

Поиск и анализ последовательностей, кодирующих фенолоксидазы эндемичного вида байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*

Арбузова Г.*, Дроздова П., Золотовская Е., Помазкин В., Тимофеев М.

НИИ биологии, Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

* halina.arbuzova@gmail.com

Ключевые слова: озеро Байкал; амфиподы; фенолоксидаза

Мотивация и цель: Озеро Байкал – уникальный пресноводный водоем с высокой степенью эндемизма и продолжающимся процессом видообразования. Типичным эндемичным обитателем литорали озера является вид байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*, занимающий важное место в его трофической структуре. Он выступает удобным модельным объектом для изучения экологии и особенностей метаболизма байкальской фауны.

Одним из способов иммунного ответа ракообразных является синтез белков-фенолоксидаз. Данные белки отвечают за меланизацию поврежденных тканей и инкапсуляцию патогенов. Фенолоксидазы ракообразных широко исследуются, но в настоящее время в литературе нет информации о белках этого семейства у амфипод. Исследование направлено на поиск генов, кодирующих фенолоксидазы *E. verrucosus*. Изучение этих белков позволит расширить фундаментальную базу знаний о метаболизме и иммунитете байкальских амфипод. Кроме того, холодоадаптированные фенолоксидазы могут быть перспективны в фармацевтической промышленности для синтеза коммерческого меланина в качестве биологически активной добавки к пище, УФ-фильтра в косметических средствах, а также для производства биосовместимых полупроводников.

Методы и алгоритмы: Для исследования генов, кодирующих фенолоксидазы *E. verrucosus*, был проведен анализ литературных источников с целью поиска консенсусных последовательностей для нахождения сходств в транскриптом данного вида. За основу исследования были взяты известные гены, кодирующие фенолоксидазы видов *Macrobrachium nipponense* (AFA26602) и *Homarus gammarus* (CAE46724) [1]. Поиск в сборке транскриптома *E. verrucosus* осуществлен при помощи программы GenExploT [3]. Анализ последовательностей производился с использованием программы SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>). Для дальнейшего исследования и подбора праймеров выбирали области генов с открытой рамкой считывания и длиной аминокислотных последовательностей, соответствующих размерам известных фенолоксидаз. Для выбора плазмидного вектора и подходящих сайтов рестрикции с последовательностями проводили ПЦР *in silico* в программе UGENE [2]. Подбор праймеров осуществляли в программе SnapGene Viewer. ПЦР проводили при помощи коммерческих реакционных смесей 5x Screen Mix (Evrogen), 5x q-PCR Mix-HS (SYBR), 2.5x Mix («Синтол»), 2x Screen Mix Hs-Taq Color («БиоЛабМикс»).

Результаты: Для исследования были выбраны две наиболее подходящие последовательности нуклеотидов *E. verrucosus* – GJDV01086918.1 (2437 п. н.) (рис. 1) и GJDV01086920.1 (4404 п. н.) (рис. 2), именуемые далее EvePO1 и EvePO2 соответственно. В обеих последовательностях имеется открытая рамка считывания длиной 2187 п. н. (728 а. к.).

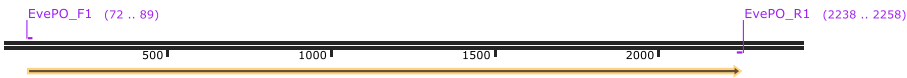


Рис. 1. Последовательность EvePO1 *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)

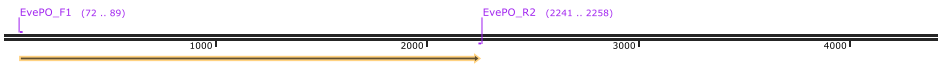


Рис. 2. Последовательность EvePO2 *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)

Для конструирования плазмидного вектора были выбраны плаزمида pPROEX и сайты рестрикции BamHI и PstI, не имеющие повторов в анализируемых последовательностях (рис. 3). Для дальнейшей работы были заказаны коммерческие праймеры, представленные ниже.

Последовательность	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
EvePO1	TCCCGGATCCATGGCGTC TACCGAGCAA	GGTCCTGCAGCTACATATCTGTG GCAGGATT
EvePO2	TCCCGGATCCATGGCGTC TACCGAGCAA	ATCCCTGCAGCTACGCATCTGTGC CTGG

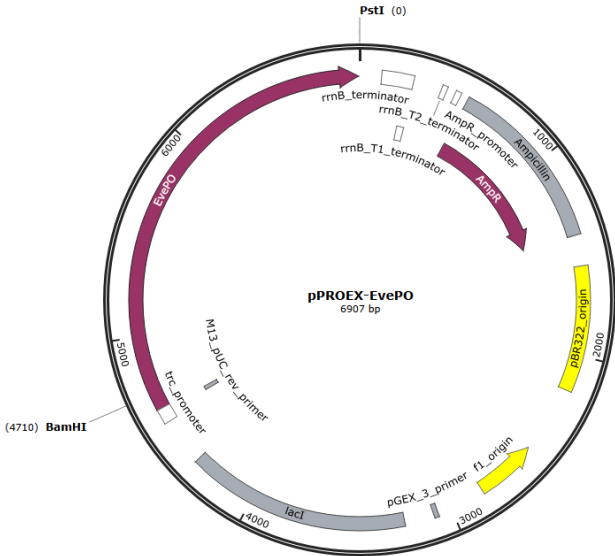


Рис. 3. Плазмидный вектор, содержащий участок гена для вставки анализируемых последовательностей, кодирующих фенолоксидазы *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)

С кДНК *E. verrucosus* проводили амплификацию последовательностей EvePO1 и EvePO2 в градиенте температур 50–60 °С, используя праймеры EvePO_F1, EvePO_R1, EvePO_R2. На данный момент ПЦР не дала результатов (рис. 4).

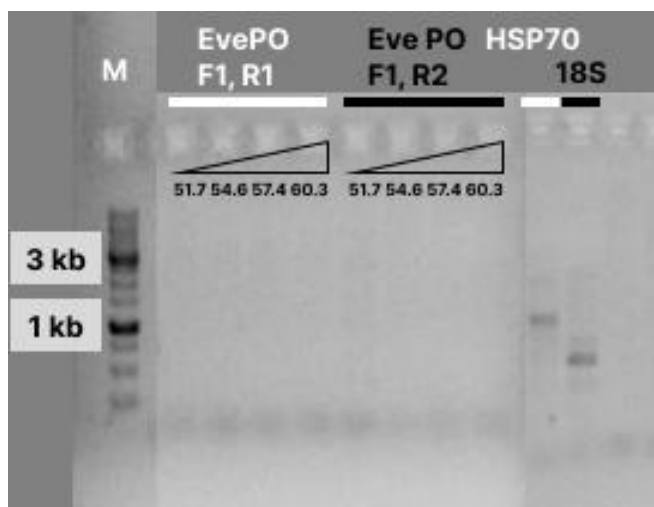


Рис. 4. Результаты ПЦР, проведенной со сконструированными праймерами к потенциальным последовательностям фенолоксидаз *E. verrucosus*. М – маркер; F1 – прямой праймер; R1, R2 – обратные праймеры

Выводы: В ходе исследования генов фенолоксидаз эндемичных байкальских амфипод *E. verrucosus* был осуществлен анализ литературных источников и поиск последовательностей, сходных с известными, кодирующими фенолоксидазы других ракообразных. Подобраны праймеры для ПЦР и сконструирован плазмидный вектор *in silico*, необходимый для дальнейшей работы. В транскриптом *E. verrucosus* найдены как минимум две последовательности, подходящие на роль генов фенолоксидаз, для которых продолжается биоинформатический и лабораторный анализ.

Финансирование: Исследование проведено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования России № FZZE-2024-0008.

Search and analysis of sequences encoding phenoloxidases of the endemic Baikal amphipod species

Eulimnogammarus verrucosus

Arbuzova G.*, Drozdova P., Zolotovskaya E., Pomazkin V., Timofeyev M.

Institute of Biology, Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

* halina.arbuzova@gmail.com

Key words: Lake Baikal; amphipoda; phenoloxidase

Motivation and Aim: Lake Baikal is a unique freshwater body with a high degree of endemism and an ongoing process of speciation. Typical endemic inhabitant of the littoral is the Baikal amphipod species *Eulimnogammarus verrucosus*, which plays an important role in the trophic structure of the lake. This species is a convenient model

object for studying the ecology and metabolic peculiarities of the Baikal fauna. One of the mechanisms of immune response in crustaceans is the synthesis of phenoloxidase proteins. These proteins are responsible for melanization of damaged tissues and encapsulation of pathogens. Crustacean phenoloxidase family proteins have been widely investigated, but currently there is no information on amphipod phenoloxidases in the literature. This study aims to find genes encoding phenoloxidases in the endemic Baikal amphipod species *E. verrucosus*. The study of these proteins will expand the fundamental knowledge on metabolism and immunity of Baikal amphipods. In addition, cold-adapted phenoloxidases may be used in the pharmaceutical industry for the synthesis of commercial melanin as a biologically active food additive, UV filter in cosmetics, as well as for the production of biocompatible semiconductors.

Methods and Algorithms: To investigate the genes encoding phenoloxidases of *E. verrucosus*, the available literature was analyzed to search for consensus sequences to find similarities in the transcriptome assembly of this species. The known sequences encoding phenoloxidases of *Macrobrachium nipponense* (AFA26602) and *Homarus gammarus* (CAE46724) species were taken as the query [1]. The search in the *E. verrucosus* transcriptome was carried out using the GenExploT program [3]. Sequence analysis was performed using the SnapGene Viewer program (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>). Sequences with an open reading frame and a suitable length of the encoded amino acid sequence were selected for further study and primer selection. The selected sequences were further subjected to *in silico* PCR procedure in UGENE [2] program for selection of plasmid vector and suitable restriction sites. The selection of primers was performed in the SnapGene Viewer program. PCR of the desired sequences was performed using commercial PCR mixes 5x Screen Mix (Evrogen), 5x q-PCR Mix-HS (SYBR), 2.5x Mix (“Syntol”), 2x Screen Mix Hs-Taq Color (“BioLabMix”).

Results: The two best-fitting nucleotide sequences of *E. verrucosus*, GJDV01086918.1 (2437 bp) (Fig. 1) and GJDV01086920.1 (4404 bp) (Fig. 2), hereafter referred to as EvePO1 and EvePO2 respectively, were selected for further analysis. Both sequences contain a 2187 bp (728 aa) long open reading frame.



Fig. 1. EvePO1 sequence of *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)



Fig. 2. EvePO2 sequence of *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)

For plasmid construction we chose the plasmid pPROEX and the restriction sites BamHI and PstI, which are absent from the analyzed sequences (Fig. 3). Commercial primers were ordered for further work with the sequences:

Sequence	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
EvePO1	TCCCGGATCCATGGCGTCTACC GAGCAA	GGTCCTGCAGCTACATATCTGTGGCA GGATT
EvePO2	TCCCGGATCCATGGCGTCTACC GAGCAA	ATCCCTGCAGCTACGCATCTGTGCCT GG

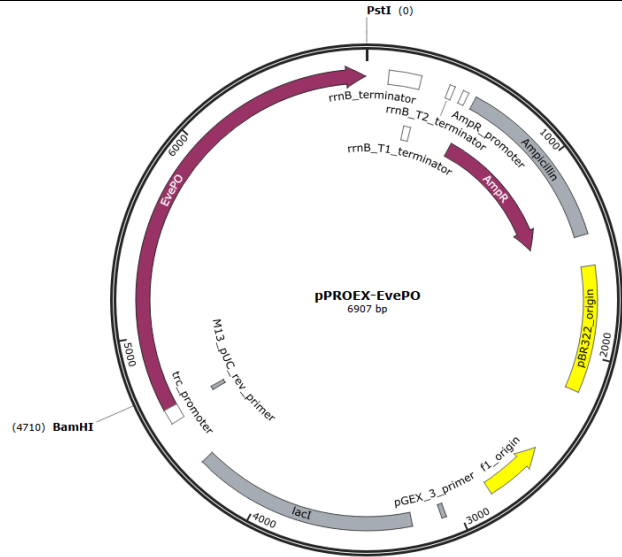


Fig. 3. Plasmid vector designed for insertion of analyzed sequences encoding phenoloxidases of *E. verrucosus* (SnapGene Viewer)

Amplification in a temperature gradient of 50-60°C was performed with the investigated sequences using cDNA of *E. verrucosus*. At this point, PCR was inconclusive (Fig. 4).

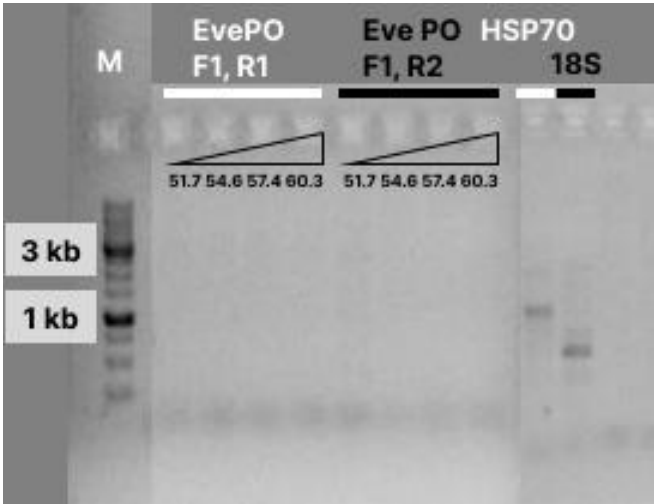


Fig. 4. PCR results of candidate sequences encoding phenoloxidases of *E. verrucosus*. Denotes: M – marker; F1 – forward primer; R1, R2 – reverse primers

Conclusion: During the study of sequences encoding phenoloxidasases of the endemic Baikal amphipod *E. verrucosus*, we analyzed literature sources and searched for sequences similar to those known to encode phenoloxidasases of other crustaceans. PCR primers were selected and an *in silico* plasmid vector was constructed for further work with the sequences. At least two sequences were found in the transcriptome of *E. verrucosus* that are suitable for the role of phenoloxidasase encoding sequences and further bioinformatic and laboratory analysis is in progress.

Funding: This study was supported by grant No. FZZE-2024-0008 from the Russian Ministry of Science and Higher Education.

Список литературы/References

1. Arockiaraj J. et al. A novel prophenoloxidasase, hemocyanin encoded copper containing active enzyme from prawn: Gene characterization. *Gene*. 2013;524(2):139-151. doi 10.1016/j.gene.2013.04.044
2. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. doi 10.1093/bioinformatics/bts091
3. Мутин А.Д. Веб-приложение для количественного анализа экспрессии и поиска гомологов транскриптов и белков у байкальских эндемичных амфипод. В: Эколого-биологические и географические исследования в решении региональных проблем. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского университета, 2022;103-107. doi 10.18101/978-5-9793-1803-5-2022-1-186