

Отбор и идентификация бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae* с неканоническими основаниями ДНК из природных источников

¹Никулин Н.А., ²Воложанцев Н.В., ²Кисличкина А.А., ¹Шляпников М.Г., ¹Зимин А.А.

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН)
²ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии; nikitakulin@gmail.com

Введение. На данный момент известно как минимум 19 неканонических оснований, входящих в состав ДНК различных бактериофагов [1, 2, 3]. Наибольшее число обнаруженных вариантов найдено у вирусов подсемейства *Tevenvirinae*. У различных фагов этого подсемейства экспериментально подтверждено наличие следующих неканонических оснований: 5-гидроксиметилцитозина, α -гликозил-5-гидроксиметилцитозина, β -гликозил-5-гидроксиметилцитозина, гентобиозил-5-гидроксиметилцитозин, арабинозилированный гидроксиметилцитозин. Кроме того, при помощи методов биоинформатики было предсказано наличие и других модификаций оснований у этой группы вирусов. Являясь достаточно изученным подсемейством, *Tevenvirinae* могут быть использованы в качестве модельных объектов для исследования влияния неканонических оснований на эволюцию и экологию фагов. В данной работе подобран способ скрининга бактериофагов из природных источников для отбора вирусов подсемейства *Tevenvirinae*, содержащих неканонические основания в составе ДНК и проведена молекулярно-генетическая и геномная идентификация отобранных фагов.

Материалы и методы. Для исследования использовались бактериофаги, выделенные в предыдущих работах из воды с очистных сооружений города Пушкино Московской области и фекалий зубров [4]. Для скрининга было взято 50 штаммов, полученных из проб воды, инфицирующих *E.coli* В, 15 штаммов, инфицирующих *E.coli* С600 и 12, заражающих *E.coli* В из фекалий зубров. Для определения принадлежности к роду *Tevenvirinae* использовалась ПЦР с вырожденными праймерами [5]. Для определения принадлежности к виду *Escherichia virus T4* использовались специфические праймеры, отжигающиеся на консервативных последовательностях генома T4 [6]. Для определения наличия антирестрикционных механизмов у фагов использовали спот-тест для исследования ограничения роста фагов на штаммах *E.coli* с системами рестрикции-модификации (RM) II типа. При отсутствии роста на штамме с RM системой считалось, что фаг не обладает антирестрикционными механизмами. Фаги, отобранные по генетическим маркерам и наличию антирестрикционных механизмов затем исследовали методом электрофореза в 1% агарозном геле частиц. Фаги, отличающиеся по электрофоретической подвижности, использовали для секвенирования. Полногеномное секвенирование осуществлено на платформе Illumina MiSeq с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v. 3, сборка ридов осуществлялась при помощи SPAdes v. 3.11, Newbler v. 3.0 и Unicycler v. 0.4.7. Аннотирование осуществлялось при помощи RAST Annotation Server, SEED Viewer, а также сравнением последовательностей геномов из базы данных RefSeq хорошо аннотированных фагов данного подсемейства.

Результаты и обсуждение. В ходе скрининга 77 штаммов рабочей коллекции, выделенных из природных источников, было найдено 57 фагов, у которых не ограничивался рост на штаммах с системами RM II типа, все они содержали в составе своего генома последовательность, свойственную *Tevenvirinae*, 48 – консервативную последовательность вида T4. Оставшиеся 9 фагов выращивали до высокого титра (более 10^{10} БОЕ на мл), в результате 7 фагов удалось вырастить до нужного значения. Затем, после очистки изопикническим центрифугированием, определяли электрофоретическую подвижность частиц этих вирусов. Оказалось, что у изучаемых фагов имеется 2 разных подвижности, одну из которых имеют 5 фагов, другую – 2, что, вероятно, связано с

различным зарядом белка Нос. Для электрофореза фаговых частиц были успешно использованы не только очищенные фаги, но и фаголизаты. Было показано, что данный метод возможно применять для скрининга. Для секвенирования было отобрано 4 фага, три из которых имели одинаковую электрофоретическую подвижность, а один – другую. Их названия: Escherichia virus PuMWB11, PuMWB13, PuMWB30 и PuMWB40. После аннотирования геномов оказалось, что первые 3 штамма (с одинаковой электрофоретической активностью) принадлежат к подсемейству *Tevenvirinae*, роду *Mosigvirus* и к одному виду, PuWB40 – подсемейству *Tevenvirinae*, роду *Tequatrovirus*. Таким образом, метод электрофореза фаговых частиц позволил разделить изучаемые фаги с точностью до вида. При анализе геномов у PuMWB11, PuMWB13, PuMWB30 найдены гены, чьи продукты осуществляют модификацию dCMP до ^{hm}dCMP и арабинозилируют остаток ^{hm}dСТР. У PuMWB40 найдены гены, чьи продукты осуществляют модификацию dCMP до ^{hm}dCMP и производят гентобиозилирование остатка ^{hm}dСТР. Таким образом скрининг при помощи ПЦР с вырожденными и специфическими праймерами, спот-теста на ограничение роста на штаммах с системами RM II типа, электрофореза фаговых частиц позволил отобрать вирусы, которые интересны с точки зрения изучения неканонических оснований ДНК. В данном случае из 77 штаммов было отобрано по сути 2 различных бактериофага. Они принадлежали к двух разным родам подсемейства *Tevenvirinae* с различными неканоническими основаниями в составе ДНК.

Заключение. В ходе работы был подобран способ скрининга бактериофагов из природных источников на наличие среди них Т4-родственных фагов с неканоническими основаниями и установления различия между отобранными фагами на уровне вида для секвенирования и дальнейших исследований. После секвенирования, сборки и аннотации, результаты скрининга были подтверждены: 3 фага принадлежали к одному виду рода *Mosigvirus*, обладали арабинозилированным 5-гидроксиметилцитозином, 1 – принадлежал к роду *Tequatrovirus*, обладал гентобиозилированным 5-гидроксиметилцитозином. В дальнейшем планируется выделить Т4-родственные фаги с другими неканоническими основаниями в составе ДНК при помощи данного способа скрининга и изучить экологическую роль большого разнообразия неканонических оснований в составе ДНК данного подсемейства.

Литература

1. Weigle P, Raleigh EA. Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses. *Chem Rev.* 2016 Oct 26;116(20):12655-12687.
2. Thomas JA, Orwenyo J, Wang LX, Black LW. The Odd "RB" Phage-Identification of Arabinosylation as a New Epigenetic Modification of DNA in T4-Like Phage RB69. *Viruses.* 2018 Jun 8;10(6). pii: E313.
3. Lee YJ, Dai N, Walsh SE, Müller S, Fraser ME, Kauffman KM, Guan C, Corrêa IR Jr, Weigle PR. Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic DNA of widespread bacterial viruses. *PNAS* 2018 Apr 3;115(14):E3116-E3125.
4. Никулин Н.А., Зимин А.А. Исследование фаговой флоры очистных сооружений города Пущино, Московской области, а также фекалий зубров и бизонов Приокско-Террасного государственного природного биосферного заповедника. Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2016, Тула: Изд-во ТулГУ, 2016. 202 с., стр. 168
5. Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch HM. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *PNAS* 2005 Aug 30;102(35):12471-6.
6. Никулин Н.А., Шляпников М.Г., Зимин А. А. Анализ колифагов зубров на наличие антирестрикторных систем. Сборник научных трудов КНЦЗВ. - Краснодар, 2019. Т. 8. - № 1. стр. 123 – 128. DOI: 10.34617/54hk-q635

