ный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – № 161 (07). – С. 150–160.

3. Скобликов Н. Э. Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов E.coli для противоколибактериозных препаратов / Н. Э. Скобликов, С. И. Кононенко, Д. В. Осепчук, [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – 2016. – № 08(122). – С. 554–566.

4. Kiryanova O.Yu., Kiselev S.S., Panyukov V.V., Nikulin N.A., Nazipova N.N., Chemeris A.V., Zimin A.A. Using Multiplex Virtual PCR for Genetic Barcoding of Tequatrovirus Bacteriophages. – Mathematical biology and bioinformatics. – 2024. – Vol. 19. – pp. t1–t21. – doi: 10.17537/2024.19.t1

5. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – pp. 1547–1549.

6. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., Schäffer A.A. Database indexing for production MegaBLAST searches. // Bioinformatics. – 2008. – Vol. 24. – pp. 1757–1764.

7. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Shlyapnikov M. G., Boronin A. M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with Pseudo-T-Even Bacteriophages // Russian Journal of Genetics. – 2003. – Vol. 39. – No. 7. – pp. 761–772.

8. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Boronin A. M. The Cotransduction of pET System Plasmids by Mutants of T4 and RB43 Bacteriophages // Microbiology. – 2003. – Vol. 72. – No. 6. – pp. 694–700.

DOI: 10.48612/sbornik-2025-1-55
УДК 574.24 579.262:578.4:636.4

НЕТРАНСДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИОФАГИ PU-KRD-SF1, PU-KRD-SF2, PU-KRD-SF3, PU-KRD-SF4, PU-KRD-SF5, PU-KRD-SF6 AND PU-KRD-SF7 ОТ СВИНЕЙ СОДЕРЖАТ ПОВТОР PKD-ДОМЕНОВ В СОСТАВЕ ИХ ПОВЕРХНОСТНОГО КАПСИДНОГО БЕЛКА, ХАРАКТЕРНЫЙ ДЛЯ БАКТЕРИОФАГОВ RB27 И RB30

Зимин Андрей Антонович[1], канд. биол. наук
Микулинская Галина Викторовна[2], канд. биол. наук
Кудрявцева Анна Викторовна[3], д-р биол. наук
Назипова Нафиса Наиловна[4], канд. физ.-мат. наук
Делеган Янина Адальбертовна[1], канд. биол. наук
Летарова Мария Анатольевна[5], канд. биол. наук
Летаров Андрей Викторович[5], д-р биол. наук
Сузина Наталья Егоровна[1], канд. биол. наук
Скобликов Николай Эдуардович[6], канд. мед. наук
Осепчук Денис Васильевич[6,7], 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», г. Пущино, Российская Федераци
[2]Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Российская Федерация
[3]Институт молекулярной биологии им. М.А.Энгельгардта РАН, г. Москва, Российская Федерация
[4]Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. Келдыша РАН, г. Пущино, Российская Федерация
[5]Институт микробиологии им. Виноградского Н.И. РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского Центра «Биотехнология» РАН, г. Москва, Российская Федерация
[6]ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснода, Российская Федерация
[7]ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»,

г. Краснодар, Российская Федерация

Из фекалий свиней опытного хозяйства «Рассвет» КНЦЗВ (СКНИИЖ) в 2011–2012 годы был проведен отбор проб и в ИБФМ РАН были выделены бактериофаги. При исследовании аннотации геномов бактериофагов Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2, Pu-Krd-SF3, Pu-Krd-SF4, Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 и Pu-Krd-SF7 было обнаружено, что их ген *hoc* кодирует белок длиной 472 аминокислоты. Такой длины белок Hoc характерен для бактериофагов RB30, RB27 и близкородственных им фагов рода *Tequtrovirus*. Сравнение этого белка с БД аминокислотных последовательностей GenBank NCBI подтвердило наше предположение. Было показано, что Hoc-белки этих семи бактериофагов содержат повтор PKD-домена, как и у RB27 и RB30. Возможно, последующие геномные исследования позволят их отнести к группе RB27-подобных фагов внутри рода *Tequtrovirus* семейства *Straboviridae*.

Ключевые слова: нетрансдуцирующие бактериофаги рода *Tequtrovirus*, ген *hoc;* бактериофаги RB30 и RB27; PKD-домены

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 24-64-00017, https://rscf.ru/project/24-64-00017/

NON-TRANSDUCTING BACTERIOPHAGES PU-KRD-SF1, PU-KRD-SF2, PU-KRD-SF3, PU-KRD-SF4, PU-KRD-SF5, PU-KRD-SF6 AND PU-KRD-SF7 FROM PIGS CONTAIN A REPEAT OF PKD-DOMAINS IN THEIR SURFACE CAPSID PROTEIN, CHARACTERISTIC OF BACTERIOPHAGES RB27 AND RB30

Zimin Andrei Antonovich[1], PhD Biol. Sci.
Mikoulinskaya Galina Victorovna[2], PhD Biol. Sci
Kudryavtseva Anna Viktorovna[3], Dr. Biol. Sci
Nazipova Nafisa Nailovna[4], PhD Mat. Sci
Delegan Yanina Adalbertovna[1], PhD Biol. Sci
Letarova Mariya Anatol'evna[5], PhD Biol. Sci
Letarov Andrey Viktorovitch[5], Dr. Biol. Sci
Suzina Nataliya Egorovna[1], PhD Biol. Sci
Skoblikow Nikolai Edwardovitch[6], PhD Med. Sci
Osepchuk Denis Vasilyevich[6,7], Dr. Agr. Sci.
[1]G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences – a separate division of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation
[2]Branch of the M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[3]M. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[4]Institute of Mathematical Problems of Biology, Keldysh Institute of Applied Mathematics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation
[5]N. I. Vinogradsky Institute of Microbiology RAS – a separate division of the Federal Research Center "Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[6]Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation [7]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin", Krasnodar, Russian Federation

Samples were collected from pig feces of the experimental farm «Rassvet» of KRCAHVM (SKNIIZH) in 2011–2012, and bacteriophages were isolated at the IBFM RAS. When studying the annotation of the genomes of bacteriophages Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2, Pu-Krd-SF3, Pu-Krd-SF4, Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 and Pu-Krd-SF7, it was found that their *hoc* gene encodes a protein of 472 amino acids in length. This length of the Hoc protein is characteristic of bacteriophages RB30, RB27 and closely related phages of the genus *Tequtrovirus*. Comparison of this protein with the GenBank NCBI amino

acid sequence database confirmed our assumption. These seven bacteriophages were shown to have a repeat of the PKD domain in the Hoc protein, similar to RB27 and RB30. Possibly, subsequent genomic studies will allow to classify them as RB27-like phages within the *Tequtrovirus* genus of the *Straboviridae* family.

Key words: non-transducing bacteriophages of the genus Tequtrovirus, hoc gene of bacteriophages RB30 and RB27, PKD domains

The work was supported by the Russian Science Foundation, project no. №24-64-00017, https://rscf.ru/project/24-64-00017/

Частица бактериофага Т4 состоит из вытянутого капсида или головки длиной 120нм и шириной 86 нм и сокращающегося отростка хвоста длиной 120 нм [3]. Капсид содержит двухцепочечную геномную ДНК длиной ~171 т.п.н. Оболочка головки состоит из белка, продукта гена 23, который организован в гексагональную решетку. Капсид содержит 155 гексамерных капсомеров gp23. В центре гексамера располагается белок Hoc, а края гексамеров соприкасаются с триммерами белка Soc [3]. Капсид бактериофага декорирован этими двумя белками. Название Hoc–белка – это аббревиатура от английского Highly antigenic Outer Capsid protein (высокоантигенный белок капсида) и название Soc от английского Small Outer Capsid protein [4]. При иммунизации мышей частицами бактериофага Т4 до 90% антител образуются к белку Hoc [4]. Поэтому его можно назвать основным антигеном этих фагов. Расположение этих декорирующих белков на поверхности капсида предопределило конструирование ряда систем дисплея белков и пептидов на частицах фага Т4, в том числе, экспонирования антигенов вирусов и бактерий. На этой основе были созданы искусственные вакцинные конструкции, несущие на своей поверхности антигены *N. meningitis* и другие актуальные бактериальные антигены [5]. Поиск и исследование новых подобных белков, потенциально способных к обеспечению белкового дисплея, выглядит очень перспективным направлением получения искусственных вакцин.

Основной антиген капсида бактериофагов RB30 и RB27 отличается от гомолога у Т4 наличием дупликации так называемого второго иммуноглобулинподобного домена [6]. Этот домен называется PKD-доменом. Схематично эта дупликация представлена на рисунке 1, она приводит к увеличению размера этого белка. Если у Т4 длина этого белка 376 аминокислот, то у RB30 и RB27 – 472 аминокислоты.

При аннотировании геномов бактериофагов Pu-Krd-SF-1, Pu-Krd-SF-2, Pu-Krd-SF-3, Pu-Krd-SF-4, Pu-Krd-SF-5 Pu-Krd-SF-6, Pu-Krd-SF-7 было обнаружено, что длина белков Hoc у них 472 аминокислоты. Hoc-белок отвечает за взаимодействие с гликозидами биотопа фага, например, с муцином кишечника животных [5, 7].

Этот белок как антиген и его ген могут служить маркерами для идентификации нетрансдуцирующих бактериофагов рода *Tequtrovirus* семейства *Straboviridae*. Более того присущий фагам RB30 и RB27 вариант гена hoc может быть использован как генетический маркер внутри рода *Tequtrovirus*.

Методика исследований. Анализировались аминокислотные последовательности белков Hoc, основных антигенов бактериофагов RB30, RB27, Pu-Krd-SF-1, Pu-Krd-SF-2, Pu-Krd-SF-3, Pu-Krd-SF-4, Pu-Krd-SF-5 Pu-Krd-SF-6, Pu-Krd-SF-7 из базы данных (БД) генетических последовательностей Genbank NCBI. Использовались методы сравнительного анализа аминокислотных последовательностей с различными БД Genbank NCBI: BLASPp, итерационный PSI-BLAST и доменориентированный DELTA-BLAST [8], пакет программ MegaX [9].

Результаты исследований и их обсуждение. Из фекалий свиней опытного хозяйства «Рассвет» КНЦЗВ (СКНИИЖ) в 2011–2012 годы был проведен отбор проб и в ИБФМ РАН были выделены бактериофаги [1, 2]. Фаги были очищены микробиологически с помощью 5 последовательных выращиваний из отдельной бляшки, затем выращены препаративно и переданы для секвенирования в ИМБ РАН. Для каждого из этих бактериофагов удалось получить при сборке контиги длиной, характерной для бактериофагов рода *Tequtrovirus*. При исследовании аннотации геномов бактериофагов Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2, Pu-Krd-SF3, Pu-Krd-SF4, Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 и

Pu-Krd-SF7 было обнаружено, что все они имеют ген *hoc*, который кодирует белок длиной 472 аминокислоты. Такой длины белок Нос характерен для бактериофагов RB30, RB27 и близкородственных им. Сравнение этого белка с помощью программного средства BLASTp с БД аминокислотных последовательностей GenBank NCBI подтвердило наше предположение. Было показано, что Нос-белок этих семи бактериофагов содержит повтор PKD-домена, как и у RB27 и RB30 (рисунок 1).

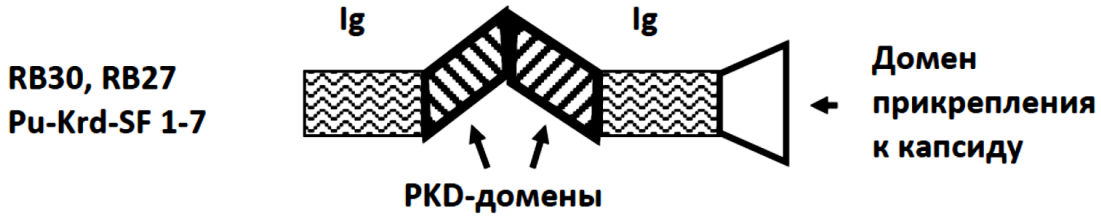

Рисунок 1 – Схематичное представление дупликации PKD-домена в аминокислотной последовательности белка Нос бактериофагов RB30, RB27, Pu-Krd-SF-1, Pu-Krd-SF-2, Pu-Krd-SF-3, Pu-Krd-SF-4, Pu-Krd-SF-5 Pu-Krd-SF-6, Pu-Krd-SF-7

Возможно, последующие геномные исследования позволят их отнести к группе RB27- подобных фагов внутри рода *Tequtrovirus* семейства *Straboviridae*. На основе полученного BLASTp списка сходных последовательностей была сделана выборка из 39 белков, близких Нос-белкам фагов группы PU-KRD-SF. С использованием этой выборки аминокислотных последовательностей были проведены эволюционные анализы с помощью алгоритмов Maximal Parsimony (максимальной экономии) и Minimal Evolution (минимальной эволюции). Построенные на основе этих анализов филогенетические деревья приведены на рисунках 2 и 3. В обоих случаях была получена сходная топология расположения ветвей с белками Нос бактериофагов Pu-Krd-SF. При этом белки Pu-Krd-SF3 и Pu-Krd-SF4 располагались на отдельной ветви немного удаленной от остальных гомологов у фагов этой группы. Белки Нос остальных пяти фагов образовывали в обоих анализах общую ветвь, которая разделялась на ветвь белков фагов Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2 и ветвь белков фагов Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 и Pu-Krd-SF7. Сходная топология расположения была обнаружена при эволюционном анализе и их геномов (приводится в другой статей этого же номера данного издания). Полученные данные эволюционного анализа говорят о большом сходстве белков Нос всей этой группы фагов, выделенных одновременно от одной группы поросят в разное время их 2-месячного выращивания.

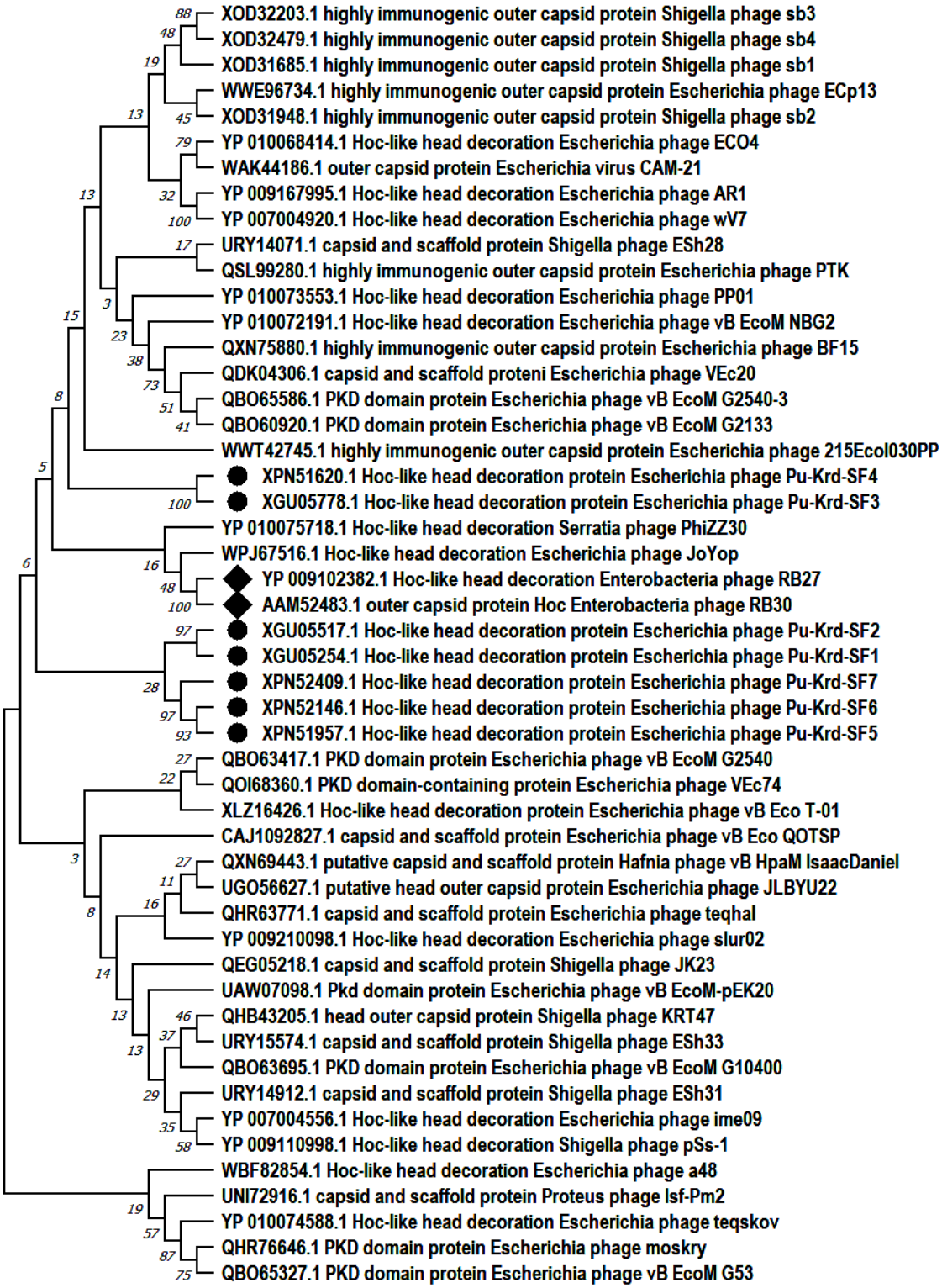

Рисунок 2 – Эволюционный анализ с помощью алгоритма Maximal Parsimony аминокислотных последовательностей 46 Hoc-белков бактериофагов группы Pu-Krd-SF с их гомологами. Hoc фагов Pu-Krd-SF обозначены кружками, фагов RB27 и RB30 – ромбами. Консенсусное дерево бутстрепа, было выведенное из 500 повторов. Ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50% повторов бутстрепа, были свернуты. Дерево MP было получено с использованием алгоритма Subtree-Pruning-Regrafting

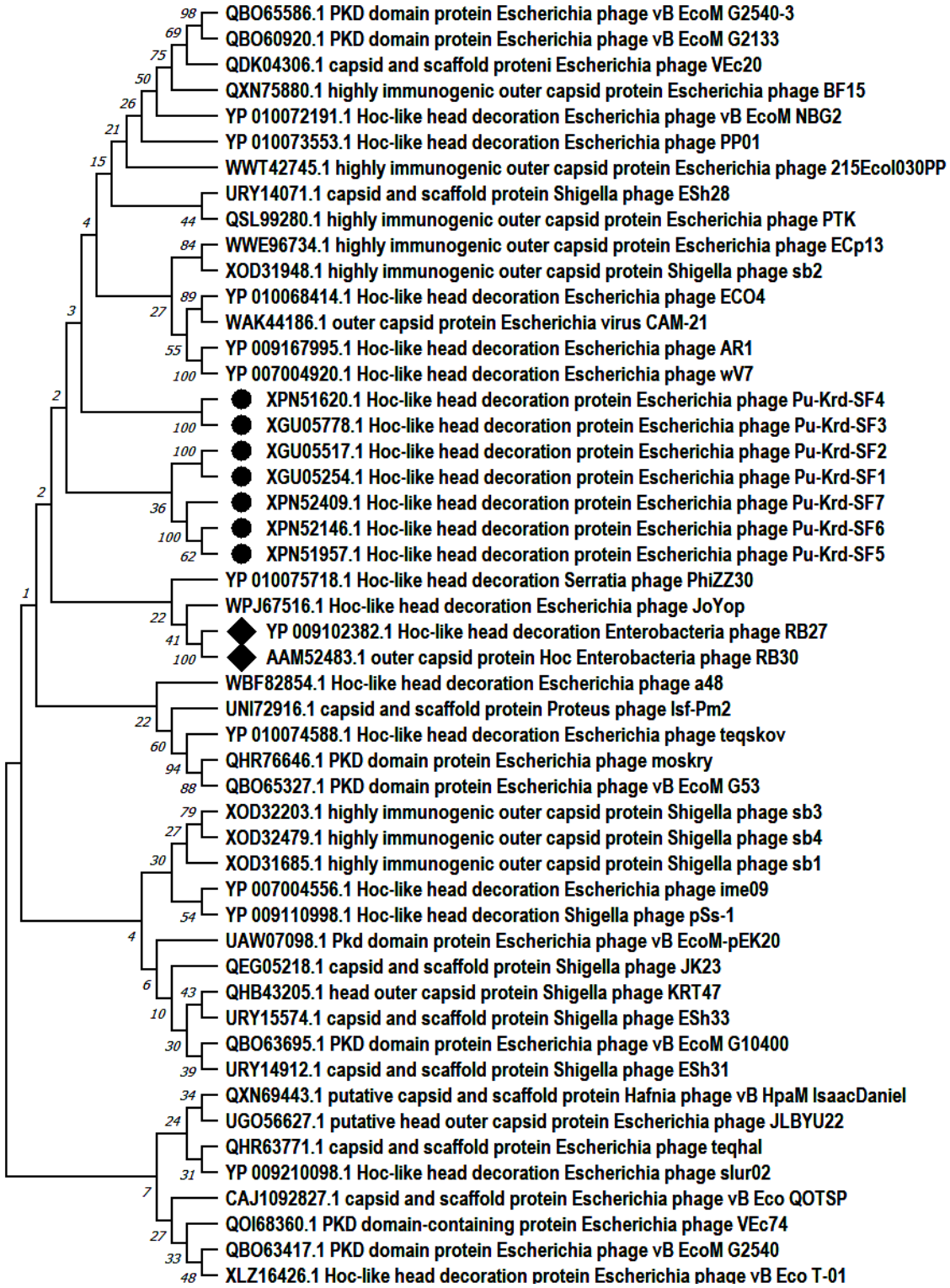

Рисунок 3 – Эволюционный анализ с помощью алгоритма Minimal Evolution аминокислотных последовательностей 46 Hoc-белков бактериофагов группы Pu-Krd-SF с их гомологами Hoc фагов группы Pu-Krd-SF обозначены кружками, фагов RB27 и RB30 – ромбами. Ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50% повторов бутстрепа, свернуты. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода на основе матрицы JTT и выражены в единицах числа аминокислотных замен на сайт. Дерево ME было найдено с использованием алгоритма Close-Neighbor-Interchange (CNI) на уровне поиска 1. Алгоритм Neighbor-joining использовался для генерации начального дерева

Выводы. При исследовании аннотации геномов бактериофагов Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2, Pu-Krd-SF3, Pu-Krd-SF4, Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 и Pu-Krd-SF7 было обнаружено, что их ген hoc кодирует белок длиной 472 аминокислоты. Такой длины белок Hoc характерен для бактериофагов RB30, RB27 и близкородственных им фагов из рода *Tequtrovirus* семейства *Straboviridae*.

С помощью эволюционных анализов в пакете программ MEGA X было показано, что Hoc белки Krd-SF3 и Pu-Krd-SF4 располагались на отдельной ветви, немного удаленной от остальных. Белки Hoc остальных пяти фагов образовывали в обоих анализах общую ветвь, которая разделялась на ветвь белков фагов Pu-Krd-SF1, Pu-Krd-SF2 и ветвь белков фагов Pu-Krd-SF5, Pu-Krd-SF6 и Pu-Krd-SF7.

Список литературы

1. Скобликов Н. Э. Подробная динамика титра колифагов кишечной микрофлоры цыплят-бройлеров / Н. Э. Скобликов, Д. В. Осепчук, Е. А. Москаленко [и др.] // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2019. – Т. 8. – № 2. – стр. 222–225.

2. Скобликов Н. Э. Выделение и отбор нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* для противоколибактериозных препаратов / Н. Э. Скобликов, С. И. Кононенко, Д. В. Осепчук [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 08(122). – С. 554–566.

3. Fokine A., Islam M.Z., Fang Q., Chen Z., Sun L., Rao V.B. Structure and Function of Hoc-A Novel Environment Sensing Device Encoded by T4 and Other Bacteriophages // Viruses. – 2023. – Vol. 15.– pp. 1517.

4. Ishii T., Yanagida M. The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro // J. Mol. Biol. – 1977. – Vol. 109. – pp. 487–514.

5. Gamkrelidze M., Dąbrowska K. T4 bacteriophage as a phage display platform // Arch. Microbiol. – 2014. – Vol. 196. – pp. 473–479.

6. Zimin A.A., Mikoulinskaia G.V., Nigmatullina L.F., Nazipova N.N. Comparative Analysis of Individual Domains of Hoc Proteins in Subfamily Teequatrovirinae Bacteriophages // Mathematical biology and bioinformatics. – 2018. – Vol. 13. – pp. t39–t58.

7. Barr J.J., Auro R., Furlan M., Whiteson K.L., Erb M.L., Pogliano J., Stotland A., Wolkowicz R., Cutting A.S., Doran K.S., Salamon P., Youle M., Rohwer F. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – Vol. 110. – pp. 10771–10776.

8. 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 // Nucleic Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – pp. 3389–3402.

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