

УДК 619:616-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГЕНОМА НОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»
8(84231)55-95-47

Ключевые слова: Бактериофаги, энтеробактерии, фаголизаты, осаждение бактериофагов, нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, размер генома, электрофорез, агарозный гель; рестрикционный анализ.

Работа посвящена определению типа нуклеиновой кислоты и размера генома у 14-ти новых бактериофагов патогенных энтеробактерий. При проведении молекулярно-генетических исследований авторами установлено, что нуклеиновые кислоты всех изученных фагов представлены типом ДНК размером от 45000 п.о. до 67000 п.о.

Введение

Всесторонние исследования по изучению бактериофагов, выполненные за последние 40-50 лет, позволили широко использовать их для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, биохимии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологических исследований. Поэтому учение о фагах, развивающееся вначале как узкая область медицинской и ветеринарной микробиологии, в настоящее время приобрела общебиологическое значение.

В течение двух последних десятилетий преобладало мнение, что изучение фагов уже не может дать науке ничего принципиально нового. В России при возникновении и развитии геномной инженерии произошла утрата интереса к изучению фагов, и лишь единичные научные лаборатории в настоящее время продолжают заниматься фундаментальными исследо-

ваниями бактериофагов. Однако, несмотря на накопленный большой научный материал по изучению биологических свойств бактериофагов, многие вопросы требуют дополнительных исследований. Так, например, у большинства, как считалось ранее, глубоко изученных модельных эшерихиозных фагов Т-серии так и не удалось выяснить функцию двух третей синтезируемых ими продуктов (В.Н. Крылов, 2003). Кроме того, нет единой схемы таксономии и морфологической классификации этих микроорганизмов, отсутствуют стандартные наборы бактериофагов многих возбудителей заболеваний животных и человека, а также схемы и регламенты их применения (В.С. Русалеев, 1990; 1992).

Интерес к фагам у отечественных исследователей возродился сравнительно недавно по ряду причин и, прежде всего, с возникновением множественно-устойчивых к антибиотикам возбудителей

разных болезней. Кроме того, в настоящее время в результате молекулярно-генетических исследований была выявлена связь генома патогенности бактерий с профагом и отмечена возможность генетического обмена не только между бактериями и фагами, но и между фагами и эукариотами (В.Н. Крылов, 2003).

Целью исследований было изучение типа и размера генома у выделенных и селекционированных нами фагов патогенных энтеробактерий.

Объекты и методы исследований

Материалом для исследований явились 14 штаммов бактериофагов энтеробактерий родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, видов, *Y. enterocolitica*, *M. morganii* и *E. coli* сероваров O157:H7 и H-, предложенных нами для изготовления диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

Для изучения типа нуклеиновой кислоты и молекулярной массы генома бактериофагов нами поэтапно были проведены следующие исследования:

1. освобождение фаголизатов от фрагментов бактериальных клеток;
2. осаждение бактериофагов;

3. выделение нуклеиновых кислот фагов;

4. определение типа нуклеиновой кислоты;

5. определение размера генома фагов электрофорезом в агарозном геле;

6. рестрикционный анализ генома фагов;

В работе было использовано четырнадцать штаммов бактериофагов различных энтеробактерий в виде лизатов бульонных культур в титрах $2,1-5,9 \times 10^9$ фаговых корпускул в $1,0 \text{ см}^3$ (табл.1).

Для освобождения фаголизатов от обломков бактериальных клеток исследуемый материал разливали по $100,0 \text{ см}^3$ в стеклянные стерильные центрифужные флаконы и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 мин.

После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно переливали (чтобы не попал осадок) в другие центрифужные пробирки также по $100,0 \text{ см}^3$, которые центрифугировали на высокоскоростной центрифуге в режиме при 19 000 об./мин в течение 5 часов для осаждения вирионов бактериофагов. Затем надосадок сливали, а из осадка готовили суспензию для выделения нуклеиновых

Таблица 1

№ п/п	Название фага	Объем материала	Титр фагов по Грациа (корпускул фага в 1 см^3)
1	<i>Y. enterocolitica</i> Y/9	500 см^3	$2,5 \times 10^9$
2	<i>Enterobacter</i> En-13	500 см^3	$3,4 \times 10^9$
3	<i>Enterobacter</i> En-2	500 см^3	$4,2 \times 10^9$
4	<i>Klebsiella</i> K-10	500 см^3	$5,1 \times 10^9$
5	<i>Klebsiella</i> K-80	500 см^3	$3,7 \times 10^9$
6	<i>Citrobacter</i> C-61	500 см^3	$4,8 \times 10^9$
7	<i>E. coli</i> O157 E-67	500 см^3	$5,9 \times 10^9$
8	<i>E. coli</i> O157 E-67	500 см^3	$2,1 \times 10^9$
9	<i>Proteus</i> П-16	500 см^3	$3,2 \times 10^9$
10	<i>Proteus</i> П-261	500 см^3	$4,1 \times 10^9$
11	<i>M. morganii</i> M-17	500 см^3	$2,2 \times 10^9$
12	<i>M. morganii</i> M-20	500 см^3	$2,7 \times 10^9$
13	<i>Citrobacter</i> C-66	500 см^3	$3,1 \times 10^9$
14	<i>Citrobacter</i> C-52	500 см^3	$5,4 \times 10^9$

Таблица 2

Результаты электрофореза при определении типа нуклеиновой кислоты у бактериофагов

№ п/п	Название фага	Результат электрофореза		
		в контроле	после обработки РНК-азой	после обработки ДНК-азой
1	Y. enterocolitica Y/9	+	+	-
2	Enterobacter En-13	+	+	-
3	Enterobacter En-2	+	+	-
4	Klebsiella K-10	+	+	-
5	Klebsiella K-80	+	+	-
6	Citrobacter C-61	+	+	-
7	E. coli O157 E-67	+	+	-
8	E. coli O157 E-67	+	+	-
9	Proteus П-16	+	+	-
10	Proteus П-261	+	+	-
11	M. morganii M 17	+	+	-
12	M. morganii M 20	+	+	-
13	Citrobacter C-66	+	+	-
14	Citrobacter C-52	+	+	-

Примечание : «+» - положительный результат; «-» - отрицательный результат

кислот, для чего его растворяли в 200,0 см³ 1хТЕ буферного раствора pH7,5 (TE-10 mM Трис и 1 mM ЭДТА).

Для выделения нуклеиновых кислот к приготовленной суспензии добавляли: 10% от объема SDS (10 % додецилсульфат натрия) и 20 % от объема 5 M NaCl, перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре.

К полученной смеси добавляли равный объем фенола (pH 7,5), перемешивали в течение 5 мин, затем ее центрифугировали на микроцентрифуге системы «эппендорф» при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную верхнюю водную фазу отбирали и переносили в другую чистую пробирку «эппендорф», к которой добавляли равный объем фенола (pH 7,5) и перемешивали в течение 5 минут при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин.

После этого верхнюю водную фазу

переносили в другую чистую пробирку «эппендорф», куда вносили равный объем хлороформа (pH 8) и перемешивали в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость вносили в стерильную пробирку и добавляли в нее 10% от объема AcNa и 2,5 объема 96% этилового спирта для осаждения нуклеиновых кислот.

Полученную смесь выдерживали при -20°C в течение 18 часов, а затем центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин., промывали пробы 75% этиловым спиртом; осадки растворяли в 40 мкл H₂O.

Для проведения электрофореза в 2% агаровый гель вносили по 10 мкл каждой пробы.

После электрофореза проводили обработку нуклеиновых кислот РНК-азой (по 1 единице активности) и ДНК-азой (по

Таблица 3

Характеристика молекулярной массы генома

№	Наименование проб	Размер п.о.
1	Y/9	60346
2	M-17	50957
3	En-13	45083
4	En-2	55043
5	E-61	50252
6	E-67	60857
7	K-10	67045
8	K-81	58672
9	C-52	60000
10	C-61	50573
11	C-66	50357
12	M-20	45190
13	П-16	48430
14	П-261	65451
15	П-143	48880

5 единиц активности), с целью определения типа нуклеиновой кислоты.

Смесь инкубировали в течение 10 мин при 37°C и результаты исследований учитывали в 1% агаровом геле.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты электрофореза показали, что нам удалось выявить нуклеиновые кислоты у всех образцов. При обработке РНК-азой у всех образцов был положительный результат электрофореза, а при обработке ДНК-азой – отрицательный. Следовательно, все изучаемые нами фаги содержат нуклеиновую кислоту типа ДНК, т.е. выделенные и селекционированные нами бактериофаги энтеробактерий относятся к ДНК-содержащим вирусам.

Для определения молекулярной массы генома вносили в гель по 15 мкл каждой пробы и ДНК-маркер II. Компьютерная обработка результатов электрофореза показала, что все фаги имеют молекулярный вес размером от 4800 п.о. до 6500 п.о. (табл. 3).

При проведении электрофореза проводился рестрикционный анализ с эндонуклеазой Hind III в течение 2,5 часов. Результаты исследований показали, что используемая рестриктаза не разрезает

данные образцы.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о возможности выделения нуклеиновых кислот бактериофагов энтеробактерий фенольно-деградационным методом. Выделенные нуклеиновые кислоты у всех бактериофагов были представлены ДНК небольшим размером от 45083 до 67045 п.о.

Заключение

Проведенные молекулярно-генетические исследования выделенных нами бактериофагов свидетельствуют о том, что все изученные бактериофаги по типу нуклеиновой кислоты относятся к ДНК-содержащим вирусам. Молекулярная масса генома находится в пределах от 45000 п.о. до 67000 п.о.

Литература:

1. Крылов В.Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий. // Генетика, том №5, 2003, с. 595-620.
2. Русалеев В.С. Таксономия вирусов бактерий// Ветеринария -1990 №3, с. 34-36.
3. Русалеев В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий // Ветеринария.