ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

5 • 2013

БІОЛОГІЯ

УДК 578.81+57.083.33

Л. А. Максименко, С. И. Войчук, Т. В. Иваница

Серологическое родство бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков (MCTV) и бактериофага ZF-40 *Pectobacterium carotovorum*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Б. П. Мацелюхом)

Методом электронной микроскопии показано, что обработка бактериофага ZF-40 антисывороткой, полученной к бактериоцинам типа фаговых хвостовых отростков (MCTV) Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum, приводит к агрегации частиц бактериофага. Обработка смеси бактериоцинов кроличьей антисывороткой, полученной к бактериофагу ZF-40, вызывает появление преципитата бактериоцинов типа "снопиков", соединенных друг с другом боковыми поверхностями. Возникают также и длинные жгуты, соединенные MCTV своими концами. Кроме этого, образуются большие агрегаты сферических частиц с разной величиной головок. Нейтрализация лизирующей активности бактериофага ZF-40 происходит при воздействии на него обеих антисывороток. Таким образом, фитопатогенные бактерии P. carotovorum имеют серологически родственные белки в составе бактериоцинов и бактериофага ZF-40, которые, очевидно, сопряжены с их лизирующей или киллерной активностью.

Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (*Erwinia carotovora*) под влиянием индукторов способны выделять большое множество киллерных факторов в виде хвостовых отростков бактериофагов, базальные пластинки разной ширины и головки бактериофагов размером от 18 до 95 нм [1]. При этом не происходит сборки полноценных фаговых частиц.

Вид умеренного бактериофага *Pectobacterium carotovorum* — ZF-40 впервые выделен и описан Ф. И. Товкачем [2]. После анализа сиквенса бактериофага ZF-40 было показано, что он является типичным представителем бактериофагов семейства Myoviridae (морфотип A1) [3]. Частицы фага состоят из изометрической головки диаметром 58,3 нм и сократимого хвостового отростка длиной 86,3 нм с короткими хвостовыми нитями длиной 31,5 нм.

Ранее нами было исследовано серологическое родство между MCTV *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага

© Л. А. Максименко, С. И. Войчук, Т. В. Иваница, 2013

ZF-40 [4]. Было показано, что полученная к MCTV сыворотка инактивирует как киллерное действие бактериоцинов относительно *E. carotovora* и некоторых штаммов *Esherichia coli*, а также снижает лизирующую активность бактериофага ZF-40 относительно *E. carotovora*.

Представляет интерес изучить влияние антисывороток, полученных к бактериофагу ZF-40 и MCTV, на киллерные частицы *P. carotovorum* с применением метода электронной микроскопии.

В работе использовали бактерии *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* штамм J2 и *Pcc* RC 5297. Подращивание клеток и индукцию бактериоцинов проводили как описано в [1]. Далее, бактериоцины высаливали с помощью 50% сульфата аммония в присутствии 0,1 M NaCl. Преципитат частиц каротоворицинов осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Смесь бактериоцинов разделяли в роторе SW-40 центрифуги Beckman при 30000 об./мин в течение 4 ч в сахарозном градиенте (5–20%), содержащем 20% этилового спирта в 0,01 M *трис*-HCl буфере, pH 7,2. Осадки бактериоцинов, содержащие хвостовые отростки, ресуспендировали, диализировали против физраствора и использовали для дальнейших исследований. Бактериофаг ZF-40 получали методом слитного лизиса в титре $(2 \div 4) \cdot 10^{11}$ БОЕ/мл. Лизат фага концентрировали и очищали дифференциальным ультрацентрифугированием (ротор SW28, Spinco L8-70, 26000 об./мин, в течение 60 мин) [2, 5].

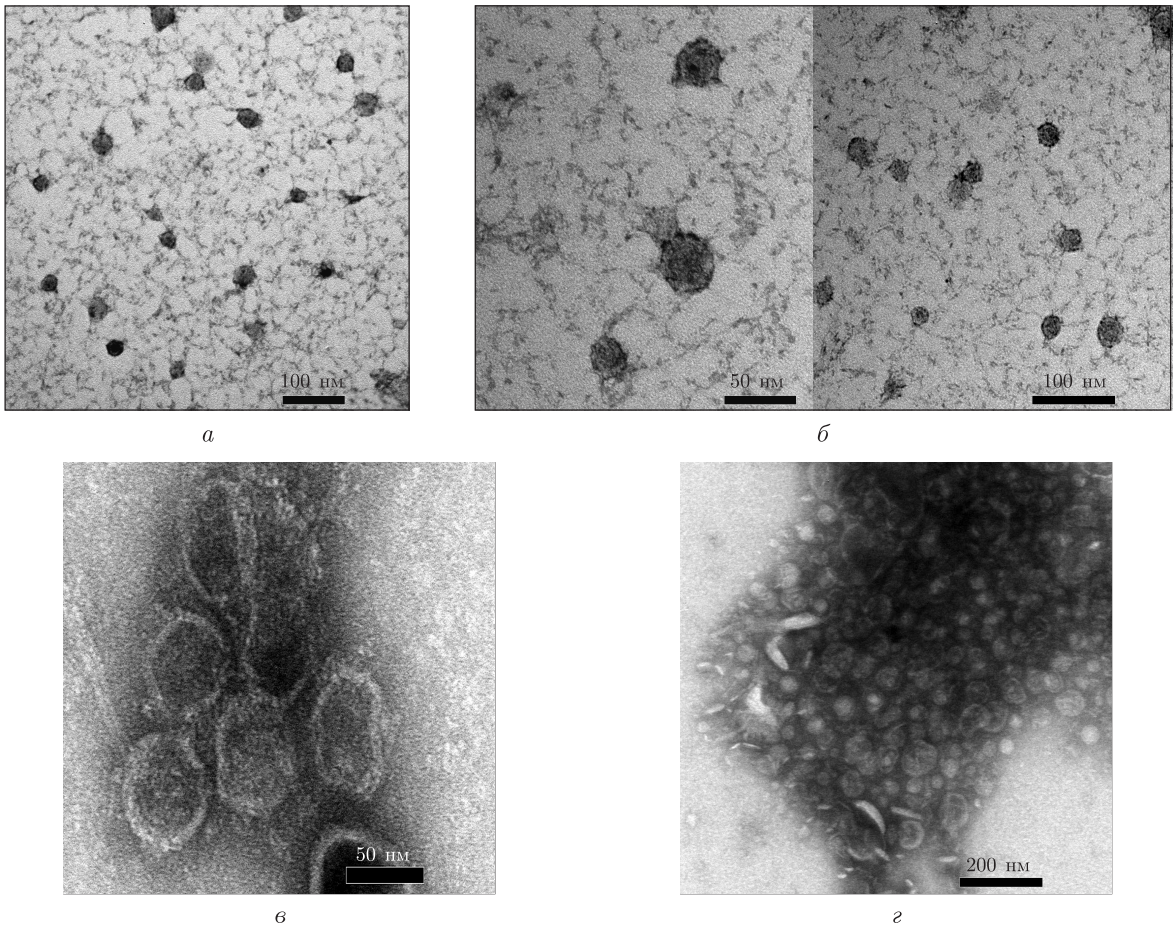
К бактериофагу ZF-40 и бактериоцинам получали кроличью антисыворотку. Концентрацию в них белка определяли по оптической плотности раствора при длине волны 278 нм на Specord. Согласно J. F. Shepard и G. A. Socor [6] 12,3 опт. ед. соответствуют 1 мг/мл белка. Белковую смесь бактериоцинов смешивали с равным объемом адъюванта Фрейнда и иммунизировали кроля. После реимунизации по истечении 7 дней отбирали кровь, отделяли сыворотку [4]. Затем обрабатывали ею раствор бактериоцинов в концентрации 1 мг/мл и раствор бактериофага, используя его 5-е разведение. После выпадения осадка (через 5–10 мин) смесь центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ *трис*-HCl буфере pH 7,2, содержащем 0,5 M NaCl, с целью избавления от неспецифических сывороточных белков. Осадки отмывали центрифугированием, проводя процедуру 3 раза. Отмытые комплексы растворяли в 100 мкл физраствора. Полученные препараты наносили на коллодиевые подложки сеточек и контрастировали 2% уранилацетатом. Электронномикроскопические исследования проводили с помощью микроскопа JEOL 1400 при инструментальном увеличении 20000–40000.

Нейтрализующее действие сывороток на бактериофаг определяли на бактериальных клетках *Pcc* RC 5297.

На рис. 1, *а* представлены микрофотографии частиц бактериофагов ZF-40, которые не подвергались обработке сыворотками. Следует отметить, что частицы не соединены друг с другом. В качестве контроля использовали сыворотку, полученную у здорового кроля, аналогичным образом обработали частицы бактериофага (см. рис. 1, *б*).

После добавления в раствор бактериофага сывороток, полученных как к бактериофагу ZF-40, так и к MCTV, образуются агрегаты частиц бактериофагов (см. рис. 1, *в*, *г*). Причем связываются друг с другом как полноценные бактериофаги, так и фаговые головки разных типов. Ранее было показано, что агрегированные при помощи антисыворотки, полученной к MCTV, частицы бактериофага ZF-40 утрачивают свою лизирующую активность в 20 раз по сравнению с контролем [4].

Обработка бактериофагов собственной антисывороткой (гомологичной) способна полностью инактивировать действие бактериофага ZF-40 относительно клеток *P. carotovorum*



а *б* *в* *г*

Рис. 1. Частицы бактериофага ZF-40: *а* — не обработанные антисыворотками; *б* — обработанные нормальной сывороткой; *в* — агрегаты частиц бактериофага, образованные после добавления антисывороток, полученных к бактериофагу ZF-40; *г* — агрегаты частиц бактериофага после обработки его антисывороткой, полученной к MCTV

RC 5297. Результат зависит от подбора титра сыворотки, количества частиц бактериофага в растворе и времени инкубации бактериофага с сывороткой. Антисыворотка, полученная к MCTV, также снижает лизирующую активность бактериофага (рис. 2). Вероятно, антисыворотка блокирует активные компоненты бактериофага, что препятствует в дальнейшем прикреплению частиц к оболочке бактерий.

Очищенные частицы MCTV показаны на рис. 3, *а*. При обработке MCTV гомологичной антисывороткой, содержащей антитела к структурным белкам бактериоцинов, происходит связывание частиц между собой боковыми поверхностями. Образуются комплексы, напоминающие снопики (см. рис. 3, *б*), либо частицы связываются конец в конец и вытягиваются в длинные нити (см. рис. 3, *г*).

Аналогичным образом связывание бактериоцинов происходит при обработке их сывороткой, полученной к бактериофагу ZF-40 (см. рис. 3, *в*).

На следующем этапе исследования изучали способность связывания MCTV и бактериофага ZF-40 между собой с помощью антисывороток. Для этого к раствору очищенных бактериоцинов в концентрации 1 мг/мл вносили раствор частиц бактериофага (4-е разве-

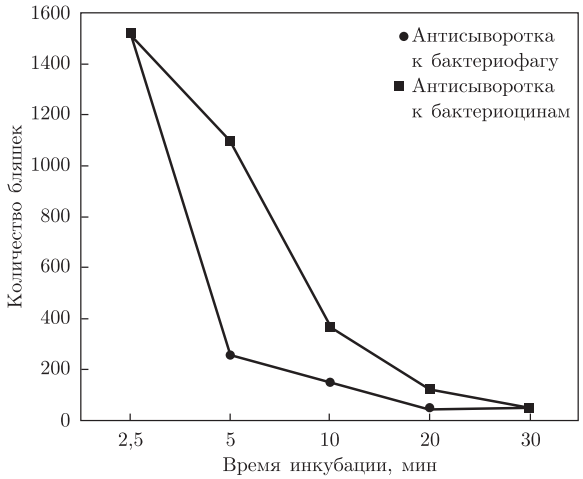


Рис. 2. Нейтрализация лизирующей активности бактериофага ZF-40 с помощью гомологичной и гетерологичной антисывороток

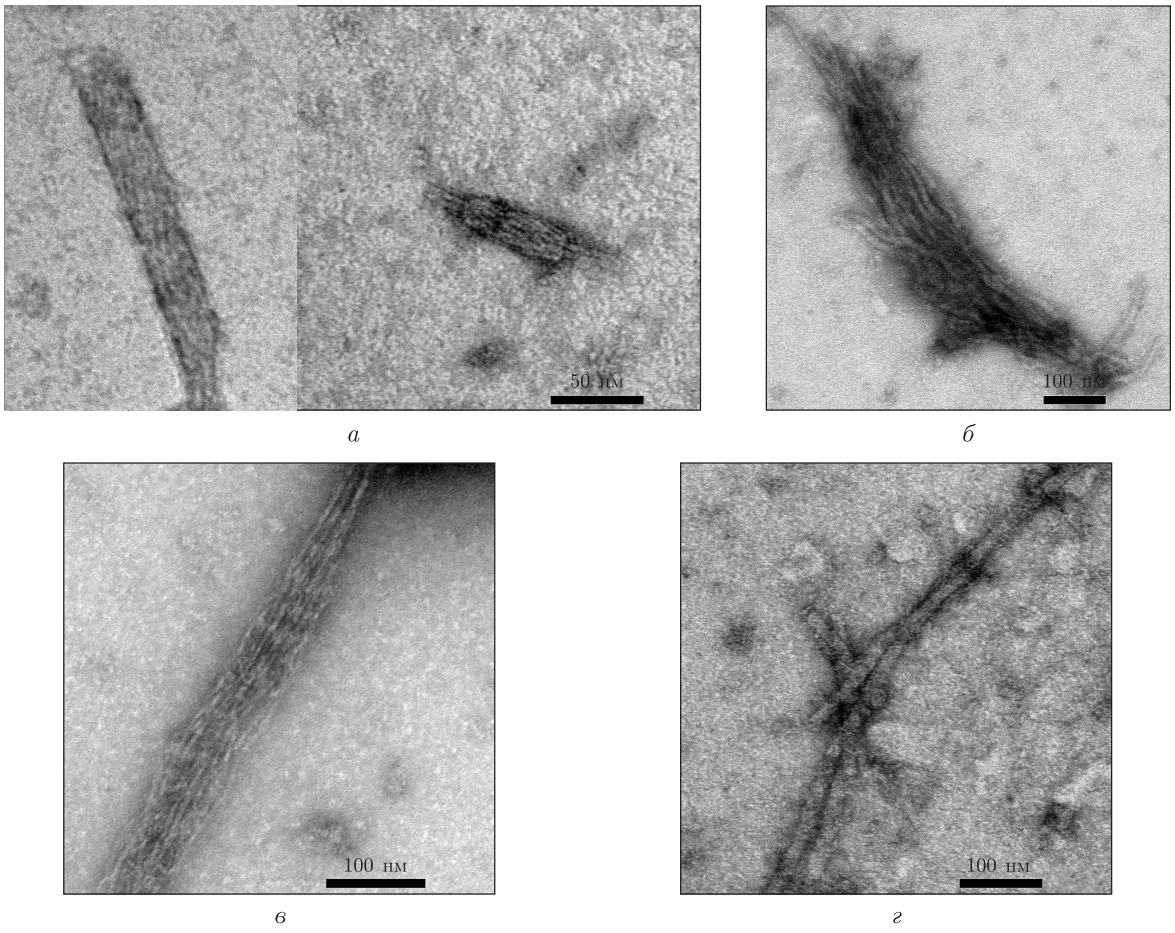


Рис. 3. Частицы бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков (MCTV): *а* — не обработанные антисыворотками; *б* — обработанные гомологичной антисывороткой; *в* — обработанные гетерологичной антисывороткой; *г* — соединенные концами частиц

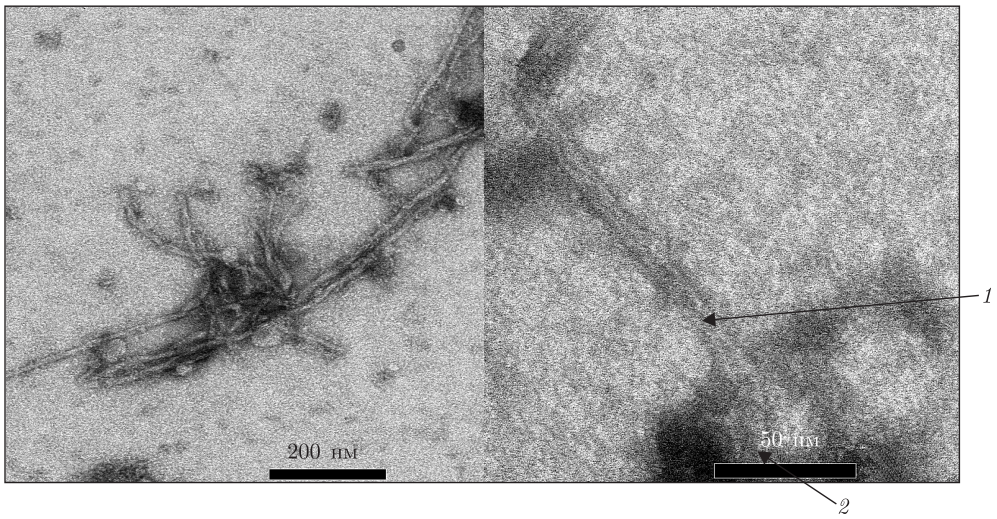


Рис. 4. Связывание частиц MCTV и бактериофага между собой при помощи антисывороток, полученных к бактериофагу ZF-40 и к MCTV: *1* — частицы MCTV; *2* — частицы бактериофага ZF-40

дение), после чего смесь перемешивали. В этот раствор вносили сыворотку, инкубировали в течение 5 мин и осадок собирали центрифугированием. Агрегат частиц отмывали от сывороточных компонентов трижды буфером, содержащим 0,5 M NaCl, растворяли в буфере M9 [1] и изучали с помощью электронного микроскопа.

Общие антитела, содержащиеся в антисыворотке, полученной к бактериофагу ZF-40, способны связывать между собой частицы MCTV, разные типы фаговых головок и частицы бактериофага ZF-40 между собой (рис. 4).

Таким образом, фитопатогенные бактерии *P. carotovorum* имеют серологически родственные белки в составе бактериоцинов и бактериофага ZF-40, которые, очевидно, сопряжены с их лизирующей или киллерной активностью.

1. *Товкач Ф. И.* Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 3. – С. 359–367.
2. *Товкач Ф. И.* Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 1. – С. 75–81.
3. *Comeau A. M., Tremblay D., Moineau S. et al.* Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses // PLoS ONE. – 2012. – **7**, No 7. – P. 40102.
4. *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.
5. *Панщина 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.
6. *Shepard J. F., Socor G. A.* Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double-diffusion test in agar // Phytopathology. – 1969. – **59**, No 12. – P. 1838–1844.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 17.10.2012

Л. О. Максименко, С. І. Войчук, Т. В. Іваниця

Серологічна спорідненість бактеріоцинів типу фагових хвостових відростків (MCTV) і бактеріофага ZF-40 *Pectobacterium carotovorum*

Методом електронної мікроскопії показано, що обробка бактеріофага ZF-40 антисироваткою, одержаною до бактеріоцинів типу фагових хвостових відростків (MCTV) Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum, призводить до агрегації часток бактеріофага. Обробка суміші бактеріоцинів кролячою антисироваткою, одержаною до бактеріофага ZF-40, викликає появу преципітату бактеріоцинів типу "снопів", з'єднаних один з одним бічними поверхнями. Виникають також і довгі джгути, з'єднані MCTV своїми кінцями. Крім того, утворюються великі агрегати сферичних часток з різною величиною головок. Нейтралізація лізуючої активності бактеріофага ZF-40 відбувається при дії на нього обох антисироваток. Таким чином, фітопатогенні бактерії P. carotovorum мають серологічно споріднені білки у складі бактеріоцинів і бактеріофага ZF-40, які, очевидно, пов'язані з їх лізуючою або кілерною активністю.

L. A. Maksymenko, S. I. Voychuk, T. V. Ivanytsia

Serological relationship between bacteriocins such as phage tail-like particles (MCTV) and bacteriophage ZF-40 of *Pectobacterium carotovorum*

The electron microscopy method shows that the treatment of bacteriophage ZF-40 by antiserum prepared to bacteriocins such as phage tail-like particles of Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum leads to the aggregation of phage particles. Treatment with a mixture of bacteriocins by rabbit antiserum prepared to bacteriophage ZF-40 causes a precipitation of bacteriocins of such type as "sheaf" which are interconnected with surfaces side by side. Long tubes appear, which are connected by ends of MCTV. In addition, there were the formations of large aggregates of spherical particles with different sizes of heads. Neutralization of the lysing activity of bacteriophage ZF-40 occurs when it is treated by both antisera. Thus, the phytopathogenic bacteria Pectobacterium carotovorum have a serologically related proteins in the bacteriocins and bacteriophage ZF-40, which are obviously involved in their lysing or killer activity.