

[DOI: 10.34617/54hk-q635](https://doi.org/10.34617/54hk-q635)

УДК 599.735.51:578.4:579.6

**АНАЛИЗ КОЛИФАГОВ ЗУБРОВ НА НАЛИЧИЕ
АНТИРЕСТРИКЦИОННЫХ СИСТЕМ
ANALYSIS OF WISENTS COLIPHAGES FOR THE
PRESENCE OF ANTIRESTRICTION SYSTEMS**

Никулин Никита Алексеевич,

Михаил Григорьевич Шляпников, канд. биол. наук,

Зимин Андрей Антонович, канд. биол. наук

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.

Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино, Российская Федерация,

Nikulin Nikita Alekseevich,

Nikulin Nikita Alekseevich,

Mikhail Grigorievich Shlyapnikov, Ph. D. Biol. Sci.,

Andrey Antonovich Zimin, Ph. D. Biol. Sci.

G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology

of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushino

Russian Federation.

Аннотация: в данной работе были исследованы колифаги зубров (*Bison bonasus*) Центрального зубрового питомника Приокско-Тerrasного биосферного заповедника на способность противостоять системам рестрикции-модификации бактерий-хозяев методом ограничения роста на изогенных штаммах *Escherichia coli* с данными системами для разработки метода отбора фагов для антибактериальной терапии.

Ключевые слова: *Bison bonasus*; колифаги; системы рестрикции-модификации; *Escherichia coli*

Abstract: in this study, coliphages of the wisents of the Bison Breeding Centre of the Prioksko-Terrasny Nature Biosphere Reserve were investigated for the ability to resist the restriction-modification systems of host bacteria by growing on isogenic *Escherichia coli*

strains with these systems to develop a phage selection method for antibacterial therapy.

Key words: *Bison bonasus*; coliphages; restriction-modification systems; *Escherichia coli*

Для защиты от систем рестрикции-модификации (RM-системы) бактерий-хозяев бактериофаги в процессе коэволюции приобрели системы антирестрикции, которые позволили обезопасить вирусную ДНК от пагубного действия эндонуклеаз. Одним из широко изученных представителей фагов, обладающих данной системой, является фаг T4. В составе его генома имеется несколько генов, кодирующих белки, обладающие антирестрикционным действием: g42 (тимидилатсинтаза, гидроксиметилирует дЦМФ), a-gt и b-gt (гликозилтрансферазы, гликозилируют гидроксиметилцитозин), arg (белок Arg, ограничивает действие специфической эндонуклеазы рестрикции, воздействующей на сайты с необычными основаниями). Стоит отметить, что с ДНК с неканоническим составом связаны и другие белки, которые, например, увеличивают пул дЦМФ и снижают пул дЦТФ (таким образом, увеличивая пул гидроксиметилированного дЦТФ), а также блокируют транскрипцию обычной ДНК или разрезают ее [4].

По литературным данным некоторые из этих белков (а также белок, собственно модифицирующий дЦМФ) критично снижают частоту трансдукции бактериофага T4, что является важным пунктом при создании препарата, используемого в антимикробной терапии [2,5]. Таким образом, имеется необходимость в методе, позволяющем отбирать T4-подобные фаги и бактериофаги с другими системами антирестрикции для дальнейшего изучения и отбора наиболее подходящих в качестве средства борьбы с патогенными штаммами *Escherichia coli* краснокнижного вида *Bison bonasus* и КРС.

Методика. В ходе предыдущих работ были получены очищенные изоляты бактериофагов фекалий зубров Приокско-Тerrasного государственного природного биосферного заповедника имени Михаила Зabloцкого [1].

ПЦР для определения принадлежности к группе T4-родственных фагов, а также к виду T4 проводились в объеме 15 мкл (концентрация праймеров 10 мМ каждый, концентрация дНТФ 200 мкМ каждый, 2 единицы активности ДНК-полимеразы, 2 мкл лизата, 1-кратный буфер для полимеразы В305). В этой реакции использовали праймеры MZIA1bis и MZIA6 [3]. Для идентификации бактериофага T4 использовали специфичные для консервативной области его генома праймеры hocFR: 5'-ttgaaTTCAGCAAGATGCTTCCGG-3' и inhRC: 5'-ttatcgATCGGTCCAGTGCGTTTAGC-3' (строчными буквами указана некомплиментарная последовательность для клонирования).

Для проверки наличия систем антирестрикции у бактериофагов зубров использовали метод ограничения роста на изогенных штаммах с присутствующими или отсутствующими системами рестрикции-модификации. Для этого готовили питательную среду LB с 1,5 % и 0,7 % агаром. До половины объема чашки Петри наливали плотную питательную среду и давали ей застыть. Полужидкую среду разливали по стерильным стеклянным пробиркам в объеме 4,5 мл. Перед началом эксперимента расплавляли полужидкую среду на водяной бане, а затем ставили пробирки в водяной термостат (температура 44°C). В эти пробирки добавляли штаммы бактерий, затем производили перемешивание в руках под углом 45° и равномерно распределяли содержимое на застывшую плотную питательную среду в чашке Петри. В качестве чувствительных штаммов использовали парные изогенные штаммы *Escherichia coli* 5KRI (присутствует RM-система EcoRI), 5K (отсутствует данная система) и Jc5183/pLG13/ (присутствует RM-система EcoRV), Jc5183 (отсутствует).

При помощи автоматической одноканальной механической пипетки отбирали 5 мкл очищенного фагового лизата и производили накапывание на застывшую полужидкую питательную среду с чувствительным штаммом. Капле давали подсохнуть, а затем инкубировали чашки при 37°C в течение ночи. На следующий день проверяли результаты, учитывая наличие или отсутствие литических пятен на парных штаммах.

Для проверки данного спот-теста альтернативно производили учет изменения титра методом Грация на парных изогенных штаммах.

В качестве контрольных штаммов использовались вирусы кишечной палочки T4wt, RB43, RB49, T2L и λ vir

Результаты исследования и их обсуждение. При анализе метода ограничения роста фагов на изогенных штаммах с RM-системами и без, контрольные бактериофаги показали следующие результаты: T4wt, T2L (T4-подобный фаг), RB49 (T4-родственный фаг) образуют литические пятна на всех штаммах, RB43 образует мутное литическое пятно на штаммах с системами RM, при этом его титр уменьшается на 2 порядка, λ vir (фаг другой группы, ДНК с обычным цитозином) не образует литические пятна на штаммах с RM-системами. Данный метод также позволяет оценить чистоту лизата, как на загрязненность бактериями (на литическом пятне образуются колонии микроорганизмов), так и другими фагами (происходит диссоциация на литическом пятне, свойственно не для всех проб). При проверке самого метода, при помощи сравнения с методом Грация, результаты совпали. Более того, спот-тест является более быстрым, менее затратным по реактивам, а также он позволяет выявлять загрязнения, которые нельзя обнаружить при помощи метода двойных агаровых слоев.

Первоначально бактериофаги из кишечника зубров были выделены с чувствительных штаммов *Escherichia coli* С600 и В, что отражено в предыдущих работах [1]. Анализ этих вирусов на ограничение роста показал, что рост всех фаги (15 вирусов), выделенные на С600, полностью ограничивается на штаммах с RM-системами. Со штамма В лишь 4 бактериофага не росли на данных бактериях, остальные 8 росли без ограничения. Анализ на наличие генетических маркеров показал, что все вирусы, чей рост не ограничивался на штаммах с RM-системами, являются T4-подобными, в дальнейшем было определена их принадлежность к виду T4.

Таким образом, полученные фаги являются перспективными объектами для фаговой терапии зубров и КРС.

Выводы. Нами были проанализированы 26 бактериофагов, выделенных из фекалий зубров. Выявлено, что в качестве чувствительного штамма для отбора фагов с системами антирестрикции более подходящим штаммом является *Escherichia coli* В, нежели С600. Метод ограничения роста бактериофагов на парных изогенных штаммах с присутствующими или отсутствующими системами рестрикции-модификации, проверяемый накапыванием на поверхность питательной среды LB с концентрацией агара 0,7% с чувствительным штаммом, при сравнении с методом Грациа оказался оптимальным для скрининга бактериофагов при поиске антирестрикционных систем. При анализе 26 фагов из фекалий зубров, 15 вирусов со штамма *Escherichia coli* С600 на бактериях с системами рестрикции-модификации не росли, как и 3 вируса со штамма В, 8 же со штамма В образовывали литические пятна, такие же, как и на изогенных штаммах с отсутствующими RM-системами. По результатам проверки генетических маркеров, все 8 вирусов оказались Т4, таким образом, они являются перспективными для фаговой терапии краснокнижных зубров.

Список литературы

1. Зимин, А.А. Изучение бактериофаговой флоры европейских зубров *Bison bonasus* (L,1758) и американских бизонов *Bison bison* (L,1758) (Bovinae, Bovidae, Artiodactyla) Приокского террасного государственного заповедника / А.А. Зимин, Н.А. Никулин, В.И. Землянко : материалы III-й Пущинской школы-конференции; Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов; с 7 по 11 декабря 2016 года, Пущино. Московская область.– С. 141-143

2. Никулин, Н. А. Конструирование терапевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа: преимущества и недостатки / Н.А. Никулин, С.И. Кононенко, А.Г. Кощаев, А. А.Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – №. 133.

3. Filée, J. et al. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere //Proceedings of the

National Academy of Sciences. – 2005. – Т. 102. – №. 35. – С. 12471-12476.

4. Petrov, V. M. et al. Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution //Virology journal. – 2010. – Т. 7. – №. 1. – С. 292.

5. Young, K. K. et al. Genetic analysis of bacteriophage T4 transducing bacteriophages //Journal of virology. – 1982. – Т. 41. – №. 1. – С. 345-347.

[DOI: 10.34617/gc5d-wt32](https://doi.org/10.34617/gc5d-wt32)

УДК 636.2.087.8:612.017.1:579.67:591.11

**ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ
ТЕТРАЛАКТОБАКТЕРИН НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ
И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ
ТЕЛЯТ-МОЛОЧНИКОВ**

**EFFECT OF PROBIOTIC SUPPLEMENT OF
TETRALACTOBACTERIN ON NONSPECIFIC
RESISTANCE, HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
VALUES OF BLOOD OF MILK-FED CALVES**

Овчарова Анастасия Никитовна, канд. биол. наук
Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания животных – филиал
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», г. Боровск, Российская
Федерация,

Ovcharova Anastasia Nikitovna, Cand. Biol. Sc.
All-Russian research Institute of physiology, biochemistry
and animal nutrition - branch of the Federal research centre
of animal husbandry – named after academician L. K. Ernst, Bo-
rovsk, Russian Federation.

Аннотация: в результате опыта на 20-дневных телятах ус-
тановлено иммуномодулирующее действие пробиотического