

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.12.090>

УДК 578.81+57.083.33

Л.А. Максименко, Л.В. Романюк

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев
E-mail: Maksimenko_L_A@mail.ru

Связь серологического родства белков с адсорбцией частиц бактериоцина *Pectobacterium carotovorum* J2 и бактериофага ZF40

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Ф.И.Товкачем)

*Методом иммуноблотинга с использованием кроличьей антисыворотки выявлены серологически родственные белковые компоненты в составе макромолекулярных каротоворицинов типа фаговых хвостовых отростков (MCTV/J2) и бактериофага ZF40 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Эти компоненты могут быть фактором узнавания общих сайтов связывания с бактериальной клеткой. Показана конкуренция при адсорбции на индикаторном штамме RC 5297 в условиях смешанной инфекции фага ZF40 и MCTV/J2.*

Ключевые слова: макромолекулярные каротоворицины (MCTV), *Pectobacterium carotovorum*, бактериофаг ZF40, белки, серологическое родство.

Известно, что все три составляющие бактериальных липополисахаридов (ЛПС) — липид А, кор и О-специфическая полисахаридная цепь, могут быть рецепторами для бактериофагов и бактериоцинов [1]. Потеря боковых цепей ЛПС или части наружной мембраны бактериальной клетки приводят к утрате этих рецепторов.

Ранее исследования морфологии частиц макромолекулярных каротоворицинов (MCTV) показали, что их структура подобна хвостовому отростку бактериофагов семейства Myoviridae [2, 3]. У нового умеренного бактериофага *Pectobacterium carotovorum* — ZF40 наряду с морфологическими свойствами анализ сиквенса генома показал, что он является типичным представителем бактериофагов семейства Myoviridae (морфотип А1) [4, 5]. В литературе имеются сведения о генетическом родстве бактериоцинов и бактериофагов [6]. Известно, что макромолекулярные бактериоцины начинают реализовывать свойственную им киллерную активность благодаря прикреплению к рецепторам на клеточной стенке бактерий и разрушению оболочки клетки [7]. Бактериофаги, в отличие от бактериоцинов, вводят в клетку собственную ДНК и воспроизводят свою популяцию. Для лизиса одной бактерии фактически необходима лишь одна частица бактериофага, тогда как для разрушения такой бактерии бактериоцинами их количество должно быть значительно большим [7].

Целью исследования было определить родство между белковыми компонентами MCTV/J₂ и бактериофага ZF40, а также способность макромолекулярных бактериоцинов и бактериофага ZF40 осуществлять конкуренцию за сайты связывания на чувствительной культуре в условиях смешанной инфекции *in vitro*.

Для выделения MCTV/J₂ использовали бактерии *P. carotovorum*. Киллерную активность бактериофага ZF40 и MCTV определяли с помощью популяционных диссоциантов RC 5297 и RC 5195. Диссоциант RC 5195 не способен к адсорбции бактериофага ZF40, тогда как бактерии RC 5297 адсорбируют как бактериоцины типа фаговых хвостовых отростков, так и бактериофаг ZF40 (рис. 1).

Индукцию бактериоцинов проводили как описано в [8]. Частицы MCTV осаждали 50 % сульфата аммония в присутствии 0,1 М NaCl. От примеси нуклеиновых кислот избавлялись с помощью РНКазы и ДНКазы. Смесь бактериоцинов разделяли в сахарозном градиенте (5–20 %), содержащем 20 % спирта, в 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 7,2, при 30000 об./мин в течение 4 ч. Дальнейшую очистку MCTV проводили с помощью колонки с ДЕАЕ сефарозой.

Частицы бактериофага ZF40 получали методом слитного лизиса [9]. Далее к ним была получена кроличья антисыворотка как описано в [10]. Смесь бактериоцинов в концентрации 1 мг/мл была обработана сывороткой, преципитат центрифугировали и полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ *трис*-HCl буфере, pH 7,2, содержащем 0,5 М NaCl для избавления от неспецифических примесей. Полученные препараты наносили на коллоидные сеточки и контрастировали 2 % уранилацетатом. Для электронномикроскопических исследований использовали микроскоп JEOL 1400.

Иммуноблоттинг белков осуществляли по Н. Towbin с соавт. [11]. После электрофоретического разделения в ПААГ белковые фрагменты переносили на нитроцеллюлозный фильтр Schleicher & Schull с размером пор 0,45 мкм. Свободные места связывания на нитроцеллюлозе блокировали 1 % раствором БСА в 20 мМ *трис*-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,5 М NaCl. Затем фильтр помещали в сыворотку, полученную к ZF40, и выдерживали в течение 12 ч при комнатной температуре и постоянном встряхивании. После этого нитроцеллюлозу пятикратно промывали в буфере без антител, фильтры погружали в 20 мМ *трис*-HCl буфер, pH 7,5, содержащий 0,5 М NaCl, 1 % БСА и конъюгат “второго” антитела против иммуноглобулинов кролика, меченого фосфатазой “Sigma” No A2556. Через 2 ч фильтры промывали в 20 мМ *трис*-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,14 М NaCl, затем их помещали в раствор бензидина в вышеуказанном буфере и 0,03 % H₂O₂. Серологически родственные белки проявлялись через 10–20 мин. Для остановки реакции фильтры помещали в воду. В качестве контроля в иммунохимической реакции использовали полипептиды бактериофага T4.

Ранее нами с помощью антисыворотки, полученной к MCTV/J₂, методом Оухтерлони выявлены серологически родственные белки в каротоворицинах: MCTV/2М, MCTV/62А и

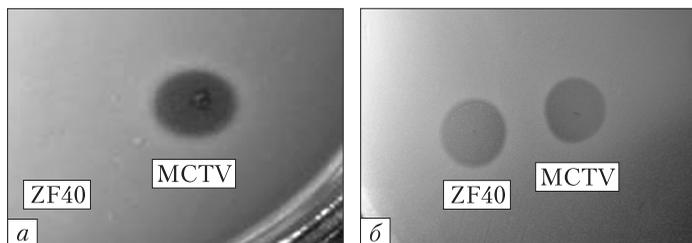


Рис. 1. Киллерная активность ZF40 и MCTV/J₂ относительно штамма RC5195 (а) и RC 5297 (б)

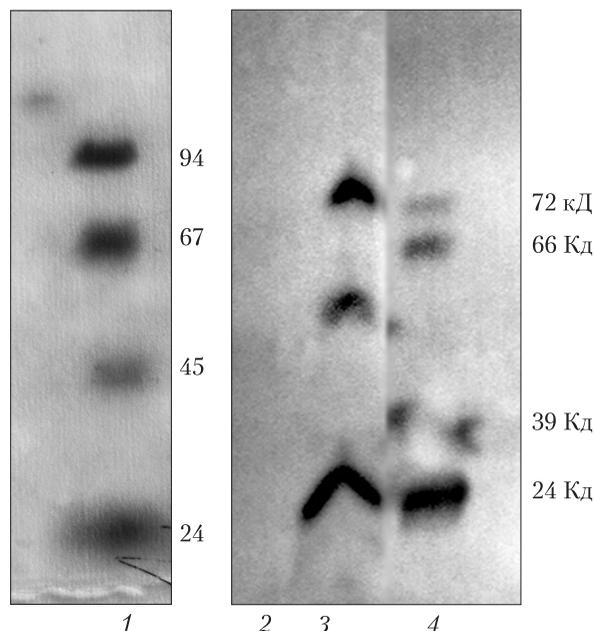


Рис. 2. Иммуноблотинг белковых компонентов МСТV/J2 и бактериофага ZF40 с использованием антисыворотки, полученной к белкам ZF40: 1 – маркеры; 2, 3 – бактериофаги T4 и ZF40 соответственно; 4 – МСТV/J2

МСТV/153, а также показано серологическое родство некоторых из них у бактериоцинов и бактериофага ZF40. Антисыворотка нейтрализует киллерную активность бактериоцинов, выделенных из *P. carotovorum* различных экологических ниш [10].

С использованием антисыворотки, полученной к структурным белкам бактериофага ZF40, методом иммуноблотинга выявлены серологически родственные белки в составе смеси МСТV/J2 и бактериофага ZF40 с молекулярной массой 72, 66, 39 и 24 кД (рис. 2).

При использовании антисыворотки к бактериофагу ZF40 в составе бактериофага T4 серологически родственных белков не обнаружено. Выявлено серологическое родство белков МСТV и ZF40.

Известно, что у бактериофагов T4, PS17, ZF40, а также у МСТV основные структурные белки хвостовых отростков имеют соответственно следующие значения молекулярной массы: белок футляра – 71, 40, 31, 50 кД, внутренний белок стержня – 19–20 кД и белки фибрилл – 56, 72, 76, 78 кД у бактериофагов [9] и 68, 72, 78 кД у бактериоцинов [12]. Скорее всего, белки фибрилл определяют специфичность адсорбции каротоворицинов. Общими выявленными нами белками фибрилл для исследуемых частиц являются белки с молекулярной массой 66 и 72 кД.

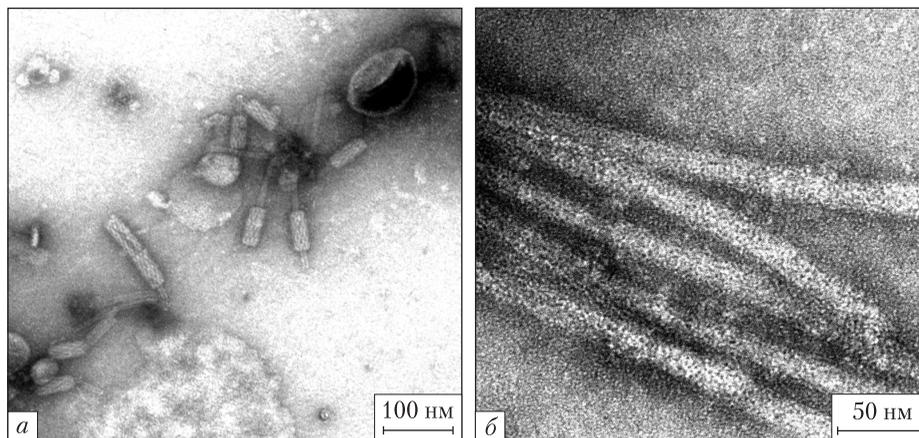
Как было показано ранее, при обработке смеси частиц бактериоцинов антисывороткой, полученной к МСТV, они утрачивают киллерную активность. Лизирующая активность бактериофага ZF40, обработанного антисывороткой, полученной к МСТV, существенно снижается [10].

Обработка образцов МСТV/J2 антисывороткой, полученной к бактериофагу ZF40, приводит к агрегации частиц бактериоцинов (рис. 3). Причину образования агрегата мы пока достоверно объяснить не можем. Вероятно, содержащиеся в МСТV/J2 белковые компоненты, родственные таковым в составе бактериофага ZF40, связываются с антителами,

Таблица 1. Выживаемость клеток RC 5297 при адсорбции препаратами фага ZF40 и МСТV/J2

Штамм/фаг/МСТV/ смесь фага и МСТV	Титр клеток (КОЕ) после адсорбции (15 мин)	Кол-во выживших клеток, %	Единицы летальной дозы (LD ₃₇)
RC 5297	$1,7 \cdot 10^8$	100	—
ZF40	$4,0 \cdot 10^7$	23,5	1,4
МСТV/J2	$2,0 \cdot 10^7$	12	2,1
ZF40 + МСТV/J2	$2,0 \cdot 10^6$	1,2	4,4

Рис. 3. Электронная микроскопия частиц МСТV/J2: *а* – частицы МСТV, не обработанные антисывороткой; *б* – агрегаты частиц МСТV после обработки их антисывороткой, полученной к бактериофагу ZF40



полученными к белкам бактериофага. Возможно наличие и других причин появления таких агрегатов. Эта агрегация частиц может приводить к утрате киллерных свойств МСТV.

Таким образом, в результате проведенных исследований в составе МСТV/J2 и бактериофага ZF40 обнаружены серологически родственные белковые компоненты с помощью антисывороток, полученных как к МСТV [10], так и к бактериофагу ZF40. Эти компоненты могут быть факторами узнавания общих сайтов связывания с бактериальной клеткой.

Для доказательства этого предположения исследовали выживаемость клеток RC 5297 при смешанной инфекции (табл.1).

Количественные показатели киллерной активности выражали через величину $KA = -\ln B/B_0$, где B/B_0 – выживаемость бактерий, B_0 – исходная концентрация клеток, B – концентрация клеток после влияния бактериоцина или бактериофага. В этом случае единица активности соответствует 37 % выживания – LD_{37} , или e^{-1} [13]. В эксперименте множественность инфекции фага составляла >1 , объемная концентрация бактериоцина (v/v) – 0,5.

Критерием служили выжившие бактериальные клетки после инкубации с фагом, бактериоцином, а также смесью ZF40 и МСТV/J2 соответственно (см. табл.1). При этом наблюдали увеличение летальной дозы при адсорбции смеси фага и каротоворицина в 4 раза по сравнению с адсорбцией только фагом и в 2 раза по сравнению с МСТV/J2. Возможно, такие низкие показатели количества выживших клеток индикаторного штамма при совместном заражении фагом и бактериоцином указывают на общие рецепторы прикрепления на клеточной оболочке бактерий.

Для определения наличия конкуренции за сайты связывания при совместном заражении было подсчитано количество неадсорбированного фага при адсорбции его на натив-

Таблица 2. Показатели адсорбции фага ZF40 при совместном заражении с МСТV/J2 клеток RC 5297

Фаг/бактериоцин	Время адсорбции, мин	Титр фага БОЕ/мл		Количество неадсорбированного фага, %
		P_0	P	
ZF40	15	$6,2 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^7$	13,1
ZF40 + МСТV/J2	15	$6,2 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	25,8

Примечание. P_0 – начальный титр фага, P – титр фага после завершения инфекции.

ных клетках бактерий. В результате проведенных экспериментов был обнаружен факт совместимости рецепторов штамма RC 5297 для бактериофага ZF40 и MCTV/J2 (табл.2).

Согласно данным [14] скорость адсорбции частиц бактериоцина на нативных клетках — очень стремительный процесс. Уже за первые 2 мин адсорбируется основное количество частиц. В результате исследований установлено, что в случае совместного заражения клеток фагом ZF40 и бактериоцином J2 количество неадсорбированного фага в 2 раза превышает количество фаговых частиц при моноинфекции. Данные табл. 2 подтверждают наличие общих сайтов связывания фага и бактериоцина на чувствительной бактерии.

Таким образом, адсорбционная способность фага ZF40 и MCTV/J2 коррелирует с наличием серологически родственных белков в составе их частиц.

Авторы выражают благодарность С.А. Войчуку за получение электронномикроскопических снимков.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Beumer J., Hannecart-Pocorni E., Godard C.* Bacteriophage receptors // *Bull. Inst. Pasteur.* — 1984. — **82**, No 3. — P. 173–253.
2. *Daw M.A., Falkiner F.R.* Bacteriocins: nature, function and structure // *Micron.* — 1996.— **27**, No 6. — P. 461–479.
3. *Smarda J., Benada O.* Phage tail-like (high-molecular-weight) bacteriocins of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* (Enterobacteriaceae) // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — **71**, No 12. — P. 8970–8973.
4. *Товкач Ф.И.* Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // *Микробиология.* — 2002. — **71**, № 1. — С. 75–81.
5. *Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., Krisch H.M., Ackermann H.W.* Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses // *PLoS ONE.* — 2012. — **7**, No 7. — 40102.
6. *Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H., Hayashi T.* The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage // *Mol. Microbiol.* — 2000. — **38**, No 2. — P. 213–231.
7. *Товкач Ф.И.* Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // *Микробиология.* — 1998. — **67**, № 6. — С. 767–774.
8. *Товкач Ф.И.* Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // *Микробиология.* — 2002.— **71**, № 3. — 359–367.
9. *Паницина А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А.* Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // *Мікробіол. журн.* — 2007.— **69**, № 2. — С. 15–22.
10. *Максименко Л.А., Товкач Ф.И.* Серологическое родство белков бактериоцинов *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF-40 // *Доп. НАН України.* — 2012. — № 7. — С. 158–163.
11. *Towbin H., Stalhelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1979. — **76**, No 9. — P. 4350–4354.
12. *Товкач Ф.И., Максименко Л.А.* Полипептидный состав и киллерная специфичность как показатели множественности каротоворицинов // *Мікробіол. журн.* — 2010. — **72**, № 5. — С. 41–48.
13. *Maeda A., Nomura M.* Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins // *J. Bacteriol.* — 1966. — **91**, No 2. — P. 685–694.
14. *Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Гвоздяк Р.И.* Изучение адсорбционных рецепторов макромолекулярных бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // *Мікробіол. журн.* — 2001. — **63**, № 1. — С.23–33.

REFERENCES

1. *Beumer J., Hannecart-Pocorni E., Godard C.* *Bull. Inst. Pasteur*, 1984, **82**, No 3: 173-253.
2. *Daw M.A., Falkiner F.R.* *Micron*, 1996, **27**, No 6: 461-479.
3. *Smarda J., Benada O.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, No 12: 8970-8973.
4. *Tovkach F.I.* *Microbiology*, 2002, **71**, No 1: 75-81 (in Russian).
5. *Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., Krisch H.M., Ackermann H.W.* *PLoS ONE*, 2012, **7**, No 7: 40102.

6. Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H., Hayashi T. Mol. Microbiol., 2000, **38**, No 2: 213-231.
7. Tovkach F.I. Microbiology, 1998, **67**, No 6: 767-774 (in Russian).
8. Tovkach F.I. Microbiology, 2002, **71**, No 3: 359-367 (in Russian).
9. Panshchina A.I., Tovkach F.I., Romaniuk L.V., Maksymenko L.A. Mikrobiol. Zhurn., 2007, **69**, No 2: 15-22 (in Russian).
10. Maksymenko L.A., Tovkach F.I. Dopov. NAN Ukraine, 2012, No 7: 158-163 (in Russian).
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, **76**, No 9: 4350-4354.
12. Tovkach F.I., Maksymenko L.A. Mikrobiol. Zhurn., 2010, **72**, No 5: 41-48 (in Russian).
13. Maeda A., Nomura M. J. Bacteriol., 1966, **91**, No 2: 685-694.
14. Tovkach F.I., Moroz S.N., Gvozdyak R.I. Mikrobiol. Zhurn., 2001, **63**, No 1: 23-33 (in Russian).

Поступило в редакцию 07.06.2016

Л.О. Максименко, Л.В. Романюк

Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: Maksimenko_L_A@mail.ru

**ЗВ'ЯЗОК СЕРОЛОГІЧНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ БІЛКІВ
З АДСОРБЦІЄЮ ЧАСТОК БАКТЕРІОЦИНУ
PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM J2 І БАКТЕРІОФАГА ZF40**

Методом імуноблотингу з використанням кролячої антисироватки виявлено серологічно споріднені білкові компоненти у складі макромолекулярних каротоворичинів типу фагових хвостових відростків (MCTV/J2) і бактеріофага ZF40 Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum. Ці компоненти можуть бути фактором впізнавання спільних сайтів зв'язування з бактеріальною клітиною. Показано конкуренцію при адсорбції на індикаторному штамі RC 5297 в умовах змішаної інфекції фага ZF40 і MCTV/J2.

Ключові слова: макромолекулярні каротоворичини (MCTV), Pectobacterium carotovorum, бактеріофаг ZF40, білки, серологічна спорідненість.

L.A. Maksymenko, L.V. Romaniuk

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: Maksimenko_L_A@mail.ru

**THE RELATION BETWEEN THE SEROLOGICAL SIMILARITY
OF PROTEINS AND THE ADSORPTION OF PARTICLES OF
PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM J2 BACTERIOCINS AND BACTERIOPHAGE ZF40**

Immunoblot analysis with rabbit antiserum has revealed serologically related protein components in the structure of phage tail-like macromolecular carotovoricins (MCTV/J2) and bacteriophage ZF40 Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum. These components may act as recognition factors for the common binding sites on the bacterial surface. A competition for the adsorption sites between the phage ZF40 and MCTV/J2 is demonstrated under the conditions of mixed infection.

Keywords: macromolecular carotovoricins (MCTV), Pectobacterium carotovorum, bacteriophage ZF40, proteins, serological similarity.