

[DOI: 10.34617/tyd5-z704](https://doi.org/10.34617/tyd5-z704)

УДК 639.4:578.232

**НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ
АНЕМИИ КУР ИМЕЕТ СХОДСТВО С БЕЛКАМИ ФАГОВ
СЕМЕЙСТВА *MICROVIRIDAE*
THE NON-STRUCTURAL PROTEIN OF THE INFECTIOUS
ANEMIA VIRUS VIRUS IS SIMILAR TO THE PROTEINS OF
PHAGES OF THE FAMILY OF *MICROVIRIDAE***

Зимин Андрей Антонович¹, канд. биол. наук

Скобляков Николай Эдуардович², канд. мед. наук

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФГБНУ
«Пушкинский научный центр биологических исследований»
РАН, г. Пушкино, Российская Федерация

²ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии
и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация

Zimin Andrey Antonovich¹, PhD. Biol.

¹G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of
Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Russian
Federation, Pushchino

Skoblikov Nikolay Edvardovich², PhD. Med.

²Krasnodar Scientific Center for Animal Husbandry
and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation

Аннотация: в данном эволюционном исследовании про-
веден поиск гомологов неструктурного белка вируса SAV, на
следующем этапе построено филогенетическое дерево гомоло-
гов этого белка у бактериофагов семейства *Microviridae*. Пока-
зано, что белок SAV находится в центре дерева его гомологов из
вирусов бактерий, что указывает на возможность ложноположи-
тельных ответов при иммуноферментном обнаружении вируса
за счет взаимодействия антител к вирусу с белками фагов-
микровирусов.

Ключевые слова: неструктурный белок вируса SAV; фи-
логенетическое дерево гомологов; бактериофаги семейства *Mi-*

croviridae; ложноположительный ответ ИФА; белки фагов-микровирусов.

Abstract: in this evolutionary study, a search was made for the homologs of the non-structural protein of the CAV virus; at the next stage, a phylogenetic tree of the homologs of this protein was constructed in bacteriophages of the *Microviridae* family. It has been shown that the CAV protein is located in the center of the tree of its homologs from the bacterial virus, which indicates the possibility of false-positive responses during enzyme-linked immunosorbent assay of the virus due to the interaction of antibodies to the virus with proteins of *Microviridae* phages.

Key words: non-structural protein of the CAV virus; phylogenetic tree of homologs; bacteriophages of the *Microviridae* family; false-positive ELISA; phage-microvirus proteins.

Введение. Одной из наиболее интересных и интригующих задач биологии является расшифровка происхождения и эволюции вирусов. Вирусы – это корпускулярная форма жизни, которая в отличие от клеточной формы жизни может быть весьма примитивной. Вероятно, самыми примитивными вирусами в свою очередь являются представители семейства *Circoviridae*, имеющие геном длиной около 2000 нуклеотидов, кодирующий два – три белка. В тоже время эти вирусы являются значимыми патогенами в сельском хозяйстве, вызывая цирковирусную инфекцию свиней (вирус PCV-2 – postweaning multisystemic wasting syndrome) и вирусную анемию (грипп) у цыплят (вирус - CAV – Chicken anemia virus).

Вирус CAV относится к роду *Gyrovirus* семейства *Circoviridae*. Он является этиологическим агентом инфекционной анемии кур. CAV инфицирует клетки костного мозга, что приводит к тяжелой анемии и иммуносупрессии у молодых цыплят или тяжелой коррекции иммунного ответа у половозрелых птиц. Исследования по молекулярной эпидемиологии CAV у больных кур проводятся довольно широко во всем мире. Например, в Китае с 2014 по 2015 годы было обнаружено, что CAV-положительный ответ составил 13,30 %. В этой же стране в те годы было выделено 15 новых штаммов CAV. Самые различные методы используются для анализа заболевшей птицы: это

непрямой иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг и ПЦР. Филогенетический анализ полученных последовательностей, доступных в GenBank, позволил разделить штаммы CAV на четыре различные группы (A – D) [1]. Для создания филогенетических деревьев обычно используются предсказанные последовательности вирусного белка (VP) [1]. Альтернативное использование неструктурного белка тоже может дать весьма интересные результаты. Но в обоих случаях возникает вопрос – не могут ли белки других вирусов или даже бактериофагов дать ложноположительные ответы.

Цель исследования. В царстве вирусов обнаруживают сходства структуры белков у весьма удаленных представителей корпускулярной формы жизни. В этой работе мы поставили задачу поиска в базах данных последовательностей белков бактериофагов гомологов и сходных последовательностей с неструктурным белком вируса куриной анемии – CAV и задачу последующего филогенетического анализа полученных хитов.

Методика. Методы биоинформатики, использованные в работе, и тактика анализа. С помощью алгоритма BLASTp [2] проводили сравнение аминокислотной последовательности неструктурного белка вируса кур CAV с базой данных белковых последовательностей Genbank на сервере NCBI [3].

Использовали разделы БД Genbank, таксиды, включающие фаги, имеющие отростки и микровириды, по отдельности.

Нами было введено ограничение на уровень достоверности результатов - E-value < 7.

Найденные последовательности использовали для последующего филогенетического исследования. Последовательности сохраняли в виде текстового файла, содержащего полные аминокислотные последовательности белков-аналогов.

Был осуществлен филогенетический анализ гомологов белка нуклеокапсида денсовируса SSaDV.

Для этого предварительно были проведены выравнивания последовательностей с помощью программы Muskel [4], филогенетическое дерево строилось с помощью пакета программ MegaB [4]. Длина неструктурного белка нуклеокапсида гировируса CAV 222 аминокислотных остатка.

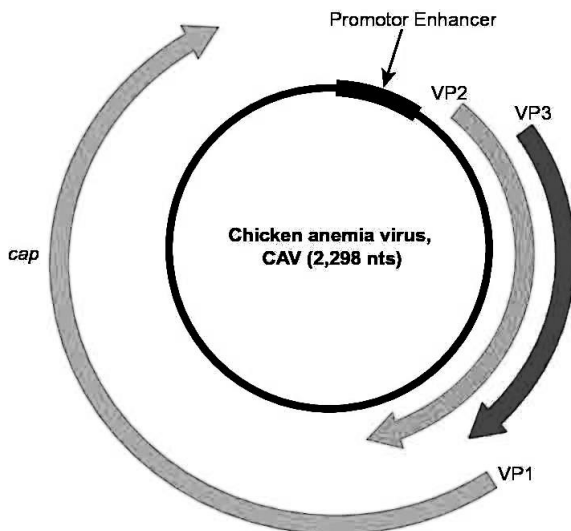


Рис. 1 – Карта генома вируса CAV. Стрелками обозначены рамки трансляции вируса, кодирующие его белки: VP1, VP2, VP3. (Модифицировано из [1]).

Результаты исследований и их обсуждение. Поиск гомологов неструктурного белка вируса CAV среди последовательностей белков фагов семейства *Microviridae*.

Программным средством BLASTr было найдено 10 гомологов NSP CAV при значении статистической характеристики $E < 7$.

Остальные параметры сравнения были следующие: длина слова (Word size) – 6, матрица синонимических замен – BLOSUM80, штраф на открытие бреши – 11, на расширение – 1, фильтры и маски не использовались. Использовался таксид (подБД) – микровирусы.

Для того чтобы понять основы сходства NSP CAV в эволюции денсовирусов беспозвоночных мы предприняли филогенетический анализ.

Филогенетическое исследование гомологов неструктурного белка вируса CAV и его гомологов из семества фагов *Microviridae*.

Эволюционная история была выведена и филогенетическое дерево было построено с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), основанного на матричной модели JTT [5]. Статистический бутстрап-анализ проведен путем 1000 итераций [6].

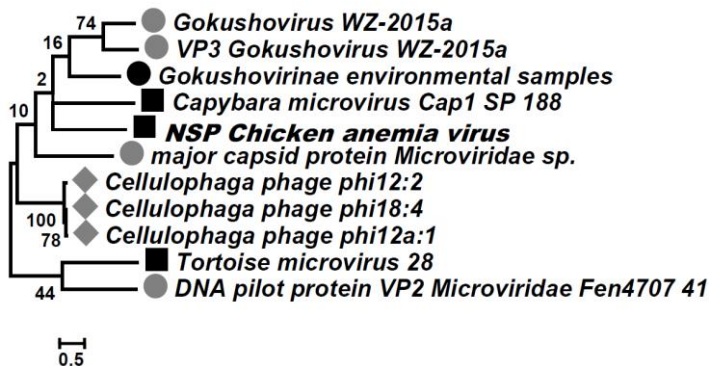


Рис. 2 – Молекулярно-филогенетический анализ гомологов структурного белка гировируса из семейства фагов Microviridae максимального правдоподобия (Maximum Likelihood).

На рисунке 2 показано дерево с самым высоким логарифмическим правдоподобием (-11578,0225). Ветви, в которые связанные таксоны сгруппированы вместе, статистически оценены в процентах устойчивости при бутстрап-анализе. Процент показан рядом с ветвями. Исходное дерево для эвристического поиска были получено автоматически с использованием метода Maximum Parsimony. Дерево построено в масштабе, при котором длина ветвей измеряется числом замен на сайт.

В анализе были использованы 11 аминокислотных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и делеции, были исключены. В итоговом наборе данных было 64 позиций. Эволюционный анализ был проведен в MEGA6 [9]. Аминокислотная последовательность неструктурного белка гировируса кур отмечена черным квадратом и выделена шрифтом ArialBold, микровирусы бактерии *Cellulophaga algicola* – серыми ромбами, последовательности из фагов, ассоциированных с позвоночными

животными: капибарой и черепахой – черными квадратами, остальные аминокислотные последовательности микровирусов – серыми кружками.

Выводы. Последовательность белка из вируса СAV находится среди радиации последовательностей гомологов из микровирид. Это указывает на реальную возможность узнавания белков бактериофагов семейства *Microviridae* антителами, полученными против белка вируса, вызывающего анемию и коррекцию иммунной системы цыплят.

Работа была поддержана для Скобликова Н.Э. проектом РФФИ 19-44-230040 p_a.

Список литературы

1. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The 9th Report of the ICTV (2011) https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ Дата обращения 11.09.2019
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
3. Сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Дата обращения 09_09_2019.
4. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. and Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
5. Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. // Computer Appl. in the Biosciences. 1992. V. 8. P. 275–282.
6. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.