

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ФКУЗ РосНИПЧИ
«Микроб» Роспотребнадзора

**АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
РИБОСОМАЛЬНЫХ ГЕНОВ ПРОСТЕЙШИХ
ИЗ ПОЧВ ГОРНОГО АЛТАЯ**

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студентки 5 курса 531 группы
Специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика
Биологического факультета
Макашовой Марины Александровны

Научный руководитель
Зав. кафедрой биохимии и биофизики
д.б.н., профессор


подпись, дата
20.05.2018

С.А. Коннова

Научный консультант
с.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», к. б. н.


подпись, дата

Е.Г. Оглодин

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
д.б.н., профессор

19.05.2018


подпись, дата

С.А. Коннова

20.05.2018

Саратов, 2018

Введение. Простейшие (Protozoa) являются неотъемлемой частью почвенных биоценозов, в которых они выполняют разнообразные функции. Одной из наиболее практически значимых считается роль данных микроорганизмов в качестве природных резервуаров бактерий – возбудителей инфекционных болезней человека. Недавно высказано предположение о том, что возбудитель чумы *Yersinia pestis* способен сохраняться в природных биоценозах очагов чумы, вступая во взаимодействие с почвенными амебами. Это подтверждается рядом исследований по совместному культивированию штаммов простейших и чумного микроба.

В связи с этим, актуальной проблемой является изучение видового разнообразия доминирующих представителей простейших в природных очагах чумы. Это позволит охарактеризовать состав почвенного биоценоза в очагах и изучить некоторые стороны экологии и механизмы персистенции *Y. pestis*.

До настоящего момента было проведено только одно исследование в этом направлении. В нем охарактеризован видовой состав простейших из почв очагов чумы Прикаспия. В нашей работе проведена идентификация штаммов почвенных амеб, выделенных из разных участков Горно-Алтайского высокогорного очага чумы с выраженной эпизоотической активностью. Для анализа систематической принадлежности амеб использовались нуклеотидные последовательности рибосомальных генов.

Таким образом, целью этой работы является определение систематической принадлежности и филогенетического родства простейших из почв Горного Алтая на основе анализа нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выбор участков рибосомальных генов для определения филогенетического родства выделенных штаммов амеб из почв Горного Алтая. Расчет праймеров и оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Получение фрагментов рибосомальных генов.

2. Определение нуклеотидной последовательности полученных фрагментов рибосомальных генов почвенных амеб. Анализ данных фрагментарного секвенирования.

3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов. Определение систематической принадлежности амеб из почв Горного Алтая.

Работа проводилась с аксеническими культурами почвенных амеб и их ДНК. В ходе исследования были использованы методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, электрофорез нуклеиновых кислот) и методы биоинформатики, такие как расчет праймеров (программы Primer3Plus, Ugene 1.28.1, Vector NTI), анализ данных фрагментарного секвенирования (программа NCBI BLAST) филогенетический анализ (программа Mega 7.0, алгоритм Maximum Likelihood).

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования и результаты исследования), заключение и список использованных источников.

Основное содержание работы. Для выделения доминирующих видов амеб был проведен анализ образцов почв, взятых из эпизоотичных участков Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Пробы были собраны в 2016 г. в восьми точках с номерами 4, 5, 8, 9, 10, 13, 18, 20, расположенных в разных участках очага и на разной глубине (от 10 до 120 см). Отобранные колонии амеб размножали на газоне штамма *Escherichia coli* OP50.

По морфологическим признакам была определена принадлежность выделенных штаммов к родам *Acanthamoeba* и *Dictyostelium*. При этом в точках 4, 5, 10 присутствовали амебы обоих родов, в точках 18 и 20 преимущественно простейшие рода *Acanthamoeba*, в точках 8, 9, 13 – представители рода *Dictyostelium*. Название штамма складывалось из номера точки, из которой он был выделен, и первой буквы названия рода, к которому принадлежит анализируемый изолят.

Для подтверждения принадлежности выделенных амёб к роду *Acanthamoeba* были использованы праймеры JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК. По результатам анализа полученных нуклеотидных последовательностей размером от 431 до 443 п.н. штаммы 4А, 10А, 18А и 20А показали 100% гомологию с последовательностью *A. castellanii* (ID: GU001160.1), депонированной в базе данных GenBank, при покрытии генома 99%. Также высокий процент гомологии обнаружен с другими представителями данного рода, что объясняется консервативностью этого участка генома.

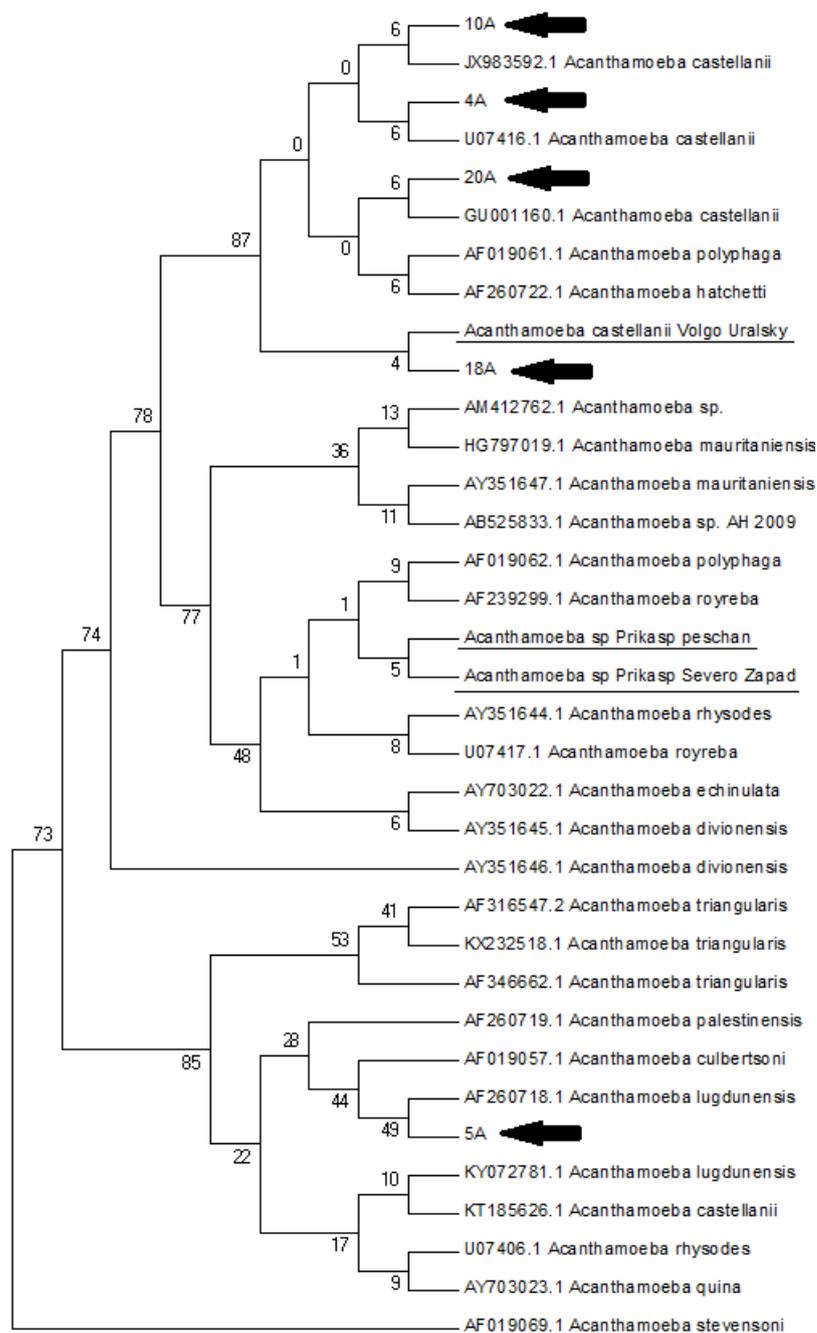
Исключение составляет изолят 5А, отличающийся от остальных последовательностей на 3%. Более высокий процент гомологии данного штамма найден с последовательностью *A. castellanii* (ID: KT185626.1), составляющий 99% при 100% покрытии последовательностей, а также с последовательностью участка 18S рРНК *A. lugdunensis* (ID: AF260718.1) при значении идентичности 100% и покрытии 99%.

Результаты филогенетического анализа исследуемых штаммов акантамёб по последовательности фрагмента гена 18S рРНК представлены на рисунке 1. Для получения данных о распространении видов амёб в разных природных очагах чумы в анализ были включены последовательности ранее изученных штаммов из почв очагов Прикаспия.

В соответствии с установленным процентом гомологии исследуемые штаммы 4А, 10А, 18А, 20А кластеризуются с представителями вида *A. castellanii*. В эту же группу также входят виды *A. polyphaga* и *A. hatchetti*. Изолят из Волго-Уральского степного очага (*A. castellanii* Volgo Uralsky) также относится к данной ветви, что соотносится с результатами ранее проведенных исследований. Можно сделать вывод о широком распространении данного вида в природных очагах чумы степной зоны России.

Исследуемый штамм 5А из Горного Алтая вследствие отличий в нуклеотидных последовательностях от последовательностей остальных штаммов входит в эволюционно более ранний кластер и наиболее близок к *A. lugdunensis* (ID: AF260718.1) и *A. castellanii* (ID: KT185626.1), с которыми ранее

был обнаружен высокий процент сходства последовательности участка гена 18S рРНК при достаточном проценте покрытия.



Стрелками обозначены штаммы из Горного Алтая. Подчеркнуты штаммы из почв очагов Прикаспия. В узлах показаны значения поддержки бутстреп.

Рисунок 1 – Филогенетический анализ амёб рода *Acanthamoeba* по нуклеотидным последовательностям участка гена 18S рРНК (Программа Mega 7.0, алгоритм Maximum Likelihood).

На основании анализа гомологии и филогенетических связей исследуемых штаммов акантамеб по нуклеотидной последовательности участка гена 18S рРНК подтверждена принадлежность исследуемых штаммов к роду *Acanthamoeba*. Следует отметить, что данный участок гена рРНК является достаточно консервативным, и получаемых данных бывает недостаточно для установления видовой принадлежности.

Для получения более точных данных о систематической принадлежности штаммов акантамеб из почв Горного Алтая были использованы последовательности рибосомальных генов, включающие в себя фрагмент генов 18S, 5.8S рРНК и расположенный между ними более вариабельный внутренний транскрибируемый спейсер 1 (ITS1). На данный участок были рассчитаны специфичные праймеры, приведенные в таблице 1. Специфичность рассчитанных праймеров была доказана в ходе проведения ПЦР.

Таблица 1 – Последовательности и характеристика праймеров (рассчитаны программами Primer3Plus, Ugene 1.28.1, Vector NTI) на участок рибосомальных генов простейших рода *Acanthamoeba*

№	Название	Участок рибосомального гена	Последовательность 5'-3'	Температура плавления T _m , °C	GC состав, %
1	ITS1_F	часть гена 18S, ITS1, часть гена 5.8S	CGTCGCTCCTACCGATTGAA	60	55
2	ITS1_R		TAAACCACGAGAGCGCAACT	60	50
3	AR_F	часть гена 17S, ITS1, 5.8S, ITS2, часть гена 26S	AGTCATCAGCTCGCGTTGAT	60	50
4	AR_R		TCCCAAACAACCCGACTCTG	60	55
5	Ac1_F	часть гена 18S, ITS1	GGCGAAGTCGATTGAACCTT	60	40
6	Ac1_R		ATTTCGCTGCGTTCTTCATC	60	45

При анализе данных фрагментарного секвенирования полученных продуктов ПЦР была выявлена вариабельность последовательности ITS1 исследуемых амёб. Полная гомология последовательностей штаммов 5А–20А и 4А–18А наблюдается на протяжении участка гена 18S рРНК, а с началом внутреннего спейсера сходство составляет около 53%.

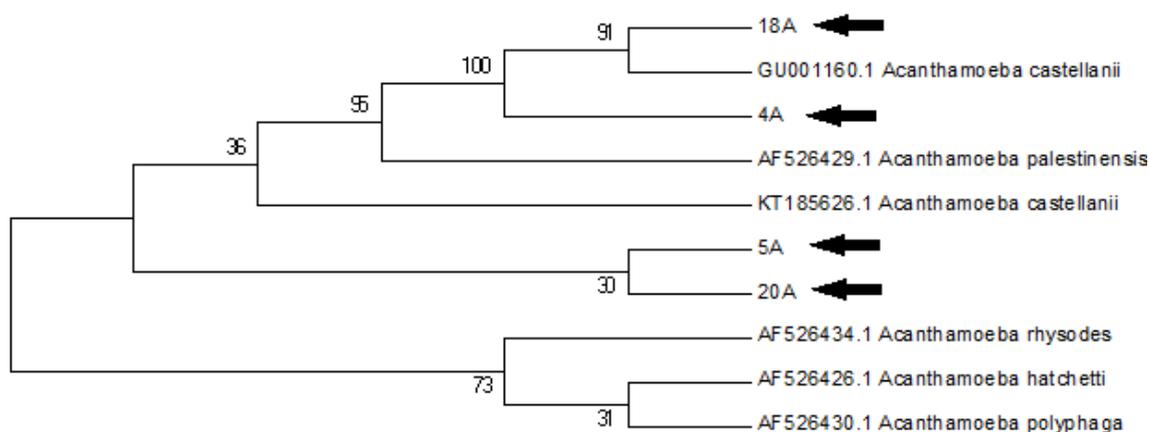
Штаммы 4А и 18А имеют сходство между своими последовательностями (98%) и с референсной последовательностью *A. castellanii* (ID: GU001160.1) 4А - 94% и 18А - 98%. Штаммы 5А и 20А, между которыми наблюдается сходство анализируемых последовательностей (85% идентичности) более близки к последовательности *A. castellanii* (ID: KT185626.1) при процентах сходства для 5А – 84%, для 20А – около 82%.

Изолят 10А отличается от других исследуемых штаммов по своей нуклеотидной последовательности. Наибольшая идентичность исследуемой последовательности наблюдается с последовательностью некультивируемого представителя Amoebozoa (ID: HE605245.1). Также в консервативном участке 5.8S (около 150 п.н.) и в начальном участке внутреннего спейсера (около 150 п.н.) обнаружено сходство в 86-89% с последовательностями представителей родов *Naegleria* (ID: KF442972.1), *Vannella* (ID: AY929930.1), но низкого процента покрытия (от 33% и ниже) недостаточно для отнесения данного штамма к указанным родам.

Таким образом, в совокупности с данными анализа последовательности гена 18S рРНК изолят 10А относится к роду *Acanthamoeba*, однако для установления видовой принадлежности необходимо изучение более протяженных участков нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов. В связи с тем, что в международной базе данных NCBI GenBank не было обнаружено последовательностей с определенным таксономическим положением, можно предположить, что данный штамм относится к новому, еще не описанному ранее виду акантамеб.

Результаты филогенетического анализа по полученным последовательностям участка 18S и ITS1 рРНК представлены на рисунке 2. Исследуемые штаммы кластеризуются с представителями вида *A. castellanii*. Виды *A. polyphaga* и *A. hatchetti*, по результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей участка гена 18S рРНК входившие с ними в единый кластер, теперь образуют отдельную ветвь рода *Acanthamoeba*.

Таким образом, анализ филогенетических связей по более вариабельным участкам рибосомальных генов акантамеб предоставляет более детальную информацию об отношениях между исследуемыми штаммами, выделенными из почв Горного Алтая. В совокупности с данными филогенетического анализа по последовательностям участка гена 18S рРНК исследуемые штаммы относятся к виду *A. castellanii*. Для получения более точных данных необходимо изучение более протяженного участка рибосомальных генов.



Стрелками обозначены штаммы из Горного Алтая. В узлах показаны значения поддержки бутстреп.

Рисунок 2 – Филогенетический анализ амёб рода *Acanthamoeba* по нуклеотидным последовательностям участка рибосомальных генов, включающего фрагмент 18S – ITS1 рРНК (Программа Mega 7.0, алгоритм Maximum Likelihood).

Для определения систематической принадлежности и изучения филогенетических связей простейших рода *Dictyostelium* были рассчитаны праймеры на протяженную последовательность, включающую в себя консервативные участки генов 17S, 5.8S, 26S и разделяющие их последовательности внутренних спейсеров (ITS1 и ITS2). Рассчитанные праймеры представлены в таблице 2. Специфичность рассчитанных праймеров была доказана в ходе проведения ПЦР.

При анализе данных фрагментарного секвенирования полученных ПЦР фрагментов участков генов амёб рода *Dictyostelium* размером от 957 до 1200

п.н. был выявлен высокий процент гомологии (98-99%) исследуемых штаммов с последовательностью *D. mucoroides* (ID: AF351197.1). Также высокая гомология была установлена со штаммами *D. sphaerocephalum*, но с меньшим процентом покрытия.

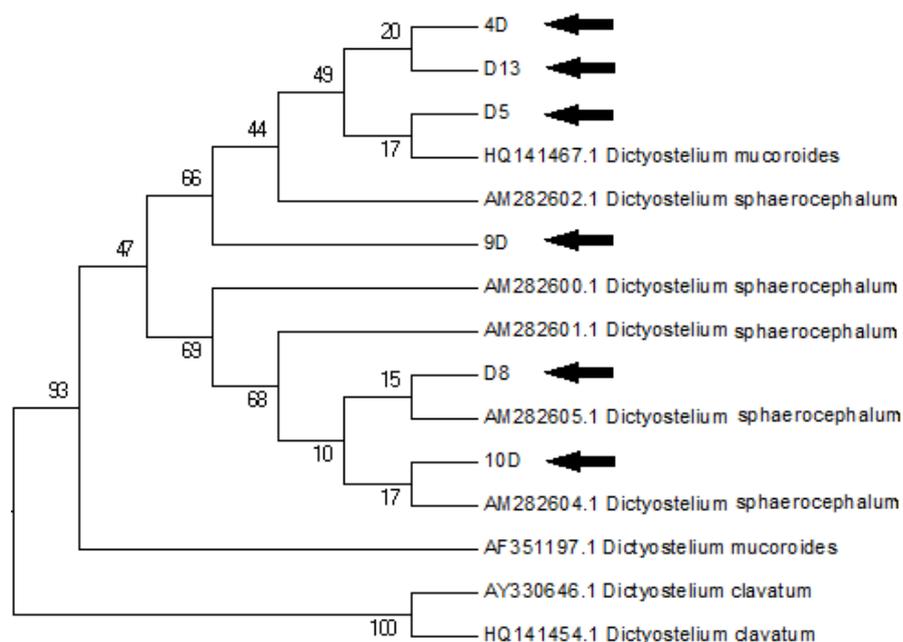
Таблица 2 - Последовательности и характеристика праймеров (рассчитаны программами Primer3Plus, Ugene 1.28.1, Vector NTI) на участок рибосомальных генов простейших рода *Dictyostelium*

№	Название	Участок рибосомального гена	Последовательность 5'-3'	Температура плавления T _m , °C	GC состав, %
1	ITS1_D_F	часть гена 17S, ITS1, часть гена 5.8S	CGCTCCTACCGATCGAATGA	59	55
3	ITS1_D_R		ATCAGGACCACTCTCACCCA	60	55
4	ITS2_D_F	часть гена 5.8S, ITS2, часть гена 26S	ACTTGGGTGAGAGTGGTCCT	60	55
5	ITS2_D_R		CGTCTTCACTCGCCGTTACT	60	55
8	AR_D_F	часть гена 17S, ITS1, 5.8S, ITS2, часть гена 26S	TCCCTGCCCTTTGTACACAC	60	55
9	AR_D_R		TATTCGGTCTTCACTCGCCG	60	55
10	AR_S		GCCACCATTTTGCACCTTTGAT	60	46
11	AR_As		CGTCTTCACTCGCCGTTACT	60	55

Полученные нуклеотидные последовательности использовались для филогенетического анализа исследуемых штаммов клеточных слизевиков. Результаты филогенетического анализа штаммов, выделенных из почв Горного Алтая, представлены на рисунке 3.

Штаммы амёб, выделенные из почв Горного Алтая, входят в смешанный кластер, образованный представителями *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. Несмотря на показатели высокой гомологии изучаемых штаммов с *D. mucoroides*, по результатам филогенетического анализа наблюдается разделение анализируемых штаммов на две группы. Штаммы D8 и 10D более близки к представителям *D. sphaerocephalum*. Штаммы 4D, D5 и 13D кластеризуются с представителем *D. mucoroides*. Изолят 9D занимает промежуточное положение между данными подкластерами, но более близок к

D. sphaerocephalum. Учитывая то, что использованный при построении дерева алгоритм Maximum Likelihood анализирует единичные нуклеотидные замены в конкретных позициях, в то время как данные о проценте гомологии указывают лишь на общее сходство последовательностей, для установления родства организмов предпочтительней опираться на данные о филогенетических отношениях исследуемых объектов.



Стрелками обозначены штаммы из Горного Алтая. В узлах показаны значения поддержки бутстреп.

Рисунок 3 – Филогенетический анализ амёб рода *Dictyostelium* по нуклеотидным последовательностям участка рибосомальных генов: фрагмент 17S – ITS1– 5.8S – ITS2– фрагмент 26S рРНК с включением представителей родов *Polysphondylium* и *Acytostelium* (Программа Mega 7.0, алгоритм Maximum Likelihood).

Таким образом, на основании определения высокого процента гомологии участков рибосомальных генов и выявления филогенетических связей установлено, что анализируемые штаммы *Dictyostelium* относятся к видам *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides* данного рода.

Заключение. Определение систематической принадлежности выделенных штаммов простейших пополняет знания о доминантных членах

почвенного биоценоза нор грызунов природных очагов чумы. Полученные данные, в совокупности с публикациями отечественных и зарубежных исследователей, подтверждают, что простейшие родов *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* широко представлены в природных очагах чумы. Они являются перспективной моделью для изучения механизмов сохранения и передачи возбудителя чумы. Выявление природных резервуаров возбудителя чумы в почвенных биоценозах в дальнейшем позволит оптимизировать комплекс профилактических мер, проводимых в природных очагах чумы.

На основании проведенной работы сделаны следующие выводы:

1. Выбранные последовательности участков рибосомальных генов 18S и ITS региона (ITS1, 5.8S, ITS2) и рассчитанные на них праймеры обеспечивают определение систематической принадлежности амёб родов *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* из почв очага чумы Горного Алтая.
2. В результате секвенирования полученных методом ПЦР фрагментов рибосомальных генов определена высокая гомология участка 18S рРНК исследованных штаммов акантамеб с *A. castellanii* (штаммы 4А, 10А, 18А, 20А - 100%, 5А - 97%), а также участка генов, включающего фрагмент 17S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - фрагмент 26S рРНК клеточных слизевиков, с *D. sphaerocephalum* (штаммы 9D - 98%, D8, 10D - 99%) и с *D. mucoroides* (штаммы 4D, D5, D13 - 99%). Выявлена значительная вариабельность участка ITS1 штаммов акантамеб, которая составляет от 82 до 94%.
3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участков рибосомальных генов позволил установить систематическую принадлежность почвенных амёб из Горного Алтая к *A. castellanii* (штаммы 4А, 5А, 18А, 20А), а также к *D. sphaerocephalum* (штаммы D8, 9D, 10D) и *D. mucoroides* (штаммы 4D, D5, D13).

По результатам исследований опубликованы работы:

1. Видовая принадлежность, численность и динамика взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммами *Yersinia pestis* / Е. Г. Оглодин, О. А. Морозов, К. А. Никифоров, Л. М. Куклева, Н. А. Шарапова, Е. Н. Рождественский, Г. Х. Базарова, А. В. Денисов, П. П. Санаров, Е. Г. Токмакова, **М. А. Макашова**, В. Г. Германчук, Г. А. Ерошенко, В. В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. Вып. 4. С. 56-61.
2. Анализ систематической принадлежности простейших из почв горно-алтайского высокогорного очага чумы / **М.А. Макашова**, Е.Г. Оглодин, К.А. Никифоров, Н.А. Шарапова, Г.А. Ерошенко // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2018. (в печати)

Исследования по теме представлялись на конференциях:

1. Региональная научной конференция «Исследования молодых ученых в биологии и экологии».
2. Конференция «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»»

