Данные, представленные в таблице, не выявили различий в соотношении масс внутренних органов животных всех подопытных групп к массам внутренних органов контрольных аналогов.

Выводы. Таким образом, результатами эксперимента установлено отсутствие дополнительной нагрузки на внутренние органы лабораторных крыс, связанной с длительным применением селефлана в субтоксических дозах.

Список литературы

1. Колганова К.А. Применение гепатопротекторов в клинической практике / К.А. Колганова // РМЖ. 2008. №1. С. 26.

2. Абрамов А.А., Семененко М.П., Кузьминова Е.В., Тяпкина Е.В., Долгов Е.П. Фармакологическая регуляция метаболических функций печени новыми гепатопротекторными средствами. Новости науки в АПК. 2018. № 2-1 (11). С. 226-229.

3. Бурков П.В. Изучение влияния модифицированных цитотоксинов «Геприм для кур» на морфологические характеристики печени / П.В. Бурков, П.Н. Щербаков, Н.П. Щербаков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2014. № 12 (122). С. 108-113.

4. Скакун Н.П. Клиническая фармакология гепатопротекторов / Н.П. Скакун, В.В. Шманько, Л.М. Охримович // Тернополь: Збруч. 1995. 272 с.

5. Ушкалова Е.А. Проблемы применения гепатопротекторов / Е.А. Ушкалова // Фарматека. 2004. № 4. С.45-55.

6. Семененко М.П., Кузьминова Е.В., Тяпкина Е.В., Фомин О.А. Доклиническое изучение гепатозащитного средства. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 141-143.

7. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях. Методическое руководство, утвержденное Департаментом ветеринарии МСХ РФ от 17. 07. 2002.

DOI: 10.34617/bmf5-ra89
УДК 574.24

UPGMA - АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ И НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК-ЛИГАЗ - ПЕРСПЕКТИВНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ АЭРОМОНАД ПОДСЕМЕЙСТВА TEVENVIRINAE

Зимин Андрей Антонович[1], канд. биол. наук
Никулин Никита Алексеевич[1]
Лу Иньхуа[2], PhD Biol. Sci.
Осепчук Денис Васильевич[3,4], д.-р. с-х. наук
[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Российская Федерация, г. Пущино, Российская Федерация
[2]Колледж естественных наук, Педагогический университет Шанхая, г. Шанхай, Китай
[3]ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация
[4]ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

С целью выбора генетического маркера для анализа фагов аэромонад проведен филогенетический анализ последовательностей структурных генов ДНК-лигаз и аминокислотных последовательностей самих ферментов бактериофагов Т4-типа, заражающих аэромонады. Полученные данные обсуждаются в контексте использования этих маркеров для таксономии бактериофагов для их использования в терапии и профилактики заражений аквакультуры.

Ключевые слова: аквакультура; аэромонозы рыб; бактериофаги; ген ДНК-лигазы, Т4-бактериофаги

UPGMA - ANALYSIS OF PROTEIN AND NUCLEOTIDE SEQUENCES OF DNA LIGASES – A PROSPECTIVE GENETIC MARKER FOR TAXONOMY OF AEROMONADE BACTERIOPHAGES OF THE TEVENVIRINAE SUBFAMILY

Zimin Andrei Antonovich[1], PhD Biol. Sci.
Nikulin Nikita Alekseevich[1]
Lu Yinhua[2], PhD Biol. Sci.
Osepchuk Denis Vasilyevich[3,4], Dr. Agr. Sci.
[1]*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation*
[2]*College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China*
[3]*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*
[4]*Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

In order to select a genetic marker for the analysis of phages of Aeromonas, a phylogenetic analysis of the sequences of structural genes of DNA ligases and amino acid sequences of the enzymes of T4-type bacteriophages infecting aeromonads was carried out. The data obtained are discussed in the context of the use of these markers for the taxonomy of bacteriophages for their use in therapy and prevention of aquaculture infections.

Key words: aquaculture; aeromonosis of fish; bacteriophages; DNA ligase gene, T4 bacteriophages

Аквакультура рыбы несет существенные экономические потери, связанные с бактериальными инфекциями. Борьба с инфекциями рыбы необходима и для получения здорового питания человека. Аэромонады – это повсеместно распространенные свободноживущие организмы, обитающие в основном в водной среде. Эти бактерии являются условно-патогенными микроорганизмами, которые вызывают различные типы инфекций у широкого круга хозяев, включая рыб и людей. Например, *Aeromonas hydrophila* является этиологическим агентом аэромонозной септисемии и обычно ассоциируется с такими симптомами, как покраснение или гниение плавников, небольшие язвенные поражения на коже и кровоизлияния, за которыми часто следует смерть рыб в течение нескольких часов после проявления болезни. Подробных данных об экономических потерях в производстве рыбы, связанных с инфекцией *A. hydrophila* довольно мало. Например, бразильские рыбоводы сообщают, что распространенность аэромонозной септисемии является причиной 20-30 % ежегодной смертности в промышленной аквакультуре. *A. salmonicida* является возбудителем фурункулеза рыб семейства лососевых. Впервые этот вид аэромоноза описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году. Работы последних десятилетий показали, что достаточно часто происходит инфицирование *A. salmonicida*

и представителей других семейств рыб. Человеческие инфекции возникают в результате травм на рабочем месте или воздействия во время рекреационных мероприятий, лечения пиявками, потребления воды или пищи рядом с водоемами.

Бактериофаги широко исследуются для использования в животноводстве [1-3]. Большинство бактериофагов Т4-типа не способны к горизонтальному переносу генов бактерий как генов устойчивости к антибиотикам, так и генов патогенности за счет фаговой трансдукции. Это является существенным преимуществом в использовании именно их в фаговой терапии [2-4]. Одной из перспектив контроля аэромонад является поиск новых бактериофагов, специфичных к штаммам *A. hydrophila* или *A. salmonicida*, выделенных в районах содержания аквакультуры. Для таксономического определения новых фагов, выделенных из зараженных водоемов, требуется использование генетических маркеров, которые позволяют надежно устанавливать с помощью ПЦР и секвенирования ДНК степень родства или, наоборот, расхождения между вновь выделенными и хорошо изученными штаммами бактериофагов.

В качестве исследуемого маркера использовали ген ДНК-лигазы – ключевого белка репликации, рекомбинации и репарации геномной ДНК этих бактериофагов. Ген этого белка (ген 30) обозначен цифрой у бактериофага Т4. Цифрами у бактериофага Т4 обозначают так называемые «существенные» гены, то есть, те гены, мутации по которым останавливают развитие бактериофага. В случае гена 30 (гена ДНК-лигазы) мутации приводят к остановке репликации геномной ДНК фага Т4. Сравнительное исследование генов ДНК-лигаз проводится нами на регулярной основе уже несколько десятилетий и приоритетно было начато нами [5]. В данной работе проведено сопоставление сходства аминокислотных и нуклеотидных последовательностей ДНК-лигаз известных бактериофагов аэромонад семейства *Tevenvirinae*, перспективных для фаговой терапии гидробионтов при заболевании аэромонозами.

Методика исследований. Для выбора последовательностей было проведено сравнение аминокислотных последовательностей PSI-BLAST [2] с базой данных белков GenBank. Предварительное множественное выравнивание и построение филогенетических деревьев проводилось с использованием пакета программ Mega6 [3]. Для исследования были взяты аминокислотные последовательности ДНК-лигаз и транслированных открытых рамок (структурных генов) бактериофагов аэромонад 65, Aeh1. Для реконструкции филогении и построения филогенетических деревьев белков и ДНК использовали метод UPGMA для предварительного анализа. Филогенетический статистический тест каждый раз был проведен методом бутстрэппинга (Bootstrap method) с 1000 повторов. Аминокислотные замены учитывались с помощью статистической модели JTT (Jones-Taylor-Thornton model) [4].

Результаты исследований и их обсуждение. Применению бактериофагов как антибактериальных агентов предшествуют ряд стадий научной работы по выделению и таксономической идентификации бактериовирусов. Быстрое первичное определение изолированного из природы бактериофага наиболее рационально проводить с помощью ПЦР. На следующем этапе можно предпринять полногеномное секвенирование бактериофагов, но для первичного анализа может оказаться достаточным секвенирование отдельных генетических маркеров. В отличие от бактерий, бактериофаги и вирусы в целом более разнообразны. «Коэффициент разнообразия» вирусов превышает соответствующий параметр у бактерий на порядки. В этой ситуации выбор и предварительный теоретический анализ удобных генетических маркеров может оказаться весьма существенным. Более того для различных групп вирусов

идентификационные генетические маркеры могут быть разными. Для большинства групп бактериофагов в качестве основного генетического маркера группы используется ген главного белка капсида. Но данные генетический маркер может оказаться применимым для таксономии нового фага до подсемейства или в лучшем случае рода. Для надежной идентификации рода бактериофага и внутри родов необходимо использование ряда генетических маркеров, а не только одного гена основного белка капсида. Для выбора стратегии быстрой первичной таксономической идентификации бактериофагов необходимо подобрать адекватные поставленной задаче генетические маркеры. Выбор и анализ пригодности для использования таких маркеров можно осуществить на основе филогенетического эволюционного анализа сходства их последовательностей из уже известных геномов бактериофагов той или иной группы. Различные базы данных биологических последовательностей, в первую очередь GenBank Национальных институтов здоровья США предоставляют для этого достаточно большие возможности как по наличию большого числа секвенированных геномов, так и ассоциированных методов их исследования. В первую очередь методов сравнения последовательностей с БД. Одними из основных методов являются различные варианты алгоритма BLAST. На следующем этапе сравнения производят построение филогенетических деревьев аминокислотных и нуклеотидных последовательностей на основе выбранного генетического маркера. По расположению исследуемых и контрольных последовательностей на филогенетических деревьях судят о применимости исследуемого маркера для таксономии бактериофагов. Метод UPGMA хорош тем, что он отражает в первую очередь простое сходство последовательностей между собой, что и необходимо для последующего выбора олигонуклеотидов-праймеров для первичной таксономии новых выделенных бактериофагов.

На первом этапе мы предприняли сравнение полных аминокислотных последовательностей ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад и контрольных последовательностей других бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae*. Результаты сравнения представлены на рисунке 1. Было показано, что ДНК-лигазы контрольных фагов, близкородственных вирусу T4, образуют отдельную ветвь и тем самым дерево ферментов фагов аэромонад T4-типа имеет хорошее укоренение. Филогенетический анализ методом UPGMA АТФ-зависимых ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад разделил их на две группы. Это группа фага Aeromonas virus Aeh1, а именно Aeromonas virus Ah1, Aeromonas phage AsFcp, Aeromonas phage PX29 и Aeromonas phage phiAS5. Другая группа - группа фага Aeromonas virus 65, кроме него в данную группу входят Aeromonas virus 65.1, Aeromonas phage CC2, Aeromonas phage AS-yj, Aeromonas phage AS-zj, Aeromonas phage AS-sw, Aeromonas phage Assk, Aeromonas phage Asswx 1, Aeromonas phage AS-szw и Aeromonas phage Aswh 1. При этом Vibrio phage vB_VmeM-32, согласно этому анализу отличается от контрольных вирусов кишечной палочки и более близок к бактериофагам аэромонад обеих групп.

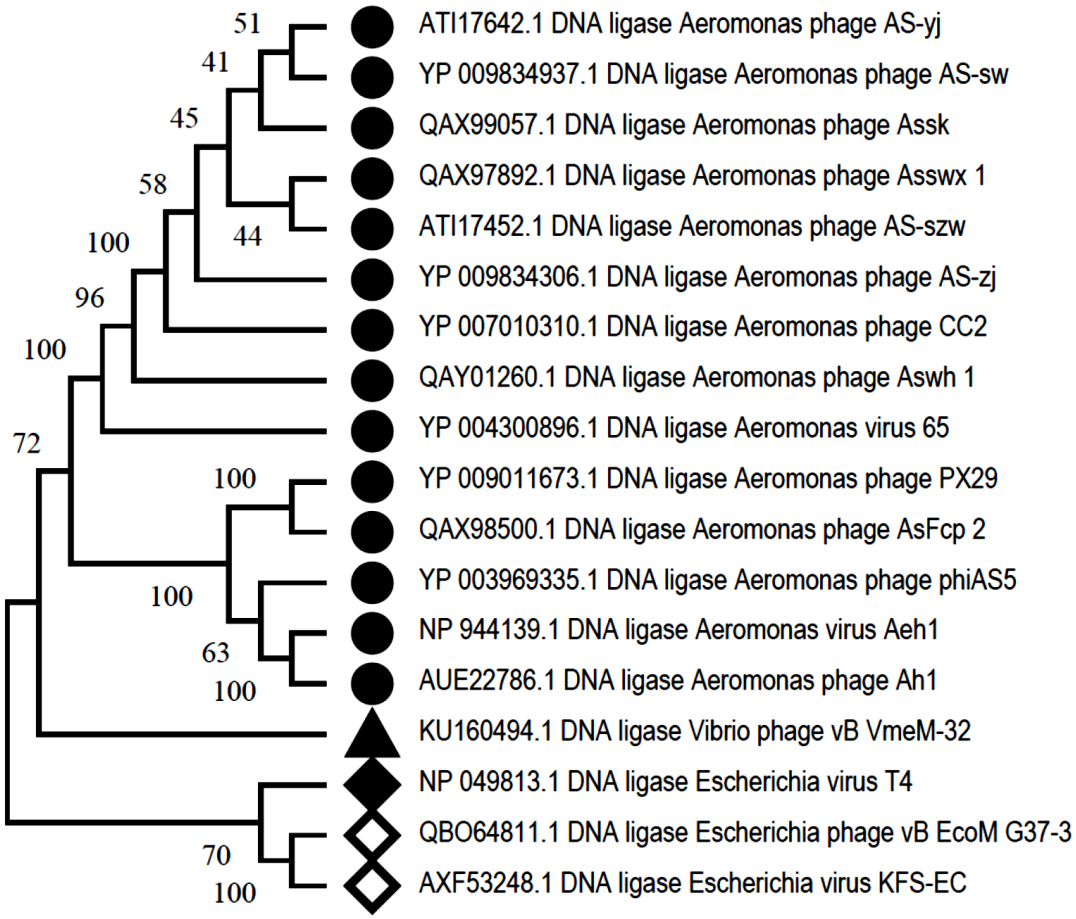

Рисунок 1 – Филогенетическое дерево эволюционного сходства аминокислотных последовательностей ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад (обозначены черными кружками) и контрольных последовательностей вирусов *E. coli* близкородственных T4 (обозначены ромбами, T4 – черным ромбом), а также последовательности ДНК-лигазы вибриофага vB VmeM-32 (обозначена треугольником), полученное методом UPGMA [6]. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 2,88133313. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показан рядом с ветвями [7]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием матрицы JTT [8] и выражены в единицах числа аминокислотных замен на сайт. Этот анализ включал 18 аминокислотных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были удалены (вариант полного удаления). В окончательном наборе данных было 432 позиции. Эволюционный анализ проводился в MEGA X [9]

Как показало наше исследование, выполненное при помощи построения множественного наложения программой MASKL, центральная часть последовательности ДНК-лигазы фага T4 наиболее консервативна и кодирует активный центр фермента. N-концевой домен ответственен за компартментализацию фермента, а C-концевой домен - за связывание ДНК. Было предпринято филогенетическое исследование наиболее консервативной центральной части последовательностей, кодирующей активные центры этих ферментов. Результат этого исследования в виде филогенетического дерева представлен на рисунке 2. Эволюционный анализ центральных частей аминокислотных последовательностей ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад подсе-

мейства *Tevenvirinae* был проведен аналогично предыдущему – методом UPGMA.

Данное филогенетическое дерево существенно отличается от предыдущего. Разделение фагов аэромонад на две группы и составы этих групп остались такими же. Но аминокислотная последовательность ДНК-лигазы фага Т4 С была отнесена в результате этого исследования к группе Aeromonas virus Aeh1, а ДНК-лигазы фагов кишечной палочки Escherichia phage vB EcoM G37-3 и Escherichia virus KFS-EC сгруппировалась с последовательностями из фагов аэромонад сильнее, чем последовательность из вибриофага, которая расположилась отдельно, определяя корень данного дерева.

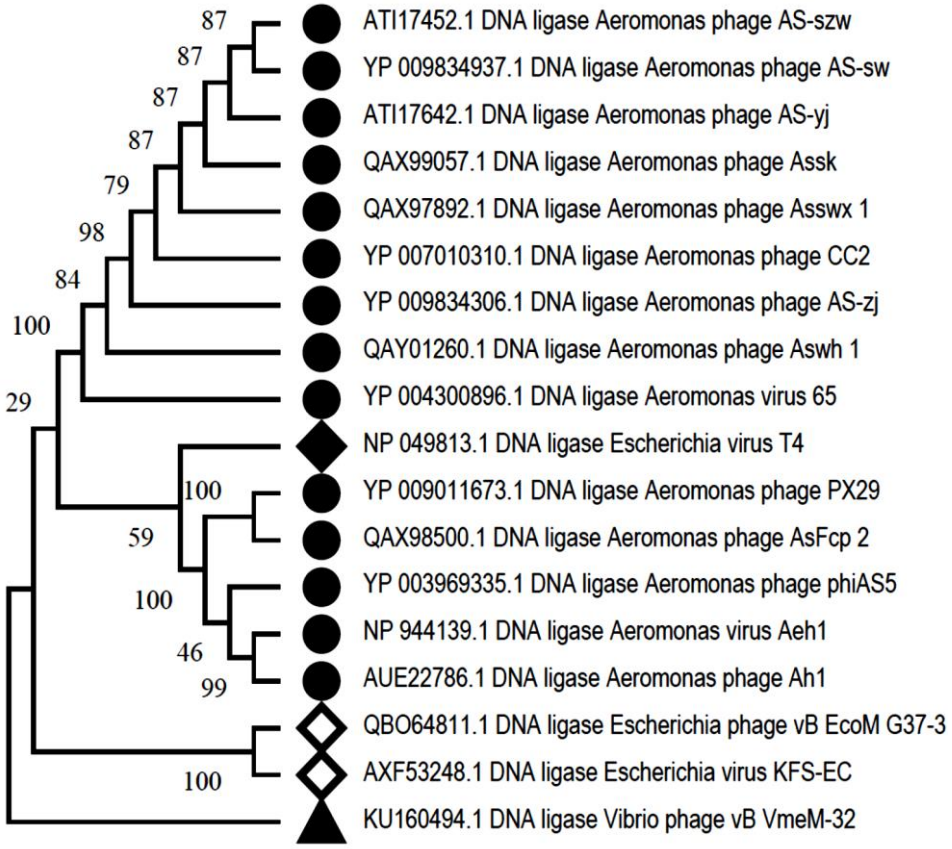

Рис. 2 – Филогенетическое дерево эволюционного сходства аминокислотных последовательностей активного центра ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад и контрольных последовательностей вирусов *E. coli* близкородственных Т4, а также последовательности ДНК-лигазы вибриофага vB VmeM-32, полученное методом UPGMA [6]. Обозначения такие же, как на Рис.1. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 2,77253350. Остальные параметры работы программы были аналогичные предыдущему исследованию. В окончательном наборе данных было всего 57 позиций. Эволюционный анализ проводился в MEGA X [9].

Результаты статистического исследования полученных деревьев также сильно различались. В окончательном наборе данных было 432 позиции в первом случае, а во втором было всего 57 позиций. Процент разветвления ветвей, в которых родственные белки сгруппированы вместе, оказался во втором анализе более высоким, но более низким для корня разделения фагов аэромонад на две группы. В первую очередь эти проценты (частоты) в ряде случаев были ниже внутри групп. Хотя можно и пренебречь этими статистическими результатами, ес-

ли решать вопрос только об отнесении какого-либо нового фага к одной из двух данных выявленных в этом исследовании таксономический групп.

С наименьшей вероятностью определено распределение по отдельным ветвям последовательностей из Aeromonas phage AS-szw, Aeromonas phage AS-sw, Aeromonas phage AS-yj, Aeromonas phage Assk и Aeromonas phage AS-zj – 87%. Но вероятность отделения этих фагов от других фагов этой же группы уже имеет более высокий процент. Следовательно, этот анализ не позволяет изучить эволюционную историю аминокислотных последовательностей ряда фагов аэромонад внутри групп, что не существенно для задачи первичной таксономии новых фагов аэромонад. Этот анализ позволяет достоверно идентифицировать фаги аэромонад и распределить на обнаруженные в предыдущем исследовании две группы. Данный анализ подтвердил дивергенцию фагов аэромонад на две родственные группы, два «подрода». Скорее всего для выбора праймеров для ПЦР в этом случае придется задействовать последовательности, кодирующие и другие домены данных белков. На это указывает попадание последовательности активного центра ДНК-лигазы фага Т4 в ветвь группы фага Aeromonas virus Aeh1 в данном анализе.

Мы предприняли аналогичные анализы методом UPGMA последовательностей структурных генов и центральных последовательностей структурных генов, кодирующих активные центры исследуемых ДНК-лигаз. Полученные в результате анализа деревья сходств этих нуклеотидных последовательностей представлены на рисунках 3 и 4.

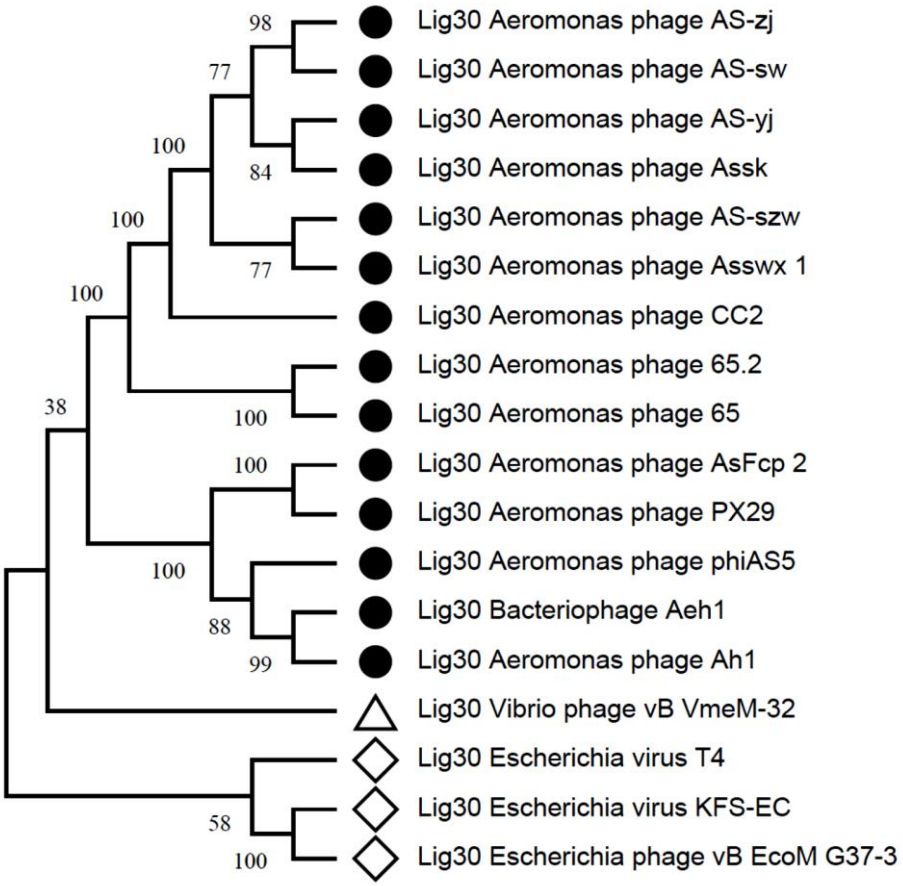

Рис. 3 – Филогенетическое дерево эволюционного сходства структурных генов ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад и контрольных последовательностей вирусов *E. coli* близкородственных фагу Т4, а также последовательности гена ДНК-лигазы виб-

риофага vB VmeM-32, полученное методом UPGMA [6]. Бактериофаги аэромонад обозначены кружками, фаги кишечной палочки – ромбами, вибриофаг – треугольником. На рисунке показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 3.83296688. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показан рядом с ветвями [7]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального совокупного правдоподобия и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Этот анализ включал 18 нуклеотидных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были удалены (вариант полного удаления). В окончательном наборе данных было всего 1125 позиций. Эволюционный анализ проводился в MEGA X [9].

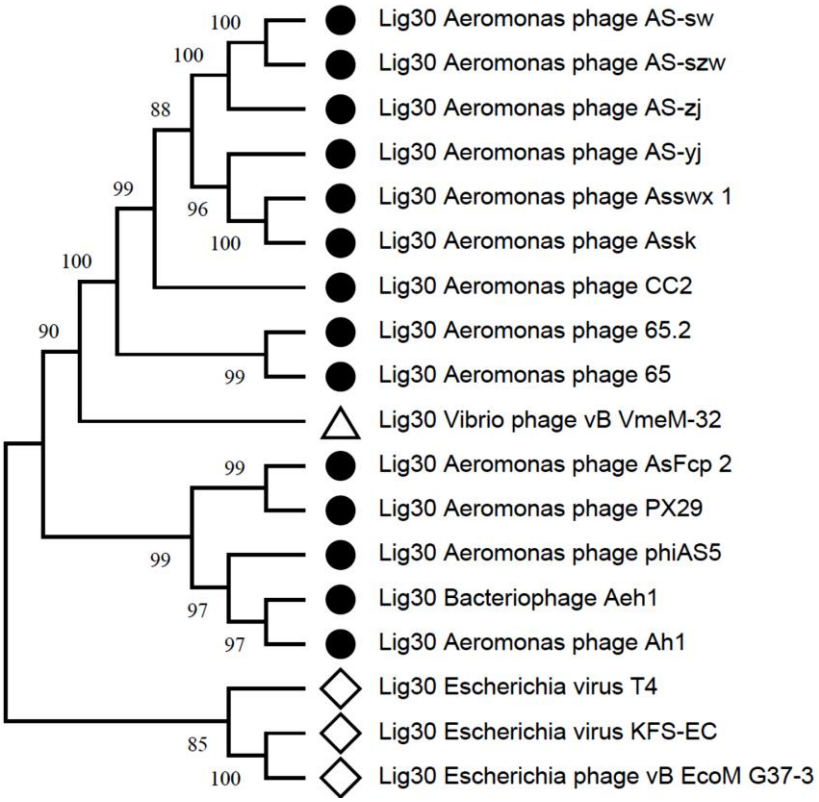

Рис. 4 – Филогенетическое дерево эволюционного сходства структурных генов ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад и контрольных последовательностей бактериофагов *E. coli* близкородственных фагу T4, а также последовательности гена ДНК-лигазы вибриофага vB VmeM-32, полученное методом UPGMA [6]. Обозначения такие же, как на Рис.3. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 2,46982507. Процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показан рядом с ветвями [7]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального совокупного правдоподобия и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Этот анализ включал 18 нуклеотидных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были удалены (вариант полного удаления). В окончательном наборе данных было всего 440 позиций. Эволюционный анализ проводился в MEGA X [9].

На обоих деревьях, отражающих сходства и различия нуклеотидных последовательностей генов ДНК-лигаз и их центральных частей, контрольные бакте-

риофаги кишечной палочки распределяются в отдельную достаточно удаленную ветвь. Это говорит о возможности получения праймеров для ПЦР, с помощью которых можно идентифицировать только фаги аэромонад, отделяя их от других фагов подсемейства. Как и при анализе белковых последовательностей происходит разделение бактериофагов аэромонад на две отдельные группы.

Выводы. 1. С помощью анализа методом UPGMA аминокислотных последовательностей ДНК-лигаз бактериофагов аэромонад, частей этих аминокислотных последовательностей, составляющих активный центр данных ферментов, анализа аналогичным методом генов этих ферментов и нуклеотидных последовательностей, кодирующих активные центры данных ферментов, было показана возможность использования данного маркера для идентификации исследуемых фагов и их ближайших родственников.

2. Было показано, что по последовательностям данного генетического маркера возможно разделение новых выделенных в целях фаговой терапии рыбы бактериофагов аэромонад на две хорошо разделенные по данному маркеру систематические группы.

Исследование было частично поддержано грантом РФФИ №20-54-53018 ГФЕН_а, для Зимина А.А. и Никулина выполнено ими в рамках этого проекта.

Список литературы

1. Зимин А.А. Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве / Зимин А.А., Кочетков Ф.В., Кононенко С.И., Осепчук Д.В., Скобликов Н.Э. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 123. С. 421-432. DOI: 10.21515/1990-4665-123-029.

2. Никулин Н.А. Конструирование терепевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа: преимущеситва и недостатки. / Никулин Н.А., Кононенко С.И., Кощаев А.Г., Зимин А.А. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 133. С. 823-849. Doi: 10.21515/1990-4665-133-063.

3. Скобликов Н.Э. Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов E.coli для противоколибактериозных препаратов / Скобликов Н.Э., Кононенко С.И., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 122. С. 554-566. Doi: 10.21515/1990-4665-122-040.

4. Tanyashin, V.I. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages / Tanyashin, V.I., Zimin, A.A., Shlyapnikov, M.G., A. M. Boronin. // Russian Journal of Genetics 2003. 39. 761-772. https://doi.org/10.1023/A:1024748903232.

5. Калиман А.В. Сравнительное изучение генов ДНК-лигаз бактериофагов Т4 и Т6 / Калиман А.В., Зимин А.А., Назипова Н.Н., Крюков В.М., Таняшин В.И., Краев А.С., Миронова М.В., Скрябин К.Г., Баев А.А. // Доклады Академии наук СССР. 1988. Т. 299. № 3. С. 737-742. eLIBRARY ID: 21212463.

6. Sneath P.H.A. and Sokal R.R. Numerical Taxonomy. 1973. Freeman, San Francisco.

7. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / Felsenstein J. // Evolution 1985. 39:783-791.

8. Jones D.T. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences / D.T. Jones, W.R. Taylor, J.M. Thornton // Computer Applications in the Biosciences 1992. 8; 275-282.

9. Kumar S. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // Molecular Biology and Evolution 2018. 35:1547-1549.