

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**JAUNIZDALĪTO *CEDECEA DAVISAE* INVICĒJOŠO
BAKTERIOFĀGU IZOLĒŠANA UN RAKSTUROŠANA**

Bakalaura darbs

Autors: Agneta Jonikāne

Stud. apl. Nr. aj19071

Darba vadītājs: MSc. biol. Ņikita Zrelavs

Zinātniskais konsultants: BMC vad. pētnieks Dr. biol. Andris Dišlers

Recenzents: Dr. biol. Jānis Rūmnieks

RĪGA 2022

SATURS

Saīsinājumi	4
Kopsavilkums	5
Summary.....	6
Ievads.....	7
1. Literatūras apskats	9
1.1. Bakteriofāgi	9
1.2. Bakteriofāgu dzīves cikli.....	11
1.3. Bakteriofāgu pielietojumi.....	14
1.4. Bakteriofāgu genomika	16
2. Materiāli, vielas un iekārtas.....	19
3. Metodes	22
3.1. Paraugu ievākšana	22
3.2. Baktēriju izolēšana	22
3.3. Fāgu izdalīšana	22
3.4. Fāga daļiņu skaita noteikšana jeb titrēšana (divslāņu agara metode).....	22
3.5. Individuāla fāga preparāta pagatavošana.....	24
3.6. Fāga pavairošana šķidrā barotnē.....	25
3.7. Fāga daļiņu gulsnēšana centrifugējot	26
3.8. Fāga preparātu transmisijas elektronmikroskopija.....	26
3.9. Fāga vai bakteriālās DNS izdalīšana (<i>Zymo Research Genomic DNA Clean & Concentrator-10 kit</i>)	27
3.10. DNS koncentrācijas novērtēšana ar NanoDrop spektrofotometru (ND-1000).....	28
3.11. Natīvā agarozes gēla elektroforēze (NAGE).....	28
3.12. DNS fragmenta izdalīšana no agarozes gēla (<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>)	29
3.13. DNS sekvenēšana ar Sangera metodi (<i>BigDye kit</i>)	30
3.14. Bakteriālā 16S rRNS gēna sekvenēšana.....	31
3.15. Fāga DNS šķelšana ar restriktāzēm.....	31

3.16. DNS fragmentu bibliotēkas sagatavošana (<i>TruSeq DNA Nano Low-Throughput Library Prep Kit</i>)	32
3.16.1. DNS fragmentēšana (sonikācija ar <i>Covaris S220</i>)	32
3.16.2. DNS fragmentu galu reparācija un atlase pēc garuma	33
3.16.3. 3' galu adenilēšana	34
3.16.4. Adapteru ligēšana	34
3.16.5. DNS fragmentu pavairošana.....	35
3.17. DNS koncentrācijas novērtēšana ar <i>Qubit</i>	35
3.18. Bioanalizators DNS fragmentu bibliotēku pārbaudei (<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>)..	36
3.19. Sekvenēšana (<i>Illumina MiSeq</i>).....	37
3.20. Sekvenēšanas datu apstrāde.....	37
4. Rezultāti un diskusija	40
4.1. Baktēriju un fāgu izolēšana	40
4.2. Baktēriju izolātu taksonomiskā piederība	41
4.3. Izolēto fāgu virionu morfoloģija	44
4.4. Inficētas un neinficētas <i>C. davisae</i> kultūras H1 kultivēšana šķidrā barotnē	45
4.5. Fāga Yanou stabilitāte pie dažādām vides pH vērtībām un dažādas temperatūras	47
4.6. <i>C. davisae</i> fāgu genomiskās DNS restrikcijas analīze	49
4.7. <i>C. davisae</i> fāgu genomu vispārīgs raksturojums.....	50
4.8. Fāga Yanou genoma anotēšana	51
4.9. Fāga Yanou taksonomiskā piederība.....	54
4.10. Fāga Yanou genoma fiziskie gali un pakošanās stratēģija	55
5. Secinājumi	58
6. Pateicības.....	59
7. Literatūras saraksts	60
Pielikumi.....	69

SAĪSINĀJUMI

Fāgs – bakteriofāgs

OD₅₄₀ – optiskais blīvums (*optical density*) pie starojuma ar viļņa garumu 540 nm

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction*)

bp – bāzu pāris

NAGE – natīvā agarozes gēla elektroforēze

TEM – transmisijas elektronmikroskopija

SDS – nātrija dodecilsulfāts (*sodium dodecyl sulfate*)

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

pfu/mL – inficētspējīgo fāgu vienību skaits/mL (*plaque forming units/mL*)

cfu/mL – kolonijas veidojošo vienību skaits/mL (*colony forming units/mL*)

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

RNS – ribonukleīnskābe

IK – indikator kultūra

SDTR – īsie tiešie terminālie atkārtojumi (*short direct terminal repeats*)

aa – aminoskābe (*amino acid*)

TerL – termināzes lielā subvienība

ORF – atvērtais nolasīšanas rāmis (*open reading frame*)

KOPSAVILKUMS

Darbā izolētas baktērijas no dažādu rožu dzimtas augļkopības kultūru augu lapām, kuras identificētas ar 16S rRNS gēna sekvenēšanas metodi. Izmantojot šīs baktērijas kā saimniekkultūras, tika izolēti 10 jauni dsDNS bakteriofāgi. Vēlāk ar *Cedecea davisae* baktēriju izolātu kā saimnieku no notekūdeņu paraugiem tika izolēti vēl 13 fāgi. Tālākai izpētei tika izvēlēts jaunizdalītais *Cedecea* fāgs Yanou. Fāgs Yanou ir *Autographiviridae* dzimtai, *Teseptimavirus* ģintij piederošs lītisks podovīruss ar 40865 bp garu genomu. Tas ir otrs līdz šim zināmais *Cedecea* ģints fāgs un pirmais raksturotais *Cedecea* lītiskais podovīruss. Bakteriofāga Yanou pilnais anotētais genoms deponēts GenBank brīvpieejas datubāzē ar nosaukumu “*Cedecea* phage Yanou” (piekļuves numurs: ON568193).

Atslēgvārdi: bakteriofāgi, *Cedecea davisae*, genoma sekvenēšana, genoma anotēšana, *Autographiviridae*, podovīruss.

SUMMARY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL *CEDECEA DAVISAE* INFECTING BACTERIOPHAGES

In this thesis, bacterial strains were isolated from leaves of different pomiculture *Rosaceae* plants and were identified using 16S rRNA gene sequencing. Using these bacteria as hosts ten new dsDNA phages were isolated. Later, thirteen additional phages were isolated from sewage samples using *Cedecea davisae* as the host. One of the phages was chosen for further characterization in greater detail – *Cedecea* phage Yanou. Yanou belongs to the *Autographiviridae* family, *Teseptimavirus* genus, it is a virulent podovirus with 40865 bp long genome. To our knowledge, phage Yanou is the second known *Cedecea* phage and the first characterized *Cedecea* virulent podovirus. Complete annotated genome sequence of phage Yanou was deposited to GenBank open-access database under the title “*Cedecea* phage Yanou” (accession number: ON568193).

Keywords: bacteriophages, *Cedecea davisae*, genome sequencing, genome annotation, *Autographiviridae*, podovirus.

IEVADS

Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, un tie ir biosfērā visizplatītākie bioloģiskie objekti. Tie ir sastopami visur, kur ir sastopamas baktērijas, – augsnē, ūdenī, dzīvnieku zarnu traktos, uz augiem utt. Pasaulē kopā varētu būt aptuveni 10^{31} fāgu virionu (Mushegian 2020), un līdz šim zināmie fāgi pēc genomiskajām nukleotīdu sekvencēm un to kodētajiem proteīniem ir ļoti daudzveidīgi. To evolūcija notiek ciešā saistībā ar baktērijām, un fāgiem ir svarīga loma horizontālajā gēnu pārnēsē. (Dion *et al.* 2020).

Fāgi ir nozīmīgi molekulārās bioloģijas attīstībā kā modeļsistēmas. Izmantojot fāgus, tika pierādīts, ka gēni ir veidoti no DNS (Hershey and Chase 1952) un ka ģenētisko kodu veido nukleotīdu tripleti (Crick *et al.* 1961), tika izolētas daudzas restriktāzes un izstrādāti gēnu inženierijas vektori. Fāgu genomi arī ir pirmie, kas ir tikuši sekvenēti, piemēram, MS2 (ssRNS), Φ X174 (ssDNS) un λ (dsDNS). Turklāt tieši saistībā ar fāgiem ir atklātas CRISPR-Cas sistēmas, kas paver plašas iespējas gēnu inženierijas nozarē (Salmond and Fineran 2015). Galvenie fāgu pielietojumi ir saistīti ar cīņu pret baktērijām un antimikrobiālo rezistenci. Tie tiek izmantoti medicīnā (fāgu terapija), pārtikas ražošanā, biotehnoloģijās (zāļu, vakcīnu izstrāde) un kā biosensori (Sharma *et al.* 2017).

Cedecea davisae ir gramnegatīvu, fakultatīvi anaerobu nūjiņveida baktēriju suga, kas pieder dzimtai *Enterobacteriaceae* (Grimont *et al.* 1981). Tā ir salīdzinoši rets, nosacīts patogēns, kuram līdz 2020. gadam ir tikuši aprakstīti 13 klīniskie gadījumi (Thompson and Sharkady 2020). Tā kā suga nav bieži sastopama, tad tai ir aprakstīts tikai viens fāgs ϕ Cd2018, kas tika izolēts maģistra darba ietvaros Dienvidkorejā (Jun-heon 2018). ϕ Cd2018 ir sifovīrusa morfortips un lizogēnais dzīves cikls. Tikmēr šī darba ietvaros tika sīkāk aprakstīts lītiskais *Cedecea* fāgs, kurš tika nosaukts par “Yanou” un kuram raksturīgs podovīrusa morfortips, tādējādi paplašinot esošās zināšanas par *Cedecea* fāgu daudzveidību.

Bakalaura darba ietvaros kopumā tika izolēti 23 jauni fāgu izolāti, no kuriem 14 ir izdalīti, izmantojot mūsu saimiekkultūru *C. davisae* H1. Sīkākai raksturošanai tika izvēlēts *C. davisae* fāgs Yanou (GenBank piekļuves numurs: ON568193).

Darba mērķis bija izolēt jaunus fāgus, pievēršot īpašu uzmanību fāgiem, kuru saimnieks ir retāk sastopams un ir ar mazu raksturotu fāgu skaitu. Jaunizolētie fāgi tika raksturoti morfoloģiski un genomiski, izmantojot mikrobioloģijas, molekulārās bioloģijas un bioninformātikas metodes.

Darba uzdevumi bija:

1. No vides paraugiem izolēt jaunas baktēriju kultūras, identificēt tās ar gandrīz pilna 16S rRNS gēna sekvenēšanu un salīdzināt ar šī paša gēna sekvencēm iepriekš aprakstītām baktērijām.
2. Izmantojot interesantākās izolētās baktērijas kā saimniekus, no vides izdalīt, pavairot un attīrīt jaunus fāgus.
3. Mikrobioloģiski raksturot jaunizdalīto bakteriofāgu pavairošanas iespējas un stabilitāti.
4. Sekvenēt jaunizdalīto fāgu pilnus genomus un veikt interesantākā fāga genoma funkcionālo anotēšanu.

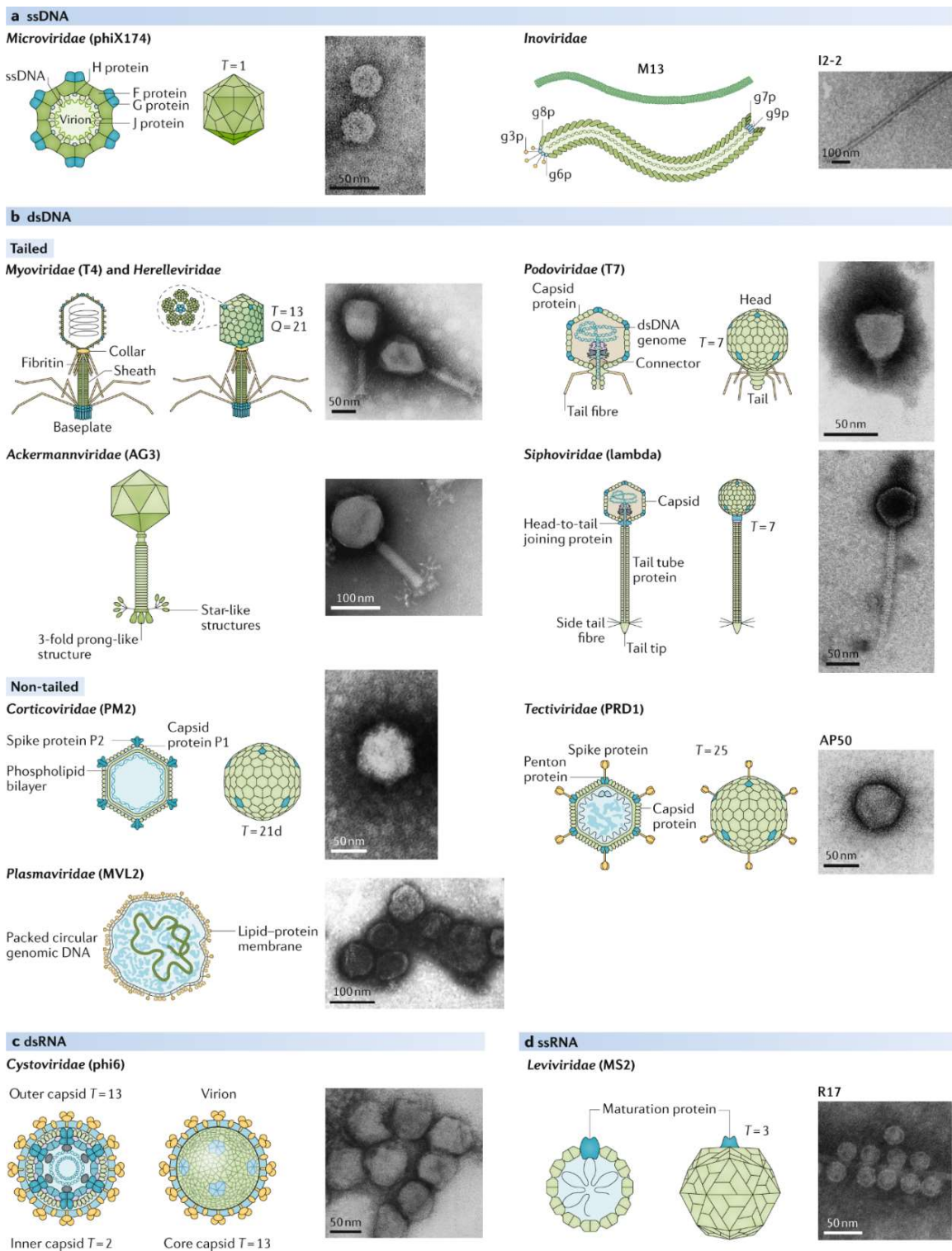
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Bakteriofāgi

Bakteriofāgi jeb fāgi ir obligāti iekššūnas parazīti, kas inficē tikai baktērijas. Fāgus neatkarīgi viens no otra atklāja divi zinātnieki – britu patologs Frederiks Tverts 1915. gadā (Tvert 1915) un franču-kanādiešu mikrobiologs Fēlikss d'Herells 1917. gadā (D'Herelle 1917). Kopš tā laika tie ir bijuši svarīgi bioloģiskie modeļi. Fāgu genomi ir pirmie, kuri tika sekvenēti, kā arī to pētījumu dēļ ir atklātas CRISPR-Cas sistēmas (Salmond and Fineran 2015). Tiem ir liela nozīme baktēriju gēnu horizontālajā pārnesē (Ohnishi *et al.* 2001).

Fāgi ir visizplatītākās bioloģiskās vienības biosfērā. Tiek lēsts, ka visā pasaulē ir 10^{31} vīrusveidīgo daļiņu (Mushegian 2020). Fāgi ir sastopami visur, kur ir sastopamas baktērijas. Jūras ūdeņos to daļiņu ir aptuveni $10^5 - 10^7$ uz mililitru (Wigington *et al.* 2016), cilvēka fēcēs ap 10^8 uz gramu (Hoyles *et al.* 2014), savukārt augsnē šis skaits var stipri atšķirties atkarībā no tās tipa – 10^3 līdz 10^9 vīrusveidīgo daļiņu uz gramu augsnes (Chevallereau *et al.* 2022).

Fāgu taksonomija ir nozare, kas nemitīgi mainās un attīstās, jo mūsdienās visu laiku tiek atklāti un raksturoti jauni fāgi. Vīrusu metagenomikas projektos tiek identificētas jaunas vīrusu nukleīnskābju sekvences, kas neatbilst līdz šim zināmajiem fāgiem, tāpēc regulāri tiek izveidoti jauni taksoni. Fāgu klasifikāciju veic Starptautiskā Vīrusu taksonomijas komiteja (ICTV), kura to papildina katru gadu. To dzimtas un kārtas vēsturiski, galvenokārt, tika iedalītas pēc genoma veida (RNS vai DNS, vienpavediena vai divpavedienu) un morfoloģijas. Lielākā vēsturiski bija *Caudovirales* kārtā, kurā ietilpa fāgi ar lineāru divpavedienu DNS (dsDNS) genomu un asti morfoloģiskajā uzbūvē (Dion *et al.* 2020). Gan jāņem vērā, ka pie tā, ka lielākā daļa raksturoto fāgu ir ar dsDNS genomu, ir vainojamas arī tradicionālās fāgu izolēšanas un sekvenēšanas metodes, ar kurām vieglāk ir raksturot tieši šos fāgus (Chevallereau *et al.* 2022). Pēc jaunākajiem datiem lielākā ir klase *Caudoviricetes*, kurā ietilpst četras kārtas, 33 dzimtas un 37 apakšdzimtas. Vēl fāgi ir atrodami daudzās citās vīrusu dzimtās, kas ietilpst dažādās kārtās un klasēs, un savā starpā atšķiras gan pēc genoma nukleīnskābes veida un sekvences īpatnībām, gan pēc virionu morfoloģijas (ICTV 2022).



1. attēls. Reprēzētatīvi bakteriofāgu virionu morfoloģijas un genomiskās nukleīnskābes tipi. a – vienpavediena DNS, b – divpavedienu DNS, c – divpavedienu RNS, d – vienpavediena RNS (Dion *et al.* 2020).

Figure 1. Diversity of representative phage morphology and genomic nucleic acid types. a – single-stranded DNA, b – double-stranded DNA, c – double-stranded RNA, d – single-stranded RNA (Dion *et al.* 2020).

1.2. Bakteriofāgu dzīves cikli

Visbiežāk ir sastopami divi fāgu dzīves cikli – lītiskais un lizogēnais. Tomēr novērojami ir vēl divi – pseidolizogēnais un hroniska infekcija. Pseidolizogēnais cikls notiek baktērijas šūnas stresa gadījumā, bet hroniska infekcija ir raksturīga pārsvarā pavedienveida fāgiem. Visiem ciklu veidiem ir kopīgas divas fāzes – adsorbcija un ģenētiskā materiāla ievadīšana saimniekšūnā. Savukārt dažādiem ciklu veidiem var būt raksturīgas vēl līdz trim fāzēm: virionu izveidošanās, saimniekšūnas lizēšana un jaunizveidotu fāgu daļiņu nonākšana apkārtējā vidē (Olszak *et al.* 2017).

Jebkurš fāgu dzīves cikls sākas ar adsorbciju. Tā notiek, fāgam pievienojoties receptoram uz baktērijas šūnas virsmas. Receptori var būt dažādas molekulas, piemēram, proteīni, ogļhidrāti, glikoproteīni, lipīdi un lipoproteīni, tomēr fāgi spēj arī pievienoties pie flagellām un pillām (Madigan *et al.* 2019). Piemēram, fāgs T5 neatgriezeniski piesaistās pie proteīna FhuA, kas atrodas uz *Escherichia coli* šūnas ārējās membrānas un parasti ir iesaistīts dzelzs jonu transportā. Atgriezeniski tas spēj piesaistīties arī pie lipopolisaharīdiem (Rakhuba *et al.* 2010). Tālāk tiek injicēta nukleīnskābe. Atšķirībā no dzīvnieku un augu vīrusiem vairumam fāgu baktērijas šūnā nonāk tikai DNS/RNS (dažos gadījumos arī daži specifiski proteīni), nevis viss virions (Madigan *et al.* 2019). Izņēmums ir *Cystoviridae* dzimta, kuras fāgiem saimniekšūnā iekļūst viss nukleokapsīds (Poranen and Mäntynen 2017). Fāga T4 gadījumā DNS ievadīšanu šūnas iekšienē nodrošina T4 astes lizocīma komplekss, kas spēj izveidot poru *E.coli* peptidoglikāna slānī, astes apvalka saraušanās un liels spiediens kapsīdā, kas “grūž” DNS iekšā šūnā.

Fāgus, kuriem ir raksturīgs tikai lītiskais cikls, sauc par lītiskiem jeb virulentiem fāgiem. Lītiskā cikla gadījumā pēc fāga genoma ievadīšanas notiek genoma replikācija un transkripcija, kas atkarībā no fāga nukleīnskābes nedaudz atšķiras, kā arī translācija. Saimnieka šūnā šie procesi tiek pārtraukti, un tā vietā notiek fāga genomu un proteīnu sintēze (Madigan *et al.* 2019). Kad ir uzsynetēti nepieciešamie proteīni un vairākas fāga genoma kopijas, tad notiek to apvienošanās virionos. Bieži šis process ir spontāns. Tomēr tas tāpat notiek pēc konkrētas shēmas. Piemēram, T4 no sākuma izveidojas tukšs prokapsīds, kurā gar iekšpusi izvietots sastatņu (*scaffold*) proteīns. Tad tam piesaistās iesaiņošanas (*packaging*) komplekss, kas atpazīst un ar ATF hidrolīzes palīdzību ievieto prokapsīdā fāga dsDNS (dažreiz daži fāgi kļūdaini mēdz iepakot prokapsīdā arī daļu bakteriālā genoma). Sastatņu proteīnu sašķel T4 kodēta proteāze, un prokapsīds nobriest par kapsīdu. Beigās atsevišķi apvienojusies aste savienojas ar kapsīdu (Aksyuk and Rossmann 2011). Gatavi virioni izkļūst ārā no šūnas, to nodrošina vīrusa enzīmi, kas spēj šķelt baktērijas šūnas membrānu un peptidoglikāna slāni.

Jaunie fāgi spēj inficēt nākamos saimniekus. Virionu skaitu, kas izkļūst no vienas šūnas, sauc par sprādziena lielumu (*burst size*), un gan dažādiem fāgiem, gan saimniekiem tas var atšķirties būtiski – no dažiem līdz dažiem tūkstošiem (Madigan *et al.* 2019). Sprādziena lielums atšķiras arī atkarībā no vides apstākļiem, kas ietekmē saimnieka fizioloģisko stāvokli, piemēram, ūdenī mītošajiem fāgiem tika atklāts, ka ar barības vielām bagātākos ūdeņos šis rādītājs ir lielāks nekā nabadzīgākos ūdeņos (Parada *et al.* 2006).

Lizogēnā cikla galvenā atšķirība no lītiskā ir tā, ka fāgs nevis savairojas un noārda saimniekšūnu, bet tā genoms spēj integrēties saimnieka hromosomā un vairoties, saimniekam daloties, vai arī eksistēt episomālā stāvoklī (līdzīgi plazmīdai), tādējādi ilgstoši “sadzīvojot” ar saimnieku. Fāgus, kam raksturīgi abi cikli, sauc par mērenajiem fāgiem, savukārt vīrusa genomu, kas ir integrējies saimniekā, – par profāgu (Madigan *et al.* 2019). Pēc adsorbcijas un genoma ievadīšanas, kas notiek tāpat kā lītiskajā ciklā, tiek pieņemts lēmums par to, kurš cikls turpināsies. Ļoti labi šis process ir izpētīts fāgā λ – lēmuma pieņemšanu regulē regulētājproteīnu kaskāde, kurā galvenie ir CI un Cro represori. CI uztur profāga stāvokli, represējot visu citu λ gēnu transkripciju, bet to aktivē cits proteīns CII, kurš pēc infekcijas nepieciešams pietiekamā daudzumā, lai norisinātos lizogēniskais cikls. Ja CII nav pietiekami daudz, tad turpinās lītiskais cikls. Turklāt Cro represē CII, līdz ar to arī CI sintēzi, tāpēc pie pietiekamas Cro koncentrācijas tiek ierosināts lītiskais cikls. Vēl ir arī regulētājproteīns Q, kas aktivizē dažādu λ proteīnu sintēzi, kas noved pie saimnieka līzes, bet to represē iepriekšminētais CII. Šo procesu un lēmumu ietekmē dažādi apstākļi: saimniekšūnas lizogēnizācija ar lielāku varbūtību notiek tad, ja šūnu ir inficējuši vairāki fāgi vai arī ja saimniekšūnas aug bagātīgā vidē (Oppenheim *et al.* 2005). Turklāt ir atklāts, ka fāgi spēj “komunicēt” savā starpā ar nelielu peptīdu palīdzību. Ja fāgs sastopas ar lielu baktēriju skaitu, tad ar lielāku varbūtību norisinās lītiskais cikls, kura laikā papildus tiek sintezēti un sekretēti lēmuma pieņemšanas (*arbitrium*) peptīdi. Ja ir liela šo peptīdu koncentrācija vidē, tad tos uzņem citas baktērijas caur oligopeptīdu permeāzes (OPP) transporteri. Tad šie peptīdi inhibē lizogēnijas inhibitora ekspresiju, notiek lizogēnija (Erez *et al.* 2017). Pārēju no lizogēnā cikla/profāga stāvokļa uz lītisko ciklu nosaka stresa apstākļi un saimnieka DNS bojājumi (Madigan *et al.* 2019), kā arī baktēriju populācijas blīvums un izmaiņas saimnieka metabolismā (Laganenka *et al.* 2019). Visi šie regulācijas mehānismi ļauj mērenajiem fāgiem pielāgoties apstākļiem un izvēlēties konkrētajā brīdī labāko vairošanās stratēģiju. Lizogēnija ir arī nozīmīgs horizontālās gēnu pārnese cēlonis. Tās rezultātā vienas baktēriju sugas dažādos celmos ir atrodamī daudzi dažādi profāgi, kas noved pie lielas ģenētiskās daudzveidības gan baktērijām, gan arī fāgiem, jo līdzīgi profāgi un fāgi var rekombinēties savā starpā (Ohnishi *et al.* 2001). Dažkārt baktērijām profāgu dēļ var izmainīties

fenotips. Šīs izmaiņas sauc par lizogēnisku konversiju, un tās ietvaros baktērijā tiek ekspresēti profāga gēni, kas var pasargāt saimnieku no līdzīgu fāgu superinfekcijas, uzlabot tā spēju izdzīvot dažādos apstākļos, ieviest virulences faktorus un jaunus metabolisma ceļus, palīdzēt veidot bioplēves u.c. veidos palīdzēt saimniekam. Tomēr profāgi arī var traucēt baktērijām, piemēram, ievietojoties to genomā pa vidu funkcionējošam gēnam, šādi palēninot saimnieka metabolismu vai pat izraisot tā bojāeju (Obeng *et al.* 2016).

Pseudolizogēnija ir parādība starp lizogēno un lītisko ciklu. Tas ir stāvoklis, kurā ir aizkavēta fāga attīstība saimniekšūnā, nenotiek ne vīrusa genoma replikācija, ne integrācija saimnieka genomā, ne vīrusa genoma noārdīšana (Łoś and Wegrzyn 2012). Pseudolizogēnija parasti notiek, ja saimniekšūna ir pakļauta bada stresam (*starvation stress*), un ir raksturīga gan virulentajiem, gan mērenajiem fāgiem. Vīrusa genoms saimniekā atrodas kā neaktīva, cirkulāra episoma, šo stāvokli mēdz arī dēvēt par fāga nesējstāvokli (*phage carrier state*). Svarīga atšķirība no lizogēnijas ir tā, ka vīrusa genoms nereplicējas kopā ar saimniekšūnas genomu, tāpēc nākamajā baktēriju paaudzē ir šūnas, kurās nav fāga genoma (Olszak *et al.* 2017). Daudz retāk pseudolizogēnija ir atklāta arī optimālos apstākļos kultivētās baktērijās. Piemēram, *Clostridium botulinum* fāgs c-st, kas pārnēsā C1 tipa botulīna toksīna un C3 eksoenzīma gēnus, saimniekšūnā veido cirkulāru plazmīdu, kas spēj replicēties, tomēr ne tik efektīvi kā, piemēram, fāgs P1, kas veido stabilu plazmīdas profāgu. Tāpēc nākamajās baktēriju paaudzēs fāga c-st var arī nebūt (Sakaguchi *et al.* 2005). Ja saimniekšūnas augšanas apstākļi uzlabojas, tad pseudolizogēnija pārtop īstā lizogēnijā vai arī lītiskajā ciklā (Łoś and Wegrzyn 2012).

Hroniska infekcija jeb episomālā replikācija ir dzīves cikls, kas ir raksturīgs pavedienvēda fāgiem (Rakonjac *et al.* 2011). Vislabāk izpētīti ir fāgi Ff. To primārie receptori ir pillas uz baktērijas virsmas, bet sekundārais – konservatīvs gramnegatīvo baktēriju iekšējās membrānas proteīnu komplekss TolQRA. Lielākais viriona proteīns pIII piesaistās abiem receptoriem un nodrošina ssDNS ievadīšanu saimniekšūnā. Turklāt galvenais apvalka proteīns pVIII integrējas baktērijas iekšējā membrānā. Tālāk pozitīvais DNS pavediens, kas tika ievadīts šūnā, savienojas galos, izveidojot cirkulāru struktūru. Saimnieka biomašinerija uzsintezē tam komplementāru negatīvo pavedienu. Tad iesaistās fāga proteīns pII, kas nodrošina jauna pozitīvā pavediena replikāciju. Genoma replikatīvā forma (dsDNS) tiek izmantota, lai ar saimnieka biomašineriju sintezētu fāga proteīnus. Šie procesi atkārtojas, līdz ir pietiekami daudz vīrusa genomu kopiju un proteīnu. Fāga proteīni pI, pIV un pXI izveido transporta kompleksu šūnas membrānā. Vēlāk vīrusa pozitīvie ssDNS pavedieni tiek aplāti ar proteīnu pV, kas neļauj tiem izveidot cirkulāru struktūru, un transportēti caur membrānu, vienlaikus aizvietojuot pV ar pVIII un pievienojoties arī apvalka proteīniem pVI un pIII. Gatavi virioni ir

izlaisti ārpus šūnas. Lai gan šajā dzīves ciklā šūnas biomašīnērija tiek piespiesta darboties fāga labā, tas tomēr nenoārda pašu saimniekšūnu. Daļa pavedienveida fāgu ir mērenie, tie spēj arī integrēties saimnieka genomā un īstenot lizogēno ciklu. Stresa apstākļos šie fāgi atkal pāriet episomālajā replikācijā (Rakonjac *et al.* 2011).

1.3. Bakteriofāgu pielietojumi

Fāgu pielietojuma iespējas tiek pētītas jau kopš to atklāšanas, kad Fēlikss d'Erells sāka pētīt fāgu terapijas iespējas (Salmond and Fineran 2015). Tagad tiek veikti pētījumi pielietojumiem biotehnoloģijās (zāļu un vakcīnu izstrāde, jaunu proteīnu sintēze u.c.), fāgu terapijā pret bakteriālām slimībām, biosensoru izstrādē, cīņā pret pārtikas sabojāšanos un antibiotiku rezistenci, kā arī notekūdeņu attīrīšanā (Sharma *et al.* 2017). Parasti ir nepieciešami lītiskie fāgi, lai efektīvi iznīcinātu baktērijas, bet arī mērenos fāgus ir iespējams izmantot, lai pret antibiotikām rezistentas baktērijas pārveidotu par atkal uzņēmīgām (Yosef *et al.* 2015), un lai ar gēnu inženierijas palīdzību atvasinātu lītiskus fāgus, kurus var droši pielietot fāgu terapijā (Dedrick *et al.* 2019). Kā arī pateicoties tam, ka baktērijas evolūcijas gaitā attīsta rezistences mehānismus pret fāgiem un fāgi cenšas tos apiet, ir atklātas dažādas rezistences sistēmas, t.sk. CRISPR-Cas9 sistēma, kuru ir iespējams izmantot gēnu inženierijā (Jiang and Doudna 2017).

Viena no nozarēm, kurā arvien vairāk tiek attīstītas metodes, kas ietver fāgu izmantošanu, ir pārtikas ražošana. Fāgi noder cīņā pret pārtikas izraisītām slimībām un pārtikas sabojāšanos. Tradicionāli patogēnas baktērijas pārtikā tiek iznīcinātas pasterizējot, apstrādājot ar augstu spiedienu, apstarojot ar gamma starojumu vai apstrādājot ar ķīmiskām vielām. Tomēr katru no šīm metodēm ir iespējams pielietot tikai atsevišķām pārtikas grupām, turklāt tās nogalina visas baktērijas – gan patogēnās, gan labvēlīgās. Tāpēc arvien pieprasītāka kļūst fāgu biokontrole. Šīs metodes priekšrocības ir tās, ka ar to var specifiski atbrīvoties no konkrētām patogēnajām baktērijām, tā ir pašlaik videi draudzīgākā antibakteriālā metode, fāgiem netiek pievienotas piedevas vai konservanti, un tās cena ir lētāka nekā augsta spiediena apstrādei vai apstarošanai. Trūkumi fāgu izmantošanai – nepieciešamība tos pievienot atsevišķi no ķīmiskiem līdzekļiem, kas varētu fāgus inaktivēt, to specifiskums, kas var traucēt, ja pārtiku inficē vairākas baktērijas, un obligāti lītisko fāgu piemeklēšanas un padziļinātas raksturošanas nepieciešamība (Moye *et al.*, 2018).

Fāgu endolizīni ir peptidoglikāna hidrolāzes, kuras fāgi izmanto, lai šķeltu saimniekšūnas peptidoglikāna slāni lītiskā cikla beigās. Tos, tāpat kā veselus fāgus, var pielietot cīņā pret patogēnām baktērijām, iedarbojoties uz tām specifiski. Tomēr natīvus endolizīnus var izmantot tikai pret grampozitīvām baktērijām, jo tie netiek cauri gramnegatīvo baktēriju ārējai

membrānai. Tāpēc pēdējā laikā arvien vairāk tiek izstrādāti mehānismi, kas ļauj pielietot endolizīnus pret gramnegatīvām baktērijām, piemēram, tiek izvēlēti endolizīni, kas spēj izkļūt cauri ārējai membrānai, tiem tiek pievienotas vielas, kas noārda ārējo membrānu, vai tie tiek saistīti ar antibakteriāliem peptīdiem, kas arī ļauj tikt cauri šai membrānai. Nozīmīga šo enzīmu īpašība ir spēja noārdīt bioplēves, ko nespēj izdarīt daudzi citi antibakteriālie līdzekļi. Bioplēves ir bīstamas, jo to dēļ pārtika var tikt inficēta atkārtoti (Schmelcher & Loessner, 2016). Tāpēc ir izdevīgi izmantot endolizīnus virsmu dezinfekcijai vietās, kurās tiek ražota pārtika (Chang, 2020).

Fāgi tiek izmantoti arī medicīnā cīņā ar bakteriālu patogēnu izraisītām akūtām vai hroniskām infekcijām. Šim nolūkam tiek izmantoti no vides izdalīti lītiski fāgi, kas lizē attiecīgo patogēnu, un šo procesu sauc par fāgu terapiju (Viertel *et al.* 2014). Pašlaik tā ir īpaši svarīga, jo arvien vairāk pieaug bakteriālo patogēnu antibiotiķu rezistence, un tuvojas tā dēvētā “pēcantibiotiķu ēra”, kurā antibiotikas vairs varētu nebūt iespējams efektīvi pielietot medicīnā. Galvenie cēloņi tik izplatītai rezistencei ir pārmērīga to lietošana medicīnā un lauksaimniecībā un arvien retāka jaunu antibiotiķu atklāšana un izstrāde (Ventola 2015). Tāpēc ir svarīgi atrast alternatīvas ārstēšanas metodes, un fāgu terapija ir viena no tādām.

Fāgu terapijai, salīdzinot ar antibiotiķu izmantošanu, ir daudz priekšrocību – fāgi iznīcina tikai konkrētu patogēnu, nevis ietekmē visu mikrobiomu; kad patogēns iznīcināts, tad arī fāgs pārstāj vairoties; der pacientiem ar alerģijām pret antibiotikām; neietekmē zīdītāju šūnas; tā kā fāgs pacientā vairojas, tad nepieciešamas mazas devas; ja baktērijas kļūst rezistentas pret fāgu, tad fāgs var evolūcijas ceļā šo rezistenci apiet; fāgi spēj iznīcināt bioplēves; viegli un lēti ražot; sastopami visur. Tomēr ir arī trūkumi – tā kā fāgi iedarbojas specifiski, tad nepieciešams pirms ārstēšanas precīzi identificēt patogēnu; imūnsistēma var ražot antivielas pret fāgu; pašlaik vēl ir maz informācijas un klīnisko pētījumu par efektivitāti; nav līdz galam izstrādāta likumdošana, kas regulētu fāgu terapijas līdzekļu ražošanu un izmantošanu (Gordillo Altamirano and Barr 2019).

Kopš 1966. gada ir publicēti deviņi fāgu terapijas klīniskie pētījumi, kā arī 30 gadījumu apraksti (Pirnay *et al.* 2022). Nesen tika veikts nesalīdzinošs pētījums (*single-arm non-comparative trial*), kurā 13 pacientiem ar smagu *Staphylococcus aureus* infekciju papildus antibiotikām intravenozi tika dots trīs fāgu kokteilis AB-SA01. Pētījumā nebija iespējams noteikt fāgu terapijas efektivitāti, salīdzinot ar antibiotikām, tomēr tika secināts, ka šis fāgu kokteilis neizraisa blakusparādības, un pret to neizveidojās bakteriālā rezistence. Kā arī tika noskaidrots, ka optimālā fāgu kokteiļa AB-SA01 deva ir 10^9 pfu, un šos datus var izmantot turpmākos pētījumos (Petrovic Fabijan *et al.* 2020). Savukārt 2019. gadā ir publicēts gadījuma

apraksts, kurā *Mycobacterium abscessus* infekcija tika ārstēta ar trīs fāgiem, no kuriem divi bija ar gēnu inženierijas palīdzību izveidoti mēreno fāgu lītiski atvasinājumi. Tika novērota klīniskā stāvokļa uzlabošanās, kas saistīta ar fāgu kokteiļa izmantošanu. Tas ir pirmais aprakstītais gadījums, kurā fāgi tika izmantoti pret mikobaktērijas infekciju un kurā tika izmantoti ģenētiski modificēti fāgi (Dedrick *et al.* 2019). Salīdzinot fāgu terapijas klīniskos pētījumus ar gadījumu aprakstiem, var novērot, ka klīniskajos pētījumos fāgu terapija parasti neuzrāda augstu efektivitāti, kamēr atsevišķos gadījumos tā spēj uzlabot pacienta veselības stāvokli. Tam ir dažādi iemesli – reglamentējumu radītie šķēršļi, fāgu ražošanas metodes un to produktu stabilitāte, un loģistikas problēmas. Tomēr galvenais iemesls ir tas, ka klīniskajos pētījumos fāgu produkti tiek vērtēti kā jebkuri citi medikamenti, lai gan tie stipri atšķiras – atšķirībā no medikamentiem fāgi iedarbojas uz ļoti specifiskiem patogēniem, un tiem ir koevolucionāras attiecības ar baktērijām. Ārstējot individuālus gadījumus, tiek atlasīti tieši tie fāgi, kas lizē no konkrētā pacienta izdalīto patogēnu, turklāt bakteriālās rezistences gadījumā ir iespējams veiksmīgi izveidot fāgu atvasinājumus, kas šo rezistenci apiet. Tādēļ šādi ir iespējams veiksmīgi pielietot fāgu terapiju, kamēr masveidā ražoti fāgu terapijas produkti vēl nav tik efektīvi (Pirnay *et al.* 2022).

1.4. Bakteriofāgu genomika

Bakteriofāgu genomi ir pirmie, kuri tika sekvenēti pilnā to garumā. 1977. gadā tika sekvenēts 5386 bp garais ssDNS fāga ϕ X174 genoms (Sanger *et al.* 1977), savukārt pirmais sekvenētais dsDNS genoms (48502 bp) pieder fāgam λ (Sanger *et al.* 1982). Kopš tā laika pilno zināmo fāgu genomu skaits ir būtiski audzis – 2020. gada jūnijā Nacionālā biotehnoloģiju informācijas centra datubāzē bija pieejamas 8245 atzīto un potenciālo fāgu sugu genomu sekvences, no kurām lielākā daļa (~94%) pieder dsDNS fāgiem (Zrelovs *et al.* 2020). Fāgu genomu izmēri var būt ļoti dažādi – viens no mazākajiem genomiem (2435 bp) pieder *Leuconostoc* fāgam L5, savukārt lielākie ir cilvēku un dzīvnieku zarnu metagenomos atrastie megafāgi, kuru genoms ir lielāks par 540 kb (Dion *et al.* 2020).

Izteikta fāgu genomu īpašība ir to mozaīcisms. Jau 1980. gadā tika publicēta bakteriofāgu modulārās evolūcijas teorija, kas nosaka to, ka katrs genoms ir veidots no moduļiem, ar kuriem fāgiem ir iespējams savā starpā apmainīties. Modulis ir viena vai dažu gēnu kopums, kas nodrošina konkrētu funkciju, piemēram, DNS replikāciju vai saimniekšūnas līzi (Botstein 1980). Fāgi ar moduļiem var apmainīties divos veidos – homologās vai nelikumīgās rekombinācijas ceļā. Homologās rekombinācijas gadījumā gēnu savienojumos ir atrodamas īsas konservatīvas sekvences, kas nodrošina to, ka ar saimnieka vai fāga kodētas rekombināzes

palīdzību tiek apmainīti gēni. Ir atrastas dažas šādas sekvences, kas varētu piedalīties šajā procesā, tomēr skaidrs, ka tas nav izplatīts fāgu genomu rekombinācijas veids (Hatfull 2008). Daudz vairāk raksturīga ir nelikumīga rekombinācija, kura notiek, gēniem apmainoties nejauši. Lielākā daļa šādi radušos fāga variantu nav spējīgi funkcionēt, tomēr dažos gadījumos rodas inficēt spējīgi virioni. Lai šī veida rekombinācija notiktu veiksmīgi, genomam jāsauglabā visu obligāti nepieciešamo funkciju gēni un vajadzīgais kopējais garums. Ģenētiskā apmaiņa var notikt vai nu starp diviem fāgiem, kas vienlaicīgi inficē vienu baktēriju šūnu, vai arī starp fāgu un saimnieka genomā esošu profāgu. Otrais variants ir ar lielāku iespējamību, jo biežāk vienu šūnu inficē viens atšķirīgs fāgs nevis divi, turklāt profāgam nav jābūt pareizā garumā vai uzreiz lītiski jāvairojas. Tāpēc lizogēniem fāgiem parasti mozaīcisms ir vairāk raksturīgs kā lītiskiem (Krupovic *et al.* 2011).

Rekombinācijas biežums dažādiem genoma moduļiem atšķiras. Izšķir “kodola” gēnus un hiperplastiskos reģionus. “Kodola” gēni fāgam ir obligāti nepieciešami, jo tie atbild par tādām funkcijām kā, piemēram, viriona struktūra un DNS replikācija. Tāpēc to sekvences ir ļoti konservatīvas, un mozaīcisms pārsvarā nav raksturīgs. Savukārt hiperplastiskie reģioni parasti satur “papildus” gēnus ar bieži vien nezināmu funkciju un izcelsmi, tie nereti piedalās rekombinācijā un vairāk atšķiras dažādu fāgu starpā. Piemēram, salīdzinot fāga T4 un tam līdzīga fāga RB49 genomus, tika secināts, ka fāgam RB49 ir raksturīgi 58 no 62 obligāti nepieciešamajiem T4 gēniem, un ir trīs variabli hiperplastiskie reģioni, kuri satur gēnus ar nezināmām funkcijām (Comeau *et al.* 2007). Tomēr nevar droši apgalvot, ka nelikumīgā rekombinācija biežāk notiek tieši hiperplastiskajos reģionos, visticamāk tā notiek nejauši, tikai fāgam ir lielākas iespējas pēc tam veiksmīgi vairoties, ja “kodola” gēni ir palikuši neskartī (Hatfull and Hendrix 2011).

Lizogēnajiem jeb mērenajiem fāgiem ir raksturīgi īpaši ģenētiskie elementi, kurus sauc par “moroniem”, un tie palīdz izdzīvot saimniekšūnai, kad fāgs ir profāga stāvoklī (lizogēniskā konversija). Tie pieder pie “papildus” gēniem, jo nav obligāti nepieciešami fāga lītiskā cikla īstenošanai, un to nosaukums radies no frāzes angļu valodā “*more on*” tādēļ, ka tie papildina fāga genomu. “Moronu” GC saturs atšķiras no blakus esošajiem gēniem, un tiem ir savi promotera un terminatora elementi, kas ļauj ekspresēt gēnu arī tad, ja pārējie profāga gēni ir represēti. Šīs pazīmes liek domāt par to, ka “moroni” ir iegūti horizontālās gēnu pārneses rezultātā (Cumby *et al.* 2012b). Viens no piemēriem šiem ģenētiskajiem elementiem ir fāga HK97 proteīns gp15, kas spēj inhibēt tā paša un radniecīga fāga iekļūšanu saimniekšūnā, tādējādi palīdzot gan izdzīvot baktērijai, gan pastāvēt profāgam (Cumby *et al.* 2012a). Profāgā kodēti gēni var arī palīdzēt patogēnam izvairīties no zīdītāju imūnsistēmas. Piemēram,

Staphylococcus aureus fāga kodēta stafilokināze, aktivējot plazmīnu un šādi izraisot serīna proteāzes aktivitāti, degradē divus svarīgus opsonīnus – cilvēka imunoglobulīnu G (IgG) un C3b proteīnu (Rooijackers *et al.* 2005).

Lielākajai daļai fāgu, kam ir dsDNS genoms, DNS iepakojšanai prokapsīdā ir nepieciešams proteīns termināze. Tā sastāv no divām subvienībām – mazās, kas veic fāga DNS atpazīšanu, un lielās, kas spēj piesaistīties prokapsīdam, ievietot tajā DNS un šķelt DNS konkatemēru monomēros (genoma kopijās) (Fujisawa and Morita 1997). Tā kā termināze ir viens no konservatīvākajiem fāga proteīniem, tad lielās subvienības gēna sekvences tiek izmantotas, lai, salīdzinot ar tā paša gēna sekvenci citos fāgos, būtu iespējams ar lielu iespējamību paredzēt DNS iepakojšanas stratēģiju un genoma galu sekvenču tipu. Ir izpētīts, ka dsDNS fāgiem raksturīgi seši genoma galu veidi: vienas ķēdes lipīgie gali, cirkulāri permutēti tiešie terminālie atkārtojumi, īsi tiešie terminālie atkārtojumi, gari tiešie terminālie atkārtojumi, terminālās saimnieka DNS sekvences un kovalenti saistītie terminālie proteīni. Vienīgais no šiem veidiem, kuram nav nepieciešama termināze, ir gali ar kovalenti saistītajiem terminālajiem proteīniem (Casjens and Gilcrease 2009).

Mūsdienās jaunu fāgu taksonomija tiek noteikta galvenokārt pēc genoma struktūras un tā kodētā proteoma. Svarīga ir genoma sekvenču līdzība ar citiem fāgiem, piemēram, ICTV sugas demarkācijas kritērijs ir 95%. Tas nozīmē to, ka katras sugas ietvaros fāgu genomu sekvenču atšķirības ir mazākas kā 5% un, lai jaunizolētu fāgu pasludinātu par jaunu sugu, tā genoma līdzība ar tuvāko cita fāga genomu jābūt mazāka par 95%. Ja jaunais, sekvenētais fāgs ir ļoti līdzīgs jau iepriekš plaši aprakstītam fāgam, tad no šīs genomu sekvenču līdzības ir iespējams paredzēt gēnu skaitu un to kodētos proteīnus (Adriaenssens *et al.* 2017). Savukārt ģints demarkācijas kritērijs pēc ICTV taksonomijas principiem ir ~70% (Moraru *et al.* 2020).

Tā kā fāgu ģenētiskā daudzveidība ir ļoti liela, tad aptuveni vairāk kā puse anotēto fāgu genomu produktu ir ar nezināmu funkciju (hipotētiskie proteīni) (Pope *et al.* 2015; Wan *et al.* 2021). Daudzi no šiem proteīniem tiek ekspresēti agrīnajās infekcijas stadijās, tāpēc tas liek domāt par to iespējamo lomu saimnieka vielmaiņas procesu pārņemšanā, lai tos izmantotu savā labā. Sīkāka šādu proteīnu pētīšana var ne tikai ļaut labāk izprast fāgu un baktēriju mijiedarbību, bet arī atrast jaunus, potenciāli antimikrobiālus proteīnus (Wan *et al.* 2021).

2. MATERIĀLI, VIELAS UN IEKĀRTAS

Vielas, reaģenti

Reaģents	Ražotājs	Izcelsmes valsts
CsCl	Реахим	PSRS
NaOH	Реахим	PSRS
NaCl	Реахим	PSRS
SDS	Serva	Vācija
TEMED	Reanal	Ungārija
Coomassie brilliant blue	Serva	Vācija
Rauga ekstrakts	Fluka	Vācija
Peptons	Fluka	Vācija
Tris	Prolabo	Beļģija
Glicerīns	Applichem	Vācija
TopVision agaroze	Fermentas (ThermoFisher Scientific)	Lietuva
Akrilamīds	Prolabo	Beļģija
Amonija persulfāts	Sigma-Aldrich	Vācija
Hloroforms	Sigma-Aldrich	Vācija
Marķieris Pierce Unstained Protein MW Marker	ThermoFisher Scientific	ASV

Šķīdumi

10% SDS; 96% etanols; 70% etanols; eŕidija bromīds 5 mg/mL; 0,2M NaOH; 0,5% uranilacetāts; 40% glicerīns; 0,05% nātrija azīds; DNA Gel Loading Dye (ThermoFisher, ASV); Hi-Di formamīds (ThermoFisher, ASV); 50 mg/mL ampicilīns (ThermoFisher, ASV); 30 mg/mL kanamicīns (Sigma-Aldrich, Vācija), 6M NaOH, 6M HCl.

Barotnes

Šķidrā LB (Luria-Bertani) – triptons 10 g/L; rauga ekstrakts 5 g/L; NaCl 10 g/L.

Mīkstais agars (LB barotne) – triptons 10 g/L; rauga ekstrakts 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; bakto agara piedeva līdz 0,7%.

Cietā PA (Peptone Agar) – peptonu maisījums 10 g/L, rauga ekstrakts 5 g/L, NaCl 5 g/L, bakto agara piedeva līdz 1,5%

Cietā CR – kazamino skābes (*Casamino acids*, BD, ASV) 6 g/L; rauga ekstrakts 3 g/L; NaCl 3 g/L; agaroze 15 g/L.

Visas barotnes gatavotas pēc BMC receptēm.

Buferi

FastDigest buferis 10x (ThermoFisher, ASV); pagatavoti pēc standarta receptēm un atšķaidīti – TRIS; PBS; EDTA; TAE.

Kiti

Kita nosaukums	Ražotājs	Izcelsmes valsts
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ThermoFisher Scientific	ASV
Genomic DNA Clean & Concentrator-10 kit	Zymo Research	ASV
GeneJet Gel Extraction Kit	ThermoFisher Scientific	ASV
Qubit dsDNA HS quantification Assay Kit	Invitrogen	ASV
TruSeq Nano DNA Low-Throughput Library Prep Kit (24 samples)	Illumina	ASV
TruSeq DNA Single Indexes Set A (12 Indexes, 24 Samples)	Illumina	ASV
High Sensitivity DNA Kit	Agilent	ASV
500-cycle MiSeq Reagent Kit v2 nano	Illumina	ASV

Enzīmi

Taq polimerāze 5 u/μL; proteināze K 20 mg/mL, Fast Digest sērijas (ThermoFisher, ASV) restriktāzes: EcoRI, BamHI, HindIII, Bsp199I, MunI, PstI, SmaI.

Praimeri

Pasūtīti no “metabion international AG” Vācijā.

27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

Programmatūra

Uzskaitīta pie attiecīgajām metodēm.

Iekārtas

Iekārta/Aprikojums	Ražotājs	Izcelsmes valsts
Stikla pipetes; V = 1 mL; 2 mL; 5 mL; 10 mL	Ilmabor; Qualicolor	Vācija
Automātiskās pipetes; V = 1000 μL; 200 μL; 100 μL; 10 μL	Gilson	Francija
Automātisko pipešu uzgaļi; V = 10 μL; 200 μL; 1000 μL	Sarstedt	Vācija
Cilpiņas	Sarstedt	Vācija

Petri plates; d = 10 cm	-	-
Mēģenes; d = 1,5 cm; 2,0 cm	-	-
Kolbas; V = 250 mL; 500 mL; 1000 mL	Ilmabor	Vācija
Vārglāzes; V = 50 mL; 500 mL	Rasotherm	Vācija
Mērcilindri; V = 50 mL; 100 mL; 250 mL	Simax	Čehija
Stobriņi; V = 1,5 mL; 2 mL	Eppendorf	Vācija
Falcon stobri; V = 15 mL; 50 mL	Sarstedt	Vācija
PCR stobri; V = 0,2 mL; 0,5 mL	Eppendorf	Vācija
Membrānu filtri Millipore 10 kDa	Millipore	ASV
Amicon Ultra 100 000 NMWL stobri	Millipore	ASV
Centrifūga Eppendorf 5810R; F-34-6-38 rotors	Eppendorf	Vācija
Termobloks Thermo block TDB-120	Biosan	Latvija
Vorteksēšanas iekārta	ELMI	Latvija
Elektriskie svāri	Kern	Vācija
Termostats MM 2 A	Laboratori Pastroje Prahā	Čehija
Ledusskapis Atlant VZP6-2444	-	Baltkrievija
Ultracentrifūga Avanti J-30 I; JA-30.50 rotors	BECKMAN COULTER	ASV
Ūdens vanna Omron E5CS	Biosan	Latvija
Spektrofotometrs NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific	ASV
UV gaismas illuminators UV Transilluminator	UVP	ASV
Kratītājs Infors HT Multitron Incubator Shaker	Infors	Šveice
Caurstarojošais (transmisijas) elektronmikroskops JEM-1230	Jeol Ltd	Japāna
Elektronmikroskopa kamera Morada 11 MegaPixel TEM CCD	Olympus Soft Imaging Solutions	Vācija
Centrifūgas Eppendorf 5424; F-45-24-11 un FA- 45-24-11 rotori	Eppendorf Labnet	Vācija ASV
Biociklizators MultiGene Mini		
Ultrasonikators Covaris S220	Covaris	ASV
Bioanalizators Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	ASV
Fluorometrs Qubit	Invitrogen	ASV
Illumina MiSeq sekvenēšanas sistēma	Illumina	ASV

3. METODES

3.1. Paraugu ievākšana

2021. gada vasaras beigās tika ievākts lapu paraugs no simptomātiskas ābeles (nokaltušas lapas), kā arī lapu paraugi no korintes un dārza pīlādža saimniecībā “Paeglīši” (Pociems, Katvaru pagasts, Limbažu novads). Vēl tika ievākti lapu paraugi no krebu ābeles, saldajiem ķiršiem, mežābeles un kultūrbumbieres saimniecībā “Ķiršukalni” (Sēmes pagasts, Tukuma novads). 2022. gada janvārī tika savākti notekūdeņu paraugi no 11 Latvijas pilsētām – Salaspils, Daugavpils, Jelgavas, Jēkabpils, Tukuma, Liepājas, Ventspils, Jūrmalas, Rēzeknes, Rīgas un Valmieras, kuri tika izmantoti arī citā BMC projektā.

3.2. Baktēriju izolēšana

1. Aptuveni piecas konkrētā auga lapas ievieto 500 mL kolbā ar 200 mL autoklāvētas LB barotnes.
2. Ievieto kratītājā pie 160 rpm, inkubē +25°C temperatūrā ~1 h.
3. Pagatavo lapu nomazgājuma sērījveida atšķaidījumus 0,8% NaCl šķīdumā (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} pakāpē) un izsēj 3 atkārtojumos uz cietā PA (vai CR) agara platēm, gan ar špateli, gan ar mikrobioloģisko cilpu.
4. Plates inkubē istabas temperatūrā (RT) līdz izveidojas saskatāmas kolonijas.
5. Atsevišķas, morfoloģiski atšķirīgas kolonijas subkultivē, pārsējot uz jaunām platēm. To atkārtoti trīs reizes, lai nodrošinātu baktēriju izolātu tīrību.

3.3. Fāgu izdalīšana

Fāgu izdalīšanai izmanto 3.2. nodaļā 1.-2. punktā iegūtās kolbas saturu.

1. Kolbas šķidro saturu centrifugē 15 min pie $2057 \times g$, +4°C, lai nosēdinātu baktēriju un lapu daļiņas. Centrifugēšanu notekūdeņu paraugiem veic 30 min pie $4629 \times g$.
2. Supernatantus filtrē ar 0,45 μm poru diametra šļirces filtru, tādējādi atbrīvojoties no supernatantā esošajām baktērijām, filtrātā visticamāk paliek tikai vīrusi.
3. Fāgu filtrātu var izmantot fāga daļiņu klātbūtnes un skaita konstatēšanai (sk. 3.4. nodaļu) un “spot” testiem.

3.4. Fāga daļiņu skaita noteikšana jeb titrēšana (divslāņu agara metode)

Fāgu titrēšana ir metode, kas ļauj noteikt inficētspējīgo fāgu skaitu paraugā jeb fāgu titru. Tā pamatojas uz plaku (*plaques*) jeb negatīvo koloniju veidošanos saimniekcelma šūnu

blīvaudzē (*lawn*). Tiek veikta fāgu filtrāta atšķaidīšana līdz tādai pakāpei, kurā, izsējot kopā ar saimniekcelmu pēc divslāņu agara metodes, ir iespējams saskaitīt individuālus plakus. Tiek pieņemts, ka katrs plaks veidojas, vienam fāgam no sākuma veiksmīgi inficējot vienu šūnu un tad lizējot arī blakus esošās šūnas, līdz beigās tas ir ar aci saskatāms. Zinot plaku skaitu, atšķaidījuma pakāpi un izsētā fāgu filtrāta tilpumu, ir iespējams aprēķināt plakus veidojošo vienību (*plaque forming units*) skaitu mililitrā – pfu/mL (Stephenson 2016).

1. Sagatavo indikator kultūru (IK) jeb pret fāgu uzņēmīgu šūnu suspensiju: individuālu kultūras koloniju iesēj mēģenē ar 5 mL sterilas LB barotnes, stacionāri inkubē pie attiecīgās baktērijas sugas optimālās augšanas temperatūras ~20 h. Iespējams arī ātri sagatavot IK, suspendējot vairākas kolonijas nelielā barotnes tilpumā. Pārbauda fāga filtrāta spēju veidot līzes zonas: ar divslāņu agara metodi uz plates uznes IK kopā ar ~20 µL fāga filtrātu, inkubē pie IK optimālās augšanas temperatūras. Jāievēro, ka, lai iegūtu optimālus rezultātus, IK jābūt ne vecākai par 3-5 dienām.
2. Pagatavo fāgu filtrāta sērijveida atšķaidījumus: atkarībā no nepieciešamības gatavo desmitkārtīgus vai simtkārtīgus atšķaidījumus. Desmitkārtīgam atšķaidījumam mēģenē, kurā ir 4,5 mL 0,8% NaCl šķīduma, ienes 0,5 mL fāgu filtrāta vai iepriekšējās pakāpes atšķaidījuma. Savukārt simtkārtīgam atšķaidījumam mēģenē ienes 4,95 mL 0,8% NaCl šķīduma un pievieno 50 µL filtrāta/cita atšķaidījuma. Šos soļus atkārto, veidojot sērijveida atšķaidījumus nepieciešamajās pakāpēs, katru atšķaidījumu īslaicīgi vorteksējot.
3. Platē ar cietā agara barotni (agara koncentrācija 1,5%) centrā uznes 50 µL IK.
4. IK pilienā ienes 50 µL fāga filtrāta atšķaidījuma.
5. Platē ielej ~7 mL siltas (+50°C) mīkstā agara barotnes (agara koncentrācija 0,7%), iemaisa IK un fāga atšķaidījumu barotnē, kustinot plati pa un pret pulksteņrādītāja virzienu. Kamēr mīkstais agars netiek izmantots, to tur ūdens vannā +50°C temperatūrā, lai tas nesacietētu.
6. Pagatavo arī plati ar divslāņu agaru, kurā ir tikai IK (kontrolē), veicot 3. un 5. punktu. Ja nepieciešams, tad var uz šādas plates, kur mīkstajā agarā ir iesēta IK un kad agars ir sacietējis, veikt “spot” testu – ar cilpiņu uznest fāga filtrāta vai tā atšķaidījuma mikropilienu.
7. Uzgaida ~5 min, kamēr mīkstais agars sacietē, un neapvērsta plates inkubē pie IK optimālās temperatūras 18-24 h.

8. Pēc plaku izveidošanās atrod plates ar tādiem atšķaidījumiem, kuros ir individuāli, saskaitāmi plaki (optimāli: 50-200), un atkārtoti tos izsēj pēc divslāņu agara metodes vidējo vērtību iegūšanai. Svarīgi ir fāgu titra noteikšanai izmantot tās plates, kur desmitkārtīgiem atšķaidījumiem arī plaku skaits aptuveni atšķiras desmitkārtīgi. Drošākiem aprēķiniem šo atšķaidījumu izsēšanu ar divslāņu agara metodi atkārtoti triplikātā.
9. Aprēķina fāgu titru pēc formulas: T (titrs) = vidējais plaku skaits $\times 20$ (jo tika izsēti 50 μL , bet titru aprēķina uz mL) \times atšķaidījuma pakāpe. Piemērs: izsējot 10^{-6} atšķaidījumu, platēs vidēji ir 40 plaku; $T = 40 \times 20 \times 10^6 = 8 \times 10^8$ pfu/mL.

3.5. Individuāla fāga preparāta pagatavošana

Metodi pielieto, lai izolētu individuālu fāgu un attīrītu to no iespējamās citu fāgu kontaminācijas.

1. Titrē 3.3. nodaļā iegūto fāgu filtrātu un izvēlas plati, kurā ir skaidri redzami individuāli plaki (~50).
2. Izvēlas morfoloģiski atšķirīgus plakus (vai ja visi ir vienādi, tad pēc nejaušības principa izvēlas vairākus atsevišķus).
3. Ar bakterioloģisko cilpiņu izolē izvēlētos plakus un katru suspendē 1 mL 0,8% NaCl.
4. Centrifugē $18\,407 \times g$ 5 min. Šādi ir iegūti primārie fāgu preparāti.
5. Supernatantu titrē, kā arī veic "spot" testu.
6. Atkārtoti 2.-5. soli vēl divas reizes, lai pārliecinātos, ka iegūts tīrs fāga preparāts. Ja titrējot (vai veicot "spot" testu) no viena plaka pavairotie plaki (vai līzes zonas) morfoloģiski izskatās vienādi, tad var veikt turpmāku pavairošanu. Ja plaki ir atšķirīgi, tad vēlreiz jāatkārto 2.-5. solis.
7. Fāgu pavairo, uz daudzām (5-20) platēm ar divslāņu agara metodi izsējot tādu atšķaidījumu, kurā plaku ir tik daudz, ka tie ir saplūduši kopā, un saimnieka mauriņš gandrīz nav redzams.
8. Ar sterilu karoti savāc mīkstā agara slāni no visām platēm un ieliek 50 mL *Falcon* stobros, pievieno ~10 mL 0,8% NaCl vai LB barotni. Stobrus intensīvi krata ar rokām līdz agars ir samaisījies "putras" konsistencē.
9. Centrifugē $2057 \times g$ 30 min $+4^{\circ}\text{C}$.
10. Iegūto supernatantu (fāga lizātu) filtrē ar šļirci un membrānas filtru (poru diametrs: 0,45 μm). Tas nepieciešams, lai to attīrītu no saimniekšūnu

kontaminācijas. Ja nepieciešama vēl lielāka sterilitāte, tad var arī lietot filtru ar 0,20 µm poru diametru.

3.6. Fāga pavairošana šķidrā barotnē

1. Iegūst indikator kultūru tāpat kā 3.4. nodaļas 1. punktā – 5 mL LB barotnes ar cilpiņu iesēj atsevišķu koloniju no plates un inkubē istabas temperatūrā 20-24 h. Šādi tiek iegūts sējmateriāls turpmākai pavairošanai. Ieteicams arī pārbaudīt fāga spēju uz konkrētās IK veidot līzes zonas, kā aprakstīts iepriekšminētajā punktā.
2. Kratītāj kolbā LB barotnē iesēj sējmateriālu (piemēram, 6 mL sējmateriāla 120 mL barotnes) un nomēra OD₅₄₀. OD₅₄₀ jābūt ~0,05, ja tā nav, tad ir jāpievieno vēl barotni vai sējmateriālu un vēlreiz jānomēra OD₅₄₀. Šim rādītājam ir jābūt tik zēmam, lai nodrošinātu to, ka iegūtā kolbā ar IK būs ļoti maz bojā gājušo šūnu, kas traucētu, aprēķinot nepieciešamo fāga daudzumu. Turklāt, ja nepieciešams lielāks/mazāks kopējais tilpums, tad attiecīgi barotnes un sējmateriāla tilpumus var mainīt, tikai galvenais, lai OD₅₄₀ ~ 0,05.
3. Kratītāj kolbu ievieto kratītājā 120 rpm un pie optimālās temperatūras, kurā uz platēm titrējot labi veidojas gan IK blīvaudze, gan plaki. Ik pēc noteikta laika (20-60 min) nomēra OD₅₄₀ un turpina audzēt šūnu kultūru, līdz OD₅₄₀ sasniedz ~0,3. Kratīšana nepieciešama, lai šūnām nodrošinātu aerāciju un tās būtu vienmērīgi izklidētas barotnē.
4. Kamēr aug šūnu kultūra, aprēķina nepieciešamo fāga tilpumu. Jāņem vērā zināmais fāga titrs, paredzamais šūnu titrs (iespējams noteikt pirms eksperimenta, atšķaidot šūnu suspensiju pie konkrētas OD₅₄₀ vērtības, izsējot uz cietā agara barotnes, saskaitot kolonijas un izsakot tās vienībās cfu/mL, cfu – *colony forming units*) un MOI (inficētspējīgo fāgu jeb *plaque forming units (pfu)* un šūnu attiecība). Ir vēlams, ka MOI ~ 2-3, lai tiktu inficētas lielākā daļa šūnu.
5. Kolbai ar šūnu kultūru pievieno aprēķināto fāga tilpumu un turpina to kratīt tādos pašos apstākļos kā pirms tam.
6. Ik pēc noteikta laika (5-60 min) nomēra OD₅₄₀. Turpina kratīt, līdz OD₅₄₀ ir samazinājies līdz ~0,1 un arī barotne vizuāli izskatās dzidra. Šie rādītāji liecina par to, ka ir veiksmīgi notikusi šūnu līze un fāgs ir savairojies. Jāpiemin arī, ka šūnu līzes ātrums un intensitāte dažādiem fāgiem var stipri atšķirties.
7. 1 mL kolbas satura atfasē 1,5 mL stobriņā, centrifugē 5 min pie 18 407 × g un notitrē supernatanta sērijveida atšķaidījumus. Tas ļauj uzzināt, vai un cik daudz fāgs ir pavairojies.

8. Kolbu ar lizātu var uzglabāt pie +4°C.

3.7. Fāga daļiņu gulsnēšana centrifugējot

Metodi izmanto, lai efektīvi sakoncentrētu fāgu.

1. Fāga filtrātu ieļej ultracentrifūgai piemērotos stobros (25 mL) tā, lai līdz malai paliek vēl 1 cm.
2. Stobrus nolīdzsvaro un ar marķieri apakšā atzīmē paredzamo nogulšņu atrašanās vietu, jo iespējams, ka nogulsnes būs bezkrāsainas un grūti saredzamas.
3. Centrifugē pie 20 000 rpm (Rotors – JA-30.50; $48\,384 \times g$), 1-1,5 h, +4°C.
4. Aizvāc supernatantu, pirms tam 1,5 mL stobriņā atlejot ~0,5 mL titrēšanai (nepieciešams, lai noteiktu gulsnēšanas efektivitāti). Ar pinceti paņem salveti un uzmanīgi izslauka stobra augšējo daļu.
5. Nogulsnes šķīdina ar pipeti stobrā palikušajā supernatantā vai arī pievienojot 100-150 µL PBS.
6. Izšķīdinātās nogulsnes savāc 1,5 mL stobriņā. Lai gulsnētais fāgs ilgāk saglabātos bez kontaminācijas, var pievienot 5% NaN₃ tādā daudzumā, lai gala koncentrācija būtu 0,05%.

3.8. Fāga preparātu transmisijas elektronmikroskopija

Transmisijas elektronmikroskopija (TEM) ir mikroskopijas metode, kurā paraugam tiek caurstaroti elektroni, attēls tiek uztverts ar detektoru. Fāga paraugam tiek veikta negatīvā krāsošana ar uranilacetātu, kas pielīp parauga daļiņām, bet tajās neiekļūst, tāpēc attēlos daļiņas izskatās gaišākas par to fonu.

1. Sagatavo divus atšķirīga tipa elektronmikroskopijas sietiņus, jo pastāv iespēja procesa laikā sabojāt paraugu.
2. Uz Parafilm plēves uzpilina 5 µL parauga šķīduma. Drošākam rezultātam ieteicams ir augsts fāga parauga titrs vieglākai virionu atrašanai, apskatot elektronmikroskopā.
3. Pilienam pa virsu uzliek elektronmikroskopijas sietiņu ar plēvi uz leju. Sietiņu jāņem uzmanīgi ar pinceti, turot to pie pašas malas, savādāk sietiņš un tā pārklājumi tiks sabojāti.
4. Inkubē 3 min. Pa šo laiku uz Parafilm plēves uznes 5 µL kontrasta krāsvielas šķīduma (0,5% uranilacetāts).

5. Sietiņu paņem ar pinceti un skalo 1 mM EDTA šķīdumā, to nosusina, uzmanīgi ar sietiņa malu pieskaroties papīra salvetei.
6. Sietiņu uzliek uz uranilacetāta piliena ar plēvi uz leju un inkubē 1 min. Pēc tam to atkal nosusina, ar malu pieskaroties salvetei.
7. Atkārti 5. soli, lai aizvāktu krāsvielas (uranilacetāta) paliekas.
8. Sietiņu ar nokrāsoto paraugu apskata elektronmikroskopā, iegūst attēlus.

3.9. Fāga vai bakteriālās DNS izdalīšana (*Zymo Research Genomic DNA Clean & Concentrator-10 kit*)

No sākuma tiek lizētas šūnas ar nātrija dodecilsulfātu (SDS) un proteīnāzi K. SDS denaturē proteīnus un solubilizē membrānas lipīdu slāni. Proteīnāze K pie optimālās temperatūras 50-65°C sašķeļ visus proteīnus, izjaucot peptīdu saites. DNS ekstrakcija tiek veikta ar adsorbcijas (*solid-phase*) metodi.

1. 300 µL šūnu kultūras parauga pievieno 15 µL 10% SDS (gala SDS koncentrācijai jābūt 0,5%) un 0,8 µL proteīnāzes K (jābūt 50 µg uz vienu parauga mL, proteīnāzes K koncentrācija 20 mg/mL). Samaisa vorteksējot un centrifugē *short spin* režīmā, tad inkubē termoblokā 1 h pie +56°C, inkubācijas laikā pēc 30 min vēlreiz vorteksē.
2. Paraugam pievieno 632 µL *ChIP* DNS saistīšanās bufera (parauga un bufera attiecībai jābūt 1:2), vorteksē.
3. Paraugu ar saistīšanās buferi pārnes uz *Zymo-Spin IC XL* kolonnu, kas ielikta savākšanas stobriņā (*Collection Tube*), centrifugē 2 min pie 15 871 × g. Nolej cauri izgājušo šķīdumu. (Saistīšanās buferis piesaista DNS kolonnas matricai.)
4. Kolonnai pievieno 200 µL DNS mazgāšanas bufera, centrifugē 1 min pie tādiem pašiem apstākļiem kā 3. solī. Nolej cauri izgājušo šķīdumu. Atkārti šo soli vēl vienu reizi. (Mazgāšanas buferis izskalo cauri membrānai nevēlamās vielas (piemēram, saistīšanās bufera paliekas), kamēr DNS paliek piesaistīts.)
5. Kolonnu pārliet tīrā 1,5 mL stobriņā. Tieši matricas centrā, tam nepieskaroties, uzpilda 20 µL eluēšanas bufera. Inkubē RT 1 min.
6. Centrifugē 1 min. (Svarīgi ir stobriņu vāciņus novietot centrifūgā uz iekšu, lai tie netiktu nolauzti.)
7. Pēc centrifugēšanas kolonnu var mest ārā un stobriņā šķīdumā būs palikusi izdalīta un attīrīta DNS, ko var uzglabāt pie -20°C.

3.10. DNS koncentrācijas novērtēšana ar NanoDrop spektrofotometru (ND-1000)

NanoDrop ir spektrofotometrs, ko nepieciešams pieslēgt datoram un vadīt ar programmatūras, kurā ir gatavas iestādnes dažādiem paraugu veidiem, palīdzību. Salīdzinot ar klasiskajiem spektrofotometriem, NanoDrop galvenās priekšrocības ir tās, ka nepieciešams mazs parauga tilpums (1µL), nav vajadzīgas kivetes, un pats spektrofotometrs ir maza izmēra.

1. Datorā atver programmu ND-1000, izvēlas darbību *Nucleic Acid*.
2. Veic pirmo kalibrēšanu – uz apakšējā mērījumu pjedestāla uzpilina 1 µL dH₂O, aizver augšējo mērījumu pjedestālu un palaiž programmu, tad ar salveti noslauka abus pjedestālus.
3. Veic otro kalibrēšanu arī ar dH₂O, pēc uzpilināšanas un pjedestālu aizvēršanas izvēloties darbību *Blank*. Noslauka pjedestālus.
4. Uz apakšējā pjedestāla uznes 2µL parauga (nedrīkst būt gaisa burbuļu), aizver augšējo pjedestālu un izvēlas darbību *Measure*. Mērījuma rezultāti būs redzami datora ekrānā gan grafiskā, gan skaitliskā veidā. Pjedestālus noslauka un tad notīra ar dH₂O, to uzpilinot, aizverot un atverot augšējo pjedestālu un vēlreiz noslaukot. Starp paraugu mērījumiem vēlams arī veikt pārbaudes mērījumus ar dH₂O, kura grafikam ir jābūt horizontālai līnijai pie y vērtības 0.

Rezultātos ir redzama DNS koncentrācija mērvienībās ng/µL. Spektrofotometra kļūda: paraugiem ar DNS koncentrāciju 2-100 ng/µL tā ir ±2 ng/µL, ar DNS koncentrāciju >100 ng/µL tā ir ±2%.

DNS kvalitāti novērtē ar absorbciju attiecībām pie dažādiem viļņu garumiem: 260/280 un 260/230. Absorbcijas maksimums pie 260 nm ir nukleīnskābēm, pie 280 nm – proteīniem un pie 230 nm – ogļhidrātiem un fenolam (mēdz izmantot DNS izdalīšanā). Attiecībai 260/280 optimālā vērtība, kas liecina par parauga tīrību, ir 1,75-2,00. Savukārt attiecībai 260/230 šī optimālā vērtība ir 2,00-2,20 pie nosacījuma, ka 260/280 attiecība ir optimāla. Grafiski ir iespējams novērtēt parauga kvalitāti visā mērīšanas diapazonā (220-350 nm).

3.11. Natīvā agarozes gēla elektroforēze (NAGE)

Metodes pamatā ir dažādu garumu DNS fragmentu pārvietošanās agarozes matriksā elektriskajā laukā. Tā kā DNS ir negatīvi lādēta (standarta apstākļos), tā pārvietosies no negatīvā uz pozitīvo elektrodu. Garākie DNS fragmenti pārvietosies lēnāk, bet īsākie – ātrāk. DNS fragmentu vizualizācijai tiek izmantota fluorescējoša krāsviela, kā arī, ja tiek izmantots marķieris, ir iespējams novērtēt bāzu pāru aptuveno skaitu katrā fragmentā.

1. Pagatavo 1% agarozes gēlu – kolbiņā ielej 98 mL dH₂O un 2 mL 50x TEA. Nosver 1 g agarozes un pievieno kolbiņai, samaisa. Tad ar pipeti pievieno 5 μL EtBr šķīdumu, samaisa.
2. Agarozes gēlu uz plītiņas uzkaršē līdz šķīdums ir sācis vārīties, tikmēr elektroforēzes kariatē ievieto ķemmīti.
3. Siltu (bet ne karstu, jo tad kariete var ieplīst) agarozes gēlu ielej karietē, svarīgi ir nepieļaut gaisa burbuļu rašanos, gēla biezumam jābūt ne mazākam kā 3 mm.
4. Gaida kamēr gēls sacietē, tad izvelk ķemmīti un gēlu pagriež tā, lai ķemmītes veidotās bedrītes būtu pret elektrodu.
5. Pirmajā bedrītē iepilda 5 μL DNS marķiera, pārējās bedrītēs ienes 10 μL DNS parauga ar nelielu daudzumu bufera ar krāsvielu (*Loading Dye*). Ja pēc tam paredzēts izmantot kādu no iegūtajām zonām gēlā, piemēram, 16S rRNS gēna sekvenēšanai, tad ieteicams uznest (atkarībā no koncentrācijas) lielāku daudzumu parauga, piemēram, 50 μL, pirms tam to sajaucot (pipetējot) ar ~10 μL bufera.
6. Kariatē no malām ielej 1x TEA buferi līdz tas pārklāj visu gēla virsmu.
7. Uzliek vāku ar elektrodiem (obligāti bedrīšu pusē jābūt pieslēgtam katodam, bet otrā pusē – anodam), ieslēdz iekārtu (76 mA 118 V), elektroforēzi veic 20-30 min.
8. Gēlu apskata UV gaismas kamerā, ja nepieciešams, tad nofotografē.

3.12. DNS fragmenta izdalīšana no agarozes gēla (*GeneJET Gel Extraction Kit*)

1. NAGE gēlu apskata UV gaismā, ar skalpeli izgriež nepieciešamo gēla zonu un to ieliek tīrā 1,5 mL stobriņā. (Ar šo metodi iespējams izdalīt DNS fragmentus garumā no 100 bp līdz 10 kb.)
2. Pievieno 200 μL saistīšanās bufera un inkubē termoblokā +60°C 15 min vai kamēr gēls ir izkusis, ik pēc ~5 min vorteksējot paraugus.
3. Paraugu pārnes uz GeneJet attīrīšanas kolonnu, centrifugē 2,5 min 15 871 × g, nolej cauri izgājušo šķīdumu.
4. Ja izdalītā DNS tiks izmantota sekvenēšanai – pievieno 100 μL saistīšanās bufera, centrifugē 1,5 min 15 871 × g, nolej cauri izgājušo šķīdumu.
5. Pievieno 700 μL mazgāšanas bufera, centrifugē 1,5 min 15 871 × g un nolej cauri izgājušo šķīdumu.
6. Centrifugē tukšo kolonnu 1,5 min 15 871 × g, lai pilnīgi atbrīvotos no mazgāšanas bufera paliekām. (Savādāk palikušais etanols var traucēt turpmākajām enzimatiskajām reakcijām.)
7. Kolonnas augšējo daļu (ar matriksu un DNS) pārliet tīrā 1,5 mL stobriņā.

8. Tieši virs matricas centra pievieno 20 μL eluēšanas buferi, inkubē RT 2 min.
9. Centrifugē 1,5 min $15\,871 \times g$, attīrīšanas kolonnu izmet ārā, stobriņu ar izdalīto DNS var uzglabāt pie -20°C .

3.13. DNS sekvenēšana ar Sangera metodi (*BigDye kit*)

Par Sangera sekvenēšanu sauc pirmās paaudzes DNS sekvenēšanas metodi, kuras pamatā ir DNS ķēdes sintēzes selektīva terminācija, izmantojot fluorescenti iezīmētus dideoksinukleotīdus. No sākuma tiek veikta PCR jeb polimerāzes ķēdes reakcija, kas vispārīgi tiek izmantota DNS pavairošanai, izmantojot dezoksiribozes nukleozīdu maisījumu (dNTP), termostabilu polimerāzi un praimeri, lai biociklizatorā mainot temperatūru, veicinātu ciklisku DNS denaturāciju un sintēzi. Tikai sekvenēšanas gadījumā tiek pievienoti arī modificēti dideoksinukleotīdi, rezultātā iegūstot dažāda garuma DNS fragmentus, kuri ir fluorescenti iezīmēti. Pēc tam PCR produkti tiek attīrīti, izgulsnējot ar etanolu, lai atbrīvotos no piemaisījumiem, kas var traucēt pareizai sekvenences nolasīšanai. Tad dsDNS tiek denaturēta, pievienojot formamīdu un karsējot, lai atbrīvotos no garajiem matricas DNS fragmentiem. Beigās tiek veikta sekvenēšana kapilārajā elektroforēzē, kurā tiek uztverti iezīmēto dideoksinukleotīdu fluorescences signāli.

1. PCR stobriņā sagatavo reakcijas maisījumu – sajauc 1 μL DNS parauga, 1 μL praimera (5 pmol/ μL), 1 μL *BigDye* v3.1. terminatoru maisījuma, 3,5 μL 5X *BigDye* sekvenēšanas bufera un 13,5 μL dH₂O. Var arī pagatavot vienā 1,5 mL stobriņā reakcijas maisījumu visiem paraugiem, visus daudzumus (izņemot DNS, ko pievieno atsevišķi) sareizinot ar paraugu skaitu un pieskaitot vēl nepieciešamos daudzumus divām reakcijām pipešu kļūdas dēļ.
2. Vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā. Ja reakciju maisījums gatavots vairākiem paraugiem kopā, tad PCR stobriņos iepilda 19 μL maisījuma un 1 μL DNS parauga, vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
3. PCR stobriņu ievieto biociklizatorā, uzstāda programmu: $+96^\circ\text{C} - 3$ min; ($+96^\circ\text{C} - 10$ s; $+50^\circ\text{C} - 5$ s; $+60^\circ\text{C} - 4$ min) – 30 cikli; $+72^\circ\text{C} - 5$ min; $+4^\circ\text{C} - \text{Hold}$.
4. PCR stobriņa saturu pārliet 1,5 mL stobriņā un pievieno 16 μL H₂O un 64 μL 96% etanola. (Etanolu izmanto, lai izgulsnētu DNS.)
5. Vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā, inkubē RT 20 min.
6. Centrifugē 23 min $15\,871 \times g$. (Pirms tam jāatzīmē paredzamā nogulsņu vieta, jo tās nebūs ar aci saskatāmas.)
7. Uzmanīgi aizvāc supernatantu, neaizskarot nesaskatāmās nogulsnes.

8. Pievieno 200 μL 70% etanola, centrifugē 7,5 min $15\ 871 \times g$.
9. Vēlreiz aizvāc supernatantu, nepieskaroties nogulsnēm.
10. Nogulsnes žāvē termoblokā $+65^\circ\text{C}$ ~ 7 min (līdz etanola paliekas ir izgarojušas).
11. Pievieno 20 μL *Hi-Di* formamīda, vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
12. Inkubē termoblokā $+95^\circ\text{C}$ 5 min, pēc tam atdzesē ledus vannā.
13. Paraugu uzglabā -20°C līdz tā ievietošanai sekvenēšanas iekārtā.

3.14. Bakteriālā 16S rRNS gēna sekvenēšana

16S rRNS ir prokariotiskās ribosomas 30S subvienības RNS daļa, kas ir atrodama visās baktērijās. To kodē 16S rRNS gēns, kura sekvenēšana tiek plaši pielietota baktēriju klasifikācijā tādēļ, ka tas ir ļoti konservatīvs gēns (Tringe and Hugenholtz 2008). Pēc sekvenēšanas iegūtā gēna sekvenca tiek salīdzināta ar datubāzēs (piemēram, EzBioCloud) atrodamajām sekvencēm, lai noteiktu to savstarpējo līdzību (Yoon *et al.* 2017).

1. No šūnu kultūras parauga izdala DNS (sk. 3.9. nodaļu).
2. Nosaka DNS koncentrāciju un kvalitāti (sk. 3.10. nodaļu).
3. PCR stobriņā pagatavo reakcijas maisījumu (kopā 50 μL) – sajauc 4 μL DNS parauga (tilpumu var mainīt atkarībā no DNS koncentrācijas), 5 μL *DreamTaq* bufera (10x), 1 μL dNTP (10 mM), 0,5 μL 27F praimera (100 pM/ μL), 0,5 μL 1492R praimera (100 pM/ μL), 38,5 μL dH₂O (tilpumu aprēķina atkarībā no DNS parauga tilpuma) un obligāti kā pēdējo pievieno 0,5 μL *DreamTaq Hot Start* DNS polimerāzes.
4. Vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
5. Ievieto biociklizatorā un uzstāda šādu programmu: $+95^\circ\text{C}$ – 3 min; ($+95^\circ\text{C}$ – 30 s; $+55^\circ\text{C}$ – 30 s; $+72^\circ\text{C}$ – 1,5 min) – 35 cikli; $+72^\circ\text{C}$ – 10 min; $+4^\circ\text{C}$ – *Hold*.
6. Paraugiem veic natīvo agarozes gēla elektroforēzi (NAGE) (sk. 3.11. nodaļu).
7. DNS izdala no gēla (sk. 3.12. nodaļu). Nepieciešamā josla gēlā ir ~ 1500 bp gara (var noteikt pēc marķiera).
8. Paraugā esošo attīrīto 16S rRNS gēna DNS sekvenē ar *BigDye* Sangera metodi (sk. 3.13. nodaļu).

3.15. Fāga DNS šķelšana ar restriktāzēm

Restriktāzes jeb restrikcijas endonukleāzes ir enzīmi, kas spēj šķelt DNS pavedienu pie konkrētām sekvencēm, kuras sauc par restrikcijas saitēm. Tās spēj piesaistīties vai nu pašam saitam vai arī tā tuvumā.

1. Nepieciešamais DNS daudzums vienai reakcijai – 400-500 ng uz 2-5 μL .
2. DNS paraugam pievieno 1 μL izvēlētā restrikcijas enzīma.
3. Pievieno arī 1 μL piemērota 10x bufera.
4. Pievieno nepieciešamo dH_2O tilpumu, lai kopējais reakcijas tilpums būtu 10 μL .
5. Vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
6. Inkubē 30 min pie +37 °C.
7. DNS paraugam veic NAGE (sk. 3.11. nodaļu).

3.16. DNS fragmentu bibliotēkas sagatavošana (*TruSeq DNA Nano Low-Throughput Library Prep Kit*)

3.16.1. DNS fragmentēšana (sonikācija ar *Covaris S220*)

Metodi izmanto, lai iegūtu nejausus, aptuveni vēlamā vidējā garuma apstrādājamus DNS fragmentus lielā daudzumā. Beigās tiek iegūti dsDNS fragmenti ar 3' vai 5' pārkarēm.

1. Uzpilda *Covaris* ūdens vannu līdz līmenim 12 ar *Milli-Q* ūdeni.
2. Atdzesē un degazē ūdens vannu (~30 min).
3. Tikmēr paņem vajadzīgo DNS parauga tilpumu, ja bibliotēku sagatavošanai nepieciešami ~100 ng (parasti nepieciešami 200 ng, bet šajā darbā kopā zem viena adaptera/indeksa tika sekvenēti divi savā starpā atšķirīgi DNS paraugi, kas tika sajaukti pirms sonikācijas)
4. Pievieno dH_2O , lai kopējais parauga tilpums būtu 50 μL .
5. Pārnes iegūto paraugu *Covaris microTUBE* stobriņā, stobriņu ievieto sonikatorā.
6. Sonicē ar iestādījumiem, kas paredzēti vidēji 550 bp fragmentu garumam: *Duty Factor 5%; Peak/Displayed Power 175 W; Cycles/Burst 200; Duration 25 sec; Temperature 5.5-6 °C*.
7. Pārnes sonicēto DNS paraugu tūrā 1,5 mL *Eppendorf* stobriņā.
8. Pievieno 80 μL paraugu attīrīšanas lodītes (*Sample Purification Beads*), vorteksē un inkubē RT 5 min.
9. Stobriņus ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, līdz šķīdums ir dzidrs un visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā pusē (~ 8 min).
10. Novāc un izmet supernatantu, svarīgi ir neaizikt nevienu lodīti.
11. Lai noskalotu paraugus, pievieno 200 μL svaigi atšķaidīta 80% etanola, inkubē 30 sec, tad novāc supernatantu.
12. Atkārti 11. soli, beigās vēl uzmanīgi ar 20 μL pipeti novācot atlikušo etanolu.

13. Lodītes žāvē 5 min, stobriņiem atverot vāciņus un tos atstājot magnētiskajā statīvā.
14. Pievieno 62,5 μL resuspendēšanas bufera, noņem no magnētiskā statīva un vorteksē.
15. Inkubē RT 2 min.
16. Ievieto magnētiskajā statīvā un gaida 2-5 min līdz lodītes ir piesaistījušās.
17. Pārviesto 60 μL parauga tīrā stobriņā.

3.16.2. DNS fragmentu galu reparācija un atlase pēc garuma

Šajā procesā dsDNS fragmentu galu pārkares tiek pārveidotas par strupiem galiem. Galu reparācijas maisījumā (*End Repair Mix 2*) 3'-5' eksonukleāzes aktivitāte novāc 3' pārkares, savukārt 5'-3' polimerāzes aktivitāte aizpilda 5' pārkares. Pēc tam tiek atlasīti fragmenti ar nepieciešamo garumu, izmantojot paraugu piesaistīšanas lodītes dažādās attiecībās.

1. Paraugam pievieno 40 μL galu reparācijas maisījuma, vorteksē.
2. Inkubē termoblokā 30 min pie +30°C.
3. Tīrā 15 mL stobriņā atšķaida lodītes ar *Milli-Q* ūdeni attiecībā 1:1, uz katru paraugu rēķinot 92 μL gan lodīšu, gan ūdens (iekļauts 15% pārpalikums). Piemēram, uz 12 paraugiem būtu nepieciešami 1104 μL lodīšu + 1104 μL dH₂O.
4. Atšķaidītās lodītes vorteksē.
5. Katram DNS paraugam pievieno 160 μL atšķaidīto lodīšu, vorteksē un inkubē RT 5 min.
6. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida līdz visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
7. 250 μL supernatanta pārviesto tīrā stobriņā.
8. Supernatantam pievieno 30 μL neatšķaidītu lodīšu, vorteksē un inkubē RT 5 min.
9. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
10. Novāc supernatantu.
11. Veic paraugu skalošanu: pievieno 200 μL svaigi atšķaidīta 80% etanola, inkubē uz magnētiskā statīva 30 sec, novāc supernatantu.
12. Atkārti 11. soli, atlikušo etanolu uzmanīgi novāc ar 20 μL pipeti.
13. Žāvē paraugus, atstājot atvērtus stobriņus magnētiskajā statīvā uz 5 min.
14. Pievieno 20 μL resuspendēšanas bufera, stobriņus izņem no magnētiskā statīva, vorteksē, inkubē RT 2 min.

15. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
16. Pārviesto 17,5 µL supernatanta tīrā PCR stobriņā.

3.16.3. 3' galu adenilēšana

Strupo fragmentu 3' galos tiek pievienots viens A nukleotīds, lai novērstu to ligēšanos savā starpā adapteru ligēšanas reakcijā. Katra adaptera 3' galā esošais T nukleotīds nodrošina komplementāru pārkaru, kas ļaus to ligēt pie DNS fragmenta. Šis process nodrošina mazu himēru veidošanās iespējamību.

1. Pievieno 12,5 µL *A-Tailing Mix*, vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
2. Stobriņus ievieto biociklizatorā, uzstāda programmu: +37°C – 30 min; +70°C – 5 min; +4°C – *Hold*.

3.16.4. Adapteru ligēšana

Tiek ligēti katram paraugam unikāli indeksēšanas adapteri, sagatavojot tos hibridizēšanai sekvenēšanas procesā. Adapteri ļauj atšķirt dažādu paraugu bibliotēku sekvenēšanas datus.

1. Pievieno reaģentus tieši šādā secībā: 2,5 µL resuspendēšanas bufera, 2,5 µL ligēšanas maisījuma 2 un 2,5 µL attiecīgā DNS adaptera.
2. Vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
3. Inkubē termoblokā 10 min pie +30°C.
4. Pievieno 5 µL ligēšanas apturēšanas bufera, vorteksē.
5. Pievieno 42,5 µL attīrīšanas lodīšu, vorteksē un inkubē RT 5 min.
6. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
7. Novāc supernatantu.
8. Veic paraugu skalošanu: pievieno 200 µL svaigi atšķaidīta 80% etanola, inkubē uz magnētiskā statīva 30 sec, novāc supernatantu.
9. Atkārti 8. soli, atlikušo etanolu uzmanīgi novāc ar 20 µL pipeti.
10. Žāvē paraugus, atstājot atvērtus stobriņus magnētiskajā statīvā uz 5 min.
11. Pievieno 52,5 µL resuspendēšanas bufera.
12. Stobriņus izņem no magnētiskā statīva, vorteksē un inkubē RT 2 min.
13. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
14. Pārviesto 50 µL supernatanta tīrā stobriņā.

15. Atkārtro soļus 5.–13., šoreiz pievienojot 50 µL lodīšu un 27,5 µL resuspendēšanas bufera.
16. Pārviesto 25 µL supernatanta tīrā PCR stobriņā.

3.16.5. DNS fragmentu pavairošana

Šajā procesā tiek izmantota PCR, lai selektīvi pavairotu tos DNS fragmentus, kuriem ir adapteru molekulas abos to galos. Fragmenti bez adapteriem vai ar adapteri vienā tā galā nebūs derīgi sekvenēšanai, jo tie nespēs veidot klāsterus, turklāt fragmenti bez adapteriem nevarēs hibridizēties ar sekvenēšanas čipa virsmai piestiprinātiem praimeriem.

1. Pievieno 5 µL PCR praimeru kokteili (*PCR Primer Cocktail*).
2. Pievieno 20 µL PCR maisījuma (*Enhanced PCR Mix*), vorteksē un centrifugē *short spin* režīmā.
3. Stobriņus ievieto biociklizatorā, uzstāda programmu: +95°C – 3 min; (+98°C – 20 sec; +60°C – 15 sec; +72°C – 30 sec) – 8 cikli; +72°C – 5 min; +4°C – *Hold*.
4. Paraugiem pievieno 50 µL attīrīšanas lodīšu, vorteksē un inkubē RT 5 min.
5. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
6. Novāc supernatantu.
7. Veic paraugu skalošanu: pievieno 200 µL svaigi atšķaidīta 80% etanola, inkubē uz magnētiskā statīva 30 sec, novāc supernatantu.
8. Atkārtro 7. soli, atlikušo etanolu uzmanīgi novāc ar 20 µL pipeti.
9. Žāvē paraugus, atstājot atvērtus stobriņus magnētiskajā statīvā uz 5 min.
10. Pievieno 32,5 µL resuspendēšanas bufera.
11. Stobriņus izņem no magnētiskā statīva, vorteksē un inkubē RT 2 min.
12. Ievieto magnētiskajā statīvā un sagaida, kad visas lodītes ir sakoncentrējušās vienā stobriņa pusē (~5 min).
13. Pārviesto 30 µL supernatanta tīrā stobriņā. Ir iegūtas gatavas DNS bibliotēkas, kuras var izmantot sekvenēšanai.

3.17. DNS koncentrācijas novērtēšana ar *Qubit*

1. Sagatavo 0,5 mL *Qubit* stobriņus visiem paraugiem un diviem standartiem, aprakstīt drīkst tikai stobriņu vāciņus.
2. Atšķaida vēlamo *Qubit dsDNA HS Reagent* krāsvielas tilpumu ar buferi *Qubit dsDNA HS Buffer* attiecībā 1:200. (Ņemot vērā pārpalikumu, rēķina, ka uz katru

- paraugu un standartu nepieciešami 200 μL sajauktā šķīduma.) Jaunākajos kitos krāsviela jau ir iepriekš ir sajaukta ar buferi, šajā gadījumā šo soli var izlaist.
3. Standartiem paredzētajos stobriņos iepilda 190 μL 2. solī iegūtā šķīduma, kā arī 10 μL standarta #1 vienā stobriņā un 10 μL standarta #2 otrā. Kopējais tilpums 200 μL .
 4. Paraugiem paredzētajos stobriņos iespējams iepildīt 1 – 20 μL parauga un 2. solī sajaukto šķīdumu pievieno tā, lai kopējais tilpums būtu 200 μL . Parasti tiek sajaukti 2 μL parauga un 198 μL šķīduma, bieži sanāk DNS paraugus pirms tam atšķaidīt, jo DNS daudzumam jābūt robežās 0,1 – 120 ng.
 5. Visus stobriņus vorteksē.
 6. *Qubit* fluorometrā sadaļā *Menu* izvēlas *DNA*, tad *dsDNA High Sensitivity*, tad *Read Standarts*.
 7. Ievieto stobriņu ar standartu #1, izvēlas *Read Standart*, tad izņem stobriņu un atkārtoti to pašu ar standartu #2.
 8. Nospiež *Run Samples*, ievada parauga tilpumu (1–20 μL) un mērvienību.
 9. Ievieto stobriņu ar paraugu, izvēlas *Read tube*, ekrānā parādīsies tā koncentrācija. Nospiežot *Calculate Stock Conc.* ir iespējams aprēķināt koncentrāciju oriģinālajā paraugā, tikai nepieciešams norādīt izmantoto parauga oriģināla tilpumu.
 10. Izņem stobriņu, ievieto nākamo un izvēlas *Read Next Sample*. Šādi var nomērīt koncentrāciju tik paraugiem, cik vajag.

3.18. Bioanalizators DNS fragmentu bibliotēku pārbaudei (*Agilent 2100 Bioanalyzer*)

Izmantojot bioanalizatoru, ir iespējams veikt paraugu kapilāro elektroforēzi čipā un šādi novērtēt DNS bibliotēkas kvalitāti (dažādu garumu fragmentu klātbūtni un daudzumu). Šī ir daudz objektīvāka un precīzāka metode par NAGE.

1. Jaunai šļircei noņem uzgali un ievieto to spailē. Pieskrūvē šļirci pie čipa stacijas augšējās daļas un iestāda spaili zemākajā nodalījumā.
2. Ievieto jaunu *High Sensitivity DNA* čipu tā sagatavošanas stacijā.
3. Ar pipeti iepilda 9 μL gēla-krāsvielas maisījuma bedrītē, kura apzīmēta ar burtu G aplī. Svarīgi ir to iepildīt bedrītes centrā un bez gaisa burbuļiem.
4. Uzstāda taimeru uz 60 sec, pārlicinās, ka šļirces rokturis ir pie 1 mL atzīmes šļircē.
5. Aizver čipa staciju, jābūt dzirdamam klikšķim.

6. Nospiež šļirces rokturi līdz to notur spaile, nogaida precīzi 60 sec (ieslēdz taimeri) un atlaiž rokturi, izmantojot spailes atlaišanas mehānismu, rokturim ir pašam jāatgriežas vismaz līdz 0,3 mL atzīmei.
7. Pagaida 5 sec, tad lēnām atvelk rokturi līdz 1 mL atzīmei.
8. Atver čipa staciju un iepilda pa 9 μL gēla-krāsvielas maisījuma visās pārējās bedrītēs, kas atzīmētas ar G.
9. Iepilda 5 μL *High Sensitivity DNA marker* (zaļais stobriņš) visās paraugu bedrītēs (1–11), kā arī tajā, kura atzīmēta ar kāpņu simbolu.
10. Iepilda 1 μL *High Sensitivity DNA ladder* (dzeltenais stobriņš) bedrītē, kas apzīmēta ar kāpņu simbolu.
11. Iepilda 1 μL parauga katrā paraugu bedrītē. Ja paraugu ir mazāk kā bedrīšu (11), tad brīvajās iepilda 1 μL *High Sensitivity DNA marker*.
12. Pārlicinās, ka nevienā bedrītē nav gaisa burbuļu, un vorteksē čipu 1 min pie 2400 rpm speciālizētajā čipu vorteksā.
13. Čipu ievieto bioanalizatorā *Agilent 2100* un aizver vāku.
14. Datorprogrammā *2100 Expert* izvēlnē *Instrument* izvēlas atbilstošo analīzes veidu, ievada informāciju par paraugiem un izvēlas *Start*.
15. Uzreiz pēc analīzes beigām un rezultātu ieguves nepieciešams tīrīt elektrodus: tīrīšanas čipā iepilda 350 μL *Milli-Q* ūdens, to ievieto bioanalizatorā, uz 10 sec aizver vāku, tad to atver, pagaida vēl 10 sec, kamēr ūdens uz elektrodiem iztvaikos, izņem tīrīšanas čipu un aizver vāku.

3.19. Sekvenēšana (*Illumina MiSeq*)

DNS bibliotēkas tika sekvenētas ar *Illumina MiSeq* sistēmu, izmantojot 500 ciklu *MiSeq Reagent Kit v2 nano*. Katra fāga DNS bibliotēkas veidoja pusi no sākotnējā DNS daudzuma katrā no 12 apvienotajām bibliotēkām, kur katrai, kas saturēja divu neradniecīgu fāgu DNS, bija savs svītru kods (*barcode*).

3.20. Sekvenēšanas datu apstrāde

Pēc sekvenēšanas tika iegūti daudzi nolasījumi (*reads*), un mērķis bija no tiem izveidot pilnu genoma sekvenci. Pagatavot bibliotēkas un sekvenēt ir iespējams arī ar viena nolasījuma (*single-read*) metodi, tomēr šajā darbā tika izmantota sapāroto galu (*paired-end*) metode, kas ļauj iegūt vairāk datus no tā paša DNS parauga. Daļai no 550 bp (šajā darbā, citur var būt izmantoti arī cita garuma fragmenti) garajiem, randomizētiem, fāga genomiskās DNS insertiem, kas bija iepriekš sagatavotajās DNS bibliotēkās, nolasīja 250 bp no abiem tā galiem. Rezultātā

tika iegūti sapāroti sekvenēto insertu nolasījumi ar aptuveni zināmu attālumu starp tiem. Tad pārbaudīja nolasījumu kvalitāti un *de novo* apvienoja pēc iespējas garākās DNS nukleotīdu sekvencēs, visos gadījumos beigās iegūstot pilno fāga genoma sekvenci. Pēc tam genomu bija nepieciešams apstiprināt jeb validēt ar dažādām metodēm. Dažkārt papildus tiek veikta Sangera sekvenēšana ar specifiskiem praimeriem, lai pārbaudītu neskaidrus reģionus vai DNS molekulas fiziskos galus.

Fāga DNS bibliotēkas neapstrādāti nolasījumi tika sākotnēji analizēti, izmantojot programmu FastQC v0.11.9 (Andrews 2010), kura parāda tādas nolasījumu kopuma īpašības kā to skaitu, garuma diapazonus, kvalitāti "Phred" skalā (tā atspoguļo nepareizas bāzes noteikšanas varbūtību), GC% īpatsvaru utt. Pēdējās katra nolasījuma bāzes noņemšana un nolasījumu aplīdzināšana (*trimming*) pēc kvalitātes (noņem bāzes, kurām Phred < 20) un garuma (noņem nolasījumus, kuru garums < 50 bp) tika veikta ar *bbduk* no *BBmap* programmatūras paketes (Bushnell 2014). Apstrādāto nolasījumu *de novo* apvienošana garākās sekvencēs tika veikta ar programmu *Unicycler* v0.4.8, izmantojot standarta (*normal mode*) iestatījumus (Wick *et al.* 2017).

Neskaidros gadījumos, kur pārklājums bez acīmredzama iemesla ir zemāks kā vajadzētu vai nolasījumu robežas ir neviennozīmīgas, ir iespējams veikt genoma pārbaudi ar Sangera sekvenēšanu, izmantojot specifiskus praimerus, kuri spēj saistīties ar DNS molekulu nedaudz pirms vai pēc neskaidrā reģiona. Šo metodi izmanto arī genoma fizisko galu noteikšanai, kaut arī vairākus genoma fizisko galu veidus un pat precīzas sekvenses, izmantojot izvēlēto DNS bibliotēkas sagatavošanas veidu, var diezgan droši noteikt *in silico*, izmantojot programmu *PhageTerm* v1.0.12 (Garneau *et al.* 2017), kurā analizē pilna genoma sekvenci ar neaplīdzinātiem nolasījumiem (piemēram, īso tiešo terminālo atkārtojumu (SDTR) sekvenču identifikācija vairumam šajā darbā sekvenēto fāgu genomu). Bieži fizisko galu noteikšanai izmanto termināzes lielās subvienības (TerL) gēna sekvenču filoģenētisko analīzi, kuru izmantojot ir iespējams paredzēt fāga pakošanās stratēģiju pēc pētāmā fāga TerL sekvenses radniecības ar fāgiem, kuriem pakošanās stratēģija iepriekš tika pārbaudīta eksperimentāli (Merrill *et al.* 2016). No sekvenēšanas datiem savākto fāgu genomu sekvenču pilnību un pareizību ir iespējams validēt arī ar genomiskās DNS restrikcijas analīzi (sk. 3.15. nodaļu), salīdzinot NAGE redzamo fragmentu garumus ar *in silico* iegūtajiem. Iegūto fāgu genoma sekvenču sagaidāmā šķelšana ar restriktāzēm un sekojošā *in silico* NAGE tika veikta programmā *Serial Cloner* v2.6.1.

Pilnā genoma anotēšana tika veikta ar programmu *DNA Master* v5.23.6 (Lawrence 2022). Hipotētisko atvērto nolasīšanas rāmju (ORF) noteikšanai tika izmantoti rīki *Glimmer* (Delcher

et al. 2007) un GeneMark (Besemer and Borodovsky 2005), tRNS gēnu meklēšanai tika izmantoti rīki Aragorn (Laslett and Canback 2004) un tRNAscan (Lowe and Eddy 1997). Tika atļauti četri iespējamie starta kodoni (ATG, TTG, CTG un GTG) un analizēti tikai ORF, kuru potenciālais produkts bija garāks par 30 aminoskābēm. Izvērtējot ORF starta pozīcijas, priekšroka tika dota garākajai sekvencei, kamēr vien tā ļoti nepārklājās ar kādu citu ORF. Kā arī 20 bāzes (5' – 3') pirms iespējamā starta kodona tika izvērtēta potenciālās *Shine-Dalgarno* (SD) sekvences klātesamība, kas būtu komplementāra saimnieka anti-SD sekvencei (13 bāzes no *C. davisae* DSM 4568 16S rRNS gala: 3'-AUUCCUCCACUAG-5') (Amin *et al.* 2018), pieļaujot arī nestabilo G-U bāzu saistīšanos. ORF produktu funkcijas noteica, salīdzinot katra iespējamā proteīna sekvenci ar pieejamajām sekvencēm NCBI Konservatīvo domēnu (CDD) (Marchler-Bauer *et al.* 2011) datubāzē ar konservatīvo domēnu meklētāju, proteīnu sekvenču datubāzē ar BLASTp algoritmu (e-vērtības sliekšnis 1×10^{-3}) (Altschul *et al.* 1990) un HHpred meklētājā (starp Protein Data Bank, Pfam, UniProt-SwissProt-viral70, NCBI CDD datubāzēm) (Söding *et al.* 2005). Starta pozīcijas tika vēlreiz manuāli izvērtētas un rediģētas, lai atbilstu datubāzēs esošajām sekvencēm, ja vien tas bija nepieciešams un pamatots (ņemot vērā analizējamā fāga genomisko kontekstu katram ORF individuāli). Tika arī aprēķināta brīvās enerģijas izmaiņa ΔG (kcal/mol), kas nepieciešama, lai SD un anti-SD sekvences saistītos un veidotu dubultspirāli (aptuveni raksturo translācijas iniciācijas iespējamību no analizējamā ORF starta kodona), izmantojot `free_align.pl` skriptu ar “helix only” uzstādījumiem (Starmer *et al.* 2006). Iegūto pilna genoma anotāciju jaunizdalītajam *Cedecea* fāgam Yanou saglabāja GenBank formātā (*.gb) un iesniedza GenBank publiskajā bioloģisko sekvenču repositoriņā.

Lai veiktu fāga Yanou pilna genoma nukleotīdu sekvenču (*pairwise*) salīdzinājumu ar tam tuvāko fāgu (*Escherichia* fāga JeanTinguely celms Bas64, piekļuves numurs MZ501081.1) un vislabāk izpētīto *Autographiviridae* pārstāvi (*Escherichia* fāgs T7, piekļuves numurs NC_001604), tika iegūti to anotēti genomi GenBank formātā. Anotācijas failos (*.gb), izmantojot teksta redaktoru, katram fāga ORF kodētam proteīnam manuāli tika piešķirta krāsa (“/colour=”) atkarībā no tā funkcionālās grupas pēc RGB krāsu modeļa: dzeltena (255 255 0) – virionu morfoģenēzē iesaistītie proteīni, zila (0 0 255) – DNS replikācija, modifikācija un atjaunošana, zaļa (0 255 0) – līze, pelēka (100 100 100) – nezināma funkcija (hipotētiskie proteīni) un sarkana (255 0 0) – RNS polimerāze. Tad šo izvēlēto fāgu genomu sekvenses kopā ar failiem, kuros gēniem tika piešķirtas krāsas, tika apstrādātas ar programmu EasyFig v2.2.3, izmantojot BLASTN un TBLASTX salīdzinājumu iespējas un atfiltrējot BLAST rezultātus, kuri ir šaurāki par 4 pikseliem (Sullivan *et al.* 2011).

4. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

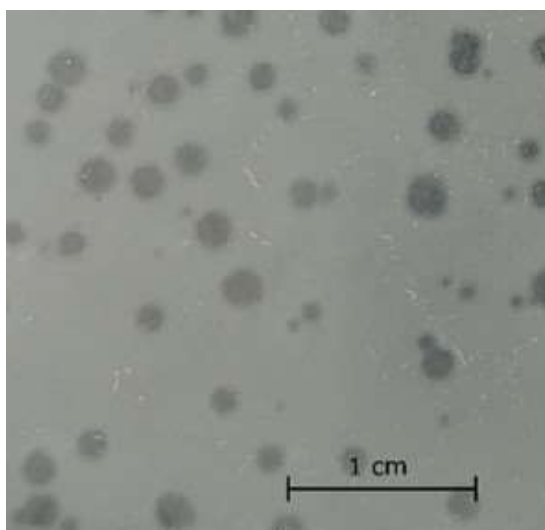
4.1. Baktēriju un fāgu izolēšana

No dažādu kultūraugu lapām uz cietās PA barotnes platēm, inkubējot RT, tika izolētas deviņas morfoloģiski atšķirīgas baktēriju kolonijas H1–H9 (sk. 3.2. nodaļu), kurām tika noteiktas dažādas īpašības, piemēram, jutība vai rezistence pret noteiktām antibiotikām (sk. 1. pielikumu). Visas kultūras spēja augt RT un +30°C, tomēr tikai daļa no tām arī +37°C. Visām kultūrām, kurām tika veikta antibiotiķu rezistences pārbaude, tika konstatēta rezistence pret ampicilīnu (50 µg/mL), bet ne pret kanamicīnu (10 µg/mL).

Pēc 3.3. un 3.4 nodaļās aprakstītajām metodēm, izmantojot to pašu suspensiju, no kuras tika izolētas individuālas baktēriju kultūras, katrai no šīm kultūrām, izmantojot tās kā indikatorkultūras un cieto PA barotni, RT, tika iegūti fāgu plaki. Atsevišķi plaki tika izolēti, tos pārsējot “spot” testā, pēc tam no izteiktākajiem līzes plankumiem (spotiem) tika iegūti primārie fāgu preparāti, kuros noteica fāgu titru un kas tika izmantoti tālākai attiecīgā fāga pavairošanai (sk. 3.5. nodaļu). Šādi katrai baktēriju kultūrai tika iegūts savs fāga izolāts, un tie attiecīgi tika nosaukti kā F1–F9 (sk. 2. pielikumu).

Turpmākai fāgu izolēšanai tika izvēlēta baktēriju kultūra H1, jo pēc 16S rRNS sekvenēšanas datiem tā pieder sugai *Cedecea davisae*, kas ir salīdzinoši reti sastopama, un līdz šim uz tās ir izolēts un aprakstīts tikai viens fāgs (Jun-heon 2018). No 11 pilsētu notekūdeņu paraugiem (15 mL) iegūtie filtrāti (sk. 3.3. nodaļu) tika titrēti, izmantojot jau iepriekš izolēto H1 kā indikatorkultūru. Kā aprakstīts iepriekš, arī no notekūdeņiem iegūto fāgu plaki tika izolēti un attiecīgie fāgi pavairoti, iegūstot 13 jaunus fāgu izolātus. No katras pilsētas notekūdeņiem tika iegūts viens fāga izolāts, izņemot Tukuma un Jūrmalas notekūdeņus, no kuriem plaku atšķirīgās morfoloģijas dēļ tika iegūti pa diviem izolātiem (sk. 3. pielikumu).

Pēc vēlāk veiktās fāgu genomu sekvenēšanas, kuras rezultāti aprakstīti, sākot ar 4.7. nodaļu, tika pieņemts lēmums rūpīgāk aprakstīt tieši fāga izolātu 9-1 jeb *C. davisae* fāgu Yanou. Tas tāpēc, ka no visiem lītiskajiem fāgiem, kuru genomi tika sekvenēti šī darba ietvaros, šis ir visunikālākais. Turklāt atšķirībā no jau aprakstītā *C. davisae* fāga φCd2018 (Jun-heon 2018), kuram ir sifovīrusa morfotips un lizogēnais dzīves cikls, Yanou ir podovīrusa morfotips un lītisks dzīves cikls. Šis fāgs tika izolēts no Rēzeknes notekūdeņu parauga un spēj veidot plakus RT, +30°C, un +37°C temperatūrā. Yanou veidotie plaki ir dzidri ar šauru, duļķainu malu (2. attēls), un to diametrs pie dažādām temperatūrām atšķiras. RT tas ir $1,00 \pm 0,14$ mm, +30°C – $1,37 \pm 0,47$ mm, bet +37°C tas ir vislielākais – $3,87 \pm 1,36$ mm. Tas varētu liecināt par to, ka fāgs visaktīvāk spēj lizēt šūnas +37°C temperatūrā.



2. attēls. *C. davisae* fāga Yanou veidotie plaki uz PA cietās barotnes, izmantojot *C. davisae* izolātu H1 kā saimnieku, plate inkubēta +30°C.

Figure 2. Plaques formed by original *C. davisae* phage Yanou on PA solid medium using *C. davisae* isolate H1 as a host, incubated at +30°C.

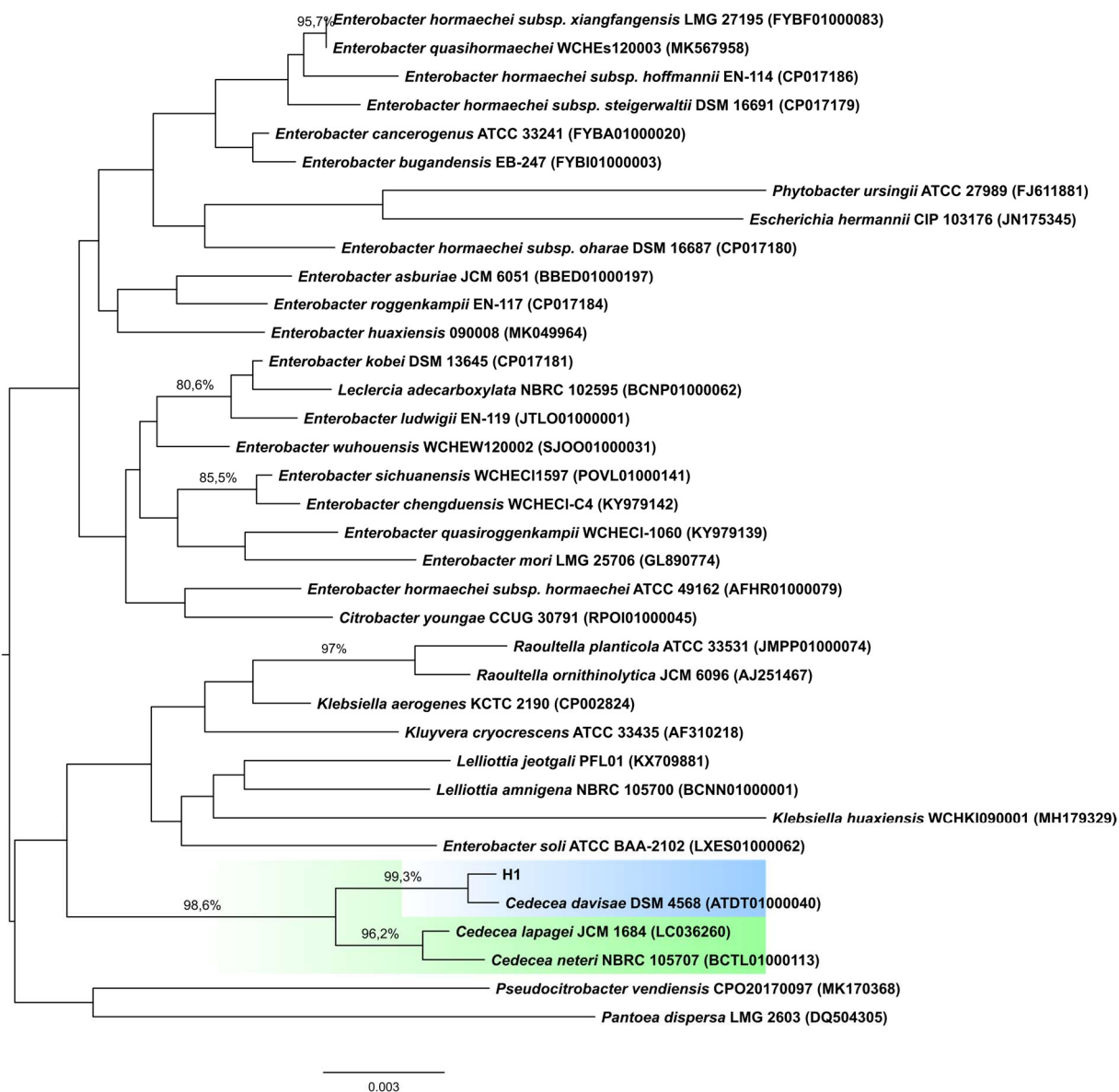
4.2. Baktēriju izolātu taksonomiskā piederība

Lai noteiktu visu darba gaitā iegūto saimniekkultūru taksonomisko piederību, tika veikta to 16S rRNS gēna sekvenēšana pēc iepriekš aprakstītās metodes (sk. 3.14. nodaļu) ar praimeriem 27F un 1429R (praimeru sekvenences dotas 2. nodaļā). Iegūtā daļējā 16S rRNS gēna sekvenca tika salīdzināta ar EzBioCloud datubāzē atrodamajām, tādējādi noskaidrojot radniecīgākās baktēriju sugas. Kultūra H1 tika identificēta kā sugas *Cedecea davisae* izolāts, kuram, salīdzinot ar *C. davisae* celmu DSM 4568, tika konstatētas atšķirības piecos no pielīdzinātiem 1405 bp. Pārējie jauniegūtie baktēriju izolāti tika noteikti kā ģinšu *Pantoea* un *Pseudomonas* pārstāvji (sk. 1. pielikumu), taču to precīza identifikācija līdz sugas līmenim ar iegūtajām sekvencēm nebija droša, kaut arī koloniju morfoloģija liecina, ka tie varētu pārstāvēt savstarpēji atšķirīgas sugas. Izolētā *C. davisae* kultūra tika arī reģistrēta LU Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijā ar numuru LMKK 1640.

C. davisae ir ģints *Cedecea* tipiskā suga. Ģints pieder dzimtai *Enterobacteriaceae*, tās pārstāvji ir kustīgas, gramnegatīvas un fakultatīvi anaerobas nūjiņbaktērijas, kurām nav raksturīga kapsulas un sporu veidošanās. Pirmo reizi gan ģints, gan suga tika nosauktas 1981. gadā. Ģints nosaukums veidots no saīsinājuma CDC, kas apzīmē ASV Slimību kontroles centru (*Center for Disease Control*), kur no klīniskajiem paraugiem 1977. gadā pirmo reizi tika izolēti tās pārstāvji (Grimont *et al.* 1981). Līdz 2020. gadam ir aprakstīti 13 klīniskie gadījumi, kur *C. davisae* visbiežāk ir izolēta no asiņu paraugiem. Lielākā daļa pacientu bija vecāki par 50 gadiem

un viņiem inficēšanās brīdī jau bija raksturīgas saslimšanas, kuras novājināja viņu imūnsistēmu. Balstoties uz šiem gadījumiem, tika secināts, ka tipiski šī suga ir rets, nosacīts patogēns (Thompson and Sharkady 2020). Tomēr tā ir izolēta arī no dzīvniekiem (Kateete *et al.* 2013) un augiem (Akinsanya *et al.* 2015). Pēc 2020. gada ir vēl aprakstīti bakteriēmijas (Akın Şen and Şen 2021) un kaula infekcijas (Notter *et al.* 2022) gadījumi, kas ir saistīti ar šīs sugas izolātiem.

Lai noteiktu H1 izolāta un vairāku *C. davisae* radniecīgu baktēriju sugu 16S rRNS gēnu sekvenču savstarpējās evolucionārās attiecības, tika izveidots filoģenētiskais koks (3. attēls). Tam tika izvēlētas 35 H1 radniecīgākās 16S rRNS gēna sekvences no datubāzes EzBioCloud, pievienojot arī H1 izolāta 16S rRNS sekvenci. Pēc iegūtajiem sekvenču salīdzināšanas datiem redzams, ka izolāts H1 pieder *C. davisae* sugai un ka visas trīs *Cedecea* ģints sugas ir radniecīgas savā starpā un līdz ar to pamatoti iekļautas vienā ģintī. Uz filoģenētiskā koka zariem ir attēlotas *bootstrap* vērtības – procentuālās daļas filoģenētisko koku replikātiem, kuros sagrupējās konkrēta kopa (*clade*), salīdzinot ar oriģinālo koku, kurš tika būvēts, izmantojot oriģinālo sekvenču pielīdzinājumu. Tomēr daudziem citiem šī koka zariem darba ietvaros *bootstrap* procentuālās vērtības netika norādītas, kas nozīmē to, ka tās bija zemākas par 80% (sliksnis, par kuru vienādas vai lielākas vērtības tika izvēlētas savstarpējās, no attiecīga zara distāla mezgla jeb kopsenča (*most common recent ancestor*) atejošo zaru ticamas turpmākās radniecības atbalstam, veidojot kopīgu kopu) un netika uzskatītas par droši ticamām. Lielākā daļa sugu šajā kokā pieder *Enterobacter* ģintij, kuras pārstāvjiem raksturīgi, ka kopas filoģenētiskajos kokos, vadoties pēc 16S rRNS gēna sekvencēm, ir heterogēnas un ar zemu ticamību. Šajā gadījumā evolucionāro attiecību noteikšanai parasti tiek veidoti papildus koki, kuri balstīti uz citu konservatīvu gēnu, piemēram, RNS polimerāzes β subvienības (*rpoB*), sekvencēm (Stephan *et al.* 2007; Madhaiyan *et al.* 2010; Akita *et al.* 2019).



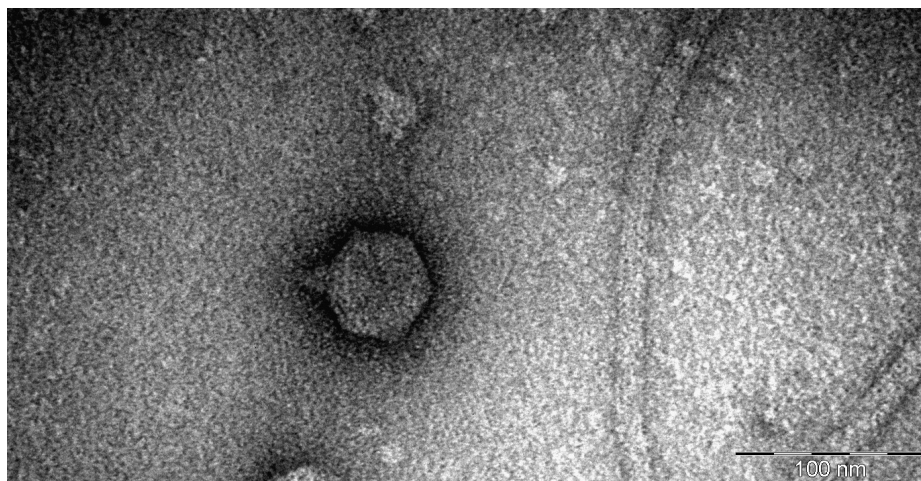
3. attēls. Baktēriju sugu evolucionārās attiecības, balstoties uz daļējām 16S rRNS gēna sekvencēm. Ģints *Cedecea* ir izcelta zaļā krāsā un suga *C. davisae* – zilā. Evolucionārās attiecības tika noteiktas ar “kaimiņu savienošanas” metodi (Saitou and Nei 1987). Attēlā redzams optimālais koks ar zaru garumu summu 0,17526018. Par koka sakni ir noteikts tā viduspunkts. Pie zariem ir norādītas procentuālās vērtības (ja >80%) no 1000 *bootstrap* testu replikātiem, kuros radniecīgās sugas tika sagrupētas kopā (Felsenstein 1985). Koks ir zīmēts mērogā, zaru garumi attēloti vienībās, kas atbilst evolucionārajām distancēm, attēla apakšā dots mērogs. Evolucionārie attālumi aprēķināti, izmantojot p-attāluma metodi (Nei and Kumar 2000), un ir izteikti vienībās, kas atbilst bāzu atšķirībām uz pozīciju. Analīze ietvēra 36 nukleotīdu bāzu sekvences. Sekvenču pielīdzināšana tika veikta ar programmu Muscle (Edgar 2004). Visas pozīcijas, kuras bija pārstāvētas mazāk nekā 90% sekvenču, tika izslēgtas no analīzes. Tātad mazāk kā 10% pielīdzināšanas spraugu, trūkstošu datu un neskaidru bāzu tika atļautas katrā pozīcijā. Kopā galīgajā datu kopā bija 1374 pozīcijas. Evolucionārās analīzes tika

veiktas programmā MEGA7 (Kumar *et al.* 2016), un iegūtais koks tika vizualizēts programmā FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

Figure 3. Evolutionary relationships of bacterial taxa based on partial 16S rRNA gene sequences. The genus *Cedecea* is highlighted in green and the species *C. davisae* – in blue. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 0,17526018 is shown. The tree is rooted at midpoint. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown (if >80%) next to the branches (Felsenstein 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree, the scale is given at the bottom of the figure. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar 2000) and are in the units of the number of base differences per site. The analysis involved 36 nucleotide sequences. Sequence alignment was performed with Muscle (Edgar 2004). All positions with less than 90% site coverage were eliminated. That is, fewer than 10% alignment gaps, missing data, and ambiguous bases were allowed at any position. There were a total of 1374 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) and the resulting tree was drawn in FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

4.3. Izolēto fāgu virionu morfolģija

Darbā jaunizdalģtais fāgs Yanou pieder podovģrusu morfotipam, tam ir ikosaedrģska galva un ģsa aste. Fāģa galvas diametrs ir $63,1 \pm 5,7$ nm, astes garums – $17,0 \pm 2,9$ nm un astes platum – $12,8 \pm 3,2$ nm (mģrģti 6 virioni programmā ImageJ (Schneider *et al.* 2012)). Attiecģbģ uz pģrģģjiem fģģu izolģģtiem – vienu no tiem var pieskaitģt sifovģrusu morfotipam, piecus – podovģrusiem un 17 – miovģrusiem (sk. 2., 3. pielģkumu). Vienģģģģjam lģdz Ńim aprakstģģtajam *C. davisae* fģģam ϕ Cd2018 raksturģģs sifovģrusa morfotips (Jun-heon 2018), tģpģc var secinģt, ka darbģ ir aprakstģģts pirmais *C. davisae* fģģs ar podovģrusa morfotipu.



4. attēls. Fāga Yanou daļiņas morfoloģija. Ar 0,5% uranilacetātu negatīvi krāsota preparāta TEM.

Figure 4. The morphology of phage Yanou particle, negatively stained with 0,5% uranyl acetate (TEM).

4.4. Inficētas un neinficētas *C. davisae* kultūras H1 kultivēšana šķidrā barotnē

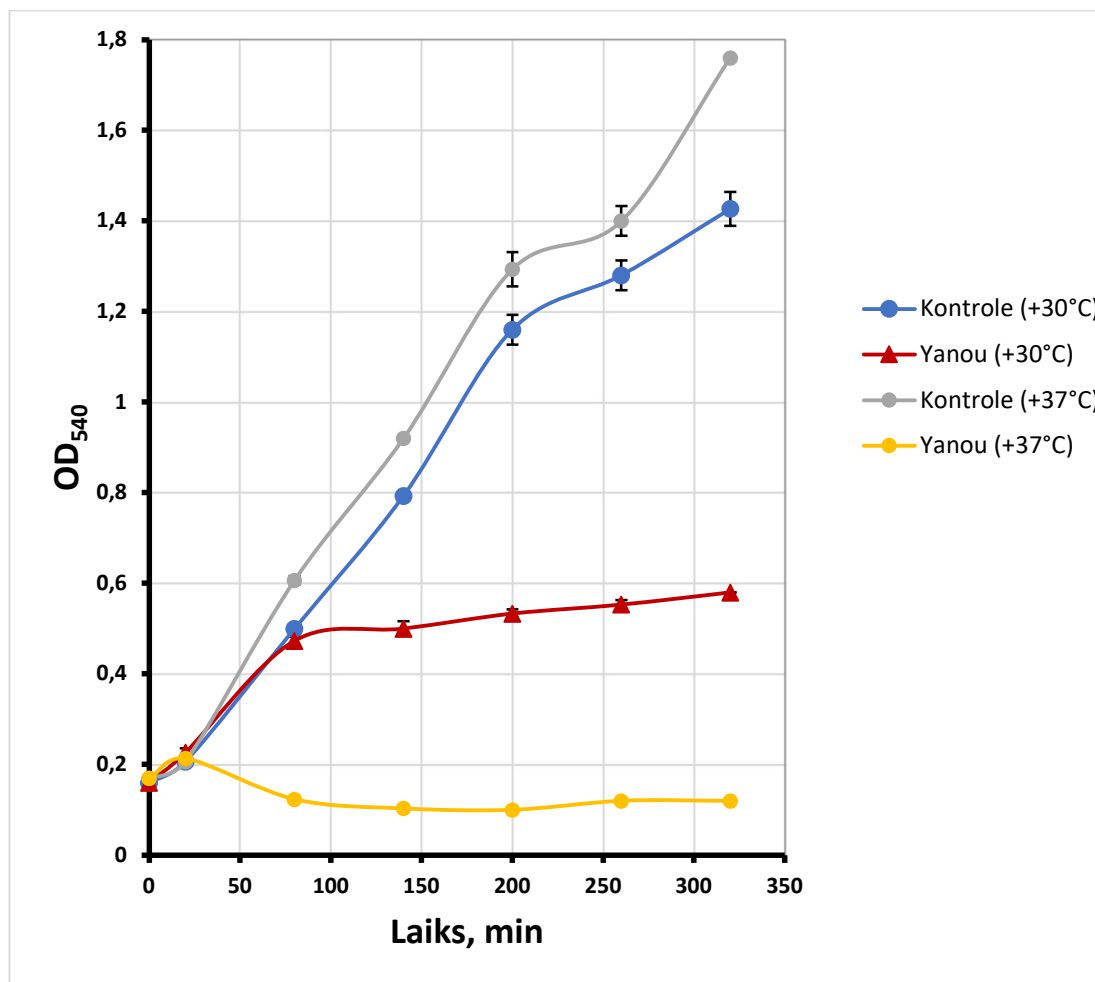
Augšanas līkne (5. attēls.) tika iegūta, iesējot 4 mL H1 šūnu kultūras 500 mL kolbā ar 300 mL šķidrās LB barotnes ($OD_{540} \sim 0,06$). Kultūra tika aerēta uz kratītāja pie 120 rpm, $+30^{\circ}\text{C}$ vai $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūrā līdz OD_{540} vērtība sasniedza 0,16 – 0,17. Tad kultūra sadalīta sešās 100 mL kolbās, ielejot katrā pa 50 mL šūnu kultūras. Trīs kultūras tika inficētas ar fāga Yanou filtrātu (5 mL katrā), savukārt pārējām trim kultūrām tika pievienoti 5 mL LB šķidrās barotnes (negatīvā kontrole). Kolbas tika aerētas iepriekšminētajos apstākļos, ik pēc ~ 1 h nosakot kultūras OD_{540} vērtību.

Lai gan eksperimenti pie $+30^{\circ}\text{C}$ un $+37^{\circ}\text{C}$ tika veikti identiski, pastāvēja iespēja, ka MOI vērtības abos eksperimentos atšķirās, jo pagaidām izskatās, ka fāgs nezināmu iemeslu dēļ labāk spēj inficēt šūnas pie $+37^{\circ}\text{C}$. Fāga filtrāta titrs, plātes inkubējot pie $+30^{\circ}\text{C}$, bija $7 \times 10^8 \pm 8,2 \times 10^7$ pfu/mL, bet pie $+37^{\circ}\text{C}$ tas bija $1,5 \times 10^9 \pm 3,7 \times 10^8$ pfu/mL. Šūnu titrs inficēšanas brīdī ($OD_{540} \sim 0,17$) bija $5,9 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^6$ cfu/mL. Līdz ar to MOI bija attiecīgi vai nu 1,2 vai 2,6, lai gan abos augšanas līknes uzņemšanas eksperimentos (pie $+30^{\circ}\text{C}$ un $+37^{\circ}\text{C}$) tika pievienoti 5 mL tā paša fāga filtrāta. Pēc šiem datiem var secināt, ka $+30^{\circ}\text{C}$ temperatūrā daļa virionu nespēj veiksmīgi inficēt saimniekšūnas. Iemesls šim novērojumam nav skaidri zināms, bet varētu būt turpmāko pētījumu vērts. Ir aprakstīti gadījumi, kuros *Streptococcus lactis* un *Lactococcus lactis* sugu baktēriju izolātiem pie dažādas temperatūras atšķiras restrikcijas-modifikācijas sistēmas darbības aktivitāte: pie augstākas temperatūras (attiecīgi $+40^{\circ}\text{C}$ vai $+37^{\circ}\text{C}$) tika novērots lielāks plaku skaits un izmērs jeb šie baktēriju izolāti bija uzņēmīgāki pret fāgu

infekciju (Sanders and Klaenhammer 1984; O'Driscoll *et al.* 2004). Pētījumā, kurā tika izmantots baktēriju sugas *Listeria monocytogenes* celms, tika konstatēta saimnieka rezistence pret fāga infekciju, ja saimnieka kultūra pirms infekcijas tika inkubēta pie +25°C, savukārt, ja kultūru pirms tam inkubēja pie +37°C, saimnieks bija uzņēmīgs pret fāgu. Interesanti, ka šajā pētījumā fāga titra atšķirības tika konstatētas tikai atkarībā no temperatūras, kādā saimnieka kultūra tika inkubēta pirms infekcijas, – temperatūra, pie kādas notika kultūras inficēšana un tam sekojošā plašu inkubācija, saimnieka uzņēmību neietekmēja (Kim and Kathariou 2009). Turpmāk būtu noderīgi pārbaudīt fāga Yanou spēju inficēt saimniekkultūru atkarībā no kultūras pirmsinfekcijas temperatūras.

Kā redzams 5. attēlā, piecu stundu un 20 min laikā fāgs Yanou pie +30°C temperatūras spēj tikai ierobežot saimniekkultūras augšanu, savukārt pie +37°C tas jau pirmās stundas laikā izraisa OD₅₄₀ vērtības kritumu no 0,2 uz 0,12. Tātad pēc šiem novērojumiem, kā arī pēc 4.1. nodaļā pieminētajām plaku izmēra atšķirībām var secināt, ka optimālā temperatūra fāga Yanou pavairošanai ir +37°C, turklāt arī saimniekkultūra H1 intensīvāk aug tieši pie šīs temperatūras. Fāga pavairošanas efektivitātes izmaiņas atkarībā no temperatūras ir jau iepriekš novērotas, piemēram, 1964. gadā tika noskaidrots, ka jo augstāka temperatūra (līdz aptuveni +39°C), jo fāgs T1 spēja ātrāk pavairoties. Tomēr, ja temperatūra pārsniedza +41,25°C, tad fāgs vairs nespēja vairoties tādēļ, ka tā enzīmi lizēja baktēriju šūnas ātrāk nekā spēja izveidoties jauni fāga virioni (Pollard and Woodyatt 1964). Iespējams, ka turpmākos fāga Yanou pētījumos varētu veikt augšanas līknes eksperimentu arī pie citas temperatūras, piemēram, +15°C un +41°C.

Tika veikts *one-step* augšanas līknes eksperiments pēc iepriekš aprakstīta protokola (Kropinski 2018) pie +37°C temperatūras, tomēr tas bija neveiksmīgs, jo piecu minūšu laikā lielākā daļa fāga virionu vēl nebija spējuši adsorbēties uz saimniekšūnu virsmas, netika novērota arī fāga intensīva vairošanās. Turpmākos pētījumos būtu nepieciešams ļaut virioniem adsorbēties ilgāku laiku, kā arī veikt šūnu centrifugēšanu un resuspendēšanu svaigā LB šķidrā barotnē, lai nodrošinātu, ka kultūrā nav brīvu virionu.



5. attēls. *C. davisae* baktēriju šūnu kultūras augšanas līknes ar (Yanou) un bez pievienota fāga Yanou (Kontrolē) pie temperatūras +30°C un +37°C. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes, veicot eksperimentu trīs atkārtojumos.

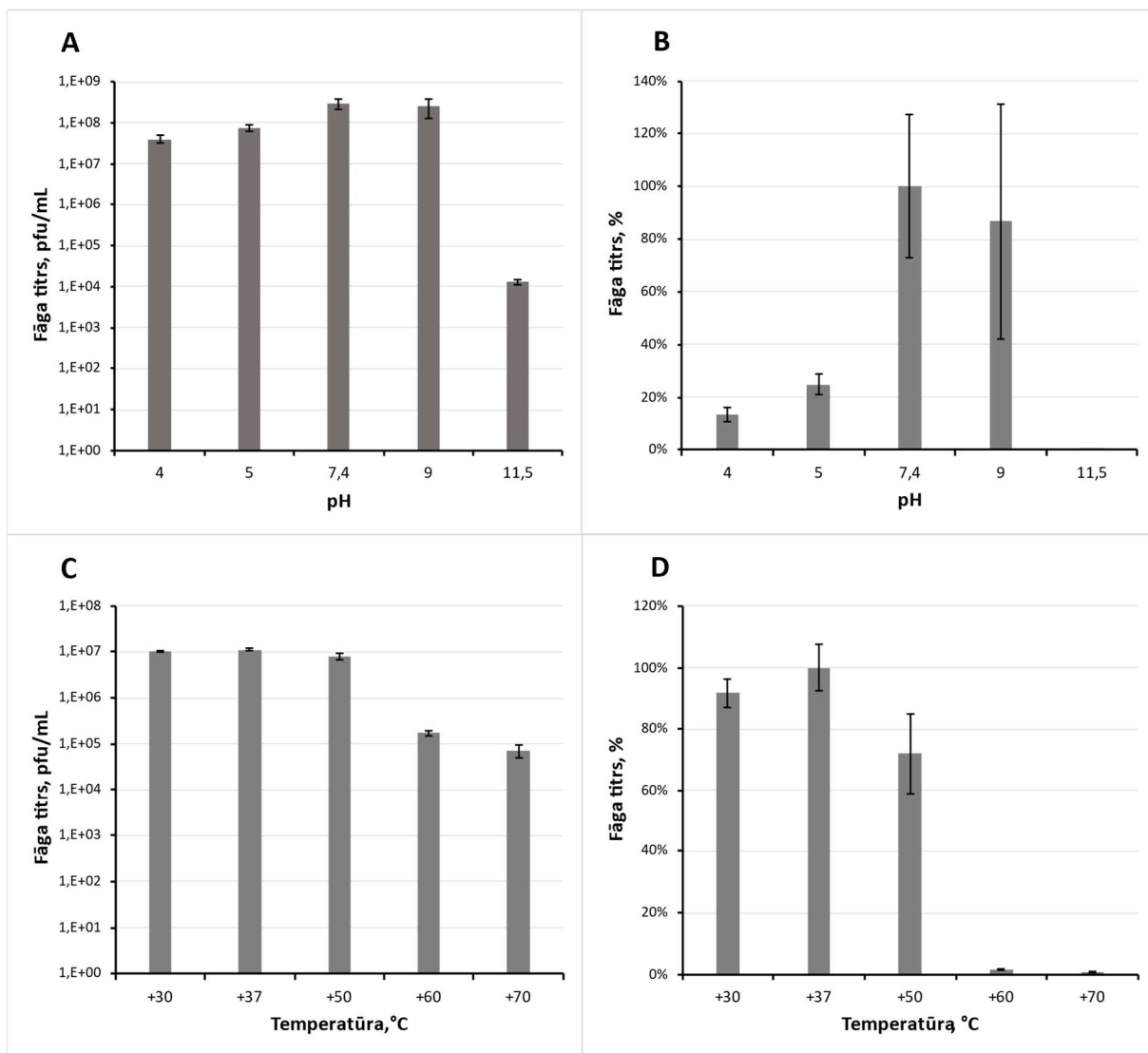
Figure 5. Growth curves of *C. davisae* culture with (Yanou) and without added phage Yanou (Kontrolē) at temperature +30°C and +37°C. Error bars represent standard deviations of three independent experiments.

4.5. Fāga Yanou stabilitāte pie dažādām vides pH vērtībām un dažādas temperatūras

Lai noteiktu fāga Yanou pH stabilitāti, tika pagatavoti buferi ar dažādām pH vērtībām, PBS buferim pakāpeniski pievienojot 6M HCl vai 6M NaOH šķīdumu. Lai gan retāk, tomēr PBS buferis arī tiek veiksmīgi pielietots šāda tipa eksperimentos (Litt and Jaroni 2017; Międzybrodzki *et al.* 2017). pH stabilitātes pārbaudei tika izmantots fāga filtrāta (ar titru 6×10^8 pfu/mL) 10^{-2} pakāpes atšķaidījums 0,9% NaCl šķīdumā, kas tika atšķaidīts līdz 10^{-4} pakāpei, izmantojot iepriekš pagatavotos pH buferus, tad šie atšķaidījumi tika inkubēti 1 h pie RT un titrēti trīs atkārtojumos, plātes tika inkubētas pie +30°C. Tā kā pie pH 11,5 fāga titrs strauji kritās

(< 2×10^4 pfu/mL), tad šajā gadījumā eksperiments tika atkārtots, inkubējot 10^{-2} pakāpes atšķaidījumu pH 11,5 buferī. Attēlos 6-A un 6-B ir redzams, ka fāgs bija stabils pie pH 7,4 (PBS bufera parastais pH) un pH 9. Pie pH 4 un pH 5 tā titrs jau bija būtiski samazinājies, kamēr pie pH 11,5 bija palicis pavisam neliels skaits fāga inficētspējīgo daļiņu. Salīdzinot ar otru aprakstīto *C. davisae* fāgu ϕ Cd2018 (Jun-heon 2018), var spriest, ka šajā darbā izolētais fāgs ir ar zemāku pH izturību, jo fāga ϕ Cd2018 titrs pie vērtībām pH 4 un pH 11 arī bija krities, bet ne tik strauji. Tomēr droši šos datus salīdzināt nevar, jo fāgs Yanou tika inkubēts pH buferos 1 h, bet ϕ Cd2018 – 30 min. Turklāt jāpiemin, ka standartnovirzes pie pH 7,4 un pH 9 (6-B attēls) ir ļoti lielas, tāpēc, lai iegūtu ticamākus rezultātus, būtu nepieciešams atkārtot šo eksperimentu vēl vairākos atkārtojumos. Kā arī, lai iegūtu pilnīgāku priekšstatu par fāga Yanou stabilitāti, eksperimentu vajadzētu veikt arī pie citām pH vērtībām, piemēram, pH 6 un pH 10.

Stabilitāte pie dažādas temperatūras fāgam Yanou tika pārbaudīta, inkubējot 30 min termostatā pie attiecīgās temperatūras fāga filtrāta (ar titru $1,2 \times 10^7$ pfu/mL) 10^{-2} (+30°C, +37°C) vai 10^{-1} (+50°C, +60°C, +70°C) atšķaidījumus, kas tika pagatavoti LB barotnē. Pēc tam atšķaidījumi tika titrēti trīs atkārtojumos, un plates tika inkubētas pie +30°C. Attēlos 6-C un 6-D redzams, ka fāga titrs ir stabils pie +30°C un +37°C. Tas pat bija nedaudz labāk saglabājies +37°C, kas, kā jau tika iepriekš secināts (4.4. nodaļa), ir optimālā temperatūra *C. davisae* kultūras H1 inficēšanai. Pie +50°C fāga titrs jau būtiski krīt un pie temperatūras +60°C un +70°C tas samazinās par vairākām pakāpēm. Salīdzinājumam, iepriekšminētais fāgs ϕ Cd2018 arī tika inkubēts dažādā temperatūrā 30 min, un pie +65°C tā titrs samazinājās ~15 reizes (Jun-heon 2018), kamēr Yanou titrs pie +60°C samazinājās ~65 reizes. Tātad fāgs ϕ Cd2018 ir stabilāks arī pēc inkubācijas dažādā temperatūrā. Svarīgi pieminēt arī to, ka arī šis eksperiments tika veikts vienu reizi, un ticamāku rezultātu ieguvei būtu vēlams to veikt vairākos atkārtojumos.



6. attēls. Fāga Yanou stabilitāte pie dažādām vides pH vērtībām (A, B) un temperatūrām (C, D). Grafikos A un C ir attēlots fāga titrs (pfu/mL), bet B un D – titra procentuālā vērtība, salīdzinot ar optimālo (attiecīgi pie pH 7,4 un +37°C). Kļūdu stabiņi attēlo standartnovirzi no trīs atkārtojumiem, titrējot fāgu uz platēm, kas inkubētas pie +30°C.

Figure 6. Stability of phage Yanou at different pH values (A, B) and temperatures (C, D). Graphs A and C show phage titer (pfu/mL) but B and D show percentage of titer, compared to the optimal value (at pH 7,4 and +37°C accordingly). Error bars represent the standard deviation from three plaque assays incubated at +30°C.

4.6. *C. davisae* fāgu genomiskās DNS restrikcijas analīze

Lai jau pirms sekvenēšanas varētu aptuveni salīdzināt visus jaunizolētos *C. davisae* fāgus savā starpā, tika veikta to genomiskās DNS šķelšana ar restriktāzi EcoRI pēc 3.15. nodaļā aprakstītās metodes. Tā kā pēc šķelšanas ar šo restriktāzi nevienam no fāgu izolātiem NAGE attēlos nebija novērojami skaidri saredzami dažādu izmēru fragmenti, eksperiments tika

atkārtots, šoreiz izmantojot restriktāžu BamHI un HindIII kokteili (sk. 4. pielikumu). Vairāku fāgu izolātu restrikcijas profili bija ļoti līdzīgi, bet, piemēram, izolātiem 1-1 un F1 bija raksturīgi četri izteikti fragmenti, kuri atšķīrās no visiem pārējiem paraugiem. Fāgam Yanou netika novērota DNS fragmentu veidošanās, gan šķeļot ar EcoRI, gan ar BamHI+HindIII, kas arī pēc sekvenēšanas apstiprinājās, fāga genoma sekvenci šķeļot *in silico* programmā Serial Cloner v2.6.1.

Lai pēc sekvenēšanas un genoma sekvences apvienošanas pārlicinātos, ka tas ir izdarīts pareizi, tika veikta padziļinātāka restrikcijas analīze fāgam Yanou, tā genomisko DNS atsevišķi šķeļot ar Bsp119I, MunI, PstI un SmaI restriktāzēm. Pēc tam restrikcijas profili tika salīdzināti ar *in silico* iegūtajiem profiliem programmā Serial Cloner (sk. 5. pielikumu). Tā kā gandrīz visu teorētiski iegūto DNS fragmentu garumi sakrīt ar reālajiem, tad var spriest, ka fāga genoms tika apvienots pareizi. Viena fragmenta nesakrītību (Bsp119I 8. fragments) var skaidrot ar to, ka tā kā tas bija visīsākais fragments, tad iespējams tā koncentrācija nebija pietiekami liela vai arī DNS netika pilnīgi sašķelta. Vēl par iemeslu neveiksmīgai DNS šķelšanai var kalpot DNS metilācijas izraisīta restriktāzes bloķēšana. No šajā darbā izmantotajām restriktāzēm metilācija varēja bloķēt tikai EcoRI un Bsp119I darbību (Roberts *et al.* 2015).

4.7. *C. davisae* fāgu genomu vispārīgs raksturojums

No visiem šī darba gaitā izolētajiem fāgiem pilna genoma sekvenēšanai tika izvēlēti *C. davisae* fāgi, jo to saimniekkultūra ir salīdzinoši reta, un kā jau iepriekšējās nodaļās tika minēts, līdz šim saistībā ar šo saimnieku ir aprakstīts tikai viens fāgs (Jun-heon 2018). Tādēļ noderīgāk ir padziļinātāk pētīt tos fāgu izolātus, kuri ir potenciāli unikāli zināmo fāgu daudzveidības kontekstā.

Lielākajai daļai *C. davisae* fāgu izolātu genoma garums bija ~88000 bp, pārējiem izolātiem ~45000 (sk. 3. pielikumu). Visiem izolātiem, izņemot F1 un 1-1, tika paredzēts SDTR (*short direct terminal repeats*) genoma fizisko galu veids. Tāpat visiem, izņemot F1 un 1-1, tika paredzēts lītiskais dzīves cikls, kamēr jau pieminētajiem F1 un 1-1 potenciāli ir raksturīga *headful* genoma pakošanās stratēģija un lizogēns dzīves cikls. Fāga izolāts 9-1 jeb fāgs Yanou tika izvēlēts padziļinātākai genoma izpētei, jo tas ir relatīvi unikāls lītiskais podovīruss, savukārt vienīgais līdz šim zināmais *Cedecea* fāgs ir lizogēns sifovīruss (Jun-heon 2018).

DNS bibliotēkas, kurā ietilpa arī fāga Yanou paraugs, sekvenēšanas rezultātā tika iegūti 88621 pārveida nolasījumi, katrs līdz 251 bp garš. Pēc *de novo* apvienošanas programmā Unicycler v0.4.8. (Wick *et al.* 2017) no attiecīgās bibliotēkas nolasījumu kopas tika iegūti divi, it kā cirkulāri kontīgi (*contigs*), no kuriem viens atbilda fāgam Yanou (tas tika pārbaudīts arī ar

restrikcijas analīzi, sk. 4.6. nodaļu) un bija 40706 bp garš. Izmantojot programmu PhageTerm v1.0.12 (Garneau *et al.* 2017), tika noteikti 159 bp gari SDTR genoma fiziskie gali, attiecīgi pilnais lineārais dsDNS fāga Yanou genoms ir 40865 bp (40706 + 159 bp) garš. Pakošanās stratēģija vēlāk tika arī pārbaudīta ar termināzes lielās subvienības (TerL) filoģenēzes metodi (sk. 4.10. nodaļu). Neapstrādātu nolasījumu salīdzināšana ar jau korekti sakārtoto kontigu, kas reprezentē pilnu genomu, atklāja, ka vidējais pilnā genoma dziļums (*read depth*) ir 561x. Fāga GC% īpatsvars ir 48,4%, savukārt saimnieka *C. davisae* tipiskajam celmam DSM 4586 pēc NCBI datubāzes *Assembly* datiem tas ir 54% (piekļuves numurs: GCA_000412335.2). Ir novērots, ka fāgu genomu GC% saturs pozitīvi korelē ar attiecīgo saimnieku GC% īpatsvaru, turklāt parasti tas ir nedaudz zemāks kā konkrētajam saimniekam (Simón *et al.* 2021). Vairāku procentu GC% īpatsvara atšķirība starp Yanou un tā saimnieka sugas reprezentatīvo genomu varētu nozīmēt to, ka fāgs Yanou evolūcijas gaitā vēl nav paspējis pielīdzināt sava genoma GC% saturu saimniekam, kas varētu vai nu liecināt par nesenu saimnieka maiņu uz *Cedecea* ģints pārstāvjiem, vai arī par to, ka fāgs Yanou varētu būt polivalents fāgs, kas labāk spētu inficēt kādu citu bakteriālo sugu. Kamēr mēģināt pārbaudīt pirmo hipotēzi būtu diezgan sarežģīti, otrās hipotēzes pārbaudīšanai varētu nākotnē pārbaudīt fāga Yanou spēju inficēt citas ģintij *Cedecea* radniecīgas baktērijas ar GC% īpatsvaru, kas ir līdzīgāks fāgam Yanou. Salīdzinājumam var pieminēt, ka iepriekšminētajam *C. davisae* fāgam φCd2018 ir cirkulārs dsDNS genoms, kas ir 42587 bp garš, ar GC% īpatsvaru 53,95%, un tas satur 69 ORF. (Junheon 2018).

4.8. Fāga Yanou genoma anotēšana

Genoma atvērtie nolasīšanas rāmji (ORF) tika paredzēti programmā DNA Master (Jacobs-Sera *et al.* 2011), izmantojot rīkus Glimmer (Delcher *et al.* 2007) un GeneMark (Besemer and Borodovsky 2005), savukārt tRNS gēnu paredzēšanai tika izmantoti rīki Aragorn (Laslett and Canback 2004) un tRNAscan (Lowe and Eddy 1997). Fāga Yanou genomā netika atrasti tRNS gēni. Savukārt tika paredzēti 55 ORF, no kuriem visi atrodas uz dsDNS pozitīvās ķēdes. Jāpiemin, ka no sākuma automātiskās anotēšanas rezultātā tika atrasti trīs salīdzinoši īsi (~150 bp) ORF arī uz negatīvās ķēdes, tomēr tie pēc manuālas apskatīšanas tika izdzēsti, jo to paredzētās *Shine-Dalgarno* (SD) sekvenču stipri atšķīrās no kanoniskā AGGAGG motīva, kā arī fāgu genomam parasti nav raksturīgi tikai viens vai divi gēni pēc kārtas, kas atrodas uz pretējās ķēdes nekā visi pārējie ORF. Arī pārējiem ORF tika izvērtēta starta kodonu atbilstība (ATG, CTG, TTG, GTG), SD sekvenču stiprums un attālums no attiecīgā starta kodona, lai pārbaudītu, vai ORF paredzēšanas programma ir tiešām izvēlējusies ticamāko ORF sākuma pozīciju. Nepieciešamības gadījumā tika arī izvēlēta kāda cita no piedāvātajām iespējamajām

sākuma pozīcijām. Identificētiem ORF starta kodons ATG bija raksturīgs 51 gadījumos, kodons GTG – 4, kamēr TTG un CTG starta kodoni netika atrasti.

Gēnu (kas fāgu gadījumā atbilst ORF) funkcijas tika paredzētas, salīdzinot to kodēto produktu aminoskābju sekvences ar BLASTp (Altschul *et al.* 1990), Konservatīvo domēnu datubāžu (Marchler-Bauer *et al.* 2017) un HHpred (Söding *et al.* 2005) meklēšanas rezultātiem, izmantojot katru individuālo aminoskābju sekvenci kā pieprasījumu līdzīgāko sekvenču meklēšanai (konkrētas datubāzes, iestādnes un metodoloģija aprakstītas 3.20. nodaļā). Pilna genoma anotācija ar visiem paredzētajiem ORF un to funkcijām atrodama 6. pielikumā tabulas veidā. No visiem 55 identificētajiem ORF attiecīgā produkta funkciju bija iespējams kaut cik droši paredzēt vismaz 36 ORF. No pārējiem 19 ORF, kuriem funkcija netika ticami paredzēta, izmantojot salīdzinošās genomikas pieeju, 14 tika nosaukti par hipotētiskiem proteīniem, savukārt pieci saturēja DUF (*domain of unknown function*). DUF klātesamība proteīnā liecina par to, ka lai gan vēl droši nav zināma proteīna funkcija, ir zināms, ka šādi proteīni ir plaši izplatīti arī citu fāgu vai pat baktēriju genomos, un tie ir evolucionāri konservatīvi, līdz ar to tie varētu būt labs mērķis turpmākos pētījumos par proteīnu funkcijām. Tas, iespējams, ļautu vienam vai pāris proteīniem ar konkrētu DUF noteikto funkciju attiecināt arī uz citiem šo pašu DUF saturošiem proteīniem. Kopumā liela daļa proteīnu ar veiksmīgi paredzētām funkcijām ir homoloģiski plaši aprakstīta un pētīta *Escherichia* fāga T7 proteīniem (7. attēls). Savukārt vislielākā genoma nukleotīdu sekvenču līdzība fāgam Yanou ir ar *Escherichia* fāgu JeanTinguely, ar kura proteomā identificētajiem produktiem homoloģiska ir arī liela daļa Yanou gēnu produktu.

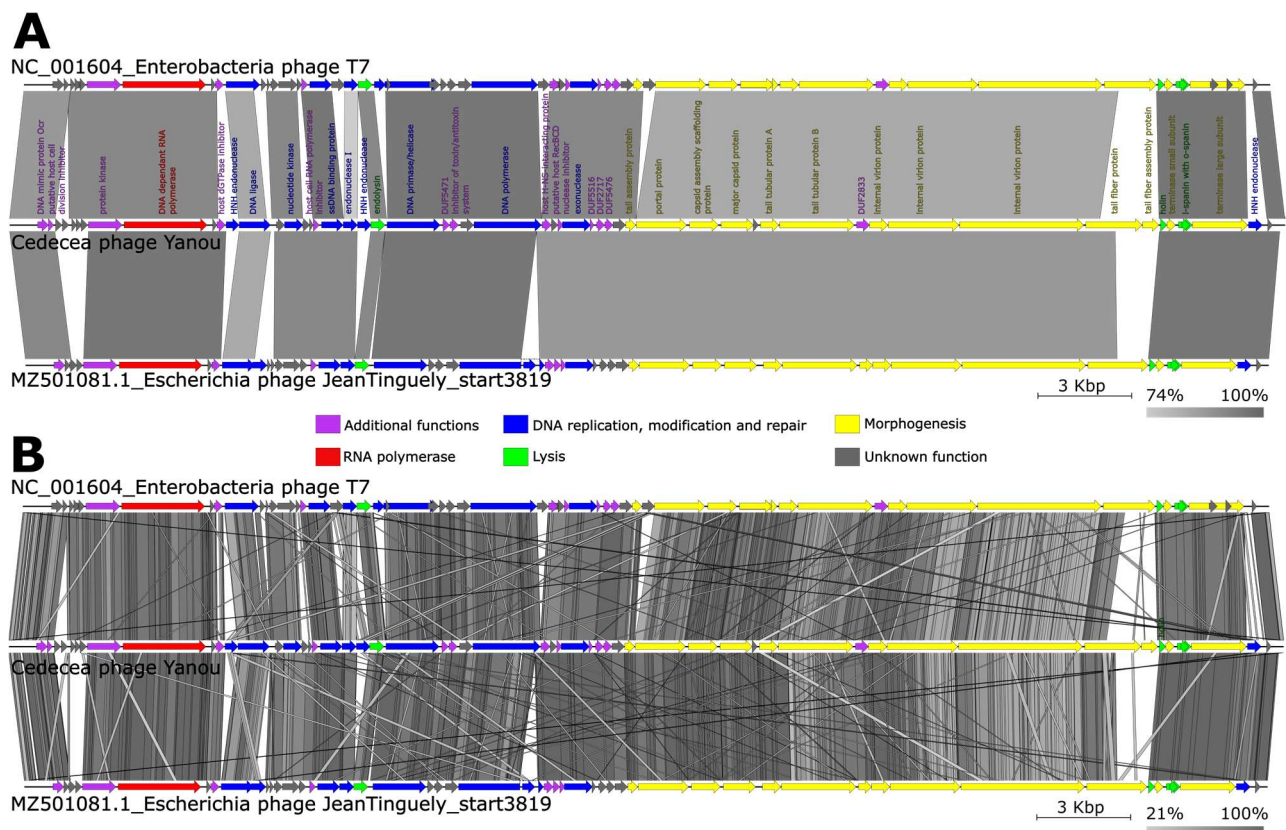
Par fāga Yanou morfoģenēzes moduli varētu uzskatīt 36.–53. ORF, taču tas iekļauj arī vairākus līzes proteīnus, kā holīnu (49. ORF) un spanīnus (51., 52. ORF), kuri nav secīgi apvienoti vienā funkcionālā modulī, kā tas ir raksturīgs vairākiem citiem fāgiem. Piemēram, starp Yanou holīna ORF un spanīnu ORF atrodas termināzes mazo subvienību kodējošais ORF, bet endolizīna ORF (22. ORF Yanou genomā) identificēts pavisam citā genoma vietā vairāku ORF attālumā. Tāda līzes proteīnus kodējošo ORF izklaidētība genomā mēdz būt raksturīga T7 līdzīgajiem fāgiem. Gandrīz visi strukturālie proteīni ir analogi fāga T7 proteīniem, piemēram, lielais kapsīda proteīns, astes proteīni un iekšējie viriona proteīni, tomēr astes šķiedras (*tail fiber*) proteīns atšķiras, kam varētu būt nozīme saimnieku diapazonu dažādībā, jo tieši šī viriona struktūras daļa ir iesaistīta sākotnējā viriona adsorbijā pie saimniekšūnas lipopolisaharīdiem (LPS). 45., 46. un 47. ORF kodē iekšējos viriona proteīnus, kas attiecīgi ir analogi fāga T7 proteīniem gp14, gp15 un gp16 (sk. 7. pielikumu). Svarīgi pieminēt, ka 43. ORF tika anotēts kā DUF2833, jo lai gan kādreiz to uzskatīja par T7 iekšējo (strukturālo) proteīnu A, tā funkcija

tomēr nav droši zināma, turklāt tas varētu nemaz nebūt strukturālais proteīns. Iespējams tā funkcija fāgā T7 ir saistīta ar to proteīnu organizāciju, kuri atrodas tuvu portāla proteīnam gp8 (Kemp *et al.* 2005).

Pie līzes proteīniem ir pieskaitāmi 22. (endolizīns), 49. (holīns), 51. un 52. ORF (i-spanīns un o-spanīns). Spanīni ir proteīni, kuri nodrošina pēdējo soli šūnas līzē, veicot šūnas ārējās un iekšējās membrānas apvienošanu, un tie ir funkcionāli analogi Rz/Rz1 kompleksam fāgā λ . Vērts pievērst uzmanību tam, ka fāga Yanou gadījumā o-spanīna gēna sekvenca atrodas iekšā i-spanīna gēnā, kas ir novērojams arī fāga T7 genomā. Iemesls šim neparastajam izkārtojumam varētu būt tas, ka šādi izkārtoti gēni pasargā sevi no pārkārtošanās rekombinācijas laikā (Summer *et al.* 2007).

Devītais ORF kodē DNS atkarīgo RNS polimerāzi. Liela (>100 kDa), no vienas subvienības sastāvoša RNS polimerāze kopā ar iepriekš noteikto podovīrusa morfotipu (4.3. nodaļa) ir noteicošās pazīmes dzimtai *Autographiviridae* (Walker *et al.* 2020), kas nozīmē to, ka arī fāgs Yanou ir šīs dzimtas pārstāvis. Literatūrā ir minēts, ka *Autographiviridae* pārstāvjiem raksturīgs 35–50 kb garš genoms (Family *et al.* 2022), tāpēc var secināt, ka Yanou genoma garums (40865 bp) ir atbilstošs tā dzimtai.

Papildus vērts pieminēt, ka datubāzēs publiski pieejamā fāga JeanTinguely genoma sekvenca (piekļuves numurs: MZ501081.1) visticamāk netika pareizi savākta, jo T7 līdzīgajiem fāgiem ir diezgan raksturīga konkrēta genoma organizācija un definēti genoma īsie, tiešie, terminālie atkārtojumi (SDTR), kas JeanTinguely genomā netika atrasti un ņemti vērā, pirms autori to deponēja GenBank datubāzē, kaut gan tie diezgan precīzi atrodami pēc attiecīgo atkārtojumu sekvenču homologijas gan ar T7, gan ar Yanou. Tāpēc JeanTinguely genoms 7. attēlam tika cirkularizēts un pārkārtots tā, lai tas sāktos no pieejamās sekvences (MZ501081.1) 3819. bāzes, nodrošinot tā kolinearitāti ar fāgu T7 un Yanou genomiem.



7. attēls. Fāgu Yanou, T7 un JeanTinguely savstarpējais pilna genoma nukleotīdu sekvenču salīdzinājums pēc BLASTN (A) un TBLASTX (B). Attēliem dots mērogs 3kbp, bultas apzīmē katra ORF transkripcijas virzienu un iekrāsotas atbilstoši funkciju grupai. Pelēkās trapeces apzīmē līdzību starp genomu reģioniem, skalas līdzībai dotas katra attēla labajā apakšējā stūrī. Attēlā A pie katra Yanou ORF ir dota tā kodētā produkta paredzētā funkcija.

Figure 7. Pairwise genome nucleotide sequence comparison of phages Yanou, T7 and JeanTinguely using BLASTN (A) and TBLASTX (B). Scale of 3 kbp is given, the arrows represent transcription direction of each ORF and are colored according to each functional group. Gray boxes represent the similarity between regions of genomes, scales for this similarity are given in the bottom right corner of each image. In the image A the predicted function of each ORF encoded product of phage Yanou is given.

4.9. Fāga Yanou taksonomiskā piederība

Fāga Yanou genoma funkcionālās anotēšanas (sk. 4.8. nodaļu) laikā jau tika noskaidrota fāga piederība *Autographiviridae* dzimtai, bet vēl nebija zināma tā piederība zemāka līmeņa taksoniem (ģints, suga) oficiālās šī brīža ratificētās fāgu taksonomijas kontekstā. Lai sīkāk izpētītu genomu līdzības un taksonomiju starp fāgu Yanou un vēl 30 radniecīgāko (ar augstāko *Total Score* vērtību) fāgu genomu, kas identificēti ar BLASTN sekvenču salīdzināšanas serveri ar standarta iestatījumiem (pieci genomi ņemti no nr/nt (*non-redundant nucleotide*))

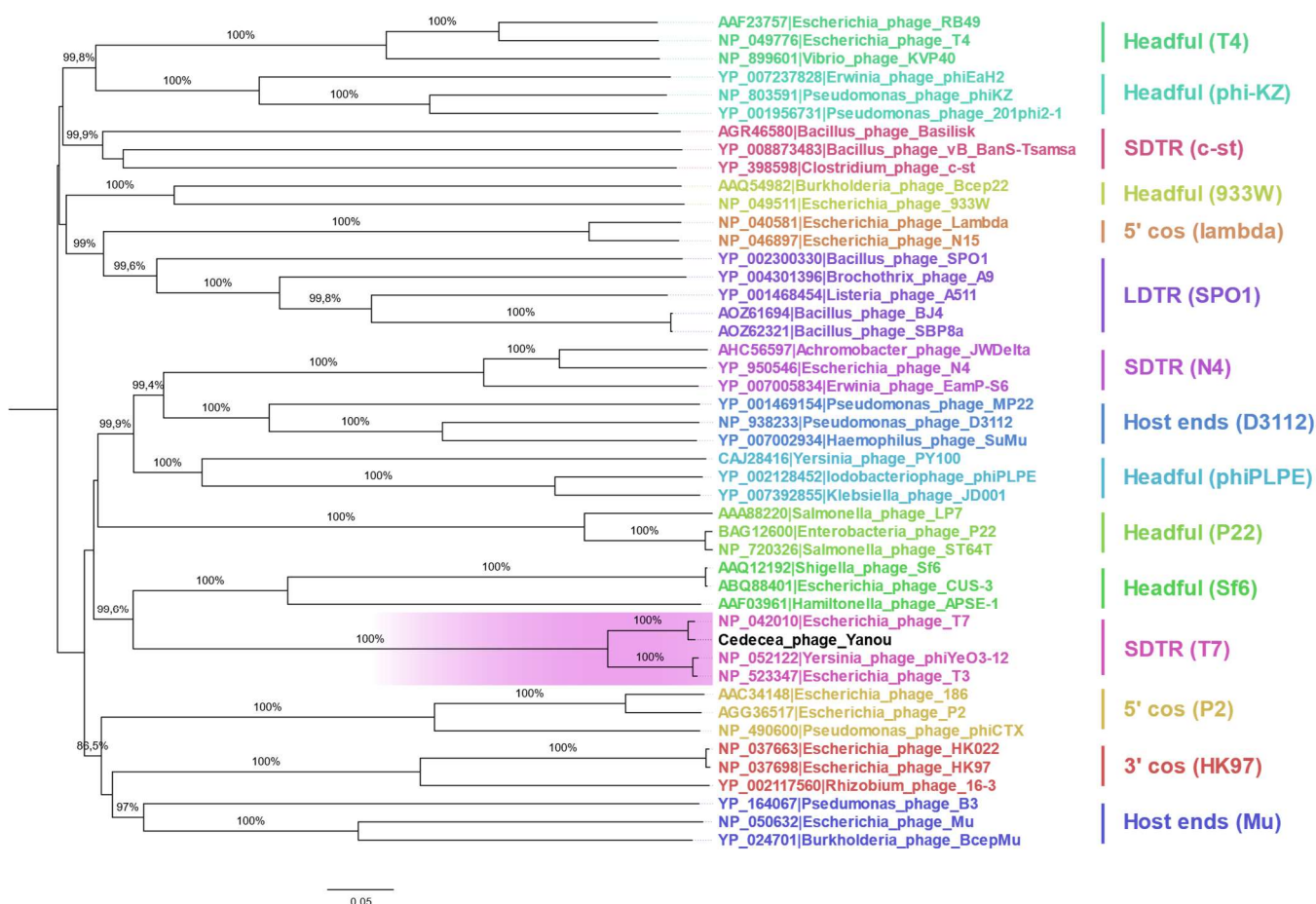
datubāzes vīrusiem, savukārt 25 – no RefSeq (“drošāki” un reprezentatīvi genomi) esošajiem vīrusiem), ar programmas VIRIDIC (Moraru *et al.* 2020) palīdzību ar standarta iestatījumiem tika izveidots attēls, kurā uzskatāmi ir uzrādīta savstarpējā šo fāgu genomu līdzība (sk. 8. pielikumu). Vislielākā līdzība fāgam Yanou ir ar *Escherichia* fāgu JeanTinguely (84,2%), kamēr ar plaši izpētīto *Escherichia* fāgu T7 tā ir 80,0%. Genomu nukleotīdu sekvenču pielīdzināšana ar šiem fāgiem (un daudziem citiem) ļauj arī spriest par jaunizdalīta fāga taksonomisko piederību šī brīža zināmu fāgu kontekstā. ICTV fāgu savstarpējās pilna genoma nukleotīdu sekvenču līdzības demarkācijas kritērijs ģintij ir ~70%, bet sugai 95%. Tā kā fāgam Yanou lielākā līdzība ar radniecīgāko fāgu ir jau iepriekšminētie 84,2%, tad var secināt, ka šis fāgs pārstāv jaunu *Teseptimavirus* ģints sugu.

Lai noteiktu fāga Yanou evolucionārās attiecības ar citiem *Autographiviridae* dzimtas fāgiem, tika izveidoti divi filoģenētiskie koki (sk. 9. pielikumu), vadoties atsevišķi pēc RNS polimerāzes un lielā kapsīda proteīna aminoskābju sekvenču. Šie abi proteīni ir salīdzinoši konservatīvi, tāpēc tie noder fāgu radniecības noteikšanai. Tika izmantotas 50 radniecīgākās attiecīgās sekvenču no datubāzes RefSeq, un manuāli tika pievienotas fāgu Yanou un JeanTinguely attiecīgo proteīnu aminoskābju sekvenču. Abi koki apstiprina fāga piederību *Teseptimavirus* ģintij, kas ietilpst *Autographiviridae* dzimtā. Jāpiemin, ka lielā kapsīda proteīna sekvenču kokam ir raksturīga īpatnība: daudzi fāgi kokā ir pieminēti divas reizes, jo šim proteīnam var būt divas versijas – viena ir garāka, un otra ir īsāka (T7 gadījumā – gp10A un gp10B). Īsāko versiju dažkārt mēdz arī dēvēt par mazo kapsīda proteīnu, un tā rodas programmētas nolasīšanas fāzes nobīdes (*frameshift*) rezultātā (Kemp *et al.* 2005).

4.10. Fāga Yanou genoma fiziskie gali un pakošanās stratēģija

Kā jau iepriekš tika minēts, fāga Yanou genoma fiziskie gali tika jau paredzēti genoma apvienošanas procesā, un tie ir 159 bp gari SDTR (īsi tieši terminālie atkārtojumi). Tiešo terminālo atkārtojumu (DTR) gadījumā fāga virionā atrodas pilns genoms ar identiskām sekvenču abos genoma galos, kuras ir vienādas visiem virioniem. Pēc infekcijas šie gali homologās rekombinācijas rezultātā izveido cirkulāru DNS molekulu, kuras sastāvā ir viena DTR kopija, un notiek lineāra konkatemēra sintēze pēc ritošā apļa (*rolling circle*) principa. Tad, griežot DNS un to pakojot prokapsīdā, tiek duplicētas šo atkārtojumu sekvenču, lai katrai genoma kopijai abos galos būtu identiski atkārtojumi. Par SDTR sauc tādus atkārtojumus, kuri ir vairākus simtus bp gari, bet mēdz būt arī garie DTR (LDTR), kuru garums var būt līdz pat 16 kpb (Merrill *et al.* 2016).

Par fāga Yanou pakošanās stratēģiju bija arī iespējams pārliecināties, veicot TerL aminoskābju (aa) sekvenču evolucionāro analīzi. Tika izveidots filoģenētiskais koks (8. attēls), izmantojot 45 fāgu TerL aa sekvences, kuru pakošanās stratēģijas ir eksperimentāli pārbaudītas (Merrill *et al.* 2016), un fāga Yanou TerL aa sekvenci. Kokā redzams, ka fāgam Yanou visradniecīgākā TerL no šīs datu kopas pieder jau iepriekš pieminētajam fāgam T7. Tā kā par šo fāgu skaidri zināms, ka tam ir raksturīgi SDTR, tad var secināt, ka Yanou ir raksturīga tāda pati pakošanās stratēģija. Vēl, ja tas būtu nepieciešams, papildus par pakošanās stratēģiju un precīzu SDTR garumu būtu iespējams pārliecināties, veicot atkārtotu sekvenēšanu ar specifiskiem praimeriem, kuri spēj piesaistīties DNS molekulai unikālās pozīcijās tieši pirms tiešajiem atkārtojumiem (Casjens and Gilcrease 2009). Taču šajā gadījumā gan SDTR klātbūtne, gan to precīzais garums, gan sekvenca bija droši identificējami arī *in silico* programmā PhageTerm (Garneau *et al.* 2017).



8. attēls. Fāgu lielās termināzes subvienības aminoskābju sekvenču evolucionārās attiecības. Fāgu nosaukumi ir iekrāsoti pēc to pakošanās stratēģijas, kuras ir norādītas labajā pusē, kopa ar fāgu Yanou ir izcelta violetā krāsā. Evolucionārās attiecības tika noteiktas ar “kaimiņu savienošanas” metodi (Saitou and Nei 1987). Attēlā redzams optimālais koks ar zaru

garumu summu 12,77615483. Par koka sakni ir noteikts tā viduspunkts. Pie zariem ir norādītas procentuālās vērtības (ja >80%) no 1000 *bootstrap* testu replikātiem, kuros radniecīgās sekvenču tika sagrupētas kopā (Felsenstein 1985). Koks ir zīmēts mērogā, zaru garumi attēloti vienībās, kas atbilst evolucionārajām distancēm, attēla apakšā dots mērogs. Evolucionārie attālumi aprēķināti, izmantojot p-attāluma metodi (Nei and Kumar 2000), un ir izteikti vienībās, kas atbilst aminoskābju atšķirībām uz pozīciju. Analīze ietvēra 46 aminoskābju sekvenču. Sekvenču pielīdzināšana tika veikta ar programmu Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Visas pozīcijas, kuras bija pārstāvētas mazāk nekā 90% sekvenču, tika izslēgtas no analīzes. Tātad mazāk kā 10% pielīdzināšanas spraugu, trūkstošu datu un neskaidru bāzu tika atļautas katrā pozīcijā. Kopā galīgajā datu kopā bija 371 pozīcija. Evolucionārās analīzes tika veiktas programmā MEGA7 (Kumar *et al.* 2016), iegūtais koks tika vizualizēts programmā FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

Figure 8. Evolutionary relationships of phage terminase large subunit amino acid sequences. The names of phages are colored according to their packaging strategy which is written on the right side, the clade with phage Yanou is highlighted in purple. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 12,77615483 is shown. The tree is rooted at midpoint. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown (if >80%) next to the branches (Felsenstein 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree, the scale is given at the bottom of the figure. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar 2000) and are in the units of the number of amino acid differences per site. The analysis involved 46 amino acid sequences. Sequence alignment was performed with Clustal W (Thompson *et al.* 1994). All positions with less than 90% site coverage were eliminated. That is, fewer than 10% alignment gaps, missing data, and ambiguous bases were allowed at any position. There were a total of 371 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.* 2016), and the resulting tree was drawn in FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

5. SECINĀJUMI

1. Darba gaitā no dažādu Latvijas rožu dzimtas (*Rosaceae*) augļkopības kultūru augu lapām tika izolētas deviņu baktēriju celmu individuālas kultūras, viena no tām pēc 16S rRNS gēna sekvenēšanas tika identificēta kā sugas *Cedecea davisae* jaunizdalīts celms, kas nosaukts par H1.
2. No kultūrābeles (*Malus domestica*) lapām un dažādu pilsētu notekūdeņu paraugiem tika iegūti 14 *C. davisae* fāgu izolāti, no kuriem tālākai izpētei tika izvēlēts izolāts 9-1 ar nosaukumu Yanou.
3. Pēc TEM attēliem tika noteikts, ka fāga Yanou virioniem ir podovīrusiem raksturīgais morfotips.
4. Optimālā temperatūra fāga Yanou pavairošanai šķidrā barotnē, tā titrēšanai uz platēm ar cieto barotni, kā arī tā saimnieka kultūras *C. davisae* H1 audzēšanai ir +37°C.
5. Fāgs Yanou ir relatīvi stabils pēc 1 h inkubācijas pie pH7,4 un pH9, kā arī pēc 30 min inkubācijas temperatūrās +30°C un +37°C, bet tā inficētspēja krītas pie pH4, pH5, pH11,5 (pēc 1 h) un temperatūrās +50°C, +60°C, +70°C (pēc 30 min).
6. Fāgam Yanou ir 40865 bp garš dsDNS lineārs genoms ar 159 bp gariem SDTR tipa genoma fiziskajiem galiem, un tajā identificējami 55 ORF, kuru funkcijas, izmantojot salīdzinošās genomikas pieeju, var diezgan droši noteikt 36 ORF produktiem.
7. RNS polimerāzi kodējošā ORF klātbūtne Yanou genomā, kombinācijā ar tā virionu podovīrusiem raksturīgo morfologiju, liecina par Yanou piederību *Autographiviridae* fāgu dzimtai.
8. Pēc genomiskās DNS sekvenču līdzības fāgam Yanou radniecīgākais ir *Escherichia* fāgs JeanTinguely, bet no padziļinātāk raksturotiem fāgiem tuvākais ir *Escherichia* fāgs T7.
9. Vadoties pēc ICTV bakteriofāgu taksonu demarkācijas kritērijiem, *Cedecea* fāgs Yanou pārstāv *Autographiviridae* dzimtas, *Teseptimavirus* ģints jaunu sugu.

6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt patecību:

Darba vadītājam MSc. biol. Ņikitam Zrelovam par apmācību bioinformātikas pamatos, kā arī iepriekšējo galveno mikrobioloģijas un molekulārās bioloģijas metožu apmācību, palīdzību ar ieteikumiem eksperimentu plānošanā un darba rakstīšanā, kā arī atsaucību vienmēr ātri atbildēt uz jautājumiem.

Zinātniskajam konsultantam Dr. biol. Andrim Dišleram par iepriekšējo apmācību mikrobioloģijas metodēs, kultūraugu lapu ievākšanu, jaunām idejām eksperimentiem un sadarbību ikdienas praktiskā darba procesā.

Recenzentam Dr. biol. Jānim Rūmniekam par bakalaura darba recenzēšanu.

Dr. biol. Andrim Kazākam par palīdzību molekulārās bioloģijas metožu pielietošanā.

Dr. biol. Jurim Jansonam par iepriekšējo apmācību TEM paraugu sagatavošanā.

BSc. biol. Inārai Akopjanai par izpalīdzību ikdienas praktiskajā darbā.

Dr. biol. Dāvidam Fridmanim par notekūdeņu paraugu sagādi.

BSc. biol. Līgai Birzniecei par NGS bibliotēku sekvenēšanu ar Illumina MiSeq sistēmu.

Pārējam BMC personālam par draudzīgo attieksmi un gatavību palīdzēt un atbildēt uz jautājumiem.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Adriaenssens, E.M., Rodney Brister, J., Quax, T.E.F., Debarbieux, L. and Fischer, M.G. 2017. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses* 2017, Vol. 9, Page 70, **9**, 70, <https://doi.org/10.3390/V9040070>.
2. Akinsanya, M.A., Goh, J.K., Lim, S.P. and Ting, A.S.Y. 2015. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in Aloe vera. *FEMS Microbiology Letters*, **362**, 184, <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNV184>.
3. Akita, H., Matsushika, A. and Kimura, Z. ichiro. 2019. Enterobacter oligotrophica sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. *MicrobiologyOpen*, **8**, e00843, <https://doi.org/10.1002/MBO3.843>.
4. Akın Şen, İ. and Şen, C. 2021. Cedecea Davisae Bacteraemia after Tocilizumab Usage for Coronavirus Disease-2019 Treatment. *Turkish Journal of Intensive Care*, **19**, 148–151, <https://doi.org/10.4274/TYBD.GALENOS.2021.46330>.
5. Aksyuk, A.A. and Rossmann, M.G. 2011. Bacteriophage assembly. *Viruses*, **3**, 172–203, <https://doi.org/10.3390/v3030172>.
6. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**, 403–410, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
7. Amin, M.R., Yurovsky, A., Chen, Y., Skiena, S. and Futcher, B. 2018. Re-annotation of 12,495 prokaryotic 16S rRNA 3' ends and analysis of Shine-Dalgarno and anti-Shine-Dalgarno sequences. *PLOS ONE*, **13**, e0202767, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0202767>.
8. Andrews, S. 2010. FastQC – A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
9. Besemer, J. and Borodovsky, M. 2005. GeneMark: Web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Research*, **33**, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI487>.
10. Botstein, D. 1980. A THEORY OF MODULAR EVOLUTION FOR BACTERIOPHAGES*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **354**, 484–491, <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1980.TB27987.X>.
11. Bushnell, B. 2014. BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner.
12. Casjens, S.R. and Gilcrease, E.B. 2009. Determining DNA Packaging Strategy by Analysis of the Termini of the Chromosomes in Tailed-Bacteriophage Virions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **502**, 91–111, https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_7.

13. Chevallereau, A., Pons, B.J., van Houte, S. and Westra, E.R. 2022. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, **20**, 49–62, <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>.
14. Comeau, A.M., Bertrand, C., Letarov, A., Tétart, F. and Krisch, H.M. 2007. Modular architecture of the T4 phage superfamily: A conserved core genome and a plastic periphery. *Virology*, **362**, 384–396, <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2006.12.031>.
15. Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S. and Watts-Tobin, R.J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, **192**, 1227–1232, <https://doi.org/10.1038/1921227A0>.
16. Cumby, N., Edwards, A.M., Davidson, A.R. and Maxwell, K.L. 2012a. The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *Journal of Bacteriology*, **194**, 5012–5019, <https://doi.org/10.1128/JB.00843-12/ASSET/A8F30018-2DF4-4D40-A92A-D0FF6AD7D015/ASSETS/GRAPHIC/ZJB9990918960006.JPEG>.
17. Cumby, N., Davidson, A.R. and Maxwell, K.L. 2012b. The moron comes of age. *Bacteriophage*, **2**, 225, <https://doi.org/10.4161/BACT.23146>.
18. D’Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques [An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery Bacillus] (in French). *C. R. Acad. Sci.*, 373–375.
19. Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., et al. 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus. *Nature Medicine*, **25**, 730–733, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
20. Delcher, A.L., Bratke, K.A., Powers, E.C. and Salzberg, S.L. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, **23**, 673–679, <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM009>.
21. Dion, M.B., Oechslin, F. and Moineau, S. 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, **18**, 125–138, <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
22. Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>.
23. Erez, Z., Steinberger-Levy, I., et al. 2017. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*, **541**, 488–493, <https://doi.org/10.1038/nature21049>.
24. Family, A., Bujak, K., Decewicz, P., Kitowicz, M. and Radlinska, M. 2022. Characterization of Three Novel Virulent Aeromonas Phages Provides Insights into the Diversity of the, <https://doi.org/10.3390/v14051016>.
25. Felsenstein, J. 1985. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution*, **39**, 783–791, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.

26. Fujisawa, H. and Morita, M. 1997. Phage DNA packaging. *Genes to Cells*, **2**, 537–545, <https://doi.org/10.1046/J.1365-2443.1997.1450343.X>.
27. Garneau, J.R., Depardieu, F., Fortier, L.C., Bikard, D. and Monot, M. 2017. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Scientific Reports* 2017 7:1, **7**, 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07910-5>.
28. Gordillo Altamirano, F.L. and Barr, J.J. 2019. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, **32**, <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18/ASSET/59E47274-79BC-44BE-9606-AAA673B114B3/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00066-18-F0002.JPEG>.
29. Grimont, P.A.D., Grimont, F., Farmer, J.J. and Asbury, M.A. 1981. *Cedecea davisae* gen. nov., sp. nov. and *Cedecea lapagei* sp. nov., new Enterobacteriaceae from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **31**, 317–326, <https://doi.org/10.1099/00207713-31-3-317/CITE/REFWORKS>.
30. Hatfull, G.F. 2008. Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 447–453, <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.09.004>.
31. Hatfull, G.F. and Hendrix, R.W. 2011. Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, **1**, 298–303, <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.06.009>.
32. Hershey, A.D. and Chase, M. 1952. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, **36**, 39, <https://doi.org/10.1085/JGP.36.1.39>.
33. Hoyles, L., McCartney, A.L., Neve, H., Gibson, G.R., Sanderson, J.D., Heller, K.J. and van Sinderen, D. 2014. Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Research in Microbiology*, **165**, 803–812, <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2014.10.006>.
34. ICTV. 2022. ICTV master species list 2021 v1 <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/5945>.
35. Jacobs-Sera, D., Pope, W.H., Russell, D.A., Bowman, C.A., Cresawn, S.G. and Hatfull, G.F. 2011. Annotation and bioinformatic analysis of bacteriophage genomes: a user guide to DNA master. Software Guides on phagesdb.org. https://phagesdb.org/media/docs/DNAMasterAnnotationGuide_11.28.11.pdf.
36. Jiang, F. and Doudna, J.A. 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, **46**, 505–529, <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>.

37. Jun-heon, Y. 2018. A Thesis for the Degree of Master Complete Genome Sequencing and Comparative Genome Analysis of the Novel Cedecea davisiae phage ϕ Cd2018.
38. Kateete, D.P., Kabugo, U., et al. 2013. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria from Milkmen and Cows with Clinical Mastitis in and around Kampala, Uganda. *PLOS ONE*, **8**, e63413, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063413>.
39. Kemp, P., Garcia, L.R. and Molineux, I.J. 2005. Changes in bacteriophage T7 virion structure at the initiation of infection. *Virology*, **340**, 307–317, <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2005.06.039>.
40. Kim, J.W. and Kathariou, S. 2009. Temperature-dependent phage resistance of *Listeria monocytogenes* epidemic clone II. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2433–2438, <https://doi.org/10.1128/AEM.02480-08>.
41. Kropinski, A.M. 2018. Practical advice on the one-step growth curve. *Methods in Molecular Biology*, **1681**, 41–47, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3.
42. Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R.W. and Bamford, D.H. 2011. Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**, 610–635, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-11/ASSET/189AEBA3-C51A-48F7-9FA0-8BE1FDD23AD3/ASSETS/GRAPHIC/ZMR9990922830011.JPEG>.
43. Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>.
44. Laganenka, L., Sander, T., Lagonenko, A., Chen, Y., Link, H. and Sourjik, V. 2019. Quorum sensing and metabolic state of the host control lysogeny-lysis switch of bacteriophage T1. *mBio*, **10**, 3–8, <https://doi.org/10.1128/mBio.01884-19>.
45. Laslett, D. and Canback, B. 2004. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, **32**, 11–16, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH152>.
46. Lawrence, J.G. 2022. DNA Master v5.23.6 <https://phagesdb.org/DNAMaster/>.
47. Litt, P.K. and Jaroni, D. 2017. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157:H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *International Journal of Microbiology*, **2017**, <https://doi.org/10.1155/2017/7013236>.
48. Łoś, M. and Wegrzyn, G. 2012. Pseudolysogeny. *Advances in Virus Research*, **82**, 339–349, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4>.

49. Lowe, T.M. and Eddy, S.R. 1997. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Research*, **25**, 955–964, <https://doi.org/10.1093/NAR/25.5.955>.
50. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.S., Saravanan, V.S., Lee, K.C. and Santhanakrishnan, P. 2010. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, 1559–1564, <https://doi.org/10.1099/IJS.0.013664-0/CITE/REFWORKS>.
51. Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. and Stahl, D.A. 2019. *Brock Biology of Microorganisms*, Fifteenth. Beuparlant, S. (ed.).
52. Marchler-Bauer, A., Lu, S., et al. 2011. CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, **39**, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ1189>.
53. Marchler-Bauer, A., Bo, Y., et al. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, **45**, D200, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1129>.
54. Merrill, B.D., Ward, A.T., Grose, J.H. and Hope, S. 2016. Software-based analysis of bacteriophage genomes, physical ends, and packaging strategies. *BMC Genomics*, **17**, 1–16, <https://doi.org/10.1186/S12864-016-3018-2/FIGURES/13>.
55. Międzybrodzki, R., Kłak, M., et al. 2017. Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Frontiers in Microbiology*, **8**, <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00467>.
56. Moraru, C., Varsani, A. and Kropinski, A.M. 2020. VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses 2020, Vol. 12, Page 1268*, **12**, 1268, <https://doi.org/10.3390/V12111268>.
57. Mushegian, A.R. 2020. Are There 1031 Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *Journal of Bacteriology*, **202**, 2192–2197, <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>.
58. Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*.
59. Notter, J., Seiffert, S.N., et al. 2022. AmpC hyperproduction in a *Cedecea davisae* implant-associated bone infection during treatment: a case report and therapeutic implications. *BMC Infectious Diseases*, **22**, 1–7, <https://doi.org/10.1186/S12879-021-07000-Y/FIGURES/4>.
60. O’Driscoll, J., Glynn, F., Cahalane, O., O’Connell-Motherway, M., Fitzgerald, G.F. and Van Sinderen, D. 2004. Lactococcal plasmid pNP40 encodes a novel, temperature-sensitive restriction-modification system. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**,

- 5546–5556, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5546-5556.2004>.
61. Obeng, N., Pratama, A.A. and Elsas, J.D. van. 2016. The Significance of Mutualistic Phages for Bacterial Ecology and Evolution. *Trends in Microbiology*, **24**, 440–449, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.009>.
 62. Ohnishi, M., Kurokawa, K. and Hayashi, T. 2001. Diversification of Escherichia coli genomes : are bacteriophages the major contributors ? **9**, 481–485.
 63. Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M.A. and Drulis-Kawa, Z. 2017. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current Medicinal Chemistry*, **24**, 3987–4001, <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>.
 64. Oppenheim, A.B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D.L. and Adhya, S. 2005. Switches in bacteriophage lambda development. *Annual Review of Genetics*, **39**, 409–429, <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113656>.
 65. Parada, V., Herndl, G.J. and Weinbauer, M.G. 2006. Viral burst size of heterotrophic prokaryotes in aquatic systems. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 613–621, <https://doi.org/10.1017/S002531540601352X>.
 66. Petrovic Fabijan, A., Lin, R.C.Y., et al. 2020. Safety of bacteriophage therapy in severe Staphylococcus aureus infection. *Nature Microbiology*, **5**, 465–472, <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0634-z>.
 67. Pirnay, J.P., Ferry, T. and Resch, G. 2022. Recent progress toward the implementation of phage therapy in Western medicine. *FEMS Microbiology Reviews*, **46**, 1–17, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab040>.
 68. Pollard, E. and Woodyatt, S. 1964. The Effect of Temperature on the Formation of T1 and T2r Bacteriophage. *Biophysical Journal*, **4**, 367–385, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(64\)86789-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(64)86789-8).
 69. Pope, W.H., Bowman, C.A., et al. 2015. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife*, **4**, <https://doi.org/10.7554/ELIFE.06416>.
 70. Poranen, M.M. and Mäntynen, S. 2017. ICTV virus taxonomy profile: Cystoviridae. *Journal of General Virology*, **98**, 2423–2424, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000928>.
 71. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E.I., Szwajcer Dey, E. and Novik, G.I. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, **59**, 145–155, <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-023>.
 72. Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D. and Russel, M. 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current issues in molecular biology*, **13**, 51–76, <https://doi.org/10.21775/cimb.013.051>.

73. Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2.<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
74. Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J. and Macelis, D. 2015. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, **43**, D298–D299, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1046>.
75. Rooijackers, S.H.M., Van Wamel, W.J.B., Ruyken, M., Van Kessel, K.P.M. and Van Strijp, J.A.G. 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes and Infection*, **7**, 476–484, <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2004.12.014>.
76. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**, 406–425, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
77. Sakaguchi, Y., Hayashi, T., et al. 2005. The genome sequence of Clostridium botulinum type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 17472–17477, <https://doi.org/10.1073/pnas.0505503102>.
78. Salmond, G.P.C. and Fineran, P.C. 2015. A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 777–786, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>.
79. Sanders, M.E. and Klaenhammer, T.R. 1984. Phage resistance in a phage-insensitive strain of Streptococcus lactis: Temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 979–985, <https://doi.org/10.1128/AEM.47.5.979-985.1984>.
80. Sanger, F., Air, G.M., et al. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 1977 265:5596, **265**, 687–695, <https://doi.org/10.1038/265687a0>.
81. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. and Petersen, G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology*, **162**, 729–773, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90546-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90546-0).
82. Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, **9**, 671–675, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
83. Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R.K. and Vairale, M.G. 2017. Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, **62**, 17–55, <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>.
84. Simón, D., Cristina, J. and Musto, H. 2021. Nucleotide Composition and Codon Usage Across Viruses and Their Respective Hosts. *Frontiers in Microbiology*, **12**, <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.646300/FULL>.
85. Söding, J., Biegert, A. and Lupas, A.N. 2005. The HHpred interactive server for protein

- homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, **33**, W244, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI408>.
86. Starmer, J., Stomp, A., Vouk, M. and Bitzer, D. 2006. Predicting Shine–Dalgarno Sequence Locations Exposes Genome Annotation Errors. *PLOS Computational Biology*, **2**, e57, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.0020057>.
 87. Stephan, R., Van Trappen, S., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vos, P. and Lehner, A. 2007. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 820–826, <https://doi.org/10.1099/IJS.0.64650-0/CITE/REFWORKS>.
 88. Stephenson, F.H. 2016. Working with Bacteriophage. In: *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. 81–96., <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802211-5.00004-7>.
 89. Sullivan, M.J., Petty, N.K. and Beatson, S.A. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, **27**, 1009–1010, <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR039>.
 90. Summer, E.J., Berry, J., Tran, T.A.T., Niu, L., Struck, D.K. and Young, R. 2007. Rz/Rz1 Lysis Gene Equivalents in Phages of Gram-negative Hosts. *Journal of Molecular Biology*, **373**, 1098–1112, <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.08.045>.
 91. Thompson, D.K. and Sharkady, S.M. 2020. Expanding spectrum of opportunistic Cedecea infections: Current clinical status and multidrug resistance. *International Journal of Infectious Diseases*, **100**, 461–469, <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.09.036>.
 92. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673, <https://doi.org/10.1093/NAR/22.22.4673>.
 93. Tringe, S.G. and Hugenholtz, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 442–446, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>.
 94. Twort, F.W. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, **186**, 1241–1243, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3).
 95. Ventola, C.L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, **40**, 277, <https://doi.org/Article>.
 96. Viertel, T.M., Ritter, K. and Horz, H.P. 2014. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, 2326–2336, <https://doi.org/10.1093/JAC/DKU173>.
 97. Walker, P.J., Siddell, S.G., et al. 2020. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified

- by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Archives of Virology*, **165**, 2737–2748, <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04752-x>.
98. Wan, X., Hendrix, H., Skurnik, M. and Lavigne, R. 2021. Phage-based target discovery and its exploitation towards novel antibacterial molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, **68**, 1–7, <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.08.015>.
99. Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L. and Holt, K.E. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, **13**, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005595>.
100. Wigington, C.H., Sonderegger, D., et al. 2016. Re-examination of the relationship between marine virus and microbial cell abundances. *Nature Microbiology*, **1**, 1–9, <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.24>.
101. Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**, 1613–1617, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
102. Yosef, I., Manor, M., Kiro, R. and Qimron, U. 2015. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 7267–7272, <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>.
103. Zrelavs, N., Dislers, A. and Kazaks, A. 2020. Motley Crew: Overview of the Currently Available Phage Diversity. *Frontiers in Microbiology*, **11**, <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.579452/FULL>.

PIELIKUMI

Kultūrauga suga	Baktēriju kultūras nosaukums	Koloniju morfoloģija	Augšanas temperatūra			Antibiotiku rezistence		Identificēšanas rezultāti, balstoties uz 16S rRNS sekveni
			RT	+30°C	+37°C	Kanamicīns	Ampicilīns	
Ābele <i>Malus domestica</i>	H1	Gaiši pelēcīgas	+	+	+	–	+	<i>Cedecea davisae</i>
Saldais ķirsis <i>Prunus avium</i>	H2	Koši dzeltenas	+	+	+	–	+	<i>Pantoea sp.</i>
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	H3	Blāvi dzeltenas	+	+	+	–	+	<i>Pantoea sp.</i>
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	H4	Blāvi dzeltenas	+	+	+	–	+	<i>Pantoea sp.</i>
Mājas bumbiere <i>Pyrus communis</i>	H5	Bēšīgi dzeltenas	+	+	–	–	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	H6	Pelēcīgi caurspīdīgas	+	+	–	–	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
Korinte <i>Amelanchier sp.</i>	H7	Pelēcīgi caurspīdīgas	+	+	–	–	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
Pīlādzis <i>Sorbus aucuparia</i>	H8	Bēšīgi dzeltenas	+	+	–	–	+	<i>Pseudomonas sp.</i>
Saldais ķirsis <i>Prunus avium</i>	H9	Pelēcīgi baltas	+	+	–	?	?	<i>Pseudomonas sp.</i>

1. pielikums. Darba gaitā izolētās baktēriju kultūras. Doti ir kultūraugi, no kuru lapām katra kultūra tika izolēta, koloniju morfoloģijas apraksts, augšanas temperatūras (“+” nozīmē, ka aug, “–” neaug), rezistence pret kanamicīnu (10 µg/mL) un ampicilīnu (50 µg/mL) (“?” – nav datu), kā arī piederība sugai vai ģintij pēc 16S rRNS gēna sekvenēšanas datiem.

Appendix 1. Newly isolated cultures of bacteria. Plant species from which each culture was isolated, descriptions of colony morphology, growth temperatures (“+” means growth, “–” no growth), resistance against kanamycin (10 µg/mL) and ampicilin (50 µg/mL) (“?” – no data), and species or genus according to 16S rRNA gene sequencing data are given.

Kultūrauga suga	Saimniekkultūras suga un nosaukums	Fāga izolāta nosaukums	Fāga morfotips	Fāga plaku morfolģija
Ābele <i>Malus domestica</i>	<i>Cedecea davisae</i> H1	F1	miovīruss	mazi, dzidri
Saldais ķirsis <i>Prunus avium</i>	<i>Pantoea sp.</i> H2	F2	sifovīruss	mazi, duļķaini
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	<i>Pantoea sp.</i> H3	F3BL	podovīruss	lieli, duļķaini ar dzidru centru
		F3DZ	podovīruss	mazi, dzidri
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	<i>Pantoea sp.</i> H4	F4	podovīruss	mazi, dzidri
Mājas bumbiere <i>Pyrus communis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> H5	F5	miovīruss	mazi, dzidri
Meža ābele <i>Malus sylvestris</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> H6	F6	miovīruss	vidēji, duļķaini ar dzidru centru
Korinte <i>Amelanchier sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> H7	F7	miovīruss	vidēji, duļķaini
Pīlādzis <i>Sorbus aucuparia</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> H8	F8	podovīruss	lieli, dzidri, ar duļķainu ārmalu
Saldais ķirsis <i>Prunus avium</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> H9	F9	podovīruss	lieli, dzidri

2. pielikums. Darba gaitā no kultūraugu lapām izolētie fāgi. Fāga morfotips noteikts, analizējot TEM attēlus. Plaki pēc to diametra aprakstīti: mazi (~0,5–1mm), vidēji (~1–2mm), lieli (>2mm), to izmēri ir salīdzināti, inkubējot plates pie RT.

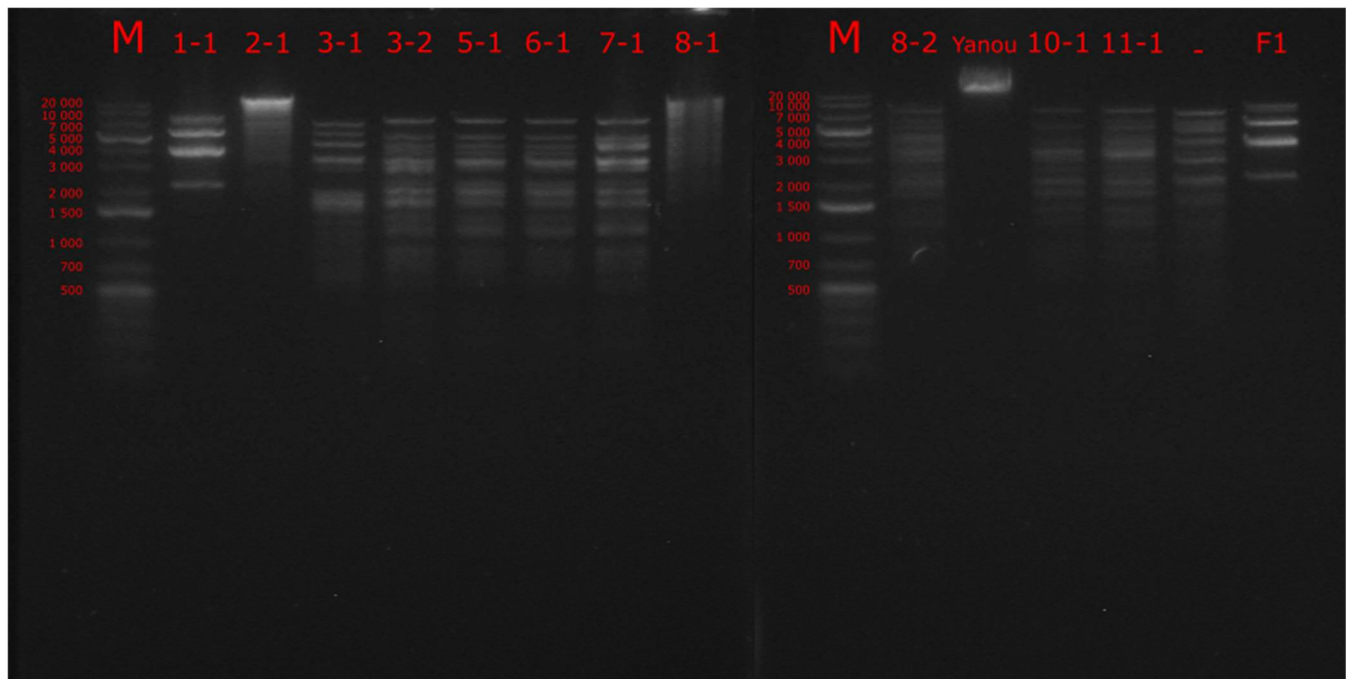
Appendix 2. Newly isolated phages from plant leaves. The morfotype of phages was determined by analysing TEM images. Plaques are described by their diameter: small (mazi) (~0,5–1mm), average (vidēji) (~1–2mm), big (lieli) (>2mm), their sizes are compared after incubating plates at RT.

Pilsēta/ kultūraugs	Saimniekkultūras suga un nosaukums	Fāga izolāta nosaukums	Fāga morfotips	Fāga plaku morfoloģija	Genoma garums, bp	Paredzētie genoma fiziskie gali	Genomiski noteiktais dzīves cikls	Genomu savstarp ējā līdzība
Ābele <i>Malus domestica</i>	<i>Cedecea davisae</i> H1	F1	miovīruss	mazi, dzidri	45482	Headful	Lizogēnais	
Rīga		1-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	45563	Headful	Lizogēnais	
Salaspils		2-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	89055	SDTR (570 bp)	Lītiskais	
Tukums		3-1	miovīruss	mazi, dzidri	86270	SDTR (569 bp)	Lītiskais	
		3-2	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	89109	SDTR (569 bp)	Lītiskais	
Valmiera		4-1	miovīruss	vidēji, dzidri	88754	SDTR (570 bp)	Lītiskais	
Jēkabpils		5-1	miovīruss	vidēji, dzidri ar duļķainu malu	88491	SDTR (570 bp)	Lītiskais	
Jelgava		6-1	miovīruss	vidēji, dzidri ar duļķainu malu	88491	SDTR (570 bp)	Lītiskais	
Ventspils		7-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	–	–	–	–
Jūrmala		8-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	89291	SDTR (570 bp)	Lītiskais	
		8-2	miovīruss	vidēji, dzidri	88756	SDTR (569 bp)	Lītiskais	
Rēzekne		Yanou (9-1)	podovīruss	vidēji, dzidri ar duļķainu malu	40865	SDTR (159 bp)	Lītiskais	
Liepāja		10-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	–	–	–	–
Daugavpils	11-1	miovīruss	mazi, dzidri ar duļķainu malu	89044	SDTR (570 bp)	Lītiskais		

3. pielikums. Darba gaitā izolētie *C.davisae* fāgi. Morfotips noteikts, analizējot TEM attēlus.

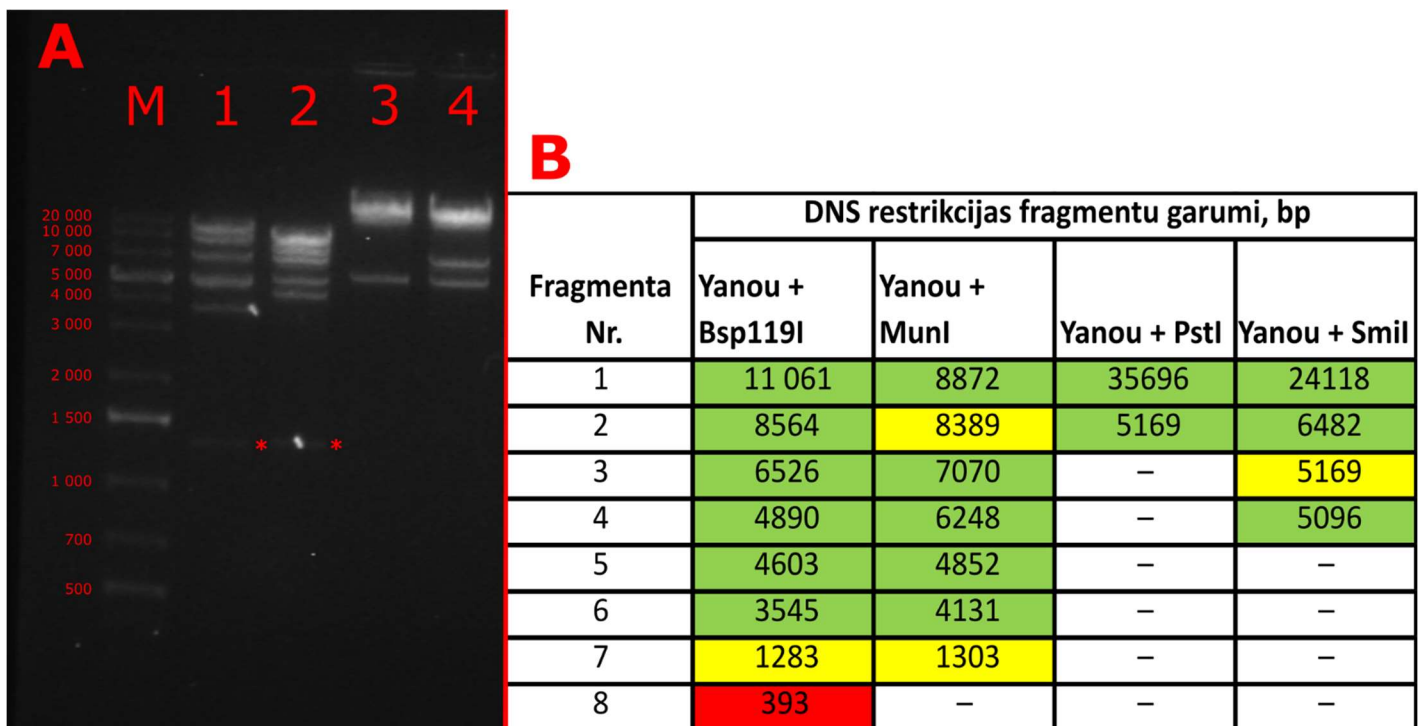
Plaki pēc to diametra aprakstīti: mazi (~0,5–1mm), vidēji (~1–2mm), lieli (>2mm), to izmēri ir salīdzināti, inkubējot plates pie +30°C. Genomu līdzība parādīta ar dažādām krāsām – viena krāsa ir dota tiem fāgu izolātiem, kuri pēc genoma nukleotīdu sekvenču savstarpējās līdzības potenciāli pieder vienai sugai un reprezentē tās izolātus.

Appendix 3. Newly isolated *C. davisae* phages. Morfotype was determined by analysing TEM images. Plaques are described by their diameter: small (mazi) (~0,5–1mm), average (vidēji) (~1–2mm), big (lieli) (>2mm), their sizes are compared after incubating plates at +30°C. The similarity of genomes is shown by colors – those phage isolates which have the same color (by the similarity of genome nucleotide sequences) potentially belong to one species and represent its isolates.



4. pielikums. *C. davisae* fāgu DNS restrikcijas profili, šķeļot ar BamHI un HindIII restriktāžu kokteili. M – marķieris (1 kb Plus DNA Ladder, ne visiem fragmentiem ir norādīti to garumi), fāgu izolātu paraugu nosaukumi ir doti virs attiecīgajām kolonnām, “-” apzīmē ar šo darbu nesaistītu paraugu.

Appendix 4. DNA restriction profiles of *C. davisae* phages, after using BamHI and HindIII restriction enzyme cocktail. M – marker (1 kb Plus DNA Ladder, not all fragments are annotated with their lengths), the names of phage isolates are given above the corresponding columns, “-” is used to label a sample which was not involved in this thesis.



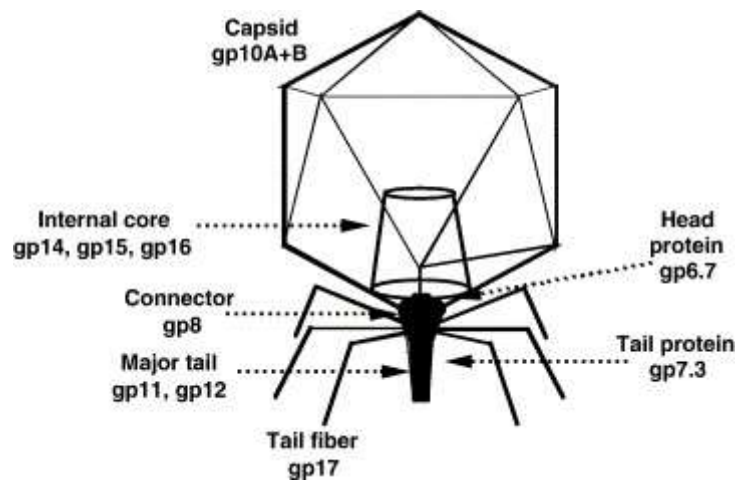
5. pielikums. Fāga Yanou DNS restrikcijas profils un tā salīdzinājums ar šķelšanu *in silico*. A – restrikcijas profils: M – marķieris (1 kb Plus DNA Ladder), 1 – Yanou + Bsp119I, 2 – Yanou + MunI, 3 – Yanou + PstI, 4 – Yanou + SmaI, ar sarkanu * simbolu apzīmēti ļoti vāji redzami fragmenti. B – *in silico* genoma šķelšanas rezultātā iegūtie DNS fragmenti un to garumi, zaļa krāsa – restrikcijas profilā labi saskatāmi fragmenti, dzelteni – vāji saskatāmi vai pārklājas ar citiem fragmentiem, sarkana – fragments netika novērots, “–” nav attiecināms.

Appendix 5. Restriction profile of phage Yanou and a comparison with restriction *in silico*. A – restriction profile: M – marker (1 kb Plus DNA Ladder), 1 – Yanou + Bsp119I, 2 – Yanou + MunI, 3 – Yanou + PstI, 4 – Yanou + SmaI, barely noticeable fragments are represented with a red * symbol. B – expected DNA fragments in *in silico* restriction and their lengths, green color – fragments are clearly visible in restriction profile, yellow – barely noticeable or overlapping fragments, red – fragment was not observed, “–” not applicable.

ORF	Strand	Start	End	Product size	Shine-Dalgarno (SD) sequence assuming antiSD of <i>Cedecea davisae</i> DSM 4568*				Start codon	Assigned product function
					20 bp upstream of start	putative SD (assuming G-U wobble base pairing and only helix formation)	DeltaG (kcal/mol)	Spacer (bases)		
ORF1	+	900	1250	116	ACACTATGAGGT AACACAAG	GAGGU	-5,86	8	ATG	DNA mimic protein Ocr
ORF2	+	1250	1408	52	GAAGAGGAGG ATGAAGAGTA	GAGGAGG	-10,19	10	ATG	putative host cell division inhibitor
ORF3	+	1476	1682	68	ACTAACTGAAGGT ATCTATC	AGGU	-3,50	7	ATG	hypothetical protein
ORF4	+	1698	1898	66	GATAAAAT AGGA CTAAACATC	AGGA	-3,61	8	ATG	hypothetical protein
ORF5	+	2000	2143	47	CTTAACCTTGAATGGGG TA	GGGAG	-5,73	2	ATG	hypothetical protein
ORF6	+	2140	2301	53	ATCAGAGGGG TACTGCACAA	GAGGGG	-6,17	10	ATG	hypothetical protein
ORF7	+	2285	2503	72	TAACAAGATAGGT TCCATCT	AGGU	-3,50	7	ATG	hypothetical protein
ORF8	+	2526	3605	359	AACATACAGGA CAAACTGCA	AGGA	-3,61	9	ATG	protein kinase
ORF9	+	3676	6327	883	CTAACCGGAAGAGG CACGAA	GAGG	-3,61	6	ATG	DNA dependent RNA polymerase
ORF10	+	6513	6644	43	ACTAAGAGAGGA CTTTAAGT	GAGGA	-4,87	8	ATG	hypothetical protein
ORF11	+	6646	6918	90	TAGCTGGGAGG GTCATAAG	GGGAGG	-8,98	9	ATG	host dGTPase inhibitor
ORF12	+	6943	7359	138	ACTCAGTATAGGAGG AAACC	AGGAGG	-8,93	5	ATG	HNH endonuclease
ORF13	+	7356	8369	337	GGAAAGAATAGGAG ATTGT	AGGAG	-5,68	6	ATG	DNA ligase
ORF14	+	8552	8812	86	CTCACTAAGAGG ACACATAT	AGGAG	-6,61	7	ATG	hypothetical protein
ORF15	+	8812	9405	197	CGAATCAAGGAGGTG TTCTG	AAGGAGGUG	-14,21	5	ATG	nucleotide kinase
ORF16	+	9395	9622	75	GAAACATAAGGA TAAGTGCT	UAAGGA	-5,87	8	ATG	hypothetical protein
ORF17	+	9615	9734	39	CTGTGTTATGGTGA ACCGCT	GGUGA	-5,88	6	ATG	hypothetical protein
ORF18	+	9736	9930	64	GCTATCGAGAGG TACTGAT	GAGGU	-5,86	7	ATG	host cell RNA polymerase inhibitor
ORF19	+	9997	10695	232	ACCTAAAGGAG ATTAACATT	AAGGAG	-6,61	9	ATG	single-stranded DNA-binding protein
ORF20	+	10696	11151	151	ACGAAGACGGAG ATTTCTAA	GAGG	-3,61	8	GTG	endonuclease I
ORF21	+	11148	11597	149	CAAGCGAAAGGAG TTAAGAA	AAGGAG	-6,61	7	GTG	HNH endonuclease
ORF22	+	11578	12033	151	CAACAAGTGGAGG CATTTAA	GAGG	-6,86	7	ATG	endolysin
ORF23	+	12101	13801	566	GTTGATTAAGGA ATAACCAT	UAAGGA	-5,87	8	ATG	DNA primase/helicase
ORF24	+	13890	14102	70	CACTAAAGGAG ACACACATC	AAGGAG	-6,61	9	ATG	protein of unknown function (DUF5471)
ORF25	+	14122	14391	89	ATCAAACAGGAG AAACCATT	AGGAG	-5,68	8	ATG	inhibitor of toxin/antitoxin system
ORF26	+	14465	14872	135	TCACTATAGGAG ATATTACC	AGGAG	-5,68	8	ATG	hypothetical protein
ORF27	+	14891	17047	718	AATCAAT AGGAG AAATCAAC	AGGAG	-5,68	8	ATG	DNA polymerase
ORF28	+	17067	17363	98	ATTCTATAGGAG AAATATT	AGGAG	-5,68	8	ATG	host H-NS-interacting protein
ORF29	+	17363	17572	69	ACTGTACGGGAGGTG TTCTG	GGGAGGUG	-13,33	5	ATG	hypothetical protein
ORF30	+	17572	17730	52	CGAATGGAGG GTGTGATA	GGGAGG	-8,98	9	ATG	putative host recBCD nuclease inhibitor
ORF31	+	17717	18619	300	TGAGCTAGAGGAG AAACCTTA	GAGGAG	-6,94	7	ATG	exonuclease
ORF32	+	18607	18720	37	ATTGACAAGGAG ATTTACCT	AAGGAG	-6,61	8	GTG	protein of unknown function (DUF5516)
ORF33	+	18818	19072	84	CTCTAAGAGGA ATCTTTATC	GAGGA	-4,87	9	ATG	protein of unknown function (DUF2717)
ORF34	+	19077	19343	88	TGATGGGGAGG ATTGACCTT	UGGGGAGG	-10,48	9	ATG	protein of unknown function (DUF5476)
ORF35	+	19343	19744	133	GCATTTGGAGG CAAGAAGTG	GGAGG	-6,86	9	ATG	hypothetical protein
ORF36	+	19748	20068	106	ACTTTAAGGAGGT ATAAGTT	UAAGGAGGU	-13,44	7	ATG	tail assembly protein
ORF37	+	20083	21693	536	ATTTAATCAGGAGGTGA CAC	AGGAGGUGA	-15,64	3	ATG	portal protein
ORF38	+	21790	22713	307	ACTTTAAGGAG ACAATAATA	UAAGGAG	-7,94	9	ATG	capsid assembly scaffolding protein
ORF39	+	22808	23839	343	TTTAAGAAGGAG ACATACAT	AAGGAG	-6,61	8	ATG	major capsid protein
ORF40	+	23839	23997	52	GTGGTTTTCAAGGGGAAGTA	AAGGGG	-5,84	5	ATG	hypothetical protein
ORF41	+	24065	24655	196	CTGAAAGGAGGAGG AACTAT	GAGGAGG	-10,19	6	ATG	T7 gp11-like tail tubular protein A
ORF42	+	24676	27063	795	TAATCAATAAGGAGG CTCTA	UAAGGAGG	-11,19	5	ATG	T7 gp12-like tail tubular protein B
ORF43	+	27144	27560	138	GACTACGGGAGG GTTTTCTT	GGGAGG	-8,98	8	ATG	T7 gp13-like protein of unknown function (DUF2833)
ORF44	+	27565	28155	196	CACGAAAGGAGG ATAACCAT	AAGGAGG	-9,86	8	ATG	T7 gp14-like internal virion protein
ORF45	+	28162	30423	753	AGACGGGAGGT AATGAGCT	GGGGAGGU	-11,73	8	ATG	T7 gp15-like internal virion protein
ORF46	+	30450	34424	1324	GCTACATAAGGAGG CCCTAA	UAAGGAGG	-11,19	6	ATG	T7 gp16-like internal virion protein
ORF47	+	34497	36293	598	ATTTACTTTAAGGAGGT CAA	UAAGGAGGU	-13,44	3	ATG	tail fiber protein
ORF48	+	36306	36833	175	TTTACTGATAGGAGG ACGAT	AGGAGG	-8,93	5	ATG	tail fiber assembly protein
ORF49	+	36888	37091	67	GGACTAATTTAGGAGG ATAC	AGGAGG	-8,93	4	ATG	holin
ORF50	+	37095	37364	89	AAGCCAATAAGGAGG TAATAT	UAAGGAG	-7,94	6	ATG	terminase small subunit
ORF51	+	37459	37902	147	GAAAGTTAACGGGAGG CATT	GGGAGG	-8,98	4	ATG	i-spanin
ORF52	+	37574	37825	83	ATGGAAACAGGAGGT ACACA	AGGAGGU	-11,18	5	ATG	o-spanin
ORF53	+	37912	39672	586	AAATCAAGTAAGGAGG CAAC	UAAGGAGG	-11,19	4	GTG	terminase large subunit
ORF54	+	39710	40153	147	GGCCAATTAAAGGAGGT AAT	UAAGGAGGU	-13,44	3	ATG	HNH endonuclease
ORF55	+	40318	40467	49	AACATAA AGGGAGG AGACTT	AGGGAGG	-9,52	6	ATG	hypothetical protein

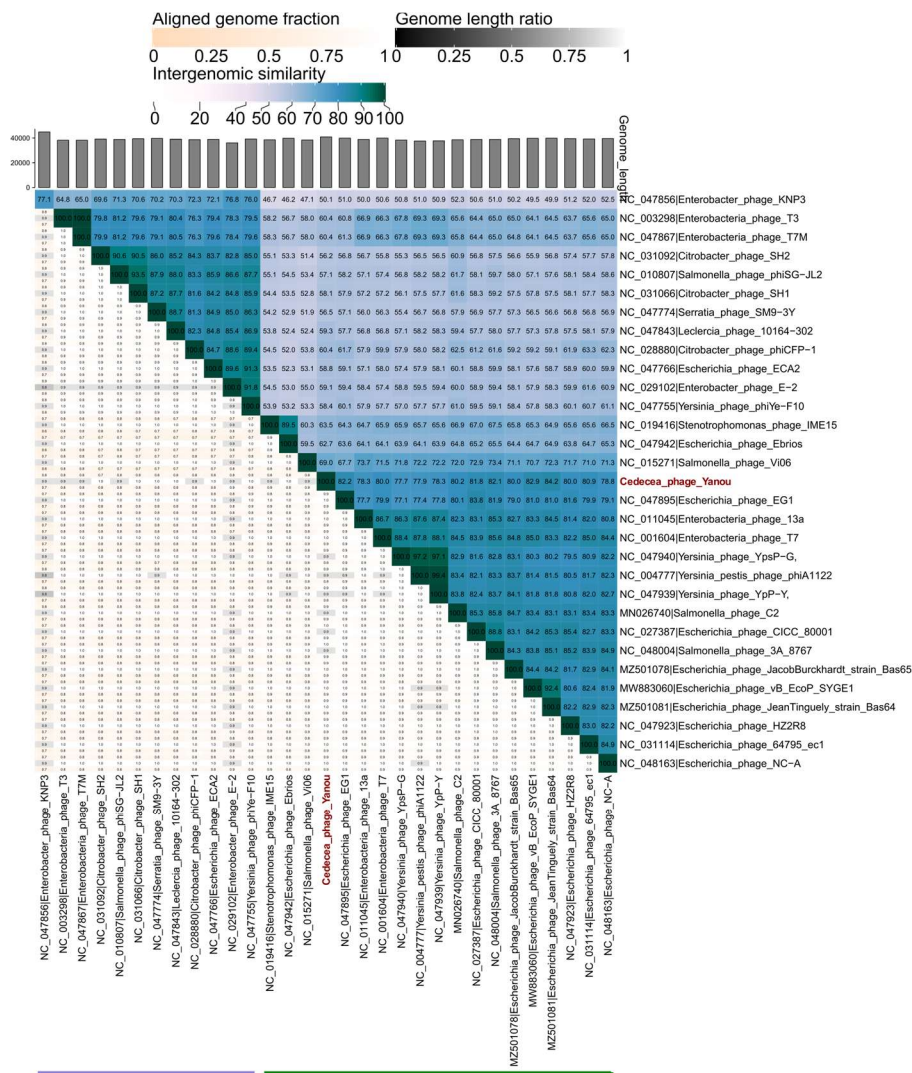
6. pielikums. Fāga Yanou genoma anotācija. Tabulā attēlots ORF numurs pēc kārtas, ķēdes virziens, ORF sākums, beigas, gēna produkta izmērs, SD sekvenca, starta kodons un gēna produkta funkcija. * – (16s rRNA aste *C. davisae* DSM 4568 genomā (piekļuves Nr.: NZ_KE161030.1): 3'-AUUCCUCCACUAG-5')

Appendix 6. Annotation of phage Yanou genome. ORF number, strand direction, ORF start, end, gene product size, SD sequence, start codon and assigned product function are shown. * – (16s rRNA tail of *C. davisae* DSM 4568 (accession: NZ_KE161030.1): 3'-AUUCCUCCACUAG-5')



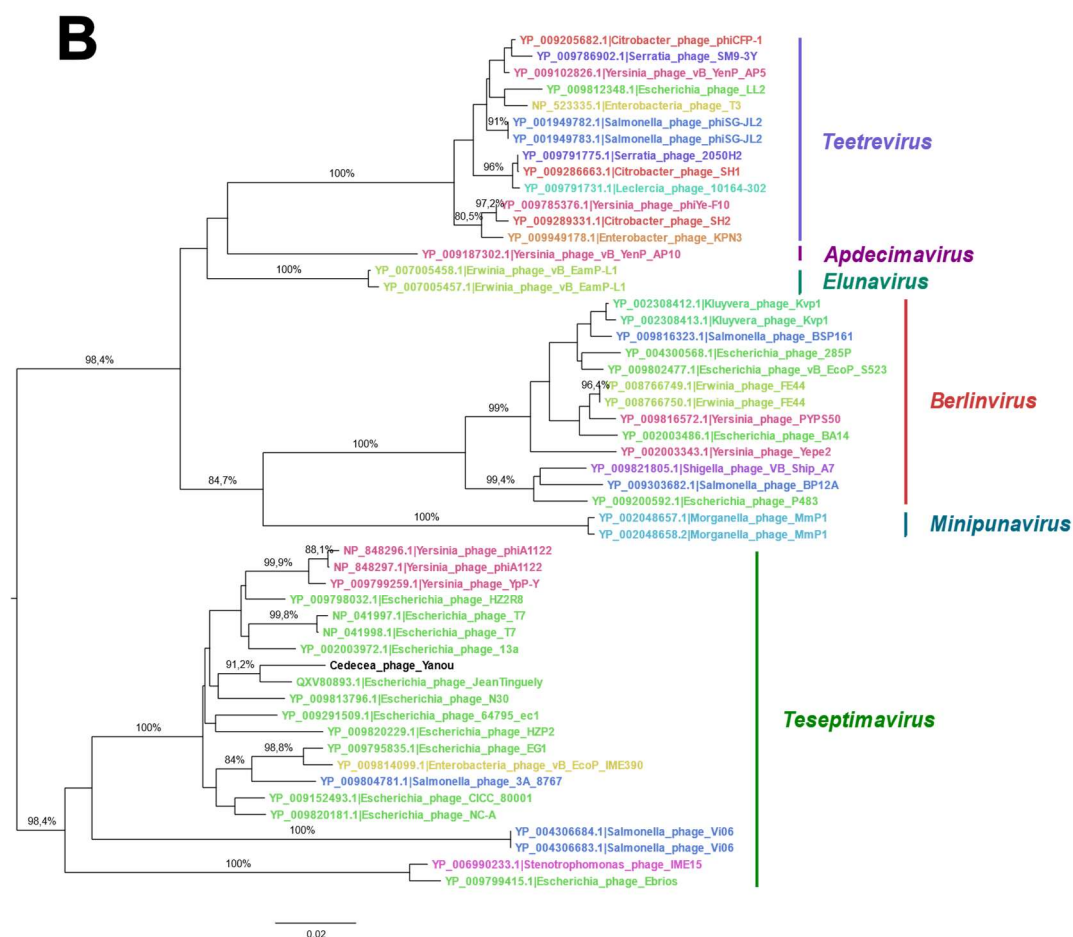
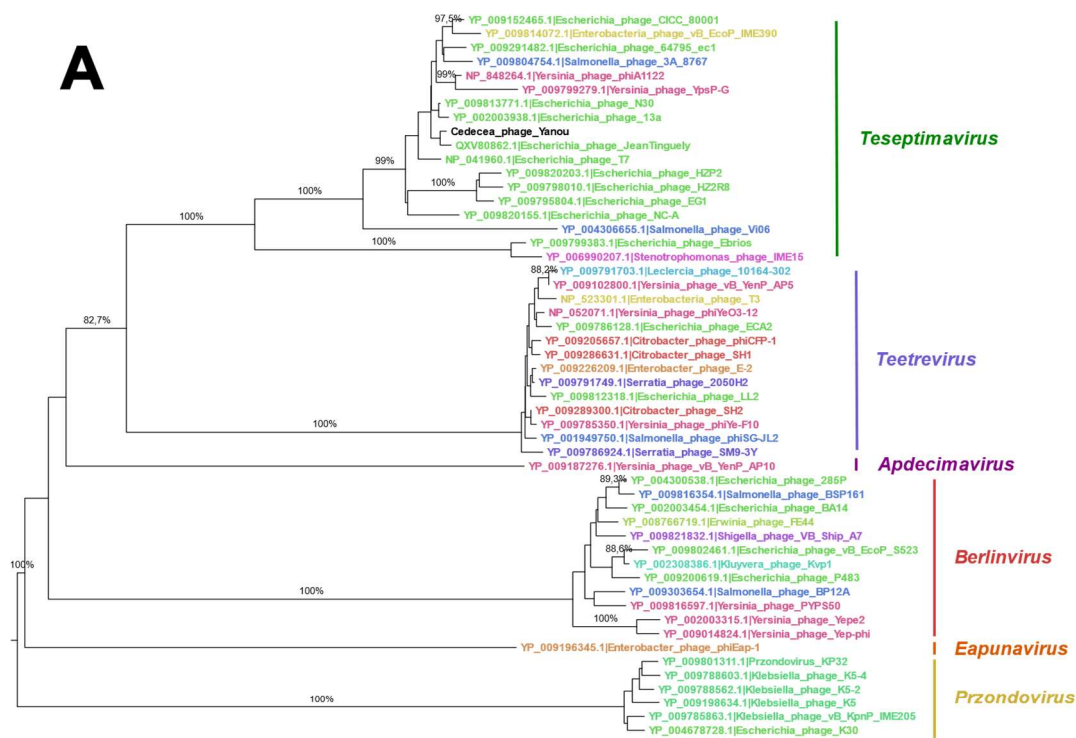
7. pielikums. *Escherichia* fāga T7 viriona uzbūve un strukturālie proteīni (Kemp *et al.* 2005).

Appendix 7. Structure and proteins of *Escherichia* phage T7 virion (Kemp *et al.* 2005)



8. pielikums. Genomisko nukleotīdu sekvenču līdzība starp fāgu Yanou, piecu tam radniecīgāko fāgu pilniem genomiem (nr/nt datubāze) un 25 radniecīgāko datubāzē RefSeq atrodamo “references” fāgu genomiem, aprēķināta, izmantojot rīku VIRIDIC (Moraru *et al.* 2020). Ne visi izmantotie fāgi ir oficiāli iekļauti ICTV taksonomijā. Labajā pusē ir redzama fāgu savstarpējā līdzība, krāsojuma skala ir dota virs attēla. Kreisajā pusē katram fāgu pārim ir norādīta pielīdzinātā 1. fāga genoma daļa, atšķirība abu genomu garumos un pielīdzinātā 2. fāga genoma daļa, krāsojuma skalas ir dotas augšpusē.

Appendix 8. Intergenomic similarity between phage Yanou, complete genomes of five most closely related phages to Yanou (nr/nt database) and 25 full genomes of most closely related “reference” phages to Yanou found in RefSeq database, similarity was calculated with a tool VIRIDIC (Moraru *et al.* 2020). Not all used phages have been officially included in ICTV taxonomy. On the right side the intergenomic similarity is shown, the colored scale is given at the top of the figure. On the left side for each pair of phages is given aligned fraction genome 1, genome length ratio and aligned fraction genome 2, colored scales are given at the top of the figure.



9. pielikums. Fāgu RNS polimerāzes (A) un lielā kapsīda proteīna (B) aminoskābju sekvenču evolucionārās attiecības. Fāgu nosaukumi ir iekrāsoti pēc to saimnieka ģints, pašu fāgu ģintis ir rakstītas labajā pusē, ne visi fāgi ir oficiāli iekļauti ICTV taksonomijā.

Evolucionārās attiecības tika noteiktas ar “kaimiņu savienošanas” metodi (Saitou and Nei 1987). Attēlā redzami optimālie koki ar zaru garumu summu 0,94508003 (A) un 1,07344106 (B). Par koku sakni ir noteikti to viduspunkti. Pie zariem ir norādītas procentuālās vērtības (ja >80%) no 1000 *bootstrap* testu replikātiem, kuros radniecīgās sugas tika sagrupētas kopā (Felsenstein 1985). Koki ir zīmēti mērogā, zaru garumi attēloti vienībās, kas atbilst evolucionārajām distancēm, attēlu apakšā doti mērogi. Evolucionārie attālumi aprēķināti, izmantojot p-attāluma metodi (Nei and Kumar 2000), un ir izteikti vienībās, kas atbilst aminoskābju atšķirībām uz pozīciju. Katra analīze ietvēra 52 aminoskābju sekvenču. Sekvenču pielīdzināšana tika veikta ar programmu Muscle (Edgar 2004). Visas pozīcijas, kuras bija pārstāvētas mazāk nekā 90% sekvenču, tika izslēgtas no analīzes. Tātad mazāk kā 10% pielīdzināšanas spraugu, trūkstošu datu un neskaidru bāzu tika atļautas katrā pozīcijā. Kopā galīgajā datu kopā bija 850 (A) un 334 (B) pozīcijas. Evolucionārās analīzes tika veiktas programmā MEGA7 (Kumar *et al.* 2016), iegūtie koki tika vizualizēti programmā FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

Appendix 9. Evolutionary relationships of RNA polymerase (A) and major capsid protein (B) amino acid sequences. The names of phages are colored according to their host genus, their own genus are written on the right side, not all phages have been officially included in ICTV taxonomy. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The optimal trees with the sum of branch length = 0,94508003 (A) and = 1,07344106 (B) are shown. The trees are rooted at midpoint. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown (if >80%) next to the branches (Felsenstein 1985). The trees are drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic trees, scales is given at the bottom of the figure. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar 2000) and are in the units of the number of amino acid differences per site. Each analysis involved 52 amino acid sequences. Sequence alignment was performed with Muscle (Edgar 2004). All positions with less than 90% site coverage were eliminated. That is, fewer than 10% alignment gaps, missing data, and ambiguous bases were allowed at any position. There were a total of 850 (A) and 334 (B) positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.* 2016), and the resulting tree was drawn in FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

Bakalaura darbs „Jaunizdalīto *Cedecea davisae* inficējošo bakteriofāgu izolēšana un raksturošana” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Agneta Jonikāne *paraksts* 02.06.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: MSc. biol. Ņikita Zrelovs *paraksts* 02.06.2022.

Recenzents: *paraksts* Dr. biol. Jānis Rūmnieks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 02.06.2022.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: