

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ *PROTEUS SPP.*, *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, *ENTEROBACTER SPP.*

Масиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сульдина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

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

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: праймеры, полимеразно-цепная реакция, подбор, бактериофаги, *Proteus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter*.

В статье представлены результаты экспериментов по индикации выделенных и селекционированных бактериофагов, специфичных в отношении *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* с помощью аннотированных праймеров методом постановки ПЦР. Ввиду полученного отрицательного результата на данном этапе нами были разработаны более специфичные системы для их молекулярно-генетической идентификации с учетом проведенного секвенирования геномов. Были определены специфические фрагменты геномов *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* и *Proteusphage* – ген терминазы. Проведено сравнение с аннотированными аналогами в базе NCBI (GenBank) и построено филогенетическое древо каждого из них. В системе Blast были определены специфичные праймеры для индикации и идентификации *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* и *Proteusphage*.

Для индикации *Yersiniaphage* (ген терминазы) определена пара праймеров TCCGTTGGGGGATAAACAСТ и TTGCTACTGCAGGGTCATCT, отвечающая оптимальным условиям: GC не более 50 %, температура плавления ≈ 58,6 °С, длина ампликона 330 п.н., длина праймеров 20 п.н. Подобраны праймеры GTTCGGTATTTCCCGGGTT и TCTGTTACTCGTGTGCCACC для индикации *Proteusphage* (ген терминазы), имеющие следующие характеристики: GC не более 55 %, температура плавления ≈ 59,9 °С, длина ампликона 333 п.н., длина праймеров 20 п.н. Установлены праймеры CCGTACACCGCAATTGGAA и ATAACCTTCTTCAGCCGCCC для индикации *Enterobacterphage* (ген терминазы), характеризующиеся следующими показателями: GC не более 55 %, температура плавления ≈ 60 °С, длина ампликона 690 п.н., длина праймеров 20 п.н. Получены результаты, подтверждающие специфическую работу праймерных систем.

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

Введение

По литературным данным в конце 1990-х годов было распространено мнение, что геномы всех фагов являются полностью мозаичными и группировка сколько-нибудь удаленных вирусов практически невозможна, то с начала 2000-х становится ясно, что большинство вирулентных фагов обладают так называемым геномным кором – характерным набором генов, сравнительно мало подвергающихся латеральному переносу [1]. Это позволяет выделять естественные группы бактериофагов (T4-подобные, ϕHKZ-подобные, T7-подобные и т. д.), многие из которых признаны международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) как роды [2, 3]. Многие биологические свойства фагов оказываются общими для всех представителей рода или группы внутри рода, поэтому идентификация близ-

кого или даже среднего родства кандидатного фага известному опорному изоляту, хорошо изученному биологически и с известным геномом, позволяет достаточно надежно прогнозировать многие свойства, в том числе вирулентный характер вируса [4]. В большинстве случаев отнесение нового фагового изолята к известной группе возможно на основании морфологических критериев с подтверждением частичного секвенирования участков генома [5, 6]. Однако для массового скрининга бактериофагов при их выделении и селекции он не является основным. В данном случае оптимальными будут являться амплификационные методы, в том числе полимеразно-цепная реакция (ПЦР) [7-10].

Цель исследований - определение размеров нуклеиновых кислот фагов и подбор праймеров для амплификации фрагментов геномов

бактериофагов, специфичных в отношении *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*

Объекты и методы исследований

Объект исследования – бактериофаг *Pr* – 6 УГСХА, выделенный в 2017 году коллективом авторов из объектов внешней среды, имеющий следующие характеристики – диаметр бляшкообразующих единиц – $0,5 \pm 0,1$ мм, титр по Грация – $1,3 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, титр по Аппельману – 10^8 , устойчив к воздействию трихлорметана в течение 15 минут и специфичен для культур *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, выделенных из патологического материала и объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям в 2016–2017 гг. Индикаторная культура *Pr. vulgaris* 28 обладает типичными для вида характеристиками [11–13]. Бактериофаг Е4, выделенный в 2017 году коллективом авторов из объектов внешней среды, имеющий следующие характеристики – бляшкообразующие единицы округлые, прозрачные, без зон неполного лизиса, до 3–4 мм в диаметре. Литическая активность фага составляет $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл по Грация и 10^9 по Аппельману. Диапазон литической активности более 80 %. Бактериофаг специфичен по отношению к гомологичным бактериям рода *Enterobacter*, устойчив к воздействию температуры до 65 °С и трихлорметану в течение 40 минут. Индикаторная культура *Enterobacter cloacae* 1 обладает типичными для вида характеристиками [14]. Бактериофаг Ye3-f2, выделенный в 2017 году коллективом авторов из объектов внешней среды, которому характерны бляшкообразующие единицы диаметром 1,0–1,5, прозрачные, без зоны неполного лизиса; литическая активность $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл по Грация и 10^9 по Аппельману. Спектр литического действия – 85 % на 34 культурах вида *Y. enterocolitica*. Фаг Ye3-f2 обладает умеренной устойчивостью к воздействию температуры и хлороформа. Индикаторная культура *Yersinia enterocolitica* Ye-3 обладает типичными для вида характеристиками [15]. Также в работе были использованы бактериофаги *Pr* – 4, Е6, Е7, Ye5-f2 серии УГСХА, выделенные коллективом из объектов внешней среды ранее [11–15].

Материалы: 5-кратный раствор с ксиленицианолом, 7,5 мМ MgCl₂ (ООО «Интерлабсервис», Кат. № 861), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ). Водный раствор дезокси-нуклеозидтрифосфатов с концентрацией 1,76 мМ каждого (ООО «Интерлабсервис», Кат. № R3-1), смесь типоспецифических праймеров по 10 пкМ каждого (НПФ «Литех», Москва); Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл) (Promega, USA, Cat. № M5001), агароза («Хеликон» LOT 2308B504); трис-HCl («Amresco», Cat. № Am-O234-0.5), три-

тон X-100 («Amresco», Cat. № Am-O694-1.0), борная кислота Хеликон (Кат. № H-0202-0.5, (о.с.ч.), ЭДТА-Na («Amresco», Cat. № Am-O105-0.1), NaCl («Хеликон» H-1401-1.0 (х.ч.), 0,1%-й бромид этидия («Amresco», Cat. № Am-O492-1.0), маркер молекулярного веса (ООО «Интерлабсервис», Кат. № MDNA-100bp), набор для очистки ДНК от агарозного геля («QIAquick Gel Extraction», QIAGEN, Германия), набор для секвенирования, набор для выделения ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Москва), микроцентрифуга на 12000 об/мин для пробирок объемом 1,5 мл и 0,5 мл (Eppendorf Minispin, Германия), автоматические пипеточные дозаторы на 20 мкл, 100 мкл и 1000 мкл (ThermoScientific), полипропиленовые пробирки на 0,2 мл, 0,5 мл и 1,5 мл (Axygen, США), сменные наконечники к автоматическим пипеточным дозаторам (Axygen, США), амплификатор для проведения ПЦР («MaxyGene», AXYGEN Scientific, США), смеситель «Vortex» (Biosan, Латвия), твердотельный термостат (Термит, ДНК Технология, Москва), фильтрующие насадки Миллекс 0,22 мкм (PVDF) (Millipore, Ирландия), генетический анализатор («Applied Biosystems 3130XL», Applied Biosystems, США), набор компонентов для очистки сиквенсовой смеси («BigDye Terminator kit 3.1», Applied Biosystem, США), амплификатор «T100» («BioRad, USA»).

Методы. Для наращивания титра бактериофагов бактериальную культуру выращивали в течение ночи в среде LB, 10 мкл этой культуры переносили в 10 мл LB и инкубировали при 37 °С в орбитальном шейкере со скоростью 150 об/мин до оптической плотности (OD, $\lambda=695$), равной 0,2. Далее, 300 микролитров этой культуры добавляли к 100 мкл вирусного материала ($\sim 10^6$ бляшкообразующая единица (БОЕ) / мл). Вирусным частицам позволяли адсорбироваться на клетках-хозяевах в течение 15 мин при комнатной температуре, затем зараженные клетки добавляли к 3 мл расплавленного полужидкого агара в пробирку, содержимое которой тщательно перемешивали перед тем, как вылить его на питательный агар, после чего содержимому чашки давали застыть и помещали в термостат на сутки при 37 °С. Верхний слой полужидкого агара с полностью лизированной культурой соскабливали и собирали в колбу емкостью 250 мл. Добавляли 40 мл буфера SM и хорошо перемешивали, затем инкубировали в течение ночи при 10° С, чтобы позволить вирусным частицам диффундировать из полужидкого агара в буфер. Пробирку центрифугировали при 250 g в течение 25 мин, а затем супернатант переносили в свежую пробирку. Супернатант фильтровали через 0,45 мкм, а затем через фильтр Millipore 0,22 мкм, чтобы обеспечить удаление агара и клеточных остатков. Отфильтрованные частицы бактериофага использовали для выделения фаговой ДНК.

Выделение ДНК. Геномную фаговую ДНК выделяли при помощи коммерческого набора «ДНК-СОРБ-Б» (ЗАО «Интерлабсервис») для выделения общей ДНК согласно инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция. Для выявления ДНК бактериофагов использовали метод ПЦР [10] с применением типоспецифических праймеров (табл. 1-2).

Учет и интерпретация результатов. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) специфической полосы, соответствующей размеру специфического гена или его участка. Результаты считали достоверными только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации.

Анализ участков нуклеиновых кислот и подбор специфических праймеров. Уникальность последовательностей устанавливали на основе статистической значимости совпадений нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования на более раннем этапе данного проекта. Дополнительный анализ последовательностей проводили с помощью выравнивания, используя программу ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

Результаты исследований

Выявление консервативных участков генома, содержащих гены белков капсида или фаговых нуклеаз.

Геномные последовательности фагов сравнивались детально между собой для выявления консервативных участков, наиболее подходящих для подбора праймеров. Наиболее подходящими оказались гены минорного хвостового белка L7, консервативного гипотетического белка капсида; мажорного белка капсида и ген ДНК-хеликазы структуры Холлидея. При помощи специальных компьютерных программ были рассчитаны последовательности праймеров (табл. 1-2). Также в работе использовали праймеры М. Moisan (2012), которые были подобраны на различные субъединицы терминаз, мажорные капсидные и хвостовые белки, ген эндолизина и другие.

Каждую реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК, по 20 пкмоль праймеров, 200 мкМ каждого dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,8) и 1,25 единицы активности Taq-полимеразы. ДНК денатурировали при 94 °C в течение 3 мин. Затем проводили 35 циклов, включающих денатурацию ДНК при 94 °C в течение 15 сек, отжиг праймеров при температуре 52 °C в течение 30 сек и элонгацию в течение 1 мин. Заключительный этап элонгации проводили при 72 °C в течение 5 мин.

Таблица 1
Последовательности праймеров для амплификации фрагмента гена *hypothetical protein* фагов

Primer ID	Sequence(5'-3')	Length (bp)	Tm(°C)
F1__C2	TGTCATTTCAGGCAGAACTGG	20	55,2
F2__C2	GCGTTCTAAGCAATGCTAGGGA	22	57,3
F3__C2	AGAAACACAGAGAGCCTTAAACC	23	55
R1__C2	AACTGACTTTCTAATGCCTGCAC	23	55,7
R2__C2	ATCTTAGCGTTCGCAAGTGC	20	56,1
R3__C2	AGCAAGGTTTAAGGCTCTCTGTG	23	57,2
F1__B	TTCATGGATAATTTATCACGAAC	23	49
R1__B	CGCTTAAGTGATTTTTAGTGAAC	24	51,1
F1_PODO	CGTTTGTGASCGATAATRRGCTTG	24	56,6
R1_PODO	AATCGGGTTGGCTRGTTTGG	20	59,2

Таблица 2
Последовательности праймеров для амплификации фрагментов генов *large terminase subunit*, *major capsid protein*, *tail protein* и *membrane protein* фагов

Primer ID	Sequence(5'-3')	Length (bp)	Tm (°C)
terS-F	TAAGATGTAYGAAGAACCGC	20	50.9
terS-R	TTAAGGTCATKAGCGCTTG	19	51.4
mcp-F	GCAAACTTGCTGAAAATGG	20	51.0
mcp-R	CTCATCTAACAAGGCTTTACG	21	51.0
mtp-F	TARCTGGTTTAGTATCRGTTGG	22	51.9
mtp-R	ACTGAWTCTGTTTCTGATTCTT	22	49.7
tmp-F	AAYTTACAAACGCAGTTGG	19	50.0
tmp-R	CAAAYGCTTGGTTAGCTTTTA	21	50.5

Результаты амплификации ДНК фагов с праймерами terS-F/ terS-R, 8F-924R, F1_C2-R1_C2, F1_Podo-R1_Podo дали положительные результаты с образованием ПЦР-продуктов ожидаемой длины (рис. 1-2).

После проведенных экспериментов по индикации выделенных и селекционированных бактериофагов, специфичных в отношении *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, с помощью аннотированных праймеров методом постановки ПЦР мы не добились удовлетворительных результатов специфичности их работы в отношении выделенных на ранних этапах данного проекта бактериофагов. Исходя из этого, нами были разработаны более специфичные системы для их молекулярно-генетической идентификации с учетом проведенного нами секвенирования геномов.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генома фагов изучаемых бактерий.

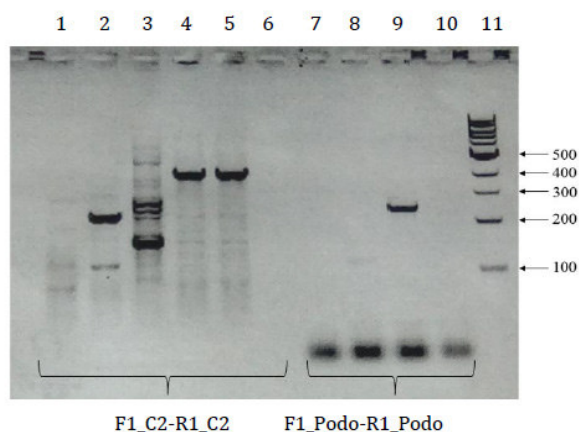


Рис. 1 - Результаты амплификации с парами праймеров F1_C2-R1_C2, F1_Podo-R1_Podo: 1 - Pr – 6 УГСХА; 2 - E4; 3 - Ye3-f2; 4 - Pr – 4; 5 – положительный контроль; 6 – отрицательный контроль; 7 – отрицательный контроль; 8 – E4; 9 – Ye3-f2; 10 – положительный контроль; 11 – маркер

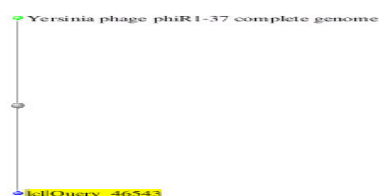


Рис. 3 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности образца Yersinia phage (после синтеза олигонуклеотидных праймеров) с гомологичными известными последовательностями генов в базе данных GeneBank

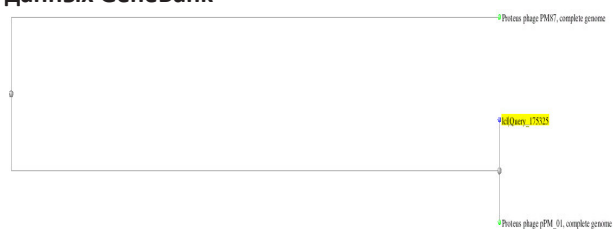


Рис. 4 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности образца Proteusphage (ген терминазы) с гомологичными известными последовательностями генов в базе данных GeneBank

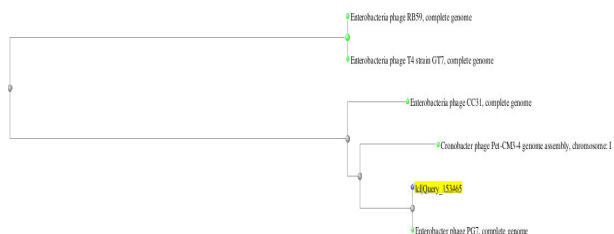


Рис. 5 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности образца Enterobacterphage (ген терминазы) с гомологичными известными последовательностями генов в базе данных GeneBank

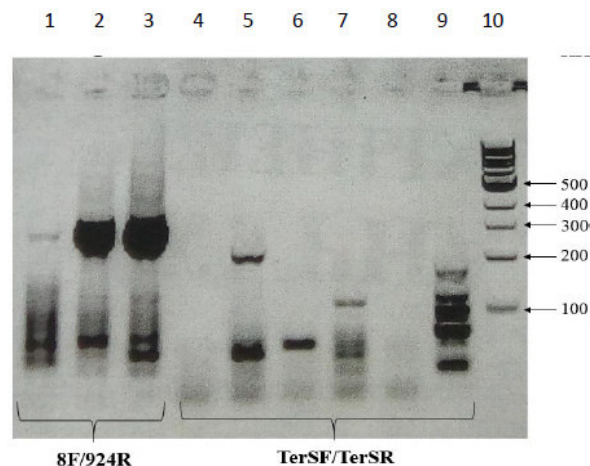


Рис. 2 - Результаты амплификации с парами праймеров 8F/924R, TerSF/TerSR: 1 – отрицательный контроль; 2 – E4; 3 – положительный контроль; 4 – отрицательный контроль; 5 - Pr – 4 УГСХА; 6 – E4; 7 – Ye3-f2; 8 - Pr – 6; 9 – положительный контроль; 10 – маркер

Сначала была определена последовательность гена терминазы у каждого из выделенных и селекционированных бактериофагов, специфичных в отношении *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* Затем были установлены ближайшие гомологи в базах данных GeneBank и построено филогенетическое дерево Yersiniaphage, Enterobacterphage и Proteusphage (рис. 3-5). После этого в системе Blast были определены праймеры и их основные характеристики (табл. 3-5). После подбора праймерных систем к участку гена терминазы одной из первоочередных задач было определение их работоспособности на пробах, содержащих экстагированную ДНК вышеуказанных культур. Для этого необходимо было провести цикл экспериментов с применением метода полимеразной цепной реакции с последующей детекцией методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Результаты представлены на рисунках 6-8.

В результате проведенных исследований были определены специфические фрагменты геномов, выделенных и селекционированных Yersiniaphage, Enterobacterphage и Proteusphage – ген терминазы. Проведено сравнение с аннотированными аналогами в базе NCBI (GenBank) и построено филогенетическое дерево каждого из них. В системе Blast были определены специфичные праймеры для индикации и идентификации Yersiniaphage, Enterobacterphage и Proteusphage.

Выводы

Ввиду возможной стандартизации всех этапов работ и относительной быстроты (время исследования занимает 60-120 минут) нами предложено применение ПЦР для начального этапа выделения бактериофагов. Для этого были раз-

работаны системы ПЦР для быстрой индикации наличия в исследуемых пробах изучаемых культур бактериофагов.

Для индикации Yersiniaphage (ген терминазы) определена пара праймеров TCCGTTGGGGGATAAACACT и TTGCTACTGCAGGGTCATCT, отвечающая оптимальным условиям: GC не более 50 %, температура плавления $\approx 58,6$ °C, длина ампликона 330 п.н., длина праймеров 20 п.н. (табл. 3). Подобраны праймеры GTTCGGTATTTCCCGGGTT и TCTGTTACTCGTGTGCCACC для индикации Proteusphage (ген терминазы), имеющие следующие характеристики: GC не более 55 %, температу-

ра плавления $\approx 59,9$ °C, длина ампликона 333 п.н., длина праймеров 20 п.н. (табл. 4). Установлены праймеры CCGTACACCGCAATTGGAA и ATAACSTTCTTCAGCCGCC для индикации Enterobacterphage (ген терминазы), характеризующиеся следующими показателями: GC не более 55 %, температура плавления ≈ 60 °C, длина ампликона 690 п.н., длина праймеров 20 п.н. (табл. 5).

Нами были получены результаты, подтверждающие специфическую работу праймерных систем при постановке полимеразно-цепной реакции.

На основе метода полимеразной цепной реакции будет создана система быстрой индикации бактериофагов, которая позволит в течение 2-3 часов определять объекты как для последующего исследования выявленных фаговых штаммов, так и для дальнейшего выделения и накопления бактериофаговой массы.

Библиографический список

1. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
2. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. - 311 p.
3. Hanlon, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections / G.W. Hanlon // Int. J. Antimicrob. Agents. - 2007. - Vol.30. - P. 118-128.
4. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or surmesure / J.P. Pirnay, D. De Vos, G. Verbeken, M.

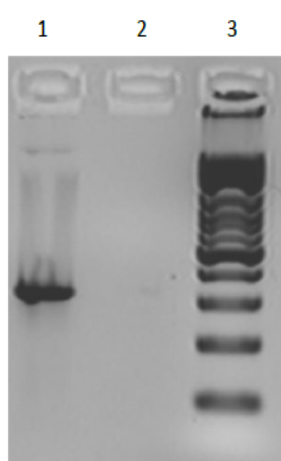


Рис. 6 - Результаты постановки ПЦР по индикации и идентификации Yersinia phage (ген терминазы): 1 – штамм Yersiniaphage, 2 – отрицательный контроль, 3 – маркер молекулярного веса

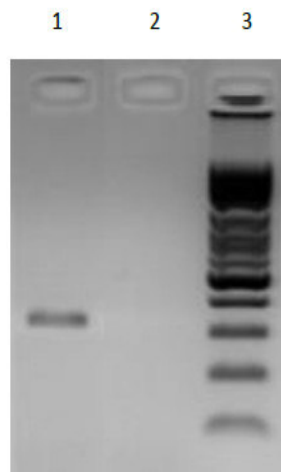


Рис. 7 - Результаты постановки ПЦР по индикации и идентификации Proteusphage (ген терминазы): 1 – штамм Proteusphage, 2 – отрицательный контроль, 3 – маркер молекулярного веса

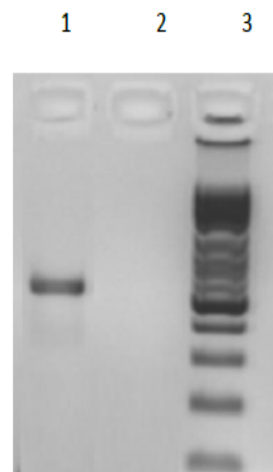


Рис. 8 - Результаты постановки ПЦР по индикации и идентификации Enterobacterphage (ген терминазы): 1 – штамм Enterobacterphage, 2 – отрицательный контроль, 3 – маркер молекулярного веса

Merabishvili, N. Chanishvili, M. Vaneechoutte, M. Zizi, G. Laire, R. Lavigne, I. Huys, G. Van den Mooter, A. Buckling, L. Debarbieux, F. Pouillot, J. Azeredo, F. Kutter, A. Dublanche, A. Górski, R. Adamia // Pharm. Res. - 2011. - Vol. 28. - P. 934-937.

5. Isolation and characterization of KP34 - anovel фKMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* / Z. Drulis-Kawa, P. Mackiewicz, A. Kesik-Szeloch, E. Maciaszczyk-Dziubinska, B. Weber-Dabrowska, A. Dorotkiewicz-Jach, D. Augustyniak, G. Majkowska-Skrobek, T. Bocor, J. Empel, A.M. Kropinski // Applied Microbiol. Biotechnol. - 2011. - Vol. 90. - P. 1333-1345.

6. Bernhardt, T.G. Genetic evidence that the bacteriophage fX174 lysis protein inhibits cell wall synthesis / T.G. Bernhardt, W.D. Roof, R. Young // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2000. - Vol. 97. - P. 4297-4302.

7. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters / H. Leclerc, S. Edberg, V. Pierzo, J.M. Delattre // J. Appl. Microb. - 2000. - Vol. 88. - P. 5-21.

8. Gill, J.J. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy / J.J. Gill, P. Hyman // Curr. Pharm. Biotechnol. - 2010. - Vol. 11. - P. 2-14.

9. Мирошников, К.А. Геномика и протеомика литических бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. дисс. ...докт. хим. наук: 03.01.04, 03.01.06 / Мирошников Константин Анатольевич. - Москва, 2013. - с.49

10. Легоцкий Сергей Александрович. Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и разработка способа эффективного лизиса грамотрицательных бактерий: автореф. дис. ... канд. биол.

наук : 03.01.04; 03.01.06 / Легоцкий, С.А. – Москва, 2016. –29 с.

11. Феоктистова, Н.А. Протеиновые 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.

12. 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.

13. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д.А. Ва-

сильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 70-76.

14. Сульдина, Е.В. Бактериофаги бактерий *Enterobacter* и их основные биологические свойства / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.И. Богданов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 4 (40). – С. 94-98.

15. Сульдина, Е.В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 3 (39). – С. 50-55.

DEVELOPMENT OF PCR SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF *PROTEUS SPP.*, *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, *ENTEROBACTER SPP* BACTERIOPHAGES

Mastilenko A.V., Suldina E.V., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novyy Venets Boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: primers, polymerase chain reaction, selection, *Proteus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* bacteriophages.

The article presents results of experiments on indication of isolated and selected bacteriophages specific to *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. using annotated primers by PCR method. Due to negative result obtained at this stage, we developed more specific systems for their molecular genetic identification, taking into account the sequencing of genomes. Specific fragments of the genomes *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* and *Proteusphage* - terminase gene were identified. Comparison with the annotated analogues in the NCBI database (GenBank) was made and a phylogenetic tree for each of them was constructed. Specific primers were identified for indication and identification of *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* and *Proteusphage* in the Blast system. For indication of *Yersiniaphage* (terminase gene), a pair of primers TCCGTTGGGGGATAAACAAC and TTGCTACTGCAGGGTCATCT was determined, corresponding to the appropriate conditions: GC not more than 50%, melting point $\approx 58.6^\circ\text{C}$, amplicon length 330 bps, primer length 20 bps. Primers GTTCGGTATTTCCCGGGTT and TCTGTACTCGTGTGCCACC were chosen for indication of *Proteusphage* (terminase gene) with the following characteristics: GC not more than 55%, melting point $\approx 59.9^\circ\text{C}$, amplicon length 333 bps, primer length 20 bps. Primers CCGTACACCGCAATTGGAA and ATAACCTTCTTCAGCGCCC were chosen for indication of *Enterobacterphage* (terminase gene), characterized by the following parameters: GC not more than 55%, melting point $\approx 60^\circ\text{C}$, length of amplicon 690 bps, length of primers 20 bps. The results confirming the specific work of primer systems are obtained.

Bibliography

1. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. - 510 p.
2. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. - 311 p.
3. Hanlon, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections / G.W. Hanlon // Int. J. Antimicrob. Agents. - 2007. - Vol.30. - P. 118-128.
4. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or surmesure / J.P. Pirnay, D. De Vos, G. Verbeken, M. Merabishvili, N. Chanishvili, M. Vaneechoutte, M. Zizi, G. Loire, R. Lavigne, I. Huys, G. Van den Mooter, A. Buckling, L. Debarbieux, F. Pouillot, J. Azeredo, F. Kutter, A. Dublanche, A. Górski, R. Adamia, // Pharm. Res. - 2011. - Vol. 28.-P. 934-937.
5. Isolation and characterization of KP34-anovel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* / Z. Drulis-Kawa, P. Mackiewicz, A. Kesik-Szeloch, E. Maciaszyk-Dziubinska, B. Weber-Dabrowska, A. Dorotkiewicz-Jach, , D. Augustyniak, G. Majkowska-Skrobek, T. Bocer, J. Empel, AM Kropinski // Applied Microbiol. Biotechnol. - 2011. - Vol. 90.-P. 1333-1345.
6. Bernhardt, T.G. Genetic evidence that the bacteriophage ϕ X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis / T.G. Bernhardt, W.D. Roof, R. Young // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2000. - Vol. 97. - P. 4297-4302.
7. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. H. Leclerc, S. Edberg, V. Pierzo, J.M. Delattre, J. Appl. Microb. - 2000. - Vol. 88. - P. 5-21.
8. Gill, J.J. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy / J.J. Gill, P. Hyman // Curr. Pharm. Biotechnol. - 2010. - Vol. 11. - P. 2-14.
9. Miroshnikov, K.A. Genomics and proteomics of lytic bacteriophages *Pseudomonas aeruginosa*: author's abstract of dissertation of Doctor of Chemical Sciences: 03.01.04, 03.01.06 / Miroshnikov Konstantin Anatolevich. - Moscow, 2013. - p.49
10. Legotskiy Sergey Alexandrovich. Preparation, study of properties, regulation of recombinant endolysin of bacteriophage S-394 and development of a method for effective lysis of gram-negative bacteria: author's abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences: 03.01.04; 03.01.06 / Legotskiy, S.A. - Moscow, 2016. -29 p.
11. Feoktistova, N.A. *Proteus* bacteriophages: the study of some biological properties / N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017 - No. 4 (40). - P. 75-80.
12. Feoktistova, N.A. Study of the biological properties of bacteriophages of *Proteus* genus / N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017 - No. 3 (39). - P. 99-105.
13. Vasiliev, D.A. Isolation and study of biological properties of *Proteus* genus bacteria / D.A. Vasiliev, N.A. Feoktistova, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - No. 2 (38). - P. 70-76.
14. Suldina, E.V. Bacteriophages of *Enterobacter* bacteria and their basic biological properties / E.V. Suldina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, I.I. Bogdanov // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - No. 4 (40). - P. 94-98.
15. Suldina, E.V. Isolation of *Yersinia enterocolitica* bacteria and bacteriophages / E.V. Suldina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - No. 3 (39). - P. 50-55.