

А.Н. Остапчук¹, Н.А. Король², Л.В. Романюк¹, Ф.И. Товкач^{1,2}

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина

² Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ И HPLC-ХРОМАТОГРАФИЯ ВИРИОНОВ МУТАНТОВ ФАГА ZF40

Изучение полипептидного состава вирулентных вариантов эрвиниофага ZF40c_{5/5} и ZF40-421 показало, что в состав вирионов входят не менее 10 структурных белков с молекулярными массами от 16.9 до 96.5 кДа. К группе мажорных отнесены три полипептида с молекулярными массами 39.2, 33.1, 18.5 кДа, которые соотносятся с полипептидами головки, чехла футляра и стержня хвостового отростка соответственно. Доказано, что белковый состав этих фагов одинаков, так как процентное соотношение всех полипептидов стремится к 1.0. Для полипептидного профиля изогенного варианта фага ZF40-421, полученного на *EccRC5297*, характерно иное соотношение мажорных белков. Эти различия сказываются на строении прокапсидов, чем и объясняется низкая стабильность и жизнеспособность данного варианта.

В работе впервые показана возможность применения HPLC-хроматографии для изучения нативных фаговых частиц и их структурных компонентов.

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, бактериофаг ZF40, фаговые мутанты, полипептиды вирионов, HPLC-хроматография.

Структурная гетерогенность вирионов является важной характеристикой бактериофаговых популяций [8], она присуща также и фагам фитопатогенных бактерий рода *Erwinia* [1].

Предыдущие исследования впервые показали, что вирулентные мутанты эрвиниофага ZF40c_{5/5} и ZF40-421, адаптированные к репродукции в клетках альтернативного хозяина *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) M2-4/50RI, значительно стабильнее, чем изогенные варианты, полученные на традиционной культуре *EccRC5297*. Эти мутанты полностью сохраняют свою жизнеспособность и не разрушаются под действием осмотического шока при очистке в хлориде цезия. Данный факт позволил сделать предположение об определенном влиянии на морфогенез вирионов механизмов и структур бактерии-хозяина, возможно, за счет их специфических шаперонных систем [2].

Для изучения природы структурной гетерогенности популяции фага ZF40 необходимыми являются более тонкие исследования, в частности, высокочувствительные хроматографические методы, позволяющие разделять белки и нуклеопротеиды на основе их гидрофобных взаимодействий с носителем. [5].

Целью данной работы было сравнительное изучение полипептидного состава вирионов наиболее стабильных вариантов эрвиниофага ZF40, а также их анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы. Объектами данного исследования были бактериофаги ZF40c_{5/5} и ZF40-421, адаптированные и наработанные на штамме *Ecc50RI*, а также фаг ZF40-421, полученный на *EccRC5297* [2]. В работе использовали штамм *Ecc50RI*, который являлся спонтанным диссоциантом штамма *EccM2-4*, а также *EccRC5297* - бактериоцинустойчивым диссоциантом штамма *Ecc62A*.

Фаголизаты получали стандартным методом слитного лизиса [3].

Фаговые частицы концентрировали и очищали дифференциальным центрифугированием в роторе SW 28 Spinco L7-70 при 26000 об/мин 1,5 часа, 10 °С. Осадок фаговых частиц ресуспендировали в минимальном объеме буфера STM, который составлял 1/50 часть исходного объема фагового лизата. Полученную суспензию освобождали от остатков клеток и конгломератов фаговых частиц путем их осаждения на микроцентрифуге ELM1 при 11000 об/мин 10 мин.

Более глубокую очистку вирионов проводили центрифугированием в преформированных градиентах хлорида цезия. Двухступенчатые градиенты CsCl (1,42 г/см³ и 1,60 г/см³) готовили в центрифужных пробирках на 5 мл непосредственно перед центрифугированием. Суспензию фага наслаивали на градиент и центрифугировали в роторе SW55 при 35000 об/мин 4 часа,

10 °С. После центрифугирования полосы, содержащие вирусный материал, отбирали шприцом или с помощью автоматической пипетки.

SDS-ПААГ – электрофорез структурных полипептидов вирионов фагов проводили стандартным методом по Леммли [4]. Для оценки молекулярных масс использовали следующие белки: β-галактозидаза – 116,0 кДа, BSA – 66,2 кДа, овальбумин – 45 кДа, лактат-дегидрогеназа – 35 кДа, REase Bsp918 *E. coli* – 25 кДа, β-лактоглобулин – 18,4 кДа.

Подсчет молекулярных масс фаговых полипептидов осуществляли с помощью компьютерной программы Total Lab (версия 2.01).

Анализ белковых препаратов проводили методом HPLC с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldronn, USA). Колонка аналитическая Zorbax 300SB-C18 2.1mm × 150mm × 5µm (Agilent Technologies). Разделение проводили в градиентном режиме. Как элюант использовали систему: буфер А - 0.25 мМ раствора муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил-вода (50:50), буфер Б - 0.25 мМ раствора муравьиной кислоты в воде. Скорость потока 0.3 мл/мин. Температура колонки 30 °С. Детекцию вирусного материала проводили при длинах волн 280 и 260 нм соответственно. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программного пакета Chemstation (Agilent Technologies). Результаты сравнивали с данными спектрофотометрического анализа исходных высокоочищенных препаратов фагов. В качестве контроля использовали буфер STM (NaCl - 200 µМ; трис-НСl (рН 7.4) - 10 µМ; MgCl₂ - 10 µМ).

Результаты и их обсуждение. Анализ электрофореграмм и денситометрических изображений белковых профилей фагов ZF40c₅₅ и ZF40-421, представленных на рис. 1, позволил установить, что в состав вирионов входят не менее 10 структурных полипептидов. Их молекулярные массы варьируют от 16,9 до 96,5 кДа. Группа мажорных белков (по относительному процентному содержанию) представлена тремя белками: p₅, p₆ и p₉ с молекулярными массами 39.2, 33.4 и 18.5 кДа соответственно; остальные входят в группу минорных белков (табл. 1). Эти данные полностью соответствуют полученным ранее результатам полипептидного анализа *clear*-мутанта с₆ фага ZF40 [6].

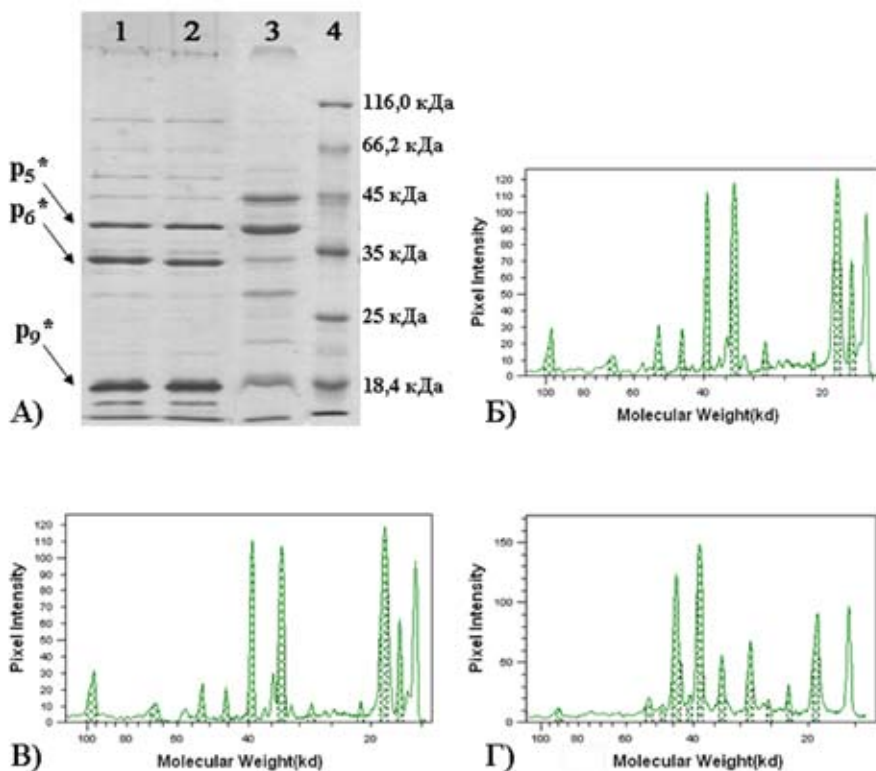


Рис. 1. А. Электрофорез в SDS-ПААГ-геле очищенных препаратов фагов. 1 - ZF40c₅₅/50RI, 2 – ZF40-421/50RI, 3 – ZF40-421/5297, 4 - маркер. Стрелками указаны мажорные белки. Б, В, Г – денситограммы, соответствующие полосам геля 1, 2, 3 соответственно.

Таблица 1

**Полипептидный состав вирионов фагов ZF40-421/5297, ZF40-421/50RI
и ZF40c_{s/s}/50RI**

Наименование полипептида	ZF40-421/5297		ZF40-421/50RI		ZF40c _{s/s} /50RI		% соотношение белков фагов ZF40-421/50RI и ZF40c _{s/s} /50RI
	Молекулярная масса, кДа	%	Молекулярная масса, кДа	%	Молекулярная масса, кДа	%	
p ₁	90,0	0,8	96,5	3,63	96,2	3,20	1,1
p ₂			67,5	1,59	68,9	1,67	1,0
p ₃	51,9	2,5	51,5	2,80	51,6	3,66	0,8
p ₄	44,1	22,3	45,0	2,80	45,0	2,95	0,9
p ₅ *	38,5	27,8	39,2	19,65	39,1	18,20	1,1
p ₆ *	33,4	8,5	33,1	21,89	33,4	25,34	0,9
p ₇	28,1	9,5	27,8	2,15	28,2	2,96	0,7
p ₈	22,2	4,2	21,1	2,33	21,1	1,92	1,2
p ₉ *	18,9	17,0	18,4	33,63	18,5	29,68	1,1
p ₁₀			16,9	9,53	16,9	10,42	0,9

Мы попытались соотнести обнаруженные полипептиды с определенными структурными частями вириона ZF40. Очевидно, что основной структурный полипептид головки представлен белком – p₅ с молекулярной массой 39,2 кДа. Его количество составляет около 25 % от всех мажорных белков и приблизительно равно количеству белка, который мы предположительно указываем как структурный компонент чехла футляра хвостового отростка – белок p₆ – 31 %. Известно, что наиболее консервативной частью вириона бактериофагов является стержень хвостового отростка. Как правило, он образован приблизительно одинаковыми по своей молекулярной массе полипептидами, которые составляют около 20 кДа для фагов семейства *Myoviridae* [7]. По нашим данным, для фага ZF40 на белок стержня претендует белок – p₉ с молекулярной массой 18,5 кДа. (табл. 1).

Отсутствие декорирующих белков в капсидах фага ZF40 говорит о том, что стабильность фаговых вирионов поддерживается только основным белком головки и белком, который образует пентамерные вершины икосаэдра. По-видимому, для вариантов фагов, полученных на *Ecc50RI*, количественное соотношение этих белков является оптимальным, что обуславливает устойчивость вирионов к внешним воздействиям и их высокую жизнеспособность.

Скорее всего, вирионы мутантов ZF40c_{s/s}/50RI и ZF40-421/50RI абсолютно одинаковы по белковому составу. Об этом свидетельствует процентное соотношение их белков, которое стремится к 1,0 (табл. 1).

Полипептидный профиль изогенного варианта фага ZF40-421, полученного на *EccRC5297*, значительно отличается от указанных выше фагов. Для него характерно совершенно другое соотношение между мажорными белками вириона (табл. 2). Превалирующим является полипептид p₅ с молекулярной массой 39 кДа, в два раза превышающий концентрацию аналогичного полипептида у двух других вариантов. В то же время, количество полипептида p₉ с молекулярной массой 19 кДа меньше на 10 %. Заслуживает внимания тот факт, что концентрация полипептида p₄ с молекулярной массой 44,1 кДа почти в 10 раз превышает концентрацию аналогичного белка в составе фагов, адаптированных к культуре *Ecc50RI*. Такие различия в концентрации белка p₄, вероятно, сказываются на отличиях в строении прокапсидов – продуктов созревания вирионов. Возможно, этот факт объясняет одну из причин отличия электрофоретической подвижности у капсидов вирулентных вариантов фага ZF40 [2].

Для обнаружения тонких различий в строении вирионов фагов ZF40c_{s/s}/50RI, ZF40-421/50RI и ZF40-421/5297 использовали чувствительный метод HPLC-хроматографии. Анализируя хроматограммы вариантов фага ZF40 учитывали такие стандартные показатели, как время задержки образца на колонке или время ретракции (RT, мин), интенсивность пиков по высоте (H, mAU) и относительно количественное содержание вещества, которое определялось как часть площади под пиком к общей площади пиков (A, %). Кроме этих показателей

обращали внимание также и на количественное соотношение спектрометрических пиков при длинах волн $A^{260}/_{280}$, которое было достаточно показательным для всех образцов (табл. 3). Общеизвестно, что показатель $A^{260}/_{280}$ составляет около 1,5–1,6 для нуклеопротеинов типа фаговых вирионов. Было обнаружено, что пики с такими показателями характерны для нативных фагов ZF40c_{5/5}/50RI и ZF40-421/50RI, а также отмечено совпадение этих пиков по времени ретракции (табл. 3). Однако у варианта ZF40-421/5297 не было зафиксировано пиков с соотношением $A^{260}/_{280}$ равным 1,5–1,6, что указывает на его крайнюю нестабильность и неспособность давать выход нуклеопротеида в виде нативных вирионов.

Таблица 2

Процентное содержание мажорных белков в составе вирионов фагов ZF40c_{5/5}/50RI, ZF40-421/50RI и ZF40-421/5297. За 100 % взята сумма мажорных полипептидов вириона.

Вариант фага	Наименование полипептида		
	p5*	p6*	p9*
ZF40c _{5/5} /50RI	24,9	34,6	52,1
ZF40-421/50RI	26,1	29,1	15,9
ZF40-421/5297	52,1	44,7	31,9

Далее, используя данные HPLC-анализа установили, каким фаговым структурам соответствует каждый из четырех пиков спектра (рис. 2). Предположительно, первый пик можно соотносить с хвостовым отростком, так как он наименее прочно связан с капсидом и отрывается в первую очередь. Два другие спаренные пики (III и IV), вероятнее всего, соответствуют родственным фагоподобным структурам. Разница в значении RT для них составляет всего 0.215 минут или 13 сек. Возможно, компоненты с такими близкими значениями RT претендуют на то, чтобы отнести их к таким компонентам вириона, как капсиды, заполненные и незаполненные ДНК.

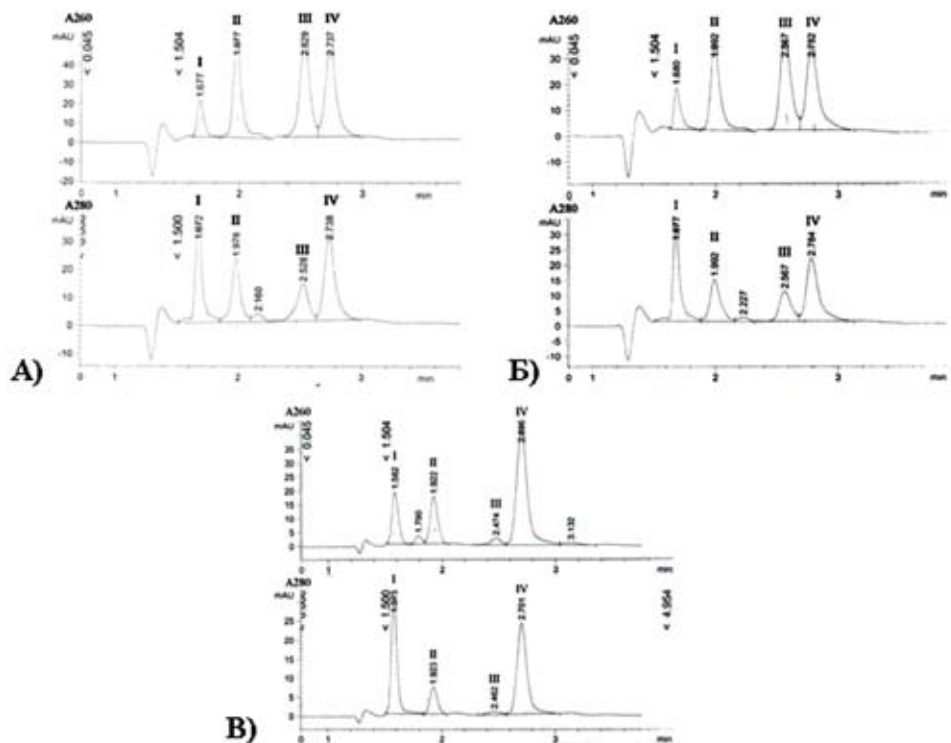


Рис. 2. HPLC-профили изогенных вариантов фага ZF40c_{5/5}/50RI (А), ZF40-421/50RI (Б) и ZF40-421/5297 (Б) при длинах волн 260 и 280 нм.

Данные HPLC-хроматографии очищенных препаратов фагов ZF40_{s/s}/50RI, ZF40-421/50RI и ZF40-421/5297.

Вариант фага	Компонент (пик)	RT, мин	H, mAU	A, %	A 260/280
ZF40 _{s/s} /50RI	I	1,677	18,981	7,912	0,538
	II	1,977	51,372	28,340	2,294
	III	2,529	47,767	31,523	3,647
	IV	2,737	45,280	32,225	1,536
ZF40-421/50RI	I	1,680	16,130	9,390	0,514
	II	1,992	32,910	25,767	2,378
	III	2,567	34,917	31,913	3,545
	IV	2,782	31,932	32,930	1,555
ZF40-421/5297	I	1,582	18,742	15,978	0,606
	II	1,922	17,038	16,277	2,382
	III	2,474	2,567	3,479	2,763
	IV	2,696	42,540	59,909	1,770

Так как исходные частицы фагов ZF40_{s/s}/50RI и ZF40-421/50RI, очищенные в градиенте CsCl, являются нативными, указанные выше компоненты появляются вследствие HPLC-хроматографии. Несмотря на то, что причины разрушения частиц остаются неизвестными, они, тем не менее, вполне специфичны, так как хроматографические профили являются абсолютно воспроизводимыми (рис. 2). Об этом свидетельствуют и минорные компоненты хроматограмм с показателями времени ретракции 2.160 и 2.227 мин, которые пока трудно соотносить с реальными макромолекулярными структурами. Тем не менее, идентификация таких структур в процессе дальнейших исследований могла бы быть полезной для более детальных исследований процессов морфопоэза и морфогенеза эрвиниофага ZF40.

Последующий спектрофотометрический анализ высокоочищенных препаратов фагов подтвердил, что соотношение A_{260}/A_{280} равное 1,6 свойственно более стабильным и жизнеспособным фагам ZF40_{s/s}/50RI и ZF40-421/50RI, в то время как отсутствие хроматографического пика с таким показателем указывает на нестабильность варианта ZF40-421/5297 (рис. 3). Таким образом, полученные результаты указывают на возможность использования HPLC-хроматографии для тонкого изучения фаговых частиц и их морфогенеза.

Гетерогенность популяции фаговых частиц наиболее часто проявляется в изменениях строения (размер и форма) вирусных капсидов. Так, в популяции фага T4 всегда обнаруживается небольшое количество aberrантных структур, не относящихся к типичным частицам A2-морфотипа [10]. Образование таких форм может происходить либо вследствие мутаций в геноме самого фага, либо в результате влияния на морфогенез вирионов со стороны специфических механизмов, присущих бактерии-хозяину [12].

В результате исследований еще раз было доказано, что по полипептидному составу вирулентные варианты эрвиниофага ZF40_{s/s}/50RI и ZF40-421/50RI, наряду с *clear*-мутантом ZF40_c, могут быть отнесены к структурной группе P2-подобных вирионов [13]. Предполагается, что различие в подвижности капсидов соответствующих фагов в гелях агарозы обусловлено различиями в строении прокапсидов этих фагов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография представляет собой метод, широко используемый для выделения, учета и очистки различных компонентов смеси, отличающихся по силе гидрофобного взаимодействия с носителем. Согласно литературным данным, HPLC-анализ использовался как полуколичественный метод для определения наличия в суспензии вирусных частиц: аденовирусов [9] и бактериофага Felix-O1 *Salmonella* spp. [11]. К основным недостаткам относится недостаточно высокая чувствительность этого метода для учета количества частиц и способность носителя взаимодействовать с белками питательной среды и ДНК, находящейся в смеси.

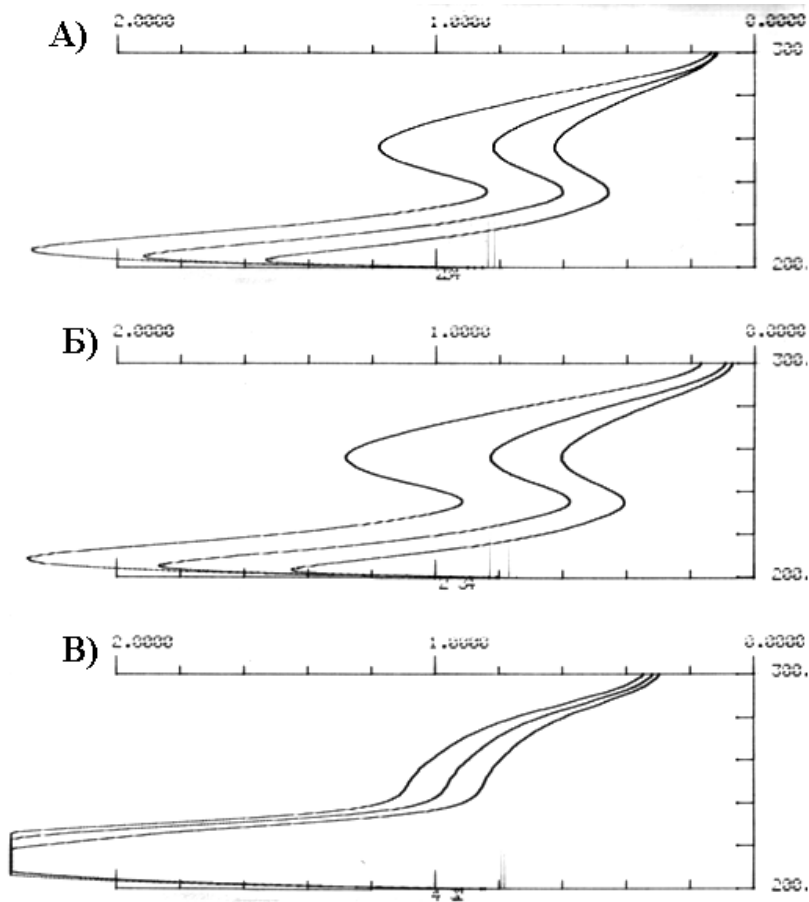


Рис. 3. Спектри фагов ZF40_{c5/50RI} (А), ZF40-421/50RI (Б), ZF40-421/5297 (В)

Несмотря на это, в данной работе впервые показана возможность применения HPLC-хроматографии для изучения нативных фаговых частиц. В дальнейшем перспективной является разработка подходов для препаративного получения отдельных компонентов вирусных частиц и изучения процессов сборки вириона.

А.М. Остапчук¹, Н.А. Король², Л.В. Романюк¹, Ф.І. Товкач^{1,2}

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса

ПОЛІПЕПТИДНИЙ СКЛАД ТА HPLC-ХРОМАТОГРАФІЯ ВІРІОНІВ МУТАНТІВ ФАГА ZF40

Резюме

Вивчення поліпептидного складу вірулентних варіантів ервініофага ZF40_{c5/50RI} і ZF40-421 показало, що до складу їх віріонів входить не менше 10 структурних білків із молекулярними масами від 16,9 до 96,5 кДа. До групи мажорних віднесено три поліпептиди з молекулярною масою 39,2, 33,1 і 18,5 кДа, які співвідносяться відповідно з поліпептидами головки, чохла футляра і стержня хвостового відростка. Доведено, що білковий склад цих фагів однаковий, так як процентне співвідношення усіх поліпептидів наближується до 1,0. Для поліпептидного профілю ізогенного фага ZF40-421, отриманого на *EccRC5297*, характерне інше співвідношення мажорних білків. Ці відмінності характеризують різну будову прокапсидів, чим і пояснюється низька стабільність і життєздатність даного варіанту.

У роботі вперше показана можливість використання HPLC-хроматографії для вивчення фагових часток та їх структурних компонентів.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, бактеріофаг ZF40, фагові мутанти, поліпептиди віріонів, HPLC-хроматографія.

POLYPEPTIDE CONTENT AND HPLC-CHROMATOGRAPHY OF THE VIRIONS OF PHAGE ZF40 MUTANTS

S u m m a r y

Study of the polypeptide content of erwinioophage ZF40_{c_{3/5}} and ZF40-421 virulent mutants has shown that their virions include no less than 10 structural proteins with molecular weights ranging from 16.9 to 96.5 kDa. Three polypeptides belong to a group of major proteins with molecular weights 39.2, 33.1 and 18.5 kDa. They correlate with the polypeptides of phage head, tail sheath and tail core correspondingly. It has been proven that the protein contents of these phages are identical, taking into account that the percent ratio of all polypeptides approaches 1.0. The polypeptide profile of isogenic variant of phage ZF40-421 obtained on *EccRC5297* is characterized by another ratio of major proteins. These differences are reflected in the structure of procapsids, that explains low level of stability and viability of the variant.

The work shows for the first time the possibility of using HPLC-chromatography for studying native phage particles and their structural components.

The paper is presented in Russian.

К е у в о р д с: *Erwinia carotovora*, bacteriophage ZF40, phage mutants, virion polypeptides, HPLC-chromatography.

The author's address: *Ostapchuk A.M.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Іваниця Т.В.* Особливості дефектної лізогенії *Erwinia carotovora*: Автореф. дис... канд. біол. наук. – Київ, 2008. – 19 с.
2. *Король Н.А., Романюк Л.В., Остапчук А.Н., Іваниця Т.В., Кушкіна А.И., Товкач Ф.И.* Особенности морфогенетического развития вирулентных мутантов эрвиниофага ZF40 // *Мікробіол. журнал.* – 2011. – Т. 73. № 2. – С. 58–64.
3. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике: Пер. с англ. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
4. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
5. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М., Наука, 1985. – 300 с.
6. *Паницна А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А.* Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // *Мікробіол. журн.* – 2007. – Т. 69, № 2. – С. 15–22.
7. *Ackermann H.-W.* Tailed bacteriophages: the order caudovirales // *Adv. Virus Res.* – 1999. – Vol. 51. – P. 135–201.
8. *Black L.W., Showe M.K.* Morphogenesis of the T4 head // *Bacteriophage T4 / Ed. by C.K. Mathews, E.M. Kutter, G. Mosig, P.B. Berget.* - Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1983. - P.219-245
9. *Blanche F., Cameron B., Barbot A., Ferrero L., Guillemin T., Guyot S., Somarriba S., Bisch D.* An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles // *Gene Therapy.* – 2000. – Vol. 7. – P. 1055-1062.
10. *Cummings D. J., Bolin R. W.* Head Length Control in T4 Bacteriophage Morphogenesis: Effect of Canavanine on Assembly // *Bacteriological Reviews.* – 1975. – Vol.40. – № 2. – P. 314–359.
11. *Hirsh D. C., Martin L. D.* Rapid Detection of Salmonella spp. by Using Felix-O1 Bacteriophage and High-Performance Liquid Chromatography // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1983. – Vol. 45. - № 1. – P. 260-264.
12. *Lata R., Conway J.F., Cheng N. Et.al.* Maturation dynamics of a viral capsid visualization of transitional intermediate states // *Cell.* – 2000. – 100. – № 1. P. 253–263.
13. *Lengyel J.A., Goldstein R.N., Marsh M., Sunshine M.G., Calendar R.* Bacteriophage P2 head morphogenesis: cleavage of the major capsid proteins // *Virology.* – 1973. – Vol. 53, N 1. – P. 1-23.

Отримано 12.10.2010