

Е. Д. Крылова, Т. В. Иваница, Ф. И. Товкач

**Применение многокомпонентного
электрофоретического анализа для исследования
вирусоподобных частиц *Erwinia carotovora***

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

*For the first time, a method of multicomponent electrophoretic analysis for the research of *Erwinia carotovora* virus-like-particles (VLP) has been proposed. VLP have been obtained in the way of lysogen induction of *E. carotovora*. This method is also effective in the analysis of native spherical virions, capsids, and phage-tail-like bacteriocins. It has allowed us to separate and to identify macromolecular carotovoricins specific against *Escherichia coli* and *E. carotovora*.*

Ранее было показано [1, 2], что множественная дефектная лизогения может рассматриваться в качестве одного из видовых признаков важной фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*. При лизогенной индукции ее клетки синтезируют отдельные компоненты фагового вириона — капсиды, базальные пластины и хвостовые отростки. Последние способны убивать родственные бактерии, а также некоторые лабораторные штаммы *Escherichia coli* и носят название макромолекулярных каротоворицинов — МСТV [1]. Большое разнообразие, наряду с неспособностью формировать целостный вирион [1, 2], во многом затрудняет исследование вирусоподобных частиц (VLP) эрвиний. В связи с этим их экологическое значение и, особенно, их роль в формировании патогенности *E. carotovora* до сих пор остаются неизученными.

Представленная работа имеет отношение к начальному этапу решения указанной проблемы, цель которого состояла в использовании многокомпонентного электрофоретического анализа VLP в гелях агарозы.

В качестве источника вирусоподобных частиц использовали референсный штамм *E. carotovora* subsp. *carotovora* Ec153 = ATCC 15359 = NCPPB 1847. Биологическая активность каротоворицинов в налидиксовых лизатах этой бактерии была определена с применением двух индикаторных штаммов *E. carotovora* M2-4/50RI и *E. coli* C600 [1]. Для этого с мест нанесения препаратов МСТV на двухслойные индикаторные чашки, после инкубации их при оптимальных условиях роста индикаторных культур в течение 18 ч, вырезали агаровые блочки размером 5 × 5 × 3 мм. Блочки помещали в стерильный буфер А на 5 ч при 4 °С. Далее определяли титр выживших клеток и соотносили его с концентрацией газонных клеток, которые не подвергались воздействию бактериоцинов. Киллерную активность бактериоцинов выражали через величину

$$КА = -\ln \frac{B}{B_0},$$

где B/B_0 — выживаемость бактерий, B_0 и B — концентрация клеток в блочке, отобранном с бактериального газона и негативного пятна, формируемого МСТV, соответственно. В этом случае одна единица активности соответствует 37% выживаемости или e^{-1} [3].

Для анализа VLP-частиц, содержащих ДНК, использовали метод, в котором их идентификация основана на окраске этидий бромидом [4]. Для разделения любых VLP-частиц, в том числе и свободных от нуклеиновых кислот, впервые использовали 0,8–1,0% гели агарозы для изоэлектрофокусирования белков (Agarose for Isoelectric Focusing type VIII, “Sigma”, А-4905) и стандартную *tris*-фосфатную буферную систему [5], без Na₂ЭДТА. Горизонтальный электрофорез проводили при напряженностях постоянного электрического поля 6–11 В/см. Затем гелевую пластину переносили в емкость и выдерживали 30 мин в фиксирующем растворе, содержащем сульфосалициловую и трихлоруксусную кислоты в концентрациях 5 и 10% соответственно. Далее гель дважды отмывали по 15 мин в обесцвечивающем растворе: 35% этанола и 10% уксусной кислоты. После этого перенесенный на стекло гель накрывали несколькими слоями фильтровальной бумаги и высушивали под прессом 1 кг в течение 12–18 ч. Высушенный гель окрашивали 0,2% Coomassie Blue R 250 (Blue R C.I., “Serva”, 42660) 5–10 мин и отмывали в обесцвечивающем растворе. Гели фотографировали на пленку Микрат 300 или сканировали, получая их цифровые изображения.

Исследовали два типа вирусоподобных частиц *E. carotovora* Ec153. Первый тип VLP получали методом ультрацентрифугирования [2], другой — в результате концентрирования бактериальных лизатов и разделения частиц с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (DEAE 23 SS, “Serva”, 09047). Через колонку диаметром 1,6 см и высотой 32,5 см, уравновешенную буфером NaP (0,02 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0), пропускали 700 мл лизата клеток, полученного после лизогенной индукции каротоворицинов налидиксовой кислотой [1]. В составе каждой фракции определяли наличие белка и опалесценции, характерной для растворов вирусных частиц. Киллерную активность фракций устанавливали методом негативных зон, образуемых частицами MCTV на газонах чувствительных бактерий.

Для сравнительного анализа в опытах использовали препараты фагов MS2, FE44 [6] и ZF40 [7] и MCTV EspZM-1 *E. carotovora* ZM-1 [1]. РНК-содержащий колифаг MS2 концентрировали и очищали, применяя один цикл дифференциального ультрацентрифугирования частиц в роторе SW41 при 35 000 об/мин в течение 90 мин. Концентрированные частицы других фагов и MCTV получали методом осветления лизатов [8].

Величину подвижности (EM) капсида типа C1 фага ZF40 [4] в геле агарозы условно принимали за единицу. Таким образом, все VLP, зафиксированные в виде электрофоретических полос в IEF-пластине, располагающиеся вблизи старта и выше полосы, соответствующей капсиду 1, будут иметь значение меньше единицы. Напротив, те частицы, у которых этот показатель больше единицы, будут отражены рефlekсами, находящимися ниже такового для капсида 1 (см. далее рис 1.)

Применение предлагаемого нами многокомпонентного электрофоретического анализа оказалось эффективным не только в случае VLP *E. carotovora*, но и для изучения нативных вирионов и промежуточных компонентов сборки фаговых частиц. Последние, как правило, представляют собой капсиды, заполненные нуклеиновой кислотой или “пустые” прокапсиды [4].

Как видно из электрофореграмм, приведенных на рис. 1, а, вирусные частицы *E. carotovora* Ec153 и ZM-1 и фаговые частицы характеризуются высокой подвижностью, которая является удовлетворительной для их обнаружения и анализа. Опыты показывают, что идентификация электрофоретических полос, соответствующих указанным макромолекулярным структурам, является более надежной в IEF-гелях, чем в гелях агарозы, традиционно при-

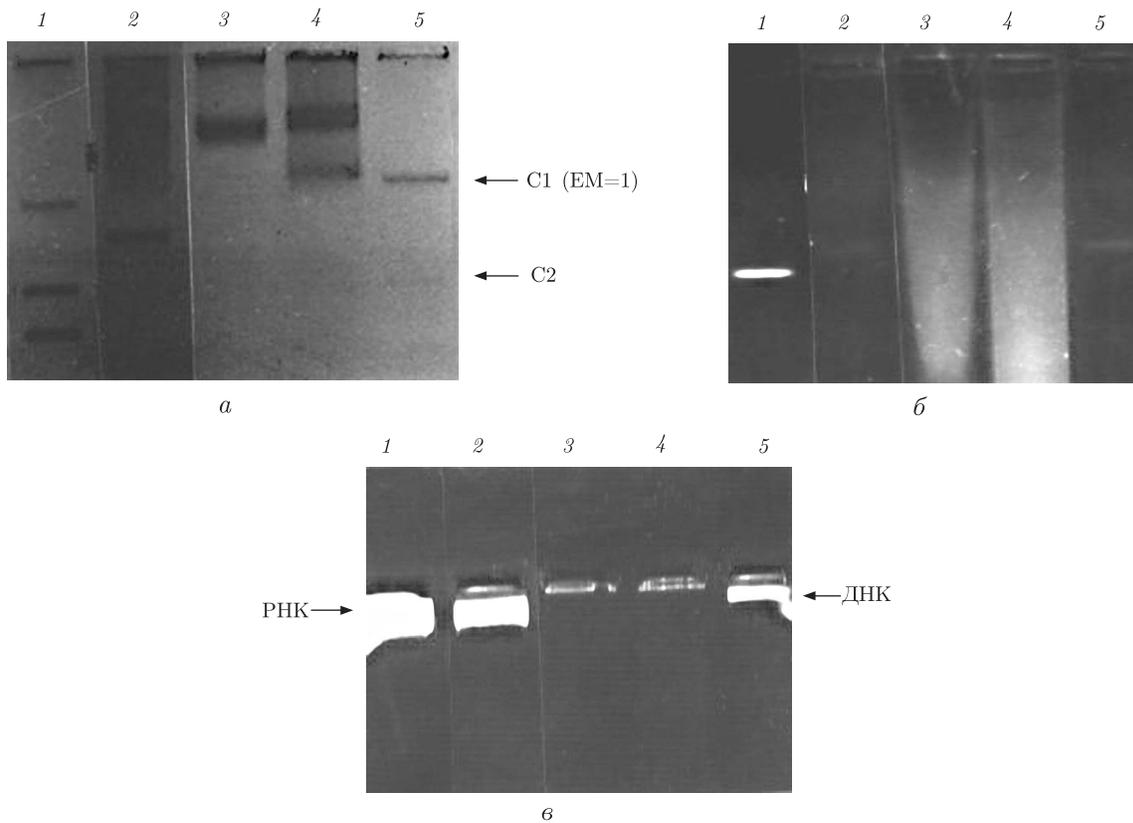


Рис. 1. Электрофореграмма вирионов, вирусоподобных частиц, ДНК и РНК в гелях агарозы для изоэлектрофокусирования. Гели окрашены Coomassie Blue R 250 и этидий бромидом — 1 мкг/мл, 20 мин (б и в). На рис. а и б препараты частиц: 1 — фага MS2, 2 — фага FE44, 3 — VLP *E. carotovora* ZM-1, 4 — VLP *E. carotovora* Ec153, 5 — фага ZF40. На рис. в — нуклеиновые кислоты, полученные из указанных препаратов с помощью 0,8% SDS. Стрелками отмечены положение капсида C1 с электрофоретической подвижностью (EM), принятой за единицу, и капсида C2 фага ZF40, а также положение полос ДНК и РНК

меняемой для разделения фрагментов ДНК. По нашим данным, это становится возможным за счет полной отмывки фона после фиксирования и окраски геля (см. рис. 1, а).

Исследование вирусоподобных частиц штамма Ec153 подтвердило множественность макромолекулярных каротоворицинов, установленных ранее с помощью электронной микроскопии [2]. Препараты индуцированных частиц этой бактерии характеризуются наличием трех беловых полос в геле IEF-агарозы (см. рис. 1, а, 4), которые располагаются выше макромолекулярной полосы капсида C1 фага ZF40 и имеют подвижности 0,44, 0,58 и 0,97. Два типа частиц с низкими значениями EM (0,44 и 0,58), вероятно, представляют собой фаговые хвостовые отростки палочковидной формы, которые по данным электронной микроскопии являются превалирующими компонентами препаратов VLP *E. carotovora*. Частицы третьего типа, по нашему мнению, имеют форму, отличную от палочковидной, так как их подвижность сравнима со сферическими частицами C1 диаметром 60 нм [7], а также с таковыми фага MS2 — значение EM равно 1,18 (см. рис. 1, а, 1). Не вызывает сомнений, что капсид C2 с EM 1,90 (см. рис. 1, а, 5) также имеет сферическую форму. Очевидно, что он, как и два сферических образования фага MS2 с подвижностями 1,90 и 2,29 (см. рис. 1, а, 1),

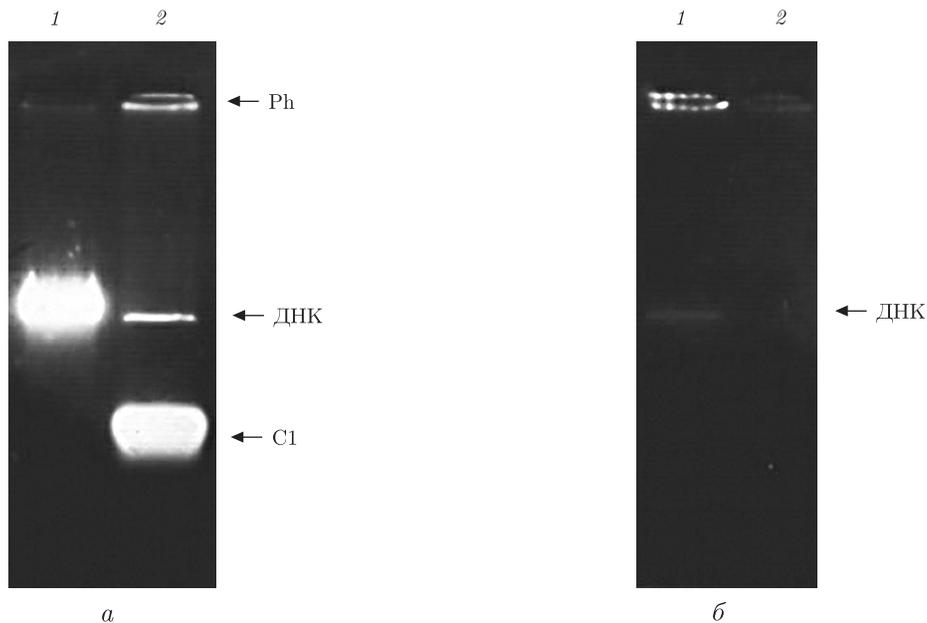


Рис. 2. Электрофореграмма молекул ДНК (1) и ДНК-содержащих частиц (2) фага ZF40 (а) и VLP *E. carotovora* Ec153 (б). Стрелками отмечены положения вирионов фага ZF40 (Ph), ДНК и капсида C1

представляет собой промежуточные продукты сборки вириона, которые воспроизводимо обнаруживаются с помощью предложенного метода.

Для того чтобы установить, какие частицы ассоциированы с нуклеиновой кислотой, IEF-гели окрашивали этидий бромидом. Один из таких гелей представлен на рис. 1, б, из которого видно, что в этом случае идентифицируются только ДНК-капсиды фагов FE44 и ZF40 (дорожки 2 и 5), а также частицы фага MS2, содержащие РНК (дорожка 1). При этом подвижность полос ДНК совпадает с таковой соответствующих белковых полос. В случае VLP эрвиний дискретные ДНК-полосы не обнаружены. Вместо них материал, имеющий отношение к нуклеиновым кислотам, выявляется в виде флуоресцирующих треков (см. рис. 1, б, 3, 4), которые слабо отмываются в воде или электрофоретическом буфере. Тем не менее в этих двух образцах также содержатся частицы, ассоциированные с молекулами ДНК. Их наличие подтверждает электрофореграмма, приведенная на рис. 1, в, на которой представлено разделение РНК (дорожка 1) и ДНК (дорожки 2–5), полученных при воздействии на частицы 0,8%-го додецилсульфата натрия (SDS) при 60 °С в течение 10 мин.

Как следует из рис. 1, скорость миграции нуклеиновых кислот в гелях IEF-агарозы является очень низкой по сравнению с таковой частиц вирусной природы. В связи с этим для более убедительной демонстрации VLP, содержащих ДНК, мы использовали 0,8–0,9%-ные гели агарозы NA (“Pharmacia”, 17–0554–03). Это позволило идентифицировать ДНК, ассоциированные с частицами, после обработки их SDS. Подвижность ДНК VLP Ec153 составляет 0,65 и совпадает с таковой контрольной ДНК фага ZF40, после разрушения капсида C1 и нативных вирионов (рис. 2).

Таким образом, использование электрофореза в нативных системах IEF- и NA-агарозы и соответствующих методов окраски белков и нуклеиновых кислот позволяют идентифицировать и исследовать любые частицы вирусной природы, которые способны мигрировать в данных гелях.

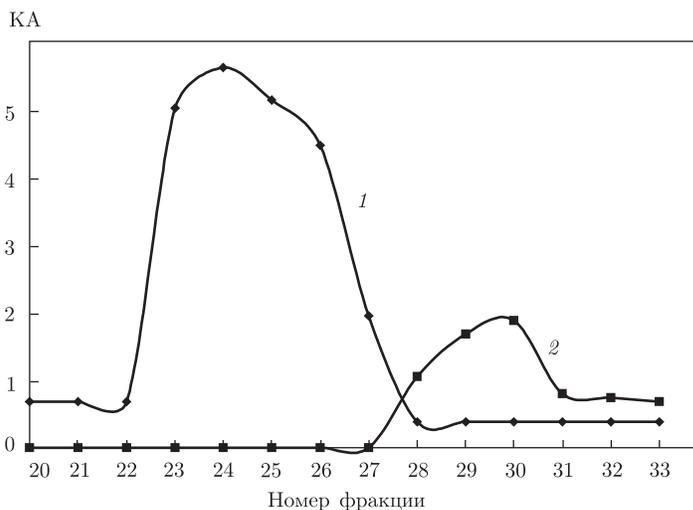


Рис. 3. Среднее значение киллерной активности (КА) МСТV *E. carotovora* Ec153, распределенных в DEAE целлюлозе, по отношению к *E. coli* C 600 (1) и *E. carotovora* M2-4/50RI (2)

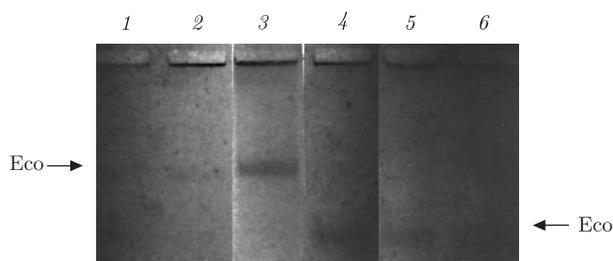


Рис. 4. Идентификация коли- и каротовораспецифичных МСТV с помощью IEF-геля. 1, 2, 4, 5 и 6 соответствуют фракциям 25, 26, 29, 30 и 31, которые отмечены на рис. 3. Контрольный образец (3) получен методом дифференциального центрифугирования. Стрелками отмечены колиспецифичные МСТV (Eco) и каротоворицины, убивающие *E. carotovora* (Ecc)

Далее эффективность предложенного анализа вирусных частиц апробировали с помощью разделения множественных VLP *E. carotovora* Ec153 на колонке с DEAE-целлюлозой. Для того чтобы соотнести киллерную активность с типом и формой частиц, ее количественно определяли в тех фракциях, которые были способны убивать индикаторные штаммы *E. carotovora* M2-4/50RI и *E. coli* C 600. В результате опытов установлено наличие двух пиков киллерной активности (рис. 3). Колиспецифичные МСТV типа фаговых хвостовых отростков были обнаружены во фракциях 22–28, полученных после промывки колонки 0,2 М раствором NaCl. Максимум этого пика, соответствующий фракции 23, выражен не вполне четко, что, скорее всего, свидетельствует о двух типах близкородственных киллеров, лизирующих клетки *E. coli*. Это предположение подтверждает электрофореграмма (см. рис. 1, а, 4), отражающая наличие двух белковых полос с близкими значениями EM — 0,44 и 0,58. Эти же полосы характерны и для отдельных фракций 25 и 26 (рис. 4, 2, 3).

Каротоворицины третьего типа убивают исключительно штаммы *E. carotovora*. В сравнении с колиспецифичными фаговыми отростками они имеют повышенное сродство к DEAE-целлюлозе, обладают большей подвижностью в гелях IEF-агарозы (см. рис. 1, а, 4; рис. 4, 5, 6, 7) и, очевидно, имеют другую форму частиц. Все три типа этих МСТV не содер-

жат ДНК. ДНК-содержащие VLP *E. carotovora* Ec153 предстоит детально изучить с помощью колоночной хроматографии, нативной белковой системы с применением IEF-агарозы и электронной микроскопии.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об эффективности предложенного многокомпонентного электрофоретического анализа вирусоподобных частиц, получаемых путем лизогенной индукции клеток *E. carotovora*. Его применение позволит установить роль VLP в экологии этой важной фитопатогенной бактерии.

1. Товкач Ф. И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767–774.
2. Товкач Ф. И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Там же. – 2002. – **71**, № 3. – С. 359–367.
3. Товкач Ф. И., Мороз С. Н., Гвоздяк Р. И. Изучение адсорбционных рецепторов макромолекулярных бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Микробиол. журн. – 2002. – **64**, № 3. – С. 20–26.
4. Иванюца Т. В., Товкач Ф. И. Предварительная характеристика ДНК-содержащих вирусоподобных частиц *Erwinia carotovora* // Там же. – 2007. – **69**, № 3. – С. 19–26.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
6. Товкач Ф. И. Молекулярно-биологические свойства вирулентного бактериофага FE44 // Доп. НАН України. – 2002. – № 6. – С. 176–179.
7. Товкач Ф. И. Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 1. – С. 75–81.
8. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. – Москва: Мир, 1984. – 176 с.

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

Поступило в редакцию 24.09.2007

УДК 547.313.2:581.13:581.143:582.542.11

© 2008

М. М. Щербатюк, Т. П. Маменко

Особливості виділення етилену міжвузлями кукурудзи (*Zea mays* L.)

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

The intensity of ethylene emission in growing maize stem internodes is studied. The most intensive ethylene biosynthesis in maize internodes is ascertained for the early stages of development (5 leaves), and the least intensive one – for older stages (a flowering of panicle). So, during the maize development, the high and low levels of ethylene accumulation are typical of, respectively, rapidly growing top internodes and lower internodes.

Ріст стебла злаків здійснюється за рахунок поділу та розтягування клітин у зонах інтеркалярного росту міжвузлів (рис. 1). На ранніх періодах розвитку стебло росте дуже повільно. У цей час його ріст забезпечується виключно поділом клітин. На пізніших етапах – поділом та розтягуванням, внаслідок чого швидкість росту значно зростає [1]. Звичайно регуляція ростових процесів рослин здійснюється шляхом формування концентраційних градієнтів