450.
3. Dorobantu, L.S. Atomic force microscopy: A nanoscopic view of microbial cell surfaces /

L.S. Dorobantu, G.G. Goss, R.E. Burrell // *Micron*. – 2012. – V. 43. – P. 1312–1322.

4. Popova, A.V. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* / A.V. Popova, E.L. Zhilenkov, V.P. Myakinina, V.M. Krasilnikova, N.V. Volozhantsev // *FEMS Microbiology Letters*. – 2012. – V. 332, – P.40–46.

5. Дубровин, Е.В. Изучение особенностей адгезии вируса табачной мозаики методом атомно-силовой микроскопии / Е.В. Дубровин, М.Н. Кирикова, В.К. Новиков, Ю.Ф. Дрыгин, И.В. Яминский // *Коллоидный журнал*. – 2004. – Т.66. – С. 750-755.

6. Wendt, C. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces / C. Wendt, B. Dietz, E. Dietz, H. Ruden // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1997. – V. 35. – P. 1394–1397.

UTILIZATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR PHAGE INFECTION STUDY

*Dubrovin E.V., Popova A.V., Kraevskiy S.V., Ignatov S.V., Yaminsky I.V.,
Volozhantsev N.V.*

Key words: *Atomic force microscopy, bacteriophages, Acinetobacter baumannii*

The study is devoted to the development of atomic force microscopy for application in bacteriophages research on the example of bacteriophage AP22 to A. baumannii.