

Л. А. Максименко, Н. И. Пархоменко

Серологически родственные белки в составе бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков и бактериофага ZF-40 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

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

С помощью кроличьей антисыворотки, полученной к каротоворицинам типа фаговых хвостовых отростков (MCTV) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* J2, а также антисыворотки к структурным белкам бактериофага ZF-40 методом перекрестной реакции двойной иммунодиффузии в агарозном геле получены полосы преципитации, что свидетельствует о наличии серологически родственных белков в бактериоцинах *P. carotovora* и в составе бактериофага ZF-40. Методом иммуноблоттинга с использованием антисыворотки, полученной к MCTV, выявлены серологически родственные белки с молекулярной массой 78, 56, 39, 20 и 18 кД у бактериоцинов из разных штаммов *P. carotovora* и 72 и 39 кД у бактериофага ZF-40. Возможно, серологически родственные белки MCTV и ZF-40 сопряжены с их киллерной специфичностью.

При лизогенной индукции некоторые штаммы фитопатогенной бактерии *Pectobacteria carotovora* (ранее *Erwinia carotovora*) продуцируют фаговые отростки, макромолекулярные каротоворицины (MCTV), обладающие киллерной активностью относительно близкородственных энтеробактерий [1–3]. На основании полипептидного состава бактериоцинов и их киллерной специфичности у *P. carotovora* обнаружено несколько различных биологически активных неполных умеренных бактериофагов типа фаговых хвостовых отростков [4]. Ранее нами методом Оухтерлони были выявлены серологически родственные белки в составе бактериоцинов, выделенных из бактерий *E. carotovora* разных экологических ниш [5]. Однако механизмы образования множественных профагов у бактерий *P. carotovora*, их взаимосвязь и экологическая роль пока еще мало исследованы.

В литературе есть данные о родственности между бактериофагами P2, PS17 и R-пиоцинами *Pseudomonas aeruginosa* [6, 7]. Так, методом иммуноблота показано, что с помощью сыворотки, полученной к белкам бактериофага PS17, выявляются фаговые белки в составе пиоцина R2 *P. aeruginosa* [6]. В связи с этим нашей целью было с помощью антисывороток, полученных к бактериоцинам *P. carotovora* и бактериофагу ZF-40, используя иммунологические методы, определить, какие именно серологически родственные белки выявляются в составе MCTV и ZF-40.

Выращивание бактериальных клеток, их последующее подрачивание и индукцию бактериоцинов проводили как описано в [8]. Далее, к лизату добавляли 50% сульфата аммония в присутствии 0,1 М NaCl. Преципитат частиц каротоворицинов осаждали центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин. Осадки ресуспендировали в А-буфере с добавлением 20 мМ MgSO₄. Для избавления от возможной примеси фрагментов нуклеиновых кислот суспензию обрабатывали РНКазой и ДНКазой из расчета 1 мкг/мл, 30 мин при 37 °С.

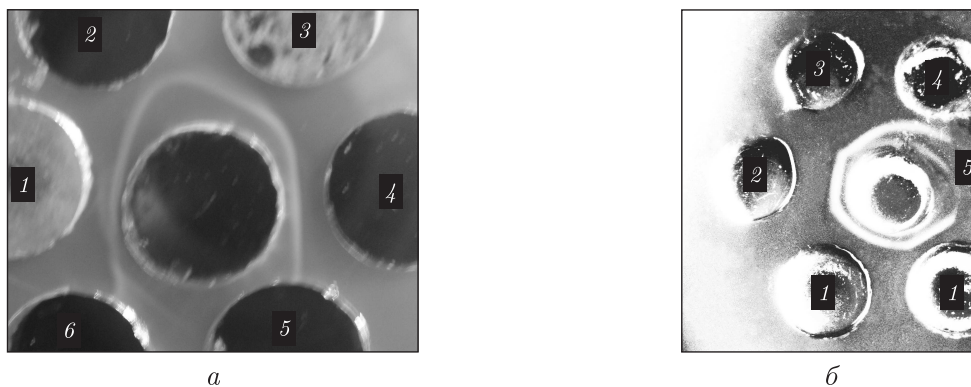


Рис. 1. Реакция иммунопреципитации белков бактериоцинов и бактериофага ZF-40 методом Оухтерлони с антисывороткой, полученной к ZF-40 (а) и к МСТV (б):

1, 2 — МСТV разных штаммов *P. carotovora*; 3, 4 — бактериофаг ZF-40; 5, 6 — контроль (5 — бактериофаг T4, 6 — низкомолекулярные бактериоцины CCTV)

Смесь бактериоцинов разделяли в роторе SW-40 центрифуги Beckman при 30 000 об./мин в течение 4 ч в сахарозном градиенте (5–20%), содержащем 20% спирта в 0,01 М *трис*-HCl буфере, pH 7,2. Осадки каротоворицинов ресуспендировали, диализировали против физраствора и использовали для дальнейших исследований. Бактериофаг ZF-40 получали методом слитного лизиса [9]. К бактериофагу ZF-40 и бактериоцинам *P. carotovora* штамма J2 получали кроличьи антисыворотки как описано [5], и серологическое родство белков определяли по Оухтерлони [10].

Иммуноблоттинг белков осуществляли по методу Тоубина и соавт. [11] с некоторыми модификациями. В качестве контроля в иммунохимической реакции использовали белки бактериофага T4. Бактериофаг T4 выращивали с использованием в качестве хозяина бактерии *E. coli* B, руководствуясь методикой [12]. Очистку бактериофага T4 проводили как описано в [13].

После электрофоретического разделения в ПААГ белковые полосы переносили на нитроцеллюлозный фильтр Schleicher & Schul 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 МСТV. Сыворотку разводили в 100 раз вышеуказанным буфером. Фильтры выдерживали в сыворотке в течение ночи при комнатной температуре и постоянном встряхивании. После этого нитроцеллюлозу пятикратно промывали в буфере без антител, затем 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. Реакцию проводили при комнатной температуре и постоянном встряхивании. Спустя 2 ч фильтры промывали в 20 мМ *трис*-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 0,14 М NaCl. Для выявления серологически родственных белков фильтры помещали в раствор бензидина в вышеуказанном буфере и 0,03% H₂O₂. Реакцию проводили в течение 10–40 мин при комнатной температуре. Для остановки реакции фильтры помещали в воду.

В результате проведенной реакции иммунодиффузии оказалось, что с сывороткой, полученной к бактериофагу ZF-40, прореагировали как белки, входящие в структуру бактериофага ZF-40, так и белки каротоворицинов (рис. 1, а). Аналогичные результаты получены с использованием антисыворотки против МСТV (см. рис. 1, б).

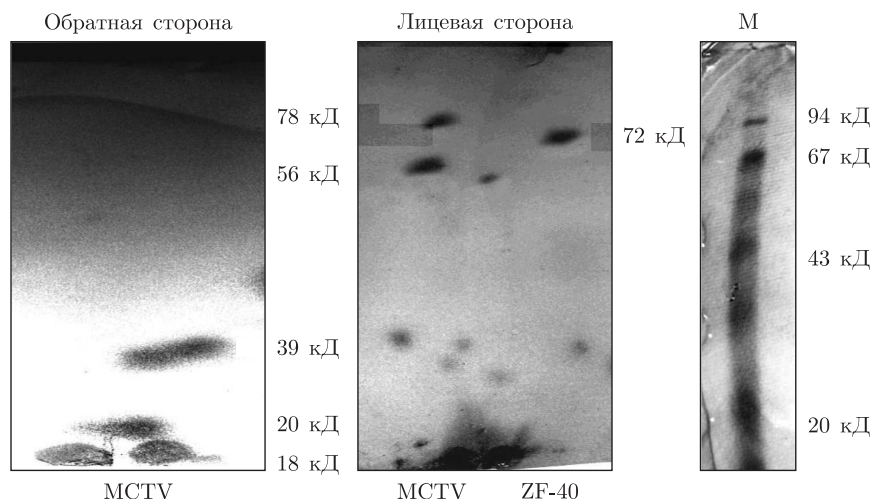


Рис. 2. Серологически родственные белки у бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков *P. carotovora* и бактериофага ZF-40, выявленные методом иммуноблоттинга с использованием антисыворотки к МСТV

Методом иммуноблоттинга с использованием антисыворотки к белкам МСТV были выявлены серологически родственные белкам МСТV структурные белки бактериофага ZF-40 с молекулярной массой 72 и 39 кД (рис. 2). Причем в составе МСТV с помощью гомологичной для них сыворотки были обнаружены серологически родственные белки с молекулярной массой около 78, 56, 39, 20 и 18 кД. Низкомолекулярные белки особенно хорошо проявились с обратной стороны миллипорового фильтра, а высокомолекулярные — с лицевой стороны (см. рис. 2).

В качестве контроля использовали бактериофаг Т4. Однако при использовании антисыворотки к бактериоцинам *P. carotovora* не выявлено серологически родственных белков в составе Т4. Очевидно, что структурные белки бактериофага Т4 не имеют в своем составе последовательностей, серологически идентичных или родственных белкам МСТV и ZF-40. Это может свидетельствовать в пользу того, что серологически родственные белки МСТV и ZF-40 являются сугубо специфичными для бактериофагов *P. carotovora*.

Электрофоретический анализ белков частиц макромолекулярных бактериоцинов в ПААГ показал, что они включают от 10 до 15 полипептидов с молекулярной массой от 20 до 91 кД [4]. МСТV мало отличаются между собой по молекулярной массе мажорных белков. Некоторое отличие наблюдается относительно минорных компонентов. Белок стержня бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков, полученных из *E. carotovora* штаммов J2 и Esp 78, имеет молекулярную массу 19–20 кД. Внутренний белок стержня с аналогичной молекулярной массой содержит хвостовые отростки бактериофагов ZF-40 *Erwinia carotovora*, Т4 *Escherichia coli* и RS17 *Pseudomonas aeruginosa*. Из литературных источников известно, что пиоцин R2 *P. aeruginosa* имеет в своем составе белки, идентичные таким хвостового отростка бактериофага PS17. В частности, белок фибрилл — 78 кД, мажорный белок хвоста — 40 кД и фибриллярный белок — 36 кД [6]. Есть также свидетельство о генетическом родстве между бактериофагом P2 и пиоцинами R-типа у *P. aeruginosa* [7].

У бактериофагов Т4, PS17, ZF-40, а также у высокомолекулярных бактериоцинов *P. carotovora* основные структурные белки хвостовых отростков имеют соответственно такие значения: белок футляра — 71, 40, 31 и 50 кД, внутренний белок стержня — 19–20 кД и белки

фибрилл — 66, 72, 76, 78 кД у бактериофагов и 68, 72, 78 кД у бактериоцинов. Известно, что именно белки фибрилл определяют специфичность адсорбции каротоворицинов.

Таким образом, в составе структурных белков бактериофага ZF-40 и бактериоцинов методом Оухтерлони выявлены серологически родственные белки. В составе различных МСТV с помощью гомологичной для них сыворотки обнаружены серологически родственные белки с молекулярной массой около 78, 56, 39, 20 и 18 кД. Методом иммуноблоттинга с использованием антисыворотки к белкам МСТV выявлены серологически родственные им структурные белки бактериофага ZF-40 с молекулярной массой 72 и 39 кД. Эти белки специфичны для бактериофагов *P. carotovora*. Возможно, что наличие или отсутствие тех или иных серологически родственных белков сопряжено с их киллерной активностью.

1. *Nguyen A. H., Tomita T., Hirota M. et al.* A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – **63**, No 10. – P. 1360–1369.
2. *Strauch E., Kaspar H., Schaudinn C. et al.* Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, No 12. – P. 5634–5642.
3. *Thaler J.-O., Baghdiguian S., Boemare N.* Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus* // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – **61**, No 5. – P. 2049. – 2052.
4. *Товкач Ф. И., Максименко Л. А.* Полипептидный состав и киллерная специфичность как показатели множественности каротоворицинов // Микробиол. журн. – 2010. – **72**, № 5. – С. 41–48.
5. *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.
6. *Shinomiyama T., Ina S.* Genetic Comparison of Bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-Type Pyocin // J. Bacteriol. – 1989. – **171**, No 5. – P. 2287–2292.
7. *Nakayama K., Takashima K., Ishihara H. et al.* 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.
8. *Товкач Ф. И.* Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767–774.
9. *Панцина А. И., Товкач Ф. И., Романюк Л. В., Максименко Л. А.* Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 15–22.
10. *Ouchterlony O.* Antigen-antibody reactions in gels // Handbook of immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. – Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1968. – P. 37.
11. *Towbin H., Staehelin 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. *Выращивание T-четных бактериофагов* // Практикум по общей вирусологии / Под ред. И. Г. Атабекова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1981. – С. 30–34.
13. *Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж.* Очистка фага // Генетика бактерий. – Москва: Мир, 1984. – С. 63–65.

Л. О. Максименко, Н. Й. Пархоменко

Серологічно споріднені білки у складі бактеріоцинів типу фагових хвостових відростків і бактеріофага ZF-40 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

За допомогою кролячої антисироватки, одержаної до каротоворицинів типу фагових хвостових відростків (MCTV) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* J2, а також антисироватки до структурних білків бактеріофага ZF-40 методом перехресної реакції подвійної імунодифузії в агарозному гелі одержані смуги преципітації, що свідчить про наявність серологічно споріднених білків у бактеріоцинах *P. carotovora* і в складі бактеріофага ZF-40. Методом імуноблотингу з використанням антисироватки, одержаної до MCTV, виявлені серологічно споріднені білки з молекулярними масами 78, 56, 39, 20 і 18 кД у бактеріоцинів з різних штамів *P. carotovora* та 72 і 39 кД у бактеріофага ZF-40. Можливо, серологічно споріднені білки MCTV і ZF-40 пов'язані з їх килерною специфічністю.

L. A. Maksymenko, N. I. Parkhomenko

Serological related proteins in the composition of phage-tail-like bacteriocins and bacteriophage ZF-40 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

With the help of rabbit antiserum obtained to phage-tail-like carotovorycine (MCTV) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* J2 and antiserum to structural proteins of bacteriophage ZF-40 by the method of cross-linked double immunodiffusion in agarose gel, the strands of precipitation are obtained that are in agreement with the presence of serological related proteins of bacteriocins *P. carotovora* and proteins of bacteriophage ZF-40. By the method of immunoblotting with the use of antiserum obtained to MCTV, the serologically related bacteriocin proteins with mol. masses 78, 56, 39, 20, and 18 kD and those with 72kD and 39kD of bacteriophage ZF-40 are discovered. It is possible that the serological related proteins of MCTV and ZF-40 are connected with their killer specificity.